

الباب السابع

إنتاج نباتات أحادية فى العمل

In vitro Production of Haploids

الأعضاء المذكورة فى النبات

هى مجموعة من الأسدية Stamens موجودة فى الزهرة. وتتكون السداة من خيط Filament وامتك Anther. ويتكون المتك من فصين كبيرين مفصولين من الداخل بحاجز. ويحتوى كل فص على حجرتين يفصلهما نسيج فاصل. ويحتوى كل فص على كيس جرثومى بداخله حبوب اللقاح. وجميع خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بين حجرات وجدر المتك هى خلايا جسمية ثنائية العدد الكروموسومى. بينما حبوب اللقاح هى خلايا أحادية العدد الكروموسومى. وينتج عن الزراعة المعملية للمتك نباتات ثنائية مصدرها خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بالمتك ونباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح. وتنشأ حبوب اللقاح فى المتك من خلايا أمية Pol-len mother cells موجودة فى الطبقات الداخلية لجدر الأكياس الجرثومية. وتنقسم الخلية الأمية انقسامًا اختزاليا Meiosis إلى خليتين أحاديتين Haploid، ويسمى دور الخليتين Dyad. ويتبع ذلك انقسامًا عاديا Mitosis ليكون أربع خلايا أحادية، ويسمى دور الأربع Tetrad. وبذلك ينتج عن كل خلية أمية واحدة أربع حبوب لقاح. ثم تتفك خلايا حبوب اللقاح (Microspores) جاهزة للتلقيح والإخصاب. وحببة اللقاح خلية كروية أو بيضاوية أو مضلعة لونها أصفر غالبا لها جدار خارجى عادة سميك عليه تجاعيد وأشواك مميزة لكل نوع نباتى. وحببة اللقاح بداخلها مادة هلامية عكرة تحتوى على مواد غذائية فى صورة حبيبات. وقبل انتشار حبوب اللقاح من المتك تنقسم نواة حبة اللقاح إلى نواتين تتميز إحداهما بكثافة السيتوبلازم المحيط بها، وتسمى نواة جنسية Generative nucleus أو خلية

تناسلية وتبقى صغيرة بدون جدار، بينما النواة الأخرى كبيرة وتسمى نواة خضرية
.Vegetative nucleus

الأعضاء المؤنثة فى النبات

يمثل المتاع Gynaecium عضو التأنيث بالزهرة فى نباتات مغطة البذور -Angio- sperms. ويتكون المتاع من كربلة واحدة أو عدة كرابل. وتتركب الكربلة Carpel من جزء قاعدى يعرف بالمبيض Ovary ويعلو المبيض خيط رفيع يعرف بالقلم Style. ويوجد فى الطرف العلوى للقلم جزء منتفخ يسمى بالميسم Stigma. والميسم جسم كروى صغير وبرى أو أملس مغطى بطبقة لزجة لاقتناص حبوب اللقاح. ويحتوى المبيض على بويضة Ovule واحدة أو أكثر. وتقوم البويضة بوظيفة الخلية التناسلية الأمية، فيها ينشأ الجنين بعد الإخصاب أو هى الكيس الذى يحتضن الجنين بداخله. ولذلك تسمى البويضة علميا بالخلية الأمية للكيس الجنينى Embryo- sac mother cell مثلها مثل الخلية الأمية لحبوب اللقاح. وتتركب البويضة أساسا من نسيج النيوسيلة Nucellus محاطا غالبا بغطاء من الخارج متكون من غلاف أو غلافين ماعدا منطقة خاصة يتكون فيها النقيير Micropyle وقد يكون نسيج النيوسيلة بدون أغلفة. وحيث إن البويضة وظيفتها تناسلية فلا بد وأن تدخل فى انقسام اختزالي (ميوزى) لتكوين خليتين Dyad، ثم انقسام عادى (ميتوزى) للوصول إلى دور أربع الخلايا Tetrad، وهى النتيجة النهائية للانقسام الاختزالي. وتحتوى كل من الخلايا الأربع على نصف العدد الأصلي من الكروموسومات. ثم تهضم ثلاث من الخلايا الأربع وتبقى خلية واحدة فقط فى المبيض وتعتبر نواة أنثوية حقيقية تبدأ فى تكوين الكيس الجنينى. وتنقسم النواة الأنثوية الحقيقية إلى ثلاث انقسامات بطريقة الانقسام العادى Mitosis ليتكون بعدها ثمانى أنوية جميعها مختزلة، أى تحتوى على نصف عدد كروموسومات الخلية الجسمية. ويحدث بعدها توزيع للثمانى أنوية فى فراغ الكيس الجنينى، فتتجه ثلاث منها نحو أحد أقطاب الكيس الجنينى وتسمى بخلايا Antipodal. وتتجه ثلاث أخرى نحو القطب الآخر حيث تمثل خلية منهم الخلية الأنثوية الحقيقية True female egg

وتسمى الخليتان بالخلايا المنشطة Synergetic cells. وتبقى نواتان من ثماني الأنوية، وهاتان تندمجان معا لتكونا نواة ثنائية العدد الكروموسومي وتسمى بالنواة المندمجة Fusion nucleus أو النواة القطبية Polar nucleus وبعد انتهاء هذا التوزيع يصبح الكيس الجنيني مؤهلا لاستقبال حبوب اللقاح. وزراعة البويضة معمليا قبل إخصابها يؤدي إلى إنتاج نبات أحادي العدد الكروموسومي. وبمضاعفة عدد الكروموسومات فيها تنتج نباتات مماثلة لنبات الأم. وزراعة المبيض أو البويضة أو الكيس الجنيني بجمع محتوياتهم سيؤدي إلى إنتاج نباتات مختلفة في عدد الكروموسومات، إذ يؤدي إلى إنتاج نباتات ثنائية من الخلايا الثنائية ونباتات أحادية من الخلايا الأحادية.

التلقيح والإخصاب

تنتقل حبة اللقاح إلى الميسم، وتسمى بعملية التلقيح Pollination. ثم تثبت حبة اللقاح مكونة أنبوبة لقاحية Germ tube تخترق نسيج الميسم ثم القلم متجهة نحو المبيض ثم الكيس الجنيني ثم البويضة. وعند بدء إنبات حبة اللقاح على الميسم أو قبل ذلك مباشرة تنقسم الخلية الجنسية (الذكورية) إلى خليتين Dyad. وعند وصول طرف أنبوبة اللقاح إلى البويضة تختفى عادة النواة الخضرية Vegetative nucleus. ثم تفرغ أنبوبة اللقاح محتوياتها في الكيس الجنيني فتندمج إحدى الأنوية الذكورية مع البويضة (النواة المؤنثة الحقيقية)، ويسمى ذلك بالاندماج أو الإخصاب Fertilization، وتنتج نواة الزيجوت Zygote التي تحتوى على عدد من الكروموسومات يساوى الموجود في الخلية الجسمية. أما النواة الذكورية الثانية فتندمج مع النواة المندمجة القطبية Polar nucleus وينتج عن هذا الاتحاد نواة واحدة هي نواة الإندوسبرم Endosperm تحتوى على ثلاثة أضعاف العدد الأساسى من الكروموسومات، لأنها تنشأ من اتحاد ثلاث أنوية تحتوى كل منها على نصف العدد الأساسى من كروموسومات الخلية الجسمية. وبانتهاء الإخصاب وتكوين الجنين (الزيجوت) واكتمال نمو الجنين يكون قد اكتمل تكوين البذرة.

تعريف النباتات الأحادية Haploid plants

يعرف النبات الناتج من الطور الجرثومي Sporophyte (حبة لقاح أو بيضة) بأنه نبات أحادي Haploid عقيم تحتوى خلاياه على نصف العدد الكروموسومى الموجود فى الخلية الجسمية. والنبات الأحادى قد يكون مصدره حبة لقاح ويسمى نشوءا ذكريا -Androgene-sis، أو مصدره بيضة غير مخصبة ويسمى نشوءا أنثويا Genogenesis أو نشوءا بكريا -Par-thenogenesis; Apomixes. وتضاعف عدد الكروموسومات فى النباتات الأحادية يؤدي إلى إنتاج نباتات متضاعفة Polyhaploids أى إنها نباتات متضاعفة ومصدرها نباتات أحادية. وهى نباتات خصبة منتجة للبذور. وبدأت تجارب زراعة المتوك عام ١٩٧٠ على الأرز والقمح فى الصين، ثم امتدت التجارب إلى الذرة والشوفان والتريتيكال والتبغ والقطن وفول الصويا والشاجم والكرب الصينى والفلفل وبعض الأشجار والشجيرات وكثير من نباتات الزينة. وشملت زراعة المتوك وحبوب اللقاح الآن أكثر من ١٧١ نوعا نباتيا ينتمون إلى ٦٠ جنسا و٢٦ عائلة نباتية. ومازالت تحتاج إلى مزيد من البحث لحل بعض الصعوبات التى تواجه إنتاج النباتات الأحادية لبعض المحاصيل.

أهمية النباتات الأحادية

١- إنتاج سلالات نقية

يمكن الحصول على سلالات نقية بطرق تقليدية تشمل التهجين والتلقيح الذاتى أو الرجعى لعدة أجيال مع الانتخاب للتخلص من الصفات غير المرغوبة. ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى مجهود وفترة زمنية طويلة. بينما زراعة المتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة فى المعدل يمكن إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Haploid، فإذا عوملت النباتات العملية الأحادية بالكولشسين يتضاعف عدد الكروموسومات فيها وتنتج سلالات ثنائية Dihaploid خصبة متجانسة Homozygous وثابتة وراثيا Isogenic فى وقت قصير. وقد أنتجت سلالة ذرة "Qun-Hua" بزراعة المتوك فى فترة تقل عشر سنوات بالمقارنة بإنتاج سلالة مماثلة فى التجانس بالطرق التقليدية.

وتميزت هذه السلالة بارتفاع المحصول وقدرة عالية على التوافق الهجينى حيث أدخلت فى إنتاج ٦٢ هجيناً، تميز منها ٥٦ هجيناً بارتفاع المحصول، وقد تفوق الهجين Qun (411 x Hua) عليهم جميعاً (Wu, et al, 1980).

٢- استحداث تنوع وراثى فى النباتات الأحادية المتضاعفة

نباتات الأرز الناتجة من الجيل الأول «F1» للهجين «Jili x Xian nong 5675» هى نباتات ثنائية غير متجانسة لأنها تحتوى على جينات متجمعة من الصنفين. وبالزراعة العملية لحبوب لقاح الجيل الأول (F1) نتجت نباتات فى الجيل الأول (H1) مختلفة فى تركيبها الوراثى. وبمضاعفة العدد الكروموسومى لهذه النباتات ظهرت ٧ تكوينات وراثية، بعضها يحمل صفات الصنف الأول وبعضها يحمل صفات الصنف الثانى، والبعض الآخر جمع بين صفات الصنفين Institute of ge-netics 1974, 1977b) (شكل ١).

شكل (١) مقارنة بين برنامج تربية نباتات أحادية وبرنامج تربية تقليدية

برنامج تربية تقليدية	برنامج تربية للنباتات الأحادية
نبات الأم X نبات الأب	نبات الأم
↓	↓
F1	زراعة حبوب لقاح أو متوك أو بيضة
↓	↓
F2 - 5	→ إنتاج نباتات أحادية ←
التلقيح الذاتى أو	↓ ↓
التبجين الرجعى مع الانتخاب	تضاعف ذاتى تضاعف بانكولشين
↓	↓ ↓
↓	→ → H1 ← ←
F6	نباتات ثنائية متجانسة
سلالات ثابتة وراثياً	↓
	H2

٣- استحداث أصناف جديدة من الأرز والقمح والتبغ

بإزراعة متوك الجيل الأول الهجين (F₁) من الأرز والقمح والتبغ تم الحصول على :
(أ) صنفين من الأرز هما (Hua Yu No.-1) و(Hua Yu No.-2) يتميزان بمحصول مرتفع من الحبوب (٧٥٠٠ كيلوجرام/ هكتار) ومقاومة للفحة البكتيرية Bacterial blight والتأقلم للبيئة بدرجة عالية. وصنفين آخرين هما (Xin Xiu) و(Tang Huo) (No.-2) يتميزان بارتفاع المحصول. (Chen and Li, 1978).

(ب) سلالة جديدة من القمح الشتوى تسمى (Jingdan-2288) تتميز بسنابل كبيرة وارتفاع محصول الحبوب وقوة نمو الأشطاء ومقاومة مرض الصدأ المخطط Stripe rust والبياض الدقيقي Powdery mildew وقصر الساق ومقاومة الرقاد (Insti-tute of genetics, China, 1977b).

(ج) الصنف (Danyu No.-1) من التبغ متفوق بجدارة على آباءه فى المحصول ومقاومة الأمراض. واستغرق ٣ سنوات من زراعة حبوب لقاح الجيل الأول الهجين حتى تم توزيعه على المزارعين (Institute of Tobacco, Shantung, China, 1974a).

٤- رفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية

تحتوى النباتات الأحادية على طاقم واحد من الكروموسومات، لذلك فإنها ثابتة وراثيا أى إن صفاتها السائدة تظل سائدة والمتنحية تظل متنحية، والتعبير الوراثى للصفات الوراثية شديد التباين. فمثلا تهجين الصنف Sonora-62 من القمح ذات الحبوب الحمراء مع الصنف Hongtu ذات الحبوب البيضاء كانت حبوب الجيل الأول (F₁) الناتجة حمراء اللون، لأن اللون الأحمر سائد على اللون الأبيض. وفى الجيل (F₂) تم الحصول على ٤١٣ نبات منهم ٣١٣ نبات حبوبه حمراء و ١٠٠ نبات حبوبه بيضاء، وكانت نسبة الانعزال (١ : ٣ : ١). وأوضحت هذه التجربة أن تربية النباتات الأحادية من الممكن أن ترفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية مع سهولة التخلص من الكايميرا (Institute of genetics 1974 , 1977b).

٥- إنتاج نباتات مذكرة

يمكن الحصول على نباتات مذكرة من الذرة والأسبرجس *Asparagus*. وتتميز نباتات الأسبرجس المذكرة على النباتات المؤنثة في إنتاج محصول المهاميز (الطرف القمي من الساق وهو الجزء الصالح للغذاء)، كما أن النباتات المذكرة تعمر أطول من النباتات المؤنثة (Wu, et al, 1980).

٦- سهولة استحداث الطفرات فى المزارع الأحادية

يعتمد نجاح تحسين أى محصول على مقدار التغييرات الوراثية المتوفرة مع انتخاب الأفضل من هذه التغييرات. ويعتبر الإشعاع والمطفرات الكيميائية وسائل ناجحة فى إحداث تباينات وراثية. وتعتبر مزارع الكالس الغنية بالسيتوكاينينات مصدرا هاما أيضا للحصول على تباينات وراثية. وتيسر زراعة الخلايا الأحادية دراسة وراثية الخلايا الجسمية، لأنه فى بعض الحالات قد تكون للطفرة الخلوية *Mutant cell lines* أهمية خاصة. والظفرات الناتجة من معظم الخلايا الأحادية ليس لها تعبير جينى لأنها طفرات متنحية. ويمكن استخدام خلايا الكالس أحادية العدد الكروموسومى فى دراسة تأثير بعض المطفرات مثل الإشعاع والكيمائيات، وقد تميزت فى ذلك الخلية الأحادية وحبوب اللقاح على المتوك، حيث تؤدى زراعة المتوك إلى إنتاج نباتات أحادية *Haploids* بجانب نباتات مختلفة التضاعف. وتستخدم مزارع الخلايا الأحادية ومزارع البروتوبلاست بنجاح فى عزل خلايا طافرة *Mutant cell lines* لأنواع نباتية عديدة مقاومة للضاد الحيوى ستربتومايسين وطفرات مقاومة لمركب *5-Brqmodeoxy- uridine* (Maliga, et al., 1973) وطفرات مقاومة لمركب *Me-thionine sulfoximine* وطفرات مقاومة لنيماتودا البطاطس وطفرات مقاومة لدرجات حرارة مختلفة. (Wenzel and Uhrig, 1981) كذلك تم الحصول على طفرات بتعرض نباتات تبغ حديثة العمر، ناتجة من زراعة المتوك، إلى جرعات من ١,٥ إلى ٣ كيلواراد من أشعة جاما. وأظهرت هذه الطفرات نسبة عالية من التغييرات الوراثية فى الشكل

والحجم ولون الزهرة وبعضها كانت كإيميرا مؤكدة. وفتجت طفرة أزهارها بيضاء بعد زراعة متوك نبات التبغ على بيئة مضاف إليها 10^{-6} مولر من مادة (Nitsch and Devreux and Sac- 1969) N-3-Nitrophenyl-N-Phenylurea Nitsch (1971) cardo بتعريض براعم زهرية للصنف Virginia Bright من التبغ *Nicotiana tabacum* إلى الجرعة واحد كيلوراد من أشعة X- γ . ثم زرعت المتوك بعد فصلها من الأزهار المشعة على بيئة غذائية وكانت النتيجة أن ظهرت تشوهات كروموسومية بنسبة 6٪. كذلك بتطبيق زراعة المتوك أمكن استحداث تغييرات وراثية في العديد من النباتات وانتخب سلالات منها وأصبحت بعد ذلك أصنافا تجارية. فمثلا في الصين استحدثت أصنافا جديدة من الأرز تسمى Tanfong-1 (Yin, et al., 1976) و Huagu-1 و Huagu-2 ومن القمح تسمى Lunghua-1 و Huapei-1 ومن التبغ تسمى Tanyu-1 (Hu, et al., 1978) و Tanyu-2 و Tanyu-3. وفي اليابان استحدثت صنف F-211 من التبغ مقاوم للذبول البكتيري من خلال زراعة المتوك.

إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح

أهمية زراعة حبوب اللقاح

- ١- يفضل زراعة حبوب اللقاح لتجنب الصعوبات الناتجة عن صلابة جدر متوك بعض الأنواع النباتية.
- ٢- النباتات الناتجة من حبوب اللقاح متجانسة بعد تضاعف كروموسوماتها بالكولشسين، ولا ينتج عنها انعزالات وراثية، وأن حوالي 90٪ من السلالات الناتجة هي سلالات ثنائية لها تعبير جيني متجانس. بينما النباتات الناتجة من زراعة المتوك تحتوي على نباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح ونباتات ثنائية مصدرها جدر المتك والأنسجة الضامة به.
- ٣- تعطى حبوب اللقاح جنينا ذكريا مباشرة. وهذا يسهل الدراسة وتتبع التغييرات الوراثية والفسولوجية والبيوكيميائية للأجنة الذكرية الناشئة مثل متابعة مراحل

تكوين الأجنة من حبوب اللقاح ابتداء من تكوين الخلية الفردية *Uninucleus*، ودراسة الامتصاص *Uptake* والتحور الوراثي *Transformation* وتأثير المطفرات مثل المطفرات الكيميائية والفيزيائية مثل أشعة جاما وأشعة X.

خطوات زراعة حبوب اللقاح *Pollen grains culture*

فصل حبوب اللقاح

١- بالنسبة للأزهار الكبيرة مثل أزهار الداتورا *Datura innoxia* والبيتونيا *Pe-tunia hybrida*، تفصل حبوب اللقاح من متوك طازجة. وتتم هذه الخطوة داخل كابينة معقمة.

٢- بالنسبة للأزهار الصغيرة، تعقم البراعم الزهرية أو النورات تعقيمًا سطحيًا. وتفصل المتوك وتوضع في الدورق الزجاجي الخاص بجهاز المجنس *Homogenizer* يحتوي على بيئة سائلة، ويفضل استخدام دوارق زجاجية نوع *Potter-Elvehjem*، وبذلك يمكن الحصول على حبوب لقاح معلقة في بيئة سائلة ومعها بقايا جدر المتك. ومن الضروري بالنسبة لنبات التبغ *Nicotiana tabacum* زراعة المتوك في بيئة سائلة لمدة ٤-٦ أيام قبل فصل حبوب اللقاح. ويرشح المحلول لفصل حبوب اللقاح عن بقايا جدر المتك، ويستخدم لذلك قماش نايلون مساميته دقيقة تسمح بمرور البيئة السائلة ومعها حبوب اللقاح فقط.

٣- توضع حبوب اللقاح المعلقة في بيئة سائلة في جهاز طرد مركزي يعمل بسرعة (10 x g) لمدة أربع دقائق. ثم يتم التخلص من معظم البيئة السائلة إلا القليل منها المحتوي على حبوب لقاح متجمعة. ثم يضاف إليها بيئة سائلة طازجة لغسل حبوب اللقاح. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات مع الحرص على إضافة بيئة جديدة طازجة كل مرة لضمان حسن غسل حبوب اللقاح.

٤- تنقل حبوب اللقاح مع كمية بسيطة من البيئة السائلة إلى دوارق الزراعة المعملية المحتوية على بيئة سائلة طازجة، وقد تستخدم بيئة صلبة طازجة بدلا

من البيئة السائلة. ويفضل في حالة الزراعة في بيئة سائلة استمرار تحريك دوارق الزراعة بصورة بطيئة لضمان انتشار حبوب اللقاح فيها، وإن كانت عملية تحريك دوارق الزراعة ليست ضرورية مع بعض النباتات مثل *Datura* والتبغ *Nicotiana*.

تحفيز حبوب اللقاح

١- ثبت أن غياب منظمات النمو من البيئة يؤدي إلى تحفيز حبوب اللقاح لتكوين أجنة، بينما إضافتها للبيئة يؤدي إلى تكوين قليل من الكالس بجانب الجنين.

٢- لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* تستخدم بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية المذكورة في بيئة (H) Bourgin and Nitsch, 1967 مضافا إليها الحديد لتحفيز حبوب اللقاح على النمو. ثم تنقل حبوب اللقاح بعد ذلك إلى بيئة طازجة مضافا إليها ٨٠٠ ملليجرام/ لتر جلوتامين + ١٠٠ ملليجرام/ لتر سيرين + ٥٠٠٠ ملليجرام/ لتر إينوسيتول + Myo-Inositol + أملاح العناصر المعدنية بقدر يعادل أربعة أمثال تركيزها الأساسى فى البيئة الغذائية (H) (جدول ١).

٣- يمكن دفع حبوب لقاح الداتورا *Datura innoxia* للنمو بزراعتها فى بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية + ٢٪ سكرورز ثم تحضن عند ٢٥ - ٣٠ م°، ويبدأ انقسام الخلايا بعد ٢٤ ساعة من الزراعة. وبعد ٧٢ - ٩٦ ساعة يزداد انقسام الخلايا ويبدأ تخصصها وتكوين أجنة ثم تنمو الأجنة إلى نباتات.

٤- يزداد نشاط تكوين الأجنة من حبوب اللقاح أو المتوك كثيرا برفع تركيز السكرورز و Myo-Inositol فى البيئة، حيث إن زيادة تركيز السكرورز من ٠,٠٨٨ إلى ٠,١٨ مولر من العوامل الهامة لخروج النباتات من حبوب اللقاح والمتوك وله تأثير جيد على النمو وينظم الضغط الأسموزى للبيئة.

٥- التركيزات المرتفعة من أيونات الأمونيوم Amonium توقف تكوين الكالس الناتج من حبوب لقاح الشعير والأرز. وتحتوى بيئة (N6) على نسبة منخفضة من الأمونيوم وزيادة أيونات النترات Nitrate . لذلك تعتبر بيئة (N6) هى أكثر البيئات

كفاءة بالمقارنة ببعض البيئات الأخرى المستخدمة في زراعة متوك الأرز والنجيليات الأخرى (Chu, et al., 1975) (جدول ٢ و ٣).

٦- يضاف أحيانا مستخلص درنات البطاطس إلى بيئة «Mille's medium» لزراعة متوك التبغ. واستحدثت بيئة «Potato II medium» تحتوى على ١٠٪ مستخلص بطاطس + ٥٠٪ من قوة العناصر الكبرى للبيئة «WH» + أملاح حديد + ثايمين Thiamine بالتركيز المذكور في بيئة (MS). وزيادة نسبة الثايمين في هذه البيئة يشجع إنتاج الكالس (Institute of Genetics, 1977b) (جدول ٤).

جدول (١) المكونات الأساسية لبيئات غذائية خاصة بزراعة المتوك وحبوب اللقاح (ملليجرام/لتر)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
KNO ₃	2830	1000	950	950	2500
NH ₂ NO ₃	-	100	825	720	-
(NH ₂) ₂ SO ₄	463	-	-	-	134
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	347	-	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	-	220	166	750
KCl	-	65	-	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	35	185	185	250
KH ₂ PO ₄	400	300	85	63	-
NaHPO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	150
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	4.4	11.2	25	10
H ₂ PO ₄	1.6	1.6	3.1	10	3

تابع جدول (١)

المكونات	(MM) Modified Miller Chu, 1975	(M) Miller 1963	(0.5 MS) Murashige & Skooge 1962	(H) Bourgin & Nitsch, 1967	(K) Keller et al., 1975
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.5	1.5	4.3	10	2
KI	0.8	0.8	0.4	-	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	-	-	0.13	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	-	0.013	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	0.013	-	0.025
FeSO ₄ · H ₂ O	27.8	-	14	-	-
Na ₂ EDTA	37.5	-	19	37.5	-
NaFeEDTA	-	32	-	-	-
Sequestrene	-	-	-	Fe 330	40
Thiamine- HCL	1.0	0.1	0.05	0.5	10
Pyridoxin- HCL	0.5	0.1	0.25	0.5	1
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.25	5.0	1
Folic acid	-	-	-	0.5	-
Biotin	-	-	-	0.05	-
Glycine	2	2	1	2	-
Glutamine	-	-	-	-	800
m- Inositol	-	-	50	100	100
Sucrose x 10 ³	50	30	30	20	100
pH	5.8	6	5.5	5.5	5.8

جدول (٢) محتوى بيئة (N6) من العناصر والحديد والسكروز والأحماض
الأمينية لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات (Chu, 1978)

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
$(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$	3.5 mM	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 mM (Solution)
KNO_3	0.03 M	Glycine	0.027 mM
KH_2PO_4	3.0 mM	HCl-Thiamine	3.0 μM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75 mM	HCl-Pyridoxine	2.4 μM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.13 mM	Nicotinic acid	4.1 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02 mM	Sucrose	0.15 M
$\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5.2 μM	Agar	0.1 – 1.0%
H_3BO_3	0.025 mM	PH	5.6
KI	4.8 μM		

□□□

جدول (٣) محتوى بيئة (N6) من الأكسينات والسيبتوكايفينات
لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات

إضافات مفيدة (μ M)	إضافات هامية (M)	السكروز (M)	مرحلة نمو حبوب اللقاح	الهدف من الزراعة
5.4-11.0 NAA, 300-500 mg/l*	9.0 2,4-D	0.15	-Middle or late uninuclear	<u>Callus induction:</u> -Oryza sativa
*1.4-2.3 KIN, 500 mg/l LH, 0.55 mM myo- inositol, 0.4mg/l Vit. B,	9.0 2,4-D	0.23- 0.29	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
* 2.3 KIN, 500 mg/l CH or LH, 0.5% active carbon	9.0 2,4-D	0.35- 0.44	-Middle uni- nuclear	-Zea mays
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN,	0	0.15	-Middle or late uninuclear	<u>Shoot from callus:</u> -Oryza sativa
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
*2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Zea mays

تابع جدول (٣)

إضافات مفيدة (μ M)	إضافات هامة (M)	السكروز (M)	مرحلة نمو حبوب اللقاح	الهدف من الزراعة
--	0	0.088	-Middle or late uninuclear	<u>Pollen embryo and plantlet</u> -Oryza sativa
--	0	0.23	-Middle uni- nuclear	-Triticum, triticale, Secale
--	0	0.35	-Middle uni- Nuclear	-Zea mays

c.f. Chu, 1978

* LH = Lactalbumin hydrolysate

جدول (٤) مكونات بيعة البطاطس Potato II medium لزراعة متوك القمح

المكونات	التركيز	المكونات	التركيز
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.75 mM	FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 mM (Solution)
KNO ₃	9.9 mM	Aqueous potato medium	10%
KH ₂ PO ₄		Glycine	-
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5 mM	Na ₂ EDTA . 2H ₂ O	0.11 mM
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.51 mM	Thiamine-HCl	3.0 μ M
MnSO ₄ .4H ₂ O	-	Pyridoxine-HCl	-
ZnSO ₄ .H ₂ O	-	Nicotinic acid	-
H ₃ BO ₃	-	Sucrose	0.26 M
KI	-	Agar	0.1 - 1.0%
KCl	-	PH	5.8
	0.5 mM		

c.f. Chu, et al., 1975

طرق زراعة حبوب اللقاح

تزرع حبوب اللقاح مباشرة فى أطباق بتري مثل زراعة الخلايا الفردية ويمكن زراعتها معلقة فى بيئة سائلة. وتستخدم إحدى الطرق الآتية لزراعة حبوب اللقاح وتكوين أجنة ذكورية Androgenesis.

١- طريقة الزراعة الحاضنة Nurse culture technique

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح نبات الطماطم *Lycopersicon escul-entum*. حيث توضع المتوك على سطح البيئة الغذائية الأساسية الصلبة فى أطباق بتري ثم تغطى بقرص صغير من ورق الترشيح. ثم تضاف قطرات من البيئة الغذائية المعلق بها حبوب اللقاح على أقراص ورق الترشيح بمعدل ١٠ حبوب لكل قرص. ثم تحضن البيئة ومحتوياتها عند ٢٥م مع وجود ضوء مستمر. وبعد ٢٨ يوما تقريبا تظهر عناقيد من خلايا خضراء بنسبة ٦٠٪ من حبوب اللقاح المنزرعة، وهى مستعمرات خلوية أحادية العدد الكروموسومى. وثبت من هذه التجربة أنه لا يمكن إنتاج الخلايا الخضراء فى حالة زراعة حبوب اللقاح بدون وجود المتوك فى البيئة الغذائية. وبالرغم من نجاح هذه الطريقة فى زراعة حبوب لقاح نباتات الطماطم، إلا إن تطبيقاتها العملية ما زالت قاصرة على بعض الأنواع النباتية (Sharp, et al., 1972).

٢- طريقة القطرة المعلقة Hanging drop

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح الكرنب *Brassica oleracea* وحبوب لقاح الهجين "B. oleracea. x B. alboglabra" (Kameya and Hinata 1970) ومضمونها:

- توضع قطرة من البيئة الغذائية مضاف إليها ماء جوز الهند، تحتوى القطرة على ٥٠ - ٨٠ حبة لقاح، على غطاء شريحة زجاجية Cover ثم يوضع هذا الغطاء مقلوبا على شريحة زجاجية مقعرة.

- يفضل تثبيت عمود صغير من شمع البرافين وسط الشريحة المقعرة، ثم يثبت غطاء الشريحة الحامل للقطرة المعلقة مقلوبا على الشريحة المقعرة، ثم تثبت الشريحة المقعرة مع غطاء الشريحة بشمع البرافين وترج الشريحة بحركة دائرية لتحسين التهوية. وبعد أربعة أسابيع تتكون عناقيد من الخلايا المنبثقة من حبوب اللقاح.

٣- طريقة نيتش Nitsch, 1974; 1977 method

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* وتشمل الخطوات التالية:

- تفصل المتوك وتزرع في بيئة سائلة تحت ظروف معقمة. ثم تحضن لمدة أربعة أيام عند ٢٧°م، بعدها تستخلص حبوب اللقاح من المتوك بواسطة جهاز المجنس Homogenizer، وتنقل إلى بيئة سائلة تحتوى على KNO_3 (٨,٩ مليمول) + NH_4NO_3 (٨,٩ مليمول) + $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (٠,٧٥ مليمول) + $CaCl_2$ (١,٤٢ مليمول) + KH_2PO_4 (٠,٥ مليمول) + $FeEDTA$ (١٠٠ مليمول) + Glutamine + Zn (٥,٥ مليمول) + Serine (٠,٩٥ مليمول) + Myoinositol (٠,٠٣ مول) + atin (٠,٠٤٦ ميكرومول) + Indole Acetic Acid (IAA) (٠,٥٧ ميكرومول) + Sucrose (٠,٢٣ - ٠,٠٦ مول).

- يرشح معلق الخلايا لفصل البيئة السائلة المحتوية على حبوب اللقاح والتخلص من بقايا جدر المتك، ثم يعامل الراشح المحتوى على حبوب اللقاح بالطرد المركزي لتكوين تجمعات عنقودية من حبوب اللقاح. ثم تفصل حبوب اللقاح وتغسل مرتين ببيئة سائلة باستخدام جهاز الطرد المركزي.

- تنقل حبوب اللقاح إلى بيئة سائلة طازجة لتكوين معلق خلايا كثافته حوالى ٥٠٠٠ حبة لقاح/ مليلتر.

- توزع أحجام متساوية (٢ مليلتر) من معلق الخلايا فى طبقات رقيقة فى أطباق بتري صغيرة أو دوارق سعة ٢٥ مليلتر. وتستخدم طريقة Bajaj, 1978a التالية إذا كان حجم معلق حبوب اللقاح صغيرا جدا.

٤- طريقة باجاج (1978a) method Bajaj

- توضع قطرة من السليكون فى وسط طبق بترى معقم من البلاستيك قطره سنتيمتر. ثم يوضع غطاء شريحة مقاس ٢٢ X ٢٢ ملليمتر بحذر فوق قطرة السليكون.
- توضع قطرة ٢٥٠ - ٥٠٠ ميكرو لتر من معلق حبوب اللقاح فوق غطاء الشريحة باستخدام ماصة ميكرومترية. وتغطى الأطباق بواسطة غشاء Parafilm - M، ثم تحضن لمدة ٤ - ٦ أيام تحت ضوء ضعيف (٥٠٠ لكس).
- تحضن الأطباق عند ١٤ ساعة ضوئية يوميا وشدة ضوئية ٢٠٠٠ لكس وحرارة ٢٨°م وتبقى حتى النهاية.

عوامل إنجاح زراعة حبوب اللقاح

١- غسل حبوب لقاح نباتات التبغ والداتورا جيدا بعد فصلها من المتوك خطوة هامة للتخلص من المواد المانعة لإنباتها، وتعريضها للبرودة قد يؤدي إلى انقسام ميتوزى Mitosis طبيعى وتكوين أنوية خضرية وتناسلية طبيعية وزيادة حيويتها، وقد تسبب تشوهات فى الانقسام الميتوزى الأول وتثبيط مراحل تطور الجاميطات واختلاف فى إنتاج الأجنة الذكرية. ولذلك يوصى بعدم تعريض حبوب اللقاح للبرودة (Bajaj, 1978).

٢- تتكون الأجنة الذكرية من حبوب اللقاح المفصولة من نبات التبغ عند أية مرحلة من مراحل نمو حبوب اللقاح ابتداء من مرحلة وحيدة النواة Uninucleus والانقسام الميتوزى الأول First mitosis حتى الطور الأخير من تكوين النواتين Late binucleus. وتخفض نسبة النجاح بدرجة كبيرة كلما تقدمت حبوب اللقاح فى العمر. وزراعة حبوب اللقاح وهى فى مرحلة متوسطة أو متأخرة من النمو وعندها تحتوى على نوية واحدة Mid- or late- Uninucleus- microspores تؤدى إلى الحصول على أفضل عائد من النباتات الأحادية. وحيث إن المتك الواحد يحتوى على جميع أطوار النمو المختلفة لحبوب اللقاح، ابتداء من مرحلة الخلايا الأمية

المنشئة لحبوب اللقاح حتى مرحلة حبوب اللقاح كاملة النضج ، فإن ذلك يؤكد إلى وجود تباين شديد في النباتات الناتجة من زراعة المتك. وقد تأكد ذلك بزراعة متوك القمح ومحاصيل أخرى (He and Ouyang, 1980) (جدول ٥) .

جدول (٥) طور نمو حبوب اللقاح المناسب للزراعة العملية

Species	Pollen grain stage	References
- <i>Hordeum vulgare</i>	-Uninucleate or late uninucleate	-Clapham, 1971, Zhou & Yang, 1980
- <i>Oryza sativa</i> spp.	-Mid or late uninucleate -Uninucleate or late unicolate	-Guha et al., 1970, Wang et al., 1973 -Ghua-Mukherjee, 1973
- <i>Secale cereal</i>	-Late uninucleate	-Sun, 1978
- <i>Triticale</i>	-Uninucleate	-Sun, et al., 1973
- <i>Triticum aestivum</i>	-Mid- or late uninucleate	-Ouyang, et al., 1973, Pan & Gao, 1978
- <i>T. aestivum</i> x <i>Agropyron glaucum</i>	-Late uninucleate	-Wang et al., 1973

٢- زراعة المتوك Anther culture

نباتات يمكن إكثارها بزراعة المتوك

تتميز طرق الزراعة العملية للمتوك بأنها بسيطة نسبياً وسريعة ولها كفاءة عالية في إنتاج نباتات أحادية. وأمكن إنتاج نباتات أحادية بزراعة متوك أو نباتات أحادية أو أنسجة أحادية لنباتات عديدة مثل:

Brassica campestris; *Brassica oleracea*; *Brassica pekinensis*; *Brassica chinensis*;

Lycopersicon spp.; *Lycopersicon esculentum*; *Datura innoxia*; *Datura* spp.;

Luffa echinata; Luffa cylindrica; Capsicum annum; Capsicum frutescens; Citrus limon; Citrus medica; Festuca arundinacea; Festuca pratensis; Nicotiana spp.; Populus spp.; Arachis spp.; Hyoscyamus spp.; Freesia spp.; Glycine max; Asparagus officinalis; Beta vulgaris; Fragraria virginiana; Sorghum vulgare; Saccharum sinensis; Triticum; Triticum aestivum; «T.aestivum x Agropyron glaucum»; Vicia faba; Vitis vinifera; Zea mays. Arabidopsis thaliana; Anemone spp.; Agropyron repens; Atropa belladonna; Cassia fistula; Coffea arabica; Digitalis purpurea; Gladiolus; Hordeum vulgare; Lilium spp.; Linum usitatissimum; Lotus corniculatus;

فصل زراعة متوك نبات التبغ

نبات التبغ من الأمثلة النموذجية لإنتاج نباتات أحادية. وتنتخب المتوك غير الناصجة لضمان احتوائها على حيوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus وهي في مرحلة ما قبل الانقسام الميتوزي الأول (Zhou and Yang, 1980). ويمكن إجراء الآتي لإنتاج أجنة ذكورية Androgenesis.

١- تعقم البراعم الزهرية في محلول هيبوكلوريت صوديوم بتركز ١٪ (وزن/حجم)، أو محلول كلوركس تجارى Clorox بتركيز ٥٪ (حجم/حجم). ثم تغسل البراعم مرتين بماء مقطر معقم مرتين. وإذا فصلت البراعم الزهرية من نباتات نامية داخل صوبة محمية فلا تحتاج إلى تعقيم.

٢- تفصل المتوك بإحداث شق من جانب واحد من البرعم الزهري. ثم يضغط على الأسدية برفق لفصلها. ثم تفصل المتوك بحذر تام حتى لا يحدث أى ضرر لها، وتستبعد المتوك التي حدث لها ضرر أثناء فصلها لأنها تعيل عادة إلى تكوين كالس. ثم تجمع في طبق بترى معقم وتزرع مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- تزرع المتوك بمعدل ٥ - ١٠ متوك في الدورف المخروطى مع مراعاة كثافة الزراعة المناسبة.

الاحتياطات اللازمة لفصل وزراعة المتوك

- ١- تعتبر البراعم الزهرية المقفولة بعد تعقيمها سطحيا مصدرا جيدا للمتوك. حيث تزال أوراق الكأس والتويج بحذر، مع الحرص بعدم وصول مواد التعقيم إلى المتوك لتفادي الضرر الذى قد يحدث. وفي نباتات العائلة النجيلية مثل القمح والشعير تعقم السنبله وهى مازالت متصلة بحامل السنبله ثم تفصل السنبله بعد تعقيمها.
- ٢- يفصل المتك تحت ميكروسكوب إذا كان البرعم الزهرى صغيرا مثل نباتات *Asparagus* و *Brassica*. ويتم ذلك بإزالة غلاف الزهرة *Perianth* فقط، والإبقاء على باقى أجزاء البرعم على اتصال مع الأسدية. ولا يؤثر وجود بقايا أجزاء الزهرة فى البيئة الغذائية على طبيعة نمو حبوب اللقاح الموجودة داخل المتوك.
- ٣- فى حالة الأزهار والمتوك كبيرة الحجم تزال الأسدية *Stamens* بأكملها مع الخيط الحامل لها، ثم توضع فى وضع أفقى ويفصل المتك من الخيط *Filament* بدقة وحرص. حيث لا تنتقل المواد الغذائية من البيئة الغذائية إلى المتك خلال الخيط وقد يسبب وجوده منع نمو حبوب اللقاح.
- ٤- تزرع المتوك بعد فصلها مباشرة على بيئة مناسبة صلبة أو سائلة، بحيث يكون هناك اتصال مباشر بينها وبين البيئة الغذائية بما يضمن وصول المواد الغذائية إلى حبوب اللقاح. وزراعة المتوك فى بيئة سائلة يجعلها تطفو على سطحها، لذلك يستلزم تثبيتها على جسر من ورق الترشيح.
- ٥- بالنسبة للأزهار الكبيرة يمكن الحصول على كثافة جيدة من حبوب اللقاح بزراعة متك واحد/ مليلتر بيئة سائلة، حيث تعطى هذه الكثافة حوالى 5×10^4 حبة لقاح/ مليلتر بيئة فى نبات *Datura innoxia* و 4×10^4 حبة لقاح/ مليلتر بيئة فى نبات *Nicotiana tabacum*. ويمكن زيادة عدد المتوك/ مليلتر فى البيئة السائلة بالنسبة للبراعم الزهرية الصغيرة للحصول على نفس الكثافة تقريبا.
- ٦- تنبت حبوب اللقاح بعد ٣ - ٤ أسابيع من زراعة المتوك منتجة نبيتات أحادية لا تشابه النباتات الثنائية المأخوذة منها. وقد ينتج المتك الواحد أعدادا

كبيرة من النباتات، ويفضل فصلها عن بعضها مباشرة بعد تفتح المتك. وفصل النباتات في هذه المرحلة المبكرة يساعد على فصلها ونقلها بسهولة إلى بيئة طازجة جديدة، بينما يؤدي التأخير في فصل النباتات إلى تداخل وتشايك جذورها داخل المتك المتفتح مما يؤدي إلى تكوين كالس وتكوين أعداد أخرى من الأفرع.

٧- تنقل النباتات ذات المجموع الجذري الجيد إلى عبوات تحتوى على بيت موس ورمل. ويجب إزالة آثار الأجار جيدا من الجذور قبل النقل. ثم تنقل النباتات للصوبة لتبقى تحت الري الرزازي (الضبابي) Mist irrigation لمدة عشرة أيام لإتاحة الفرصة لتكوين مجموع جذري يقوم بوظيفته جيدا.

البيئة الغذائية المناسبة لزراعة المتوك

تستخدم بنجاح بيئات White, 1963, Murashige and skoog, 1962 Nitsch وNitschm 1969, وغيرها من البيئات المشتقة منهم فى الزراعة المعملية لمتوك الدخان وقد أدخل عليها بعض التطويرات. ويعتبر الحديد من العناصر الهامة المضافة لبيئة المتوك. وتصنف الأنواع النباتية كالتالى:

١- أنواع نباتية لا تحتاج منظمات نمو

تعتبر بيئة Murashige and Skoog, 1962 (MS) والإضافات التى أحدثها Nitsch, (1967) أساسية لزراعة متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات. وإضافة الفيتامينات والحديد والسكرورز لهم أهمية فى تحفيز نمو وتكوين النباتات من حبوب اللقاح أو الكالس. ولا تحتاج هذه المجموعة إلى منظمات نمو. وتتميز حبوب اللقاح فيها أنها ثنائية الخلية Bicellular. وتضم هذه المجموعة الأنواع النباتية الآتية:

Datura innoxia ; *Hyoscyamus niger* ; *Petonia hybrida*; *Nicotiana tabacum*;
N. sylvestris ; *N. paniculata* ; *N. knightiana*.

وإضافة الفحم النباتى النشط تحت البيئة الصلبة فى وعاء زراعة المتوك يساعد على تكوين كاس جيد وإنتاج أعداد كبيرة من النباتات لقدرتة على امتصاص المركبات المثبطة للنمو والمواد الضارة التى يفرزها جدار المتك (Nitsch, 1972, 1974). والتركيز الأمثل للسكروز هو ٠,٢٦ مولر فى بيئة متوك القمح و٠,٣٥ مولر لمتوك الذرة. ويفضل زيادة السكروز فى بيئة متوك النجيليات بوجه عام من ٢ - ٤٪ إلى ٨ - ١٢٪، وزيادة السكروز فى بيئة متوك نباتات Barley و Rapeseed و Triticale من ٠,١٨ إلى ٠,٣٥ مولر. (Chen and Li, 1978) ويبين جداول (٢ و ٣) البيئات المناسبة لزراعة حبوب اللقاح ومتوك النجيليات.

٢- أنواع نباتية تحتاج إلى منظمات نمو

تضاف منظمات النمو إلى بيئات متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات، وتختلف احتياجاتها باختلاف النوع والصفة النباتى. وتحتوى هذه الأنواع على حبوب لقاح ثنائية Bicellular أو ثلاثية Tricellular الخلايا، مثل الأنواع التابعة للأجناس *Triticale; Triticum; Oryza; Hordeum*. ويتكون الكالس إذا زرع متوك هذه النباتات. وقد تنتج أجنة تنمو وتكون نباتات مثل *Brassica campestris* و *Asparagus officinalis*. والأوكسينات هى أهم الهرمونات المؤثرة فى طبيعة نمو المتوك، وحاجتها من السيتوكاينين ومنظمات النمو الأخرى أقل كثيرا من حاجتها للأوكسينات. ومن الأوكسينات مركبات عديدة أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA). 3-Indole Butaric Acid (IBA). Naphthalene Acetic Acid (NAA). 2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T). 2,4-Dichlorophenoxy

Acetic Acid (2,4-D). 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA).

4-Amino- 3,5,6-Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ومن السيتوكاينينات مركبات عديدة أهمها:

6-Benzyl Amino Purine (BAP). 6-Benzyl Adenine (BA).

Isopentenyl Adenine (IPA). 6-y-y-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip).

5-(4-Hydroxy-3-Methyl-trans-2-Butenylamino) Purine (Zeatin).

6-Furfuryl - Amino Purine (Kinetin = KIN).

والأنواع النباتية التي تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثلاثية الخلايا Tricellular تحتاج إلى إضافة سكروز بنسبة ٥ - ١٥٪. بينما الأنواع التي تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثنائية الخلايا Bicellular فيضاف السكروز بنسبة ٢ - ٥٪. والسكروز له تأثير منظم للضغط الأسموزى فى البيئة الغذائية. والتركيز العالى للسكروز ضرورى جدا لتحفيز متوك نبات *Brassica campestris* للنمو، حيث يضاف بتركيز ١٠٪ للبيئة + ٠,١ ملليجرام/لتر من كل من NAA 2,4-D. ويضاف السكروز بتركيز ١٢٪ إلى بيئة متوك نبات الشعير *Hordeum vulgare*، وبتركيز ٦ - ٩٪ إلى بيئة الأجناس *Triticum; Tritical; Oryza* مضاف إليه ٢ ملليجرام/لتر 2,4-D، وبتركيز ١٢٪ لمتوك الذرة *Zea mays* مضاف إليه ٢ ملليجرام/لتر من Kinetin و 2,4-D. وتعتبر المكونات الأساسية لبيئة (MS) هى الأفضل للأجناس *Zea* و *Triticum* و *D*. وليبيئة Miller (M) قبول واسع فى زراعة متوك الأرز ومتوك نباتات أخرى دون غيرها من البيئات. وقد حدثت بعض التغييرات على بيئة Miller (M) مثل زيادة تركيز النترات وتخفيض الأمونيوم، وعرفت هذه البيئة بعد تحديثها بالرمز (MM)، وتستخدم خاصة لزراعة متوك نبات *Brassica campestris* ويضاف مستخلص الخميرة وماء جوز الهند ومستخلص البطاطا والأحماض الأمينية -Gluta minc و Asparagine إلى مكونات البيئة (MM) لزيادة معدل نمو الكالس من حبوب اللقاح وتكشفه إلى أجنة. ويتم إنتاج النباتات من الكالس بإضافة تركيزات مختلفة من الهرمونات، وتخفيض السكروز إلى ٢ - ٣٪. ويتقدم عمر الكالس تنخفض قدرته بشدة على إنتاج نباتات كاملة. كذلك يمكن تغيير نوع وتركيز أملاح العناصر الغذائية فى البيئة. ويفضل قبل نقل النباتات الصغيرة من البيئة الغذائية إلى التربة أن تسبقه الزراعة فى بيئة سائلة ضعيفة تحتوى على أملاح العناصر الغذائية المذكورة فى بيئة White, 1963 + سكر مختزل بتركيز ٠,٥ - ١٪.

تحضين المتوك وحبوب اللقاح

تحصن المتوك وحبوب اللقاح بعد زراعتها عند ٢٤-٢٨ م. وارتفاع الحرارة عن ٣٠ م تسبب اختلافا كبيرا فى إنتاج ونمو الكالس وعدد النباتات الناتجة منه. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة لنباتات القمح ولقت الزيت. وأن النباتات العملية الناتجة من متوك القمح المفصلة من سنبله الفرع الرئيسى كانت أكثر من سنابل الأفرع الجانبية (Hu, et al, 1982). وتعريض متوك القمح والأرز ومحاصيل نجيلية أخرى لحرارة منخفضة ١-٤ م لمدة ٤٨ ساعة قبل زراعتها يؤدى إلى زيادة تكوين الكالس وزيادة الاختلافات (Institute of Genetics, 1977a) (جدول ٦). بينما لا يوجد ما يشير إلى أهمية الضوء فى المرحلة الأولى من زراعة حبوب اللقاح ومتوك التبغ. ويفضل تعريض حبوب اللقاح والمتوك لفترة ظلام قصيرة جدا يتبعها ضوء مستمر لمدة ١٤ ساعة يوميا شدته ٢٠٠٠ لكس لتشجيع نمو النباتات من المتوك وزيادة عددها. بينما جاء فى مضمون بعض الأبحاث على نباتات *Datura in-* و *Hyoscyamus niger* أن ١٦ ساعة ضوء فلوروسنت شدته ١٥٠٠ لكس وحرارة ٢٨ م يعقبها ٨ ساعات ظلام وحرارة ٢٠ م أعطت أفضل عدد من النباتات. كما أن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون والإيثيلين داخل أوانى الزراعة يؤثر تأثيرا ضارا على نمو حبوب اللقاح وتكوين الأجنة. لذلك يضاف للبيئة ايدروكسيد بوتاسيوم لقدرته على امتصاص ثانى أكسيد الكربون ومركب Mercuric perchlo- rate لقدرته على امتصاص الإيثيلين وإضافة ٨-٤٠ ملليجرام/ لتر من 2-Chlo- roethyl-phosphonic acid (مادة منتجة للإيثيلين) للبيئة تؤدى إلى تضاعف استجابة متوك الأرز *Oryza sativa* للنمو. ومضمون ذلك أن حبوب اللقاح والمتوك تختلف باختلاف نوع النبات فى احتياجها من الظروف الهوائية والغازية لتحفيز نمو وتكوين الأجنة وتكشفها.

جدول (٦) درجات الحرارة والمدة المناسبة لإنبات متوك بعض النجيليات

Species	(°C)	Duration
Hordeum vulgare	3	48 h.
Oryza sativa	10	48 h. or 4 - 7 days
Secale cereal	6	3- 15 days
Triticale	3- 5	72 hr.
Triticum aestivum	3- 5	48 hr.

منشأ الأجنة الأحادية Haploid embryogenesis

١- أجنة ذكورية المنشأ والتكوين Androgenesis

هي أجنة أحادية العدد الكروموسومي تنشأ في المعمل من حبوب لقاح (جاميطات ذكورية) Microspores أو متوك بعد زراعتها في المعمل. وينتج عنها نباتات أحادية. وتختلف هذه النباتات وراثيا وظاهريا عن نبات الأم الذي فصل منه حبوب اللقاح والمتوك. وتنشأ الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

(١) منشأ أجنة ذكورية من حبوب اللقاح Pollen embryogenesis

- تكوين مباشر للأجنة الذكورية Direct embryogenesis حيث تنتج أجنة أحادية العدد الكروموسومي مباشرة من حبوب اللقاح بدون الدخول في مرحلة تكوين الكالس. وبعد ٣-٤ أسابيع تظهر الأجنة في صورة نموات أنبوبية تنمو وتتطور إلى نباتات أحادية العدد الكروموسومي.

- منشأ غير مباشر للأجنة Indirect embryogenesis حيث يتكون كالس أحادي العدد الكروموسومي من حبوب اللقاح. ثم يتكشف الكالس إلى أجنة أحادية ينتج عنه نباتات أحادية.

(ب) منشأ أجنة ذكورية من المتوك Anther embryogenesis

حيث ينتج عن زراعة المتوك نباتات مختلفة المستوى فى التضاعف الكروموسومى. فالنباتات الناتجة من حبوب اللقاح تكون أحادية العدد الكروموسومى، والنباتات الناتجة من خلايا جدار المتك والخلايا الضامة تكون ثنائية العدد الكروموسومى لأنها خلايا جسمية. وتختلف الفترة اللازمة لخروج النباتات من المتك باختلاف الأنواع النباتية. فتحتاج متوك الدخان من ٣ إلى ٥ أسابيع، وتحتاج متوك نبات الأتروبا والأرز إلى ٨ أسابيع. والمتوك المحتوية على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus والمزروعة على بيئة (MS) يتحول لونها إلى اللون البنى خلال أسبوعين بدون ظهور أى نمو. وبعد أسبوعين آخرين تظهر نوات أنبوبية هى عبارة عن أجنة مصدرها حبوب اللقاح فى المتك، حيث تتطور بعد ذلك لتصبح نباتات أحادية العدد الكروموسومى Pollen embryogenesis. وقد يظهر عند الطرف القاعدى للمتك خلايا كالس تنمو حتى تغطى كل المتك وقد تنتج نباتات من الكالس ثنائية العدد الكروموسومى لأن مصدرها خلايا جسمية. وبعد ٦ أسابيع تقريبا يمكن نقل النباتات إلى التربة.

٢- أجنة أنثوية المنشأ والتكوين Genogenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ من بيضة غير مخصبة، وينتج عنها نباتات أحادية مختلفة وراثيا ومظهريا عن النبات الأم المفصول منه البيضة. وتنشأ هذه الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

- نشوء الأجنة البكرية Parthenogenesis

قد تتكون نباتات أحادية تلقائيا بنسبة لا تزيد عن ٠.١٪ بدون تدخل الإنسان. وهى من الحالات النادرة التى تحدث فى بعض النباتات دون غيرها. ومصدر إنتاج الأجنة البكرية هو المبيض. فقد ينشط المبيض وينمو مكونا ثمرة تحتوى على بذور بدون اخصاب. وهذه البذور أحادية العدد الكروموسومى، وبزراعة هذه البذور فى

المعمل تنتج نباتات أحادية ضعيفة النمو صغيرة الحجم عقيمة وغير قادرة على الانقسام الاختزالي وتكوين خلايا تناسلية، لأنها تحتوى على كروموسومات غير متشابهة ولا تستطيع أن تكون أزواجا كروموسومية Bivalents، وهذه من خصائص المجموعة الكروموسومية الأحادية. وتتكون الأجنة الأحادية ذاتيا في الطبيعة من خلال التكوين البكرى، أى بدون إخصاب، نتيجة لزيادة محتواها من هرمونات النمو وقد يحدث التلقيح وتنبت الأنبوبة اللقاحية من حبة اللقاح ولكنها تكون غير قادرة على استكمال نموها والنفاذ إلى المبيض وإتمام الإخصاب. ويكون دور حبوب اللقاح فى هذه الحالة هو تنبيه المبيض فقط لإفراز هرمونات النمو.

- نشوء الأجنة من البيضة

هى أجنة تنشأ من البيضة غير المخصبة (الجاميطة المؤنثة) بعد فصلها وزراعتها فى المعمل. وهى أجنة أحادية العدد الكروموسومى ينتج عنها نباتات أحادية لها نفس مواصفات الأجنة البكرية.

بعض الممارسات الوراثية لإنتاج أجنة أحادية

1- طريقة إقصاء الكروموسومات Chromosomes elimination

تستخدم هذه الطريقة لإنتاج أجنة شعير أحادية العدد الكروموسومى Haploid بكفاءة عالية. وتعتمد هذه الطريقة على إدخال نوع الشعير *Hordeum bulbosum* فى تهجين مع النوع *Hordeum vulgare* لإنتاج هجين *"H. bulbosum x Hordeum vulgare"*. فتنمو أجنة الهجين لمدة 10 - 14 يوما من الإخصاب ثم تموت بعد اختفاء كروموسومات النوع *H. bulbosum*. فإذا فصلت أجنة الهجين مبكرا بعد 10 أيام من الإخصاب قبل موتها ثم زرعت على بيئة (B5) خالية من الأكسجين 2,4-D فإنها تستمر فى النمو وتكون نباتات معظمها أحادية العدد الكروموسومى ($n=7$)

Monoploid، تحتوي على كروموسومات النوع *Hordeum vulgare* فقط. وبمعاملة النباتات بالكولشيسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة من النوع *H. vulgare*. وتحتوى الخلية الجسمية للشعير ثنائية العدد الكروموسومى Diploid على ١٤ كروموسوما ($2n = 14$). والجاميطة المذكرة والمؤنثة هي خلايا أحادية Haploid تحتوى على نصف عدد الكروموسومات ($n = 7$). وباندماج الجاميطتين عن طريق التلقيح والإخصاب ينتج الهجين «*H. bulbosum* x *H. vulgare*» الذى تحتوى أجنته على ١٤ كروموسوما، أى أجنة ثنائية العدد الكروموسومى ($2n = 14$) وخاصة إقصاء Elimination كروموسومات النوع *H. bulbosum* بعد التهجين هي صفة وراثية بصرف النظر عن استخدامه كأب أو أم فى التهجين أو إذا كان ثنائيا Diploid أو رباعيا Tetraploid.

كذلك تم الحصول على نباتات قمح أحادى بتهجين قمح سداسى *Triticum aestivum* ($2n = 6X = 42$) مع شعير ثنائى ($2n = 2X = 14$) *H. bulbosum*. وقد حدث إقصاء (تخلص ذاتى) لكروموسومات النوع *H. bulbosum* وتكونت أجنة أحادية من القمح *T. aestivum* ($n = 3X = 21$). وقد تميزت هذه الطريقة عن طريقة زراعة المتوك فى إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى من أى صنف تجارى من الشعير. ومعدل إنتاج النباتات الأحادية مرتفع جدا. كذلك يمكن الاستفادة من هذه الطريقة فى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة Dihaploids من نباتات البطاطس *Solanum tuberosum* الرباعية Tetraploids بواسطة تهجين النوع *S. phureja* الثنائى. بحبوب لقاح من النوع *S. phureja* الثنائى.

٢- زراعة الإندوسبرم Endosperm culture

تم الحصول على كالس وأجنة ونباتات ثلاثية التضاعف الكروموسومى Triploids بزراعة نواة الإندوسبرم المفصلة من الكيس الجنينى للموالح ($3n = 27$) بعد حوالى شهرين من الإخصاب. وقد تحقق ذلك بزراعة الإندوسبرم المفصول من الموالح *Citrus grandis* L. Osbeck صنف Bei Pei Pummels والنوع *C. sinensis* Osbeck صنف Chin- Cheng or- ange على بيئة غذائية (2 MT) مضافا إليها (GA3) بتركيز ٠,٧٧ - ٤٣,٣ ميكرومولر.

العوامل المؤثرة فى تكوين الأجنة الذكرية

Androgenesis

تنتج أجنة ذكرية فى المعمل بزراعة متوك بعض الأنواع النباتية التابعة للعائلة الباذنجانية Solanaceae والنجيلية Gramineae والصلبية Cruciferae. والعوامل المؤثرة فى إنتاج الأجنة الذكرية منها:

١- عمر النبات

يؤثر عمر النبات والمرحلة الفسيولوجية تأثيرا واضحا على تكوين الأجنة الذكرية. فالأزهار المفصولة من نباتات حديثة العمر نسبيا وفى بداية موسم التزهير تكون مناسبة لإنتاج أجنة ذكرية أكثر من البراعم الزهرية المفصولة من نباتات متقدمة فى العمر أو فى نهاية موسم التزهير.

٢- مرحلة نمو حبوب اللقاح

مرحلة نمو حبوب اللقاح من العوامل الهامة المؤثرة فى إنتاج أجنة ذكرية. فزراعة متوك التبغ والداتورا والهيوسيامس *Hyoscyamus* وهى فى مرحلة تكون فيها حبوب اللقاح أحادية النواة Uninucleate تنتج نباتات أحادية العدد الكروموسومى فقط. بينما زراعة حبوب لقاح متقدمة فى العمر تعطى نباتات متعددة فى مستوى التضاعف الكروموسومى، وكانت أفضل النتائج بالنسبة لنباتات التبغ والطماطم عندما كانت حبوب اللقاح فى مرحلة ثنائى النواة Binucleate.

٣- الصدمات الحرارية Thermal shocks

الصدمات الحرارية المرتفعة أو المنخفضة أو المتبادلة مع بعضهما تظهر نجاحا فى تكوين الأجنة الأحادية فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح، وقد تحقق ذلك فى نباتات

الداتورا، والطماطم والأتروبا والتبغ. والمعاملة الباردة التي يعقبها فترة قصيرة حرارة مرتفعة تؤدي إلى انقسام متكرر لحبة اللقاح. وتعرض متوك نبات الكرنب *Brassica* لحرارة ٣٠°م لمدة ٢٤ ساعة أو ٤٠°م لمدة ساعة واحدة كان له تأثير منشط لتكوين الأجنة الذكرية (Keller, et al. 1981). وقد فسر ذلك بأن المعاملة الباردة لها تأثير غير مباشر في زيادة عدد الأجنة الذكرية، والحرارة المنخفضة ٣-٥°م تحافظ على حيوية حبوب اللقاح مدة طويلة وتؤخر شيخوختها وتمنع اجهاضها. ويزداد بذلك عدد حبوب اللقاح القادرة على تكوين أجنة ذكرية (Bajaj 1978a). بينما الصدمات الحرارية تؤدي إلى تحلل الأنابيب الدقيقة Microtubules وتشتت خيوط المغزل من مكانها وتسبب انقسامات شاذة لنواة حبة اللقاح.

٤- الفحم النباتي Active charcoal

إضافة الفحم النباتي بنسبة ٢٪ إلى البيئة المزروعة بمتوك نبات التبغ يؤدي إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية من ١٥٪ إلى ٤٥٪ للصفة هافانا Havana، ومن ٤١٪ إلى ٩١٪ للصفة Badischer Burley. ويؤدي إلى زيادة عدد النباتات وسرعة نموها، ويؤدي أيضا إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية للأنيمون Anemone والشوفان Rye والبطاطس. وينشط تكوين الأجنة الذكرية لنبات الجزر في حالة غياب الأكسجين من البيئة. وإضافة الأكسجين للبيئة ينشط تكوين الأجنة الذكرية لنبات التبغ في حالة غياب الفحم النباتي. وترجع أهمية الفحم النباتي في تنشيط وإنتاج الأجنة الذكرية لبعض الأنواع النباتية إلى قدرته على امتصاص مركب 5-Hydroxymethyl furfural الناتج من السكروز أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وغيره من المركبات السامة التي تسبب موت الأجنة الذكرية النامية من حبوب اللقاح. كما أن الفحم النباتي يقوم بتنظيم امتصاص منظمات النمو الداخلية En-dogenous والخارجية Exogenous.

طرق الحصول على أجنة أحادية من البيضة

١- زراعة بويضات غير مخصبة فى المعمل

هى وسيلة لإنتاج نباتات أحادية تحمل صفات الأم. ويتم ذلك بزراعة البيضة غير المخصبة. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية من نبات *Aerva tomentosa* بزراعة البراعم الزهرية أو السنابل غير المخصبة.

٢- تنبيه المبيض باستخدام حبوب لقاح غير مكتملة الحيوية

ينشط المبيض باستخدام حبوب لقاح غير كاملة الحيوية أو من أنواع بعيدة القرابة. وتعرض حبوب اللقاح لجرعات مناسبة من أشعة جاما أو الأشعة السينية يؤدى إلى خفض حيويتها بحيث يكون لها القدرة على الإنبات واختراق الميسم والقلم لمسافة محدودة ثم تموت قبل الوصول إلى الكيس الجنينى، وهذه المعاملة تعمل على تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة أحادية تحمل نصف عدد كروموسومات الأم. فإذا زرعت الأجنة مبكرا فى المعمل تنتج نباتات أحادية عقيمة لا تنتج بذورا إلا إذا تحولت إلى نباتات ثنائية بالكولوشين.

٣- تنبيه البيضة بالصدمة الحرارية Thermal shocks

قد تؤدى المعاملة الحرارية المفاجئة إلى تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة بكرية بدون إخصاب. وبزراعة هذه الأجنة تنتج نباتات أحادية. وقد تحقق ذلك بتعرض نباتات الداتورا *Datura stramonium* إلى حرارة منخفضة أثناء الإخصاب، وتعرض نباتات التبغ إلى حرارة منخفضة أو مرتفعة، وتعرض نباتات الشوفان Rye إلى ٣ م. وفى جميع هذه الحالات تكون النباتات الناتجة فى المعمل أحادية عقيمة ناتجة أصلا من البيضة وتحتوى على كروموسومات البيضة فقط. ولإنجاح هذه التجربة يجب تعرض كل من البيضة وحببة اللقاح إلى نفس الصدمة الحرارية. وتسبب الصدمات الحرارية

المفاجئة إلى تغيير نظام انقسام نواة حبة اللقاح والبيضة. فقد وجد أن معاملة حبوب لقاح نبات *Hyoscyamus orientalis* بالبرودة فقط تفقدها القدرة على الإخصاب.

٤- تنبيه البيضة بالمعاملة الكيميائية Chemical treatment

تحدث بعض الكيماويات ظاهرة الأجنة البكرية Parthenogenesis، فلوحظ نشاط البيضة داخل الكيس الجنيني وانقسامها عدة انقسامات متتالية بعد حقن مبيض نبات البيتونيا بمركب بلفيتان Belvitan.، أو رش النباتات ببعض منظمات النمو مثل الإيثريل Ethrel التي تسبب عمقا ذكريا ويبقى المبيض حيا ليكون ثمرة.

الإخصاب المعملی In vitro fertilization

يواجه مربو النبات بعض الظواهر مثل عدم التوافق الذاتي Self-incompatibility وعدم التوافق الخلطي Cross-incompatibility. ويعنى ذلك عدم إنبات حبة اللقاح على الميسم وعدم حدوث إخصاب، وقد تنبت حبة اللقاح وتخرج منها أنبوبة لقاحية ولكنها لا تستطيع استكمال مسارها داخل القلم وتتوقف قبل الوصول إلى المبيض ولا يكتمل الإخصاب. وقد يحدث إخصاب لخلية البيضة ويتكون الجنين ولكنه يتوقف عن النمو ويموت مبكرا. ومضمون ذلك أن عدم التوافق يؤدي إلى عدم تكوين البذور. ولم تظهر فكرة الإخصاب المعملی داخل أنبوبة اختبار قبل ١٩٦٢. وفي الواقع أن المعلومات حول الإخصاب المعملی مازالت محدودة.

طرق الإخصاب المعملی

١- إخصاب الميسم Stigma fertilization

فى هذه الطريقة تعقم الزهرة الخنثى تعقيما جيدا، مع الحرص بعدم ملامسة الميسم لمادة التعقيم لفترة طويلة حتى لا يؤدي إلى إزالة المادة اللزجة وعدم التصاق

حبوب اللقاح على الميسم. ويزرع المبيض المعقم على بيئة غذائية صلبة في أنبوبة اختبار، ثم تنثر حبوب اللقاح من المتك على الميسم. وهذه الطريقة معادلة للإخصاب الذى يتم فى الحقل. ويمكن استخدامها إذا كان المبيض يسقط مبكرا قبل النضج. ويعتبر إخصاب الميسم أفضل من إخصاب المشيمة لنبات التبغ وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع الأنواع:

Antirrhinum majus; Pisum sativum; Lathyrus odoratus; Zea mays; Glycine max;
Nicotiana rustica; Nicotiana tabacum; Petunia violacea.

٢- إخصاب المشيمة Placental fertilization

تفصل مشيمة محتوية على بويضات غير مخصبة من زهرة معقمة جيدا. ويتم ذلك تحت ستريوميكروسكوب ثم تزرع فى بيئة غذائية. وتعقم المتوك وهى فى مرحلة ما قبل الانفتاح مباشرة. وتستخدم المتوك التى تنفتح أثناء التعقيم، وينثر منها حبوب اللقاح قريبا من البويضات غير المخصبة. وينتظر حتى تنبت حبوب اللقاح وتخرق الكيس الجنينى Embryo-sac. وقد نجحت هذه الطريقة مع نباتات العائلة *Caryo-phyllaceae* والأنواع النباتية التابعة لجنس القطن *Gossypium* والذرة *Zea mays*.

عوامل إنجاح الإخصاب المعملی

- أن تكون حبوب اللقاح والبويضات فى حالة فسيولوجية وتكوينية سليمة.
- يجب أن تتغير مكونات البيئة الغذائية بتغيير مرحلة النمو ابتداء من إنبات حبوب اللقاح والإخصاب ونمو الجنين، وقد يضاف إليها بعض المعقدات الطبيعية المناسبة لكل مرحلة.
- درجة حرارة التحضين قد تكون عاملا هاما لإنجاح عملية الإخصاب، فمثلا يحتاج البنفسج *Nareissus* إلى التحضين عند أقل من ٢٥°م ويحتاج الخشخاش *Papaver somniferum* للتحضين عند أكثر من ٢٥°م.
- ينجح إخصاب المشيمة أحيانا إذا كانت النباتات تحتوى بصورة طبيعية

على ظاهرة عدم التوافق الذاتي. ومن أمثلة ذلك التهجين بين نباتات نوعين من البيتونيا: *Petunia hybrids* و *Petunia axillaris*.

- ينجح التلقيح الخلطي أحيانا حتى ولو كان غير ناجح في الحقل. وقد تم إنتاج نباتات هجن من نبات التبغ نوع *Nicotiana alata* بعد إخصاب البويضات في أنبوبة اختبار بحبوب لقاح من نبات التبغ نوع *Nicotiana tabacum*.

طرق مضاعفة العدد الكروموسومي

١- تضاعف العدد الكروموسومي بدون انقسام النواة Endomitosis

الخلايا الأحادية Haploids هي خلايا غير مستقرة أثناء الزراعة العملية، وتميل دائما إلى مضاعفة العدد الكروموسومي ذاتيا بدون انقسام للنواة، فيتضاعف عدد الكروموسومات داخل النواة وتصبح خلية ثنائية.

٢- المعاملة بالكولشيسين Cholchicine treatment

يستخدم الكولشيسين على نطاق واسع كمانع لتكوين خيوط المغزل Spindle والصفحة الوسطى Middle lamella بالخلية، فيتضاعف عدد الكروموسومات بها وتصبح خلية واحدة متضاعفة ينتج عنها نبات متضاعف Polyploid. وقد تم الاستفادة من هذا المركب للحصول على سلالات ثنائية متجانسة Homozygous lines من خلال الزراعة العملية لخلايا أو أنسجة أحادية العدد الكروموسومي. ويتم ذلك بزراعة المتوك ومعاملة النباتات الأحادية الناتجة - وهي مازالت متزاحمة ومحاطة بجدار المتك - بمادة الكولشيسين بتركيز ٠,٥٪ ولمدة ٢٤ - ٤٨ ساعة ثم تغسل جيدا بعد إخراجها من المتك ثم يعاد زراعتها معمليا بعد فصلها عن بعضها. كذلك يمكن معاملة النباتات الناضجة بعجينة من اللانولين Lanolin تحتوى على ٤٪ كولشيسين وتضاف إلى إبط الأوراق. وعند الحصول على نباتات ثنائية خضبة متجانسة يمكن استخدامها كسلالات نقية Inbred lines تدخل بعد ذلك في إنتاج الهجن.

