الفصل الثالث عشر

إكثار الجيرمبلازم وحفظه

مصادر الجيرمبلازم المحتفظ به

تتنوع الجهات، والمصادر التى يحصل منها على الجيرمبلازم – لأجل إكثاره – وحفظه، وتخزينه – كما يلى.

١ - شركات البذور.

٢ – بنوك الجيرمبلازم الوطنية فى مختلف الدول

٣ – المجموعات الخاصة التى تركز – عادة – على محصول واحد.

٤ – مساهمات المربيين، وخاصة بالنسبة لما يتوفر لديهم من أصول تربية تزيد عن حاجتهم خلال برامج التربية

٥ – الحدائق النباتية.

٦ – رحلات الاستكشاف الداخلية، وما يترتب عليها من مجموعات جيرمبلازم محلية

٧ – رحلات الاستكشاف الخارجية، وما يترتب عليها من مجموعات جيرمبلازم عالمية.

فئات الجيرمبلازم المحتفظ بها

يمكن تقسيم ثروات الجيرمبلازم إلى الفئات الرئيسية التالية:

١ - الجيرمبلازم الأساسى

ويتضمن ما يلى:

أ – الأنواع البرية القريبة من الأنواع المحصولية.

ب – الطرز التى تنمو كحشائش من النوع المزروع.

جـ - السلالات التى تنمو بريًا من المحصول المزروع وأصنافه البدائيه

٢ - الجيرمبلازم المستمد من جهود التربية

ويتضمن ما يلى

أ – الأصناف المهملة (التى لم تعد مستخدمة فى الزراعة)

ب سلالات التربية التى تحتوى على جينات معينة أو التى تتميز بأداء خاص

جـ – الجيرمبلازم المستمد من التربية الأولية pre-breeding materials

د الأصناف المحسنة المتقدمة

هـ – آباء الهجن التجارية.

و – السلالات المستخدمة فى دراسات الوراثة السيتولوجية

ز – الطفرات

٣ - جيرمبلازم المستوى الجزيئ

ويتضمن ما يلى

أ مكتبات الدنا DNA libraries خارج النبات *in vitro* (عن Chopra ٢٠٠٠)

ونتناول – فيما يلى – عددًا من تلك الفئات بتفصيل أكبر

١ - الأصناف الحديثة

تمثل الأصناف الحديثة modern cultivars أكثر التراكيب الوراثية تطورا وأقلها على مناطق معينة، ولكنها تتميز بأقل قدر من التباين الوراثى؛ ولذا فإنها تكون عرضة للإصابات المرضية الوبائية، وللتأثر بالظروف البيئية المعاكسة

ومن أهم مزايا هذه المجموعة أنها تمثل الأصناف القياسية التى تقارن بها الأصناف الجديدة، وأنها تستغل كأساس للتحسين فى برامج التربية بغرض نقل جينات جديدة إليها

٢ - الأصناف المهملة

تمثل الأصناف المهملة obsolete cultivars "الأصناف الحديثة" للماضى القريب.

وعلى الرغم من استبعادها من الزراعة لتوفر أصناف جديدة أفضل منها، فإنه يحتفظ بها لاحتمالات استعمالها فى برامج التربية. وهى - كمجموعة - تشكل مدى من التباين أوسع كثيرًا عما تمثله مجموعة الأصناف الحديثة، وتمثل - فى مجموعها على مستوى العالم - قدرة كبيرة على التأقلم على مختلف الظروف البيئية. وكثيرا ما يلجأ إليها الباحثون للحصول منها على جينات لم يلتفت إليها عندما أنتجت الأصناف الحديثة.

٣ - أصول التربية

يُنتج - عادة - خلال أى برنامج للتربية أعدادا كبيرة جدًا من السلالات الجيدة المحسنة التى يتم الاستغناء عنها، نظرًا لقصورها فى إحدى الصفات الهامة أو فى أكثر من صفة، مما يجعلها غير صالحة للاستعمال كأصناف تجارية. وعلى الرغم من الأهمية الواضحة لتلك السلالات كأصول وراثية فإنها غالبًا ما تفقد بمعدلات عالية، حيث يتم الاستغناء عنها أولاً بأول أثناء برامج التربية، نظرًا لاستحالة استمرار البرنامج بكل السلالات، ولصعوبة التنبؤ بما يمكن أن يكون لها من استعمال مستقبلى. كذلك ينتج من بعض برامج التربية عشائر يتم تطويرها بالانتخاب المتكرر أو كأصناف تركيبية من خلال الانتخاب الإجمالى أو طرق التربية الأخرى، وتدخل كل تلك السلالات والعشائر الوراثية - معًا - تحت مسمى أصول التربية breeding stocks.

٤ - السلالات المحلية

تمثل السلالات المحلية (أو البلدية) land races أقرب التراكيب الوراثية للطرز التى أخضعت لعملية الاستئناس. وتشكل تلك المجموعة مدى أوسع من التباينات الوراثية عن أى من المجموعات السابقة، إلاّ أن أداءها يكون أدنى منها جميعا. تنشأ تلك السلالات فى مناطق نشوء المحصول، ولكنها قد تزدهر فى مراكز أخرى ثانوية، وهى نتاج أجيال لا حصر لها من الانتخاب الطبيعى لمقاومة الأمراض والآفات السائدة، ولتحمل مختلف الظروف البيئية؛ ولذا .. فهى تحتوى على مخزون جيد من الجينات التى قد يحتاج إليها المربى. وعلى الرغم من ذلك فكثيرًا ما فقدت مجموعات محصولية من تلك السلالات.

٥ - الطرز البرية للأنواع المزروعة

تلك هى أقل أنواع الجيرمبلازم توفرًا فى الجيرمبلازم المخزن، خاصة وأن كثيرا من الطرز البريه لعديد من الأنواع المحصولية لم يعد لها وجود فى الطبيعة، كما لم يتم تمثيل المتبقى منها تمثيلا كافيًا فى مجموعات الجيرمبلازم وتتميز نباتات تلك المجموعة عن المجموعة التالية بأنها كثيرًا ما تتلقح - بصورة طبيعية - مع النوع المزروع وكثيرا ما يلجأ المربى لتلك الطرز للحصول على جينات المقاومة للأمراض والآفات

٦ - الأنواع البرية القريبة

لا يمكن لنباتات هذه المجموعة أن تتلقح طبيعيًا - على نطاق واسع - مع الأنواع المحصولية المزروعة، وتعد هى آخر ما يلجأ إليه المربى للحصول على الجينات المرغوب فيها والتى لا يجدها فى أى من المجموعات السابقة وعادة لا يُقبل المربى على اللجوء إلى تلك المجموعة إلا للضروره القصوى بسبب مشاكل التهجينات، والعقم، والانعزالات الكثيرة غير المرغوب فيها. واحتمالات التدهور بعد الجيل الثانى، وحالات الارتباط المبطة للتقدم فى التحسين الوراثى

هذا ولا يقتصر افتقار مجاميع الجيرمبلازم فقط إلى بعض الأنواع البرية القريبة، وإنما هى تفتقر - كذلك إلى التمثيل الوراثى الجيد لمختلف التباينات فى النوع الواحد

٧ - الطفرات الطبيعية والمستحدثة صناعيًا

عندما يلجأ المربى إلى البحث عن الطفرات أو استحداثها صناعيًا فإن جيرمبلازم تلك الطفرات تودع - كذلك - فى مخازن الجيرمبلازم للاستفادة منها من قبل الباحثين الآخرين (عن Rick ١٩٨٤)

٨ - مُجمّعات الجيرمبلازم

يُحصل على مُجمّعات الجيرمبلازم germplasm complexes بخلط بذور عدة سلالات

أو عشائر من مصادر مختلفة معًا، وتركها للتلقيح الخلطى العشوائى؛ بحيث تصبح مُجمَّعًا للجينات، وهى تعد عشائر تجريبية، وليست أصنافًا تجارية.

٩ - الحامض النووى للجينات الهامة (بنوك الدنا)

إلى جانب بنوك الجيرمبلازم التى يحتفظ فيها بالجيرمبلازم على صورة بذور، أو أعضاء للتكاثر الخضرى، أو نباتات حقلية، أو مزارع أنسجة، أو مزارع خلايا، فإنه توجد كذلك بنوك للدنا DNA banks، وفيها يحتفظ بأجزاء من دنا التراكيب الوراثية للجيرمبلازم المرغوب فيه على صورة cosmid clones، أو phage lysates، أو دنا نقى، علمًا بأن الصورة الأخيرة لا يحتفظ بها إلا لفترة قصيرة. ويمكن تقييم أجزاء الدنا وفصل الجينات المرغوب فيها منها واستعمالها فى إنتاج نباتات محولة وراثيًا وتصلح تلك التقنية لحفظ المادة الوراثية للأنواع التى اندثرت بالفعل. ولكن يحتفظ بها فى صورة عينات مجففة فى المعشبات herbariums، حيث يمكن - غالبًا - عزل الدنا منها (Singh ١٩٩٣).

وتجدر الإشارة إلى ضرورة الاستمرار فى حفظ جميع سلالات الجيرمبلازم، حتى إن لم يجد مربو النبات فيها ضالتهم من الصفات التى يرغبون فى إدخالها ضمن برامج التربية؛ ذلك لأن ما لا قيمة له اليوم .. قد تكون له أهمية كبيرة فى المستقبل، خاصة أن أهداف التربية تتغير على الدوام

حفظ الجيرمبلازم فى المحميات

لاشك أن أفضل وسائل حفظ الجيرمبلازم تتم بتوفير المحميات المناسبة له فى البيئة الطبيعية *in situ*؛ لحمايته من الانقراض؛ حيث تتكاثر النباتات وتُلقَّح خلطيًا مع بعضها، وتحدث فيها الطفرات بشكل طبيعى.

وبينما قد يمكن تطبيق هذه الطريقة بالنسبة للأنواع التى يخشى عليها من الانقراض - وهو أمر ممكن ومطلوب فى هذه الحالة - فإن تطبيقها غير ممكن، وغير مطلوب بالنسبة للأنواع التى تنتشر زراعتها على نطاق واسع؛ فهو أمر غير ممكن نظرًا

للمكاليف الباهظة التي يتطلبها حفظ الجيرمبلازم بهذه الطريقة، حيث تتطلب توفير مساحات كبيرة من المحميات الطبيعية في المناطق الجغرافية التي تنتشر فيها الأنواع التي يراد حفظها، كما لا يعد حفظ الأنواع الواسعة الانتشار بهذه الطريقة أمر مرغوب فيه لأنه لن يمكن الاحتفاظ إلا بعدد قليل من الاختلافات الوراثية التي تتوفر منها في الطبيعة، هذا فضلا عن احتمال تعرضها للإصابة بالأوبئة. وتتم الطريقة الأخرى لحفظ الجيرمبلازم بالتخزين *ex situ*.

وقد اقترح Bretting & Duvick (١٩٩٧) المصطلح "الحفظ الاستاتيكي" static conservation ليحل محل المصطلح *ex situ* conservation (الحفظ في بنوك الجيرمبلازم)، والمصطلح "الحفظ الديناميكي" dynamic conservation ليحل محل المصطلح *in situ* conservation (الحفظ في المحميات)، علمًا بأن أي من طريقتي حفظ الجيرمبلازم لا تفضل الطريقة الأخرى، فلكل منها أهدافها واستعمالاتها. فبينما يعمل الحفظ الاستاتيكي على تجنب فقد الجيرمبلازم وسهولة توزيعه على المربين، فإن الحفظ الديناميكي لا يعمل فقط على حفظ الجيرمبلازم في الطبيعة، ولكنه يهدف كذلك إلى المحافظة على العمليات التطورية الجارية من انعزالات وراثية وانتخاب طبيعي.

إكثار الجيرمبلازم

تقع مهمة إكثار الجيرمبلازم وحفظه على عاتق محطات الإدخال، ومعهد ومركز البحوث الدولية والإقليمية والوطنية، وتعاونيات الوراثة والتربية، ومستودعات النباتات الخضرية التكاثر المسئولة عن المجموعات المحصولية المختلفة؛ فتكون هي المسئولة أولاً وأخيرًا - عن بقاء السلالات - الموجودة لديها - نقية، ومحتفظة بحيويتها. ويتحقق ذلك بتخزين بذور السلالات الجنسية التكاثر في ظروف مثلى للتخزين، بحيث يمكن أن تحتفظ بحيويتها فترات طويلة، تزيد على عشر سنوات عادة، مع اختبار حيويتها على فترات، بحيث تعاد زراعتها وإكثارها قبل أن تنخفض نسبة إنباتها بشكل حاد، حتى لا تفقد نهائيًا. كما تعاد - أيضا - زراعة وإكثار السلالات، التي يقل رصيد المخزون منها عن حد معين؛ بسبب كثرة الطلب عليها من قبل المربين.

إكثار سلالات الأنواع الجنسية التكاثر

بينما يسهل إكثار النباتات الذاتية التلقيح فإن النباتات الخلطية التلقيح تكون مشكلة كبيرة؛ بسبب الأعداد الهائلة من السلالات التى يلزم إكثارها من جانب، وبسبب انتشار ظاهرة عدم التوافق الذاتى فى كثير من أنواعها، أو التدهور فى نباتاتها مع التربية الداخلية من جانب آخر. ويتم التغلب على هذه المشاكل إما بإجراء التلقيح صناعيًا بين نباتات السلالة الواحدة (كما فى القرعيات، والذرة، وأنواع الجنس *Lycopersicon* غير المتوافقة ذاتيًا على سبيل المثال)، وإما بوضع عدة نباتات تحت شبكة غير منفذة للحشرات، وإدخال بعض الحشرات النظيفة من حبوب اللقاح للقيام بعملية التلقيح وتتبع هذه الطريقة مع بعض المحاصيل الحشرية التقيح (كالبصل، والجزر، والكرفس).

إكثار سلالات الأنواع الخضرية التكاثر

إن المحاصيل الخضرية التكاثر يحافظ عليها – غالبًا – على صورة خضرية فى مستودعات الجيرمبلازم ومراكز البحوث الخاصة بها وتمثل الإصابات الفيروسية مشكلة كبيرة بالنسبة للنباتات النامية، ويتم التخلص منها بإكثار النباتات عن طريق مزارع القمة الميرستيمية. وقد يمكن حفظ جيرمبلازم هذه النباتات بالتخزين كمزرع أنسجة تحت ظروف معينة – كما سيأتى شرحه فيما بعد - بدلاً من استمرار زراعتها.

إكثار سلالات مجموعات القلب

إن أكبر مشكلة تواجه بنوك الجيرمبلازم هى كيفية تحقيق أكبر استفادة ممكنه منها من قبل أكبر عدد ممكن من المستعملين للجيرمبلازم؛ وذلك بسبب ضخامة أعداد السلالات التى يحتفظ بها فى معظم بنوك الجيرمبلازم ومن أجل ذلك .. تم تطوير ما يعرف باسم مجموعة القلب core collection، وهى مجموعة من السلالات التى تضم فيما بينها – وبأقل قدر ممكن من التكرار – أكبر قدر ممكن من التباينات الوراثية للمحصول المزروع والأنواع البرية القريبة منه. وليس الغرض من تلك المجموعات – التى تمثل خلاصة المجموعات الأصلية المحتفظ بها – ليس الغرض منها أن تحل محل

المجموعات الأصلية، وإنما أن تجعل الاختلافات الوراثيه بينها سهله المنال من قبل مستخدمى الجيرمبلازم

ومن الطبيعى أن اختيار السلالات التى يمكن أن تمثل مجموعات القلب يعتمد على ما يتوفر لدينا من معلومات عن كل سلالة من المجموعات الأصلية (عن Hamon وآخرين ١٩٩٥)

وتستخدم فى تحديد مجموعات القلب الطرق التالية:

١ - تحليل الإنزيمات الشبيهة

يستخدم تحليل الإنزيمات الشبيهة isozyme analysis كثيرا فى تحديد سلالات مجموعات القلب من بين آلاف السلالات التى يحتفظ بها وكمثال على ذلك تمكن Human وآخرون (٢٠٠٠) من اختيار ٣٠٦ سلالة من البطاطس لتمثيل مجموعة سلالات تحت النوع *andigena* المحتفظ بها فى معهد البطاطس الدولى (فى ليما بيرو) والتى تقدر بـ ٢٣٧٩ سلاله - وذلك بالاستعانة بـ ٣٨ allozyme.

٢ - المعلمات الوراثية

تستخدم المعلّمات الوراثيه genetic markers فى تحديد مدى التقارب أو البعد الوراثى بين مختلف سلالات المحصول الواحد أو النوع الواحد التى يُحتفظ بها فى بنوك الجيرمبلازم. وهى إما مُعلّمات مورفولوجية، أو سيتولوجية، أو تخص بنواتج الأيض الثانوية secondary metabolites، أو بأنواع البروتينات، أو بالدنا

ويستفاد من إخضاع مجموعات الجيرمبلازم لدراسات الجينات المُعَلّمة فى الجوانب التالية:

١ - تقدير مدى التباين الوراثى بين السلالات

٢ - تقدير مدى التقارب الوراثى بين السلالات.

٣ - توجيه سياسة إدارة مجموعات الجيرمبلازم وحفظها

٤ تحديد المستوى الأمثل لأعداد السلالات التى يتعين جمعها، وطريقة تمثيل الجيرمبلازم فيها

٥ – تحديد طريقة توصيف وتمييز الجيرمبلازم، وتقييمه

٦ – تحديد أسس اختيار مجموعات القلب core collections

٧ – تحديد سياسة التعزيز الوراثى genetic enhancement للجيرمبلازم (Bretting & Widrlechner ١٩٩٥).

تخزين البذور ذات المحتوى الرطوبى المنخفض فى الحرارة المنخفضة

تختلف الطرق المتبعة فى تخزين تقاوى المحاصيل الزراعية التى تستخدم فى الزراعة لسنة أو سنوات قليلة عن تلك التى تتبع فى حفظ الجيرمبلازم وتخزينه لسنوات عديدة، سواء أكان الجيرمبلازم على صورة بذور، أم أجزاء خضرية، أم مزارع أنسجة، أم أى جزء نباتى آخر.

ومن أهم مزايا حفظ الجيرمبلازم لفترات طويلة ما يلى:

١ – توفير نفقات إعادة زراعة السلالات على فترات متقاربة قبل أن تفقد حيويتها.

٢ – تجنب احتمالات الخلط الميكانيكى لبذور السلالات عند إعادة إكثارها.

٣ – تجنب – أو تقليل – احتمال حدوث أى تغير وراثى فى مجمع الجينات gene pool الأصلى للسلالة، الأمر الذى قد يحدث عند إكثارها من وقت لآخر (عن Stanwood & Roos ١٩٧٩).

ظروف التخزين المناسبة لمختلف فئات مجموعات الجيرمبلازم

يفضل تقسيم مجموعات الجيرمبلازم البذرية – حسب ظروف التخزين المناسبة - إلى فئتين.

أولاً: المجموعات الأساسية

تخزن بذور المجموعات الأساسية Base collections لمدة طويلة، تحت ظروف مثلى من الحرارة والرطوبة. لا تستعمل هذه المجموعات فى التوزيع، وتختبر حيويتها، على فترات منتظمة، ويجب أن يخزن من كل سلالة كمية من البذور، تكفى الاحتياجات المتوقعة منها لاختبارات الإنبات خلال فترة التخزين، ثم إعادة الزراعة حينما يحين وقت ذلك. وبرغم وجود عينات صغيرة منها لاختبارات الإنبات الدورية فإن الجزء

أكبر يبقى فى أوعية غير منفذة للرطوبة، لا تفتح إلا عند إعادة الزراعة، التى تكون عند انخفاض نسبة الإنبات إلى ٨٠- ٨٥٪ من النسبة الأصلية ويوصى بتخزين هذه البذور فى حرارة ١٨°م، أو أقل من ذلك فى أوعية غير منفذة للرطوبة، مع خفض رطوبة البذور قبل التخزين إلى ٥+١٪ على أساس الوزن الرطب، وهو ما يعنى أن هذه الطريقة لا تصلح لتخزين البذور التى تفقد حيويتها عند التجفيف كما يجب توفر اجهزة توليد كهرباء اضافية، لتعمل تلقائيًا عند انقطاع التيار.

ثانيًا المجموعات النشطة

تخزن بذور المجموعات النشطة Active collections لفترات متوسطة المدى، وهى التى تستعمل فى الإكثار، والتوزيع، والتقييم ويعد الحد الأدنى المقبول – من الظروف التى تلزم لتخزين هذه المجموعات حرارة ٥°م، مع خفض رطوبة البذور قبل التخزين إلى ٥–٧٪، وحفظها إما فى أوعية غير منفذة للرطوبة، وإما فى أوعية منفذة للرطوبة، لكن مع مراعاة إلا تزيد الرطوبة النسبية فى جو المخزن على ٤٠٪ وتحفظ بذور المجموعة النباتية – التى توجد فى مخزن البذور الوطنى فى الولايات المتحدة - على حرارة ٤°م (٤٠°ف)، مع رطوبة نسبية ٣٢٪ فى أوعية غير منفذة للرطوبة (عن Justice & Bass ١٩٧٩) كما تحفظ بذور بعض السلالات على حرارة ١٢–١٠°م تحت الصفر. فى أوعية غير منفذة للرطوبة وتختبر السلالات المخزنة كل خمس سنوات، حيث تكثر من جديد إذا وجد أن نسبه إنباتها قد انخفضت عن حد معين (Hartmann & Kester ١٩٨٣)

وسائل خفض المحتوى الرطوبى للبذور

إن من أهم متطلبات حفظ البذور لفترات طويلة فى الحرارة المنخفضة خفض محتوى البذور الرطوبى إلى نحو ٥ ٦٪، ويتحقق ذلك إما بخفض نسبه الرطوبة فى الهواء المحيط بالبذور الى أن تصل رطوبتها إلى حالة توازن مع الرطوبة النسبية للهواء، وإما برفع درجة حرارة الهواء، وتعد الطريقة الأولى هى الأكثر فاعلية والأكثر استعمالا ومن الطبيعى أن الرطوبه النسبية للهواء يجب أن تكون عند مستوى معين لكى يكون التوازن

النهائى مع رطوبة البذور عند محتوى رطوبى حوالى ٥-٦٪. وتستخدم محاليل ملحية مختلفة للمحافظة على الرطوبة النسبية فى الهواء الملامس لها عند مستوى معين، حيث يحدث التوازن فى خلال ٣٠-٤٥ يومًا (جدول ١٣-١) (Fang وآخرون ١٩٩٨)

جدول (١٣-١). الرطوبة النسبية للهواء الملامس للمحاليل المشبعة لبعض الأملاح وحامض الكبريتيك فى مختلف درجات الحرارة.

الملح	الحرارة				
	٥	١٥	٢٥	٣٥	٥٠
H_2SO_4 (<٩٩,٥٪)	١	١	١	١	١
$ZnCl_2$	٥,٥	٥ ٥	٥.٥	٥,٥	٥.٥
NaOH	٩	٨	٧	٧	٦
LiCl	١٥	١٤	١٣	١١ ٥	١١
$CaBr_2$	٢٣	٢٢	١٦,٥	١٥	١٤
$MgCl_2$	٣٣,٥	٣٣	٣٢,٥	٣٢ ٥	٣١.٥
K_2CO_3	٤٣	٤٣	٤٣	٤١,٥	٤١
$Mg(NO_3)_2$	٥٦	٥٤,٥	٥٣	٥٠,٥	٤٦
NH_4NO_3	٧٢	٦٨	٦٢	٦٢,٥	٦١
NaCl	٧٥,٥	٧٥,٥	٧٥	٧٥	٧٤,٥
KCl	٨٨	٨٦	٨٥	٨٤	٨٠,٥
KNO_3	٩٣	٩٢,٥	٩١	٩٠	٨٥

ويعتبر التجفيد freeze-drying أحد وسائل خفض المحتوى الرطوبى للبذور، إلا أنها ما زالت فى مرحلة الدراسة والبحث. يراعى عند اتباع هذه الطريقة .. أن تجفف البذور - أولاً - بالطرق العادية إلى أن تنخفض نسبة رطوبتها إلى ١٠٪ ثم تجفف بالتجفيد (أى بالتبريد إلى حرارة أقل من الصفر، مع التجفيف تحت التفريغ فى آن واحد) إلى أن تنخفض رطوبتها إلى ٥٪، ثم تخزن - بعد ذلك - فى أوعية غير منفذة للرطوبة تحتفظ البذور المجففة بهذه الطريقة بحيويتها لسنوات عديدة فى حرارة الغرفة، ولمدد غير محدودة، إذا خزنت فى حرارة التجمد (عن مجلة HortScience - العدد الثانى - المجلد ٢١ لعام ١٩٨٦).

التنبؤ بالقدرة على التخزين فى الحرارة المنخفضة

أوضح Harrington (١٩٦٣) أن معدل تدهور البذور وفقدها لحيويتها يرتبط ارتباطا مباشرا بكل من المحتوى الرطوبى للبذور ودرجة حرارة التخزين كما يلى

١ تقل فترة احتفاظ البذور بحيويتها بمقدار النصف مع كل زيادة فى محتواها الرطوبى مقدارها ١ بين ٥ ، و ١٤ ٪

٢ تقل فترة احتفاظ البذور بحيويتها بمقدار النصف مع كل ارتفاع فى حرارة التخزين مقداره ٥ م بين صفر، و ٥٠ م

وقد صور اختبار الإسراع بالتدهور accelerated aging test للتنبؤ بمدى القدرة التخزينية للبذور وفى هذا الاختبار تحفظ البذور فى حرارة ٤٠ ، ٤٥ م ورطوبة نسبية تزيد عن ٩٠ لمدة ٢ ، ٥ أيام، ثم تختبر حيويتها وتقارن النتائج ببذور من نفس الوسط لم تعرض لاختبار الإسراع بالتدهور

ويستخدم فى بنوك الجيرمبلازم اختبار آخر للتنبؤ بطولات البذور التى يمكن أن تبدأ بالتدهور، ما يعرف باسم اختبار "التدهور غير الطبيعى" artificial aging، وفيه ترفع رطوبة البذور إلى أعلى من ١٤ ٪ والرطوبة النسبية إلى حوالى ٧٥٪ (لتجنب نمو الأعفان على البذور) وترفع الحرارة إلى أقل من ٣٥ م، وذلك لعدة أسابيع أو شهور (عن Roos ١٩٨٩)

وقد أوضحت الدراسات عدم الحاجة إلى تخزين البذور تحت تفريغ فى بنوك حفظ الجيرمبلازم (Tao ١٩٩٢)

وكما أظهرت الدراسات الحديثة أن بذور بعض الأنواع النباتية وخاصة تلك الغنية بالدهون - يمكنها الاحتفاظ بحيويتها لفترات طويلة إذا ما حفظت رطوبتها الى أقل من نسبة ٥ ٪ التى يوصى بها عادة، ويختلف الحد الأدنى للرطوبة - مدى لا يفيد معه زيادة خفض الرطوبة فى زيادة فترة التخزين باختلاف الأنواع

ويمثل على ذلك وجد فى *Brassica napus* (نبات الزيت) أن فترة احتفاظ البذور بحيويتها ازدادت ١٢ مرة عندما جففت إلى ٣ ٪ محتوى رطوبى بدلا من ٥ ٪ وأن خفض محتوى البذور الرطوبى من ٥ إلى ٢ ٪ أعطى تأثيرا على مدة احتفاظ البذور

بحيويتها مماثلاً لخفض حرارة التخزين من +٢٠°م إلى -١٠°م ويعنى ذلك أنه قد يصبح بالإمكان عن طريق الخفض الشديد لرطوبة البذور إمكان تخزينها فى مجمدات الثلاجات العادية بدلا من النيتروجين السائل (Holden وآخرون ١٩٩٣)

اختبارات إنبات البذور

تُجرى اختبارات إنبات بذور الجيرمبلازم المخزنة - على فترات - فى ظروف تختلف باختلاف كل نوع نباتى، وذلك تبعًا للقواعد الدولية أو المحلية فى هذا الشأن وستمر الاختبارات الدورية على كل لوط من البذور حتى ينخفض عدد البذور المتبقية منه إلى حد معين، أو إذا لم يزدد عدد البذور النابتة عن حد معين (كما فى جدول ١٣-٢)، حيث يتعين - حينئذ إكثار اللوط وتجديد مخزونه

جدول (١٣-٢) نتائج اختبارات متتابعة لإنبات البذور المخزنة (٤٠ بذرة فى كل اختبار) وماذا يعنى ذلك ؟ (تجب إعادة الزراعة لأجل تجديد مخزون البذور عندما تقل الحيوية عن ٨٥%) (عن Holden ١٩٩٣).

عدد البذور المختبرة	إذا كان عدد البذور النابتة		
(العدد المتجمع)	لا يزيد عن	فى حدود	لا يقل عن
٤٠	٢٩	٣٠-٤٠	—
٨٠	٦٤	٦٥-٧٥	٧٦
١٢٠	١٠٠	١٠١-١١٠	١١١
١٦٠	١٣٥	١٣٦-١٤٥	١٤٦
٢٠٠	١٧٠	١٧١-١٨٠	١٨١
	↓		
	يلزم تجديد مخزون البذور	استمر فى اختبار الإنبات	استمر فى التخزين

اختبارات قوة البذور

يستخدم لتقدير قوة البذور seed vigor عددًا من الاختبارات، منها ما يلى

١ - اختبار الإسراع بالشيخوخة accelerated aging

٢ - اختبار الشيخوخة المتحكم فيها controlled aging

يتم فى هذا الاختبار جعل البذور تتشرب بالماء جزئيًا – إلى مستوى رطوبى يحدد سلفًا بوضعها على ورق ترشيح مبلل بالماء ويتم تقدير المحتوى الرطوبى فى هذه الطريقة بوزن البذور على فترات متقاربة خلال تشربها ويلى ذلك وضع البذور فى عبوة محكمة إغلاقها وتترك لمدة ٢٤ ساعة فى حرارة ١٠°م؛ ليحدث فيها نوع من التوازن الرطوبى بين مختلف أجزاء البذرة، وبين مختلف البذور، ويلى ذلك نقلها إلى حمام مائى على ٤٥°م لمدة يوم كامل، ثم يختبر إنبات البذور بعد ذلك على ٢٠°م

٣ اختبار الإنبات البارد cold germination test

يستخدم هذا الاختبار أساسا فى التنبؤ بإنبات بذور الذرة تحت ظروف الحقل، ويستعان فى إجرائه بتربة تؤخذ من حقول الزراعة، حيث يتأثر الإنبات بكل من الحرارة المنخفضة والكائنات الدقيقة التى توجد طبيعيًا فى التربة

٤ - اختبار التوصيل الكهربائى conductivity test

يعتمد اختبار التوصيل الكهربائى على ازدياد التسرب الأيونى من البذور أثناء تشربها بالماء كلما ازداد تدهورها، وذلك بسبب ما يلحق بالأغشية الخلوية من أضرار

٥ – اختبار معدل نمو البادرات الصغيرة عند الإنبات (عن Roos ١٩٨٩)

النظريات التى قدمت لتفسير تدهور البذور أثناء التخزين

يمكن استنفاذ الغذاء المخزن بالتنفس من أوائل النظريات التى قدمت لتفسير تدهور البذور المخزنة، إلاّ أن ما يفقد من غذاء لا يكون أبدًا بدرجة يمكن أن تؤثر على حيوية البذور، ولا شك أن كثيرا جدًا من البذور التى تفقد حيويتها تكون مازالت ممتلئة بالغذاء

ومن أهم النظريات التى قدمت لتفسير تدهور البذور أثناء تخزينها، ما يلى

١ حدوث تغيرات فى المحتوى الكيميائى للبذور، مثل تجلط البروتين وتحلله، وتأكسد الدهون وزيادة حموضتها

٢ – تدهور الأغشية الخلوية، ومما يدل على أهمية ذلك زيادة التسرب الايونى من

البذور التى تفقد حيويتها – عند تشربها بالماء – عما فى البذور المحتفظة بحيويتها. ويحدث هذا التدهور فى الأغشية الخلوية – غالبًا – بسبب أكسدة الأحماض الدهنية التى توجد ضمن تركيبها.

٣ الأضرار الوراثية

تحدث فى البذور المخزنة كثيرا من التحورات الكروموسومية، كما تكون عرضة لتراكم الطفرات بها (Roos ١٩٨٩)

ظروف تخزين بذور الجيرمبلازم فى مراكز ومؤسسات المجلس الدولى للثروة الوراثية النباتية

تخزن البذور فى المراكز والمؤسسات التابعة للمجلس الدولى للثروة الوراثية النباتية IBPGR – حسب مدة التخزين المتوقعة – كما يلى:

أولاً التخزين طويل الأمد

عندما يكون التخزين طويل الأمد long-term storage فإنه لا يتوقع إعادة إكثار البذور وتجديدها قبل مضى ١٠–٢٠ سنة – على الأقل – على تخزينها.

وتكون ظروف التخزين، كما يلى:

١ – تجفف البذور إلى ٥٪ محتوى رطوبى بتركها تتوازن فى جو يحتوى على ١٠–١٥٪ رطوبة نسبية على ١٥°م.

٢ – تخزن البذور على –١٨°م أو أقل من ذلك.

٣ – تكون تعبئة البذور فى أوعية غير منفذة للرطوبة زجاجية أو معدنية لا تصدأ أو ألومنيومية

٤ – يتراوح حجم العينات المخزنة بين ٤٠٠٠ بذرة للعينات المتجانسة وراثيًا إلى ١٢٠٠٠ بذرة للعينات غير المتجانسة

٥ - تجرى اختبارات الإنبات كل عدة سنوات مع استعمال ٢٠٠ بذرة فى كل اختبار

٦ – يعاد تجديد البذور وإكثارها عندما تنخفض نسبة الإنبات عن ٨٥٪.

ثانيًا التخزين متوسط الأمد

عندما يكون التخزين متوسط الأمد medium-term storage فإنه لا يتوقع إعادة إكتار البذور وتجديدها قبل مضى ٥-١٠ سنوات على تخزينها

وتكون ظروف التخزين، كما يلى.

١ - تخفض رطوبة البذور إلى ٥٪.

٢ تحفظ البذور فى أوعية غير منفذة للرطوبة، أو أوعية غير محكمة الإغلاق، ولكن مع عدم زيادة الرطوبة النسبية فى المخازن عن ٣٥٪

٣ - يكون التخزين على صفر إلى ١٠°م

٤ - يتوقف حجم العينة المخزنة على التوزيع المتوقع لها

ظروف تخزين بذور الجيرمبلازم فى مخزن البذور الوطنى الأمريكى

تتم فى مخزن البذور الوطنى National Seed Storage Laboratory الأمريكى مراعاة ما يلى

١ - تجفيف البذور إلى ٦٪ رطوبة فى حجرات تتراوح رطوبتها بين ٥٪، و ١٠٪ على ٥ °٨م

٢ - يكون التخزين على -١٨°م. وقد يكون فى النيتروجين السائل

٣ - تعبأ البذور فى أكياس من الأغشية الألومنيومية أو المصنوعة من أغشيه البوليثيلين

٤ - يتراوح حجم العينات بين ١٥٠٠، و ٣٠٠٠ بذرة للسلالات النقية، و ٣٠٠٠-٤٠٠٠ بذرة لسلالات المحاصيل الخلطية التلقيح

٥ - تجرى اختبارات الإنبات كل ٥-١٠ سنوات على ٥٠ أو ١٠٠ بذرة فى كل مرة (عن Roos ١٩٨٩)

ظروف تخزين بذور الجيرمبلازم فى بنك الجينات الجرمانى (الاسكندنافى)

تدير الدول الإسكندنافية الخمس (الدانمرك، وفنلندا، وأيسلندا، والنرويج، والسويد)

بنكاً للجينات (يعرف باسم Nordic Genebank) يقع فى موقع لنجم مهجور فى جزيرة Svalbard عند خط عرض ٨٠° شمالا، أى داخل دائرة القطب المتجمد الشمالى. حيث تبلغ درجة الحرارة داخل المنجم - ٤°م ± ١ ٠°م على مدار العام وعلى الرغم من أن تلك الدرجة أعلى من المثلى إلاّ أنها تعد مقبولة؛ بسبب عدم الحاجة إلى تشغيل أجهزة تبريد، مع الأمان التام وضمان استمرار حرارة التبريد (عن Holden ١٩٩٣)

تخزين بذور الجيرمبلازم فى النيتروجين السائل

لا يوجد أى ضرر يمكن أن يحدث للبذور عند تعرضها لدرجات الحرارة الشديدة الانخفاض حتى لو خزنت على درجة الحرارة المطلقة (وهى -٢٧٣°م) مادام محتواها الرطوبى منخفضا، كما فى البذور العادية orthodox seeds، أما البذور ذات المحتوى الرطوبى المرتفع فإنها تضار بشدة إذا تعرضت لدرجة التجمد، ويتناسب مدى الضرر الحادث طرديًا مع نسبة الرطوبة فى البذور، ويظهر فى صورة تدهور شديد فى نسبة الإنبات؛ وبذا فإن هذه الطريقة لا تصلح لتخزين البذور التى تفقد حيويتها عند التجفيف، والتى تعرف باسم recalcitrant seeds؛ كبذور الموالح، والبن، والكاكاو، والمطاط، ونخيل الزيت، وجوز الهند، وإن كانت هناك استثناءات لتلك القاعدة سوف نتناولها بالشرح لاحقا فى هذا الفصل

عند استخدام النيتروجين فى حفظ الجيرمبلازم فإن ذلك يكون إما وهو فى الصوره السائلة (حرارة الغليان ١٩٦°م)، وإما فى محيط البخار الذى يعلو الصورة السائله، والذى تكون حرارته حوالى -١٨٠°م؛ علما بأنه فى حرارة -١٩٦°م تتوقف كل العمليات الحيوية التى تقود إلى تدهور حيوية البذور، فإذا تحملت بذور أى نوع نباتى التعرض لهذه الدرجة الحرارية ولو لفترة قصيرة – ثم تحملت تدفئتها إلى درجة حرارة الغرفة بعد ذلك، فإنها يمكن أن تُحفظ بحالة جيدة فى النيتروجين السائل لفترات غير محدودة

ولتخزين البذور فى النيتروجين السائل .. تجب مراعاة ما يلى:

١ تجفف البذور أولا – إلى درجة منخفضة من الرطوبة (حوالى ٥٪ على أساس الوزن الرطب)

٢ - توضع البذور فى أوعية ألومنيومية، أو بلاستيكية ذات غطاء

٣ - نغمس الأوعية - بما فيها من بذور - فى النيتروجين السائل

٤ - تنقل الأوعية - بما فيها من بذور - بعد انتهاء فترة التخزين، من النيتروجين السائل إلى جو الغرفة مباشرة دون المرور بمراحل وسطية من درجات الحرارة (عن Sakai & Noshiro ١٩٧٥)

وقد قام Stanwood & Roos (١٩٧٩) بتخزين بذور ١٤ نوعًا من الخضر فى النيتروجين السائل لمدة أسبوع، وشهر، وستة شهور - وهى فى أكياس ورقية - وتراوحت نسبة الرطوبة فى البذور المخزنة من ٥٪ إلى ٩٪ وقد تبين من النتائج التى حصل عليها (جدول ١٣- ٣) أن تخزين البذور فى النيتروجين السائل. ثم إعادة إخراجها منه لم يكن له أى تأثير ضار على نسبة الإنبات، كما لم تتأثر نسبة إنبات البذور بعد تخزينها لمدة ستة شهور وقد قام الباحثان كذلك بدراسة تأثير حفظ بذور الفاصوليا، والبسلة، والخس فى النيتروجين السائل لمدة أسبوع على قود الإنبات Vigor، ولم يجدا أى تأثير للمعاملة على وزن السويقة الجنينية العليا epicotyl، أو وزن البادرة بعد ثمانية أيام من بدء اختبار الإنبات

وقد قدرت تكلفة حفظ الجيرمبلازم على المدى الطويل (لمدة ١٠٠ سنه) فى النيتروجين السائل بنحو ٢٥٪ من تكلفة حفظة فى حرارة -١٨°م، مع ما يتطلبه ذلك من اختبارات الإنبات وتجديد للبذور على فترات (عن Roos ١٩٨٩)

ولمزيد من التفاصيل عن مساكل حفظ الجيرمبلازم فى النيتروجين السائل يراجع Sakai & Nashiro (١٩٧٥)

ولمزيد من التفاصيل عن حفظ الجيرمبلازم بتخزين البذور فترات طويلة فى الحرارة المنخفضة - بصورة عامة - يراجع Harrington (١٩٧٠)، و Roberts (١٩٧٥)، و Bass (١٩٨٠)

جدول (١٣-٣): تأثير تخزين بذور بعض محاصيل الخضر فى النيتروجين السائل على نسبة الإنبات

المحصول	رطوبة البذور (٪)	نسبة الإنبات الأولية (٪)	الإنبات (٪) بعد الحفظ فى النيتروجين السائل لمدة أسبوع	شهر	٦ شهور
الفاصوليا	٧	١٠٠	—	١٠٠	—
البنجر	٦,٣	٩٦	٩٦	٩١	—
الكرنب	٦,٢	٩٨	٩٤	٩٥	٩٢
القاوون	٥	٩٠	٨٩	٨٩	٩٢
الجزر	٦,١	٨٧	٨٢	—	—
الخيار	٥,١	٩٥	٩٤	٩٥	٩٢
الباذنجان	٦,٢	٩٥	٩٥	٩٤	٩٢
الخس	٨,٠	٩٩	٩٩	٩٩	—
البصل	٦,٢	٩٨	٩٩	٩٩	٩٨
البسلة	٧,٢	٩١	—	٩٦	—
الفلفل	٦,٢	٩٣	٩١	٩٥	٩٣
الكوسة	٦,٧	٨٢	٧٣	٧٧	٧٩
الطماطم	٥,٣	٩١	٩٦	٩٢	٩٣
البطيخ	٩	٩٤	٩٥	—	—

تخزين بذور الجيرمبلازم ذات المحتوى الرطوبى المرتفع فى الحرارة المنخفضة

إن من أهم مشاكل حفظ البذور ذات المحتوى الرطوبى المرتفع recalcitrant seed. ما يلى

١ – الأضرار التى تنشأ نتيجة فقدها للرطوبة

٢ – أضرار البرودة التى تحدث مع المحتوى الرطوبى المرتفع.

٣ – أضرار النموات الميكروبية التى تزداد احتمالات حدوثها مع المحتوى الرطوبى المرتفع (Towill ١٩٨٩).

هذا إلا أنه أمكن حفظ البذور ذات المحتوى الرطوبى المرتفع فى النيتروجين السائل بالاستعانة بالـ cryoprotectants (Roos ١٩٨٩).

كذلك امكن حفظ بذور الـ lychee (*Litchi chinesis*)، والـ longan (*Dimocarpus longan*) وكلاهما recalcitrant أمكن حفظهما لفترات طويله بلغت ١٢ أسبوعا (مع الحصول على ٩٢٪ إنبات)، و ٧ أسابيع (مع الحصول على ٧٠٪ إنبات) للنوعين على التوالى – فى ٨٠٪ N_2O (nitrous oxide) + ٢٠٪ أكسجين، مقارنة بنسب إنبات بلغت ٤٤٪، وصفر٪ للنوعين على التوالى – عندما خزنت بذورهما لنفس الفترات فى الهواء (Sowa وآخرون ١٩٩١)

وتجدر الإشارة – فى هذا المقام – الى أن بذور بعض النباتات يمكن أن تحتفظ بحيويتها لفترات طويلة وهى منبعة بالماء imbibed، مع حفظها فى ظروف لا تسمح باستمرار الإنبات ويحاول الإنسان - بذلك - محاكاة الطبيعة حينما تتتبع البذور التى توجد تحت أشجار الغابات بالماء، ولكنها لا تباشر الإنبات، لوجودها تحت غطاء سميك من البقايا النباتية غير المتحللة والمتحللة جزئيًا، ولكثافة الغطاء النباتى الذى يقلل كثيرا من وصول الضوء إليها وربما تصلح هذه الطريقة لتخزين بذور الأنواع النباتية التى يتدهور انباتها عند تجفيفها، إلا أن تلك الطريقة لا تتبع – إطلاقا – فى حفظ الجيرمبلازم فى الوقت الحالى. ولمزيد من التفاصيل عنها يراجع Villiers (١٩٧٥)

حفظ جيرمبلازم النباتات الخضرية التكاثر

تتبع عدة طرق فى حفظ جيرمبلازم النباتات التى تتكاثر خضريًا، منها ما يلى

الإكثار الخضرى

يتطلب حفظ الجيرمبلازم – بطريق الإكثار الخضرى – إعادة زراعة السلالات الخضريه سنويًا بالنسبة للمحاصيل الحولية مثل البطاطس، وكل عدة سنوات بالنسبة للمحاصيل المعمرة وفضلا عن أن هذه الطريقة تعد مكلفة للغاية، وتتطلب جهدا كبيرا، ومساحات كبيرة لتنفيذها فإن الجيرمبلازم يتعرض للإصابة بالأمراض الفيروسية التى تلازمه بعد ذلك، مما يتطلب جهودا كبيرة إضافية للمحافظة عليه

تخزين الطعوم

يمكن تخزين الطعوم scion، التى تؤخذ من السلالات الخضرية فى حرارة، تتراوح

بين الصفر، و ٥°م، ولكن يعاب على هذه الطريقة أن فترة التخزين لا تدوم سوى بضعة شهور، أو سنوات قليلة.

تخزين بذور السلالات الخضرية

برغم أن البذور الحقيقة (الجنسية) لا تعطى – عند زراعتها – نباتات مشابهة للسلالات الخضرية التى أخذت منها . إلا إنها تحتوى على جميع الجينات، التى يظهر تأثيرها فى السلالة الخضرية وتتبع هذه الطريقة – حاليًا – فى حفظ سلالات بعض المحاصيل الخضرية التكاثر مثل البطاطس ولقد وجد Barker & Johnston (١٩٨٠) أن بذور البطاطس الحقيقية يمكن تخزينها لمدة ١٠ سنوات تحت الظروف العادية، دون أن يحدث لها أى نقص فى نسبة – أو قوة – الإنبات، كما ظلت نسبة إنبات البذور عالية بعد ١٥–٢٠ سنة من التخزين، إلا أنها كانت أبطأ فى الإنبات، وأقل فى قوة نمو البادرات. وكما هى الحال بالنسبة لبذور النباتات التى تتكاثر جنسيًا فإن بذور السلالات الخضرية يمكن أن تُخزَّن فى النيتروجين السائل لأمد بعيد.

وتتميز طريقة حفظ جيرمبلازم النباتات الخضرية التكاثر بتخزين البذور بسهولتها وقلة تكلفتها، كما تفيد فى التخلص من العدد الأكبر من الفيروسات التى تصيبها، إذ لا تنتقل بطريق البذور سوى نسبة قليلة جدًا من الفيروسات، بالإضافة إلى سهولة نقل الجيرمبلازم بهذه الطريقة من دولة إلى أخرى (Foldo ١٩٨٧)

تخزين حبوب اللقاح

تتميز حبوب اللقاح بتحملها لظروف التخزين سواء أكانت فى حرارة –٢٠°م، أم فى النيتروجين السائل على حرارة –١٩٦°م، وهى وسيلة سهلة وبسيطة لحفظ جيرمبلازم مختلف الأنواع النباتية سواء أكانت جنسية، أم خضرية التكاثر كما أن حبوب لقاح بعض الأنواع – مثل الطماطم (Sacks & Clair ١٩٩٦) – تتحمل التجميد على –٨٠°م ثم التدفئة إلى ٢٢–٢٤°م ست مرات دون أن تتأثر حيويتها

ويعاب على الاعتماد على حبوب اللقاح - فى حفظ الجيرمبلازم – أنها لا تمثل سوى نصف الجينات التى يحملها الفرد، فهى لابد أن تستخدم فى تلقيح نباتات

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

وإضافه إلى ما تقدم بيانه من وسائل لحفظ جيرمبلازم النباتات الخضريه 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 الخضريه التكاثر

وتعد مزارع القمة النامية المرستيمية 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 سريعا فى البدايه إلا أنه يصبح بطئًا 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 شهرا، 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 ٢م٢، مقارنة بالحاجة إلى نحو هكتار من الأرض (٢٣٨ 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 (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 نباتا جديدًا فى غضون ٥٠ يومًا، ثم تنقل – بعد ذلك – إلى حرارة ٩°م، حيث يقل معدل نموها تدريجيًا 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 الطريقه، مع إعادة زراعتها فى بيئة جديدة سنويًا

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 شهريًا، وهذا يعنى أنه يمكن إنتاج أكثر من ١٠ مليون نبت 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 لإصابة 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 سيقانا 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 ٨٠ ملى مكافئ/لتر فى بيئة White، و ٢١ ملى مكافئ/لتر فى بيئه Gautkeret، وهى بيئات تستعمل فى مزارع الأنسجه 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، والأفحوان) 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 gr th 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 شهرا 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 فمثلا 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 نسبيًا (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)

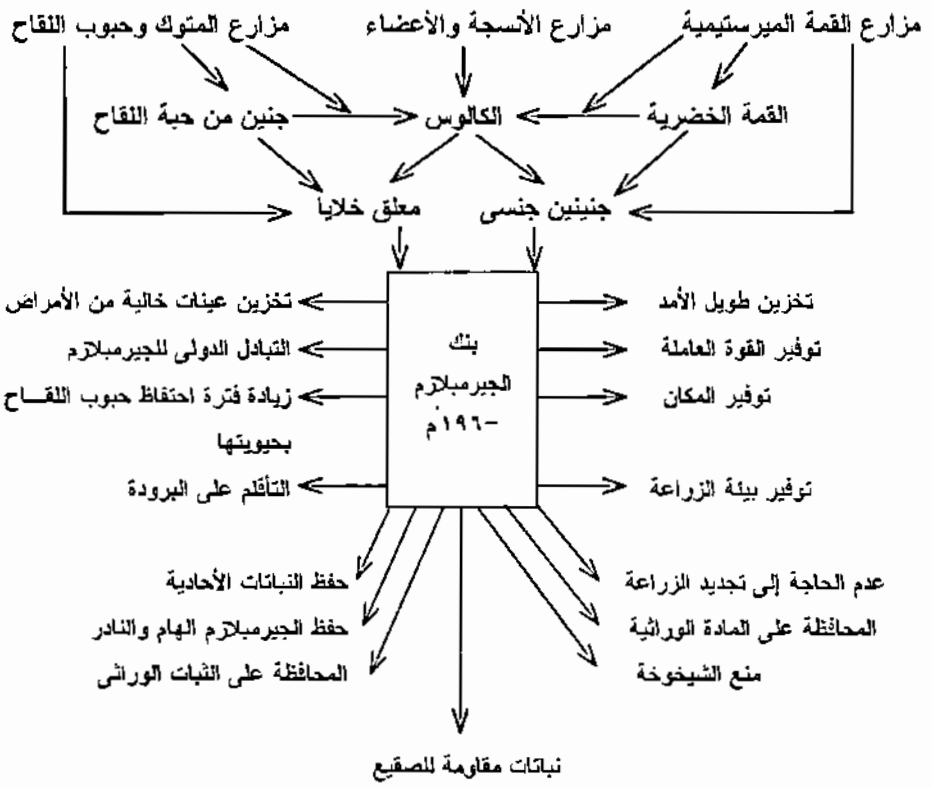
٦ – التخزين فى النيتروجين السائل:

يعد التخزين فى النيتروجين السائل على –١٩٦°م هو الطريقة الوحيدة الفعالة لتخزين مزارع الأنسجة والخلايا لأمد طويل (عن Baja 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 ونظريًا 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 لسوك الجيرمبلازم (عن Bajaj ١٩٩٥).

ومن الطبيعى أنه يلزم توفير مصدر دائم للنيتروجين السائل (وهو رخيص 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، والبنغ، وغيرها

مزايا التخزين فى النيتروجين السائل

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

١ – حفظ البايناب الوراثيه الجسمية والجاميطية التى تظهر فى المزارع

٢ – حفظ التجانس الوراثى للسلالات الخضرية من النبتات 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، وتبادل 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 النبتات التى لا تتوافق فى مواعيد إزهارها

ب – إجراء التهجينات بين النباتات التى تنمو فى أماكن مختلفه وبعيده 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 لأربعه أنواع بتبريدها ببطء، بمعدل 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 منتبذ . وإما فى صورة كالوس، وقد كانت أفضل المواد الحامية خليطا من البلولينيين جلبكوز، و لجلوكوز، والـ dimethylsulfoxide.

٢ لتجميد السريع

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

٣ – التبريد التدريجى، ثم السريع:

يكون من المفضل - أحيانا – تبريد المزارع بمعدل درجة مئوية أو خمس درجات متوية 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 الثلجيه فى الخلايا

٤ التجميد على خطوات

يجرى التجميد على خطوات بخفض الحرارة إلى –٢٠°م، ثم إلى –٥٠°م، ثم الى –٧٠°م، تم 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 بالنسبه لجميع الأنواع النباتية، الاّ أن التفاصيل الدقيقة لكيفية إجراء تلك الخطوات تختلف من محصول لآخر. ويمكن – على سبيل المثال – الرجوع إلى تلك التفاصيل بالنسبة لأكثر من ٤٠ نوعا 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 المختلفه من مزارع الأنسجة والخلايا التى أمكن حفظها فى النيتروجين السائل فى مختلف الأنواع النباتية كذلك يمكن الرجوع إلى Henshaw واخرين (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 شيوعا 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 استعمالا الـ DMSO، كما قد يستعمل الجليسرول glycerol إما منفردًا، وإما مع الـ DMSO، إلا أن الـ DMSO هو الأكثر كفاءة والأكثر استعمالا 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 تماما 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 بأنه تلعب دورا 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 التجميد

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 لمواد التى تحميها من الحرارة الشديدة الانخفاض cryoprotectants، ويفيد ذلك فى لإسراع بعملية التبريد دونما حاجة إلى التبريد البطئ الموقوت باستعمال منظمات حرارية cryostats ويلغى التزجج التام أية فرصة لحدوث أضرار من بلور الثلج بين لخلايا أو داخلها وفى الحقيقة فإن التزجج هو عملية تكوين ماده صلبه غير متبلورة سبيهه بالزجاج عند نقطة التجمد لمحلول مائى وفى الحرارة المنخفضة بما فيه لكفاية، يصبح محلول الـ cryprotective المركز عالى الكثافه إلى درجة أنه يتصلب إلى حالة مستقرة شبيهة بالزجاج ويكون الهدف هو الحصول على تركيز عال من المحلول كاف لمنعه من التجمد فى صوره ثلج مبلور عند تبريده، وتأكيد تحوله إلى الصورة الزجاجية غير المتبلورة

تغلف الاجنة

يعرف تغليف الأجنة باسم "كبسلة" أى وضعها فى كبسولة encapsulation، أو تغطيتها بالألجينيت alginate coating فمثلا يتم فى الجزر تغليف الأجنة الجسيمة بالألجينيت، ثم تترك فى ١٠،٢٪ 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 كثيرا

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 لأجل 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 النسطة رقيقة الجدر وممتلئه 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 والعلبية التشكل heart-shaped تكون أكثر قدرة على التحمل

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

٥ - تباين 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 بيئه 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 – تباين 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 تدهورا 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)

التغيرات الوراثية المصاحبة لتخزين الجيرمبلازم

يصاحب تخزين الجيرمبلازم عادة نوعان من التغيرات الوراثية، هما التغيرات الوراثية التي تحدث بشكل تلقائي، مثل الطفرات العاملية، والتحورات الكروموسومية، والتغيرات التي تحدث في الجينات gene pool، نتيجة للتأقلم الوراثي، والانحراف الوراثي genetic drift، وما قد ينتج عنها من تغيرات في نسب الجينات، أو فقدان بعضها.

الطفرات العاملية

تعد الطفرات العاملية مفيدة، وتسهم في زيادة التباين الوراثي في الجيرمبلازم، ويزداد تراكم الطفرات في البذور التي تخزن لفترات طويلة.

التحورات الكروموسومية

يحدث استبعاد تلقائي لحالات التحورات الكروموسومية، لفشل الانقسام الطبيعي في الخلايا التي تحدث فيها تلك التحورات، وبذا فإن النباتات التي توجد فيها هذه التحورات لا تشترك - غالبا - في إنتاج البذور للجيل التالي.

الانحراف الوراثي

يحدث الانحراف الوراثي genetic drift نتيجة لاستعمال عينات صغيرة من البذور في إكثار سلالات الجيرمبلازم المخزنة، ويسهم هذا الانحراف بشكل خطير في تغيير نسب الجينات في العشيرة، وهو أمر يجب تجنبه تماما.

فمن المعلوم أنه يتعين إعادة إكثار الجيرمبلازم البذرى لمخزن كل عدة سنوات، وقبل أن تفقد البذور حيويتها، أو قبل أن يفنى المخزون منه (الذى ينخفض نتيجة للتوزيع واستهلاكه في اختبارات الإنبات)، وهي العملية التي تعرف باسم germplasm regeneration ومن الأهمية بمكان أن يستعمل في عملية اعادة الإكثار ما يكفي من البذور للحصول على ٥٠ - ١٠٠ نبات من كل سلالة (لأجل منع الانحراف الوراثي genetic drift)، تم زرعها قدر المستطاع في بيئات مماثلة لتلك التي جمعت منها (لأجل منع الانتخاب الطبيعي natural selection) ويحدث الانحراف الوراثي

بصورة عشوائية عندما تكون عينة الإكثار صغيرة ولا تمثل فيها كل آليلات مختلف جينات السلاله (عن Singh ١٩٩٣)

هذا .. وقد يحدث الإنحراف الوراثى genetic drift فى أى من مراحل الإكثار التالية:

١ – مرحلة الإنبات:

قد تختلف البذور وراثيًا فى أى من

أ – طول فترة احتفاظها بحيويتها، ويلزم لتجنب ذلك إجراء اختبار الإنبات قبل أن ينخفض إنباتها إلى أقل من ٨٥٪.

ب سكونها، ويلزم لتجنب ذلك كسر سكون البذور بأى معاملة مناسبة

٢ – مرحلة البادرة والنمو الخضرى:

قد تختلف البادرات وراثيًا فى القدرة عل البقاء لأى من الأسباب التالية.

أ – التفاعل مع العوامل الجوية والأرضية، ويلزم لذلك إجراء الإكثار فى بيئة مماثلة لتلك التى جمعت منها البذور، أو تحت ظروف متحكم فيها.

ب – القابلية للإصابة بالأمراض والآفات، ويلزم لذلك الحماية من الإصابة بالمعاملة بالمبيدات.

جـ – التنافس، ويلزم لذلك زراعة النباتات على مسافات واسعة عند إكثارها

٣ – مرحلة النمو الزهرى والثمرى

قد تختلف النباتات وراثيًا فى قدرتها على إنتاج الأزهار، وحبوب اللقاح، والبذور، ويلزم لذلك الزراعة بطريقة تضمن إنتاج أكبر قدر ممكن من البذور من كل نبات، ثم حصاد كمية متساوية من البذور من كل منها

٤ – مرحلة الحصاد، والدراس، والتجفيف، والتعبئة

قد تختلف النباتات وراثيًا فى موعد نضج بذورها وانتثارها، ويلزم لذلك حصاد الرؤوس كل على انفراد فى المرحلة المناسبة من اكتمال التكوين حتى لا تفقد البذور بالانتثار.

٥ التحزين

قد يؤثر تخزين البذور التى تختلف فى مدى اكتمال تكوينها قد يؤثر ذلك فى مدى احتفاظها بحيويتها أثناء التخزين (عن Holden وآخرين ١٩٩٣)

التأقلم الوراثى

يعرف التأقلم الوراثى Acclimatisation. أو genetic adaptation – فيما يتعلق باستخدامات الجيرمبلازم والاستفادة منه – بأنه التغير الوراثى الذى يطرأ على "تركيب" (المجمع الوراثى genetic pool) عشيرة الجيرمبلازم تحت تأثير العوامل البيئية السائدة فى المنطقه التى أدخل إليها وبداية فإن العوامل البيئيه لا تحدث فى الجيرمبلازم أى تغيرات وراثية. كما أن التغيرات المشار إليها ليست مستحدثة، وإنما هى كانت متواجدة أصلا فى العشيرة وفى مثل تلك الحالات التى يحدث لها تأقلم وراثى يكون سلوك عشيرة الجيرمبلازم سيئًا خلال السنوات الأولى من إدخاله، ولكنه يبدأ فى التحسن ويصبح أكثر إنتاجية بعد ذلك وحقيقة ما يحدث فى تلك الحالات أن العشيرة التى يحدث لها تأقلم وراثى تكون غير متجانسة وراثيًا heterogenous فى بداية الأمر (وقت جمعها من بيئتها الأصيله)، ومع تعرضها للظروف البيئية الجديدة فإن التراكيب الوراثية التى لا تجود فى تلك الظروف تكون أقل قدرة على البقاء والمنافسة مع التراكيب الوراثية المتأقلمة على تلك الظروف، مما يؤدى إلى اختفائها تدريجيًا، فى الوقت الذى تزداد فيه فى تلك العشيرة نسبة التراكيب الوراثية المتوافقه على الظروف البيئة السائدة، ومن ثم تصبح عشيرة الجيرمبلازم اكثر تأقلمًا

وتتوقف كفاءة عملية التأقلم على العوامل التالية:

١ – مدى عدم تجانس العشيرة الأصلية وراثيًا

٢ – طريقه التلقيح السائدة فى المحصول، حيث تزداد كفاءة التأقلم بزيادة نسبة التلقيح الخلطى

٣ - فترة دورة حياه النوع النباتى، حيث ترتبط كل درجة من التأقلم باستكمال النبات لدورة من حياته

٤ – مقدار الشدّ البيئى الذى يمكن أن تتعرض له العشيرة الجديدة، والذى لا يمكن بدونه حدوث أى تأقلم (Chopra ٢٠٠٠)

ولمزيد من التفاصيل عن التغيرات الوراثية المصاحبة لتخزين الجيرمبلازم يراجع Roos (١٩٨٨)

مصادر إضافية

سبقت الإشارة إلى عديد من المصادر التى تتناول شتى جوانب عملية استكشاف الجيرمبلازم وجمعه، وتقييمه، وتوثيقه، وحفظه، وبالإضافة إلى ما تقدم فإن المراجع التالية تتناول الموضوع بشكل عام، وتغطى كافة جوانبه، ويفيد الرجوع إليها فى معرفة المزيد من المعلومات، وهى. Frankel & Bennett (١٩٧٠)، و Creech & Reitz (١٩٧١)، و Frankel & Hawkes (١٩٧٥)، و Hawkes (١٩٨٣). و Prescott-Allen & Prescott-Allen (١٩٨٨)، وASHS (١٩٨٨)، و Brown وآخرون (١٩٨٩)، و Holden وآخرون (١٩٩٣)، و Virchow (١٩٩٩)، و Cooper وآخرون (٢٠٠١)، و Engels وآخرون (٢٠٠٢).