الباب الثالث

زراعة الأنسجة النباتية

تتكاثر النباتات بطريقتين، الأولى وهى طريقة جنسية Sexual وتستخدم فيها البذور. وهى طريقة شائعة فى محاصيل كثيرة. ويؤدى التكاثر بالبذور إلى إنتاج نباتات مختلفة فى صفاتها عن الآباء. وتزداد الاختلافات بارتفاع نسبة التلقيح الخلطى. والطريقة الثانية هى التكاثر الخضرى اللاجنسى Asexual. وهى طريقة تقليدية تستخدم فيها أى جزء آخر خلاف البذور مثل الخلفات والفسائل والعقل والأبصال والدرنات والكورمات وغيرها. ويستخدم التكاثر الخضرى فى إكثار كثير من محاصيل الفاكهة ونباتات الزينة وأشجار وشجيرات وبعض نباتات الخضر وبعض محاصيل الحقل. ويؤدى التكاثر الخضرى إلى تكوين نباتات متجانسة ومشابهة لنبات الأم.

الكفاءة الذاتية للخلية النباتية Cellular totipotency

تطبق زراعة الأنسجة انطلاقا من الحقيقة العلمية بأن للخلية النباتية قدرة ذاتية على الانقسام والتناسخ والنمو وإنتاج نبات كامل له نفس مواصفات نبات الأم، بصرف النظر عن مصدرها من النبات، وهذا ما يسمى بالجهد الذاتى وتحتوى الخلية النباتية الحية على نسخة كاملة من الجينات الموجودة فى أى خلية جسمية أخرى من خلايا نبات الأم. وجميع هذه الجينات ساكنة غير معبرة Unexpressed (Turned-off) ماعدا بعض الجينات المعبرة عن نشاطها فى العضو النباتى الموجودة فيه. لذلك يمكن فصل خلية أو نسيج أو جزء من أى عضو نباتى ثم تزرع على بيئة غذائية مناسبة فتنمو وتنتج نباتا كاملا. كما تتميز أية خلية بوجودها تحت تأثير ما يعرف بالتأثير الوضعى Position effect. فالخلية اللحائية لا يمكن أن تتحول

إلى خلية برانشيمية بمحض إرادتها طالما لم تتعرض إلى ما يجبرها على تغيير تخصصها أو إلغائه. ويعنى ذلك أن الخلية النباتية وهى مازالت ضمن نسيج نباتى معين لا يظهر لها إلا وظيفة فسيولوجية محددة ، ويعرف هذا بالتأثير الوضعى Position effect. فإذا فصلت خلية حية نشطة فسيولوجيا من النسيج وأصبحت حرة بعيدة عن التأثير الوضعى السابق وزرعت فى بيئة غذائية مناسبة فإنها تنشط وتقوم بجميع العمليات الحيوية وتنتج نباتا جديدا بصرف النظر عن مصدر هذه الخلية. وخاصية الجهد الذاتى تميزت بها الخلية النباتية فقط. فلا يمكن فصل خلية حيوانية أو نسيج حيوانى وزراعته فى بيئة غذائية داخل المعمل لإنتاج حيوان كامل كما يحدث فى النبات. ومن هنا كان الاهتمام بتطبيق تقنية زراعة الأنسجة النباتية (White, 1963; Yamada and Hashimoto, 1988)

أهداف زراعة الأنسجة النباتية

١- إكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور

زراعة الأنسجة النباتية وسيلة لإكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالبذور لعدم قدرتها على تكوين بذور أو تنتج بذورا بكميات قليلة جدا أو بذور تفقد حيويتها بسرعة أو نسبة التلقيح الخلطى مرتفعة مما يؤدى إلى إنتاج نسل غير متجانس وراثيا Heterogeneous progeny.

٢- الإكثار السريع للشتلات Rapid multiplication

تستخدم زراعة الأنسجة فى الإكثار التجارى للنباتات لما تتميز به من صغر حجم الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار، وصغر المساحة المطلوبة للزراعة، وسهولة توفير كل من البيئة الغذائية والمناخية المناسبة، وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات فى فترة قصيرة على مدار السنة دون التقيد بالموسم الزراعى. ففى خلال سنة واحدة وباستخدام جزء نباتى واحد تم الحصول على ٤ ملايين نبات أوركيد جنس

سيمبيديم Cymbidium و٣٠٠ ألف نبات اسبرجس Asparagus. كما وجد أن إنتاج ١٠ آلاف نبات قرنفل قابلة للتسويق بالزراعة التقليدية تحتاج إلى توفير ٦٦٧ نباتا فى مساحة ١٧ مترا مربعا. بينما إنتاج نفس العدد من نباتات القرنفل فى الزراعة المعملية يكفى تدبير ٣ نباتات فقط تشغل ٠,٠٨ متر مربع (Morel, 1960).

٣- إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية

بزراعة المرستيم الطرفى يمكن إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية والبكتيرية والفطرية. وتطبق المعاملة الحرارية للمساعدة على التخلص من الفيروسات. وقد نجحت الزراعة المعملية فى إنتاج نباتات بطاطس وطماطم وفراولة وقرنفل وغيرها خالية من الفيروس.

٤- إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Production of haploid plants

هى نباتات عقيمة لا تنتج بذورا، وتحتوى على نصف العدد الكروموسومى (n). بينما النباتات الثنائية خصبة وقادرة على تكوين بذور. وتنتج النباتات الأحادية بالزراعة المعملية للمتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة. ثم تعامل النباتات الأحادية بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى والحصول على نباتات ثنائية نقية خصبة متجانسة، بدون الدخول فى عمليات التلقيح الذاتى لعدة سنوات للحصول على سلالات نقية. ولهذه الطريقة أهمية كبيرة فى مجال تربية وتحسين النباتات وإنتاج نباتات محورة وراثيا (Wang, et al., 1973; Wenzel and Uhrig, 1981).

٥- إنتاج هجن بدمج البروتوبلاست Protoplast fusion

باندماج بروتوبلاست خليتين مختلفتين يتكون بروتوبلاست هجين فى خلية واحدة، فإذا زرعت خلية البروتوبلاست المندمج (الهجين) فى المعمل ينتج نبات يحتوى على مجموعتين من الكروموسومات إحداهما قادم من الأم والثانية من الأب

بصـرف النظر عن وجود توافق أو عدم توافق بينهما. والنباتات الناتجة من الزراعة المعملية لها صفات وراثية مختلفة عن صفات الأب والأم كل على حدة.

٦- استحداث الطفرات Mutation induction

تحدث طفرات بنسبة عالية وبصورة تلقائية أثناء الزراعة الثانوية للكالس. كذلك يمكـن الحصول علـى طفرات بمعاملة النباتـات المعملية أو أجـزاء منها بمطفرات كيميائية أو بأشـعة جاما أو أشـعة- X، ثم زراعتها على بيئة مناسـبة وانتخاب مـا يحدث من تغييرات وراثية مناسـبة. وتثبت الصفـة المنتخبة من خلال الزراعة المعمليـة المتكررة. ثـم متابعتها بعد زراعتها فى الحقل لعـدة أجيال مع الانتخاب المستمر للنباتات الحاملة للصفة المطلوبة.

٧- المحافظة على الأصول الوراثية

تحفـظ الأصول الوراثية فى بنوك خاصـة لحمايتها من التدهور أو الاندثار. ويتم ذلك بطرق مختلفة لمنع نموها والمحافظة على حيويتها لفترة طويلة. وتسـهل طرق حفـظ الأصول الوراثية تبادل الأصول الوراثية و تصدير الأصناف التجارية بتكاليف منخفضة جدا.

٨- تحديث وإكثار الأشجار والشجيرات الخشبية

بزراعة الأنسجة يمكن تحديث عمر الأشجار المعمرة وإنتاج كميات كبيرة من الشتلات، كما أن لها أهميتها بالنسبة للأشجار والشجيرات التى يصعب إكثارها خضريا.

٩- إنتاج مركبات ثانوية

ومن أمثلة ذلك استخدام زراعة الخلايا فى إنتاج الكابسيسين Capsaicin من ثمار الفلفل Capsicum frutescens، ومادة Tropane alkaloids من نبات الداتورا Datura innoxia. حيث تزرع خلايا النبات فى مخمر Fermenter يحتوى على بيئة غذائية

مناسبة لزيادة عددها بكمية كبيرة. ثم تنقل إلى مخمر آخر يحتوى على بيئة إنتاج Production medium ثم تستخلص المادة الفعالة منها.

١٠- الإخصاب المعملى

يجرى الإخصاب المعملى للتغلب على بعض الظواهر الطبيعية التى تعوق تكاثر النباتات بطريقة طبيعية مثل ظاهرة العقم الأندوسبيرمى ومشاكل التهجينات الجنسية وعدم التوافق وفشل حبوب اللقاح فى الإنبات.

عوامل إنجاح زراعة الأنسجة

يجب توفير مهارات فنية وأجهزة ومعدات خاصة. وأن يكون معدل إنتاج معمل زراعة الأنسجة متمشيا مع احتياج الأسواق المحلية والخارجية لكى تنخفض تكاليف الإنتاج. كما يجب تحديد خطوط الإنتاج والنوع النباتى المطلوب إنتاجه. واختيار الطريقة المناسبة لإكثاره فى المعمل. والاستفادة من ظاهرة عدم الثبات الوراثى فى مرحلة إنتاج الكالس لاستحداث طفرات جديدة. وهى خاصية تهم مربى النباتات واستحداث الطفرات.

مراحل الزراعة المعملية Propagation stages

قسم Murashige, (1961, 1964, 1974) خطوات زراعة الأنسجة النباتية إلى:

١- مرحلة إنتاج نباتات الأم Mother plants.

٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية Isolation of explants من نباتات الأم.

٣- مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explants culture.

٤- مرحلة الزراعة الثانوية Subculture لإكثار الكالس أو النبتات.

٥- مرحلة أقلمة النباتات Hardening والزراعة فى التربة.

١- مرحلة إنتاج نباتات الأم

١- نباتات الأم هى نباتات مرجعية وهى المصدر الآمن لفصل أجزاء نباتية تستخدم فى الزراعة المعملية. ولتحديث نباتات الأم تفصل عقل منها بطول ١٥- ٢٠سم. ثم تجزأ العقل إلى أجزاء (Micro-stocks; Explants) لاستخدامها فى الزراعة المعملية. والأجزاء المفصولة من نباتات حديثة العمر تنتج نموات متجانسة فى المعمل وبنسبة نجاح أعلى، وتنتج جذورا عرضية أكثر، ونموها أفضل من الأجزاء المفصولة من نباتات بالغة.

٢- فى الزراعة التجارية التى تلجأ غالبا إلى النباتات النامية فى الحقل، وهى نباتات عادة تكون شديدة التلوث لتعرضها الدائم للأتربة والآفات الناقلة للأمراض وتحتاج إلى تعقيم يتناسب مع شدة تلوثها. لذلك يجب اختيار أفضل النباتات من حيث قوة النمو وتجانسها وراثيا فى صفاتها من حيث سرعة النمو والتبكير فى النضج وإنتاج الأزهار ولونها وجودة ثمارها .

٣- استبعاد النباتات التى كانت مصابة بأمراض فيروسية وفطرية وبكتيرية ومسببات نقل العدوى مثل الحشرات الثاقبة الماصة مثل المن والعنكبوت الأحمر والذبابة البيضاء. و استبعاد النباتات التى تعرضت لضغوط بيئية أثناء نموها مثل البرودة الشديدة والجفاف الشديد وقصر الفترة الضوئية وعدم انتظام شدة الضوء. وتؤدى شدة البرودة إلى انكسار طور السكون وظهور أمراض البرودة ويؤدى الجفاف وعدم وفرة الضوء إلى ضعف النمو.

احتياج نباتات الأم -

- **الحالة الغذائية** Stock plant nutrition

من المتوقع أن يتأثر محتوى الأجزاء النباتية بالمعاملات السابقة التى تطبق على نباتات الأم. وأن المحتوى الداخلى من الهرمونات والعناصر الغذائية فى الأجزاء

النباتيــة هو امتــداد لما يحتويه نبــات الأم. لذلك يجب اختيــار نباتات أم جيدة النمو. وأن تكون خالية من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروســية. ويفضل أن تكون مــن إنتاج معمل زراعة الأنســجة، وتربى فى حجــرة النمو أو فى صوبة محمية من الآفــات الناقلة للأمراض، مع توفير رعاية منتظمــة ومنضبطة من الناحية الغذائية والبيئية. ويراعى خفض الرطوبة النسبية فى الصوبة بقدر الإمكان، وأن يكون الرى بالتنقيط أو بالانتشار تحت سطح التربة بدلا من الرى بالرش لحمايتها من الأمراض. والأجزاء المفصولة من نباتات الأم غالبا لاتحتاج إلى تعقيم.

● الفترة الضوئية Photoperiod

للفــترة الضوئية تأثير فســيولوجى كبــير على بعض الأنواع النباتية المســتخدمة كأمهات. وتحتاج نباتات الأم غالبا من ١٢ إلى ١٦ ساعة يوميا. وتؤدى إطالة الفترة الضوئية إلى اســتمرار التمثيل الضوئى وتنشــيط نمو الأجزاء النباتية المفصولة منها. وتقصير الفترة الضوئية يؤدى إلى ضعف نباتات الأم.

وللكثافــة الضوئية Light intensity تأثير هام على نمو النباتات المعملية. فتحتاج كثــير من الأنواع النباتيــة إلى ٤٠٠٠ لكس لكى ترتفع حيويتها. وقد يحتاج البعض الآخر إلى شــدة إضاءة منخفضة. ولذلك يوصــى بتعريض نباتات الأزاليا الأم لكثافة ضوئيــة متوســطة 10MM/ m^2 للحصــول على أفضل نموات خضرية تســتخدم فى الزراعة المعملية. وقد يرجع ذلك إلى أن شــدة الضوء المرتفعة تسبب فقد الأكسينات الداخلية Endogenous auxin التى لها دور هام فى تكوين الجذور.

ويعتقد أن الضوء الأحمر Red light له علاقة بانخفاض الأكسين وزيادة السيتوكاينين فــى البيئة الغذائية. وأن الأشــعة Near- Ultraviolet لها علاقة بانخفاض محتوى الأكسين. ويفسر ذلك نشاط تكوين نموات خضرية من أجزاء نباتية مختلفة. ولوحظ أن زراعــة القمــم النامية المفصولــة من أفرع كانت مظللة لســتة أصناف من أمهات العنب أنتجت عددا أكبر من الأفرع المعملية بالمقارنة بالمفصولة من أفرع نامية فى جو مشــمس بصورة كاملة. ويفسر ذلك بأن النباتات المظللة تستقبل ضوءا مرشحا ترتفع

فيـه موجـات الضوء الأحمر الذى له القدرة على إنتاج قدر كبير من السـيتوكاينين الداخلـى Endogenous Cytokinin الذى يحسـن نمو النباتات تحت ظروف الضوء المنخفض (Economou, 1982; Economou and Read, 1987).

- **الحـرارة** Temperature

تختلـف النباتات فـى احتياجها من الحرارة المنخفضة أو الحـرارة المرتفعة. لذلك يجـب إنماء نباتات الأم تحت ظروف من الحرارة المناسـبة حتـى تكون مصدرا جيدا للأجـزاء النباتيـة المطلوب زراعتها فى المعمل. فمثلا تعريـض بصيلات نباتات الليلى Lily الأم لفـترات مختلفة من التخزين عنـد ٤°م كان له تأثير إيجابى قوى على عدد ووزن البصيلات الناتجة فى المعمل من زراعة أوراق حرشفية مفصولة من نباتات الأم.

- **منظمات النمو** Growth regulators

رش نباتات الطماطم الأم بمادة Chlormequat chloride تركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون يـؤدى إلى زيادة واضحة فى نمـو الأجزاء المفصولة منها فى المعمـل. كذلك وجد زيادة فـى نمـو الكالس والنبتات الناتجة من زراعة أجزاء ورقية مفصولة من نباتات Dahlia و Petunia بعد رشها بمادة Diaminozide بتركيز ٢٠٠٠ جزء فى المليون. لذلك يفضل رش نباتات الأم بالسيتوكاينين أو غمس الأجزاء المفصولة منها قبل زراعتها فى محلول منظم للنمو يحتوى على سـكر وبعض الهرمونات مثل GA; BA أو زراعتها فى بيئة سـائلة تحتوى على تركيزات مختلفة من (de Langthe and BA de Bruijne, 1976) .

٢- مرحلة فصل وتجهيز الأجزاء النباتية

فصل وتعقيم الجزء النباتى Explant

يفضل فصل الأجزاء من نباتات معملية مرباة فى حجرة النمو أو فى الصوبة. وبعـد تعقيمها تشـطف عدة مرات فى مـاء مقطر لإزالة آثار مـادة التعقيم، ثم

تجفف سطحيا وترص على ورق ترشيح معقم أو مسطح زجاجى معقم باستخدام ملقط معقم. ويستخدم سلاح شفرة معقم فى التخلص من أى جزء تغير لونه أوعند تجزئة الجزء النباتى إلى أحجام أصغر. وتتم التجزئة تحت ميكروسكوب داخل كابينة الحقن. ويستخدم ثاقب فلين لفصل أقراص من أوراق أو من أنسجة داخلية للدرنات. وقد يستخدم جهاز خاص لتقطيع العينات وفصل أجزاء محددة فى الحجم أو الوزن. ويستخدم ورق ألومنيوم معقم عند وزن الجزء النباتى بعد فصله. و يؤخذ فى الاعتبار الحجم المناسب للجزء النباتى لأهمية ما يحتويه من هرمونات ومواد غذائية. ويجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة لأنها مصدر لانبعاث الإيثلين. أما البذور فيمكن زراعتها مباشرة على بيئة مناسبة بعد تعقيمها وشطفها جيدا. وقد تفصل كل من الأجنة والفلقات لزراعتها على حدة. وقد يفضل غمر أو تعويم الأجزاء النباتية فى محلول سيتوكاينين مناسب لرفع محتواها من السيتوكاينين لما له من أهمية كبيرة فى تكوين النموات الخضرية. وثبت أن معاملة أجزاء ورقية من البيتونيا *Petunia hybride* بالسيتوكاينين قبل زراعتها على بيئة خالية منها يؤدى إلى إنتاج نموات خضرية مساوية أو تزيد عن النموات الناتجة من بيئة مضاف إليها نفس السيتوكاينين. كذلك وجد أن غمس ورقة كاملة فى محلول ٤٠٠ جزء فى المليون بنزايل أدينين (BA)، ثم زراعة أجزاء مفصولة منها فى بيئة خالية من السيتوكاينين كان لها تأثير إيجابى كبير فى إنتاج نموات جيدة.

٣- مرحلة زراعة الأجزاء النباتية Explant culture

يزرع الجزء النباتى المعقم فى تماس مع البيئة الغذائية المناسبة إما قطبيا Polar أى قائما Straight up، بحيث تكون القمة متجهة إلى أعلى والقاعدة الفسيولوجية منغمسة فى البيئة، وإما غير قطبى Apolar أى مقلوبا Upside down بحيث تكون القاعدة الفسيولوجية بعيدة عن البيئة وتكون القمة منغمسة فيها. ويفضل زراعة نباتات العائلة

Amaryllidaceae فـى المعمل بطريقة قطبيـة لأنها تعطى جذورا عرضية أفضل، بينما يفضل البعض الزراعة بطريقة غير قطبية لتسـهيل نمو الجذور والسوق وتيسير الإمداد بالأكسيجين وعدم ظهور آثار ضارة ناتجة عن مواد سامة يفرزها الجزء النباتى (Pierik and Steegmans, 1975). وزيـادة الأسـطح المجروحة تسـاعد على زيادة امتصاص العناصر ومنظمات النمو من البيئة، إلا إنها تؤدى فى نفس الوقت إلى زيادة انطلاق غاز الإيثلين الضار. لذلك يجب تقليل مساحة الأسطح المجروحة بقدر الإمكان على الجزء النباتى حتى لا تكون سببا فى فشل نموه. ويفضل إزالة طبقة الأوعية الإسكلارانشيمية من الجزء النباتى حتى لا تكون عائقا لتكوين الجذور.

الأجزاء المستخدمة فى الزراعة المعملية

● كالس Callus

إنتاج الكالس وسـيلة سـريعة للحصول على أعداد كبيرة من النبتات Plantlets. وتنجـح هذه الطريقة مـع بعض الأنواع النباتية دون غيرها. وهى طريقة مسـتحبة على المسـتوى التجارى وعند مربـى نباتات الزينة واسـتحداث الطفرات. ويظهر عـن الكالـس طفرات ذاتية كثـيرة إذا كانت البيئة تحتوى علـى تركيز مرتفع من السيتوكاينين. وتحدث الطفرات فى خلايا الكالس نتيجة التضاعف أو التوزيع غير المنتظم للكروموسومات.

● بادرات معملية Plantlets كاملة أو مجزأة

يمكـن الحصول على بادرات كاملة بزراعة بذور معقمة على بيئة مناسـبة. وقد تفصـل البـادرات وتهذب بإزالة الأوراق والجذور وتجـزأ إلى عقل وحيدة البرعم ثم تـزرع هذه العقل فى بيئة مماثلة لإنتاج نباتات كاملة. وقد تفصل أجزاء من الأوراق أو الجذور أو الأزهار وتزرع فى المعمل لإنتاج كالس يتكشف بعد ذلك إلى بادرات.

● **أجنة** Embryos

تزرع الأجنة فى بيئة غذائية بعد فصلها من البذور واستبعاد القصرة والفلقات. وقد تفصل السويقة الجنينية من الجنين لزراعتها فى المعمل.

● **نسيج مرستيمى** Meristemic tissue

هى طريقة مفضلة بالرغم من انخفاض نسبة نجاحها بالمقارنة بزراعة البراعم، ولكنها الطريقة الرئيسية لإنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية. ويحتوى المرستيم على خلايا سريعة الانقسام. ويفصل المرستيم من طرف القمة النامية للفرع بعد استبعاد جميع الأوراق المحيطة بها ماعدا ١- ٢ من منشئات الأوراق، ثم يزرع المرستيم بعد فصله مباشرة فى بيئة غذائية صلبة. ويتم فصل المرستيم وزراعته داخل الكابينة المعقمة. والقمة المرستيمية الصغرى فرصتها أكبر للحصول على نباتات خالية من الفيروس.

● **براعم طرفية وجانبية** Auxiliary and Terminal bud

تزرع البراعم الطرفية والجانبية على الساق الرئيسى والأفرع الجانبية فى بيئة غذائية مناسبة لتحفيزها على النمو. ويجب اختيار البراعم المحتوية على بعض الأوراق الأولية، وألا تكون البراعم فى حالة سكون. ويتم اختيار الأفرع حديثة العمر قوية النمو، ويفضل نقعها فى الماء قبل فصل البراعم منها.

● **متوك وحبوب لقاح** Anther and Pollen grains

تزرع المتوك وحبوب اللقاح بهدف إنتاج نباتات أحادية Haploid تحتوى على نصف العدد الكروموسومى للخلية الجسمية. ثم تعامل النباتات الأحادية الناتجة بالكولشيسين لمضاعفة العدد الكروموسومى بها وإنتاج نباتات ثنائية متجانسة.

● **خلية واحدة Single cell**

يتم تفكيك خلايا نسيج أو كالس فى بيئة سائلة ميكانيكيا أو إنزيميا. ثم تلقط خلية واحدة من معلق الخلايا المتكون بماصة ميكرومترية، ثم تزرع منفردة فى بيئة سائلة أو بيئة صلبة تحتوى على آجار، فتتحول الخلية بسهولة إلى جنين جسمى Somatic embryo قادر على التكشف إلى نبات كامل. والنباتات الناتجة تكون مطابقة لمواصفات الأم Cell line وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع عديد من النباتات الراقية.

● **بروتوبلاست Protoplast**

يتميز البروتوبلاست بقدرته على الاندماج والتكتل. ويستفاد من هذه الظاهرة فى دمج بروتوبلاست لخليتين من الخلايا الجسمية. ويستلزم لذلك هضم الجدر الخلوية للخليتين بفعل الإنزيمات لإطلاق البروتوبلاست منهما واندماجهما، ثم إعادة تكوين الجدار الخلوى للخلية الهجينية الجديدة. وبزراعة الخلية الهجين فى بيئة غذائية مناسبة يتكون جنين جسمى ينمو ويكون نموات خضرية وجذرية.

الزراعة فى الأنابيب والدوارق المخروطية

تمسك الأنابيب والدوارق المخروطية المحتوية على بيئة محتوية على آجار فى وضع أفقى. ويقلل هذا الوضع التلوث بشدة خصوصا إذا كانت الزراعة خارج الكابينة المعقمة. ويجب تجنب تعريض فوهة الأنابيب أو الدوارق إلى اللهب إذا كانت الزراعة داخل الكابينة حتى لايؤدى إلى إنتاج الإيثلين وتجمعه داخلها. وتحتاج زراعة البذور أو الأنسجة المرستيمية إلى تثبيتها على سطح البيئة الصلبة بالضغط عليها برفق باستخدام إبرة الحقن أو ما يماثلها. لأن غمس البذرة أو النسيج بالكامل فى البيئة يعرضهما إلى نقص الأكسجين. بينما بالنسبة للبراعم أو أجزاء من النخاع أو أى جزء آخر فيغمس نصفها تقريبا فى الآجار حتى لا يتعرض إلى نقص الأكسيجين. ويراعى المحافظة على قطبية الجزء النباتى عند زراعته، إن

كان قائمـا Straight up (Polar) أو مقلوبا Upside down (Apolar). وهذا يتوقف على نـوع النبات. فتتكون الجـذور العرضية على المنطقة القاعدية للجزء النباتى إذا زرع قائما. وإذا كان الجزء النباتى مفصولا من نبات مفترش غير قائم فيفضل زراعته فى وضع أفقى على البيئة الغذائية، وقد تتكون الجذور العرضية بصورة أفضل فى بعض النباتات إذا زرع الجزء النباتى مقلوبا.

العوامل المؤثرة على نمو الجزء النباتى فى المعمل

(أ) عوامل خاصة بالجزء النباتى

• تجانس وحجم الجزء النباتى

يجب أن تكون الأجزاء النباتية متجانسة فى خلاياها، ويؤدى عدم التجانس إلى تكوين كالس غير متجانس الخلايا، والنموات الناتجة منه تكون غير متجانسة فى النمو والتركيب الوراثى. كذلك يؤثر حجم وشكل الجزء النباتى على نموه. فقد يفشل فى النمو إذا قل حجمه عن القدر المناسب، وإذا كبر حجمه يكون له قدر كبير فى النجاح والنمو. وقد يرجع ذلك إلى احتوائه على كمية أكبر من المواد الغذائية وعدد أكـبر من الخلايا مما يزيد من إنتاج نموات كثيرة. لذلك يفضل تحديد حجم الجزء النباتى وشـكله وتركيبـه فمثلا الأجزاء المفصولة من مناطـق التخزين فى البطاطس والبطاطا واللفت والجزر وغيرها فيفضل فصل جزء أسـطوانى منها بأبعاد 2.4 x 20 ملليمتر لأن الشـكل الأسـطوانى يتيح فرصة أفضل لامتصاص العناصر الغذائية من البيئة وتبادل الغازات. كما أن لمنظمات النمو والعناصر الغذائية المفرزة من الأسـطح المجروحة بالجزء النباتى لها دور فعال فى تنشيط الانقسام وتكوين الكالس. ويوصى بأن الحد الأدنى لوزن القطعة من جذر الجزر هو ٣,٨ ملليجرام حيث يحتوى على ٢٥ ألـف خلية تقريبا. بينما نفس الكتلة من درنات الخرشـوف تحتوى على عدد أقل من الخلايا نظرا لكبر حجمها. ولذلك يوصى بأن تكون كتلة القطعة من درنات

الخرشوف ٨ ملليجرام حيث تحتوى على ٢٠ ألف خلية تقريبا. وأن يفصل الطرف المرستيمى من القمة النامية لنباتات البطاطس أصغر من ذلك لضمان إنتاج نباتات خالية من الفيروس.

● **النمط الوراثى للنبات** Genotype

تختلف قدرة النباتات على النمو والتكاثر المعملى باختلاف نوعها وتركيبها الوراثى. فمن الثابت صعوبة تكوين الجذور العرضية على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe farinaceae* إذا زرعت فى الحقل، بينما يسهل ذلك بزراعتها فى بيئة غذائية مناسبة فى المعمل. وعموما يسهل تكاثر النباتات ثنائية الفلقات Di-cotyledons فى المعمل عن النباتات أحادية الفلقات Monocotyledons. والنباتات التى تتكاثر خضريا بسهولة فى الحقل يسهل تكاثرها فى المعمل. كما أن بعض العائلات والأجناس النباتية لها قدرة عالية على التكاثر مثل العائلة *Solana-cea* ومنها الأجناس *Petunia; Datura; Lycopersicon; Nicotiana; Solanum* ؛ والعائلة *Crueiferae* ويتبعها الأجناس *Arabidopsis; Brassica Lunnaria;*. والعائلة *Gesneriaceae* ويتبعها الأجناس *Streptocarpus Achimenes; Saintpaulia* ؛ والعائلة *Compositae* ومنها الأجناس *Chrysanthemum; Chichorium Lactuca;* والعائلة *Liliaceae* ومنها الأجناس *Lil (George, 1993) ium; Ornithogalum; Haworthia; Allium*.

● **العمر الفسيولوجى** Physiological age

الأنسجة الجنينية والأنسجة الحديثة Juvenile أكثر قابلية للنمو والتكوين الشكلى Morphogenesis عند زراعتها معمليا بالمقارنة بالأنسجة المتقدمة فى العمر Adult. وتنخفض قدرة الأشجار والشجيرات على التكاثر المعملى بتقدمها فى العمر، لذلك يجب إنتاج نباتات حديثة منها. ويفضل للزراعة المعملية استخدام

أجزاء نباتية حديثة العمر مثل الأنسجة المرستيمية والبادرات الحديثة. وتختلف بعض الأنواع النباتية فى هذا المضمون العام مثل-*Anthurium andreanum Lu-naria annua; Hedera helix;*. كما أن الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات يسهل تكاثرها خضريا تكون أفضل للزراعة المعملية عن الأجزاء المفصولة من نباتات لا تتكاثر خضريا. كذلك البراعم الساكنة والبذور الساكنة تكون أصعب فى النمو فى المعمل بالمقارنة بغيرها غير الساكنة. وقد تزداد قدرة النمو والتكاثر للأجزاء النباتية المفصولة أثناء فترة تزهير بعض النباتات بصرف النظر عن عمرها مثل-*Ranuncu-lus seeleratus; Freesia; Launaria*. وعموما تظل القمم النامية المفصولة من سوق حديثة العمر هى الأفضل فى الزراعة المعملية لأنها نشطة وقادرة على الانقسام والتكاثر بالمقارنة بالقمم النامية المفصولة من سوق متقدمة العمر. بالرغم من ذلك تنجح زراعة القمم النامية والأنسجة المرستيمية المفصولة من سوق متقدمة فى العمر لبعض النباتات مثل:

Rhododendron hybrids; Sequoia sempervirens; Malus sylvestris; Pinus pinas-ter; Cryptomeria japonica; Vitis vinifera; Thuja occidentalis.

(ب) عوامل خاصة بالبيئة المحيطة

● طول الفترة الضوئية Photoperiod

المرحلة الأولى لنمو الأجزاء النباتية لأنواع كثيرة من النباتات لا تتأثر إن كانت فى ضوء أو ظلام. بينما فى مراحل النمو التالية يكون من الضرورى تتابع فترتى الضوء والظلام لتكوين نموات خضرية وجذور. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة للنموات الناتجة من زراعة براعم زهرية حديثة للفريزيا Freesia. وقد يستلزم وجود الضوء لإنبات بعض أنواع البذور، بينما يستلزم وجود الظلام لإنبات بذور أنواع أخرى مثل الأوركيد Orchid (Pierik and Steegmans, 1975). وتؤثر طول الفترة الضوئية على نمو الأجزاء النباتية وتكوين النبتات فى المعمل. ويختلف هذا التأثير باختلاف

نوع النبات. وتعتبر ١٢ ساعة ضوءا هى الأفضل لنشوء وتكوين نموات على أجزاء مفصولة من درنات نبات Helianthus. وأن ١٥– ١٦ ساعة ضوءا هى الأفضل لتكوين أجنة على كالس نبات Geranium، بينما تنخفض عدد الأجنة المتكونة بإطالة أو تقصير الفترة الضوئية عن ذلك. ويتغير لون الكالس إلى اللون الأخضر ولا تتكون منه أجنة إذا كان ناميا فى ظلام تام. بينما لم يتأثر تكوين النموات الجديدة بزراعة المرستيم القمى لنبات Pharbitis nil تحت ظروف ١٦– ٢٤ ساعة ضوءا. كما ثبت أن مستوى الأكسجين والسيتوكينين داخل النسيج يتأثر بإطالة الفترة الضوئية فى الأنسجة المرستيمية المفصولة من نباتات تحتاج أصلا إلى فترة ضوئية طويلة.

● شدة الإضاءة Light intensity

لم يتم حتى الآن تحديد أفضل شدة إضاءة مناسبة لنمو الأنسجة النباتية المختلفة، وقد يرجع ذلك إلى اختلاف احتياج النباتات باختلاف مراحل النمو والنوع النباتى، فقد وجد أن ١٠٠٠ لكس Lux هو أفضل شدة إضاءة فى المرحلة الأولى والثانية من الزراعة الثانوية للأنسجة والخلايا النباتية، وقد تزداد إلى ٣٠٠٠– ١٠٠٠٠ لكس فى المرحلة الثالثة. ويتطلب زيادة شدة الإضاءة بعد نقل النباتات من البيئة الغذائية إلى التربة. ويجب ألا تصل الكثافة الضوئية فى المعمل إلى نفس المستوى السائد فى الحقل أو الحجرة الضوئية (تقدر ما بين ٣٠– ٧٠ وات/ متر مربع)، لأن زيادة شدة الضوء داخل المعمل عن القدر الأمثل والمناسب للزراعة المعملية يسبب أضرارا كثيرة. فقد لوحظ نشاط نمو الأجزاء النباتية المزروعة فى المعمل عند شدة إضاءة منخفضة (٨– ١٦ وات/ متر مربع)، وقد يحدث النمو فى المعمل عند شدة إضاءة أقل من ذلك. ويفضل اختيار الشدة الضوئية المنخفضة لأن التمثيل الضوئى فى الأجزاء النباتية المزروعة والنموات الحديثة الناتجة منها يكون ضعيفا لعدم اكتمال تكوين الكلوروفيل، خصوصا إذا انخفض تركيز ثانى أكسيد الكربون فوق الآجار. ويمكن تعويض النقص فى الشدة الضوئية بإضافة السكر للبيئة الغذائية، إلا إن الإضافة الزائدة من السكر قد تؤدى إلى ضعف سرعة نمو النباتات فى المعمل.

● **طول الموجة الضوئية** Wave length

فـــى حالة النباتات التى تتأثر بطول الموجـــة الضوئية Photomorphogenic plants يتم الســـيطرة عليها بإضافة صبغة الفيتوكروم Phytochrome لقدرتها على امتصاص الضـــوء بطول موجه (٦٦٠ نانوميتر) وتتحـــول إلى صيغة Phytochrome – red (Pr). فـــإذا تعرضت الصبغة (Pr) إلى الأشـــعة الحمراء تتحول إلى صيغـــة Phytochrome far red (Pfr) التى تســـتطيع امتصاص الأشعة بطول (٧٣٠ نانوميتر). ويحدث تحول صبغة الفيتوكروم من (Pr) إلى (Pfr) ببطء فى الظلام وبسرعة عندما تتعرض للأشعة الحمراء البعيدة Far red، وتسيطر صبغة (Pfr) على التكوين النباتى عن طريق تحفيز الجينات بطريقة مباشرة أو غير مباشرة. وفى دراسة على أنسجة نبات التبغ ثبت وجود اختلاف فـــى قـــدرة كلٍ من الضوء الأحمر والأخضر بالمقارنة بالضـــوء الأزرق على تحطيم هرمون انـــدول حمض الخليك (IAA) المضاف للبيئة الغذائية، حيث يعمل الضوء الأزرق على تحطيم هذا الهرمون، بينما ليس له تأثير على هرمون نفثالين حمض الخليك (NAA)، ممـــا يـــؤدى إلى إضعاف النمو. وهذه النتائج لا تماثل نتائـــج نباتات الكريزانثم *Chry-santhemum* والداليا Dahlia (Beauchesne, et al., 1970) . ولوحظ أن الضوء الأحمر (٦٦٠ نانوميتر) يشجع على تكوين الجذور العرضية على الأجزاء المفصولة من نبات الطرطزفـــة *Helianthus tuberosis* أكثر من الضوء الأزرق. وأن نمو كالس نبات *Pel-argonium* كان أفضـــل فى وجـــود الضوء الأبيض (يحتوى على جميع ألوان الطيف (Polychromatic)، وكان وجـــود الضـــوء الأزرق أفضل من الضـــوء الأخضر والأحمر أو الإظلام التام. كذلك ثبت أن الضوء الأزرق والبنفســـجى ينشـــطان تكوين الســـوق العرضية من كالس التبغ، بينما يشجع الضوء الأحمر على تكوين الجذور العرضية. وفى مضمون عام ثبت أن الضوء الأبيض عادة يثبط تكوين الجذور العرضية وينشـــط تكوين السوق العرضية، بينما فى معظم الحالات ينشط الضوء الأحمر تكوين الجذور العرضية لنبات (*Pseudotsuga menziesii*) ونبات الكرنب Brassica oleracea .

● **مصدر الضوء** Light source

تستعمل لمبات فلورسنت بيضاء باردة عادة لإضاءة معامل زراعة الأنسجة. ويستخدم فى بعض المعامل لمبات فلورسنت قوة ٣٨ وات (38W, Fluorescent-Tubes, Philips, Type 33)، مع أن لمبات الصوديوم قد تعطى نتائج أفضل. وأن تكوين الجذور على أجزاء ورقية من نبات *Kalanchoe* كانت أفضل بتعريضها لضوء من لمبات Interna 39 and Warm White de Lux 32، لاحتوائه على ضوء أحمر برتقالى Orange- red light بنسبة أعلى. وأن اللمبات التى ينبعث منها نسبة مرتفعة من الأشعة فوق البنفسجية (UV) كان لها تأثير مثبط على تكوين الجذور العرضية. وثبت أن الضوء المنبعث من لمبة فلورسنت يضعف منذ اللحظة الأولى من بدء تشغيلها، فإذا كانت كمية الضوء المنبعث عند بداية التشغيل ١٠٠٪ فإنها تنخفض لتصبح ٩٣٪ بعد ٨ أيام، ثم تصل إلى ٨٦٪ بعد ٤ أشهر ثم ٧٠٪ بعد ١٢ شهرا. (Norton and Norton, 1986)

● **الحرارة** Temperature

تختلف درجات الحرارة المناسبة لنمو الأجزاء النباتية باختلاف أنواعها. ولذلك يجب تزويد حجرة النمو بجهاز تكييف يعمل ذاتيا لتثبيت درجة الحرارة، وأن تفصل النباتات المتماثلة فى احتياجاتها الحرارية فى حجرة زراعة واحدة. وللحرارة المنخفضة أهمية فى كسر سكون البراعم والبذور وتحسين نموها؛ لذلك يجب تعريضها وهى فى مرحلة السكون إلى حرارة منخفضة لفترة زمنية حتى ينكسر سكونها ومن هذه النباتات التفاح والكمثرى والعنب والصنوبر *Pine* كما أن اختلاف الحرارة بين النهار (٢٦°م) والليل (١٥°م) وتعاقبهما بصورة مستمرة ومنتظمة يؤدى إلى زيادة عدد الجذور المتكونة على الأجزاء المفصولة من درنات الطرطوفة *Heli-anthus tuberosus* والجزر Carrot وذلك بالمقارنة بتلك المعرضة لحرارة ثابتة فى النهار والليل. وكان أفضل نمو لها عند ٢٦°م فى النهار و ٢٠°م فى الليل (Skoog,

(et al., 1974. ويعتبر المدى ٢٦– ٢٨°م هو أنسب درجات حرارة لنمو معظم الأجزاء النباتية و١٨°م للأنواع المكونة للأبصال والدرنات و٢٨– ٢٩°م للأنواع الاستوائية. وتزرع أغلب الأجزاء المفصولة من أشجار الفاكهة ما بين ٢٣– ٣٢°م ، حيث ينمو كالس أشجار التفاح جيدا عند ٢٠– ٣٢°م، ويكون نموها ضعيفا عند أقل من ٢٠°م. بينما الأجزاء المفصولة من الأفوكادو Avocado تحتفظ بحيويتها عند ٥٥°م. ووجد أن أنسب حرارة لنمو الأجزاء المفصولة من البطاطا *Ipomoea* والنامية فى بيئة سائلة هى ٢٥– ٣٢°م والأجزاء المفصولة من نبات *Rhododendron* والنرجس *Narcissus* هى ٢٥°م، والليليم *Lilium auratum* هى ٢°م.

● **الرطوبة** Humidity

بالرغم من قلة الدراسات عن تأثير الرطوبة داخل حجرة النمو، إلا إن ارتفاع الرطوبة بها قد يؤدى إلى ارتفاع نسبة التلوث. وزيادة الرطوبة فى البيئة الغذائية المنزرعة تؤدى إلى زيادة تكثيف بخار الماء على الجدار الداخلى لها. مما يؤدى إلى ظهور التزجج Vitrification وهى ظاهرة تؤدى إلى موت الأنسجة المنزرعة فى المعمل. ويمكن التحكم فى هذه الظاهرة بزيادة تركيز الآجار فى البيئة الغذائية.

● **الأكسيجين** Oxygen

التهوية الجيدة لها أهمية كبيرة لمساعدة الخلايا والأنسجة وغيرها على النمو. ويتم تحقيق ذلك باستخدام ماكينات رج مثل Shaking machines; Orchid wheels تناسب الدوارق المخروطية المحتوية على بيئة سائلة. ولتحسين التهوية فيها تزرع الأجزاء النباتية داخل الدوارق على كبارى ورقية. بينما يمكن تحسين التهوية داخل الأنابيب بتغطيتها بأغطية معدنية فقط ولا تستخدم سدادات قطن صوفى. وتزرع الأجزاء النباتية فيها بطريقة غير قطبية على سطح البيئة الصلبة المحتوية على آجار ولا تغمس فيها.

● **ثانى أكسيد الكربون** Carbon dioxide

يؤدى تجمع ثانىأكسيد الكربون إلى سمية النباتات النامية داخل أوانى الزراعة المعملية خاصة إذا كانت محكمة الغلق. لذلك يجب التخلص من ثانى أكسيد الكربون الزائد فى الأوانى المزروعة لتجنب حدوث الضرر للنباتات، مع إضافة السكروز للبيئة كمصدر هام للكربون.

● **غاز الإيثلين** Ethylene gas

استخدام لهب كحولى أو غازى فى تعقيم فوهة الأنابيب أو الدوارق أثناء الزراعة المعملية يؤدى إلى زيادة تجمع الإيثلين داخلها خصوصا إذا كانت محكمة الغلق. وزيادة الإيثلين تسبب الأضرار الآتية :

– تكوين خلايا نباتية غير متخصصة (كالس) مما يؤدى إلى إعاقة تكوين النبتات أو إنتاج نبتات رخوة وضعيفة.

– انخفاض تركيز اللون الأخضر أو عدم ظهوره فى الأجزاء النباتية وزيادة محتوى البيئة الغذائية من اندول حمض الخليك (IAA).

(جـ) عوامل خاصة بالبيئة الغذائية

● **تركيب البيئة الغذائية**

جميع الأجزاء النباتية المفصولة من نباتات ذات الفلقتين أو ذات الفلقة الواحدة قادرة على إنتاج كالس عند زراعتها فى بيئة مناسبة. ويفضل المحافظة على مكونات البيئة المناسبة لكل مرحلة من مراحل النمو، وأى تغيير فى تركيب البيئة حتى ولو كان بسيطا يؤدى إلى إحداث تغيير كبير فى طبيعة نمو الكالس.

● رقم الحموضة pH- Value

رقم حموضة البيئة عند 5 -6.5 يعتبر مناسبا لنمو النباتات المعملية، ويفضل ضبطه عند pH6 . ويتغير تماسك البيئة المضاف إليها الآجار بانخفاض رقم الحموضة عن 5.4 أو ارتفاعها عن 7. ويسبب التعقيم بالأوتوكلاف انخفاض حموضة البيئة بمعدل 0.3 -0.5 وحدة، كذلك رقم حموضة البيئة السائلة قابل للتغيير بعد زراعتها. وقد يرجع ذلك إلى إفرازات الأجزاء النباتية أثناء نموها. كذلك تتأثر حموضة البيئة بسرعة امتصاص عنصر النيتروجين. لذلك يجب العمل على ثبات رقم الحموضة بالمحافظة على التوازن بين تركيز النترات والأمونيا فى البيئة الغذائية والانخفاض الشديد للحموضة يؤدى إلى:

– انخفاض امتصاص الحديد إذا كانت البيئة حامضية (pH 5.4 -4.5). لذلك من الضرورى جدا رفع رقم الحموضة فى اتجاه نقطة التعادل بإضافة مركب Ethylene Diamine Tetra Acetate (EDTA) لضمان توفير عنصر الحديد والعناصر الأخرى.

– يصبح IAA وGA_3 وفيتامين B_1 وحمض البانتوثينيك أقل ثباتا. وتصبح الآجار غير متماسك Sloppy.

– ترسيب لبعض الأملاح مثل الفوسفات والحديد وينخفض امتصاص أيونات الأمونيا ويتوقف النمو.

– سهولة تحلل السكريات أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف. إلى جلوكوز وفركتوز ويتحول الجلوكوز جزئيا إلى فركتوز بعد التعقيم بالأوتوكلاف إذا كانت حموضة البيئة (pH 6).

● الجهد الأسموزى Osmotic potential

تؤثر عوامل كثيرة على الجهد الأسموزى للبيئة الغذائية مثل تركيز الآجار والعناصر المعدنية والوزن الجزيئى للأملاح المعدنية وسهولة تأينها. وللسكروز تأثير نسبى فى زيادة الجهد الأسموزى، والسكروز هو سكر ثنائى يتحلل أثناء التعقيم بالأوتوكلاف إلى وحدتين من السكر الأحادى مما يكون سببا فى رفع الجهد الأسموزى للبيئة. وللأملاح المعدنية الكبرى تأثير أكبر. ويختلف الجهد الأسموزى

كثيرا باختلاف محتوى البيئة من السكريات والأملاح. ويقدر الجهد الأسموزى بوحدة البار Bar أو الباسكال Pascal (البار = 10^5 باسكال). وأظهر Pierik and Steegmans, 1975 أن زيادة الجهد الأسموزى أكثر من 3×10^5 باسكال (= 3 بار) يؤدى إلى توقف النمو نتيجة توقف امتصاص الماء. ويعتبر مركب المانيتول Man-nitol من المركبات المسببة لرفع الجهد الأسموزى للبيئة ومثبط فسيولوجى للنمو. وإضافة واحد مولر من المانيتول يؤدى إلى جهد أسموزى يعادل (22.4 بار) . وحديثا يضاف مركب Polyethylene-glycole لتغيير الجهد الأسموزى للبيئة بدلا من المانيتول (جدول ١).

● **إفرازات الجزء النباتى** Explant exudates

الأجزاء المفصولة من بعض النباتات مثل الأشجار والشجيرات الخشبية تفرز صبغات بنية أو سوداء من الجروح الموجودة عليها. وهى مركبات متعددة الفينول Polyphenols وتانينات Tannins سامة تؤدى إلى توقف النمو فى مزارع الأنسجة. واقترح Anonymous (1978) المعاملات التالية للتغلب على هذه الإفرازات:

– تقليل الجروح على الجزء النباتى أو نقع الأجزاء النباتية فى الماء قبل زراعتها فى البيئة الغذائية؛ وإضافة الفحم النشط (AC) للبيئة بتركيز 0.2 - 3.0٪ (وزن/ حجم).

– إضافة مركب (PVP) للبيئة الغذائية بتركيز 250 - 1000 ملليجرام/ لتر، وهو بوليمر له القدرة على إدمصاص المركبات الفينولية أو إضافة مركبات مضادة للأكسدة مثل حمض الستريك وحمض الأسكوربيك والثيوريا والسيستين وهى مركبات مانعة لأكسدة الفينولات أو إضافة ثلاثة أحماض أمينية وهى: جلوتامين Glutamine والأرجينين Arginine والأسبرجين Asparagine. كما أن تخفيض تركيز الأملاح المعدنية فى البيئة الغذائية يقلل من الجهد الأسموزى وتقل الإفرازات.

– تجديد الزراعة على بيئة سائلة طازجة يؤدى إلى انتشار الإفرازات السامة بصورة مخففة حول الجذور.

وتساعد منظمات النمو على اسوداد البيئة وأكسدة المركبات الفينولية، وعدم إضافتها يؤدى إلى توقف عمليات الأكسدة. وثبت أن إضافة مركب Diethyl-dithio carbonate (DIECA) فى ماء شطف الأجزاء النباتية بعد تعقيمها بمركبات التعقيم بتركيز ٢ جرام/ لتر أو إضافة قطرات من هذا المركب وقت تقطيع وتهذيب الأجزاء النباتية وقبل زراعتها على البيئة يعمل على إيقاف أكسدة المركبات الفينولية ولوحظ ظهور لون بنى عند قاعدة الأفرع فى مزارع الأنسجة ناتج عن النشاط الضوئى Photo activation ويمكن تقليل هذه الظاهرة بحفظ قواعد السوق فى الظلام أثناء نموها، أو يمنع نفاذ الضوء بدهان الجوانب الخارجية للأوانى المزروعة باللون الأسود حتى مستوى البيئة الغذائية، أو تلف قواعدها بورق ألومنيوم، أو إضافة طبقة رقيقة من الفحم النباتى غير النشط وآجار على سطح البيئة الغذائية.(Rugini, et al., 1986)

جدول (١) الجهد الأسموزى لبعض البيئات الغذائية

البيئة الغذائية	الضغط الاسموزى	الضغط الاسموزى
	السكر(بار)	العناصر الغذائية (بار)
White (1939)	1.46	0.43
Hilderbrandt (1971)	1.46	0.67
Heller (1953)	4.05	0.96
M. S. (1962)	2.20	2.27

٤- مرحلة الزراعة الثانوية (زراعة متكررة)

Sub-culturing

هى زراعة النبتات Plantlets أو الكالس Callus عدة مرات متتالية وعلى فترات متقاربة بهدف زيادة عدد النبتات أو زيادة كمية الكالس بما يتناسب مع حاجة العمل.

ويستخدم فى كل مرة نفس البيئة الغذائية ولكنها طازجة. ويفضل عدم تكرار الزراعة الثانوية أكثر من اللازم حتى لا يفقد الجزء النباتى قدرته الذاتية على تكوين النموات. وكان ذلك مؤكدا مع نبات العليق *Convolvulus* وكالس الجزر والقمم النامية لجذور نبات *Isatis tinctoria* حيث تفقد قدرتها على تكوين النموات الجديدة تدريجيا بزيادة عدد مرات الزراعة الثانوية. بينما فى حالات أخرى وجد أن نباتات *Lilium longiflorum* و *Chrysanthemum* وأشجار خشبية كثيرة تزداد قدرتها على تكوين النموات الجديدة بتكرار الزراعة الثانوية التى قد تصل إلى عدة سنوات.

الحاجة إلى إجراء الزراعة الثانوية

١- عندما تصبح البيئة معرضة للجفاف. أو تحولت من صورة صلبة إلى صورة سائلة لزيادة حموضتها.

٢- عندما تملأ النموات الفراغ الداخلى لأوانى الزراعة أو عند الحاجة إلى زيادة عدد النباتات أو كمية الكالس.

٣- عند ظهور لون بنى أو أسود على البيئة نتيجة تجمع مواد تفرزها الأنسجة النباتية خلال الأسابيع القليلة الأولى من الزراعة، وهذه المواد سامة قد تؤدى إلى موت النباتات.

٤- عند الرغبة فى تغيير اتجاه النمو. ويستلزم لذلك إتمام الزراعة الثانوية فى بيئة غذائية جديدة ذات تركيب منشط لنمو الجذور أو السوق ويتم ذلك بتغيير منظمات النمو.

خطوات الزراعة الثانوية

تعقم الأنابيب أو الدوارق المخروطية جيدا من الخارج وعند الفوهة بكحول ٩٦٪، ويفضل تعقيم السدادات تعقيما سطحيا. ثم يستبعد ورق الألومنيوم أو غشاء البوليثين Polythene المستخدم فى تغطية فوهة الأوانى الزراعية. وباستعمال ملقط معقم يستخرج الجزء النباتى أو كتلة الكالس بحذر من الأنبوبة أو الدورق المخروطى

ويوضع فى طبق بترى معقم أو بين ورق ترشيح معقم. وباستخدام مشرط معقم تستبعد الأجزاء المتضررة بالقرح Necrotics ثم يقطع الجزء الباقى إلى أجزاء متجانسة، وتزرع فى بيئة طازجة. وتجرى جميع هذه الخطوات داخل الكابينة المعقمة. وقد تحدث بعض التغييرات فى التكوين الظاهرى للنباتات أثناء الزراعة الثانوية مثل:

١- انخفاض مستوى منظمات النمو الموجودة طبيعيا فى الجزء النباتى مما يؤدى إلى عدم تكوين نموات جديدة. وتستعيد الأجزاء النباتية قدرتها على النمو بإضافة الكاينيتين إلى البيئة. وقد تأكد ذلك فى نبات *Isatis tinctoria*.

٢- زيادة تكرارات الزراعة الثانوية يؤدى إلى إنتاج نباتات مختلفة وراثيا عن نباتات الأم. وقد يرجع ذلك إلى سرعة انقسام الخلايا وعدم انتظام توزيع الكروموسومات أثناء انقسامها. وتؤثر هذه الاختلافات سلبا على الإنتاج التجارى، وإن كانت لها أهمية عند مربى النبات الذى يبحث عن الاختلافات الوراثية. ويختلف عدد تكرارات الزراعة الثانوية باختلاف النبات، فزيادة تكرارات الزراعة الثانوية للأشجار والشجيرات الخشبية يساعد على التخلص من المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية فى البيئة.

٣- لا يفضل إطالة الفترة بين تكرارات الزراعة الثانوية أكثر من ٤- ٦ أسابيع لأنه يؤدى إلى استنزاف عناصر البيئة وجفاف البيئة وتشققها إن كانت صلبة أو زيادة تركيز بعض مكوناتها إن كانت سائلة نتيجة تبخير الماء منها وتراكم المركبات الأيضية السامة والمثبطة للنمو التى تفرزها الأجزاء النباتية فى البيئة، وقد تنتقل هذه المواد السامة إلى البيئة إذا تم تجديدها. كذلك يؤدى تأخير الزراعة الثانوية للكالس إلى إضعاف نشاطه وتلف جزء منه ولا يفضل زراعة الكالس الضعيف مرة ثانية لأنه يؤدى إلى مزيد من الضعف .

٥- مرحلة أقلمة النباتات والزراعة فى التربة

النباتات المعملية عادة لها أسطح مغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكل نتيجة زيادة الرطوبة داخل أوانى الزراعة إلى ٩٠- ١٠٠٪، وتكون الأوراق عادة رقيقة وغضة

وغير قـادرة على التمثيل الضوئـى لانخفاض محتواها من البلاسـتيدات الخضراء النشـطة وزيادة محتواها من البلاسـتيدات غير النشـطة Palissade cells، واحتواء خلايا الميزوفيل على مسافات بينية هوائية كثيرة، والثغور Stomata دائمة الانفتاح وغير قادرة على تأدية وظيفتها الطبيعية، وضعف الأوعية الناقلة التى تربط الجذور بباقى أجـزاء النبات مما يـؤدى إلى ضعف حركة المياه داخل النبات. ومضمون ذلك أن النباتات المعملية هى نباتات ضعيفة لا تسـتطيع الاعتماد على نفسـها فى بناء غذائهـا Heterotrophic. ومن السـهل أن تفقد قدرا كبيرا من محتواها المائى خلال السـاعات الأولى بعد نقلها إلى البيئة الخارجية ممـا يعرضها للجفاف والموت. وقد تنجـح بعض النباتات مثـل *Saintpaulia; Episcia* على تحمل البيئة الجديدة بعد نقلهـا من المعمل إلى الصوبة لقدرتها على اسـتكمال نمو الجذر. وقد لا تنجح أنواع أخرى مثل القرنفل والقنبيط لسـهولة ذبولها. لذلك فمـن الضرورى أقلمة النباتات المعملية لكى تتحمل الظروف البيئية الجديدة فى الصوبة أو الحقل، وتقوم بالتمثيل الضوئى بكفاءة تحفظ لها حياتها، وتعمل الثغور بكفاءتها لكى تحافظ على المحتوى المائى للنبات وتكوين طبقة شمعية مناسـبة لحماية الخلايا. والشـعيرات الجذرية للنباتـات المعملية عادة ضعيفة ويسـهل جرحها وتقطيعها عند تخليصها من البيئة إذا كانت صلبة تحتوى على آجار. ويجب تخليص الجذور من الآجار لاحتوائه على سـكر يسـاعد على إصابة النباتات بالكائنات الدقيقة. وتحتاج إلى فترة زمنية حتى تعوض ما فقدته من الشعيرات الجذرية. وخلال هذه الفترة قد تتعرض النباتات إلى الذبول والموت. لذلك يفضل تنمية النباتات فى المرحلة الأخيرة من الزراعة الثانوية على بيئة سـائلة تحتوى على ٥٠٪ من مكونات بيئة (MS). ويفضل البعض غمس النباتـات المعملية فى محلول مخفف من الأكسـين لتشـجيع تكويـن ونمو الجذور عليهـا. ثم تنقل إلى تربة أو بيت مـوس ناعم. وقد تعقم التربة بالبخار تحت ضغط أو بأشـعة جاما. ويجب المحافظة على النباتات بعد نقلها إلى التربة وحمايتها من الإصابة بالأمراض والحشرات.

وتتعرض النباتات المعملية إلى فقد قدرتها على المعيشة التكافلية أثناء نموها فى المعمل. وتحتاج لفترة زمنية عقب نقلها خارج المعمل حتى تنمو الجذور ويتكون عليها عقد بكتيرية مثل الرايزوبيوم Rhizobium والميكوريزا Mycorrhiza. وثبت أن إضافة بكتيريا الميكوريزا أثناء فترة التقسية لنباتات البتولا Birch وLeucaena و*Paxillus involutus* يؤدى إلى تكوين عقد بكتيرية على ٨٠٪ من الجذور وينشط نمو النباتات المحقونة بمعدل ٧٥٪ بالمقارنة بالنباتات غير المحقونة.

وقد يكون من الضرورى تعريض النباتات لمعاملة باردة (٥°م) لمدة ٤– ٨ أسابيع. وتتم هذه المعاملة فى المعمل أو بعد نقل النباتات مباشرة إلى البيئة الخارجية لكسر طور السكون. وكسر طور السكون له أهميته للأبصال والدرنات والكورمات وبراعم الأشجار والشجيرات لرفع نسبة نجاح نمو النباتات.

وقبل نقل النباتات إلى خارج المعمل تنزع سدادات الأوانى تدريجيا لخفض الرطوبة النسبية داخلها ورفع حيوية النباتات لمساعدتها على التأقلم مع البيئة الخارجية وتكوين طبقة شمعية فوق طبقة الكيوتيكل. ثم تخفض شدة الإضاءة تدريجيا. وبعد نقل النباتات ترفع الرطوبة النسبية بإحداث شبورة Mist أو ضباب Fog حول النباتات أو زراعتها تحت أغطية من البلاستيك لمدة ١– ٢ أسبوع. وقد تستعمل أحيانا رشاشات مائية مع خفض درجة الحرارة والضوء باستخدام التظليل. وقد تنقل النباتات المعملية إلى صوانٍ كبيرة مقسمة إلى حجرات مربعة تحتوى على تربة، ثم تغطى بالبلاستيك للمحافظة على المستوى المرتفع من الرطوبة على أن يتم رفع الأغطية تدريجيا حتى تتم أقلمة البادرات. وتوجد صوان بلاستيك تسمى Plug plate تحتوى على ٤٠٠ حجرة تملأ ببيئة صناعية مثل البيت موس مضافا إليه مواد منشطة لتكوين الجذور. والبيت موس قادر على الانتفاخ بعد ترطيبه بالماء ويعمل على تثبيت النباتات. وتوضع هذه الصوانى فى صوبة نصف معقمة وتستخدم فيها رشاشات للمحافظة على الرطوبة النسبية المرتفعة. وبعد اكتمال نمو الجذور تبدأ السوق الحديثة فى النمو، حينئذ تنقل النباتات إلى الصوبة ويزرع كل نبات على حده فى التربة. وتنجح هذه الطريقة فى زراعة عقل ساقية متكونة فى المعمل لنباتات Rhododendren Gerbera;

زراعة الأجنة الجنسية

Sexual (Zygotic) embryos

أهمية زراعة الأجنة الجنسية

الأجنة الجنسية (الزيجوتية) ناتجة من اندماج محتويات حبة اللقاح مع محتويات البيضة. وتفصل الأجنة فى أى مرحلة من مراحل نضج البذرة لزراعتها فى المعمل. ولزراعة الأجنة أهمية فيما يلى:

١- التغلب على حالة عدم إنبات البذور

تستخدم زراعة الأجنة لبعض الأنواع النباتية التى يستحيل إنبات بذورها فى الحقل مثل القلقاس *Colocasia esculenta* والموز *Musa balbisiana*

٢- التغلب على ظاهرة السكون فى البذور

قد يكون صلابة غطاء البذرة سببا فى منع أو تقليل نفاذ الماء والأكسجين داخل البذرة. وإنبات مثل هذه البذور قد يكون بطيئا جدا وقد يمتنع تماما. وتنبت هذه البذور بعد إزالة غطائها. وفصل الأجنة غير الناضجة وزراعتها هى وسيلة للتغلب على ظاهرة السكون ومن أمثلة ذلك الورد البلدى والتفاح ونخيل الزيت والأيريس.

٣- التغلب على ظاهرة عدم التوافق

يتم فصل الأجنة قبل اكتمال نضجها ثم زراعتها فى المعمل. ومن أمثلة ذلك الهجن الناتجة من بعض الأنواع التابعة لجنس الفاصوليا Phaseolus وأنواع الليلى والكتان والقطن والطماطم والأرز والشعير.

٤- إنتاج نباتات متجانسة

بالزراعة المعملية لأجنة أحادية العدد الكروموسومى تنتج نباتات أحادية، وبمضاعفة عدد الكروموسومات بالكولشسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة خصبة.

٥- إكثار الأجنة ثلاثية العدد الكروموسومى

تطبق زراعة الأجنة الجنسية غير الناضجة لإكثار نباتات ثلاثية العدد الكروموسومى، وهى نباتات تعطى بذورا عقيمة غير مكتملة النضج وفيها الإندوسبرم غير مكتمل التكوين، ومن أمثلتها الشعير والشوفان والجويدار. وتنتج النباتات الثلاثية من التهجين بين نباتات ثنائية ونباتات رباعية.

٦- التغلب على ظاهرة الموت المبكر للأجنة

قد يتوقف مبكرا انتقال الماء والعناصر الغذائية للأجنة غير الناضجة ويسبب ذلك موت الأجنة مبكرا. ولوحظت هذه الظاهرة فى هجن بين أنواع ذات النواة الحجرية مثل الخوخ والكريز والمشمش والبرقوق . ولذلك تستخدم الزراعة المعملية الأجنة للتغلب على ظاهرة الفشل المبكر لنمو الجنين فى الحقل.

طرق فصل الأجنة من بعض البذور

تستخدم الأجنة غير الناضجة Immature embryo فى الزراعة المعملية لإكثار النباتات التى تنتج بذورا يموت فيها الجنين مبكرا. لذلك يفضل فى هذه الحالة فصل الأجنة مبكرا من البذور، مع الحرص بعدم إحداث أى ضرر للجنين أثناء فصله، ثم زراعته فى بيئة غذائية مناسبة. وتزرع الأجنة الناضجة Mature embryo للتغلب على ظاهرة السكون. وفصل الأجنة من بذور تامة النضج بسهولة وتزرع فى بيئة غذائية بسيطة مضافا إليها آجار وسكر وعناصر معدنية.

وتعقم الأسطح الخارجية لكل من البذور الناضجة أو غير الناضجة بالطريقة العادية للتعقيم السطحى. بالنسبة للبذور الناضجة تشق القصرة لكى يصبح الجنين ظاهرا ويسهل فصله من الفلقات. أما بالنسبة للأجنة غير الناضجة فيتم فتح غلاف الثمرة بحرص حتى تصبح البويضات المخصبة (أجنة غير ناضجة) وقد تحدد موقعها بدقة ثم تفصل بحرص. و يراعى عدم جرح الأجنة عند فصلها حتى لا تفشل فى نموها أو تكون كالس. ويفضل استخدام ميكروسكوب عند فصل الأجنة إذا كانت صغيرة أو أنسجتها ضعيفة فى وجود مصدر ضوئى بارد (فلوروسنت) مع استخدام شفرة حادة و إبرة حقن. والآتى عرض لفصل بعض الأجنة:

١- **فصل جنين الشعير** embryo Barley، حيث تفصل الحبوب من السنبلة، ثم تعقم وتشطف بماء مقطر، ثم ترص فى أطباق بترى بحيث يكون ظهر الحبة المحتوى على الجنين لأعلى. ثم تزال المنطقة القمية للثمرة ويستبعد غلاف الحبة وغطاء البذرة لكى يصبح الجنين حرا . عندئذ يفصل الجنين بواسطة مشرط ويثبت على بيئة صلبة.

٢- **فصل جنين الكريز** Cherry embryo، حيث تنزع البذور الصلبة من ثمار الكريز وتوضع فى إناء به ماء للكشف عن حيويتها، فالبذور الجيدة تغوص وترسب فى القاع. وتجمع البذور الجيدة ثم تعقم تعقيما سطحيا. وتشق البذرة المعقمة بحيث يصبح الجنين مرئيا. ثم تستخرج الأجنة بحرص باستخدام ملقط مدبب الطرف ثم تنقل مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- **فصل جنين الليلى** Lily embryo، تجمع الثمار بعد ٤٠-٦٠ يوما من الإخصاب وتعقم سطحيا بكحول إيثايل ٩٦٪. ثم تفصل البذور وتوضع فى إناء يحتوى على ماء معقم لمنع جفافها. ويزال غطاء البذرة بكشطه بمشرط حتى يصبح الإندوسبرم مرئيا. ثم يشق غطاء البذرة طوليا فى اتجاهات متعددة. ويفصل الجنين بواسطة دفعه إلى خارج الإندوسبرم ويزرع مباشرة عقب فصله فى بيئة غذائية صلبة.

عوامل إنجاح زراعة الأجنة الجنسية

١- تختلف قدرة الأجنة على النمو فى المعمل باختلاف الصنف والنمط الوراثى Genotype والعمر الفسيولوجى، لذلك يجب التعرف إلى خصائص الأجنة ومرحلة النمو المناسبة لفصلها. فقد تنجح بعض الأجنة إذا زرعت فى المعمل بعد اكتمال نضجها ولا تنجح إذا زرعت فى مرحلة مبكرة من النضج. ويفضل فصل الجنين ملتصقا به جزء من الإندوسبرم أو جزء من السويقة الجنينية Hypocotyl فى حالة صغر عمر الجنين بصورة واضحة.

٢- ينمو الجنين جيدا إذا كانت الفلقات أكثر نضجا وممتلئة بالمواد الغذائية المخزنة. أما بالنسبة للبذور التى تحتوى فلقاتها على مسببات السكون فيجب إزالة الفلقات قبل زراعة الأجنة. وأحيانا تعامل نباتات الزينة المزهرة بالجبرلين قبل فصل الأجنة وهذا يؤدى إلى زيادة حجمها وسهولة فصلها.

٣- يؤدى تحسين الظروف البيئية المحيطة بنبات الأم إلى نمو جيد للأجنة المفصولة منها.

٤- تزرع الأجنة غير الناضجة بعد فصلها مباشرة على بيئة تحتوى على نسبة مرتفعة من السكر.

٥- يراعى عدم تلوث الأجنة وعدم الإضرار بها أثناء فصلها من البذور خصوصا إذا كانت بذورا صلبة.

٦- الأجنة المفصولة عمر ٧- ١٤ يوما تنمى فى ظلام قبل نقلها إلى الضوء لتشجيع تكوين الكلوروفيل.

٧- تحتاج مزارع الأجنة للأكسيجين بتركيز أعلى من تركيزه فى الهواء الجوى.

٨- درجة الحرارة المثلى لنمو الأجنة تختلف باختلاف النوع النباتى. وعادة تحضن الأجنة بعد زراعتها عند ٢٢- ٢٨°م. بينما يستلزم تحضين أجنة بعض الأنواع النباتية مثل الليلى Lily عند (١٧°م)، على أن يبقى نبات الأم لمدة

٤–٦ أسابيع عند ٥– ٩°م للحصول على نمو جيد للأجنة. وقد يستلزم تعريض الأجنة لمعاملة باردة (٤°م) لكسر سكونها.

البيئة الغذائية المناسبة لنمو الأجنة

تحتاج الأجنة الناضجة وغير الناضجة إلى بيئة صلبة يتوفر فيها العناصر الكبرى والصغرى والسكر. و تكون حموضتها ٦– ٥ pH. وتستخدم بيئات عديدة مثل بيئة Monnier (1976) لزراعة أجنة نبات Capsella bursa-pastoris وأنواع نباتية أخرى، حيث تحتوى على أيونات أمونيا وبوتاسيوم وسكروز. وقد يكون لوجود الجلوكوز والفركتوز فى البيئة أهمية أحيانا. كما أن السكروز له أهمية كمصدر للطاقة ويساعد على خفض الضغط الأسموزى للبيئة خصوصا مع الأجنة غير الناضجة. وتنمو الأجنة الناضجة على بيئة تحتوى على ٢– ٣٪ سكروز، بينما تحتاج الأجنة غير الناضجة إلى بيئة تحتوى على ٨– ١٢٪ سكروز. ولا تضاف منظمات النمو إلى بيئة الأجنة لاحتواء الأجنة على ما يكفيها منها. وإضافة منظمات النمو للبيئة يؤدى إلى تكوين كالس. ويفضل إضافة الجبرلين أحيانا لبيئة الأجنة المفصولة من بذور ساكنة لدوره الهام فى كسر السكون. وقد يستلزم إضافة بعض الفيتامينات لمزارع الأجنة مثل الجلوتامين Glutamine كمصدر هام للنيتروجين وله أهمية خاصة لنمو الأجنة غير الناضجة، كما أن إضافة لبن جوز الهند والكازين Casein hydrolysate ومستخلص المولت لها أهميتها أيضا لنمو الأجنة غير الناضجة.

□□□