الأجناس لنقل صفات هامة من الأنواع البرية إلى الأنواع المزروعة ؛ ففى الجنس *Cucumis* تتوفر المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور فى عدة أنواع مثل: *C. metuliferus* ، و *C . anguria* ، ولكنها لا توجد فى أى من القاوون *C . melo* أو الخيار *C . sativus* . وأمكن الحصول على أجنة من التهجين *C . metuliferus* x *C . melo* إلا أنه لم يمكن زراعتها لإنتاج نباتات تصلح للشتل ، وأعطت التهجينات *C . anguria* x *C . melo* و *C.metuliferus* x *C . anguria* ثماراً كانت خالية من البذور الحية ، إلاّ أنه أمكن عزل أجنة حية من هذه الثمار قبل اكتمال تكوينها ، وتمكن Fassuliotis & Nelson (١٩٨٨) من الحصول على النباتات الهجين من هذه الأجنة ، بزراعتها بعد ٣٤ – ٩٩ يوماً من التلقيح . وفى الجنس *Brassica* .. أمكن إجراء التهجين النوعى : *B . napus* x *B. juncea* ، باستخدام مزارع الأجنة (Bajaj ١٩٨٦) . أما الهجين النوعى *B . napus* X *B . oleracea* ، والذى تنتج بذوره بنسبة نجاح تتراوح من ٥٠٪ – ٣٪ من التلقيحات .. فقد أمكن إنتاجه ، بمعدلات وصلت إلى ٢٫٦٤٪ باستخدام مزارع الأجنة (Ayotte وآخرون ١٩٨٧) . ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأجنة فى تربية النبات .. يراجع Raghavan (١٩٨٠) .

أهمية مزارع البروتوبلازم

يستفاد من مزارع البروتوبلازم فى النواحى التالية :

١– تعد مزارع البروتوبلازم أفضل من مزارع الخلايا الكاملة ، ويجب استعمالها كبداية فى عمليات الإكثار وعزل السلالات الطفرية .

٢– دمج بروتوبلازم الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها معاً ، وهو ما يعد وسيلة فعّالة لإجراء التهجينات البعيدة .

٣– إدخال تراكيب مجهرية حية أو غير حية فى الخلايا النباتية ، ويستفاد من ذلك فى دراسات الهندسة الوراثية وتجرى محاولات فى هذا الخصوص ؛ لنقل الجزء الكروموسومى الخاص بالقدرة على المعيشة التعاونية مع بكتيريا العقد الجذرية من الجنس *Rhizobium* إلى نباتات غير بقولية ، علماً بأن هذه الظاهرة لاتوجد إلا فى البقوليات ، ونبات *Trema canabino* .

٤– إجراء الدراسات الفسيولوجية الخاصة بتمثيل الجدار الخلوى

وخصائص الغشاء البلازمى .

٥- إحداث الإصابة بالفيروسات بإدخالها فى البروتوبلازم مباشرة .

٦- زراعة كلوروبلاستيدات نباتات عالية الكفاءة فى عملية البناء الضوئى فى بروتوبلازم نباتات منخفضة الكفاءة ، ونقل الصفات المرتبطة بالكلوروبلاستيدات (مثل المقاومة لمبيد الحشائش اترازين atrazine فى اللفت) من نوع إلى آخر .

٧- إدخال صفة العقم الذكرى الستوبلازمى فى النباتات (Bajaj ١٩٧٤ ، و Vasil ١٩٧٦) ، وقد أمكن - على سبيل المثال - إدخال صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى بواسطة مزارع البروتوبلازم من النوع *Nicotiana tabacum* إلى *N . sylvestris* ، ومن *Petunia hybrida* إلى *P . axillaris* (عن Sink ١٩٨٤) .

٨- الحصول على تباينات وراثية يمكن الاستفادة منها فى تحسين النباتات ، خاصة الأنواع العقيمة منها التى لاتنتج بذوراً .

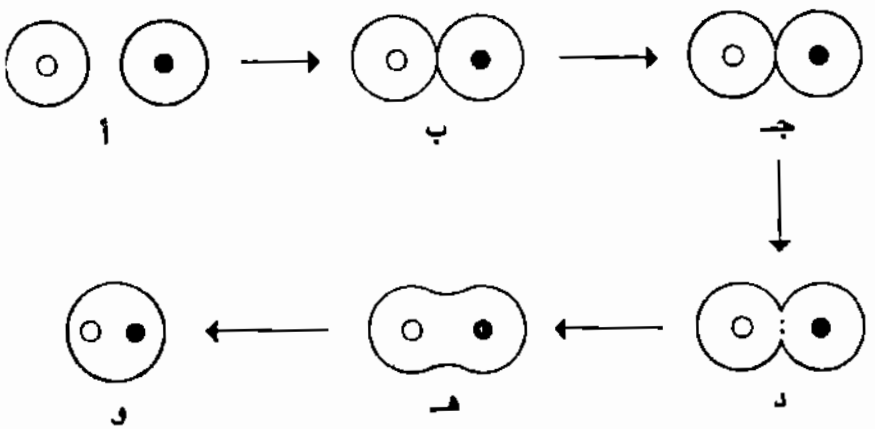
اندماج البروتوبلازم وإنتاج الهجن

يحدث اندماج البروتوبلازم Protoplasm Fusion بصورة تلقائية وطبيعية فى مزارع البروتوبلازم المجهزة من خلايا نشطة فى الانقسام . ويحدث الاندماج باتساع الأغشية البروتوبلازمية المتجاورة والتحام الروابط البلازمية بينها ؛ لتتكون بذلك وحدات بروتوبلادمية جديدة بكل منها من ٢ - ٤٠ نواة . ويمكن تقليل حالات اندماج البروتوبلازم بوضع الخلايا المستخدمة فى إعداد مزارع البروتوبلازم فى سائل ذى ضغط أسموزى مرتفع ، لبلزمتها بغرض قطع الروابط البروتوبلازمية .

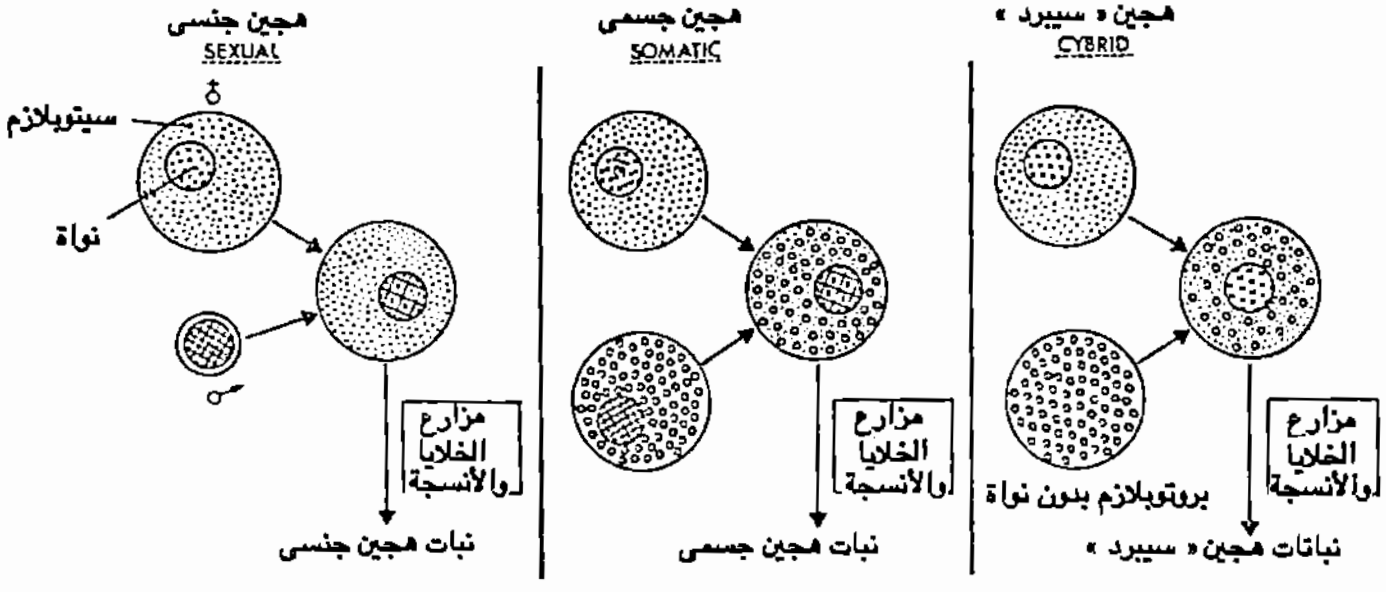
أما إنتاج الهجن .. فيتطلب اندماج بروتوبلازم الأنواع التى يراد تهجينها ، ويستلزم ذلك توفر عامل ، أو وسيلة مناسبة لتحقيق الاندماج (fusogen) . وقد جربت لذلك معاملات كثيرة أثبت بعضها نجاحاً كبيراً فى تحفيز اندماج بروتوبلازم الأنواع البعيدة ، مثل معاملات نترات الصوديوم ، والـ pH المرتفع ، والتركيز المرتفع لأيون الكالسيوم ، والبولثيلين جليكول ، والمعاملة بتيار كهربائى ذى فولت مرتفع لفترة قصيرة .

ويحدث اندماج البروتوبلازم بالطريقة المبينة فى شكل (١٨-١) ، وينتج عنه إنتاج بروتوبلازم ذى نواتين مختلفتين Binucleate Heterokaryon . يعقب الاندماج اختلاط بروتوبلام الأنواع المندمجة خلال ساعات قليلة ، وتكون جداراً خلوياً حول البروتوبلازم

المندمج ، ثم تدخل الخلية الهجين فى انقسامات ينشأ عنها تكون هجين جسمى Somatic Hybrid ، وقد تنقسم كل نواة فى البروتوبلازم ذى النواتين منفصلة عن الأخرى ، دون أن تشترك كروموسوماتهما معا فى خيوط مغزل واحدة ، وتنشأ عن ذلك حالات من الكيميرا . وقد تستمر الخلايا ذات النواتين المختلفتين فى إنتاج خلايا مماثلة لعدة أجيال ، دون أن تندمج النواتان معاً . وقد يحدث اندماج للنواتين فى الطور البينى Interphase بين الانقسامات ، ولكن هذا الاندماج لايترتب عليه إنتاج خلية هجين قادرة على الاستمرار فى الانقسام . ولايكون اندماج النواتين مفيداً فى إنتاج خلايا هجين hybrids إلا إذا حدث أثناء الانقسام الميتوزى . وحتى إذا تكونت الخلايا الهجين فى أثناء الانقسام الميتوزى .. فإن اندماج النواتين لايكون تاماً فى أغلب الحالات ، وكثيراً ما تستبعد الكروموسومات الخاصة بأحد النوعين المندمجين من الخلايا الهجين بعد عدة أشهر من الانقسام . كما يحدث الشئ نفسه – غالباً – بالنسبة لعضيّات الخلية ، مثل البلاستيدات الخضراء . وقد تستبعد كروموسومات أحد النوعين ، بينما تستبعد بلاستيدات النوع الآخر ، ويعطى ذلك الفرصة لإنتاج خلايا لأحد النوعين المهجنين ، وهى تحتوى على بلاستيدات النوع الآخر ، ولنقل عوامل سيتوبلازمية (مثل العقم الذكرى) من نوع أو جنس إلى آخر . وتعرف الهجن التى تحتوى على نواة من أحد الأنواع وسيتوبلازم من النوع الآخر ، أو منهما معًا باسم سيبرد Cybrds (شكل ١٨ – ٢) .



شكل (١٨ – ١) : خطوات عملية اندماج البروتوبلازم لنوعين مختلفين . يبدأ الاندماج بتقارب البروتوبلازم كما فى الشكل (ب) ، ثم اندماج الأغشية البروتوبلازمية فى مناطق محددة (كما فى الشكل جـ) ، وينتهى بتكوين الخلية ذات النواتين المختلفتين binucleate heterokaryon .



شكل (١٨ – ٢) : مقارنة بين الهجين الجنسى ، والهجين الجسمى والسيبرد cybrid .

وقد استخدمت تقنية اندماج البروتوبلازم فى إنتاج هجن كثيرة ، نذكر منها – على سبيل المثال – مايلى :

1 - *Daucus carota* (2n = 18) + *D . capillifolius* (2n = 18) .

2 - *Nicotiana tabacum* (2n = 48) + *N . glauca* (2n = 24) .

3 - *Petunia parodii* (2n = 14) + *P . hybrida* (2n = 14) .

4 - *Solanum tuberosum* (2n = 24) + *S . chacoense* (2n = 24) .

5 - *Datura innoxia* (2n = 24) + *D . discolor* (2n = 24) .

6 - *Nicotiana tabacum* (2n = 24) + *Lycopersicon sp* . (2n = 24) .

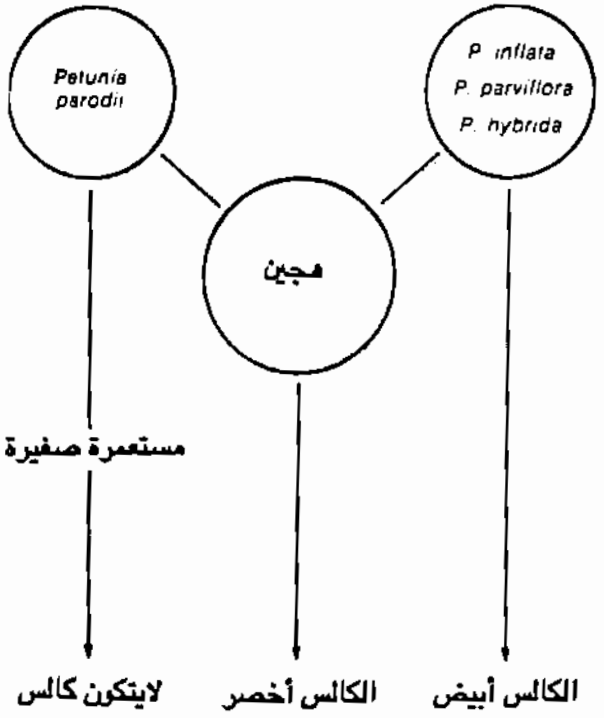
7 - *Solanum tuberosum* (2n= 24)+*Lycopersicon esculentum* (2n = 24)

8 - *Daucus carota* (2n = 18) + *Petroselinum hortense* (2n = 22) .

9 - *Lycopersicon esculentum* + *Solanum nigrum* .

وقد اختلف عدد كروموسومات الهجن الناتجة عن إجمالى عدد كروموسومات الأبوين المهجنين فى معظم الحالات ؛ فعلى سبيل المثال .. كان عدد كروموسومات نباتات الهجين الثانى – أعلاه – من ٥٠ – ٨٠ كروموسوماً ، والهجين الثالث من ٢٤ – ٢٨ كروموسوماً ، والهجين السابع من ٥٠ – ٧٠ كروموسوماً ، والهجين الثامن ١٩ كروموسوماً . تعقب المعاملة بالعامل المحفز للاندماج fusogen تواجد خليط من الطرز الأبوية ، والخلايا المتعددة الأنوية المتماثلة homokaryons ، والخلايا المتعددة الأنوية الهجين heterokaryons ، مع طرز متعددة تحتوى على توافيق مختلفة من المحتويات النووية والستوبلازمية للنوعين المندمجين . ولاتشكل الخلايا المتعددة الأنوية الهجين سوى نحو ٠,٥٪ – ١٠,٠ ٪ من هذا الخليط ؛ لذا .. فإنه من الضرورى التعرف على هذه الخلايا فى مرحلة مبكرة من تكوينها وانتخابها ؛ لكى تطور إلى الهجن المرغوب فيها . وقد طورت عدة طرق لتحقيق ذلك ؛ مثل الطريقة المبينة فى شكل (١٨ – ٣) ، وطريقة الطرد المركزى مع فصل الهجن على أساس الكثافة النوعية . هذا .. وتتميز النباتات الهجين من نسيج الكالس الذى ينمو من الخلايا المتعددة الأنوية المنتخبة . ويتطلب تكوين الكالس وتميز النباتات منه توفر ظروف خاصة مختلفة فى بيئة الزراعة فى كل من الحالتين .

ويتلخص الوضع الحالى لاستخدام مزارع البروتوبلازم فى إنتاج الهجن البعيدة فى أن



شكل (١٨ – ٣) : طريقة انتخاب الخلايا الهجين بين النوع *Petunia parodii* وأى من الأنواع *P. inflata* ، أو *P. parviflora* ، أو *P . hybrida* باستعمال مزارع البروتوبلازم .

غالبية المحاولات فى هذا الاتجاه كانت على الأجناس التى يسهل الحصول فيها على نباتات من مزارع البروتوبلازم ، وهى : *Nicotiana* ، و *Petunia* ، و *Daucus* ، و *Solanum* ، و *Datura* . ويلزم تطوير تقنية إنتاج النباتات من مزارع البروتوبلازم فى أجناس أخرى مهمة لكى يمكن أن تشملها محاولات الهجن البعيدة . وقد أمكن – عن طريق دمج بروتوبلازم الأنواع البعيدة –معًا– فى مزارع البروتوبلازم – إنتاج أربعة أنواع من الهجن هى :

١– هجن تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين (أى متعددة المجموعات الكروموسومية شبيهة بالثنائية Amphidiploids مثل الهجين : *Datura innoxia + D . stramonium* ، و *D . innoxia + D . discolor* .

٢- هجن خليطة وعقيمة أنتجت بإضافة هيئات كروموسومية من أنواع برية إلى النوع المزروع ، وتكثر خضريًا كما في جنس البطاطس *Solanum* .

٣- هجن تحتوى على جزء فقط من الهيئة الكروموسومية لأنواع أخرى ، مثل غالبية الهجن التى أنتجت حتى الآن .

٤- هجن تحتوى على نواة أحد الأنواع ، وسيتوبلازم النوع الآخر ، أو كلا النوعين المهجنين سيبرد Cybrids (عن Schieder ١٩٨٢) .

وعلى صعيد تربية النباتات .. أجرى Tang & Punja (١٩٨٩) دراسات مزارع البروتوبلازم اللازمة لزراعة ، ودمج بروتوبلازم الخيار مع بروتوبلازم السلالة P. I . 292190 من النوع البرى *Cucumis metuliferus* المقاومة لكل من نيماتودا تعقد الجذور ، وفيرس تبرقش الزوكينى الأصفر ، وفيرس تبرقش البطيخ رقم (١) . كما أمكن نقل صفة المقاومة لمبيد الحشائش أترازين atrazine من محصول الـ rapeseed إلى القنبيط ؛ عن طريق دمج بروتوبلازم المحصولين معًا ، ثم تعريض البروتوبلازم المندمج للأترازين . وقد أنتجت الخلايا التى أمكنها البقاء نباتات قنبيط مقاومة للمبيد (HortScience ١٩٨٨ - المجلد ٢٣- العدد ٣) . وقد أجرى الشئ نفسه بالنسبة للطماطم ؛ حيث هجنت مع النوع *Solanum nigrum* المقاوم للأترازين ، مع التخلص من نواة النوع الأخير وسيتوبلازم الطماطم ، وأمكن بذلك إنتاج سيبرد Cybrid يحتوى على الطماطم وسيتوبلازم *S . nigrum* الذى توجد به المقاومة للأترازين (عن Fobes ١٩٨٧) .

أما هجين الطماطم مع البطاطس .. فقد ظهرت به بعض صفات الأبوين ، رغم أنه كان أقرب دائماً إلى أحدهما . ولذا .. فقد أطلق على الهجين اسم topato ، او pomato حسبما تكون صفاته ، أقرب إلى الطماطم ، أو إلى البطاطس ، على التوالى . وقد تكونت لبعض النباتات الهجين درنات صغيرة بيضاء اللون ، وأزهار ، وثمار ، صفراء اللون ، لها نكهة الطماطم ، إلاّ أن جميع الأزهار كانت عقيمة ، وكانت الثمار خالية من البذور (عن Gaynor & Kaur-Shawney ١٩٨٥) .

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع البروتوبلازم فى إنتاج الهجن البعيدة .. يراجع Cooking (١٩٧٥، ١٩٨٣) ، و Schieder & Vasil (١٩٨٠) ، و Galun

(١٩٨٢) ، و Schieder (٩٨٢) ، و Sink (١٩٨٤) ، و Gaynor & Kaur - Sawhney (١٩٨٥) ، و Power & Chapman (١٩٨٥) .

أهمية الإكثار الدقيق و مزارع القمة الميرستيمية

يتم إكثار السلالات الجديدة من المحاصيل التى لاتتكاثر جنسيًا ، إما خضريًا Vegetatively وإما لا إخصابياً Apomictically ، وتفيد كلتا الطريقتين فى إنتاج سلالات متجانسة تماماً ومشابهة للأصل الذى توصل إليه المربى ، والذى استخدم فى الإكثار . ويعطى الإكثار الخضرى سلالات خضرية Clones ، بينما يعطى الإكثار اللاإخصابى سلالات لا إخصابية Apomictic Lines . ويعاب على التكاثر الخضرى أن إنتاج أعداد كبيرة من نباتات الصنف الجديد تصلح للزراعة التجارية على نطاق واسع ، يستغرق عدة سنوات ، لايستفاد خلالها من الصنف الجديد . كما قد تصاب النباتات خلال عملية الإكثار بالفيروسات ؛ مما يترتب عليه انتشار الإصابة الفيرسية بين نباتات الصنف الجديد . أما التكاثر اللاإخصابى .. فيعيبه قلة الأنواع النباتية التى تتكون بها الأجنة اللاإخصابية ، فضلاً على صعوبة التمييز بين البادرات التى تنمو من أجنة جنسية ، وتلك التى تنمو من أجنة لاإخصائية فى حالة التكاثر اللاإخصابى الاختيارى . ومن العيوب الأخرى للتكاثر اللاإخصابى – مقارناً بالتكاثر الخضرى – طول فترة سكون البذور فى بعض الأنواع ، ووجود مرحلة حداثة Juvenile Phase طويلة فى أنواع كثيرة عند إكثارها بالبذور ؛ أما الإكثار الجنسى .. فلا يصلح لهذه الأنواع التى تكثر تجاريًا بوسائل غير جنسية لأنه يؤدى إلى إنتاج نباتات مخالفة للصنف الأصلى ، فضلاً على أن كثيراً من الأنواع النباتية لاتنتج بذوراً بالمرة ؛ مثل الموز ، والعنب البناتى ، والتين .

تتضح من المناقشة السابقة أهمية الإكثار الدقيق فى إكثار الأصناف الجديدة وإنتاج آلاف أو ملايين النباتات الصالحة للزراعة من قطعة مجهرية الحجم من النسيج النباتى فى وقت قصير للغاية . وقد بدأ استخدام هذه الطريقة مع نبات الأوركيد Orchid ثم انتشر استخدامها فى معظم النباتات الاقتصادية المهمة ، التى لاتكثر جنسياً مثل نخيل البلح (شكل ١٨–٤) والموز ونخيل الزيت وعديد من الفواكه الأخرى ، ونباتات الزينة مثل الجربيرا ؛ وبذلك .. أمكن تقليل الفترة ما بين إنتاج الأصناف الجديدة ، وانتشار زراعتها . كما أفادت هذه الطريقة فى التوسع فى زراعة الأصناف الجديدة خارج حدود