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 ،

عندما تتجه النباتات التى تنمو من هذه الأجنة نحو الإزهار المبكر ، ففى نبات الجنسنج ginseng ..أعطت الأجنة العرضية التى انتجت فى مزارع كالس الجذور نباتات اتجهت مباشرة نحو الإزهار ، وهو ما يعنى توفير ثلاث سنوات فى كل جيل من أجيال التربية بالنسبة لهذا النبات .

أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح

تنتج النباتات الأحادية بسهولة من مزارع المتوك وحبوب اللقاح ، وقد سبق أن بيّناً فى الفصل الرابع عشر أن من أهم فوائد النباتات الأحادية استخدامها فى إنتاج نباتات ثنائية أصيلة من المحاصيل الخلطية التلقيح فى خطوة واحدة بمضاعفتها بالكولشيسين (بدلاً من التربية الداخلية لستة أو ثمانية أجيال) . كما تفيد النباتات الأحادية فى إنتاج مختلف حالات التعدد الكروموسومى غير التامة aneuploids . وذكرنا – من قبل – أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح بالنسبة للتربية بالطفرات ؛ حيث تفيد فى التعرف على الطفرات المتنحية بسهولة . وإلى جانب ذلك .. فإن مزارع المتوك تعد وسيلة سهلة لإنتاج النباتات ذات الأصول الوراثية المتشابهة Isogenic Lines ، كما أمكن إنتاج أصناف جديدة محسنة فى وقت قياسي من كل من الدخان ، والقمح ، والأرز ، والشعير ، وغيرها من المحاصيل باستخدام مزارع المتوك . واستخدمت مزارع حبوب اللقاح فى إنتاج أصناف هجين من الهليون كانت جميع نباتاتها مذكرة فقط ؛ وذلك بإنتاج نباتات مذكرة أحادية (Y) من حبوب اللقاح ، ثم مضاعفتها بالكولشيسين لإنتاج نباتات فائقة الذكورة (YY) ، ثم تلقحيها بالإناث (XX) لإنتاج هجن ذكور خليطة (XY) .

وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية من مزارع حبوب اللقاح فى عدد كبير من الأنواع النباتية ، نذكر منها – على سبيل المثال – ما يلى (عن Chu ١٩٨٢) :

Brassica oleracea
B. chinensis
B. napus
B. campestris
C. annuum
C. frutescens

Solanum tuberosum

S. melongena

Lycopersicon esculentum

L. pimpinellofolium

Ipomea batatas

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع المتوك وحبوب اللقاح فى تربية النبات .. يراجع Sink & Padmanabhan (١٩٧٧) ، و Nitsch (١٩٧٥) و Sunderland (١٩٨٠) ، و Chu (١٩٨٢) .

أهمية مزارع الإندوسبرم

إن الهدف الرئيسى من إنتاج مزارع الإندوسبرم - بالنسبة لمربى النبات - هو الحصول على النباتات الثلاثية التى تكون لها أهمية خاصة فى عديد من المحاصيل الإقتصادية الهامة ؛ مثل التفاح ، والموز ، وبنجر السكر ، والشاى ، وأصناف البطيخ اللابذرى ، وتعد مزارع الإندوسبرم بديلاً سهلاً للطريقة الأخرى المتبعة فى إنتاج النباتات الثلاثية وهى تلقيح نباتات رباعية مع أخرى ثنائية المجموعة الكروموسومية . وتبرز أهمية مزارع الإندوسبرم فى الحالات التى لايكون فيها هذا التهجين ناجحاً دائماً كما فى الحمضيات . ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Johri وآخرون (١٩٨٠) .

أهمية مزارع المبايض والبويضات

يستفاد من مزارع المبايض والبويضات فى الجوانب التالية :

١- إنتاج النباتات الأحادية ، من خلال عملية التوالد الذاتى .

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

٣- التغلب على مشاكل العقم فى بعض الهجن النوعية البعيدة (بين أنواع من أجناس مختلفة من نفس العائلة (intergeneric crosses) ، أو من عائلات مختلفة (interfamily crosses) . وقد أمكن بالفعل إنتاج لاقحات zygotes تحتوى على هينات كروموسومية لأنواع بعيدة ، ونمت هذه اللاقحات إلى درجات مختلفة من التطور نحو تكوين الأجنة .

ومن 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 تباينا واسعًا فى الصفات (Bajaj وآخرون ١٩٨٦) .

أهمية مزارع الأجنة

يستفاد من مزارع الأجنة فى الأمور التالية :

١- إمكانية الحصول على الهجن البعيدة التى يستحيل إنتاجها بالطرق العادية . ويتحقق ذلك فى الحالات التى يبدأ فيها الجنين الهجين فى التكوين بصورة طبيعية بعد التلقيح والإخصاب ، إلا أنه يتدهور بعد فترة ، ويختفى نظراً لعدم التوافق بين الجنين النامى ، والإندوسبرم . وقد أمكن - عن طريق مزارع الأجنة - إنتاج هجن نوعية هامة فى كل من الأجناس : *Phaseolus* ، و *Brassica* ، و *Lycopersicon* ، و *Oryza* ، وغيرها ، كما أمكن - عن طريقها كذلك - الحصول على هجن جنسية مثل *Hordeum* x *Secale* ، و *Hordeum* x *Agropyron* ، و *Triticum* x *Aegilops* ، و *Triticum* x *Secale* .

٢- إنتاج النباتات الأحادية بسبب الاستبعاد الكروموسومى الذى يحدث أحياناً بعد التهجينات البعيدة كما فى الهجين *Hordeun vulgare* x *H . bulbosum* ؛ حيث تفقد كروموسمات *H . bulbosum* خلال الإنقسامات القليلة الأولى للأقحة ، وبمضاعفة النباتات التى تنمو من الأجنة الأحادية بالكولشيسين .. يتجمع لدى المربى عدد كبير من النباتات الأصيلة المختلفة عن بعضها وراثيا ، ويمكن انتخاب أفضلها ؛ لتصبح أصنافا جديدة .

٣- تقصير دورة التربية بالتخلص من حالات سكون البذور التى قد تمتد إلى عدة شهور ، وربما إلى سنتين أو ثلاث سنوات كما فى الجنس *Iris* .

٤- إكثار بعض النباتات التى لاتنبت بذورها ، برغم احتوائها على جنين جنسى ، كما فى النوع *Musa balbisiana* الذى يمكن إنتاج بادراته بسهولة بزراعة أجنة بذوره فى بيئات صناعية .

وقد أمكن الاستفادة من مزارع الأجنة فى إنتاج هجن نوعية صعبة فى عدد من

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 .

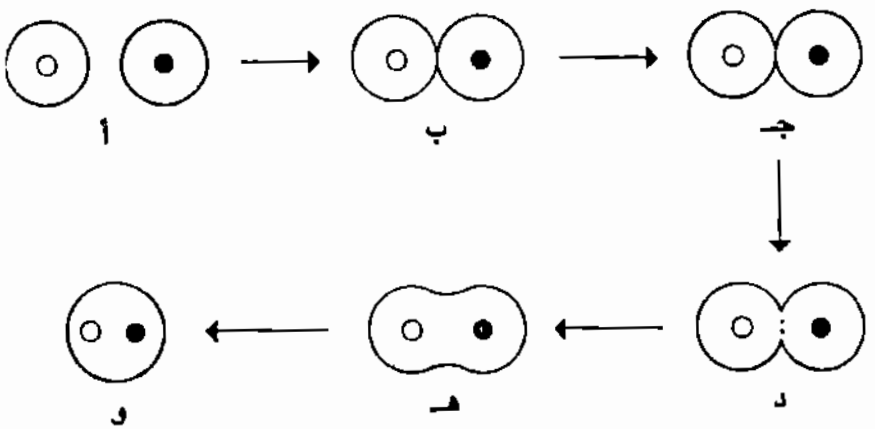
اندماج البروتوبلازم وإنتاج الهجن

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 .

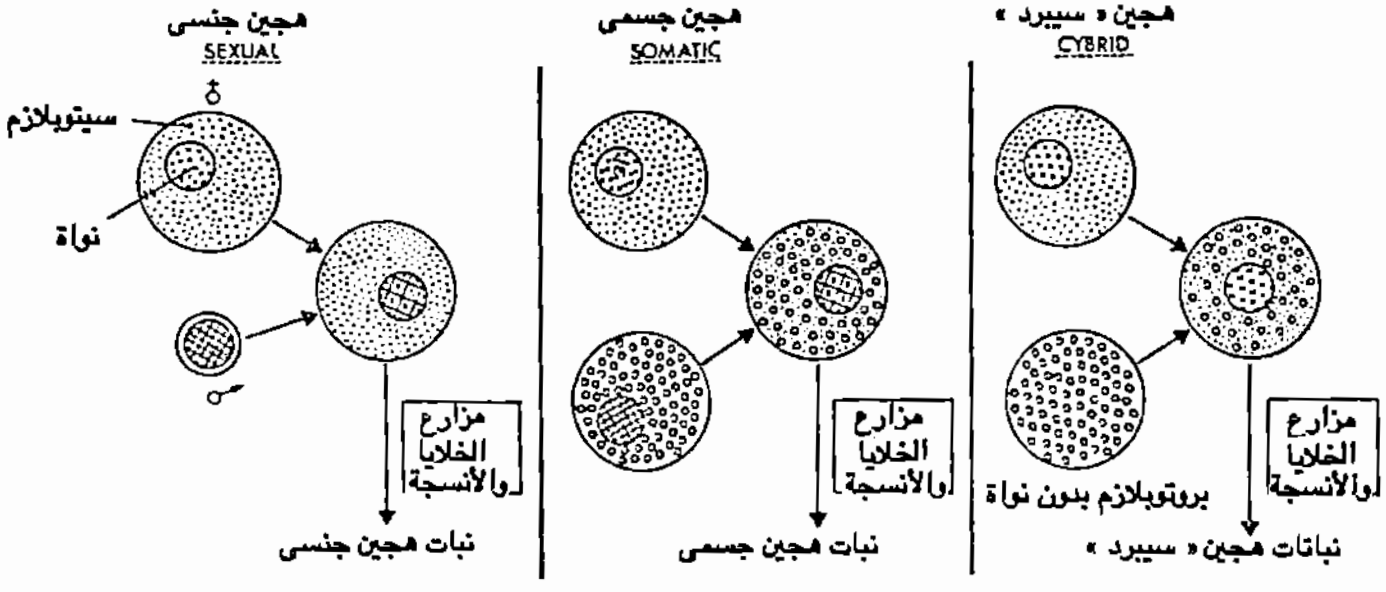
أما إنتاج الهجن .. فيتطلب اندماج بروتوبلازم الأنواع التى يراد تهجينها ، ويستلزم ذلك توفر عامل ، أو وسيلة مناسبة لتحقيق الاندماج (fusogen) . وقد جربت لذلك معاملات كثيرة أثبت بعضها نجاحاً كبيراً فى تحفيز اندماج بروتوبلازم الأنواع البعيدة ، مثل معاملات نترات الصوديوم ، والـ pH المرتفع ، والتركيز المرتفع 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) .

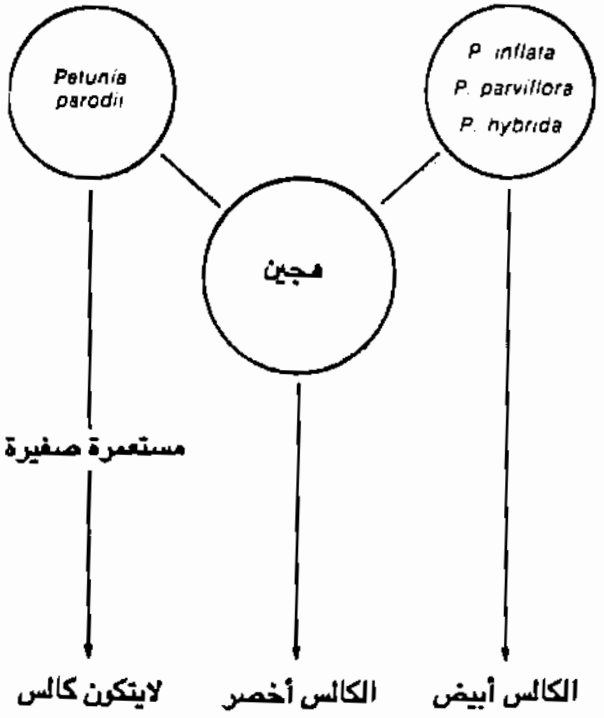
7 - *Solanum tuberosum* (2n= 24)+*Lycopersicon esculentum* (2n = 24)

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

الدول التى أنتجت فيها ؛ نظراً لسهولة إجراءات الحجر الزراعى على النباتات النامية فى أنابيب الاختبار . وكان من المزايا الأخرى للإكثار الدقيق المحافظة على النباتات خالية من جميع الإصابات المرضية ، واستمرار عملية الإكثار على مدار العام ، دون التقيد بالمواسم الزراعية .

ويعدّ إنتاج نباتات من الجنس المطلوب من أكبر مزايا الإكثار الدقيق بالنسبة للأنواع الوحيدة الجنس الثنائية المسكن ؛ حيث تنتج – مثلاً – نباتات مذكرة فقط من الهليون ، ونباتات مؤنثة فقط من نخيل البلح ، كما يطمح الباحثون فى إنتاج نباتات مؤنثة فقط من الباباظ . ولاشك فى أن المحافظة على عشرات الآلاف من نباتات المشاتل فى أوعية زجاجية صغيرة فى مساحة من المختبر لاتتعدى عشرة أمتار مربعة يعد أمراً بالغ الأهمية من الوجهة الاقتصادية . وإلى جانب ما تقدم .. فإن مزارع الإكثار الدقيق يمكن الاستفادة منها فى إكثار هجن بعض الأنواع الجنسية التكاثر المرتفعة الثمن ؛ كهجن القنبيط ، والسلالات العقيمة الذكر المستخدمة كأمهات ، بدلاً من اتباع طريقة التهجين الرجعى كما فى البصل .

شكل (١٨– ٤) : بادرات نخيل بلح منتجة بطريقة مزارع الإكثار الدقيق .

وفى مجال إكثار الهجن الجنسية .. تجرى محاولات لإنتاج بذور صناعية artificial seeds من هذه الهجن باتباع طرق الإكثار الدقيق . ويعمد العلماء – فى هذه الحالة – إلى إنتاج أجنة جسمية من خلايا الهجين الجنسى مباشرة بزراعة أنسجته (مثل نسيج الأوراق الفلقية) فى البيئات المناسبة ؛ وبذا ... يمكن الحصول على عدد كبير من الأجنة الجسمية من كل نبات هجين جنسى . تغلف هذه الأجنة بعد ذلك بأغلفة مناسبة – وهى العملية التى تعرف باسم encapsulation – ثم تزرع كالبذور العادية .

وللإكثار الدقيق دوره المباشر فى مجال تربية بعض الأنواع الحولية التى يتطلب تقييمها للصفات المرغوبة أن تحصد وتزال من الحقل (كما فى الخس ، والكرنب ، والكرفس) وهو ما يؤدى إلى فقدان قدرتها على النمو . ومن أمثلة ذلك صفات الصلاحية للتخزين ، والقدرة على تحمل عمليات التداول والشحن ، والمقاومة للعيوب الفسيولوجية والأمراض التالية للحصاد . وبرغم أنه يمكن أحياناً الإبقاء على جزء من النبات فى الحقل لحين إجراء التقييم .. إلا أن هذه الطريقة مكلفة . وتتطلب جهداً إضافياً . وتقدم مزارع الإكثار الدقيق حلاً جيداً لهذه المشكلة ؛ بإكثار النباتات التى يتم انتخابها – بعد التقييم المختبرى – من القمم النامية ، أو البراعم الإبطية لهذه النباتات . وتحقيقاً لهذا الهدف .. قام Bloksberg & Saltveit (١٩٨٦) بتطوير تقنية إكثار نباتات الخس من البراعم الإبطية التى توجد فى الرؤوس .

ويفيد الإكثار الدقيق كذلك فى التغلب على مشاكل تقييم النباتات التى عمّرت سنوات كثيرة ، خاصة أشجار الغابات ؛ ففى هذه الأنواع .. تميل النباتات الجديدة إلى مشابهة النمو النباتى فى الجزء الذى استخدم فى الإكثار الخضرى من النبات الأم ، مما يؤدى إلى حدوث تباين واضح فى النمو النباتى بين نباتات السلالة الخضرية الواحدة . ويمكن التغلب على هذه المشكلة بالإكثار الدقيق لهذه الأشجار ؛ لأنه يؤدى إلى استعادة مرحلة الحداثة Juvenility فى جميع النباتات الجديدة المكثرة (عن Jensen ١٩٨١) .

ولمزيد من التفاصيل عن تطبيقات الإكثار الدقيق لمختلف المحاصيل الزراعية .. يراجع Yang (١٩٧٧) بالنسبة للهليون ، و Hussey (١٩٨٠ ، ١٩٨٣) بالنسبة للمحاصيل الإقتصادية عامة ، و Science and Education Administration (١٩٨٠) بالنسبة للفاكهة ، و Bottino (١٩٨١) بالنسبة للخضر ، و Congor (١٩٨١) بالنسبة للمحاصيل

الاقتصادية عامة ، و Evans وآخـــرون (١٩٨١) ، و Hartmann & Kester (١٩٨٣) بالنسبة للمحاصيل البستانية ، و George (١٩٨٦) ، و Wooster & Dixon (١٩٨٧) بالنسبة للبطاطس .

أما مزارع القمة الميرستيمية .. فإن لها أهميتها البالغة فى ثلاثة جوانب تتعلق بإكثار النباتات الاقتصادية هى كما يلى :

١- الاستفادة من ظاهرة خلو القمم الميرستيمية من الإصابات الفيرسية فى عملية الإكثار الدقيق ذاتها ؛ لضمان خلو ألاف النباتات المنتجة بهذه الطريقة من أية إصابة فيرسية أو ميكوبلازمية .

٢- عمل إكثار أولى للنباتات الخضرية التكاثر التى تصاب بشدة بالأمراض الفيرسية ؛ لإنتاج تقاوٍ من الفئات الممتازة التى تكثر بعد ذلك خضرياً ، لإنتاج التقاوى التى يستخدمها المزارعون ؛ وتلك هى الطريقة التى تتبع فى إكثار تقاوى البطاطس والشليك الذى يصاب بنحو ٦٢ مرضاً تسببها فيروسات وميكروبلازمات .

٣- إعادة إنتاج نباتات خالية من الفيرس من الأصناف القديمة للمحاصيل الخضرية التكاثر التى لم يعد فيها نبات واحد خال من الإصابات الفيرسية ، كما حدث بالنسبة لبعض أصناف البطاطس . ولمزيد من التفاصيل عن تطبيقات مزارع القمة الميرستيمية يراجع Ingram & Helgeson (١٩٨٠) .

حفظ الجيرمبلازم

تسهل المحافظة على جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر جنسياً على صورة بذور ، وقد سبقت مناقشة هذا الموضوع فى الفصل الخامس ، أما حفظ جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر خضريًا .. فهو أمر باهظ التكاليف ؛ نظراً لأنه يتطلب تواجد الجيرمبلازم ناميًا على الدوام فى حالة الأنواع المعمرة ؛ كالتفاح والكمثرى ، أو تجديد زراعتها سنويًا فى حالة الأنواع الحولية منها كالبطاطس . هذا فضلاً على صعوبة المحافظة عليها خالية دائماً من الإصابات الفيرسية . أما حفظ هذه الأنواع على صورة بذور .. فإنه يؤدى إلى تغيرات وراثية كبيرة فى السلالات المحتفظ بها ، ولايفيد سوى فى المحافظة على "الجينات" المهمة التى توجد بكل من هذه السلالات ؛ لأجل ذلك .. اتجه تفكير مربى النبات نحو مزارع

الانسجة لحفظ سلالات وأصناف الأنواع الخضرية التكاثر ، وهو ما يحقق المزايا التالية :

١- حفظ أعداد كبيرة من السلالات فى مساحة صغيرة للغاية بالمختبر ، مع توفير النفقات التى تتطلبها زراعة وخدمة هذه السلالات فى الحقول .

٢- بقاء السلالات المخزنة خالية من جميع الإصابات المرضية ، خاصة الفيروسية منها .

٣- يمكن استخدام المزارع المحفوظة كتقاوى نواة لإكثارها وإنتاج أعداد كبيرة منها فى أى وقت حسب الحاجة .

٤- سهولة نقل مزارع السلالات من دولة إلى أخرى ، نظراً لخلوها من الإصابات المرضية .

إن أهم الأمور التى تجب مراعاتها عند حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة هو تجنب تكرار زراعتها على فترات قصيرة ، حتى لاتتعرض للإصابات الميكروبية ، أو للأخطاء البشرية . ويتحقق هذا الهدف بحفظ المزارع إما مجمدة وإما مبردة .

حفظ المزارع بالتجميد

تحفظ مزارع الجيرمبلازم لفترات طويلة وهى مجمدة فى النيتروجين السائل على درجة - ١٩٦°م ، التى تفقد عندها الخلايا كل مظاهر نشاطها . ونظرياً .. فإن تطوير الطرق المناسبة لتجميد النسيج النباتى فى النيتروجين السائل ثم تفكيكه (إذابته) دون أن تحدث له أية أضرار ، يعنى إمكان حفظه بهذه الطريقة إلى مالا نهاية وكما هو معلوم .. فإن السائل المنوى للحيوانات الزراعية يحفظ فى النتيروجين السائل بشكل روتينى لأغراض التلقيح الصناعى .

تعتبر مزارع الأعضاء النباتية مثل مزارع القمة النامية ، ومزارع الأجنة ، ومزارع الإكثار الدقيق هى أنسب المزارع لحفظها بالتجميد للأسباب التالية

١ - تجنب وجود أية اختلافات وراثية عند بدء التخزين ، وهو الأمر الذى قد يحدث فى مزارع الكالس ومعلقات الخلايا .

٢- تجنب التغيرات الوراثية الكثيرة ، التى يمكن حدوثها فى مزارع الكالس ، ومزارع معلقات الخلايا خلال فترة التخزين الطويلة .

٣- تحتفظ مزارع الأعضاء بقدرتها على استمرار النمو لتكوين نباتات جديدة خلال فترة التخزين ، بينما تفقد الخلايا فى مزارع الخلايا قدرتها على إنتاج النباتات الجديدة (أى تفقد خاصية الـ totipotency) خلال فترات التخزين الطويلة . هذا .. فضلاً على أن مزارع الخلايا لم يمكن دفعها لإنتاج النموات الخضرية فى عديد من الأنواع النباتية .

٤- يمكن المحافظة على الحالة الأحادية فى النباتات الأحادية بسهولة وهى على صورة مزارع القمم الميرسيتمية والبراعم الإبطية ، بينما لاتبقى السلالات على الحالة الأحادية فى مزارع الكالس .

٥- تكون خلايا القمم النامية والأجنة (وهى خلايا ميرستيمية) أكثر قدرة على تحمل عمليتى التجميد والتفكك .

وقد استخدمت طريقة التجميد فى حفظ الجيرمبلازم لفترات تجريبية قصيرة نسبيًا (تراوحت من خمس دقائق إلى شهرين) فى عدة أنواع نباتية ، وكان منها الجزر ، والشليك ، والطماطم ، والدخان والبسلة ، والبطاطس ، والذرة ، ويلاحظ أن معظم هذه الأنواع تتكاثر جنسيًا ، ولكنها تتميز بأن تقنيات مزارع القمم الميرستيمية أو مزارع الأجنة قد تقدمت فيها بدرجة كبيرة ، إلى درجة سمحت بتجربة استخدامها فى تطوير تقنينات حفظها بالتجميد .

حفظ المزارع بالتبريد

يمكن حفظ المزارع فى درجات حرارة منخفضة ، تتراوح من ١ - ٩°م . يعمل هذا المجال الحرارى على إبطاء تدهور النسيج النباتى ، ولكنه لايمنعه ، ويعنى ذلك ضرورة إعادة زراعة النسيج على فترات متباعدة نسبياً . وتستخدم هذه الطريقة - حاليا - فى تخزين جيرمبلازم الشليك ، وعديد من نباتات الفاكهة مثل التفاح والعنب .

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأنسجة فى حفظ الجيرمبلازم .. يراجع Morel (١٩٧٥) ، و Henshaw وآخرون (١٩٨٠ ، ١٩٨٣) ، و Withers (١٩٨٠ ، ١٩٨٣) .

مصادر إضافية لأوجه الاستفادة من مزارع الأنسجة فى تربية النبات

لمزيد من التفاصيل عن تطبيقات مختلف أنواع مزارع الأنسجة فى شتى مجالات تربية النبات يراجع كل مما يلى : Morel (١٩٧٢) ، و Ledoux (١٩٧٥) ، و Street (١٩٧٥) Murashige (١٩٧٧) ، و Day (١٩٨٠) ، و Cooking & Riley (١٩٨١) ، و Jensen (١٩٨١) ، و Thorpe (١٩٨١) ، و Vasil وآخرون (١٩٨٢) ، و Bhojwani & Razdan (١٩٨٣) ، و Mantell & Smith (١٩٨٣) ، و Bliss (١٩٨٤) ، و Cailloux (١٩٨٤) ، وChin (١٩٨٥) ، والمرضى (١٩٨٦) ، و Fobes (١٩٨٧) و Hermsen (١٩٨٧) .

الهندسة الوراثية

يستعمل مصطلح الهندسة الوراثية Genetic Enginering – أحياناً – كمرادف لمصطلح التقنية البيولوجية Biotechnology ، إلاّ أن المصطلح الأخير أوسع وأشمل ، ويدخل ضمنه كل تقنيات الهندسة الوراثية . وتتضمن التقنيات البيولوجية – إلى جانب الهندسة الوراثية – كل تقنيات مزارع الخلايا ، والأنسجة ، والبروتوبلازم ، واندماج البرتوبلازم ، وتقنيات أخرى تهم الصناعات التى تعتمد على نظم حيوية معينة . أما الهندسة الوراثية .. فيعنى بها عزل وتنقية جينات معينة ، وإدخالها بتقنيات خاصة فى الكائنات الحية لتغييرها وراثيًا .

يعود الفضل فى دراسات الهندسة الوراثية إلى البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* التى تصيب معظم النباتات ذات الفلقتين (تتوزع العوائل فى أكثر من ٩٠ عائلة نباتية) وتحدث تدرنات بها . توجد فى نواة هذه البكتريا قطعة كروموسومية تعتبر كبيرة نسبيًا ، تعرف باسم Tuber - inducing plasmid (تكتب اختصاراً T-i plasmid) تتميز بخاصية الانفصال عن البكتريا ، والدخول إلى خلية العائل حاملة معها بعض الجينات ، التى تتسلط على جينات العائل وتجعلها تكثر من الانقسام فيحدث التدرن ، وتتكون بروتينات لاستعمال البكتريا فقط .

يتميز النسيج الذى تحدثه البكتريا *A. tumfaciens* بقدرته على النمو فى البيئات الصناعية البسيطة دون إضافة أية أوكسينات ، أو سيتوكينينات ، وبقدرته على تمثيل واحد

أو أكثر من مشتقات الأحماض الأمينية الأساسية ، يطلق عليها اسم أوبينات Opines . ولاتوجد هذه الأوبينات فى الأنسجة السليمة ، وتستفيد منها البكتريا فى الأنسجة المصابة . ويتحكم فى ذلك كله الـ T- i plasmid الذى تدخله البكتريا فى خلايا العائل . ويعد ذلك تحولاً وراثياً genetic transformation ؛ مثل التحولات الوراثية التى عرفت فى الكائنات الدقيقة (عن Schell وآخرين ١٩٨٢) .

تعتمد الهندسة الوراثية على التعرف على الجينات المرغوبة – أولا – وتحديد مكانها على كروموسومات الأنواع التى توجد فيها ، ثم فصلها عنهابطرق متقدمة ، يمكن الرجوع إلى تفاصيلها فى Flavell (١٩٨٢) .

ويلى ذلك إدخال الجين المرغوب فى الـ T-i plasmid للبكتريا *A. tumfaciens* قبل إصابتها للعائل . وعندما تحدث الإصابة تقوم البكتريا بنقل الـ T-i plasmid المحتوى على الجين المرغوب إلى نواة العائل ، ويتعرف على هذه الخلايا بقدرتها على النمو فى البيئات البسيطة التى لاتحوى هرمونات . ومن الطبيعى أن تكون الخطوة التالية فى إنتاج نباتات غير متدرنة من هذه الخلايا المتحولة وراثياً . وإذا تحقق ذلك يصبح بالإمكان تحسين جميع النباتات ذات الفلقتين التى تصاب بالبكتريا *A.tumfaciens* بإضافة أية صفات مرغوبة إليها من أى نوع نباتى توجد به هذه الصفات .

وقد استخدمت البكتريا *A. tumfaciens* – على سبيل المثال – فى نقل جينات من مصادر مختلفة إلى الطماطم ، منها جينات من أصناف أخرى من الطماطم ، ومن البكتريا والفيروسات ، والبقوليات ، والذرة ، ومن نباتات أخرى من العائلة الباذنجانية . ومع ذلك .. فلم يمكن – إلى الآن – إنتاج صنف جديد من الطماطم استفيد فى عملية إنتاجه من تقنيات الهندسة الوراثية (عن Fobes ١٩٨٧) . ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات الـ T-i plasmids فى مجال الهندسة الوراثية .. يراجع Chiltom (١٩٨٠) ، و Schell (١٩٨٢) ، و Schroder وآخرون (١٩٨٣) .

تتميز الفيروسات – كذلك – بقدرتها على إصابة النباتات ونقل أحماضها النووية إلى عوائلها ، لذا .. فإنها تستخدم فى الأخرى لأغراض الهندسة الوراثية ، ويستفاد فى هذا الشأن من الفيروسات التى يكون حامضها النووى من نوع دى إن إيه DNA سواء أكانت

مزدوجة الخيط double - stranded (مجموعة Caulimovirus التى يعرف منها ١٢ فيرساً ؛ مثل فيرس تبرقش القنبيط Cauliflower Mosaic Virus الذى يتكون من دى إن إيه مزدوج الخيط double - stranded DNA ويصيب نباتات العائلة الصليبية بصفة أساسية) أو مفردة الخيط Single - stranded DNA (مثل فيروسات مجموعة الجمنى geminii viruses ، التى يوجد منها أكثر من ١٢ فيرساً ، منها فيرس تبرقش القاصوليا الذهبى ، وفيرس تخطيط الذره) .

ولكن يعاب على استخدام الفيروسات فى مجال الهندسة الوراثية أنه لم يمكن إضافة قطعة دى إن إيه كبيرة إلى الحامض النووى الخاص بالفيرس دون التأثير فى قدرته على إصابة العائل ، وهى الخطوة الضرورية لإحداث التحول المطلوب . كما أن الجينات الصغيرة المضافة تبطئ حركة الفيرس من خلية إلى أخرى ، ويرجع ذلك إلى أن الحامض النووى الخاص بالفيروس صغير بطبيعته فهو لايتعدى واحدا من ثلاثين جزءاً من الـ T - i plasmid (Kado ١٩٨٢) .

وقد تبين أن دى إن إيه فيرس تبرقش القنبيط يحمل ستة جينات ، ليس لأحدها (وهو الجين رقم II) ضرورة بالنسبة لتكاثر الفيرس ، أو تمثيل بروتين الفيرس ، أو حركة الفيرس من خلية إلى أخرى ، ولكنه يؤثر فى عملية الانتقال الحشرى الفيرسى فى الطبيعة ، ويعد هذا الجين موقعاً مناسباً لإضافة الجينات المرغوبة إلى دى إن إيه الفيرس . كما وجدت منطقة كروموسومية أخرى عن دى إن إيه الفيرس (هى الجين رقم VI) تتحكم فى شدة أعراض المرض ، حيث يؤثر أى تغيير فى هذه المنطقة كثيراً على شدة الأعراض . ووجد أن أعراض الإصابة بالفيرس ، قد تلاشت تقريباً حينما أضيفت ١٢ نيكليوتيدة فى هذا الموقع الجينى ، ونمت النباتات التى تمت عدواها بهذه الطفرة من الفيرس بصورة طبيعية (Shepherd وآخرون ١٩٨٢) . ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات الفيروسات فى مجال الهندسة الوراثية .. يراجع Hull (١٩٨٣) .

وقد تبين من الدراسات التى أجريت على التحولات الوراثية فى الفطريات والخلايا الحيوانية أن عدم وجود الجدر الخلوية أو التخلص منها ، وتحضين البروتوبلازم مع الـ DNA المرغوب فيه فى ظروف مهيئة للاندماج البروتوبلازمى يعد ضروريا لزيادة كفاءة عملية التحول الوراثى ، ويستفاد من ذلك فى النباتات بتحضين البروتوبلام مع ناقل

أوموّجه الـ دى إن إيه DNA vector الذى يحمل الجين المرغوب . يظهر تأثير الجين بعد أن يكتسب البروتوبلازم الجدر الخلوية من جديد، ثم تتميز منه النباتات التى نقل إليها هذا الجين . يقتصر اتباع هذه الطريقة فى الوقت الحاضر على النباتات التى تنجح فيها زراعة البروتوبلازم وتتميز منها النباتات ، وأغلبها من العائله الباذنجانية .

ويتجه البعض إلى الحقن المباشر للدى إن إيه المرغوب فيه – بعد تنقيته – فى جاميطات النبات الذى يُراد تحويله وراثيًا ، وبذلك تصل الجينات المرغوبة إلى حبوب اللقاح أو البيضات مباشرة . يبدو أن لهذه الطريقة أهميتها فى نباتات الحبوب ، والبقول التى لم ينجح فيها إنتاج النباتات من مزارع البروتوبلازم ، بالإضافة إلى أن نباتات الحبوب هى من نوات الفلقة الواحدة التى لاتصاب بالبكتيريا *A. tumfaciens* .

وقد كانت آخر محاولات الهندسة الوراثية هى قذف النسيج النباتى الذى يراد تحويله وراثيًا (مثل قطعة من نسيج ورقى أو مزرعة خلايا) بالجين المرغوب (الدى إن إيه النقى) وهو محمل على كريات صغيرة جداً beads ، ويستخدم لذلك جهاز خاص لقذف الجينات بقوة كبيرة تحت تفريغ ، يعرف باسم micro injector ؛ تخترق الكريات المحملة بالجينات خلايا النسيج النباتى الذى يعطى – عند وضعه فى بيئة مناسبة – نسيجاً من الكالس تكون بعض أجزائه من الخلايا التى حدث بها التحول الوراثى .

لقد فكر العلماء فى نقل الجينات nif المسئولة عن تثبيت النيتروجين الجوى (Nitrogen Fixation) من إحدى سلالات بكتيريا تثبيت أزوت الهواء الجوى من النوع *Rhizobium japonicum* التى تعيش معيشة تعاونية مع جذور فول الصويا – إلى المحاصيل الزراعية الهامة ؛ مثل القمح و الذرة . وقد نجح العلماء فى عزل كروموسوم البكتريا *R. japonicum* وتنقيته لإدخاله فى البكتيريا *Escherici coli* . وقُدِّر أن إدخال الكروموسوم الكامل للبكتريا *Rhizobium* فى البكتيريا *E. coli* يتطلب نحو ٢٠٠٠ – ٤٠٠٠ تحول وراثى مستقل indepent transformations ، ووجد لدى فحص ٣٣٢٥ من هذه التحولات الوراثية فى *E. coli* أن ٢١ منها احتوت على قطعة من دى إن إيه البكتيريا *R. japonicum* يوجد بها الجينات nif . وقد مكّن ذلك العلماء من دراسة تأثير هذه الجينات عند زراعة البكتيريا *E. coli* – التى نقلت إليها الجينات – فى بيئات صناعية . هذا .. ويتطلب تثبيت أزوت الهواء الجوى – بواسطة بكتيريا العقد الجذرية فى

جذور البقوليات – بذل طاقة كبيرة من جانب النبات ، وقد قدر أحد الباحثين أن الطاقة التى تفقد لهذا الغرض فى حقول فول الصويا بالولايات المتحدة تعادل كل الطاقة التى تستخدمها بريطانيا لمدة ثلاثة شهور .

وقد تبين أن بعض سلالات البكتيريا *R. japonicum* تحتوى على جينات لاستقبال الأيدروجين hup genes ، وهو ما يعنى أن نباتات فول الصويا التى تحتوى عقدها الجذرية nodules على هذه البكتيريا تكون أكثر كفاءة من النباتات الأخرى . كما تبين أن هذه الجينات توجد على plasmids ، وهو ما يعنى إمكانية انتقالها من خلية بكتيرية إلى أخرى فى حالات التزاوج البكتيرى Conjugation ، وإذا أمكن نقل هذه الجينات إلى البكتيريا *R . japomicun* التى تفتقر إليها .. فإن ذلك يوفر على النبات كثيراً من الطاقة التى تنعكس إيجابيًا على المحصول (عن Valentine ١٩٨٢) .

إن الأهمية الكبرى للهندسة الوراثية تكمن فى أنه أصبح فى الإمكان فصل جينات مرغوب فيها بصورة نقية ، وإدخالها فى نباتات من نفس النوع ، أو من أنواع أخرى . تماثل هذه الخطوة فى نتائجها برنامجاً كاملاً للتربية بطريقة التهجين الرجعى ، دون الدخول فى أى من مشاكل التربية ، خاصة ارتباط الصفات المرغوب فيها بصفات أخرى غير مرغوب فيها . كما أن تأثير الجين يتحدد – جزئيا – بموقعه من الجينات الأخرى على الكروموسوم ؛ وعليه .. فإن إدخال جين ما إلى مواقع مختلفة من الكروموسومات يعنى الحصول على تباينات وراثية ، لاتتوفر فى الظروف الطبيعية ؛ نظرا لأن الجين يحتل موقعاً ثابتاً على الكروموسوم . ومن المؤكد أن النباتات الجديدة المتحولة وراثيًا .. سوف تختلف فى عدد نسخ الجين التى تنقل إليها ، والموقع (أو المواقع) الكروموسومية التى تستقر بها هذه النسخ الجينية وينتج عن ذلك كله .. تباينات لا حصر لها ، قد يكون بعضها مرغوباً فيه ؛ ويعنى ذلك أن خطوة انتخاب النباتات المرغوب فيها بعد إحداث التحول الوراثى لاتقل أهمية عن عملية التحول الوراثى ذاتها ، كما يعنى – كذلك – ضرورة إنتاج تحولات وراثية كثيرة ؛ لكى تزيد فرصة الحصول على تغيرات مرغوب فيها (عن Flavell ١٩٨٢) .

تتبقى كلمة أخيرة فى هذا الموضوع ، وهى أن تربية النبات ليست مجرد نقل جين مرغوب فيه من نوع نباتى إلى آخر ، بل إنها تتضمن خطوات كثيرة ، وتقييماً مستمراً لكى ينتهى البرنامج بصنف يقبله المزارعون ، والمستهلكون ، ويكون له مستقبل فى الزراعة

التجارية ، ولايتحقق ذلك بالهندسة الوراثية وحدها ؛ فلابد من التعاون الوثيق بين علماء الهندسة الوراثية ، ومربى النبات ، لكى تعطى الهندسة الوراثية ثمارها ؛ فهى ليست أكثر من أداة لزيادة الاختلافات الوراثية ، أما تطوير الجيرمبلازم الجديد إلى أن يصبح صنفاً مقبولاً .. فإنه يبقى من مهام مربى النبات (عن Moore ١٩٨٨) .

وينبغى أن نتذكر أن الهندسة الوراثية لم تثمر - حتى الآن - صنفاً واحدًا جديداً من الطماطم - مثلاً - التى تعد من أكثر المحاصيل ، التى أجريت عليها دراسات الهندسة الوراثية ، وأكثرها مناسبة لهذه النوعية من الدراسات (Fobes ١٩٨٧) ولايمكننا عمل توقعات بشأن مايمكن أن تضيفه الهندسة الوراثية إلى تربية النبات ، إلى أن تظهر فعلاً بعض هذه الإضافات إلى حيز الوجود (Ryder ١٩٨٤) ، مثلما ظهرت بالنسبة لحقل الطب ؛ حيث كان أول نشاط عملى للهندسة الوراثية تحديد وتنقية الجين المسئول عن إنتاج هرمون الأنسلين وإدخاله فى البكتريا *E. coli* بواسطة الـ T-i plasmid لتصبح بدورها قادرة على إنتاج الأنسلين عوضاً عن استخراجه من غدد الحيوانات المذبوحة (عن نجار ١٩٨٦) .

ولمزيد من التفاصيل عن الهندسة الوراثية واستخداماتها فى مجال تحسين النباتات .. يراجع McDaniel (١٩٨١) ، و Panopoulos (١٩٨١) ، و Rachie & Lyman (١٩٨١) ، و Univ . Calif . (١٩٨٢) ، و Flavell (١٩٨٢) ، و Bliss (١٩٨٤) .