وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة .: زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة .: د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي .: 2017/2016

المحاضرات النظرية

اسم المادة	زراعة الانسجة النباتية		
مقرر الفصل	الخريفي		
عدد الساعات	ساعات النظري	ساعات العملي	عدد الوحدات
	2	3	3.5
اهداف المادة	الأكثار السلالي السريع . 3- أنتاج المركبات الثانوية والعقاقير الطبية . 2- أنتاج نباتات خالية من الفايروسات . 1- أستخدامها في مجال تربية وتحسين النبات وحفظ المصادر الوراثية .		
الكتب المنهجية	أساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية 1988.جامعة بغداد اعداد / د.محمد عباس سلمان .العراق. 2-المفاهيم الرئيسية في زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء للنبات . 1990 تأليف الدكتور مبشر صالح عمر . جامعة الموصل . العراق 3-زراعة الانسجة والخلايا النباتية تأليف الدكتور فيصل رشيد الكنافي 1987. جامعة الموصل 4-نباتات من انابيب الاختبار كتاب مترجم تأليف ليديان كيت ترجمة الدكتور محمد علي حسين الحديدي .دار الفكر للطباعة والنشر ، الاردن 2000 5-تقنيات القرن 21 لتحسين النبات بزراعة الانسجة دار الفكر العربي عبد الرحيم الرفاعي وسمير عبد الرزاق الشويكي2002		
	1-Robert .N . Tragiano and Dennis J.Gray .2000.plant Tissue Coneepts and Laboratory Exercises		

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

المصادر الخارجية	.secoud Edition.CRC.Press454 PP._inter mediate 2-George.E.F.2008_Plant propa gation by Tissu .Culture Third Edition.Exegeties Uk. 1361pp_advanced. Plant Cell and Tissue Culture_A Tool in Biotehnology.Basic and Applieation .Germany.2009

الأسبوع	النظري	العملي
الأول	مقدمة ونبذة تاريخية عن تطور زراعة الأنسجة والخلايا النباتية.	التعرف على مختبر زراعة الأنسجة النباتية واحتياجاته وملحقاته
الثاني	العوامل المؤثرة في نجاح زراعة الخلايا والأنسجة النباتية	التعرف على مختبر زراعة الأنسجة النباتية واحتياجاته وملحقاته
الثالث	المراحل المتبعة في الإكثار الدقيق. العوامل المؤثرة في كل مرحلة من هذه المراحل ومعالجة المركبات الفينولية	التعرف على مختبر زراعة الأنسجة النباتية واحتياجاته وملحقاته
الرابع	التطبيقات العملية لزراعة الخلايا والأنسجة النباتية في مجال تربية وتحسين النباتات لإنتاج نباتات سليمة من الإصابات بمسببات مرضية محددة.	الأوساط الغذائية والوحدات المستعملة للتعبير عن تراكيز المواد المستعملة في تحضير الاوساط الغذائية
الخامس	التطبيقات العملية لزراعة الخلايا والأنسجة النباتية في مجال تربية وتحسين النباتات لإنتاج نباتات سليمة من الإصابات بمسببات مرضية محددة.	الأوساط الغذائية والوحدات المستعملة للتعبير عن تراكيز المواد المستعملة في تحضير الاوساط الغذائية
السادس	أنتاج بعض المركبات الصيدلانية	الأوساط الغذائية والوحدات المستعملة للتعبير عن تراكيز المواد المستعملة في تحضير الاوساط الغذائية
السابع	الإكثار ألسلالي السريع	التعقيم

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

الثامن	أستحثاث ونمو الكالس	التعقيم
التاسع	دمج وزراعة البروتوبلاست	الأجزاء النباتية المستعملة في الزراعة النسيجية
العاشر	زراعة الأعضاء النباتية	الأجزاء النباتية المستعملة في الزراعة النسيجية
الحادي عشر	زراعة الأجنة	تدريب على زراعة البراعم الابطية والقمم النامية وإنشاء الزروعات تنشئة الكالس على الأجزاء النباتية
الثاني عشر	تكوين الأجنة الجسمية	تدريب على زراعة البراعم الابطية والقمم النامية وإنشاء الزروعات تنشئة الكالس على الأجزاء النباتية
الثالث عشر	زراعة حبوب اللقاح والمتوك وإنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	تدريب على زراعة البراعم الابطية والقمم النامية وإنشاء الزروعات تنشئة الكالس على الأجزاء النباتية
الرابع عشر	زراعة حبوب اللقاح والمتوك وإنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	تدريب على زراعة البراعم الابطية والقمم النامية وإنشاء الزروعات تنشئة الكالس على الأجزاء النباتية
الخامس عشر	زراعة البراعم الابطية والقمم النامية	تدريب على زراعة البراعم الابطية والقمم النامية وإنشاء الزروعات تنشئة الكالس على الأجزاء النباتية

مفهوم. زراعة الانسجة النباتية

زراعة الانسجة النباتية يمكن ان تعرف بأنها العملية التي يتم بموجبها فصل اجزاء صغيرة من انسجة نباتية حية (القمة النامية ، الساق ، الورقة ، البراعم الزهرية والخضرية والجذور..الخ)

وتنميتها في ظروف معقمة على وسط غذائي تحت ظروف مسيطر عليها

مفردة تعني خارج الجسم الحي او في الزجاج Invitro :-

وتتركز هذه التقنية على مفهومين مهمين من مفاهيم علم النبات الاول يدعى بالطاقة الكامنة للتطويرTotipotenc :- ويعني الطاقة الوراثية لتكوين نبات كامل وقابليتها على انجاز الفعاليات

الخاصة بالنمو والتطور والتي تتميز بها البيضة المخصبة والمفهوم الثاني

plasticity :-ويعني مرونة النبات على التأقلم مع الظروف البيئية المحيطه عن طريق

تحوير عملياته الايضية ونموه وتطوره بما يلائم هذه الظروف .

التطبيقات العملية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية :-

ان التقنيات المختلفة لزراعة الانسجة النباتية يمكن استخدامها في مجالين رئيسيين هما

اولاً :- في المجال البحثي:-

الطفرات Genetic 1-الوراثة:وتشمل أ-اجواء الدراسات والبحوث التي تتعلق باستحداث

باستخدام تقنية زراعة الخلايا ب- وكذلك يمكن (Mutagenesis in vitro) خارج الجسم الحي

عن طريق دمج البروتو بلاست somatic mybridization اجراء التهجين الجسمي

واستحداث هجن لا يمكن الحصول عليها في الطبيعة

) حيث يمكن استخدام تقنيةHaploidج-الحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية (

عزل وزراعة حبوب اللقاح او المتوك للحصول على نباتات تحتوي على نصف العدد الاصلي من

الكروموسومات ونقية من الناحية الوراثية

عن طريق زراعة البويضات In vitro Fertilization د-التخصيب خارج الجسم الحي

وتلقيحها بحبوب اللقاح الصنف المطلوب والحصول على بذور منها والتغلب على ظاهرة عدم التوافق الذاتي او اختلاف موعد نضج حبوب اللقاح والبويضات وغيرها

حيث يمكن استخدام احد تقنيات نقل الجينات لنقل قطعة Genes Transfer هـ -نقل الجينات

هجين معين عن طريق الزراعة خارج الجسم الحي الى هجين نبات اخرDNA قطعة معينه من

وبالتالي الحصول على تعبير هذا الجين في النبات المضيف اي نقل هذه الصفه اليه كأن تكون

المحاضرات النظرية

مقاومة مرض معين او حشرة او تحمل ظروف بيئية غير ملائمة وهي جزء من الهندسه الوراثيه

Plant genetic engineering للنبات

وتشمل العضيات كالمايتوكوندريا والكلوروبلاست Organels Transfer و-نقل العضيات

لغرض زيادة كفاءة النبات لعملية التركيب الضوئي والتنفس وبالتالي تحسين الصفات

وهو العلم الذي يهتم بعملية نشوء وتطور الاعضاء والسيطرة 2Morphogenesis-علم التمايز

على العمليات الحيوية التي تؤدي الى نشوء هذه الاعضاء وتطورها ،وتشمل زراعة الاعضاء

المختلفه (المتوك ،البويضات ،الجذور،القمم الناميه ،البراعم وغيرها) حيث يمكن دراسة العمليات

التطورية المختلفة للاعضاء دون حصول التداخل من التأثيرات البيئية الخارجيه وكذلك اتاحت

تقنية زراعة الخلايا وانسجة الكالس المجال امام الباحثين لدراسة العمليات المرتبطة بنشوء

الاعضاء كافة وتتبع مراحلها المختلفة وساعدت كثيراً في فهم العديد من العمليات الحيويه المتعلقه بها.

ساهمت التقنيات المختلفة لزراعة انسجة النبات Plant Pathdogy 3- علم الامراض النباتية

في فهم العديد من الظواهر البايولوجية المتعلقة بنشوء الامراض واستحداث الاصابة وكذلك

دراسة العلاقة بين العوائل والمسبب المرضي والمثل الواضح هنا استخدام هذه التقنية في دراسة

كما فتحت التقنية Agrobacterium ,الذي تسببه بكتريا Crown gall) التورم التاجي)

امكانية دراسة كيفية استحداث صفة المناعة لدى العديد من النباتات للاصابة بالامراض والحشرات

المختلفة.

4-التداخل بين النباتات والكائنات الدقيقة مثال على ذلك دراسة العلاقة التعايشية في تثبيت

ويعكف الباحثون حالياً لاستخدام تقنية زراعة البروتوبلاست Nitrogen fixation النيتروجين ودمجه بين الاصناف التي لها القابلية على تثبيت النايتروجين مع تلك التي ليس لها هذه القابلية للحصول على هجن جسمية قادرة على تثبيت النيتروجين.

وتصنيف النباتPlant phsiology وفسلجة النبات (Bio chcmistry) 5-الكيمياء الحيوية جميعها استفادة من التقنيات المختلفة لزراعة الانسجة بشكل او بآخر حيث Plant taxonomy اتاحت هذه التقنيات اجراء البحوث في هذه المجالات عن طريق زراعة الكالس والخلايا.

ثانياً:-تم استخدام هذه التقنية في اربعة مجالات رئيسية

وانتاج embryocuture أ-تربية وتحسين النبات :-التي تشمل تقنيات زراعة الاجنة والتلقيح production of Hapliod plants نباتات احادية العدد الكروموسومي والاخصاب خارج الجسم الحي فضلاً عن تقنيات التطفير والانتخاب خارج الجسم الحي وغيرهاIn vitro secreeneing

ب-انتاج مركبات ذات قيمة اقتصادية وتشمل انتاج المواد الاوليةPrimerymetabalits مثل الكاربوهيدرات والدهون والبروتينات والاحماض الامينية اضافة الى المواد الثانوية مثل القلويدات وبعض الصبغات وغيرها وكذلك انتاج Scondary meta bolits بعض المضادات الحيويه.

ج-انتاج نباتات خالية من الاصابة حيث امكن انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية كالفايروسات والفطريات والمايكوبلازما بأستخدام تقنيات مختلفة كزراعة المرستيم القمي والتطعيم والتركيب خارج الجسم الحي Apical

او زراعة انسجة متخصصة مثل الجويزاء والمتوك In vitro micro grafting

المحاضرات النظرية

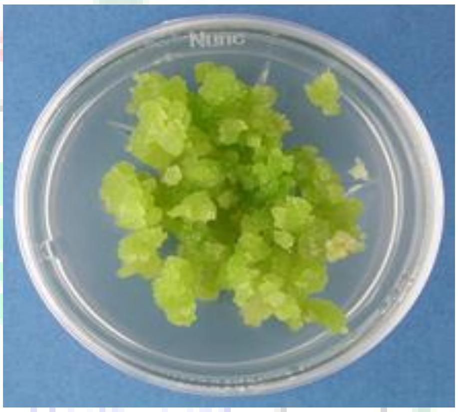
د-الاكثار السلالي السريع Rapid clonal propagation ويهدف الى الحصول على نباتات متجانسة بفترة قصيرة واعداد كبيرة وقد امكن تحقيق هذا الهدف اما بواسطة تكوين او بتكوين البراعم Somatic embryogenesis الاجنة الجسمية (اللاجنسية) او بتحفيز نمو Adventious bud formation العرضية على الانسجة المزروعة Proliferation of Axiallary budsالبراعم الابطية

هـ-حفظ المصادر الوراثية : تستخدم تقانة زراعة انسجة النبات في مجال حفظ المصادر الوراثية ومن المعروف ان حفظ المادة الوراثية لفترات طويلة يعد من الامور المهمه لمربي النبات اذ توفر هذه العملية الخطوط الوراثية اللازمة لعملهم وتوفر تقانة الزراعة النسيجية امكانات الحفظ بالاتجميد او باستخدام المزارع ذات النمو البطيء للماده الوراثية وتوفيرها على مدار السنة مع خلوها من المسببات المرضية .

استحداث وأدامة الكالس Callus Initiation and Maintenance

يعرف الكالس انه نسيج غير منتظم الشكل يتكون عند انقسام خلايا النبات بطريقة غيرمنتظمة ومن الممكن ان يستحث على الاجزاء الكاملة للنبات بواسطة الجروح او وجود الحشرات او الاحياء الدقيقة او نتيجة التعرض للاجهاد (Stress) . ومن الممكن تحفيز نشوء الكالس بزراعة الانسجة بوضع اجزاء صغيرة من النبات (Explant) على وسط النمو تحت ظروف معقمة بوجود منظمات النمو الداخلية مع اضافة منظمات نمو للوسط الغذائي ويطلق عليه الكالس الاولي (Primary callus). وقد يعرف الكالس بأنه نسيج غير متمايز يتألف من خلايا برنكيمية او شبه برنكيمية يستعمل في تكوين الاعضاء Organs أوالاجنة الجسمية Embryogenesis وفي دراسة العديد من الفعاليات الفسيولوجية وفي مجال الهندسة الوراثية وتشريح النبات . ان الكالس المتكون يختلف في لونه ومظهره

الخارجي وصلابته اعتماداً على مصدر القطعة النباتية Explant ونوع النبات، فأما ان يكون هشا" ذا مظهر مفكك (Friable tissue) ويكون مفضلاً في عملية تنشئة او استحثاث Induction المزارع الخلوية وذلك لان الخلايا المكونة له تكون غير مرتبطة مع بعضها ومن الممكن تفككها الى تجمعات خلوية صغيرة او خلايا مفردة بوساطة التحريك في الوسط الغذائي السائل المنقول اليه او ان يكون صلبا" ذا قوام متماسك Compact.



مسارات نشوء الكالس

يمكن تقسيم مسار نشوء الكالس من قطعة النسيج النباتي المزروع على وسط غذائي الى ثلاث مراحل هي، التحفيز، والانقسام، والتمايز، ففي المرحلة الاولى تتهيأ الخلايا للانقسام وتنشط فيها العمليات البنائية المختلفة مثل بناء البروتين وانقسام الحامض النووي ويبقى عدد الخلايا وحجمها ثابتا، وتختلف مدة هذه المرحلة حسب الحالة الفسيولوجية لخلايا الجزء النباتي وظروف الزراعة، ان الخلايا المكونة للقطعة النباتية لا تستجيب بصورة متساوية لعملية التحفيز وذلك بسبب وضعها على الوسط الغذائي فالخلايا الخارجية للنسيج تحفز وتنقسم فقط مكونة كتلة من الخلايا تحيط بالخلايا غير المنقسمة ولاسيما في مناطق الجروح على القطعة النباتية.

المحاضرات النظرية

ان العامل المحدد لانقسام الخلايا في المرحلة الثانية هو مدى جاهزية النتروجين المختزل تحصل منافسة بين الخلايا المنقسمة على النتروجين المختزل ويمكن التغلب على هذه المنافسة باضافة خليط من هذه الحوامض الامينية الى الوسط وان سبب بدء الانقسام في الطبقات المحيطة الخارجية (الانسجة) والاجزاء المزروعة يعود الى عوامل عدة متداخلة مع بعضها توفر الاوكسجين بكميات كبيرة سرعة تحرر ثاني اوكسيد الكاربون الى المحيط الخارجي ووفرة العناصر الغذائية. وفي هذه المرحلة تحدث تغييرات عكسية تتضمن تحول الخلايا المنقسمة الى خلايا مرستيمية مكونة كتلا" خلوية غير منتظمة في مناطق انقسام الخلايا فقط. اما المرحلة الثالثة فتبدأ من خلال توسع خلايا معينة وتحول قسم من الخلايا المرستيمية الى خلايا متمايزة التي تؤدي في النهاية الى تكوين النبات الكامل.

مصدر الاجزاء النباتية

ان انتخاب الجزء النباتي الذي سوف يكون مصدراً للاكثار يجب ان يتم بطريقة دقيقة بحيث يمتاز بتوفره وسهولة تعقيمه وقابليته العالية للاستجابة للتمايز الشكلي وكذلك ان تكون انسجته ذات طبيعة خضرية لضمان تطابق النباتات التي تنتج منه مع امهاتها وتواجه الزراعة النسيجية مصاعب اكثر عند الانتقال في تطبيقاتها من النباتات العشبية herbacious الى الاشجار الخشبية woody plants. وتشتد الصعوبات عند التحول الى النباتات ذوات الفلقة الواحدة Monocotyledonary plants. يمكن استحداث الكالس من أجزاء مختلفة مأخوذة من النبات منها الاوراق وقطع الساق والنسيج المريستيمي.

الوسط الغذائي:

يعد الوسط الغذائي من اهم العوامل المؤثرة في نجاح الزراعة النسيجية اذ يؤمن العناصر الغذائية لنمو وتطور الجزء المزروع بشرط التوازن بين مكونات الوسط ولم يتم التوصل لحد الان الى تركيبة خاصة من الوسط الغذائي تلائم جميع انواع النباتات، ويعد وسط Murashige و Skoog ، 1962 (MS) اكثر الاوساط استخداماً في الاكثار الدقيق.

المحاضرات النظرية

ان معظم النباتات تحتاج الى مكونات اساسية في الوسط الغذائي هي خليط من املاح العناصر المغذية مع مصدر للطاقة وهو السكروز فضلا"عن حاجتها الى مواد اخرى مثل الفيتامينات والاحماض الامينية والسكريات الكحولية ومنظمات النمو اذ تشيرالدراسات الحديثة الى ان الاوكسين يعمل على تحفيز الجينات التي يقوم السايتوكاينين بالسيطرة على تعبيرها الجنيني وان نواتج التعبير الجيني للجينات المنتظمة تؤدي دورا"اساسيا في العمليات البيولوجية مثل انقسام الخلايا والتركيب الضوئي وتطور الكلوروبلاست وايض العناصر المغذيـــــــة . ان التداخل في فعالية الاوكسينات والسايتوكاينينات يؤثر في طبيعة نسيج الكالس إذ تحفز الاوكسينات المضافة للوسط الغذائي انتاج كالس ابيض هش خال من المراكز المرستيمية بينما تعمل اضافة 2,4-D بالتداخل مع BA على نشوء كالس عقدي Nodular قادر على التحول الى اجنة جسمية والانبات لاحقاً، وذلك لكون السايتوكاينينات تعمل كمكافىء لتاثيرات الاوكسينات التي تؤثر سلبا في التطور المرستيمي للكالس الجنيني

تؤدي الحالة الفيزيائية للوسط الغذائي دوراً مهماً في نمو وتطور الزروعات وتضاعفها ، وبالتالي نجاح برنامج الإكثار بزراعة الانسجة .

ان اختيار الحالة الفيزيائية الملائمة والتي توفر افضل نمو للزروعات يعتمد على عدة جوانب منها النوع النباتي ومدى ملاءمته للزراعة في الوسط السائل إذ تفضل بعض العوائل النباتية الزراعة فيه مثل Bromeliaceae (نباتاتهاوحيدة الفلقة) وكذلك عامل التهوية إذ ان وضع الأجزاء النباتية في اوعية الزراعة شبه مغمورة بالوسط السائل سوف يقلل من تجهيزها بالاوكسجين الضروري للنمو ولذلك يلجأ اما لتقليل كمية الوسط السائل في وعاء الزراعة او بجعل الجزء النباتي يطفو على سطح السائل وذلك بوضع الجزء النباتي فوق قطعة من ورق الترشيح بحيث تلامس الوسط الغذائي، وتعمل ورقة الترشيح كموصل للمواد الغذائية بين الانسجة والوسط الغذائي وكذلك تعمل على تثبيت الانسجة مع بقاء الجزء النباتي معرض للهواء بصورة مباشرة ويسمى الوسط الغذائي السائل الثابت. اما في حالة الوسط السائل المتحرك فيلجا عادة الى استخدام الهزازات Shakers بمختلف انواعها لتحقيق هذا الغرض ولكن في هذه الحالة يجب الاخذ بنظر الاعتبار الأضرار التي تسببها عملية الهز نتيجة اصطدام

الزروعات او الخلايا النباتية ببعضها او بجدران الوعاء ، ويوفر الوسط السائل عادة نمو جيدا للزروعات إذ يقوم بامداد العناصر المغذية بشكل افضل من الوسط شبه الصلب، كما ان الافرازات الضارة التي قد تفرز من الزروعات تذوب وتتخفف فيه على عكس الوسط الصلب الذي يؤدي استخدامه الى تجمع موضعي لهذه الافرازات الضارة حول الاجزاء المزروعة ، وبالتالي احتمال تسمم الانسجة وموتها.

ان اغلب البحوث المنشورة تؤيد الحاجة الى استخدام الوسط شبه الصلب – Semi solid medium إذ يتم تضمين الوسط الغذائي بمادة الاكار (Agar) وبتراكيز تتراوح بين 0.6 – 1.0% وذلك اعتماداً على مصدره ودرجة نقاوته وكذلك شدة التصلب المطلوبة في الوسط الغذائي

طرائق زراعة الكالس:

1- الزراعة في الوسط الصلب Solid Culture Medium :

وهي اول طريقة استخدمت في زراعة الكالس وتمتاز بأنها طريقه سهلة ولا تحتاج الى أجهزه مختبرية معقدة وكذلك أمكانية أستحداث الكالس من العديد من القطع النباتية باستخدام حيز صغير ، ويستخدم الأكار عادة لتصليب الوسط الغذائي ألا ان الدراسات التي تهتم بالعمليات البنائية مثل دراسة بناء البروتينات بطريقة الاشعاع أو دراسة انتقال منظمات النمو تكون غير مجدية عند استخدام الوسط الصلب وذلك لعدة أسباب منها ان أنتقال المواد الغذائية ألى الجزء النباتي يكون غير متساوي اذ أن الجزء الملامس للوسط تكون له فرصة اكثر للاستفاده من المواد الغذائية مقارنة بالاجزاء البعيدة عن الوسط كذلك طمر الجزء النباتي في الوسط سيؤدي ألى تقليل التبادل الغازي بين الكالس والوسط المتكون عليه فضلا عن تعرض الكالس ألى ظاهرة الاستقطاب Polarization بفعل الجاذبية الارضية و التعرض للضوء و اخيراً أمكانية حصول اضرار للكالس عند نقله الى وسط اخر.

2- **الزراعة في الوسط السائل Liquid Culture Medium :** و هي على نوعين

أ- الوسط الغذائي السائل الثابت stationary liquid culture medium

ب- الوسط الغذائي السائل المتحرك Agitated liquid culture medium

اعادة زراعة الكالس

يتم نقل الكالس الى وسط غذائي جديد كل 4 أسابيع اذ أن استمرار النمو في نفس الوسط يؤدي الى استنزاف العناصر الغذائية وجفاف الوسط الصلب او زيادة تركيز مكونات الوسط السائل عند تبخر الماء ومن ثم تجمع وتراكم المخلفات الايضية للاجزاء النباتية. ان الفترة الزمنية اللازمة لنقل الكالس تعتمد على طبيعة النبات ومعدل نمو الكالس الناتج منه، ويفضل نقل الكالس الى اوساط جديدة عند بلوغ نموه الحد الأعلى اذ ان بقاء الكالس لفترة طويلة مع عدم نقله الى وسط جديد قد يسبب في احداث بعض التغيرات الوراثية التي قد تحدث كظهور حالات التعدد الكروموسومي أو نتيجة لفقدان جزء من الكروموسوم او تغيرات في التعبير الجيني.

قياس نمو الكالس:

يحدد نمو الكالس بطرق مختلفة منها:

1- قياس الوزن الطري أو الجاف للكالس: يمكن قياس الوزن الطري باخذ قطعة الكالس ووزنها واعادتها الى الوسط الغذائي تحت ظروف معقمة ومن سلبيات هذه الطريقة هي عدم امكانية وزن جميع الكالس المتكون لبقاء اجزاء منه متعلقة بالوسط الغذائي كذلك فأن كميات الماء الممتصة من قبل الخلايا تتأثر بدرجة كبيرة بالظروف البيئية كدرجة الحرارة والرطوبة، لذلك قد يعتمد في حساب نمو الكالس على الوزن الجاف الا ان من سلبيات هذه الطريقة هو عدم امكانية الاستفادة ثانية من الكالس المستخدم.

2- قياس محتوى الكالس من المكونات الخلوية الاساسية كالبروتين والكربوهيدرات

3- حساب عدد خلايا النسيج المكون للكالس.

المحاضرات النظرية

تكوين الأجنة الجسمية (اللاجنسية)

Non zygotic or Somatic Embryogenesis

أن قابلية النباتات المزهرة على تكوين الاجنة لا تنحصر فقط في تطور البيضة المخصبة بل يمكن للخلايا الجسمية المفصولة من أجزاء نباتية مختلفة أن تكون أجنة بعد زراعتها على أوساط غذائية صناعية . ولقد لوحظت ظاهرة تكوين الأجنة من خلايا جسمية لأول مرة في مزارع الخلايا المعلقة لنبات الجزر من قبل Steward وجماعته عام 1958 ، كما لوحظت في كالس الجزر المنمى على وسط مصلب بالآكار من قبل Reineret عام 1950.

وقد أستعملت هذه الطريقة في دراسة الخطوات التي تؤدي إلى تكوين الأجنة الجسمية خارج الجسم الحي في نباتات الحمضيات .Citrus sp والقهوة Coffea sp. وأكثر من 30 نوع نباتي .

- **تتكون الأجنة الجسمية خارج الجسم الحي *in vitro* من ثلاثة أنواع من الخلايا الجسمية :**

1- الخلايا الجسمية (الخضرية) للنباتات البالغة .
2- خلايا الأنسجة التكاثرية غير البيضة المخصبة (Zygot)
3- السويقة الجنينية والفلق للأجنة والبادرات الفتية .

- تتكون الأجنة الجسمية في مزارع الخلايا ، الأنسجة والأعضاء النباتية أما بصورة مباشرة أو بصورة غير مباشرة.

1- نشوء الأجنة الجسمية مباشرةً Direct Somatic embryogenesis

تتكون الأجنة الجسمية في هذه الحالة من خلية أو مجموعة خلايا على الجزء النباتي مباشرةً ودون المرور بمرحلة الكالس . يمكن ملاحظة هذه الحالة في الحمضيات حيث تكون خلايا انسجة النيوسيلة (الجويزاء) أجنة تعرف بالأجنة النيوسيلية أو الأجنة الخضرية. وهناك بعض الحالات التي كونت فيها خلايا الجزء النباتي أجنة بشكل مباشر في نبات الفاصوليا وكذلك النخيل ومن البروتوبلاست المزروع لبعض الأنواع النباتية ، كذلك تم ملاحظة هذه الظاهرة عند زراعة المتوك وحبوب اللقاح لبعض الأنواع النباتية . وبصورة عامة تعتبر هذه الظاهرة نادرة الحدوث إذا ما قورنت بطريقة تكوين الأجنة غير المباشر. وتمتاز هذه الطريقة بكون النباتات الناتجة من أنبات الأجنة تكون على الأغلب متطابقة وراثياً مع الام أي ثباتها الوراثي يكون عالي ، وكذلك فأن الاجنة غير البالغة المتكونة تتصف أحياناً بالتبرعم

وتكون أجنة أضافية . أن التوازن بين منظمات النمو النباتية المضافة للوسط الغذائي والمستوى الداخلي للهرمونات النباتية له دور رئيسي في عملية تحول الخلايا الجسمية المباشر إلى أجنة لاجنسية أو جسمية .

2- نشوء الأجنة الجسمية بطريقة غير مباشرة Indirect Somatic embryogenesis

في هذه الحالة تنشأ الاجنة الجسمية من خلايا نسيج الكالس المتكون على الأجزاء النباتية المزروعة . ويتم تحفيز تكوين الأجنة بصورة غير مباشرة بالخطوات التالية:

أ- تزرع الأجزاء النباتية في أوساط حاوية على تراكيز عالية من الاوكسينات مثل 2,4-D .

ب-بعد تكون الكالس على الأجزء النباتية ينقل الكالس إلى وسط غذائي آخر خالي من منظمات النمو وذلك لتحفيز نشوء أجنة ثنائية القطبية من أوليات الأجنة التي تكونت من خلايا الكالس في الوسط الاول.

جـ- تنقل مجاميع الأجنة بعد ذلك إلى أوساط غذائية آخرى لغرض بلوغ وانبات هذه الاجنة لتكوين نبيتات صغيرة .

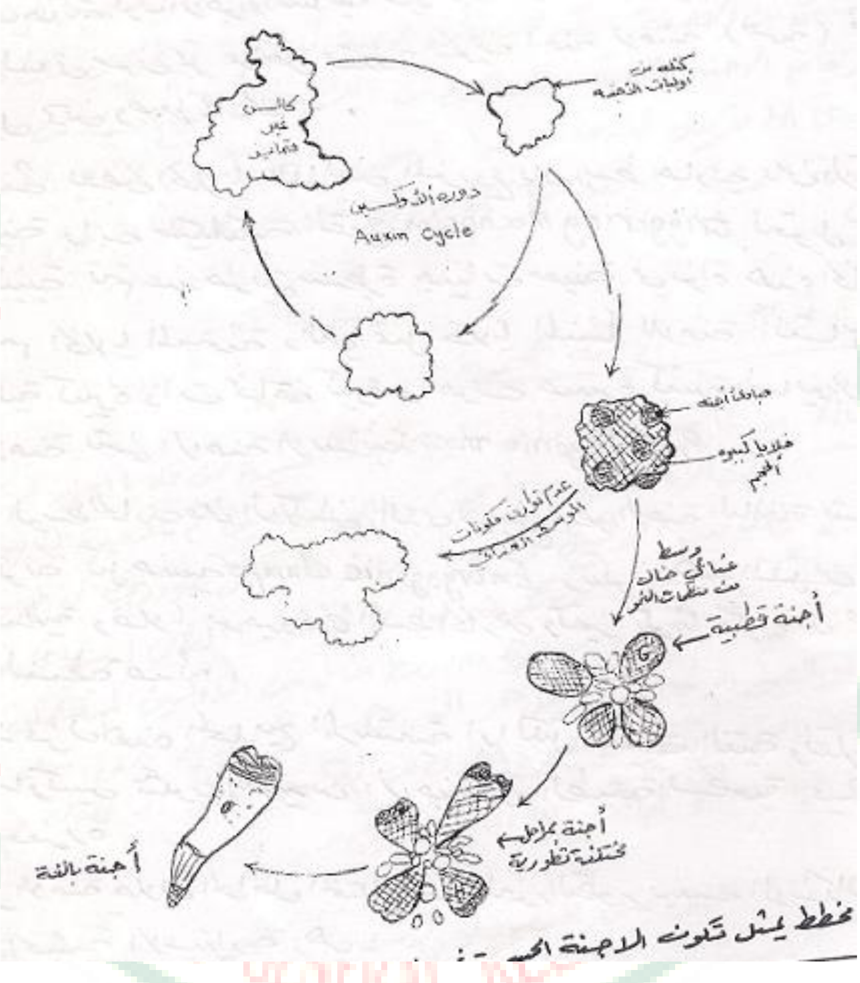
عادة تشترك نسبة صغيرة من خلايا الجزء النباتي في تكوين الكالس ، وتقع هذه الخلايا في الطبقة السطحية للجزء النباتي وتكون بتماس فيزياوي مع الوسط . وقد تتكون أوليات الأجنة من خلايا مفردة أو مجموعة من الخلايا ، بعد نقل نسيج الكالس إلى وسط خال من منظمات النمو أو تحتوي على مستويات منخفضة منها تتطور أوليات الأجنة المتكونة اساساً إلى أجنة ثنائية القطبية Bipolar embryos في مراحل مختلفة من التطور شكل (1) ولا تستعمل هذه الطريقة في الأكثار الخضري على النطاق التجاري لأن الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من هذه الطريقة مشكوك فيه .

منشأ الأجنة الجسمية (اللاجنسية) Origin of non zygotic embryos

على الرغم صعوبة تفسيرأو تحديد أصل الأجنة الجسمية (اللاجنسية) والتي تتطور من أجزاء نباتية مثل الأنسجة الأولية المعقدة نوعاً ما أو نسيج الكالس إلا أن الدلائل تشير إلى أن هذه الأجنة تنشأ عادة من خلية واحدة وليس من عدة خلايا ، اذ

أن الأجنة المتطورة عادة من حبوب اللقاح أو البروتوبلاست تنشأ من خلية مفردة وليس من خلايا متعددة .

أن هذه الخاصية سوف تساعد كثيراً في تقانات الهندسية الوراثية وذلك بسبب كون الخلية التي يتم أدخال جينات معينة في مادتها الوراثية هي التي يجب أن تتطور إلى نبات بعد أن تتحول إلى خلية جنينية وأن التعديل الوراثي للخلية الجنينية هوالذي سوف يؤدي في النهاية إلى الحصول على نبات محور وراثياً.



شكل (1) مخطط يمثل الاجنة الجسمية في المزارع المعلقة لنبات الجزر

نشوء وتكوين الأجنة الجسمية (اللاجنسية) Initiation and Formation of S.E

في الأجزاء النباتية المعقدة تنشأ الاجنة اللاجنسية بصورة نموذجية فقط من الأنسجة الأكثر حداثة والمرستيمية وعلى سبيل المثال الأجنة الجنسية غير البالغة والسويقات الجنينية فوق لفلقية epicotyledon وتحت الفلقية Hypocotyledon

والفلق المستاصلة من البذور غير الناتبة ، والاوراق الفتية والقمم النامية Shoot tips وحتى الجذور للنباتات المزروعة عادة ما تستخدم كأجزاء نباتية لأنشاء مزارع الأجنة وتعتمد أستجابة النبات لتكوين الأجنة على التركيب الوراثي ونوع الجزء النباتي المستخدم .

هناك العديد من المسالك التي بواسطتها ممكن أن تصبح الخلية الجسمية مباديء للأجنة وبشكل عام فأن أحتواء الجزء النباتي على أنسجة جنينية غير متمايزة مثل أنسجة الأجنة غير البالغة فأن نشوء وادامة الكالس الجنيني من هذه الاجزاء سوف يشابه زراعة وأكثار أوليات الأجنة أي أن هذه الأنسجة تكون متقدمة خطوة أكثر في طريق تكوين الأجنة الجسمية وبالتالي فأن أسهل في الأكثار من الأنسجة الأخرى أما في حالة كون الأجزاء النباتية غير محتوية على خلايا جنينية فأن ذلك يعني أن خلايا أنسجة الجزء النباتي سوف تمر بمراحل مختلفة لتكوين أجنة لاجنسية (جسمية) في النهاية . أن هذه المراحل يمكن وصفها كما يلي :-

1- تستحث بعض خلايا الكالس المزروع على وسط حاوي على الأوكسين لتكوين أوليات الأجنة وأن ميكانيكية القدح triggering mechanism لتحويل هذه الخلايا إلى خلايا جنينية تتم عن طريق سيطرة جينات معينة في نواة هذه الخلايا .
2- تنقسم الخلايا المستحثة والتي تمثل خلايا المنشأ للاجنة أنقسام غير متساوي منتجة خلية كبيرة ذات فجوات وأخرى صغيرة كثيفة السايتوبلازم لها القابلية على تكوين الأجنة تسمى الأجنة الأبتدائية Pro-embryonic masses .
3- في الوسط الحاوي على الأوكسين والذي لا يسمح بتطور الأجنة البالغة Embryogenesis تستمر الخلايا الصغيرة بالأنقسام مكونة كتل جنينية clumps وتتكون هذه الكتل من نوعين من الخلايا ، خلايا وسطية وخلايا موجودة في المحيط الخارجي وتتميز بكونها مكونة من مجاميع من الخلايا المرستيمية النشطة جداً .
4- عند عزل هذه المجاميع المرستيمية أو الكتل الجنينية الفتية ونقلها إلى وسط خالي من الاوكسين تتكون العديد من الاجنة من الطبقة السطحية بحيث ينشأ جنين من كل خلية مفردة .
5- تمر الاجنة خلال المراحل المختلفة من النمو والتطور بنفس الاشكال التي تتميز بها الاجنة الجنسية الاعتيادية وهي :

أ- الطور الكروي Globular Stage

ب-الطور القلبي Heart Stage
جـ- الطور الطوربيدي Torpedo Stage
د- الطور الفلقي Cotyledonary Stage

بلوغ الأجنة الجسمية Embryo maturation

أن البلوغ هو الحدث النهائي لتكوين الأجنة وهو يتميز بما يلي : (في الأجنة الجنسية البذرية)

1- البلوغ الشكلي و المظهري للأجنة .
2- تجمع الكاربوهيدرات المخزنة والدهون والبروتينات
3- أختزال أو تقليل المحتوى المائي.
4- الأنخفاض التدريجي وتوقف عمليات الايض .

أما في حالة الأجنة اللاجنسية (الجسمية) فأنها لا تبلغ بالمقارنة مع الأجنة الجنسية وعادة يستمر النمو السريع للأجنة مؤدياً إلى الأنبات المبكر وأن النضج التام غير ضروري للحصول على نبات من الأجنة . كذلك فأن الأجنة اللاجنسية لا تحتوي على فترة سكون أو خمول بالمقارنة مع الاجنة الجنسية وعلى الرغم من ذلك فأن أنواع معينة من النباتات التي تحتاج بذورها إلى تعريض لدرجات حرارة منخفضة حتى تنبت تحتاج إلى تعريض الأجنة الناشئة الفتية والبالغة منها إلى برودة لضمان تطورها اللاحق إلى نباتات بشكل أعتيادي .

العوامل المؤثرة في تكوين الأجنة الجسمية :-

1- الأوكسين Auxin:- كما سبق ذكره فأن تطور الاجنة الجسمية من خلايا الجزر يمر بمرحلتين من الزراعة على وسط يحتوي على الاوكسين ثم المرحلة الثانية نقل الزروعات إلى وسط خال من الاوكسين ويبدو أن وجود الأوكسين ضروري في الوسط الاول (وسط التوالد) لكي تتمكن الأنسجة من تكوين الأجنة في الوسط الثاني (وسط نمو لأجنة) اذ أن الأنسجة التي تركت بصورة مستمرة على وسط خال من الاوكسين لم تتمكن من تكوين أجنة . الاوكسين الرئيسي المستعمل هو الـ 2,4-D بتراكيز تتروح بين 0.5 ولغاية 10 ملغم/لتر وقد يستعمل أنواع أخرى من الاوكسينات مثل الـ NOA و NAA والـ IBA والـ dicamba أو الـ picloram.

المحاضرات النظرية

2- مصدر النتروجين : يؤثر النتروجين الموجود في الوسط الغذائي بدرجة ملحوظة على تكوين الأجنة ، اذ لوحظ أن وجود النتروجين المختزل يعد ضرورياً فقط في وسط التحفيز (الوسط الاول) بحيث إذا نمي الكالس على وسط يحتوي على KNO_3 مع NH_4Cl فأنه سيكون أجنة بغض النظر عن وجود او غياب NH_4Cl في وسط التميز (الوسط الثاني) . كما ثبت أهمية وجود الـ NH_4^+ لتكوين الأجنة في مزارع الجزر .

تقانة البذور الصناعية Synthetic Seed Technology

البذرة الصناعية Synthetic (artificial) seed :- ممكن أن تعرف على انها جنين جسمي قد صمم للأستخدام العلمي في الأنتاج التجاري للنباتات . ويتم ذلك بخطوتين الاولى أنتاج الأجنة الجسمية من زراعة الأجزاء النباتية خارج الجسم الحي والثانية هو تغليف هذه الأجنة وإحاطتها بأغلفة خاصة تحافظ على محتواها الرطوبي وحيويتها لفترة طويلة من الزمن قد تصل إلى ستة أشهر ومن هذه المواد المستعملة هو Sodium alginate وتوضع في كبسولات خاصة ولهذه لتقنية أهمية في مجال الأنتاج التجاري لبعض المحاصيل مثل الخضر ذات الكلف العالية للبذور مثل الرقي عديم البذور وغيرها .

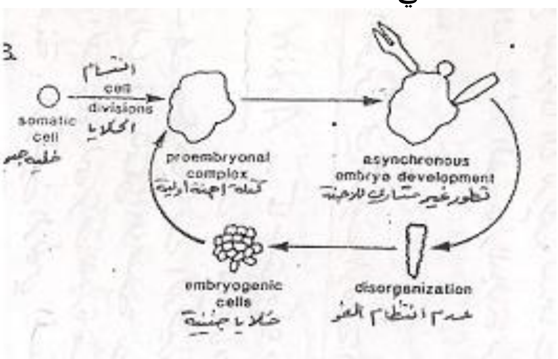
مقارنة بين الأجنة الجنسية واللاجنسية (الجسمية)

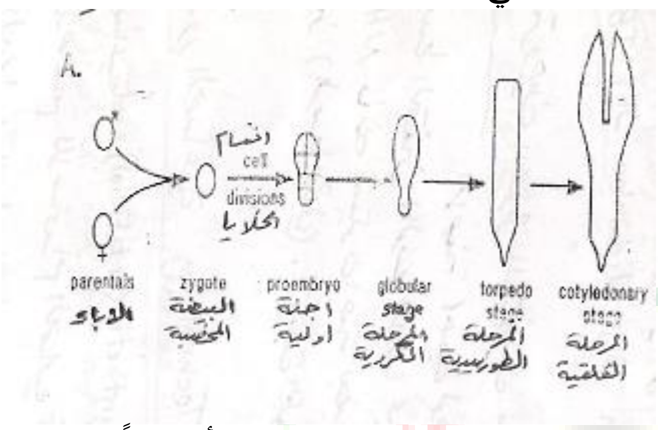
الأجنة اللاجنسية (الجسمية) Non zygotic embryo	الأجنة الجنسية Zygotic embryo

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

<table>
<tr>
<td>1- يمر بمراحل تطورية موضحة بالمخطط التالي


2- ينمو في مراحل المبكرة أعتماداً على الوسط الغذائي وليس له حبل سري ولا تحيط به السويداء ويكون عارياً
3- مرحلة البلوغ غير موجودة ويستمر بالنمو السريع.
4- غير خاضع لنظام تغذوي منظم ومتخصص
5- لا يمر بمرحلة سكون أو خمول قبل الأنبات</td>
<td>1- يمر بمراحل تطورية موضحة بالشكل التالي:-


2- ينمو في المراحل المبكرة أعتماداً على الغذاء الذي يحصل عليه من أنسجة الفلق أو نسيج السويداء عن طريق الحبل السري.
3- مرحلة البلوغ واضحة وتتضمن عدة تغيرات
4- خاضع لنظام تغذوي منظم ومتخصص
5- يمر بعد البلوغ أو النضج بمرحلة سكون قبل الانبات.</td>
</tr>
</table>

تكوين الأجنة الجسمية (اللاجنسية)

Non zygotic or Somatic Embryogenesis

أن قابلية النباتات المزهرة على تكوين الاجنة لا تنحصر فقط في تطور البيضة المخصبة بل يمكن للخلايا الجسمية المفصولة من أجزاء نباتية مختلفة أن تكون أجنة بعد زراعتها على أوساط غذائية صناعية . ولقد لوحظت ظاهرة تكوين الأجنة من خلايا جسمية لأول مرة في مزارع الخلايا المعلقة لنبات الجزر من قبل Steward وجماعته عام 1958 ، كما لوحظت في كالس الجزر المنمى على وسط مصلب بالآكار من قبل Reineret عام 1950.

وقد أستعملت هذه الطريقة في دراسة الخطوات التي تؤدي إلى تكوين الأجنة الجسمية خارج الجسم الحي في نباتات الحمضيات Citrus sp. والقهوة Coffea sp. وأكثر من 30 نوع نباتي .

المحاضرات النظرية

- **تتكون الأجنة الجسمية خارج الجسم الحي *in vitro* من ثلاثة أنواع من الخلايا الجسمية :**

4- الخلايا الجسمية (الخضرية) للنباتات البالغة .

5- خلايا الأنسجة التكاثرية غير البيضة المخصبة (Zygot)

6- السويقة الجنينية والفلق للأجنة والبادرات الفتية .

- تتكون الأجنة الجسمية في مزارع الخلايا ، الأنسجة والأعضاء النباتية أما بصورة مباشرة أو بصورة غير مباشرة.

3- نشوء الأجنة الجسمية مباشرةً Direct Somatic embryogenesis

تتكون الأجنة الجسمية في هذه الحالة من خلية أو مجموعة خلايا على الجزء النباتي مباشرةً ودون المرور بمرحلة الكالس . يمكن ملاحظة هذه الحالة في الحمضيات حيث تكون خلايا انسجة النيوسيلة (الجويزاء) أجنة تعرف بالأجنة النيوسيلية أو الأجنة الخضرية. وهناك بعض الحالات التي كونت فيها خلايا الجزء النباتي أجنة بشكل مباشر في نبات الفاصوليا وكذلك النخيل ومن البروتوبلاست المزروع لبعض الأنواع النباتية ، كذلك تم ملاحظة هذه الظاهرة عند زراعة المتوك وحبوب اللقاح لبعض الأنواع النباتية . وبصورة عامة تعتبر هذه الظاهرة نادرة الحدوث إذا ما قورنت بطريقة تكوين الأجنة غير المباشر. وتمتاز هذه الطريقة بكون النباتات الناتجة من أنبات الأجنة تكون على الأغلب متطابقة وراثياً مع الام أي ثباتها الوراثي يكون عالي ، وكذلك فأن الاجنة غير البالغة المتكونة تتصف أحياناً بالتبرعم وتكون أجنة أضافية . أن التوازن بين منظمات النمو النباتية المضافة للوسط الغذائي والمستوى الداخلي للهرمونات النباتية له دور رئيسي في عملية تحول الخلايا الجسمية المباشر إلى أجنة لاجنسية أو جسمية .

4- نشوء الأجنة الجسمية بطريقة غير مباشرة Indirect Somatic embryogenesis

في هذه الحالة تنشأ الاجنة الجسمية من خلايا نسيج الكالس المتكون على الأجزاء النباتية المزروعة . ويتم تحفيز تكوين الأجنة بصورة غير مباشرة بالخطوات التالية:

ت-تزرع الأجزاء النباتية في أوساط حاوية على تراكيز عالية من الاوكسينات مثل 2,4-D .

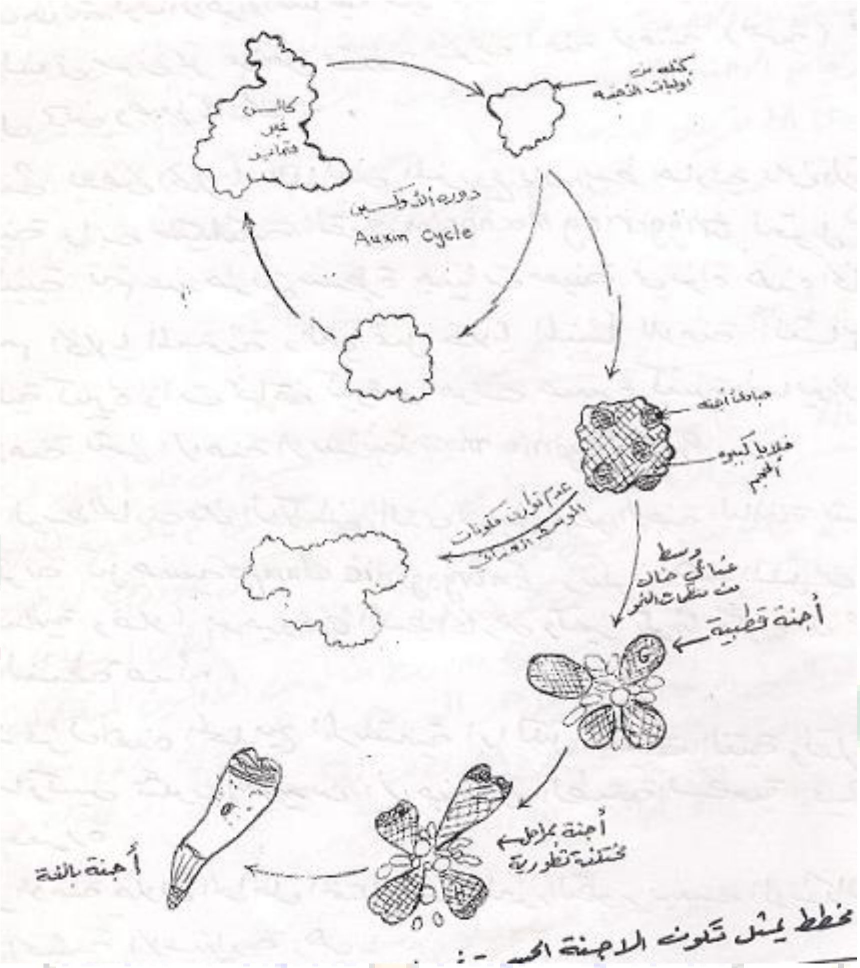
ث-بعد تكون الكالس على الأجزء النباتية ينقل الكالس إلى وسط غذائي آخر خالي من منظمات النمو وذلك لتحفيز نشوء أجنة ثنائية القطبية من أوليات الأجنة التي تكونت من خلايا الكالس في الوسط الاول.

جـ- تنقل مجاميع الأجنة بعد ذلك إلى أوساط غذائية آخرى لغرض بلوغ وانبات هذه الاجنة لتكوين نبيتات صغيرة .

عادة تشترك نسبة صغيرة من خلايا الجزء النباتي في تكوين الكالس ، وتقع هذه الخلايا في الطبقة السطحية للجزء النباتي وتكون بتماس فيزياوي مع الوسط . وقد تتكون أوليات الأجنة من خلايا مفردة أو مجموعة من الخلايا ، بعد نقل نسيج الكالس إلى وسط خال من منظمات النمو أو تحتوي على مستويات منخفضة منها تتطور أوليات الأجنة المتكونة اساساً إلى أجنة ثنائية القطبية Bipolar embryos في مراحل مختلفة من التطور شكل (1) ولا تستعمل هذه الطريقة في الأكثار الخضري على النطاق التجاري لأن الثبات الوراثي للنباتات الناتجة من هذه الطريقة مشكوك فيه .

منشأ الأجنة الجسمية (اللاجنسية) Origin of non zygotic embryos

على الرغم صعوبة تفسيرأو تحديد أصل الأجنة الجسمية (اللاجنسية) والتي تتطور من أجزاء نباتية مثل الأنسجة الأولية المعقدة نوعاً ما أو نسيج الكالس إلا أن الدلائل تشير إلى أن هذه الأجنة تنشأ عادة من خلية واحدة وليس من عدة خلايا ، اذ أن الأجنة المتطورة عادة من حبوب اللقاح أو البروتوبلاست تنشأ من خلية مفردة وليس من خلايا متعددة .
أن هذه الخاصية سوف تساعد كثيراً في تقانات الهندسية الوراثية وذلك بسبب كون الخلية التي يتم أدخال جينات معينة في مادتها الوراثية هي التي يجب أن تتطور إلى نبات بعد أن تتحول إلى خلية جنينية وأن التعديل الوراثي للخلية الجنينية هوالذي سوف يؤدي في النهاية إلى الحصول على نبات محور وراثياً.



شكل (1) مخطط يمثل الاجنة الجسمية في المزارع المعلقة لنبات الجزر

نشوء وتكوين الأجنة الجسمية (اللاجنسية) Initiation and Formation of S.E

في الأجزاء النباتية المعقدة تنشأ الاجنة اللاجنسية بصورة نموذجية فقط من الأنسجة الأكثر حداثة والمرستيمية وعلى سبيل المثال الأجنة الجنسية غير البالغة والسويقات الجنينية فوق لفلقية epicotyledon وتحت الفلقية Hypocotyledon والفلق المستاصلة من البذور غير الناتبة ، والاوراق الفتية والقمم النامية Shoot tips وحتى الجذور للنباتات المزروعة عادة ما تستخدم كأجزاء نباتية لأنشاء مزارع الأجنة وتعتمد أستجابة النبات لتكوين الأجنة على التركيب الوراثي ونوع الجزء النباتي المستخدم .

هناك العديد من المسالك التي بواسطتها ممكن أن تصبح الخلية الجسمية مباديء للأجنة وبشكل عام فأن أحتواء الجزء النباتي على أنسجة جنينية غير متمايزة مثل

أنسجة الأجنة غير البالغة فأن نشوء وادامة الكالس الجنيني من هذه الاجزاء سوف يشابه زراعة وأكثار أوليات الأجنة أي أن هذه الأنسجة تكون متقدمة خطوة أكثر في طريق تكوين الأجنة الجسمية وبالتالي فأن أسهل في الأكثار من الأنسجة الأخرى أما في حالة كون الأجزاء النباتية غير محتوية على خلايا جنينية فأن ذلك يعني أن خلايا أنسجة الجزء النباتي سوف تمر بمراحل مختلفة لتكوين أجنة لاجنسية (جسمية) في النهاية . أن هذه المراحل يمكن وصفها كما يلي :-

6- تستحث بعض خلايا الكالس المزروع على وسط حاوي على الأوكسين لتكوين أوليات الأجنة وأن ميكانيكية القدح triggering mechanism لتحويل هذه الخلايا إلى خلايا جنينية تتم عن طريق سيطرة جينات معينة في نواة هذه الخلايا .

7- تنقسم الخلايا المستحثة والتي تمثل خلايا المنشأ للاجنة أنقسام غير متساوي منتجة خلية كبيرة ذات فجوات وأخرى صغيرة كثيفة السايتوبلازم لها القابلية على تكوين الأجنة تسمى الأجنة الأبتدائية Pro-embryonic masses .

8- في الوسط الحاوي على الأوكسين والذي لا يسمح بتطور الأجنة البالغة تستمر الخلايا الصغيرة بالأنقسام مكونة كتل جنينية Embryogenesis clumps وتتكون هذه الكتل من نوعين من الخلايا ، خلايا وسطية وخلايا موجودة في المحيط الخارجي وتتميز بكونها مكونة من مجاميع من الخلايا المرستيمية النشطة جداً .

9- عند عزل هذه المجاميع المرستيمية أو الكتل الجنينية الفتية ونقلها إلى وسط خالي من الاوكسين تتكون العديد من الاجنة من الطبقة السطحية بحيث ينشأ جنين من كل خلية مفردة .

10- تمر الاجنة خلال المراحل المختلفة من النمو والتطور بنفس الاشكال التي تتميز بها الاجنة الجنسية الاعتيادية وهي :

ت-الطور الكروي Globular Stage

ث-الطور القلبي Heart Stage

جـ- الطور الطوربيدي Torpedo Stage

ذ- الطور الفلقي Cotyledonary Stage

بلوغ الأجنة الجسمية Embryo maturation

أن البلوغ هو الحدث النهائي لتكوين الأجنة وهو يتميز بما يلي : (في الأجنة الجنسية البذرية)

5- البلوغ الشكلي و المظهري للأجنة .

6- تجمع الكاربوهيدرات المخزنة والدهون والبروتينات
7- أختزال أو تقليل المحتوى المائي.
8- الأنخفاض التدريجي وتوقف عمليات الايض .

أما في حالة الأجنة اللاجنسية (الجسمية) فأنها لا تبلغ بالمقارنة مع الأجنة الجنسية وعادة يستمر النمو السريع للأجنة مؤدياً إلى الأنبات المبكر وأن النضج التام غير ضروري للحصول على نبات من الأجنة . كذلك فأن الأجنة اللاجنسية لا تحتوي على فترة سكون أو خمول بالمقارنة مع الاجنة الجنسية وعلى الرغم من ذلك فأن أنواع معينة من النباتات التي تحتاج بذورها إلى تعريض لدرجات حرارة منخفضة حتى تنبت تحتاج إلى تعريض الأجنة الناشئة الفتية والبالغة منها إلى برودة لضمان تطورها اللاحق إلى نباتات بشكل أعتيادي .

العوامل المؤثرة في تكوين الأجنة الجسمية :-

3- الأوكسين Auxin:- كما سبق ذكره فأن تطور الاجنة الجسمية من خلايا الجزر يمر بمرحلتين من الزراعة على وسط يحتوي على الاوكسين ثم المرحلة الثانية نقل الزروعات إلى وسط خال من الاوكسين ويبدو أن وجود الأوكسين ضروري في الوسط الاول (وسط التوالد) لكي تتمكن الأنسجة من تكوين الأجنة في الوسط الثاني (وسط نمو لأجنة) اذ أن الأنسجة التي تركت بصورة مستمرة على وسط خال من الاوكسين لم تتمكن من تكوين أجنة . الاوكسين الرئيسي المستعمل هو الـ 2,4-D بتراكيز تتروح بين 0.5 ولغاية 10 ملغم/لتر وقد يستعمل أنواع أخرى من الاوكسينات مثل الـ NOA و NAA والـ IBA والـ dicamba أو الـ picloram.

4- مصدر النتروجين : يؤثر النتروجين الموجود في الوسط الغذائي بدرجة ملحوظة على تكوين الأجنة ، اذ لوحظ أن وجود النتروجين المختزل يعد ضرورياً فقط في وسط التحفيز (الوسط الاول) بحيث إذا نمي الكالس على وسط يحتوي على KNO_3 مع NH_4Cl فأنه سيكون أجنة بغض النظر عن وجود او غياب NH_4Cl في وسط التميز (الوسط الثاني) . كما ثبت أهمية وجود الـ NH_4^+ لتكوين الأجنة في مزارع الجزر .

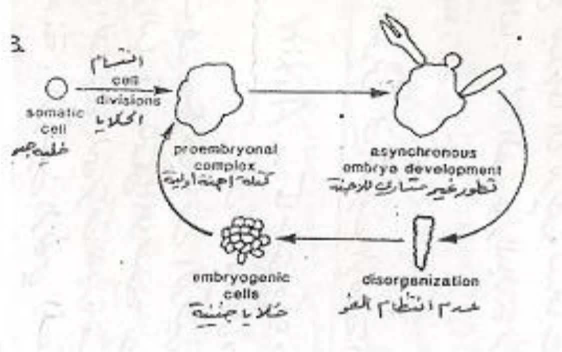
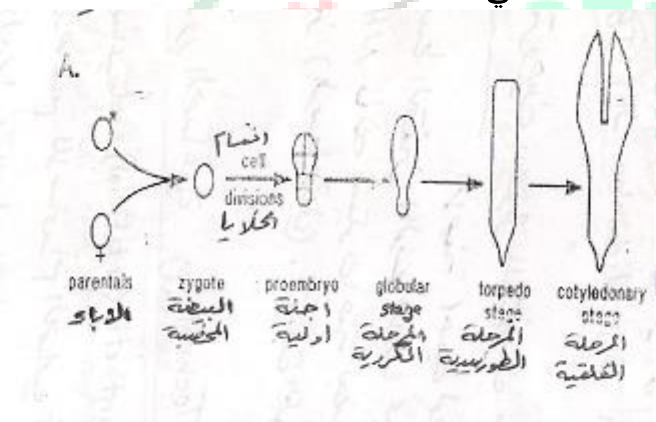
تقانة البذور الصناعية Synthetic Seed Technology

البذرة الصناعية Synthetic (artificial) seed:- ممكن أن تعرف على انها جنين جسمي قد صمم للأستخدام العلمي في الأنتاج التجاري للنباتات . ويتم ذلك بخطوتين الاولى أنتاج الأجنة الجسمية من زراعة الأجزاء النباتية خارج الجسم الحي

المحاضرات النظرية

والثانية هو تغليف هذه الأجنة وإحاطتها بأغلفة خاصة تحافظ على محتواها الرطوبي وحيويتها لفترة طويلة من الزمن قد تصل إلى ستة أشهر ومن هذه المواد المستعملة هو Sodium alginate وتوضع في كبسولات خاصة ولهذه لتقنية أهمية في مجال الأنتاج التجاري لبعض المحاصيل مثل الخضر ذات الكلف العالية للبذور مثل الرقي عديم البذور وغيرها .

مقارنة بين الأجنة الجنسية واللاجنسية (الجسمية)

الأجنة اللاجنسية (الجسمية) Non zygotic embryo	الأجنة الجنسية Zygotic embryo
6- يمر بمراحل تطورية موضحة بالمخطط التالي 	6- يمر بمراحل تطورية موضحة بالشكل التالي:- 
7- ينمو في مراحل المبكرة أعتماداً على الوسط الغذائي وليس له حبل سري ولا تحيط به السويداء ويكون عارياً	7- ينمو في المراحل المبكرة أعتماداً على الغذاء الذي يحصل عليه من أنسجة الفلق أو نسيج السويداء عن طريق الحبل السري.
8- مرحلة البلوغ غير موجودة ويستمر بالنمو السريع.	8- مرحلة البلوغ واضحة وتتضمن عدة تغيرات
9- غير خاضع لنظام تغذوي منظم ومتخصص	9- خاضع لنظام تغذوي منظم ومتخصص
10- لا يمر بمرحلة سكون أو خمول قبل الأنبات	10- يمر بعد البلوغ أو النضج بمرحلة سكون قبل الانبات.

زراعة أنسجة نباتية / نظري

تطبيقات تقانة زراعة الانسجة النباتية Plant Tissue Culture Application

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

أولاً :- الأكثار الدقيق للنبات Plant Micropropagation

من أكثر أستعمالات زراعة الأنسجة النباتية في الوقت الحاضر هو أكثار النباتات خضرياً وعلى نطاق تجاري وهناك الآن المئات من الأنواع النباتية يمكن أكثارها بواسطة هذه الطريقة وأولى المحاولات بهذا الاتجاه جرت عام 1950 من قبل Morel الذي اوضح امكانية استعمال أطراف الافرع لأنتاج نباتات خالية من الامراض الفايروسية من الداليا والقرنفل البطاطا .

وقد بينت التقانة المتبعة في أكثار النباتات خضرياً بوساطة زراعة الانسجة النباتية على ضوء الاسس التالية :

1- ظاهرة اعادة التكوين في الخلايا النباتية بفعل الطاقة الكامنة للتطور Totipotency.
2- إمكانية الحصول على نباتات عديدة لزراعة أجزاء صغيرة من النباتات وفقاً لما يلي :

أ _ تشجيع التمايز إلى أجنة جسمية (لا جنسية) متعددة Somatic embryogenesis من نسيج الكالس المتكون على الاجزاء النباتية المزروعة أو من الاجزاء النباتية مباشرةً

ب _ تشجيع التمايز إلى الأجذع والجذور من أنسجة الكالس المتكونة على الجزء النباتي

جـ _ تحفيز نشوء البراعم العرضية Adventitious buds على الأجزاء النباتية المزروعة خاصة في الانواع التي تكون مثل هذه البراعم في الطبيعة.

د _ تحفيز نمو البراعم الأبطية Enhance axillary branching بعد القضاء على ظاهرة السيادة القمية Apical dominance

- **إن أهم ما يميز هذه الطريقة في الأكثار عند الطرق التقليدية المتبعة هو ما يلي :**

1- إمكانية إنتاج أعداد كبيرة جداً من النباتات بأستعمال أجزاء صغيرة من النبات الأم وخلال فترة قصيرة نسبياً
2- الأنتاج على مدار السنة ودون التقييد بالمواسم بسبب سهولة السيطرة على الظروف البيئية في أماكن الاكثار.
3- الأكثار الخضري للنباتات التي يصعب أكثارها خضرياً بالطرق التقليدية .
4- تجنب المحافظة على الصفات الوراثية للنباتات المكثرة .

5- تجنب التدهور الذي قد يصيب النباتات المكثرة بالطرق التقليدية بسبب الاصابة بالامراض المختلفة خاصة الامراض الفايروسية .
6- الأقتصاد في المساحة المخصصة للأكثار.

- مراحل الأكثار الدقيق للنبات Plant Micropropagation Stages :-

هناك أربع مراحل رئيسية تتبع عادةً عند أكثار النباتات بزراعة الأنسجة وهي :
1- المرحلة الأولى : تسمى مرحلة انشاء الزراعة النسيجية Initiation Stage
2- المرحلة الثانية : تسمى مرحلة التضاعف وأكثار الزراعات Multiplication Stage
3- المرحلة الثالثة : تسمى مرحلة تجذير الأفرع الناتجة من المرحلة الثانية Rooting Stage
4- المرحلة الرابعة : تسمى مرحلة الاقلمة والنقل للتربة Acclimitzation and transfer to Soil

- المرحلة الأولى :- مرحلة إنشاء الزراعة النسيجية :

يتم في هذه المرحلة أختيار الجزء النباتي الذي سيستعمل في الأكثار Explant ومن ثم تعقيم هذا الجزء وزراعته في ظروف معقمة بغية الحصول على إستجابة معينة وحسب الهدف من الزراعة وهي في هذه الحالة الحصول على نمو بسيط للجزء النباتي الذي سيتم أكثاره في المراحل اللاحقة . وتستغرق هذه المرحلة 2-8 أسبوع حسب نوع النبات.

أ- أختيار الجزء النباتي :-

أن طبيعة الجزء النباتي المستعمل في أكثار النباتات يعتمد بدرجة رئيسية على طريقة الأكثار المتبعة . فمثلاً لغرض زيادة الحصول على أفرع جانبية يتم أستعمال أجزاء نباتية تحتوي على براعم خضرية كاملة . وإذا كان الهدف هو أنتاج نباتات خالية من الأمراض الفايروسية يجب أستعمال أجزاء من القمة النامية أما إذا كان النبات الأم خالياً من الأمراض الفايروسية فيتم أستعمال أجزاء من الساق بطول عقدة واحدة . ويعتمد أختيار الجزء النباتي الذي سيستعمل للأكثار كمصدر للأنسجة المزروعة على أساس قابليته على تكوين البراعم عرضية وفي نباتات ذوات الفلقة الواحدة تقع المرستيمات للاوراق الحراشف في النهاية المورفولوجية حيث تربط

بالصفيحة القاعدية لذلك يجب أن تحتوي الأجزاء النباتية المفصولة من قوعد الاوراق أو قواعد الحراشف على جزء صغير من الصفيحة القاعدية .

ويجب أن يتصف الجزء النباتي الذي يتم أختياره بكونه خضري لضمان تشابهه مع النبات الام وبالتالي تشابه النباتات التي سوف تتوالد منه مع النبات الام كما يجب أن يتصف بتوفره وسهولة تعقيمه وأن تكون أنسجته فتية وغضة قدر الأمكان ويفضل أجراء بعض المعاملات على النبات المصدر Donor plant مثل الرش بمنضمات النمو كالـ BA أو الـ GA_3 وبعض المغذيات لزيادة أستجابة الأجزاء المأخوذة منه للزراعة خارج الجسم الحي.

ب- التعقيم :-

بعد أختيار الجزء النباتي يتم تعقيمه قبل زراعته على الوسط الملائم ، حيث يتم غسله بواسطة المحاليل المطهرة مثل هايبوكلورات الصوديوم أو كلوريد الزئبق أو معاملته بالحراة أو المضادات الحيوية وكما مر ذكره في موضوع التعقيم.

ج -زراعة الأجزاء النباتية في الوسط الغذائي :-

بعد الأنتهاء من عمليات التعقيم تنقل الأجزاء النباتية إلى الوسط الغذائي والذي يكون صلباً أو سائلاً ، عند أستعمال أوساط صلبة توضع الأجزاء أفقياً ثم تضغط برفق على سطح الآكار وذلك لضمان حدوث تماس جيد مع سطح الوسط وعند وضع الأجزاء عمودياً يجب وضع ثلثها داخل الوسط ، وتوجد عدة عوامل تؤثر على نجاح زراعة الاجزاء النباتية في الوسط الغذائي :-

1- درجة غمرها بالوسط الغذائي فكلما غمرت بالوسط كلما قلت كمية الاوكسجين المجهز .
2- نوع الغطاء المستعمل لغلق فوهة وعاء الزراعة حيث يؤثر ذلك على التبادل الغازي بين محيط الاوعية الداخلية والخارج .
3- النسبة بين الحجم الظاهري للجزء النباتي وكمية الوسط . ويفضل زراعة عدة أجزاء نباتية في وعاء واحد .

المرحلة الثانية :- مرحلة التضاعف وأكثار الزروعات :-

تعتبر هذه المرحلة من مراحل الاكثار المهمة والحرجة حيث يقرر فيها نجاح أو فشل عملية الاكثار كما يعتمد عليها عدد النباتات لكلية الناتجة وكذلك نوعيتها وفي هذه المرحلة يتم أكثار الجزء الذي تمت زراعته في المرحلة الاولى وتبدء مرحلة

أكثاره إلى العدد المطلوب وهناك ثلاثة طرق مختلفة لأكثار الجزء النباتي المستعمل وهي :

1- تكوين البراعن العرضية **Adventitious bud formation**

البراعم العرضية هي تلك البراعم التي تنشأ في غير أماكنها الاعتيادية (البراعم الطرفية أو القمة النامية والبراعم الابطية في آباط الاوراق). فمن الممكن تشجيع تكوين هذه البراعم مباشرةً من أي جزء نباتي (بدون المرور أو تكوين نسيج الكالس).

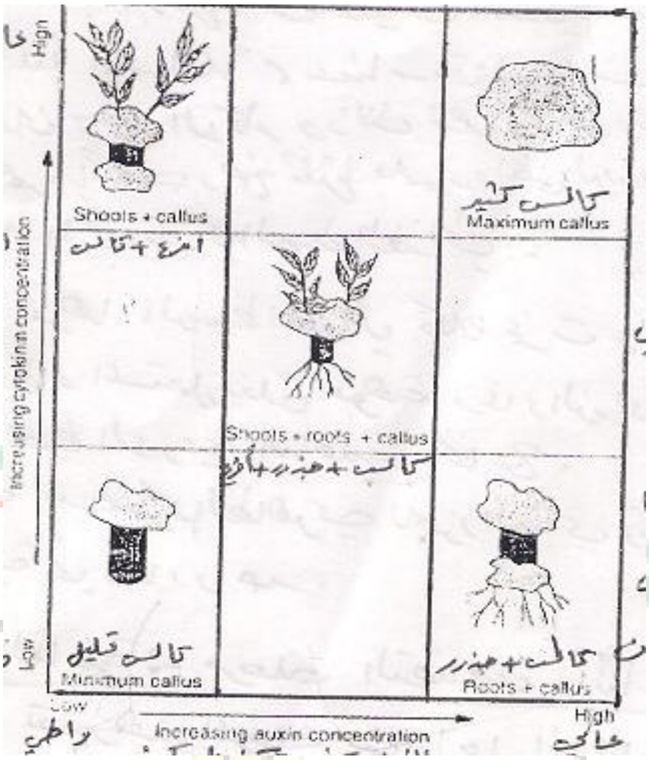
هنالك العديد من النباتات والتي تكون براعم عرضية في الطبيعة مثل نبات الفلوكس وبعض السلالات الخضرية للتفاح وبعض الابصال كالهايسنت وبعض النباتات الورقية كما في البيكونيا والبنفسج الافريقي والببروميا pepromia .

أما في زراعة الانسجة النباتية فأن هذه الطريقة تعتمد اساساً على تشجيع نمو البراعم العرضية من الاجزاء النباتية المستعملة بزراعتها تحت ظروف معقمة وفي أوساط ملائمة حيت يتم الحصول على أفرع منها . وقد اتبعت هذه الطريقة في أكثار العديد من النباتات الوحيدة الفلقة مثل نخيل التمر وبأستخدام القمم النامية وكذلك في أبصال الهايسنت والليلم بزراعة الحراشف وأبصال النرجس وكذلك نباتات ذوات الفلقتين مثل نباتات البيكونيا وبأستخدام الاجزاء الورقية والتفاح والعنب وكذلك نباتات معراة البذور التي وجد أن لبعضها القابلية على تكوين البراعم مباشرة مثل الدافليا وقرن الغزال وبالأضافة إلى تكوين البراعم العرضية مباشرةً على الأجزاء النباتية فمن الممكن تشجيع تكوينها من أنسجة الكالس في أوساط غذائية محددة لتنمو فيما بعد إلى سيقان يمكن تجذيرها بسهولة أو تعتمد هذه الطريقة من طرق الأكثار على تنظيم نشوء السيقان والجذور بواساطة الاوكسينات والسايتوكاينينات كما تم وصفه من قبل Skoog و Miller عام 1957 في كالس التبغ فلدى زراعة انسجة الكالس في وسط غذائي مجهز بكمية من الاوكسين أعلى من السايتوكانين فأن ذلك يؤدي إلى أستحداث الجذور من الكالس . أما إذا كان الوسط مجهز بتراكيز عالية من السايتوكنين وواطئة من الاوكسين فأن ذلك يحفز نشوء السيقان أو الافرع وبتنظيم هذه العملية وحسابها لكل نوع من النباتات فأن ذلك سوف يؤدي إلى أخلاف أفرع عديدة يمكن فصلها عن بعض وتجذيرها بصورة منفردة (شكل 1).

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية



شكل (1) :- تكوين الكالس والافرع والجذور من الجزء النباتي المزروع في أوساط حاوية على تراكيز مختلفة من الاوكسين والاسايتوكاينين

وعلى الرغم من شيوع هذه الطريقة من الاكثار إلا انه يعاب عليها مرورها بمرحلة الكالس وبالتالي أحتمالية حصول تضاعف في عدد الكروموسومات Poly polidization خصوصاً بعد عدة مرات من تقطيع الكالس لفترات طويلة وبالتالي الحصول في النهاية على نباتات غير متجانسة مظهرياً .

أما الطريقة الاولى وهي تكوين البراعم المباشر ودون المرور بمرحلة الكالس فأن الثبات الوراثي للنباتات الناتجة يكون عالي والنباتات الناتجة عموماً تكون متجانسة ومشابهة للنبات الام الذي اشتقت منه ولكن من عيوبها انه في حالة أستخدامها في الانواع أو الاصناف التي فيها كايميرا Chimera وراثية فأن الاكثار بهذه الطريقة سوف يؤدي إلى أختلاف النباتات الناتجة وفقدانها لهذه الطفرة .

الكايميرا :- هي عبارة عن طفرة نسيجية تحدث في نسيج معين ويصبح يختلف عنه النسيج المجاور له فتصبح هناك حالة من التبرقش في نباتات الزينة مثلاً تكون ذات جمالية وقيمة أقتصادية.

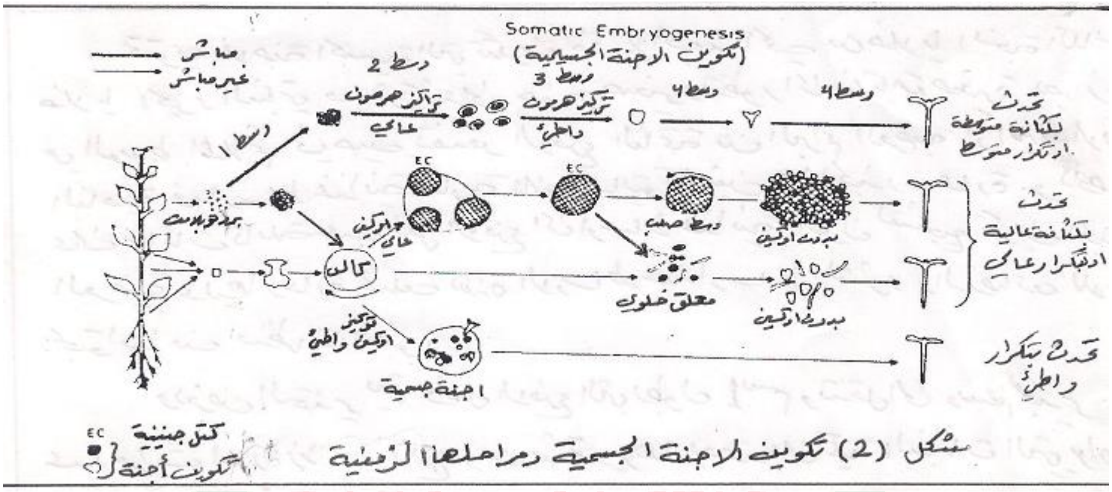
2- تكوين الأجنة الجسمية (اللاجنسية) Somatic or Non-zygotic Embryogenesis

ويتم تكوين الأجنة الجسمية أما بشكل مباشر من الأنسجة المزروعة أو بشكل غير مباشر من خلال تكوين أنسجة الكالس ومن ثم الحصول على الكالس الجنيني Wmbryogenic callus وعند نقل هذا الكالس إلى أوساط غذائية مشابهة للأوساط التي تكونت فيها الأجنة الأولية فأن هذه الأجنة تتطور وتنمو ومن الممكن عزلها وزراعتها لغرض انباتها . وتعد طريقة نشوء الأجنة الجسمية من الكالس من أسرع الطرق وأكثرها شيوعاً فضلاً عن الاعداد الهائلة من النباتات التي يمكن أنتاجها بهذه الطريقة وقد تمكن الباحثون في هذا المضمار من أكثار أنواع عديدة من النباتات وأصبح بالامكان أكثار نباتات الزينة والخضروات وبأعداد كبيرة جداً إلا أنه يعاب على هذه الطريقة من طرق الأكثار مرورها بمرحلة الكالس وأحتمال حصول تغاير وراثي على عكس طريقة تكوين الأجنة المباشرة حيث تمتاز بثبات وراثي عالي للنباتات الناتجة (شكل 2).

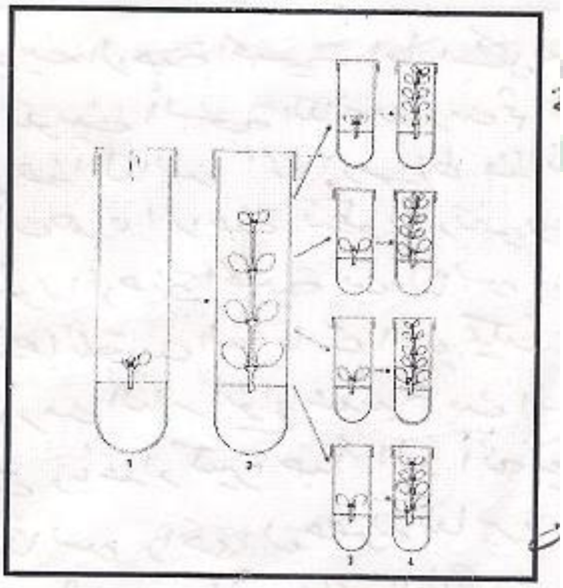
3- تحفيز التفرعات الجانبية (الأبطية) Inhancement of Axillary Branching

تعتمد هذه الطريقة اساساً على القضاء على ظاهرة السيادة القمية وذلك لتحفيز نمو البراعم الأبطية . فقد وجد أن أضافة تراكيز عالية من السايتوكاينين إلى الوسط الغذائي يؤدي إلى التغلب على ظاهرة السيادة القمية وتبدأ البراعم الأبطية بالنمو والتطور إلى سيقان يمكن عزلها وتجذيرها بصورة منفردة على أوساط غذائية محددة . وهذه الطريقة سريعة وكفوءة حيث يمكن الأستمرار بعمليات عزل السيقان وهكذا إلى أن يتم الحصول على العدد المطلوب من الأفرع . عندئذ يمكن نقل هذه الأفرع إلى أوساط التجذير للحصول على شتلات كاملةوتستخدم هذه الطريقة في أكثار الشليك Strawberry وبعض أنواع النباتات .

المحاضرات النظرية



وفي بعض لأنواع من النباتات لا يمكن التغلب على ظاهرة السيادة القمية بأضافة الهرمونات إلى الوسط الغذائي لذا فأن الفرع الناتج من البرعم الموجود على الجزء النباتي يكون غير متفرع (شكل 3) . أن معدل التضاعف في هذه الحالة يعتمد على عدد العقد المتكونة من نمو هذا الفرع حيث يتم فصل العقد وأعادة زراعتها على أوساط جديدة وتستخدم هذه الطريقة في تضاعف زروعات البطاطا Potato . أن هذه الطريقة أبطأ من الطريقة الأولى (البراعم العرضية) والثانية (الأجنة الجسمية) لكن بنهاية كل مرحلة من مراحلها يزداد عدد الأفرع لوغارتيمياً وبذا نستطيع الحصول على أعداد هائلة خلال سنة واحدة.



شكل (3): تضاعف الأفرع عن طريق زيادة طول الفرع وتكوين عقد جديدة وأعادة زراعتها للحصول على تضاعف خضري

المحاضرات النظرية

لقد شاع أستعمال هذه الطريقة في أكثار النباتات في الوقت الحاضر بسبب التغايرات الوراثية في النباتات المكثرة بهذه الطريقة . أضافة إلى ذلك فأن تكوين البراعم العرضية تتطلب وجود قابلية طبيعية في الجزء النباتي وهي حالة تفتقر إليها العديد من النباتات ذات الأهمية الأقتصادية .

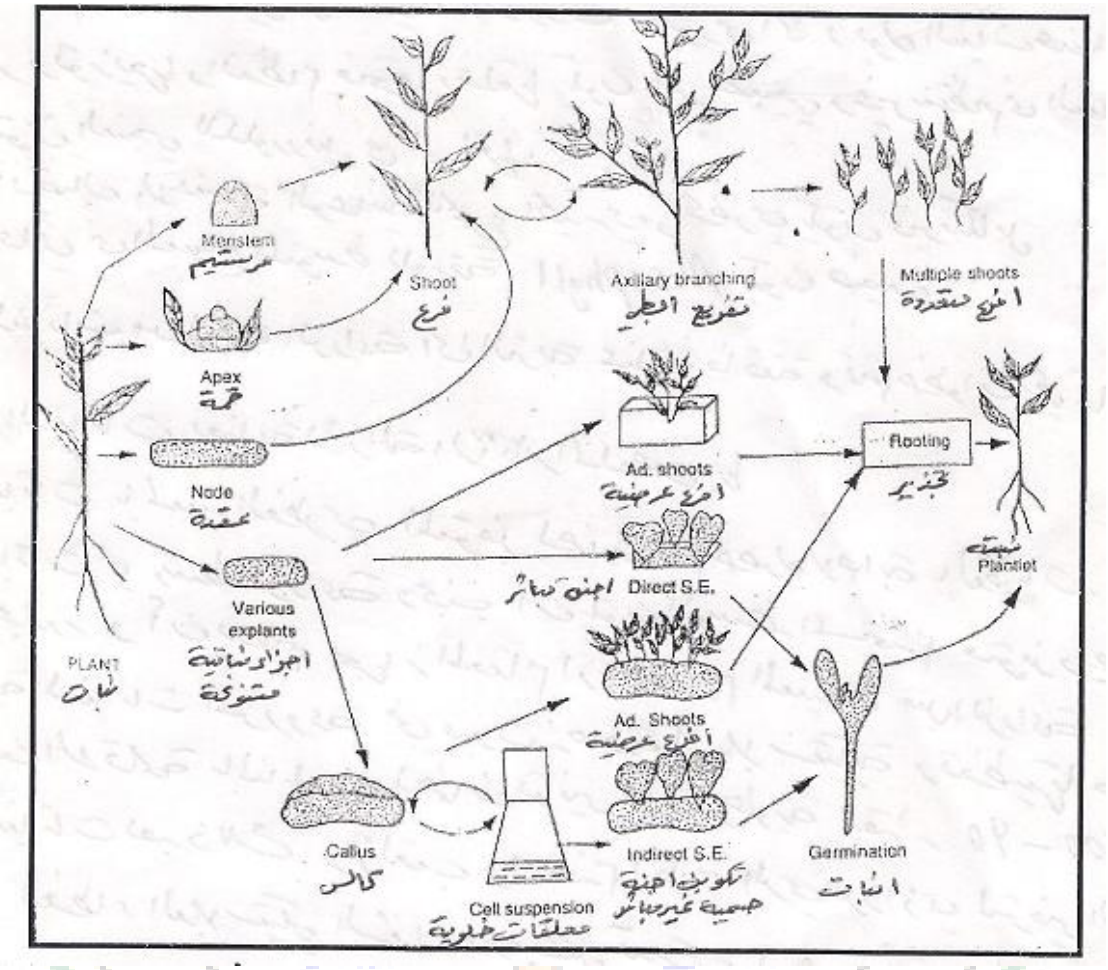
المرحلة الثالثة : مرحلة تجذير الأفرع الناتجة Rooting Stage

تحتوي الأجنة الجسمية التي تتكون خارج الجسم الحي من خلايا أنسجة الكالس أو خلايا الجزء النباتي مباشرةً على جذير صغير وتتطور إلى نباتات صغيرة بعد زراعتها في الوسط الملائم في حين تفتقر الأفرع الناتجة من البراعم العرضية أو البراعم الأبطية النامية في أوساط غذائية حاوية على السايتوكاينين إلى الجذور عادة . وللحصول على نباتات كاملة يجب نقل الأفرع إلى أوساط غذائية أخرى لتشجيع تكوين الجذور العرضية عليها وعادة تختلف هذه الأوساط عند أوساط النشوء والتضاعف للأفرع بمحتوياتها من منظمات النمو.
ولغرض التجذير يتم فصل الأفرع التي بطول مناسب وتنقل إلى وسط التجذير . أن عدد مرات أعادة زراعة الأفرع ومن ثم تجذيرها يعتمدعلى كمية النباتات التي يراد أنتاجها والأمكانيات المتوفرة في المختبر . وفي بعض لنباتات يمكن معاملة الأفرع الناتجة من مرحلة التضاعف كعقل صغيرة ويتم تجذيرها خارج الوسط الغذائي بعد معاملة قواعدها بمسحوق من الـ IBA وزراعتها في سنادين . كما يمكن تجذير الأفرع الناتجةمباشرة في التربة أو في أوساط التجذير وبأستخدام الري الرذاذي المتقطع والتغطية بالبلاستيك الشفاف ويعتمد هذا الأسلوب على نوع النبات فليس كل الأنواع النباتية تستجيب لهذه المعاملات ومن النباتات التي تم تجذيرها بهذه الطريقة هي أصول التفاح والشليك والجربرا والبطاطا والـ Rhododendron ومن مزايا هذه الطريقة :-

أ- أن الجذور الناتجة تكون أكثر كفاءة وأكثر عدداً وبالتالي النباتات تكون أقوى وأكثر تجانساً .

ب-تجنب الصدمة الناتجة من عملية الأقلمة والنقل لتربة.

ت-أختزال مرحلة كاملة من مراحل الأكثار وبالتالي نقلل تكاليف الأنتاج.



شكل (4) : مخطط يوضح مراحل وخطوات الاكثار الدقيق بأستخدام أجزاء نباتية متنوعة

المرحلة الرابعة : مرحلة الأقلمة والنقل للتربة

Aclimatization and transferto soil

أن النجاح النهائي للأكثار الدقيق للنبات بواساطة زراعة الأنسجة النباتية كوسيلة تجارية يعتمد على النقل الناتج للنبيتات الناتجة من المختبر إلى الحقل الخارجي ، حيث تمثل هذه المرحلة تحول النبات من التغذية الرمية Heterotrophlc المعتمدة على الوسط الغذائي إلى التغذية الذاتية Autotrophic أي القيام بعملية التركيب الضوئي والعيش معتمدة على نفسها. أن نمو النبيتات مختبرياً في أوعية الزراعة Culture Vessels والتي تصل نسبة الرطوبة إلى 100% تقريباً سيؤدي إلى ظهور بعض الاختلافات في الخواص الفسلجية والتشريحية التي تؤثر في قابلية هذه

النبيتات في القيام ببعض الوظائف الحيوية مقارنة بالنبات المنتج في الظروف الطبيعية ومن هذه الأختلافات :

1- أختزال أو انعدام طبقة الكيوتكل المحيطة بالأوراق مما يؤدي إلى ذبول النبات عند النقل للحقل مباشرةً
2- عدد الثغور وتوزيعها ونظام فتحها وغلقها يكون غير منتظم في النباتات النسيجية.
3- إنخفاض المحتوى النسبي للكلوروفيل في أوراقها.
4- أرتباط أو أتصال الأنسجة الوعائية للمجموع الجذري والخضري غير متكامل
5- التمايز الوعائي في النسيج المتوسط للورقة Mesophyll يكون ضعيف .

- **يحتاج نقل النباتات من أوعية الزراعة إلى التربة عناية فائقة وتتم خطواتها كما يلي :-**

1- غسل جذور بعناية لأزالة الآكار الملتصق بها.
2- معاملة النباتات بالمبيد الفطري المتوفر لضمان عدم حصول الأصابة بالفطريات.
3- زراعة النباتات في وسط الزراعة ويجب أن يكون الوسط المستخدم متوفر ويضمن تهوية جيدة للجذور وأن يعقم بجهاز المعقام أو بأستخدام المبيدات قبل الزراعة.
4- وضع أوعية النباتات المزروعة في بيوت زجاجية أو بلاستيكية وتغطيتها خلال الاسابيع الأولى من الأقلمة بالنايلون لضمان توفير نسبة رطوبة بمقدار 90-100%.
5- تراعى النباتات بعد ذلك وتراقب ويستخدم نظام الري الرذاذي لتوفير الرطوبة الملائمة
6- يتم رفع الغطاء البلاستيكي الشفاف وبشكل تدريجي أو عمل ثقوب فيه للسماح بنفوذ الهوء.
7- بعد عدة أسابيع تنقل النباتات إلى أحواض البيت الزجاجي وتظلل وتجرى عليها عمليات الخدمة المختلفة من ري وتسميد مع مراعاة الرش الدوري بالمبيدات الفطرية لضمان سلامتها.

زراعة الخلايا المعلقة Cell suspension culture

تعريفها :- هي عبارة عن خلايا نباتيه مفردة أو تجمعات بشكل كتل خلويه كبيرة أو صغيرة نامية في الأوساط الغذائيه السائلة.

المحاضرات النظرية

ويمكن القول ان التقنية المتبعة في زراعة المعلقات الخلوية النباتية هي نفسها المتبعة في نمو الاحياء المجهرية في اوساط غذائية سائلة ، ألا انه من الصعوبة بمكان الحصول على مزارع خلوية أحادية الخلايا كما هو الحال بالنسبة للاحياء المجهرية وأنما يكون خليط من خلايا مفردة او تجمعات خلوية كبيرة أو صغيرة، ومن اولى الملاحظات حول هذا الموضوع هو ماذكره Muir وجماعته 1954 حول امكانية زراعة خلايا التبغ على شكل معلقات خلوية في اوساط غذائية سائلة . وقد امكن الحصول بنجاح على معلقات خلوية للجزر والكرفس ونبات الجميز خلال السبعينيات من القرن الماضي.

أهمية نظام الزراعة المعلقة :-

1- توفر نظاماً جيداً لدراسة نمو الخلايا النباتية وتخصصها لان الخلايا المعلقة تتكون من خلايا معزولة او كتل خلويه متشابهة لحد ما فسلجياً وحيوياً مما يسهل دراستها .

2- توفر هذه التقنيه مجالا كبيراً لتتبع أنقسام الخلايا المفردة وتوسعها والتي لايمكن تتبعها في تقنية زراعة الأنسجة النباتية والكالس .

3-توفر نظاماً جيداً لانتاج المواد الثانوية Secondary Metabolits وأستخلاصها خارج الجسم الحي.

4- الخلايا الناميه في هذا النوع من المزارع تعاني من تحول في عملياتها البنائيه والايضية ومعدل نموها وتكون مايسمى بالخطوط الخلوية cell lines

وأهم مميزات الخطوط الخلوية هي :-

1- درجة عالية من تفكك الخلايا وانفصال تجمعاتها.
2- متجانسة ومتشابهة مظهرياً .
3- أنوية مميزة وسايتوبلازم كثيف
4- تجمع حبيبات النشا فيها
5- فقدانها لطاقتها الكامنة للتطور Totipotency
6- مقدرتها على النمو والتكاثر بغياب الهرمونات النباتية Habituation
7- زيادة المتضاعفات الكروسومية polyploidy فيها

Habituation :- هو قدرة الخلايا والانسجة على النمو بغياب منظمات النمو والهرمونات النباتية بعد تنميتها عليها لفترة زمنية معينة . وتحدث في الزراعة خارج الجسم الحي *In vitro* culture .

الخلايا في المزارع الخلوية لها اشكال مختلفة من ناحية الحجم والشكل ، والفعالية الايضية . وهذه الخاصية تظهر بعض المعوقات في دراسة تطور الخلايا .
وكما هو الحال بالنسبة لانسجة الكالس فأن التعدد الكروموسومي Polypolidy والأشكال غير الطبيعية للكروموسومات تكون ظاهرة في المزارع الخلوية ويعود ذلك اساساً الى الخلايا المختلفة المكونة للمزارع الخلوية . ويوضح الشكل (1) أشكال لخلايا وتجمعات المزارع الخلوية للجزر .

شكل (1) يبين خلايا مفردة وتجمعات خلوية عديدة من المزارع الخلوية لنبات الجزر

أستحداث المزارع الخلوية Initiation of suspension culture

تستعمل عادة انسجه مختلفة من اجل استحداث المزارع الخلوية وهي الكالس أومن خلايا النسيج المتوسط لاوراق العديد من النباتات .

1- نسيج الكالس Callus tissue

يعد نسيج الكالس من افضل المصادر لاستحداث المزارع الخلوية ذلك لان الكالس

1- لايحتاج تعقيم لانه ينمو في ظروف معقمة
2- العملية لاتحتاج الى اضافة مواد خاصة لفصل الخلايا التي ربما تؤثرعلى حيوية ونشاط الخلايا في المزارع المعلقة الخلوية المستحدثة.

وكما مر بنا سابقاً يستحدث الكالس من الاجزاء النباتية المختلفة كالسيقان ، الاجزاء تحت الفلقية ، الاوراق ...... الخ بزراعتها على اوساط غذائية في ظروف معقمة .

ويستعمل عادة الكالس الهش في استحداث المزارع الخلوية في اوساط غذائية سائلة للحصول على خلايا مفردة او تجمعات خلوية صغيرة . وتعتمد صلابة الكالس على مكونات الوسط الغذائي وخاصة النسبة بين الاوكسينات الى السايتوكاينين لذلك فأن اختيار الوسط المناسب يعد اساسياً للحصول على كالس هش لاستعماله في استحداث المزارع الخلوية . ويستعمل 2-4 غم من الكالس الهش لكل 100سم^{3}من الوسط الغذائي . ويتم نقل الكالس الى وسط غذائي سائل مشابه في مكوناته لذلك المستخدم لاستحداث الكالس في اوعية خاصة .ويتم تحريك الوسط الغذائي مع انسجة الكالس بأستمرارباستعمال وسيلة مناسبة ويؤدي تحريك الوسط الغذائي الى توفير ضغط معتدل على خلايا انسجة الكالس مما يساعد على تفككها إلى كتل خلوية صغيرة أو خلايا مفردة ، كذلك توزيع المكونات بصورة منتظمة في الوسط وتوفير تبادل غازي مناسب بين الخلايا المغمورة في الوسط الغذائي والهواء الموجود داخل اوعية الزراعة.

2- النسيج المتوسط للأوراق Mesophyll tissue of leaves

توجد طريقتان تستعملان للحصول على خلايا مفردة أو تجمعات خلوية صغيرة من النسيج المتوسط للأوراق لأستحداث المزارع الخلوية وهي:-

أ- الطريقة الانزيمية Enzyme method

تعتمد هذه الطريقة اساساً على تحلل أو تكسر الجدران الخلوية يعقبها تحلل للصفيحة الوسطى التي تربط الخلايا بواسطة انزيمات تعمل على تحلل الجدران الخلوية وبذلك يمكن الحصول على خلايا مفردة أو تجمعات خلوية صغيرة يمكن أن تستعمل في أستحداث المزارع الخلوية . ويقتصر أستعمال هذه الطريقة على نباتات معينة فقط ولا تستعمل في معظم نباتات ذوات الفلقة الواحدة مثل الحنطة والذرة.

ومن سلبيات هذه الطريقة هي أحتياج الخلايا المفصوله إلى حماية أزموزية دقيقة وكذلك فأن تعريض الخلايا إلى محاليل أنزيمية يؤدي إلى تضرر قسم منها مما يؤثر سلباً على نشاطها ونموها في المزارع الخلوية.

ب- الطريقة الميكانيكية Mechanical method

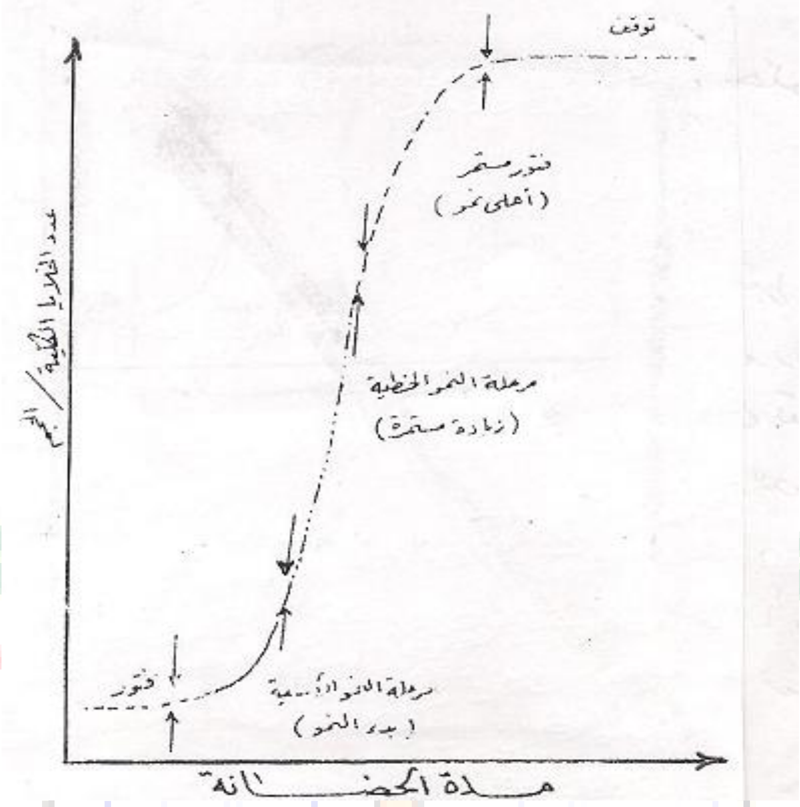
تعتمد هذه الطريقة على تحررالخلايا أو التجمعات الخلوية الصغيرة دون أستعمال المواد الكيميائية وذلك بأزالة أنسجة معينة من الأوراق ميكانيكياً بأدوات خاصة. وأستعملت هذه الطريقة لأول مرة عام 1968 على نبات فستق الحقل . وتمتاز هذه الطريقة عن غيرها بعدم تعريض الخلايا إلى التأثيرات الضارة للانزيمات وكذلك عدم

أحتياجها إلى حماية ازموزية خاصة . وعند فصل الخلايا بهذه الطريقة يجب أختيار النسيج المتوسط بحيث يحتوي على خلايا برنكيمية سائبة وقليلة الاتصال فيما بينها.

مراحل نمو المزارع الخلوية المعلقة Cell Suspension culture growth Stage

تمر الخلايا في المزارع الخلوية عادة بأطوار مختلفة من النمو ، فعند وضع الخلايا المنشئة للمزارع الخلوية في الوسط الغذائي يتوقف نموها لمدة زمنية وتدعى هذه المدة بفترة الفتور وذلك لتأقلمها على الظروف الجديدة يتبع ذلك زيادة أسية في عدد الخلايا وزيادة خطية في مجاميع الخلايا يعقب ذلك أنخفاض ملحوظ في معدل الأنقسام وبعدها تتوقف الخلايا عن الأنقسام وتدخل في مرحلة التوقف (شكل 2) . ومن أجل المحافظة على حيوية الخلايا والمزارع الخلوية فيجب أعادة زراعة الخلايا بمرحلة قبل توقف الأنقسام . وكثافة الخلايا في المزارع الخلوية تؤثر بشكل عام على مدة أعادة الزراعة . وكذلك حيوية الخلايا المكونة للمزارع الخلوية تختلف بأختلاف الخلايا المكونة للمزارع، وتختلف المدة الزمنية للوصول إلى أعلى كثافة معتمدة على نشاط وحيوية الخلايا وأحياناً تحتاج إلى 18-25 يوم لأعادة الزراعة في حين تحتاج مزارع أخرى إلى 6-9 يوم فقط ، ويجب الأخذ بنظر الاعتبار الكثافة الحرجة Critical density وهي كثافة الخلايا في الوسط عند زراعة أو أعادة زراعته والتي لا تنمو المزارع إذا قلت عنها وتبلغ مثلاً الكثافة الحرجة لنبات الجميز 9-15 x 10^3 خلية لكل سم^3 من الوسط الغذائي.

المحاضرات النظرية



طرق زراعة الخلايا المعلقة Suspension culture methods

هناك طريقتان لزراعة الخلايا المفردة تعتمد كل منهما على نوعية الأبحاث التي تجرى عليها ولكل منهما سلبيات وايجابيات ، وهما زراعة الخلايا الكمية Batch cultures وزراعة الخلايا المستمرة Continuous cultures .

1- الزراعة الكمية Batch cultures

تستخدم طريقة الزراعة الكمية بصورة شائعة في العديد من أبحاث الاحياء المجهرية وخاصة التطبيقية منها كأبحاث بروتين أحادية الخلية ، المخلفات الثانوية لقسم من الاحياء المجهرية . وتعتمد هذه الطريقة على تنمية الخلايا المعلقة في وسط غذائي سائل ثابت الحجم في نظام مغلق closed system ويحرك الوسط لضمان التوزيع المتساوي للخلايا المعلقة في الوسط ولتوفير تبادل غازي جيد بين الخلايا في الوسط والهواء . وتنمو الخلايا المعلقة في هذا النظام وتصل إلى أقصى نمو لها في مدة معينة (maximum growth) . ويتوقف النمو بعد هذه النقطة وذلك لأستفادة المواد الغذائية وتراكم المواد الايضية الضارة بنمو الخلايا . لذلك من الضروري أعادة زراعة الخلايا المعلقة بعد نمو الكتلة الحيوية Biomass إلى أقصى حد . وتختلف مدة النمو القصوى من نظام إلى أخر معتمدة بدرجة كبيرة على حالة نمو المزرعة الاساس ، وكذلك نوعية

الخلايا المستخدمة . ويمكن جعل المزارع الخلوية تنمو بدرجة جيدة من خلال أعادة زراعتها . وتختلف مدة أعادة الزراعة من نبات إلى أخر وتتراوح ما بين 3-6 أيام.

وتمر الخلايا المعلقة في المزارع المغلقة بادوار مختلفة وتنمو وفق طراز ثابت ففي البداية تمر المزارع بفترة تباطؤ في النمو وذلك لأقلمة الخلايا على البيئة الجديدة يعقبها فترة نمو أسية تنقسم فيها الخلايا بسرعة، وسرعة الأنقسام يعتمد بصورة أساس على حيوية الخلايا المستعملة عند أعادة الزراعة أو أستحداث المزارع الخلوية . وتستمر بعدها في الانقسام إلى أن تصل الخلايا بمرحلة أنخفاض معدل النمو وبعدها تدخل المزارع الخلوية في مرحلة التوقف عن الانقسام .

ووجد أن ترك المزارع الخلوية لفترة طويلة بعد مرحلة التوقف أدى إلى موت وتحلل أعداد كبيرة من الخلايا. لذلك من الضروري إعادة الزراعة في مرحلة التوقف . ويمكن التغلب على هذه الظاهرة بأضافة مود معينة إلى الوسط الغذائي. وتختلف المدة اللازمة لمضاعفة الخلايا في المزارع الخلوية بأختلاف نوع النبات.

ومن أجل أستمرار نمو المزارع الخلوية لأقصى ما يمكن يؤخذ حجم صغير من لوسط الغذائي الحاوي على الخلايا المعلقة ويضاف إلى وسط غذائي جديد وبذلك يمكن الحفاظ على نمط ثابت من النمو ، وتستعمل عادة ماصات أو حقن ذات فوهات خاصة تسمح بمرور الخلايا المفردة أو الكتل الخلوية الصغيرة ، وتمنع مرور الخلايا الكبيرة أو التجمعات الخلوية الكبيرة . ومن مميزات الزراعة الكمية ثبات نمط التغيرات التي تحصل في نمو الخلايا وكذلك العمليات البنائية الاساس وكذلك بعدم تغير في مكونات الوسط الغذائي لذلك تعد هذه المزاراع غير مثالية لدراسة نمو الخلايا والعمليات البنائية فيها. وهناك أربعة طرق رئيسة تستخدم حالياً في الزراعة الكمية لمعلقات الخلايا معتمدة على الطريقة المستعملة في تحريك الوسط الغذائي وهي :

أ- المزارع ذات الدوران البطيء Slowly rotating cultures

قدم الباحثان Steward و Shanz سنة 1956 تصميماً لدوارق تستعمل لزراعة الخلايا الحرة والكتل الخلوية الصغيرة المعزولة من كالس نبات الجزر . وهذه الدوارق لها زوائد في الأطراف وعدد الزوائد تعتمد على حجم الدورق . فالدورق الذي سعته 250 سم^3 له ثمانية زوائد في حين الدورق الذي سعته 1000سم^3 له عشر زوائد . وتدعى هذه بالدوارق ذات الحلم أو الزوائد Nipple Flask وتثبت هذه الدوارق على قرص دوار بسرعة بطيئة (1-2 دورة في الدقيقة) وعند دوران القرص فأن الخلايا أو الكتل الخلوية في حلم الدوارق

المحاضرات النظرية

شكل : طريقة Steward و Shanz لتنمية المزارع الخلوية بطريقة الدوران البطيء.
أ- قرص كبير يحوي على 10 دوارق تستعمل لأستحداث المزارع الخلوية لنبات الجزر.
ب- رسم تخطيطي يوضح هيئة الدوارق ذات الحلم

تجعلها تتعرض تارة إلى الوسط الغذائي وتارة أخرى إلى الهواء في دوارق الزراعة وأستخدمت هذه في العديد من الدراسات لأنواع مختلفة من النباتات . ونمو الخلايا المعلقة في الوسط الغذائي السائل بهذه الطريقة يكون على شكل غلاف مبطن لمنطقة واسعة من الدورق مما يزيد عملية التبادل الغازي بين الخلايا والهواء في دورق الزراعة .

ب- المزارع الاهتزازية Shake Cultures

أستخدم هذه الطريقة لأول مرة Muir سنة 1954. وتتصف هذه الطريقة ببساطتها وبنفس فعالية النظام السابق . توضع الدوارق ذات الاحجام المختلفة وحسب طبيعة البحث على منصة تتحرك بصورة دائرية . وسرعة دوران الجهاز تتراوح ما بين 40-170 دورة في

الدقيقة . وتختلف سرعة الدوران للحصول على أعلى معدل للنمو وأكبر أنتشار للخلايا المزروعة بأختلاف أنواع النباتات. وصممت عدة أنواع من الدوارق للأستعمال في هذه الطريقة للحصول على نمو مثالي للخلايا المزروعة

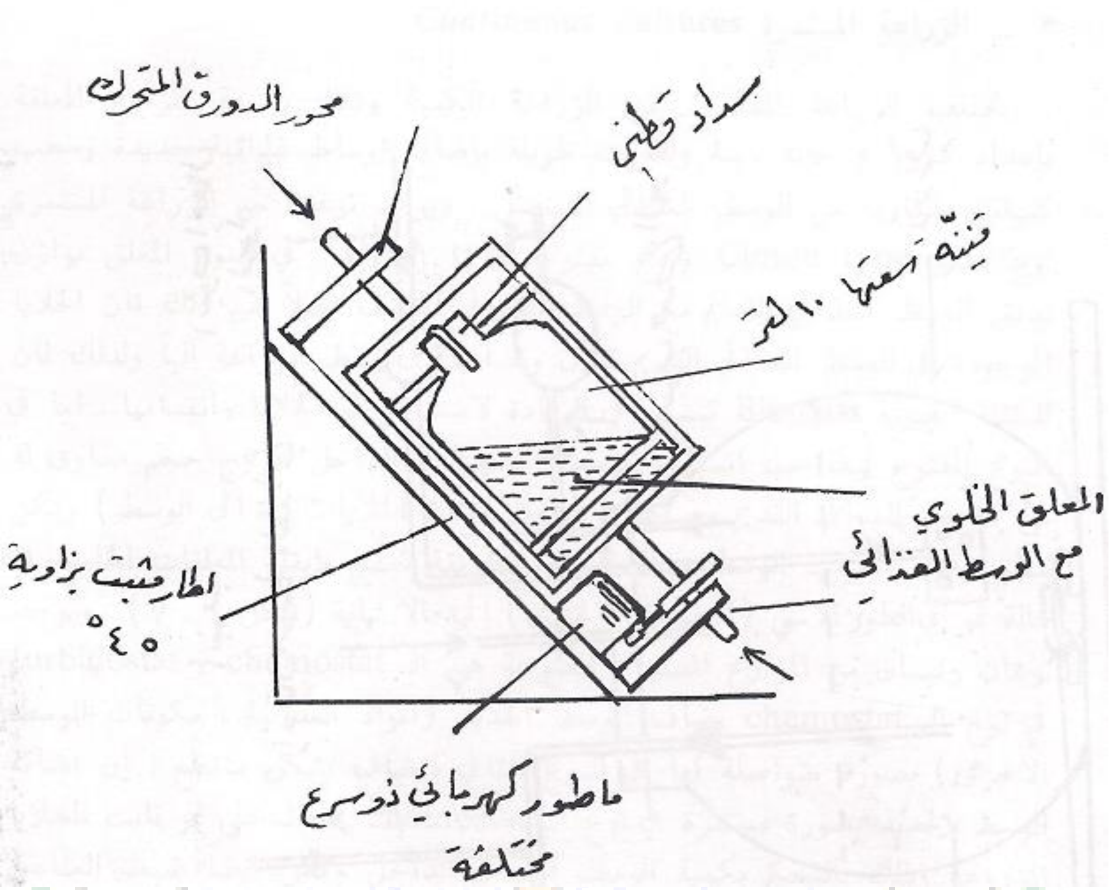
نوع من الأجهزة المستخدمة في أستحداث المزارع الخلوية بطريقة المزارع الاهتزازية .

ج- المزارع ذات الحركة المغزلية Spinning Cultures

تتميز هذه الطريقة بالسعة الكبيرة نسبياً لوعاء الزراعة ويتراوح حجم الوعاء من 10-4.4 ألتار يحوي ما بين 1-3.5 لتراً من الوسط الغذائي السائل .

وتثبت قناني الزراعة على حامل صلب بوضع مائل (45°) أما سرعة الدوران فتكون مسيطراً عليها وتتراوح ما بين 8-100 دورة في الدقيقة وتغلف فوهات القناني بسداد قطني يسمح للتبادل الغازي الجيد . وللكمية الكبيرة من الوسط الغذائي فأن المواد الغذائية تكون عاملاً غير محدد في نمو الخلايا المعلقة وكذلك يمكن السيطرة على ظروف الزرعة بسهولة.

المحاضرات النظرية



شكل يمثل مخطط توضيحي لجهاز أستحداث المعلقات الخلوية بطريقة المزارع ذات لحركة المغزلية.

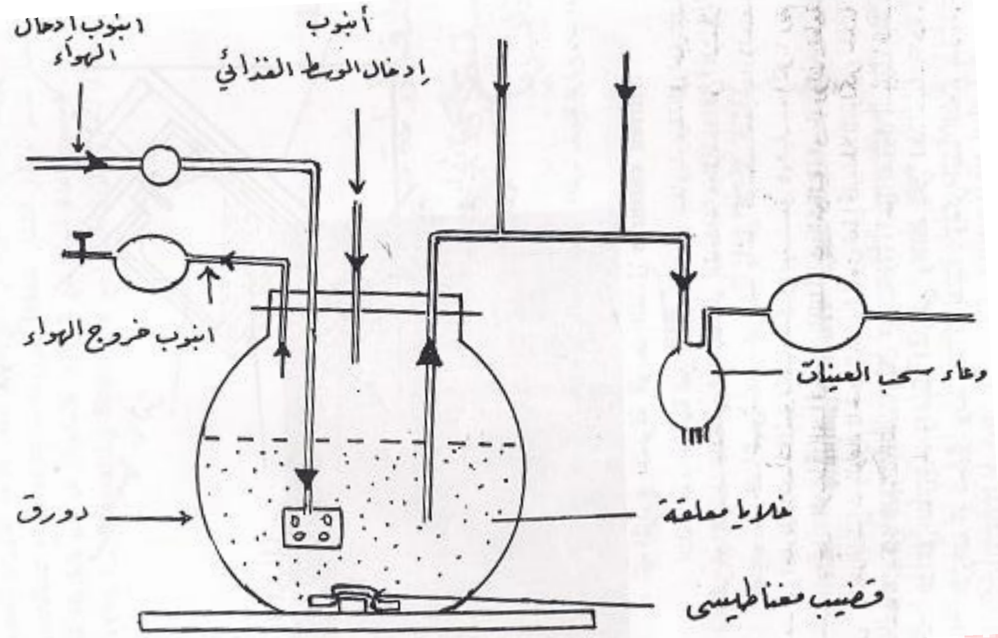
د- المزارع المتحركة الوسط الغذائي Stirred cultures

تختلف هذه الطريقة عن الطرق الاخرى ببقاء أوعية الزراعة ثابتة في حين يتم تحريك الوسط الغذائي اما بأدخال فقاعات هوائية داخل الوسط أو بأستعمال قضيب من المغناطيس يدور كهربائياً داخل الوسط الغذائي . وتستعما عادة عند زراعة المعلقات الخلوية بكميات كبيرة وتستعمل أوعية بسعة 1.5-10 لتر . ويتم أنتشار الخلايا داخل الوسط الغذائي بفعل الفقاعات الهوائية أو لدوران قطعة المغناطيس . ونظراً لثبات الوعاء الحاوي على الوسط الغذائي والخلايا ولكبر حجمه فأنه من السهولة بمكان إيصال أنبوب إلى داخل الدورق للتبادل الغازي بين المحيط الداخلي للدورق ، والمحيط الخارجي وكذلك يمكن أخذ عينات منه بسهولة لأعادة الزراعة أو لتجهيز وسط غذائي جديداً . ويمكن أيضاً التحكم بدرجة حرارة الوعاء بسهولة وبدقة بأستعمال ملف حراري أو غلاف عازل يزود بالماء على شكل Water Jacket لخفض درجة الحرارة. وتوجد عدة تصاميم للعديد من أنواع النبات.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية



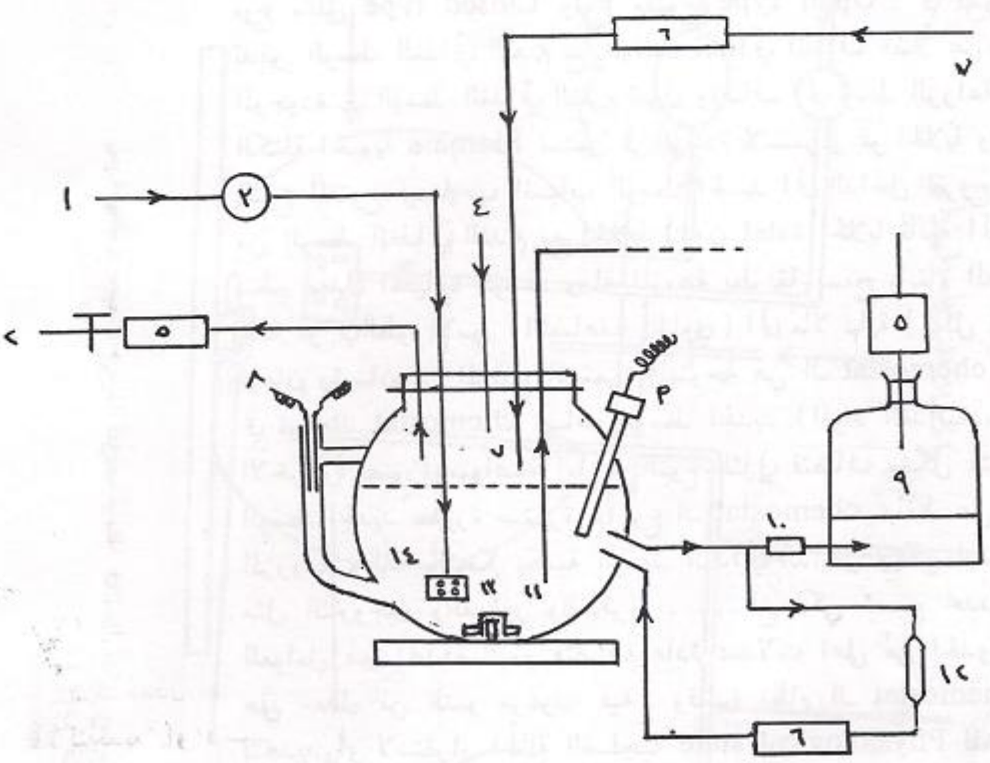
2- الزراعة المستمرة Continuous cultures

تختلف الزراعة المستمرة عن الزراعة الكمية وذلك بتنمية المزارع المعلقة بأعداد كبيرة في حالة ثابتة ولفترات طويلة بأضافة أوساط غذائية جديدة وحسب كميات متساوية من الوسط الغذائي المستعمل . ويوجد نوعان من الزراعة المستمرة نوع مغلق Closed type ونوع مفتوح Open type . في النوع المغلق يوازن تدفق الوسط الغذائي القديم مع الوسط الغذائي المضاف فضلاً عن ذلك فأن الخلايا الموجودة في الوسط الغذائي القديم تعزل وتضاف إلى وسط الزراعة ألياً ولذلك فأن الكتلة الحيوية Biomass تستمر في الزيادة لأستمرار نمو الخلايا وانقسامها . أما في النوع المفتوح فيصاحب انسياب الوسط الجديد إلى الداخل بخروج حجم مساوي له من الوسط الغذائي القديم مع الخلايا (دون أعادة الخلايا ثانية إلى الوسط) ويمكن تنظيم معدل أنسياب الوسط وغلة المزرعة بطريقة تسمح بأبقاء المعلقات الخلوية في حالة نمو في الطور الاسي (التضاعف الخلوي) إلى ما لا نهاية.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية



شكل (٤ ـ ٧) : مخطط توضيحي لزراعة الخلايا المعلقة بطريقة الزراعة المستمرة .

١ ـ دخول الهواء .
٢ ـ خروج الهواء .
٣ ـ فلتر زجاجي، معقم .
٤ ـ ادخال اللقاح.
٥ ـ فلتر معقم من نوع صوف الزجاج .
٦ ـ مضخة .
٧ ـ ادخال الوسط الغذائي .
٨ ـ قطب لتقدير حجم الوسط الغذائي مع الخلايا .
٩ ـ وعاء منتظم الوسط .
١٠ ـ ضابط للمحلول الغذائي الخارج .
١١ ـ انبوب النموذج .
١٢ ـ مقدر الكثافة .
١٣ ـ قضيب مغناطيسي.
١٤ ـ محرك للتهوية .

وتوجد نوعان رئيسان من المزارع المستمره المفتوحة هي الـ chemostat وturbidostat في نوع الـ chemostat يضاف الوسط الجديد (المواد الغذائية، مكونات الوسط الاخرى) بصورة متواصلة أما في النوع الثاني فتضاف بشكل متقطع . إن إضافة الوسط الجديد بصورة مستمرة في نوع الـ chemostat يحافظ على نمو ثابت للخلايا المزروعة وذلك بالتحكم بكمية الوسط الغذائي الداخل ويمكن أيضاً ضبط العناصر مثل النتروجين والفسفور والسكروز ..... الخ لكي تصبح محددة للنمو اما بقية العوامل غير

المحددة للنمو فتضاف عادة بمعدلات أعلى من الحدود المطلوبة للابقاء على معدل من النمو مرغوب فيه . وفائدة نظام الـ chemostat ايضاً أستعماله لتحديد أو أستقرار الحالة الفسلجية physiological state للخلايا. ووجد بأن الخلايا تمر بأدوار نمو مختلفة وفي حالة فسلجية مستقرة تختلف معنوياً بالتركيب الكيمياوي وكذلك بالافعال الايضية. ومن ناحية أخرى فأن نوع مزارع الـ turbidostat يتم السيطرة عليه بقياس كمية التعكر turbidity في المزارع وأضافة كميات متقطعة من الوسط تعتمد أساساً على نمو الخلايا فيه . ويمكن الابقاء على الكتلة الحيوية Biomass بأخراج كمية مناسبة من الوسط مع الخلايا النامية فيه.

توفر الزراعة المستمرة مجاميع خلوية لها أحتياجات ايضية خاصة وهذه الميزات لها فائدة كبيرة بأستخدام المزارع الخلوية لأنتاج مواد ايضية مهمة أقتصادياً مثل القلويات alkaloids والستيرويدات steroid وحتى المضادات الحيوية antibiotics .

الوسط الغذائي لزراعة الخلايا المعلقة

Cell suspension culture medium

يعد الوسط الغذائي لتنمية المزارع الخلوية من أهم العوامل التي تؤثر على نجاح ديمومة المعلقات الخلوية . وكذلك يعد اساساً أختيار الوسط الغذائي الملائم من حيث المكونات لنمو الخلايا في المزارع الخلوية . فأنخفاض عنصر ما دون الحد الامثل يؤثر بدرجة كبيرة على نمو المزرعة الخلوية بصفة عامة . وعموماً فأن الوسط لغذائي الملائم لنمو الكالس الهش لنبات معين يمكن أن يستعمل لأستحداث ونمو المعلقات الخلوية لذلك النوع من النبات . ويفضل أختيار الوسط المناسب لنمو الخلايا المعلقة بتغير بعض المكونات الاساس في الوسط الغذائي كالاوكسينات والسايتوكينات .

وتختلف أحتياجات المزارع الخلوية بالنسبة للفيتامينات ضمن الصنف النباتي الواحد. لذلك فمن الضروري أختيار الوسط الغذائي المناسب بعد دراسة مكوناته بصورة دقيقة وخاصة نسبة الاوكسينات إلى السايتوكاينينات. زيادة على ذلك ، وبعد أختيار الوسط الغذائي المناسب فأن pH الوسط يؤثر على أمتصاص المواد مثل الحديد في المزارع الخلوية والـ pH في الوسط الغذائي قابل للتغيير خاصةً بعد أضافة اللقاحات الجديدة Inoculum إليه فيجب عندها تعديل الـ pH بأضافة مواد معينة لضمان جاهزية عنصر الحديد والعناصر الأخرى مثل النتروجين والامونيوم.

تعتمد كميات المواد المعقدة التركيب والمضافة إلى الوسط الغذائي على حجم ونوعية اللقاح المضاف لأستحداث المزارع الخلوية .

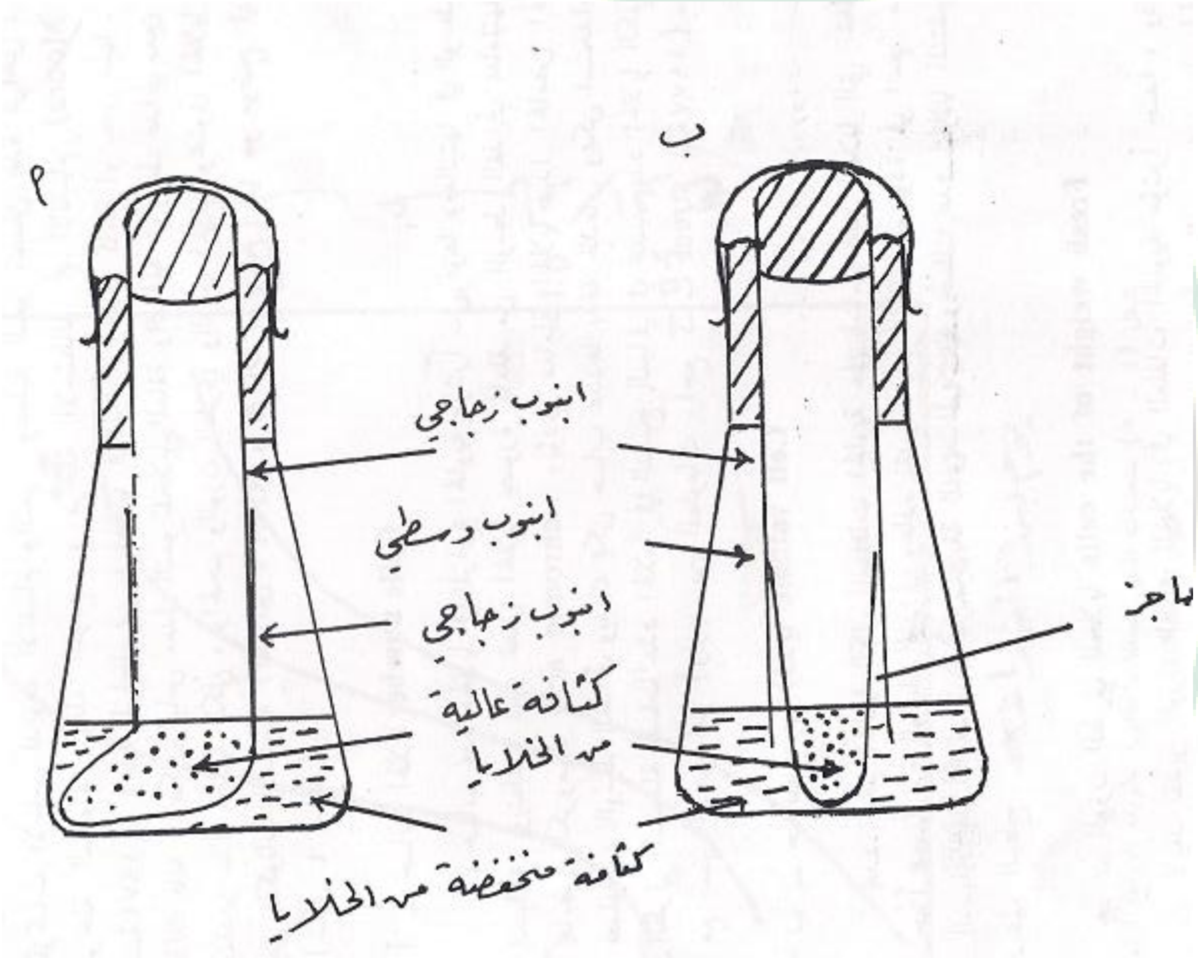
وكثافة الخلايا في اللقاح يجب تحديدها بالنسبة لحجم الوسط الغذائي المستعمل في أستحداث المزارع الخلوية ويستعمل وسط B5 ووسط Eriksson لزراعة الخلايا المعلقة للنباتات الراقية وتعد هذه الاوساط ملائمة لنمو المعلقات الخلوية إذا كانت الكثافة الابتدائية للخلايا المزروعة بحدود 5×10^{5} خلية للسم^{3} من الوسط .

المزارع الخلوية والحد الادنى لكثافة الخلايا

Cell suspension culture and critical cell density

تحتاج عملية أستحداث المزارع الخلوية إلى عدد معين من خلايا النسيج أو الكالس لأضافتها في وسط غذائي وبظروف بيئية مثلى . لذلك يجب أن تكون كثافة الخلايا (عدد الخلايا أو التجمعات أو الكتل الخلوية) ضمن المستوى الحرج critical level أو لحد لأدنى لنمو وأنقسام الخلايا في الوسط الغذائي لأستحداث المزارع الخلوية cell suspension culture . والكثافة الحرجة تعد مؤشراً لقدرة الخلايا على الأنقسام والنمو وصولاً إلى مستوى معين من النمو في ظروف المثالية . أن حجم الجزء النباتي يؤثر بدرجة كبيرة على عملية أستحداث الكالس لذلك فأن كثافة الخلايا المستخدمة في الزراعة تؤثر أيضاً في عملية وطبيعة نموها. وزراعة الخلايا النباتية بالمستوى الامثل من الكثافة تؤدي إلى نمو جيد في فترة زمنية قليلة مقارنة بزراعة الخلية المفردة بغض النظر عن الظروف البيئية المثلى المتوفرة لنموها. وفي دراسات خاصة يمكن أستخدام معدلات منخفضة من كثافة الخلايا لقاحات تحت نظام خاص جداً (تغذية خاصة) وصولاً إلى مستوى جيد من النمو . وتحتاج عملية زراعة المعلقات الخلوية بكثافات منخفضة إلى وجود عناصر غذائية ومواد معقدة التركيب لتحفيز الخلايا على الأنقسام والنمو. وهذه المواد قد لايتطلب وجودها في الوسط الغذائي عند زراعة كثافة عالية (فوق المستوى الحرج) من الخلايا المعلقة ، لأن الخلايا بهذه الاعداد الكبيرة لها المقدرة على بناء مواد خاصة داخلياً تفرز خارجاً إلى الوسط الغذائي تؤثر بشكل فعال على نمو الخلايا المفردة أو الكتل الخلوية الصغيرة . لذلك فأن أضافة هذه المواد إلى مزارع الخلايا المستخدمة من كثافات خلوية دون المستوى الحرج يؤدي إلى نمو جيد لها . ويستعمل الوسط الغذائي المكيف (conditioned medium) وقد وصلت خلاياه مرحلة أفراز المواد المشجعة للنمو. ويتطلب الحصول على هذا النوع من الوسط (الوسط المكيف) فصل وعزل الخلايا النامية في الأوساط الغذائية في دور التوقف عن النمو بأستخدام حاجز يسمح بمرور هذه المواد فقط (انظر الشكل ادناه) وهناك عوامل عدة تؤثر على إمكانية أستخدام الوسط المكيف في زراعة الخلايا المعلقة دون المستوى الحرج . ففترة الحضانة تؤثر بدرجة كبيرة على نمو الخلايا وانقسامها وأطالة هذه الفترة إلى مرحلة بعد التوقف من النمو يؤدي إلى أفراز مواد ضارة وأستنزاف في المواد الغذائية المكونة للوسط الغذائي. لذلك

فمن المستحسن أستخدام الوسط الغذائي في مرحلة بقاء عدد الخلايا ثابتاً. وهناك دراسات تشير إلى امكانية أستخدام وسط غذائي مكيف لخلايا نوع معين من النبات يؤثر بدرجة كبيرة على خلايا نوع أخر من أستحداث من النبات حين أستعمال الخلايا بكثافة دون المستوى الحرج في أستحداث المزارع الخلوية في الظروف المثالية. ومن الصعوبة بمكان تحديد المدة الزمنية للحضانة اللازمة لمرحلة التكيف ومرحلة ما بعد التكيف . إلا أن المؤشر الذي يعتمد في ذلك هو قياس مرحلة نمو الخلايا المعلقة وأعتماد العدد الثابت منها مؤشراً لحالة التكيف.



معدل نمو الخلايا وفعاليتها الايضية

Growth and metabolic activities of cultured cells

يعتمد معدل نمو الخلايا النباتية في النسيج النباتي على قابلية خلاياه لبناء المركبات الاساس لديمومة الانقسام والنمو. وعملية النمو تتضمن عدة مراحل ، مرحلة البناء ، مرحلة التوسع ، مرحلة الاستطالة ثم الانقسام. وهذه المراحل تمر بها الخلايا في المزارع الخلوية كاملة أو بعض منها . لذلك فأنه بالامكان قياس معدل النمو في الخلايا المعلقة والنامية في وسط غذائي معين بتقدير عدد الخلايا الكلي ، والحجم والوزن الطري

والوزن الجاف ومحتوى الخلايا من المكونات الاساسية (البروتين ، RNA و DNA ... الخ) كما هو موضح في

أ- حساب عدد الخلايا Cells number

يعد حساب عدد الخلايا في المزارع الخلوية مؤشراً على نموها وفعاليتها في الوسط الغذائي . ويتطلب ذلك فصل الخلايا بصورة كاملة من الوسط الغذائي بمعاملتها بحامض الكروميك chromic acid . ويؤدي معاملة الخلايا بهذا الحامض إلى فصلها من الوسط الغذائي وبذلك يمكن حساب عددها بدقة لحد ما . ويمكن أستخدام الطرق المستعملة لحساب عدد الخلايا في النسيج النباتي في تحديد عدد الخلايا الكلي مع بعض التحويرات

ب- حساب حجم الخلايا Cell volume

يحدد حجم الخلايا الكلي للمعلقات الخلوية على أساس عدد الخلايا التي تشغل حيزاً معيناً من الوسط الغذائي وعادة تقدر بحجم الخلايا الموجودة في 1 سم^3 من الوسط الغذائي بعد ترسيبها بطريقة الطرد المركزي وحساب عدد الخلايا المنتشرة على السطح .

ج- الوزن الطري للخلايا Fresh weight of the cells

لا يعد تقدير الوزن الطري للخلايا ف المعلقات الخلوية موشراً جيداً ، وذلك نسبة إلى أمتصاص المواد الغذائية من الوسط الغذائي ، الذي يعتمد على الحالة الفسلجية للخلايا . إلا أن ذلك ليس معوقاً بل يستعمل هذه الطريقة العديد من الباحثين . وفي هذه الطريقة تفصل الخلايا عن الوسط الغذائي ، وتتم أزالة الوسط الغذائي العالق بعملية الترشيح ثم تجفف الخلايا بوساطة الترشيح والضغط ويتم بعدها حساب الوزن الطري للخلايا . ومن سلبيات هذه الطريقة هو أستعمال كميات كبيرة من الوسط الزراعي للحصول على أعداد مناسبة من الخلايا لحساب وزنها الطري .

د- الوزن الجاف للخلايا Dry Weight of the cells

تعد هذه الطريقة مثلى في تحديد نمو الخلايا في المزارع الخلوية وتستعمل نفس الخطوات التي تستخدم في طريقة حساب الوزن الطري ، إلا أن التجفيف يتم بوساطة الحرارة لمدة زمنية معتمدة على نوع النبات وعادة درجة الحرارة المستعملة هي ما بين

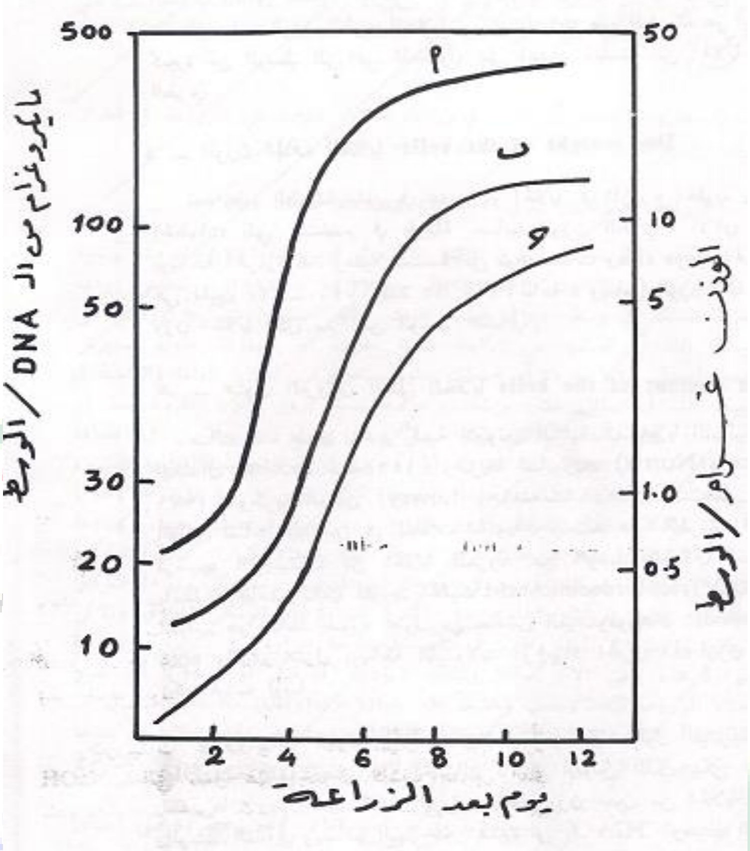
60 -70 م° ولمدة 12 -26 ساعة ، ويقاس الوزن الجاف على أساس وزن الخلايا لكل سم^3 من الوسط الغذائي .

هـ - محتوى البروتين الكلي للخلايا Protein content of the cells

هناك عدة طرق لتقدير كمية لبروتين لكلية في الخلايا النباتية وهي طريقة الكلدال وطريقة البايوريت وطريقة الفولين. وتعد طريقة الفولين الأكثر شيوعاً لقياس البروتين في المعلقات الخلوية .وتعتمد هذه الطريقة في الاساس على ترسيب البروتينات من الخلايا المعزولة عن الوسط الغذائي للمعلقات الخلوية بأستعمال حامض ثالث كلوريد الخليك Trichloroacetic (TCA) . وكاشف الفولين هو اساساً بصورة محلول من حامض الفوسفومولبيدك Phosphomolibdic acid والذي يختزل بواسطة الفينولات أو مواد أخرى إلى أزرق المولبد نم الذي يمكن قياسه لونياً.

والبروتينات عموماً يمكن أستخلاصها بواسطة محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH . التي تعمل على أختزال كاشف الفولين الذي يمكن أن يستخدم في تقديرها . ويتم تحديد كمية البروتين بأخذ وزن معين من الخلايا بعد فصلها من الوسط الغذائي ويضاف إليها حجم معيم من الـ TCA لترسيب البروتين ثم يعزل الراسب عملية الترسيب بجهاز الطرد المركزي ويذاب الراسب بعد ذلك في محلول الـ NaOH لتحرير البروتين من الراسب . وتقدر قيمته بأستخدام طريقة الفولين .

إن هذه الطريقة هي لتقدير البروتينات الكلية ولأجل تحديد قابلية بناء البروتين في الخلايا فيجب حساب عملية بناء البروتين وهدمه للحصول على مؤشر من ذلك لنمو الخلايا .



شكل (٤ ـ ٩) منحنيات النمو للمعلقات الخلوية بطريقة الزراعة الكمية .
أ ـ محتوى الـ DNA
ب ـ الوزن الطري
جـ ـ الوزن الجاف

و- محتوى الـ RNAو الـ DNA للخلايا RNA and DNA Content of the cells

تستخدم طرق عدة لتحديد كمية الأحماض النووية (RNA والـ DNA) للأنسجة النباتية التي يمكن أستعمالها في تحديد هذه الكمية في معلقات الخلايا المفصولة من المزارع الخلوية . وكما هو الحال بالنسبة للأنسجة والخلايا النباتية فتوجد طرق متعددة لتحديد الكمية معتمدة على نوع النسيج والخلايا وكذلك على نوع النبات . ومن هذه الطرق الشائعة الاستعمال طريقة Sherry سنة 1962 وطريقة Burton سنة 1956 وطريقة Walton و Soofi سنة 1969 ... الخ .

وتعتمد هذه الطرق اساساً على إيقاف فعالية أنزيم النيوكلييز (Nuclease) أولاً ثم ترسبي الاحماض النووية بنوعيها وأزالة المواد الاخرى غير الأحماض النووية التي

تتداخل معها في حساب كمياتها . يؤخذ وزن معين من الخلايا المفصولة من المزارع الخلوية وتعامل بعدها بمحاليل تعمل على ترسيب الحوامض النووية والبروتينات ثم تحرر الحوامض النووية من البروتينات بأستعمال حامض البركلوريك PCA (Perchloric acid) وتقدر قيمها بقياس الامتصاص على طول موجة 260 -290 نانو ميتر بأستعمال جهاز المطياف Spectrophotometer ويقدر سرعة نمو الخلايا في الوسط الغذائي على أساس قابلية الخلايا على بناء الحوامض النووية وخاصة الـ DNA . لأن زيادة كمية الـ DNA خلال فترة زمنية معينة يعد مؤشراً على نمو وأنقسام الخلايا في المزارع الخلوية لذلك تعد هذه الطريقة من الطرق المفضلة في عملية تحديد نمو الخلايا .

زراعة الخلايا المفردة **Single cell culture**

تعد طريقة زراعة الخلايا المفردة من الطرق الحديثة نسبياً وتتضمن زراعة خلية نباتية مفردة (مستقلة) على وسط غذائي معين وأنتاج تجمعات خلوية أو نباتات كملة منها . وتوفر زراعة الخلية المفردة Single cell culture إمكانيات جيدة لدراسة العمليات البنائية المختلفة (الايضية Metabolic processes) التي تقوم بها الخلية النباتية وكذلك أستجابتها للتأثيرات المختلفة . فضلاً عن ذلك فأن هذه الطريقة تسمح بأجراء دراسات حول كيفية أنتقال المواد الغذائية وتضمينها بين الخلايا المختلفة . وكذلك أستخدامها في تربية وتحسين النبات لقدرة الخلايا المفردة على أنتاج نباتات كاملة لأن من السهولة أجراء تغايرات وراثية على خلايا مفردة عما هو عليه في حالة أستخدام خلايا متجمعة Cell Aggregates كبيرة أو صغيرة وتستخدم ثلاثة طرق لزراعة الخلايا المفردة وهي:

أ- الزراعة في أطباق بتري Petri dish plating culture
ب- الزراعة في الغرف الدقيقة Micro-chamber growth room
جـ- الزراعة بطريقة الحاجز Paper raft-nurse culture

فصل وزراعة البروتوبلاست

Isolation and Culture of Protoplast

- **البروتوبلاست** :- هي الخلايا الحية العارية (بدون الجدار الخلوي) للنبات والتي أزيل عنها الجدار اما بطريقه ميكانيكيه او بواسطة فعل الانزيمات الهاضمه للجدار الخلوي ونتيجة لأزالة الجدار فأن الحاجز بين البروتوبلازم (الماده الحيه) والبيئه

الخارجيه المحيطه هو غشاء البلازما (plasma membrane) الذي يتم عبره انتقال المواد الذائبه من الخليه النباتيه واليها . ويجب وضع البروتوبلاست المعزولة في وسط غذائي ذي أزموزيه متعادلة Isotonic للحفاظ عليها من التلف .
وفصل البروتوبلاست ليس حدثاً جديداً وأنما عزلت في اوائل القرن العشرين بالطرق الميكانيكيه لدراسة الجريان البروتوبلازمي . واستخدمت بعدها في مجالات عديدة.

تطبيقات زراعة البروتوبلاست:

1- يمكن حث البروتوبلاست المعزول للاندماج من اجل الحصول على نبات هجينيه Hybrid plants وعلى الرغم من ان هذه الظاهرة طبقت لعدة انواع من النبتات الا ان الاندماج قد لايحدث في قسم من انواع النباتات . وتستعمل هذه الطريقة في الانواع التي يصعب الحصول منها على انواع هجينه .
2- البروتوبلاست المعزول له القابليه على تضمين المواد الغريبه عنه وأدخالها في السايتوبلازم كما هو الحال في البلازميدات plasmids والانويه والعضيات الأخرى
3- يعد البروتوبلاست النامي في اوساط غذائيه معينه نظاماً جيداً لدراسه تكوين الجدر الخلوي .
4- البروتوبلاست المعزولة يمكن دراستها على انها نظام احادي يمكن الحصول منه على خلايا وبالتالي نباتات ذات مواصفات خاصة.

فصل البروتوبلاست :

ألاجزاء النباتيه المستخدمه في فصل البروتوبلاست :-

يعد أختيار الجزء النباتي مهم جداً في عملية فصل البروتوبلاست وتتضمن هذه العملية عدة خطوات معتمدة لدرجة كبيرة على نوعية الجزء النباتي ومصدره وتعد الاوراق مصادر ملأئمة للخلايا التي يمكن فصل البروتوبلاست منها .والطريقه المستعمله عادة هي التعقيم السطحي للاوراق اولاً يعقبها أزالة البشره وبعدها اضافة انزيمات هاضمه للجدار الخلوي ومن ثم أزالة الشوائب العالقة بالبروتوبلاست المعزول. ويمكن الحصول على مصادر اخرى عديده مثل الكالس،والمزارع الخلويه ، والجذور وكذلك الاعضاء الخازنة من النباتات المختلفة وهذه المصادر يمكن ادراجها كما يلي :-

المحاضرات النظرية

مصادر البروتوبلاست :

1- نباتات نامية في اوساط غذائيه معقمه :- plants grown in sterile culture media ان استعمال نباتات خاليه من الملوثات ونامية في اوساط غذائيه خاصة توفر مصدراً جيداً لفصل البروتوبلاست من الاوراق السيقان وذلك للأسباب التالية :

أ- أن الاوراق والسيقان المستعملة لا تحتاج إلى تعقيم قبل وضعها بالمحاليل الانزيمية الهاضمة للجدار الخلوي .

ب- يمكن السيطرة على الظروف البيئية بسهولة ووضعها تحت ظروف فسلجية مثالية

جـ - الأجزاء النباتية المغذية وهي الأوراق والسيقان تمتاز بطبقة رقيقة من الكيوتكل مما يسهل دخول الأنزيمات إلى الخلايا لتحطيم الجدر الخلوية وأطلاق البروتوبلاست إلى الوسط المستعمل في فصلها . ولقد أستعملت هذه الطريقة في العديد من النباتات مثل نبات البطاطا والطماطة والبنجر السكري والخس .

2- المزارع الخلوية Cell Suspension Culture

تعد المزارع الخلوية السريعة النمو من أكثر المصادر ملائمة لعزل البروتوبلاست الخالية من صبغات البناء الضوئي ، وعادة ترشح المزارع الخلوية عبر مرشحات خاصة للتخلص اولاً من كتل الخلايا الكبيرة قبل البدء بعملية فصل البروتوبلاست . وذلك لأن الكتل الكبيرة تكون عادة ذات جدران خلوية سميكة يصعب في بعض الأحيان هضمها بوساطة الانزيمات الهاضمة . ويستعمل في بعض الاحيان نزيم السليوليز Cellulase بتركيز منخفض (1%) في مزارع الخلايا لمدة 3-4 أيام قبل فصل البروتوبلاست وهذه المعاملة تضعف الجدر الخلوية وبذلك تكون عملية فصل البروتوبلاست سهلة إلى حد ما .

3- الجذور والأعضاء الخازنة Roots and Storage organs

أستعملت الجذور والاعضاء الخازنة للعديد من النباتات مصدراً رئيسياً للبروتوبلاست كما عزلت البوتوبلاست من جذور الطماطة والبطاطا والألمازة وجذور البصل وعموماً فأن المعاملة ألانزيميه لهذه المصادر تحتاج الى فتره اطول مماهي عليه الحال بالنسبة للسيقان وكذلك المحاليل الانزيمية تكون معقدة.

4- حبوب اللقاح pollen :

فصلت البروتوبلاست من حبوب اللقاح للعديد من النباتات، وتوفر هذه الطريقه محاسن عديدة منها

1- أن حبوب اللقاح متوفره بشكل كبير جداً
2- انها تكون متجانسه وراثياً
3- توفر فرصة جيدة لدراسة التغايرات والطفرات الخلوية المختلفه
4- ان اندماج البروتوبلاست المعزول من حبوب اللقاح يؤدي الى تكوين هجين طبيعي ذي عدد كروسومي مضاعف
5- أمكانية انتاج نباتات احادية المجموعه الكرموسومية من زراعة البروتوبلاست المعزول من حبوب اللقاح، وتعتمد عملية فصل البروتوبلاست وسهولتها على مراحل تكوين حبوب اللقاح ومن المفضل أستعمال حبة اللقاح بمرحلة الخلية الامية لحبة اللقاح pollen mother أو مرحلة تكوين الرباعيات pollen tetrad

ألانزيمات المستخدمه في فصل البروتوبلاست Enzymes

تتكون الجدر الخلويه للخلايا الحيه النباتية من مركبات معينة مثل السليلوز Cellulose واشباه السليلوز Hemi cellulose والبكتين pectin ومن اجل ازالة الجدران فأن الانزيمات المستعملة لها القدرة على تحليل السليلوز واشباه السيليوز والبكتين .ويستعمل عادة انزيم السليوليز Cellulase والذي يعمل على هضم جدار الخلية السليلوزي وانزيم البكتنيز Pectinase الذي يعمل على تحليل الصفيحة الوسطى بدرجة رئيسية واول المستحضرات التجارية لهذين الأنزيمين هما :Onozuka R10 cellulase و Macerozyme R10 Pectinase وتعتمد فعالية الانزيمات على عوامل عديدة منها تركيز الانزيم وفترة المعاملة والاس الهيدروجيني pH ودرجة الحرارة وهذه العوامل تحدد بالتجارب الاولية اثناء عملية فصل البروتوبلاست .

المحاليل الحافظة Osmotica

:

بعد المعاملة الانزيمية فأن البروتوبلاست الموضوعة في المحلول سوف تكون تحت شد أزموزي Osmotic Stress فأذا لم يحتوي المحلول المستعمل لعملية الفصل على مواد حافظة للازموزية فأن البروتوبلاست سوف تأخذ الماء بعملية الازموزية Osmosis وتنفجر وذلك لعدم أحتوائها على الجدار الخلوي لذلك تستعمل

مواد حافظة للازموزية للحفاظ على توازن ازموزي بين الوسط والبروتوبلاست المفصول وهذه المواد هي السكريات الكحولية Sugar alcohol و السوربيتول Sorbitol و Manitol بنسبة تتراوح بين 10-13 % ويمكن أستخدام السكروز Sucrose ايضاً . إلى أن السكروز في بعض الاحيان يستخدم مصدراً كاربونياً من قبل البروتوبلاست المعزول لذلك فأن تركيز السكروز سوف ينخفض في الوسط مما يؤدي إلى تغيير في ازموزية الوسط لذلك لا يفضل أستخدام السكروز في المحاليل المحافظة للبروتوبلاست .

طرق فصل البروتوبلاست Methods of Protoplast Isolation

- هناك طريقتين رئيسيتين لفصل البروتوبلاست هي :

1- الطريقة الميكانيكية Mechanical isolation

تعتمد هذه الطريقة بصورة رئيسية على الأنكماش البروتوبلازمي Plasmolysis للخلايا وبعملية الانكماش البروتوبلازمي يتقلص حجم البروتوبلاست وتبتعد عن الجدار الخلوي وبعد ذلك يعمل قطع في مناطق معينة من النسيج المستعمل مما يؤدي إلى تحرر البروتوبلاست بعد تخفيف حدة الانكماش De-plasmolysis عبر الجدار الخلوي المقطوع (شكل -1) والبروتوبلاست المتحررة تكون في بعض الاحيان غير متضررة نتيجة القطع .

ومن مزايا هذه الطريقة أن البروتوبلاست لا يتعرض إلى العمل الانزيمي كما في الطريقة الثانية التي ربما تؤثر على الغشاء البروتوبلازمي للبروتوبلاست .

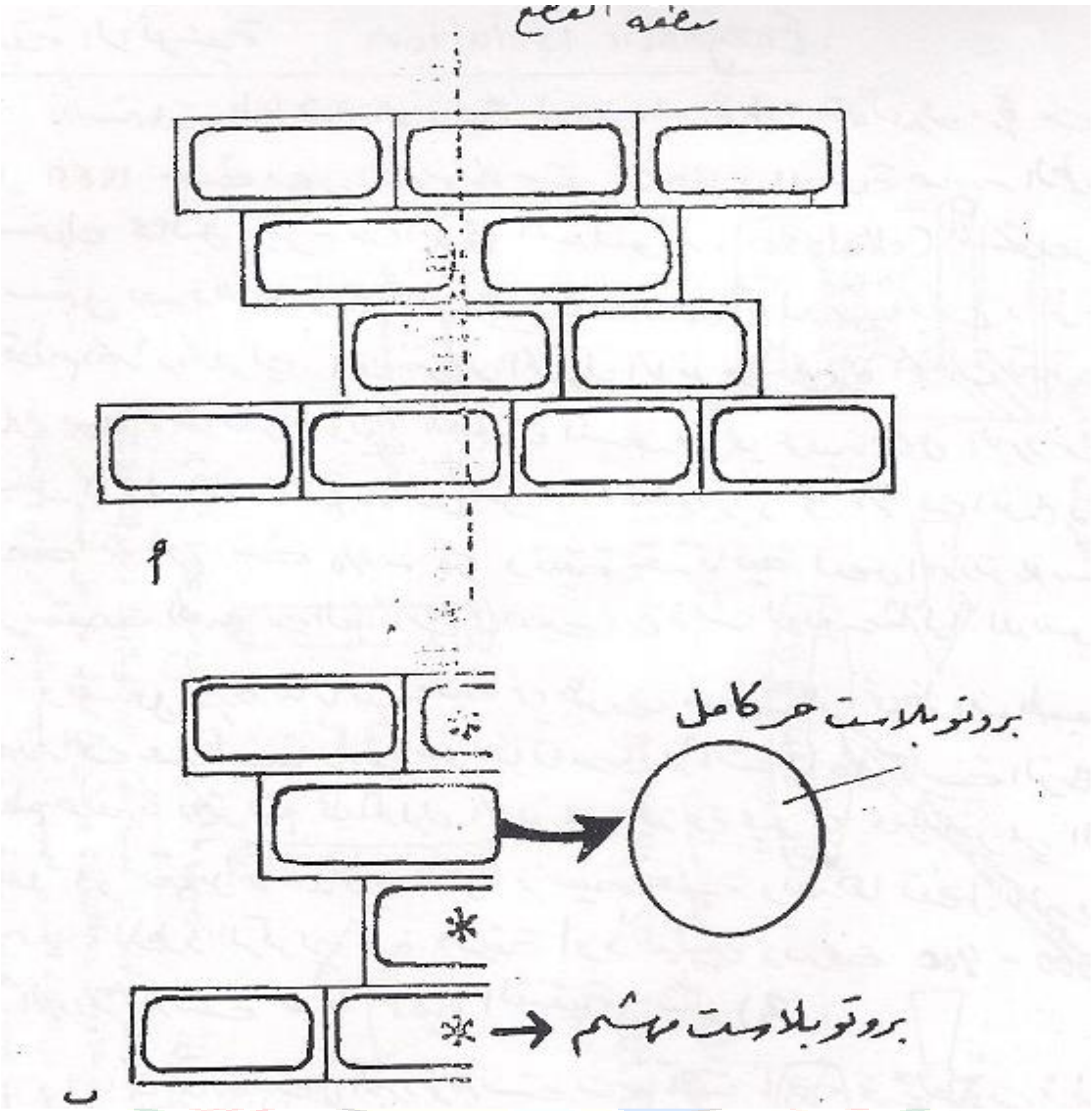
ومن مساوئ هذه الطريقة :

أ- أنها تحتاج إلى وقت وجهد للحصول على البروتوبلاست المفصول .

ب- كمية البروتوبلاست المفصولة تكون محددة .

جـ- يقتصر أستعمالها على الأنسجة الحاوية للخلايا ذات الفجوات الكبيرة فقط مثل خلايا الأنسجة الخازنة مثل الجذور والاوراق الحرشيفية وهي غير ملائمة لفصل البروتوبلاست من الخلايا المرستيمية والبالغة.

المحاضرات النظرية



شكل (1) الطريقة الميكانيكية لفصل البروتوبلاست
أ- منطقة قطع الورقة النباتية ممثلة بالخط المتقطع
ب- بعد عملية القطع فأن بعض من البروتوبلاست سوف تحرر من الجدران الخلوية

2- الطريقة الأنزيمية Enzymatic isolation:

أستعملت الطريقة الانزيمية لفصل البروتوبلاست لأول مرة من قبل Coking عام 1960 اذ فصل البروتوبلاست من خلايا انسجة جذور الطماطة وذلك بأستعمال محاليل مركزة من أنزيم السليوليز Cellulase المستخلص من الفطريات وأستعمل بعد ذلك أنزيم البكتنيز Pictenase لفصل الخلايا وانزيم السليلوليز لتحطيم الجدار الخلوي . أما تركيز المحلول الانزيمي وفترة الحضن فتعتمد بدرجة كبيرة على

نوعية الأنسجة ونوع النبات المستخدم في عملية فصل البروتوبلاست ، وعلى سبيل المثال فأن 2% من أنزيم السليوليز و 3% من انزيم البكتنيز وفترة حضن تترواح بين 40-50 دقيقة تعد كافية لفصل البروتوبلاست من الانسجة المرستيمية للعديد من النباتات في حين أن ذلك لا يعد مثالياً للانسجة الخازنة .

وتستعمل عادة نباتات نامية في ظروف معقمة أو في ظروف طبيعية اذ تفصل الاوراق عن السيقان في جو خال من الملوثات داخل كابينة الزراعة ثم تقطع إلى قطع صغيرة وتوضع في المحلول الملحي الانزيمي الذي يحتوي على انزيمي السليوليز والبكتينيز معاً أو تعامل بالتعاقب لفترة زمنية معينة وبعدها تفصل البروتوبلاست المتحررة بعملية الطرد المركزي لمدة دقيقة أو دقيقتين وبسرعة 400-500 دورة بالدقيقة وبذلك تكون البروتوبلاست معدة لعملية التنقية . شكل (2)

اما حالة فصل البروتوبلاست من نباتات نامية تحت ظروف الطبيعية فأن التعقيم السطحي للأجزاء النباتية يعد ظروري قبل فصل البروتوبلاست حيث تعامل الاوراق بالمطهرات المعروفة مثل الكحول الاثيلي بتركيز 70% أو هايبوكلورات الصوديوم أو الكاليسيوم بتركيز 10% ثم تغسل بالماء المقطر المعقم لعدة مرات لأزالة آثار المعقم بعدها تعامل الأوراق بالأنزيمات لتحرير البروتوبلاست .

تنقية البروتوبلاست المعزول Purification of isolation protoplast

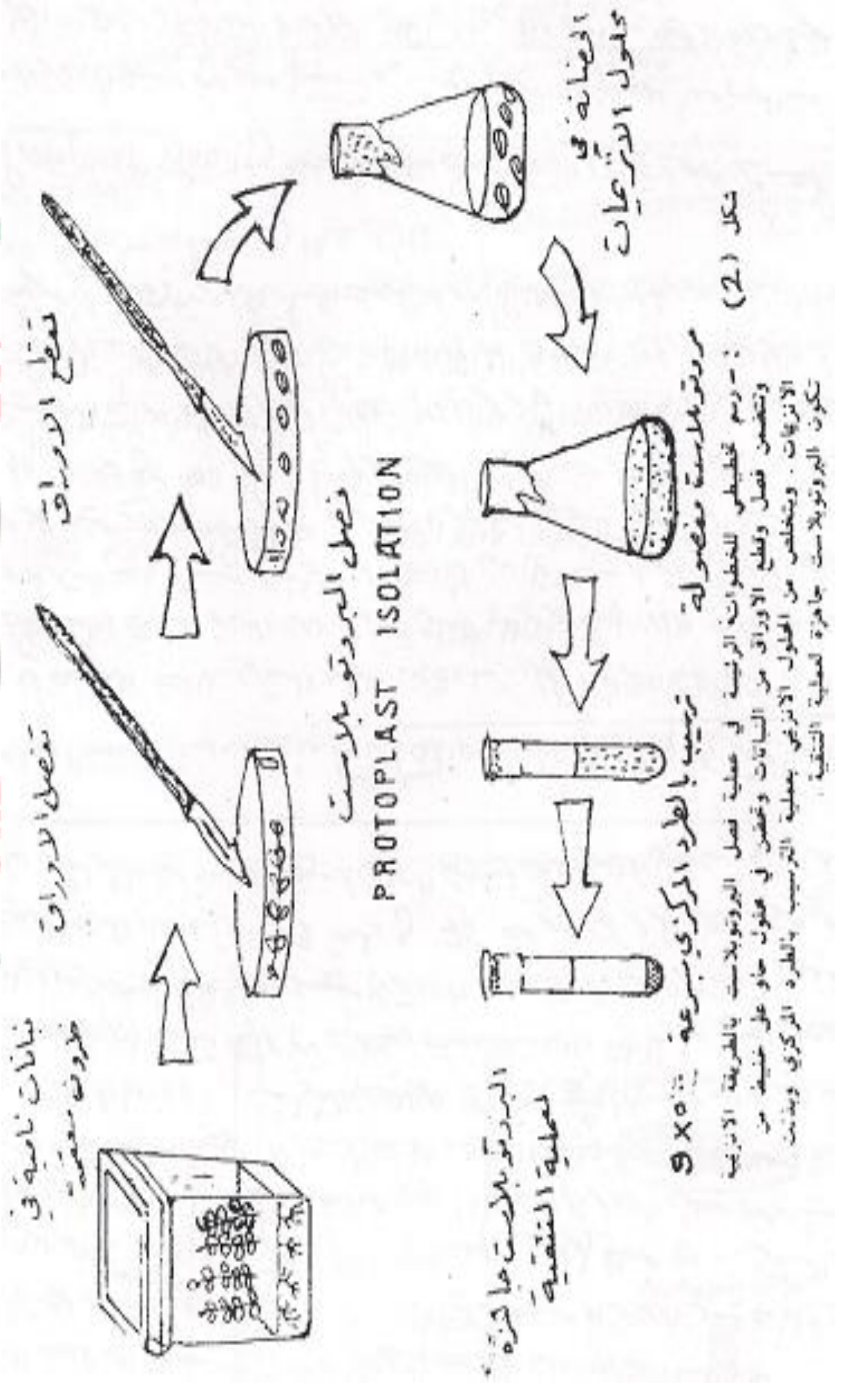
يحوي المحلول الناتج من عملية فصل البروتوبلاست بالطريقة الأنزيمية على بقايا الخلايا المختلفة وخاصة البلاستيدات الخضر والخلايا التي لم يتم هضم جدرانها وكذلك البروتوبلاست المهشمة جزئياً أضافة إلى البروتوبلاست السليمة .

وتوجد عدة طرق تستخدم لتنقية البروتوبلاست منها

1- الترسيب والغسل Sedimentation and washing :

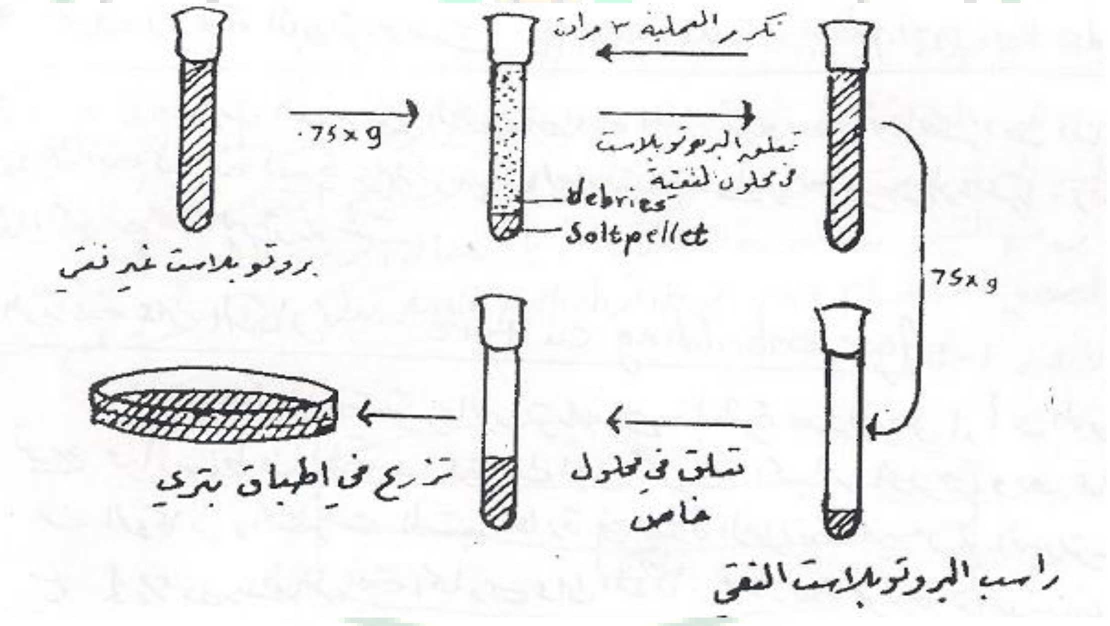
تعتمد هذه الطريقة على ترسيب البروتوبلاست السليمة بعد عملية الفصل وتعليقها في محلول غسل البروتوبلاست الحاوي على مواد حافظة للجهد التنافذي كالمانيتول والسكروز مع ضبط الأس الهيدروجيني (pH) بمقدار 5.8 كما هو موضح بالشكل (3) اذ يوضع معلق البروتوبلاست في أنابيب خاصة ثم ترسب في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وتحت هذه الظروف فأن البروتوبلاست السليمة تكون راسباً خفيفاً في قعر الانبوب أما الراشح فيحتوي على معظم الشوائب Cell debries . ويتخلص من الراشح بواساطة ماصات خاصة وبذلك تتم عملية تنقية البروتوبلاست

بصورة جزئية يعلق ثانية الراسب الحاوي على البروتوبلاست في وسط غذائي جديد ويعاد ترسيبه في جهاز الطرد المركزي بسرعة 75 دورة بالدقيقة ولمدة 3 دقائق ، تعاد هذه العملية لعدة مرات من أجل الحصول على كمية من البروتوبلاست الخالية من الشوائب مناسبة للزراعة .



2- طريقة التعويم (التطويف) Flotation

تتم هذه الطريقة عمل وسادة من محلول السكروز عالية الكثافة في أنابيب خاصة تدعى Babcock ويوضع المعلق الحاوي على البروتوبلاست والشوائب الخلوية .
ولأن كثافة البروتوبلاست أقل من كثافة باقي الشوائب نسبياً فأن البروتوبلاست يطفو فوق سطح الوسادة المكونة من محلول السكروز بتركيز 0.6 مولار بينما تنزل الشوائب إلى أسفل الوسادة وبعد جراء الطرد المركزي بسرعة 100 دورة بالدقيقة ولمدة 10 دقائق .
ومن محاسن هذه الطريقة أنها تؤدي إلى تحطيم البروتوبلاست بعملية الترسيب والغسل كما في الطريقة الأولى . إلا أن التراكيز العالية من المواد الحافظة للجهد الازموزي المستخدمة ربما تؤثر بصورة مباشرة على تأخير في تكوين الجدار الخلوي أو قلة في حيوية البروتوبلاست .



شكل(3) تنقية البروتوبلاست بطريقة الغسل والترسيب

تقدير حيوية البروتوبلاست Protoplast viability estimation

من المهم جداً فصل البروتوبلاست غير المتضرر والحية من أجل نجاح زراعتها على الاوساط الغذائية ومن هذه الطرق :

1- الجريان السايتوبلازمي Cytoplasmic Streaming

2- أستعمال صبغة ايفان الزرقاء Evan blue method

3- قياس فعالية التنفس والبناء الضوئي Measurement of photosynthetic respiratory activity

4- قياس التغير بالحجم Chang in protoplast size

5- طريقة التصبيغ بمركب (FDA) Staining with fluoreccin diacetate

يستخدم مركب الـ FDA لتقدير حيوية البروتوبلاست المفصول . ويتجمع هذا المركب عبر الغشاء البلازمي للبروتوبلاست وأن جميع البروتوبلاست الحية تبدو ذات وميض أخضر إلى الأخضر الفاتح بمعاملتها بتركيز 0.01 % من الصبغة ، ويجب ملاحظة الوميض خلال 5-15 دقيقة ويتم تحديد حيوية البروتوبلاست بتقدير كمية الوميض الناتج من مادة الفلورسين بأستخدام المجهر التألقي Flourecence microscope ولنسبة المئوية لحيوية البروتوبلاست يمكن تحديدها بأستخدام المعادلة الاتية :

$$\text{النسبة المئوية للبروتوبلاست الحية} = \frac{\text{عدد البروتوبلاست المتألقة}}{\text{العدد الكلي للبروتوبلاست}} \times 100$$

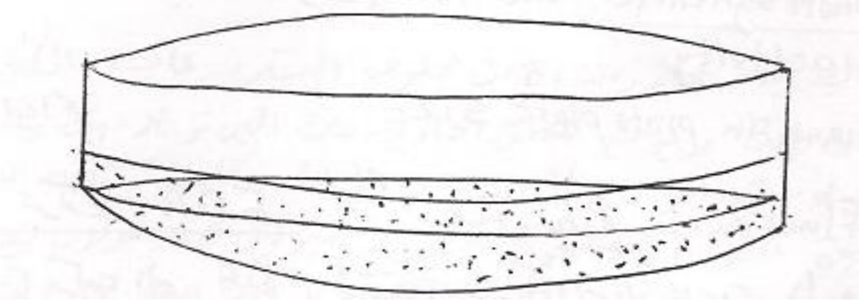
طرق زراعة البروتوبلاست Methods for protoplast

طورت العديد من الطرق لزراعة البروتوبلاست في السنوات الماضية . وتعتمد كل طريقة بدرجة كبيرة على نوعية البروتوبلاست والغرض من زراعتها . ومن الطرق المتبعة في زرعة البروتوبلاست .

1- الزراعة في الآكار Agar embedding culture

في هذه الطريقة تزرع البروتوبلاست مباشرة بعد الفصل أو ان البروتوبلاست المفصولة تزرع في أوساط غذائية سائلة من أجل تكوين الجدار الخلوي وبعدها تزرع على طبقة من الآكار والخطوات المتبعة عادة في هذه الطريقة هي مزج البروتوبلاست المفصولة مع 1% من وسط الزراعة الحاوي على الآكار بدرجة حرارة ما بين 40-45 ° م ثم يؤخذ كمية قليلة من الخليط الحاوي على الآكار والبروتوبلاست سوف تنمو على مواقع ثابتة من الآكار المتصلب ومن فوائد هذه الطريقة أمكانية زراعة البروتوبلاست بكثافة منخفضة شكل (4) .

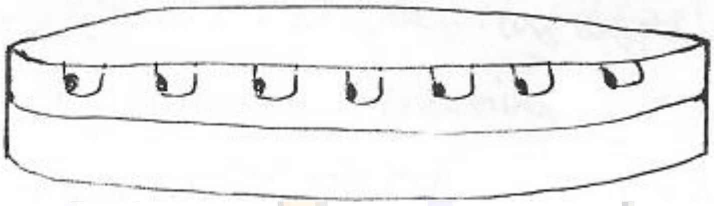
المحاضرات النظرية



شكل (4) زراعة البروتوبلاست المفصولة والنقية في طبق بتري على الآكار

2- الزراعة في القطرة المعلقة Hanging drop Culture

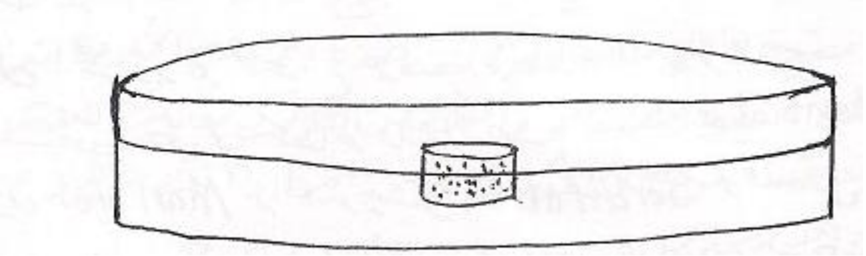
وتستعمل هذه الطريقة عادة في زراعة البروتوبلاست في المعلق الخلوي لتتبع تطورها . توضع قطرة من البروتوبلاست المعلق في الوسط الغذائي في حفرة للشرائح المعدة لهذا الغرض ويمنع التبخر بواسطة قطرة من الزيت توضع حول غطاء الشريحة . وعادة توضع الشرائح في أطباق بتري حاوية على محلول المانيتول للحفاظ على مستوى معين من الرطوبة شكل (5) .



شكل (5) زراعة البروتوبلاست بطريقة القطرة المعلقة

3- طريقة الغرفة الدقيقة Micro chamber

تستخدم هذه الطريقة بصورة شائعة في زراعة البروتوبلاست المفصولة والتي يمكن ملاحظة تطور البروتوبلاست من خلالها وهناك عدة تصاميم أقترحت لتفي بهذا الغرض المهم هنا أن منع التبخر من الغرفة الدقيقة يتم بأستعمال الزيت الطبيعي إلا أنه وجد أن من المفضل أستخدام صبغ الاظافر Nail polish بدلاً من الزيت لمنع التبخر بصورة كاملة (شكل 6).



شكل (6) زراعة البروتوبلاست بطريقة الغرفة الدقيقة

الوسط الغذائي Culture medium

يعد الوسط الغذائي من العوامل المهمة في نجاح زراعة البروتوبلاست ، ويعتمد بدرجة كبيرة نوع الوسط الغذائي المستعمل في زراعة البروتوبلاست وتوالد النباتات على نوع النبات وكذلك على الأجزاء النباتية المستخدمة في فصل البروتوبلاست . وتشابه المكونات الاساسية التي تدخل في تركيب الأساط الغذائية المستخدمة في نشوء الكالس أو زراعة الخلايا المعلقة تلك المستخدمة في زراعة البروتوبلاست مع بعض التحويرات وغالباً ما يستخدم وسط Murashige and Skoog (MS) 1962 ووسط Gamborg B5 1968 أو أوساط أخرى محورة عنها لنجاح عملية زراعة وتوليد النباتات من البروتوبلاست المفصول .

وتحتاج المراحل الاولى من زراعة البروتوبلاست مواد معينة تساعد على تثبيت الاغشية البروتوبلازمية ويستعمل عادة ايونات ثنائية موجبة الشحنة مثل Ca^{+2} والذي مصدره $CaCl_2$ كلوريد الكاليسيوم في الوسط وكذلك Mg^{+2} والذي مصدره $MgSO_4$ لهذا الغرض . كما لوحظ بأن أضافة الـ Casein hydrolysate إلى الوسط الغذائي وهو خليط من الاحماض الامينية أدى إلى زيادة في معدل الانقسامات الخلوية في بروتوبلاست المفصولة من النسيج المتوسط لأوراق البزاليا اما مصدر الطاقة فيستخدم عادة السكروز بتراكيز مختلفة أعتماداً على نوعية النبات المستعمل وفي بعض الاحيان من المفيد أضافة أنواع معينة من السكريات مثل الكلوكوز والزايلوز والرايبوز من أجل الحصول على أنقسام خلوي وتكوين جدران خلوية بصورة أفضل أما منظمات النمو النباتية فيعد وجودها عاملاً مهماً في الوسط الغذائي المستعمل لزراعة البروتوبلاست المفصول من الاجزاء النباتية للعديد من النباتات ، ويعد الـ 2,4-D أو الـ IAA في بعض الاحيان وتركيز الاوكسينات في الوسط الغذائي يتراوح بين 0.1 إلى 5.0 ملغم/لتر معتمدة على نوعية البروتوبلاست المستخدمة أو السايتوكاينينات فيستخدم عادة الكاينين أو BAأو 2ip وبتراكيز مختلفة .

ومن العوامل المحددة لنجاح عملية زراعة البروتوبلاست وجود تراكيز مثالية من المواد المستخدمة في الحفاظ على الجهد التنافذي Osmotic Potential لها.
ومنها المانيتول Manitol والسوربيتول Sorbitol وتستعمل عادة بتراكيز تتراوح ما بين 0.5 إلى 0.8 مول/لتر . وفي بعض الاحين يستخدم خليط من هذه المواد .

تكوين الجدار الخلوي Cell Wall regeneration

أن البروتوبلاست عبارة عن خلايا حية عديمة الجدار الخلوي ، لذلك فأن بناء الجدار الخلوي خطوة مهمة في نجاح زراعة البروتوبلاست وعدم تكوين ونشوء الجدار الخلوي في البروتوبلاست المفصول يحدد فشل تكوين الخلايا النباتية وعدم تخصصها في حين أنه لا توجد علاقة بين أنقسام النواة والبروتوبلاست مع نشوء الجدار بحيث يمكن أن يتم ذلك دون الحاجة إلى وجود الجدار الخلوي .

ويتم تكوين الجدار الخلوي للبروتوبلاست النامي في أوساط غذائية معينة بعد عدة ساعات من غسلها من الانزيمات ويستغرق بناءها كاملة مدة تتراوح بين يومين إلى ثلاثة أيام ويتكون الجدار الخلوي حديث التكوين من لويفات سليلوزية سائبة في البداية تنتظم بعد ذلك مكونة جدار خلوي وينشأ ذلك من غشاء البلازما وربما تشترك الشبكة البلازمية الداخلية في بناء الجدار الجديد. وهناك عوامل كثيرة تؤثر بصورة مباشرة على تكوين الجدار منها :

1- توفير المصدر الخارجي للكاربون مثل السكروز : اذ أنه بغياب السكروز لا يحصل تكون للجدار الخلوي .
2- وجود نوع معين من الاملاح بدلاً من المانيتول : اذ يؤدي ذلك إلى تكوين خلايا تنقسم لمرتين أو ثلاثة ثم تتوقف عنة الانقسام وتكون محاطة بجدران رقيقة جداً.
3- غسل البروتوبلاست بمواد الغسل الخاصة والتي ذكرت في تنقية البروتوبلاست بشكل غير كافي لوحظ أن لغسل غير الكافي للبروتوبلاست قبل زراعتها يمكن أن يؤدي إلى بروتوبلاست متعدد النوى من دون تكوين جدار خلوي .

أنقسام البروتوبلاست Protoplast division :

يعد وجود الجدار الخلوي اساساً للحصول على أنقسام منتظم ، إلا أن الخلايا المتكونة من البروتوبلاست لا تشرع جميعها بالانقسام ففي التبغ وجد أن هناك

انقسامات غير متساوية للخلايا المتكونة من البروتوبلاست ولا تشرع جميعها بالانقسام وهذا ربما يؤدي إلى حصول أختلافات وراثية بين النباتات الناتجة .

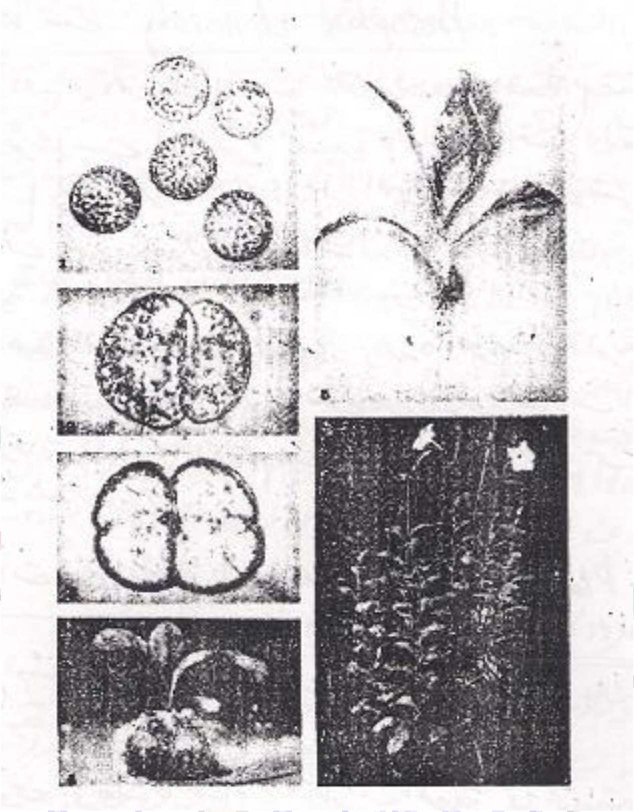
ويمكن ملاحظة الانقسام الثاني بعد أسبوع من الانقسام الاول مما يؤدي إلى تكوين مجموعات خلوية صغيرة (Cell clumps) . وهذه المجموعات الخلوية تنمو بعد ذلك مكونة الكالس الذي يمكن تحفيزه على النمو والتخصص لتكوين نباتات كاملة . ويتم ذلك بنقل تلك المجموعات الخلوية إلى أوساط غذائية ذات تراكيز منخفضة من المواد الحافظة للجهد الازموزي .

نشوء النباتات من زراعة البروتوبلاست Regeneration of Plants from protoplast culture

تتضمن عملية نشوء النباتات من زراعة البروتوبلاست على أوساط غذائية محددة خطوات اساسية هي :

1- تكوين الجدار الخلوي : ويعد ذلك من الخطوات المهمة في عملية أنتاج النباتات .
2- يعقب تكوين الجدار أنقسام الخلايا المتكونة منتجة تجمعات خلوية صغيرة Cell aggregates تنقسم لاحقاً لتؤدي إلى كتل خلوية (الكالس) .
3- تكوين الأعضاء من هذا الكالس بعملية تسمى تكوين الأعضاء Organogenesis ويمكن السيطرة على هذه العملية بوساطة منظمات النمو المضافة للوسط الغذائي .
4- تكوين الاجنة من هذا الكالس بعملية تسمى تكوين الاجنة Embryogenesis ويتم ذلك بطرق مختلفة معتمدة بصورة رئيسية على مكونات الوسط الغذائي المستخدم وتتضمن العملية أستحداث الاجنة من خلايا خاصة من الكالس لها القابلية على تكوين الاجنة تدعى embryonic cells وبعد أكمال هذه الاطوار ينشأ النبات الكامل من البروتوبلاست النامي على الوسط الغذائي المحدد . والمدة الزمنية اللازمة لنشوء النبات الكامل تختلف بأختلاف أنواع النباتات وعموماً يمكن القول بأن المدة (الأساس) الأولى تستنفذ في تكوين الجدار والأنقسام والكتل الخلوية وهذه تتراوح ما بين 3-6 أسابيع.

المحاضرات النظرية



شكل (7) نشوء نباتات البتونيا من بروتوبلاست مفصولة من خلايا النسيج المتوسط للاوراق

1- بروتوبلاست مفصولة من جدار خلوي
2- عملية أنقسام البروتوبلاست
3- زيادة في عملية الانقسام
4- نشوء النباتات من كالس البروتوبلاست النامي على الوسط الغذائي
5- نبات كامل مفصول من الوسط الغذائي
6- نبات كامل مشابه للنبات الاصل

- **تطبيقات تقانة زراعة الأنسجة النباتية :**
- **تربية وتحسين النبات Plant breeding and improvement :**

توفر زراعة الأنسجة النباتية أمكانية كبيرة للحصول على نباتات بمواصفات خاصة خلال تغير التركيب الوراثي للفرد الناتج . وعلى الرغم من التطور الكبير الذي شهدته حقول علوم الحياة إلا أنه لاتزال هناك العديد من المشكلات التي تواجه مربو وعلماء النبات مثل العامل الزني ومشكلة عدم التوافق بين النباتات لأجراء التهجينات لمختلفة النقل صفة محددة بين نبات وآخر وغيرها . ولذلك أتجه الباحثون ومربو النبات ومنذ لقرن الماضي إلى الاستعانة بزراعة الأنسجة النباتية للتغلب على بعض المشاكل ومن أهم التقانات المستخدمة في هذا المضمار هي زراعة المتوك وحبوب

اللقاح وزراعة الأجنة والبويضات فضلاً عن أجراء التهجين البروتوبلازمي وأستحداث الطفرات خارج الجسم الحي وغيرها .

أولاً : زراعة المتك وحبوب اللقاح Anther and pollen culture :

تحمل الخلايا الجنسية في النباتات الثنائية التضاعف العدد الأحادي الأساسي من الكروموسومات وفي حالات كثيرة يرغب مربي النبات في الحصول على نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية ومضاعفة عددها الكروموسومي لأنتاج نباتات ثنائية والتي يمكن أن تكون تامة النقاوة وتربيتها حقيقية True breeding . ومن الطرق المتيسرة هي تلك الخاصة بزراعة المتك وحبوب اللقاح وتنميتها بشكل مباشر إلى نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية .

مراحل تطور المتك Anther development stages :

أن تحويل حبوب اللقاح المأخوذة من نباتات مغطاة البذور من شكل التطور الاعتيادي (الأنبات وتكوين الانبوب اللقاحي) إلى شكل النمو والتطور إلى نباتات يحدث فقط عند زراعتها في المرحلة المثلى من التطور . و وتعتبر هذه المرحلة من تكون السبورات الرباعية بعد أنتهاء مرحلة الانقسام الخيطي وتنتهي قبل ترسب النشا في المرحلة المبكره من المرحلة المشيجية Gametphyte .

وأعتماداً على التركيب الداخلي لمراحل نشوء حبة اللقاح يمكن تقسيمها إلى عدة مراحل تطورية أعتماداً على الاطوار العمرية لها من أجل مقارنة أستجابة المتوك لعملية الزراعة. وهناك نباتات ذات أستجابة عالية لزراعة متوكها بحيث يمكن الحصول على نباتات من زراعة المتوك في جميع مراحلها التطورية مثل نبات الداتورا والتبغ.

وتعد البراعم الزهرية غير المتفتحة مصدراً جيداً لزراعة المتوك وذلك لسهولة تعقيمها وأزالة الأوراق الكأسية والتويجية وزراعتها في أوساط غذائية صلبة أو سائلة . وزراعة المتوك على الاوساط تكون اما بصورة طافية او بواساطة روابط من ورق الترشيح توضح بينها وبين الوسط الغذائي السائل ويعتبرGuha و Maheshwari عام 1964 أول من حصل على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية من زراعة المتوك بتطور حبوب اللقاح لنبات الداتورا كما أستعملت للعديد من النباتات ذات الأهمية الأقتصادية مثل الرز والحنطة والشعير والشيلم والذرة والبطاطا والتبغ.

أن الهدف من أستعمال هذه الطريقة هو ايجاد وسيلة تسمح بنمو وتطور حبوب اللقاح فقط دون الانسجة الاخرى داخل المتك مكونة اجنة منتظمة كما في نبات التبغ أو في قسم من الحالات تتطور إلى كتلة غير منتظمة من الكالس كما هو الحال في نباتات المحاصيل الحقلية كالحنطة والشعير .

زراعة حبوب اللقاح Pollen grain culture :

تكمن أهمية زراعة حبوب اللقاح بعد فصلها من المتوك على نباتات أحادية haploid plants وذلك لأن زراعة المتك كاملاً على وساط غذائية معينة قد تؤدي إلى تكوين نباتات ناشئة من حبوب اللقاح أو في بعض الاحيان من أنسجة المتك التي تكون عادة غير متجانسة وراثياً وللتغلب على مثل هذه المعوقات يفضل زراعة حبوب اللقح لناضجة أو الفتية بعد فصلها من المتك . وتفضل عادة حبوب اللقح من المتوك المعقمة في أوساط غذائية سائلة بأستعمال خلاط زجاجي glass homogenizer ويتم فصل حبوب اللقاح عن الوسط الغذئي السائل بأستخدام الطرد المركزي بسرعة بطيئة نسبياً ووضعها بعد ذلك على وسط صلب محدد لهذا الغرض.

وتكون حبوب اللقاح الناضجة للعديد من نباتات معراة البذور نسيج الكالس عند زراعتها على أوساط غذائية صلبة في حين أن حبوب اللقاح لنباتات مغطاة البذور لا تكون كالس عادة عند زراعتها على اوساط غذائية مناسبة .

وهناك عدة طرق لزراعة حبوب اللقاح مثل

1- طريقة القطرة المعلقة .
2- طريقة الـ Nurse-culture

أن عملية تطور حبوب اللقاح ومرورها بسلسلة من نقسام الخلايا وتمايزها ذلك أعتماداً على طاقتها التطورية الكائنة لتكوين نبات احادي المجموعة الكروموسومية يطلق عليها Androgenesis

Androgensis : is the in vitro development of haploid plants originating from totipotent pollen grains through a series of cell division and differentiation step .

- وهناك نوعان من عملية الـ Androgenesiss هما :-

1- المباشر Direct androgenesis : وفيه تسلك حبة اللقاح سلوك البيضة المخصبة Zygot حيث تعاني سلسلة من التغيرات لتكوين جنين جسمي Somattic embryo ينمو هذا الجنين ليعطي نباتاً أحادي المجموعة الكروموسومية كما يحصل في نبات الداتورا والتبغ.

2- الغير مباشر Indirect androgenesis : وفيه تنقسم حبة اللقاح أنقسامات متكررة لتكوين نسيج الكالس والذي يتمايز إلى نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية عن طريق تكوين أجنة لا جنسية (جسمية) أو أفرع يتم تجذيرها لاحقاً كما يحصل في نباتات الحنطة والشعير والشيلم .

العوامل المؤثرة على تكوين النبات من زراعة المتوك وحبوب اللقاح :

1- مرحلة تطور حبة اللقاح Pollen development stage :-

تعتبر عامل اساسي في نجاح زراعة المتك وحبوب اللقاح والمرحلة المثلى لزراعة حبوب اللقاح تتباين بأختلاف أنواع النباتات ولا توجد مرحلة معينة لنجاح زراعة حبوب اللقاح لجميع النباتات .

2- عامل جدار المتك Anther wall factor (s) :-

حيث تفشل حبوب لقاح قسم من النباتات في تكوين الاجنة عند زراعتها دون وجود جدار المتك حتى في المرحلة المثلى لزراعتها حيث أشارت البحوث إلى أن جدار المتك له تأثير مباشر على تكوين الأجنة من حبوب اللقاح .

3- نوع النبات والظروف البيئية Type of plant and environ mental factors

تتأثر المتوك وحبوب اللقاح بالعدبد من العوامل عند زراعتها في المرحلة المثلى للتطور وخاصة حالة النبات الفسلجية عند أخذ متوكها والظروف البيئية النامية فيها كذلك عمر النبات الام كما وجد من خلال الدراسات إلى أستجابة المتوك للنمو تختلف بأختلاف مواسم النمو في العديد من الانواع النباتية مثل البطاطا والحنطة والشعير .

ثانياً : زراعة الاجنة Embryo Gulture :

يعد اجهاض الاجنة أكثر الحالات شيوعاً التي تحصل أثناء عملية التهجين سواء بين الاجناس intergeneric Crosses أو حتى بين أصناف أو انواع الجنس الواحد Interspecefic crosses وعلى الرغم من حصل عملية الاخصاب إلا ان الجنين يجهض في مراحل معينة من تطور البذور بسبب اضمحلال السويداء endosperm وحرمان الجنين من الغذاء اللازم لنموه وتطوره ويمكن إنقاذ الجنين في هذه الحالات

عن طريق عزله وزراعته على وسط غائي محدد ومن ثم تطوره إلى بادرة وبعدها إلى نبات كامل .

وترجع بدايات زراعه الاجنه النباتيه الى العام 1904 عندما قام الباحث Hannig بفصل اجنه بالغه من بذور انواع نباتيه معينه وتنميتها في ظروف معقمه على اوساط غذائية تحتوي على الاملاح المعدنيه والسكروز .

وتعتمد زراعة الاجنة بصوره اساسية على فصل الجنين من البذرة وتنميته على اوساط غذائية صناعية. تسلك الاجنه سلوكاً مختلفاً عند زراعتها على الاوساط الغذائية وهي أن الاجنه الناميه خارج الجسم الحي لا تمر بمرحله السكون التي تمر بها الاجنه البالغة في البذرة وأن الاوساط الغذائيه الحاويه على المواد الغذائيه الاساسية مع وجود السكروز تكون ملائمة لنمو الاجنه المفصوله من البذور البالغه في حين انها لا تلائم نمو الاجنه المفصوله من البذور غير البالغه بحيث تنمو هذه الاجنه على هذه الاوساط مكونه بادئات مشوهة وتعرف هذه الحالة بالانبات المبكر Recocious germination . ويعد عام 1941 نقطة التحول في مجال زراعة الاجنة عند نجاح Van Overbeak وجماعته في زراعته اجنة نبات الداتورا الهجينه على وسط غذائي يحوي على المواد الغذائية الاساس مضافاً اليها حليب جوز الهند .

3- <u>متطلبات زراعة الاجنه :</u>

من اهم العوامل التي تحدد نجاح زراعة الاجنة هو اختيار الوسط الملائم الذي يوفر الاحتياجات المختلفة للجنين في مراحل تطوره المختلفة . فالاجنه البالغه (كاملة التكوين في المرحلة الطوربيدية) تحتاج فقط الى محلول من عناصر الاملاح المعدنيه والسكروز ، في حين ان الاجنة غير البالغه(في المرحلة الكروية) لا تنمو على هذا الوسط وتحتاج الى اضافات محدده من اجل نموها . ويحدد تطور الاجنة بمرحلتين رئيسيتين وحسب ما قدم من قبل Raghavanعام 1976 :

1- مرحله طفيلية التغذية Heterotrophic Stage : وفيها يعتمد الجنين في غذائة على السويداء والانسجة الاخرى المحيطة به من اجل نموه وتطوره .

2- مرحلة ذاتية التغذية Autotrophic Stage : في هذه المرحلة يمكن للجنين أن يستفيد من المواد الغذائية والسكر في الوسط الغذائي لبناء المواد اللازمة لنموه وتطوره وبذلك يكون ذاتي التغذية .

وينتقل الجنين من مرحلة التغذية الرمية (الطفيلة) الى مرحلة التغذية الذاتية باستمرار مراحل تطوره ، فقد وجد ان الجنين يكون طفيلي التغذية في نبات كيس الراعي حتى

المرحلة الكروية ثم يصبح ذاتي التغذية في المراحل المتاخرة (المرحلة الطوربيدية) وتكون احتياجات الجنين اقل كلما تقدم بالعمر .

4- العوامل المحددة لنمو الاجنة خارج الجسم الحي :

1- الاملاح المعدنية للوسط الغذائي :

استعملت العديد من الاوساط الغذائيه الستخدمة في زراعة الانسجة والخلايا النباتيه في زراعة الاجنة مثل وسط Murashige and Skooge ووسط Heller ووسط B5 ... الخ

وقد وجد أن نمو الاجنة على وسط MS قليل نسبياً في حين ان نموها في وسط Knop ضعيف للغاية ولذلك قام الباحث Monnier عام 1976 بتغيير تركيز الاملاح المعدنية لوسط MS ليكون ملائماً لنمو الاجنة المزروعة يحوي وسط Monnier على تراكيز عالية من البوتاسيوم والكالسيوم مع مستويات واطئة من أيون الامونيوم .

2- الكاربوهيدرات : من اكثر الكاربوهيدرات استعمالاً في اوساط الزراعة للاجنة هو السكروز الذي يعد مصدراً للطاقة فضلاً عن المحافظة على ضغط ازموزي مناسب في وسط الزراعة وتراكيزه تترواح بين 8-12 % ويعتمد التركيز المضاف على مرحلة تطور الجنين فالاجنة البالغة تحتاج الى تراكيز واطئة من السكروز اما الاجنة غير الناضجه فتحتاج الى تراكيز اعلى نسبياً لفعاليتها الايضية النشطة .

3- الحوامض الامينية والفيتامينات :

الحوامض الامينية عموماً لها دور تحفيزي في زراعة الاجنة . ويعد الحامض الاميني الكلوتامين من اكثر الحوامض الامينيه استعمالاً في زراعة الاجنة . أما الفيتامينات فيمكن الاستغناء عنها ما عدا الـ B1 و B2 ، ويضاف عادة الـ Caslen hydiolysate لاحتواءه على جميع الحوامض الامينية اللازمة للنمو .

4- منظمات النمو النباتية :

على الرغم من عدم وجود ما يشير الى ضرورة اضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي الخاص بزراعة الاجنة الا أن بعض الابحاث اشارت الى أن وجود الاوكسين يعد ضرورياً لتمايز الاجنة في نبات الذرة كما وجد ان وجود السايتوكاينين مع الاوكسين كان ضرورياً لنمو وتخصص أجنة بعض النباتات وربما يعزى ذلك إلى التأثير المتبادل للأوكسين والسايتوكاينين وتداخلها مع بعضها في التأثير على نمو الأجنة .

5- الأس الهيدروجيني pH للوسط الغذائي :

لا يوجد pH محدد للوسط يتراوح الـ Ph المثالي لنمو أجنة الداتورا يتراوح بين 5-7.5 .

المحاضرات النظرية

6- ظروف الزراعة والتحضين :
تنمو الاجنة المزروعة لمعظم النباتات في درجة الحرارة تتراوح بين 25-30 مْ أما ظروف الاضاءة فتشابه تلك المستخدمة في زراعة قمة الساق.

- **التطبيقات العملية لزراعة الاجنة : Aplications of Embryo Culture**

1- الحصول على الهجن النادرة :- وهي أكثر أستعمالات زراعة الاجنة وأكثرها شيوعاً ففي العديد من التهجينات لتي تجري بين الانواع أو بين الاجناس يحصل الاخصاب بصورة طبيعية ويتطور الجنين الناتج بصورة طبيعية إلا ان عدم تطور نسيج السويداء يؤدي إلى موت مبكر للجنين مما يتعذر معه الحصول على بذور قابلة للانبات . وقد أشار الباحثين إلى امكانية تنمية الاجنة الناتجة من التضريب بين الانواع أو الاجناس المختلفة على أوساط غذائية صناعية بشرط أن يتم الفصل في الوقت الملائم (قبل حدوث الاجهاض للجنين) ولذلك تستعمل هذه التقنية لزراعة أو لإنتاج هجن نباتية من تضريبات غير ناضجة بسبب المعوقات التي تظهر بعد الاخصاب .

2- تقصير دورات التربية والتحسين :-
تحتاج تربية النباتات البستنية خاصة الاشجار والشجيرات إلى فترة طويلة بسبب فترة السكون الطويلة بسبب فترة السكون الطويلة التي تمر بها البذور ، ولكن بفضل وتنمية هذه الاجنة على أوساط غذائية صناعية يمكن تقصير هذه الفتره ، ففي التفاح البري لوحظ أن البذور تبدي بالانبات بعد 48 ساعة من زراعتها على أوساط غذائية صناعية وبعد 3 أسابيع أمكن الحصول على بادرات قابلة للشتل وبعد 5 أشهر وصلت الشتلات إلى طول 1 متر في حين تتطلب البذور المزروعة في التربة تسعة اشهر لتثنت.كما لوحظ أن النباتات الهجينة للمشمش والخوخ الناتجة من زراعة الاجنة على أوساط غذائية كانت أفضل من تلك المنتجة من بذور من ناحية التكبير بالازهار وعدد الازهار للنبات .

3- الاكثار الدقيق للاصناف النادرة : مثل بعض أنواع الصنوبريات والبقوليات والتي يصعب انباتها ونسبة انباتها قليلة جداً.

4- أداة فعالة في فحص نقاوة البذور .

5- يستخدم لدراسة نمو وتطور الاجنة والتكوين الجنيني في النبات .

ثالثاً : زراعة المبيض Ovary Culture

:

المحاضرات النظرية

تعريفها : هي زراعة المبايض غير المخصبة للحصول على نباتات احادية المجموعه الكروموسومية من خلية البيضة أو أية خلايا أحادية في الكيس الجنيني وتسمى العملية هي Gynogenesis.

Culture of unfertilized ovaries to obtain haploid plants from egg cell or other haploid cells of emberyosac is called ovary culture and the process is known as Gynogenesis .

وأول من كتب عن الـ Gynogenesis هو San Noem في عام 1976 هي نبات الشعير وعموماً تزرع المبايض طافية على أوساط غذائية حاوية على تراكيز منخفضة من الاوكسينات وتحضن في الظلام وتساعد هذه الزراعة على تحفيز المبايض في حين تنقل بعدها إلى أوسط التوالد regenerationالتي تكون اوساط صلبة وحاوية تراكيز أعلى من الاوكسين وتحضن في الضوء .

محددات زراعة المبايض Limitation of ovary culture :

1- نسبة أستجابة المبايض لزراعة الانسجة قليلة (1-5%) وعدد النباتات المتكونة من المبيض الواحد قليل (1-2) نبات.

2- أنواع قليلة من النباتات فقط نجحت زراعة مبايضها خارج الجسم الحي .

فوائد أومزايا زراعة المبايض Advantages of ovaries culture:

1- تستخدم في الدراسات التي تتعلق بمظهر الثمار وفسلجتها ومراحل تطورها واحتياجاتها الغذائية

2- تستخدم في حالة وجود العقم الذكري male sterility في المحاصيل المختلفة

3- تستخدم لأجراء التلقيح والاخصاب خارج الجسم الحي Invitro pollination and fertilization

4- تستخدم في حالات انقاذ الجنين Embryo rescue بعد الاخصاب من الاجهاض .

5- لتقليل نسبة النباتات عديمة الكلوروفيل Albino plants

رابعاً: زراعة البويضات Ovule culture:

تستخدم طريقة زراعة البويضات بدلاً من زراعة المبايض Ovary culture في الحالات التي يحدث الاجهاض abortionفي وقت مبكر جداً (بعد عملية الاخصاب

مباشرةً) وكبديل لزراعة الاجنة في حالة عدم امكانية او صعوبة استئصالها في هذه المرحلة المبكرة جداً.

Ovule culture is mainly tried only in those cases where embryo abrts very early , and embryo culture is not possible due to difficulty of it's excisions at Avery early stage.

وعادة تفضل البويضات عدة أيام من التلقيح وقبل أنقسام لبيضة المخصبة ومن المشكلات الاخرى التي تواجه مربي النبات هو عدم التوافق Incompatability سواء كان التلقيح ذاتياً او خليطاً وبصورة خاصة الاجناس المتباعدة وراثياً .

فقد تنضج حبوب اللقاح في أوقات مبكرة قبل نضج المياسم وقبل أن تكون مستعدة لعملية التلقيح . أو عدم نمو انبوب اللقاح على المياسم الزهرة أو قصر طوله وكذلك وجود بعض المثبطات لنمو حبوب اللقاح على المياسم في بعض الاحيان والطريقة الوحيدة للتغلب على هذه المشكلات هي أستخدام طريقة التلقيح والتخصيب خارج الجسم الحي ففي هذه التقانة يمكن عزل البويضات وزراعتها على أوساط غذائية محدودة ومن ثم تلقيحها بحبوب لقاح من النبات المطلوب . والحصول بعدها على بذور تنمو فيما بعد إلى بادرات وأستعملت هذه التقانة في الحصول على بذور حية لنباتات مثل البتونيا غير التوافق طبيعياً.

أنتاج المواد الايضية الثانوية Secondary Metabolites Prodution

<u>المواد الايضية الثانوية Secondary metabolites or Secondary by products</u>

هي عبارة عن مواد او مركبات تمثل أحدى مكونات الخلية غير الأساسية والتي لا تدخل ضمن الفعاليات الايضية الرئيسية الضرورية لنمو وتطور الخلية مثل التركيب الضوئي والتنفس وبناء البروتين وغيرها وهذه المواد هي القلويدات والكلوكوسيدات والتربينويدات والفلافورات والعطور وغيرها .

النباتات هي المصدر الرئيسي لكثير من المواد الحياتية التي لها أهمية طبية وأن بعض النباتات المتخصصة في أنتاج مثل هذه المواد عند زراعتها خارج الجسم الحي *in vitro* وفي أوساط غذائية معينة تنتج هذه المواد ويتم جمعها والاستفادة منها .

المحاضرات النظرية

النباتات التي تنمو في ظروف طبيعية *in vivo* عادة تكون هذه المواد ولكن أستخلاص هذه المنتجات من أنسجتها يكون صعب كذلك فأن الحصول على هذه المنتجات من مزارع الانسجة النباتية له مزايا عديدة منها :-

1- كمية ونوعية المنتج تكون أكثر ثباتية في حالة الخلايا المزروعة خارج الجسم الحي لأنها لا تتأثر بالظروف البيئية (درجة الحرارة ، الرطوبة ، نوع التربة).
2- أمكانية جدولة الانتاج بسبب سهولة التحكم والسيطرة على الظروف المختبرية (المعملية).
3- أمكانية زيادة أنتاج هذه المواد في الزراعة خارج الجسم الحي بتضمين الوسط الغذائي ببادئات تكوين هذه المود أو المعالجة الوراثية للخلايا المزروعة .
4- تقانات الزراعة خارج الجسم الحي توفر الفرصة للانتاج الواسع لهذه المنتجات الثانوية من النباتات المفيدة .
5- مشكلة تلوث المنتج تكون معدومة لأن الزروعات يتم أنشاؤها في ظروف معقمة تماماً .

وعلى الرغم من هذه المزايا للزراعة النسيجية في أنتاج هذه المواد إلا أن هناك بعض المساوئ والجوانب غير المرغوبة ومنها :

1- في زراعة الانسجة ليس كل الخلايا المزروعة تنتج هذه المواد الثانوية وهذا يمكن أن يعزى إلى توقف النشاط الجيني لأنتاج هذه المواد على المستوى الخلوي كنتيجة لتغير الحالة الفسيولوجية والمورفولوجية للخلايا المزروعة .
2- خلال الزراعة خارج الجسم الحي فأن الانسجة تبقى في الحالة المرستيمية غير المتمايز سواء كانت أنسجة كالس أو معلقات خلوية وهذه الحالة سوف تؤثر سلباً على أنتاج المواد الثانوية لأن هذه المواد تتراكم عادة في الأنسجة العالية التمايز مثل أنسجة الغدد في (النعناع) والقنوات الزيتية في (الكرفس) وقواعد الاوراق المنتفخة (البصل).
3- جاهزية البادئات اللازمة لتكوين هذه المنتجات الثانوية في الوسط الغذائي وأحياناً تكون واطئة خاصة على المستوى الخلوي مما يؤدي أنخفاض حاد في أنتاج المواد الثانوية .

4- بعض ظروف التحضين مثل الاضاءة ودرجة الحرارة واحياناً وجود منظمات نمو معينة الوسط الغذائي يؤثر بشكل سلبي على تراكم هذه المنتجات الثانوية .

- وفيما يلي بعض مجاميع المواد الثانوية التي يتم الحصول عليها من النبات .

Group المجموعة	المواد Examples
1-Alkaloids (القلويدات)	Morphin, Codeine, quinine, nicotin, Cocalne, lysergie acid
2- Terpenoids (التربينويدات)	Menthol, Camphor, Cartenoid, polyterpenes
3- Phenylpropanids	Anthocyanin, coumarins, flaronoids, isoflaronoids
4-Quinines	Anthraquinone, nebzoquinones
5-Steriod	Sterols

وهناك مواد تستعمل كعقاقير صيدلانية تستخلص من النبات بواسطة زراعة الانسجة النباتية ومنها :-

المركب **Compound**	النوع النباتي **Plant species**	القيمة الطبية **Medicinal Value**
1-Shikonin	***Lithospermum erythorhizon***	**Antiseptic (معقم طبي)**
2-Berberine	***Coptis japonica***	**Antibacterial (مضاد بكتيري)**
3-Quinine	***Cinchona sp.***	**Antimalarial (مضاد للملاريا)**
4-Taxol	***Taxus sp.***	**Breast and ovarian cancer teratment (يستخدم لمعالجة سرطان الثدي والمبيض)**

المحاضرات النظرية

أن أنتاج المواد الثانوية عبر المسارات الايضية الثانوية خارج الجسم الحي يكتسب أهمية كبرى في مجال التقانات الأحيائية وتتزايد هذه الاهمية يوماً بعد يوم ، ولأنشاء برنامج لأنتاج هذه المواد يتبع الخطوات التالية :

1- أنتخاب خطوط خلوية معينة Cell lines لأنتاج كميات كبيرة من هذه المواد الثانوية وهناك طريقتين يمكن أستخدامها في هذا المجال وهما:-

أ- أستنسال خلية واحدة Single cell cloning :

نظرياً فأن استنسال خلية واحدة هي الطريقة الأفضل لعزل خلايا تنتج كميات كبيرة من المواد الثانوية ولكن لعديد من الخلايا المستنسلة الناتجة من خلية مفردة تكون غير متجانسة أو متغايرة في قابليتها على أنتاج المواد الثانوية فضلاً حصول حالات التعدد الكروموسومي Polyploidy فيها .

ب- أستنسال مجموعة من الخلايا Cell aggregate cloning

هذه الطريقة أسهل من الطريقة السابقة وتشمل الخطوات التالية

1- أستحداث تكوين الكالس .
2- أنتخاب مجاميع من الخلايا المتخصصة بأنتاج المركبات المعينة .
3- زراعة هذه المجاميع الخلوية المنتخبة .
4- تقسيم كل مجموعة خلوية إلى نصفين :- الأول يعاد زراعته sub culturing والثاني يستعمل للتقدير الكمي للمنتج المعني .
5- أنتخاب المجموعة الخلوية التي تنتج أكبر كمية من المنتج الثانوي .
6- التأكد من ثبات الأنتاج للمواد الثانوية في المجاميع المنتخبة بتكرار أعادة الزراعة .
7- أنتاج الكالس من المجاميع المنتخبة وزراعته وأكثاره لأنتاج هذه المواد الايضية وذلك بأستخدام طريقة الزراعة للكالس في الأوساط السائلة أو الصلبة أو بأستخدام المزارع الخلوية المعلقة أو بأستخدام المفاعلات الحيوية Bioreactors.

س / ما هي المفاعلات الحيوية Bioreactors وما هي أنواعها :-

المحاضرات النظرية

ج / المفاعلات الحيوية هي أوعية للزراعة خارج الجسم الحي وتكون بشكل عام ذات سعة كبيرة ومجهزة بمنظومات للتهوية والخلط والدوران للحصول على خليط خلوي ومنظومات للسيطرة على التلوث وتجديد الوسط الغذائي أو الخلايا المزروعة وهناك أربعة أنواع من المفاعلات الحيوية التي تستخدم لأنتاج المواد الثانوية والصيدلانية على نطاق تجاري هي :

1- المفاعلات الحيوية الكمية Batch bioreactors .
2- المفاعلات الحيوية المستمرة Continuous bioreactors .
3- المفاعلات الحيوية ذات الأطوار المختلفة Multistage bioreactors.
4- المفاعلات الحيوية ذات الخلايا غير المتحركة Immobilized cell bioreactors .

العوامل المؤثرة في أنتاج المواد الايضية الثانوية :

1- تمايز الخلايا المنتجة وتكوين الانسجة والأعضاء ومنها يؤثر في تجميع أو تراكم هذه المنتجات الثانوية اذ أن تكون الانسجة والأعضاء سوف يؤدي إلى ايجاد الأنسجة الخاصة بتراكم هذه المواد وتمنع وصول أنزيمات هدم هذه المواد وأنتاجها من قبل الأنسجة.
2- تركيز السكروز Sucrose concentration : اذ وجد أن خفض تركيز السكروز في الوسط الغذائي إلى 2% يزيد أو يحفز زيادة أنتاج المواد الثانوية في الخلايا المزروعة .
3- شدة الاضاءة وطول الفترة الضوئية خلال فترة التحضين تؤثر بشكل واضح في تكوين المنتجات الايضية .
4- عامل القدح Triggering agent

عوامل القدح تحفز بقوة أنتاج المواد الثانوية وهذه العوامل هي اما بادئات precursors للمادة أو المنتج المرغوب أو الأنزيمات تحفز أنتاج تلك المادة الايضية. ان تضمين هذه المادة أو المواد في الوسط الغذائي يساعد على زيادة أنتاج تلك المواد فمثلاً أضافة أنزيم الـ ribonuclease إلى الوسط الغذائي قد قدح أو حفز تجميع أو تراكم isoflavinoid phaseollin في المزارع الخلوية المعلقة لنبات الفاصوليا .

زيادة أنتاج المواد الأيضية الثانوية :

أن أنتاج المواد الايضية الثانوية خارج الجسم الحي يمكن أن يزداد عن طريق أستخدام طريقتين :

1- الاستدرار Elicitation:- هي عملية زيادة تحفيز انتاج المواد الايضية الثانوية في المزارع النسيجية النباتية إلى اقصى حد ممكن عن طريق أضافة مواد تسمى Elicitors إلى الوسط الغذائي وقد تكون هذه المواد حياتية مثل السكريات المتعددة وبعض أنواع البروتينات والاحماض الدهنية غير المشبعة أو لا حياتية مثل الاشعة فوق البنفسجية أو الايونات المعدنية الثقيلة أو التجريح أو التجميد أو التعريض للحرارة العالية .

2- تثبيت مزارع الخلايا Immobilization of cultured cell

وتعد من التقنيات الحديثة المستخدمة في زيادة أنتاج المواد الثانوية الايضية ويستخدم أما البلمرة polymerization بأستخدام مواد بلمرة فعالة أو بتوقيت أو حجز الخلايا المزروعة بواسطة مناخل معدنية خاصة Stainless steel meshes .

تطبيقات تقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant Tissue Culture Application

إنتاج نباتات خالية من الأمراض والمسببات المرضية والفايروسات

تصاب أغلب النباتات خاصة المكثرة بوسائل خضرية بواحد أو اكثر من المسببات المرضية كالفطريات والبكتريا والفايروسات والمايكوبلازما وغيرها . فنباتات الشليك على سبيل المثال تهاجم بـ 62 نوع من المايكوبلازما والفايروسات مما يجعل من الضروري النباتات الام المستخدمة للأكثار الخضري سنوياً للمحافظة على الأنتاج سليماً وخالياً من الأمراض . ولقد أستخدمت تقانات زراعة المرستيم القمي لتخليص العديد من الأنواع النباتية من المسببات المرضية .

فقد أستخدمت هذه التقنية في أستئصال البكتريا الجهازية في نبات الدفنباخيا <u>Dieffenbachia sp.</u> والجيرانيوم <u>Pelargonium</u> . كما تم تخليص نبات القرنفل Carnation من فطريات عفن الساق الذي يسببه الفطر <u>Fusarium roseus</u> . أن البكتريا والفطريات تنمو بسرعة على سطح الوسط الغذائي أو داخله في حالة كون الأجزاء النباتية مصابة ولذلك يجري عزل للزروعات المصابة واتلافها ولذلك فأن الزروعات السليمة هي التي يتم أكثارها فقط ، فضلاً عن أستعمال بعض المضادات الحيوية في الوسط الغذائي لهذا الغرض .

المحاضرات النظرية

أما الفايروسات فأنها تمثل لخطر الأكبر كون وجودها في النبات يقلل الحاصل ونوعيته بشكل كبير ولا يمكن الكشف عنها لأن العديد من الفايروسات لا تظهر أية أعراض مرئية ولا توجد أي وسيلة يمكن بواسطتها معالجة النباتات المصابة بأمراض فايروسية على نطاق تجاري لحد الآن . ومن حسن الحظ فأن اعداداً كبيرة من الفايروسات لا تنتقل خلال البذور ، في مثل هذه الحالات من الممكن الحصول على نباتات خالية من الامراض من افراد مصابة بأستعمال بذورها كنواة لأكثارها إلا ان المشكلة الرئيسية هي أن أكثار بعض النباتات عن طريق البذور غالباً ما يعطي نباتات تختلف وراثياً عن النبات الام ونظراً لأن معظم النباتات البستنية المهمة تجارياً تكثر بوسائل خضرية لذا يصبح من الضروري أختيار نباتات سليمة خالية من الأمراض الفايروسية وجعلها كنواة للاكثار الخضري.

أن الطريقة الوحيدة للحصول على نبات خالي من الامراض الفايروسية هي أختيار أنسجة معينة وتخليصها من الفايروس ثم تنميتها إلى نبات كامل ، وحالما يتم الحصول على مثل هذا النبات فأن من الممكن أكثاره خضرياً في ظروف ممكن أن تحميه من أحتمال اصابته مرة ثانية بالأمراض الفايروسية .

يمكن زراعة أجزاء نباتية مختلفة من النبات الام المصاب منها البروتوبلاست ، الكالس ، نسيج الجويزاء (النيوسيلة nucellus) ، البويضات ، مبادىء المرستيمات الزهرية والطرف المرستيمي . ويعد الطرف المرستيمي أو المرستيم القمي Apical meristem الأكثر شيوعاً في هذا المضمار . وعلى العموم فأن طرق انتاج النباتات الخالية من الفايروس هي :

طرق انتاج نباتات الخالية من الفايروسات :-

1- زراعة المرستيم القمي Apical meristem culture
2- أجراء التطعيم خارج الجسم الحي *In vitro* Micro garafting
3- المعاملة بالحراة Thermotherapy
4- المعاملة بالمواد الكيميائية Chemotherapy

1- زراعة المرستيم القمي Apical meristem culture

تعد هذه الطريقة الأكثر ملائمة لأنتاج نباتات خالية من الفايروسات في العديد من المحاصيل المهمة أقتصادياً كالفاكهة مثل الشليك والموز والاناناس والحمضيات ومحاصيل الخضر كالبطاطا الحلوة والثوم والقرنابيط ونباتات الزينة كالقرنفل

والاوركيد والداودي والداليا والجيرانيوم وبعض الابصال كالكلاديولس ولفريزيا والاميرلس والآيرس والليلم . أن اسباب كون المرستيم القمي هو الجزء النباتي الأفضل لأنتاج نباتات خالية من الفايروسات هي :

أ- عند زراعته على وسط ملائم يمكن أن يتوالد إلى نباتات بصورة أسرع من بقية الانسجة النباتية .

ب-النباتات المتوالدة منه تكون مشابهة لأمهاتها من الناحية الوراثية لأن التركيب الوراثي للخلايا المرستيمية يكون منتظم وثابت .

جـ- أن القمم النامية المرستيمية للنباتات المصابة بالفايروسات أما ان تكون خالية من الفايروسات أو حاوية على تراكيز واطئة جدا منها.

أن تدرج توزيع الفايروسات في طرف الفرع قد مكن كل من Morel و Martin عام 1952 من أنتاج أول نبات داليا خالي من الفايروسات من نبات مصاب .
ولقد ذكر Quak عام 1977 عدة أسباب لخلو القمة المرستيمية من الفايروسات :

1- أن الفايروسات تنتقل في الجسم النباتي خلال النسيج الوعائي الذي يكون غائباً في المرستيم
2- قلة أو انعدام الروابط البروتوبلازمية Plasmodesmata في المرستيم القمي بين الخلايا المرستيمية المنقسمة بسرعة وأن حركة الفايرسات خلال هذه الروابط بطيئة جداً .
3- أن الفعاليات البنائية العالية في الخلايا المرستيمية النشطة الانقسام لا تسمح للفايروس بالتضاعف.
4- أن المواد المثبطة لفعالية الفايروس في بعض الانواع النباتية وجد أنها اعلى تركيز في المرستيمات القمية للنبات .
5- أن المستويات العالية من الاوكسين في القمة النامية قد تثبط تضاعف الفايروس .

أن المرستيم القمي هو قمة الفرع الواقعه بعيدا عن احدث مباديء ورقية ، قطره يبلغ حوالي 100 مايكرون وطوله 250 مايكرون ونظرا لصعوبة وفصل هذه القمة لذلك يلجأ إلى أستعمال قمة الفرع Shoot Apox الذي يصل طوله إلى 1000 مايكرون ويحتوي 1-2 زوج من بادئات الاوراق Leaf primordia .

التقنية المتبعة في زراعة المرستيم القمي :

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية

1- ينصح بتربية النباتات التي تستعمل كمصادر للاجزاء النباتية في سنادين بالبيت الزجاجي ومعاملتها بالمبيدات الفطرية والبكتيرية الجهازية بشكل دوري .

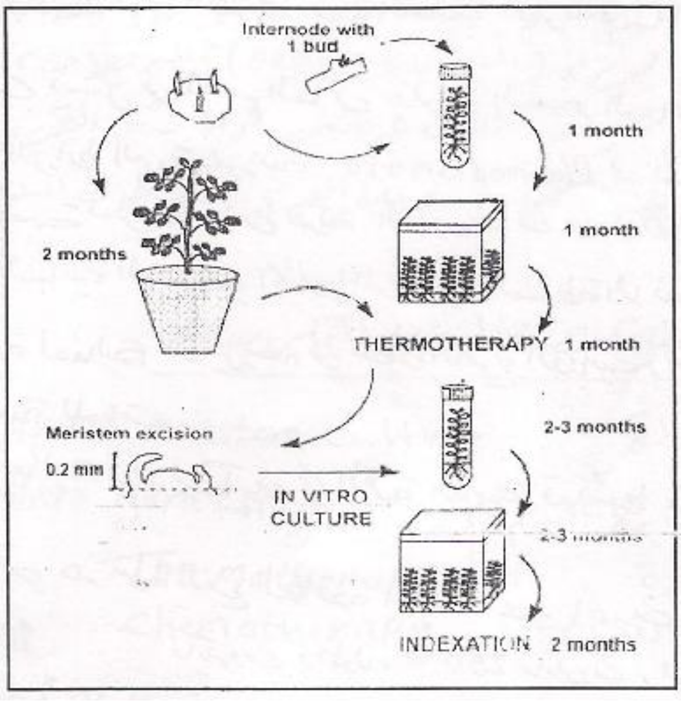
2- تفصل الاجزاءالنباتية وهي القمم النامية Shoot tips بطول 1-5 سم وتغسل ويتم أجراء عمليات التعقيم عليها.

3- تنقل الاجزاء النباتية إلى أماكن معقمة مثل كابينة الزراعة وتجرى عملية فصل المرستيم ونظراً لصعوبة مشاهدة المرستيم القمي بالعين المجردة لذا يلجأ إلى أستخدام المجهر بقوة تكبير واطئة (8-x40) مع مراعاة تعقيم منصته عند وضعه في كابينة الزراعة ويراعى عند فصل المرستيم ما يلي:

أ- أستعمال الأدوات والملاقط الملائمة ذات الحافات الدقيقة الحادة الملساء والمزودة بمقابض ملائمة والابر الناعمة لتجنب اتلاف المرستيم .

ب-المحافظة على المرستيم من الجفاف لأنه يجف بسرعة ولذلك ينصح بوضع الاجزاء النباتية على ورق ترشيح معقمة ورطبة وأستئصال الفايروس عليها لتجنب الجفاف

جـ- تزال المباديء الورقية بحذر ويستأصل المرستيم وينقل بطرف الابرة الناعمة بحذر إلى الوسط الغذائي المعد للزراعة (شكل 1) .



شكل (1): مراحل أنتاج نباتات خالية من الفايروسات بزراعة المرستيم القمي للبطاطا potato

المحاضرات النظرية

2- أجراء التطعيم الدقيق خارج الجسم الحي In vitro Micrografting

يمكن اتباع هذه التقية في الحالات التي يصعب فيها تجذير القمة المرستيمية المزروعة بالطريقة السابقة وخصوصاً في الاشجار وقد تم أستخدام هذه التقنية في الحصول على حمضيات خالية من العديد من الفايروسات وتتلخص هذه الطريقة بأستئصال المرستيم القمي مع 1-2 زوج من بادئات الاورق وتركيبها على بادرات صغيرة الحجم نامية في الوسط الغذائي المعقم ومن ثم تطور الطعم بوصفه نباتاً كاملاً يتم نقله فيما بعد إلى التربة ويتطلب أجراء هذه التقنية مهارة خاصة ودقة متناهية من أجل ضمان الحصول على نباتات سليمة . كما أن عدد النباتات التي يتم الحصول عليها بهذه الطريقة يعتمد على مهارة العاملين وكذلك نوع النبات المستخدم .

3- المعاملة بالحرارة Thermotherapy

على الرغم من خلو الاطراف المرستيمية من الفايروسات إلا ان ذلك يمكن اعتباره ظاهرة عامة الحدوث فهناك دلائل عديدة تدل على أن بعض الفايروسات قد تهاجم المنطقة المرستيمية للقمم النامية مثل فايروس الطماطة TMV والبطاطا PVX وفايروس تبرقش الخيار CMV ففي مثل هذه الحالات هناك امكانية للحصول على نباتات خالية من الفايروسات بدمج المعاملات الحرارية وزراعة المرستيم القمي ، يمكن اجراء المعاملات الحراية على النبات الام قبل فصل الطرف المرستيمي أو تعريض مزارع أطراف الافرع إلى درجات حرارية مرتفعة. ولقد لاحظ بعض الباحثين أن دمج المعاملة بالحرارة (36 مْ لمدة 6 أسابيع) ثم زراعة الطرف المرستيمي كان أكثر فعالية من زراعة أطراف الأفرع المرستيمية لوحدها في نبات الشليك. وتزيد المعاملة بالحرارة من حجم الجزء النباتي المستأصل وبالتالي تزيد من معدل أستجابة وتطور الأفرع من المرستيم ويجب تحديد فترة المعاملة بدرجات الحرارة المرتفعة بصورة دقيقة لأن ذلك قد يؤدي تأثيرات ضارة على النبات الام عند زيادة طول فترة التعريض للحرارة العالية. كذلك هناك أدلة أن الحرارة العالية تؤدي إلى إبطال فعالية المواد المقاومة للفايروس في النبات .

4- المعاملة بالمواد الكيميائية Chemotherapy

على الرغم من بعض الملاحظات حول أستخدام منظمات النمو النباتية كالأوكسينات والسايتوكينات يؤدي إلى خفض تركيز الفايروس في الأنسجة المزروعة إلى أن وجد أن أستخدام المواد الكيميائية المضادة للعمليات البنائية Anti-metabolite مثل Virazole (Ribavirin) في الوسط الغذائي قد تكون أكثر فعالية في أستئصال الفايروس أن وجود هذه الكيمياويات مع درجات الحرارة العالية يؤدي إلى منع تضاعف الفايروسات في الانسجة المصابة ، ويبدو أنه أثناء توقف بناء الفايروس يستمر الخطاط أو تدهور الفايروسات الموجودة إلى ان تتم عملية الاستئصال ولقد وجد أن أستخدام Virazol بتركيز 50-100 ملغم/لتر يؤدي إلى أستئصال فايروس البطاطا x فايروس CMV في التبغ .

أختبارات الأصابة بالفايروسات : Viruses Testing

بعد التأكد من نجاح عملية زراعة المرستيم القمي والحصول على نبيتات نسيجية منه يصبح من الظروري التأكد من خلوها من الفايروس ولأن للفايروسات القدرة على الأختفاء والظهور بين فترة وأخرى لذلك يجب فحص النباتات الام خلال السنة الاولى بشكل مستمر كما يجب أجراء الفحوصات الدورية على المزارع للتأكد من سلامتها . وهناك عدة طرق للفحص وأجراء الأختبارات منها :

1- فحص عصير الأوراق بالمجهر الالكتروني Serum-specific electron microscopy test
2- طريقة النباتات الكاشفة Indicator plants methods
3- الأختبارات السيرولوجية Seorogical tests

ومنها الفحص بأستخدام تقنية اليزا (Enzyme Linked Immuosorbent Assay) (ELISA)

ويوضح الشكل أو المخطط التالي مراحل أنتاج نباتات خالية من الفايروس

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة بغداد – كلية الزراعة
قسم البستنة وهندسة الحدائق
المرحلة: الرابعة

المادة :. زراعة انسجة نباتية
مدرس المادة :. د. حسام خير الدين محمد
العام الدراسي :. 2017/2016

المحاضرات النظرية