أخرى من نفس النوع لدى إخراجها من المخازن. نظرًا لعدم توفر الطور الجاميطى المؤنث لنفس السلالة حينئذٍ. كذلك فإن فقد الطور الجاميطى المؤنث يعنى فقدًا لما كان يحمله من عوامل سيتوبلازمية.

وإضافة إلى ما تقدم بيانه من وسائل لحفظ جيرمبلازم النباتات الخضرية التكاثر .. فإن حفظها على صورة مزارع أنسجة أصبح يحظى باهتمام الكثيرين من مربى النبات. والمراكز والمؤسسات المهتمة بالمحافظة على الجيرمبلازم؛ ولذا .. فإننا نتناوله بشئ من التفصيل تحت العنوان الرئيسى التالى.

تخزين مزارع الأنسجة

أصبح تخزين مزارع الأنسجة إحدى الوسائل الهامة لتخزين جيرمبلازم النباتات الخضرية التكاثر.

وتعد مزارع القمة النامية الميرستيمية أفضل مزارع الأنسجة لحفظ جيرمبلازم السلالات الخضرية. وتكون النباتات المتحصل عليها - بهذه الطريقة - صغيرة جدًا، وأوراقها دقيقة، وسيقانها رفيعة للغاية. وعلى الرغم من أن نموها يكون سريعًا فى البداية إلا أنه يصبح بطيئًا بمجرد استنفاذ العناصر المغذية فى بيئة الآجار. وتبقى النباتات حية على هذه الصورة - دون نمو يذكر - لعدة شهور. ويمكن استمرار حفظها فى أنابيب الاختبار على بيئة مغذية لمدد غير محدودة، بتجديد المزارع كل ٦ أشهر إلى ١٢ شهرًا؛ ويجرى ذلك بقطع أجزاء صغيرة من المزارع، تحتوى كل منها على عقدة من الساق. والورقة التى توجد عندها. ثم نقلها إلى مزارع جديدة.

مزايا تخزين الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة

من أهم مزايا تخزين الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة، ما يلى:

١ - إمكان تخزين مجموعات كبيرة من سلالات الجيرمبلازم فى حيز صغير، مقارنة بالزراعة الحقلية. فيمكن - على سبيل المثال - تخزين ٨٠٠ سلالة عنب؛ بواقع ٦ مكررات لكل منها فى مساحة ٢م^{٢}، مقارنة بالحاجة إلى نحو هكتار من الأرض (٢.٣٨ فدان) لزراعة نفس العدد من النباتات.

٢ – تُحفظ النباتات خالية من الآفات ومسببات الأمراض، بما فى ذلك الفيروسات.

٣ – يمكن – عند الرغبة – إنتاج أعداد كبيرة من النباتات بسرعة كبيرة.

٤ – ونظرًا لخلو مزارع الأنسجة من الأمراض والآفات فإنه يمكن نقلها بسهولة من دولة لأخرى، مع تقليل إجراءات الحجر الزراعى (Salih وآخرون ٢٠٠١).

٥ – يمكن المحافظة على النباتات فى مزارع الأنسجة بإعادة زراعتها كل ٤–٨ أسابيع بصورة منتظمة لمدد غير محددة.

عيوب تخزين الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة

يعاب على هذه الطريقة أن إنتاج مزارع الأنسجة يتطلب وقتًا طويلاً، كما أن زراعة النباتات بعد ذلك تتطلب وقتًا طويلاً أيضًا حتى تزهر وتثمر. ولا تخفى علينا الأخطار التى تواجه مجموعات الجيرمبلازم المخزنة من جراء الكوارث الطبيعية، أو الأخطاء البشرية، أو انقطاع التيار الكهربائى، أو التلوث الميكروبى والإصابة ببعض آفات المزارع، مثل العناكب mites (Brooks & Barton ١٩٨٣).

الطريقة

تتبع طريقة مزارع القمة الميرستيمية على نطاق واسع لإكثار وحفظ سلالات عديد من النباتات، ففى العنب – على سبيل المثال – تزرع القمة النامية لساق النبات فى أنابيب اختبار تتوافر بها بيئة مغذية، تحتوى على تركيز مرتفع من أيون البوتاسيوم، وتركيز منخفض (٠.١ جزءًا فى المليون) من منظم النمو إندول حامض الخليك IAA. تحفظ الأنابيب فى حرارة ٢٠°م، وتعرض لإضاءة ضعيفة (٣٠٠ lux) لمدة ١٢ ساعة يوميًا. تنمو الساق، وتتكون الجذور فى خلال ٢٠ يومًا، ويعقب ذلك نقل النباتات الصغيرة plantlets إلى بيئة تحتوى على تركيز أقل من أيون البوتاسيوم (مثل محلول نوب Knop المغذى)، وخالية من الأوكسين، حيث يصل طولها إلى نحو ١٠ سم فى حوالى ١٠ شهور، ويمكن إكثار هذه النباتات بعد ذلك بالعقل الساقية، حيث تؤخذ النباتات الصغيرة من أنبوبة الاختبار، وتقطع إلى أجزاء صغيرة يحتوى كل منها على عقدة وورقة. وتنقل هذه الأجزاء – بعد ذلك – إلى بيئة جديدة، فى حرارة ٢٠°م؛ حيث تنتج

كل منها نباتًا جديدًا فى غضون ٥٠ يومًا، ثم تنقل - بعد ذلك - إلى حرارة ٩°م، حيث يقل معدل نموها تدريجيًّا إلى أن يتوقف. وبرغم توقف نمو النباتات إلا أنها تبقى حية. ولو أخذت منها عقل بعد فترات طويلة تصل إلى ٢٩٠ يومًا، ووضعت فى بيئة جديدة فى حرارة ٢٠°م .. فإنها تبدأ فى النمو فى الحال. وهو ما يعنى إمكان حفظ النباتات بهذه الطريقة، مع إعادة زراعتها فى بيئة جديدة سنويًّا.

تتميز مزارع القمة الميرستيمية بإمكان استخدامها فى الإكثار الخضرى، وإنتاج أعداد هائلة من النباتات فى فترة قصيرة. فيمكن - فى حالة مزارع العنب - الحصول على ٥ عقل cuttings من النباتات الصغيرة شهريًّا. وهذا يعنى أنه يمكن إنتاج أكثر من ١٠ مليون نبات صغير من قمة ميرستيمية واحدة فى السنة (تسمى السلالات المنتجة بهذه الطريقة mericlones). وفضلاً على أن مزارع القمة الميرستيمية تكون خالية من الإصابات الفيروسية .. فإن بقاءها فى بيئة معقمة يحميها من التعرض للإصابة بالفيروسات والآفات الأخرى. وتعد هذه المزارع مناسبة لحفظ جيرمبلازم النباتات التى لا تتحمل بذورها التجفيف، وهى التى لا يمكن أن تخزن بذورها. كما تتوفر النباتات الصغيرة طوال العام، ويمكن نقلها من دولة إلى أخرى دون مشاكل فى الحجر الزراعى.

هذا .. ويلاحظ أن معظم النباتات الصغيرة تعطى - عند زراعة ميرستيمها القمى فى بيئات مغذية - نموات تشبه الكالوس Callus-like outgrowth، أو سيقانًا مشوهة، وصفراء، ولا يحدث التميز differentiation إلا عند توفر بعض المواد فى البيئة. وأهمها حامض الجبريلليك بتركيز ٠.١ جزءًا فى المليون وأيون البوتاسيوم بتركيز مرتفع يصل إلى ١٠ ملى مكافئ/لتر؛ مقارنة بتركيز ٠.٨ ملى مكافئ/لتر فى بيئة White، و ٢.١ ملى مكافئ/لتر فى بيئة Gautkeret، وهى بيئات تستعمل فى مزارع الأنسجة الأخرى (Morel ١٩٧٥).

وسائل الحد من معدل النمو النباتى فى مزارع الأنسجة المخزنة

إن من أهم الوسائل التى اتبعت لتقليل معدل النمو فى مزارع الأنسجة والخلايا - بهدف تقليل معدل إعادة الزراعة وتجديدها - ما يلى:

١ - استعمال البيئات غير الغنية ومثبطات النمو:

يفيد استعمال البيئات غير الغنية باحتياجات النمو (minimal media)، والتى يضاف إليها بعض مثبطات النمو مثل حامض الأبسيسك، أو خلو البيئات من السكروز .. يفيد ذلك كله فى تأخير الحاجة إلى تجديد زراعة المزارع.

٢ – تغطية البيئة وما بها من نمو بالزيوت المعدنية:

أفادت – كثيرًا – تغطية مزارع كالوس الجزر بالزيت المعدنى فى تقليل معدل نمو الكالس؛ وبذا .. أخرت الحاجة إلى تجديد المزارع.

٣ – التجفيف:

أمكن تجديد نمو الكالوس المجفف بعد سنة من التخزين، كما أمكن حفظ الأجنة الجسمية لعديد من النباتات مجففة.

٤ – الضغط المنخفض وتركيز الأكسجين المنخفض:

أمكن خفض معدل نمو مزارع الأنسجة لعديد من النباتات (مثل التبغ، والطماطم، والأقحوان) إلى الربع بتخفيض الضغط الجوى وتركيز الأكسجين (عن Bajaj ١٩٩٥).

٥ – التخزين فى الحرارة المنخفضة:

يمكن تخزين مزارع أنسجة الجيرمبلازم فى حرارة ١ إلى ٩°م (وقد يتسع المدى ليتراوح بين –٣، و ١٥°م)، وهو مدى حرارى ينخفض فيه معدل تدهور المزارع، ولكنه لا يوقف نشاطها كلية كما فى حالة التجميد على –١٩٦°م؛ ولذا .. يلزم تجديد المزارع على فترات تكون متباعدة نسبيًا. وتتبع تلك الطريقة فى حفظ مزارع عديد من النباتات وخاصة أنواع الفاكهة.

وقد يكون تخزين المزارع فى ظروف محدِّدة للنمو restrictive growth conditions تشمل – إضافة للحرارة المنخفضة – إضاءة ضعيفة، وشد أسموزى خفيف، مع إضافة بعض مثبطات النمو إلى بيئة الزراعة؛ بهدف إبطاء نمو المزارع إلى أدنى مستوى ممكن؛ فلا يحتاج الأمر إلى إعادة تجديدها إلا على فترات متباعدة.

وعلى سبيل المثال .. أمكن بهذه الطريقة تخزين مزارع الفراولة لمدة ست سنوات لم تحتج خلالها المزارع إلا لتزويدها بالماء لتعويض المفقود منها بالبخر. كذلك احتفظت

مزارع الثوم بحيويتها لمدة ١٦ شهرًا على حرارة ٤°م فى بيئة زودت بالسكروز بتركيز ١٠٠ جم/لتر (Towill ١٩٨٩).

وقد اتبعت طريقة تخزين المزارع فى الحرارة المنخفضة الأعلى من درجة التجمد (٢-٨°م) فى حفظ مزارع الأنسجة أكثر من أى من الطرق الأخرى، وفى عدد كبير من الأنواع النباتية. وتباينت مدة حفظ المزارع - قبل تجديدها - من شهور إلى سنوات. فمثلاً .. حفظت مزارع الأقحوان والبيتونيا على ٤-٥°م لمدة ٦ سنوات، مع تعريضها للضوء على فترات متباعدة، حيث أزهرت حينما نقلت إلى الأصص دون أن تلاحظ عليها أية نموات غير طبيعية.

كذلك يحتفظ معهد البطاطس الدولى بمجموعاته من سلالات البطاطس (٥٥٦٦ سلالة)، والبطاطا (٢٢٦ سلالة)، وغيرهما من المحاصيل الجذرية والدرنية الاستوائية (٢٢٦ سلالة) على صورة مزارع أنسجة (إحصائيات عام ١٩٩٥)، ويتم التخزين فى حرارة منخفضة نسبيًّا (٦°م للبطاطس، و ١٨°م للبطاطا)، وباستعمال بيئات محدِّدة للنمو، حيث لا يحتاج الأمر إلى تجديد مزارع البطاطس قبل سنتين، والبطاطا قبل سنة (Golmirzaie & Ghislain ١٩٩٥).

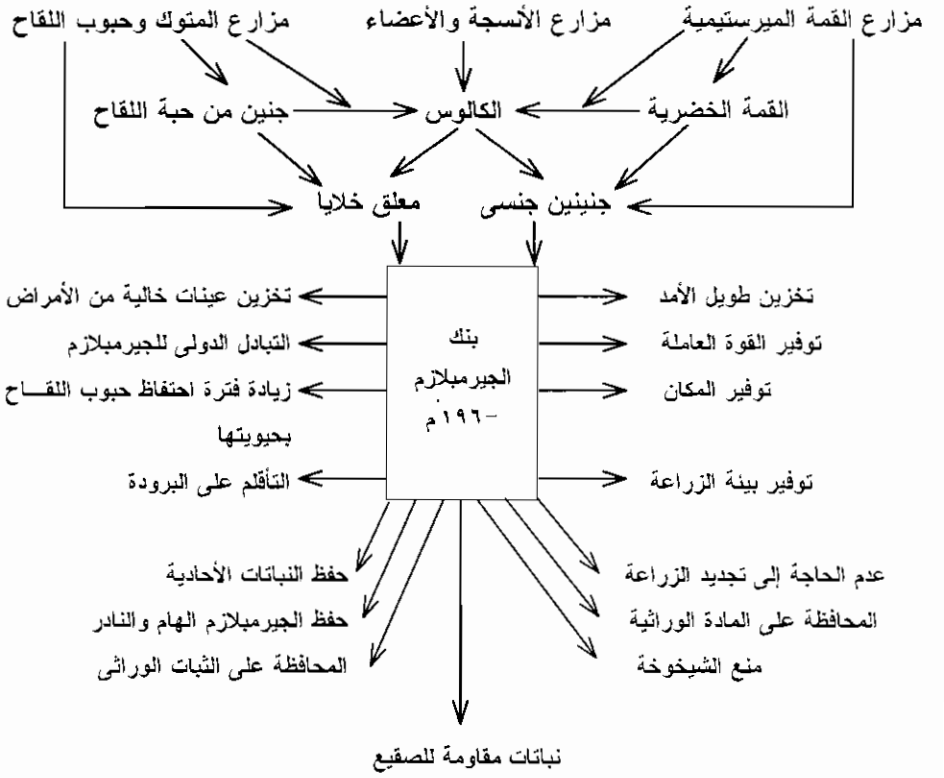
٦ - التخزين فى النيتروجين السائل:

يعد التخزين فى النيتروجين السائل على -١٩٦°م هو الطريقة الوحيدة الفعالة لتخزين مزارع الأنسجة والخلايا لأمد طويل (عن Bajaj ١٩٩٥)؛ الأمر الذى نتناوله - فيما يلى - بشئ من التفصيل.

تخزين مزارع الأنسجة فى النيتروجين السائل

نستعرض أولاً - وقبل الدخول فى تفاصيل موضوع تخزين مزارع الأنسجة فى النيتروجين السائل - تخطيطًا (شكل ١٣-١) يمثل أهمية هذا الموضوع بالنسبة لبنوك الجيرمبلازم.

تحفظ مزارع الأنسجة فى النيتروجين السائل على -١٩٦°م لمدة غير محدودة؛ ففى تلك الدرجة تبقى الخلايا فى حالة توقف تام عن النشاط. ونظريًّا .. إذا أمكن تجميد المزارع وتفكيكها دون الإضرار بها فإنها يمكن أن تحفظ فى النيتروجين السائل إلى مالا نهاية.



الحفظ بالتجميد وإنشاء بنك الجيرمبلازم

شكل (١٣-١): رسم تخطيطى يمثل تخزين مزارع الخلايا، والأنسجة، والأعضاء فى النيتروجين السائل وأهميتها بالنسبة لبنوك الجيرمبلازم (عن **Bajaj ١٩٩٥**).

ومن الطبيعى أنه يلزم توفير مصدر دائم للنيتروجين السائل (وهو يعد نسبيًا) للمحافظة على المزارع فى حرارة مأمونة.

وتعد مزارع القمة الميرستيمية، ومزارع الأجنة، والنباتات الصغيرة أفضل من مزارع الخلايا عند حفظ الجيرمبلازم بالتجميد. حيث تعد النوعيات الأولى أكثر قدرة على البقاء فى النيتروجين السائل. ولا تتعرض لعدم الثبات الوراثى مثلما تتعرض له مزارع الخلايا. كما أن الخلايا تفقد بعد فترة من التخزين خاصية الـ totipotency.

ولقد أمكن بهذه الطريقة حفظ مزارع أنسجة عديد من النباتات – جنسية وخضرية التكاثر – منها: الجزر، والفراولة، والطماطم، والبسلة، والبطاطس، والذرة، والتبغ، وغيرها.

مزايا التخزين فى النيتروجين السائل

تتلخص أهم المزايا المرتقبة لحفظ مزارع الأنسجة والخلايا – والجيرمبلازم عمومًا – فى النيتروجين السائل، فيما يلى:

١ – حفظ التباينات الوراثية الجسمية والجاميطية التى تظهر فى المزارع.

٢ – حفظ التجانس الوراثى للسلالات الخضرية من النباتات الخضرية التكاثر.

٣ – حفظ البذور التى تفقد حيويتها عند التجفيف (recalcitrant seeds) .. وذلك بتجميد الأجنة الكاملة أو أجزاء منها.

٤ – حفظ الجيرمبلازم النادر، والذى يتوقع اختفاءه.

٥ – حفظ سلالات مزارع الخلايا التى تستعمل فى إنتاج العقاقير.

٦ – حفظ مزارع القمة الميرستيمية الخالية من الفيروسات بهدف الإكثار. والتبادل الدولى الآمن للجيرمبلازم.

٧ – الوقف التام لحالة التدهور التى تحدث – عادة – بمرور الوقت فى المزارع التى لا تخزن فى النيتروجين السائل.

٨ – تخزين حبوب اللقاح؛ الأمر الذى يفيد فى:

أ – إجراء التهجينات بين النباتات التى لا تتوافق فى مواعيد إزهارها.

ب – إجراء التهجينات بين النباتات التى تنمو فى أماكن مختلفة وبعيدة عن بعضها البعض.

جـ – تقليل انتشار الأمراض بواسطة الكائنات الناقلة لحبوب اللقاح.

د – حفظ الجيرمبلازم لفترات طويلة (عن Bajaj ١٩٩٥).

خطوات عملية الحفظ فى النيتروجين السائل

تمر عملية حفظ المزارع بالتجميد فى النيتروجين السائل بالخطوات التالية:

١ – إنتاج المزارع ذاتها.
٢ – إضافة مادة واقية مناسبة من أضرار حرارة التجمد cryoprotectant.
٣ – تعريض المزارع لحرارة فائقة البرودة.
٤ – تخزين المزارع فى النيتروجين السائل.
٥ – تفكيك المزارع عند الرغبة فى استعمالها.
٦ – إزالة الـ cryoprotectant بالغسيل.
٧ – فحص حيوية المزارع.
٨ – تجديد زراعة المزارع.
٩ – إكثار نباتات من المزارع.

طرق تجميد المزارع

تتبع فى تجميد المزارع إحدى الطرق التالية:

١ – التجميد التدريجى البطئ:

يكون التجميد البطئ بخفض الحرارة بمعدل ٠.٥–٤°م كل دقيقة من الصفر حتى –١٠٠°م. الأمر الذى يتحقق باستعمال منظم حرارى للتجميد cryostat يتوفر تجاريًا. ثم تنقل المزارع إلى النيتروجين السائل. وتناسب تلك الطريقة مزارع الخلايا المعلقة. كذلك تمكن Reed & Lagerstedt (١٩٨٧) من حفظ القمم الميرستيمية لخمس سلالات من الـ *Rubus*. تنتمى لأربعة أنواع بتبريدها ببطء. بمعدل ٠.٨°م كل دقيقة إلى أن وصلت حرارتها إلى –٤٠°م، ثم بردت بسرعة – بعد ذلك – حتى –١٩٦°م فى وجود مواد حامية cryptoprotectants. وقد أمكن – بعد ذلك – تبريدها بسرعة إلى حرارة الغرفة. واستعادت القمم الميرستيمية نموها فى بيئة آجار بعد ذلك؛ إما بشكل منتظم، وإما فى صورة كالوس. وقد كانت أفضل المواد الحامية خليطًا من البلوليثليين جليكول. والجلوكوز. والـ dimethylsulfoxide.

٢ – التجميد السريع:

يجرى التبريد السريع إما بغمر المزارع فى النيتروجين السائل أو بسكبه عليها حيث يكون التبريد بمعدل يزيد عن ١٠٠٠°م فى الدقيقة. لكن يفضل تبريد المزارع أولاً إلى –١٥°م قبل بدء التبريد السريع.

٣ – التبريد التدريجى، ثم السريع:

يكون من المفضل – أحيانًا – تبريد المزارع بمعدل درجة مئوية أو خمس درجات مئوية فى الدقيقة حتى –٣٠ إلى –٥٠°م وتركها فى ذلك المدى لمدة ٣٠ دقيقة قبل غمسها فى النيتروجين السائل، والهدف من ذلك تجنب تكوين البللورات الثلجية فى الخلايا.

٤ – التجميد على خطوات:

يجرى التجميد على خطوات بخفض الحرارة إلى –٢٠°م، ثم إلى –٥٠°م، ثم إلى –٧٠°م، ثم إلى –١٠٠°م، ثم إلى –١٩٦°م، على أن تتم تلك الخطوات وفق برنامج زمنى محدد (عن Bajaj ١٩٩٥).

وعلى الرغم من أن حفظ مزارع الأنسجة – بمختلف أنواعها – فى النيتروجين السائل يجرى بتطبيق خطوات محددة واحدة بالنسبة لجميع الأنواع النباتية. إلاّ أن التفاصيل الدقيقة لكيفية إجراء تلك الخطوات تختلف من محصول لآخر. ويمكن – على سبيل المثال – الرجوع إلى تلك التفاصيل بالنسبة لأكثر من ٤٠ نوعًا من النباتات الاستوائية فى Engelmann (١٩٩١)، والبطاطس والكاسافا فى Bajaj (١٩٩٥)، والفراولة فى Reed & Hummer (١٩٩٥). كما قدم Bajaj (١٩٩١، و ١٩٩٥) قوائم طويلة بالأنواع المختلفة من مزارع الأنسجة والخلايا التى أمكن حفظها فى النيتروجين السائل فى مختلف الأنواع النباتية. كذلك يمكن الرجوع إلى Henshaw وآخرين (١٩٨٠) بخصوص تخزين مزارع أنسجة البطاطس، و Withers (١٩٨٠، و ١٩٨٥) بالنسبة لحفظ مزارع الخلايا والأنسجة فى النيتروجين السائل. و Brooks & Barton (١٩٨٣)، و Towill (١٩٨٨).

٩ - حماية الخلايا من أضرار الحرارة الشديدة الانخفاض

إن من أهم الأمور التى تجب مراعاتها عند حفظ مزارع أنسجة الجيرمبلازم فى النيتروجين السائل حماية الخلايا من الأضرار التى يمكن أن تسببها الحرارة الشديدة الانخفاض.

ومن أهم وأكثر الأضرار شيوعًا: تكوين بللورات ثلجية كبيرة داخل الخلايا (وهى

التى تؤدى إلى تمزيق عضيات الخلية والخلية ذاتها)، وزيادة تركيز العصير الخلوى إلى مستويات سامة.

ومن أهم أنواع المركبات التى تستخدم فى حماية مزارع الأنسجة والخلايا من أضرار الحرارة الشديدة الانخفاض - وهى التى تعرف باسم cryprotectants - ما يلى:

- داى مثيل سلفوكسيد dimethylsulfoxide (اختصارًا: DMSO).
- DMSO مع أى من: السكروز، أو الجلوكوز، أو الإثيلين جليكول ethylene glycol، أو البروبلين جليكول propylene glycol، أو البوليثيلين جليكول polyethylene glycol، أو البرولين proline، أو السوربيتول sorbitol.
- أى من المركبات السابقة منفردة.

تستخدم تلك الـ cryoprotectants بإذابتها فى بيئة الزراعة.

ومن أكثر المواد استعمالاً الـ DMSO. كما قد يستعمل الجليسرول glycerol إما منفردًا، وإما مع الـ DMSO. إلا أن الـ DMSO هو الأكثر كفاءة والأكثر استعمالاً. كذلك تفوق البرولين على كل من الـ DMSO والجليسرول منفردين أو مجتمعين فى مزارع معلقات الخلايا لبعض الأنواع النباتية.

يتراوح التركيز المناسب من الـ DMSO بين ٥٪، و ٨٪ فى مزارع الخلايا وحتى ٢٠٪ فى مزارع القمة الميرستيمية، بينما يبلغ التركيز المناسب للبرولين ١٠٪. وتتم إضافة تلك المركبات للمزارع على مدى ٣٠-٦٠ دقيقة فى حرارة قريبة من الصفر المئوى (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

كذلك فإن محاليل الـ cryoprotectants، ومعدلات التبريد والتدفئة التى تحفز وتحافظ على تكوين "الزجاج" (حالة الـ vertification) فى المزارع تعد مناسبة للحفظ فى النيتروجين السائل. وتجدر الإشارة إلى أن عملية تكوين هذا "الزجاج" المفيدة فى حالة الـ cryopreservation لمزارع الأنسجة تختلف تمامًا عن حالة الـ vertification. وهى النمو غير الطبيعى الذى يشاهد أحيانًا فى مزارع الأنسجة (عن Towill ١٩٨٩).

إن الكيفية التى تعمل بها الـ cryoprotectants لا تعرف على وجه التحديد. ولكن

يعتقد بأنها تلعب دورًا أسموزيًا (بإنقصاها المحتوى الرطوبى للخلايا)، كما قد تعمل على حماية الأغشية الخلوية ومواقع ارتباط الإنزيمات بالمواد التى تعمل عليها enzymatic binding sites من أضرار التجمد (Engelmann ١٩٩١).

تقنيات حفظ الجيرمبلازم الحساس لعملية التجمير

إن من أهم التقنيات التى اتبعت لأجل حفظ الجيرمبلازم فى صوره المختلفة بالتجميد، وخاصة الصور الحساسة لعملية التجميد، دون الإضرار به، ما يلى:

١ – التزجيج أو التزجج:

تتضمن عملية التزجيج أو التزجج vertification معاملة المزارع بتركيزات عالية من المواد التى تحميها من الحرارة الشديدة الانخفاض cryoprotectants، ويفيد ذلك فى الإسراع بعملية التبريد دونما حاجة إلى التبريد البطئ الموقوت باستعمال منظمات حرارية cryostats ويلغى التزجج التام أية فرصة لحدوث أضرار من تبلور الثلج بين الخلايا أو داخلها. وفى الحقيقة .. فإن التزجج هو عملية تكوين مادة صلبة غير متبلورة شبيهة بالزجاج عند نقطة التجمد لمحلول مائى. وفى الحرارة المنخفضة بما فيه الكفاية، يصبح محلول الـ cryprotective المركز عالى الكثافة إلى درجة أنه يتصلب إلى حالة مستقرة شبيهة بالزجاج. ويكون الهدف هو الحصول على تركيز عالٍ من المحلول كافٍ لمنعه من التجمد فى صورة ثلج متبلور عند تبريده، وتأكيد تحولّه إلى الصورة الزجاجية غير المتبلورة.

تغلف الأجنة:

يعرف تغليف الأجنة باسم "كبسلة" أى وضعها فى كبسولة encapsulation، أو تغطيتها بالألجينيت alginate coating. فمثلاً .. يتم فى الجزر تغليف الأجنة الجسيمة بالألجينيت، ثم تترك فى ٢،١٠٪ سكروز (الذى يقوم بالحماية من البرودة الشديدة cryoprotection)، ثم تجفف لمدة ٤ ساعات فى laminar flow، ثم تعرض للتجميد الفجائى فى النيتروجين السائل. وقد أعطت الأجنة التى عوملت بهذه الكيفية حيوية بنسبة ٩٢٪ بعد تفكيكها، حيث نمت تلك الأجنة مباشرة إلى نباتات بعد تهيئة الظروف المناسبة لنموها.

٣ – التجفيف باستعمال السيليكاجل:

أمكن تحسين قدرة الأجنة الخضرية لنخيل الزيت على تحمل التجمد كثيرًا

بتعريضها للتجفيف. وذلك بتركها لمدة ٦-١٨ ساعة فى الظلام فى هواء صندوق محكم يحتوى على ٤٠ جم من السليكاجل silica gel، وذلك قبل غمسها فى النيتروجين السائل (Bajaj ١٩٩٥).

ما يتعين مراعاته للأجل المحافظة على المزارع بحالة جيدة بعد تجميدها

لأجل المحافظة على مزارع الأنسجة بحالة جيدة بعد تجميدها، تجب مراعاة ما يلى:

١ - التخزين المتواصل فى الحرارة المنخفضة:

إن المحافظة على المزارع المجمدة فى الحرارة المناسبة أثناء التخزين لا يقل أهمية عن عملية التجميد ذاتها. ففى حرارة تزيد عن -١٣٠°م يمكن أن تتكون وتنمو البللورات الثلجية داخل الخلايا؛ مما يضعف حيويتها. ولذا .. فإن التخزين لفترات طويلة على -١٩٦°م يتطلب إجراء ذلك فى ثلاجة نيتروجين سائل. ولحفظ حوالى ٤٠٠٠ "أمبولة" سعة كل منها ٢ مل يلزم نحو ٢٠-٢٥ لترًا من النيتروجين السائل أسبوعيًا. ولا تحتاج المزارع إلى أى رعاية إضافية متى توفر لها النيتروجين السائل بانتظام.

٢ - تفكيك المزارع بحرص عند الرغبة فى استعمالها:

يجرى التفكيك السريع للمزارع المجمدة على -١٩٦°م بغمسها فى الماء على حرارة ٣٧-٤٠°م؛ مما يعطى تفككًا بمعدل ٥٠٠-٧٥٠°م فى الدقيقة. وبعد حوالى ٩٠ ثانية تنقل المزارع إلى حمام ثلجى حيث تبقى لحين إعادة زراعتها أو اختبار حيويتها. يعمل التفكيك السريع على تجنب تكوين البللورات الثلجية التى تقضى على المزارع.

٣ - غسيل المزارع قبل إعادة زراعتها:

تتم قبل إعادة الزراعة غسيل المزارع عدة مرات لأجل التخلص من الـ cryoprotectant، ولكن ذلك الإجراء قد لا يكون ضروريًا مع كل الأنواع النباتية، وقد يضر أحيانًا بالمزارع (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

العوامل المؤثرة فى تحمل المزارع لعمليتى التجميد والتفكيك

يعتمد تحمل مزارع الأنسجة والخلايا لعمليات التجميد والتفكيك على عدد من العوامل، نذكر منها ما يلى:

١ – الحالة الفسيولوجية للمزرعة التى يراد حفظها، وعمرها، وطبيعتها.

٢ – تركيز الـ cryoprotectants وطبيعتها.

٣ – طريقة التجميد.

٤ – درجة حرارة التخزين.

٥ – طريقة التفكيك.

٦ – طريقة تقدير حيوية المزرعة.

وعمومًا .. فإنه للحصول على أفضل النتائج مع مزارع الأنسجة والخلايا المجمدة .. يجب أن تؤخذ الأمور التالية فى الحسبان:

١ – تتحمل مزارع معلقات الخلايا التى تجدد على فترات محددة (وهى فى مرحلة نموها اللوغاريتمى) .. تتحمل التجمد أكثر من المزارع المسنة التى تكون فيها الخلايا كبيرة وسمكية الجدر وذات فجوات عصارية، بينما تكون خلايا المزارع النشطة رقيقة الجدر وممتلئة بالسيتوبلازم وتخلو من الفجوات العصارية، وصغيرة الحجم ومكونة لتجمعات.

٢ – يلزم لحفظ نباتات المزارع والأعضاء الكاملة والأجنة تجفيفها جزئيًا قبل تجميدها.

٣ – ضرورة الاستعانة بمزارع القمة الميرستيمية لسلالات النباتات الخضرية التكاثر، وذلك لضمان خلوها من الفيروسات.

٤ – تُظهر الأجنة الصغيرة غير المكتملة النمو سواء أكانت جنسية الأصل، أم جسمية، أم من حبوب اللقاح .. تُظهر قدرًا أكبر من القدرة على تحمل الحرارة المنخفضة عن الأجنة الأكبر سنًا والمكتملة التميز. ولذا .. فإن الأجنة الكروية globular والقلبية الشكل heart-shaped تكون أكثر قدرة على التحمل.

ويمكن الاستعانة بالمفاعلات البيولوجية bioreactors فى إنتاج أجنة جسمية من مختلف الأنواع النباتية بما فى ذلك الأنواع التى تنتج بذورًا recalcitrant. وذلك على نطاق واسع، وتجميدها لأجل حفظها واستعمالها فى التبادل الدولى للجيرمبلازم.

٥ – تتباين الأنواع، والأصناف، والسلالات الخضرية، والسلالات البذرية،

والهجن .. إلخ .. تتباين فى استجابتها لمعاملات حفظ مزارع خلاياها وأنسجتها بالتجميد.

٦ – تعد النباتات الاستوائية – بصورة عامة – أكثر حساسية لعمليات الحفظ بالتجميد عن غيرها من النباتات.

تظهر بفعل الاختلافات الموسمية تغيرات فى البروتينات الذائبة ومستوى السكريات والكحولات. وهى تغيرات تؤثر بدورها على مدى القدرة على تحمل عمليات الحفظ بالتجميد. ولذا .. فإن الـ explants المتحصل عليها فى الشتاء قد تختلف فى سلوكها عن تلك التى يُتحصل عليها صيفًا.

كذلك تختلف المادة النباتية المأخوذة من المزارع فى سلوكها – عند حفظها بالتجميد – عن تلك المأخوذة من الحقل.

٨ – قبل التجميد .. يمكن زراعة الخلايا أو الأنسجة لأيام قليلة على بيئة تحتوى على تركيز منخفض من الـ cryoprotectants (مثلاً: ٥٪ DMSO).

٩ – يجب وضع المزارع فى الثلج أثناء معاملتها بالـ cryoprotectants لتجنب حدوث أى ضرر محتمل.

١٠ – تتباين نتائج طرق التجميد المختلفة. وعلى الرغم من احتفاظ نسبة من الخلايا بحيويتها بعد تعريضها للتجميد الفجائى أو التدريجى المنظم، إلاّ أن طريقة التزجيج ثم التجميد الفجائى هى المفضلة.

١١ – تُظهر المزارع التى تخزن على –٢٠ أو –٧٠°م تدهورًا بمرور الوقت؛ ولذا .. فإن التخزين طويل الأمد يجب أن يكون فى النيتروجين السائل.

١٢ – تبين من معظم الدراسات أن التفكيك السريع على ٣٥–٤٠°م كان أفضل من الطرق الأخرى. هذا .. إلا أن طرق الصبغ وحدها قد لا تعطى معلومات دقيقة عن احتفاظ المزارع بحيويتها؛ حيث توجد دائمًا بعض الخلايا التى تموت بعد فترة قصيرة من التفكيك على الرغم من إعطاءها نتائج إيجابية باختبار الصبغة (عن Bajaj ١٩٩٥).