الفصل السادس

الإكثار الدقيق

تمهيد

يتم إكثار السلالات الجديدة من المحاصيل التى لا تتكاثر جنسيًا، إما خضريًا Vegetatively وإما لاإخصابيًا Apomictically، وتفيد كلتا الطريقتين فى إنتاج سلالات متجانسة تمامًا ومشابهة للأصل الذى توصل إلية المربى، والذى استخدم فى الإكثار. ويعطى الإكثار الخضرى سلالات خضرية Clones، بينما يعطى الإكثار اللاإخصابى سلالات لاإخصابية Apomictic Lines.

ويعاب على التكاثر الخضرى أن إنتاج أعداد كبيرة من نباتات الصنف الجديد تصلح للزراعة التجارية على نطاق واسع يستغرق عدة سنوات، لا يستفاد 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 — مقارنًا 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 كثيرًا من الأنواع النباتية لا تنتج بذورًا 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

إن تطبيق تقنيات مزارع الأنسجة على برامج تربية وتحسين النباتات يعتمد أساسا على توفر التقنيات التى تلزم لتجديد نمو نباتات كاملة من تلك المزارع. ويعرف الإكثار النباتى من خلال مزارع الأنسجة باسم الإكثار الدقيق micropropagation وتعد النباتات التى تنتج بتلك الطريقة — وهى مازالت فى المزارع — مجرد صورة مصغرة جدًا (منمنمة) للنباتات العادية

وقد بدأ استخدام هذه الطريقة مع نبات الأوركيد Orchid ثم انتشر استخدامها فى معظم النباتات الاقتصادية المهمة، التى لا تكثر جنسيًا مثل نخيل البلح 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؛ نظرًا 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

ويعّد إنتاج نباتات من الجنس المطلوب من أكبر مزايا الإكثار الدقيق بالنسبة للأنواع الوحيدة الجنس الثنائية المسكن؛ حيث تنتج — مثلاً — نباتات مذكرة فقط من لهليون، 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 لا تتعدى عشرة أمتار مربعة يعد أمرا 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.

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 أحيانًا الإبقاء على جزء من النبات فى الحقل لحين إجراء التقييم . إلا أن هذه الطريقة مكلفة. وتتطلب جهدًا إضافيًا وتقدم مزارع الإكثار الدقيق حلاً جيدًا لهذه المشكلة، بإكثار النباتات التى يتم انتخابها — بعد التقييم المختبرى — من القمم النامية، أو البراعم الإبطية لهذه النباتات. وتحقيقًا 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).

ويفضل دائمًا استخدام القمة الميرستيمية فى الزراعة، لكى تكون النباتات المنتخبة خالية من الفيروسات. أما إن لم يكن ذلك ضروريًا .. فإن يمكن استعمال أجزاء صغيرة من ساق النبات، تحتوى كل منها على عقدة وبرعم جانبى (nodal segments)، ذلك لأن البراعم الجانبية المفصولة بمفردها من الأشجار البالغة لا تنمو فى معظم الحالات، بينما يساعد النسيج الأمى الموجود مع البرعم الإبطى فى هذه العقل (nodal cuttings) على نمو البرعم وتتحمل البراعم الجانبية عمليات التعقيم أفضل من البراعم الطرفية ويمكن استعمال أى جز نباتى آخر فى التكاثر الدقيق إذا أمكن دفعه لتكوين براعم عرضية، سواء تكونت من خلال نسيج الكالس، أم بدونه. وتستخدم لهذا الغرض أجزاء من الجذور، والسيقان، والأوراق .. ويتوقف الاختيار على قدرة العضو النباتى على تكوين براعم عرضية

ولقد كان أول التطبيقات الواسعة للتكنولوجيا الحيوية فى مجال الإكثار الدقيق لنباتات الزينة، وكانت أكثر التقنيات استخدامًا فى هذا المجال مزارع النموات الخضرية shoot culture، وهى التى تكثر فيها النموات الجديدة (من العقل الصغيرة جدًا microcuttings) من خلال تحفيز نمو براعم إبطية من السيقان المزروعة.

وتعد تكلفة تداول العقل الصغيرة وزراعتها أكبر محددات مزارع النموات الخضرية لأجل الإكثار الدقيق، حيث تشكل العمالة — وحدها — أكثر من ٦٠٪ من تكلفة الإنتاج الكلية، الأمر الذى حدا بالعلماء إلى محاولة أتمتة تلك العملية باستخدام الروبوتات (الإنسان الآلى) وعلى الرغم من نجاح الروبوتات على المستوى التجريبى، فإن تكلفتها العالية أعاقت استعمالها تجاريًا، هذا فضلاً عن الحاجة إلى التقييم النوعى للنسيج المستخدم فى الزراعة، وضرورة تجانس الأجزاء النباتية explants المزروعة

وللتغلب على مشكلة عدم تجانس الأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة (الـ explants) .. كان الاتجاه إلى استخدام الأجنة الجسمية ومزارع العقد nodal cultures (عقدة مع جزء صغير جدًا من الساق) فى بيئات سائلة.

وقد صاحبت تقنيات الإكثار الدقيق تطور تقنيات التخلص من مسببات الأمراض،

مثل: مزارع القمة الميرستيمية، والعلاج الحرارى thermotherapy (عن McCown ٢٠٠٣)

هذا .. ويزيد عدد الأنواع النباتية التى أكثرت بطريقة الإكثار الدقيق عن الآلف. وعلى الرغم من كثرة أعداد معامل وشركات الإكثار الدقيق للأغراض التجارية، فإن الكثير منها لا يقوى على المنافسة، لأسباب كثيرة تتعلق بتكلفة الإنتاج مقارنة بالإكثار بالطرق العادية، وزيادة العرض، وضرورة تسويق ونقل وتوزيع أعداد هائلة من النباتات خلال فترة قصيرة من الزمن، والحاجة إلى الاستخدام الأمثل للقوة العاملة، خاصة وأنها تشكل — غالبًا — حوالى ٥٠٪ من تكلفة الإنتاج فى شركات الإكثار الدقيق (Kitto ١٩٩٧).

مراحل الإكثار الدقيق

يمر الإكثار الدقيق فى مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بخمس مراحل متداخلة فيما بينها، كما يلى:

أولاً: مرحلة التأسيس Establishment Stage (أو Stage I)

إن وظيفة هذه المرحلة هى ثبات واستطراد نمو (تأسيس وترسيخ) جزء نباتى مزروع ومعقم (explant) فى بيئة للزراعة، حيث ينمو طوليًا ويظهر واضحًا للعين

ثانيًا: مرحلة التضاعف Multiplication (أو Stage II)

إن وظيفة مرحلة التضاعف هى زيادة أعداد النموات النباتية تمهيدًا لتجذيرها فى مرحلة لاحقة. يقسم الـ explant — الذى نما طوليًا فى المرحلة الأولى — إلى عدة أجزاء تزرع مستقلة فى بيئة جديدة ويتوقف تضاعف النموات الخضرية المتكونة إما على الإنتاج المستمر للنموات الإبطية، وإما على تكوين نموات عرضية من الكتل الكالوسية التى تتكون عند قواعد الأجزاء النباتية المزروعة. ومن الأهمية بمكان تجديد الزراعة على فترات متقاربة حتى لا ينخفض معدل التضاعف، ويكون من الصعب استمرار النباتات فى النمو عندما تنقل إلى بيئة جديدة. قد يجرى هذا التجديد كل ٢-٤ أسابيع، وأفضل وقت لذلك هو عندما تبدأ النموات فى الزيادة فى الطول

ثالثًا المرحلة السابقة للشتل Pretransplanting Stage (أو Stage III)

إن الهدف من هذه المرحلة هو تهيئة النموات المتضاعفة للصلاحية للشتل بتوفير الظروف التى تسمح بتجذيرها فى البيئات، الأمر الذى يتحقق بخفض تركيز السيتوكينين أو حذفه من إضافات البيئة، مع زيادة تركيز الأوكسين، فتلك ظروف تسمح بتكوين جذور جديدة مع استطالة النموات بعد أن كانت الظروف السابقة (التركيز العالى للسيتوكينين) تسمح بتضاعف النموات فقط، تستغرق هذه المرحلة نحو ٢-٤ أسابيع

رابعًا مرحلة الشتلة Transplant Stage (أو Stage IV)

تتضمن هذه المرحلة نقل النبات الصغير من ظروف البيئات المعقمة إلى البيئة العادية فى الصوبات أولا ثم فى مكانه النهائى بعد ذلك تمر النباتات خلال تلك المرحلة بفترة أقلمة acclimation تجعلها قادرة على البقاء عند نقلها إلى الظروف الطبيعية الخارجية وفى بداية هذه المرحلة يُحافظ على نسبة عالية من الرطوبة النسبية حول النباتات، مع حمايتها من كافة الإصابات المرضية والحشرية، ويلى ذلك تعريض النباتات — تدريجيًا — إلى ظروف أقرب إلى الظروف الطبيعية (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

ويبين شكل (٦-١) تخطيطًا لمختلف مراحل الإكثار الدقيق

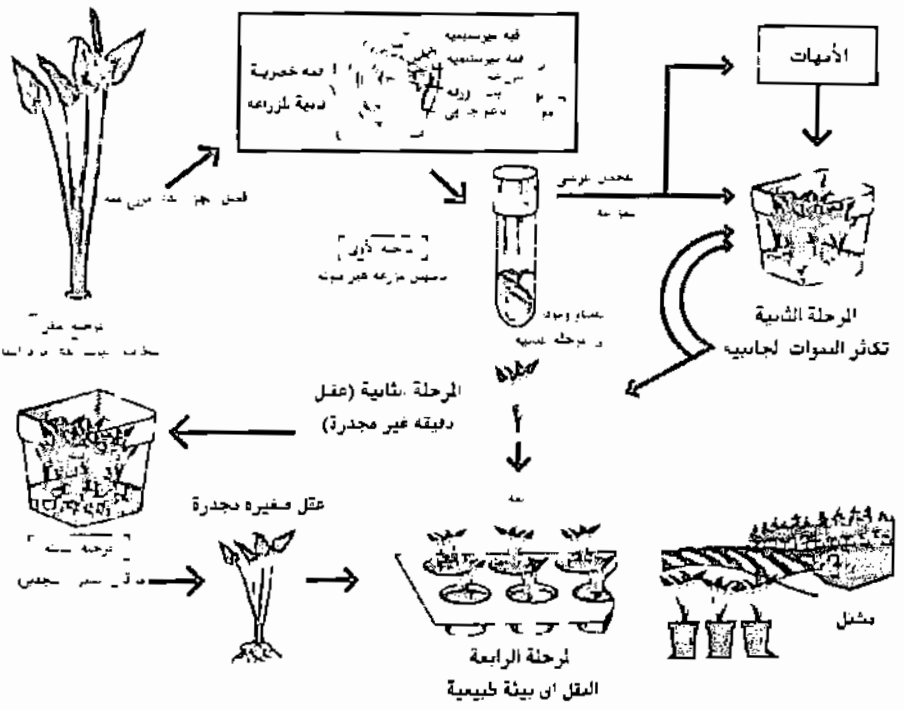
طرق التكاثر وتجديد النمو فى مزارع الإكثار الدقيق

مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية

يحدث التكاثر وتجديد النمو regeneration فى مزارع الأنسجة والأعضاء النباتية بأحد خمس طرق (يتداخل بعضها معًا)، كما يلى

أولاً من خلال النمو المباشر (من خلال تكاثر البراعم الخضرية وتحفيز النمو الجانبى)

يحدث النمو المباشر بتكاثر الميرستيم المتواجد أصلاً فى الجزء النباتى المزروع، كما فى مزارع القمة الميرستيمية، ومزارع القمة النامية الخضرية، ومزارع البراعم الإبطية، ومزارع العقدة المفردة



شكل (٦-١) مراحل الإكثار الدقيق (عن Kane ٢٠٠٥)

يمكن الحصول على الأجزاء النباتية التى تستعمل فى التكاثر إما من النباتات النشطة فى النمو، وإما من النباتات الساكنة

ولبدء زراعة البراعم تُزال الأوراق المحيطة بالبرعم بعناية، وبعد غسيلها بماء الصنبور، فإن البراعم تغسل بمحلول منظف مخفف جدًا، ثم تعقم فى محلول مخفف من كلوريد الزئبقيك أو هيبوكلوريت الصوديوم يحتوى على نقطة من مادة مبللة، مثل توين ٢٠، ثم تغسل عدة مرات بماء معقم قبل نقلها لبيئة الزراعة

ويلى ذلك نقل القمم البرعمية المطهرة سطحيًا إلى بيئة الإكثار، حيث تتكون فيها نموات جديدة عديدة، ويلى ذلك نقلها منفردة إلى بيئة التجذير، وتنقل بعد ذلك النباتات التى يتكون بها مجموعًا جذريًا قويًا إلى حيث تجرى أقلمتها وبتلك الطريقة يمكن زيادة معدل التكاثر من النبات الواحد بنحو ١٠٠٠٠ مرة فى المتوسط

يتحقق الإكثار السريع — من خلال النمو المباشر — بإحدى طريقتين تُحفَّز فى

أولاهما البراعم الإبطية التى توجد بالجزء النباتى المزروع، وفى آباط النموات الجديدة المتكونة تحفز للنمو إلى فروع جديدة، وذلك بتوفير تركيز عالٍ نسبيًا من سيتوكينين فى بيئة الزراعة. وبعد فترة مناسبة يتم فصل كل نمو جانبى جديد إلى بيئة طازجة جديدة لتكوين مزيد من النموات الجديدة. أما الطريقة الأخرى فإنها تناسب الأنواع التى لا يمكن أن يتحقق فيها التفريع الإبطى السريع، حيث ينمو فيها كل برعم إبطى إلى نمو خضرى واحد، حيث يتم فى هذه الحالة عمل عقل من تلك النموات تحتوى كل منها على عقدة واحدة (nodal segments)، وتزرع فى بيئة جديدة لمزيد من الإكثار

وتجدر الإشارة إلى أن تحفيز النمو لجانبى فى المزارع يتم بتوفير السيتوكينين فيها بتركيز معين، إما مع الأوكسين، وإما بدونه. ويؤدى استمرار توفر السيتوكينين فى المزرعة إلى نمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمة الميرستيمية التى تنمو من البراعم المزروعة (أى من الـ nodal segments)، ثم تنمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمم الميرستيمية الجديدة . وهكذا يؤدى استمرار هذه العملية — لعدة مرات — إلى تكون كتلة من النموات الجديدة.

وعلى الرغم من توقف تكاثر المزرعة الواحدة بهذه الطريقة بعد فترة . إلا أنه يمكن استمرار التكاثر — فى هذه المرحلة — بنقل أجزاء من المزرعة إلى مزارع أخرى جديدة، وبذلك يمكن استمرار التكاثر إلى مالا نهاية، إلى درجة أنه يمكن — على سبيل المثال — إنتاج من ١٥–٢٥ مليون نبات فراولة من نبات واحد فى العام؛ لأن كل نبات يكون قادرًا على إنتاج ١٠ نباتات جديدة كل أسبوعين.

هذا .. وبينما توجد الجذور — طبيعيًا — فى حالة التميز من الجنين الجنسى الذى يحتوى — بطبيعته — على جذير، فإن عملية التجذير تعد ضرورية فى الحالات التى تنمو فيها النباتات من الأجنة الجسمية. ولإحداث التجذير يلزم نقل النموات المتكونة إلى بيئة أخرى، تختلف فى مكوناتها الهرمونية عن بيئة التكاثر ويكون نقل النموات الخضرية — عادة — إلى هذه البيئات وهى بطول حوالى ١ سم، ثم تنقل النباتات بعد أن تتكون جذورها إلى أصص معقمة بحرص تام، وتتعهد بالرعاية إلى أن تكبر

هذا .. ويندرج تحت النمو المباشر الإكثار الدقيق بتكوين الدرنات في المزارع كما يلي:

يعد تكوين الدرنات في المزارع in vitro tuberization إحدى وسائل الإكثار الدقيق، وتجرى تلك الطريقة –في البطاطس – بزراعة نموات مزارع أنسجة البطاطس الخضرية في بيئة تحتوى على سيتوكينينات وتعريضها للضوء لمدة ٨ ساعات يوميًا في حرارة ٢٢م. وأهم ما يميز تلك الطريقة إمكان إنتاج الدرنات الصغيرة تلك في أى وقت من العام، مع إمكان شحنها من مكان لآخر بسهولة، وتخزينها لعدة شهور.

ثانيًا: من خلال تكوين البراعم العرضية

بينما تنشأ النموات العادية من الميرستيم القمى أو من البراعم التى توجد فى آباط الأوراق، فإن النمو العرضى ينشأ من براعم عرضية تتكون إما مباشرة على الجزء النباتى المزروع، وإما بطريقة غير مباشرة من الكالوس الذى يتكون على الأجزاء المقطوعة لتلك الأجزاء المزروعة.

ومن بين أنواع الأجزاء النباتية المزروعة التى يتكون منها نموات عرضية، ما يلي:

١ – أجزاء الأوراق.

٢ – الفلقات، والسويقة الجنينية السفلى، وغيرهما من أجزاء البادرة.

٣ – أجزاء من نورات غير مكتملة التكوين وحواملها

٤ – التراكيب الورقية الإبرية كما فى المخروطيات

٥ – أوراق الأبصال، وهى التى تحتوى على حلقات من النسيج الميرستيمى فى قواعدها

٦ – أقراص من النسيج النباتى، مثل تلك التى تؤخذ من درنات البطاطس من نسيج القشرة – حول الأسطوانة الوعائية – وليس من النخاع.

يحدث النمو المباشر بتحول بعض الخلايا البرانشيمية (التى تقع فى البشرة أو تحتها مباشرة فى السيقان) إلى خلايا ميرستيمية، تعرف كل مجموعة منها باسم

meristemoid، وهى البراعم العرضية الحقيقية التى تستمر فى نموها لتعطى النموات الجديدة

أما النمو العرضى المباشر فإنه يتضمن أولاً تكوين كالس على الأجزاء المزروعة فى البيئة، تنمو من حواف هذا الكالوس النموات الجديدة التى لا تكون — فى بادئ الأمر — متصلة بالجهاز الوعائى للجزء النباتى المزروع ويمكن أن تعطى النموات العرضية من هذا الكالس معدلات عالية جدًا من التضاعف، تكون أعلى بكثير من تلك التى تنتج من النموات الجانبية ويقابل ذلك زيادة متوقعة فى نسبة النباتات المخالفة وراثيًا من بين التى تنشأ عرضيًا من الكالس (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣)

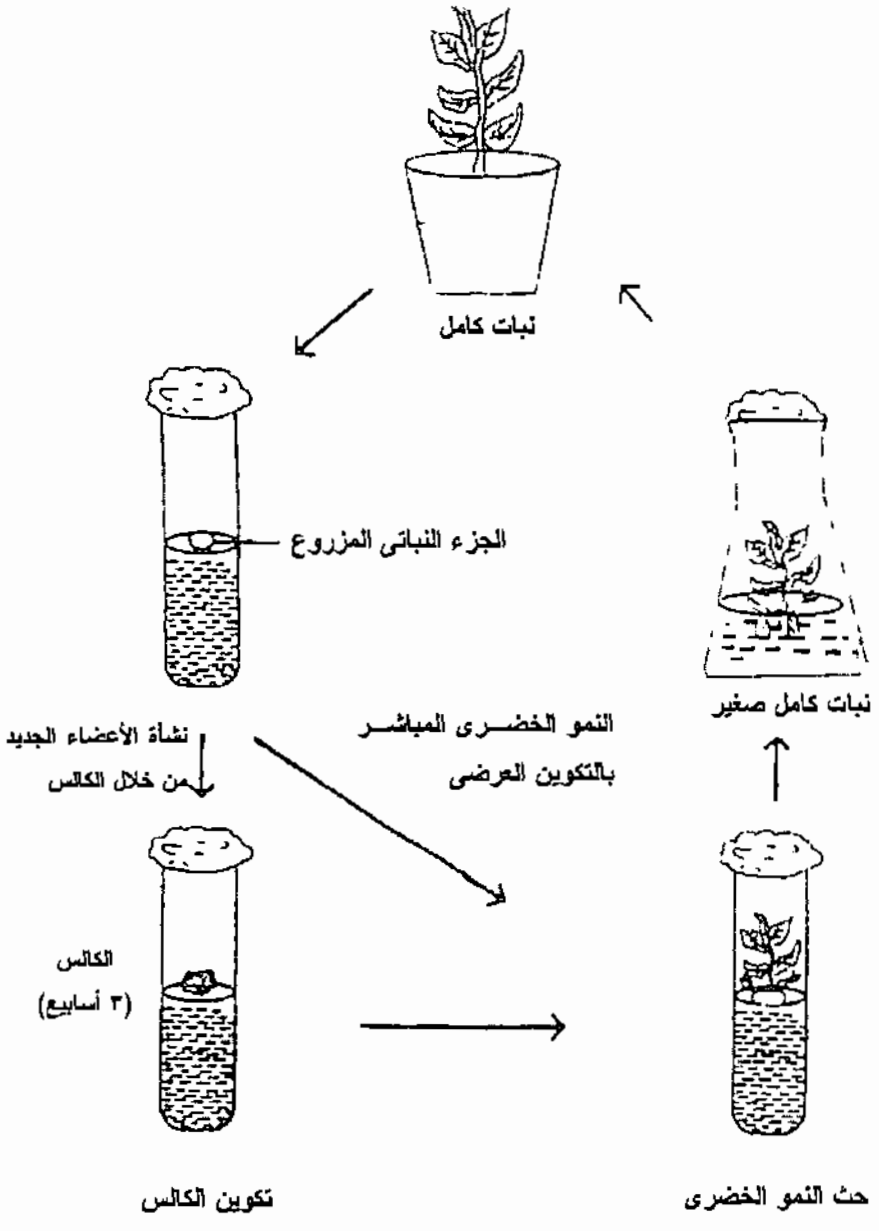
يحدث التميز فى خلايا الكالس إما بتكوين الجذور والنموات الخضرية مباشرة، وإما من خلال هذه الطريقة — وبسبب حالات التضاعف الكروموسومى والتباينات الوراثية التى ترافقها — لم يشع استخدامها سوى فى أنواع نباتية قليلة، مثل الموالح، والنخيل، والبن.

ثالثًا. من خلال نشأة أعضاء جديدة

يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأعضاء باسم organogensis، حيث تتكون أعضاء جديدة مفردة — مثل الجذور والنموات الخضرية - إما مباشرة من الأنسجة النباتية غير الميرستيمية المنتظمة التكوين (مثل مزارع أنصال الأوراق ومزارع الفلقات إلخ)، وإما بصورة غير مباشرة، تكون — بدورها — إما من الكالس أو الخلايا المفردة التى قد تنتج عن زراعة تلك الأجزاء غير الميرستيمية المنتظمة التكوين، وإما من مزارع الكالس ومزارع الخلايا ذاتها وتعرف الطريقة غير المباشرة لنشأة الأعضاء باسم de novo origin (شكل ٦-٢)

رابعًا. من خلال تكوين الأجنة الجسمية

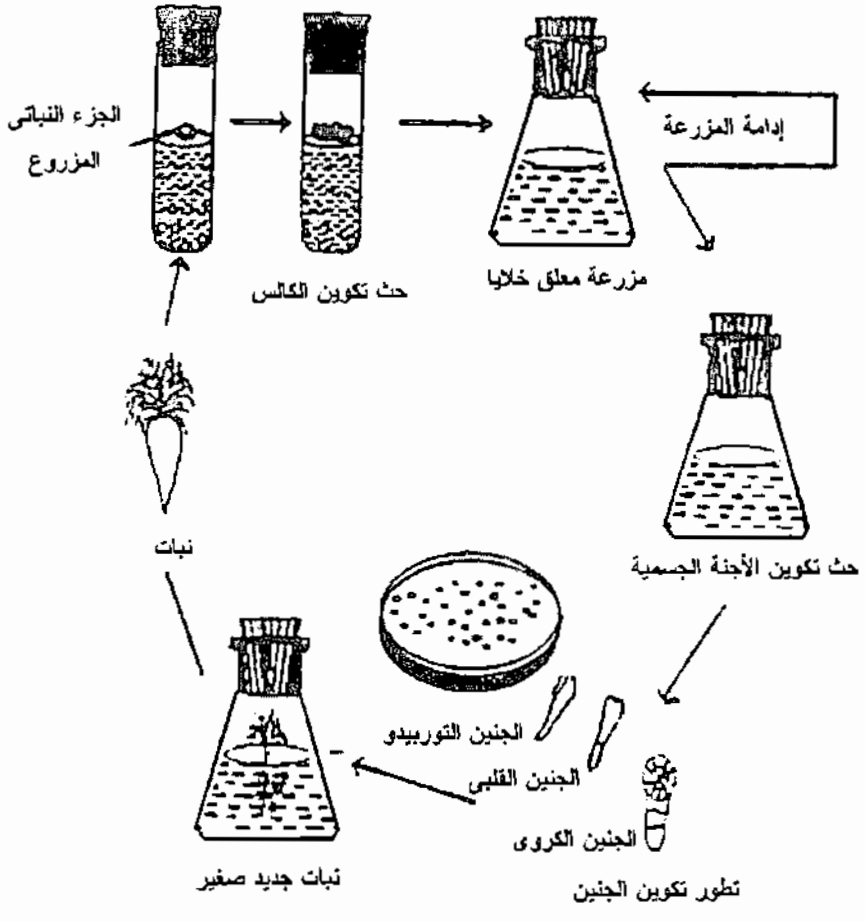
يعرف تجديد النمو الذى يعتمد على ظاهرة نشأة الأجنة الجسمية باسم somatic embryogensis (شكل ٦-٣)، بتكوين تراكيب ثنائية القطب الميرستيمى (bipolar) تعطى نموًا جذريًا وخضريًا معًا، وتعرف هذه الطريقة لنشأة الأجنة الجسمية باسم de novo origin



شكل (٦-٢): تجديد النمو الخضرى عن طريق نشأة أعضاء جديدة organogensis.

يمكن أن تنشأ الأجنة الجسمية فى مزارع الأنسجة من أنواع كثيرة من الأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة (explants)، مثل الأوراق، والأجزاء الزهرية، والنورات،

والمتوك. والأجنة غير المكتملة التكوين، والنيوسيلة . إلخ وتمر الأجنة الجسمية بذات المراحل التى تمر بها الأجنة الجنسية، وهى مراحل التكوين الكروى globular، والقلبى التكل heart-shaped، والتوربيدو torpedo، والفلقى cotyledonory فى ذوات الفلقتين، والكروى، والصفيحى أو الحرشفى scutellar، والغمدى coleoptilar فى ذوات الفلقة الواحدة



شكل (٦-٣) تجديد النمو عن طريق نشأة أجنة جسمية embryogensis فى الجزر

هذا وتتكون الأجنة الجسمية إما مباشرة دون المرور بمرحلة نمو كالوسى. وإما بطريقة غير مباشرة من خلال الكالس وفى كلتا الحالتين يمر تكوين الجنين الجسمى

بمرحلتين، حيث يستحث أولاً على تكوين خلايا ذات قدرة جنينية تنافسية (تعرف باسم proembryonic cell masses، أو clumps، أو proembryos) فى وجود تركيز عال من الأوكسين، ويلى ذلك تطور الكتل الجنينية (أو الـ proembryos) إلى أجنة فى غياب الأوكسينات أو فى وجود تركيز منخفض منها (عن Kaur وآخرين ٢٠٠٠).

وقد أمكن إنتاج أجنة جسمية فى أنواع مختلفة من المزارع لعدة أنواع محصولية، ومن أمثلتها ما يلى:

المحصول		العضو أو النسيج النباتى المستخدم كمصدر للجنين الجسمى
الثيف	*Allium schoenoprasum*	النواتان المساعدتان فى الكيس الجنينى
الرجلة	*Portulaca oleracea*	الإندوسبرم
الفراولة البرية	*Fragaria vesca*	النواتان المساعدتان
الفلفل من النوع	*Capsicum frutescens*	الجنين
الفلفل	*C. annuum*	التوك
الهندباء	*Cichorium endivia*	الجنين
الكوسة	*Cucurbita pepo*	السويقة الجنينية العليا – الفلقات
الأسبرجس	*Asparagus officinalis*	السويقة الجنينية العليا – الأوراق – التوك – الساق – الجنين – البروتوبلازم – الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم	*Lycopersicon esculentum*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم البرية	*L. pimpinellifolium*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الجزر	*Daucus carota*	الجنين – نسيج الكالس – السويقة الجنينية العليا – الأوراق – أعناق الأوراق – اللحاء – البروتوبلازم – الجذور – السيقان
الفينوكيا	*Foeniculum vulgare*	الساق – الجنين

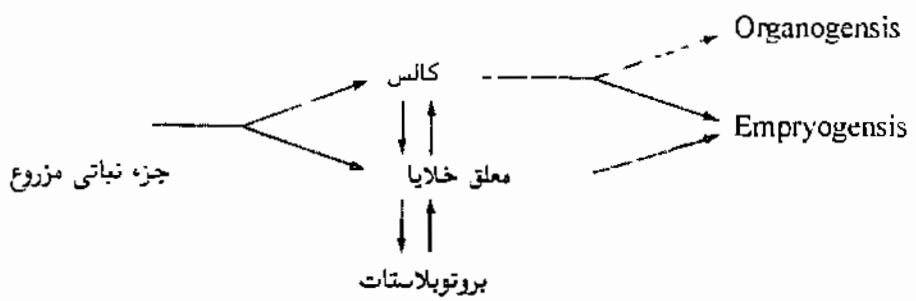
ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Tisserat وآخرون (١٩٧٩).

مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست

إن زراعة الخلايا النباتية — إما على صورة نسيج كالس، وإما على صورة معلقات من الخلايا أو البروتوبلاستات — يوفر وسيلة هامة — قد تكون أساسية — لتجديد نمو نباتات كاملة، ولكن بسبب كثرة التباينات الوراثية التى تصاحب تلك النوعية من المزارع فإنها لا تستخدم كثيرا فى إكثار الأصناف، وإن كانت تستعمل فى الدراسات الوراثية، والتربية، والهندسة الوراثية وعلى الرغم من ذلك فهى تقدم وسيلة فعالة لتكوين الأجنة الجسمية بأعداد هائلة، وهى التى يمكن زراعتها حقليًا وهى محمولة فى السوائل (fluid drilling)

يبدأ حث تكوين الجذور والسيقان ومبادئ الأجنة proenbryoids بإعادة تميز مجموعات من الخلايا البرانشيمية مكونة مراكز للنشاط الميرستيمى، وقد أطلق عليها اسم meristemoids فى حالة الـ organogensis، و preembryonic masses فى حالة الـ embryogensis ويتوقف حدوث الـ organogensis أو الـ embryogensis على الجزء النباتى المزروع، ولكن الاتجاه قد يمكن التحكم فيه بالتحكم فى مكونات بيئة الزراعة (شكل ٦-٤)

كذلك تنتج الأجنة الجسمية إما مباشرة (مثلما يكون عليه الحال عند استعمال النسيج النيوسيلى لأصناف الموالح ذات البذور متعددة الأجنة، وبويضات العنب، وأجنة الكاكاو غير المكتملة التكوين)، وإما بصورة غير مباشرة من خلال نسيج الكالس أو مزارع الخلايا المعلقة وتنشأ الأجنة الجسمية من خلايا أحادية تقع داخل عناقيد من الخلايا الميرستيمية فى الكالس أو فى المعلق



شكل (٦-٤) تخطيط لمراحل الـ organogensis والـ embryogensis فى مزارع الكالس والخلايا والبروتوبلاست.

ونظرًا لسبق مناقشة موضوع مزارع البروتوبلاست بالتفصيل فى الفصل الرابع من هذا الكتاب، فإننا نقصر المناقشة على كل من مزارع الخلايا ومزارع الكالس فقط.

مزارع الكالس

ينتج الكالس على الأجزاء النباتية المزروعة فى البيئات الصناعية نتيجة للجروح التى تحدث فيها، وذلك استجابة للهرمونات التى قد تتواجد طبيعيًا فى تلك الأجزاء المزروعة أو تزود بها بيئة الزراعة. هذا ويمكن فصل أى جزء نباتى (بذور أو سيقان أو جذور أو أوراق أو أعضاء تخزين أو ثمار) وتطهيره، وزراعته على سطح بيئة زراعة لإنتاج الكالس ويمكن استمرار إعادة زراعة أنسجة الكالس عدة مرات ولفترات طويلة بعيدا عن الجزء النباتى الأصلى المزروع

وأفضل البيئات وأكثرها استعمالاً فى إنتاج الكالس هى بيئة موراشيج وسكوج.

وعلى الرغم من أن نسيج الكالس المتكون فى البيئات يبدو لأول وهلة كأنه نسيج متجانس من الخلايا، إلا أنه فى حقيقة الأمر نسيج معقد يحتوى على تباينات كثيرة مورفولوجية، وفسيولوجية، ووراثية

يكون نمو الكالس لوغاريتميًا، حيث يمر بالمراحل التالية:

١ – فترة أولية من الانقسام الخلوى البطئ .. وهى فترة الحث induction period، وهى تتطلب تواجد الأوكسين.

٢ – فترة من الانقسام الخلوى السريع، مع التمثيل النشط لكل من الدنا والرنا والبروتين

٣ – فترة يتوقف فيها انقسام الخلايا، وتتميز فيها خلايا الكالس المتكونة إلى خلايا برانشيمية أكبر حجمًا وخلايا أخرى من طراز الخلايا الوعائية.

هذا .. ولا يحدث الانقسام الخلوى فى كل الكتلة الكالوسية، ولكنه يقع أساسًا فى طبقة ميرستيمية عند الحافة الخارجية لكتلة الخلايا. أما الأجزاء الداخلية للكالس فإنها تبقى ككتلة غير منقسمة من النسيج، وبمرور الوقت .. فإنها قد تتميز فسيولوجيًا ووراثيًا

عن خلايا الطبقة الخارجية. يقل الانقسام فى خلايا الطبقة الخارجية للكالس بعد فترة، وتظهر فيه عقد knobs (يصبح knobby) بعدما يصبح الانقسام محصورا فى أماكن منفصلة منه، هى التى تظهر فيها تلك العقد ويعنى ذلك أن خلايا الكالس تتباين فى أعمارها، حيث تكون الخلايا الوسطية أكبر عمرًا، بينما تكون خلايا الحافة ميرستيمية وأصغر عمرًا

مزارع معلقات الخلايا

تعد مزارع معلقات الخلايا cell suspension culture امتدادًا لمزارع الأنسجة أو مزارع الكالس، حيث إنها تتكون من خلايا أو مجموعات منها منتشرة ونامية فى بيئة مغذية سائلة.

تتميز مزارع الخلايا عن مزارع الكالس فى أن الخلايا تكون — غالبا — مفردة، وتكون كل منها على اتصال مباشر بالبيئة، وتقل فيها كثيرًا ظهور التباينات الوراثية، مقارنة بمزارع الكالس

تبدأ مزرعة معلقات الخلايا بوضع قطعة من الكالس المفككة أو نسيج مجنس homogenized فى بيئة سائلة، بحيث تنفصل فيها الخلايا عن بعضها البعض. وقد توضع المزرعة فى دوراق على جهاز هزاز دوّار للسماح باختلاط الهواء مع البيئة السائلة، أو فيما يعرف باسم turbidostat الذى يحافظ على دوران البيئة داخل الدورق المخروطى بصورة دائمة. وفى طريقة ثالثة توضع الخلايا على ورقة ترشيح توضع بدورها على سطح بيئة سائلة توجد فى طبق بترى دونما حاجة إلى إحداث أى اهتزازات

يمر انقسام الخلايا بالمراحل التالية:

١ — فترة من الانقسام البطئ lag phase.

٢ — فترة من الانقسام السريع اللوغاريتمى exponential growth.

٣ — فترة من الانقسام الثابت linear growth.

٤ — فترة من التدهور فى الانقسام وفى أعداد الخلايا الحية deceleration phase

٥ — فترة نهائية من الثبات فى أعداد الخلايا stationary state

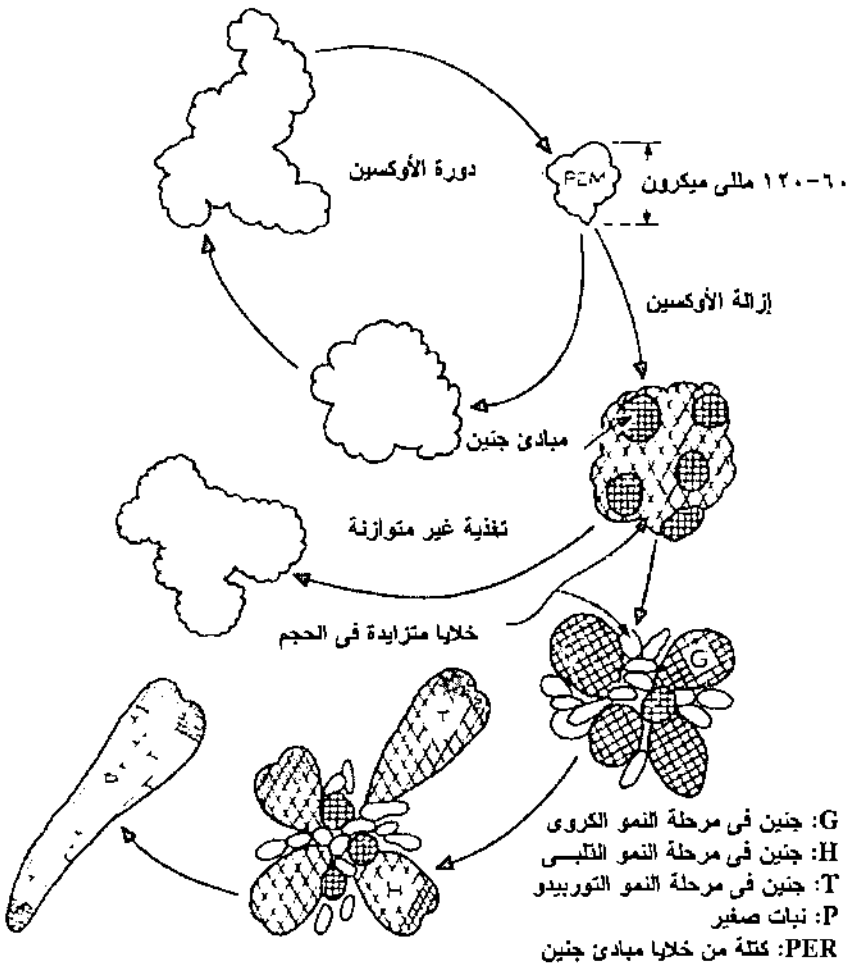
ويعرف منحنى النمو هذا بالمنحنى اللوغاريتمى، وهو يتكرر إذا ما جددت زراعة نفس الخلايا فى بيئة جديدة، ويمكن أن يستمر ذلك إلى مالا نهاية باستمرار إعادة الزراعة (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

تتكون الأجنة الجسمية Somatic Embryos، أو Embryoides فى مزارع الخلايا عندما تتوفر لها شروط معينة، تتعلق بمنظمات النمو (خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات)، مع توفر مصدر للنيتروجين، وبعض العوامل الأخرى؛ ففى مزارع خلايا الجزر (شكل ٦-٥) يتكون الكالس عندما تكون البيئة غنية بالأوكسين (يستعمل عادة الأوكسين ٢، ٤-د بتركيز ٠,٥-١,٠ جزءًا فى المليون)؛ وإذا نقلت تجمعات من هذه الخلايا الميرستيمية إلى بيئة ذات محتوى شديد الانخفاض من الأوكسين (حوالى ٠,٠١-٠,١ جزءًا فى المليون)، أو خالية تمامًا منه .. فإنه تتميز فيها أجنة كاملة.

ويبدو أن وجود الأوكسين فى البيئة الأولى ضرورى لتكوين الأجنة فى البيئة الثانية؛ لأن الأنسجة التى تبقى دائمًا فى بيئة خالية من الأوكسين لا تتكون بها أجنة. أما مصدر النيتروجين فى البيئة .. فيفضل أن يكون على صورة مختزلة؛ مثل كلوريد الأمونيوم NH_4Cl منفردة، أو مع نترات البوتاسيوم KNO_3 ومرد ذلك أن تكوين الأجنة يتطلب حدًا أدنى من أيون الأمونيا NH_4^+ داخل الخلايا، وهو ما لا يتحقق إلاّ إذا توفر أيون الأمونيا بتركيز منخفض (٢.٥ ملى مول/لتر)، أو أيون النترات NO_3^- بتركيز مرتفع (٦٠ ملى مول/لتر) فى البيئة. ومن الشروط الأخرى الضرورية لتميز الأجنة توفر تركيز عالٍ من البوتاسيوم (٢٠ ملى مول/لتر) فى البيئة، وألا يزيد تركيز الأكسين الذائب عن ١,٥ مجم/لتر؛ لأن التركيز الأعلى من ذلك يشجع على تكوين الجذور.

وتجدر الإشارة إلى أن الأجنة المتكونة فى مزارع الخلايا تبقى على اتصال سيتوبلازمى مع الخلايا المجاورة لها فى البيئة خلال المراحل الأولى لتكوين الأجنة، ولا تنفصل عنها إلا فى مراحل متأخرة حينما يصبح الجنين مكونًا من عدة خلايا. وتكمل الأجنة نموها وتنبت مباشرة فى نفس البيئة، إلا أن الأنواع — التى تحتاج بذورها إلى المعاملة بالبرودة لكى تنبت — تتطلب نفس المعاملة، حتى تنبت أجنتها الجسمية المتكونة فى البيئات. هذا .. ويطلق على القدرة الموروثة فى الخلايا النباتية

لإنتاج نباتات كاملة – حتى بعد أن تكون هذه الخلايا قد تميزت نهائيًا فى جسم النبات الذى أخذت منه – اسم Totipotency (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٦-٥). تخطيط يبين مراحل تكوين الأجنة الجسمية فى مزارع الخلايا المعلقة للجذر (Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق

تتنوع بيئات الزراعة المستخدمة فى الإكثار الدقيق لمختلف الأنواع النباتية، ولكنها تعد – بصورة عامة – تباينات من بيئة موراشيج وسكوج.

وتستخدم فى كثير من الأنواع النباتية ثلاثة أنواع من البيئات لأجل الإكثار الدقيق من خلال التوالد الجنينى embryogensis، تكون الأولى منها لأجل تكوين الكالس واستمراريته، والثانية لأجل تكوين الأجنة الجسمية، والثالثة لأجل السماح لتلك الأجنة بالنمو إلى نباتات كاملة.

يعد تواجد الأوكسين فى البيئة ضروريًّا لبدء تكوين الأجنة، وإذا ما استمر تعرض الأنسجة أو الكالس لبيئة خالية من الأوكسين، فإنه لا تنتج أجنة. يعمل الأوكسين على حث تميز مجموعات من الخلايا الميرستيمة تعرف باسم التجمعات الجنينة embryogenic culumps. وتتطور تلك التجمعات من الخلايا الميرستيمية إلى أجنة مكتملة التكوين لدى نقلها إلى بيئة خالية من الأوكسين، أو ذات تركيز منخفض منه (عن Chawla ٢٠٠٠).

ويبين جدول (٦-١) تركيب المحاليل القياسية المستخدمة فى تحضير بعض بيئات الإكثار الدقيق، كما يبين جدولا (٦-٢)، و (٦-٣) تركيب بيئات الإكثار الدقيق لكل من نخيل التمر، والفراولة على التوالى — كمثالين — علمًا بأن البيئات المناسبة تختلف كثيرًا من نبات إلى آخر.

ولقد كانت أفضل بيئة للإكثار المبدئى من عيون درنات البطاطس (صنف كارا) هى بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالسيتوكينين بنزيل أمينوبيورين BAP، والأوكسين نفثالين أسيتك آسيد NAA بتركيز ٢ مجم/لتر، و ٠,٥ مجم/لتر لكل منهما على التوالى، حيث بلغ متوسط عدد العقد المنتجة لكل تكوين نباتى كامل نما على هذه البيئة بعد زراعة العيون ٦,٧ عقدة.

وقد أكثرت السيقان ذات الأوراق الصغيرة الناشئة بإعادة زراعتها خمس مرات متتالية على بيئة إكثار تتكون من بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالسيتوكينين BAP، والأوكسين NAA، وحامض الجبريلليك GA_3، وبانتوثينات الكالسيوم calcium pantothenate بتركيز ٢,٠، و ٠,٥، و ٠,٠١، و ٢,٠ مجم/لتر، على التوالى، علمًا بأن معدل تضاعف السيقان ذات الأوراق الصغيرة لم يتأثر سلبيًّا خلال خمس مرات من التقسيم وإعادة الزراعة.

كذلك أمكن تجذير السيقان الصغيرة المتكونة — التى احتوت كل منها على ثلاث

عقد – على بيئة موارشيج وسكوج المزودة بالأوكسين 2,4-D بتركيز ٢ مجم/لتر أو المزودة بالسكروز بتركيز ٨٪. وعقب التجذير نقلت النباتات الجديدة بنجاح إلى خارج المعمل

جدول (٦–١): المحاليل القياسية المستخدمة فى تحضير بعض بيئات الإكثار الدقيق(أ) (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

مجموعة المحاليل	المركب	Murashige and Skoog (MS)		Woody Plant Medium (WPM)		Anderson (AND)		Gamborg B5	
A	NH_4NO_3	١٦٥,٠٠	جم/لتر	٤٠,٠٠	جم/لتر	٤٠,٠٠	جم/لتر	—	
	KNO_3	١٩٠,٠٠	جم/لتر	—		٤٨,٠٠	جم/لتر	٢٥٠,٠٠	جم/لتر
	$Ca(NO_3.4H_2O)$	—		٥٥,٦	جم/لتر	—		—	
B	K_2SO_4	—		٩٩,٠٠	جم/لتر	—		—	
	$MgSO_4.7H_2O$	٣٧,٠٠	جم/لتر	٣٧,٠٠	جم/لتر	٣٧,٠٠	جم/لتر	٢٥,٠٠	جم/لتر
	$MnSO_4.H_2O$	١,٦٩	جم/لتر	٢,٢٣	جم/لتر	١,٦٩	جم/لتر	١,٠٠	جم/لتر
	$ZnSO_4.7H_2O$	٠,٨٦	جم/لتر	٠,٨٦	جم/لتر	٠,٨٦	جم/لتر	٠,٢	جم/لتر
	$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٠٢٥	جم/لتر	٠,٠٠٢٥	جم/لتر	—		٠,٠٠٢٥	جم/لتر
	NH_4SO_4	—		—		—		١٣,٤	جم/لتر
C	$CaCl_2.2H_2O$	٤٤,٠٠	جم/لتر	٩,٦	جم/لتر	٤٤,٠	جم/لتر	١٥٠٠٠	جم/لتر
	KI	٠,٠٨٣	جم/لتر	—		٠,٠٨٣	جم/لتر	٠,٠٧٥	جم/لتر
	$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٠٢٥	جم/لتر	—		٠,٠٨٣	جم/لتر	٠,٠٠٢٥	جم/لتر
D	KH_2PO_4	١٧,٠٠	جم/لتر	١٧,٠٠	جم/لتر	—		—	
	H_3BO_3	٠,٦٢	جم/لتر	٠,٦٢	جم/لتر	٠,٦٢	جم/لتر	٠,٣٠	جم/لتر
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٠٢٥	جم/لتر	٠,٠٢٥	جم/لتر	٠,٠٢٥	جم/لتر	٠,٠٢٥	جم/لتر
	$NaH_2PO_4.H_2O$	ب		—		٣٨,٠٠	جم/لتر	١٥,٠٠	جم/لتر
E	$FeSO_4.7H_2O$	٢,٧٨٤	جم/لتر	٢,٧٨	جم/لتر	٥,٥٧	جم/لتر	٢,٧٨	جم/لتر
	$Na_2.EDTA$	٣,٧٢٤	جم/لتر	٣,٧٣	جم/لتر	٧,٤٥	جم/لتر	٣,٧٢٥	جم/لتر
F	Thiamin.HCl	٠,١٠	جم/لتر	٠,١٠	جم/لتر	٠,٠٤	جم/لتر	١,٠٠	جم/لتر
	Nicotinic acid	٠,٠٥	جم/لتر	٠,٠٥	جم/لتر	—		٠,١٠	جم/لتر
	Pyridoxine.HCl	٠,٠٥	جم/لتر	٠,٠٥	جم/لتر	—		٠,١٠	جم/لتر
	Glycine	٠,٢٠	جم/لتر	٠,٢٠	جم/لتر	—		—	
G	Myo-inositol	١٠,٠٠	جم/لتر	١٠,٠	جم/لتر	١٠,٠٠ جـ	جم/لتر	١٠,٠٠	جم/لتر

أ – تبلغ قوة هذه المحاليل مائة ضعف التركيز النهائى المطلوب من كل منها يستخدم ١٠ مل من كل محلول قياسى فى تحضير لتر واحد من بيئة الزراعة.

ب – تُزود بها بيئة الزراعة – عادة – بمعدل ٨٥–٢٢٥ مجم/لتر

جـ – يضاف – كذلك – كبريتات الأدنين بمعدل ٨٠ مجم/لتر.

جدول (٦-٢): بيئات الإكثار الدقيق لنخيل التمر.

المكونات	البيئـــة (مجم/لتر) من خلال الكالس	من خلال الأجنة
مركبات غير عضوية		
NH_4NO_3	١٦٥٠	١٦٥٠
KNO_3	١٩٠٠	١٩٠٠
$CaCl_2$	٣٢٢	٣٢٢
$MgSO_4.7H_2O$	١٨١	١٨١
KH_2PO_4	١٧٠	١٧٠
$NaH_2PO_4.2H_2O$	١٧٠	١٧٠
KI	٠,٨٣	٠,٨٣
H_3BO_3	٦,٢	٦,٢
$MnSO_4.H_2O$	١٦,٩	١٦,٩
$ZnSO_4.H_2O$	٨,٦	٨,٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٠,٢٥
$CuSO_4$	٠,٠١٦	٠,٠١٦
$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
FeNa.EDTA	٣٦,٧	٣٦,٧
مركبات عضوية		
Inositol	١٠٠	١٠٠
Thiamine HCl	٠,٤	٠,٤
منظمات نمو		
2,4-D	١٠٠	—
2-ip	٣	—
فحم مُنَشطَ neutralized charcoal	٣٠٠٠	٣٠٠٠
آجار	٪٠,٨	٪٠,٨
سكروز	٪٣	٪٣

وقد أدت زيادة تركيز السكروز إلى ٨٪ فى بيئة موراشيج وسكوج — وبدون هرمونات — إلى تحفيز تكوين الدرنات معنويًا وزيادة أعدادها وأحجامها. وبينما قللت الفترة الضوئية القصيرة (٨ ساعات) النمو الخضرى مقارنة بالفترة الطويلة (١٦ ساعة) .. فإن الفترة الضوئية لم يكن لها تأثير معنوى على عدد الدرنات المنتخبة لكل ساق ورقية زرعت معمليًا، إلاّ أنها أثرت فقط على وزن تلك الدرنات. وقد أمكن تنبيت الدرنات الصغيرة بسهولة، حيث أعطت نباتات ذات صفات مطابقة للصنف المستخدم (Ebida & El-Gamal ١٩٩٢).

جدول (٦–٣): بيئات الإكثار الدقيق للفراولة.

المكونات	البيئات (مجم/لتر)		
	التجذير	التكاثر	التهيئة
مركبات غير عضوية			
KNO_3	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
$MgSO_4.7H_2O$	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
KH_2PO_4	٢٥٠	٢٥٠	٢٥٠
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	١٠٠٠	١٠٠٠	١٠٠٠
KI	٠,٨٣	٠,٨٣	٠,٨٣
H_3BO_3	٦,٢	٦,٢	٦,٢
$MnSO_4.4H_2O$	١٦,٩	١٦,٩	١٦,٩
$ZnSO_4.7H_2O$	٨,٦	٨,٦	٨,٦
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٠,٢٥	٠,٢٥
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥	٠,٠٢٥
$FeSO_4.7H_2O$	٢٧,٨	٢٧,٨	٢٧,٨
$Na_2.EDTA$	٣٧,٣	٣٧,٣	٣٧,٣
مركبات عضوية			
Inositol	١٠٠	١٠٠	١٠٠
Nicotinic acid	٠,٥	٠,٥	٠,٥
Pyridoxine HCl	٠,٥	٠,٥	٠,٥
Thiamine HCl	٠,١	٠,١	٠,١
Glycine	٢	٢	٢
منظمات نمو			
BAP	٠,١	١	—
IBA	١	١	١
GA_3	٠,١	٠,١	—
جلوكور	٪٤	٪٤	٪٤
آجار	٪٠,٨	٪٠,٨	٪٠,٨

كذلك أمكن إكثار صنف البطاطس رصّت بيربانك باستعمال أقراص من النموات الجديدة المتبرعمة بالدرنات وزراعتها – بعد تطهيرها سطحيًّا – في بيئة الإكثار،

حيث كونت سيقانًا خضرية صغيرة فى خلال ٢٠ يومًا، ثم أكثرت تلك النموات باستعمال العقل الورقية nodal cuttings وبعد تجذير تلك النموات الجديدة أمكن زراعتها خارج المعمل بنجاح. وفى الوقت ذاته أمكن تكوين درنات صغيرة بمعدل ثلاث درنات صغيرة بكل نبات مزروع explant يحتوى على ثلاث عقد فى بيئة موراشيج وسكوج المزودة بالكينتين والأنسيميدول ancymidol بتركيز ٧,٥، و ١٠,١ مجم/لتر، على التوالى، وذلك فى خلال خمسة أيام من زراعتها (Ebida & Hu ١٩٩٣).

مزارع القمة الخضرية

الجزء النباتى المستخدم فى الزراعة

يكون الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار الدقيق فى مزارع القمة الخضرية إما كل النمو القمى أو بعضه (شكل ٦-٦)، وإما النمو الجانبى على ساق (شكل ٦-٧)، وإما قطعة من ساق النبات تحتوى على عدة عقد (شكل ٦-٨أ)؛ أى إن حجم الجزء النباتى المزروع يتباين كثيرًا.

وأكثر الأجزاء النباتية استعمالاً هى القمة الخضرية المندمجة التى يتراوح طولها بين ٠,٥ إلى ٢,٠ سم (شكل ٦-٩). ومن الطبيعى أن هذا الحجم أسهل فى تداوله، ولكنه قد لا يكون خاليًا من الإصابات الفيروسية.

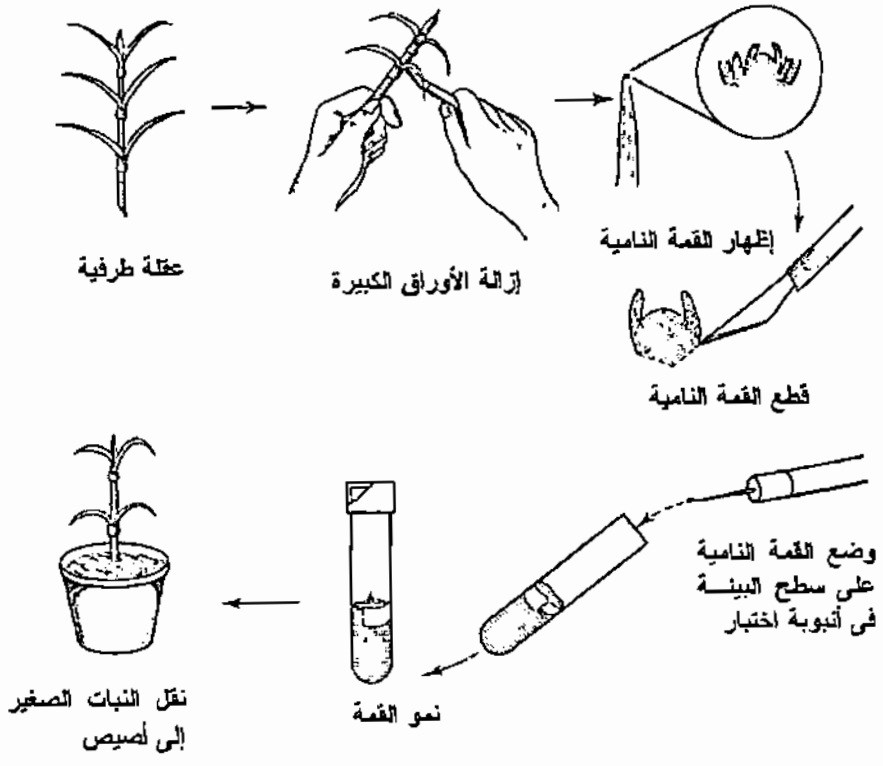
وفى نظام آخر للإكثار الدقيق تستعمل أجزاء بطول ١-٢ سم — أو أطول من ذلك — من قمة خضرية نامية وغير مكتملة التكوين، وتحتوى على أوراق غير مكتملة التكوين. وتلك الأجزاء تكون أسهل فى تداولها، ولكنها غالبًا ما تكون ملوثة بمسببات الأمراض أو مصابة بالفيروسات.

وقد تؤخذ — كذلك — أجزاء نباتية مماثلة — لزراعتها — من نموات البراعم الجانبية — تكون بمثابة عقلاً وحيدة العقدة (شكل ٦-٧، و ٦-٨ب).

تتوطد زراعة القمة الخضرية من خلال استطالة الميرستيم القمى وما يصاحب ذلك من نمو محدود للميرستيمات الإبطية - أما مرحلة التضاعف فإنها تحدث عند توقف

الميرستيم القمى وتحفيز نمو البراعم الإبطية واستطالتها ويؤدى التجديد المستمر للمزارع وفصل النموات الجديدة وزراعتها فى بيئات جديدة إلى إحداث تضاعف كبير فى النمو، ولكن يبقى مدى ذلك التضاعف رهنًا على عدد البراعم الإبطية فى الجزء النباتى المزروع.

وكذلك فإن إنتاج النموات الجانبية قد يتحقق من خلال التكوين الغزير لبراعم إبطية من الكالس فى قاعدة الجزء النباتى المزروع (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).



شكل (٦-٦) مزارع القمة الخضرية فى القرنفل.

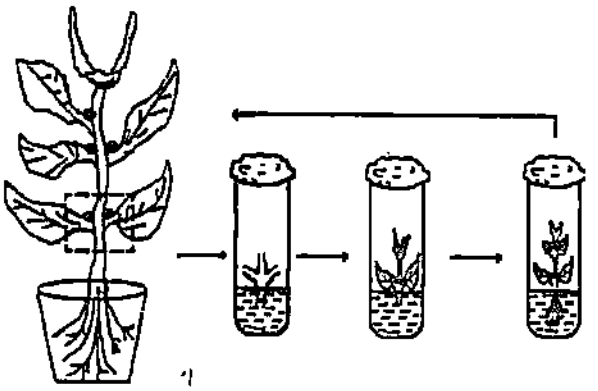
الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية

يُراعى فى عملية الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية ما يلى:

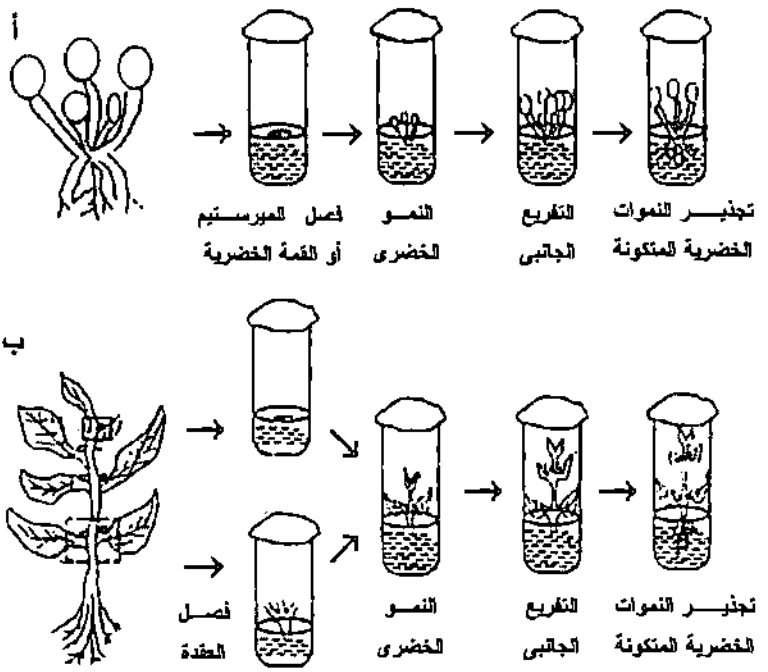
١ – الجزء النباتى المزروع:

ما لم يكن الهدف من الإكثار الدقيق هو التخلص من الفيرس، فإنه يكون من المفضل

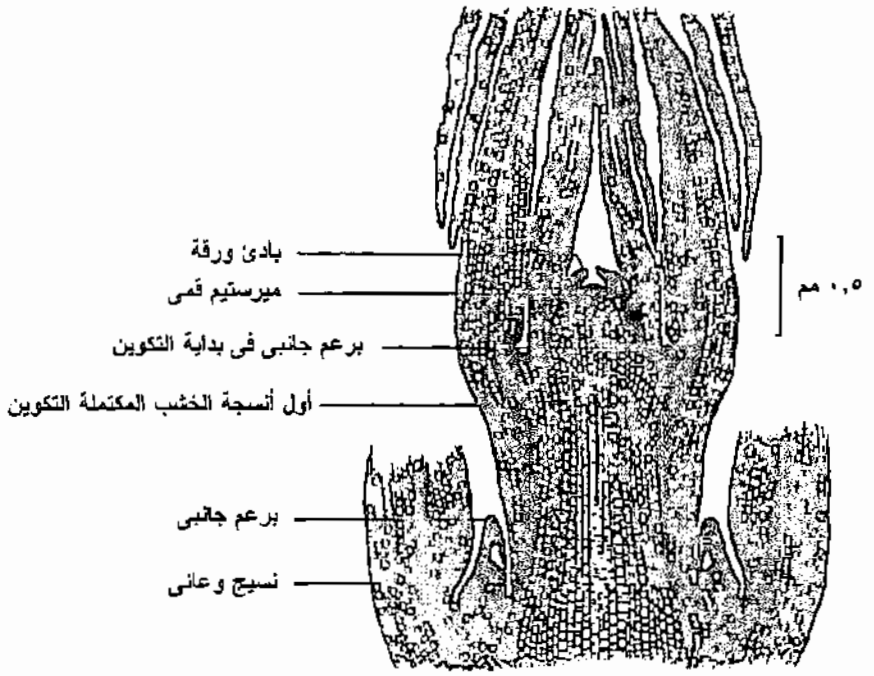
بدء المزارع من عقد ساقية؛ ذلك لأن البراعم أو القمم الميرستيمية المفصولة من النباتات البالغة قد تموت، وقد لا تعطى نتائج جيدة. أما عند استعمال العقد الساقية فإن النسيج الأمى للعقل الصغيرة المزروعة يلعب دورًا هامًا فى بقاء ونمو البراعم.



شكل (٦-٧): مزرعة إكثار دقيق تعتمد على استخدام العقدة المفردة.



شكل (٦-٨): مزرعة إكثار دقيق تعتمد على استخدام البراعم الإبطية: (أ) فى حالة النباتات ذات النمو المتورد rosette، (ب) وفى حالة النباتات ذات السيقان الطويلة elongate



شكل (٦-٩) القمة الخضرية النباتية

٢ التلون البنى للبيئة

يعتبر تأكسد المواد الفينولية التى تتسرب من السطح المقطوع للأجزاء النباتية المزروعة التى تؤخذ من الأنسجة المكتملة النمو للأنواع الخشبية — وبعض الأنواع الأخرى كذلك — يعتبر أحيانا مشكلة خطيرة، حيث تغير أكسدة الفينولات لون البيئة إلى البنى القاتم نسبيًا، كما تصبح سامة للأنسجة وتؤدى سرعة نقل الأجزاء النباتية المزروعة إلى بيئة جديدة مرتين أو ثلاث مرات على فترات قصيرة (أيام قليلة) إلى الحد من تلك المشكلة أحيانًا، حيث يلتئم خلال تلك الفترة السطح المقطوع للجزء النباتى المزروع، ويتوقف التسرب منه

وإذا ما استمرت مشكلة التلون البنى فى كل مرة تعاد فيها الزراعة فإنه يوصى بإضافة أحد مضادات الأكسدة إلى بيئة الزراعة، مثل الـ cysteine-HCl (بتركيز ١٠٠ مجم لتر)، وحامض الأسكوربيك (بتركيز ٥٠-١٠٠ مجم/لتر). وحامض الستريك (بتركيز ١٥٠ مجم/لتر) كذلك وجد أنه بإضافة البولى فينيل بيروليدون polyvinyl-

pyrrolidone — الذى يقوم بامتصاص المركبات الفينولية — فإنه يمكن إنقاذ النسيج النباتى المزروع من التأثير السام للفينولات المؤكسدة. هذا .. مع العلم بأن إبقاء المزارع فى الظلام فى بداية الزراعة يحد من مشكلة التلون البنى لأن الضوء يساعد فى تحفيز أكسدة الفينولات.

٣ — دور الفلوروجلوكينول:

يلعب الفلوروجلوكينول phloroglucinol — وهو مركب فينولى يوجد فى عصارة الخشب بالتفاح —يلعب دورًا فى تضاعف السيقان وتجذير عدد من الأنواع النباتية بالعائلة الوردية (Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

التطعيم الدقيق للقمة الخضرية

يُعَرَّف التطعيم الدقيق micrografting بأنه تطعيم قمة نامية من النبات الأم على نبات صغير نامٍ فى صوبة أو فى مشتل، أو على بادرة نباتية أنتجت فى ظروف معقمة — وذلك بعد إزالة قمتها — أو على عقلة دقيقة حُصِل عليها من التكاثر الدقيق فى مزارع الأنسجة.

ومن أهم مزايا التطعيم الدقيق للعربى، ما يلى:

١ — التخلص من الفيروسات، عندما يكون من الصعب تجديد نمو سيقان وجذور من القمة الخضرية للنباتات الخشبية فى مزارع الأنسجة.

٢ — تخطى مرحلة الحداثة التى ترتبط بالإكثار البذرى فى النباتات الخشبية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

ولقد نجحت طريقة التطعيم الدقيق فى كل من الموالح، والتفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية.

وفى الموالح .. نجحت هذه الطريقة فى إنتاج نباتات فى مرحلة النمو البالغ adult stage مباشرة دون المرور بمرحلة الحداثة القوية التى تمر بها البادرات التى تنتج من الأجنة النيوسيلية، وهى الطريقة التى تستعمل — كذلك — فى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيروسية (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

مزارع القمة الخضرية الميرستيمية

يستفاد من مزارع القمة الخضرية الميرستيمية Meristem Shoot Tip Culture (شكل ٦-١٠) فى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية، ويعد ذلك أمرًا بالغ الأهمية فى المحاصيل التى تتكاثر خضريًا، والتى تنتقل فيها الفيروسات تلقائيًا مع الأجزاء الخضرية المستخدمة فى التكاثر

وبرغم أن النباتات قد تكون مصابة جهازيًا بالفيروسات إلا أن القمة الميرستيمية النامية تكون غالبا خالية تمامًا من الفيروسات، أو لا تحتوى إلا على قليل جدً منها. ويرجع ذلك إلى الأسباب الآتية

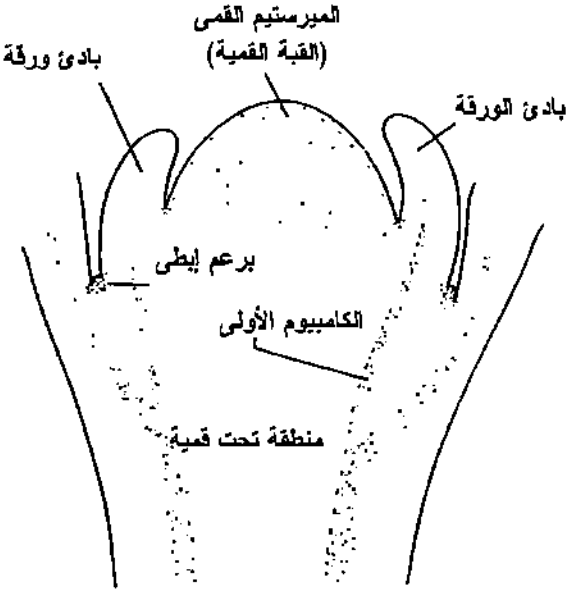
١ — خلو القمة الميرستيمية من الأنسجة الوعائية التى يكون انتقال الفيروسات فيها سريعًا، بينما يكون انتقالها خلال الروابط البروتوبلازمية أبطأ من سرعة نمو القمة النامية

٢ — يكون النشاط الأيضى فى الخلايا الميرستيمية عاليًا بدرجة يقل معها تكاثر الفيرس فيها

٣ - تكون نظم المقاومة لتكاثر الفيروسات أعلى من الأنسجة الميرستيمية مما فى أى نسيج آخر

٤ - قد يتبط التركيز العالى للأوكسين الطبيعى فى القمة النامية نشاط الفيروسات فيها

ولهذه الأسباب كلها فإن فصل القمة الميرستيمية (شكل ٦-١١، يوجد فى آخر الكتاب) وزراعتها فى بيئة صناعية يؤدى إلى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية وقد استخدمت هذه التقنية تجاريًا، لإنتاج نباتات خالية من الفيرس من عديد من الأنواع النباتية، مثل الفراولة (شكل ٦-١٢، يوجد فى آخر الكتاب). والبطاطس، والبطاطا، والروبارب، والكاسافا، والكرسون المائى، واليام، وقصب السكر، والتفاح، والموز، وعديد من نباتات الزينة التى تتكاثر خضريًا، والأسبرجس (شكل ٦-١٣. يوجد فى آخر الكتاب)



شكل (٦-١٠): القمة الخضرية لنبات ثنائى الفلقة، تظهر فيها القمة الميرستيمية ومبادئ الأوراق المحيطة بها، وما فى آباطها من براعم إبطية (عن Wang & Charles ١٩٩١)

يتكون الميرستيم القمى -- عادة -- من قبة من النسيج تقع فى قمة النمو الخضرى وتقدر بنحو ١ ٠ مم فى القطر، وحوالى ٠,٢٥-٠,٣ مم فى الطول. وتتشكل القمة الخضرية النامية shoot apex من تلك القمة الميرستيمية apical meristem مع بادئة ورقية صغيرة واحدة إلى ثلاث بادئات، تقدر كلها بنحو ٠,١ إلى ٠,٥ ملليمترًا

وقد يتكون الجزء النباتى الذى يستخدم فى الزراعة explant فى مزارع القمة الميرستيمية إما من القبة الميرستيمية القمية فقط، وإما من تلك القبة مع قليل من مبادئ الأوراق المجاورة لها، علمًا بأن تواجد بعض مبادئ الوريقات مع القبة الميرستيمية -- التى تقطع بطول حوالى ٠,٣-٠,٥ مم -- يفيد فى نجاح الزراعة.

أما مزارع الإكثار الدقيق التى يكون فيها النبات الذى يُراد إكثاره خال أصلاً من الإصابات الفيروسية، فإنه تفضل زراعة القمة الخضرية بطول ٢ سم (عن Chawla ٢٠٠٠).

ويقسم الميرستيم القمي – عادة – إلى منطقتين، هما:

١ – الميرستيم الأولى promeristem . وهو الذى يتكون من الخلايا الميرستيمية القمية والخلايا المجاورة لها.

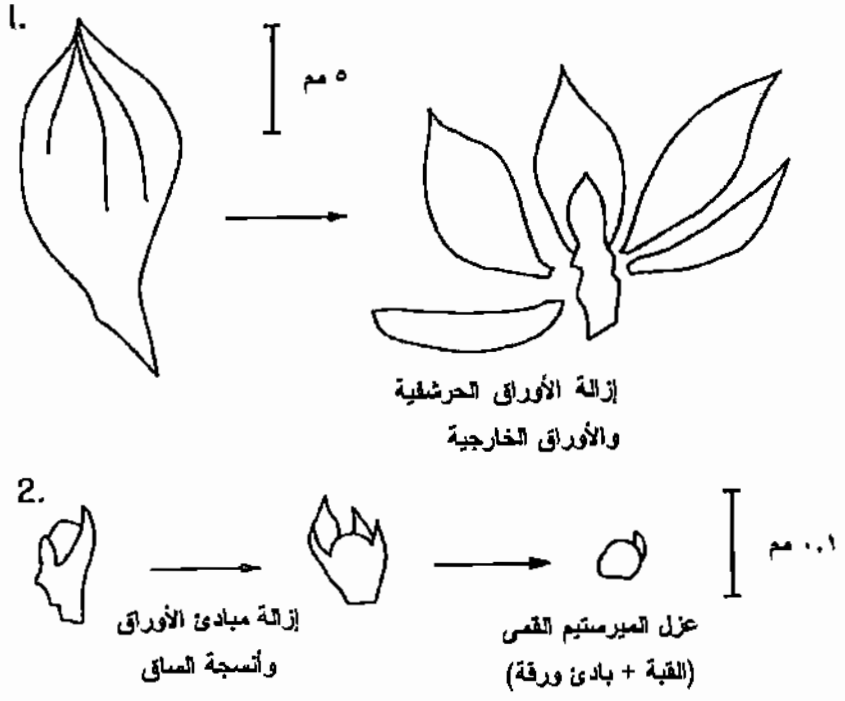
٢ – الميرستيم المحيطى peripheral meristem .. وهو الميرستيم الذى يوجد أسفل الميرستيم الأولى ويحيط به جانبيًا ومن أسفله، ويمكن أن يميز به كلا من مبادئ الأوراق leaf primordia، والكامبيوم الأولى procambium، والميرستيم الأساسى ground meristem.

وعند زراعة القمة النامية الميرستيمية فإن الجزء المستخدم فى الزراعة يكون هو القبة القمية apical dome، وهى المنطقة التى تكون محصورة داخل مبادئ الأوراق، والتى يتراوح قطرها بين ٠,٠٧٥، و ١٢ ٠ مم، وطولها بين ٠,٢، و ٠,٢٥ مم ولا تتصل تلك القبة القمية بجهاز وعائى مع أى من الأنسجة المكونة للميرستيم المحيطى؛ الأمر الذى يفيد – كثيرًا – فى منع وصول المسببات المرضية – وخاصة الفيروسات – إلى القبة القمية

وعمليًا . تستخدم – عادة – فى الزراعة القبة القمية (الميرستيم الأولى) مع بعض مبادئ الأوراق المحيطة بها وإذا ما تضمن الجزء المزروع جزءًا من الساق يحتوى على جزء – ولو يسير – من النسيج التالى للنسيج الميرستيمى تحت القمى، فإن طريقة الإكثار يجب أن تكنى باسم مزارع القمة النامية shoot tip culture (شكل ٦–١٤)، وليس meristem culture، علمًا بأن فصلهما يكون تحت المجهر (Wang & Charles ١٩٩١)

ويعتبر فصل القمة النامية سريعًا – دون إحداث أضرار بها – من أهم مقومات نجاح مزارع القمة الميرستيمية. هذا .. بالإضافة إلى أهمية بيئة الزراعة التى يجب أن تكون محفزة لتكوين الجذور والأوراق من القمم الميرستيمية المزروعة.

وتتطلب زراعة القمة الميرستيمية – عادة – بيئات تحتوى على تركيز منخفض من السيتوكينين وتركيز متوسط من الأوكسين، ولكن تلزم إعادة الزراعة فى بيئة خالية من الأوكسين لتحسين التجذير.



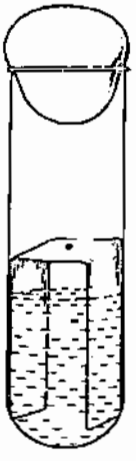
شكل (٦-١٤): فصل القمة النامية الميرستيمية وزراعتها (عن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

وتزداد فرصة تميز النباتات فى المزرعة كلما ازداد حجم القمة الميرستيمية المزروعة، ذلك لأن القمم الصغيرة تنتهى غالبًا بتكوين جذور وكالس، وربما لا تعطى جذورًا ألبتة إن كانت صغيرة جدًا، فى حين أن القمم الخضرية الكبيرة قد لا تكون خالية من الفيرس؛ لذا .. فإن القاعدة هى أن تكون القمم الميرستيمية المزروعة صغيرة بالقدر الذى

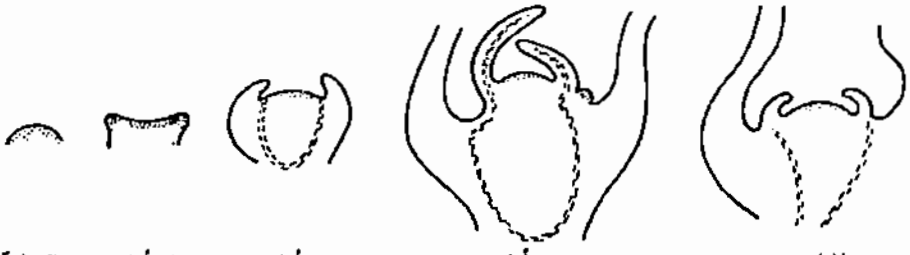
يضمن خلوها من الفيرس، وكبيرة بالقدر الذى يسمح بتميزها إلى نباتات مكتملة النمو. وعمومًا فإن طول القمة الميرستيمية التى تستعمل فى الزراعة يختلف باختلاف النوع النباتى، وهى تتراوح فى الفراولة — على سبيل المثال — بين ٠,٥، و ٠,٩ مم لأفضل تجديد للنمو مع التخلص من الإصابات الفيروسية.

وقد وجد أن النباتات المصابة جهازيًّا بالفيروسات تعطى عند زراعة أى من أنسجتها المصابة خلايا كالس، تختلف فى محتواها من الفيرس، وأمكن الحصول على نباتات خالية من الفيرس من خلايا الكالس السليمة فى هذه المزارع كذلك .. وجد أن نسبة النباتات الخالية من الفيرس كانت أعلى بكثير من النباتات التى تميزت من الكالس فى مزارع القمة الميرستيمية عما فى النباتات التى تميزت من القمة الميرستيمية مباشرة وربما يرجع السبب فى ذلك إلى أن سرعة تكاثر الفيرس تكون أقل من سرعة تكاثر الخلايا فى نسيج الكالس. هذا .. إلا أن كثيرًا من الأنواع النباتية الهامة لم تتميز فيها نباتات من نسيج الكالس، كما أن هذا النسيج لا يكون ثابتًا وراثيًّا.

بعد فصل القمة الميرستيمية، فإنه يفضل وضعها على قنطرة من ورقة ترشيح مغمورة — جزئيًّا — فى بيئة سائلة فى أنبوبة اختبار (شكل ٦–١٥)، حتى تكبر بالقدر الكافى (شكل ٦–١٦) قبل نقلها إلى بيئة سائلة.



شكل (٦–١٥): تقية زراعة القمة الميرستيمة على قنطرة من ورقة تشريح مغمورة جزئيًّا فى بيئة سائلة فى أنبوبة اختبار.



شكل (٦-١٦): مراحل نمو القمة الميرستيمية لنبات القرنفل بدءًا من فصلها حتى اليوم السابع عشر من زراعتها فى بيئة موراشيج وسكوج مزودة بالكينيتين وإندول حامض الخاليك. يلاحظ بدء ظهور محورى النمو الخضرى والجذرى من اليوم السابع، وعدة أوراق بدءًا من اليوم العاشر للزراعة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا .. ويستفاد من مزارع القمة الميرستيمية 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 آلاف النباتات المنتجة بهذه الطريقة من أية إصابة فيروسية أو ميكوبلازمية.

٢ — عمل إكثار أولى للنباتات الخضرية التكاثر التى تصاب بشدة بالأمراض الفيروسية؛ لإنتاج تقاوٍ من الفئات الممتازة التى تكثر بعد ذلك خضريًا، لإنتاج التقاوى التى يستخدمها المزارعون؛ وتلك هى الطريقة التى تتبع فى إكثار تقاوى البطاطس والفراولة التى تصاب بنحو ٦٢ مرضًا 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.

وتعد هذه الطريقة فى الإكثار سهلة ومناسبة لعديد من النباتات العشبية، مثل: القرنفل، والبطاطس، والأقحوان، والأوركيد، والفراولة.

العوامل المؤثرة فى عملية الإكثار الدقيق

تتأثر عملية الإكثار الدقيق بالعوامل التالية:

أولاً: بيئة الزراعة

تؤثر بيئة الزراعة فى عملية الإكثار خلال مختلف المراحل، كما يلى.

١ – بداية الزراعة وتضاعف النموات:

أثبت مخلوط أملاح بيئة موراشيج وسكوج صلاحية للإكثار الدقيق فى عديد من الأنواع المحصولية. وغالبًا ما يمكن استعمال البيئة ذاتها لكل من بدء الزراعة culture initiation، وتضاعف النموات الخضرية shoot multiplication

وتتباين احتياجات منظمات النمو تبعًا للكيفية التى تتضاعف بها النموات الخضرية، علمًا بأن تميز الأعضاء يعتمد على التوازن بين مجموعتين من الهرمونات والتركيز النسبى لهما، وهما: الأوكسينات والسيتوكينينات. وتبعًا لذلك . فإن نسبة السيتوكينين المرتفعة مقارنة بنسبة الأوكسين تحفز تكوين النموات الخضرية، بينما تحفز نسبة الأوكسين المرتفعة مقارنة بالسيتوكينين تكوين الجذور ولا يعنى ذلك أنه لتحفيز كل من التفريع الجانبى وتكوين الجذور ينبغى توفر كلاً من الهرمونين فى البيئة وعلينا أن نتذكر – كذلك – أن الاحتياجات الإضافية من الهرمونات التى يتعين تزويد بيئة الزراعة بها تتوقف على مستواها فى النبات المزروع، الأمر الذى يختلف باختلاف الجزء النباتى explant المستعمل فى الزراعة، والنوع النباتى، ومرحلة النمو النباتى ومن ثم فإن تضاعف النمو الخضرى لا يتطلب بالضرورة تزويد بيئة الزراعة بأوكسين إضافى وفى كثير من الأحيان يكفى تزويد البيئة بالسيتوكينين فقط لإحداث التضاعف المطلوب فى النموات الخضرية

ويتعين تحديد الاحتياجات الكمية من كل من السيتوكينين والأوكسين لإحداث أقصى تضاعف ممكن، الأمر الذى يتحدد – لكل نوع نباتى – بسلسلة من التجارب ولقد استعملت السيتوكينينات بتركيز ٥ ٠–٣٠ مجم/لتر، إلا أن تركيز ١–٢ مجم/لتر يعد مناسبًا فى معظم الحالات، علمًا بأن تركيزات السيتوكينيات الأعلى تستحث تكوين

البراعم العرضية بسرعة كبيرة؛ حيث يكون من الصعب تحديد أصل كل نمو منفرد عند تجديد الزراعة. وباستعمال تركيز منخفض من السيتوكينين (٥ مجم/لتر من 2-ip) .. فإن تكوين النموات العرضية ينخفض كثيرًا، ولكن يظل من الممكن تحقيق ٣-٦ تضاعفات فى النموات كل ٦ أسابيع من خلال تحفيز التفريع الجانبى. وفى النباتات التى لا تكون فيها البراعم العرضية مأمونة الجانب فى عملية الإكثار الدقيق، فإنه يتعين التضحية بالكمية لأجل النوعية الجيدة. كذلك فإن زيادة تركيز السيتوكينين قد يحدث تشوهات مورفولوجية، كالأوراق المشوهة فى البيجونيا.

وفى التركيزات العالية من السيتوكينينات قد تزداد أعداد النموات الخضرية المتكونة إلا أن نمو كل واحد منها يبقى مقيدًا؛ الأمر الذى قد يتطلب خطوة زراعة إضافية فى بيئة ذات محتوى منخفض من السيتوكينين — وربما فى وجود حامض الجبريلليك — لأجل تحفيز استطالة النموات، قبل محاولة تجذيرها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

ومن بين مختلف الأوكسينات فإن إندول حامض الخليك IAA هو أكثرها ثباتًا؛ ولذا . فإن الأوكسينات المخلقة، مثل NAA، و IBA هى المفضلة للاستعمال فى بيئات مزارع الأنسجة ولأجل تضاعف النموات الخضرية ينبغى أن يتراوح تركيزها بين ٠.١ إلى ١ مجم/لتر. وبسبب تأثيره القوى فى تحفيز تكوين الكالوس .. فإن الـ 2,4-D لا يستخدم عند الرغبة فى إحداث تضاعف للنموات الخضرية من خلال التفريع الجانبى أو تكوين البراعم العرضية. ولكن يعد الـ 2,4-D أهم أوكسين للاستعمال عند الرغبة فى تحفيز تكوين الأجنة الجسمية.

ونظرًا لأن البيئات شبه الصلبة هى الأسهل فى عمليات التداول، لذا .. فإن بيئات الإكثار الدقيق يضاف إليها الآجار بتركيز ٠.٦-٠.٨٪، إلاّ أن بعض الأنواع النباتية تناسبها البيئات السائلة.

٢ — التجذير:

وجد أن البيئات ذات المحتوى المنخفض من الأملاح أكثر مناسبة لتجذير عدد كبير

من الأنواع النباتية عن تلك التى تحتوى على تركيز مرتفع من الأملاح، حيث تستعمل – عادة – بيئة موراشيج وسكوج بنصف قوتها، أو حتى بربع قوتها.

وقد ذكر أن الريبوفلافين يُحَسِّن من عملية التجذير فى النوع *Eucalyptus ficifolia*

ثانياً: الضوء

يؤثر الضوء فى عملية الإكثار الدقيق خلال مختلف مراحلها، كما يلى.

١ – بدء الزراعة وتضاعف النموات.

على الرغم من أن نموات المزارع تكون خضراء اللون، فإنها لا تعتمد على البناء الضوئى لتصنيع احتياجاتها من الغذاء، فهى تنمو كـ heterotrophs معتمدة فى كل غذائها العضوى وغير العضوى على بيئة الزراعة، وتقتصر الاحتياجات الضوئية لتلك المزارع – فقط – على عمليات التميز المورفولوجى، وتكفى لذلك إضاءة قوتها ١٠٠٠–٣٠٠٠ لكس، علمًا بأن ١٠٠٠ لكس هى القوة الأنسب لعدد كبير من الأنواع النباتية، وأن قوة تزيد عن ٣٠٠٠ لكس تعد مثبطة للنمو. أما الفترة الضوئية فهى ليست حرجة، ولكن يناسب معظم المزارع إضاءة مدتها ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات من الظلام

٢ – التجذير.

يعد التجذير فى المزارع ضروريًا للقيام بعملية الشتل وللتخفيف من صدمة الشتل ويعمل خفض مستوى السكروز إلى حوالى ١٪ مع زيادة شدة الإضاءة إلى ٣٠٠٠–١٠٠٠٠ لكس خلال مرحلة التجذير على تحويل النبات من الاعتماد على البيئة فى غذائه (heterotrophic) إلى الاعتماد على نفسه (autotrophic)، كما تحفز الإضاءة العالية التجذير الجيد، وتزيد من تقسية النباتات. وقد تبدو النباتات فى ظروف الإضاءة العالية أقل اخضرارًا وقوة فى النمو، إلا أنها تكون أقدر على تحمل عملية الشتل عن النباتات الطويلة الخضراء التى تبقى معرضة لإضاءة منخفضة (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا . وقد وجد فى مزارع البطاطس أن إضاءة شدتها ١٠٠ لكس كانت مناسبة لبدء

المزرعة، مع إمكان زيادة شدة الإضاءة إلى ٢٠٠٠ لكس بعد أربعة أسابيع من التحضين. ومع بلوغ النمو الخضرى ١ سم طولاً .. تجب زيادة الإضاءة إلى ٤٠٠٠ لكس. وتعد الإضاءة العالية تلك مفيدة فى زيادة معدل بقاء المزرعة عندما تبدأ النموات فى الازدياد عددًا وطولاً، وبعد نقلها إلى بيئة التجذير. وتعد تلك القيم لشدة الإضاءة مناسبة لأنواع نباتية أخرى كثيرة، منها الأسبرجس، والجيربيرا *Gerbera*. وإن كان من الممكن زيادة شدة الإضاءة فى المرحلة الأخيرة حتى ١٠٠٠٠ لكس.

ونظرًا لأن الضوء يحفز التلون البنى فى الأجزاء المزروعة ذات المحتوى العالى من البولى فينول polyphenol، فإنه يوصى بخفض شدة الإضاءة إلى أقل من ١٠٠٠ لكس، أو تحضين المزرعة فى الظلام. وفى البلارجونيم *Pelargonium* يتحتم توفير ظلام كامل لفترة فى مزارع القمة الخضرية لتجنب التأثير المثبط لنشاط إنزيم البولى فينول أوكسيديز فى ظروف الإضاءة. وعلى العكس من ذلك .. فإن الإضاءة أفضل من الإظلام بالنسبة للبطاطس.

وللحصول على أكبر قدر من النمو ومنع دخول المزرعة فى حالة سكون تفضل — فى معظم الحالات — توفير فترة ضوئية طويلة تبلغ — عادة — ١٦ ساعة بالتبادل مع ٨ ساعات ظلام. وفى الغالب تتوفر الإضاءة من لمبات فلورسنتية بيضاء باردة، وقد تستعمل أحيانًا لمبات تونجستين صغيرة — بالإضافة إلى اللمبات الفلورسنتية — لتزويد المزرعة بكل من الضوء الأحمر والأشعة تحت الحمراء (عن Wang & Charles ١٩٩١).

ثالثًا: درجة الحرارة

تتباين درجة الحرارة المثلى المناسبة لمزارع الإكثار الدقيق باختلاف النوع النباتى — المزروع، وهى لا تختلف كثيرًا عن الاحتياجات الحرارية العادية تحت ظروف الزراعة الطبيعية، وغالبًا ما تتراوح حرارة تحضين المزارع بين ٢٠، و ٢٨°م، وتكون أكثرية الأنواع النباتية فى منتصف ذلك المدى. وفى أغلب الحالات تبقى الحرارة ثابتة على مدى اليوم، لكن بعض الأنواع يناسبها تباين قدره °٣ فى درجة الحرارة. ويؤدى ارتفاع الحرارة عن ٢٨°م إلى تكثف الماء على النباتات وجدران الأوعية؛ مما قد يحد من النمو.

وعادة لا يتم التحكم فى الرطوبة النسبية أثناء تحضين المزارع، وإذا تم التحكم فيها . فإنها تكون غالبًا بين ٦٠٪، و ٨٠٪، والأفضل ضبطها عند ٧٠٪ (Wang & Charles ١٩٩١).

التحديات التى تواجه عمليات الإكثار الدقيق

إن من أهم المشاكل التى قد تواجه عملية الإكثار الدقيق، ما يلى.

١ — التلوث الميكروبى.

يعد التلوث الفطرى والبكتيرى من أكبر المشاكل التى لا تسمح بنمو المزارع وتؤدى إلى حتمية التخلص منها. ويمكن التغلب على تلك المشكلة بتنمية النباتات التى يؤخذ منها الأجزاء التى تستعمل فى زراعة الأنسجة فى غرف نمو، مع التعقيم الجيد لتلك الأجزاء. وإجراء كل عمليات الزراعة فى البيئات فى Laminar Air Flow Cabinets مزودة بمرشحات HEPA (٠,٢ ميكروميتر)، واستعمال أدوات تشريح معقمة ويفيد تبخير حجرات الزراعة باستعمال محلول فورمالين مخفف فى تقليل حالات التلوث الميكروبى

٢ — تلون بيئات الزراعة باللون البنى.

تفرز الأجزاء النباتية المزروعة من بعض النباتات — مثل قصب السكر — مركبات فينولية فى بيئة الزراعة تؤدى إلى اكتسابها لونا بنيًا، وتقليل نمو الأجزاء النباتية المزروعة فيها. ويرجع هذا التلون إلى تأكسد المركبات الفينولية العديمة اللون وتحولها إلى مركبات أخرى بنية اللون. ويمكن الحد من ظاهرة التلون البنى بتزويد بيئة لزراعة بالفحم النباتى النشط بنسبة ٠,١—٠,٢٪، أو بحامض الستريك أو حامض الأسكوربيك بتركيز ٥٠٠—١٠٠٠ مجم/لتر، أو بالبولى فينيل بيروليدون polyvinylpyrrolidone (اختصارًا: PVP)

٣ — تكوين الكالس.

على الرغم من أن تكوين الكالس callusing قد يكون مرغوبًا فيه أحيانًا، إلاّ أنه غالبا ما يكون أمرا غير مرغوب فيه، نظرًا لأن كتلة خلايا الكالس غير المتميزة تؤثر فى

التطور الطبيعى لكل من النمو الخضرى والجذرى، وقد يؤدى إلى ظهور تباينات وراثية فى النباتات التى يتجدد نموها. ومن بين الوسائل التى تحد من ظاهرة تكوين الكالس تزويد البيئة بالـ triiodobenzoic acid، والـ phloroglucinol، والـ phloridzin، أو خفض تركيز الأملاح غير العضوية فى بيئة الزراعة.

٤ — التزجج:

التزجج vetrification هو ظهور نباتات غير طبيعية المظهر (زجاجية المظهر ونصف شفافة) فى بيئة الزراعة، وخاصة عند استعمال بيئات سائلة. تبدو هذه النباتات غير طبيعية المظهر بسبب النمو غير الطبيعى لأوراق نباتات المزارع، وقلة محتواها من الشمع الأديمى، وضعف كفاءتها فى البناء الضوئى، وعدم قيام الثغور بوظائفها. ويمكن الحد من تلك الظاهرة بجعل ظروف الزراعة تسمح بحركة الماء والغذاء والعناصر فى النبات من خلال خفض الرطوبة النسبية فى أوعية الزراعة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

٥ — حساسية النباتات الصغيرة الناتجة من الإكثار الدقيق لصدمة الشتل:

إن أكبر مشكلة فى عملية الإكثار الدقيق هى موت نسبة كبيرة من النبات فى مرحلة الأقلمة، أى بعد نقلها من مزرعة الإكثار إلى بيئات النمو العادية.

ولزيادة فرصة بقاء النباتات المكثرة خلال مرحلة الـ acclimatization فإن الظروف البيئية فى بدايات تلك المرحلة يجب أن تقترب من ظروف مرحلتى النمو التكاثرى والتجذير فى البيئة الصناعية. ولزيادة فرصة بقاء النباتات المتأقلمة بعد نقلها إلى المكان الدائم لنموها، يجب أن تقترب الظروف البيئية عند اقتراب نهاية فترة الأقلمة من الظروف التى سوف تتعرض لها النباتات بعد النقل الدائم .. هذا فى الوقت الذى يجب فيه تحفيز عملية البناء الضوئى خلال عملية الأقلمة.

ومن أهم العوامل التى يجب توفيرها خلال مرحلة الأقلمة الرطوبة النسبية العالية، وخاصة فى المراحل المبكرة من فترة الأقلمة، ويتحقق ذلك بتغطية النباتات الصغيرة بغشاء بلاستيكى، مع التظليل والتضبيب (misting) المتكرر. ويعد التظليل ضروريًّا لأن ضوء الشمس القوى ذاته قد يضر بالنباتات الصغيرة، كما قد يزيد من فقد النباتات لرطوبتها بسبب رفعه لدرجة الحرارة، ومن ثم خفضه للرطوبة النسبية.

وبينما يعد التضبيب أسهل وسيلة لرفع الرطوبة النسبية، فإنه يضعف عملية البناء الضوئى، ومن ثم يبطئ من عملية تجذير النباتات الصغيرة واعتمادها على ذاتها فى تحضير غذائها وامتصاصها لاحتياجاتها من الماء والعناصر. ومع تقدم عملية الأقلمة تُخفَّض – تدريجيًا – شدة التظليل ومعدلات التضبيب (عن Kozai ١٩٩١)

٦ – التباينات الوراثية التى تظهر فى مزارع الإكثار الدقيق.

بينما قد تكون تباينات مزارع الأنسجة أمرًا مرغوبًا فيه بالنسبة لمربى النبات الذى يسعى – دائمًا – إلى الحصول على تلك التباينات التى قد تفيده فى برامج التربية، إلاّ أنها لا تفيد – أبدًا – فى عملية الإكثار الدقيق التى يجب أن تعطى نباتات متجانسة وصادقة للصنف المكثر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

تطبيقات الإكثار الدقيق فى مجال تربية النباتات وإكثارها

استعراض التطبيقات

إن من أهم تطبيقات مزارع الإكثار الدقيق التى تخدم تربية النبات، ما يلى:

١ – التخلص من الفيروسات

يتبع فى التخلص من الفيروسات الطرق التالية:

أ – المعاملة الحرارية:

تعرف تلك المعاملة باسم thermotherapy، وبمقتضاها تعرض النباتات لحرارة عالية نسبيًا، وهى تستخدم فى التخلص من الفيروسات والميكوبلازما، وقد تستعمل منفردة، أو مع المعاملة الكيميائية، أو مع مزارع القمة الميرستيمية، أو مزارع القمم النامية المجزأة.

ب – استعمال مضادات الفيروسات:

تعرف تلك المعاملة باسم chemotherapy، وبمقتضاها تعامل الأجزاء النباتية التى تؤخذ منها الأجزاء (explants) التى تستعمل فى الزراعة، وذلك قبل فصلها. هذا وقد تضاف تلك المركبات الكيميائية إلى بيئة الزراعة – كذلك – وذلك لأجل دعم عملية التخلص من الفيروسات ويستخدم لهذا الغرض مركبات مثل مالاشايت جرين malachite green، وفيراكسول virazole.

جـ – مزارع القمة الميرستيمية:

يتضمن الجزء النباتى explant الذى يستخدم فى مزارع القمة الميرستيمية القبة الميرستيمية، بالإضافة – عادة – إلى زوج من مبادئ الأوراق.

د – مزارع القمم النامية المجزأة fragmented shoot apices culture:

تستعمل مزارع القمم النامية المجزأة على نطاق واسع فى إكثار العنب.

هـ – التطعيم الدقيق فى البيئات الصناعية in vitro micrografting.

هذا .. ويجب أن نتذكر أن النباتات الناتجة من مزارع الإكثار الدقيق لا تكون – بالضرورة – خالية من الفيروسات وإنما هى غالبًا ما تكون خالية، ويلزم إجراء اختبارات عليها للتأكد من خلوها من الإصابات الفيروسية. ومن بين الاختبارات الشائعة الاستعمال لهذا الغرض اختبار إلايزا ELISA.

وعلى الرغم من احتمال إصابة النباتات بالفيروسات بعد نقلها إلى حقل الزراعة، إلاّ أن بدء زراعتها وهى خالية من الفيروسات يعطيها دفعة قوية من النمو.

٢ – الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر:

يمكن إكثار نبات واحد إلى عدة ملايين من النباتات فى خلال عام واحد، الأمر الذى يستحيل تحقيقه بطرق التكاثر العادية، وبذا .. فإن الإكثار الدقيق يعد أدة غاية فى الأهمية لإسراع تكاثر الأنواع الخضرية التكاثر.

كذلك يفيد الإكثار الدقيق فى الإكثار التجارى للنباتات الخضرية التكاثر مع المحافظة على صفة التجانس، كما حدث بالنسبة لمحاصيل الخرشوف (إيطاليا)، والثوم (التشيك وسلوفاكيا)، والبطيخ الثلاثى (رومانيا)، والروبارب (بلجيكا)، وفجل الحصان (ألمانيا)، وغيرهم.

٣ – تسهيل إكثار الأجزاء النباتية المسنة – التى يصعب غالبًا إكثارها خضريًّا – بإعادة الحداثة إليها فى مزرعة أنسجة، ثم إكثارها بعد ذلك

٤ – غالبًا ما تكون النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة أقوى نموًّا عن مثيلاتها الناتجة من الإكثار العادى، بسبب استعادتها لحداثتها، أو لخلوها من الإصابات

الفيروسية، وبذا فإن الإكثار الدقيق يفيد فى استعادة النباتات المعمرة لحداثتها بعدما تكون قد وصلت إلى مرحلة الشيخوخة.

٥ — يعد الإكثار الدقيق وسيلة سهلة واقتصادية — كذلك — فى الأنواع التى يعد إكثارها معقدا وبطيئًا.

٦ — يمكن إكثار الجيرمبلازم بسهولة على صورة مزارع أنسجة، مع المحافظة عليه خاليًا من الإصابات الفيروسية، ودونما حاجة إلى إعادة تجديد الزراعة على فترات متقاربة، خاصة عند حفظ المزارع فى النيتروجين السائل (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

٧ — تسهيل مهمة انتقال الجيرمبلازم عبر الحدود بين الدول على صورة مزارع أنسجة خالية من الإصابات المرضية، دونما حاجة إلى إجراءات الحجر الزراعى

٨ — إن إنتاج الدرنات الصغيرة جدًا (الـ microtubers) فى البيئات الصناعية من أجزاء نباتية خالية من الفيرس أثبتت جدواه كطريقة فعالة لإكثار الجيرمبلازم، وتخزينه، وانتقاله من دولة لأخرى، على الأقل فى كل من البطاطس واليام

٩ — الإكثار التجارى السريع للنباتات البذرية التكاثر

يمكن فى النباتات البذرية التكاثر — وخاصة خلطية التلقيح منها — إكثار النباتات الفردية ذات الصفات المتميزة دونما حاجة إلى تأصيلها، مع إمكانية تخزينها، واستعمالها فى أغراض التربية، والحصول على انعزالات وراثية منها — فيما بعد — عندما نلجأ إلى إكثارها جنسيًا.

١٠ — يفيد الإكثار الدقيق فى المحافظة على التركيب الوراثى للنباتات المكثرة دونما تغيير، كما فى سلالات آباء الهجن فى القنبيط، وكذلك فى الإكثار السريع للأصناف الجديدة التى تنتج من برامج التربية

١١ — يمكن إكثار السلالات المزروعة فى البيئات فى أى وقت من السنة، حيث تعد بيئات الزراعة بمثابة مشتل دائم، الأمر الذى لا يمكن تحقيقه بوسائل الإكثار العادية

١٢ — الحد من الحاجة إلى الصوبات الزراعية فى عمليات الإكثار، مما يقلل من تكلفتها

١٣ – يفيد الإكثار الدقيق – كذلك – أثناء التربية الداخلية، التى تجرى لأجل تجانس السلالات، ومن ثم تحسين تجانس الهجن التى تستعمل تلك السلالات فى إنتاجها.

ويفيد الإكثار الدقيق – فى هذا الشأن – من بعض الوجوه، كما يلى:

أ – بعد إجراء التلقيح الذاتى – فى نهاية برنامج التربية الداخلية – يكون محصول بذور النباتات الفردية قليلاً للغاية، ولكن إذا ما أكثر النبات – الذى يرغب فى تلقيحه ذاتيًا – عن طريق مزارع الأنسجة، فإنه يمكن الحصول من النباتات المكثرة (وهى التى تكون متماثلة وراثيًا ويمكن تركها لتلقح بعضها بعضًا) على أعداد كبيرة من البذور، بما يسمح بإجراء الاختبارات اللازمة عليها؛ ومن ثم توسيع أساس الانتخاب، وإمكان استخدامها فى إنتاج الهجن مباشرة.

ب – يمكن عن طريق عملية الإكثار الدقيق إدامة السلالات المرباة داخليًا العقيمة الذكر دونما حاجة إلى سلالات الإدامة maintainer lines؛ مما يقلل من الوقت اللازم للانتهاء من برنامج التربية، مع تجنب مشكلة ظهور نباتات خصبة الذكر كانعزالات فى سلالة الأمهات العقيمة الذكر.

١٤ – للإكثار الدقيق أهمية كبيرة فى إنتاج هجن الجيل الأول من الخضر فمثلاً .. يستحيل فى النباتات وحيدة الجنس ثنائية المسكن – مثل الأسبرجس – إنتاج سلالات هجين دون اللجوء إلى الإكثار الدقيق. وفى الكرنب الذى يعتمد فيه إنتاج الهجن على خاصية عدم التوافق – وحيث يعتمد إكثار سلالات الآباء على التلقيح البرعمى الذى يفقدها قوة النمو – فإن مزارع الأنسجة يمكن أن تستخدم فى إكثار تلك السلالات.

١٥ – يمكن بالإكثار الدقيق عزل وإكثار الكيميرا والطفرات الطبيعية، والحصول على أفراد طفرية كاملة عندما تجرى المعاملة بالعوامل المطفرة فى المزرعة؛ ذلك لأن النباتات العرضية تنشأ – غالبًا – من خلية واحدة (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق).

١٦ – استنبات البذور:

إن استعمال البيئات الصناعية فى استنبات البذور قد يكون عمليًا مع البذور الصغيرة جدًا مثل بذور الأوركيد الذى استعملت المزارع الصناعية فى إكثاره تجاريًا بنجاح منذ

فترة طويلة نجد فى الطبيعة أن بذور الأوركيد تعتمد فى إنباتها على علاقة تبادل منفعة مع بعض الكائنات الدقيقة فى قلف الأشجار، حيث توفر لها بعض العناصر المغذية، وقد وجد أن من الممكن توفير تلك المغذيات فى البيئات الصناعية

١٧ – إمكان إنتاج البذور "الصناعية" artificial seeds عن طريق "كبسلة" الأجنة الجسمية التى تنتج فى مزارع الإكثار الدقيق (تراجع تفاصيل الموضوع تحت عنوان لاحق)

١٨ – مع إمكان تجديد نمو البروتوبلاست، والخلايا، والأنسجة فى المزارع، يكون من الممكن إجراء عملية التحول الوراثى (الهندسة الوراثية) للصفات الهامة

هذا وقد استخدمت تقنية الإكثار الدقيق – بالفعل – فى تطوير إنتاج أصناف جديدة محسنة مفتوحة التلقيح من القنبيط والكرفس، وفى إنتاج بعض هجن الكرنب وكرنب بروكسل، وفى إكثار بعض هجن الأسبرجس (عن Lerke & Bauch ١٩٩٢، و Pierik ١٩٩٣، و Chawla ٢٠٠٠).

التطبيقات فى مجال الإكثار التجارى

تستخدم طرق الإكثار الدقيق – حاليًا – فى الإكثار التجارى لعديد من الأنواع النباتية، نذكر منها ما يلى:

أولاً: الزهور ونباتات الزينة

يمكن تقسيم الزهور ونباتات الزينة – حسب مدى التوسع فى تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق فى إنتاجها – إلى ثلاث مجموعات، كما يلى:

١ – نباتات تكثر بسهولة بطرق الإكثار الدقيق على مدار العام بجودة عالية، وتكون – غالبًا – خالية من مسببات الأمراض، مثل:

Alstomeria	*Anthurium*
Caladium	*Chrysanthemum*
Diffenbachia	*Drosera*
Gerbera	*Gloxinia*
Gypsophila	*Heliconia*
Freesia	*Musa*

Nepeta — *Nephrolepis*
Philodendron — *Rhododendron*
Rosa — *Santpaulia*

٢ — نباتات يمكن إكثارها بطرق الإكثار الدقيق، ولكنها بحاجة إلى مزيد من الاهتمام بتقنيات إكثارها، مثل:

Begonia — *Dianthus*
Gladiolus — *Haemanthus*
Hemerocallis — *Hosta*
Hyacinth — *Iris*
Lilium — *Pelargonium*
Petunia

٣ — نباتات تكثر ببعض الصعوبة، ومازالت بحاجة إلى تطوير لطرق إكثارها، مثل:

Acer — *Chamaecyparis*
Junipers — *Paeonia*
Potentilla — *Sequoia*
Taxus — *Howeia*
Grevilla

ثانيًا: نباتات الخضر

١ — الفراولة:

تنتج الملايين من شتلات الفراولة سنويًا بطرق الإكثار الدقيق فى مختلف أنحاء العالم، وتتبع طريقة زراعة الميرستيم مع المعاملة الحرارية للتخلص من الفيروسات.

٢ — الأسبرجس:

تكثر السلالات المتميزة من الأسبرجس بنجاح بطرق الإكثار الدقيق.

٣ — الثوم:

تستخدم مزارع القمة الميرستيمية فى إنتاج نباتات خالية من الفيروسات، وفى حفظ الجيرمبلازم.

٤ — يستخدم الإكثار الدقيق فى إنتاج تراكيب وراثية معينة — مثل السلالات العقيمة الذكر — من نباتات مثل الخيار، والطماطم، والبصل، وغيرها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

٥ — البطاطس

يمكن أن تعطى تقنيات الإكثار الدقيق فى البطاطس حوالى ١٦٠٠ درنة من نبات بطاطس واحد سنويًا وربما أكثر من ذلك (George ١٩٨٦)

٦ القنبيط

أمكن باستخدام قرص القنبيط فى عملية إكثار دقيق الحصول على أكثر من ١٠٠٠٠ نبات صغير من كل قرص خلال فترة قصيرة للغاية لم تتعد عشرة أيام، وذلك فى دراسة استعمل فيها سبعة أصناف من المحصول. وتلخص الطريقة فيما يلى أزيلت الطبقة الميرستيمية للقرص ووضعت فى الخلاط لفترة قصيرة، بهدف فصل التجمعات الميرستيمية عن بعضها، ثم دُرِّجت حسب الحجم بإمرارها من مناخل ذات ثقوب متدرجة وبهذه الطريقة أمكن الحصول على أكثر من ٤٠٠٠٠٠ explant (قمة ميرستيمية) من الحجم الثانى (١ - ٣٠٠ مم) من كل قرص وقد حُصل من كل explant على ١-٣ نموات بعد زراعتها فى بيئة موارشيج وسكوج سائلة مزودة بـ ٢ مجم كينيتن، و ١ مجم إندول حامض البيوتريك لكل لتر وقد وصلت النموات إلى طول ١-٣ مم فى خلال ١٠ أيام بمعدل أكثر من ١٠٠٠٠ نمو نباتى من كل قرص وقد جذِّرت نحو ٨٠٪ من تلك النموات بعد ١٠ أيام من نقلها إلى بيئة موراشيج وسكوج شبه صلبه ومزودة بـ ١- ٣ مجم إندول حامض البيوتريك/لتر (Kieffer وآخرون ١٩٩٥)

٧ — تستخدم مزارع الأنسجة فى الإكثار الدقيق لعديد من المحاصيل الجذرية والدرنية، كما يلى:

المحصول	الـ explant المستعمل فى التكاثر
الكاسافا	القمة الميرستيمية
الكوكويام coco yam (*Xanthosoma* spp)	القمة الخضرية
البطاطا	القمة الميرستيمية
اليام الحلو sweet yam (*Amorphophallus*)	أجزاء من الكورمة
القلقاس	القمة الخضرية
اليام (*Discorea alata*)	القمة الخضرية

ثالثًا: نباتات الفاكهة

١ – التفاح

يقتصر استخدام زراعة الأنسجة فى التفاح – أساسًا – على إكثار الأصول الجذرية، مع ضرورة تقييم الطعوم التى تكثر بطرق الإكثار الدقيق – حقليًّا – قبل نشر زراعتها تجاريًّا

٢ – الكريز:

تتوفر تفاصيل طرق الإكثار – الدقيق للكريز بنوعية الحلو والحامض، وتستخدم التقنية لإكثار بعض الأصول الجذرية.

٣ – الخوخ والمشمش:

لم يكثر بطرق الإكثار – الدقيق سوى عدد محدود من أصناف الخوخ وأصوله، ولا يعرف سوى القليل جدًّا عن الإكثار الدقيق للمشمش. وتعد مشاكل التجذير وعدم انتظامه فى هذين المحصولين من أهم العقبات التى تواجه تطبيق تقنيات الإكثار الدقيق عليهما على النطاق التجارى.

٤ – الكمثرى

لم تتطور تقنيات الإكثار الدقيق للاستعمال التجارى فى الكمثرى

٥ - الراسبرى والبلاكبرى.

يُكثر كلا من الراسبرى والبلاكبرى باستعمال مزارع العقل ذات العقدة الواحدة، وتتوفر تفاصيل التقنيات الخاصة بتلك الطريقة.

٦ – البلوبرى

يتكاثر البلوبرى بسهولة بالعقل، ويمكن استعمال مزارع الأنسجة فى إكثار النباتات المتميزة -- مبدئيًّا -- قبل اللجوء إلى التكاثر بالعقل

٧ – العنب

يتوفر عدد من تقنيات مزارع الأنسجة لإكثار العنب تجاريًّا وتخليصه من الفيروسات، وهى تستعمل فى إكثار السلالات المنتخبة، والهجن والأصناف الجديدة، والأصول.

٨ – الفاكهة الاستوائية:

تستخدم تقنيات مزارع الأنسجة فى إكثار – عديد من نباتات الفاكهة الاستوائية، مثل

المانجو	الأناناس	الباباظ
التين	التوت	الموز

(عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التربية بالطفرات

يستفاد من مزارع الإكثار الدقيق فى برامج التربية بالطفرات بإحدى طريقتين، هما إما بأخذ الأجزاء النباتية التى تستعمل فى الإكثار (explants) من نباتات أو أجزاء نباتية سبق تعريضها للعوامل المطفرة، وإما بتعريض مزرعة الإكثار الدقيق ذاتها (القمة النامية، أو البراعم العرضية على الأجزاء النباتية المزروعة، أو النموات الجانبية المتضاعفة، أو العقل وحيدة العقدة single node cuttings . إلخ) تعريضها للعوامل المطفرة

وتجدر الإشارة إلى أن تعريض مزارع الإكثار الدقيق للإشعاع قد يُحدث تغيرات كيميائية غير مرغوب فيها فى بيئات الزراعة؛ ولذا .. يوصى بنقل المزرعة التى عُرِّضت للإشعاع إلى بيئة جديدة بعد معاملة الإشعاع.

وعند المعاملة بالمركبات الكيميائية المطفرة يتعين تعقيم محاليل تلك المركبات بالترشيح قبل استعمالها (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

التطبيقات فى مجال التكاثر بالبذور الصناعية من الأجنة العرضية

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 في هذه المزارع، وذلك للأسباب التالية:

١ تزداد فرصة العثور على الاختلافات الوراثية المرغوبة، نظرًا لأن كل خلية في المزرعة يمكن أن تتميز إلى جنين يعطى فردًا جديدا

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

٣ – يصعب – كثيرًا – في الحمضيات إنتاج نباتات خالية من الفيروسات عن طريق مزارع القمة النامية الميرستيمية، ولكنها تنتج بشكل روتيني من الأجنة اللاإخصائية التي تكون خالية تماما من الإصابات الفيروسية (تكون الأجنة الجنسية خالية – هي الأخرى – من الإصابات الفيروسية، ولكنها لا تصلح للإكثار التجاري)، إلا أن بعض أصناف الحمضيات تكون خالية من البذور، مثل البرتقال أبو سرة، والأصناف اللابذرية من اليوسفي والجريب فروت، وفي أصناف كهذه .. لا يمكن إنتاج نباتات خالية من الفيروسات إلا بطريق الأجنة العرضية، التي تتكون في مزارع الأنسجة والخلايا.

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

٥ – يفيد إنتاج الأجنة العرضية في تقصير فترة برنامج التربية في بعض الحالات. عندما تتجه النباتات التي تنمو من هذه الأجنة نحو الإزهار المبكر، ففي نبات الجنسنج ginseng . أعطت الأجنة العرضية التي أنتجت في مزارع كالس الجذور نباتات اتجهت مباشرة نحو الإزهار، وهو ما يعني توفير ثلاث سنوات في كل جيل من أجيال التربية بالنسبة لهذا النبات (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣).

هذا . ولبعض الأنواع النباتية قدرة فائقة على تكوين الأجنة الجسمية العرضية، ومن ذلك الجزر، الذي تكوّن بادراته أجنة جسمية لدى زراعتها في بيئة تحتوى على حامض الأبسيسك كمنظم نمو وحيد (Nishiwaki وآخرون ٢٠٠٠)

أهمية البذور الصناعية

يُستفاد من عملية إنتاج البذور الصناعية بتغليف (كبسلة capsulation) الأجنة الجسمية – ناتج مزارع الأنسجة – فى الأمور التالية.

١ – إكثار النباتات الخضرية التكاثر بذريًا، الأمر الذى لا يمكن تحقيقه فيها باللجوء إلى البذور الحقيقية؛ بسبب ما يحدث فيها من انعزالات وراثية تكون مختلفة عن التركيب الوراثى للنبات الأصلى.

٢ – إكثار النباتات العقيمة بذريًا.

٣ – إمكان إكثار وزراعة النباتات القيمة التى تنتج من عملية دمج البروتوبلاستات، مع المحافظة على جميع خصائص الهجين الجسمى.

٤ – إكثار النباتات التى ترتفع أسعار بذورها الحقيقية.

كبسلة (تغليف) الأجنة الجسمية

تستخدم أغلفة الهيدروجل hydrogel – مثل ألجينيت الصوديوم sodium alginate – فى إنتاج بذور صناعية وحيدة الأجنة لعديد من الأنواع النباتية، مثل الكرفس، والجزر، والقطن، والخس، والبرسيم الحجازى، والأرز، والذرة. وتعد أكثر الأنواع النباتية مناسبة لهذه التقنية تلك التى يمكن إنتاج أجنتها فى مزارع الأنسجة بأعداد وفيرة، مع ارتفاع أسعار بذورها أو أن يكون لاستعمالها أساس تجارى قوى

ويمكن تصنيف المحاصيل الزراعية حسب توفر التقنية، والجانب الاقتصادى المتعلق بأسعار البذور الصناعية إلى ثلاث فئات، كما يلى:

١ – أنواع تتوفر التقنية لها .. مثل: الكراوية، والجزر، والـ *Panicum*، و الـ *Pennisectum*

٢ – أنواع ترتفع أسعار بذورها وأجزائها المستعملة فى التكاثر، ولاستعمالها أساس تجارى قوى . مثل: الأسبرجس، والبيجونيا، والبروكولى، والقنبيط، والخيار، والثوم، والجيرانيم، والخس، والبيتونيا، والبطاطس، والجنسنج، والأرز، والسبانخ، وقصب السكر، والتبغ، والطماطم، والبطيخ. هذا .. إلا أنه لا تتوفر لهذه المجموعة أساس تقنى جيد لإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية.

٣ – أنواع تتوفر التقنيات الخاصة بإنتاج أجنتها الجسمية وبذورها الصناعية ولاستعمالها أساس تجارى قوى .. مثل: البرسيم الحجازى، والكرفس، والبن، والذرة، والقطن، والعنب، والمانجو (عن Redenbaygh وآخرين ١٩٩١).

ولقد حظى موضوع تجفيف وتخزين الأجنة الجسمية باهتمام بالغ من قبل الباحثين، إلا أن تغليف الأجنة فى صورة بذور صناعية لم يصل إلى نفس المستوى من التقدم.

ولمزيد من التفاصيل عن موضوع تغليف الأجنة والبذور الصناعية .. يراجع Redenbaugh وآخرون (١٩٩١).

خصائص الأجنة الجسمية المعلقة ومحدودات استعمالها لبذور صناعية

إن من أهم خصائص الأجنة الجسمية افتقارها إلى كل من الإندوسبرم والغلاف البذرى اللذان يتكونان بصورة طبيعية فى البذور الحقيقية. كذلك فإن تلك الأجنة الجسمية تكون صغيرة للغاية إلى درجة لا يمكن معها تداولها فى الزراعة أو ضمان نجاح زراعتها ولذا . يتعين تغليف تلك الأجنة بقالب من الإندوسبرم الصناعى يمكن أن يوفر لها حماية، ودعمًا غذائيًا أثناء الإنبات.

ولقد استخدم لهذا الغرض جل ألجينات الكالسيوم calcium algınate gels، بالإضافة إلى كل من أوكسيد البوليثيلين، والشيتوسان chitosan.

وبينما يمكن أن يوفر جل ألجينات الكالسيوم حماية للجنين، فإن فائدته فى توفير الدعم الغذائى له أثناء إنباته تعد محدودة للغاية.

هذا ويمكن للنشا – الذى يعد أحد أهم مكونات الإندوسبرم، وخاصة فى النباتات وحيدة الفلقة – أن يوفر كلا من الحماية والدعم الغذائى للجنين الجسمى فى البذور الصناعية، لكن يعيبه أنه أكثر نعومة من كل من الجرليت Gerlite والآجار، وألجينات الكالسيوم، الأمر الذى يؤدى إلى انطمار الجنين فى بيئة النشا. وللتغلب على تلك المشكلة يمكن خلط النشا بمواد جيلاتينية أكثر صلابة منه مثل الأجاروز agarose والجرليت (Sorvari وآخرون ١٩٩٧).

التطبيقات فى مجال حفظ الجيرمبلازم

أهمية حفظ الجيرمبلازم على صورة مزارع أنسجة

تسهل المحافظة على جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر جنسيًا على صورة بذور. أما حفظ جيرمبلازم الأنواع التى تتكاثر خضريًا . فهو أمر باهظ التكاليف؛ نظرًا 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 دائمًا من الإصابات الفيروسية أما حفظ هذه الأنواع على صورة بذور فإنه يؤدى إلى تغيرات وراثية كبيرة فى السلالات المحتفظ بها، ولا يفيد سوى فى المحافظة على"الجينات" المهمة التى توجد بكل من هذه السلالات

لأجل ذلك .. اتجه تفكير مربى النبات نحو مزارع الأنسجة 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، وتوفرها على مدار العام

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، نظرًا 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 لا تتعرض للإصابات الميكروبية، أو للأخطاء البشرية ويتحقق هذا الهدف بحفظ المزارع إما مجمدة وإما مبردة

هذا .. ويحفظ الجيرمبلازم إما لفترات قصيرة تمتد من سنة واحدة إلى أربع سنوات، وإما لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل على -١٩٦م

يفيد التخزين لفترات قصيرة فى الحد كثيرًا من تكلفة حفظ الجيرمبلازم، ويجرى بخفض كل من درجة الحرارة وشدة الإضاءة، وتعديل بيئات الزراعة (وخاصة فيما يتعلق بزيادة الضغط الأسموزى أو مثبطات النمو).

هذا .. إلاّ أنه لا توجد — حاليًا — مجموعات للجيرمبلازم قائمة بالكامل على مزارع الأنسجة، وإن كانت هذه التقنية قد استخدمت على نطاق واسع فى حفظ الكثير من جيرمبلازم الأجناس *Solanum*، و *Fragaria*، و *Ipmoea*، و *Mentha*، و *Prunus*، و *Vaccinium*.

أما التخزين لفترات غير محدودة فى النيتروجين السائل فما يزال فى الدور التجريبى بالنسبة لغالبية الأنواع النباتية، ولكنه أصبح روتينيًّا فى نباتات محدودة، وخاصة أجناس *Rubus*، و *Pyrus*، و *Solanum*، و *Elaeis* (عن McCown ٢٠٠٣).

حفظ المزارع بالتبريد

يمكن حفظ المزارع فى درجات حرارة منخفضة، تتراوح بين ١ و ٩م، يعمل هذا المجال الحرارى على إبطاء تدهور النسيج النباتى، ولكنه لا يمنعه. ويعنى ذلك ضرورة إعادة زراعة النسيج على فترات متباعدة نسبيًّا. وتستخدم هذه الطريقة — حاليًا — فى تخزين جيرمبلازم الفراولة، وعديد من نباتات الفاكهة مثل التفاح والعنب.

ومن أمثلة حالات حفظ الجيرمبلازم بالتبريد، ما يلى (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣):

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (٪)
Fragaria × ananassa	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. virginiana	٧٢ شهرًا	١٠٠
F. vesca	٧٢ شهرًا	١٠٠
Lolium multiflorum	١٠–١١ شهرًا	١٠٠–٨٨
Lotus corniculatus	شهر واحد	٩٠
Malus domestica	١٢ شهرا	١٠٠
Medicago sativa	١٥–١٨ شهرا	٩٥–٩٤

النوع النباتى	فترة التخزين	مدى احتفاظ المزرعة بحيويتها (%)
Rubus sp.	١٤ شهرًا	٩٥
Trifolium pratense	١٥–١٨ شهرًا	٧٠–٨٦
T. repens	١٥–١٨ شهرًا	٨٩–٩٢
	١١ شهرًا	٩٠–١٠٠
Vitis vinifera	١٢ شهرًا	؟

حفظ المزارع بالتجميد الفائق (التخزين الكريوجينى)

يعنى بالتخزين الكريوجينى التخزين فى حرارة تنخفض إلى –١٣٠م أو أقل من ذلك وهى تعد طريقة آمنة وفعالة لتخزين الجيرمبلازم لفترات غير محدودة، سواء أكانت على صورة بذور، أم حبوب لقاح، أم أجنة، أم براعم، أم مزارع أنسجة. وبينما قد لا يكون تخزين البذور فى الحرارة الشديدة الانخفاض اقتصاديًا (حيث يمكن تخزينها بفاعلية على حرارة –٢٠م)، فإن تخزين مزارع الأنسجة يعد ضمانًا للمحافظة على جيرمبلازم السلالات الخضرية التى قد تتعرض للفقدان إذا ما استلزم الأمر إكثارها سنويًا. وعلى الرغم من إمكان تخزين مزارع البروتوبلاست ومزارع الخلايا فى الحرارة الشديدة الانخفاض، فإنها لا تخزن بصورة روتينية بتلك الطريقة

كذلك يمكن تخزين السلالات الخضرية — على صورة أجنة جسمية — فى الحرارة الشديدة الانخفاض، علمًا بأن الأجنة الجسمية لا تختلف عن الأجنة الجنسية فى القدرة على تحمل تلك الظروف التخزينية. ويعنى ذلك إمكان حفظ جيرمبلازم السلالات الخضرية التكاثر كما يحفظ الجيرمبلازم البذرى (عن Towill ٢٠٠٢)

تعتبر مزارع الأعضاء النباتية مثل مزارع القمة النامية، ومزارع الأجنة، ومزارع الإكثار الدقيق هى أنسب المزارع للحفظ بالتجميد الفائق 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 جديده خلال فترة التخزين، بينما تفقد الخلايا فى مزارع الخلايا قدرتها على إنتاج النباتات الجديدة (أى تفقد خاصية الـ totipotency) خلال فترات التخزين الطويلة هذا فضلا 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 الميرستيمية والبراعم الإبطية، بينما لا تبقى السلالات على الحاله الأحادية فى مزارع الكالس

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

وقد استخدمت طريقة التجميد الفائق فى حفظ الجيرمبلازم لفترات تجريبية قصيرة نسبيًا (تراوحت من خمس دقائق إلى شهرين) فى عدة أنواع نباتية، وكان منها الجزر، والفراولة، والطماطم، والتبغ، والبسلة. والبطاطس، والذره، ويلاحظ أن معظم هذه الأنواع تتكاثر جنسيًا. ولكنها تتميز بأن تقنيات مزارع القمم الميرستيمية أو مزارع الأجنة قد قطعت فيها شوطًا كبيرًا، إلى درجة سمحت بتجربة استخدامها فى تطوير تقنيات حفظها بالتجميد (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

ويبين جدول (٦-٤) أمثلة لبعض الأنواع النباتية التى نجح فيها تخزين الأنسجة الميرستيمية على -١٩٦م.

جدول (٦-٤): أمثلة على التخزين الفائق البرودة (-١٩٦م) للأنسجة الميرستيمية فى بعض النباتات الاقتصادية (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢).

المحصول	الجزء المخزن	تحضير الجزء المخزن وطريقة التجميد	القدرة على البقاء، والنمو، وتجديد النمو
الأسبرجس	القمة الخضرية	٤٪ DMSO، و ٣٪ جلوكوز لمدة ٣ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم فى النيتروجين السائل	بقاء (حياة) بنسبة ١٠٠٪ وتجديد كامل للنمو النباتى
التفاح	القمة الخضرية	تقسية لمدة ٢٠ يوم على -٣م	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٧٥٪
الوز	خلايا جنينية	المعاملة بتركيز ٦٪ مانيتول لمدة ٢-٧ أيام، ثم التجميد البطئ حتى -٤٠م، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٥٠٪
الوالح	أجنة جسمية	التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٠٪
	أجنة جسمية	تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٣٠٪
الكاسافا	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول و ٥٪ سكروز، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٣٪
الحمص	القمة الخضرية	٤٪ DMSO لمدة ٢٤ ساعة، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٤٠٪
البسلة	القمة الخضرية	١٠٪ جليسرول، و ١٠٪ سكروز لمدة ١٥ دقيقة، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء بنسبة ١٠٠٪ وتجديد نمو بنسبة ٦٠٪
البطاطس	النموات البرعمية للدرنات	٢-٧٪ DMSO لمدة يومين، ثم التجميد السريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ١٠-٢٠٪
قصب السكر	كالس	١٠٪ DMSO، و ٠,٥ مولار سوربيتول، ثم تجميد بطئ حتى -٤٠م، ثم تجميد سريع فى النيتروجين السائل	بقاء وتجديد نمو بنسبة ٩٧٪

هذا .. ويحتفظ — حاليًا — بعدد من سلالات الجيرمبلازم لبعض الأنواع الخضرية التكاثر، مجمدة على صورة مزارع قمة خضرية، فى دول مختلفة، كما يلى (عن Reed ٢٠٠٢):

النوع المحصولى	الدولة (والمؤسسة)[أ]	تقنية التجميد[ب]	عدد السلالات/والمكررات
التفاح	الصين (CI)	CF/E-D	٢٠ سلالة/٥٠ قمة خضرية لكل منها
البلاكبرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٧ سلالة/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكاسافا	كولومبيا (CIAT)	E-D	٩٥ سلالة/٣٠ قمة خضرية لكل منها
حشيشة الدينار	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	سلالتان/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
الكمثرى	الولايات المتحدة (NCGR)	CF	١٠٦ سلالات/١٠٠ قمة خضرية لكل منها
البطاطس	ألمانيا (DSM/FAL)	Droplet	٢١٩ سلالة/٤٠–٣٥٠ قمة خضرية لكل منها
	بيرو (CIP)	Vit	١٩٧ سلالة/٢٥٠ قمة خضرية لكل منها
الكشمش/عنب الثعلب	اسكوتلندا (UAD)	E-D	٣١ سلالة/٢٥–٣٠ قمة خضرية لكل منها

أ – المؤسسات:

CI: Changli Institute of Pomology.
NCGR: National Clonal Germplasm Repository, Corvallis.
CIAT: International Center for Tropical Agriculture.
DSM/FAL: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zelkulturen/Institute fur Pflanzenbau. Buundesforsch-ungsanstalt fur Landwirtschaft.
CIP: International Potato Center.
UAD: University of Abertay-Dundee.

ب – التقنيات:

CF: Controlled freezing.
E-D: Encapsulation-dehydration.
Vit: Vitrification.

يستخدم فى التبريد الفائق مركبات تقوم بحماية المزارع من الحرارة الشديدة الانخفاض

وتُقسم تلك المركبات التى تحمى المزارع والأنسجة النباتية من التبريد الفائق (الـ cryoprotectants) – إلى ثلاث فئات – حسب مدى قدرتها على توفير تلك الحماية – كما يلى (عن Taji وآخرين ٢٠٠٢)،

١ - مركبات توفر حماية قليلة وتشمل:

Acetyl glycine	Dimethyl acetamide
Glucosamine	Mannitol

٢ – مركبات توفر حماية متوسطة .. وتشمل:

Acetyl choline	Dimethyl urea
Glutamic acid	Hydroxyproline
Methyl acetamide	

٣ – مركبات توفر حماية عالية .. وتشمل:

Betaine	Dimethyl sulfoxide
Ethylene glycol	Glucose
Glyceraldehyde	Glycerol
Sorbitol	Sucrose

ولمزيد من التفاصيل عن استخدامات مزارع الأنسجة فى حفظ الجيرمبلازم .. يراجع Morel (١٩٧٥)، و Henshaw وآخرون (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Withers (١٩٨٠، و ١٩٨٣)، و Bajaj (١٩٩٥)، وحسن (٢٠٠٥).

مصادر إضافية

للإطلاع على مزيد من التفاصيل فى موضوع الإكثار الدقيق .. يراجع ما يلى:

المرجع	الموضوع
Murashige (١٩٧٤)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٠)	الإكثار الدقيق
Ingram & Helgeson (١٩٨٠)	إنتاج نباتات خالية من الفيروسات
Bottino (١٩٨١)	الإكثار الدقيق لمحاصيل الخضر
Evans وآخرون (١٩٨١)	تجديد النمو من مزارع الخلايا
Wetherell (١٩٨٢)	الإكثار الدقيق
Hussey (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق
Hartmann & Kester (١٩٨٣)	الإكثار الدقيق للمحاصيل البستانية
George (١٩٨٦)	الإكثار الدقيق للبطاطس
Dhawan (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق للأنواع الخشبية
Paranjothy (١٩٩٣)	الإكثار الدقيق لأنواع النخيل
Prakash وآخرون (١٩٩٣)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية فى مزارع الأنسجة
Cassells (١٩٩٨)	إنتاج نباتات خالية من الإصابات المرضية