Biotechnology in Plant Tissue Culture

تقنيات زراعة الأنسجة النباتية

دكتور
ماجد زكى
جامعة الزقازيق

دكتور
فوزى الفقى
جامعة الأزهر

١٩٩٦

GN:002371
BibID:9503020
ر ب.580,28
ن/33

التقنية الحيوية فى النبات

Plant Biotechnology

الغلاف الخارجي

جنين جسدي ناضج ناتج من إنقسام أحد أو بعض خلايا الكالس المتكون علي بيئة مغذية.. نتيجة للإنقسام السريع والمتعدد للخلايا الجنينية يتكون تركيب يحتوي العديد من الخلايا وهذا بدوره يتطور ماراً بالمراحل التطورية المختلفة التي تتمثل في الشكل الكروي ، القلبي ، التوربيدو . يمكن الحصول علي نبات كامل من هذا التركيب بواسطة نقل الجنين الناضج إلي بيئة مغذية ذات تركيب هرموني ينشط تكوين الجذور والنموات الخضرية وبهذا يمكن القول أنه يمكن الحصول علي نبات كامل من أحد أو بعض الخلايا المكونة لنسيج الكالس. (للتفصيل يرجع إلي فصل الأجنة الجسدية ص. ٢٠٤)

غير مصرح بنسخ كل أو جزء من هذا الكتاب بأي من الوسائل المختلفة سواء بالتصوير أو بالأجهزة الإلكترونية المتباينة أو غيرها من وسائل النسخ الشخصي أو العام.. ويجب الرجوع إلي المؤلفين للحصول علي تصريح متضمنًا هذا المعني .

الطبعة الأولي ١٩٩٦

يطلب الكتاب من

المطبعة التجارية الحديثة

٢٢ شارع إدريس راغب - الظاهر - غمرة - القاهرة.

ت : ٥٩٠٣٣٦٤

إهـــداء

Dedication

اهدي هذا العمل إلي والدتي مفيده، زوجتي سارا، ابنتي آن، ابني عمر وأصدقائي آيلين و توم بكندا.

This work is dedicated to my wife Sara, my daughter Anne, my son Omar and also to my best friends Eillen and Tom in Canada.

M. Zaki

ماجد زكي

اهدي هذا العمل إلي والدي ووالدتي وزوجتي د./ حبيبه وأبنائي علياء وأسماء ومحمود وإلي أصدقائي K. Giles, S. Dellaporta and P.Bradely

F. El-Fiki

فوزي الفقي

شكر وتقدير

كلمة المؤلف

تاريخ تطور علم زراعة الانسجة (ماجد زكي) ـــــــــــــ ١

تجهيز معمل زراعة الانسجة (ماجد زكي) ـــــــــــــ ١٥

مكان الغسيل ـــــــــــــ ١٨

تحضير البيئة المغذية والتعقيم ـــــــــــــ ٢٠

حجرة تحضير البيئة المغذية ـــــــــــــ ٢٠

التعقيم ـــــــــــــ ٢٣

التعقيم بالحرارة ـــــــــــــ ٢٤

التعقيم بالبخار في حرارة مرتفعة ـــــــــــــ ٢٤

التعقيم بالامرار خلال فلتر ـــــــــــــ ٢٦

التعقيم بالمواد الكيميائية ـــــــــــــ ٢٧

حجرة أو مكان اجراء زراعة الانسجة ـــــــــــــ ٣٠

حجرة التحضين ـــــــــــــ ٣١

حجرة للملاحظة وجمع البيانات ـــــــــــــ ٣٣

حجرة تجهيز النباتات الناتجة ونقلها الي التربة ـــــــــــــ ٣٣

إجراءات أمنية لسلامة العاملين ـــــــــــــ ٣٤

مكونات وتحضير البيئة المغذية (ماجد زكي) ———— ٣٧
مكونات البيئة المغذية ———— ٣٧
العناصر المغذية الكبرى ———— ٣٨
العناصر المغذية الصغرى ———— ٣٩
منظمات النمو ———— ٤١
الفيتامينات ———— ٤٣
الكربون ومصدر الطاقة ———— ٤٤
الأحماض الأمينية ———— ٤٦
المستخلصات العضوية ———— ٤٦
قوام البيئة ———— ٤٧
الماء ———— ٤٨
اعداد البيئة ———— ٤٩
المحاليل المركزة ———— ٥٠
العناصر الكبري ———— ٥٠
العناصر الصغري ———— ٥٠
الفيتامينات ———— ٥١
منظمات النمو ———— ٥١
تعقيم البيئة ———— ٥٢
ملحقات ———— ٥٣
تركيب بعض البيئات الشائعة الاستعمال ———— ٥٤
كيفية حفظ منظمات النمو، الفيتامينات، الانزيمات ———— ٦٠

كيفية تحضير محاليل مخففة من محاليل مركزة ———— ٦١

كيفية تحضير محاليل البافر ———— ٦٢

كيفية تحويل درجات الحرارة من المئوي الي الفهرنهيت ———— ٦٣

الوزن الجزيئ ومكونات الاحماض الامينية المختلفة ———— ٦٤

تركيب الخلية (فوزي الفقي) ———— ٦٥

مكونات الخلية ———— ٦٧

النواه ———— ٦٧

غشاء نووي ———— ٦٧

الكروماتين والكروموسوم ———— ٦٧

النُوَيّة ———— ٦٩

الأغشية الداخلية ———— ٦٩

الشبكة الأندوبلازمية والريبوسومات ———— ٦٩

أجسام جولجى ———— ٧٠

الليزوسوم ———— ٧١

الفجوا ت ———— ٧١

الأجسام الصغيرة ———— ٧٢

الميتوكوندريا ———— ٧٢

البلاستيدات ———— ٧٣

الانيبيبات الصغيرة ———— ٧٤

جدار الخلية ———— ٧٥

فصل مكونات الخلية ———— ٧٦
طرق فحص الخلية والأنسجة ميكروسكوبيا ———— ٧٨

زراعة الأعضاء (ماجد زكي) ———— ٨١
زراعة الجذور ———— ٨٢
تكون الأفرع علي الجذور المنزرعة ———— ٨٤
النواتج الثانوية ———— ٨٦
زراعة القمم النامية للسوق ———— ٨٦
زراعة الأوراق ———— ٨٩
زراعة البراعم الزهرية والمبايض ———— ٩١
زراعة البويضات ———— ٩٢
زراعة المتك ———— ٩٤
زراعة الجنين ———— ٩٤
عناصر البيئة الأساسية ———— ٩٦
مصدر النيتروجين ———— ٩٧
الكربوهيدرات ———— ٩٧
الهرمونات ———— ٩٨

مراحل الإكثار بواسطة زراعة الأنسجة (ماجد زكي) ———— ٩٩
متطلبات مراحل الاكثار ———— ١٠٠
مرحلة إعداد النباتات الام ———— ١٠٠

مرحلة إنشاء المزارع المعقمة ـــــــــــــ ١٠١
مرحلة مضاعفة النسيج المزروع ـــــــــــــ ١٠٤
الأجنة الجسدية ـــــــــــــ ١٠٤
تطبيقها في البرامج الزراعية ـــــــــــــ ١٠٤
تطبيقها في الأفرع الجانبية ـــــــــــــ ١٠٥
مرحلة تكوين الجذور في البيئة المغذية ـــــــــــــ ١٠٦
مرحلة الأقلمة ـــــــــــــ ١٠٧
الاختلافات في النباتات الناتجة ـــــــــــــ ١٠٩

تكوين الكالس (زراعة الكالس) ـــــــــــــ ١١١
عوامل تكوين الكالس ـــــــــــــ ١١٤
مصدر المادة النباتية ـــــــــــــ ١١٤
التعقيم ـــــــــــــ ١١٥
فصل الجزء النباتي ـــــــــــــ ١١٦
البيئات المغذية ـــــــــــــ ١١٧
نمو الكالس ـــــــــــــ ١١٨
إعادة زراعة الكالس ـــــــــــــ ١٢٠
المحافظة على الكالس ـــــــــــــ ١٢١
طرق الزراعة ـــــــــــــ ١٢٢
البيئة الصلبة ـــــــــــــ ١٢٣
البيئة السائلة الساكنة ـــــــــــــ ١٢٤

البيئة السائلة المتحركة ١٢٤
الغمر المستمر ١٢٥
الغمر المتقطع ١٢٥
تعليق عام علي تكوين الكالس ١٢٦

معلقات الخلايا (ماجد زكي) ١٢٧
أهمية معلقات الخلايا ١٢٧
انشاء المعلق الخلوى ١٢٨
نظم الزراعة ١٣٠
جهاز ستيوارت ١٣١
جهاز الحركة الدائرية ١٣٢
جهاز اللف المحورى ١٣٣
جهاز التقليب والزراعة المستمرة ١٣٣
البيئة المغذية ١٣٤
نمو الخلايا والمحافظة علي المعلق الخلوي ١٣٧
تكييف البيئة المغذية ١٤٠
التجمعات الخلوية في زراعات المعلقات الخلوية ١٤١
زراعة خلايا المعلق في بيئة صلبة ١٤٤

فصل وزراعة البروتوبلاست (ماجد زكي) ١٤٩
أهمية البروتوبلاست ١٤٩

كيفية تحضير محاليل مخففة من محاليل مركزة ٦١
كيفية تحضير محاليل البافر ٦٢
كيفية تحويل درجات الحرارة من المئوي الي الفهرنهيت ٦٣
الوزن الجزيئ ومكونات الاحماض الامينية المختلفة ٦٤

تركيب الخلية (فوزي الفقي) ٦٥
مكونات الخلية ٦٧
النواه ٦٧
غشاء نووي ٦٧
الكروماتين والكروموسوم ٦٧
النُوَيّة ٦٩
الأغشية الداخلية ٦٩
الشبكة الأندوبلازمية والريبوسومات ٦٩
أجسام جولجى ٧٠
الليزوسوم ٧١
الفجوا ت ٧١
الأجسام الصغيرة ٧٢
الميتوكوندريا ٧٢
البلاستيدات ٧٣
الانيبيبات الصغيرة ٧٤
جدار الخلية ٧٥

فصل مكونات الخلية ---- ٧٦
طرق فحص الخلية والأنسجة ميكروسكوبيا ---- ٧٨

زراعة الأعضاء (ماجد زكي) ---- ٨١
زراعة الجذور ---- ٨٢
تكون الأفرع على الجذور المنزرعة ---- ٨٤
النواتج الثانوية ---- ٨٦
زراعة القمم النامية للسوق ---- ٨٦
زراعة الأوراق ---- ٨٩
زراعة البراعم الزهرية والمبايض ---- ٩١
زراعة البويضات ---- ٩٢
زراعة المتك ---- ٩٤
زراعة الجنين ---- ٩٤
عناصر البيئة الأساسية ---- ٩٦
مصدر النيتروجين ---- ٩٧
الكربوهيدرات ---- ٩٧
الهرمونات ---- ٩٨

مراحل الإكثار بواسطة زراعة الأنسجة (ماجد زكي) ---- ٩٩
متطلبات مراحل الاكثار ---- ١٠٠
مرحلة إعداد النباتات الام ---- ١٠٠

مرحلة إنشاء المزارع النسيجية ———— ١٠١
مرحلة تضاعف النسيج المنزرع ———— ١٠٤
الأجنة الجسدية ———— ١٠٤
تنشيط نمو البراعم العرضية ———— ١٠٤
تنشيط نمو الأفرع الجانبية ———— ١٠٥
مرحلة تكوين الجذور في البيئة المغذية ———— ١٠٥
مرحلة الأقلمة ———— ١٠٧
الاختلافات في النباتات الناتجة ———— ١٠٩

تكوين الكالس (ماجد زكي) ———— ١١١
مراحل تكوين الكالس ———— ١١٤
مصدر المادة النباتية ———— ١١٤
التطهير ———— ١١٥
فصل الجزء النباتي ———— ١١٦
البيئات المغذية ———— ١١٧
نشوء الكالس ———— ١١٨
اعادة زراعة الكالس ———— ١٢٠
المحافظة علي الكالس ———— ١٢١
طرق الزراعة ———— ١٢٢
البيئة الصلبة ———— ١٢٣
البيئة السائلة الساكنة ———— ١٢٤

البيئة السائلة المتحركة ———— ١٢٤
الغمر المستمر ———— ١٢٥
الغمر المتقطع ———— ١٢٥
تعليق عام علي تكوين الكالس ———— ١٢٦

معلقات الخلايا (ماجد زكي) ———— ١٢٧
أهمية معلقات الخلايا ———— ١٢٧
انشاء المعلق الخلوى ———— ١٢٨
نظم الزراعة ———— ١٣٠
جهاز ستيوارت ———— ١٣١
جهاز الحركة الدائرية ———— ١٣٢
جهاز اللف المحورى ———— ١٣٣
جهاز التقليب والزراعة المستمرة ———— ١٣٣
البيئة المغذية ———— ١٣٤
نمو الخلايا والمحافظة علي المعلق الخلوي ———— ١٣٧
تكييف البيئة المغذية ———— ١٤٠
التجمعات الخلوية في زراعات المعلقات الخلوية ———— ١٤١
زراعة خلايا المعلق في بيئة صلبة ———— ١٤٤

فصل وزراعة البروتوبلاست (ماجد زكي) ———— ١٤٩
أهمية البروتوبلاست ———— ١٤٩

الخلية النباتية والبروتوبلاست ١٥١
طرق فصل البروتوبلاست ١٥٢
الضغط البلازمي ١٥٢
الفصل الميكانيكي ١٥٣
الفصل بالإنزيمات ١٥٤
الجدار الخلوي والإنزيمات ١٥٥
فصل البروتوبلاست من الأوراق ١٥٥
الطريقة المباشرة ١٥٦
الطريقة غير المباشرة ١٥٧
فصل البروتوبلاست من المعلق الخلوى ١٥٨
فصل البروتوبلاست من الكالس ١٥٨
زراعة البروتوبلاست ١٥٩
بيئة سائلة ١٥٩
البيئة الصلبة ١٦٠
البيئة المغذية ١٦٠
تكوين الجدار الخلوي ١٦١
الانقسام الخلوى ١٦٢
اندماج البروتوبلاست ١٦٣
المعاملة بنترات الصوديوم ١٦٤
التعريض لتركيز مرتفع من أيون الأيدروجين ١٦٥
استخدام بولي اثيلين جليكول ١٦٥

التهجين الجسدي ——— ١٦٦
تعليق عام علي فصل وزراعة البروتوبلاست ——— ١٦٩

الأجنة الأحادية (ماجد زكي) ——— ١٧١
أهمية النباتات الأحادية ——— ١٧٣
إنتاج الطفرات ——— ١٧٣
التباين الجاميطي ——— ١٧٤
إنتاج أنواع جديدة ——— ١٧٥
إنتاج نباتات نقية ——— ١٧٥
نقل الجينات ——— ١٧٦
إنتاج النباتات الاحادية ——— ١٧٧
زراعة المتك ——— ١٧٧
زراعة حبوب لقاح منفصلة ——— ١٧٩
البيئة المغذية ——— ١٨٢
طرق تكون الجنين ——— ١٨٣
الطريق المباشر ——— ١٨٥
الطريق غير المباشر ——— ١٨٥
أصل الأجنة الأحادية ——— ١٨٦
نموذج "أ" ——— ١٨٧
نموذج "ب" ——— ١٨٧
نموذج "ج" ——— ١٨٩

كلية الزراعة بالفيوم
المكتبة

نموذج "د" ١٨٩
العوامل المؤثرة في تكوين أجنة من حبوب اللقاح ١٩٠
المرحلة التطورية لحبوب اللقاح ١٩١
معاملات النباتات الأم ١٩٢
مكونات البيئة المغذية ١٩٤
دور جدار المتك وطبقة التابيتوم ١٩٧
حبوب اللقاح المزدوجة ١٩٩
التركيب الوراثي لحبوب اللقاح ٢٠١
تعليق عام علي الأجنة الأحادية ٢٠٢

الأجنة الجسدية (ماجد زكي) ٢٠٤
إنتاج الأجنة الجسدية ٢٠٨
الطريقة الغير مباشرة ٢٠٩
الطريقة المباشرة ٢١٢
إنتاج الأجنة الجسدية من البروتوبلاست ٢١٤
العوامل المؤثرة في تكوين أجنة جسدية ٢١٥
تركيب البيئة المغذية ٢١٧
الهرمونات ٢١٩
مشبطات الأجنة الجسدية ٢٢٣
تعليق عام علي تكون الاجنة الجسدية ٢٢٣

التباينات في النباتات (فوزي الفقي) ـــــــــــ ٢٢٥

تكوين الأعضاء النباتية وأقلمة النباتات (ماجد زكي) ـــــــــــ ٢٤٠
تكوين الأعضاء ـــــــــــ ٢٤٢
الأساس الخلوي لتكوين الأعضاء النباتية ـــــــــــ ٢٤٨
الأقلمة ـــــــــــ ٢٤٩
التركيب التشريحي للورقة ـــــــــــ ٢٥١
البناء الضوئي ـــــــــــ ٢٥٢
طرق الأقلمة ـــــــــــ ٢٥٤

تطبيقات معملية (فوزي الفقي) ـــــــــــ ٢٥٦
التطهير السطحي ـــــــــــ ٢٥٦
الزجاجيات ـــــــــــ ٢٦٠
الكيماويات ـــــــــــ ٢٦٠
نوع الأجار ـــــــــــ ٢٦١
ضبط تركيز أيون الايدروجين والمحافظة علي الالكترود ـــــــــــ ٢٦٣
الحضانات والاضاءة ـــــــــــ ٢٦٣
التلون البني ـــــــــــ ٢٦٤

التحليل الكمي علي تجارب زراعة الأنسجة (ماجد زكي) ـــــــــــ ٢٦٦
مقدمة ـــــــــــ ٢٦٦

تقدير الوزن الطازج ـــــــــــــــ ٢٧٠
تقدير الوزن الجاف ـــــــــــــــ ٢٧١
تقدير كثافة الخلايا ـــــــــــــــ ٢٧٢
تحديد حجم الخلايا المتجمعة ـــــــــــــــ ٢٧٣
تقدير معدل الانقسام الميتوزي للخلايا ـــــــــــــــ ٢٧٣
تقدير حيوية البروتوبلاست ـــــــــــــــ ٢٧٤

المراجع ـــــــــــــــ ٢٧٦

شكـر وتقديــر

Appreciation

اكتمـلت جوانب هذا الكتاب ليكون ميسراً للقارئ في شكل علمي ولغوي دقيق ومتناسق عندما اقتطع كل من الاستاذ الدكتور محمد عبداللطيف ابراهيم والاستاذ الدكتور محمد وجدي عبدالحميد جزءاً من ساعات عملهما المتواصل لإبداء الرأي والنصح في المحتوي العلمي واللغوي لهذا العمل ... فأضافا بخبرتهما الرحبة أبعاداً عميقة كان لها أثراً بالغاً في ترسيخ المعني العلمي وصقله بلغة عربية سليمة تتميز بالبساطة واليسر مع الحفاظ علي وتأكيد البعد العلمي لمكون هذا الكتاب فبهما إزداد هذا العمل رونقاً ولهما نقدم تقديرنا لجهودهما وعنايتهما في اخراج هذا الكتاب بالصورة اللائقة والتي تتوافق مع المفهوم العلمي للتقنية الحيوية فشكراً وتقديراً لمساهمتهما الجادة والبناءه والتي لو لم تكن لما ظهر هذا العمل بالصورة التي نشرف بها.

ماجد ذكي/ فوزي الفقي

١٩٩٦

كلمة المؤلف

ظلت فكرة وضع كتاب علمي في التقنية الحيوية للنبات، خاصة تلك المنبثقة من زراعة الأنسجة النباتية تلح في الخاطر بين الحين والآخر .. وما كان يثني العزم عنها إلا الانشغال والأهتمام البالغ المصحوب في استبيان لغز خلوي جديد من خلال التجارب المعملية التي ماتكاد أن تدنو احداها من النهاية حتي تقود إلي مزيد من التساؤلات التي بدورها تقود للمزيد من العمل المعملي لإيضاح قدرات جديدة للخلية. في إطار القدرات التي تم اكتشافها والتعرف عليها ومن خلال البرامج المختلفة لزراعة الأنسجة، أصبح من اليسير تطبيق الوسائل المختلفة من أجل تحقيق التطور الكمي والنوعي للثروة النباتية التي هي ذات اتصال وثيق باقتصاد البلاد وأساس تقدمها. ليس فقط في المجال التطبيقي ولكن أيضاً علي النطاق العلمي النظري، فلقد حقق علم زراعة الأنسجة انتشاراً واسعاً بين العلوم المختلفة التي تهتم بدراسة الكائن الحي ومراحل تطوره المتعاقبة، كما أنه ساهم في تقدم العديد من الدراسات في مجالات العلوم المتعددة والتي ليس بآخرها علم الهندسة الوراثية. عودة إلي الثمانينات ومع بداية ظهور المادة العلمية لزراعة الأنسجة النباتية في الجامعات المصرية أصبح واضحاً أنه بالرغم من توفر العديد من المراجع الأنجليزية في هذا المجال، غير أنه علي الجانب الآخر لم يكن ومايزال هناك حاجة ملحة وماسة لمادة علمية منشورة باللغة العربية في هذا المجال من العلوم .. حديثاً

سجلت بعض المحاولات الجادة التي نكن لها كل التقدير ونأمل في ظهور المزيد منها .. هذه العوامل متشابكة معاً اضافة إلي الإلتقاء والتكامل الفكري بين مؤلفي هذا الكتاب أدت إلي التعرف علي أهمية وضع أساس علمي قوي صلب يعتمد عليه الطلاب والباحثين خلال سنوات الدراسة الجامعية أو من خلال برامج إعداد كوادر متميزة عن طريق الدراسات العليا.

انطلاقاً من أهمية زراعة الأنسجة النباتية فلقد صمم هذا الكتاب وفي مقدمته بعض العلامات التاريخيه البارزه التي أدت إلي ظهور هذا العلم منذ حوالي مائة عام بواسطة العالم Haberlandt الذي تسابق فكره مع عصره ووضع الأساس النظري لقدرة الخلية علي التطور إلي جنين عند الزراعة في بيئة مغذية .. في عرض موجز ركز الفصل الأول علي الاكتشافات الفريدة والمنفردة التي في مجموعها أدت إلي تشكيل علم زراعة الأنسجة .. مع بداية التطبيق المعملي كان لابد من توفر متطلبات وتجهيزات ذات طابع مميز وذلك لتسهيل تطبيق المفهوم النظري بهدف النجاح في الحصول علي نتائج دقيقة يمكن بها التحقق من المفهوم النظري أو كشف الستار عن لغز جديد لم يكن موجوداً حتي في الوضع النظري. أخذاً في الأعتبار أهمية تجهيز المعمل، وكذا الأهمية القصوي للبيئة المغذية ومكوناتها وطرق إعدادها، وانطلاقاً من الإيمان بأهمية تقديم عمل متكامل يتناسب مع نطاق واسع من القارئين علي اختلاف مستوياتهم الفكرية واختلاف اهتماماتهم العلمية فلقد صّممت بعض فصول هذا الكتاب لخدمة هذا الهدف .. يلي هذا شرح تفصيلي لتركيب الخلية النباتية شاملا مكوناتها المختلفة، كما أوضحنا أيضا التكاثر الدقيق وخطواته المتتالية. وما يزال غائراً عميقاً في الأذهان وراسخاً في العقيدة العديد من القدرات التي لم تبح لنا بها الخلية .. ليس قصراً في تجريبنا العملي ولكن قد

يكون انبهارنا بالناتج النهائي الذي أغفلنا عن التفكير والبحث عن أساس تكونه أو يكون لغياب Haberlandt عنا؟؟!!! .. وبعيداً عن المفهوم التقليدي لتكون الجنين الزيجوتي .. يقدم هذا الكتاب الأساس البيولوجي لتحول الخلية من برنامج وظيفي ما إلى آخر يختلف في كل جوانبه وفي مراحل تطوره ويقود إلي تكوين جنين من حبة اللقاح أو من خلية جسدية .. كما عرضنا أيضاً أهمية هذه الظواهر التي أصبحت بعد دراسة وتفهم أساسا بيولوجيا من اليسير التحكم فيه وتوجيهه بالصورة التي تخدم هدف ما. يتناول هذا الكتاب أيضاً الصور المختلفة لتكوين الكالس، نشوء المعلقات الخلوية، فصل وزراعة واندماج البروتوبلاست، زراعة الأعضاء، التباين الجسدي والجاميطي، التشكل المورفولوجي، انتاج نباتات مميزة وأقلمتها لتتلائم مع الظروف البيئية الطبيعية وأخيراً بعض التطبيقات العملية وتقديرات كمية علي زراعة الانسجة النباتية.

بهذا نأمل أن يكون تصميم هذا لكتاب ومادته العلمية تتناسب مع نطاق واسع من القارئين ليس فقط المتخصصين منهم ولكن أيضاً المبتدئين في هذا المجال من العلوم.

هذا العمل لم يكن له أن يظهر ما لم يبذل جهد ومتسع من الوقت للمعرفة والتعلم ويخص د. ماجد زكي بالشكر علماء تعلم في معاملهم وشاركهم أبحاثهم للعديد من السنوات وإليهم التقدير وهم كلاً من : ا. د. محمد عبد الحميد البهيدي ، ا. د. علي عطيه المنسي .

Profs. H. Dickinson of University of Oxford UK; P. Calgari, J. Bennet and L. Bonner of University of Reading UK; J. Kujit and P. Von Aderkas of University of Victoria, Canada

وكذلك يخص بالشكر د. فوزي الفقي كلاً من أ.د./ عاصم محمد علي، أ.د./ عز الدين حجاج لما قدموه من وقت ثمين كان له أثره الطيب في تقدمي العلمي في هذا المجال، وكذلك لذكري استاذي الجليل/ محمود هاشم البرقوقي رحمه الله . .. واخص بالذكر بالولايات المتحدة الأمريكية S. Dellaporta, and K. Giles وبجامعة باريس Vigier, بالإضافة إلي أعضاء قسم الوراثة والنبات بزراعة الأزهر.

كما نقدم عميق شكرنا وتقديرنا إلي كل من ساهم في اخراج هذا الكتاب خاصة : الآنسة / هناء سليمان، الأستاذ / عبد النبي شاهين والأستاذ / محسن صقر .

ماجد زكي/فوزي الفقي

١٩٩٦

١

تاريخ وتطور علم زراعة الأنسجة
History and development of tissue culture

شهدت السنوات الأخيرة الماضية اهتماماً بالغاً بزراعة الانسجة النباتية، حيث أنها تعتبر من الوسائل التى ساهمت بشكل جذرى في تطور المحاصيل الزراعية بأنواعها المختلفة ولايخفى ما لهذا من تأثيرة علي النمو الاقتصادى للبلاد. ولا تقتصر أهمية زراعة الانسجة النباتية علي هذا فقط بل تمتد الى أنها تعتبر الوسيلة الفريدة التى لم تكن في متناول العلماء من قبل لدراسة فسيولوجى النبات والتطور البيولوجي للكائن النباتى الحى من صورة بسيطة الي صور متراكبة معقدة البناء ولكنها متوافقة الوظائف. تزداد أهمية هذا العلم مع التطور التكنولوجي وبخاصة الثورة العلمية الهائلة فى مجال الهندسة الوراثية التى تشمل التعرف الدقيق والمحددعلي الجينات الوراثية التي تحكم سلوك وصفات الكائن الحى فى مراحل تطورة المختلفة، وما يتلو هذا من محاولة تعديل التركيب الجيني ليتوافق مع البيئة التي تعيش فيها ولتتوائم مع رغبات الشعوب. قبل أن نسترسل فى هذا المجال وعرفاناً بالمجهود البارز الذى بذلة علماء عديدون في مجالات متعددة ساهمت في وضع المعالم الأساسية لعلم زراعة الأنسجة النباتية فاننا ننتهز هذه الفرصه لابراز هذا الدور الفعال الذى لو لم يبذل لما وصلت الينا هذه المعرفه بشكلها الحالي.

ظهرت الملامح الأولي لهذا العلم عندما عبر Schwann (1839) عن مفهومة النظرى لخلية الكائن الحي الذى يحتوى تراكيب خلوية معقدة، غير أن اعتقاده بأن كل خلية تملك المقدرة علي تكوين كائن حي كامل كان يعتبر مفهوما حديثا وغير معروف لدى العلماء في ذاك الوقت. كان هذا المفهوم بمثابة انطلاقة عملاقة في السنوات التالية لفهم القدرة الكامنة للخلية، والآن يعتبر الأساس الذى بنى عليه علم زراعة الانسجة النباتية. قام العالم الالماني Haberlandt (1902) لأول مرة بمحاولة إثبات أن الخلية النباتية لها قدرة علي تكوين كائن حى جديد، استخدم فى تجاربة خلايا منفصلة وأجرى زراعتها فى محلول مغذ ذات بسيط التركيب بالرغم من عدم نجاح هذه التجربة وفشل الخلايا في الانقسام فى البيئة المغذية، إلا أن هذا العالم لم يفقد اعتقاده بقدرة الخلايا علي الانقسام وتكوين كائن حي متكامل .. ذكر Haberlandt أن علي العلماء فى المستقبل محاولة تحديد الظروف المناسبة اللازمة لانقسام الخلايا فى بيئة مغذية. بالرغم من الفشل فى التجربة الاولى لزراعة الخلية، غير أن التجارب فى هذا المجال استمرت لعدة سنوات في نفس المعمل، هذه السنوات شهدت تقدماً بسيطا تضمن امكانية اطالة فترة حيوية الخلية في المحلول المغذى، واستطالة الخلية في هذا المحلول . وبقيت مشكلة انقسام الخلية لم تحسم بعد .. اقترح Haberlandt اجراء تجربة تجرى فيها زراعة خلايا نباتية مع حبوب لقاح ذات أنابيب لقاحية فيما يسمى بالنقطة المعلقة وأشار الى أن الانابيب اللقاحية قد تنشط انقسام الخلايا المصاحبة. ولقد عبر هذا العالم عن اعتقاده بأهمية استخدام السائل المغذى الموجود بالكيس الجنينى لتنشيط الانقسام الخلوى، كمثال لعبقرية Haberlandt توقعة الحصول علي جنين نباتى من خلايا منزرعة فى بيئة مغذية. تعتبر هذه الفترة هي المرحلة الخصبة التى تم فيها وضع الاساس

النظري لمفهوم جديد خاص بسلوك وقدرات الخلية النباتية. للأسف تلى هذه الفترة مرحلة خمود استمرت حوالى ٣٠ سنة لم يتم فيها انجاز تجارب عملية لاثبات المفهوم الجديد للخلية النباتية.

مع أوائل القرن العشرين سجلت بعض المحاولات الغير ناجحة لزراعة الخلايا النباتية، تغير فيها اسلوب التجريب العملي عندما حاول اثنان من العلماء أحدهما تلميذ العالم Haberlandt من استخدام نسيج نباتي كامل بدلا من خلايا منفصلة وكان نتيجة لهذا أن لاحظ Kotte (1922), Robbins (1922) استمرار نمو القمم النباتية بجذور النباتات عند زراعتها في محلول مغذى يحتوى عناصر غير عضوية وكربوهيدرات في صورة جلوكوز. للأسف فان نمو هذه الجذور لم يستمر لفترة طويلة بالرغم من تكرار نقلها الى بيئة حديثة التحضير. هذا يوضح أن محتوى البيئة المغذية من العناصر المختلفة لم يكن كافيا لاستمرار نمو الجذور النباتية، وانها تحتاج الى بيئة أكثر تعقيدا .. كانت المحصلة الناتجة من هذه التجارب تبين أهمية تجنب التلوث بالكائنات الحية الدقيقة للبيئة المغذية، حيث أنها تتكاثر بسرعة فائقة تفوق معدل نمو النسيج النباتي .. كما أنها تفرز بعض المواد السامة التي تؤثر بدورها في نمو النسيج النباتي. تعتبر هذه المرحلة خطوة هامة مهدت لأول تجربة ناجحة لزراعة نسيج نباتي، والتي قام بها العالم الانجليزي White (1934) عندما أثبت القدرة الغير محدودة لنمو القمم النامية لجذور نباتات الطماطم اذا مازرعت في بيئة مغذية تحتوى على أملاح غير عضوية، مستخلص الخميرة، سكروز .. وبعد فترة وجيزة اتضح أنه يمكن استبدال مستخلص الخميرة بمجموعة فيتامين ب (ثيامين، بيريدكسين، حمض النيكوتين).

وقد أشار White الى ان الصعوبات التي أعاقت نجاح المحاولات السابقة لزراعة

/

نسيج نباتى على بيئة مغذية ترجع الى سببين أساسين هما

- عدم دقة اختيار الجزء النباتى المناسب للزراعة حيث أنة كان يستخدم خلايا منفصلة من نسيج متكشف وقد ثبت علميا أن مثل هذه الخلايا يصعب استخدامها فى تجارب زراعة الانسجة لضعف استجابتها.
- عدم توفر المعرفة الكافية لمتطلبات النسيج النباتى وبالتالى عدم إمكانية توفير بيئة مغذية مناسبة لنمو الجزء النباتى المنزرع بما يحتاجة من عناصر مغذية وغيرها.

مع النجاح في زراعة القمم النامية لجذور نبات الطماطم أصبحت المشكلة الحاسمة هي كيفية ايجاد البيئة المناسبة لامداد النسيج أو العضو النباتى المنزرع باحتياجاته اللازمة لاستمرار نموه. هنا يلزم التوقف للتمييز بين زراعة العضو النباتى وزراعة النسيج النباتى ففى حالة زراعة الجذور النباتية فان هذا يعتبر مثالا لزراعة عضو نباتى حيث أن هذا العضو يحتفظ بصفاتة المورفولوجية والتشريحية المميزة له. ويمكن القول أنه في المراحل الأولى لزراعة هذا العضو النباتى فان الحالة الفسيولوجية تكون مشابهة لمثيلتها في الجذور الموجودة علي النبات الاصلى" الام" في الطبيعة. وقد يحدث بعض التعديلات البسيطة في التركيب التشريحى والحالة الفسيولوجية للجذور المنزرعة. ويطلق مصطلح زراعة النسيج النباتي على أى جزء نباتى يحوى عديد من الخلايا على بيئة مغذية سواء سائلة أو صلبة وفى هذا النظام فان الخلايا تبقي متصلة بعضها بالاخر من خلال قنوات سيتوبلازمية. فى نفس العام الذى أثبت فية White امكانية زراعة جذور نباتات الطماطم فى بيئة مغذية أثبت العالم Gautheret المقدرة على زراعة نسيج الكامبيوم فى بيئة مغذية تحتوى على محلول مغذى (Knop) + جلوكوز + سيستين هيدروكلوريد .. مع اكتشاف الاهمية العظمى لمجموعة فيتامين ب لنمو الجذور المنزرعة فى بيئة مغذية

وكذا مع التعرف على أهمية الاكسين الذى كان مكتشف حديثا بواسطة العلماء Went & Thimann (1937) فقد أمكن للعالم Gautheret (1937, 1938) من اضافة هذه المواد الى البيئة المغذية وتبين أن هذه المواد لها أهمية كبيرة فى زيادة نمو النسيج المنزرع.

تقريبا فى نفس الوقت سجل Nobecourt (1937, 1939) النجاح فى زراعة جذور الجزر على بيئة مغذية، وعندما أضاف Gautheret (1939) جلوكوز، فيتامين ب (الثيامين)، سيستين هيدروكلوريد وحمض الاندول الى البيئة المغذية التى استعملها Nobecourt تبينت مقدرة جذور الجزر علي تكوين كالس قابل للنمو الغير محدود ولقد قام Gautheret بتقديم هذه الابحاث أمام أكاديمية العلوم الفرنسية وقد عقب White علي هذه الابحاث بقوله أنها قد أثبتت بما لاشك فيه النجاح في زراعة الانسجة النباتية ومقدرة الخلايا النباتية علي اعطاء خلايا غير متكشفة وعلي النمو الغير نهائي. هذا النمو أطلق علية كالس وهو ناتج من انقسام الخلايا النباتية فى شكل غير منتظم (عشوائى) .. هذا الكالس يحتوى على خلايا مركزية مرستيمية نشطة. ولقد أثبت أيضا أن قطع نباتية من ساق نبات الدخان لها المقدرة علي النمو على بيئة مغذية تحتوى نسبة من الاجار، وقام White (1939) بنقل هذه الاجزاء المنزرعة على بيئة جديدة وأشار الى استمرار نمو النسيج المنزرع. بعد المحاولات الناجحة التى قام بها كلا من العلماء البارزين Nobecourt, Gáutheret, White نشأ علم زراعة الانسجة النباتية وتعرف العلماء على الطريقة البسيطة لزراعة النسيج النباتى على بيئة مغذية، وكان نتيجة لهذا أن اندفع العلماء الى هذه الوسيلة الفريدة لدراسة الظواهر المختلفة بالنبات، ولهذا ازداد عدد الانواع النباتية التى اجرى استخدامها فى زراعة الانسجة النباتية غير

أنه نظرا لظروف الحرب العالمية وقلة الاهتمام بالبحث العلمى فى ذلك الوقت فإنه لم تحدث أى اضافات علمية جديده فى الفترة مابين ١٩٣٩-١٩٤٥ وقد استمر هذا الخمود حتى أوائل الخمسينات.

مع الاهتمام بهذه الطريقة الحديثة لدراسة الخلايا والانسجة النباتية والعلاقة بين الخلايا المختلفة داخل النسيج الواحد، حاول العلماء التعرف بدقة على احتياجات هذه الانسجة من المواد التى تؤثر على نجاح النمو فى بيئة مغذية وهذا دفع العلماء Van Overbeek et al. (1941) الى استخدام لبن جوز الهند الذى له أهمية كبرى فى تغذية الجنين باضافتة الى البيئة المغذية التى اجرى عليها زراعة جنين من نباتات الداتورا، ولقد ظهر أهمية هذا المكون فى نمو الجنين المنزرع على بيئة مغذية. وفى تجارب لاحقة أثبت Caplin & Steward (1948) أن لبن جوز الهند له تأثير منشط على نمو نسيج منفصل من جذور نبات الجزر .. ومن التجارب الهامة التى أجراها كل من العلماء السابقين تلك الخاصة باستخدام لبن جوز الهند مع اضافة الاكسين الى البيئة المغذية. مع استخدام هذه التركيبة الفريدة أمكن حث الخلايا علي الانقسام في بيئة مغذية مع العلم بأن هذه الخلايا كان قد صعب تنشيط أنقسامها في تجارب سابقة ومن الجدير بالذكر هنا أن التجارب السابقة أعطت معلومات قوية على وجود بعض العوامل التى تؤثر على النسيج النباتى المنزرع على بيئة مغذية وهذا أدى لاكتشاف مزيد من المواد المنشطة للنمو.

ومن الجدير بالذكر أن العالم Steward من جامعة كورنيل بأمريكا قد ساهم بشكل فعال فى تطوير علم زراعة الانسجة النباتية وذلك من خلال تطوير بعض الطرق المستخدمة في اجراء الزراعة ودراسة العوامل المغذية ونمو وتكشف الاعضاء النباتية من النسيج المنزرع على بيئة مغذية.

اكتشف العالمان Skoog & Tsui (1948) امكانية الحصول على نموات خضرية من زراعة أجزاء نباتية من نبات الدخان أو من الكالس المتكون على بيئة مغذية، ولقد أشار العلماء الى المقدرة على التحكم فى هذا النمو بواسطة التغيير فى بعض المكونات الكيميائية للبيئة المغذية. خلال التجارب البحثية لدراسة العوامل التى تؤثر على انقسام الخلايا النباتية أوضح العالم Skoog (1954) أن زراعة الكالس المتكون سابقا على أجزاء منزرعة من سويقة نبات الدخان على بيئة تحتوى "كسجن" لم تحقق نجاح في استمرار نمو الكالس. وقال أن اضافة عينة سابق تحضيرها من مادة ال DNA (داى اوكسى ريبونيوكليك اسيد) الى البيئة المغذية قد ساهمت بشكل فعال فى تنشيط انقسام الخلايا. وللدهشة أشار نفس العالم الى أن مادة ال DNA المحضرة حديثا لم يكن لها تأثير فعال على انقسام الخلايا المنزرعة. أوضح العالم Skoog أن مادة ال DNA نفسها ليس لها تأثير على انقسام الخلايا ولكن بعض المواد الناتجة من تحلل مادة الـ DNA بواسطة التعقيم تحت ضغط أدت الي تنشيط انقسام الخلايا. وفى مرحلة لاحقة أمكن فصل وتعريف هذا العامل وأطلق عليه كينتين. أمكن الحصول على عامل مشابه في تأثيره على الخلية وهو أمينو بيورين، وباستخدامه في البيئة المغذية وجد أنه ينشط انقسام الخلايا .. واطلق اسم سيتوكينين على هذه المجموعة التى تحتوى مركبات أمينو بيورين والتى لها أثر فعال على انقسام الخلية ولها تأثير فسيولوجى مشابه لمادة الكينتين. **في مرحلة لاحقة تم اكتشاف أن مادة الزياتين وبعض مركبات السيتوكينين هي في الواقع هرمونات نباتية تنتج طبيعيا. مهد اكتشاف هذه المركبات الطريق الي العلماء Skoog & Miller (1957) في اثبات أنه يمكن التحكم في شكل النمو الناتج من الكالس المنزرع على بيئة مغذية وتوجيهه إما الي نموات جذرية أو نموات خضرية**

بواسطة تعديل نسبة الاكسين الى السيتوكينين في البيئة المغذية. وبهذا اتضح أن يمكن تنشيط نمو الجذور علي الكالس المنزرع بواسطة تقليل نسبة الكينتين الي الاكسين، غير أن زيادة هذه النسبه تؤدى الي تنشيط تكون البراعم التي بدورها تعطي نموات خضرية. بهذا الاكتشاف العظيم توفر للعلماء وسيلة حديثة لدراسة المراحل التطورية المختلفة التي يمر بها النبات، وكذلك امكن انتاج نباتات عديدة من الكالس النباتي المتكون على بيئة مغذية صناعية. ومن الجدير بالذكر أنه في مراحل مبكرة لزراعة الكالس على بيئة مغذية لوحظ تطور خلايا قريبة الشبة من خلايا اللحاء و الخشب، وكان من التجارب المبدعة في هذا المجال ماقام به العلماء Wetmore & Rier (1963) من اثبات امكانية تنشيط تكون خلايا الخشب واللحاء في الكالس المنزرع على بيئة مغذية .. أمكن التحكم في نسبة اللحاء الى الخشب المتكون من خلايا الكالس بواسطة تعديل نسبة الاكسين الي السكروز المضاف الي البيئة المغذية.

وبهذا يتضح جليا أن الكالس المنزرع علي بيئة مغذية يستجيب بنفس السلوك المعقد في النباتات الراقية كما يصبح واضحاً أن تأثير المواد المنظمة للنمو سواء تنتج داخليا بواسطة الخلايا أو تضاف الي البيئة المغذية علي تكوين النموات الجذرية، النموات الخضرية أو التشكل وتكون الاعضاء النباتية علي الكالس الناتج على بيئة مغذية، أعطى قيمة عالية لزراعة الانسجة النباتية كوسيلة لدراسة التطور والتشكل من الناحية البيولوجية.

زراعة الكالس علي بيئة مغذية ساهمت بصورة كبيرة في تسهيل الدراسات البيولوجية للخلايا السرطانية التي هي عباره عن مجموعة من الخلايا التي لها نشاط ملحوظ وكبير في الانقسام المتتالى الذى يعزو للنشاط الداخلي لمثل هذه

الخلايا وليس للنبات أى شكل من التحكم فيها، نتيجة لهذا الانقسام المتتالي يتكون علي النبات مايسمي بالتورم .. يرجع أسباب حدوث هذا النشاط العالى في الانقسام الخلوي الي عامل وراثى بداخل الخلية أو نتيجة للاصابة الفيروسية أو البكتيرية. يمكن فصل هذه الخلايا المكونة للتورم وزراعتها علي بيئة مغذية لا تحتوى اكسين أو سيتوكينين، ونظرا لمقدرة هذه الخلايا علي استمرار النمو على بيئة مغذية في غياب الاكسين والسيتوكينين فانها تعتبر مادة نباتية مميزة لدراسة كيفية انتاج وعمل هذه المواد المنظمة للنمو داخليا، وبطريقة عكسية فانه يمكن تحويل الخلية الغير سرطانية الي خلية سرطانية بواسطة زراعتها فى بيئة مغذية والامداد بمنظمات النمو (الاكسين، السيتوكينين) وفي مثل هذه الحالة يتحول اعتماد الخلية علي منظمات النمو المضافة الي البيئة المغذية .. هذا النظام يسهل الدراسات الفسيولوجية والوراثية المسئولة عن تحول الخلية الى خلية سرطانية، والي هنا يتجلي أن نظرية العالم Haberlandt (1902) والتي اعتُقد فيها أنه يمكن لخلية منفردة أن تستمر في النمو والانقسام وتكوين نبات كامل لم يتم تحقيقها بعد، بل وأنه وبالرغم من النجاح في انتاج نباتات كاملة من نسيج الكالس المنزرع على بيئة مغذية غير أنه لم يتم النجاح في زراعة الخلايا النباتية منفصلة فى بيئة مغذية. ويرجع الفضل الكبير في ابتكار طريقة لزراعة الخلايا منفصلة الي العالم Muir (1953) الذى أشار الي أنه اذا اجرى نقل جزء من الكالس الي بيئة مغذية سائلة مع أجراء الاهتزاز الدوراني فانه يحدث تفتيت لقطع الكالس الي قطع صغيرة مع انفصال خلايا مستقلة في البيئة السائلة مكونة ما يسمي بالخلايا المعلقة أو المعلق الخلوي، هذه يمكن تجديدها بواسطة نقل بعضها الي بيئة مغذية سائلة حديثة التحضير. بعد حوالى سنتين من اكتشاف هذه الطريقة لانشاء المعلق الخلوى أقر

العالم Nickell (1956) أنه أمكن المحافظة علي الخلايا المنزرعة في سائل مغذى لمدة ٤ سنوات متتالية بواسطة تجديدها بالنقل الى بيئة جديدة ولايخفى علينا أهمية هذه الطريقة في الدراسات التي تهتم بالعوامل المؤثرة في انقسام الخلية وتمددها وتميزها. سجل Muir (1956) ملاحظة ذو أهميه خاصة عندما أشار الى تكون تجمعات خلوية ناتجة من خلية واحدة عندما قام بوضع خلايا منفصلة علي قطعة من ورق الفلتر التي بدورها وضعت علي كالس نامي علي بيئة مغذية، وأوضح أن هذه الخلايا تحصل علي المواد المغذية التي تحتاج اليها من البيئة المغذية بواسطة الانتشار خلال نسيج الكالس وتحصل كذلك علي بعض المواد المنشطة للأنقسام الخلوى من الكالس ذاتة. كذلك ظهرت طريقة زراعة الخلية فيما يسمي بالنقطة المعلقة وفيها يجرى زراعة الخلايا في نقطة واحدة من البيئة المغذية وفي حيز ضيق. كما ظهر أيضاً طريقة زراعة الخلايا المنفصلة فى بيئة مغذية دافئة تحتوى على آجار وتوضع هذه البيئة في أطباق بترى في طبقة رقيقة Bergmann (1960) هذه الخلايا المنفصلة تنقسم وتزداد في العدد وتكون مايسمي بالمستعمرات الخلوية. تقريبا في نفس الوقت الذى ظهر ونشأ فيه طريقة الخلايا المعلقة أثبت Steward القدرة علي الحصول علي نباتات من زراعة جذور نبات الجزر على بيئة مغذية، وفي معمل آخر لاحظ Reinert ظهور تركيب نباتي يشبة الجنين علي الكالس المتحصل علية من جذور الجزر ونظرا لاهمية هذه الملاحظة فلقد اجريت أبحاث عديدة لدراسة تكون هذه الاجنة الناتجة من الكالس ولوحظ أنها تمر بمراحل تشابة الي حد كبير الجنين الزيجوتي والمراحل التي يمر بها هذا الجنين الكروي، القلبى، الفلقي. كان السؤال المحير هو ما اذا كان هذا الجنين ناتج من خلية واحدة فقط من خلايا الكالس أو من تطور عدد من الخلايا التي تعمل معا

لتشكيل الجنين!!؟ بعد التجارب العديدة أثبت أن الجنين ناتج من خلية واحدة، غير أنه أشارت الى أهمية الخلايا المحيطة بالخلية التي تتحول الي جنين حيث أعتقد أن الخلايا المحيطة تنشط وتمد الخلية الجنينية بالعوامل اللازمة لتطورها الجنيني.

مع التقدم السريع في زراعة الخلايا في معلق خلوي وامكانية الحصول علي كالس ثم أجنة من الخلايا المنفردة، تحول العلماء الي هذه الطريقة لفصل الخلايا المتطفرة من الخلايا الغير متطفرة. ولقد عرف العلماء أهمية استخدام الخلايا المتطفرة في دراسة التركيب الوراثى وعلاقتة بالقدرة علي التمثيل الحيوي، هذا بالاضافة لاستخدام الطفرات الناتجة في بعض الانواع النباتية لانتاج الصمغيات، القلويات، المواد الطبية. للأسف فان استخدام الطفرات الناتجة من خلايا ثنائية أو متضاعفة ليس لها أصل وراثى موثوق فيه حيث أن الصفات تمثل بأثنين أو أكثر من الجينات .. من أجل هذا بدأ العلماء في استخدام النباتات الاحادية التي يوجد فيها الصفات ممثلة كلّ بجين واحد فقط. كان الاعتقاد السائد في ذلك الوقت أن النباتات الاحادية يصعب زراعتها في بيئة مغذية صناعية سائلة أو صلبة. وأثبت العلماء Melchers & Bergmann (1959) لاول مره زراعة نسيج نباتي متحصل عليه من نبات احادى علي بيئة مغذية، وذكر العلماء أن النسيج يحتفظ بصفتة الاحادية أثناء نقلة لعدة مرات ولكنة تحول الي عديد المجموعة الكروموسومية بعد فترة من الزراعة. هنا يجب الذكر أنه قبل المحاولة لزراعة نسيج نباتي متحصل علية من نبات احادى، كانت جميع المحاولات تتركز في زراعة حبوب لقاح بعض الاشجار Tulecke (1959) وسجلت هذه المحاولات امكانية الحصول علي كالس وليس نبات احادى.

شهدت بداية الستينات الانجاز الباهر في الحصول علي نباتات احادية من حبوب اللقاح بداخل غلاف المتك وأثبت العلماء (1966) Guha & Maheshwari أن الأجنة الناتجة من زراعة المتك علي بيئة مغذية هي ناتجة من انقسام حبوب اللقاح وبذلك فإن هذه الاجنة والنباتات الناتجة منها تحتوي عدد احادي من الكروموسومات. تلي هذا انتاج نباتات احادية من العديد من النباتات بواسطة زراعة المتك واعتقد العلماء العاملين في هذا المجال في ذلك الوقت أن جدار المتك يوفر بعض المواد المنشطة لتحول حبوب اللقاح الي جنين، غير أن بعض العلماء حاولوا استخدام الطريقة التي أتبعها Muir في زراعة الخلايا المنفصلة علي ورقة فلتر توضع علي كالس نشيط في الانقسام .. اجريت زراعة حبوب لقاح نبات الطماطم منفصلة علي ورقة فلتر التي بدورها وضعت علي متك منزرع علي بيئة مغذية، في هذه الحالة أمكن الحصول علي كالس من انقسام حبوب اللقاح المنزرعة علي ورق الفلتر. في نفس العام اكتشف (1974) Nitsch طريقة لزراعة حبوب اللقاح منفصلة في بيئة سائلة مغذية. علي الرغم من الصعوبات التي واجهت النجاح في زراعة حبوب اللقاح، غير أنه أمكن استخدام هذه الطريقة بصورة فعالة لانتخاب وانتاج أنواع نباتية جديدة في بعض المحاصيل.

شهدت فترة الستينات ايضا مرحلة جديدة، واضافة هامة في زراعة الانسجة النباتية ألا وهي فصل البروتوبلاست الخلوي من نسيج نباتي أو من معلق الخلايا النباتية وهنا يجب الاشارة الي أن البروتوبلاست هو عبارة عن الخلية النباتية التي فصل منها الجدار الخلوي الذى يحيط بها. أمكن للعالم (1960) Cooking من عزل بروتوبلاست من الجذور بواسطة أضافة أنزيم السليوليز في محلول يحتوي علي ٦ر مولر سكروز وذلك للمحافظة علي الضغط الاسموزى للخلايا، ولقد أثبت

[stamp]

نفس العالم إن البروتوبلاست المنزرع علي بيئة مغذية له المقدرة علي تكوين جدار خلوي جديد والانقسام وتكوين نباتات كاملة. قد يتسائل البعض عن أهمية فصل البروتوبلاست من خلايا منزرعة فعلا في معلق خلوى أى خلايا منفصلة .. في واقع الامر يعتبر البروتوبلاست وسيلة فريدة يسهل بواسطتها تقديم بعض الجزيئات الدقيقة المرغوب فيها الي الخلية، كما أن البروتوبلاست يعتبر هام في اجراء التهجين الخلوي ودمج البروتوبلاست ذو التركيب الوراثي المختلف، نتيجة لهذا ينتج خلية واحدة ذات تركيب وراثي جديد تحمل صفات كل من الخليتين المندمجتين. نتيجة لانجذاب العلماء لهذه الطريقة فلقد اجرى دمج بروتوبلاست ناتج من نباتات ذات انواع مختلفة. أجرى دمج بعض الخلايا النباتية والخلايا الحيوانية وازداد استخدام هذه الطريقة في نقل بعض مكونات الخلايا من خلية الي خلية اخري حيث اجري نقل البلاستيدات والميتوكوندريا الي بروتوبلاست خلايا اخري، كما اجري نقل الكروموسومات والاحماض النووية الي بروتوبلاست خلية منزرعة في بيئة مغذية (Mastrangelo (1979 ولقد اطلق اسم هجين سيتوبلازمي أو هتروبلاست علي البروتوبلاست الذي تم نقل بعض مكونات سيتوبلازم خلية اخري اليه، كما اطلق اسم هتروكاريون علي بروتوبلاست يحتوي علي نواة خلية اخرى. بعد أن استعرضنا معاً وبايجاز شديد بعض الملامح التاريخيه التي أدت في مجموعها لظهور علم زراعة الأنسجه وقبل أن نستعرض الماده العلميه للفصول المختلفه لهذا الكتاب يهمنا أن نشير الى أنه هناك العديد من العلماء الذين ساهمو بجديه في وضع اسس هذا العلم ونحن نكن لهم كل التقدير غير أنه من العسير ذكر كل عمل منفرد في هذه المساحه المحدوده من هذا الكتاب.

ننتقل معاً لنعرض في فصول هذا الكتاب بعض المفاهيم والتطبيقات المتعدده لزراعة الأنسجه النباتيه.

أثبتت وايت أول تجربة ناجحة لزراعة نسيج نباتي على بيئة مغذية صناعية ... من نسيج نباتات الطماطم.

"وراء الكواليس"

"خواطر باذنجانية"

٢

تجهيز معمل زراعة الانسجة

Laboratory organization

يستخدم مصطلح زراعة الانسجة النباتية مشيرا الي زراعة أى جزء نباتي سواء في صورة خلايا منفصلة ومستقلة أو نسيج كامل أو عضو نباتي علي بيئة مغذية في أوعية زجاجية أو بلاستيكية تحت ظروف معقمة. حديثا ونظرا للانتشار السريع في استخدام زراعة الانسجة النباتية في العديد من المراكز العلمية البحثية وكذا علي النطاق التجاري فلقد ظهرت بعض المصطلحات الاكثر تخصصا مشيرا الي استخدام نماذج وأجزاء مختلفة من النبات للزراعة ومن هذه المصطلحات مايلي

- زراعة النبات .. زراعة البادرة أو النبات الاكبر حجماً.
- زراعة الأجنة .. فصل وزراعة الاجنة الناضجة أو الغير ناضجة .
- زراعة الاعضاء .. زراعة الاعضاء النباتية المنفصلة كاملة أو مجزأة .
- زراعة النسيج أو الكالس .. زراعة النسيج الناتج من زراعة عضو نباتي .
- زراعة الخلايا المعلقة .. زراعة الخلايا منفصلة ومستقلة في بيئة مغذية سائلة.
- زراعة البروتوبلاست .. زراعة الخلايا منفصلة بعد ازالة الجدار الخلوي.
- زراعة المتك .. زراعة المتك كاملة بداخلها حبوب اللقاح.
- زراعة حبوب اللقاح .. زراعة حبوب اللقاح منفصلة في بيئة سائلة.
- زراعة الكيس الجنيني ذو البويضات .. زراعة البويضات للحصول علي أجنة أو

كالس احادي الكروموسومات.

ترتكز زراعة الانسجة النباتية علي ثلاث دعائم اساسية

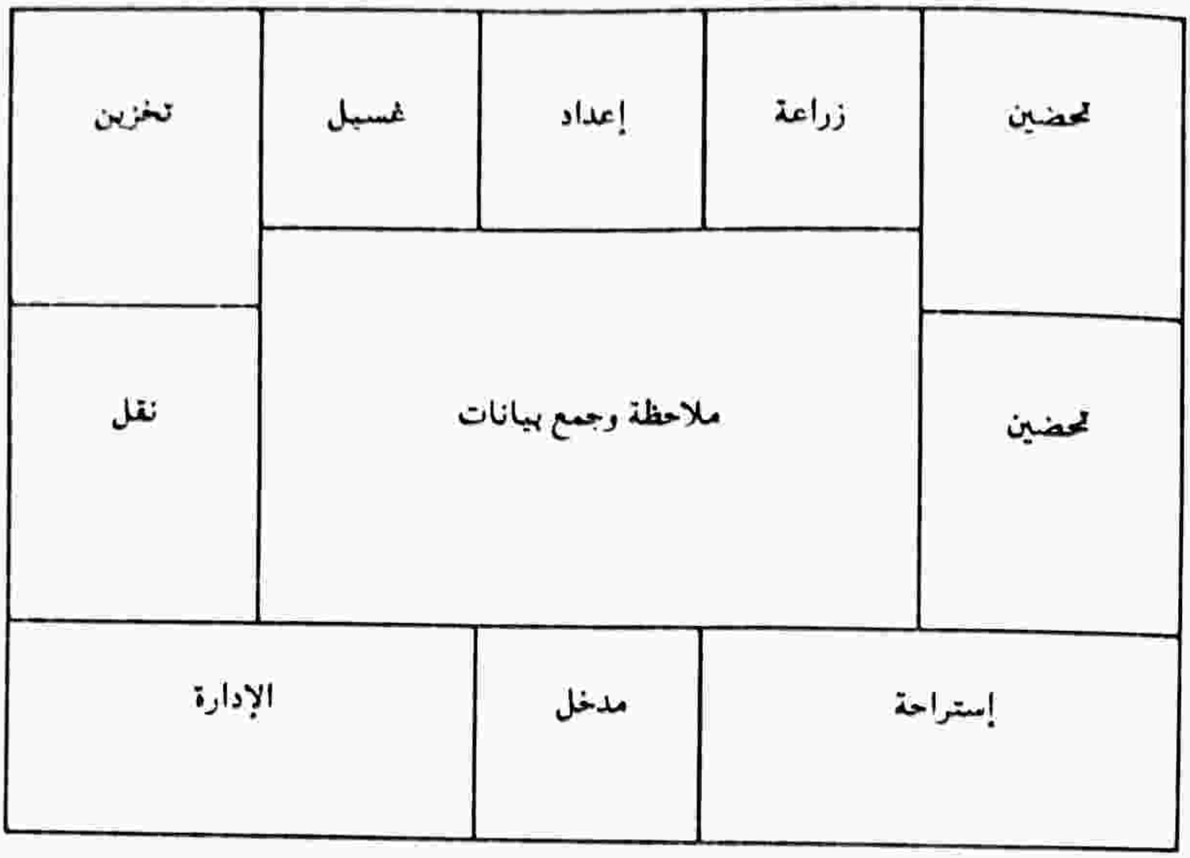
- يجب فصل الجزء النباتي المراد زراعته من النبات الام وهذا يعني حدوث اضطرابات في جميع العمليات الحيوية بهذا الجزء المنفصل، نتيجة الي فقدان التوازن والتفاعل الموجود بين الخلايا والانسجة.

- يجب المحافظة علي الجزء المنفصل في ظروف مناسبة وهذا يعني أن تركيب البيئة المغذية المنزرع عليها الجزء النباتي وكذلك الظروف المحيطة به التي تشمل التبادل الغازي، الكثافة الضوئية، درجة الحرارة، نوع وسعة الاناء المنزرع به، عدد ساعات الاضاءة .. وغيرها من العوامل البيئية الاخرى لابد أن تؤثر في التعبير عن كل الصفات الوراثية لهذا الجزء النباتي المنزرع.

- يجب المحافظة علي الجزء النباتي في جو معقم دائما، ولا يغيب عن الذهن أن البيئة المغذية التي تمد الجزء النباتي المنفصل بما يحتاجة من عناصر مغذية هي نفسها التي تساعد علي نشاط ونمو الكائنات الحية الدقيقة، البكتريا، الفطريات .. وهذه بدورها تنتج مواد سامة في البيئة المغذية وتعيق نمو وتطور الجزء النباتي المنزرع. وتعتبر الحاجة الملحة الي توفير ظروف معقمة هي الدافع وراء أهمية مراعاة تجهيز المعمل بالشكل الذى يقلل من التلوث.

هناك بعض الحجرات الاساسية التي يجب أن تكون متوفرة بمعمل زراعة الأنسجة النباتية وهذه تشمل الآتي وكما هو مبين في شكل (١)

- حجرة أو مكان مخصص لغسيل مستلزمات المعمل.
- مكان لاعداد وتعقيم وتخزين البيئة المغذية.
- حجرة أو مكان لاجراء عملية زراعة النسيج النباتي.



شكل (١) شكل تخطيطي يبين نموذج لمعمل زراعة الأنسجة.

- حجرة لتحضين ذات امكانيات للتحكم في الاضاء، الحرارة، الرطوبة.
- حجرة للملاحظة وجمع البيانات اللازمة.
- حجره لتجهيز النباتات الناتجة ونقلها الي التربة.

يجدر الاشاره الي أنه يجب أن يراعي في تجهيز المعمل أن يكون مصمما كخط انتاجي وهذا يعني أيضا أن يكون هناك تسلسل طبيعي في تعقيب الحجرات والمساحات متوافق مع تتابع العمليات المختلفة. كمثال يجب أن تكون الحجرة أو المكان المستخدم للغسيل يقود الي مكان اعداد البيئة وهذا بدورة يقود الي مكان اجراء التعقيم .. من البديهي أن يلي هذا مكان اجراء الزراعة في جو معقم يتلوها مكان للتحضين ويجب أن يتلو هذا مكان لجمع البيانات وهذا يحتوي علي ميكروسكوبات للملاحظة والتصوير وبعض الاجهزة للتحليل الكيميائي. ويراعي في هذا التسلسل سهولة رجوع الادوات المستعملة في أى مرحلة من المراحل السابقة الي مكان الغسيل .. ومن الامور الهامة أيضا أن تترك مساحة كافية حول الاجهزة تتيح التهوية الجيدة وأن يكون هناك أكثر من مكان لوضع الزجاجيات المعقمة اللازمة للاستعمال الفوري. عموما فانه يجب امداد معمل زراعة الانسجة النباتية بجهاز لتوليد الطاقة الكهربائية وهذا يستخدم في حالة انقطاع التيار الكهربائي لاستمرارية امداد الطاقة الكهربائية الي حجرة التحضين وكذا الجهاز الهزاز للخلايا المعلقة. نظرا للأهمية القصوي التي يجب أن تراعي في تصميم معمل زراعة الانسجة فاننا سنتناول كل جزئية منها بالتفصيل الكامل.

١ مكان الغسيل Washing area

يجب أن تحتوي هذه المساحة من المعمل علي أحواض غسيل كبيرة وذات عمق كبير

لسهولة الغسيل ويفضل أن تكون مغطاه بطبقة من الرصاص وذلك بهدف منع التآكل الذى يحدث نتيجة لاستخدام الأحماض والقلويات .. كما يجب أن يحتوي هذا الجزء من المعمل علي مصدر مستمر من الماء المقطر وأماكن مخصصة لماكينات الغسيل والتجفيف وحمامات غسيل الزجاجيات بالاحماض. نظرا لأهمية غسيل أدوات المعمل والزجاجيات جيداً فان الطريقة التقليدية لغسيل الزجاجيات تشمل المعاملة بمحلول من حمض الكبريتيك ويلي هذا الغسيل بماء جارى لمدة خمس دقائق يتلوها الغسيل في ماء مقطر. ونظرا للتأثير الضار لحمض الكروميك علي العاملين فانه يجرى استبدالة ببعض المطهرات وهذه تستخدم في ماكينات الغسيل بدون أى أضرار، ولاينصح باستخدام الاحماض في الغسيل إلا في الحالات التي يصعب فيها التخلص من بعض البقايا .. كما يراعي أن تغسل الزجاجيات المشتراه جديدة في الاحماض لازالة المتبقيات المتواجدة من عملية صناعة الزجاجيات. هناك بعض الطرق الاخري التي تستخدم في المعمل

- الغلي في محلول صابون ثم غسيل في ماء جاري، والغمر في محلول كحولي ٩٥٪ ويلي هذا التجفيف التعقيم.
- التنظيف بواسطة الالتراسونيك.
- الغسيل في محلول صوديوم بيروفوسفات.
- الغلي في محلول ميتا فوسفات، والغسيل في ماء جاري، ثم الغلي مرة اخري في محلول مخفف من حمض الايدروكلوريك، غسيل في ماء جاري، ثم الغمر في محلول كحول ٩٥٪.
- الغلي في محلول ٨.٪ حمض كبريتيك يحتوي حمض النتروز ويلي هذا الغسيل في ماء جاري.

ماجد زكي

- النقع في محلول يحتوي ٨٠٪ حمض كبريتيك، ١٥٪ حمض نتروز، ٥٪ ماء لمدة ٤٨ ساعة، يليه الغسيل بمطهر والغسيل في ماء جار ثم ماء مقطر.

٢ تحضير وتعقيم البيئة المغذية

Preparation and sterilization of culture medium

٢. ١ حجرة تحضير البيئة المغذية Medium preparation room

يجب أن يراعي عند تجهيز هذه المساحة من المعمل أن تحتوي علي مساحات واسعة من البنشات وذلك لتسهيل اعداد البيئة ..كما يجب أن تحتوي علي أرفف لتخزين الزجاجيات التي يحتاج اليها بصفة مستمرة أثناء الاعداد، ولايخفى أهمية وجود صوان خاص للكيماويات المتعددة المستخدمة في تحضير مختلف البيئات. ويراعي أن يتوفر مكان للثلاجات والفريزر والاجهزة الاخرى التي تشمل جهاز قياس تركيز أيون الهيدروجين، جهاز تقليب/تسخين، موازين، لهب، مصدر دائم للماء المقطر والمقطر مرتين متتاليتين. هنا يجب ان نذكر أن الاهتمام بتحضير البيئة المغذية له أهمية كبيرة في نجاح تجارب زراعة الانسجة حيث أن أى خطأ ولو بسيط يؤثر بشكل مباشر في نجاح عملية زراعة الانسجة .. ولقد أشار أحد العلماء في أحد الابحاث الى أن كثير من المحاولات الفاشلة ترجع أساسا الي الخطأ في تحضير البيئة المغذية وليس إلي الخطأ في اجراء التجارب وهذا يؤكد علي أهمية مراعاه الدقة في تحضير البيئة المغذية.

من الامور الهامة أيضا استخدام كيماويات ذات نقاوه عالية في تحضير البيئة المغذية .. وبالرغم من أن هذه الكيماويات ذات نسبة نقاوه عالية غير أنه هناك نسبه ضئيلة جداً من الشوائب. للتغلب علي الاختلافات التي قد تحدث عند

تحضير بيئات من عبوات مختلفة فانه ينصح بشراء كمية كبيرة من كل مادة كيماوية وتحفظ للاستخدام في تحضير البيئات المغذية فقط. عند تحضير بيئة مغذية فانه يجب أن يراعي الحذر الشديد أثناء عملية الوزن ومن الامثل أن يقوم اثنين معاً بالوزن ومراجعة كل الآخر حتي يتأكد تماماً من صحة الوزن وكفاءة البيئة التي تم تحضيرها. غالبا مايجرى استخدام نوع واحد أو نوعين من البيئة المغذية في معمل زراعة الانسجة، ولما كان من غير المنطقي أن يجري اعداد هذه البيئة يوميا، حيث أن هذا يتطلب الاستخدام المستمر من الزجاجيات بالاضافة الي الوقت الكبير الذى يحتاج اليه في عملية الوزن. لتسهيل عملية اعداد البيئة المغذية فانه يجري اعداد محاليل مركزة من العناصر المختلفة التي لا تنحل بالاذابة في ماء والتي يحتاج اليها في تحضير البيئة المغذية .. ويجري اعداد المحلول المركز من الفيتامينات ومنظمات النمو وتجمد بالحفظ علي حراره منخفضة - ٢٠ درجة مئوية، كما تحفظ المحاليل المركزه للأملاح الغير عضوية علي حراره ٢-٤ درجة مئوية. ويجب أن يجرى فحص هذه المحاليل علي فترات منتظمة لملاحظة حدوث أى ترسيبات أو تلوث بيولوجي، ومن الافضل استخدام هذه المحاليل المركزه للاملاح الغير عضوية في خلال شهر من تحضيرها. تستخدم مادة الاجار عند الرغبة في تحضير بيئة صلبة، والاجار متوفر في درجات مختلفة من النقاوه ويعتبر الاجار النقي ذو كفاءه عالية ولكنة غالي الثمن!! غالبا ما يستخدم الاجار عند تحضير البيئة المغذية بتركيز يتراوح بين ٦ر الي ١٪. ويجب استخدام ماء نقى في تحضير البيئة المغذية ولايستخدم ماء الصنبور في هذا الغرض وذلك لاحتوائة علي الآتي

- كاتيونات مثل الامونيوم، الكالسيوم، الحديد، المنجنيز، البوتاسيوم، الصوديوم ... وغيرها.

- آنيونات مثل بيكربونات، كربونات، كلوريد، فلوريد، نترات، فوسفات، سلفات.

- كائنات دقيقة مثل طحالب، بكتيريا، فطريات، فيروسات.

- غازات مثل أمونيا، ثاني اوكسيد الكربون، كلورين، اكسيجين، مواد عالقة، زيوت مواد عضوية.

لتنقية الماء وحتي يصبح ملائما للأستخدام في تحضير البيئة المغذية فانه يستخدم واحد أو أكثر من المعاملات التالية

- تنقية بواسطة الامتصاص

يستخدم في هذه الطريقة الكربون النشط وفيها ينقي الماء من المواد العضوية والكلورين.

- التخلص من الأيونات الشائبة

يمرر الماء علي مواد صناعية ويتم التخلص من الآيونات الذائبة بواسطة التبادل الآيوني مع كاتيون الهيدروجين (يد+) وأنيونات الايدروكسيد (أ يد-) مع الايونات الشائبة في الماء .. وفي هذه الطريقة يتبقى الكائنات الدقيقة والمواد العضوية في الماء.

- التقطير

يعتمد علي تحول الماء من الصوره السائلة الى بخار، وفيها يتم التخلص من مدي واسع من الشوائب مثل الأيونات، المواد العالقة، المواد الكيماوية الغير طيارة، الكائنات الدقيقة، المواد العضوية .. في هذه الطريقة تبقي الغازات، المواد الشائبة الطيارة.

- التنقية بواسطة الامرار خلال فلتر

فيها يزال المواد العالقة والبكتريا، ويجري امرار الماء خلال عدة فلاتر ذات ثقوب تتراوح سعتها مابين ١٥-٢ر ميكرون ويبقي الشوائب في الماء الناتج حيث أنه لايتخلص منها بواسطة الفلاتر.

- التنقية بالضغط خلال أغشية شبة نفاذه

يتم التخلص من ٩٩٪ من البكتريا، المواد العضوية، المواد العالقة وحوالي ٩٠٪ من الأيونات الشائبة .. نسبة قليلة من الغازات تزال بهذه الطريقة.

وبالرغم من تعدد الطرق لتنقية المياة غير أن أفضل الطرق وأكثرهم شيوعاً في مجال زراعة الانسجة هو طريقة التخلص من الأيونات ويتلوها تقطير الماء مره أو مرتين متتاليتين .. وكما أوضحنا من قبل فانه في الخطوة الاولي يزال معظم الايونات الشائبة وفي الخطوة الثانية تزال المواد العضوية، الكائنات الدقيقة .. وبهذا فانه يجب مراعاة استخدام ماء ذات نقاوه عالية ويجب عدم تخزين هذا الماء لفترات طويلة بل تحضيره طازجاً كلما أمكن هذا.

٢ التعقيم Sterilization

بعد أن يتم تحضير البيئة المغذية فانه يجب أن يجري تعقيمها حتي تصبح خالية من الكائنات الدقيقة التي تعيق نمو النسيج المنزرع .. هناك طرق عديدة تستخدم لتعقيم البيئة المغذية، الزجاجيات، الادوات المستخدمة أثناء عملية الزراعة .. وهذه الطرق تشمل التعقيم بالحرارة المرتفعة، التعقيم باستخدام الفلتر، التعقيم باستخدام مواد كيمائية. ونظراً لاهمية هذه المرحلة وتأثيرها في نجاح عملية زراعة الانسجة فاننا سنتناولها بالتفصيل

٢. ٢. ١ التعقيم بالحرارة
Heat sterilization

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم الزجاجيات، أدوات التشريح، الادوات الاخرى التي لاتتأثر باستخدام الحرارة المرتفعة .. وفي هذه الطريقة يجري تغليف الادوات أو الزجاجيات المراد تعقيمها في ورق الالومونيوم وتوضع في فرن على حرارة ١٨٠ درجة مئوية لمدة أربعة ساعات، بعد انتهاء فترة التعقيم اللازمة يجب اخراج هذه الأدوات من الورق الالومونيوم ووضعها في جهاز زراعة الأنسجة أو كابينة الزراعة .. بعد تعقيم سطحه الداخلي وبذلك تظل الادوات معقمة طوال فترة العمل ويجب مراعاة أن القطن والمواد التي تحتوي على منتجات ورقية مثل أوراق الترشيح وغيرها وكذلك البلاستيك لايجري تعقيمها بهذه الطريقة، كما أن المشارط التي تستخدم في التشريح لاينصح باستخدام هذه الطريقة لتعقيمها حيث أن السطح الحاد يفقد حدته نتيجة للمعاملة بالحرارة المرتفعة.

٢. ٢. ٢ التعقيم بالبخار في حرارة مرتفعة
Steam sterilization

يعتبر التعقيم في الاوتوكلاف هو الطريقة الشائعة لتعقيم البيئة الغذية، أوراق الترشيح، الزجاجيات، القطن، الاغطية البلاستيك، الماء. غالبا ماتقتل كل الكائنات الدقيقة بواسطة التعريض لبخار الماء ذات الحرارة المرتفعة لمدة ١٥-٢٠ دقيقة. وفي العادة يجري التعقيم في الاوتوكلاف على حرارة ١٢٠ درجة مئوية على ضغط جوي ١٥ لمدة ١٥-٢٠ دقيقة .. هذا في حالة تعقيم أحجام صغيرة من البيئة المغذية ..١٠٠مللي، أما في حالة اجراء تعقيم لكمية كبيرة من البيئة المغذية ٢-٤ لتر فانه يحتاج الي فترة زمنية أطول تصل الي ٣٠-٤٠ دقيقة .. ويجب الا يزيد الضغط عن ٢٠ ضغط جوي حيث أن الزيادة في الضغط قد تسبب انحلال

المواد الكربوهيدراتية وكذا بعض المواد الاخري المكونة للبيئة المغذية .. ويجب الاشارة الي أنه يبدأ حساب زمن التعقيم بعد أن تصل الحرارة الي الدرجة التي يجري عليها التعقيم وعندما يكون هناك تيار مستمر من البخار المتسرب من صمام الامان بالاوتوكلاف. ويلاحظ الا يفتح الاوتوكلاف مباشرة بعد انتهاء زمن التعقيم بل يترك حتي يعود الضغط الداخلي مساوياً للضغط الخارجي، هذا لان الاسراع في فتح الاوتوكلاف يؤدى الي فوران السوائل الموجودة بداخل الاوتوكلاف نتيجة اختلاف الضغط. عديد من المواد الكيمانية التي تدخل في تركيب البيئة المغذية تنحل نتيجة للتعرض للحرارة المرتفعة أثناء التعقيم بالبخار فمثلا مركب الجبرالين ينحل بالحرارة ويفقد حوالي ٩٠٪ من فاعليته، كما أن الاكسينات مثل نفثالين استيك آسيد، اندول استيك آسيد، ٢ر٤-داى كلوروفينوكس آستيك آسيد هي مركبات تنحل بالحرارة المرتفعة ولذا ينصح اضافتها للبيئة المغذية بعد التعقيم.
أما السيتوكينينات مثل الكينتين والزياتين وجد أنها لاتنحل بالحرارة المرتفعة .. هناك مواد تتحول من الحالة الغير نشطة الي الحالة النشطة نتيجة للمعاملة بالحرارة المرتفعة وبالتالي يصبح لها تأثير فعال في نمو النسيج المنزرع، مثال هذا مادة البيورين الغير نشطة (١-٣ بيورين) تتحول الي البيورين النشط (ن-بيورين) عند استخدام الحرارة المرتفعة في التعقيم .. البيورين النشط يؤدي الي تنشيط تكوين الكالس .. علي الرغم من ان التعقيم بالحرارة المرتفعة لايؤثر علي هرمون الابسيسيك، غير أن هذا الهرمون حساس للضوء. الثيامين يتحمل الحرارة حتي ١١٠درجة مئوية بدون أن يحدث أي انحلال ولكن اذا ارتفع تركيز ايون الهيدروجين في البيئة المغذية الي ٥ر٥ فأنه يتعرض للانحلال السريع، ويعتبر البيريدكسين من المواد التي تتأثر بالحرارة المرتفعة.

من الشائع استخدام السكروز كمصدر للكربوهيدرات في البيئة المغذية، واستخدام الاوتوكلاف في التعقيم يؤدي الي انحلال السكروز إلي جلوكوز وفركتوز وهو أقل كفاءة للاستخدام بواسطة النسيج المنزرع.

٢. ٢. ٣ التعقيم بالامرار خلال فلتر Filter sterilization

حيث أن عديد من البروتينات والاحماض الامينية والفيتامينات والهرمونات والمستخلصات النباتية والكربوهيدرات تنحل بالحرارة المرتفعة، لذا تستخدم طريقة التعقيم بالفلتر للمحافظة علي خواص وتركيب هذه المواد. هناك أنواع عديدة من الفلاتر التي تستخدم لهذا الغرض وأكثرها شيوعاً تلك التي تصنع من السليلوز وهي تحتوي علي ثقوب ذات أقطار مختلفة .. هذه الفلاتر تعمل علي تنقية البيئة المغذية من كل أنواع البكتريا والكائنات الدقيقة، وتعتمد هذه الطريقة علي أنه من المستحيل لاى كائنات دقيقة ذات قطر أكبر من قطر ثقوب الفلتر المرور خلالة .. وبذلك تحتجز هذه الكائنات بالفلتر وتنقي البيئة منها .. وعلي الرغم من أنه من السهل امرار البيئة خلال فلتر ذات أقطار ٤٥ر. ميكرون، غيرأنه ينصح باستخدام فلتر ذات أقطار ٢٢ر. وذلك للتخلص من البكتريا ذات الاقطار الصغيرة لضمان خلو البيئة من أى كائنات دقيقة. نظراً لان هذه الفلاتر رقيقة ويسهل اتلافها فانه يجب الحرص الشديد عند استعمالها .. ولذا ينصح باستخدام ملقط غير مدبب الأطراف وغير حاد عند الاستخدام. عندما يراد تعقيم كمية كبيرة من البيئة المغذية فانه يجري تعقيم الفلتر الزجاجي في اتوكلاف قبل استعماله وقبل وضع وتثبيت فلتر السليلوز عليه. أما في حالة الرغبة في تعقيم حجم صغير من البيئة المغذية فانه يجري استخدام حقنة بلاستيكية ذات سعة ١٠٠ مللي ويثبت غشاء

السليلوز في وضعة وتمرر البيئة من خلالة بواسطة الضغط الخفيف علي ذراع الحقنة ..في بعض الحالات يجري التعقيم للبيئة المغذية علي مراحل مختلفة حيث يجري تعقيم الجزء من البيئة التي تحتوي علي عناصر غير قابلة للانحلال وكذا التي تحتوي علي أجار في اوتوكلاف وتترك حتي تبرد قليلا فتصل درجة حرارتها الي ٥٠ درجة مئوية، عندها يضاف العناصر الاخري اليها بعد التعقيم بالفلتر وتخلط البيئة جيداً وتصب في أوعية الزراعة.

٢. ٢. ٤ التعقيم بالمواد الكيميائية Chemical sterilization

يجرى تعقيم حجرات المعمل بواسطة الغسيل مرتين كل شهر بمحلول يحتوي مطهرات ضد البكتريا والفطريات، تمسح بمحلول يحتوي ٢٪ صوديوم هيبوكلوريت ويراعي أن تمسح الحوائط اسبوعيا بقطعة من القماش بالمحلول السابق ويجرى تعقيم السطح الذي يجرى العمل علية بواسطة تبليل قطعة من القطن أو الشاش في محلول كحول الايثانول بتركيز ٧٠٪ وامرارها عدة مرات فوق السطح المراد تعقيمة، وقد يستخدم محلول عالي التركيز من الايثانول ٨٠-٨٥٪ لتطهير أدوات العمل من وقت لآخر .. غير أنه يجب الحرص الشديد عند استخدام مثل هذا المحلول الكحولي نظراً لقابليتة الشديدة للاشتعال .

نظراً لان الاعضاء والانسجة النباتية الحية تفقد هذه الحيوية عند تعريضها لدرجات حرارة مرتفعة مثل الحرارة التي تستخدم في التعقيم، فانه يجري استخدام محاليل كيميائية لتطهير السطح الخارجي للاعضاء والانسجة النباتية المراد زراعتها في بيئة معقمة. ويجب أن يراعي عند استخدام أى مادة كيميائية من أجل هذا الغرض أن يكون لها سمة هامة وهى أن تحافظ علي الخلايا بالنسيج أو العضو النباتي بلا

حدوث أي أضرار له وعلي الجانب الاخر يجب أن يطهر السطح الخارجي من البكتريا والفطريات التي قد تكون عالقة بها. ولقد وجد أن هناك عدة محاليل تقوم بهذه الوظيفة، وهذه المحاليل تستخدم بتركيزات مختلفة ولفترات محددة كما هي مبينة بالجدول.

جدول يبين المطهرات الشائعة الاستعمال في معامل زراعة الانسجة

مدة المعاملة	التركيز	اسم المطهر
٥-٣٠ دقيقة	٩-١٠ ٪	كالسيوم هيبوكلوريت
٥-٣٠ دقيقة	٥ر-٥ ٪	صوديوم هيبوكلوريت
٧٥-٩٥٪	عدة ثوان - عدة دقائق	كحول ايثايل
٥-٣٠ دقيقة	١ ٪	نترات الفضة
٢-١٠ دقائق	١-٢ ٪	مادة البرومين
٢-١٠ دقائق	١ر-١ ٪	كلوريد الزئبق

ويجدر الذكر هنا الي أن بعض المعامل تستخدم بعض المطهرات المستخدمة في المنازل مثل كلوراكس أو بيوركس، وهذه المنتجات التجارية تحتوي علي نسبة ٢٥ر٥ هيبوكلوريت الصوديوم .. وعندما تخفف هذه المحاليل المطهره بنسبة ١-٩ (محلول مطهر:ماء مقطر) فانه تعطي تركيز ٥ر٪ من هيبوكلوريت الصوديوم، وهذا الاخير يستخدم في تطهير السطح الخارجي للمادة النباتية المستخدمة في الزراعة. في بعض الحالات يصعب اجراء عملية تطهير السطح الخارجي نظراً

لتعرجة أو لوجود زوائد أو شعيرات كما في بعض البذور وبعض الاعضاء النباتية، في هذه الحاله ينصح باجراء عملية التطهير باستخدام نوعين من المطهرات علي مرتين متتاليتين، يجري بغمس البذور في محلول كحول الايثانول بتركيز ٧٠٪ لمدة ١-٢ دقيقة، بعدها تنقل البذور لمحلول هيبوكلوريت الصوديوم لمدة ٢٠ دقيقة وقد يضاف عدة قطرات من محلول صابوني يساعد علي تخلل المادة المطهرة الي أسطح الاجزاء النباتية التي يحتوي تركيبها كيوتين أو سوبرين .. ويجب مراعاة الحذر في زيادة تركيز المادة المطهرة أو زيادة زمن التعريض حيث أن هذا يؤثر علي حيوية البذرة وحيوية الخلايا بداخل النسيج والعضو النباتي. بعد اجراء عملية تطهير السطح الخارجي فانه يجري غسيل الجزء النباتي في ماء معقم ثلاث مرات حتي يتم التخلص النهائي من كل آثار المادة المطهرة قبل زراعة الجزء النباتي علي بيئة مغذية.

بعض الانسجة النباتية تحتوي علي كائنات حية دقيقة بداخل النسيج نفسة وبذلك يصعب التخلص من هذه الكائنات الحية بالمطهرات السطحية، ولذلك عندما يظهر تلوث أو تغيير اللون الداخلي للنسيج المنزرع فيجب استبعادة مباشرة والتخلص منه. لقد اعتاد بعض الباحثين استخدام بعض المضادات الحيوية في البيئة المغذية بهدف التخلص من أى كائنات دقيقة قد تكون متواجدة، غير أن اضافة هذه المركبات المنتجة طبيعيا إلي البيئة المغذية قد يؤدى الي التأثير علي نمو وتطور النسيج المنزرع .. كما أنه من وجهة النظر العلمية فان هذه الطريقة لايجب أن تتبع ويجب بدلا من هذا استخدام الطرق المثلي للتعقيم والتطهير، وفي واقع الامر فانه لم يوجد مضاد حيوي يعمل بكفاءه علي جميع الكائنات الحية الدقيقة التي تتواجد علي النسيج وتسبب التلوث.

بديهيا فان المضادات الحيوية أو مشتقاتها التي تنتج من انحلالها قد تدخل في عمليات التمثيل الحيوي بالنسيج المنزرع وتسبب نتائج غير متوقعة، فمثلا اضافة مادة الجنتاميسين في البيئة المغذية للخس والخرشوف تثبط تكوين الأوعية الخشبية، وهذا يوضح مدى التأثير السلبي لاستخدام المضادات الحيوية.

٣ حجرة أو مكان اجراء زراعة الانسجة Culture room

نظريا يمكن إجراء كل عمليات زراعة الانسجة علي بنشات المعمل خاصة في المعامل المجهزة من أجل هذا الغرض والتي يراعى فيها النظافة التامة، غير أنه من المفضل اجراء هذه العمليات في الجهاز المخصص لهذا الغرض والذى يوفر جو معقم نظيف من أى كائنات دقيقة .. ويجب أن يوضع هذا الجهاز في حجرة ذات جو جاف، نظيف ويراعى أن توضع في مكان مناسب في الغرفة بعيداً عن التيارات الهوائية المباشرة. ويراعي في تصميم الغرفة ألا يتراكم الغبار والكائنات الدقيقة علي الأسطح المحيطة، ويلاحظ أيضا أن تكون سهلة التنظيف الدورى بواسطة محاليل مطهرة. تعتمد نظرية عمل جهاز زراعة الانسجة في جو معقم علي امرار الهواء علي مجموعة من الفلاتر حيث يتم التخلص من الغبار، ويلي هذا مرحلة تنقية الهواء من البكتريا بواسطة امراره خلال فلاتر مختلفة يصل قطر أصغرها الي ٣ر ميكرون .. وبذلك يتم التخلص من الكائنات الدقيقة من الهواء. يدفع الهواء المعقم علي المنطقة الداخلية للجهاز، وهي المساحة التي يتم العمل فيها وبذلك يتوفر مكان مناسب معقم لاجراء عمليات الزراعة .. وتصل كفاءة تعقيم الهواء بواسطة هذا الجهاز الي ٩٩٫٩٧٪، وهي تعتبر نسبة عالية جداً ويوجد من هذه الاجهزة ما يدفع الهواء في الوضع الافقي، والآخر مايدفع الهواء في الوضع الرأسي

.. غير أن نظرية العمل متشابهة في كل منها. وأبسط جهاز لزراعة الانسجة هو عباره عن صندوق بلاستيكي ويجري تعقيم الجو الداخلي بواسطة الاشعة فوق البنفسجية التى تطفىء أثناء الاستعمال .. ويمسح السطح الداخلي بمحلول ايثانول ٩٥٪، ويعتبر هذا الصندوق كافياً لاجراء بعض العمليات المحدودة العدد في زراعة الانسجة النباتية. في جميع الحالات فانه يجب مسح مسطح العمل بمحلول ايثانول كل فتره زمنية وذلك للحفاظ علي استمرارية الجو المعقم وعدم التلوث. ومما لاشك فيه ان ارتداء معطف نظيف أثناء العمل يقلل من مخاطر التلوث. كما أن وضع قفاز طبى وغطاء الأنف والفم أثناء العمل من الاحتياطيات التي يجب أن تتبع.

٤ حجرة التحضين Incubation room

بعد الانتهاء من زراعة الانسجة النباتية على بيئة مغذية سواء صلبة أو سائلة فانه لابد من أن تحفظ هذه الزراعات تحت ظروف خاصة، فيها يتم التحكم في درجات الحرارة، الاضاءة، الرطوبة، الفترات الضوئية. مما لاشك فيه أن هذه الظروف تؤثر في نجاح عملية زراعة النسيج المنفصل علي بيئة مغذية .. وهنا يجدر الاشاره الي أهمية تفهم احتياجات كل نسيج نباتي للظروف الملائمة لنموه وهذا بلا أدني شك يختلف حسب اختلاف الأنواع النباتية. بشكل عام فانه لوحظ حساسية بعض الاعضاء النباتية مثل المتك وكذلك البروتوبلاست عن بعض الاعضاء الاخرى مثل السوق أو الاوراق. هناك حضانات مصممة خصيصاً من أجل هذا الغرض وهي ذات مواصفات متعددة تختلف تبعاً لنوعية التجارب التي تجري بالمعمل، وعموماً يجب أن يراعى في الحضانات مايلى

- أن يسمح بالتحكم في الحرارة في مدى ٢ - ٤٠ درجة مئوية وأن تكون حساسة الترموستات حوالي ٥ر درجة مئوية.
- أن تكون مجهزة بإمكانيات للتسجيل المستمر لدرجة الحرارة.
- أن يمكن التحكم في البرنامج الضوئي والحرارة لمدة ٢٤ ساعة.
- أن يمكن التحكم في الكثافة الضوئية حتى ... ر١ وحدة ضوئية.
- أن توفر رطوبة نسبية مابين ٢-٩٨٪ بحساسية ٣٪.
- أن تحتوي علي مروحة لتوزيع وتجانس الهواء بداخل الحضانة.
- أن تحتوي علي صمام للامان.

بالرغم من أن الحضانات توفر جو محكم ومتحكم فيه في كل العوامل البيئية المحيطة بالنسيج المزروع، غير أنه من أحد عيوب هذه الحضانات أنها توفر مساحة محدودة وبذلك يصعب اجراء العديد من التجارب لعدم توفر المكان المناسب أثناء عملية التحضين .. كثير من معامل زراعة الأنسجة تقوم بتجهيز غرفة أو أكثر للعمل بدلاً من الحضانات، غير أنه يجب القول أن هذه التجهيزات تكون ذات دقة محدودة في التحكم في العوامل البيئية المؤثرة علي النمو .. في هذه التجهيزات توضع العديد من المصابيح التي تعطى كثافة ضوئية تقابل الكثافة الضوئية المطلوبة لنمو النسيج النباتي، كما يوضع جهاز أو جهازين للتكييف مع وضع ترموستات لايقاف أو اعادة تشغيل جهاز التكييف حسب درجة الحرارة المطلوبة .. وقد يوضع في مثل هذه الغرف التى تقوم بعمل الحضانات وحدة أو وحدتين لزراعة الخلايا فى بيئة مغذية سائلة كما أنه قد تتسع لوضع بعض الاجهزة الاخرى.

٥ حجرة للملاحظة وجمع البيانات Observation room

يجب أن يراعى في تصميم هذه الحجرة أن تكون قريبة من غرفة التحضين، كما أنها تحتوى علي مساحة كبيرة عبارة عن بنشات متعددة وذلك لوضع العينات التى يجرى العمل عليها ومقارنتها .. في هذه الحجرة توضع الميكروسكوبات المختلفة سواء الضوئية، العاكسة، المجسمة .. ويراعى أن تكون هذه الأجهزة مثبتة جيداً حتي لا يكون هناك مخاطر من تلفها أو فقدها. وتوضع أيضاً الموازين الحساسة، الافران، أجهزة قياس تركيز الأيدروجين ... وغيرها من الاجهزة التي يحتاج اليها في القياسات المختلفة. وينصح دائماً وضع لافتة بجوار كل جهاز تشير الي خطوات استعمالة بطريقة مبسطة حتي يتيسر للعاملين من استخدامة في يسر وحتى يضمن عدم الاستخدام السئ أو المحاولة التي قد تؤدى الي فقدان الجهاز.

مما لاشك فيه أن وضع دفتر بجوار كل جهاز حيث يقوم كل مستخدم للجهاز بتسجيل الاسم وميعاد وفترة الاستعمال من الضوابط الهامة التي علي أساسها يحسب العمر الزمني لاستخدام الاجهزة ويساعد علي تحديد مسئولية كل فرد خاصة في المعامل التي يتواجد بها أعداد كبيرة من الباحثين.

٦ حجرة تجهيز النباتات الناتجة ونقلها الي التربة Transfer room

يفضل أن يراعى في تصميم معمل زراعة الانسجة أن تكون هذه الحجرة شبة منفصلة من المعمل ذاته وحجراتة المختلفة وهذا لتقليل مخاطر التلوث، حيث أنه يجرى نقل النباتات من الظروف المعقمة الي جو غير معقم وتجرى زراعة النباتات الناتجة في تربة غير معقمة أى تحوى كائنات حية دقيقة .

توافر أحواض للغسيل من الامور الهامة التى يجب عدم اغفالها في تصميم هذه

الحجرة حيث يجرى اخراج النباتات الصغيرة من أوانى الزراعة ثم غسل جذورها مما يعلق بها من بيئة مغذية سائلة أو صلبة. زراعة النباتات بدون غسل الجذور في تربة تحتوى على كائنات حية دقيقة تؤدى الي مهاجمة هذه الكائنات لبقايا البيئة المغذية علي الجذور وتكاثرها السريع ومهاجمة الجذور الدقيقة المتكونة وبالتالي هلاك النباتات الصغيرة، ويفضل دائماً أن يجرى غسل النباتات في ماء مقطر قبل زراعتها في الاصص البلاستيكية.

٧. إجراءات امنية لسلامة العاملين Safety precaution

- لابد أن يراعي الحرص الكامل عند تناول محاليل الهيبوكلوريت حيث ان استنشاق الغاز المتصاعد يسبب بعض الاضطرابات الصدرية .. كما أن الملامسة المباشرة للجلد قد تسبب التهابات موضعية، ولا يجب بأى حال من الاحوال استخدام محلول الهيبوكلوريت في وجود الاشعة فوق البنفسجية، حيث أن هذا يسبب انطلاق غاز الكلورين الذى له أضرارخطيرة علي الصحة العامة .. كما أنه من البديهي مراعاة عدم استخدام الفم في استعمال الماصة في محلول هيبوكلوريت.
- من مصادر الخطر الشديد التي يجب التنبه لها أثناء مراحل زراعة الانسجة وضع الادوات المستعملة في اللهب ثم وضعها مباشرة في الكحول حيث أن الكحول قابل للأشتعال وقد يسبب أضرار بالغة في معمل زراعة الانسجة.
- الاشعة فوق البنفسجية لها أيضا أضرار بالغة، ويجب عدم النظر أو التعريض لها حيث أنها تؤثر علي شبكية العين وقد تسبب بعض الحروق .. يجري استخدام النظارات الواقية عند الحاجة لتلافي اضرار التعرض للأشعة، ومن التأثيرات الضارة للأشعة فوق البنفسجية أنها تسبب تواجد طبقة من غاز ٣١ وهي ناتجة من

جامعة ... مكتبة ...

التفاعل بين الاشعة والاكسجين الجوى .. تراكم هذا الغاز في المعمل بكمية كبيرة له خطورة عالية حيث أنه غاز قابل لاحداث انفجار، كما أنه يؤثر علي التنفس، وعلي العين .. وبناءا علي هذا فانه يجب عدم ترك مصباح الاشعة فوق البنفسجية مضاءة لمدة طويلة في جهاز الزراعة " كابينة التعقيم " المحكمة الغلق.

يستخدم بعض الباحثين مادة كلوريد الزئبق في اجراء عمليات التطهير والتعقيم هذا بالرغم من خطورة هذه المادة حيث أنها تصنف تحت المواد السامة، كما أن محلول كلوريد الزئبق هو محلول قابل للتطاير علي درجة حرارة الغرفة، وهذا يسبب أضرار بالغة عند استنشاقة خاصة اذا كانت الغرفة محكمة الغلق.

- قد يجري تعقيم بعض الادوات البلاستيكية بواسطة الغاز، في هذه الطريقة تعرض الادوات المراد تعقيمها الي جو مشبع بغاز كلوريد الاثيلين لعدة ساعات علي درجة حرارة الغرفة ويتم هذا في اناء محكم الغلق .. نظراً لان غاز كلوريد الاثيلين قابل للاشتعال فان تسربة من الاناء قد يسبب خطورة عالية، كما أنه يسبب أضرار بالعين والاغشية المخاطية.

- ازالة والتخلص من كل الكائنات الحية الدقيقة من المكان الذى يجري فيه زراعة الانسجة هو من أهم العوامل التي تؤثر بشكل فعال في نجاح عملية زراعة الانسجة، لهذا يراعي أن تغلق الابواب والشبابيك لتفادى حدوث تيارات هوائية قد تسبب ارتفاع نسبة التلوث .. كما يجب أن يمنع دخول الافراد الي حجرة زراعة الانسجة أثناء اجراء الزراعة. ولايخفي أن استعمال القناع حول الانف والفم يقلل من التنفس المباشر الي المنطقة التي يجري فيها العمل خاصة أثناء زراعة الانسجة وهذا بالتالي يقلل من نسبة التلوث.

من الامور الهامة جداً والتي لم أجد كثيرا من الباحثين يحرصون عليها مراعاة عدم

امرار الأيدى فوق المنطقه التي يجري فيها الزراعة خاصة اذا كان هناك نسيج نباتي تحت العاملة أو أطباق أو أنابيب تحتوى بيئة مغذية غير مغطاه أو محاليل معقمة أو أدوات معقمة .. ويراعى هذا بشكل خاص عند صب البيئة المغذية المعقمة في أواني الزراعة أو أطباق الزراعة حيث أن امرار الايدى فوقها قد يسبب تساقط كائنات حية دقيقة علي البيئة المغذية وهي تسبب تلوث كامل لكل العمليات التي تجرى، ويراعي أن تكون المنطقة التى يجري فيها معاملة النسيج النباتي بعيده عن الحافة الخارجية لجهاز زراعة الانسجة بل يفضل أن يكون في منطقة داخلية من الجهاز .. ويجب أن يزال كل الادوات التي تم استعمالها من جهاز زراعة الانسجة، كما يجب التخلص من أغلفة الالومونيوم، الزجاجيات الفارغة، الفلاتر التي تم استعمالها .. وبشكل عام يجب دائماً مراعاة المحافظة علي الجو المعقم أثناء اجراء عملية الزراعة.

- توضع البيئة المغذية أو الماء المقطر المراد تعقيمة فى دوارق زجاجية ويجري تغليف قمة الدورق بورق الالومونيوم علي أن تكون محكمة علي الفوهة وممتدة لمسافة ٢-٥ر٢سم أسفل الفوهة .. ومن الجدير بالذكر أنه لتعقيم السوائل بالبخار فانه يجب احكام غلق الاناء المستعمل بواسطة طبقة أو طبقتين من البارافيلم، هذه الطبقة مصنوعة من المطاط، الشمع، وبعض المركبات الاخري .. وهي ذات سمك يصل الي ١٢٠ ميكرون .. هذه المادة تعمل كفلتر أثناء التبادل الغازى بين الجو الخارجي والداخلي. ويجب أن يراعى عدم تراكم غاز الاثيلين بداخل اناء الزراعة حيث أنه قد يسبب أضرار بالغة للنسيج المنزرع، كما أن استخدام لهب الميثانول قد يسبب انتاج غاز الاثيلين الذى يؤثر بدوره في النمو.

٣

مكونات وتحضير البيئة المغذية
Composition and preparation of nutritive media

١ مكونات البيئة المغذية Constituent of the nutrient media

تعتبر مكونات البيئة المغذية من أهم العوامل التي تتحكم في نمو النسيج النباتي المنزرع .. وتعتبر المتطلبات الأساسية من العناصر المغذية اللازمة لنمو النسيج النباتي المنزرع متشابهة لاحتياجات النبات بالكامل. بالرغم من استخدام بيئات متعددة لنمو الانسجة النباتية في المراحل الأولية لنشأة هذا العلم، غير أنه حدث تطور كبير في تفهم احتياجات الانسجة المنزرعة في العشرين سنة الماضية .. فمن الجدير الاشاره الي أن من الصعوبة اختيار بيئة مغذية مناسبة لنمو نسيج نباتي ما اذا لم تتوافر هذه البيئة من خلال أبحاث سابقة. وهذا يرجع لأن الانواع النباتية تختلف في احتياجاتها من العناصر المغذية، بل أن هذه الصعوبة تزداد عندما نعلم أن تركيزات هذه العناصر تختلف بداخل النوع النباتي الواحد وحسب الجزء المراد زراعتة، ومثال هذا فان زراعة متك بعض الانواع النباتية تحتاج الي بيئة مغذية وهذه تختلف عند اجراء زراعة نسيج نباتي أو عضو نباتي من نفس النوع. وبناء علي هذا فلقد ظهرت العديد من البيئات المغذية التي تلائم نمو أنسجة مختلفة، فهناك بيئات لزراعة المتك، الأجنة، المبيض، القمم النامية، أجزاء من الاوراق والسوق، الخلايا المنفصلة .. كما ظهرت البيئات الصلبة، الشبة صلبة والسائلة.

ماجد زكي

عموماً فان جميع هذه البيئات تتكون من عناصر كبرى، عناصر صغرى، فيتامينات، أحماض أمينية، سكر، منظمات النمو ، وقد تضاف أيضا في البيئة المغذية بعض المستخلصات العضوية .. وهذه الاخيرة وان كان لها تأثير ملحوظ في نجاح زراعة الانسجة النباتية، غير أن دورها في تنشيط النمو غير معروف للآن وهي تحتاج للمزيد من البحث. سوف نتناول في هذا الفصل من الكتاب العناصر الاساسية التي تدخل في تركيب البيئات المغذية، ولايخفى علي القارىء أن نجاح زراعة النسيج المنفصل لايعتمد فقط علي وجود عنصر مغذى ما بل يعتمد أيضا علي تركيزه الفعلي والنسبي لباقي العناصر الاخرى في البيئة المغذية.

١. ١ العناصر المغذية الكبرى Macro-nutrients

الأنسجة النباتية تحتاج الي مصدر مستمر من المواد الغير عضوية، بخلاف الكربون، الهيدروجين، الاكسجين .. العناصر التي يحتاجها النبات بكميات كبيرة يطلق عليها مجموعة العناصر المغذية الكبرى، تحتوى هذه المجموعة علي حوالي ٦ عناصر مغذية قد يحتاج الي اضافتها جميعها أو بعضا منها الي البيئة المغذية وذلك لامداد النسيج المنزرع بما يحتاجه حسب النوع النباتي وهذه العناصر هي النيتروجين (ن)، الفوسفات (فو)، البوتاسيوم (بو)، الكالسيوم (كا)، الماغنسيوم (مغ)، الكبريت (كب) .. وكما أشرنا سابقا فان تركيز كل عنصر من هذه العناصر في البيئة المغذية يختلف تبعاً لاختلاف النوع النباتي وتبعاً لاختلاف الجزء النباتي المنزرع.

عموماً فان البيئة المغذية يجب أن تحتوى نيتروجين غير عضوى بتركيز يتراوح بين ٢٥-٦٠ مللي مولر. من المعروف أن الخلايا النباتية تقوم باستخدام النيتروجين في

صورة نترات، غير أنه وجد أن وجود كلا من النترات والامونيوم في البيئة المغذية يزيد من معدل نمو النسيج المنزرع، وفي هذه الحالة فان التركيز الامثل للنترات في البيئة المغذية يتراوح مابين ٢٥-٤٠. مللي مولر، أما تركيز الامونيوم يتراوح بين ٢-٢. مللي مولر. عادة يقوم النبات بتفضيل واستخدام أيونات الامونيوم بسرعة أكبر من استخدام النترات ولهذا فان هذا التوازن بين ايونات الامونيوم والنترات في البيئة المغذية يعتبر من العوامل المؤثرة في نجاح زراعة النسيج النباتي. تعتبر سلفات الماغنسيوم كافية لامداد النسيج المنزرع بما يحتاجه من السلفات وكذلك الماغنسيوم ويستخدم بتركيز يتراوح بين ١-٣ مللي مولر. أما الفوسفور فهو غالباً يضاف في احدي الصورتين أما فوسفات صوديوم أو فوسفات بوتاسيوم ويستخدم بتركيز ١-٣ مللي مولر. البوتاسيوم من العناصر الهامه الرئيسية اللازمه لنمو النسيج المنزرع في العديد من الأنواع النباتية وهو يضاف في صورة نترات أو كلوريد إما كلوريد البوتاسيوم أو نترات البوتاسيوم بتركيز مابين ٢٠-٣٠. مللي مولر. اضافة كلوريد الكالسيوم أو نترات الكالسيوم هو مصدر مناسب لامداد البيئة المغذية والنسيج المنزرع عليها بما يحتاجة من كالسيوم وهي تستخدم بتركيز ١-٣ مللي مولر. عموماً فان ايون الكلوريد غالباً مايتحصل عليه من كلوريد البوتاسيوم أو كلوريد الكالسيوم.

١. ٢ العناصر المغذية الصغرى Micro-nutrients

بالاضافة الي العناصر المغذية الكبري التي سبق شرحها، فان نمو النسيج النباتي المنزرع يتطلب الامداد ببعض العناصر المغذية الصغري .. وتحتوي هذه المجموعة علي النحاس (نح)، الزنك (ز)، منجنيز (من)، حديد (ح)، بورون(بر)،

موليبدنيوم (مو). نظراً لان النسيج النباتي المنزرع يحتاج الي كميات ضئيلة جداً من هذه العناصر الصغري فانه يجري تحضير محلول مركز من هذه العناصر الصغري وتستخدم لتعطي التركيز النهائي المطلوب في البيئة المغذية .. في بعض الحالات الخاصة يضاف الي البيئة المغذية كل من الكوبالت والأيودين، كما أنه قد يضاف النيكل، الالومونيوم، التيتنوم .. وللأسف فان أهمية هذه العناصر لنمو النسيج النباتي مايزال غامضاً، كما أن احتياجات النسيج من هذه العناصر مايزال غير معلوم. وغالباً ما يستعمل النحاس والكوبالت بتركيز ١ر ميكرومولر، الحديد والموليبدينوم بتركيز ١ ميكرومولر، ايودين بتركيز ٥ ميكرومولر، زنك بتركيز ٥-٣.٠ ميكرومولر، منجنيز بتركيز ٢.٠-٩.٠ ميكرومولر، بورن بتركيز ٢٥-١٠٠ ميكرومولر.

الحديد من العناصر التي يجب مراعاة الدقة عند تحضيرها حيث أن كل من سترات الحديد، طرطرات الحديد من الصعب اذابتها في المحلول المغذى كما أن هذه المواد قابلة للترسيب في المحلول المغذى بعد تحضيرها. بناءاً علي هذا فانه يفضل استخدام الصورة المخلبية للحديد أثناء تحضير البيئة المغذية. ولقد استخدم العالم Murashige & Skoog (1963) اثيلين داى امين تترا ستيك آسيد(EDTA) المرتبط به حديد في البيئة المغذية، وذلك للتغلب علي مشكلة قابلية الحديد للترسيب في البيئة المغذية بعد اعدادها كما أكد Nitsch (1969) أن هذه الصورة المخلبية للحديد هي أفضل من استخدام الحديد في صورة سترات الحديد وذلك لتنشيط وحث الخلايا علي التطور الجنيني .

من الهام الذكر أن الحديد في صورة (EDTA) لا يعتبر ثابت كلياً بل أنه قد يترسب في البيئة المغذية بعد فترة زمنية وخاصة في البيئات المغذية السائلة.

من المشاكل التي يصعب مواجهتها أثناء اعداد البيئات المغذية أنه حتي مع استعمال مواد كيماوية ذات نسبة نقاوه مرتفعة غير أنه لاتزال تحتوى علي آثار من العناصر الغير معروفة، وهذه تعتبر مصدر خفي لامداد البيئة المغذية ببعض العناصر الغير معلومة وبالتالي قد تؤثر علي النمو، كما أن الآجار يعتبر مصدراً للعديد من العناصر المغذية.

١. ٣ منظمات النمو Growth regulators

عموماً فإن معظم زراعات الانسجة يجري إمدادها بمنظمات النمو وهذه تشتمل علي أربعة مجاميع شائعة الاستعمال في هذا المجال وهي الأكسين، السيتوكينين، الجبرالين، حمض الأبسيسك .. ومن التأثير المعروف للأكسين أنه ينشط استطالة الخلايا ومن أهم الاكسينات الشائعة الاستعمال في زراعة الانسجة النباتية أندول أستيك آسيد (IAA)، أندول بيوتريك آسيد (IBA)، داي كلوروفينوكس آستيك آسيد (2,4-D) نفثالين أستيك أسيد (NAA). يعتبر اندول آستيك أسيد هو منظم النمو الذى ينتج طبيعياً بواسطة النبات، أما باقي الاكسينات الاخري فهي غير منتجة طبيعياً، ولهذا فهي تختلف في درجة نشاطها وفاعليتها. فمثلاً داي كلورو فينوكسي آستيك آسيد له فاعلية حوالي ١٠ أضعاف أندول آستيك آسيد، كما أن تأثير نفثالين آستيك آسيد يضاعف تأثير أندول آستيك آسيد. بالرغم من أن أكسين أندول آسيتك آسيد يتكون طبيعياً غير أنه ينحل بواسطة الضوء ويتأكسد بالانزيمات، نظراً لأحتمال إنحلال هذه المادة في النسيج المنزرع فإنه يجب إمدادة للنسيج النباتي بنسبة عالية في البيئة المغذية تتراوح بين ١-٣٠ ملليجرام/ لتر .. وحيث أن مركب نفثالين آستيك آسيد مركب لا يتأثر بالاكسدة بالانزيمات

فإنه يضاف الي البيئة المغذية بتركيز منخفض يتراوح بين ١ر٠-٢ مليجرام/لتر. أما مبيد الحشائش داي كلورو فينوكسي استيك آسيد فهو مركب أكثر ثباتاً ولهذا يستخدم بتركيز ضئيل في البيئة المغذية.

من أهم تأثيرات الاكسين علي النسيج المنزرع هو تنشيط تكون الكالس ونمو الخلايا وحث تكوين الجذور وكذا تحول الخلية الي التطور الجنينى .. كما ان السيتوكينين ينشط انقسام الخلايا النباتية، ومن أهم السيتوكينينات المستخدمة في زراعة الأنسجة بنزايل أمينو بيورين، الزياتين، الكينتين .. ويعتبر الزياتين هو صورة السيتوكينين التي تنتج طبيعيا بواسطة النبات، أما الصور الاخرى من السيتوكينين فهي مخلقة صناعياً. ومن أهم تأثيرات السيتوكينين أنه ينشط انقسام الخلايا، تكون النموات الخضرية وتثبيط تكون الجذور، كما أن السيتوكينين ينشط تمثيل الريبوزومات والبروتينات والانزيمات، كما أنه وجد مرتبطاً بالريبوزومات الناقلة في الخلية (t-RNA).

فى مزارع الأنسجة النباتية فان كل أنواع التشكل المورفولوجي تعتمد علي نسبة الاكسين الي السيتوكينين في البيئة المغذية وكذلك علي تركيز كل منهما .. فمثلاً عندما تزداد نسبة الاكسين الي السيتوكينين فان هذا يؤدي الي تنشيط تكون الأجنة، تكون الجذور، تكون الكالس .. علي العكس من هذا عندما تقل نسبة الأكسين الي السيتوكينين فان هذا ينشط تكون النموات الخضرية والأفرع. ولقد أوضح العالم Street (1966) أن هناك بعض الأنسجة النباتية التي لاتتطلب اضافة اكسين الي البيئة المغذية حيث أن هذه الأنسجة تحتوي علي نسبة مرتفعة من الاكسين كما أنه قد يكون لها المقدرة علي تمثيل وتكوين الاكسين طبيعياً في مرحلة مبكرة من الزراعة علي البيئة المغذية الخالية من الأكسين. ولقد أطلق لفظ

التعود أو الاعتياد (Habituation) علي الأنسجة النباتية التي لها المقدرة علي تعديل التمثيل الحيوي أثناء الزراعة علي بيئات مغذية. هناك بعض الأنسجة النباتية تتطلب اضافة اكسين ولا تحتاج سيتوكينين، مثال هذا جذور نبات الجزر المنزرعة علي بيئة مغذية والتي لها القدرة علي تكوين الزياتين في حالة وجود الضوء Mizuno & Komanine (1978). يعتبر الجبرالينات (GA3) وحامض الأبسيسيك (ABA) من منظمات النمو التي قد تستخدم أحياناً في تحضير البيئة المغذية .. عموماً فان الأنسجة النباتية المنزرعة تنمو علي بيئة خالية من هذين المركبين، غير أن اضافتهما الي البيئة المغذية تؤدي الي تنشيط النمو، ومن أهم تأثيرات الجبرالينات أنها تشجع نمو الكالس وتزيد استطالة النباتات المتقزمة .. أما تأثير حمض الابسيسيك فهو زيادة من تكون الأفرع وتشكل البراعم.

١. ٤ الفيتامينات Vitamins

تقوم النباتات بتمثيل الفيتامينات اللازمة لنموها وتطورها خلال مراحل عمرها المختلفة .. هذا الفيتامينات لها وظيفة مساعدة في عمل الأنزيمات المختلفة خلال عمليات التمثيل الحيوي. يعتبر اضافة فيتامينات الي البيئة المغذية من العوامل الهامة التي تؤثر علي نمو النسيج النباتي، وبذلك يتوقف نجاح زراعة الأنسجة النباتية علي مدي استيعاب أهمية الفيتامينات للنسيج المنزرع .. من الفيتامينات الشائعة الأستعمال في هذا المجال الثيامين (B1)، حمض النيكوتين، البيرودكسين (B6)، ميو أينو سيتول. لقد أشار White (1937) أن جميع الأنسجة النباتية المنزرعة علي بيئة مغذية تتطلب اضافة الثيامين، وهذا يستخدم بتركيز يتراوح بين ١ر.-.١ ملليجرام/لتر، كما يضاف حمض النيكوتين والبيرودكسين الي البيئة

المغذية، غير أن بعض الأنواع النباتية لا تتطلب اضافة هذه الفيتامينات .. ويستخدم حمض النيكوتين بتركيز يتراوح بين ١ر.-٥ ملليجرام/لتر أما البيرودكسين فان تركيزه يتراوح بين ١ر.-١. مليجرام/لتر وهما يعتبران منشطين لنمو النسيج النباتي.

بالرغم من أن ميو اينو سيتول يعتبر من الكربوهيدرات، فلقد وجد أن له تأثير منشط لبعض الأنسجة والخلايا المنزرعة علي بيئة مغذية .. يعتقد أن هذا المركب ينحل في البيئة المغذية ليعطي حمض الاسكوربيك والبكتين وهذان يدخلان في بعض عمليات التمثيل الحيوي التي تؤدي الي تنشيط انقسام الخلية .. يستخدم ميو اينو سيتول في البيئة المغذية بتركيز يتراوح بين ٥٠.-٥٠٠٠. مليجرام/لتر.

هناك بعض الفيتامينات الأخري التي قد تستعمل في زراعة الأنسجة النباتية مثل حمض الفوليك، حمض الأسكوربيك، ريبوفلافين، فيتامين (E)، وهذه تستخدم بتركيزات ضئيلة ولا تعتبر من العوامل المحددة لنجاح زراعة الأنسجة بل أنها قد تنشط نمو النسيج المنزرع.

١. ٥ الكربون ومصدر الطاقة
Carbon and energy source

بخلاف النباتات القائمة والتي لها المقدرة علي التمثيل الضوني وتوفير الكربوهيدرات اللازمة للنمو، فان الأنسجة النباتية المنفصلة ليس لها هذه القدرة. لهذا فان اضافة مصدر للكربوهيدرات في البيئة المغذية هو أمر هام وضروري لنجاح زراعة الأنسجة النباتية.

بدون استثناء فان كل الأنسجة المنزرعة تحتاج الي مصدر للكربون والطاقة .. السكروز هو صورة الكربوهيدرات التي يفضل استعمالها فى البيئة المغذية. تعتبر

كفاءة استخدام السكروز والجلوكوز بواسطة النسيج المنزرع أعلي من كفاءة استخدام الفركتوز .. عند اضافة السكروز في البيئة المغذية فانه سريعاً يتحول الي جلوكوز وفركتوز، ويفضل النسيج النباتي استخدام الجلوكوز أولاً ويتلوا هذا استخدام الفركتوز. هناك أنواع عديدة للكربوهيدرات مثل اللاكتوز، جلاكتوز، رافينوز، مالتوز، نشا .. غير أن هذه الكربوهيدرات في البيئة المغذية لا تؤدي الي نتائج مثلي للنمو مقارنة باستخدام السكروز أو الجلوكوز. لا تقتصر وظيفة السكروز علي أنه مصدر للكربوهيدرات بل أنه أيضاً له وظيفة اسموزية، ولقد اجريت تجربة بواسطة Thorpe (1978) قام فيها بتقليل تركيز السكروز في البيئة المغذية واستبداله بالمانيتول وذلك لضبط اسموزية البيئة المغذية، ووجد أن هذا لايؤثر علي النمو وتكوين الأفرع .. ويعتبر هذا دليلاً قاطعاً علي أن السكروز له وظيفة ثنائية كمصدر للكربون وتوفير الاسموزية المناسبة لنمو النسيج النباتي. التركيز الشائع الاستعمال من السكروز في البيئة المغذية يتراوح بين ٢-٣٪، غير أن هناك بعض الأنواع والأجزاء النباتية التي تتطلب تركيز مرتفع من السكروز في البيئة المغذية.

عادة ما يجري تعقيم البيئة المغذية بعد اضافة السكروز اليها، وهذا يؤدي الي الأنحلال الجزئي للسكروز، خاصة اذا احتوت البيئة المغذية علي عناصر اخري.

وبناء علي هذا فان البيئة المغذية المعقمة تحتوي علي سكروز، جلوكوز، فركتوز وهذان الأخيران ينتجان من انحلال بعض السكروز. ولقد أشار Ball (1953) أن استخدام بيئة تحتوي علي سكروز معقم بالحرارة المرتفعة بواسطة الاوتوكلاف تعطي نتائج غير متجانسة لمثيلاتها عند استخدام بيئة تحتوي سكروز معقم بالفلتر .. في حقيقة الأمر فان اختيار نوع السكر وكذا التركيز المناسب يعتمد علي المحاولة والتجريب وكذا علي الغرض من التجربة العملية.

١. ٦ الأحماض الأمينية

Amino acids

بالرغم من أن النسيج المنزرع له القدرة على تمثيل الأحماض الأمينية اللازمة للنمو، غير أن استخدام حمض أميني معين أو مجموعة من الأحماض الأمينية في البيئة المغذية يؤدي الي تنشيط النمو .. وترجع أهمية الأحماض الأمينية الي أنها تعتبر مصدر سريع للنيتروجين حيث يسهل علي النسيج النباتي استخدامه مباشرة بسهولة ويسر مقارنة بالنيتروجين الموجود بالمركبات النيتروجنية الغير عضوية (1981) Thom et al. وبهذا فان الأحماض الأمينية لها دور فعال ورئيسي خاصة في زراعة البروتوبلاست، معلقات الخلايا، حبوب اللقاح. ومن أهم الأحماض الأمينية الشائعة الأستخدام في زراعة الأنسجة النباتية هي جليسين، جلوتامين، اسباراجين، ارجنين، سيستين، تيروسين، ادنين، مثيونين. أشار (1969) Street الا أن اضافة مجموعة من الأحماض الأمينية الي البيئة المغذية قد تسبب تثبيط لنمو النسيج المنزرع ويعزي هذا الي التفاعل بين الأحماض الأمينية وبعضها مع البعض.

١. ٧ المستخلصات العضوية

Organic extracts

علمياً فانه عند تحضير بيئة مغذية يجب استخدام مركبات معروفة، ويراعي عدم استخدام أي مستخلصات طبيعية غير معروفة التركيب. غير أنه في حالات عدم إستجابة النسيج المنزرع فانه قد تضاف هذه المستخلصات لتنشيط النمو .. من أمثلة المستخلصات العضوية التي قد تضاف الي البيئة المغذية لبن جوز الهند، مستخلص الخميره، مستخلص المولت، الموز المطحون، عصير الطماطم، عصير البرتقال، ويعتبر لبن جوز الهند من المستخلصات الطبيعية الشائعة الأستعمال في

تحضير البيئات المغذية. أشار Einset (1978) أن اضافة عصير البرتقال الي البيئة المغذية ينشط نمو الأنسجة النباتية في الموالح. يجب هنا أن يذكر أن اضافة الفحم النباتي النشط الي البيئة المغذية قد يكون له تأثير منشط أو مثبط علي نمو النسيج المنزرع ويعزي تأثير الفحم النشط علي النمو الي أحد الأسباب التالية

- امتصاص المواد المثبطة التي تنتج بواسطة النسيج المنزرع من البيئة المغذية.
- امتصاص منظمات النمو من البيئة المغذية.
- تحول البيئة المغذية من اللون الشفاف الي اللون الأسود.

ولقد وجد أن التأثير المثبط للفحم النشط علي نمو النسيج المنزرع يرجع في المقام الأول الي امتصاص منظمات النمو مثل نفثالين آستيك آسيد، كينتين، بنزيل أمينوبيورين، أندول آستيك آسيد .. هذه المواد لها قابلية عالية في الأرتباط بالفحم النشط (1977) .Constantin et al. كما يعزي التأثير المنشط للفحم النشط علي نمو النسيج المنزرع الي مقدرتة علي الأرتباط القوي بالمواد الفينولية التي تنتج من الأنسجة المنزرعة. غالبا ما يضاف الفحم النباتي النشط الي البيئة المغذية بتركيز يتراوح بين ٥ر.-٣٪.

١. ٨ قوام البيئة Medium matrix

تقسم البيئات المغذية تبعاً لقوامها الي ثلاث أنواع بيئة مغذية صلبة، بيئة شبه صلبة، بيئة سائلة. يعتبر الآجار المادة الشائعة الأستعمال في معامل زراعة الأنسجة لأعداد البيئة الصلبة أو شبه الصلبة .. بالرغم من أن هناك بعض المواد الأخري التي تستعمل في مثل هذا الغرض غير أن الآجار يتميز بأنه عند وضعه في الماء فانه يكون معلق ويسهل اذابة مادة الآجار في حرارة تتراوح بين ٦٠-١٠٠

درجة مئوية. كما أنه يتحول الي صورة الصلبة علي حرارة حوالي ٤٠ درجة مئوية .. وبهذا فهو يعتبر مادة مناسبة للأستخدام في مدي الحرارة التي يجري عليها تحضين النسيج المنزرع، كما أن الآجار لايتفاعل مع مركبات البيئة المغذية ولايتم تحلله بواسطة الأنزيمات النباتية. يتوقف مدي صلابة البيئة المغذية علي تركيز الآجار المستخدم، تركيز أيون الهيدروجين في البيئة المغذية .. يستخدم الآجار بتركيز ٥ر٠-١٪ ويجب التأكد من نقاوة الآجار المستخدم حيث أنه وجد أن الآجار قد يحتوي كاتيونات الكالسيوم، ماغنسيوم، بوتاسيوم، صوديوم، كربوهيدرات، فيتامينات، أحماض أمينية. هناك بعض المواد التي تؤدي وظيفة الآجار، فمثلاً قد يستخدم الجلاتين بتركيز ١٠٪، غير أن من أهم عيوبه أنه قابل للذوبان علي حرارة ٢٥ درجة مئوية .. أما الأجاروز (sea plaque) فهو يستخدم بتركيز ٣٥ر٠-٧٪ في البيئة المغذية، ومن المواد الأخري التي تستخدم في تحضير البيئة الصلبة (Gelrite, phytagel). من البديهي أنه لايستعمل أى من المواد السابقة عند تجهيز البيئة المغذية السائلة وقد يستخدم بعض أوراق الترشيح أو ورق السيلوفان كدعامة لوضع النسيج النباتي عليها.

١. ٩ الماء Water

يراعي استخدام ماء مقطر مرتين أو مقطر وخالي من الكاتيونات والأيونات عند تحضير البيئة المغذية، يفضل أن يجري تقطير الماء في جهاز تقطير زجاجي، كما يراعي عدم الأحتفاظ بالماء فى أواني من البولي اثيلين لان هذا قد يسبب انطلاق بعض العناصر التي قد تكون ضارة لنمو الأنسجة النباتية المنزرعة علي بيئة مغذية Robbins & Hervey (1974). كما وجد أنه من غير المرغوب فيه تخزين المياه المقطرة لفترة طويلة حتي فى أواني زجاجية وذلك تفادياً لمشاكل قد تظهر من نمو

البكتريا في ظروف غياب التعقيم.

٢ اعداد البيئة Medium preparation

يعتمد اختيار البيئة المغذية علي النوع النباتي المستخدم، النسيج أو العضو المنزرع وكذا الغرض من الزراعة .. هناك بعض الحالات والتجارب التي نجح فيها أستخدام بعض البيئات المغذية الشائعة الأستعمال .. غير أنه يفضل دائماً الاستعانة بالابحاث المنشورة للحصول علي مكونات البيئة المغذية. نظراً لتعدد إستخدام بعض البيئات المغذية في العديد من معامل زراعة الانسجة النباتية، فلقد قامت بعض الشركات الكيميائية بتوفير هذه البيئات سابقة التجهيز وهي متوفرة في شكل بودرة بداخل كيس صغير .. هذه البيئات سابقة التجهيز تحتوي العناصر الكبري والصغري فقط، كما أن الغلاف يحتوي علي تعليمات لكيفية إعداد هذه البيئة. ليس هناك شك أن أستخدام هذه البيئات سابقة التجهيز هي أفضل من تجهيز البيئة في المعمل من أملاحها المختلفة، هذا لأن البيئة السابقة التجهيز تكون أدق في تحضيرها حيث أن الشركات تقوم بتحضير كميات كبيرة منها للانتاج التجاري وبذلك تقل نسبة الخطأ في وزن الأملاح المختلفة. كما أن أستعمال هذه البيئات الجاهزة يوفر كثير من الوقت الذي يستثمر في عمليات أخري أكثر أهمية.

عندما يراد تحضير بيئة مغذية من أملاحها فإنه يجب أولاً تحضير المحاليل المركزه ويلي هذا تحضير البيئة المطلوبة بالتركيزات المختلفة.

٢. ١ المحاليل المركزة Stock solutions

لو نظرنا إلي مكونات بيئة مغذية فإننا نعلم أن هناك بعض العناصر التي يحتاج اليها بكميات ضئيلة وهذه يصعب وزنها بدقة، ولهذا فإنه يفضل تحضير محاليل مركزة لتقليل الخطأ الناتج من صعوبة وزن كمية صغيرة من بعض الاملاح .. كما أن بعض الاملاح تعتبر أكثر ثباتاً عندما تحضر في صورة مركزة عنها في صورة مخففة. لأعداد المحاليل المركزة فإنه يجري وزن الكمية المطلوبة التي توضع في دورق معياري وتذاب هذه الاملاح في ماء، كحول، حمض الايدروكلوريك، هيدروكسيد الصوديوم .. بعد إذابة الملح يجري صب الماء المقطر الي الدورق حتي يصل إلي العلامة المطلوبة .. غالباً ما يحضر المحاليل المركزة حوالي ١٠-١٠٠٠ أضعاف التركيز المراد أستخدامه.

٢. ١. ١ العناصر الكبري Macro-elements

غالباً ما تحضر المحاليل للعناصر الكبري حوالي ١٠ أضعاف المحلول النهائي .. كما يفضل ترشيح المحلول بعد ذوبان الملح وذلك لضمان التخلص من أي شوائب صلبة من المحلول المركز. يمكن الاحتفاظ بالمحلول المركز للعناصر الكبري في الثلاجة علي حرارة ٤ درجة مئوية، كما يراعي أن يحضر أملاح الكالسيوم منفصلة عن باقي الاملاح وذلك لتفادي مشكلة الترسيب.

٢. ١. ٢ العناصر الصغري Micro-elements

غالباً ما تحضر المحاليل المركزة للعناصر الصغري بتركيز ..١ أضعاف المحلول النهائي، ويحفظ المحلول في ثلاجة أو فريزر حتي يحتاج إليه .. وينصح بتحضير

ملح بوتاسيوم الايوديد منفصل عن الاملاح الاخري ويحفظ في زجاجة داكنة لتلافي الانحلال بالضوء.

٢. ١. ٣ الفيتامينات
Vitamins

تحفظ المحاليل المركزة للفيتامينات في الفريزر، وفي حالة عدم وجود فريزر فإنه يجب أن يستخدم محاليل مجهزة حديثاً. البعض يعتقد أن المحلول المركز من الفيتامينات يمكن حفظة في الثلاجة علي حرارة ٤ درجة مئوية لمدة ٣ شهور غير أنه لا ينصح بهذا.

٢. ١. ٤ منظمات النمو
Growth regulators

غالباً ما تحفظ المحاليل المركزة لمنظمات النمو في الفريزر علي حرارة -٢٠ درجة مئوية. من الاحتياطات التي يجب مراعاتها عند تحضير أندول آستيك آسيد أن يحفظ في زجاجة داكنة لتلافي الانحلال الضوئي. يلاحظ أنه من الصعب ذوبان بعض الاكسينات والسيتوكينينات في الماء، لهذا يستخدم بضع قطرات من هيدروكسيد الصوديوم لذوبان الاكسين، عدة قطرات من حمض الايدروكلوريك لذوبان السيتوكينين .. وقد يحتاج إلي التسخين البسيط لتسهيل سرعة الذوبان.
من المعلوم أن أستخدام أحماض أو قلويات اثناء ذوبان الاكسين والسيتوكينين عند أعداد المحلول المركز يؤدي إلي تغيير في درجة تركيز أيون الايدروجين، لهذا يجب إعادة قياس وضبط هذا التركيز في البيئة المغذية التي يجري إعدادها من هذه المحاليل المركزة.

المكتبة

٢ . ٢ تعقيم البيئة Medium sterilization

عموماً يتم تعقيم البيئة المغذية في الاوتوكلاف علي حرارة ١٢١ درجة مئوية وضغط قدره ١٥-.٢ضغط جوي .. يعتمد الزمن اللازم للتعقيم علي حجم البيئة المغذية المراد تعقيمها ويعتبر الزمن اللازم لتعقيم حوالي ١لتر من البيئة .٢دقيقة وتزاد هذه الفترة مع زيادة حجم البيئة .. نظراً لأن إطالة زمن التعقيم قد يسبب إنحلال بعض مكونات البيئة المغذية فإنه يفضل أن توضع البيئة المغذية في دوارق سعة كل منها ..٥-...١مللي. لقد وجد أن تعريض البيئة إلي حرارة مرتفعة جداً تؤدي إلي صعوبة تحول البيئة إلي الحالة الصلبة، هذا بجانب أن معدل النمو للنسيج المنزرع علي مثل هذه البيئة يعتبر ضعيفاً بالمقارنة بالبيئة التي لم تعرض للحرارة المرتفعة والتي لم تعرض للضغط لفترة طويلة. في تجارب معملية أثبت العلماء Lundergan & Wood (1981) أنه يمكن تعقيم البيئة المغذية بواسطة أستخدام الميكروويف وذلك لمدة تتراوح بين ٢-٤ دقائق، كما أشار نفس العلماء الي أن تقليل الفترة الزمنية عن دقيقتين تؤدي إلي حدوث تلوث بالبيئة المغذية. ومن أمثلة المركبات التي يحدث لها إنحلال بواسطة التعقيم بالحراراة المرتفعة السكروز، أندول آستيك آسيد، الجبرالينات، ريبوفلافين، حمض الفوليك، حمض النيكوتين، اليوريا، الجلوتامين، الاسباراجين، الادينين. بناءً علي هذا فإن هذه المركبات يجب أن يجري أستخدام الفلتر عند تعقيمها وتضاف إلي البيئة التي سبق تعقيمها بواسطة الاوتوكلاف Liau & Ball (1970)

٣ ملحقات

٣. ١ تركيب بعض البيئات الشائعة الاستعمال

٣. ٢ كيفية حفظ منظمات النمو، الفيتامينات، الانزيمات

٣. ٣ كيفية تحضير محاليل مخففة من محاليل مركزة

٣. ٤ كيفية تحضير محاليل الباقر

٣. ٥ كيفية تحويل درجات الحرارة من المئوي الى الفهرنهيت

٣. ٦ الوزن الجزيئ ومكونات الاحماض الامينية المختلفة

Appendix 1

Composition of nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	MS	B5	White	Heller
Ammonium nitrate	1650			
Sodium nitrate				600
Potassium nitrate	1900	2500	80	
Calcium nitrate			300	
Calcium chloride	440	900		75
Magnesium sulphate	370	250	750	250
Sodium sulphate			200	
Potassium phosphate	170			125
Sodium phosphate		150	19	
Potassium chloride			65	750
Na EDTA	27.8	27.8	2.5	
Ferrous chloride	37.3	37.3		
Ferrous sulphate				
Manganese sulphate	22.3	10	7	0.1
Zinc sulphate	8.6	2	3	1
Boric acid	6.2	3	1.5	1
Potassium iodid	0.83	0.75	0.75	0.01
Sodium molybdate	0.25	0.25		
Copper sulphate	0.025	0.025		0.03
Cobalt chloride	0.025			
Nickel chloride				0.03
Alomenium chlorate				0.03
Myo inositol	100	100		
Nicotinic acid	0.5	1	0.5	
Pyridoxine	0.5	1	0.1	
Thiaminee	0.1	10	0.1	1
Glycine	1.88		3	
Sucrose	30g	20g	20g	20g
Ph	5.8	5.5	5.5	5.6

Appendix 2

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	litvay et al.	knop	keller et al.
Sodiuom phosphate			150
Ammonium sulphate			134
Ammonium nitrate	1650		
Potassium nitrate	1900	200	2500
Calcium nitrate		1150	
Calcium chloride	22		750
Magnesium sulphate	1850	200	250
Potassium phosphate	340	200	
Ferrous sulphate	28		
Na EDTA	37		40
Mangenese sulphate	28		13.2
Zinc sulphate	43		2
Boric acid	31		3
Potassium iodid	4.1		75
Sodium molybdate	1.25		0.25
Copper sulphate	0.5		0.025
Cobalt chloride	0.13		0.025
Myo inositol	100		
Nicotinic acid	0.5		
Pyridoxin	0.1		
Thiamine	0.1		
Glutamine			800
Sucrose	30g		100g
Ph	5.8		5.8

Appendix 3

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	Skoog &Tsui	Skoog	Sheat et al.
Sodium nitrate			274.8
Calcium chloride			179.9
Magnesium sulphate	71.7	71.7	648
Potassium chloride	65	65	124
Sodium phosphate			19
Sodium sulphate			199.7
Ammonum suphate			213.5
Potassium nitrate	80	80	
Calcium nitrate	144	144	
Potassium phosphate	50	12.5	
Mangenes chloride			6
Zinc sulphate			2.6
Boric acid			1.5
Potassium iodid			0.7
Copper sulphate			0.013
Ferrous chloride			3.25
Na EDTA			5.25
Sodium molybdate			1.88
Myo inositol			100
Nicotinic acid			1
Pyridoxin			0.5
Thiamine			0.5

Appendix 4

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg L).

Constituent	Robbins & Schmidt	Miller	Tulecke
Sodium nitrate			1800
Magnesium sulphate	63	71.7	760
Potassium chloride			900
Sodium phosphate			300
Sodium sulphate			200
Potassium nitrate	63	1000	80
Calcium nitrate	333	500	280
Potassium phosphate	60	300	
Ammonium nitrate		1000	
Potassium chloride	42	65	
Mangenese sulphate	0.081		
Zinc sulphate	0.792		
Boric acid	0.057		
Copper sulphate	0.157		
Sodium molybdate	0.05		
Ferrous sulphate	2.5		
Myo inositol			100
Nicotinic acid			1
Pyridoxin	5		0.5
Thiamine	5		0.5

Appendix 5

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	Robbins	Nobcourt	Nitsch	Nitsch&Nitsch
Potassium nitrate	83.3	125	411	2000
Calcium nitrate	333.3	500	959	
Magnesium sulphate	83.3	125	548	250
Potassium chloride	41.7		2.7	1500
Potassium phosphate	83.3		137	
Calcium chloride				33
Sodium phosphate		125		250
Ammonium sulphate			137	
Mangenese sulphate			2.24	25
Zinc sulphate			0.481	10
Boric acid			3	10
Copper sulphate			0.13	0.025
Sodium molybdate				0.25
Cobalt chloride				0.025
Ferrous sulphate				27.85
Ferrous chloride	0.833			
Na EDTA			40	37.2
Yeast	400			
Myo inositol				100
Nicotinic acid				5
Pyridoxin				0.5
Thiamine				0.5
Folic acid				15
Biotin				0.05

Appendix 6

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L)

Constituent	Nickell	Nagata&Takebe	Murashige	Miller&Skoog
Potassium nitrate	202	950	80	80
Calcium nitrate	708.5		144	144
Magnesium sulphate	246.5	1233	72	72
Potassium chloride	149		65	65
Potassium phosphate	136	680	38	38
Ammonium nitrate		825	400	
Calcium chloride	441	220		
Magnesium chloride	203			
Glycine			2	
Tyrosine			150	

جدول يبين متطلبات حفظ الاكسينات والفيتامينات والانزيمات

المركب	متطلبات التخزين
الاكسينات	
اندول اسيتك اسيد	مجفف/-٢٠م
نفثالين اسيتك اسيد	٤م
٢ ٤ داي كلوروفينوكسي اسيتك اسيد	٤م
اندول اسيتك اسيد	٤م
السيتوكينينات	
كينتين	مجفف/-٢٠م
بنزايل ادينين	مجفف/-٢٠م
بيورين	مجفف/-٢٠م
زياتين	مجفف/-٢٠م
الفيتامينات	
ثيامين	٤م/ظلام
نيكوتينيك اسيد	٤م/ظلام
فوليك اسيد	٤م/ظلام
بيرودكسين	٤م/ظلام
ميو اينو سيتول	٤م/ظلام
الانزيمات	
سليوليز	مجفف/-٢٠م
سليوليسين	مجفف/-٢٠م
ماكيريز	مجفف/-٢٠م
بكتينيز	٤م/ظلام

[illegible library stamp]

جدول يبين تحضير محاليل مخففه من المحاليل المركزة

تركيز المحلول (ملج./١٠٠م)	الحجم المستخدم (مللي)	تركيز المحلول النهائي (ملليجرام)			
		٢٥٠ مللي	٥٠٠ مللي	١ لتر	٢ لتر
١	٠٫١	٠٫٠٠٠٤	٠٫٠٠٠٢	٠٫٠٠٠١	٠٫٠٠٠٥
	٠٫٥	٠٫٠٠٢	٠٫٠٠١	٠٫٠٠٠٥	٠٫٠٠٠٢٥
	١٫٠	٠٫٠٠٤	٠٫٠٠٢	٠٫٠٠٠١	٠٫٠٠٠٥
	١٠٫٠	٠٫٠٤	٠٫٠٢	٠٫٠١	٠٫٠٠٥
١٠	٠٫١	٠٫٠٤	٠٫٠٢	٠٫٠١	٠٫٠٠٠٥
	٠٫٥	٠٫٢	٠٫١	٠٫٠٥	٠٫٠٢٥
	١٫٠	٠٫٤	٠٫٢	٠٫١	٠٫٠٥
	١٠٫٠	٤٫٠	٢٫٠	١٫٠	٠٫٥
٢٠	٠٫١	٠٫٠٨	٠٫٠٤	٠٫٠٢	٠٫٠١
	٠٫٥	٠٫٠٤	٠٫٠٢	٠٫١	٠٫٠٥
	١٫٠	٠٫٨	٠٫٤	٠٫٢	٠٫١
	١٠٫٠	٨٫٠	٤٫٠	٢٫٠	١٫٠
٢٥	٠٫١	٠٫١	٠٫٠٥	٠٫٠٢٥	٠٫٥
	٠٫٥	٠٫٥	٠٫٢٥	٠٫١٢٥	٠٫٢٥
	١٫٠	١٫٠	٠٫٥	٠٫٢٥	٠٫٥
	١٠٫٠	١٠٫٠	٥٫٠	٢٫٥	١٫٢٥
٥٠	٠٫١	٠٫٢	٠٫١	٠٫٠٥	٠٫٠٢٥
	٠٫٢	٠٫٤	٠٫٢	٠٫١	٠٫٠٥
	٠٫٥	١٫٠	٠٫٥	٠٫٢٥	٠٫١٢٥
	١٫٠	٢٫٠	١٫٠	٠٫٥	٠٫٢٥
	٢٫٠	٤٫٠	٢٫٠	١٫٠	٠٫٥
	٥٫٠	١٠٫٠	٥٫٠	٢٫٥	١٫٢٥
	١٠٫٠	٢٠٫٠	١٠٫٠	٥٫٠	٢٫٥
١٠٠	٠٫١	٠٫٤	٠٫٢	٠٫١	٠٫٠٥
	٠٫٥	٢٫٠	١٫٠	٠٫٥	٠٫٢٥
	١٫٠	٤٫٠	٢٫٠	١٫٠	٠٫٥
	١٠٫٠	٤٫٠	٢٠٫٠	١٠٫٠	٥٫٠

٦٢ ماجد زكي

جدول يبين تحضير محاليل البافر

تركيز آيون الأيدروجين	محلول (سم٣) (أ)	محلول (سم٣) (ب)	تركيز آيون الأيدروجين	محلول (سم٣) (أ)	محلول (سم٣) (ب)
٢,٢	١٩,٦	٠,٤	٥,٢	٩,٢٨	١٠,٧٢
٢,٤	١٨,٧٦	١,٢٤	٥,٤	٨,٨٥	١١,١٥
٢,٦	١٧,٨٢	٢,١٨	٥,٦	٨,٤	١١,٦
٢,٨	١٦,٨٣	٣,١٧	٥,٨	٧,٩١	١٢,٠٩
٣,٠	١٥,٨٩	٤,١١	٦,٠	٧,٣٧	١٢,٦٣
٣,٢	١٥,٠٦	٤,٩٤	٦,٢	٦,٧٨	١٣,٢٢
٣,٤	١٤,٣	٥,٧	٦,٤	٦,١٥	١٣,٨٥
٣,٦	١٣,٥٦	٦,٤٤	٦,٦	٥,٤٥	١٤,٥٥
٣,٨	١٢,٩	٧,١	٦,٨	٤,٥٥	١٥,٤٥
٤,٠	١٢,٢٩	٧,٧١	٧,٠	٣,٥٣	١٦,٤٧
٤,٢	١١,٧٢	٨,٢٨	٧,٢	٢,٦١	١٧,٣٩
٤,٤	١١,١٨	٨,٨٢	٧,٤	١,٨٣	١٨,١٧
٤,٦	١٠,٦٥	٩,٣٥	٧,٦	١,٢٧	١٨,٧٣
٤,٨	١٠,١٤	٩,٨٦	٧,٨	٠,٨٥	١٩,١٥
٥,٠	٩,٧	١٠,٣	٨,٠	٠,٥٥	١٩,٤٥

محلول (أ) يحتوي ١,٠ مولر حمض الستريك

محلول (ب) يحتوي ٢,٠ مولر داي صوديوم فوسفات

جدول يبين تحويل درجات الحرارة من الدرجة المئوية إلي الفهرنهيت

مئوي	فهرنهيت	مئوي	فهرنهيت
-١٨	٠	٢٢	٧٢
-١٠	١٤	٢٣	٧٣
-٥	٢٣	٢٤	٧٥
٠	٣٢	٢٥	٧٧
١	٣٢	٢٦	٧٩
٢	٣٤	٢٧	٨١
٣	٣٧	٢٨	٨٢
٤	٣٩	٢٩	٨٤
٥	٤١	٣٠	٨٦
٦	٤٣	٣١	٨٨
٧	٤٥	٣٢	٩٠
٨	٤٦	٣٣	٩١
٩	٤٨	٣٤	٩٣
١٠	٥٠	٣٥	٩٥
١١	٥٢	٣٦	٩٧
١٢	٥٤	٤٠	١٠٤
١٣	٥٥	٥٠	١٢٢
١٤	٥٧	٦٠	١٤٠
١٥	٥٩	٧٠	١٥٨
١٦	٦١	٨٠	١٧٦
١٧	٦٣	٩٠	١٩٤
١٨	٦٤	١٠٠	٢١٢
١٩	٦٦	١٢١	٢٥٠
٢٠	٦٨	١٦٠	٣٢٠
٢١	٧٠	١٨٠	٣٥٦

الفهرنهيت = ٩/٥ × المئوي + ٣٢

المئـــوي = ٥/٩ (الفهرنهيت - ٣٢)

جدول يبين مكونات الأحماض الأمينية المختلفة

الحمض الأميني	الوزن الجزيئي	نسبة المكونات			
		الكربون	هيدروجين	أوكسجين	نيتروجين
Alanine	٨٩,٠٩٥	٤٠,٤٤	٧,٩٢	٣٥,٩١٧	١٥,٢٧٣
Arginine	١٧٤,٢٠٥	٤١,٣٦٥	٨,١٠٢	١٨,٣٦٩	٣٢,١٦٤
Aspartic acid	١٣٣,١٠٥	٣٦,٠٩٢	٥,٣٠٢	٤٨,٠٨٢	١٠,٥٢٤
Cystine	٢٤٠,٢٩	٢٩,٩٨٩	٥,٠٣٤	٢٦,٦٣٤	١١,٦٥٩
Diiodotyrosine	٤٣٣,٠١	٢٤,٩٦٢	٢,٠٩٥	١١,٠٨٥	٣,٢٣٥
Glutamic acid	١٤٧,١٣١	٤٠,٨١٤	٦,١٦٧	٤٣,٤٩٩	٩,٥٢١
Glycine	٧٥,٠٦٨	٣١,٩٩٨	٦,٧١٥	٤٢,٩٢٨	١٨,٦٦
Histidine	١٥٥,١٥٧	٤٦,٤٣٤	٥,٨٤٨	٢٠,٩٢٤	٢٧,٠٨٥
Hydroxyproline	١٣١,١٣١	٤٥,٧٩٤	٦,٨١٩	٣٦,٦٠٥	١٠,٦٨٤
Isoleucine	١٣١,١٧٣	٥٤,٩٣٥	٩,٩٩١	٢٤,٣٩٥	١٠,٦٧٩
Leucine	١٣١,١٧٣	٥٤,٩٣٥	٩,٩٩١	٢٤,٣٩٥	١٠,٩٧٩
Lysine	١٤٦,١٨٩	٤٩,٢٩٢	٩,٦٥٤	٢١,٨٨٩	١٩,١٦٤
Phenylalanine	١٦٥,١٨٧	٦٥,٤٣٥	٦,٧١٣	١٩,٣٧٢	٨,٤٨
Proline	١١٥,١٣١	٥٢,١٥٨	٧,٨٨١	٢٧,٧٩٤	١٢,١٧٦
Serine	١٠٥,٠٩٥	٣٤,٢٨٣	٦,٧١٥	٤٥,٦٧٣	١٣,٣٢٩
Threonine	١١٩,١٢١	٤٠,٣٢٩	٧,٦١٧	٤٠,٢٩٥	١١,٧٥٩
Tryptophan	٢٠٤,٢٣٢	٦٤,٦٨٩	٥,٩٢٦	١٥,٦٦٩	١٣,٧١٨
Tyrosine	١٨١,١٨٧	٥٩,٦٥٧	٦,١٢٠	٢٦,٤٩٢	٧,٧٣١
Valine	١١٧,١٤٧	٥١,٢٦٠	٩,٤٦٦	٢٧,٣١٦	١١,٩٥٨

٤

تركيب الخلية
Cell structure

من أجل دراسة الخلية ومحتوياتها فإنه يلزم إستخدام قوة تكبير تصل إلي ٢٥٠٠٠٠ مره عن الميكروسكوب الضوئي العادي، ولهذا فقد تم التوسع منذ ١٩٥٠ في استخدام الميكرسكوب الالكتروني Electron microscope فى التعرف علي ودراسة التركيب الدقيق للخلية Ultrastructure .. هذا الميكروسكوب يتميز بقوة تكبير Magnification وكذلك قوة ايضاح عالية Resolving power، التي يمكن تعريفها بإنها القدرة علي أن تري التفاصيل الدقيقة بمعني أن تري أقل مسافة بين نقطتين يمكن تمييزهم عن بعضهم البعض .. كما أن الميكرسكوب الضوئي العادي Light microscope يستخدم الضوء ذات طول الموجه (400-700 nm) فإن الميكروسكوب الالكتروني يستخدم طول موجه (0.7-0.2 nm) وبالتالي فإن قوة الايضاح تصل حوالي عشرة آلاف مره قدر رأي العين وكذلك لا يمكن للعين المجردة ان تتلقي الصورة مباشرة، حيث تتكون الصورة علي شاشات مثل شاشة التليفزيون بشعاع من الالكترونيات حيث يعمل هذا الميكروسكوب بطاقة كهربية عالية جداً للحصول علي شعاع الكترونيات. والميكروسكوب الالكتروني نوعان

- الميكروسكوب الالكتروني النفاذ

Transmission Electron Microscope (T.E.M.)

هذا يلزم عمل قطاع في العينة المراد فحصها.

- الميكروسكوب الالكتروني الماسح

Scanning Electron Microscope (S.E.M.)

حيث يمسح سطوح العينة فقط، وتغطي العينة بفيلم رقيق من الذهب الخالص.. ولهذا فهو مكلف جداً.

ويعتبر الميكرسكوب الالكتروني بنوعية وسيلة فعالة لدراسة الخلية من ناحية التركيب ولكن اذا اردت دراسة وظيفة عضيات الخلية فلابد أن تكون الطرق الكيماوية والطبيعية هي الوسيلة المستخدمة .. ولهذا يلزم تجزئة الخلية للحصول علي عضياتها ومكوناتها كل علي حده Cell fractionation ويستلزم ذلك تكسير النسيج الذي به الخلايا ثم تجزئه الخلية اما باستخدام ضغوط عالية أو بهضم الجدار انزيمياً ثم استخدام اجهزة طرد مركزي لفصل مكونات الخلية وبالاخص أجهزة الطرد المركزي فائقة السرعة وتسمي Ultracentrifuge وهي أجهزة غالية الثمن تصل سرعاتها الي ٢٥٠ر٠٠٠ لفة/دقيقة وتستخدم لفصل عضيات الخلايا المختلفة وكذلك الجزيئات الكبيرة مثل DNA بأنواعه الموجودة داخل الخلايا سواء كانت حقيقية النواه Eukaryotes أو أولية النواه Prokaryotes .

ومن أجل دراسة الخلية لابد من معرفة الفرق بين تركيب الخلية الحيوانية والنباتية والذي يمكن تلخيصه في الآتي

- الخلية النباتية يحيط بها جدار يتكون من السليلوز بحيث يمنع تغير شكل الخلية النباتية أو موقعها بعكس الخلية الحيوانية التي ليس لها جدار Cell wall.
- الخلية النباتية تحتوي البلاستيدات Plastids التي تحتوي علي صبغات الكلوروفيل وبالتالي يعتبر النبات ذاتي التغذية.
- معظم الخلايا النباتية تحتوي علي فجوة كبيرة Vacuole أو عدة فجوات صغيرة تستخدم لنقل وتخزين المواد المغذية والماء وتخزين فضلات عمليات الايض
- لايوجد في الخلية النباتية كل من عضيات السنتريول Centrioles أو الليزوسوم

.Lysosomes

١ مكونات الخلية من العضيات Cell organells

نظرا للاهميــة العظمي لمكونات الخليــة (شكل ٢) فسـوف نتكلم تفصيلياً عن عضيات الخلايا حيث أنها موجودة في السيتوبلازم Cytoplasm وهو مادة غروية حية أما ماهو موجود في النواه يسمي نيوكليوبلازم Nucleoplasm

١ . ١ النواه Nucleus

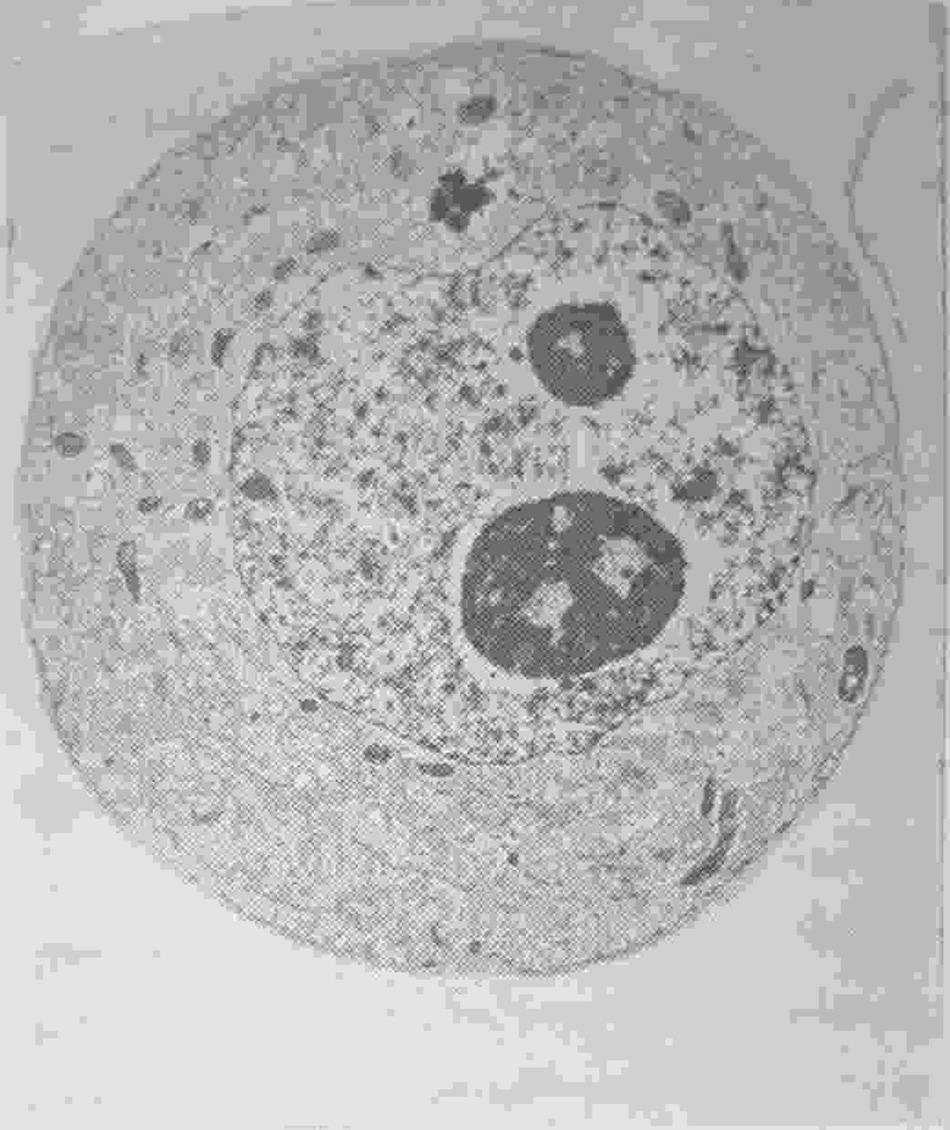
هي العضية الأساسية اللازمة لحيوية الخلية وحياتها .. شكلها كروي أو بيضاوى وقطرها متوسطة ٥ميكرون وتحتل موقع ثابت في الخليـة بالقرب من مركزها. معظم الخلايا الحية تحتوي نواه واحدة ماعدا بعض الخلايا التي تحتوي علي أكثر من نواه، مثل الخلايا المغذية لحبوب اللقاح في المتك وكذلك بعض الخلايا لا توجد بها نواه أثناء تأدية وظيفتها مثل الانابيب الغرباليه .. وتتركب النواه من

١ . ١ . ١ غشاء نووي Nuclear envelope

وهذا يتكون من غشاء مزدوج يفصل النواه ومحتوياتها عن السيتوبلازم، ويتحد الغشـائين مـعـاً في بعض المناطق ليكون ثقـوب Nuclear pores حتي يتصل السيتوبلازم بالنواه مما يسمح بمرور مواد من والي النواه .. والمرور هنا اختيـارى ويرتبط بداخل الغشاء النووى طبقة من بروتين يعمل كأساس في بناء أو هدم النواه أثناء انقسام الخلية.

١ . ١ . ٢ الكروماتين والكروموسوم Chromatin and chromosomes

يوجد بداخل النواه DNA الذى يتكون منه الجينات التي تعطي شفرات لأحماض



شكل (٢) صوره توضح المكونات الداخلية للخلية النباتية. (الصوره اعداد ماجد زكي علي الميكروسكوب الالكتروني).

أمينية يتكون منها البروتين داخل الخلية، ويتم ذلك من خلال (نسخ) DNA الي RNA في النواه ثم يخرج m-RNA من النواه الي الريبوسومات في السيتوبلازم ليقوم بتصنيع سلاسل ببتيدية وهي أساس تكوين جزيء البروتين .. ونجد أنه في الخلايا الغير منقسمة أو التي في طور الراحه يرتبط DNA ببروتين خاص ليكون مايسمى Chromatin الكروماتين .. وهذا الكروماتين يأخذ شكل نهائي أثناء تشكيله في صورة كروموسوم Chromosome يظهر طويلا أثناء دور الراحه وقصير جداً أثناء اطوار الأنقسام الميوزي أو الميتوزي

١. ١. ٣ النويه
Nucleolus

في معظم الخلايا تشاهد النويه داخل النواه حيث تكون مصبوغة بشدة عن بقية مكونات النواه .. ووظيفتها أنها المكان الذي يتم فيه تصنيع الريبوسومات، وهي اجسام تتجمع بدون غشاء داخل النواه.

١. ٢ الأغشية الداخلية
Internal memberane

١. ٢. ١ الشبكة الأندوبلازمية والريبوسومات
Endoplasmic reticulum

هي شبكة تغطي كل سطح الخلية وتصل الي النواه بعض أجزاءها وتكون ما يسمي سسترنيا Cisterna وتحتوي الشبكة علي مجموعة من الأنزيمات سواء بداخلها اي داخل سسترنيا أو علي سطح الشبكة .. وكذلك نجد أن أجزاء من الشبكة يرتبط بها الريبوسومات Ribosomes بينما أجزاء اخري لايرتبط بها الريبوسومات .. وتسمي الأولي شبكة اندوبلازمية ذو سطح خشن Rough ER والثانية ملساء Smooth ER وتوجد الريبوسومات في كل أنواع الخلايا من البكتريا الي خلايا النبات والحيوان. ويتكون الريبوسوم من وحدتين فرعيتين Sub-unit تتكون كيماوياً من r-RNA وبروتين يرتبطان مع بعضهما لتكون وحدة الريبوسوم الذى

سوف يبنى عليهما سلاسل الببتيد الخاص ببناء البروتين. وبالرغم من أن بعض الريبوسومات ممكن أن توجد حره في السيتوبلازم ويبني عليها البروتين، بالتالي فان الشبكة الأندوبلازمية ضرورية في تكوين البروتين وتجميعة وخاصة بناء أنزيمات الهضم .. كما نجد أن الشبكة الأندوبلازمية الملساء يتم علي سطحها عمليات ازالة سمية بعض المركبات الكيماوية السامه مثل المركبات السرطانية وتحولها الي مركبات سهلة الذوبان في الماء بحيث يسهل اخراجها من جسم الكائن الحي. وعلي ذلك بعض أنواع الخلايا مثل خلايا الكبد التي تكون الكولسيترول ومعظم الدهون وتقوم ايضا بعمليات ازالة السمية، تحتوي كمية هائلة من الشبكة الأندوبلازمية الملساء مقارنة ببقية الخلايا في الأعضاء الأخري.

١. ٣ أجسام جولجي Golgi bodies

لقد أكتشفها العالم الايطالي جولجي سنة ١٨٩٨ عند صبغها بصبغة خاصه داخل خلية حيوانية، وهي تتركب في كثير من الخلايا الحيوانية من مجموعة من الاغشية المتوازية تتشكل في كثير من الاحيان علي هيئة حويصلات Sacs أو Vesicels ممتلئة بافرازات الخلية، وفي الخلايا النباتية توجد هذه الاجسام علي هيئة أغشية منتشرة أو مبعثره داخل الخلية، وتتلخص الوظيفة في الاخراج أو الافراز، ولكن لها دورا آخر في تشكيل البروتين وبخاصة البروتينات التركيبية التي تدخل في تركيب الاغشية البلازمية او المكونه للعضيات، حيث ان هذه البروتينات تنتقل من الحويصلات المتكونة من الغشاء البلازمي الي اجسام جولجي القريبة من النواة، بالتالي يتم تكوين مركبات مثل الجليكوبروتين glycoprotein عن طريق اضافة الكربوهيدرات الي البروتين البروتينات المضافة اليها الدهون لتكوين lipoprotein وكثير منها يستخدم في العلميات الحيوية للهدم والبناء الي كثير من عضيات الخلية النباتية خاصة المركبات السكرية معقدة التركيب التي تدخل في تركيب جدار

الخلية من السليلوز واللجنين والسوبرين وغيره.

١ . ٤ الليزوسوم Lysosomes

هي حويصلات صغيرة منتشرة في السيتوبلازم موجودة فقط في الخلايا الحيوانية محتوية علي انزيمات هدم وتحلل كثيراً من المركبات العضوية مثل الدهون، الكربوهيدات، البروتين، والأحماض النوويه وقد تم التعرف علي ٤٠ نوع من هذه الانزيمات معظمها يكون نشط علي تركيز ايون هيدروجين (٥) .. وكلها تنشأ في اجسام جولجي ويتم تخزينها في الليزوسوم .. وقد تستخدم هذه الانزيمات في الهدم لانتاج طاقة أو لتحلل البكتريا التي تهاجم الانسجة الأنسان والحيوان من خلال كرات الدم البيضاء، وكذلك عند موت الخلية تبدأ البكتريا في تكسير وهدم الحامض النووي لمكوناتة الاساسية .. وقد يحدث خلل في وظيفتها فتهاجم الخلايا الداخله في تكوينها ومن مظاهر هذا مرض الروماتويد حيث تهدم خلايا الغضاريف Cartilage cells. عموما هذه الوظيفة غير معروفة في الخلية النباتية حتي الأن.

١ . ٥ الفجوات Vacuoles

تقوم الفجوات في الخلية النباتية وخلايا الفطريات بالوظائف التي يقوم بها الليزوسوم في الخلية الحيوانية، والفجوة عبارة عن حويصلة غشائية تحتل مساحة كبيرة في الخلية النباتية قد تصل الي ٥٠٪ وتخزن داخل الفجوة الفضلات مثل الأحماض الضارة والسامة وكذلك الأملاح مثل كربونات الكالسيوم واكسلات الكالسيوم التي تتجمع في الفجوة علي شكل بلورات ابرية أو علي أي شكل آخر. وتختزن الفجوة بروتين أو دهون "زيوت"، في المحاصيل الزيتية أو محاصيل البقول أو بروتين أو مركبات سامة ليدافع النبات عن نفسه ضد الحشرات.

١. ٦ الأجسام الصغيرة Microbodies

عضيه محاطة بغشاء مفرد تحوي مجموعة من الأنزيمات التي تنشط كثير من عمليات الأيض فمثلاً في تفاعلات هدم الدهون ينتج مركب فوق أكسيد الهيدروجين وهو مركب سام. إلا أن Peroxisomes هي نوع من الأجسام الصغيرة التي تحتوي انزيم الهيدروجين بيرو اكسيداز الذي يحلل H_2O_2 الي H_2O, O_2 وبالتالي يقلل من سمية هذا المركب ويحوله الي مواد نافعة أو تقوم بإزالة سمية وعموما هذه العضيات موجودة بكثرة في الكبد والكلية.

أما الخلية النباتية فيوجد بها نوعان أو طرازان من الأجسام الصغيرة، الطراز الأول الموجود في الأوراق وتلعب دور في عملية التمثيل الضوئي أما الطراز الثاني فيسمي Glyoxysomes وهو موجود في بعض بذور النباتات حيث به أنزيمات تحول الدهون أو الزيوت الي سكريات لتساعد البذور في الأنبات وبالتالي تعتبر الزيوت مصدر للطاقة في هذه النوعية من البذور نتيجة تحولها الي سكريات. وهذه العضيه الأخيرة لاتوجد في الخلية الحيوانية لأنها عضوية التغذية ولايمكنها تحويل الدهون الي سكريات ولهذا فان هذه العضيه موجودة بكثرة في بذور المحاصيل الزيتية.

١. ٧ الميتوكوندريا Mitochondria

توجد في الخلايا حقيقية النواة وتوجد بها أنزيمات السيتوكروم الخاصة بإنتاج الطاقة حيث يتم فيها التفاعلات الكيماوية التي تساعد علي تحول الطاقة الكيماوية المخزنة في المركبات العضوية وتخزنها في مركب طاقة كيماوي آخر هو (ATP) وتستغل هذه الطاقة في عمليات كيماوية اخري من خلال عمليات التنفس وبالتالي فان التنفس يجب أن ينظر له أنه احد مصادر انتاج الطاقة.

وعدد وحدات الميتوكوندريا كثير في كل خلية، وخاصة في اعضاء الجسم النشطة

مثل الكبد فيصل عددها الي ألاف وحدة في الخلية الواحدة، ويصل حجمها ١-٥ ميكرون .. ويمكنها أن تتكاثر حيث يوجد بداخلها DNA يحمل جينات خاصة بوظيفتها وتركيبها ولكن لا يمكنها التكاثر اذا خرجت من الخلية.

أما تركيبها فهي مكونة من غشاء مزدوج خارجي وغشاء داخلي بينهما فراغ، أما الغشاء الداخلي فينثني علي نفسه مرات ومرات مكون مايسمي Cristae.. وتعتبر الميتوكوندريا بيت الطاقة التي يتم فيه حرق السكريات لتنتج في النهاية ٣٨ جزيء منATP وهو حرق هوائي أو تنفس هوائي .. اما التنفس اللاهوائي فيتم بعيدا عنها في سيتوبلازم الخلية.

١. ٨ البلاستيدات Plastids

هي الأماكن التي تتم فيها عمليات التمثيل الضوئي من تفاعل ضوء وتفاعل ظلام أو مايسمي دورة كالفن والبلاستيدات ثلاث أنواع

- بلاستيدات خضراء Chloroplast
- بلاستيدات ملونه Chromoplast
- بلاستيدات عديمة اللون Leucoplast

النوع الأول هو الغالب حيث به صبغة الكلوروفيل بنوعيها ا، ب وهو الذي يلتقط الموجات الضوئية أو الطاقة الضوئية .. أما البلاستيدات الملونه فيوجد بها صبغات اضافية مع الكلوروفيل وهي صبغات الكاروتين Carotenoids مثل الموجودة في جذر الجزر. أما البلاستيدات الغير ملونه فوظيفتها تخزين النشا وغيره. ويختلف عددها طبقا لنوعية الكائن الحي فمثلا الطحالب يوجد بها بلاستيده واحدة أو عديد من البلاستيدات يصل عددها الي مائة مثل الخلية النباتية.

تعتبر البلاستيده ثلاثية الأغشية فلها غشاء خارجي وآخر داخلي .. أما الغشاء الثالث فيسمي Thylakoids وتوجد بداخله صبغة الكلوروفيل والفراغ الداخلي

للبلاستيده يسمي Storma ويحتوي علي انزيمات خاصة بتحويل ثاني اكسيد الكربون والماء الي سكر جلوكوز وذلك عن طريق الطاقة الضوئية التي تم تخزينها من خلال تفاعل ضوئي محتويا علي اثاره الكترونية للكلورفيل سواء في النقل الالكتروني الدائري أو الغير دائري لتخزين هذه الطاقة، ويبني مركب الطاقة التي سوف تخزن فيه هذه الطاقة وهو مركب ATP وبالتالي يستغلها النبات ليلاً أو في تفاعل لايعتمد علي الضوء يسمي تفاعل كالفن أو تفاعل الظلام ليبني به جزيء سكر الجلوكوز.

وتنشأ البلاستيده من بلاستيده بدائية Proplastid يوجد بها DNA عليه جينات خاصه بوظيفة البلاستيده .. ولكنها لا يمكنها التكاثر بمفردها اذا خرجت من الخلية وتتحول البلاستيده البدائية الي بلاستيده كاملة النضج من خلال عمليات نمو خاصه اثناء التعرض للضوء.

١. ٩ الانيبيبات الصغيرة Microtubules

هي انيببه مفرغه قضيبية الشكل وظيفتها تكوين هيكل الخلية Cytoskeleton وكذلك التحكم في حركة الكروموسوم أثناء انقسام الخلية .. وأيضاً تدخل في تركيب أدوات الحركه للخلايا والكائنات الأولية مثل الاسواط والأهداب.

وفي الخلايا الحيوانية الغير منقسمة توجد هذه التراكيب في مركز الخلية الحية Cell centre متجمعة في شكل سنتريول Centeriole مكونة حبيبات مركزية داخل عضيه تسمي الجسم المركزي أو مركز الخلية Centerosome الذي ينشأ منه خيوط المغزل Spindle fiber أما الخلية النباتية فلا يوجد بها هذا الجسم المركزي.

وتتكون هذه الانيبيبات من ثنائيات بروتينية من مادة التيوبلن Tubulins وكل ثنائي يتكون من نوعان من سلاسل البروتين الفا ، بيتا ويكبر ويعاد تجميعة ليعطي الشكل النهائي للانيبيبات وتستخدم الانيبيبات الصغيرة كوسيلة لنقل

عضية من مكان الى آخر داخل الخلية مثل تحرك الميتوكوندريا من مكان الي مكان حيث تعمل كقاطرة وهي المكون الرئيسي لخيوط المغزل تتحرك عليه الكروموسومات أثناء انقسام الخلية.

١٠ . ١ جدار الخلية Cell wall

تتميز الخلية النباتية عن الخلية الحيوانية بوجود جدار لحماية سطح الخلية .. يتكون الجدار من طبقات من سكريات عديدة هي السليلوز Cellulose وهو عبارة عن طبقات من ألياف السليلوز موضوعة فوق بعضها البعض بترتيب متوازي مثل شعيرة القطن أو قد تكون الالياف غير متوازية ومتداخلة .. وفي الخلية المرستيمية نجد ان هذا الجدار الأبتدائي Primary cell wall صغير ورقيق جداً الي ان تكبر الخلية في الحجم وتتوقف عن النمو ثم يبدأ ترسب ألياف اخري من مركبات كربوهيدراتية معقدة مثل اللجنين فيتكون جدار ثانوي Secondary cell wall أما في الكائنات عديدة الخلايا من النبات نجد أن هناك اتصال بين الخلايا بعضها ببعض لنقل المواد الغذائية .. ذلك رغم وجود هذا الجدار القوي للخلية النباتية، وبالتالي لابد من وجود فتحات Pores في هذه الجدر لتتصل الخلايا النباتية من خلال الأغشية البلازمية .. يطلق علي شبكة الاتصال في الخلايا النباتية بلازمودزماتا Plasmodesmata يكون قطر كل منها ٢٠ر-٤٠ر ميكرون ويمر بها أنبوبة غشائية تصل الشبكة الأندوبلازمية في الخليتين تسمي Desmotubule وفي الطحالب الخضراء المزرقه Blue green algae فان الجدار يتكون من سكريات عديدة مرتبطة بسلاسل ببتيدية ولايحتوي علي سليلوز وفي كثير من أفرادها يتكون مادة جلاتينية حول الجدار وتحتوي علي صبغات أو مواد سامه للدفاع عن نفسها.

أماالجدار الخلوي للبكتريا فيتكون من سكريات عديدة مرتبطة بسلاسل ببتيدية

وفي البكتريا الموجبه لصبغة جرام نجد الجدار سميك نتيجة سمك Peptidoglycan الطبقة السابقة من ببتيد الجليكان أما البكتريا سالبة الجرام تتكون من ثلاث طبقات من الغشاء الخلوي وطبقة رقيقة من ببتيد الجليكان والطبقة الثالثة الخارجية من ليبوبروتين وليبوعديد السكريات.

أما الفطريات عموماً فان جدارها يحتوي علي مركب الشيتين Chitin المكون لهيكل الحشرات وبعض العناكب .. والكايتين يتكون من وحدات من مركب الجولوكوزامين Glucosamine وبعض الفطريات لا تحتوي علي الشيتين مثل فطر الفيتوفتورا Phytophthora.

ومن الاهمية معرفة التركيب الكيماوي للجدر الخلوية لكل الكائنات السابقة اذا أراد الباحث التعامل مع الخلية في مجال عمل ودراسة البروتوبلاست Protoplast واستخدام طرق الهضم الأنزيمي Enzyme digestion.

٢ فصل مكونات الخلية Cell fractionation

من أجل دراسة الخلية علي المستوي الكيمائي والجزيئي فلابد من فصل مكونات الخلية للحصول علي عضياتها منفصله عن بعضها البعض مثل فصل النواه، البلاستيدات، الميتوكوندريا أو فصل الجزئيات الكبيرة التي بداخل النواه مثل الأحماض النوويه DNA بأنواعها RNA وأنواع البروتينات المختلفة. لهذا كان لتطور فصل مكونات الخلية الفضل لتقدم علوم البيولوجيا الجزئية والوراثة الجزئية وتطبيقاتها الهائلة المتمثلة في ثورة البيوتكنولوجي او التقنية الحيوية .. ومنها الهندسة الوراثية وزراعة الأنسجة النباتية والحيوانية. ويتم تكسير الخلية بعدة طرق منها الصدمات الأسموزية أو باستخدام الترددات العالية الصوتية Ultrasonic أو كسر جدار الخلية تحت ضغوط جوية عالية أو طحن الخليه. وكل هذه الطرق تساعد في تمزق الغشاء البلازمي للخلية أيضاً بما فيها أجسام جولجي التي ربما

تستعيد القدرة علي الاندماج وتكون نفسها مرة اخري. أما بقية العضيات الأخري مثل النواه والميتوكوندريا والليزوسوم والبلاستيدات والبيركسوزوم فتبقي سليمة، بالتالي فاننا نحتاج لطريقة اخري لفصل هذه المكونات كلها عن بعضها البعض .. وكان الفضل في هذا لعلماء الطبيعة منذ عام ١٩٤٠ الذين طوروا استخدام طرق فصل النظائر المشعه عن غير المشعه باستخدام أجهزة الطرد المركزي فائقة السرعة Ultracentrifuge وقد أمكن تطبيق هذا علي فصل مكونات الخلية اعتماداً علي الحجم والكثافة .. حيث ان عدد سرعات ولفات جهاز الطرد المركزي تتناسب عكسياً مع حجم وكثافة العضيه .. مثال ذلك نجد أن النواه وهيكل الخلية يترسب عند حوالي 1000g لمدة عشرة دقائق، اما الميتوكوندريا والليزوسوم والبيركسوزوم فتترسب عند 20000g لمدة عشرون دقيقة أما الريبوسومات والفيروسات والجزيئات الكبيرة تترسب مع 150000g لمدة ثلاث ساعات. لدقة فصل المكونات فانها تعتمد علي معامل الترسيب Sedimentation وتسمي وحدات Svedberg الذي يعتمد علي شكل وحجم العضيه Size and shape أو تستخدم مواد حامله ليتم عليها الفصل مثل السكروز أو كلوريد السيزيوم مع، حيث أن السرعات العالية يعتمد الفصل فيها علي ظاهرة الكثافة البيونتية Buoyant density أكثر من الحجم وهذه مازالت أحسن طريقة لفصل الجزيئات الكبيرة بأنواعها مثل أنواع DNA (النووي والبلاستيدي والميتوكوندريا) بعضها عن البعض كذلك أنواع RNA الثلاثة (m, t, r) اى الرسول الناقل والريبوسومي.

أما الطريقة الأخري لفصل المركبات العضوية علي الأخص البروتين فهي حالياً تعتمد علي الشحنات الكهربية الموجودة علي البروتين، وأيضاً الأحماض النوويه وتسمي بطرق المهاجرة الكهربائية Electrophoresis التي بدأت منذ الستينات مثل طريقة SDS-Polyacrylamide gel وتسمي (SDS-PAGE). قبل استخدام هذه الطريقة استخدمت طرق مختلفة منها التخطيط اللوني الكروماتوجرافي

Chromatography ومنهـا النوع الورقي Paper أو Thin layer وكان يستخدم فيها السليلوز والثانية يستخدم فيها السليكاجيل Silica gel والتخطيط اللوني ذو دقة عالية في فصل البروتين .. وعموماً بدأت الكروماتوجرافي منذ عام ١٩٠٦ بواسطة Tsweelt لفصل الصبغات النباتية علي عمود كروماتوجرافي من الطباشير .. وتم بعد ذلك تطور هائل في تحليل سلاسل الأحماض الأمينية المكونه للانسولين بواسطة Sanger سنة ١٩٥٥، وكان هذا أول بروتين يعرف فيه عدد ونوع وترتيب الأحماض الأمينية حتي أمكن حالياً معرفة تتابع الجزء من الحمض النووي DNA الخاص به و تسمي هذه الطريقة DNA sequencing لكل Gilbert & Maxam وحصلوا بها علي جائزه نوبل ١٩٧٥. ولهذا الان تطبيقات ذات اهمية في نظام الخلية الحر Cell free system الذي كان لهذه الطريقة الفضل وتفسير ومعرفة تصنيع البـروتين داخل الخليـة الحيـة Protein synthesis وعلاقته بالشفرات الوراثية Genetic code . اما الدراسات علي ما يسمي In vitro translation أو انتاج بروتين داخل أنابيب الأختبار بعيداً عن نظم الخلية فقد بدأت منذ عام ١٩٥٤ بواسطة Zamecnick

٣. طرق فحص الخلية والأنسجة ميكروسكوبيا

Microscopicl observation of cells and tissues

يعتبر بداية استخدام الميكروسكوب تاريخياً منذ ان استخدم هوك عدسات بسيطة مكوناً منها ميكروسكوب ليري خلايا فلينية ميتة .. ومنذ هذا التاريخ في القرن السابع عشر سنة ١٦٥٥ بدأ الأهتمام بنظرية الخلية الحية التي أكدها كل من العلماء Schwann & Schleiden سنة ١٨٣٥ وهي أن الخلية هي أساس الكائن الحي وبدأ استخدام الميكروسكوب الضوئي Light microscope وتطور علي يد علماء الطبيعة وخاصة علماء الضوء والعدسات لزيادة قوة ايضاح الميكروسكوب،

ولهذا تقسم الميكروسكوبات المستخدمة في الفحص طبقاً لقوة الأبضاح الي

- ميكروسكوب بقوة ايضاح عالية High resolution power مثل ميكروسكوب الأشعة البنفسجية Ultraviolet microscope ويستخدم طول موجة الأشعة البنفسجية الطويلة، ولهذا لابد من سقوط الأشعة علي شاشة فلورسنتية حتي لاتسبب أضرار لعين اذا سقطت عليها مباشرة.

- ميكروسكوب للدراسات الهستوكيميائية Histochemistry microscope وفيه تصبغ المركبات العضوية مثل الكربوهيدرات حيث تصبغ النشا باليود والليبدات مثل الزيت حيث تصبغ بصبغة Sudan III داخل الخلية وتستعمل هذه الطريقة ايضا لمعرفة ناتج نهائي للعمليات البيوكيميائية داخل الخلية. مثل التفرقه بين نسيج نباتي رباعي الكربون واخر ثلاثي الكربون وهذه الطريقة مهمه حالياً في الكشف والتشخيص في النباتات المهندسة وراثيا Transgenic organism للكشف عن مدي انتقال الجين أو الصفة الوراثية لكل الخلايا الناتجة من انقسام الخلية الأم وكذلك للدراسات السيتولوجية .. ويستخدم أيضاً ميكروسكوب ذو الأشعة البنفسجية لهذه الدراسات خاصة في طريقة التألق المناعي Imuno-influroscent وأيضاً لقياس حيوية البروتوبلاست في النبات Protoplast viability بالأضافه الي الميكروسكوب الضوئي البسيط الذي يستخدم للكشف عن النشا والزيت وبعض أنواع السكريات.

- ميكروسكوبات تستخدم لدراسة الخلية الحيه Living cell بدون صبغ. حيث أن الميكروسكوب الضوئي يعتمد علي صبغ العينة النباتية او الحيوانية بعد قتلها وتثبيتها Killing and fixation في محاليل كيماوية خاصه، وكذلك يعتمد الميكروسكوب الألكتروني .. أما في حالة فحص الخلية الحية فيستخدم ميكروسكوب Phase contrast ذو الحقل الضوئي المظلم، ويستخدم هذا

الميكروسكوب لدراسة حركة الخلية وانقسامها. ويرجع الفضل في ظهور هذا النوع من الميكروسكوبات للعالم (1952) Nomarski. ولهذا نوجه نظر الباحثين بأن طرق استخدام الميكروسكوب في الدراسات الهستوكيميائية لها مستقبل عظيم في القرن القادم، وذلك باستخدامها في الفحص المبكر والتشخيص كطريقة فعالة ودقيقة للكشف وبيان نوعية الكائنات المهندسة وراثياً عن غيرها .. وذلك بدلاً من استخدام طرق تحليل كيماوية معقدة. ولهذا يجب الاطلاع والعمل التجريبي في هذا المجال وبخاصة في علم الخلية Cytology وعلم الأنسجة Histology وعلم الأجنة Embryology في الأنسان والحيوان والنبات، وخاصة علم حبوب اللقاح في النبات وكذلك علم التقنية الدقيقة سواء للعينات التي تفحص بالميكروسكوب الضوئي أو الميكروسكوب ذو الأشعة البنفسجية أو الميكروسكوب الألكتروني.

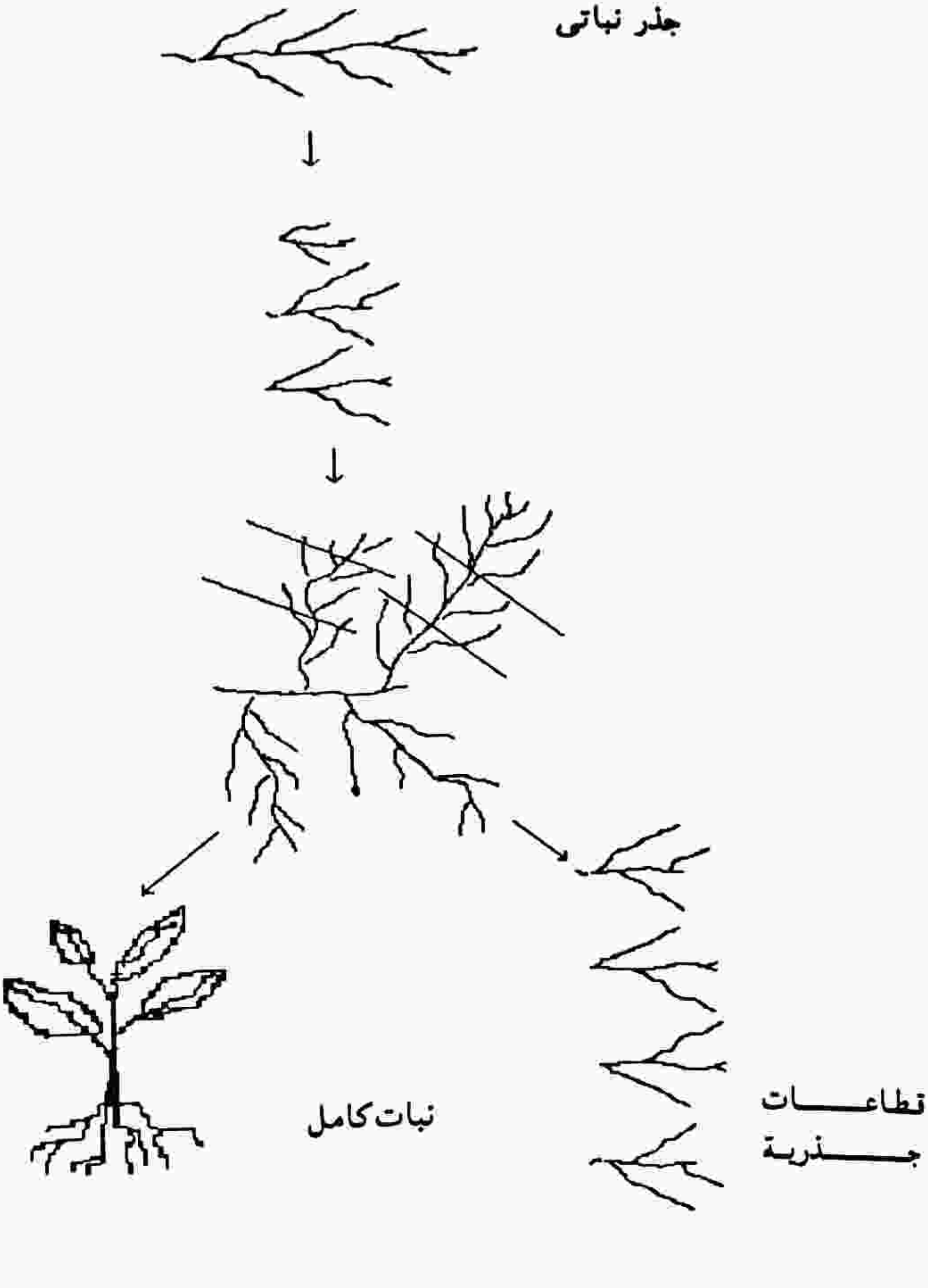
٥

زراعة الأعضاء
Organ cultures

يتكون النبات من عديد من الأعضاء المختلفة والتي تتباين في التركيب المورفولوجي والتشريحي، كما أن لكل منها وظيفة محددة .. تشترك جميع الأعضاء النباتية بالرغم من تباينها التركيبي والوظيفي في كونها تعمل معاً في توافق وتناسق تام من أجل المحافظة علي حيوية النبات لاتمام دورة حياته، كما أن هذه الأعضاء النباتية تتشابه في أنها تتكون من أنسجة وهذه بدورها تتكون من خلايا يختلف نشاطها تبعاً لموقعها في النبات. بالرغم من اختلاف الموقع، الوظيفة، التركيب بين هذه الأعضاء النباتية، غير أنها تعمل معاً في تناسق تام نتيجة للعلاقة الوطيدة والمعقدة بين هذه الأعضاء النباتية. بديهياً فان فصل أي عضو من النبات يؤدي الي الأضطراب الكامل في العمليات الحيوية بهذا العضو المنفصل، لهذا فانه من أجل النجاح في زراعة الأعضاء النباتية علي بيئة صناعية، فانه يجب الألمام الكامل بمتطلبات هذا العضو المنفصل من العناصر المغذية والظروف البيئية المحيطة. يتوافق التقدم في فهم متطلبات الأعضاء النباتية من العوامل المختلفة مع النجاح في زراعة هذه الأعضاء مثل الجذور، السوق، الأوراق، الأزهار، المبايض، البويضات، حبوب اللقاح، الأجنة.

١. زراعة الجذور Root culture

يرجع الفضل في زراعة الجذور الي العالم White (1934) الذى أمكنه زراعة قمم جذور نباتات الطماطم في بيئة مغذية بعدها سجلت محاولات ناجحة لزراعة عدد أنواع نباتية مختلفة باستخدام بيئة White بعد تعديل أحد أو بعض مكوناتها من أهم مزايا زراعة الجذور في بيئة مغذية أنه يمكن معها دراسة الأحتياجات الغذائية للجذور المنفصله بعيداً عن تأثير الأعضاء الأخري في النبات الكامل، كما أنه بواسطة هذه الطريقة يمكن استبعاد تأثير الكائنات الحية الدقيقة. ساهمت الدراسات علي زراعة الجذور في زيادة معلوماتنا عن عمليات البناء الحيوي، إفراز بعض المواد من الجذور الي البيئة المغذية المحيطة، تكوين بعض المواد ذات الأهمية الأقتصادية مثل القلوانيات، النيكوتين، وكذا فهم دور العناصر المختلفة والفيتامينات والهرمونات وتأثيرها علي نمو النبات .. لا تعتبر عملية فصل وزراعة الجذور النباتية من العمليات المعقدة، خاصة في وقتنا الحالي ومع التطور في علم زراعة الأنسجة النباتية .. في هذه الطريقة يطهر السطح الخارجي للجذور وتثبت علي ورق فلتر في طبق بتري تحت ظروف معقمة علي حرارة ٢٥ درجة مئوية. عندما تنمو الجذور وتصل الي طول مناسب يفصل قمة الجذر بطول حوالي ١سم وتنقل الي بيئة مغذية، تنمو الجذور وتزداد في الطول ويتكون جذور جانبية.. يقطع الجذر الرئيسي الي قطاعات كل منها يحتوي علي جذور جانبية، وهذه تنقل الي بيئة مغذية حديثة التحضير .. تستطيل الجذور الجانبية ويتكون عليها بدورها مجموعة اخري من الجذور الجانبية وتعاد الدوره السابقة .. بهذا يمكن توفير الماده النباتية اللازمة لأجراء البحوث العلمية أو تستخدم لتنشيط تكون الأفرع وبالتالي تكون نباتات كاملة (شكل ٣). هناك طريقة اخري لزراعة الجذور نفسها



شكل (٣) رسم توضيحي لبيان خطوات زراعة الجذور علي بيئة مغذية بهدف انتاج أعداد كبيره من القطاعات الجذرية للتجارب البحثيه أو انتاج نباتات كامله بتشجيع النمو الخضري علي الجذور المنزرعة.

٨٤ ماجد زكي

يستخدم نمطين من البيئات المغذية حيث يوضع قاعدة الجذر المنفصل في بيئة مغذية صلبة بينما ينمو قمة الجذر في بيئة سائلة .. ترجع أهمية استخدام هذه الطريقة الي امكانية دراسة كيفية تكون وتطور العقد الجذرية، حيث أن وضع البكتريا في البيئة المغذية التي تحتوي كربوهيدرات تؤدي الي النمو السريع للبكتريا وهذا يؤدي الي موت الجذر المنفصل .. كما أن وجود النترات في البيئة المغذية يؤدي الي تثبيط تكون العقد الجذرية، غير أنها هامة لنمو الجذور. بهذا يتضح لنا أهمية طريقة الزراعة التي تستخدم فيها صورتين من البيئات المغذية .. احدهما تحتوي كربوهيدرات، نترات لامداد الجذور بالعناصر اللازمة للنمو، والأخري تتكون من الأملاح الغير عضوية فقط والتي تحتوي بكتريا العقد الجذرية، وبذلك تتلامس مع الجذور لتكوين العقد الجذرية.

١. ١ تكون الأفرع علي الجذور المنزرعة Shoot formation on cultured roots

كما أشرنا من قبل فانه يمكن للجذور المنزرعة علي بيئة مغذية من استمرار نموها لعدة سنوات بدون تكوين أفرع، غير أنه في بعض الأنواع النباتية وتحت ظروف محددة يمكن أن ينشط تكون الأفرع علي الجذور المنزرعة علي بيئة مغذية. للحفاظ علي حيوية ونشاط الجذور المنزرعة فانه يجري نقلها الي بيئة مغذية حديثة التحضير علي فترات زمنية تختلف تبعاً للنوع النباتي، عندما تترك الجذور علي نفس البيئة المغذية فانه لوحظ تكون كالس علي الجزء القاعدي للجذر الذي يتكون منه براعم خضرية .. بالملاحظة العملية الدقيقة وجد أن تكون الكالس علي الجذور المنزرعة يستغرق حوالي ٥-٦ أسابيع، بينما يستغرق تكون البراعم الخضرية علي الكالس حوالي اسبوعين .. من الملاحظ أيضاً أنه بتكرار نقل واكثار الجذور تزداد

تدريجياً في الفترة التي تحتاجها لتكوين كالس كما يقل معدل تكوين الأفرع الخضرية. عموماً تفسر هذه الظاهرة بأنه يحدث تحول تدريجي في بعض عمليات البناء الحيوي بالجذور المنزرعة يؤدي بدوره الي انتاج بعض المواد التي تعمل علي التثبيط التدريجي لتكوين الكالس علي الجذور المنزرعة وتثبيط تكون البراعم الخضرية علي الكالس المتكون. يجب ألا يُفهم من هذا فقدان الجذور المنزرعة قدرتها علي تكوين النموات الخضرية مع تكرار النقل ولكن تقل قدرتها علي تكوين مثل هذه النموات .. كما أنه يجب أن يشار الى أن هذه الظاهرة ليست عامة لجميع الأنواع النباتية، حيث أن هناك بعض الأنواع النباتية التي تحتفظ بقدرتها الكاملة في تكوين الكالس والبراعم الخضرية علي مدار العديد من السنوات في البيئة المغذية. تتكون البراعم الخضرية من نسيج البريسيكل متشابهة بذلك مع البراعم الجانبية التي تنشأ علي الجذور .. تعتبر هذه الظاهرة ذات أهمية كبيرة حيث أنه أمكن في بعض الأنواع النباتية من تنشيط أو تثبيط تكون البراعم باستخدام بعض المواد الكيميائية، كما أنه أمكن تحويل بدايات البراعم الجذرية الي بدايات براعم خضرية والعكس. هذه الظاهرة ذات أهمية عظمي خاصة في الدراسات التي تهتم بقدرات الخلية علي تحويل مسارها التطوري تحت ظروف محددة، كما أنها ذات أهمية كبيرة من وجهة نظر العلم التطبيقي والذي يمكن معه استخدام بعض المواد الكيميائية لتنشيط التطور في اتجاه معين بهدف تحقيق رغبة ما .. وهذه قد تسبب زياده البراعم الخضرية التي تؤدي لزيادة النموات الخضرية وبالتالي زيادة المحصول لبعض الأنواع النباتية.

١. ٢ النواتج الثانوية Secondary products

تستخدم زراعة الأعضاء النباتية علي بيئات مغذية بهدف التعرف علي الموقع م النبات الذي يتم فيه انتاج المواد الثانوية التي قد يكون لها أهمية اقتصادية كبيرة فمثلاً هناك بعض المواد الثانوية التي لها استخدامات طبية هامة، هذه المواد تنتج في جذور بعض الأنواع النباتية، ولقد ثبت بالتجارب العديدة أن الكالس الناتج من زراعة السوق لنفس النوع النباتي لايحتوي علي هذه النواتج الثانوية الهامة ... ولما كان السؤال الهام هل ستظهر هذه المواد الثانوية في أعضاء النبات الناتج من الكالس السابق الخالي منها؟! للأجابة علي هذا السؤال فلقد اجريت تجربة استخدم فيها الكالس السابق الذي نقل الي بيئة مغذية تنشط تكوين الجذور والسوق، وكما كان متوقعا لم تنتج هذه المواد في السوق، غير أن نسبتها في الجذور كانت ضئيلة. وفي تجربة لاحقة اجري فصل الجذور الناتجة علي الكالس الخالي من المواد الثانوية وزراعتها في بيئة مغذية سائلة بهدف دراسة تكون النواتج الثانوية. أثبتت هذه التجربة أن المواد الثانوية تتكون في المجموع الجذري لهذا النوع من النباتات، كما أوضحت بما لا شك فيه أهمية زراعة الجذور علي بيئة مغذية ليست بهدف انتاج نباتات ولكن بهدف انتاج بعض المواد الثانوية ذات القيمة والأهمية الأقتصادية.

٢ زراعة القمم النامية للسوق Shoot tip cultures

يرجع الفضل لزراعة القمم النامية للسوق الي العالم White (1934) الذي قام بأول محاولة في هذا المجال، غير أن أول تجربة ناجحة لزراعة القمم النامية للسوق اجريت بواسطة العالم Loo (1945) علي نباتات الأسبرجس، في هذه التجربة اجري تعقيم السطح الخارجي للعضو النباتي، ثم فصل القمة النامية بطول حوالي ٥ ملليمتر

والزراعة علي بيئة مغذية، ويرجع علامات النجاح في هذه التجربة الي استمرار نمو القمة النامية وإستطالة السوق، وفي التجارب لاحقة أمكن تكوين جذور ونباتات كاملة من زراعة القمة النامية. أشار العالم Ball (1946) الى أنه يتم تكوين الجذور وبالتالي نبات كامل عندما تفصل القمة النامية للسوق بحيث تحتوي علي حوالي بدايات الثلاثة أوراق الأولي وجزء من الساق، غير أنه في تجارب لاحقة بواسطة Smith & Murashige (1970) أثبت امكانية زراعة القمة النباتية لسوق نباتات الدخان والداتورا، كما أنه أمكن الحصول علي نباتات كاملة عندما نقلت الي بيئة مغذية ذات تركيب ينشط تكوين الجذور .. ونظراً للأهمية العظمي لزراعة قمة السوق فلقد انتشرت هذه الطريقة بسرعه فائقة وكان من نتيجة هذا أن استخدمت مصطلحات متعددة للتعبير عن زراعة قمم السوق. يجب هنا أن نفرق بين زراعة القمة المرستيمية وزراعة القمة النامية .. القمة المرستيمية هي المنطقة القمية من الساق التي تقع مباشرة قبل بداية أصغر ورقة علي النبات، أما القمة النامية فهي تشتمل علي القمة المرستيمية بالأضافة الي بعض بدايات الأوراق التي تليها. تبعاً للنوع النباتي المستخدم فقد يكون هناك صعوبة في فصل القمة المرستيمية نظراً لصغر حجمها، كما أنها يصعب المحافظة علي حيويتها في البيئة المغذية، وعلي العكس من هذا فانه ليس من الصعب فصل القمة النامية التي تتميز بنسبة نجاح مرتفعه عند الزراعة علي بيئة مغذية .. كما أنه يمكن الحصول منها علي نباتات خالية من الفيروسات.

انتاج نباتات خالية من الفيروسات لايعتبر أمراً حديثاً في مجال زراعة الأنسجة النباتية، حيث أنه أمكن انتاج نباتات خالية من الفيروسات منذ أكثر من أربعين عاما ماضيا وذلك بواسطة زراعة القمة المرستيمية لنباتات الداليا والبطاطس علي

٨٨ ماجد زكي

بيئة مغذية Morel & Martin (1952, 1955) . الآن ومع التقدم في علم زراعة الأنسجة وكذلك الأدوات المعمليه التي تستخدم في اجراء العمل، فانه يمكن بسهولة ويسر فصل وزراعة القمة المرستيمية للعديد من الأنواع النباتية ذات الأهمية الأقتصادية بهدف انتاج نباتات خالية من الفيروسات، وهذه تتميز بقدرة انتاجية مرتفعة مقارنة بالنباتات المصابة بالفيروس. يعتمد الأساس النظري في الحصول علي نباتات خالية من الفيروسات علي أن الفيروس ينتشر في الأنسجة الوعائية للنبات وأن القمة المرستيمية النشطة تتميز بخلوها من الفيروس .. لهذا فان استخدام القمة المرستيمية فقط والخالية من الأنسجة الوعائية للزراعة علي بيئة مغذية هي ذات أهمية كبري في الحصول علي نباتات خالية من الفيروس. لايخفي أهمية زراعة القمة المرستيمية، القمة النامية في الأكثار الدقيق للنباتات بهدف الحصول علي أعداد كبيرة من النباتات والتي بدورها تتشابة في الصفات. وتستخدم هذه الطريقة في جميع الأنواع النباتية غير أنها ذات أهمية خاصة في البساتين والمحاصيل. تختلف احتياجات القمة المرستيمية أو القمة النامية لكل من العناصر المغذية والعوامل البيئية المحيطة، وذلك تبعاً لاختلاف النوع النباتي وحجم الجزء المنزرع علي بيئة مغذية. تلعب العناصر المغذية والمواد المضافة الي البيئة المغذية دوراً هاماً في نجاح زراعة القمم المرستيمية والقمم النامية، فبينما نجد أن امداد البيئة المغذية ببعض منظمات النمو يعتبر أمراً هاماً لاستمرار تطور القمة المرستيمية، غير أن القمة النامية قد لا تحتاج الي اضافة منظمات نمو في البيئة المغذية Shabde-Moses & Murashige (1979) .

أصبح الآن شائعاً استخدام بعض منظمات النمو بهدف احداث تضاعف للمادة النباتية في البيئة المغذية فمثلاً زيادة تركيز السيتوكينين في البيئة المغذية يؤدي لتكون

العديد من النموات الخضرية، التي بدورها تنقل الي بيئة ذات مستوي مرتفع من الاكسين لانتاج جذور، وبالتالي انتاج نباتات كاملة .. هناك بعض المواد الأخري التي وجد ان لها دور فعال في الاكثار الدقيق لبعض الأنواع النباتية مثل الجبرالين وبعض المستخلصات العضوية.

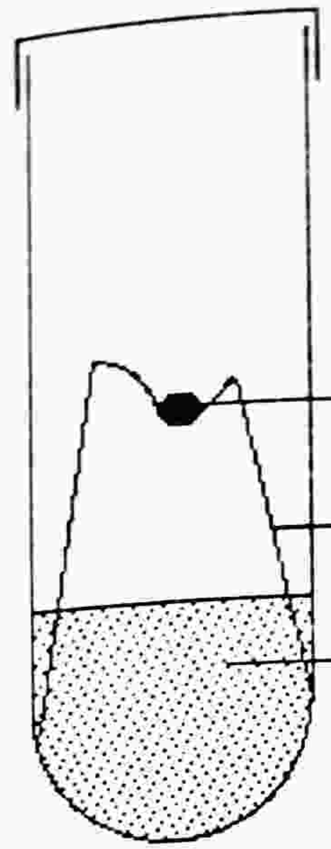
تتلخص طريقة اجراء زراعة القمة المرستيمية في الآتي

- تفصل القمة النامية من النبات بطول مابين ٥ر-١سم ويطهر السطح الخارجي بواسطة استخدام محلول مطهر لمدة ١٥ دقيقة، بعدها تغسل جيداً في ماء معقم.
- تنقل القمة النامية الي طبق بتري وتوضع علي ورقة فلتر مبللة بالماء أو البيئة المغذية .. باستخدام ميكروسكوب مجسم ومشرط دقيق تفصل القمة المرستيمية بطول ١ر-٥ر ملليمتر.
- تزرع القمة المرستيمية علي قمة ورقة الفلتر بأنبوبة الزراعة التي تحتوي بيئة سائلة (شكل ٤).
- تحضن أنبوبة الزراعة علي درجة حرارة ٢٧ درجة مئوية وفترة ضوئية مقدارها ١٦ إضاءة/٨ إظلام، وذلك لمدة عدة أسابيع حتي يتكون جذور وأفرع.

بغض النظر عن أهمية زراعة القمم المرستيمية لاكثار النباتات وانتاج نباتات خالية من الفيروس، فان القمم المرستيمية تعتبر ذات أهمية في المحافظة علي السلالات ذات الصفات الوراثية المرغوبة وذلك بواسطة الحفظ لفترات طويلة بالتجميد تحت حرارة منخفضة تصل -٢٠٠ درجة مئوية Withers (1978), Siebert (1976).

٣ زراعة الأوراق Leaves culture

المقصود بزراعة الأوراق هو فصل بدايات الأوراق وزراعتها علي بيئة مغذية .. بهذا



شكل (٤) رسم توضيحي لزراعة القمه المرستيمية علي قنطره من ورق الترشيح في بيئة مغذيه سائلة

يمكن تتبع المراحل التطورية المختلفة التي تمر بها الأوراق تحت ظروف بيئية يمكن التحكم فيها.

قد تزرع بدايات الأوراق علي بيئة مغذية صلبة أو سائلة، عموماً فان زراعة الأوراق لا تحتاج الي بيئة مغذية ذات تركيب معقد حيث أنه يمكن لها التطور في بيئة مغذية بسيطة التركيب. من أهم مزايا زراعة الأوراق هو امكانية دراسة تأثير عوامل مختلفة علي تطور الأوراق مثل تأثير بعض المواد الكيمائية التي تضاف للبيئة المغذية أو تأثير عامل أو أكثر من الظروف البيئية .. أو غيرها من العوامل الأخري المراد دراستها.

٤ زراعة البراعم الزهرية والمبايض Culture of floral buds and ovaries

تستخدم زراعة البراعم الزهرية للنباتات علي بيئة مغذية في التجارب والدراسات التي تهدف الي تعديل الجنس في الأزهار بواسطة المواد الكيمائية المختلفة، من أمثلة هذا استخدام حمض الأندول والجبرالين في تعديل الجنس في نباتات الخيار.

أجريت تجربة أمدت البيئة المغذية بحمض الأندول وذلك بهدف دراسة تأثيرة علي تعديل الجنس بالبراعم الزهرية المنزرعة علي بيئة مغذية .. كانت النتيجة المدهشة لهذه التجربة هي ملاحظة تطور المبيض في البراعم الزهرية المذكرة، كما أنه لوحظ أن تأثير الجبرالين يعاكس تأثير حمض الأندول .. من التجارب الرائدة في هذا المجال تلك التي اشتملت علي فصل وزراعة مبايض أزهار نباتات الطماطم بعد عدة أيام من التلقيح والأخصاب، يتطور المبيض ماراً بمراحل النمو الطبيعية وكانت المحصلة النهائية هو انتاج ثمرة كاملة بل وتحتوي علي بذور وذلك بداخل أنابيب الزراعة التي تحتوي بيئة مغذية Nitsch (1951). عندما اعيدت هذه التجربة باستخدام مبايض

أزهار قبل التلقيح فانه لم يحدث تطور للمبيض المنزرع علي بيئة مغذية، غير أنه في تجارب لاحقة أمكن تنشيط تطور المبيض بواسطة اضافة بعض منظمات النمو خاصة الأكسينات الي البيئة المغذية.

تعتبر زراعة المبيض في البيئة المغذية ذات أهمية كبيرة في الدراسات الخاصة بدراسة المراحل المبكرة لنمو الجنين، تطور الثمرة، نضج الثمرة، بعض الظواهر الفسيولوجية للثمار، وكذا الأصابة بالأمراض المختلفة. في طريقة زراعة المبيض يفصل البرعم الزهري بعد التلقيح والأخصاب بحوالي ٢-٥ يوم تبعاً للنوع النباتي، يفصل الكأس، التويج، السداة ويستبعد .. يجري تعقيم السطح الخارجي للمبيض في محلول مطهر، تغسل ثلاث مرات متتالية في ماء معقم، يقطع الجزء السفلي من نسيج المبيض والذي كان معرضاً للمحلول المطهر ثم يزرع المبيض في بيئة مغذية صلبة أو سائلة بوضعة علي قنطرة من ورق الفلتر. عند الرغبة في زراعة مبيض قبل التلقيح والأخصاب فانه تختار البراعم الغير متفتحة ويجري العمل عليها كما أوضحنا سابقا. تحتاج مبايض بعض الأزهار الي بيئة مغذية بسيطة التركيب تحتوي علي الأملاح الأساسية ومصدر للكربرهيدرات، غير أن البعض الآخر يتطلب بيئة معقدة التركيب لتنشيط نمو وتطور المبيض.

٥ زراعة البويضات Ovule culture

بالرغم من الصعوبة البالغة في فصل البويضات من الأغلفة المحيطة بها، غير أنه أمكن للعالم (1932) White من النجاح في فصل وزراعة بويضات نبات الأنترهينم. تلي هذا العديد من المحاولات لفصل وزراعة بويضات أنواع نباتية مختلفة وذلك بهدف دراسة العوامل التي تؤثر في تطور وتكوين الجنين الزيجوتي

(1982) Rangan لقد أمكن من زراعة بويضات وحبوب لقاح بعض الأنواع النباتية معاً في بيئة مغذية سائلة. بهذا اتيحت الفرصة لملاحظة ودراسة نمو الأنبوبة اللقاحية والمراحل المختلفة لعملية الأخصاب وتطور الجنين. كما أثبتت التجارب العملية مقدرة البويضات المنزرعة على بيئة مغذية من التطور المتتالي لتكوين جنين احادي ومنه يتكون نبات كامل.. هنا يجب الذكر أنه بالرغم من النجاح في انتاج نباتات احادية من البويضات غير أنه نظراً لقلة عدد البويضات والصعوبة في فصلها فلقد لجأ الباحثين لأستخدام حبوب اللقاح من أجل انتاج نباتات احادية.. هذه الحقيقة أدت الي وجود معلومات وفيرة عن حبوب اللقاح المنزرعة على بيئة مغذية وندرة المعلومات عن زراعة البويضات. عموماً تتلخص طريقة فصل وزراعة البويضات في الأتي

- يوضع كيس على الزهرة المراد فصل البويضات منها وذلك قبل نضج الزهرة، يراعي أن يفصل المبيض من الزهرة قبل انفتاح متك نفس الزهرة وانتشار حبوب اللقاح.

- يطهر السطح الخارجي للمبيض بعد ازالة الكأس، التويج، السدايات، وتغسل ثلاث مرات في ماء معقم.

- يشق المبيض بواسطة مشرط حاد وتفصل البويضات وتزرع على بيئة مغذية، تحضن الزراعة على درجة حرارة ٢٥ درجة مئوية.

هنا يجب الذكر أن البيئة المغذية التي تستعمل لزراعة البويضات تعتبر أكثر تعقيدا من مثيلاتها اللازمة لزراعة مبايض الأزهار.. يرجع هذا الي أنه في حالة زراعة مبايض الأزهار فان البويضات تظل محاطة بأغلفة عديدة تقوم بامتصاص وتعديل وتوفير المغذيات اللازمة لنمو البويضات. نظراً لغياب هذه الأغلفة في حالة

زراعة البويضات منفصلة فانه يلزم معها تعديل البيئة المغذية حتي يمكن للبويضات من النمو والتطور.

٦ زراعـــة المتك Anther culture

استخدمت زراعة المتك علي بيئة مغذية لدراسة المراحل التطورية المختلفة التي تمر بها حبوب اللقاح وكذلك بهدف انتاج نباتات احادية .. كانت الفكره الأساسية من زراعة متك بعض الأنواع النباتية علي بيئة مغذية هي دراسة العوامل التي تؤثر في عمليات الأنقسام الميوزي التي تحدث في خلية جسدية وتؤدي في النهاية الي تكوين الخلايا الأحادية أو حبوب اللقاح. عموماً فانه حتي وقتنا الحالي فان العوامل المسئولة عن حث الخلية للدخول في الأنقسام الميوزي مازالت غير معلومه ولايزال العديد من العلماء يحاولون جاهدين كشف هذا اللغز الذي سيزيد من معلوماتنا عن الخلية، كما أنه سيكون ذات أهمية كبري في مجال تربية النبات. نظراً لأهمية زراعة المتك وانتاج نباتات أحادية فاننا سوف نستعرض معا هذا الموضوع كاملاً في فصل آخر من هذا الكتاب.

٧ زراعة الجنين Embryo culture

يرجع تاريخ زراعة الأجنة النباتية علي بيئة مغذية الي بداية هذا القرن عندما تمكن العالم (1904) Hanning من زراعة أجنة من بعض نباتات العائلة الصليبية. حظيت هذه الطريقة في فصل وزراعة الأجنة النباتية باهتمام كثير من العلماء نظراً لأهميتها في التغلب علي مشكلة السكون في أجنة بعض الأنواع النباتية .. كما أنها طريقة هامة للمحافظة علي الجنين الذي يفقد حيويتة خاصة الجنين الهجين

وذلك لعدم مقدرتة علي الأستفادة من الغذاء المخزن في نسيج الأندوسبرم. بهذا يتضح لنا أهمية زراعة الأجنة النباتية للنجاح في انتاج نباتات هجين خاصة في الهجن التي تحتوي علي جينات وراثية منقولة من النباتات البرية .. تحققت أول تجربة ناجحة لانتاج نباتات بواسطة زراعة الأجنة في بيئة مغذية بواسطة العالم Labach (1925)، وكان للنجاح الذي حققة هذا الأنجاز الكبير أثر كبير في نشاط التجارب والأبحاث في مجال زراعة الأجنة النباتية بهدف انتاج هجن مختلفة، وكان من نتيجة هذا زيادة عدد النباتات الهجن الناتجة من زراعة الأجنة علي بيئة مغذية. كما أشرنا من قبل فان هذه الطريقة تستخدم أيضاً للتغلب علي مشكلة السكون في بعض الأجنة والتي بدورها تؤدي الي تقصير الفترة الزمنية لانتاج نباتات كاملة .. أشار Raghavan (1977) إلي أن سكون الجنين يرجع الي وجود بعض مثبطات النمو، التخزين في ظروف جافة، الحرارة المنخفضة، النضج الغير كامل للجنين .. يمكن استبعاد تأثير هذه العوامل بواسطة فصل وزراعة الجنين علي بيئة مغذية .. ولقد أمكن بواسطة زراعة الجنين من تقصير دورة التربية لانتاج بعض الانواع النباتات من عدة سنوات الي عدة أشهر. تستخدم طريقة زراعة الأجنة في بيئة مغذية في مجال دراسة المؤثرات المختلفة التي تعمل علي تطور الجنين في مراحلة العديدة مثال ذلك العناصر المغذية والعوامل البيئية المختلفة. تتلخص في طريقة زراعة الأجنة النباتية علي بيئة مغذية في الاتي .. بعد اجراء التهجينات المرغوبة تفصل الأزهار في الوقت المناسب والتي تتراوح ما بين ١١-٢٣ يوماً من التلقيح، يعقم السطح الخارجي للمبيض بالطرق المعتادة والتي سبق شرحها، يشق نسيج المبيض بحرص بواسطة مشرط حاد وذلك للحصول علي الجنين المتكون، يجب أن يراعي الحرص التام في عملية فصل وزراعة الجنين ومن الأمور الهامة أن تتم هذه

ماجد زكي

العملية بسرعة حتي لايتعرض الجنين لمخاطر فقدان الحيوية نتيجة للجفاف كما أنه يجب أن يراعي عدم احداث أضرار ميكانيكية للجنين التي قد تؤثر علي نمو وتطوره في البيئة المغذية.

عندما يراد فصل الجنين من البذرة بهدف زراعته علي بيئة مغذية للتغلب علي مشكلة السكون فانه يطهر السطح الخارجي للبذرة وتنقع في ماء معقم لعدة ساعات أو لعدة أيام تبعاً لمدي صلابة الغلاف البذري المحيط بالبذرة. تشق البذرة بواسطة مشرط مع مراعاة عدم الأضرار بالجنين الذي ينقل الي بيئة صناعية مغذية Yeung et al. (1981). غالباً مايزرع الجنين علي بيئة مغذية ذات تركيب مميز من منظمات النمو ونسبة مرتفعة من السكروز وذلك لتنشيط تطور الجنين. بعد فترة زمنية ينقل الجنين الي بيئة اخري ذات مستوي هرموني ينشط تكوين النموات الخضرية وعادة تحتوي مثل هذه البيئة علي نسبة منخفضة من السكروز مقارنة بالبيئة السابقة اللازمة لتطور الجنين.

اذا كان الهدف من زراعة الجنين هو اكثار النباتات فانه ينقل الأفرع الي بيئة تحتوي نسب مختلفة من الأكسين والسيتوكينين وذلك لتشجيع تضاعف النموات الخضرية وهذه بدورها تفصل وتنقل الي بيئة اخري تعمل علي تكوين الجذور وفي النهاية نحصل علي نباتات كاملة. من هذا يتضح لنا أهمية اختيار البيئة المغذية في المراحل التطورية المختلفة للجنين من أجل انتاج نباتات كاملة. لهذا فاننا سوف نتناول بعض مكونات البيئة المغذية التى تؤثر في نجاح زراعة الجنين.

٧. ١ عناصر البيئة الأساسية Basal medium

تعتبر العناصر المغذية الكبرى والصغري المكونة لبيئة مغذية كافية ومناسبة لنمو

الجنين، غير أن أجنة بعض الأنواع النباتية تتأثر بشدة بالعناصر الموجودة بالبيئة المغذية .. أشار Monnier (1978) الي أن استخدام بيئة تحتوي عناصرها علي الأملاح المعدنية قد تؤدي الي سمية الجنين المنزرع عليها وذلك نظراً للحساسية المرتفعة للجنين، من أجل هذا فانه يجب أن يتم تعديل العناصر الأساسية للبيئة المغذية حتي يمكن الحصول علي أفضل نمو للجنين.

٧. ٢ مصدر النيتروجين Source of nitrogen

يضاف نترات الأمونيوم ونترات البوتاسيوم كمصدر للنيتروجين الغير عضوي الي البيئة المغذية التي تستخدم لزراعة الأجنة النباتية .. ويعتبر الأسباراجين مصدر جيد للنيتروجين العضوي، غير أن بعض الباحثين يفضل استخدام الجلوتامين في البيئة المغذية Mok et al. (1978), Raghavan (1976).

٧. ٣ الكربوهيدرات Carbohydrate

أثبتت التجارب العلمية أن السكروز هو أفضل مصدر للكربوهيدرات لنمو الأجنة النباتية علي بيئة مغذية، يضاف السكروز بتركيز مرتفع ما بين ٨-١٣٪ الي البيئة المغذية .. ويرجع استخدام مثل هذا التركيز المرتفع الي الضغط الأسموزي المرتفع لخلايا الجنين النباتي مقارنة بباقي الخلايا المكونة للأعضاء النباتية المختلفة .. الضغط الأسموزي المرتفع للجنين مقارنة بالأعضاء الأخري يمنع الأنبات المبكر للجنين كما أنه قد يكون مسئولاً عن زيادة الأنقسام النشط في خلايا الجنين خلال المرحلة المبكره للنمو Raghavan (1976). وهناك اعتقاد آخر يشير الي أهمية الضغط الأسموزي المرتفع في المحافظة علي حيوية الخلية أثناء المراحل المبكره لأنقسام الجنين Norstog (1979).

٧. ٤ الهرمونات Hormones

هناك اعتقاد سائد بأنه نظراً لأن الجنين ما هو الا نبات كامل، فانه بذلك يملك كل مقومات النمو من الهرمونات اللازمة لتطوره .. بهذا فانه لا يلزم اضافة هرمونات الي البيئة المغذية التي تستخدم لزراعة الأجنة النباتية .. هناك بعض الحالات التي وجد فيها أن اضافة تركيزات ضئيلة من الأكسين أو السيتوكينين أو الأثنين معاً تؤدي الي تثبيط نمو الأجنة المنزرعة علي البيئة المغذية خاصة الأجنة الغير ناضجة في المرحلة الكروية أو القلبية. عموماً فانه يمكن القول أن أندوسبرم بعض الأنواع النباتية تحتوي علي بعض الهرمونات التي تؤثر في نمو وتطور الجنين، عندما يفصل الجنين من الأندوسبرم ويزرع علي بيئة مغذية منفصلاً فانه يلزم تعويض الجنين عن الهرمونات الموجودة بالأندوسبرم وذلك بواسطة اضافتها الي البيئة المغذية Raghavan (1980).

٦

مراحل الاكثار بواسطة زراعة الأنسجة

Stages of micro-propagation via tissue culture technique

يهمنا هنا وقبل أن نسترسل في عرض ما هو متقدم في تكنولوجيا زراعة الأنسجة النباتية أن نستعرض معا في اطار مبسط المراحل التي يمر بها النسيج المنزرع علي بيئة مغذية بداية من فصل هذا النسيج من النبات الأم وزراعتة علي البيئة المغذية حتي الحصول علي نباتات كاملة لها القدرة علي النمو في الحقل تحت الظروف البيئية الطبيعية. تقسم الفترة التي يقضيها النسيج المنزرع علي البيئة المغذية الي مراحل مختلفة .. وهذا ليس بالأمر الجديد حيث أنه قد سبق وصف هذه المراحل بواسطة العالم Murashige (1974) الذي أوضح أن هناك ثلاث مراحل يمر بها النسيج المنزرع وهي

- مرحلة انشاء المزرعة النسيجية.
- مرحلة التضاعف علي البيئة المغذية.
- مرحلة تكوين الجذور.

بالرغم من أن هذه المراحل الثلاث تغطي المراحل التطورية التي يمر بها النسيج المنزرع في البيئة المغذية، غير أنه تم حديثاً اضافة مرحلتين هامتين أحدهما تعنى بإعداد النبات الأم الذي يؤخذ منه النسيج لزراعتة علي البيئة المغذية والمرحلة الأخري تعنى بتهيئة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة لتتواءم مع الظروف

الطبيعية المحيطة أى الزراعة في الحقل، وبهذا تصبح المراحل التطورية التي تميز التكاثر بواسطة زراعة الانسجة النباتية هي

- مرحلة اعداد النباتات الأم.
- مرحلة انشاء المزارع النسيجية.
- مرحلة التضاعف علي البيئة المغذية.
- مرحلة تكوين الجذور.
- مرحلة الاقلمة.

١ متطلبات مراحل الاكثار Requirement of micro-propagation stages

مما لاشك فيه أن كل مرحلة من هذه المراحل لها متطلبات يجب أن تراعي للحصول علي استجابة عالية للنسيج المنزرع، ولهذا فاننا سوف نتناول كل مرحلة بالتفصيل ليتسني للقارىء الاطلاع علي أهمية هذه المراحل والنقاط التي يجب أن تراعي عند كل مرحلة.

١. ١ مرحلة اعداد النباتات الام Preparation of mother plants

من الامور الهامة عند بداية العمل التأكد من النوع والصنف النباتي المراد اكثاره، عدم التأكد من النوع النباتي يؤدى الي ضياع الوقت والمجهود وقد يؤدى الي الفشل في عملية الاكثار ذاتها.

أثبتت التجارب العديدة في مجال زراعة الانسجة النباتية أن استجابة النسيج المنزرع تتوقف علي مدي قوة النبات الأم والموسم الذي يؤخذ فيه النسيج للاكثار بواسطة زراعة الانسجة، ولهذا فانه يجب أن يراعي أن يكون النبات الام خالياً من

المكتبة

أيام من اجراء الزراعة، وفي حالة وجود اصابة داخلية بالنسيج المنزرع فان التلوث يظهر بعد حوالي ١٠ أيام من الزراعة .. كما أن وجود التلوث في البيئة المغذية في مكان بعيداً عن النسيج المنزرع وخلال الايام الاولي من الزراعة يدل علي عدم مراعاة الدقة أثناء عملية زراعة النسيج النباتي. ولهذا فانه في حالة وجود تلوث في مزارع الانسجة يجب أن تدرس جيداً ويحدد مصدرها حتي يسهل تجنب مصادرها المختلفة. هناك بعض الصعوبات التي تواجة الباحثين في مجال زراعة الانسجة حيث أنه في بعض الانواع النباتية يتحول النسيج المنزرع بعد بضعة أيام الي اللون البني ويتلو هذا غالباً موت النسيج وفشل اكثار النبات. غالباً يعزو هذا الي انطلاق الفينولات من النسيج المنزرع وهذا بدوره يرجع الي الضرر الميكانيكي الذى يحدث للنسيج أثناء فصله من النبات الأم .. ويمكن التغلب علي هذه المشكلة بواسطة التخلص من الفينولات التي تفرز في البيئة المغذية او تقليل نشاط الانزيم المسئول علي تمثيل الفينولات، كما يمكن التخلص من تأثير المواد الفينولية بواسطة استمرار نقل النسيج المنزرع الي بيئة حديثة التحضير، ويعتمد طول الفتره التي يجري عليها النقل علي النوع النباتي المنزرع وكمية المواد الفينولية المتكونة، وغالباً يجري النقل علي فترات زمنية متقطعة تتراوح بين ١-٥ أيام. تعتبر البيئة المغذية السائلة أفضل أنواع البيئات التي تستخدم مع الأنسجة التي تنتج فينولات، هذا لأن الفينولات تتوزع في البيئة المغذية وبذلك يتم تخفيف تركيزها وكذا تأثيرها. كما أنه يسهل احلال البيئة المغذية السائلة التي تحتوى فينولات ببيئة مغذية مجهزه حديثاً. ومن الطرق الاخري التي بواسطتها يتخلص من الفينولات اضافة الفحم النباتي النشط أو مادة (PVP) الي البيئة المغذية .. عندما ترتبط الفينولات بهذه المواد تفقد تأثيرها المثبط علي نمو النسيج النباتي المنزرع.

١. ٣ مرحلة تضاعف النسيج المنزرع Multiplication of the cultured tissue

الهدف الأساسي في هذه المرحلة هو الحصول علي تضاعف سريع للجزء النباتي المنزرع علي بيئة مغذية .. هناك طرق عديده لانجاز هذه المرحله تشمل انتاج أجنة جسدية، تنشيط نمو البراعم العرضية، تنشيط نمو الأفرع الجانبية.

١. ٣. ١ الاجنة الجسدية Somatic embryos

انتاج الأجنة الجسدية هي طريقة ذات كفاءه عالية لاكثار المادة النباتية وهي عبارة عن تحول خلية نباتية الي جنين غالباً له نفس التركيب الوراثي للخلية الأم التي نشأ منها. يمكن الحصول علي الأجنة الجسدية اما من خلال زراعة معلق الخلايا أو من الكالس المنزرع علي بيئة مغذية (1983) Ammirato. نظراً للأهمية القصوى للأجنة الجسدية في مجال تكنولوجيا زراعة الأنسجة النباتية فاننا سنتناولها بالتفصيل في فصل كامل من هذا الكتاب.

١. ٣. ٢ تنشيط نمو البراعم العرضية Stimulation of auxilary buds

عند زراعة جزء نباتي يحتوي علي برعم عرضي فان هذا الأخير ينمو الي فرع خضري أو عديد من الأفرع الخضرية، وهذه بدورها تحتوي علي براعم عرضية التي تنمو بدورها الي أفرع خضرية وبتكرار هذه الدورة فانه يحدث تضاعف للمادة النباتية المنزرعة. من الجدير بالذكر أن هذه الدورة يمكن أن تكرر الي مالا نهاية ما لم يتم نقل النسيج النباتي الي بيئة معدلة التركيب بهدف انتاج جذور علي الأفرع الناتجة. بالرغم من أن هذه الطريقة تعتبر أبطأ الطرق المستخدمة في اكثار المادة النباتية، غير أنها شائعة الاستخدام في بعض الأنواع النباتية التي يصعب فيها

الحصول علي أجنة جسدية من النسيج المنزرع.

١. ٣. ٣ تنشيط نمو الأفرع الجانبية   Stimulation of lateral buds

تنشأ البراعم الجانبية في مزارع الأنسجة النباتية من مناطق مختلفة من النسيج المنزرع وليست من البراعم الطرفية أو البراعم العرضية، فهي تتطور من الجذور، السوق، الأوراق، الكورمات، الريزومات، الكالس. يعتبر الكالس مادة وسطية بين النسيج المنزرع والأفرع الجانبية، حيث ينتج الكالس أولاً من النسيج المنزرع والمنفصل من النبات الأم ويتلو هذا تكون أفرع جانبية من الكالس المتكون .. غير أن استخدام هذه الطريقة لمضاعفة المادة النباتية المنزرعة غير مفضلة لانها قد تؤدى الي حدوث تغيرات في المادة الوراثية نظراً لطول الفترة التي يقضيها النسيج علي بيئة مغذية فقد يؤدى هذا الي التضاعف الكروموسومي، هذا بالاضافة الي التغيير الذى قد يحدث للتركيب الجينى.

١. ٤ مرحلة تكوين الجذور في البيئة المغذية

Root formation in nutrient medium

الهدف الأساسي من هذه المرحلة هو تكوين جذور علي الأفرع المتكونة في المرحلة السابقة، ويتم هذا بواسطة نقل الأفرع النباتية المتكونة الي بيئة مغذية ذات تركيب مناسب لتنشيط انتاج الجذور وغالباً ماتكون البيئة المغذية متماثلة في الأملاح الاساسية وتختلف فقط في تركيب وتركيز منظمات النمو. تختلف العناصر اللازمة لتنشيط تكون الجذور تبعاً للنوع النباتي المستخدم، حيث أن بعض الأنواع تحتاج الي النقل من بيئة تحتوي سيتوكينين الي بيئة خالية من السيتوكينين، بعض

الأنواع الاخري تحتاج الي النقل الي بيئة مغذية تحتوي اكسين وخالية من السيتوكينين .. هنا يجب الاشارة الي أن تكوين الجذور في بعض الأنواع النباتية قد يحتاج الي اضافة اكسين، غير أن تطور هذه الجذور قد يثبط بوجود الاكسين في البيئة المغذية، بناءاً علي هذا فانه يجب النقل الي بيئة خالية من الاكسين وذلك لتنشيط تطور الجذور. كما أن بعض الأنواع النباتية تحتاج الي الزراعة علي بيئة مغذية تحتوي نصف التركيز الملحي للعناصر الكبري والصغري وقد يرجع هذا الي أن النبات المتكون لايحتاج تركيز مرتفع من النيتروجين في البيئة المغذية .. كما أن التركيز العالي من العناصر الاخري ليس له تأثير ملحوظ علي النمو أو تكوين الجذور. مما لاشك فيه أن الظروف البيئية مثال التهوية، الضوء، الحرارة ... وغيرها تلعب دوراً هاما وأساسيا في عملية تكوين الجذور، ولقد لوحظ أن الشعيرات الجذرية لا تتكون علي الأفرع المنزرعة في بيئة مغذية سائلة أو التي تزرع علي قنطرة من ورق الفلتر، وقد يرجع هذا في المقام الأول الي مدي توفر الاكسجين في البيئة المغذية التي تنمو فيها الجذور. عموما فان العوامل المحيطة التي تساعد علي تكون المواد الكربوهيدراتية هي أساسية وهامه حيث أن الكربوهيدرات تعتبر عامل محدد في انتاج الجذور وأن انخفاض مستوي الكربوهيدرات يؤدي الي عدم تكون الجذور علي الأفرع النباتية المنزرعة. يعتبر تنشيط تكوين الجذور علي الأفرع المنزرعة ببيئة مغذية هي الطريقة السائدة والشائعة الاستخدام بين الباحثين في مجال زراعة الأنسجة النباتية، غير أنه حديثاً أمكن تنشيط تكوين الجذور بعد النقل الي تربة الزراعة، تعتبر هذه الطريقة هامه حيث أنها ذات قيمة إقتصادية كبيرة خاصة علي مستوي الانتاج التجاري. كما انه من المعلوم أن الجذور المتكونة علي بيئة مغذية لا تعمل بكفاءه مرتفعة أو لا تؤدى

وظيفتها عند النقل الي تربة الزراعة، وهذا يرجع أساساً الي عدم تكون شعيرات جذرية في البيئة المغذية أو الي فقدان الشعيرات الجذرية قليلة العدد المتكونة علي الفرع النباتي عند اجراء عملية النقل .. لهذا فانه يفضل أن يتم تنشيط تكوين الجذور علي الأفرع النباتية بعد نقلها الي تربة صناعية ويجب هنا الاشاره الي أنه هناك بعض الأنواع النباتية التي تنتج جذوراً فقط في بيئة مغذية ويفشل انتاج مثل هذه الجذور في تربة صناعية، ولذا يجب أن يؤخذ في الاعتبار سلوك النوع النباتي المستخدم.

١. ٥ مرحلة الأقلمة Acclimatization stage

نظراً لأن النباتات الناتجة من عملية زراعة الأنسجة النباتية تتميز ببعض المواصفات الخاصة، كمثال لهذا طبقة الكيوتيكل التي تغطي الورقة وتحد من فقد المياه من النبات تعتبر غير موجودة في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة، هذا لأن مثل هذه النباتات لا تحتاج اليها، حيث أنه ليست هناك مخاوف من فقد المياه أثناء نموها في جو ذات رطوبة مرتفعة .. بجانب هذا فانه وجد أن ثغور النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية لا تعمل بكفاءه عالية، وبذلك يكون هناك مخاطر لموت النباتات عند نقلها الي تربة صناعية في ظروف الصوبة أو الحقل، لهذا فانه يجري عملية الأقلمة وذلك لتهيئة النباتات علي النمو في ظروف الصوبة أو الحقل.

هناك العديد من الأنواع المختلفة للتربة الصناعية التي تستخدم عند نقل الأفرع أو النباتات من البيئات المغذية المعقمة الي تربة صناعية، مثال التربة الصناعية التي قد تستخدم Peat, bark, perlite, vermiculite, pumice, sand, soil. وقد تستخدم هذه الانواع منفردة أو تخلط ببعضاً من الأسمدة .. يعتبر مادة Peat ذات

درجة حامضية مرتفعة ولهذا فانها قد تشبط نمو الجذور في بعض الأنواع النباتية. كما تعتبر مادة Vermiculite قلوية الي حد ما .. من المعلوم أن أفضل تربة صناعية لتشجيع نمو الجذور يجب أن تكون متعادلة أو حامضية قليلاً، كما يجب أن يكون لها صفات المقدرة العالية علي الاحتفاظ بالرطوبة وكذا التهوية الجيدة. قبل النقل فانه يجب أن تغسل النباتات الناتجة بالماء المقطر للتخلص من بقايا البيئة المغذية وذلك قبل أن تزرع في تربة صناعية، يراعي عند النقل للتربة الصناعية المحافظة علي الرطوبة المرتفعة بالجو المحيط بالنباتات ويتم هذا بواسطة وضعها في صندوق بلاستيكي شفاف أو تغطيتها بواسطة أكياس من البلاستيك الشفاف.

من الطرق الاخرى شائعة الاستعمال خاصة في مجال الانتاج التجاري استعمال الرش الصناعي المتكرر الذى يحافظ علي نسبة رطوبة مرتفعة بالجو المحيط. ويتم أقلمة النباتات بواسطة التقليل المتدرج في نسبة الرطوبة المحيطة، ويتم هذا اما بواسطة تقليل عدد مرات الرش أو بواسطة فتح الصندوق او الكيس البلاستيكي المحيط بالنباتات لعده ساعات تزداد تدريجياً حتي يتم في النهاية ازالة الغطاء المحيط ونمو النباتات في الرطوبة النسبية العادية، ومن الطرق الاخري التي تستعمل رش النباتات المنقوله بمحلول يقلل من معدل النتح في النباتات المنقولة وبالتالي فإن هذا يؤدي الي زيادة مقدرة النباتات علي ملائمة الرطوبة النسبية المنخفضة التي ينقل اليها Wardle et al . (1979).

لابد أن يفهم تماماً أن معدل التمثيل الضوئي للنباتات النامية في بيئات صناعية يعتبر ضئيلاً مقارنة بالنباتات النامية في الصوب أو في الحقول. ولهذا فانه يجب أن يعلم القارىء أن عملية نقل النباتات من البيئة المغذية ذات الظروف المتحكم فيها الي تربة صناعية في الصوبة أو الحقل في ظروف بيئية غير متحكم فيها، فان

هذا يعني التغيير في العمليات الفسيولوجية بالنباتات ولهذا تعتبر هذه المرحلة حاسمة وهامه للحصول علي نباتات كاملة مناسبة للنمو في الصوب أو الحقل. نظرا لاهمية مرحلة الاقلمة فاننا سوف نتناولها معا بالتفصيل في الفصل قبل الاخير من هذا الكتاب.

٢ الاختلافات في النباتات الناتجة Variations in regenerants

عالقا في الذهن المفهوم التقليدى للتكاثر الخضري، فمن المتوقع نظريا أن تكون النباتات الناتجة بطريقة الاكثار بواسطة زراعة الأنسجة النباتية متشابهة وراثيا مع النبات الأم .. غير أن هذه ليست دائماً القاعدة حيث أن هناك فرصة كبيرة لحدوث اختلافات بين النباتات الناتجة والنبات الأم، وترجع هذه الاختلافات الي أحد او بعض العوامل التالية

- حدوث طفره في بعض الخلايا وانتاج ما يسمي بالكيميرا.
- التغيير في عدد الكروموسومات.
- تغير الوضع النسبي للكروموسومات بداخل الخلية.
- حدوث طفرات في النواه أو السيتوبلازم الخلوي.
- حدوث بعض التغيرات المورفولوجية التي تشمل تغير شكل الاوراق، التقزم، تغير شكل الازهار.
- ظهور النباتات الالبينو وهي غالباً مشكلة سائدة في محاصيل الحبوب وترجع أساساً الي نقص كفاءة البلاستيدات.
- يرجع وجود هذه الاختلافات في النباتات الناتجة الي تأثير أحد أو بعض مكونات البيئة المغذية الصناعية التي ينمو عليها النسيج النباتي .. ولقد أثبت

العالم (1979) Jones أن منظم النمو السيتوكينين الذى يضاف الي البيئة المغذية بهدف تنشيط نمو الأفرع النباتية، قد يسبب هو نفسه تقزم للنباتات الناتجة، تثبيط نمو الجذور، زيادة التفرع .. هناك أيضاً بعض الاختلافات التي يسببها وجود الاكسين في البيئة المغذية وهذه تشمل ضعف الخصوبة، تشوه شكل بتلات الازهار والأوراق، ضعف النمو، يجب الاشاره هنا الي أن هذه الاختلافات تظهر عند استخدام التركيزات الغير مناسبة من الاكسين . هناك بعض العناصر الاخري التي تساهم في انتاج نباتات مغايره للنبات الام وهذه تشمل اختلافات الضغط الاسموزي، تركيز مادة الآجار في البيئة المغذية، الحرارة، وجود الجبراليبنات.

بالرغم من أن حدوث اختلافات في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية أمر غير مرغوب فيه، خاصة عندما يراد اكثار المادة النباتية، غير أن هناك بعض المزايا التي قد يستفاد بها مربي النباتات، لان هذه الاختلافات توفر له فرصة كبيرة للبحث عن الصفات المرغوب فيها. سنتناول بالتفصيل في هذا الكتاب أهمية هذه الاختلافات وكيفية الاستفادة بها في تطور النباتات.

[stamp]

٧

تكوين الكالس
Callus initiation

الكالس عبارة عن خلايا بارنشيمية عشوائية الترتيب ناتجة من الأنقسام الخلوي للخلايا المكونة للجزء النباتي المنزرع علي بيئة مغذية، غالباً يتكون الكالس في المنطقة التي يقطع فيها النسيج النباتي .. هنا تجب الأشاره الي أهمية التمييز بين الكالس والكالوس .. حيث أن الكالوس عبارة عن سكريات متعددة لها وظيفة هامة في التئام الجروح بالخلايا النباتية، كما أنها تدخل في تركيب الأنابيب الغربالية بالنباتات. سجلت بعض الملاحظات علي تكوين كالس في المناطق المجروحة من النباتات، كما أشار العلماء الي الدور الذى يلعبه الاكسين والسيتوكنين في تكوين الكالس. ولقد استخدمت طريقة زراعة الأنسجة النباتية علي بيئة معقمة لتنشيط تكوين الكالس من الأعضاء النباتية المختلفة التي عادة لا تكون كالس نتيجة للجروح أو للأضرار الميكانيكية، ويمكن القول أنه في الوقت الحالي ومع توفر حجم كبير من المعلومات عن تكوين الكالس فانه يمكن تنشيط تكوين الكالس من أعضاء مختلفة لأعداد كبيره من الأنواع النباتية . يعتبر الكالس مادة نباتية ذات أهمية كبيرة في اكثار النباتات، كما إنه يمثل حقل خصيب للباحثين في دراسة المراحل التطورية المختلفة للنباتات .. ويمثل الكالس المادة الأولية اللازمة للنجاح في تكوين المعلقات الخلوية. هناك بعض العوامل الرئيسية التي تتحكم في نجاح

تكوين الكالس النباتي علي بيئة مغذية وهي

- اختيار الجزء النباتي المناسب.
- توفير البيئة المغذية والظروف المناسبة لتشجيع تكوين الكالس.
- الفصل والمحافظة علي الكالس الناتج.

يختلف الكالس المتكون في الشكل واللون ودرجة التماسك، فنجد أنه يتكون كالس متماسك نتيجة لأندماج الخلايا، وعلي الجانب الآخر قد يتكون كالس هش يسهل منه الحصول علي المعلقات الخلوية. وقد يظهر الكالس باللون الأصفر، الأخضر، الأحمر وهذا يرجع الي احتواء الخلايا المكونة للكالس علي صبغات نباتية مثل الأنثوسيانين .. أحياناً ما تنتشر الصبغات في كل أجزاء الكالس، وأحياناً اخري تظهر بعض المناطق الخالية من الصبغات. في بعض التجارب المعملية علي نبات الجزر أمكن عزل الخلايا النباتية التي لها المقدرة علي تكوين صبغات الأنثوسيانين من الأخري التي ليس لها هذه المقدرة Alfermann & Reinhard (1971).

يعتقد أن الكالس الناتج من زراعة جزء نباتي يحتوى علي كلوروفيل يكون له المقدرة علي التمثيل الذاتي وتكوين الغذاء اللازم للنمو، ووجد أن الكالس الذى يحتوي كلوروفيل يعتمد كلياً علي الامداد الخارجي بالكربوهيدرات اللازمة للنمو، حتي في حالة وجود مصدر للضوء. ليس هناك قاعدة عامة لتكون الكالس ذات اللون الأخضر الذى يحتوي كلوروفيل، فمثلاً بعض الأجزاء النباتية التي تحتوى علي كلوروفيل قد تنتج كالس عديم اللون، علي النقيض من هذا فانه قد يتكون كالس ذو لون أخضر لإحتوائة علي الكلوروفيل من أجزاء نباتية خالية من هذه الصبغات. عموماً فانه يمكن القول أنه بغض النظر عن احتواء الكالس علي الكلوروبلاست، فان الظروف الطبيعية والكيميائية التي ينمو فيها النسيج المنزرع

هي التي تحد من مقدرة الخلايا علي التمثيل الضوئي ويجب ألا يفهم من هذا عدم مقدرة الأنسجة علي التمثيل الضوئي، حيث أنه ثبت بالتجارب العملية مقدرة الأنسجة المتكونة في زراعات الأنسجة النباتية للجزر علي التمثيل الضوئي Edelman & Hanson (1971). بجانب المزايا العديدة التي يوفرها الكالس علي النطاق التجاري والبحثي فانه من أهم المشاكل والعقبات التي تلازم استخدام الكالس في مختلف المجالات هو التغيير الوراثي نتيجة للزراعة لفترة طويلة علي بيئة مغذية .. يحدث هذا التغير نتيجة للطفرات في الجينات الوراثية، التضاعف الذاتي للكروموسومات، بالرغم من أن معدل حدوث هذا التغيير الوراثي يزداد بزيادة فترة الزراعة علي بيئة مغذية، غير أن هناك عوامل اخري مؤثرة مثال مكونات البيئة المغذية، النوع النباتي المستخدم، الظروف المحيطة .. فقد يحدث تغير في عدد الكروموسومات في مرحلة مبكره خلال تكون الكالس، غير أن بعض الكالس المتكون من أنواع نباتية اخري يظل محتفظاً بصفاتة الوراثية بلا تغير لفتره قد تصل الي سنتين. بالرغم من المحاولات العديدة للحصول علي كالس نباتي يتكون من خلايا ذات تركيب وراثي متماثل، غير أن صفة التغير في التركيب الوراثي التي تلازم الكالس تعتبر عائقاً كبيراً للباحثين في مجال وراثة الكائن الحي وتربية النبات. تعتبر الأورام النباتية أحد أمثلة الكالس المتكون طبيعياً، ونظراً للأهمية العظمي لفهم سلوك الخلايا السرطانية فلقد اجري العديد من الأبحاث علي الأورام النباتية. أجريت الأبحاث علي ثلاثة أنواع من الأورام النباتية التي تختلف تبعاً للعامل المسببة لها فقد يكون المسبب بكتريا، فيروس أو تركيب وراثي.. بالرغم من اختلاف المسبب لحدوث هذه الأورام الثلاثة، غير أن هناك بعض الصفات والملامح التي تشترك فيها وهي

- لابد من حدوث جرح بالنسيج النباتي.
- يستمر النسيج السرطاني في النمو عند التطعيم علي نبات قوى.
- ينمو الكالس السرطاني علي بيئة مغذية خالية من الاكسين والسيتوكينين.

بهذا يمكن وصف الكالس السرطاني بأنه نسيج قادر علي الامداد الذاتي بالأكسين والسيتوكينين .

تختلف احتياجات الأنسجة المنزرعة المراد الحصول منها علي كالس في احتياجاتها من الأكسين والسيتوكينين، غير أننا سوف نتناول هذا الموضوع في صفحات تالية من هذا الفصل.

١ . مراحل تكون الكالس Stages for callus production

أشرنا من قبل بأنه هناك بعض العوامل التي تتحكم في نجاح تكوين الكالس علي الجزء النباتي المنزرع علي بيئة مغذية .. من أجل التعرف علي هذه العوامل فاننا يجب أولاً التعرف علي المراحل المختلفة التي تجري للحصول علي الكالس النباتي.

١ . ١ مصدر المادة النباتية Source of plant material

يتوقف مصدر المادة النباتية التي تستعمل علي الهدف من البرنامج الذى من أجلة يراد تكوين الكالس وهذا بالتالي مرتبط بالنوع النباتي المستخدم .. عموماً فان هناك أبحاث متعددة تشير الى أن النباتات الناتجة من البذرة هي أنسب مصدر للأستخدام في تكوين الكالس مقارنة بالنباتات الناتجة من الأكثار بواسطة الطرق الأخري للتكاثر الخضري. كما أشرنا من قبل فان النسيج البارنشيمي بالنباتات له المقدرة العالية علي الأنقسام نظراً لأنه يحوي خلايا غير متميزة، ويعتبر هذا

النسيج هو أفضل مادة نباتية للأستخدام من أجل انشاء الكالس، ومن أمثلة الأجزاء النباتية التي تحتوي علي كمية كبيرة من الخلايا البارنشيمية لب وقشرة السوق والجذور، الدرنات، طبقة الميزوفيل بالأوراق، أندوسبرم البذرة.

١. ٢ التطهير Disinfection

بمجرد أن يتم تحديد واختيار الجزء النباتي الذى يستخدم في تكوين الكالس فانه يجب أن يفصل من النباتات ويطهر السطح الخارجي ويزرع علي بيئة مغذية تحت ظروف معقمه .. من المعلوم أن السطح الخارجي للنباتات يحتوي علي العديد من الكائنات الحية الدقيقة التي يجب أن يتخلص منها قبل زراعة الجزء النباتي علي بيئة مغذية تحتوي مصدر للكربون والذى يعتبر هاماً لنمو وتكاثر الكائنات الدقيقة التي تؤثر في تكوين الكالس. أحياناً يضاف بعض المضادات الحيوية في البيئة المغذية لمنع نمو بعض أنواع البكتريا، غير أن المضادات الحيوية لها فترة تأثير تصيرة كما أن وجودها في البيئة المغذية قد يؤثر علي تكوين الكالس .. استخدام المضادات الحيوية يؤثر في أنواع محدودة من البكتريا تبعاً لنوع المضاد الحيوي المستخدم، ولهذا فان الأنواع التي لا تتأثر بالمضاد الحيوي تنمو وتتكاثر وتعيق تكرين الكالس. عموماً فانه هناك بعض المواد الكيميائية التي تستخدم بنجاح في تطهير السطح الخارجي للجزء النباتي المراد استخدامة لانتاج الكالس. يعتمد اختيار المادة الكيمائية وكذلك فترة التطهير علي مدي حساسية المادة النباتية المراد تعقيمها، كما أنه من الأمور الهامه عند تحديد نوع المادة المطهرة التي تستخدم التأكد من سهولة ازالة بقاياها من السطح النباتي قبل الزراعة علي بيئة مغذية حيث أن وجودها يؤثر في تكون الكالس.

هناك بعض المواد المطهرة الكيميائية التي تنحل وتصبح أقل ضرراً كما أنه يسهل غسلها من السطح النباتي، فمثلاً مادة هيبوكلوريت الصوديوم تنحل لتعطي الكلورين وهي المادة الفعالة في التطهير وهيدروكسيد الصوديوم وهذه يسهل التخلص منها بواسطة الغسل .. ويعتبر هيبوكلوريت الصوديوم المادة الشائعة الأستعمال في مجال زراعة الأنسجة النباتية وذلك لكفاءة تأثيرها علي الكائنات الحية الدقيقة وعدم تأثيرها علي النسيج النباتي. بالرغم من تعدد الطرق التي يمكن بها اجراء تطهير أسطح الأجزاء النباتية المراد زراعتها، غير أنه من المفضل استخدام جزء نباتي خالي من الكائنات الدقيقة، ويمكن الحصول علي نبات كامل معقم وذلك بواسطة تطهير السطح الخارجي للبذور وزراعتها في جو معقم وبهذا نحصل علي نبات كامل في ظروف معقمة ويستخدم أجزاء هذا النبات لتكوين الكالس.

١. ٣ فصل الجزء النباتي Isolation of explant

يتم فصل الجزء النباتي المراد زراعتة علي بيئة مغذية بواسطة مشرط أو اسطوانة أنبوبية مجوفة اذا اريد الحصول علي نسيج داخلي محدد كما في حالة الجزر. عندما يراد الحصول علي عدد كبير من الأجزاء النباتية المتشابهة في الحجم فانه يوضع ورقة رسم بياني مدرجة أسفل الطبق الزجاجي الذى يجري فيه تقطيع الجزء النباتي الي أجزاء متساوية .. عموماً فانه يراعي عند تقطيع الأجزاء النباتية ألا يزيد حجم كل قطعة عن ٥ملليمتر حيث أن الزيادة في الحجم تزيد من فرصة التلوث، رغم أنها تزيد سطح تلامس الجزء المجروح مع البيئة المغذية. يعتمد تكوين الكالس أساساً علي تنشيط انقسام الخلايا النباتية في الجزء المجروح

الملامس للبيئة المغذية، حيث وجد أنه هناك بعض المواد التي تنتج من السطح المجروح للنسيج النباتي، هذه المواد لها دور منشط في انقسام الخلايا وتكوين الكالس .. بهذا فانه من المرغوب فيه تعريض أكبر قدر من النسيج المجروح الذى ينتج هذه المواد المنشطة للبيئة المغذية لتنشيط تكوين الكالس. يستخدم غالباً بيئة صلبة تحتوي آجار بهدف تشجيع تكوين الكالس، استعمال بيئة سائلة يؤدى الي التأثير علي معدل التبادل الغازى الذى بدوره يؤدى الي التأثير علي معدل تكوين الكالس .. بالرغم من أنه من المعتاد أن يوضع الجزء النباتي المنفصل من الساق في وضع افقى علي البيئة المغذية الصلبة غير أنه يفضل دائماً غرس جزء الساق في الوضع الرأسي السليم وهذا بهدف تنشيط استمرارية تدفق الأكسين والمواد الكربوهيدراتية في الأتجاه الطبيعي لها.

قد تبدو خلايا النسيج النباتي المنزرع متشابهة، غير أنه قد يكون هناك اختلاف في محتوي الخلايا من المادة الوراثية الناتجة من التضاعف الداخلي الذاتي للكروموسومات .. ويمكن القول أنه يتكون كالس يحتوي خلايا متماثلة التركيب الوراثي عندما يستخدم نسيج نباتي يحتوي خلايا متشابهة، وعلي العكس من هذا فانه يتكون كالس خليط الصفات الوراثية عندما يستخدم نسيج نباتي به خلايا غير متماثلة التركيب الوراثي. هنا يجب الأشاره الي أنه نتيجة للفرصة العالية لحدوث تغيير في الصفات الوراثية نتيجة للزراعة في بيئة مغذية، فان الكالس المتماثل التركيب الوراثي قد يفقد هذه الصفة بعد فترة من الزراعة.

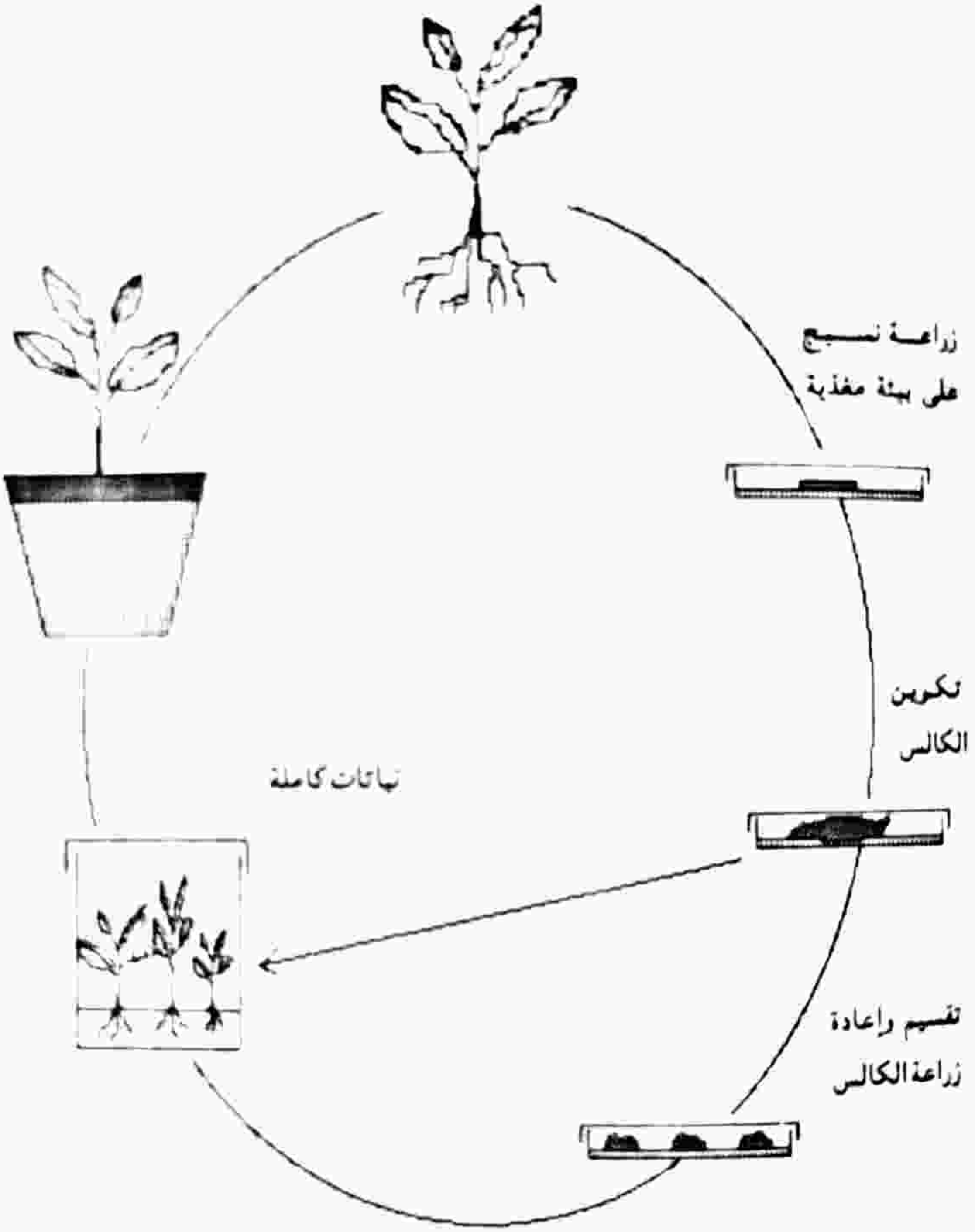
١. ٤ البيئات المغذية Nutrient media

يحتاج تنشيط تكوين الكالس من الخلايا البارنشيمية الي توفير بعض العوامل

البيئية التي تؤدي الي تحول الخلية الي الحالة المرستيمية والقدرة علي الأنقسام الميتوزى المتتابع .. لهذا يعتبر توفير البيئة المغذية التي تحتوي علي الهرمونات المناسبة من أهم العوامل المؤثره في تكوين الكالس، مما لاشك فيه أن هناك عوامل اخري تشمل الحرارة، الرطوبة، الأضاءة وهذه تلعب دوراً هاماً في تكوين الكالس.. بالرغم من تعدد البيئات المستخدمة لأنتاج كالس، غير أنه هناك بيئتين أكثر شيوعاً للأستخدام في هذا الغرض وهما بيئة Murashige & Skoog (1962) وبيئة Gamborg et al. (1968). ويعتبر الأختلاف بين هاتين البيئتين في محتواهما من النيتروجين والفوسفور، ومن أجل تنشيط تكوين الكالس فانه يفضل اضافة ٥-١٥٪ من السائل الجنيني لثمار جوز الهند الغير ناضجة، كما أنه يضاف بعض منظمات النمو بالتركيز الذى يتناسب مع النوع النباتي والجزء النباتي المنزرع .. قد يتحول لون الجزء النباتي المنزرع الي اللون البني نتيجة للأكسدة في مناطق الجروح، لتفادي هذا فانه يزاد مستوي الهرمونات والسائل الجنيني في البيئة المغذية، كما أنه قد يضاف بعض المواد التي تمنع عمليات الأكسدة مثل حمض الأسكوربيك. من أجل الحصول علي كالس فانه يجري تحضين الزراعات علي حرارة بين ٢٢-٢٨ درجة مئوية، ويراعي أن يكون الجو المحيط بالنسيج النباتي مشبعاً بالرطوبة .. يتكون الكالس في الظلام وفي درجات الأضاءة المنخفضة.

١. ٥ نشوء الكالس Callus formation

عندما تتاح الظروف المناسبة لتكوين الكالس التي تشمل البيئة المغذية التي تحتوي تركيزات ملائمة من منظمات النمو فانه يبدء ظهور الكالس علي الجزء النباتي المنزرع بعد حوالي ٣-٤ أسابيع من الزراعة (شكل ٥) .. يختلف مظهر الكالس



شكل (٥) رسم توضيحي يبين مراحل تكوين الكالس من جزء نباتي منزرع على بيئة مغذية وانتاج نباتات كامله علي الكالس المتكون.

تبعاً للنوع النباتي وتبعاً لوضع الخلايا البارنشيمية علي الجزء النباتي المنزرع. قد يحتفظ النسيج النباتي الداخلي بصفاتة المميزة له ويتكون الكالس من انقسام الخلايا الخارجية، وقد تشارك كل خلايا النسيج المنزرع في تكوين الكالس. كما أشرنا من قبل فانه قد يتكون كالس نباتي ذات لون أخضر نتيجة للتحضين في الضوء ويتكون الكلوروفيل بداخل الكلوروبلاست الذى يعطي اللون الأخضر .. كما لوحظ في بعض الأحيان انه قد يتكون جذوراً علي الكالس المتكون علي بيئة مغذية، ويمكن أن تمنع هذه الظاهرة بواسطة تعديل نسبة منظمات النمو المضافه الي البيئة المغذية.

١. ٦ اعادة زراعة الكالس Callus subculture

يترك الكالس لينمو حتي يصل قطره حوالي ٢-٣ سم، عندها يفصل الكالس ويجزأ إلي قطع صغيرة وهذه بدورها تزرع علي بيئة مغذية حديثة التحضير .. في حالة وجود تباين مظهري في الكالس المتكون فإنه يفضل أن يؤخذ الكالس الاسرع نمواً وذلك بهدف إكثاره بواسطة التجزئة والزراعة علي بيئة حديثة التحضير. غير أننا يجب هنا أن نشير الي أن أختيار الكالس لهدف الاكثار يتوقف علي النوع النباتي المستخدم وعلي الملاحظة الدقيقة والتعرف علي الكالس الذي له المقدرة علي تكوين النباتات الكاملة .. كما أشرنا من قبل فإنه قد يحدث إختلافات في المادة الوراثية للخلايا التي تكون الكالس، وهذا قد يؤدي إلي تكون كالس يحتوي تركيب وراثي مغاير للنسيج الام. علي الرغم من أن تكون كالس متباين التراكيب الوراثية تعتبر صفة غير مرغوبة للباحثين في بعض مجالات العلوم الوراثية التي تتطلب توافر مادة وراثية متجانسة، غير أن هذا التباين الوراثي

يعتبر مادة جيده لتحسين النباتات بواسطة إنتقاء الصفات الجيده والمرغوب فيها Ellis (1982), Heinz & Mee (1971).

١. ٧ المحافظة علي الكالس Callus maintenance

عندما يترك الكالس لعدة أسابيع بدون النقل إلي بيئة محضرة حديثاً فإنه يظهر عليه بعض أعراض التقدم في العمر. هذه تشمل التلون باللون البني والموت الموضعي لبعض مناطق الكالس وتوقف النمو وأخيراً جفاف وفقدان الكالس.. تحدث هذه الظاهرة نتيجة لأحد أو أكثر من الأسباب التالية

- أستهلاك العناصر المغذية من البيئة.
- صعوبة الاستفادة من العناصر المغذية.
- تبخر المياه من البيئة الذي يؤدي بدوره إلي زيادة تركيز بعض مكونات البيئة المغذية.
- إنتاج بعض المواد الكيميائية وتراكمها في البيئة المغذية والتي قد يكون لها تأثير مثبط أو سام علي نمو الكالس.

لهذه الاسباب فإنه يفضل أن ينقل الكالس إلي بيئة مغذية حديثة التحضير علي فترات متتالية، يعتمد تحديد الفترة التي ينقل بعدها الكالس إلي بيئة حديثة علي معدل نمو الكالس، النوع النباتي المستخدم، طبيعة النمو.. غير أنه ينصح عموماً بنقل الكالس علي فترات تتراوح بين ٤-٦ أسابيع من الزراعة. وبهذا يمكن المحافظة علي إستمرارية نمو الكالس. أمكن الاحتفاظ بالكالس المتكون من زراعة أجزاء نباتية من سلالات نبات فول الصويا لمدة ١٥ عاما. عموماً فإن أنسب درجة حرارة يجري التحضين عليها للمحافظة علي الكالس هي ٢٤ درجة مئوية. بعض

الباحثين يلجأ إلي الاحتفاظ بالكالس بدون نقل علي بيئة حديثة التحضير علي حرارة منخفضة ما بين ٦-١٠ درجة مئوية وذلك لمده قد تصل الي ستة أشهر. مما لاشك فيه أن الحرارة المنخفضة تؤدى الي قلة نشاط الخلايا وانخفاض معدل الانقسام وبالتالي فانه يمكن للكالس أن يبقي بدون الحاجة الى نقل لفتره أطول، غير أن اطالة فترة الزراعة علي نفس البيئة المغذية قد يؤدى الى فقدان حيوية الكالس المنزرع. من الناحية العلمية فأنه يفضل عدم الاحتفاظ بالكالس لفترة طويلة ويفضل أن يجرى انشاء كالس جديد من الأجزاء النباتية، هذا لأنه كلما طالت فترة الأحتفاظ بالكالس كلما زادت الفرصة لحدوث تغير وراثى في المادة النباتية، وهذه بدورها غير مرغوب في حدوثها في بعض التجارب أو عمليات الاكثار .. علي الجانب الآخر فإن التغير في الصفات الوراثية للكالس يعتبر أمراً هاماً ومرغوباً للباحثين في مجال تحسين النباتات بواسطة الانتخاب الفردي، وهذا سوف يتم تناوله في فصل كامل منفرد في هذا الكتاب.

٢ طرق الزراعة Culture techniques

لا تختلف الطرق المستخدمة لزراعة أجزاء النبات بهدف أنتاج كالس عن طرق زراعة نسيج نباتي ما لهدف آخر .. بالرغم من أن الاساس في هذه الطرق يعتبر مشتركاً، غير أن هناك بعض النقاط الذي يجب أن نشير إليها في هذا الفصل من الكتاب والخاص بإنتاج الكالس والمحافظة علية .. تستخدم مختلف البيئات لتشجيع تكوين الكالس، فقد تستخدم بيئة صلبة، سائلة، ساكنة، سائلة متحركة.

[illegible stamp]

٢. ١ البيئة الصلبة Solid medium

يعتبر أستخدام البيئة الصلبة لإنتاج الكالس أبسط الطرق وأقلها تعقيداً. يستخدم الآجار او الجيلاتين بهدف تحويل البيئة السائلة إلي الصورة الصلبة .. بالرغم من سهولة استخدام البيئة الصلبة في انتاج والمحافظة علي الكالس، غير أنه في بعض التجارب الخاصة بالتغذية والبناء الحيوي فإنه يفضل أستخدام البيئة السائلة للأسباب التالية

- عندما يزرع نسيج نباتي علي بيئة مغذية صلبة فإنه يكون هناك تلامس بين سطح واحد من النسيج المنزرع مع البيئة المغذية، بهذا فإنه من المتوقع أن يكون هناك أستجابة مختلفة لمعدل النمو في النسيج وهذا يرجع الي عدم إنتظام توزيع العناصر المغذية بين خلايا النسيج المنزرع.
- عدم إنتظام توزيع الغازات بين النسيج المنزرع والجو المحيط، وهذا يرجع لتلامس سطح واحد فقط من النسيج للبيئة المغذية الصلبة.
- تتركز المواد المثبطة أو السامة المنتجة بواسطة النسيج المنزرع نفسة في المنطقة من البيئة المغذية المحيطة بالنسيج ولا يحدث لها إنتشار في البيئة وبالتالي قد تسبب أضرار بالنسيج النباتى.
- في حالة أستخدام البيئة الصلبة فإن النسيج المنزرع والكالس المتكون يخضع لقانون الجاذبية، وبهذا فإنه يجب أن يراعي زراعة النسيج في الوضع الذي يلائم عدم الأخلال بالقطبية بداخل النسيج النباتي .. وذلك للحصول علي نتائج مرغوبة في وقت قصير، غير أنه في كثير من الاحيان يصعب المحافظة علي النسيج المنزرع في الوضع المناسب لفترة طويلة.

بالرغم من وجود العديد من السلبيات التي تلاحق إستخدام البيئة الصلبة من أجل

إنتاج الكالس، غير أنها تعتبر أفضل أنواع البيئات التي تستخدم من أجل المحافظة علي الكالس المتكون كما أنها ما تزال تستخدم في العديد من التجارب العلمية.

٢. ٢ البيئة السائلة الساكنة Stationary liquid medium

أستخدام البيئة السائلة الساكنة لإنتاج الكالس لها نفس مزايا البيئة الصلبة، بل أنه يضاف إلي هذا أنه بإستبعاد الآجار أو المادة التي تعطي الصلابة للبيئة فإنه يتخلص من المواد الشائبة الغير معروفة والمجهول تأثيرها علي نمو الخلايا النباتية .. وبهذا يمكن إجراء تجارب تغذية النبات بصورة أدق عنها علي البيئة الصلبة. في هذه الطريقة فإنه يتم ثنى ورقة ترشيح وتوضع في أنبوبة الأختبار علي أن يكون ثلثيها مغموساً في البيئة المغذية والثلث العلوي معرضاً للهواء الداخلي بأنبوبة الاختبار .. يوضع النسيج النباتي علي قمة ورقة الترشيح وبهذا تظل معرضة للهواء ويسهل التبادل الغازي، وفي ذات الوقت تعمل ورقة الترشيح علي إمداد النسيج بالعناصر المغذية من البيئة السائلة بواسطة التشرب والانتشار. عموماً فإن هذه الطريقة ليست شائعة الاستعمال في الوقت الحالي حيث أنه يفضل أستخدام طريقة الزراعة في بيئة سائلة متحركة.

٢. ٣ البيئة السائلة المتحركة Agitated liquid medium

في هذه الطريقة يتم التغلب علي العديد من عيوب الزراعة في بيئة سائلة ساكنة حيث أن الزراعة في بيئة مغذية متحركة تعمل علي

- تسهيل التبادل الغازي بين الجزء النباتي المنزرع والجو المحيط وبالتالي تنتج

كفاءه عالية في التنفس.

- إزاله تأثير الجاذبية علي النسيج المنزرع .

- توزيع العناصر المغذية بالتساوي علي جميع أجزاء النسيج النباتي المنزرع.

وتقسم طريقة الزراعة في بيئة سائلة متحركة إلي إحدي الطرق التالية تبعاً لكيفية غمس النسيج في البيئة.

٢. ٣. ١ الغمر المستمر Continuous immersion

في هذه الطريقة يصبح النسيج المنزرع ملامس للبيئة المغذية بصفة دائمة مع استمرار تحريك أو هز البيئة .. يراعي في هذه الطريقة أن يتم تحديد حجم البيئة المستخدم بدقة حتي يتوافر الهدف المطلوب وهو استمرار ملامسة النسيج النباتي للبيئة المغذية مع التأكد من توفير التهوية المناسبة للنسيج. عادة تجري هذه الطريقة بزراعة النسيج في دورق معياري يحتوي حوالي ٢٠٪ من حجمة بيئة مغذية سائلة، يوضع الدورق في جهاز الهز الدوراني ويضبط علي سرعة ما بين ٥٠-١٠٠ لفة/دقيقة، عادة ماتحفظ هذه الزراعات في الظلام علي حرارة ٢٥ درجة مئوية .. يمكن أيضاً استخدام مغناطيس صغير لتقليب البيئة المغذية، وفي هذه الحالة فانه يوضع ١٥ ملليمتر من البيئة المغذية في دورق مخروطي سعة ١٥٠ ملليمتر، وهذه توضع علي جهاز التقليب الذى يضبط علي سرعة ٢٥٠ لفة/دقيقة.

٢. ٣. ٢ الغمر المتقطع Periodic immersion

أهم مزايا هذه الطريقة أن النسيج المنزرع يقضي فترة زمنية مغموراً بالبيئة المغذية،

وفتره أخري مثيله لها معرضاً للهواء .. ويستخدم لهذا جهاز خاص يعتمد علي تثبيت الأنابيب الزجاجية علي قرص يدور ببطيء بحيث يسمح بتبادل الغمر والتعريض للهواء المحيط في دورة واحدة. هنا يجب أن نشير الي أنه بهذه الطريقة أمكن للعلماء Steward et al. (1952) من اثبات ولأول مره أنه يمكن الحصول علي نبات كامل من خلية نباتية واحدة، وهذا يذكرنا بالعالم Haberlandt الذى وضع أساس هذه النظرية في سنة ١٩٠٢ غير أنها لم تثبت معملياً حتي سنة ١٩٥٢.

٣. تعليق عام علي تكوين الكالس General comment on callus initiation

في نهاية هذا الفصل من الكتاب فانه يمكن القول أن انتاج الكالس، يتوقف علي عديد من العوامل التي تشمل طبيعة النسيج النباتي المستعمل، طول فترة الزراعة، مدي توفر الأجهزة المعملية، الهدف من التجربة. تكوين الكالس علي الأجزاء النباتية المنزرعة علي بيئة مغذية ما هو الا خطوة وسطية من أجل انتاج نباتات كاملة أو توفير مادة نباتية مناسبة لاجراء الأبحاث في المجالات المختلفة .. نقل الكالس الي بيئة مغذية ذات تركيب هرموني ينشط تكون الأفرع والجذور وذلك لهدف الحصول علي نباتات كاملة، أو ينقل الي بيئة مغذية سائلة بهدف انشاء معلقات الخلايا وهذه سوف نتناولها بالتفصيل في الفصل التالي من هذا الكتاب.

٨

معلقات الخلايا

Cell suspensoin

معلقات الخلايا هي عباره عن خلايا منفصله أو متجمعه تنمو وتنقسم في بيئة مغذية سائله تحت ظروف معقمة. نظراً لانقسام الخلايا في البيئة المغذية فانها تزداد في العدد خاصة في بداية اعداد المعلق .. ثم تقل الزيادة تدريجيا حتي تصل الي مرحلة الثبات حيث يصل عدد الخلايا بالبيئة الى الحد الأقصي لها .. غير أنه يمكن اعادة هذه الدورة مرة اخري بواسطة نقل جزء من هذا المعلق الي بيئة حديثة والتحضين في نفس الظروف السابقة، وبهذا يمكن القول أنه يمكن اكثار المعلق الخلوي بشكل دوري.

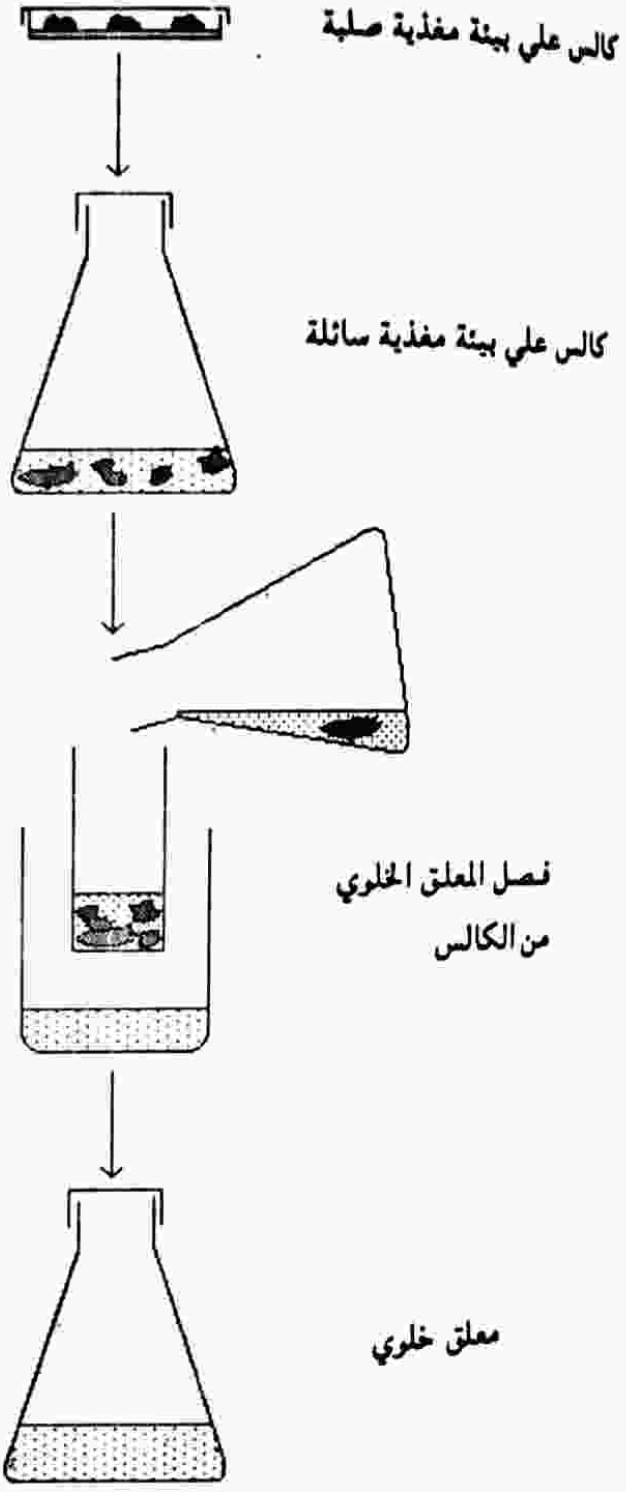
١ أهمية معلقات الخلايا Significance of cell suspension

تعتبر معلقات الخلايا ذات أهمية خاصة للباحثين في مجالات عديدة مثل الكيمياء الحيوية، الهندسة الوراثية، بيولوجيا الخلية .. وغيرها من فروع العلوم المختلفة. ترجع هذه الأهمية الي أنها توفر ماده نباتية متجانسة تنمو وتنقسم فس ظروف محكمة وفي جو معقم .. وبهذا فانه يمكن دراسة تأثير بعض المواد الكيميائية علي الخلايا بالمعلق، كما يمكن دراسة دورة حياة الخلية بدقة عالية. تستخدم معلقات الخلايا أيضاً لدراسة الطرق المختلفة التي من خلالها يتم انتاج مواد ثانوية والعلاقة

بين النشاط الأنزيمي والتعبير الجيني للخلية.

٢ انشاء المعلق الخلوى Initiation of cell suspension

هناك طرق متعددة يمكن بواسطتها انشاء المعلق الخلوي، ويعتبر استخدام الكالس لتكوين المعلق الخلوي أبسط الطرق وأكثرها انتشاراً ويطلق عليها أيضا الطريقة غير المباشرة .. عندما يتكون كالس ذات حجم مناسب فانه ينقل الي بيئة مغذية سائلة وهذه بدورها توضع علي جهاز ذو حركة دائرية لتسهيل انفصال الخلايا بعضها عن البعض وبالتالي تكوين المعلق الخلوي (شكل ٦). يمكن أيضاً استخدام أعضاء البادرات الصغيرة والأجنة المختلفة لتكوين المعلق الخلوي، وفي هذه الطريقة يجري تفتيت النسيج النباتي وينقل ناتج التفتيت الذى يحتوي خلايا حية سليمة، خلايا غير حية، بقايا النسيج المتفتت الي بيئة مغذية سائلة متحركة، وهذه تحضن علي درجة حرارة مناسبة وهذه يطلق عليها الطريقة المباشرة.. بعد مرور فترة زمنية مناسبة يتم فيها الأكثار الخلوي بواسطة الأنقسام المتعدد للخلايا الحية، ينقل جزء من البيئة المغذية التي تحتوي مزيج الخلايا وبقاياها الي بيئة حديثة التحضير وذلك لزيادة تنشيط الأنقسام الخلوى. يفضل أن تمرر البيئة المغذية المحتوية علي الخلايا وبقايا الأنسجة النباتية علي فلتر ذات ثقوب تسمح بمرور الخلايا المنفصلة الصغيرة فقط، وبهذا فانه يمكن التخلص من بقايا الأنسجة ذات الحجم الكبير من البيئة المغذية .. في حالة عدم توفر فلتر مناسب فانه يفضل أن تترك البيئة المغذية ساكنة عدة ثوان حتي تترسب بقايا الأنسجة الكبيرة الحجم، ثم يؤخذ حجم من البيئة المغذية من الجزء العلوى الذى يحتوى خلايا منفصلة وتنتقل الي البيئة المحضرة حديثاً. مع التقدم في دراسة و استعمال المعلقات الخلوية في مجالات متعددة،



شكل (٦) خطوات انشاء المعلق الخلوي من الكالس المتكون علي بيئة مغذيه .

ظهرت أنواع عديدة من الأجهزة التي تستخدم لتوفير الحركة الدائمة للمعلق الخلوى .. عموماً فان الهدف الأساسي من استمرار حركة المعلق الخلوى توفير ظروف أفضل للتبادل الغازى بين الخلايا المنزرعة في بيئة مغذية وبين الجو المحيط. يعتبر تحريك البيئة المغذية هاما أيضا في المحافظة علي التوزيع المتجانس لخلايا المعلق في البيئة المغذية السائلة. عموماً فانه ينصح دائما بتجديد انشاء المعلق الخلوى علي فترات زمنية ليست بعيدة، هذا يرجع الي أن الأحتفاظ بالمعلق الخلوى لفترة زمنية طويلة يؤدي الي حدوث تغيير في التركيب الوراثي لبعض الخلايا .. هذه التغييرات ترجع أساساً الي التغيير في عدد الكروموسومات أو التغيير في بعض الجينات الوراثية التي تقع علي الكروموسومات .. ونظراً لأنه من الصعوبة التعرف وفصل هذه الخلايا من المعلق الخلوى، ينصح بتجديدة علي فترات مناسبة. بعد التعرف علي هذه الحقائق فانه يمكن تعريف المعلق الخلوى النموذجي لاجراء الدراسات البيولوجية علي أنه مجموعة الخلايا المنفصلة التي تكون المعلق والتي تتماثل في الصفات المورفولوجية والكيميائية والوراثية.

٣ نظم الزراعة Culture system

كما أشرنا من قبل أن الأهمية العظمي للمعلقات الخلوية أدت الي التنافس بين العلماء الي ايجاد أفضل وسيلة لانشاء والمحافظة علي المعلق الخلوي .. هذا التنافس أدي الي التطوير المستمر للنظم التي اعتاد استخدامها في هذا الغرض. هنا يجب الأشاره الي أن نظم زراعة المعلقات الخلوية التي تستخدم حديثاً في معامل متعددة ما هي الا تطوير للنظم القديمة التي صممت في مراحل مبكرة من بداية هذا العلم. نظراً للتنوع الواسع في النظم الحديثة، وحيث أننا لسنا بصدد

عرض مصادر التنوع والأختلاف بينها ، فاننا سنتناول بعض الملامح الأساسية التي بنيت عليها بعض نظم الزراعة.

٢. ١ جهاز ستيوارد Steward apparatus

جهاز ستيوارد يعتبر من الأجهزة التي صممت مبكراً خصيصاً لتنشيط نمو وتكشف أجزاء من جذور نبات الجزر ولقد اطلق اسم ستيوارت علي الجهاز تخليداً لاسم العالم الذي صممه .Steward et al. (1952) يحتوى هذا الجهاز على أنابيب للزراعة طول كل منها حوالي٥ر١٢سم وقطرها حوالي ٥ر٣سم وتقع فتحة الأنبوبة في موضع وسطي، وبهذا يكون طرفي الأنبوبة مغلقتان .. تثبت الأنابيب علي المحيط الخارجي لقرص دائري، الذي يتحرك بدوره حول المحور المركزي بزاويه مائلة علي المحور الأفقي مقدارها ١٠-١٢ درجة .. تتسع الأنبوبة لحوالي ١٠ملليمتر من البيئة المغذية، تتحرك البيئة المغذية من أحد طرفي الأنبوبة الي الطرف الآخر ببطىء ونتيجة لهذه الحركة المتكررة يتعرض الجزء النباتي المنزرع لكل من البيئة المغذية والهواء بالتناوب. يوضع جهاز ستيوارت كاملاً في غرفة تحضين علي حرارة مناسبة وكثافة ضوئية ملائمة وذلك حسب احتياجات النسيج النباتي المستخدم. في مرحلة لاحقة قام العلماء ، Steward & Shantz (1956) بتطوير الجهاز وذلك باستبدال الأنابيب بدوارق تتسع لحجم أكبر من البيئة المغذية والتي صممت بحيث تعطي كفاءه أعلي في التبادل الغازى .. مع استعمال الجهاز الجديد الذي صمم خصيصاً لنمو جذور الجزر، لوحظ أنه بعد فترة زمنية من الزراعة يتحول شكل البيئة الي الصورة المعتمة قليلاً ويرجع هذا الي انفصال بعض الخلايا من الجزء النباتي المنزرع .. ونتيجة لانقسام الخلايا وزيادة عددها تتحول البيئة المغذية الي الشكل المعتم.

عندما ينقل جزء من هذه البيئة الي بيئة مغذية محضرة حديثاً فانه يمكن تنشيط نمو وانقسام الخلايا لتكوين المعلق الخلوى.

٣. ٢ جهاز الحركة الدائرية Orbital shaker

تعتمد فكرة هذا الجهاز علي توفير الحركة الدائرية المستمرة للبيئة المغذية التي تحتوي قطع من الأنسجة النباتية .. كان أول من استخدم هذه الوسيلة للحصول علي معلق خلوي هو العالم Muir (1953) بعدها انتشرت هذه الطريقة لانشاء وتكوين المعلق الخلوي في العديد من الأنواع النباتية المختلفة. نظراً للكفاءة العالية للحصول علي معلق خلوي بواسطة هذه الطريقة فنجد أنها مازالت تستخدم في وقتنا الحالي في العديد من معامل زراعة الأنسجة النباتية. من أهم مزايا هذه الطريقة أنه معها يمكن تحضير معلق خلوي ذات حجم يتراوح بين ١٠٠ ملليمتر الي ١٠٠٠ ملليمتر .. غالباً ما تحتوي هذه الاجهزة علي موضع للتحكم في سرعة الحركة الدورانية التي تتراوح ما بين ٣٠-١٥٠ لفة /دقيقة .. هنا تجب الأشاره الي أنه ليست هناك سرعة مثلي يمكن أن يوصي باستخدامها لتكوين المعلق الخلوي للأنواع النباتية المختلفة، ويعتمد تحديد السرعة المثلي علي العديد من العوامل التي تشمل نوع النسيج النباتي المستخدم، البيئة المغذية، الأناء المستخدم في الزراعة، حجم البيئة المغذية مقارناً بحجم الجزء النباتي وحجم الأناء المستخدم.. عموما فانه ينصح باستخدام حجم من البيئة المغذية مقداره ٢٠-٢٥ ملليمتر مع دورق سعتة ١٠٠ ملليمتر أو يستخدم ٧٠ ملليمتر بيئة مغذية في دورق سعته ٢٥٠ ملليمتر.

٣. ٣ جهاز اللف المحورى Spinning apparatus

يستخدم في هذا النظام زجاجات بيركس سعة ١٠ التر، توضع في كل منها ٥ر٤لتر من البيئة المغذية .. تثبت زجاجات الزراعة في جهاز اللف المحوري الذى يميل علي الخط الأفقي بزاوية مقدارها ٤٥درجة، ويمكن التحكم في سرعة اللف ما بين ٨٠-١٢٠ لفة/دقيقة . أجري وصف هذا الجهاز بالتفصيل لأول مره بواسطة العالم Lamport (1964) وللمزيد من المعلومات عن هذا الجهاز فانه ينصح بالرجوع الي المقال المنشور.

لاتختلف كفاءة هذه الطريقة عن سابقتها التي يستخدم فيها الجهاز ذو الحركة الدائرية حيث وجد أن معدل نمو ا لخلايا والحصول علي الخلايا في حجم معلوم من البيئة المغذية يتشابة في الطريقتين، وبهذا فانه يتضح أن من أهم مزايا هذه الطريقة هو امكانية استخدام حجم أكبر من البيئة المغذية لتحضير المعلق الخلوي.

٣. ٤ جهاز التقليب والزراعة المستمرة

Stirred and continuous culture system

لهذا النظام في زراعة معلقات الخلايا مزايا عديدة غير أن أهم ما يميزه هو امكانية استخدام حجم كبير من البيئة المغذية يصل الي ١٠ الترات .. في هذا النظام أيضاً يمكن المحافظة علي الخلايا موزعة بشكل متجانس في البيئة المغذية، كما يمكن توفير كفاءة عالية في التبادل الغازي وذلك بواسطة دفع الهواء المعقم بالبيئة المغذية السائلة أو بواسطة إجراء التقليب المستمر بالساق المغناطيسي أو الأثنين معا Wilson et al. (1971), Kurz (1971). نظراً لأن الزجاجات التي تحتوي المعلق الخلوى تظل ثابتة وليست متحركة، فانه يسهل امدادها بأجهزة اخري لقياس معدل

نمو الخلايا، توفير التهوية المناسبة، الامداد ببيئة حديثة التحضير، جهاز تسخين لتوفير الحرارة الملائمة للمعلق الخلوي .. وبهذا يمكن القول أن هذا النظام يمكن تحويله الي نظام للأمداد الدائم والمستمر بالمعلق الخلوى كما أنه يوفر المزايا التالية

- تقل أو تنعدم تماماً أى فرصة للتلوث نظراً لعدم الحاجه الي فتح الأناء الذى يحتوى المعلق الخلوى.

- هذه الطريقة لايستعمل فيها أجهزة لتوفير الحركة الميكانيكية مقارنة بالطرق الأخرى وبالتالي تصبح أقل تعقيداً وينعدم فرصة حدوث فشل ميكانيكي نتيجة فترة التشغيل الطويلة.

- من خلال التحكم في أجهزة معاونة فانه يمكن التحكم في درجة الحرارة، معدل التهوية، سرعة التقليب، الأضاءه، مستوي الهرمونات المضافة الي البيئة المغذية .. وغيرها من العوامل الهامة التى تؤثر في توفير أفضل ظروف لاستمرار الحصول علي معلق خلوى جديد. يجب هنا أن نشير الي أنه نظراً للأهمية الفائقة لنظام زراعات المعلقات الخلوية المستمر فلقد بذل ومايزال يبذل مجهوداً كبيراً لتطوير هذا النظام في العديد من معامل زراعة الأنسجة النباتية وسوف نكتفي هنا بما تم شرحه من الأساس النظري لنظام الزراعة المستمر لمعلقات الخلايا.

٤ البيـئـة المغـذية Nutrient medium

اختيار البيئة المغذية المناسبة هو أحد العوامل الهامه التى تؤثر مباشرة في نجاح زراعة المعلق الخلوى .. كثير من الباحثين خاصة البادئين حديثاً يجدون صعوبة في تحديد البيئة الملائمة .. هذا يرجع الي وجود أعداد هائلة من البيئات المغذية التي تستخدم في زراعة الأنسجة النباتية. عموماً فانه ينصح دائماً بالرجوع الي الأبحاث

العلمية المنشورة ومحاولة الحصول علي بيئة مغذية ملائمة، غير أنه يجب أن يؤخذ في الأعتبار أن هناك فروقا بين البيئات المغذية .. فبالرغم من أن الخلايا المنزرعة تنمو وتنقسم في بيئة ما، تكون ملائمة لاستمرار النمو والأنقسام بالمعدلات الطبيعية إلا أن بيئة أخري قد تكون الأمثل لتنشيط النمو والأنقسام الخلوى، لهذا يجب محاولة الحصول علي أمثل وأحدث تركيب من البيئة المغذية لأنشاء وتكوين المعلق الخلوى. كثيراً من الباحثين يعتقد أن البيئة المغذية التي تستخدم لأنشاء والمحافظة علي الكالس قد تستخدم أيضاً وبنجاح في انشاء وتكوين المعلق الخلوى .. مما لاشك فيه أن احتياجات الخلايا النباتية النشطة والسريعة الأنقسام من العناصر المغذية خاصة الفيتامينات يختلف تماماً عن الخلايا الأقل نشاطاً والأقل في معدل الأنقسام، وانطلاقاً من هذا المفهوم فانه يصبح جلياً لدينا أن البيئة المغذية التي تستخدم لتكوين الكالس ليست بالضرورة أن تكون ملائمة لتكوين المعلق الخلوى من نفس الكالس. في حالة عدم امكانية الحصول علي بيئة مغذية مناسبة لأنشاء المعلق الخلوى فانه ينصح بتطوير البيئة المغذية التي تستخدم لنمو الكالس وذلك بواسطة تعديل ودراسة تأثير بعض مكونات البيئة علي نمو وشكل الكالس المتكون .. فمثلا منظما النمو الأكسين والسيتوكينين يعتبرا من العناصر الهامه والشائع استخدامها بتركيزات مختلفة من أجل تعديل شكل الكالس المتكون علي بيئة صلبة .. يعتبر التوصل الي بيئة مغذية تساعد علي نمو الكالس الهش ذو الخلايا سهلة الأنفصال خطوة أولية هامه لأنشاء المعلق الخلوى، يرجع هذا الي سهولة انفصال الخلايا عن بعضها البعض عند نقلها الي البيئة المغذية السائلة المتحركة الذى يعتبر أمراً حيوياً للنجاح في انشاء المعلق الخلوى. من الأمور الهامه والتي يجب عدم اغفالها عند تحضير البيئة المغذية لأنشاء المعلق الخلوى التغير الذي

[library stamp]

يحدث في تركيز أيون الهيدروجين بالبيئة وذلك نتيجة لوضع الكالس ونمو الخلايا بالبيئة . ونظراً لأن الخلايا النباتية تنمو بنشاط في مدي محدود من تركيز أيون الهيدروجين، وجب تصحيح التغيير الذى يحدث في البيئة المغذية حتي تصبح ملائمة لنمو المعلق الخلوى . هناك بعض المواد التي تضاف الي البيئة المغذية ولها دور في المحافظة علي ثبات تركيز أيون الهيدروجين مثل

- استخدام مادة اثيلين داي امين تتراستات (EDTA) تحافظ علي استمرارية توفر أيون الحديد والمساهمة في الأحتفاظ بالحاله المتعادلة للبيئة المغذية الصناعية Klein & Manos (1960).

- التوازن بين أيونات النترات والأمونيوم في البيئة المغذية يعتبر عامل هام في احتفاظ البيئة المغذية بالحالة المتعادلة.

- استخدام بعض المواد مثل كالسيوم داي هيدروجين اوروفوسفات، كالسيوم كربونات، كالسيوم فوسفات أثبتت كفاءة في ثبات درجة تركيز أيون الأيدروجين للبيئة المغذية التي تستخدم في زراعات معلقات الخلايا Sheat et al. (1959).

لقد أشرنا في الفصل السابق من هذا الكتاب الي أهمية نقل الكالس الي بيئة مغذية حديثة التحضير وذلك من أجل المحافظة علي النمو النشط لخلاياه، يعد السبب الرئيسي في هذا الي استهلاك العناصر المغذية من البيئة الملامسة مباشرة للكالس والي عدم انتشار العناصر المغذية من المناطق الأخري بالبيئة المغذية الصلبة الي المنطقة التي ينمو عليها الكالس. علي العكس من هذا فانه في زراعات معلقات الخلايا نجد أن العناصر المغذية المكونه للبيئة المغذية تصبح في متناول الخلايا التي تنشط وتنقسم بسرعة حتي تصل الي مرحلة الثبات، وفيها قد يصل الحجم الكلي للخلايا النباتية في المعلق الي حوالي ٤٠-٦٠٪ من حجم المعلق

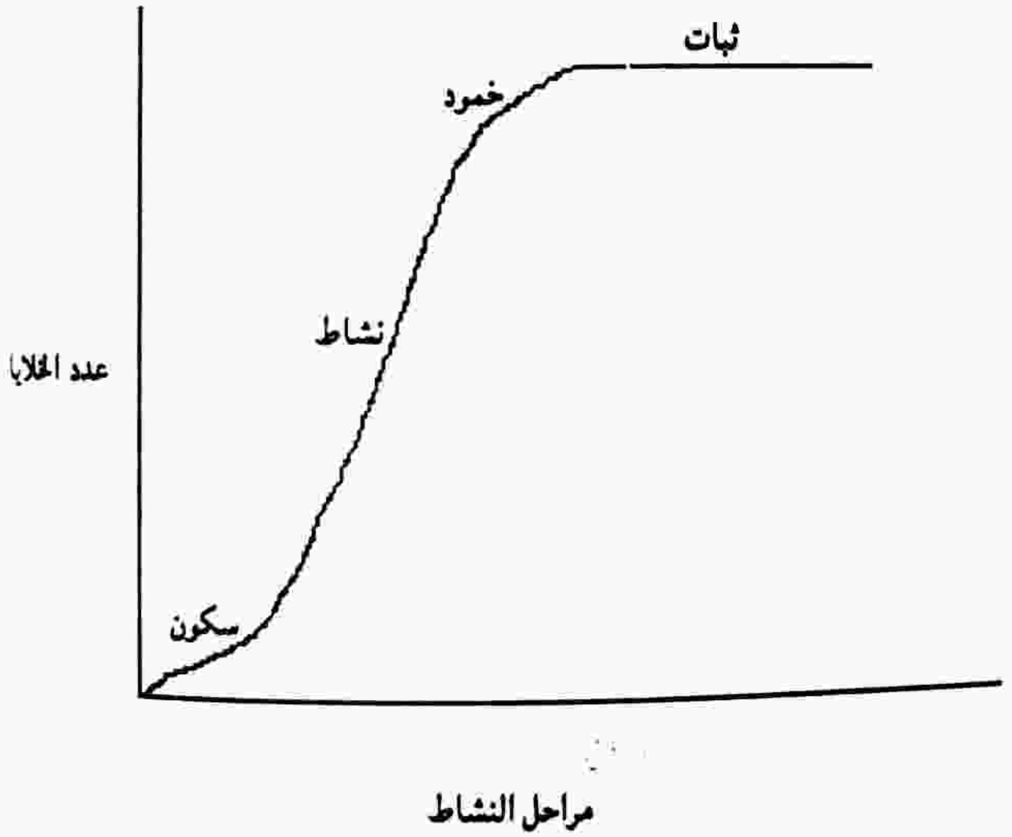
الخلوي. هنا يجب أن نشير الى أنه عندما تصل خلايا المعلق الي حالة الثبات فان هذا يعني الأستهلاك الشبه كامل للعناصر المغذية بالبيئة، بالتالي فانه لو تركت الخلايا لفترة أطول بدون نقل الي بيئة حديثة التحضير فانه يحدث انحلال فجائي للخلايا، وعلي النقيض من هذا فانه يمكن ترك الكالس لفترة طويلة علي نفس البيئة المغذية الصلبه دون أضرار جسيمة لخلاياه.

٥ نمو الخلايا والمحافظة علي المعلق الخلوي

Cell growth and maintenance of cell suspension

تمر الخلايا المكونة للمعلق الخلوي بغض النظر عن النوع النباتي، بعدة مراحل تطوريه مميزه لها .. تتميز المرحلة الأولي لأنشاء المعلق الخلوي بفترة سكون مؤقت يتلوها مرحلة النشاط والأنقسام السريع المتعدد وزيادة عدد الخلايا المكونة للمعلق .. يلي هذا فترة من الخمود التدريجى في النشاط والأنقسام حتي تصل الي المرحلة النهائية التي تتميز فيها بالثبات وعدم الزيادة في العدد (شكل ٧) .. كقاعدة عامة فانه عندما يصل المعلق الخلوى الي مرحلة الثبات يجب تجديد البيئة المغذية وذلك للمحافظة علي المعلق الخلوي.

من الأمور الهامه التي يجب أن تراعي بدقه ايضا أن يجري عمل اختبار لحيوية الخلايا في المعلق الخلوى قبل أن ينقل جزء من المعلق الخلوى الي بيئة حديثة التحضير بهدف استمرار المحافظة علي المعلق. الهدف من اجراء هذا الأختبار هو تحديد المرحلة الحاسمة التي يجب أن يجري عندها تجديد المعلق للمحافظة عليه، في هذه المرحلة يصل عدد الخلايا في حجم معلوم من المعلق الى أقصي معدل .. بعدها لايحدث زيادة في العدد بل قد يحدث أن تفقد بعض الخلايا حيويتها. أثبتت



شكل (٧) رسم توضيحي يبين منحي مراحل نمو ونشاط خلايا المعلق الخلوي في البيئة المغذية.

الأبحاث أن خلايا الأنواع النباتية المختلفة تتباين في طول الفترة التي يمكنها الأحتفاظ بحيويتها بعد أن تصل الي مرحلة الثبات .. في معنى آخر فان خلايا بعض الأنواع النباتية لها المقدرة علي الأحتفاظ بحيويتها لعدة أيام في المعلق الخلوي في مرحلة الثبات، غير أن البعض الآخر ليس له هذه المقدرة وتبدء الخلايا في فقدان حيويتها بمجرد الوصول الي مرحلة الثبات. مع بعض الأنواع النباتية يفضل تجديد المعلق الخلوى في مرحلة الأنخفاض التدريجي في النشاط والأنقسام التي تسبق مرحلة الثبات .. بينما مع البعض الآخر يفضل اجراء عملية التجديد في نهاية المرحلة النشطة للخلايا.

من هذا يتضح أنه من الضروري عند انشاء معلق خلوي لنوع نباتي ما بالمعمل وجوب اجراء اختبار لتحديد المرحلة المثلي التي عندها يتم تجديد المعلق الخلوي بنجاح كبير وذلك للمحافظة علي معلق الخلايا لفترة أطول بالمعمل .. هناك العديد من العوامل التي تؤثر في طول دورة المعلق الخلوي من مرحلة السكون حتي مرحلة الثبات وهذه تشمل كثافة الخلايا في مرحلة الأنشاء، طول فترة السكون، معدل نمو وانقسام الخلايا. عموما أثبتت التجارب العلمية أن المعلقات الخلوية للعديد من الأنواع النباتية المختلفة تتم دورتها في فترة تتراوح بين ٣-٤أسابيع .. عندما يراد تجديد المعلق الخلوي يؤخذ في الأعتبار أن نجاح تجديد المعلق يعتمد علي أن يكون عدد الخلايا في الدرجة المثلي، ويمكن التأكد من هذا بواسطة أخذ عينة من المعلق الخلوي واجراء اختبار لمعرفة عدد الخلايا في المعلق. بناء علي هذا الأختبار فانه يمكن تحديد الحجم الذى يؤخذ من المعلق للنقل الي حجم معلوم من البيئة المغذية حديثة التحضير للمحافظة علي المعلق الخلوي ..مراعاة استخدام أمثل كثافة خلوية عند تجديد المعلق الخلوى يؤدي الي اطالة مرحلة النشاط ويزيد من مقدرة الخلايا

علي النمو والأنقسام في بيئات مختلفة التركيب وتحت ظروف بيئية متباينة، علي النقيض من هذا فان انخفاض عدد الخلايا عن الدرجة المثلي تؤدي الي اطالة فترة خمود الخلايا وهذه قد تؤدي الي الفشل في المحافظة علي المعلق الخلوى.

٦ تكييف البيئة المغذية Conditioning of nutrient medium

المقصود بتكييف البيئة المغذية هو اجراء تعديل نظام زراعات المعلق الخلوي بالصورة التي تسمح بتوفير عامل أو أكثر من العوامل التي تساعد علي تجديد واعادة تكوين معلق خلوي جديد. يعتمد أساس تكييف البيئة المغذية علي ملاحظة أنه يمكن حث الخلايا علي الأنقسام النشط عند زراعتها في نظام يحتوي نسيج أو خلايا حاضنة مغذية حيث أن هذه الخلايا لا يمكنها النمو والأنقسام في غياب الخلايا الحاضنة .. هذا يعني أن الخلايا الحاضنة تفرز بعض المواد الغير معروفة الي البيئة المغذية، هذه المواد الهامه لنمو ونشاط الخلايا الأخري تنتشر في البيئة المغذية وبهذا تساعد في نجاح اعادة تكوين المعلق الخلوي نتيجة لدفع الخلايا للأنقسام النشط. لقد أمكن تعديل نظام زراعة المعلقات الخلوية وذلك بهدف استخدام بعض الخلايا لتكييف البيئة المغذية لتصبح مناسبة لنمو ونشاط خلايا اخرى .. تعتمد فكرة تعديل نظام الزراعة والتي فيها يجرى تكييف البيئة المغذية علي السماح لنوعية من الخلايا ذات الكثافة المختلفة في مشاركة واستخدام نفس البيئة المغذية لخلايا أخري بكثافة أقل مع الفصل بينهما بواسطة غشاء يسمح بمرور المواد التي تفرزها الخلايا ولكن لايسمح بمرور الخلايا نفسها. في هذا النظام بوضع المعلق ذات الكثافة العالية فى أنبوبة الزراعة التي توضع بدورها في دورق يحتوي علي بيئة مغذية تحتوي خلايا ذات كثافة منخفضة، يوضع الدورق كاملاً علي جهاز

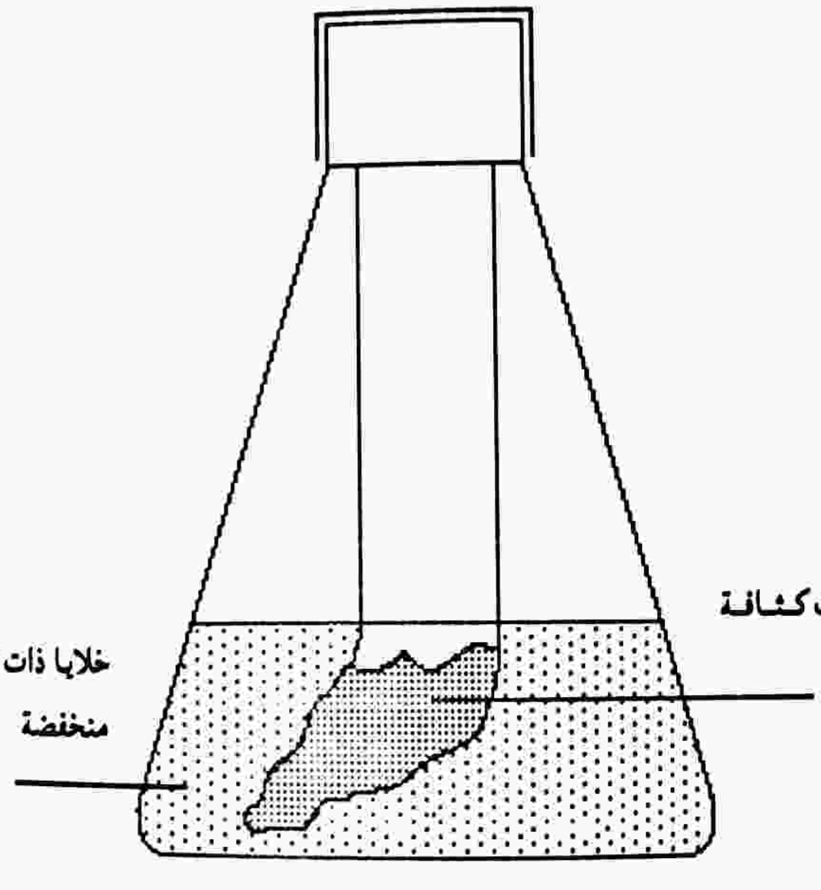
هزاز (شكل ٨) .. تفرز المواد المنشطة والتى تؤدى وظيفة تكييف البيئة المغذية من الخلايا المنزرعة بأنبوبة الزراعة ذات الكثافة العالية، وتنتقل هذه المواد بالأنتشار الي البيئة المغذية وتصبح ميسره للخلايا المنزرعة في الدورق ذات الكثافة المنخفضة، وبذلك تساعد نموها ونشاطها. هنا تجدر الأشاره الى أنه يجب ازالة أنبوبة الزراعة التي تحتوي خلايا ذات كثافة عالية وذلك عندما يمكن للخلايا ذات الكثافة المنخفضة من الوصول الي درجة من النمو والنشاط تؤهلها للأستمرار في الأنقسام .. استمرار أنبوبة الزراعة بالدورق يؤدى الي زيادة تراكم المواد المفرزه وقد تصل الي مرحلة تعمل علي تثبيط النمو بدلا من تنشيطه.

أثبتت بعض الدراسات أن خلايا نوع نباتي ما قد يستخدم لتكييف بيئة مغذية تحتوي خلايا نوع نباتي آخر، ووجد أن استخدام هذه الطريقة تؤدي الي زيادة النشاط الخلوي مقارنة بالطريقة التي يتم فيها استخدام نوع نباتي واحد.

٧ التجمعات الخلوية في زراعات المعلقات الخلوية

Cell aggregation in suspension cultures

مما لاشك فيه أن أفضل معلق خلوي هو الذي يحتوي علي خلايا مستقله ومنفصله كل عن الأخري وليس الذى يحتوي علي تجمعات خلوية وتراكيب متعددة الخلايا .. ويعتبر نوعية وطبيعة وشكل تطور الكالس المستخدم لإنشاء معلق خلوى عامل ذات أهمية قصوى في تحديد نوعية المعلق الخلوى ونسبة احتوائه علي خلايا متجمعة أو تراكيب متعددة الخلايا، كما أن البيئة المغذية ومكوناتها من أملاح معدنية، فيتامينات، منظمات نمو تلعب دوراً فعالاً في تحديد نوعية المعلق الخلوى .. فمثلاً لوحظ سهولة انفصال الخلايا عن بعضها البعض في المعلق الخلوى لبعض



شكل (٨) رسم توضيحي يبين النظام المستخدم في تكييف البيئة المغذية بهدف تنشيط نمو وانقسام الخلايا ذات الكثافه المنخفضه.

الأنواع النباتية عند اضافة لبن جوز الهند الي البيئة المغذيه. عموما فانه ينصح باستخدام معدلات مرتفعة من الفيتامينات في البيئة المغذية التي تستخدم لتكوين المعلق الخلوي مقارنة بمثيلاتها التي يتكون عليها الكالس لنفس النوع النباتي، هذا يرجع الي أن زيادة تركيز الفيتامينات يعمل علي سهولة انفصال الخلايا عن بعضها البعض وبالتالي الحصول علي معلق خلوي ذات مواصفات جيدة. أصبح معروفا أيضاً أن اضافة الأكسين الي البيئة المغذية بتركيز مرتفع نسبياً يعمل علي زيادة معدل انفصال الخلايا في المعلق الخلوي. تتكون التراكيب المتعددة الخلايا في المعلق الخلوى نتيجة للأنقسام النشط الذي لايصحبه انفصال الخليتين عن بعضهما البعض، يتلو هذا بداية دوره من الأنقسام الخلوى في كل من الخليتين ليتكون أربعة خلايا تشارك بعضها البعض في الجدر الخلوية .. وبهذا يمكن القول أنه تصبح هناك فرصة كبيرة علي أن تتكون التراكيب العديدة الخلايا في مرحلة الأنقسام النشط لخلايا المعلق الخلوى، كما لوحظ أيضاً أن معدل الأنقسام يزداد في الخلايا المكونة للتراكيب العديدة الخلايا عنها في الخلايا المنفصله بالمعلق الخلوى Henshaw et al. (1966). نظراً للعلاقة الطردية بين تكون التراكيب متعددة الخلايا ومرحلة النشاط في المعلق الخلوي، فانه يتوقع أن يزداد احتمال تكون هذه التراكيب الخلوية مع النقل المتكرر للمعلق الخلوي علي بيئة مغذية حديثة التحضير والهدف هو المحافظة علي الخلايا في حاله نشطة من الأنقسام الخلوي. تتحول بعض التراكيب عديدة الخلايا لتؤدى وظيفة ما، فقد تكون خلايا مرستيمية أو خلايا مغذية وحاضنه لخلايا المعلق الخلوي وذلك بواسطة افراز بعض المواد المنشطة للأنقسام والتي يعتقد أنها بعض الاحماض الأمينية .. لهذا فان وجود بعض التراكيب العديدة الخلايا في المعلق الخلوي قد يكون أمراً مرغوباً في مرحلة ما من

المراحل المختلفة التي يمر بها المعلق الخلوي غير ان زيادة عددها في المعلق قد يؤدي الي تثبيط النمو والأنقسام. تشير البحوث العلمية العديدة في هذا المجال الي الأختلافات البارزه في متطلبات زراعات معلقات الخلايا من العوامل المختلفة .. وبناءاً علي هذا فانه ينصح بمحاولة التعرف وتحديد أنسب العوامل اللازمة للمعلق الخلوى الموجود فعلاً بالمعمل والجاري العمل عليه. هذا يتحقق بواسطة الملاحظة الدائمة والمستمرة للمعلق الخلوي بالمعمل وتدوين وتفسير النتائج التى يتحصل عليها .. وقد لوحظ أن كفاءة انشاء والمحافظة علي معلقات خلوية تأتي من خلال الخبره بالمعمل في هذا المجال لفترة طويلة.

٨ زراعة خلايا المعلق في بيئة صلبة

Plating of cell suspension in solidified medium

تهدف هذه الطريقة الي الحصول علي مستعمرات خلوية ينشأ كل منها من خلية واحدة نتيجة لتكرار الأنقسام والزيادة في العدد .. استخدمت هذه الطريقة لأول مره بواسطة العالم Bergmann (1960) وفيها الطريقة تخلط خلايا المعلق في بيئة مغذية تحتوى آجار وهي في الصورة السائلة علي حرارة ٣٠-٣٥ درجة مئوية وقبل تحولها الي الصورة الصلبة .. توضع البيئة المحتوية علي الخلايا في أطباق بترى في طبقة رقيقة وذلك بعد التأكد من تجانس توزيع الخلايا في البيئة المغذية .. ويجب ازالة التراكيب عديدة الخلايا من المعلق الخلوي قبل مزيجه بالبيئة المغذية ويجري هذا بواسطة امرار المعلق الخلوى من خلال فلتر ذات ثقوب محددة تسمح بمرور الخلايا المستقلة ولا تمر من خلالها التراكيب عديدة الخلايا .. بديهياً فانه يجب أن تجرى هذه الخطوه تحت ظروف التعقيم الكامل وذلك لمنع التلوث بالكائنات الحية

مكتبة

الدقيقة. عموما يمكن تلخيص خطوات زراعة المعلق الخلوي علي بيئة مغذية صلبة في الخطوات التالية (شكل ٩)

- يمرر المعلق الخلوى من خلال فلتر ذات ثقوب بسعة مناسبة للتخلص من التراكيب العديدة الخلايا.

- يحدد عدد الخلايا في المعلق الخلوي للحصول علي عدد معين من الخلايا التي يراد زراعتها في بيئة صلبة.

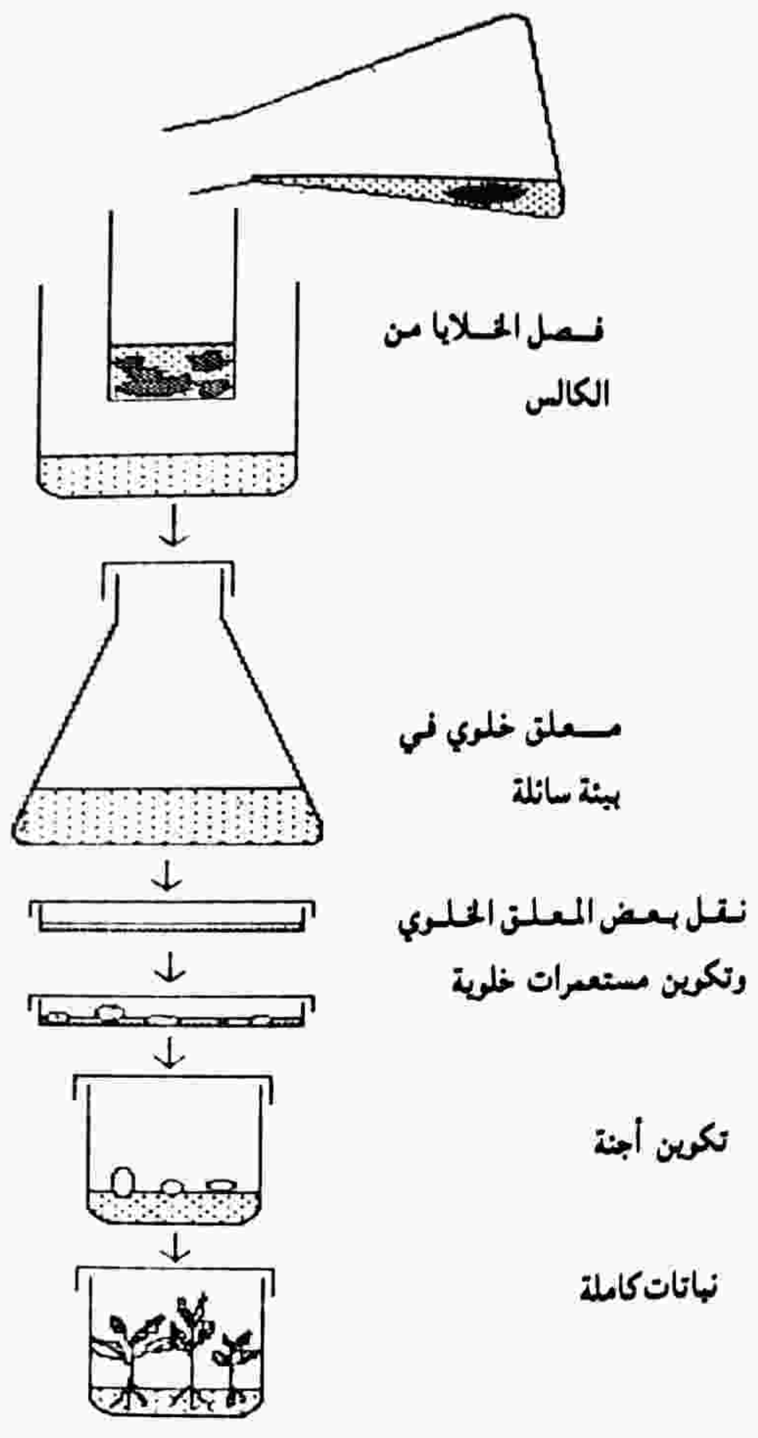
- قد يجري تخفيف أو تركيز الخلايا في المعلق الخلوي والهدف النهائي هو الحصول علي عدد معلوم من الخلايا في حجم ٢مللي من البيئة المغذية قبل الزراعة في بيئة مغذية صلبة.

- تحضر البيئة المغذية التي تحتوي آجار ويجري تعقيمها في الأوتوكلاف وتبرد حتي تصل درجة حرارتها الي ٣٠-٣٥ درجة مئوية.

- يخلط ٢مللي من المعلق الخلوي مع ١٠مللي من البيئة المغذية التي تحتوي آجار قبل تحويلها للصورة الصلبة وترج جيداً للتأكد من تجانس توزيع الخلايا في البيئة.

- تصب البيئة المغذية في طبق بتري تحت ظروف معقمة وتحفظ في الحضانة علي حرارة ٢٥ درجة مئوية لمدة ٣ أسابيع.

بعد فترة التحضين المناسبة يجري فحص أطباق الزراعة، وباستخدام ميكرسكوب مجسم يجري تحديد عدد المستعمرات الخلوية المتكونة في البيئة المغذية .. أخذاً في الأعتبار أن عدد الخلايا التي اجري زراعتها في بيئة مغذية صلبة معلوما لدينا فانه يمكن حساب كفاءة الخلايا في تكوين مستعمرات خلوية علي بيئة مغذية صلبة باستخدام المعادلة التالية



شكل (٩) رسم توضيحي يبين خطوات زراعة المعلق الخلوي علي بيئة مغذية صلبه لانتاج مستعمرات خلوية التي بدورها تنتج أجنة أو نباتات كاملة.

الكفاءة = عدد المستعمرات الخلوية المتكونة/عدد الخلايا المنزرعة في بيئة صلبة × ١٠٠

من المرغوب فيه الحصول علي كفاءة مرتفعة من الخلايا المنزرعة علي بيئة مغذية صلبة، كما أنه من الهام مراعاة زراعة عدد محدود من الخلايا في البيئة الصلبة والسبب في ذلك يرجع الي أهمية توفير مساحات مناسبة لنمو الخلايا الي مستعمرات خلوية. يسمح بنمو المستعمرات الخلوية الي حجم مناسب قبل أن تنقل الي بيئة مغذية حديثة التحضير .. ويراعي أن يتم النقل قبل أن تتلامس خلايا المستعمرات المتجاوره نتيجة للنمو النشط، ولتحقيق هذا فانه يراعي النقاط التالية

- مراعاة استخدام بيئة ملائمة تحتوي العناصر اللازمة لتنشيط نمو الخلايا المنزرعة في البيئة الصلبة.

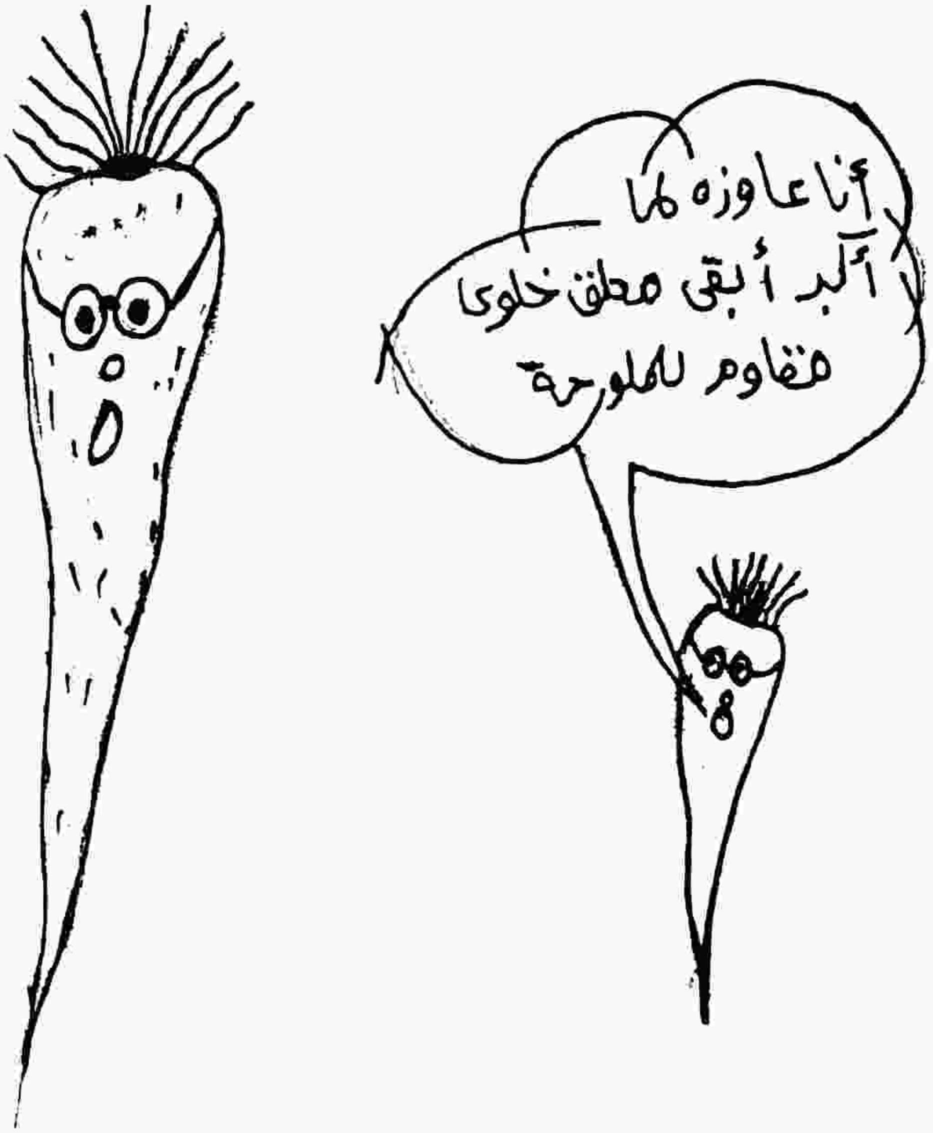
- استخدام خلايا من المعلق الخلوي وهي في المرحلة النشطة للأنقسام وليست في مرحلة السكون أو الخمود النسبي.

- عدم زراعة خلايا المعلق الخلوى في بيئة مغذية تحتوي آجار في درجة حرارة أعلي من ٣٥ درجة مئوية حتي لا تفقد الخلايا حيويتها ويقل معدل الكفاءة.

- من الهام اجراء التحضين في الظلام أو الضوء الخافت حيث أن الأضاءه المرتفعة تثبط تكون المستعمرات الخلوية.

من الجدير بالذكر أن استمرار فحص أطباق الزراعة علي فترات قصيرة ومتكررة يؤدي الي انخفاض كفاءة تكون المستعمرات الخلوية، ولهذا ينصح بعدم بدء الفحص الا بعد حوالي ٣ أسابيع من الزراعة في بيئة مغذية صلبة. عندما يصل حجم المستعمرات الخلوية الي الحجم المناسب فانها تنقل الي بيئة مغذية اخري لتنشيط تكون أجنة نباتية وهذه بدورها تعطي نباتات كاملة .. عندما يصعب الحصول علي أجنة نباتية فانه يحفز تكون نموات خضرية وهذه بدورها تنقل الي بيئة مغذية لتنشيط تكون الجذور وبالتالي الحصول علي نباتات كاملة.

"الجزرة الطموحة"



كاريكاتير تصميم واهداء طارق رشوان - مصر

٩

فصل وزراعة البروتوبلاست

Isolation and culture of protoplast

---

١ أهمية البروتوبلاست Significanc of protoplast

عرفنا في الفصل السابق من هذا الكتاب علي كيفية الحصول علي معلق خلوي من الأعضاء النباتية بكل من الطريقة المباشرة التي تنفصل فيها الخلايا وتزرع علي بيئة مغذية سائلة .. أو بواسطة استخدام الكالس الناتج من زراعة العضو النباتي علي بيئة مغذية وهذه تعرف بالطريقة الغير مباشرة وفيها يستخدم الكالس المتكون في انشاء معلقات الخلايا التي تحتوي خلايا مستقلة ومنفصلة بعضها عن البعض كما اتضح لنا أيضاً امكانية الحصول علي أجنة أو نباتات كاملة من المستعمرات الخلوية التي تتطور نتيجة للانقسام الخلوي لأحد أو بعض خلايا المعلق الخلوي.

غير أنه كثيراً مايصعب الحصول علي زراعة خلايا منفردة ومستقلة. لهذا فان بعض التراكيب الخلوية التي تتكون من خليتين أو أكثر تتطور الي مستعمرات مرئية عند الزراعة علي بيئة مغذية صلبة .. ولكن في واقع الأمر فان تكون هذه المستعمرات من خليتين أو أكثر يعتبر أمراً غير مرغوب فيه، خاصة اذا كان الهدف الحصول علي نبات كامل من خلية واحدة تحتوي تراكيب وراثية ذات صفات مميزة سبق نقل بعض الجينات الوراثية اليها. لقد أصبح الآن فصل وزراعة البروتوبلاست في بيئة مغذية هي الطريقة التي يمكن بها التغلب علي العديد من

العقبات، حيث أنه في هذه الطريقة يفصل الجدار الخلوي من الخلية وبهذا تصبح الخلايا مستقلة ومنفصلة عن بعضها البعض في البيئة المغذية. وهنا يمكن تعريف البروتوبلاست بأنه عبارة عن خلية نباتية لا تحتوي جدار خلوي ولكنها تحتفظ بحيويتها Evans & Cocking (1977). عموماً تتلخص أهمية فصل وزراعة البروتوبلاست في النقاط التالية

- ازالة الجدار الخلوي يسهل نقل الجينات الوراثية بالطرق المختلفة إلى البروتوبلاست وبالتالي تعديل التركيب الوراثي للخلية التي يمكن لها أن تنقسم وتتطور الي نبات كامل يحمل الصفات التي نقلت اليها من الخلية الأم. كما أنه يمكن نقل بعض مكونات الخلية مثل الكلوربلاست، الميتوكوندريا إلى البروتوبلاست.

- يمكن انتاج نبات هجين بواسطة حث البروتوبلاست علي الأندماج معاً ويطلق على هذا الهجين " هجين جسدى" تمييزاً له عن الهجين التقليدى والمعروف لدينا. وهذه الطريقة لأنتاج الهجين ذات أهمية خاصة في الأنواع النباتية التي يصعب فيها انتاج الهجين بالطريقة التقليدية نتيجة لعدم التوافق Power & Cocking (1971).

- نتيجة لأن البروتوبلاست له المقدرة السريعة علي تكوين جدار خلوى، فانه يمكن من خلال هذه الطريقة متابعة المراحل التطورية التي بواسطتها يتكون الجدار الخلوى وكذا العوامل التي تؤثر في تكوينه Willison & Cocking (1972).

- يمكن بواسطة زراعة البروتوبلاست في بيئة مغذية من سهولة المعاملة ببعض المواد المطفرة، وبالتالي امكانية الحصول علي طفرات ذات صفات مرغوبة تساهم في تطوير الثروة النباتية.

٢ الخلية النباتية والبروتوبلاست Plant cell and protoplast

تتكون الخلية النباتية بخلاف النواه ومكوناتها من سيتوبلازم يحتوي علي بلاستيدات، ميتوكوندريا، شبكه أندوبلازمية، أجسام جولجي، فجوات عصارية، ريبوسومات .. وغيرها من المكونات الأخرى .. يحيط السيتوبلازم ومكوناته غشاء رقيق يسمي الغشاء البلازمي، وهذا يحاط بجدار قوى لا يسمح بتمدد البروتوبلاست خارج نطاق محدود يسمي الجدار الخلوي. بالرغم من أن الغشاء البلازمى يلعب دوراً هاماً في تكوين وتطور الجدار الخلوى، غير انه ليس هناك تلامس واتصال دائم ووثيق بينهما. عندما يزداد حجم البروتوبلاست فانه يحدث تلامس بين الغشاء البلازمى والجدار الخلوى، وعندما ينكمش حجم البروتوبلاست نتيجة لقلة الماء المتوفر بالسيتوبلازم فانه يتباعد الغشاء البلازمى عن الجدار الخلوى ويفقد التلامس بينهما .. في حالات الذبول الشديد يزداد انكماش البروتوبلاست وتنقطع القنوات البلازميه " البلازمودزماتا " بين الخلايا وبهذا تفقد الخلايا الأتصال ببعضها البعض. عندما يزال الجدار الخلوي ينطلق البروتوبلاست الي البيئة المحيطه ويصبح الغشاء البلازمى هو الفاصل الوحيد بين البيئة والمكونات الداخلية .. لهذا فانه من الهام أن يكون الضغط الأسموزى للبيئة المغذية مناسب للبروتوبلاست حتي لايفقد الحيوية. تشير الأبحاث العلمية العديدة الي النجاح في فصل وزراعة البروتوبلاست من أعضاء نباتية مختلفة مثال الجذور، السوق، الأوراق، الأزهار، الثمار، حبوب اللقاح .. كما أنه يمكن فصل البروتوبلاست من الكالس المتكون علي بيئة مغذية أو من المعلقات الخلوية، هذه الطريقة ذات أهمية كبيرة نظراً لأن هذه الزراعات تنمو في ظروف معقمة.

٣ طرق فصل البروتوبلاست Methods for protoplast isolation

تعتمد كفاءة فصل البروتوبلاست علي امكانية ازالة الجدار الخلوي مع عدم احداث أضرار للبروتوبلاست والأحتفاظ بحيويتة .. كما أشرنا من قبل فان البروتوبلاست الخلوى يتأثر بالضغط الأسموزي فيزداد أو ينكمش حجمه ليتوافق مع هذا التغيير. من الأمور التي يجب أن تراعي عند فصل البروتوبلاست توفير بيئة ذات ضغط أسموزي مناسب حيث أنه قد يحدث أضرار جسيمة للبروتوبلاست ويفقد حيويته نتيجة لفصله في بيئة ذات ضغط أسموزي مرتفع أو منخفض.

٣. ١ الضغط البلازمي Plasmolyticum

عندما يراد فصل بروتوبلاست من نسيج ما لأول مره، فإنه ينصح أولاً بتحديد مستوي الضغط الاسموزي الذي يجب أستخدامه للنجاح في عمليات الفصل وللحصول علي بروتوبلاست ذات حيوية عالية. هناك العديد من الطرق التي يمكن بواسطتها تحديد الضغط الاسموزي المناسب، لعل أبسطها تعتمد علي وضع الخلايا في محاليل ذات مستويات متدرجة في الزيادة من الضغط الاسموزي مع ملاحظة التغير الذي يحدث للخلية والبروتوبلاست، ومن الافضل أن تستخدم ماده للمحافظة علي ثبات الضغط الاسموزي، لهذا فإنه يجري أستخدام تركيزات مختلفة من الماده لتحديد أفضل تركيز والذي يعطي أكبر عدد من البروتوبلاست الحي. بديهياً فإن تركيز الماده التي تستخدم للمحافظة علي ثبات الضغط الأسموزي تختلف تبعاً لنوع النسيج النباتي وتبعاً للظروف التي يُنمي فيها النبات .. كان المعتاد أن يستخدم بعض الأملاح المعدنية للمحافظة علي ثبات الضغط الاسموزي، غير أنه مع تطور طرق فصل البروتوبلاست فإنه أجري أستبدال هذه الاملاح

بالسكريات، يرجع هذا إلي أن الفصل بواسطة الانزيمات تحتاج لفترة طويلة من التحضين في بيئة الفصل، خلال هذه الفترة يتم للأملاح المعدنية أختراق البروتوبلاست بمعدل أعلي من السكريات ولهذا أعتبرت الاملاح غير مناسبة لهذا الغرض .. كما أنه وجد أن أستخدام الأملاح المعدنية تقلل من كفاءه عمل الانزيمات للتخلص من الجدار الخلوي في بعض الانواع النباتية، غير أن هذه ليست قاعدة عامة حيث وجد في بعض الحالات أن أستخدام خليط من كلوريد البوتاسيوم، كلوريد الكالسيوم يعطي نتائج أفضل من أستخدام المانيتول لفصل البروتوبلاست من نبات الجزر. عموماً فإن المانيتول يعتبر أفضل ماده تستخدم للمحافظة علي الضغط الاسموزي للبروتوبلاست، وهذا يرجع إلي بطئ إختراقها للخلية. كما أنه قد يستخدم سكر السوربيتول أو خليط من السوربيتول والمانيتول، أو خليط من السكروز والجلوكوز.

عموما يمكن القول أن هناك طريقتين أساسيتين لفصل البروتوبلاست من الجدار الخلوي وهما الفصل الميكانيكي والفصل بأستخدام الأنزيمات.

٣. ٢ الفصل الميكانيكي Mechanical isolation

تعتمد هذه الطريقة علي مقدرة البروتوبلاست علي الانكماش في الحجم بحيث يصبح غير ملامس للجدار الخلوي، لاجراء الفصل الميكانيكي يعامل النسيج النباتي أولاً بمحلول ذات ضغط أسموزي يؤدي لأنكماش البروتوبلاست وبذلك تنفصل عن السطح الداخلي للجدار الخلوي، يّقطع النسيج النباتي إلي شرائح بواسطة مشرط ويوضع في محلول ذات ضغط أسموزي منخفض يعمل علي زيادة حجم البروتوبلاست، نتيجة لتضخم البروتوبلاست فإنه ينطلق من فتحه الجدار

الخلوي ويصبح مستقلاً في البيئة المحيطة .. بالرغم من سهولة فصل البروتوبلاست بالطريقة الميكانيكية، غير أن لها بعض العيوب التي تعيق إنتشار إستخدامها بين العاملين في هذا المجال وتتلخص أهم عيوب هذه الطريقة فيما يلي

- يحدث أضرار لبعض البروتوبلاست أثناء عمليات الفصل وهذه تؤثر علي مقدرتها علي النمو والانقسام النشط.

- يعتبر عدد البروتوبلاست المنفصل بهذه الطريقة قليل جداً مقارنة بمثيله الناتج من الفصل بواسطة الانزيمات.

- لابد أن تحتوي الخلية النباتية المراد فصل البروتوبلاست منها علي فجوة عصارية كبيرة وذلك لتسهيل قابليتها للأستجابة للتغير في الضغط الاسموزي بإنكماش وتمدد البروتوبلاست.

غير أنه من أهم مزايا الفصل الميكانيكي عدم تعرض البروتوبلاست للأنزيمات التي قد تؤثر علي حيويتها وقدرتها علي النمو والأنقسام.

٣. ٣ الفصل بالانزيمات Enzymatic isolation

في أوائل الستينات ومع أكتشاف أمكانية فصل البروتوبلاست من الجدار الخلوي بواسطة الانزيمات، أنجذب الباحثين لهذه الطريقة حيث أنها توفر عدد كبير من البروتوبلاست للعمل عليها بعد التخلص من بقايا النسيج النباتي. ويهمنا قبل شرح عملية الفصل بالانزيمات أن نشير أولاً إلي تركيب الجدار الخلوي وأهم المميزات التي أدت الي فكرة أستخدام الانزيمات لفصل البروتوبلاست.

٣.٣. ١ الجدار الخلوي والانزيمات Cell wall and enzymes

يتكون الجدار الخلوي من خليط من الياف السليلوز مغطاه بماده الهيمسليلوز، كما يحتوي علي بروتينات ودهون وتختلف نسب هذه المواد بعضها لبعض تبعاً لعوامل عديدة .. غير أنه من المعروف جيداً أنه بتقدم الخلية في العمر وتكشفها فإنه تزداد نسبة السليلوز وقد تصل إلي حوالي ٩٤٪ من الوزن الجاف للجدار الخلوي لخلية ناضجة من شعيرات القطن. تتكون الطبقة الوسطي التي تقع بين الخلايا من البكتين وهي تعتبر مسئوله جزئياً عن تلاحم الخلايا المجاوره. بهذا يتضح لنا أن طبيعة تركيب الجدار الخلوي والطبقة الوسطي تحتم علينا استعمال أنزيمات تحلل كل من السليلوز، الهيمسليلوز، البكتين .. ويعتمد تركيز الانزيمات المستخدمة وطول فترة المعاملة علي طبيعة النسيج النباتي المستخدم. أعتمدت فكره أستخدام الانزيمات علي ملاحظة أن بعض الكائنات الحية الدقيقة لها المقدرة علي مهاجمة بعض الخضروات أو الفواكه بعد القطف وتسبب تحللها، كان من البديهي محاولة استخدام الكائنات الحية الدقيقة بهدف الحصول علي الأنزيمات لفصل البروتوبلاست من الخلايا النباتية. يرجع الفضل للعالم Cocking (1960) الذى أمكنه لأول مره من فصل بروتوبلاست من قمم جذور نباتات الطماطم بواسطة استخدام أنزيمات متحصل عليها من بعض الفطريات. في وقتنا الحالي ونظراً لإتساع الأهتمام بفصل البروتوبلاست من الخلية النباتية فانه يمكن الحصول علي الأنزيمات اللازمه من الشركات التجارية التي تعمل في هذا المجال.

٣.٣. ٢ فصل البروتوبلاست من الاوراق Protoplast isolation from leaves

قديماً كانت تعتبر أوراق النباتات المصدر الرئيسي لفصل البروتوبلاست، غير أنه

بتقديم طرق الفصل وفهم الأسس النظرية والعملية لهذه الطرق وموقع تأثير كل أنزيم مستعمل في عمليات الفصل فقد أمكن الآن من فصل البروتوبلاست من أعضاء وأنسجة نباتية مختلفة. عموماً فان فصل البروتوبلاست من الأوراق يتم من خلال أربعة مراحل هامة هي

- تعقيم السطح الخارجي للأوراق بأحد الطرق التي سبق شرحها في فصل سابق من هذا الكتاب.
- ازالة طبقة الأبيدرمس من الأوراق بواسطة ملقاط ومشرط تشريح.
- معاملة النسيج النباتي بالأنزيمات المحلله للجدر الخلوية مع توفير الضغط الأسموزي المناسب للبروتوبلاست.
- فصل البروتوبلاست بواسطة الأمرار خلال فلتر أو استخدام جهاز الطرد المركزي.

وهناك طريقتان يمكن بهما فصل البروتوبلاست بالمعاملة بالأنزيمات

٣. ٣. ٢. ١ الطريقة المباشرة Direct method

يوضع أجزاء نسيج الورقة في طبق بتري يحتوي خليط الأنزيمات المختلفة وهذا يشمل الأنزيمات المحلله للبكتين، السليلوز، الهيمسليلوز .. تحضن الأنسجة المعاملة علي حراره ٢٥درجة مئوية لمدة زمنية تتراوح بين ١٥-١٨ساعة، بعدها يجري الضغط برفق علي النسيج النباتي وذلك لتسهيل خروج البروتوبلاست من الجدر المنحلة بالنسيج .. تنقل المحتويات الي طبق بتري وتمرر علي فلتر بهدف تنقية البروتوبلاست من شوائب النسيج المتبقي، توضع الأنزيمات وبها البروتوبلاست في أنبوبة بغطاء وتوضع في جهاز الطرد المركزي علي سرعة ١٠٠ لفة/دقيقة وذلك لفترة زمنية مقدراها ١-٣ دقائق. يلاحظ تجمع البروتوبلاست المنفصلة في قاع

الأنبوبة وتبقي الشوائب الدقيقة معلقة في محلول الأنزيم، يزال المحلول ويستبعد ويجرى غسيل البروتوبلاست مرتين أو ثلاث مرات. وقد تستخدم بيئة مغذية مخففة بتركيز ١:١٠ أو نصف التركيز الفعلي للبيئة المغذية أثناء عملية الغسيل. عندما يستخدم المانيتول أو السوربيتول في بيئة الفصل فان البروتوبلاست المنفصل يطفو ويتجمع علي السطح العلوي، وبهذا يمكن فصل البروتوبلاست الذى ينقل الي بيئة مغذية .. أحياناً يفصل بروتوبلاست من خلايا الأبيدرمس التي تختلط ببروتوبلاست الميزوفيل، غير انه يمكن بسهولة فصل احدهما عن الآخر حيث أن بروتوبلاست الأبيدرمس تتجمع في طبقة لونها أخضر مصفر علي قمة محلول الأنزيمات الذى يحتوي مانيتول أو سوربيتول، بينما نجد بروتوبلاست الميزوفيل يتجمع في القاع باللون الأخضر الزاهي.

٢.٣.٢.٢ الطريقة الغير مباشرة Indirect method

تختلف هذه الطريقة عن سابقتها بأنه يجري معاملة النسيج النباتي بالأنزيم المحلل للبكتين أولاً بتركيز ما بين ٥ر-٢٪ .. يوضع الدورق في حمام مائي علي حرارة ٢٥ درجة مئوية مع الرج الهادىء لمدة ١٥ دقيقة، بعدها يوقف الرج ويترك الدورق في الحمام المائي لمدة ٦٠ دقيقة. تأخذ عينة وتفحص بالميكروسكوب للتأكد من انفصال خلايا النسيج بعضها عن البعض، عندما يتم انفصال الخلايا يجري فصل الخلايا من الشوائب بواسطة استعمال جهاز الطرد المركزى مع الغسيل بمحلول سكروز بتركيز ٢٠٪. تعتبر البروتوبلاست المتحصل عليها بهذه الطريقة ذات حيوية مرتفعة عن مثيلاتها المتحصل عليه باستخدام الطريقة المباشرة، وهذا يرجع الي قصر فترة التعرض للأنزيمات في الطريقة الغير مباشرة مقارنة بالطريقة المباشرة التي

يتم فيها تعريض النسيج للأنزيمات لفترة مابين ١٥-١٨ساعة .. اطالة فترة التعريض للأنزيمات تؤثر علي حيوية البروتوبلاست نتيجة لتأثيرها علي نشاط غشاء البلازما.

٣. ٣. ٣ فصل البروتوبلاست من المعلق الخلوى

Isolation of protoplasts from cell suspension

تعتبر خلايا المعلق الخلوي خاصة في مرحلة الأنقسام النشط مصدرا جيدا لفصل والحصول علي بروتوبلاست (Uchimiya & Murashige (1974. في هذه الطريقة ينقل حوالي ٥مللي من المعلق الخلوي في أنبوبة بغطاء، توضع في جهاز الطرد المركزى لفصل الخلايا عن البيئة المغذية وذلك علي سرعة ١٠٠ لفة/دقيقة لمدة ١-٢ دقيقة. تزال البيئة المغذية ويوضع محلول الأنزيمات المحللة والذى يحتوي أنزيمات السليولاز بتركيز ١٤٪، البكتيناز بتركيز ٥ر-٢٪ .. ينقل محتويات الأنبوبة الي طبق بتري الذي يوضع علي جهاز هزاز علي سرعة ٣٥-٧٥ لفة/دقيقة ويترك لفترة تراوح بين ٢-٦ ساعات، بعدها يفصل البروتوبلاست وينقل الي بيئة مغذية كما شرحنا سابقا.

٣. ٣. ٤ فصل البروتوبلاست من الكالس

Isolation of protoplasts from callus

يمكن الحصول علي كمية كبيرة من البروتوبلاست بواسطة استخدام الكالس النشط، ولاتختلف طريقة فصل البروتوبلاست من الكالس عن تلك التي تستخدم لفصل البروتوبلاست من نسيج الورقة، غير أنه في حالة استخدام الكالس كماده نباتية

للحصول علي البروتوبلاست فانه يستخدم تركيز أقل من الأنزيم المحلل للسليلوز . كما أن فترة التحضين تقل عن مثيلاتها في فصل البروتوبلاست من نسيج الورقة. من أهم النقاط التي يجب أن تراعي في هذه الطريقة أن يكون الكالس حديث العمر، وذلك لأن الكالس ذات العمر المتقدم يحتوي خلايا ذات جدر خلوية سميكة وهذه قد يصعب تحللها بواسطة الأنزيمات.

٤ زراعة البروتوبلاست Protoplast culture

مما لاشك فيه أن الهدف الأساسي من زراعة البروتوبلاست هو تشجيع الأنقسام بعد تكون الجدار الخلوي لتكوين مستعمرة خلوية ومنها يتكون الكالس .. نتيجة لتغيير محتويات البيئة المغذية خاصة منظمات النمو فانه يمكن تشجيع تكون الأفرع والجذور وبالتالي الحصول علي نبات كامل (Nagata & Takebe (1970.
هناك طريقتان لزراعة البروتوبلاست يمكن تمييزهما تبعاً لنوع البيئة المستخدمة الى الآتي

٤.١ بيئة سائلة Liquid medium

يزرع البروتوبلاست في بيئة مغذية سائلة تحتوي العناصر اللازمة لتنشيط النمو والأنقسام، تحضن الزراعة علي حرارة ٢٥درجة مئوية في الظلام التام أو الضوء الخافت .. عموماً يفضل زراعة البروتوبلاست في طبقة رقيقة من البيئة المغذية وذلك لتسهيل التبادل الغازي بين البروتوبلاست والجو المحيط حيث أن هذا له تأثير كبير علي كفاءة انقسام البروتوبلاست.

٤. ٢ البيئة الصلبة Solid medium

في هذه الطريقة يفصل البروتوبلاست وينقل الي بيئة مغذية سائلة .. تنقل المحتويات الي حجم متساوي من البيئة المغذية التي تحتوي آجار ويخلط المزيج ويترك حتي تتحول البيئة الي الصورة الصلبة، تحضن الزراعة علي حرارة ٢٥ درجة مئوية في الظلام Gamborg et al. (1975).

٥ البيئة المغذية Nutrient medium

لا تختلف البيئة التي تستخدم لزراعة البروتوبلاست عن البيئة التي تستخدم في زراعات معلقات الخلايا ، غير أنه يجب اضافة بعض المواد التي توفر ضغط أسموزى مناسب للبروتوبلاست وذلك لمعادله الضغط الذي كان يوفره الجدار الخلوي قبل ازالته. من الشائع استخدام بيئة Murashige & Skoog (1962) (MS) أو بيئة Gamborg et al. (1968) وذلك بعد اجراء بعض التعديلات لتتوافق مع زراعة البروتوبلاست .. هنا يجدر الأشاره الي أن كل باحث يفضل استخدام البيئة التي يجدها تتناسب مع المادة النباتية التي يعمل عليها وذلك بعد التجريب واجراء التعديل اللازم للحصول علي أفضل نتيجة. وهناك بعض الملاحظات الهامة التي يجب أن تؤخذ في الأعتبار عند تحضير بيئة مغذية لزراعة البروتوبلاست

- أثبتت الأبحاث أن البروتوبلاست لا تحتاج الي نسب مرتفعة من الحديد، الزنك، الأمونيوم في البيئة المغذية وذلك مقارنة بالبيئات الشائع استخدامها في مجال زراعة الأنسجة.
- زيادة تركيز الكالسيوم في البيئة المغذية يساعد عل المحافظة علي سلامة الغشاء البلازمى للبروتوبلاست وعدم انفجاره، قد تصل نسبة الزيادة أربعة أضعاف

التركيز المستخدم في البيئة التقليدية.

- يحتاج البروتوبلاست الي اكسين وسيتوكينين وذلك لتنشيط تكون الجدار الخلوي وكذا لتشجيع الأنقسام الخلوي، لذا تضاف هذه المركبات الي البيئة المغذية بالتركيزات الملائمة التى تؤدي في النهاية لتكون الكالس والتشكل المورفولوجي للحصول علي نباتات كاملة.

٦ تكوين الجدار الخلوي Cell wall formation

يعتمد نجاح زراعة البروتوبلاست علي مقدرتها علي تكوين جدار خلوي .. يبدء تكون الجدار الخلوي سريعاً بعد زراعة البروتوبلاست في بيئة مغذية. ولقد أمكن دراسة المراحل المختلفة لتكون الجدار الخلوي علي السطح الخارجي للبروتوبلاست Willison (1976), Pojnar et al. (1967). في بداية مراحل تكون الجدار الخلوي يظهر ألياف دقيقة من السليلوز تحيط بالغشاء البلازمي ويلي هذا تكون طبقة من الهيمسليلوز التي تغطي الألياف السليلوزية التي سبق تكوينها. يمكن تتبع مراحل تكون الجدار الخلوي بواسطة استخدام صبغة Calcafluor التي ترتبط بالمواد المكونة للجدار الخلوي وتعطي اشعاع فوسفوري عند التعريض للضوء الأزرق، في هذه الطريقة يوضع البروتوبلاست في محلول ذات ضغط أسموزي مناسب يحتوي علي ٠.١٪ من صبغة Calcafluor تترك لمدة ٥ دقائق ثم تغسل وتفحص بالميكروسكوب .. مما لاشك فيه أن هناك عوامل عديدة تؤثر في العمليات المسئولة عن تكون الجدار الخلوي، لعل أهمها الظروف البيئية المحيطة بالبروتوبلاست. عندما أجري زراعة البروتوبلاست في بيئة مغذية تحتوي علي أملاح بدلاً من المانيتول وذلك لتوفير الضغط الأسموزي المناسب، وجد أنه لا

يتكون جدار خلوي جيد، بل يتكون جدار خلوي رخو .. وبمتابعة المراحل التي يمر بها البروتوبلاست ذات الجدار الخلوي الرخو وجد أنها تتعرض للأنقسام الخلوي ٣-٤مرات ثم تتوقف عند هذه المرحلة .. في حالات اخري وجد أن تتعرض الخلية للأنقسام ويتلو هذا انفصال كل خلية عن الأخري في البيئة المغذية، علي الجانب الأخر فان الخلايا ذات الجدار الخلوي الغير رخو تتعرض للأنقسام المتتالي لتكوين تراكيب عديدة الخلايا .. بالرغم من أننا نعلم الآن أن هناك علاقة وطيدة بين نوع الجدار الخلوي المتكون والقدرة علي الأنقسام، غير أن تفسير هذه العلاقة علي المستوي الخلوي مايزال غامضا.

٧ الأنقسام الخلوى Cell division

كما أشرنا من قبل فان تكون الجدار الخلوي علي البروتوبلاست المنزرع في بيئة مغذية أمر هاما ولازما لحدوث الأنقسام الخلوي .. ويجب هنا أن نشير الي أن انقسام النواه في البروتوبلاست لا تتأثر بوجود أو غياب الجدار الخلوي .. هذا يعني أنه يمكن للنواه أن تنقسم مكونه نواتان في غياب الجدار الخلوي، غير أن عمليات اتمام الأنقسام وتكون جدار فاصل بين النواتان تتوقف في البروتوبلاست الذى لا يحتوي جدار خلوي .. بملاحظة البروتوبلاست المنزرع في بيئة مغذية وجد أنها تتعرض للأنقسام الأول بعد حوالي ٣-٤ أيام من تكون الجدار الخلوي، يليه الأنقسام الثاني في الأسبوع الأول. ويظهر تركيب خلوي متعدد الخلايا في البيئة المغذية خلال اسبوعين ويتطور ليكون مستعمرة خلوية في الأسبوع الثالث. هنا يجب أن تنقل المستعمرات الخلوية الي بيئة مغذية خالية من المانيتول أو السوربيتول، حيث وجد أن استمرار بقائها في بيئة ذات ضغط أسموزي مرتفع يعيق من نموها.

٨ اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion

أهم استخدامات البروتوبلاست من وجهة النظر التطبيقية هو استخدامها لأنتاج هجن جسدية ..يعتبر اندماج البروتوبلاست لأنتاج هجين جسدى يعتبر ذات أهمية كبيرة في النباتات عديمة التوافق الذاتي والنباتات التي يصعب فيها استخدام طرق التربية التقليدية. لوحظ في بعض الحالات وجود بروتوبلاست يحتوي علي نواتين وذلك بعد فصل الجدار الخلوي مباشرة، أي أنه لم يكن هناك أي فرصة لحدوث اندماج بين اثنين من البروتوبلاست المنفصل، وقد تفسر هذه الظاهرة بأنها تنتج من وجود بعض الخلايا التي تكون في مرحلة من مراحل الأنقسام المختلفة أثناء عملية فصل البروتوبلاست، غير أن هذا لايعطي تفسيراً كاملاً لوجود بعض البروتوبلاست الذى يحتوي علي عديد من النوي .. وقد تعزي هذه الظاهرة الي الأندماج التقليدي بين الخلايا والذى يحدث خلال عمليات فصل البروتوبلاست. نتيجة لانحلال الجدار الخلوي بين الخلايا تتسع الفتحات بين الخلايا التي تشغلها البلازمودزماتا وتزداد معها الفرصة للأندماج بين الخلايا المجاورة وبهذا يتكون بروتوبلاست متعدد النوي. يتكون جدار خلوي علي هذا البروتوبلاست الذى ينقسم بدوره ماراً بالمراحل المختلفة حتي يتكون نبات كامل. يجب الاشاره هنا الي أن البروتوبلاست الناتج من الأندماج التلقائي ليست له قيمة اقتصادية حيث أنه لا يمثل هجين جسدي، حيث يحدث الأندماج بين نواتين متشابهتين في التركيب الوراثي، وللحصول علي هجين جسدي فانه يجب اندماج اثنين من البروتوبلاست المتباين في التركيب الوراثي .. وهذا يعتبر أمراً ليس باليسير حيث أنه من الصعوبة دمج البروتوبلاست المنفصل .. ترجع هذه الصعوبة الي أن السطح الخارجي للبروتوبلاست يحمل شحنة سالبة، بالتالي فانه يحدث تنافر بين البروتوبلاست

وبعضها في البيئة المغذية. بديهيا اذا اريد اندماج بروتوبلاست منفصل فانه يجب تقليل الشحنة علي سطح البروتوبلاست وبالتالي اعطاء فرصة لتلامس الغشاء البلازمي لحدوث الأندماج.

عموماً فانه هناك طرق مختلفة تستخدم لأندماج البروتوبلاست

٨. ١ المعاملة بنترات الصوديوم Treatment with sodium nitrate

هذه هي أول طريقة استخدمت لأندماج البروتوبلاست، عند معاملة البروتوبلاست بنترات الصوديوم تقل الشحنة السالبة علي سطح البروتوبلاست وبالتالي تؤدى الي تلامس البروتوبلاست بعضها البعض .. أشارت الأبحاث العلمية الي أن هذا التأثير ناتج من أيون الصوديوم وليس النترات، حيث أن استخدام نترات البوتاسيوم بدلاً من نترات الصوديوم لم يعطي نفس التأثير. توضع البروتوبلاست في محلول ذات ضغط أسموزى مناسب يحتوي نترات صوديوم بتركيز ٥ر٥٪، يوضع الدورق في حمام مائي علي درجة حرارة ٣٥ مئوية لمدة ٥ دقائق، يزال المحلول من فوق البروتوبلاست وتحضن مره اخري في حمام مائي علي درجة حرارة ٣٠ مئوية لمدة ٣٠ دقيقة. يضاف بيئة مغذية تحتوي علي نترات الصوديوم بتركيز ١ر٪ وتترك ساكنة لفترة زمنية بعدها يغسل البروتوبلاست ويزرع في بيئة مغذية. بالرغم من سهولة هذه الطريقة غير أن نسبة قليلة من البروتوبلاست يحدث لها اندماج Giles (1974).

٨. ٢ التعريض لتركيز مرتفع من أيون الهيدروجين Exposure to high pH

نتيجة لقلة كفاءة الطريقة السابقة في اندماج البروتوبلاست فلقد حاول الباحثين ايجاد طريقة اخري ذات كفاءة عالية .. ووجد أن معاملة البروتوبلاست بمحلول ذات تركيز أيون هيدروجين مرتفع في وجود أيون الكالسيوم يؤدي لزيادة نسبة اندماج البروتوبلاست. عند معاملة البروتوبلاست في محلول يحتوي كلوريد الكالسيوم، مانيتول وتركيز أيون الهيدوجين ٥ر١٠ علي حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ١٠-١٥ دقيقة وجد أنه يحدث تجمع وتلاصق للبروتوبلاست، اطالة هذه الفترة الي ٢٥-٣٠ دقيقة تؤدى الي حدوث اندماج بين البروتوبلاست، كما أن زيادة فترة المعاملة الي ٤٥-٦٠ دقيقة يؤدي الي انحلال البروتوبلاست .. وقد أمكن بواسطة استخدام هذه الطريقة السهلة من للحصول علي هجين جسدى من اندماج البروتوبلاست Melchers & Labib (1974).

٨. ٣ استخدام بولي اثيلين جليكول Polyethylene glycol (PEG)

تعتبر هذه الطريقة أكثر الطرق شيوعاً واستخداماً لأندماج البروتوبلاست. يضاف ١ملليمتر من البيئة المغذية التي تحتوي بروتوبلاست الي ١ملليمتر من محلول بولي اثيلين جليكول بتركيز ٥٦٪، ترج الأنبوبة لمدة ٥ ثوان بعدها تترك ساكنة حتي يتجمع البروتوبلاست في القاع، تغسل البروتوبلاست وتنقل الي بيئة مغذية. لوحظ عند المعاملة بمحلول بولي اثيلين جليكول أن يتجمع البروتوبلاست معاً لتلاصق الغشاء البلازمي، عندما يزال بولي اثيلين جليكول فان معظم البروتوبلاست المتلاصقة تفقد تجمعها معاً وتعود الي شكلها الطبيعي، غير أن بعض البروتوبلاست تبقي متلاصقة وهذه تندمج معاً في مرحلة لاحقه. ولقد

لوحظ أن البروتوبلاست تندمج معاً في مرحلة تخفيف تركيز محلول بولي اثيلين جليكول، وليس خلال مرحلة تجمع البروتوبلاست .. لهذا فانه يراعي أن يتم تخفيف المحلول ببطىء حيث أن السرعة في هذه العملية تؤدي الي فقدان حيوية البروتوبلاست وتقلل من نسبة الأندماج Kao & Michayluk (1974). عموما فان يمكن القول أن كفاءة اندماج البروتوبلاست تعتمد علي عوامل متعددة منها الوزن الجزيئي لمادة بولي اثيلين جليكول، تركيز الماده المستخدمة، تركيز البروتوبلاست في المحلول، درجة حرارة التحضين.

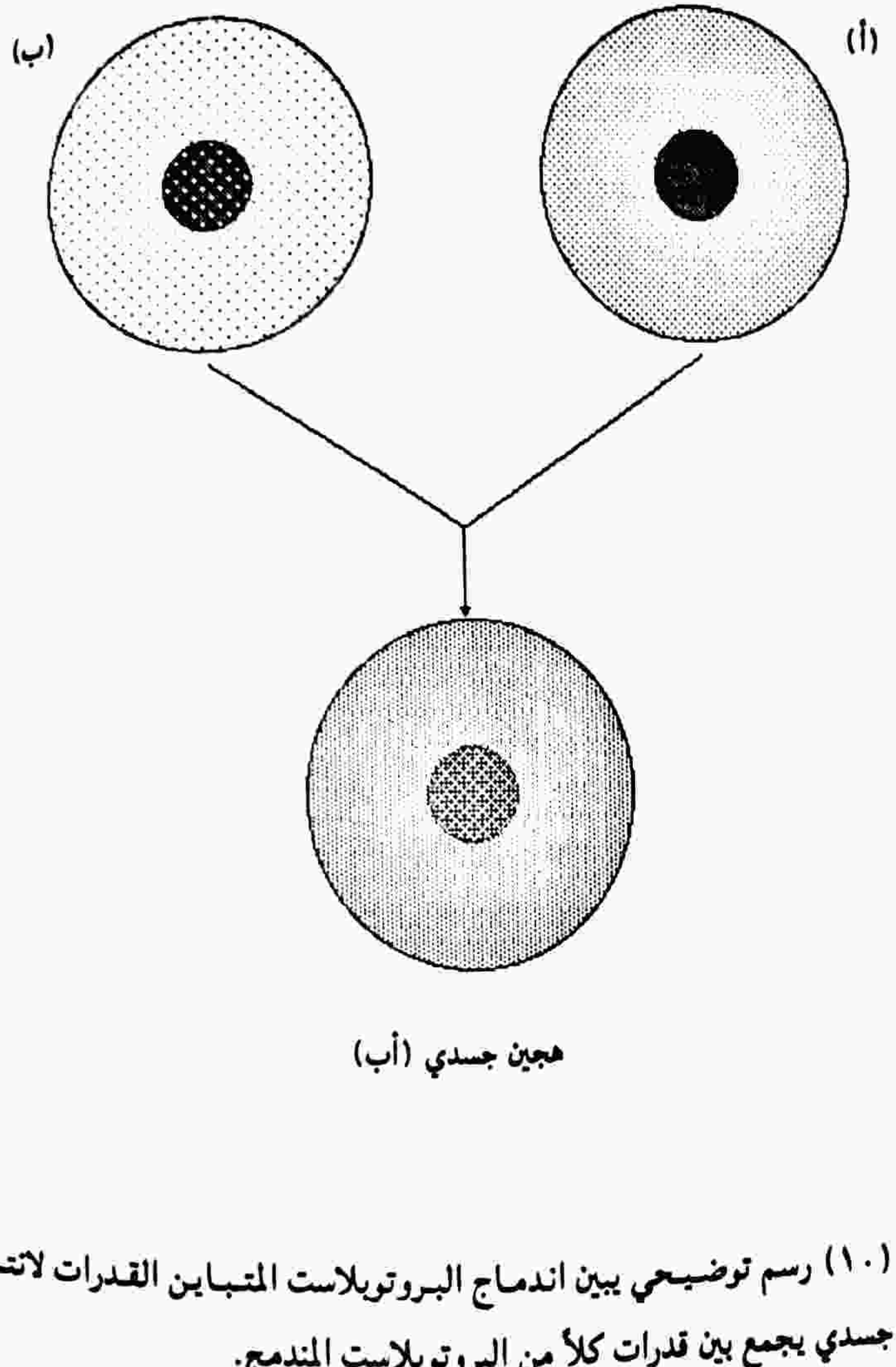
٩ التهجين الجسدي Somatic hybridization

تتركز نظرية انتاج الهجن الجسدية علي مقدرة البروتوبلاست المتباين وراثياً للأندماج معاً وتطورها الي نبات كامل ماراً بالمراحل التطورية المختلفة .. قد يبدو للقارىء أن انتاج هجن جسدية هي عملية بسيطة وغير معقدة، غير أن الحقيقة مغايرة لذلك تماما .. اندماج البروتوبلاست هو خطوة أولية يلزم بعدها المرور بمراحل تطورية متعددة حتي يتكون الهجين الجسدي. عموماً فانه ليس من الصعب المجاز الخطوة الأولي الخاصة باندماج البروتوبلاست، غير أنه من الصعوبة البالغة حث البروتوبلاست المندمج علي الدخول في المراحل التطورية التي تقود الي تكون نبات هجين جسدي وترجع أسباب الفشل الي أحد أو بعض الأسباب التالية

- الفشل في اندماج أنوية البروتوبلاست.
- فقدان الكروموسومات نتيجة للأندماج بين اثنين من البروتوبلاست ذات الدورات الخلوية المختلفة.
- فقدان الكروموسومات نتيجة للأختلاف الزمني في التضاعف الكروموسومي بين نواتي البروتوبلاست.

هنا يتضح لنا أن عملية تكوين هجين جسدي ليست بالعملية اليسيره نظراً لانخفاض كفاءة ناتج الأندماج أو نتيجة للتغيير في التركيب الوراثي سواء بالتعديل أو نقدان الكروموسومات. يستخدم في عملية اندماج البروتوبلاست لانتاج هجين جسدى نوعين من البروتوبلاست المتباينة التركيب الوراثي. غير انه قد يحدث الأندماج أيضا بين البروتوبلاست المتشابهه وراثيا، لهذا فانه يجب أن يكون هناك طريقة مثلي لفصل النوعين المختلفين لناتج الأندماج حيث يمكن الأستفادة من الهجين الجسدي. عموماً تعتمد عملية اختيار الهجن الناتجة علي مقدرتها علي النمو بعكس الخلايا الأخري التي ليست لها هذه المقدرة .. يرجع الأساس النظري لهذه الظاهرة إلي أن كل بروتوبلاست منفصل لايمكنه النمو نتيجة لخلل في بعض الوظائف الفسيولوجية أو الكيميائية، عند اندماج البروتوبلاست تكتمل العوامل اللازمة وبهذا يستمر الهجين في النمو.

ويمكننا بتتبع المثال التالي فهم أساس هذه الظاهرة .. تم فصل بروتوبلاست من نبات الدخان ذات اللون الأخضر والتي تحتاج الي الامداد بحمض النيكوتين في البيئة المغذية، وكذلك فصل البروتوبلاست من نباتات الدخان ذات اللون الأخضر الباهت والتي تتطلب الأمداد بالجلوكوز في البيئة المغذية لاستمرار نموه .. عندما يتم اندماج اثنين من كلا من النوعين من البروتوبلاست فانه يمكن لناتج الأندماج أن ينمو في بيئة مغذية خالية من حمض النيكوتين والجلوكوز (شكل ١٠). ولقد أمكن للعلماء .Carlson et al (1972) من انتاج هجين جسدى بين نوعين مختلفين من نباتات الدخان الذى يمكن لهجينها التقليدي الناتج من التلقيح والأخصاب من النمو في بيئة Nagata & Takebe. علي العكس من هذا فان بروتوبلاست كلا من النوعين منفصلا ليست لها المقدره علي النمو في هذه البيئة .. ولقد أمكن لناتج



شكل (١٠) رسم توضيحي يبين اندماج البروتوبلاست المتباين القدرات لانتاج هجين جسدي يجمع بين قدرات كلاً من البروتوبلاست المندمج.

اندماج النوعين المختلفين من النمو علي بيئة Nagata & Takebe وتكوين مستعمرات خلوية اجري نقلها إلي بيئة مغذية تحتوي منظمات النمو وذلك كمقياس آخر للتأكد من اختيار الهجين الجسدي، حيث أن المستعمرات الخلوية للهجن لها المقدرة علي استمرا النمو في بيئة مغذية خالية من منظمات النمو، وعلي العكس من هذا فان المستعمرات الخلوية الناتجة من بروتوبلاست كل نوع علي حده ليست لها المقدرة علي النمو في بيئة خالية من منظمات النمو. في طريقة اخري لانتاج الهجن الجسدية أمكن للعلماء Power et al. (1976) من انتخاب الهجين الجسدي الناتج من اندماج نوعين مختلفين من البروتوبلاست لنباتات البتونيا .. تعتمد هذه الطريقة علي أن الخلايا المنزرعة من نبات P. hybrida لا يمكنها النمو والأنقسام في وجود المضاد الحيوي Actinomycin D بينما يمكن لخلايا نبات P. parodii من النمو في وجود هذا المضاد الحيوي، غير أنها ليست لها المقدرة علي تكوين نباتات كاملة من الكالس المتكون، وبهذا يمكننا القول أن الخلايا الوحيدة التي تملك المقدرة علي النمو في وجود المضاد الحيوي وتتطور الي نبات كامل هي الهجن الجسدية الناتجة من اندماج بروتوبلاست النوعين السابقين من البتونيا.

١٠ تعليق عام علي فصل وزراعة البروتوبلاست

General comment on protoplast isolation and culture

بالرغم من التقدم المتوالي والسريع في فصل وزراعة البروتوبلاست من الخلايا النباتية للأنواع المختلفة والمقدرة علي تفهم متطلبات الخلايا من العناصر المغذية والعوامل البيئية المحيطة وتوجيهها من أجل الحصول علي نباتات كاملة، غير أنه مايزال هناك صعوبات تواجه التقدم في الحصول علي هجن جسدية .. ونظراً

لصعوبة ايجاد معايير لتمييز هذه الهجن، فان هناك حاجه ملحه الي مزيد من الدراسات علي الصفات الفسيولوجية، الكيميائية، البيئية لبروتوبلاست الأنواع المختلفة حتي يمكن ايجاد طريقة سهلة ومناسبة وموثوق فيها للتعرف علي الهجين الجسدي. عموماً فانه يمكن القول أن التقدم في مثل هذه الدراسات وانتاج نباتات من الهجن الجسدية سوف يكون ذو أهمية اقتصادية كبيرة من خلال التغلب علي بعض عقبات تحسين الثروة النباتية. عالقاً في الأذهان التقدم المذهل الذي يكاد يسابق الزمن في التعرف علي الجينات الوراثية التي تحكم الصفات المختلفة للكائن الحي وامكانية فصل المرغوب منها .. فاننا نجد احلالا للطرق التقليدية للحصول علي هجين جسدي بالطرق الحديثة والتي يتم بواسطتها تقديم أحد أو بعض الجينات الوراثية لخلية الكائن الحي بهدف تعديل التركيب الوراثي .. نظراً للكم الهائل من المعلومات التي يجب أن يلم بها القارئ قبل تناول نقل الجينات الوراثية فان هذا الموضوع سوف يمثل الماده العلمية لكتاب كامل من سلسلة البيوتكنولوجي.

جامعة القاهرة
كلية الزراعة بالفيوم
المكتبة

١٠

الأجنة الأحادية
Haploid embryogenesis

حبوب اللقاح هي عباره عن خلايا متخصصة ذات صفات تميزها عن غيرها من باقي خلايا النبات. وتعتبر حبوب اللقاح هي الناتج النهائي لمجموعة متعددة من العمليات المعقدة، وهذه تشمل الانقسام الميوزي للخلايا الام. من المعلوم ان هذا الأنقسام يؤدي الي الاختزال في عدد الكروموسومات بالخلايا الناتجة وبالتالي فان هذه الخلايا تحتوي علي عدد نصفي للكروموسومات الموجودة بالخلية الأم.

نحن نعلم أن الخلية الحية تحتوي علي مجموعتين من الكروموسومات ويرجع أصل هاتين المجموعتين أحدهما الي الأب (حبة اللقاح) والاخري الي الأم (البويضة) ويحدث أن تلتقي هاتان المجموعاتان أثناء الأخصاب أول مرحلة في عملية الانقسام الميوزي هي عمل نسخة جديدة من المادة الوراثية للخلية، بهذا فان كل كروموسوم يتضاعف في العدد. كما أنه أثناء عملية الانقسام الميوزي يحدث عملية هامة جداً الا وهي العبور وفيها يتكون توليفة جديدة من الجينات الوراثية علي الكروموسومات. عموما فأنه يمكن القول أنه نتيجة للأنقسام الميوزي الأول والثاني يتكون أربعة خلايا كل خلية تحتوي علي عدد نصفي من الكروموسومات الموجودة بالخلية الام، ولهذا فأن كل خلية نباتية تتعرض للأنقسام الميوزي تنتج في النهاية أربعة خلايا احادية ، هذه الخلايا تتطور بدورها لتعطي في حبوب لقاح ناضجة

لتعيد دورة حياة النبات بالتلقيح والاخصاب. بالرغم من أننا هنا ليس بصدد شرح المراحل التطورية الطبيعية التي تمر بها الخلايا الأحادية غير أننا من أجل ايضاح المراحل التي يتكون بها الجنين الاحادي في البيئة المغذية، فاننا سوف نوضح باختصار بعض ملامح التطورالطبيعي لحبوب اللقاح. الانقسام الميوزي الذي يحدث في الخلية الام هو أساس بداية تكون حبة اللقاح، وفي مرحلة لاحقة تتعرض حبة اللقاح الي الانقسام الميتوزي الأول الذي يتميز بتكوين خليتين غير متساويتين احداهما الخلية الخضرية والاخري الخلية التكاثرية .. ويتلو هذا تعرض الخلية التكاثرية للإنقسام الميتوزي الثاني وهو بعكس الانقسام الميتوزي الأول حيث يعطي خليتين متساويتين قد يحدث هذا الانقسام إما قبل أو بعد إنبات الانبوبة اللقاحية، وبهذا تنتهي الانقسامات بحبوب اللقاح ويلي هذا تكون غطاء حبة اللقاح وبهذا نصل الي المرحلة النهائية للتطور. بالرغم من أن حبوب اللقاح هي خلايا لها برنامج ووظيفة محدده وهي ببساطة اعادة دورة الحياء بواسطة التلقيح والاخصاب وتكوين جنين، غير أنه وجد عند زراعة متك بعض النباتات ان بعض حبوب اللقاح تعدل من برنامجها الوظيفي التي انشأت من أجله وتنقسم بشكل مخالف لمثيلاتها في الطبيعة، وتعطي خليتين متساويتين في الانقسام الميتوزي الأول .. نتيجة لاستمرار انقسام الخلايا الناتجة فانه يتكون جنين وباستمرار تطور هذا الجنين فانه يعطي نبات كامل. نظرياً فان النبات الناتج يحتوي علي عدد فردي من الكروموسومات ولهذا يطلق عليه نبات احادي. وكان الفضل في اكتشاف هذه الظاهرة الي Guha & Maheshwari (1964) وبهذا فاننا من مفهوم عملي للتطور الحيوي لحبوب اللقاح التي تستبدل برنامجها الجاميطي ببرنامج جنيني فانه يمكن القول أن هذا التحول لم يكن نتيجة لتغير في التركيب الجيني للخلية وانما نتيجة للتغيير في التعبير الجيني.

نظراً للأهمية القصوي للنباتات الأحادية خاصة في برامج التربية وتحسين المحاصيل الزراعية، فلقد انجذب العلماء الي طريقة زراعة المتك للأنواع النباتية بهدف الحصول علي اعداد كبيرة من النباتات الأحادية .. غير أنه بالرغم من المجهود الضخم الذى بذل حتي وقتنا هذا فانه مايزال هناك بعض الأنواع النباتية التي لم تستجب للزراعة في بيئة مغذية .. ولتصور ما تم انجازه خلال السنوات السابقة وما يراد انجازه في السنوات القادمة فاننا نعلم أن النباتات الزهرية تقسم الي مجموعتين

- مجموعة النباتات ذات الفلقتين، وهذه تحتوي حوالي ٢٥٠٠٠٠ نوع نباتي
- مجموعة النباتات احادية الفلقة وهذه تحتوي حوالي ٥٠٠٠٠ نوع نباتي

من اجمالي حوالي ٣٠٠٠٠٠ نوع نباتي فانه تم بنجاح انتاج نباتات احادية بطريقة زراعة المتك من حوالي ٢٤٠ نوع نباتي فقط، وهذا يشير الي المجهود الضخم المراد بذله في السنوات القادمة للحصول علي نباتات احادية من الأنواع التي لم تستجب بعد للزراعة في بيئة مغذية.

١ أهمية النباتات الأحادية Significance of haploid plants

١٠١ انتاج الطفرات Mutant production

النباتات الأحادية ذات أهمية عظمي في برنامج التربية حيث أنه باستخدام نباتات تحتوي علي نصف العدد الكروموسومي للخلية الام فانه يسهل التعرف علي الجينات الوراثية التي تحكم الصفات المختلفة للنبات، هذا لان الجينات الوراثية الموجودة بالخلية الأحادية تعبر عن نفسها كاملة فيظهر تأثير الصفات السائدة والمتنحية كما هي موجوده علي الكروموسومات. ولقد استخدمت طرق متعددة لانتاج الطفرات منها

- تعريض الأجنة الأحادية المتكونة من حبوب اللقاح الي أشعة جاما ، بهذه المعاملة أمكن انتاج طفرات تختلف في لون الزهرة، شكل الورقة، شكل البتلات.
- تعريض النباتات الام الي أشعة اكس قبل أن يجري فصل وزراعة المتك، وقد ثبت أن الأجنة الناتجة من حبوب اللقاح بها نسبة عالية من الطفرات نتيجة لهذه المعاملة.
- معاملة زراعات معلقات حبوب اللقاح المنفصلة والمنزرعة في بيئة مغذية سائلة بمادة Ethyl methane sulphate (EMS) يؤدى الي ظهور الطفرات .

لقد استخدمت هذه الطريقة بنجاح في الحصول علي نباتات كاملة مقاومة لبعض المضادات الحيوية وكذا المستويات المرتفعة من ملح كلوريد الصوديوم.

٢.١ التباين الجاميطي Gametoclonal variation

يستخدم تعبير التباين الجاميطي ليعبر عن الاختلافات التي تظهر علي النباتات الناتجة من زراعة حبوب اللقاح في بيئة مغذية. عموماً فانه من المعلوم أن النباتات الأحادية بذاتها ليست لها قيمة في مجال تربية النباتات، غير أن النباتات الأحادية و المتضاعفة هي الهدف الأساسي لمربي النباتات والتي من خلالها يتم اختيار الأنواع النباتية الجديدة بهدف تحسين المحاصيل الزراعية أو بهدف اجراء الدراسات الوراثية Morrison & Evans (1984).

ولقد أمكن باستخدام هذه الطريقة الحصول علي أنواع نباتية ذات صفات مقاومة للأمراض وذات قدرة انتاجية مرتفعة .. ويرجع التباين الجاميطي للنباتات الناتجة من زراعة حبوب اللقاح الي التغيير في تركيب الكروموسومات، وهذا يشمل الغاء عمل مجموعة من الجينات، أو تغيير موقعها علي الكروموسوم أو انعكاس وضعها

علي الكروموسوم .. هذا بالتالي يؤدي الي تغيير في التعبير الجيني الذي بدوره يؤدي الي ظهور التباين بين النباتات الناتجة.

٣.١ انتاج أنواع جديدة Production of new varieties

من المعلوم لدينا أنه أثناء عمليات الأنقسام الميوزي في الخلية الام فانه يحدث تبادل لأجزاء من المادة الوراثية من الكروموسومات فيما يسمي بعملية العبور ويكون نتيجة لهذا أن ينتج بعض التراكيب الجديدة التي تختلف عن الأباء وعن بعضها البعض ولهذا فان كل حبة لقاح تعتبر ذات تركيب وراثي مميز، وبالتالي فانه عندما يتم زراعة حبوب اللقاح الناتجة من النباتات الهجين فانه يكون هناك اختلافات كبيرة في التركيب الوراثي للنباتات الناتجة ولهذا تصبح هناك فرصة كبيرة لاختيار التراكيب المناسبة التي لها صفات مميزه ومرغوب فيها .. ولقد أمكن التعرف علي أنواع جديدة ذات صفات مرغوبة في كل من الأرز والقمح والشعير وغيرها من المحاصيل الهامة.

٤.١ انتاج سلالات نقية Production of homozygous plants

انتاج نباتات متجانسة بطرق التربية التقليدية تحتاج الي العديد من السنوات التي تصل الي عشر سنوات، ومع هذا فانه مايزال يصعب الحصول علي نباتات نقية بنسبة ١٠٠٪ .. هنا يجب الذكر أنه من المستحيل الحصول علي نباتات نقية من الأنواع التي تتميز بعدم التوافق الذاتي، وتعتبر النباتات الأحادية هي الوسيلة الوحيدة للحصول علي نباتات نقية متجانسة، حيث أنه بتضاعف عدد الكروموسومات بهذه النباتات يمكن الحصول علي العديد من النباتات المتجانسة ..

وبهذا فان هذه الطريقة توفر العديد من السنوات في العمل المتواصل لانتاج نباتات نقية، حيث أنه يمكن أن يتم انتاج النباتات النقية الأحادية المتضاعفة، في فتره قد تصل الي عدة أشهر بدلا من عدة سنوات (1977) .Wenzel et al.

هناك بعض العقبات التي تواجه الاستفادة من هذه الطريقة لانتاج نباتات متجانسة منها أن بعض الأنواع النباتية يصعب انتاج نباتات احادية من زراعة حبوب لقاحها وهناك أنواع اخري يصعب احداث تضاعف كروموسومي للنباتات الأحادية الناتجة من حبوب اللقاح أو حدوث تضاعف متعدد وهذا يؤدي الي انتاج نباتات ليست ذات قيمة عالية في برامج التربية.

٥.١ نقل الجينات Gene transformation

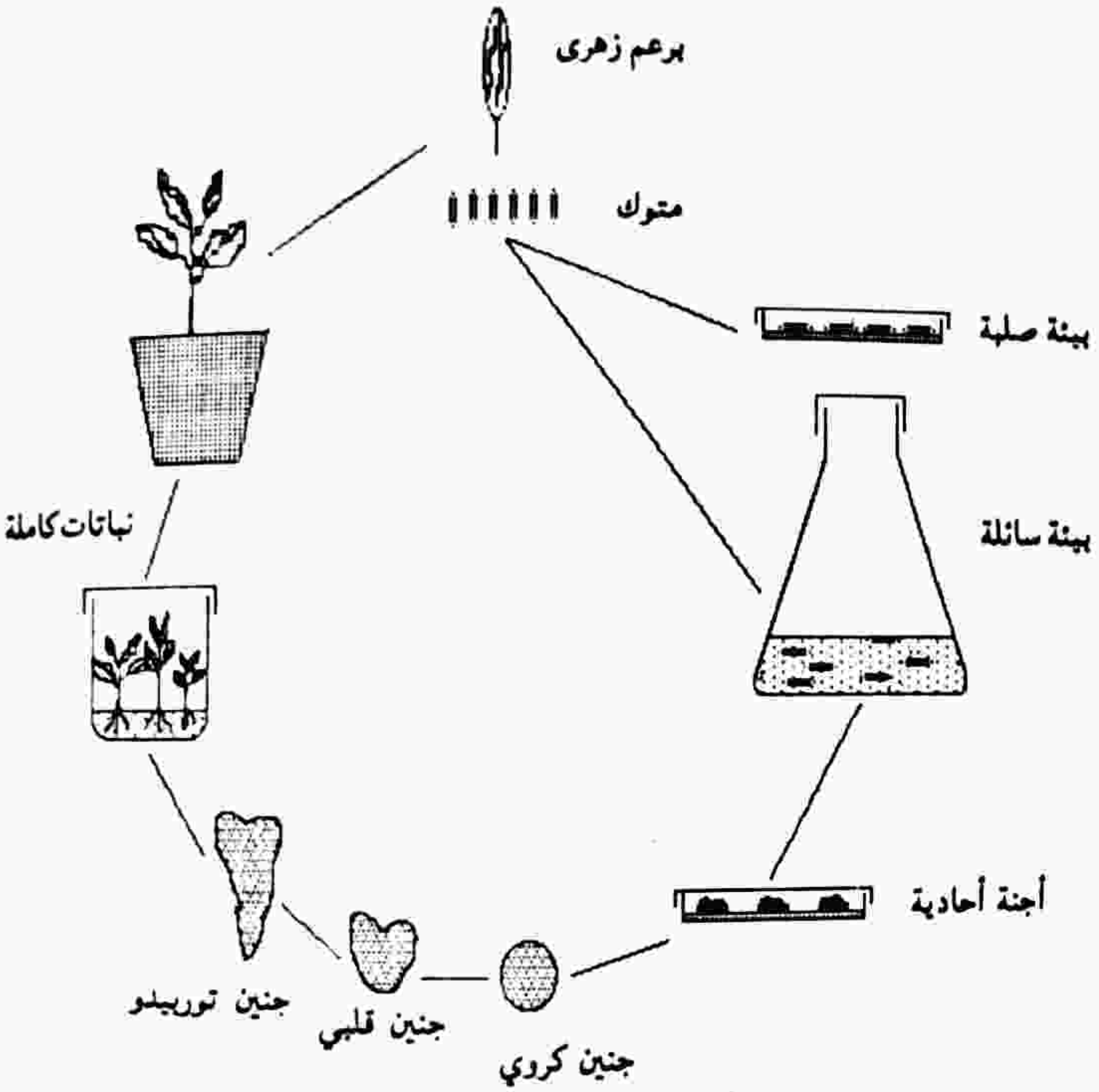
تعتبر حبوب اللقاح المنفصلة والمنزرعة في صورة معلقات خلوية مادة نباتية ذات أهميـة خاصه في نقل بعض الجينات الوراثيـة، ولقد أمكن بالفعل اجراء بعض التجارب علي نقل الجينات الوراثية لبعض حبوب اللقاح بطريقة الحقن الدقيق الذي يستخدم فيها حقنة ذات سن رفيع مدبب، وهذا يخترق جدار الخلية ويتم حقن الجينات المرغوب في نقلها الي الخلية مبا شرة .. بهذا يأمل أن يتم اندماج الجينات الي المادة الوراثية للخلية، ويتم التعبير عن نفسها فتعطي الصفات المرغوبة في النباتات الناتجة. تتميز هذه الطريقة في نقل الجينات الوراثية بأنه يتم فيها نقل الجينات الي خلية واحدة ذات عدد نصفي من الكروموسومات، نتيجة للانقسام الخلوي لهذه الخلية فانها تعطي خلية اخري لها نفس التركيب الوراثي للخلية التي تم نقل الجينات الوراثية اليها .. بالتالي عندما يتكون نبات كامل من استمرار انقسام حبة اللقاح فهذا يضمن أن يحتوي جميع خلاياه علي الجينات الوراثية الجديدة التي تم نقلها للخلية الأم.

٢ انتاج النباتات الأحادية Production of haploid plants

هناك عدة طرق لانتاج النباتات الأحادية من النباتات المزهرة، غير أن أهم الطرق والأكثر شيوعاً لانتاج نباتات احادية هي زراعة المتك التي تحتوي علي الآف من حبوب اللقاح، اما الطريقة الاخري تعتمد علي فصل حبوب اللقاح من جدار المتك وزراعتها في بيئة مغذية سائلة.

٢. ١ زراعة المتك Anther culture

تختار البراعم الزهرية الغير متفتحة والتي تحتوي حبوب اللقاح في المرحلة المناسبة للزراعة، يطهر السطح الخارجي للبرعم الزهري بعدها تغسل ثلاث مرات في ماء معقم. تفتح الزهرة بواسطة ملقط مدبب وتزال البتلات والكأس مع مراعاة عدم احداث أضرار ميكانيكية لمتك الزهرة (شكل ١١). تفصل المتك من الزهرة برفق شديد ويراعي أن يزال أيضاً بقايا الخيط الذى يكون جزءاً منه ملتصق بالمتك .. وجود بعض خلايا الخيط علي المتك المنزرعة علي بيئة مغذية يؤدي الي توقف نشاط الانقسام الخلوي في هذه المنطقة وتثبيط تكون أجنة من حبوب اللقاح. تزرع المتك المنفصلة علي بيئة مغذية صلبة، غير أنه في بعض الحالات اجريت زراعة المتك علي بيئة مغذية سائلة .. عموماً يجري تحضين الزراعات علي درجة حرارة ٢٥-٢٧ درجة مئوية وكثافة ضوئية لاتقل عن ...٢ (LUX) وفترة ضوئية ١٦ ساعة ضوء/٨ ساعات ظلام . تبعاً للنوع النباتي المستخدم فانه يبدأ ظهور الأجنة بعد فترة تراوح بين ٣-٨ أسابيع. عندما يظهر الجنين من غلاف المتك فانه

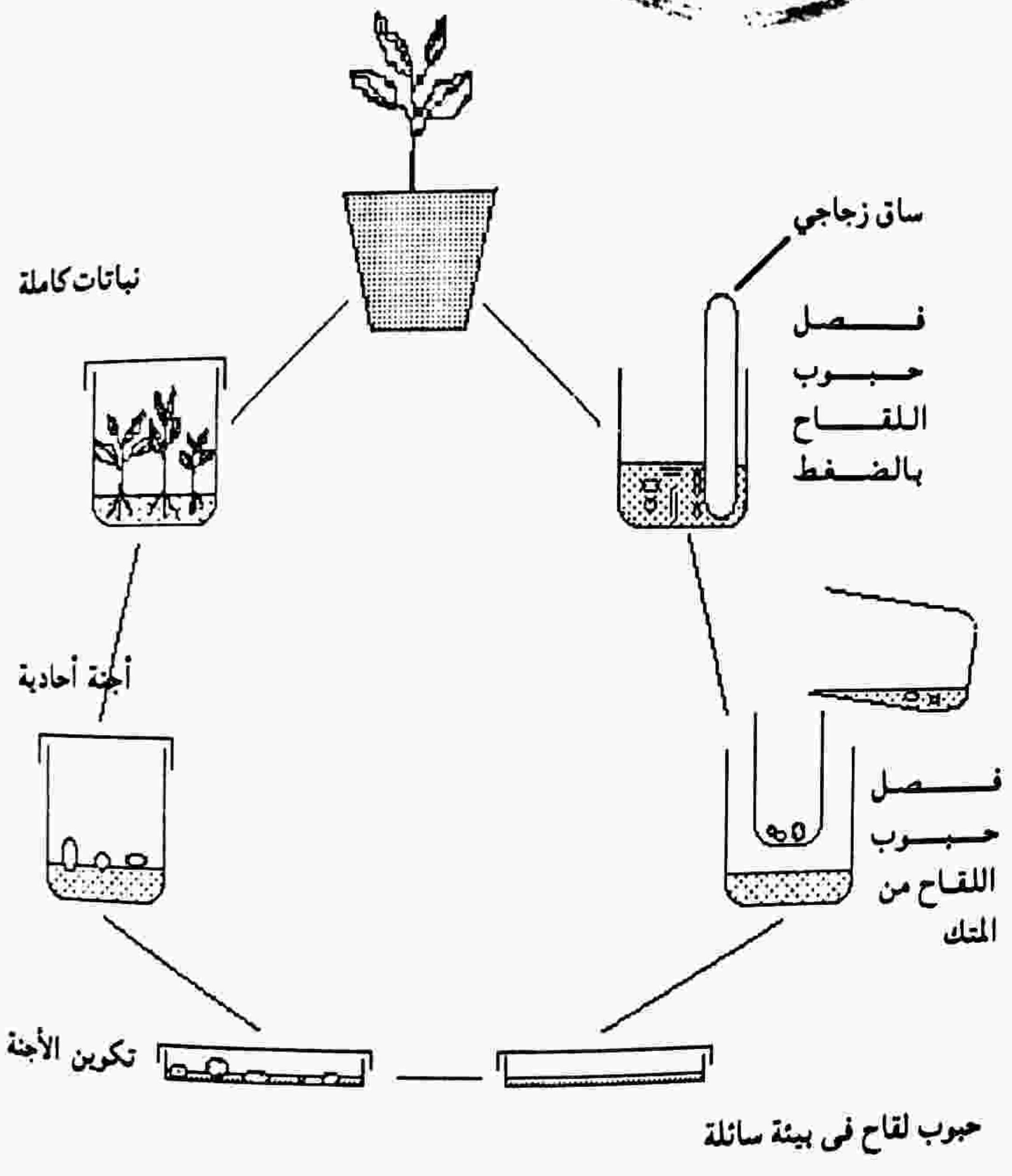


شكل (١١) رسم توضيحي يبين مراحل فصل وزراعة المتك علي بيئة مغذية لتكوين أجنة احادية ومنها نباتات كاملة.

غالباً مايكون في المرحلة الكروية، يتطور هذا الجنين ماراً بمرحلة الشكل القلبي، التوربيدو، الكوتيلدن وبهذا يصل الجنين الي مرحلة النضج الكامل .. يبدأ الجنين الناضج في اعطاء جذور وأفرع علي نفس البيئة المغذية أو عند نقله الي بيئة اخري، عموماً فانة عندما يتكون العديد من النباتات الصغيرة في حيز غير كافي بداخل وعاء الزراعة فانه يراعي أن يتم نقل هذه النباتات الي بيئة مجهزة حديثاً، وعندما تصل النباتات الي حجم مناسب فانه يجري نقلها الي التربة الصناعية وذلك بعد غسيل النباتات مما يعلق بها من بقايا البيئة المغذية .. ويراعي أن تغطي النباتات الصغيرة بأكياس من البلاستيك الشفاف في الاسبوع الأول من نقلها للتربة الصناعية وذلك للمحافظة علي الرطوبة وعدم فقدان النباتات التي تتطور وتنمو لتصل الي مرحلة النضج والازهار.

٢.٢ زراعة حبوب اللقاح منفصلة Culture of isolated microspores

تجمع البراعم الزهرية التي تحتوي حبوب اللقاح في المرحلة المناسبة لانتاج أجنة، يطهر السطح الخارجي، تغسل ثلاث مرات في ماء معقم، وتفصل المتك كما سبق الوصف. توضع حوالي ٥٠ متك في كأس زجاجي صغير يحتوي ١٠-٢٠ مللي من البيئة المغذية السائلة، يضغط علي المتك برفق فتخرج حبوب اللقاح من الغلاف وتصبح معلقة في البيئة المغذية السائلة (شكل ١٢). لازالة بقايا غلاف المتك فإنه يمرر الخليط من خلال فلتر ذو ثقوب ذات فتحات تسمح بمرور حبوب اللقاح فقط وتحتجز بقايا انسجة المتك .. يستقبل معلق حبوب اللقاح في أنبوبة زراعة معقمة التي توضع في جهاز الطرد المركزي علي سرعة حوالي ١٠٠ لمدة ٣ دقائق وذلك للسماح لحبوب اللقاح بالتجمع بقاع الأنبوبة .. يؤخذ السائل فوق



شكل (١٢) رسم توضيحي يبين فصل وزراعة حبوب اللقاح فى بيئة مغذية سائلة لإنتاج أجنة ونباتات كاملة.

حبوب اللقاح ويستبعد وتضاف بيئة مغذية جديدة للغسيل، تكرر هذه الخطوة مرتين او ثلاث مرات وذلك بهدف غسل حبوب اللقاح من مثبطات النمو التي تنطلق من جدر المتك عند الضغط عليها.

تزرع حبوب اللقاح في بيئة مغذية سائلة في اطباق قطرها حوال ٥سم، يجري تحضين زراعات حبوب اللقاح علي الحرارة الملائمة وغالباً ما تكون في الظلام التام حتي تتكون الاجنة النباتية. تنقل الاجنة الناضجة الي بيئة مغذية صلبة، عندما يتكون مجموع جذري وخضري مناسب تنقل النباتات الي تربة صناعية. بالرغم من أن زراعة حبوب اللقاح منفصلة في بيئة مغذية سائلة تحتاج عناية خاصة عند اجرائها غير أنها لها مميزات عديدة منها ما يلي

- التخلص من تأثير الجدر المحيطة بحبوب اللقاح علي تكون الاجنة.
- تقليل كثافة حبوب اللقاح بداخل غلاف المتك وبذلك يقل التنافس علي المواد الغذائية.
- التأكد من أن الاجنة أو الكالس ينتج من انقسام حبوب اللقاح وليس من الجدر المحيطة بها.
- هذه الطريقة تسهل دراسة العوامل المختلفة التى تؤثر مباشرة علي تكوين الأجنة من حبوب اللقاح بدون تأثير غلاف المتك.
- يسهل الحصول علي طفرات بواسطة تعريض حبوب اللقاح المنفصلة الي المواد المطفرة المختلفة.
- يمكن نقل بعض الجينات الوراثية المرغوب فيها الي حبوب اللقاح في مرحلة مبكرة من تكوين الجنين.

عموما فانه يجب التأكد من أن النباتات الناتجة سواء من زراعة المتك أو من زراعة

حبوب اللقاح منفصلة احادية وتحتوي علي عدد نصفي من الكروموسومات ويجري هذا بواسطة احدي الطرق التالية

- عد الكروموسومات في خلايا جذور النباتات الناتجة.
- مقارنة عدد وحجم الثغور بالنباتات الأحادية مع مثيلاتها في النباتات الثنائية، حيث وجد أنها صغيرة الحجم في النباتات الأحادية .
- تتميز النباتات الأحادية الناضجة بانها أقل حجماً من النباتات الثنائية، يصل حجم الزهرة والورقه تقريباً نصف حجم مثيلتها في النباتات الثنائية.
- النباتات الأحادية عقيمة ولا تعطى بذوراً.

عموماً فان النباتات الأحادية الناتجة يمكن أن تعامل ببعض المواد الكيمائية وذلك لمضاعفة عدد الكروموسومات بها، وبذلك يمكن الاستفادة منها في مجالات متعددة .. ويمكن اتباع احدي الطرق التالية لتحويل النباتات الأحادية الي ثنائية.

- معاملة النباتات الناتجة بمحلول كولشيسين بتركيز ٥ر.-١٪ لمده تتراوح بين ٢٤-٤٨ ساعة، تغسل النباتات جيداً بعد المعاملة وتزرع في تربة صناعية.
- اضافة مادة الكولشيسين الي البيئة المغذية بتركيز ١-٢٥ ملليجرام/لتر لمدة ١٢ ساعة.
- معاملة براعم النباتات الناضجة بمادة كولشيسين بتركيز ٥ر.٪.

من الضروري الاشارة الي أن مادة كولشيسين هي مركب مطفر، ولهذا يجب اتباع الاحتياطات اللازمة عند استعمال هذه المادة الكيميائية.

٣ البيئة المغذية Nutrient medium

في المراحل المبكرة لزراعة حبوب اللقاح كان الاعتقاد السائد أن انتاج نباتات احادية

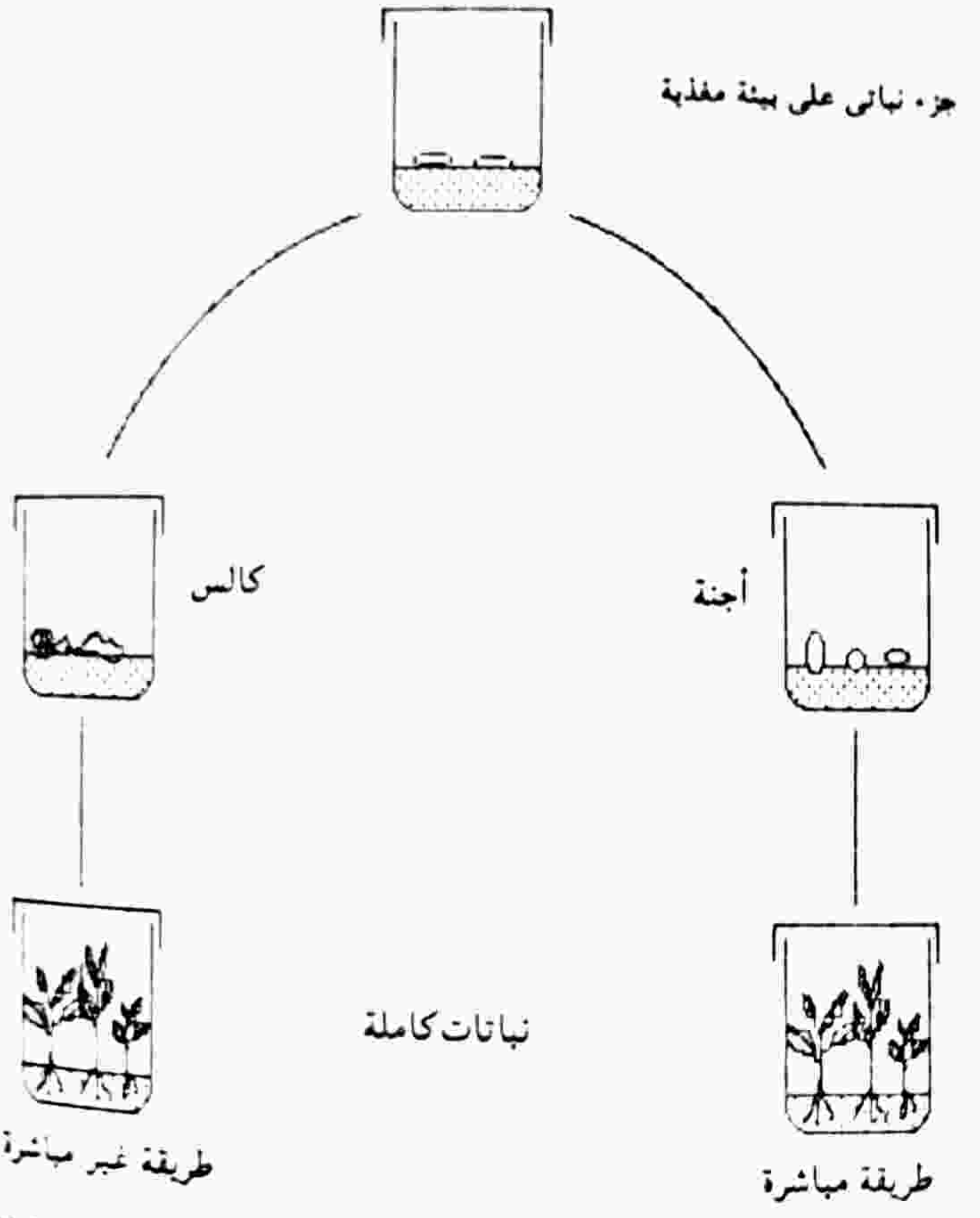
يحتاج فقط الي بيئة مغذية بسيطة .. هذا لأنه أمكن الحصول علي أجنة صغيرة من زراعة حبوب لقاح نبات الدخان علي محلول سكري يحتوي علي ٢٪ سكروز فقط!! وقد استنتج من هذا أن المراحل المبكرة لتحول حبة اللقاح الي جنين لا تحتاج الي وجود عناصر مغذية كبري، صغري، فيتامينات، منظمات النمو، غير أن وجد أن وجود الحديد في البيئة المغذية أمر هام وضروري لتطور الأجنة الصغيرة المتكونة الي نباتات كاملة. هذا يشير الي أن انتاج النباتات الأحادية من حبوب اللقاح تتميز بوجود مرحلتين أساسيتين

- مرحلة تحول الخلية الي البرنامج الجنيني.
- مرحلة انقسام الخلية وتطور الجنين.

لوحظ أن متطلبات حبوب اللقاح المنزرعة داخل المتك من البيئة المغذية تختلف عن متطلبات حبوب اللقاح المنفصلة من العناصر المغذية، حيث وجد أن المتك المنزرعة تحتاج الي تركيب مبسط من العناصر المغذية مقارنة بحبوب اللقاح المنفصلة، وهذا يشير الي أهمية جدار المتك الذى يؤدى دوراً هاماً أثناء تحول وتطور حبوب اللقاح الي جنين .. عموماً يمكن القول أن البيئات المستخدمة لزراعة حبوب اللقاح تختلف تبعاً للنوع النباتي، بل قد يكون احتياج متك نوع نباتي ما لعناصر مغذية يختلف عن احتياج حبوب اللقاح المنفصلة لنفس النوع من العناصر المغذية.

: طرق تكوين الجنين Pathways for embryo formation

تنقسم حبة اللقاح لتعطى العديد من الخلايا. من هذه الخلايا قد يتكون جنين أو كالس احادي التركيب الكروموسومي وبذلك يمكن القول أن النباتات الأحادية قد تنتج بطريقتين اما بالطريق المباشر أو الطريق الغير مباشر (شكل ١٣).



شكل (١٣) رسم توضيحي يبين طرق تكوين النبات الاحادي إما بالطريقة المباشرة أو غير المباشره التي يتوسطها الكالس الأحادي .

٤. ١ الطريق المباشر Direct pathway

تتشابه الأجنة الناتجة بهذه الطريقة بمراحل تطور الجنين الزيجوتي، ينتج الجنين نتيجة للأنقسام المنتظم لحبة اللقاح داخل جدارها، ويعتبر هذا الجدار عامل محدد للأنقسام المنتظم لحبة اللقاح المتحولة الي جنين. عندما يصل عدد الخلايا بداخل جدار حبة اللقاح حوالي ١٠-٢٠ خلية فانها تضغط علي الجدار .. وأخيراً تسبب تمزقه ويخرج الجنين وهو في المرحلة الكروية الذى يتطور ويصل الي جنين كامل ناضج يمكن منه الحصول علي نبات كامل.

٤. ٢ الطريق الغير مباشر Indirect pathway

تنقسم خلية حبة اللقاح وينفتح الجدار المحيط بها في مراحل مبكرة من الانقسام، وحيث ان وجود هذا الجدار هام لانتظام الانقسام الخلوي فان عدم وجودة يؤدى الي الانقسام العشوائي الغير منتظم ونتيجة لهذا يتكون عدد كبير من الخلايا متجمعة معاً مكونا ما يسمي بالكالس.

هناك كثير من الأبحاث تشير الي أن تعرض الجنين في مرحلة مبكره الي اختلال في العناصر المغذية يؤدى الي تكون الكالس ..كما انة في كثير من الأنواع النباتية يمكن نقل الكالس الي بيئة مغذية اخري تنشط تكوين النباتات ومنه يمكن الحصول علي نباتات كاملة، غير أنه في بعض الأنواع الاخري يصعب الحصول علي نباتات من الكالس المتكون من حبوب اللقاح، ولقد اجري تقسيم الكالس الي

- كالس جنيني Embryogenic callus

يمكن منه الحصول علي نباتات كاملة بواسطة النقل علي بيئة مغذية مناسبة.

[stamp]

- كالس غير جنيني Non-Embryogenic callus

يصعب الحصول علي نباتات من هذا الكالس غير أنه يمكن في بعض الأنواع تنشيط تكوين الجذور فقط وليست الأفرع.

عموماً فانه لايفضل استخدام الكالس الاحادى في الحصول علي نباتات كاملة حيث أن هناك فرصة كبيرة لحدوث تغيير في المادة الوراثية لبعض الخلايا مما يؤدي الي حدوث كيميرا ولهذا يفضل الحصول علي النباتات الأحادية عن الطريق المباشر.

٥ أصل الأجنة الأحادية Origin of haploid embryos

كما أشرنا من قبل فان الانقسام الميوزي يتلوه دورتين من الانقسام الميتوزي .. يتلو الانقسام الأول في حبة اللقاح الغير ناضجة تكون خليتين غير متساويتين أحداهما الخلية الخضرية Vegetative cell وهي أكبر حجما من الخلية التكاثرية Generative cell. تتعرض الخلية التكاثرية للأنقسام الميتوزي الثاني قبل أو بعد نمو الأنبوبة اللقاحية لتعطي خلية سبرمية وتحتوي كل من الخلايا المتكونة علي عدد نصفي من الكرموسومات الموجودة بالخلية الأم. عند زراعة حبوب اللقاح الغير ناضجة في بيئة مغذية فأنه يحدث تغيير في البرنامج الجاميطي وتتحول الي برنامج جنيني، ولما كان الهدف هو معرفة كيفية حدوث هذا التحول في حبة اللقاح فلابد من فهم أصل نشأة النباتات الأحادية.

لقد أمكن باستخدام الميكرسكوب الألكتروني من اكتشاف أربعة طرق لأصل نشأة النباتات الأحادية من حبوب اللقاح .. ويجب هنا الاشاره الي أن الأنواع النباتية تختلف فيما بينها في المصدر الخلوي التي تنشأ منه النباتات الأحادية ، عموماً قد تنشأ النباتات الأحادية من انقسام حبة اللقاح قبل حدوث الانقسام الميتوزي الأول

أى من خلية وحيدة النواه. وهناك أمثلة اخري يتم فيها الانقسام الميتوزي الأول وتكون النباتات الأحادية من الأنقسام المتوالي للخلية الخضرية أو الخلية التكاثرية أو الاثنين معاً .. وفي بعض الحالات تندمج الخلية الخضرية مع الخلية التكاثرية قبل أن يحدث انقسام جنيني، ولما كان من الهام فهم أصل تكون النباتات الأحادية فاننا سنستعرض كل من هذه الطرق بالتفصيل (شكل ١٤).

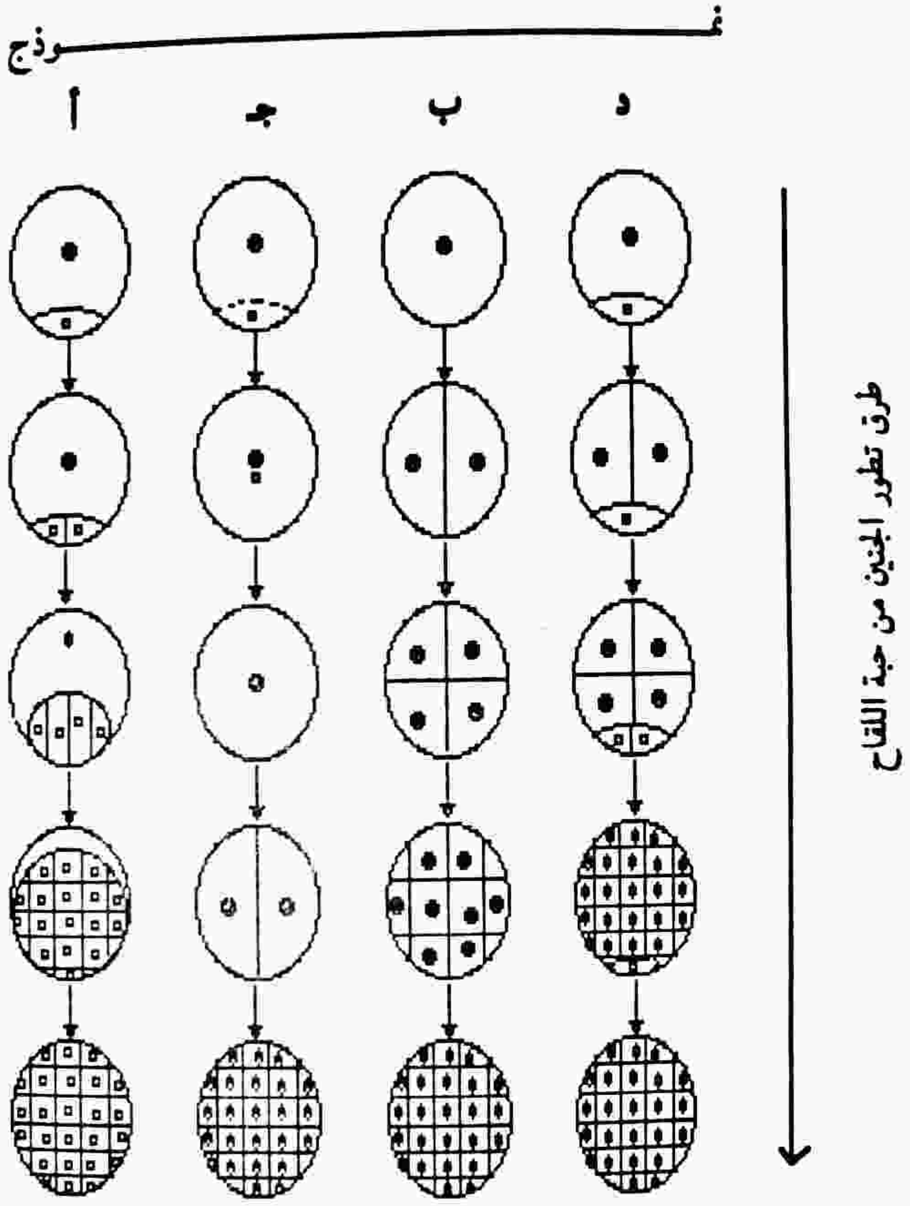
٥. ١ نموذج " أ " Type "A"

يحدث هذا النوع مباشرة بعد الانقسام الميتوزي الأول وظهور خليتين غير متساويتين يتوقف البرنامج الجاميطي لحبة اللقاح أولاً وتتحول الي البرنامج الجنيني .. في هذا البرنامج تتعرض الخلية الخضرية للأنقسام المتوالي والمتساوي لتعطي الجنين، في حين تنحل الخلية التكاثرية مباشرة أو تتعرض لعدة انقسامات وبعدها تنحل وتُمتص مكوناتها ويبقي الجنين المتكون من الخلية الخضرية.

ولقد أُكتشف هذا النموذج لانتاج نباتات احادية لأول مره في حبوب اللقاح المنزرعة من نباتات الدخان بواسطة العلماء Sunderland & Wicks (1969). وتم التأكد من ذلك في نباتات أخري مثل الداتورا، القمح، الشعير، الذره، الأرز.

٥. ٢ نموذج "ب" Type "B"

في هذا النموذج فان البرنامج الجاميطي لحبة اللقاح الغير ناضجة يُثبط تماماً ويُعدل الانقسام الغير متساوي ويحل محله الانقسام المتساوي فيعطي بهذا خليتين متساويتين في الحجم متماثلتين في الصفات الداخلية .. تتعرض كل من الخليتين لعدة انقسامات متتالية لتعطي جنين وهذا بدوره يتطور ليعطي نبات كامل ..



شكل (١٤) رسم توضيحي يبين أصل نشأة الأجنة من حبوب اللقاح.

ولقد اجريت أبحاث متعددة استخدمت فيها حبوب لقاح غير ناضجة تحتوي نواه واحدة، وأمكن باستخدام بعض المواد الكيمائية من تعديل الانقسام الغير متساوي وتحويله الي الانقسام المتساوي وبذلك أمكن من تعديل مسار الخلية الي البرنامج الجنيني Zaki & Dickinson (1991).

٥. ٣ نموذج "ج" Type "C"

يتكون الجنين في هذا النموذج من كل من الخلية الخضرية والخلية التكاثرية، حيث يحدث اندماج بين هاتان الخليتان أولاً ثم يلي هذا الانقسام الذى ينتج منه خليتين متساويتين، تتعرض هاتان الخليتان لعدة انقسامات متتالية ينتج عنها الجنين الذي يمر بمراحل التطور المختلفة ليعطي نبات كامل.

ولقد اكتشف هذا النموذج بواسطة العلماء Sunderland & Dunwell (1974).

ويحدث الاندماج بين الخلية الخضرية والتكاثرية نتيجة لعدم تكون أو عدم اكتمال الجدار الفاصل بين الخليتين مما يسبب حدوث اندماج لنوي الخلايا. ويجب هنا الاشاره الي أن النباتات الناتجة ليست بالضرورة أن تكون احادية التركيب الكروموسومي.

٥. ٤ نموذج "د" Type "D"

كان من المعتقد لفترة طويلة أن الجنين لاينتج من انقسام الخلية التكاثرية فقط، غير ان العالم Raghavan (1976) أثبت أنه يمكن للخلية التكاثرية أن تنقسم وتعطي جنين بدون مساهمة من الخلية الخضرية. من هذا يتضح أن أصل الجنين المتكون من زراعة حبوب اللقاح يختلف حسب نوع الخلية التي ينشأ منها ..

ولايجب الفهم هنا أن لكل نوع نباتي نموذج محدد بتكوين الجنين، فانه بداخل النوع النباتي الواحد قد ينشأ الجنين من أكثر من واحد من النماذج السابقة. وهذا في الواقع يثير كثيراً من التساؤلات عن كيفية حث الخلايا لتكوين جنين والعوامل التي تحكم تكوين الجنين من أحد أو بعض النماذج السابقة. وهذا بذاته يجعل من دراسة الأجنة الأحادية مجال شيق وممتع للدراسة والبحث، ومايزال هناك الكثير من الغموض الذى يحيط بهذه الظاهرة الذى يدفعنا الي بذل المزيد من الجهد لتعميق فهمنا للأجنة الأحادية خاصة وأنه هناك الآلاف من الأنواع النباتية التي مايزال البحث جاريا عليها بهدف الحصول علي أجنة احادية من زراعة حبوب لقاحها .. ومما لاشك فيه أن هذا الجهد سوف يكون مثمراً لفهم المزيد عن قدرات الخلية النباتية.

٦ العوامل المؤثرة في تكوين أجنة من حبوب اللقاح

Factors influencing pollen embryogenesis

هناك عوامل عديدة ومتشابكة التأثير علي تكوين أجنة من حبوب اللقاح بالنباتات الزهرية .. بالاضافه الي التركيب الوراثي للنباتات والذى يعتبر له تأثير قوي في استجابة حبوب اللقاح لتكوين جنين، غير أنه هناك بعض العوامل الاخرى التي لا تقل أهمية مثل الحالة الفسيولوجية للنبات الام، الظروف البيئية التي ينمو فيها النبات الأم، عمر النبات، المرحلة التطورية لحبوب اللقاح، معاملات قبل أو بعد الزراعة، درجة الحرارة، عدد ساعات الأضاءة، البيئة المغذية المستخدمة، تأثير جُدر المتك الذى يحيط بحبوب اللقاح.

[stamp]

٦. ١ المرحلة التطورية لحبوب اللقاح Stages of pollen development

من أجل النجاح في الحصول علي أجنة فانه لابد من استخدام حبوب لقاح في المرحلة المناسبة التي يمكن أن يتم فيها التحول الي جنين، نظراً لأن الأنواع النباتية تختلف فيما بينها في أنسب مرحلة لزراعة حبوب اللقاح من أجل الحصول علي أجنة، فانه تم تحديد هذه المرحلة التطورية في بعض الأنواع النباتية التي تم فيها النجاح في الحصول علي أجنة احادية . عادة ما يستعمل بعض الملامح المورفولوجية للبرعم الزهري وذلك للدلالة علي مرحلة تطورية محددة لحبوب اللقاح بداخل متك نفس البرعم الزهري. ومثال الملامح المورفولوجية التي تستخدم طول البرعم الزهري، النسبة بين طول البتلات الي طول المتك، بداية ظهور البتلات من البرعم الزهري .. هناك فتره تطورية محدودة لحبوب اللقاح يمكن لها أن تُكون أجنة عند زراعتها في بيئة مغذية، استعمال حبوب لقاح ليست في هذه المرحلة التطورية يؤدي الي فشل تكون أجنة. ولقد وجد أنه حتي خلال هذه الفترة التطورية الملائمة والمحدودة فان الاستجابة تكون متباينة، وهذا يشير الي أن أقصي استجابة يمكن الحصول عليها فقط من خلال مرحلة محدودة جداً ودقيقة .. وأن حبوب اللقاح تمضي فترة وجيزة وقصيرة خلال تطورها في هذه المرحلة. فمثلا أنسب مرحلة لزراعة حبوب لقاح نباتات الدخان هي ما بين نهاية الانقسام الميوزي وبداية الانقسام الميتوزي الأول وأقصي استجابة يمكن الحصول عليها من زراعة حبوب اللقاح في المرحلة التي تسبق بداية الانقسام الميتوزي الأول. وهناك بعض الأبحاث الاخري التي تشير الي أن أنسب استجابة يتحصل عليها من زراعة حبوب اللقاح تكون بعد الانقسام الميتوزي الأول Heberle-Bors & Reinert (1979).

مما لاشك فيه أن المرحلة التي يحدث فيها التحول من البرنامج الجاميطي الي

البرنامج الجنيني ذات علاقة وطيدة بالدورة الخلوية .. غير أنه نظراً لعدم توفر معلومات كافية توضح هذه العلاقة فانه سيكتفي هنا بالاشارة الى أنه اذا كان هدفنا هو فهم هذه الظاهرة فهماً عميقاً فانه يجب أن يبذل مزيداً من الجهد للتعرف علي كيفية حث الخلية الي تغيير مسارها علي كل من المستوي الخلوي والمستوي الجيني.

٦. ٢ معاملات النباتات الأم Pretreatment of the donor plants

وجد أن معاملة النبات الام أو البراعم الزهرية ببعض المواد الكيمائية قبل فصل وزراعة حبوب اللقاح يؤدى الي زيادة نسبة تحول حبوب اللقاح الي أجنة، ووجد العلماء Nitsch & Norreel (1973) أن هناك زيادة ملحوظة في استجابة حبوب اللقاح بداخل المتك التي تم حفظها في ثلاجة لمدة ٤٨ ساعة علي حرارة مقدارها ٤درجة مئوية . وتتم هذه المعاملة بعدة طرق

- فصل البراعم الزهرية الكبيرة الحجم ووضعها في ماء مقطر وتحفظ بالثلاجة.
- في حالة الأنواع النباتية التي لها براعم زهرية صغيرة فانه يفصل العنقود الزهري كاملاً ويوضع في ماء مقطر وتحفظ بالثلاجة.
- قد يقسم العنقود الزهري الي أجزاء صغيرة وهذه بدورها توضع في كيس بلاستيكي يحتوي بضع قطرات من الماء. يغلق الكيس جيداً ويحفظ في الثلاجة في الظلام.

تختلف الأنواع النباتية في الفترة التي تحتاجها البراعم للمعاملة بالحرارة المنخفضة، ولهذا فانه يجب تحديد أنسب فترة زمنية للنوع النباتي تحت الدراسة، عموما تعتبر الفترة ما بين ٣-٤ أيام تعتبر كافية لمعظم الأنواع النباتية التي تم دراستها، ولقد

وجد أن هناك معاملات اخرى تؤدي الي زيادة استجابة حبوب اللقاح المنزرعة، مثالها معاملة حبوب اللقاح في جهاز الطرد المركزي لفترة زمنية قبل الزراعة. ولقد وجد أن أعلي استجابة للمعاملة بالحرارة المنخفضة يتحصل عليها عندما يتم معاملة حبوب اللقاح الغير ناضجة في المرحلة المباشرة، قبل، أثناء أو مباشرة بعد الانقسام الميتوزي الأول، كما وجد أن أنسب درجة حرارة للمعاملة هي ما بين ٧-٩ درجة مئوية. هنا يجب أن نتساءل عن كيفية تأثير المعاملة بالحرارة علي تحول حبوب اللقاح الي أجنة نباتية!! .. بالرغم من أن هناك دراسات عديدة حول هذا الموضوع، كل منها يضع مفهوماً عن هذه الظاهرة، غير أنه حتي الآن لا توجد نظرية متكاملة الجوانب .. وهناك بعض النظريات التي تشير الي تأثير الحرارة علي تعديل الانقسام الميتوزي الأول من الشكل الغير متساوي الي انقسام متساوي وهذا ذو أهمية كبيرة في تحول الخلية الي التطو رالجنيني. بالرغم من أن هذه النظرية لها بعض الأساس العلمي، غير أنها لم توضح كيفية تكون أجنة من حبوب لقاح تعرضت فعلاً للانقسام الميتوزي الأول وتكون بها خليتان غير متساويتين.

عموماً فان هناك نظرية اخري تشير الي أهمية الحرارة المنخفضة علي اطالة فترة حيوية جدر المتك الذي بدوره يؤدي الي اطالة فترة حيوية حبوب اللقاح بداخلها، ولهذا تزداد فرصة تحول حبوب اللقاح من البرنامج الجاميطي الي البرنامج الجنيني. ولقد استخدمت أنواع متعددة من المعاملات المختلفة بهدف زيادة استجابة حبوب اللقاح المنزرعة الي تكوين أجنة نباتية ومن أمثلة هذه المعاملات

- معاملة البراعم الزهرية تحت ضغط جوى.
- المعاملة بالحرارة المرتفعة.
- المعاملة في جو مشبع ببخار الماء.

[stamp]

- المعاملة تحت ظروف لاهوائية.
- المعاملة بجهاز الطرد المركزى.

لو نظرنا الي هذه المعاملات المختلفة فان كل منها يؤثر بشكل أو بآخر علي الجزء النباتي المعامل، وبهذا يصبح من الصعب تحديد ميكانيكية عمل هذه المعاملات في تنشيط تكون الأجنة من حبوب اللقاح. هذه المعاملات تشترك جميعاً في كونها عوامل غير ملائمة لنمو النبات أو الجزء النباتي المعامل، وفي قول آخر فان استمرار تعريض النباتات لمثل هذه المعاملات قد تؤدي الي فقدان حيويتها .. لهذا فان النبات يحاول أن يتكيف مع هذه العوامل بواسطة تعديل التعبير الجيني بالخلية مما يؤدي الي تكون بعض البروتينات الجديدة التي بدورها تؤهل الخلية للعمل تحت الظروف الغير ملائمة .. ولقد اطلق علي هذه البروتينات Heat shock proteins ويعتقد أن هناك علاقة بين تكون هذه البروتينات وتحول الخلية الي البرنامج الجنيني .. غير أنه حتي الآن لم يوجد دليل علمي مؤكد علي هذه العلاقة، ومايزال غموض تحول حبة اللقاح الي جنين قائماً ولم يحسم بعد.

٦. ٣ مكونات البيئة المغذية Composition of the culture medium

أمكن حث حبوب اللقاح المنزرعة علي تكوين أجنة باستخدام بيئة مغذية تحتوي عناصر كبري، عناصر صغري، فيتامينات، سكروز .. ولقد وجد أن تغيير مصدر الحديد في البيئة المغذية يؤدى الي تغيير في معدلات حبوب اللقاح المتحولة الي جنين، كما أن تغيير أو تعديل نسبة السكروز أو تركيز الفيتامينات في البيئة المغذية يؤدي الي نفس النتائج. ويعتبر الحديد من العناصر الهامة التي تؤثر في تحول الخلية الي جنين ولهذا فانه لابد أن يضاف الي البيئة المغذية، ونظراً لأنه عنصر

قابل للترسيب فانه يضاف في صورة (Fe EDTA) حيث أن ايونات الحديد تنطلق الي البيئة المغذية وتصبح ميسرة للنسيج المنزرع طوال فترة الزراعة. بعض الأنواع النباتية مثل نباتات الدخان، الداتورا لا تحتاج حبوب لقاحها الي عنصر الحديد في البيئة المغذية حتي يتكون الجنين، غير أن تطور الجنين من المرحلة الكروية الي مرحلة الكوتيلدن بنجاح يحتاج الي وجود عنصر الحديد .. ولهذا فانه يمكن القول هنا أن الحديد لايلعب دور أساسي في حث وتحول حبة اللقاح الي البرنامج الجنيني Vagera & Havranek (1982). يستخدم السكروز في البيئة المغذية بنسبة تتراوح بين ٦- ٢٠٪ ولقد وجد أن بعض الأنواع النباتية تتطلب استخدام تركيزات عالية من السكروز في المراحل المبكرة من الزراعة، وذلك لحث حبوب اللقاح الي التكون الجنيني .. كما وجد أن نقل الأجنة المتكونة من حبوب اللقاح الي بيئة تحتوي تركيز منخفض من السكروز هو مطلب أساسي لاستمرار نمو وتطور الجنين الناتج. هناك اعتقاد بأن للسكروز دور في تعديل الضغط الأسموزي للبيئة المغذية، وهذا بدوره يؤثر علي نشأة وتطور الأجنة النباتية. غير أنه هنا يجب القول أنه لا يمكن الأخذ بهذا الاعتقاد كقانون عام لجميع الأنواع النباتية حيث أنه في بعض الحالات وجد أن استخدام خليط من السكروز والمانيتول لايعطي نفس كفاءة استخدام تركيز مرتفع من السكروز. هذا يعني أن هناك تأثير هام للسكروز ولا يقتصر علي كونه عامل مؤثر في تعديل الضغط الاسموزي للبيئة المغذية فقط. تشير الأبحاث العلمية أنه لنجاح تكون أجنة من زراعة حبوب اللقاح فانه يجب أن تحتوي البيئة المغذية على أحد منظمات النمو اكسين، سيتوكينين أو الأثنين معاً. بالرغم من أن الغالبية العظمي من الأنواع النباتية تحتاج الي منظمات النمو غير أنه وجد أن هناك عدد قليل منها لايحتاج الي امداد البيئة بمنظمات النمو .. حتي

بداخل الأنواع النباتية التي يلزم اضافة منظمات نمو للبيئة المغذية فان التركيز الملائم يختلف تبعاً للنوع النباتي.

عندما يتكون جنين ناضج فانه ينقل الي بيئة مغذية لا تحتوي منظمات نمو أو بيئة تحتوي تركيزات ضئيلة جداً منها وذلك لتكوين نبات كامل. والسؤال الآن .. ما هي ميكانيكية تأثير منظمات النمو علي تكوين الأجنة من حبوب اللقاح ؟؟؟ للأسف بالرغم من الانتشار الواسع لأستخدام منظمات النمو في البيئة المغذية، غير أنه ما يزال معلوماتنا محدوده في فهم العلاقة بين منظمات النمو والتحول الجنيني لحبوب اللقاح. ولقد أشار العالم Sopory & Maheshwari (1976) ان المحافظة علي مستوي محدد من الهرمونات بداخل الخلية أمر هام وضروري لحدوث أول انقسام جنيني بحبوب اللقاح، ويتوالي هذا الانقسام المتعدد والسريع .. يزداد حجم الجنين ويخرج من جدار حبة اللقاح ويتطور في البيئة المغذية حتي يصل لمرحلة الجنين الناضج، ويلي ذلك النقل الي بيئة خالية من منظمات النمو لتكوين نبات متكامل.

هناك بعض المواد التي تضاف الي البيئة المغذية وتؤثر علي نجاح زراعة حبوب اللقاح، مثال ذلك اضافة الفحم النشط الي البيئة المغذية يزيد من نجاح زراعة متك بعض الأنواع النباتية، يعزي تأثير الفحم النشط الي مقدرتة علي امتصاص المواد المثبطة التي قد تنطلق من جدر المتك والتي قد تؤثر علي استجابة حبوب اللقاح .. أو النواتج الثانوية لعملية التمثيل الحيوي أو المواد الموجودة في مادة الآجار نفسها. مما لاشك فيه أن الفينولات التي تتراكم في البيئة المغذية تؤدي الى تثبيط تكون ونمو وتطور الجنين، ولقد وجد أن اضافة مادة الفحم النباتي الي البيئة المغذية تزيد من الاستجابة وذلك من خلال امتصاص الفينولات المثبطة من البيئة

المغذية والمنتجة بواسطة النسيج المنزرع، فلقد وجد أن نسبة الفينولات المتكونة في بيئة مغذية لا تحتوي فحم نشط تزيد ٢. مرة عن مثيلاتها التي تحتوي فحم نباتي.

٦. ٤ دور جدار المتك وطبقة التابتوم Role of anther wall and tapetal layer

لابد لنا أولاً قبل أن نتناول تأثير جدر المتك علي تكوين الأجنة من حبوب اللقاح أن نعطي تفصيل مبسط لتركيب هذه الجدر التي تحيط بحبوب اللقاح .. يتكون هذا الجدار من ثلاث طبقات هي طبقة الابيدرمس(epidermis) يليها طبقة الاندوثليم (endothelium) ثم الطبقة الوسطي(middle layer) وهناك طبقة تسمي التابتوم وهي طبقة الخلايا التي تحيط مباشرة بحبوب اللقاح، ولا تعتبر التابيتوم من طبقات جدار المتك. حتي وقت قريب كان الاعتقاد السائد أن زراعة المتك التي تحتوي بداخلها علي حبوب اللقاح هي أنسب وسيلة للحصول علي نسبة مرتفعة من الأجنة .. وذلك للأعتقاد بأن جدار المتك أو طبقة التابتوم تفرز بعض المواد المنشطة لتكوين الأجنة من حبوب اللقاح، وبهذا المفهوم فانه كان من الصعب الحصول علي استجابة من حبوب اللقاح المنزرعة منفصلة أو بعد فصلها من جدار المتك .. وهنا يجب الذكر أن أول تجربة ناجحة لزراعة حبوب اللقاح منفصلة عن جدر المتك استخدم فيها مستخلص من متك منزرعة علي بيئة مغذية لفترة زمنية محدودة، هذا يشير الي أن هناك بعض المواد التي تتكون بجدار المتك خلال مرحلة مبكرة من الزراعة، وهي هامة وأساسية لتحول حبوب اللقاح الي التكوين الجنيني. كما أنه يعتقد أن هناك علاقة وطيدة بين طبقة التابتوم وتكون الأجنة من حبوب اللقاح، حيث أن تعريض المتك الي حرارة منخفضة لفترة زمنية يؤثر علي طبقة

التابتوم وهذه بدورها تؤثر علي التحول الجنيني. عموماً يجب الذكر أنه ما يزال من الصعوبة تحديد العلاقة بين هذه الطبقات (النسيج الجسدي) وحبوب اللقاح (النسيج الاحادي). في محاولات متعددة لفهم هذه العلاقة أجريت تجارب لدراسة الأحماض الأمينية التي تتكون في المراحل المبكرة من زراعة متك بعض الأنواع النباتية، ولقد وجد أن هناك زيادة كبيرة في مستوي السيرين، الجلوتامين كما وجد أنه عندما اضيفت هذه المركبات بتركيز مرتفع في البيئة المغذية التي اجري فيها زراعة حبوب اللقاح منفصلة بدون جدر المتك أمكن الحصول علي أجنة من انقسام حبوب اللقاح Sangwan (1983). نظراً للأهمية الكبري لهذه التجربة التي أثبتت أهمية الأحماض الامينية للتحول الجنيني، فلقد اجريت أبحاث متعددة في هذا المجال وكان نتيجة لهذا أن تم التأكد من أنه هناك تغيير كبير في نوع وتركيز الأحماض الأمينية المتكونة خلال المراحل المختلفة للتطور الجنيني .. ومن أمثلة الأحماض الامينية التي تلعب دوراً هاماً في هذه المراحل ثرونين، سيرين، جلوتامين، برولين. عموماً يمكن القول أن الأحماض الامينية تتكون في النسيج الجسدي (جدار المتك) ثم تنتقل الي حبوب اللقاح حيث يتم استخدامها والاستفادة منها ويظهر تأثيرها علي التحول الجنيني.

علي الجانب الآخر فان هناك دراسات تؤكد أنه بمجرد أن يبدأ جدار المتك في الانحلال الفسيولوجي فانه ينتج بعض المواد المثبطة التي تمنع تكوين أجنة من حبوب اللقاح .. عندما يتم نقل المتك المنزرعة الي بيئة مغذية حديثة التحضير علي فترات زمنية متقاربة تزداد نسبة الأجنة المتكونة، وأمكن الحصول علي تأثير متشابه عندما زرعت المتك علي بيئة مغذية سائلة .. في كلتا الحالتين فان الهدف الأساسي هو تخفيف تركيز المواد المثبطة التي تنتج من جدر المتك وبالتالي زيادة استجابة حبوب اللقاح.

وفي النهاية فانه يمكن القول أن جدر المتك لها تأثير مزدوج علي التحول الجنيني وهما تأثيران متضادين في الأتجاه حيث أن الأول منشط والثاني مثبط، وبهذا فان هناك توازن دقيق بين هذه المواد .. ولما كان من الصعب تحديد ما اذا كان هذا التوازن لصالح التحول الجنيني أو العكس فانه يجب الحذر عند استخدام طريقة زراعة المتك للحصول علي نباتات احادية .

٦. ٥ حبوب اللقاح المزدوجة الشكل Dimorphic pollen grains

عندما يراد دراسة أول مراحل تحول خلية اللقاح الي جنين فان هذا يعني زراعة حبوب اللقاح أولاً ثم متابعتها في المراحل المبكرة التي يتوقع أن يحدث خلالها بعض التغيرات في الصفات السيتولوجية. في بعض الأنواع النباتية أمكن التعرف وتحديد حبوب اللقاح التي يمكن أن تعطي جنين، غير أنه ليست هناك صفات مشتركة بين الأنواع النباتية والتي بواسطتها يمكن التعرف علي الخلايا التي لها القدرة علي التحول .. في بعض الأنواع النباتية أمكن تحديد نوعين من حبوب اللقاح خلال الساعات الأولي من الزراعة، النوع الأول وهو ممثل بعدد قليل من حبوب اللقاح ذات الكثافة السيتوبلازمية العالية والتي لا تحتوي فجوات عصارية ويوجد هذا النوع في المحيط الخارجي لتجويف المتك، أما النوع الثاني فهو يمثل الغالبية العظمي من حبوب اللقاح ويتميز بقلة الكثافة السيتوبلازمية ووجود فجوات عصاريه ذات مراحل تطورية مختلفة، وهذه الحبوب تشغل مركز تجويف المتك. ولقد وجد أن الأجنة تتكون من حبوب اللقاح ذات الكثافة السيتوبلازمية العالية والتي لا تحتوي فجوات عصارية، غير أنه في نباتات الدخان فان الكثافة السيتوبلازمية المنخفضة تعتبر علامة مميزة لحبوب اللقاح التي لها القدرة علي

تكوين جنين، أما حبوب اللقاح ذات الكثافة السيتوبلازمية العالية فليست لها هذه المقدرة، ومن هذا يتضح أن لكل نوع نباتي صفات مميزة تختلف عن باقي الأنواع الاخرى. هناك بعض العلماء الذين يعتقدون إنه يمكن التعرف علي حبوب اللقاح التي لها المقدرة علي التحول الجنيني وذلك قبل الزراعة، أساس هذا الأعتقاد يرجع الي أنه خلال المراحل التطورية الطبيعية لحبوب اللقاح بداخل جدار المتك، فان بعض الخلايا تكتسب القدرة علي تكوين أجنة عندما يتوفر لها الظروف الملائمة، ويمكن التعرف علي هذه الخلايا من بين الآلاف الاخري، حيث أنها تتميز بصغر حجمها ولها خواص صبغية مغايرة للخلايا الأخري .. ولقد وجد أن هناك علاقة طردية بين وجود هذه الخلايا وبين الأجنة المتكونة. وهناك عوامل متعددة تؤدي الي تكون مثل هذا النوع من حبوب اللقاح، بعض هذه العوامل يرجع الي التركيب الوراثي للخلية، بعضها الأخر يرجع الي الظروف البيئية التي تحيط بالنبات الأم أثناء تكون حبوب اللقاح. ووجد أن نمو النباتات تحت حرارة منخفضة ونهار قصير يؤدي الي زيادة نسبة حبوب اللقاح التي لها المقدرة علي التحول الجنيني عند الزراعة عل بيئة مغذية، كما وجد أنه هناك علاقة بين تكون حبوب اللقاح العقيمة وبين القدرة علي التكون الجنيني، حيث وجد أنه عندما تزداد نسبة حبوب اللقاح العقيمه فانه يتبعها زيادة في نسبة الأجنة المتكونة من حبوب اللقاح عند زراعتها في بيئة مغذية.
هناك بعض المعاملات التي تستخدم لزيادة الاستجابة للتكون الجنيني وفيها تعرض النباتات الام قبل أو أثناء الانقسام الميوزي الي بعض المواد الكيميائية، الاشعاع، الحرارة المنخفضة وغيرها. وتهدف هذه المعاملات الي زيادة نسبة حبوب اللقاح العقيمة من خلال احداث خلل في عمليات الانقسام وهذا بالتالي يزيد نسبة حبوب اللقاح التي لها القدرة علي التحول الجنيني.

٦.٦ النمط الوراثي لحبوب اللقاح Genotype of pollen grains

تختلف استجابة حبوب اللقاح الي التحول الجنيني تبعاً للبنية الوراثية .. هذا يعني أن التركيب الوراثي لحبوب اللقاح هو عامل محدد للأجنة النباتية المتكونة، هذا من خلال تأثيره علي عدد الخلايا التي لها القدرة علي التحول الجنيني عند الزراعة علي بيئة مغذية. لقد أمكن بواسطة التهجينات بين التراكيب الوراثية المختلفة (بعضها ذات قدرة عالية علي تكوين أجنة من حبوب لقاحها ، والبعض الآخر ليست لها هذه القدرة) من نقل هذه القدرة الي التراكيب الوراثية التي تفتقدها Jacobsen & Sopory (1978). هذا لايعني أن تأثير التركيب الوراثي هو الذي سيحدد النجاح أو الفشل في تحول الخلية، حيث أن هناك تأثير متبادل بين التركيب الوراثي والظروف البيئية المحيطة وهذا بدوره يؤثر في اكتساب القدرة علي التحول الي البرنامج الجنيني. هنا يجب الذكر أن لكل تركيب وراثي متطلبات مناسبة من الظروف البيئية، بيئة مغذية، معاملات قبل الزراعة وغيرها، ولهذا فانه عند العمل علي تركيب وراثي جديد فان الصعوبة هي ايجاد أنسب الظروف التي يتطلبها هذا التركيب للحصول علي نسبة عالية من الأجنة.

حيث اننا في اطار الحديث عن التركيب الوراثي فاننا ننتهز هذه الفرصة للحديث عن التركيب الوراثي للنباتات الناتجة من حبوب اللقاح .. الكثير منا يعتقد أن النباتات الناتجة من حبوب لقاح لها تركيب وراثي احادي، آخذاً في الاعتبار أن أساس تكونها هو خلية احادية التركيب الوراثي. نظرياً فانه لا خلاف علي هذا الاعتقاد وهو سليماً وصحيحاً طالما ان كل العمليات الخلوية تحدث بالشكل النموذجي بلا خلل في أى مرحلة من مراحلها التطورية .. ولما كان هذا ليس هو الحال وأنه يحدث بعض الخلل الخلوي أثناء التطور فانه يتوقع أن يتحصل علي نباتات غير احادية ،

هذا الخلل قد يشمل التضاعف الكروموسومي مع عدم حدوث انقسام فتنتج خلية غير احادية ، أو قد يحدث خلل في تكوين الجدار الفاصل بين النواتان اللتان تندمجان معاً لتكون تركيب وراثي غير احادي، بهذا تتكون نسبة من النباتات الثنائية والمتعددة الكروموسومات من زراعة حبوب اللقاح علي بيئة مغذية. تختلف نسبة النباتات الغير احادية المتكونة من زراعة حبوب اللقاح باختلاف النوع النباتي. مما لاشك فيه أن النباتات الثنائية أو ذاتية التضاعف هي ذات أهمية كبيرة حيث أنها توفر علي المربي اجراء عملية التضاعف الكروموسومي بواسطة المواد الكيميائية، خاصة أن هناك بعض الحالات التي يصعب فيها احداث تضاعف كروموسومي صناعي لبعض النباتات الأحادية الناتجة.

٧. تعليق عام علي الأجنة الأحادية

General comment on haploid embryogenesis

هذا الفصل من الكتاب يوضح لنا أن حبوب اللقاح لم تعد خلايا ذات وظيفة محددة وثابتة كما كان معلوماً سابقا. فقد ثبت أن هذه الخلايا الأحادية تشارك الخلايا الثنائية في rvnjih الكامنة علي تكوين كائن نباتي كامل عندما تتاح الظروف المناسبة لهذا. بالرغم من توافر عديد من الأبحاث في هذا المجال غير أنه مايزال السؤال مطروحاً وهو ما هي كيفية تحول حبة اللقاح الي البرنامج الجنينى؟؟؟.. للإجابة علي هذا السؤال فانه يجب دراسة الجينات الوراثية المسئولة عن هذا التحول، غير أنه نظراً لعدم توافر المادة الوراثية المناسبة بالقدر الكافي وفي المرحلة الملائمة لاجراء مثل هذه التجارب فانه يجب أولاً أن يبذل جهد كبير في محاولة زيادة عدد حبوب اللقاح التي لها القدرة علي التحول الجنيني، كما أنه يجب أن

تجري تجارب علي حث حبوب اللقاح علي الدخول في البرنامج الجنيني في آن واحد وبهذا تتوفر المادة اللآزمه في المرحلة المناسبة وبالقدر الكافي لاجراء دراسات علي المستوى الجينى.

١١

الأجنة الجسدية

Somatic embryogenesis

يعتبر تكون الأجنة الجسدية في مزارع الانسجة مثال مميز للقدرة الكامنة للخلية الحية علي تغيير مسارها والعمل علي الانقسام وتكوين كائن حي كامل .. تنتج الأجنة الجسدية من الخلايا المنزرعة في بيئة مغذية، حيث أنه تحت بعض الظروف المحيطة تسلك الخلايا المنزرعة سلوكاً مشابهاً للجنين الزيجوتي وهذا يؤدي إلي تكوين جنين ناضج. نظراً لأن هذا الجنين ينشأ من خلية جسدية منفصلة من احد انسجة أعضاء النبات فإنه يطلق عليه الجنين الجسدي، وهذا التمييز بينه وبين الجنين الزيجوتي الناتج من عمليات التطور التي تتلو التلقيح فالإخصاب. يرجع الفضل الأول لإكتشاف مقدرة الخليةالحية علي تكوين نبات متكامل إلي العلماء Steward et al. (1958a, b) حيث أجرى هؤلاء العلماء تجارب أستخدم فيها لحاء منفصل من نبات الجزر، وهذا الأخير تم زراعتة في بيئة مغذية تحتوي العناصر اللازمة للنمو .. بعد فترة زمنية ونتيجة للزراعة علي بيئة مغذية تبدء خلايا النسيج المنزرع في الانقسام العشوائي مكونة ما يسمي بالكالس، وهذا يتكون من مجموعة من الخلايا الغير متميزة .. عندما أجري نقل الكالس من البيئة المغذية الصلبة إلي أخري سائلة مع الرج أو الهز المستمر تنفصل الخلايا من بعضها البعض وتكون ما يسمي معلق الخلايا، بالفحص الميكروسكوبي لعينة من هذا المعلق

الخلوي وجد أنه يحتوي علي خلايا منفردة ومستقلة بعضها عن البعض، وتراكيب خلوية متجمعة معا في نفس البيئة السائلة .. ولقد لاحظ العلماء أنه بمتابعة تطور الخلايا المنفصلة المستقلة وجد أنها تنقسم وتبقي الخلايا متصلة بعضها بالبعض، ونتيجة تعدد الانقسامات بهذه الخلايا فإنه يتكون تراكيب عديدة الخلايا ومع استمرار الانقسام الخلوي فإنه يبدء تكون نسيج وعائي يتلوها تكون جذور. ولقد أمكن الحصول علي نموات خضرية وبالتالي نباتات كاملة عندما أجري النقل إلي بيئة مغذية صلبة لا تحتوي سائل جوز الهند. بالرغم من أنه في هذا الوقت لم تصمم تجارب لتتبع الاصل الذي نشأ منه النبات الكامل. غير أنه في الدراسات التشريحية اللاحقة أكدت أن أصل النبات الناتج هو خلية منفصلة وحيدة في البيئة المغذية .. شهدت السنوات التالية لهذا الاكتشاف المميز تجارب متعددة أستخدم فيها أنواع نباتية مختلفة. وكان نتيجة لهذا أن سجلت بعض المحاولات الناجحة لتكوين أجنة من أنواع نباتية مختلفة. وهنا يجب أن نتسائل عن كيفية تعريف الأجنة وبشكل خاص كيف يمكن التمييز بين الأجنة والبراعم النباتية؟ هناك معايير مورفولوجية كثيرة لتعريف الأجنة، غير أن أهمها علي الأطلاق هو أنه تركيب يتميز بأنه ثنائي القطبية وهذا يعني أنه في المراحل التطورية المبكرة فإن أحد النهايات تعطي جذراً والأخري تعطي سوقاً وتقع في الاتجاه المضاد .. ومن المعايير الهامة أيضاً في تعريف الجنين أنه لايكون متصلاً بالنسيج الوعائي للنبات الام في أي مرحلة من مراحل تطوره، وعلي العكس من هذا نجد أن البرعم النباتي أو الجذر يكون متصلاً بالنسيج الوعائي للنبات الأم أو نسيج الكالس.

لاحظ العالم Reinert (1959) أن الكالس المتكون علي بيئة مغذية تحتوي لبن جوز الهند وأكسين له المقدرة علي تكوين أجنة نباتية وذلك عندما ينقل الي بيئة اخري

[stamp]

تحتوي أحماض أمينية، فيتامينات، بيرين، اكسين. بالرغم من أنه لم يثبت أن هذه الأجنة نتجت من خلية منفصلة، غير أن هذه التجربة أثبتت أن تكون الأجنة ليست فقط قاصرة علي الأجنة التقليدية الناتجة من المراحل التطورية التي تتلو التلقيح والاخصاب .. وكان من البديهي أن يتسابق العلماء الي اجراء التجارب العلمية لحث خلية منفصلة ومنزرعة علي بيئة مغذية الي التطور الجنيني.

ويرجع أول محاولة ناجحه لاثبات أن الأجنة ناتجة من الخلايا المنفصلة الي العالم Steward (1963) عندما أثبت أن زراعات معلق خلايا الجزر تعطي عدداً كبيراً من الأجنة الجسدية .. استخدم Steward في تجاربه أجنة زيجوتية منفصلة من بذور نبات الجزر، كما أنه في تجارب لاحقه استخدم أجنة غير ناضجة منفصلة من بذور نبات الجزر وزرعة علي بيئة مغذية تحتوي لبن جوز الهند للتحول الجنيني، غير أنه أثبت فيما بعد تكوين أجنة جسدية في بيئة مغذية لا تحتوى سائل جوز الهند Halperin & Wetherell (1964). في واقع الأمر فانه يحدث حث للخلايا المنزرعة علي تكوين أجنة عندما تزرع في بيئة مغذية تحتوي أكسين. وتتطور هذه الخلايا إلي جنين ناضج عندما تنقل إلي بيئة مغذية لها نفس المواصفات ولكنها لا تحتوي أكسين أو تحتوي علي مستويات منخفضة منه. بالرغم من أن كثير من الباحثين أكدوا علي أن هناك تشابه كبير بين المراحل المختلفة التي يمر بها الجنين الجسدي والجنين الزيجوتي، غير أنه يبقي هناك سؤال هام مطروح الا وهو هل هناك تشابه بين هذين النوعين من الأجنة في المراحل المبكرة لتكوينها؟؟ وبمعنى آخر هل تتشابه الانقسامات المبكرة التي يمر بها كلا من الجنينين .. غير أنه من الصعوبة الاجابة علي هذا السؤال حيث أنه يصعب التعرف علي الخلايا التي تتحول إلي التكون الجنيني في مرحلة مبكرة من عمرها في المعلق الخلوي، عموماً فإن الجنين

الزيجوتي لنبات الجزر وجد أنه يبدء بإنقسام عرضي ليعطي خليتين، وهاتان تنقسم عرضياً أيضاً لتعطي أربعة خلايا، كل منها تنقسم عرضياً لينتج ثمانية خلايا في شكل خيطي .. تبدأ الانقسامات الطولية في الثلاث خلايا الطرفية من هذا التركيب الخيطي، يتبع هذا عدة إنقسامات طولية وعرضية لتعطي الجنين كاملاً ماعدا قمة الجذر التي تنتج من الانقسامات التي تحدث في الخمسة خلايا الأخري من التركيب الخيطي .. أما الجنين الجسدي فإنه يتكون في معلق زراعات خلايا النباتات ويظهر وهو مكوناً العديد من الخلايا، تقريباً في مرحلة الجنين الكروي. بالرغم من صعوبة دراسة المراحل المبكرة لتكوين الجنين الجسدي، غير أنه في دراسة وحيده وجد أن الخلية الجنينية الموجودة في معلق الخلايا تنقسم عرضياً مكونة خليتين، ويتكون الجنين من الانقسام الطولي للخلية القمية، بينما تنقسم الخلية الاخري القريبة من التجمعات الخلوية عرضياً لتكون مايشبه بخيط الجنين، ومن هذا يتضح أنه هناك إختلاف بين الانقسامات الاولية التي تحدث بالجنين الجسدي ومثيلتها بالجنين الزيجوتي .. بالرغم من أن هذه النتائج تشير إلي إختلافات أساسية بين الجنين الجسدي والجنين الزيجوتي في نبات الجزر، إلا أنه من الهام أن نعلم أن هذه الانقسامات والعمليات التطورية المتتالية تؤدي إلي تكوين أجنة متشابهة التركيب. هناك أيضاً بعض الصفات الفسيولوجية والبيوكيميائية التي تشير إلي التشابة بين الجنين الجسدي والزيجوتي، ومثال هذا أن الأجنة الجسدية لبعض الأنواع النباتية لها طور سكون وهذا يمكن كسره بواسطة المعاملة بالحرارة المنخفضة، متشابها بذلك مع الأجنة الزيجوتية لنفس النوع النباتي. ولقد وجد أن هناك علاقة بين المعاملة بالحرارة المنخفضة ونقص مادة اندول بيوتريك آسيد (IBA) في كل من الجنين الجسدي والزيجوتي لنباتات العنب، أما علي المستوي

البيوكيميائي فإن الأجنة الجسدية والزيجوتية لبعض الأنواع النباتية تتشابه في تمثيل الأحماض الدهنية، الدهون، البروتينات، الانثوسيانين، القلويدات.

١ إنتاج الأجنة الجسدية Production of somatic embryos

نظراً للاهمية العظمي للأجنة الجسدية في تحسين والمحافظة علي السلالات النباتية، فإن هناك مجهوداً كبيراً يبذل لفهم المزيد عن هذه الظاهرة والحصول علي أجنة جسدية من الانواع النباتية التي لم تستجب بعد .. هناك كثير من الانواع النباتية التي تستجيب بإنتاج أجنة جسدية عند توافر الظروف الملائمة، غير أن هذه الانواع تختلف في درجة استجابتها. ولقد لوحظ أن النباتات التي تتبع العائلات الخيمية، الباذنجانية تستجيب بدرجة مرتفعة عندما تزرع علي بيئة مغذية من أجل الحصول علي أجنة جسدية ..كما أستخدمت أجزاء نباتية مختلفة من أجل الحصول علي أجنة جسدية مثل السوق، الأوراق، الجذور، البراعم الزهرية، الاندوسبرم، الجنين الزيجوتي الناضج وغير الناضج، نسيج النيوسيله، أجزاء من البادرة. جميع هذه الاجزاء النباتية تحتوي علي خلايا مرستيمية مثل الكامبيوم، بدايات الجذور، والبراعم بجانب الخلايا المتكشفة، وبهذا يبقي السؤال قائماً عن أصل نشأه الجنين الجسدي هل يتكون من خلية متكشفة ومتميزه نتيجة لأن هذه الخلية لها قدرة كامنة في تكوين نبات كامل، أو أنه ينشأ من خلية مرستيمية لم تتكشف بعد؟؟ عموماً فانه قد تنتج الأجنة الجسدية أما بالطريقة المباشرة أو الغير مباشرة .. في الطريقة الأولي يتكون أجنة جسدية مباشرة من الجزء المنزرع علي نفس البيئة المغذية، أما في الطريقة الغير مباشرة يتكون كالس اولا علي الجز لنباتي المنزرع، ومن هذا الكالس تنتج الأجنة الجسدية عندما تنقل الي بيئة مغذية ذات تركيب

ينشط تكون هذه الأجنة .. ويمكن القول أنه ليس هناك معايير محددة بين الأنواع والأعضاء النباتية داخل النبات الواحد التي بواسطتها يمكن التوقع أن تنتج الأجنة الجسدية من خلال الطريقة المباشرة أو غير المباشرة .. فلقد وجد أن الأعضاء النباتية المختلفة للنبات الواحد تختلف في الطريقة التي بها تنتج الأجنة الجسدية، وقد يحدث أن تنتج الأجنة الجسدية بكلا الطريقتين علي نفس العضو النباتي المنزرع علي بيئة مغذية. هناك طريقة اخري يمكن فيها الحصول علي أجنة جسدية وذلك بواسطة زراعة البروتوبلاست، وسوف نتناول كل من هذه الطرق معا بالتفصيل.

١. ١ الطريقة الغير مباشرة Indirect pathway

يعتبر انتاج الأجنة الجسدية في نبات الجزر هي النموذج الفريد الذي تم دراسته تفصيلياً، والذي من خلاله سوف نستعرض كيفية تكون الأجنة الجسدية بالطريقة الغير مباشرة .. للحصول علي الكالس يجري أولاً انبات بعض بذور الجزر في ظروف معقمة، تفصل السويقة الجنينية، وقطع من الجذور وتزرع علي بيئة مغذية تحتوى أملاحها علي نسبة عالية من النيتروجين مثل البيئة المغذية المعروفة والشائعة الاستخدام Murashige-Skoog (MS) التي تمد بالسكروز، ميو أينو سيتول، مصدر للحديد، سيتوكنين، اكسين .. بعد عدة أسابيع يتكون الكالس علي الجزء النباتي المنزرع علي البيئة المغذية، يجري اعداد معلق الخلايا بواسطة نقل قطع من الكالس المتكون علي بيئة سائله لها نفس تركيب البيئة السابقة ولكنها تحتوي تركيز منخفض من الاكسين، ترج البيئة لتسهيل انفصال الخلايا وتكوين المعلق الخلوي. عندما يراد حث خلايا المعلق علي تكوين أجنة تنقل هذه الخلايا الي بيئة

مغذية لها نفس التركيب السابق ولكنها خالية من مادة الاكسين وتسمي هذه البيئة بيئة الحث .. يظهر بعض الأجنة الجسدية في مرحلة الشكل الكروى خلال الأسبوع الأول من النقل الي بيئة الحث، غير أن الأجنة المتكونة تكون ذات مراحل تطورية مختلفة. ولقد وجد أن معاملة خلايا الجزر بمحلول سكروز بتركيز ١ مولر يزيد نسبة الخلايا المتحوله الي التكون الجنيني، وكذا يقلل من التباين المرحلي بين الأجنة الناتجة .. استخدم العلماء طرق متعددة لزيادة نسبة الأجنة الجسدية ففي بعض الطرق أجري فصل الخلايا التي تحتوي فجوات عصارية (خلايا غير جنينيه)، من الخلايا التي لا تحتوي فجوات (خلايا جنينيه) .. ولقد لوحظ زيادة نسبة الأجنة المتكونة عند زراعة الخلايا التي لا تحتوي فجوات في بيئة مغذية خالية من الأكسين، كما وجد قلة نسبة التباين المرحلي بين الأجنة الناتجة. لوحظ أن معدل الانقسام الخلوي في الخلية الجنينية يحدث في خلال الخمسة أيام الأولى من تحول الخلية الي التكوين الجنيني، ويعتقد أن هذه الانقسامات تؤدي الي تكوين الخلايا التي سوف تتطور الي ساق، جذر. بالرغم من أنه يصعب تحديد وتمييز الخلايا في هذه المراحل التطورية المبكرة، غير أنه عندما يصل الجنين الي الشكل القلبى يصبح من السهولة تحديد المناطق بالجنين التي تتطور الي ساق والأخري التي تعطي جذور.

في بعض الأنواع النباتية اجري فصل طبقة خلايا الميزوفيل ميكانيكياً وزراعتها في بيئة مغذية تحتوي اكسين وسيتوكينين، نتيجة للأنقسام الميتوزي المتعدد فانه يتكون عديد من التركيبات الخلوية التي تشابة الكالس .. عندما تنقل هذه التراكيب الخلوية الي بيئة لا تحتوي اكسين أو تحتوي اكسين ضعيف فانه يتكون أجنة جسدية. يعتبر تكون الأجنة الجسدية من خلايا الميزوفيل من الأمور الهامه

[library stamp]

حيث أنه يمكن القول أن هذه الخلايا ذات عمر واحد ولها صفات فسيولوجية متشابهه لانها خلايا ذات نموذج واحد، هذا بدوره يسهل دراسة العوامل التي تؤثر في تحول الخلية الي التكون الجنيني.

من الامور الهامه التي يجب أن نتذكرها دائماً أنه في الطريقة الغير مباشرة فان الجنين الجسدى يتكون من الانقسام الخلوى لاحد الخلايا المرستيمية المكونة لنسيج الكالس .. هناك إفتراض بأن الخلية الجنينية الموجودة بالكالس تبقي ساكنه وليس لها المقدرة علي الأنقسام الميتوزي في تركيز مرتفع من مادة الأكسين في البيئة المغذية، وبناء علي هذا فمن المتوقع ألا يتكون أجنة جسدية من كالس منزرع علي تركيز عالي من الاكسين .. غير أن هذا ليس هو الحال حيث أنه وجد في بعض الأنواع النباتية تكون عدد محدود من الأجنة الجسدية في التركيزات المرتفعة من الاكسين، يفسر هذا أن بعض الخلايا المرستيمية الجنينية قد يكون لها المقدرة علي الهروب من التأثير المثبط للأكسين علي الانقسام، وبالتالي تنقسم مكونة أجنة جسدية .. عموماً فان هذا المفهوم دفع العلماء الي اجراء تجارب متعددة لفهم العلاقة بين التركيز الهرموني في البيئة المغذية وبين عدد الأجنة الجسدية المتكونة.

أجرى الباحثون Sandahl & Sharp (1977) تجربة لانتاج الأجنة الجسدية من نبات البن، استخدم فيها تركيزات مختلفة من الاكسين والسيتوكينين في البيئة المغذية وقد وجد أن استخدام تركيزات منخفضة من الاكسين والسيتوكينين يؤدى الي زيادة مطرده في عدد الأجنة المتكونة، وذلك مقارنة بالبيئة المغذية التي تحتوي تركيزات مرتفعة. وبمجرد أن تخرج الخلية من التأثير المثبط فانها تبدء في الانقسام، غير أنه لايتكون الجنين مباشرة نتيجة لهذا الانقسام الميتوزى، حيث تدخل الخلية في برنامج وظيفي ذو شقين أولاً، تجديد الكالس التي نشأت منه ..

ثانيا، تكوين الجنين الجسدى.

هذا بذاته يفسر لنا الظاهرة التي لوحظت كثيراً وهي زيادة نسبة الأجنة المتكونة علي الكالس الجديد الأبيض الذى ينشأ من الكالس القديم ذو اللون البني. هناك بعض الأنواع النباتية التي وجد فيها أن الأجنة الجسدية يقف تطورها في مرحلة مبكرة، ويعزي هذا الي احتياج هذه الأجنة الي النقل التدريجي الى بيئة ذات تركيز منخفض من الاكسين والسيتوكينين، حيث أن النقل المباشر الي بيئة ذات تركيز منخفض من هذه المواد يؤدي الي وقف تطور الأجنة .. يفسر هذا بأن الأجنة الجسدية تمر بمرحلة تشابة مراحل الجنين الزيجوتي وفيها تتحول تدريجياً من الاعتماد الكلي علي الامداد الخارجي لمنظمات النمو الي الأستقلالية الكاملة والأعتماد علي ماتنتجة ذاتياً.

هناك بعض النتائج الفريده والغير متوقعة التي يتحصل عليها في تجارب زراعة الأنسجة، ففي تجربة للحصول علي نبات كامل من جنين جسدي اجري نقل الجنين الي بيئة مغذية تحتوي جبرالين وبنزيل ادينين .. لوحظ أن هذه البيئة تؤدي الي تزهير الجنين الجسدى!! .. هذا يدل علي أن هذه الأجنة قد تدخل طور التزهير وتكوين الأعضاء التكاثرية بدون المرور بالطور الخضري. تعتبر هذه الظاهرة الفريدة ذات أهمية خاصة للباحثين في مجال البيولوجي حيث أنها تبرهن علي أن الخلية النباتية مايزال لها قدرات كبيرة كامنة مازالت لم تكتشف بعد.

١. ٢ طريقة المباشرة Direct pathway

مما لاشك فيه أن انتاج الأجنة الجسدية بالطريقة الغير مباشرة تعتبر عمليه معقدة، حيث أنه يلزم تكون الكالس أولاً ثم النقل الي بيئة اخرى ذات متطلبات مختلفة.

لهذا فان انتاج الأجنة الجسدية بالطريقة المباشرة والتي فيها يتكون الجنين علي الجزء النباتي المنزرع علي نفس البيئة المغذية بدون الحاجة الي النقل الي بيئة اخري يعتبر ذات أهمية خاصة في دراسة العوامل التي تؤثر في العمليات التي تؤثر في تكوين الأجنة الجسدية. لقد اكتشف العلماء Konar & Nataraja (1965) تكوين عديد من الأجنة الجسدية علي براعم زهرية منزرعة علي بيئة مغذية تحتوى ١٠٪ سائل لبن جوز الهند، ١ ملليجرام أندول آستيك آسيد .. يتكون كالس أولاً علي النهايات التي تمثل موضع القطع، ويلي هذا تكون أجنة جسدية علي الكالس المتكون. أيضا من الملاحظات المذهلة التي سجلت في هذا الوقت علي الأجنة الجسدية هي مقدرتها علي الإنبات علي نفس البيئة المغذية لتكوين بادرة، ويتكون علي ساق هذه البادرة جيل جديد من الأجنة الجسدية .. ويمكن الحصول علي أجنة جسدية بالطريقة المباشرة في كثير من الأنواع النباتية مثل الجزر، البطاطس، الكرنب، القرنبيط. ولقد اجريت كثير من المحاولات لاثبات أن الأجنة الجسدية تتكون مباشرة علي الجزء النباتي المنزرع بدون المرور بمرحلة تكون الكالس، ومن النباتات التي اجريت تجارب عديدة عليها البن، التفاح، جوز الهند، بعض الموالح، الفراوله. تشير بعض الدراسات التشريحية أن الأجنة الجسدية تتكون من خلايا متكشفة يعاد توظيفها لتصبح خلايا جنينية، غير أن هناك بعض الأنواع النباتية لم يتم فيها للآن اثبات هذه النظرية .. ويعتقد أن الأجنة الجسدية تتكون في الحالات السابقة من بدايات الكالس الجنيني المتكون علي السطح المجروح للورقة المنزرعة علي بيئة مغذية، لهذا فان الجنين المتكون يبدو أنه يخرج من خلية متكشفة من خلايا الورقة. في بعض الأنواع النباتية عندما يفصل الجزء القاعدي لورقة ويزرع علي بيئة مغذية فإنه يعطي كالس ومن الصعب تكون أجنة جسدية

[stamp]

بالطريقة المباشرة علي هذا الكالس .. غير أنه عندما يفصل الجزء الطرفي للورقة ويزرع علي بيئة مغذية فانه يعطي أجنة جسدية مباشرة بدون النقل الي بيئة اخري .. في تجربة استخدمت فيها أوراق حديثة العمر وأوراق أقدم عمراً لمقارنة الاستجابة لتكوين الأجنة الجسدية من الجزء القاعدي والجزء الطرفي وجد أن أطراف الأوراق الحديثة يتكون عليها أجنة جسدية بالطريقة المباشرة مقارنة بالورقة الأقدم عمراً .. هنا يجدر بنا أن نتذكر أن الجزء القاعدى من الورقة يحتوي خلايا مرستيمية أما الجزء الطرفي فإنه يحتوى علي خلايا متكشفة، ولهذا فان الخلايا المرستيمية لها المقدرة علي الانقسام وتكوين الكالس عند الزراعة علي بيئة مغذية، أما الخلايا المتكشفة فانة كما أشرنا من قبل يعاد توظيفها وبذلك تتحول الي أجنة جسدية مباشرة. لهذا فان المرحلة التطورية لخلايا الورقة التي تزرع بهدف الحصول علي أجنة جسدية تعتبر ذات أهمية خاصة في تحديد الطريقة التي ينتج بها الأجنة الجسدية، وقد تفوق أهميتها علي أهمية بعض المواد التي تضاف الي البيئة المغذية لتنشيط تكون الأجنة الجسدية .. عموماً فانه يمكن القول أن التغيير في الحالة الفسيولوجية للجزء المنزرع، التركيب الوراثي، التأثير البيئي أمور لها تأثير كبير علي انتاج الأجنة الجسدية.

١. ٣ انتاج الأجنة الجسدية من البرتوبلاست

Production of somatic embryos from isolated protoplasts

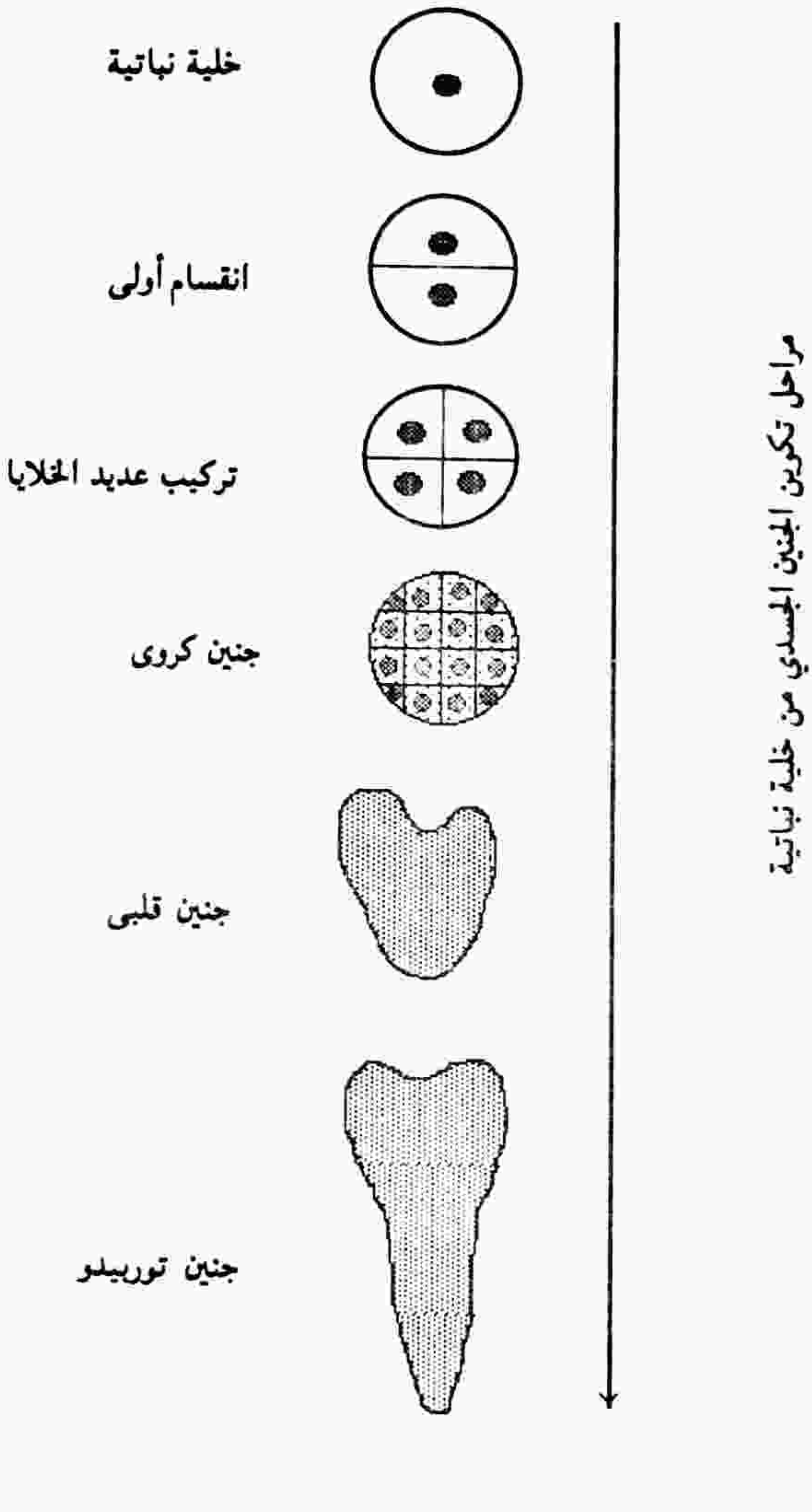
يمكن الحصول علي أجنة جسدية من زراعة البروتوبلاست في بيئة مغذية سائلة، ولقد أستخدمت أجزاء نباتية مختلفة من نبات الجزر مثل قطع الجذور، المعلق الخلوي المحضر من الجذور والاعناق بهدف الحصول علي البروتوبلاست الذي بدوره

يعطي أجنة جسدية. يجري أولاً فصل البروتوبلاست الخلوي ثم ينقي بإستخدام فلتر ويجمع البروتوبلاست باستخدام جهاز طرد مركزي ويوضع في بيئة مغذية ذات ضغط أسموزي مناسب .. ينقل البروتوبلاست إلي بيئة مغذية لها نفس التركيب السابق ولكنها ذات ضغط أسموزي منخفض، يقلل الضغط الأسموزي تدريجياً مع أستمرار نقل البروتوبلاست .. وقد لوحظ أن التغيير في شكل البروتوبلاست وحجمه له علاقة بتكوين الجدار الخلوي الجديد، كما لوحظ أن في معظم الانواع النباتية فإنه يحدث أول إنقسام خلوي بعد حوالي ٥ أيام من الزراعة علي بيئة مغذية، يتلو هذا الانقسام عديد من الانقسامات التي ينتج منها تركيب عديد الخلايا ومنه يتكون الجنين الجسدي (شكل ١٥). لقد وجد أن التركيب العديد الخلايا الناتج من البروتوبلاست المتحصل عليه من معلق خلوي لابد أن ينقل الي بيئة مغذية خالية من الاكسين وذلك للحصول علي جنين جسدي، غير أن التركيب العديد الخلايا الناتج من البروتوبلاست المنفصل من جزء نباتي يحتاج إلي بيئة تحتوي سائل لبن جوز الهند للحصول علي جنين جسدي.

٢ العوامل المؤثرة في تكوين أجنة جسدية

Factors influence somatic embryogenesis

هناك عوامل متعددة تؤثر في تكوين الأجنة الجسدية من المعلق الخلوي لنبات الجزر، هذه العوامل تشمل حجم الجزء النباتي المستخدم، السلالة النباتية، تركيب البيئة والعوامل البيئية المحيطة. يجدر أن نشير هنا إلي أن تأثير هذه العوامل علي تكوين الأجنة الجسدية يختلف حسب النوع النباتي المستخدم .. عموماً فإننا سوف نستعرض معا تأثير بعض العوامل التي يعتقد أن لها تأثير أساسي وهام في تكوين الأجنة الجسدية للانواع النباتية المختلفة.



شكل (١٥) رسم توضيحي يبين مراحل تطور الجنين الجسدي من البروتوبلاست مارا ً بالانقسام الأولي، تكوين تركيب متعدد الخلايا، الجنين الكروي، القلبي، التوربيدو.

٢. ١ تركيب البيئة المغذية Composition of the nutrient medium

في كل المحاولات التي أجريت بهدف إنتاج أجنة جسدية من الانواع النباتية أستخدم فيها بيئة مغذية تحتوي علي العناصر المعدنية المختلفة ومصدر للكربوهيدرات وغالباً ما يكون السكروز .. مما لاشك فيه أن مكونات البيئة المغذية والمواد التي قد تضاف اليها مثل الفيتامينات، الاحماض الامينية، المركبات العضوية تؤثر بشكل فعال في عمليات التمثيل الحيوى التي تحدث بالنسيج النباتي .. غير أنه يجب أيضاً الاشارة إلي أن هذه المواد ليس لها تأثير محدد وواضح علي تكوين الأجنة الجسدية. بعض الملاحظات العلمية تشير إلي أهمية كل من نوع النتروجين المضاف إلي البيئة المغذية، أيون البوتاسيوم علي تكون الأجنة الجسدية حيث يعتقد البعض أن وجود النتروجين في صورة أيون أمونيوم ذات أهمية لتكوين الأجنة الجسدية، مقارنة بنوع النتروجين المضاف إلي البيئة المغذية .. فمثلاً وجد في بعض الانواع النباتية مثال الجزر أن الكالس الناتج علي بيئة مغذية تحتوي نتروجين في صورة نترات ليس له المقدرة علي تكوين أجنة جسدية عندما تنقل إلي بيئة أخري تحتوي نتروجين في صورة أمونيوم. هذه النتائج تشير إلي أهمية أيونات الامونيوم في التأثير علي الجينات الوراثية التي بدورها تؤثر في تحول الخلية إلي البرنامج الجنيني وتكوين جنين جسدي .. كما أن أيون النترات ليس له تأثير في المراحل المبكرة لتنشيط تكون الأجنة الجسدية ولكن قد يكون له دور أساسي في تطور الجنين الجسدي، غير أنه في فترة لاحقة ظهر إعتقاد آخر يشير بأهمية تركيز النتروجين في البيئة المغذية علي تكون الأجنة الجسدية، حيث يعتمد أصحاب هذا الاعتقاد علي التجارب التي أمكن فيها

الحصول علي أجنة جسدية من الزراعة علي بيئة مغذية تحتوي نتروجين في صورة نترات فقط. نظراً للتفاوت في الاعتقاد بأهمية النتروجين علي تكون الأجنة الجسدية، أجريت تجارب أخري هدفها دراسة المحتوي الخلوي من النتروجين وعلاقته بتكون الأجنة .. ولقد وجد أن وجود النتروجين في صورة أمونيوم في البيئة المغذية ليس له أهمية في تكون الأجنة، ولكن توفر مستوي محدد من أيون الامونيوم بالخلية ذات أهمية قصوي في تحول الخلية إلي جنين. قد يؤدي إمداد البيئة المغذية بنتروجين في صورة نترات إلي توفر المستوي المطلوب من الامونيوم بداخل الخلية، وهذا بدوره ينشط التحول الجنيني. عموماً فإنه يمكن القول أن وجود النتروجين في صورة أمونيوم في البيئة المغذية تعمل علي زيادة نسبة الأجنة الجسدية المتكونة، كما أن بعض المركبات مثل الجليسين، الجلوتامين، الارجنين والاسباراجين تعمل علي تنشيط تكون الأجنة الجسدية. نتيجة للتجارب المتعددة علي الأجنة الجسدية فلقد ظهر أيضا أن المحتوي الخلوي من البوتاسيوم له أهمية كبيرة في التكون الجنيني، ففي هذه التجارب وجد تكون عدد قليل من الأجنة الجسدية عندما يزال نترات البوتاسيوم من البيئة المغذية مع استعمال مستوي معتدل من نترات الامونيوم .. ولقد وجد زيادة الأجنة المتكونة عندما يضاف فوسفات البوتاسيوم بنسبة تكافئ نترات البوتاسيوم، ويثبط تكون الأجنة الجسدية عندما أستخدم فوسفات الصوديوم في البيئة المغذية .. هذا بلا شك يشير إلي أهمية أيون البوتاسيوم في تكون الأجنة الجسدية، غير أن الدور الذي يقوم به البوتاسيوم ما يزال غير معلوم.

يعتبر مصدر الكربوهيدرات أيضاً من العوامل التي يعتقد أنها تؤثر في تكون الأجنة الجسدية .. بالرغم من أن السكروز هو الصورة الشائعة الاستخدام في البيئة

المغذية، غير أن بعض الانواع النباتية يمكنها الاستفادة من وجود الكربوهيدات في صورة جلوكوز، فركتوز، مانوز، مالتوز، رافينوز .. ويعتقد أن هناك علاقة بين التمثيل الحيوي لمادة ميو اينو سيتول والكربوهيدرات الموجودة في البيئة المغذية، حيث أن الجلوكوز والجلاكتوز الموجودين بالبيئة المغذية هما المادة الاولية التي تدخل في التمثيل الحيوي لتكوين مادة ميو أينو سيتول التي تعلب دوراً في التكون الجنيني Verma & Dougall (1979a, b). من الواضح أنه بالرغم من الانجاز العلمي والتقدم في معلوماتنا عن الأجنة الجسدية غير أن هناك عوامل عديدة تتداخل معاً وتؤثر في عملية تحول الخلية إلي البرنامج الجنيني وتطورها إلي جنين ناضج، لهذا فإنه من الصعوبة التعرف علي تأثير كل عامل منفصلاً عن العوامل الأخري وبهذا تظل ظاهرة تكون الأجنة الجسدية يحيط بها عديد من التساؤلات التي تحتاج إلي اجابة وتوضيح.

٢. ٢ الهرمونات Hormons

أشار العديد من الابحاث التي أجريت خلال الثلاثين عاماً الماضية علي أهمية الهرمونات لحث تكوين الأجنة الجسدية من الأنواع النباتية المختلفة. بالنظر إلي نتائج هذه الابحاث فإنه من اليسير استنتاج أنه ليس هناك تركيب أو شكل هرموني محدد يمكن أن يطبق بصفة عامة علي جميع الانواع النباتية بهدف تكوين الأجنة الجسدية .. كما هو معروف فإنه عادة ما يستخدم السيتوكينين، الاكسين في البيئة المغذية .. غير أن تأثير الاكسين علي تكون الأجنة الجسدية يعتبر عامل يستحق الدراسة. كما أشرنا سابقاً فإنه لابد أن ينقل الكالس إلي بيئة خالية من الاكسين حتي تتكون الأجنة الجسدية في نبات الجزر، هذه الظاهرة أدت إلي ظهور

العديد من التساؤلات حول ما إذا كان الاكسين مادة منبطة للاجنة الجسدية، وما هي وظيفة الاكسين في حث الخلايا علي التحول إلي البرنامج الجنيني. نظراً لأن نسيج الكالس النامي والمتكون علي بيئة صناعية مغذية تحتوي علي أكسين فأنه يستمر في الزيادة في الحجم بدون التطور إلي أجنة جسدية. فإن بعض العلماء Halperin & Wetherell (1964) اعتبرا أن هذا يؤكد التأثير المثبط للاكسين علي تكون الأجنة الجسدية، ولقد أستمدت هذه النظرية دعائم قوية من التجارب التي أصبح فيها من اليسير الحصول علي اجنة جسدية عندما ينقل الكالس إلي بيئة مغذية لا تحتوي أو تحتوي تركيز منخفض من الاكسين. وقد أثبتت التجارب اللاحقة أن هناك علاقة بين نوع الاكسين المستخدم وبين الأجنة الجسدية. بينما وجد أن مادة 2,4-D تثبط تكون الأجنة في الجزر، فإن أستمرار معاملة قطع منزرعة من الجزر علي بيئة تحتوي IBA، NAA، IAA، NOA لمدة ٥أسابيع تشجع تكون الأجنة الجسدية .. في الواقع فإن نقل النسيج لبيئة مغذية خالية من الاكسين بعد المعاملة لمدة أسبوعين في بيئة صناعية مغذية تحتوي IBA، NAA، IAA فإنه يستجيب بنفس الدرجة التي تستمر فيها المعاملة للنسيج المنزرع لمدة خمسة أسابيع Kamoda and Harada (1969). تأثير الاكسين علي تكون الأجنة الجسدية يجعلنا نتساءل هل تتحول الخلية إلي البرنامج الجنيني أثناء أو بعد المعاملة بالاكسين؟ بالرغم من الصعوبة في فصل دور الاكسين وتأثيرة المنشط علي تكوين الكالس عن الدور الذي يلعبة في تحول الخلية إلي التكون الجنيني، غير أن تكون الأجنة الجسدية بالطريقة المباشرة من طبقة الابيدرمس في نبات الجزر تعتبر الطريقة الفريدة التي بواسطتها يمكن دراسة التأثير المباشر للاكسين علي تكون الأجنة الجسدية .. تشير نتائج التجارب العملية أن خلايا الابيدرمس لا تتحول

إلى جنين ما لم تعامل بالاكسين، وهذا يؤكد أن الاكسين هام وله دور أساسي في تكون الأجنة الجسدية، علي الجانب الآخر فلقد وجد أن الاكسين يزيد من عدد الخلايا الجنينية في المعلق الخلوي والكالس المتكون من نبات الجزر، هذا لأنه ينشط انقسام الخلايا التي تكون كتلة من الخلايا الجنينية، غير أنه يمنع الانقسام الخلوي المنظم الذي يعطي جنيناً. هنا يجب أن نتوقف لنشير إلي الاهمية العظمي للانقسام الخلوي المنتظم خلال المراحل المبكره علي تكوين الجنين النباتي .. ولقد لوحظ أنه لو فقد الانقسام الأولي المنتظم للخليه أو في معني آخر لو حدث الأنقسام الغير منتظم والعشوائي فان هذا يؤدي الي تكوين كالس وعلي النقيض من هذا فان الانقسام المنتظم والمبكر يؤدي الي تكوين جنين ماراً بمراحل التطور المختلفه التي تشمل الشكل الكروي ، القلبي، التوربيدو. من المعلوم أن الخلايا المستقلة من النادر أن تُكون جنين مباشرةً، غير أنه في الحالات النادره فإن هذه الخلايا تنقسم أولا مكونة تراكيب متعددة الخلايا التي منها تتكون الأجنة الجسدية .. ولقد وجد أنه لا يتكون عدد كبير من الأجنة الجسدية في المعلق الخلوي لنبات الجزر الذي يحتوي ٩٨٪ خلايا مستقلة عندما تزرع في بيئة خالية من الاكسين، كما وجد أن الزراعة في بيئة مغذية تحتوي اكسين لمدة ٤أيام تؤدي الي مضاعفة عدد الأجنة الجسدية المتكونة مرتين علي الأقل .. يعلل هذا أن الخلايا المنفصلة تفتقد الي التركيب المتعدد الخلايا الذي بدوره قد يساعد علي حث الخلايا الي التحول الجنيني. بهذا فان الأمداد الخارجي بالأكسين يعتبر بديلاً عن هذا التركيب الخلوي الذي قد يكون مسئولاً عن توفير المستوي المناسب من الأكسين لحدوث التحول الجنيني. يعتبر استخدام كالس البرتقال الذي ينمو في غياب كل من الاكسين والسيتوكينين نتيجة الاعتياد في تجارب الأجنة الجسدية مثالاً هاماً

للمساهمة في فهم تأثير الاكسين علي الأجنة الجسدية، في هذه التجارب وجد أن اضافة الاكسين حتي تحت التركيزات المنخفضة الي البيئة المغذية يؤدي الي تثبيط تكون الأجنة الجسدية، وعندما استخدمت بعض المواد المثبطة لتمثيل الاكسين لوحظ زيادة ملحوظة في تكون الأجنة الجسدية .. كما أنه لوحظ تنشيط عمليات تكون الأجنة الجسدية عندما اجري تعريض الكالس المنزرع علي بيئة مغذية الي بعض الأشعة التي توقف نشاط الاكسين المنتج داخليا، غير أنه يثبط تكون الأجنة الجسدية عند تعريض الكالس لجرعات مرتفعة من الأشعة .. كما أنه وجد أن هناك علاقة بين جرعات الأشعة التي يعرض لها الكالس وبين كمية الأكسين التي تضاف للبيئة لحدوث التحول الجنيني Kochba & Spiegel-Roy (1977a, b). هذه النتائج تشير الي أن تحول الخلية الي جنين جسدي يستدعي تنشيط بعض عمليات التمثيل الحيوي التي تسبب انخفاض في مستوي الاكسين الداخلي وبهذا تحث الخلايا علي التحول الجنيني .. أثبتت التجارب العلمية أن هناك فارق كبير في قدرات الكالس الجنيني والكالس الغير جنيني، حيث وجد أن الكالس الجنيني له المقدرة علي التخلص من الاكسين الداخلي بواسطة ارتباطه بحمض الاسبارتك وكذا تثبيط فاعلية الاكسين بواسطة البيرودكسين، وبهذا يمكن المحافظة علي المستوى الأمثل للاكسين الداخلي Epstein et al. (1977), Kochba et al. (1977).

هناك أيضاً العديد من الهرمونات التي يعتقد أن لها تأثير في تكوين الأجنة الجسدية سواء علي مستوي تحول الخلية الي البرنامج الجنيني أو تطور الخلية الجنينية الي جنين ناضج، هذه الهرمونات تشمل السيتوكينين، الجبرالين.. وغيرها.

[library stamp]

٢. ٣ مثبطات الأجنة الجسدية Inhibitors of somatic embryogenesis

بعد أن تعرفنا علي دور الهرمونات في تكوين الأجنة الجسدية، فاننا يجب أن نشير الي أن هناك بعض المواد التي تنتج بالخلية ولها تأثير مثبط علي تكون الأجنة الجسدية، لعل أبسط مثال لتأثير هذه المواد ما يلاحظ عند تكرار زراعة الأنسجة أو المعلق الخلوي بهدف المحافظة عليه فانه يقل تدريجياً عدد الأجنة الجسدية المتكونه مع تكرار زراعة .. هذا بذاته يشير الي أن هناك بعض المواد المثبطة للتكون الجنيني التي تتراكم في البيئة المغذية وتقلل من الأجنة الجسدية. ولاثبات ذلك فانه اجري اضافة الفحم النباتي النشط للبيئة المغذية ووجد أنه لايحدث نقص في عدد الأجنة المتكونة مع تكرار زراعة المادة النباتية وتقدمها في العمر .. هذا يشير الي وجود بعض المواد المثبطة التي تنتج بواسطة الخلايا النباتية وتمتص بواسطة الفحم النباتي المضاف الي البيئة المغذية وبذلك لا تؤثر علي تكون الأجنة الجسدية. بالرغم من توفر العديد من البراهين والمعلومات علي تراكم مواد تثبط التكون الجنيني غير أن طبيعة هذه المواد وكيفية تأثيرها علي الأجنة الجسدية مايزال غامضاً.

٣ تعليق عام علي تكون الأجنة الجسدية
General comment on somatic embryogenesis

ظاهرة تكون الأجنة الجسدية من الخلايا النباتية لها أهمية قصوي في التقنية الحيوية والمحافظة علي الأصول النباتية المتميزة .. مايزال هناك العديد من الأنواع النباتية التي لم يتمكن بعد من تفهم متطلباتها للحصول منها علي أجنة جسدية، عموماً يمكن القول أن التطور السريع في مجال زراعة الأنسجة النباتية، يجعل من

اليسير فهم لغز تطور خلية جسدية بمراحل تشابه مراحل تطور الجنين الزيجوتي. يعتبر نوع الجزء النباتي المنفصل، مكونات البيئة المغذية من أهم العناصر التي تؤثر في تكوين الأجنة الجسدية للأنواع النباتية المختلفة. هنا يجب القول أن أغلب التجارب التي اجريت في هذا المجال استخدم فيها عدد محدود من الانواع النباتية، لهذا فانه مايزال هناك أنواع نباتية متعددة يجب أن يركز البحث عليها، خاصة البحث في مجال الأساس الخلوي وراء تحول الخلية وتكون الأجنة الجسدية. هذه المعلومات ستصبح ذات قيمة علمية فائقة حيث أنها تزيل بعض الغموض عن ميكانيكية تحول الخلية الجسدية الي البرنامج الجنيني وتطورها الي جنين ناضج ينمو مكوناً نباتاً كاملاً له نفس الأصل الوراثي للخلية التي نشأ منها.

[stamp]

١٢

التباينات في النباتات
plant variations

يهتم علم الوراثة أساساً بدراسة أسباب التشابة والأختلاف بين الأفراد التي بينها صلة قرابه .. وهذا يعني أنه لا توجد أفراد متشابة في كل الصفات الا اذا كانت ناتجة من الأنقسام الميتوزي Mitotic division حيث يتكون نتيجة هذا الأنقسام خليتين متشابهتين للخلية الأصل الأم Mother cell مثال هذا أنتاج التوائم الصنويه Identical twins سواء في الأنسان أو الحيوان أو النبات .. أما نواتج الأنقسام الميوزي فهي أربعة خلايا ٥٠٪ من العدد الكلي للخلايا علي الأقل متشابة في التركيب الوراثي Genotype للآباء وتسمي أفراد أبوية، وحوالي ٥٠٪ تسمي أفراد غير أبوية Non-Parental type .. أى أنها تعتبر أفراد غير متشابهة للآباء التي نشأت منها وتسمي أيضاً أفراد عبورية وهذه الأفراد تنتج من أثر عملية العبور الوراثى Crossing over أثناء الأدوار الاولي في الأنقسام الميوزي Meitot-ic division. ولهذا فلابد أن يميز الباحث بين خلية نشأت كنتيجة للأنقسام الميتوزي وهذه متشابهة وراثياً وربما مظهرياً وهذا حال الخلايا الجسدية التي تتكون بعد تكوين الجنين الزيجوت Zygote الناشئ من عمليتي التلقيح والأخصاب في النبات أو الحيوان أو الأنسان .. وما نتوقعة أن تكون جميع الخلايا بالنسيج الواحد متشابهه ومتطابقه وراثيا ولكن نجد أن بعض الخلايا مختلفة مظهريا Phenotypic

ويبدأ من هنا البحث عن أسباب هذه التباينات أو بالأصح الأختلافات الموجودة في الخلايا الجسدية أى التي نتجت من الانقسام الميتوزي، حيث لايحدث فيه أى عبور وراثي!! ومثال لهذه الظاهره هو دراسه التميز والتشكل Diffrentiation وتكوين الخلايا في المراحل الأولي لتكوين جنين جنسي Sexual embryo فبعد الأخصاب المزدوج بين حبة اللقاح والبويضة يبدأ تشكيل الجنين مباشرة مكون خلية مخصبة $1n + 1n = 2n$ هي خلية الزيجوت التي تبدأ في الأنقسام الميتوزي لتكون مراحل مختلفة وأنسجه مختلفة. وهذه المراحل درست قديما في علم الأجنة النباتية، ففي النبات يمر الجنين بالشكل الكروي Globular shape ثم القلبي Heart shape ثم التوربيدي .Torpido shape ثم يبدأ تكوين نسيج الأندوسبرم منفصلاً وتتكون به ثلاث مجموعات كروموسوميه (3n) وهذا النسيج متشابة وراثياً ومظهرياً ووظيفتة تغذية الجنين أثناء مراحل الأنبات الأولي حتي تخرج الاوراق الحقيقية لتقوم بعمليات التمثيل الضوئي. ويعتبر الاندوسبرم مخزن للنشا أو للسكر، ولكن أحياناً نجد أن داخل الحبة الواحدة أندوسبرم متباين بعضه نشوي والآخر سكري رغم أن كل هذه الخلايا نتجت من الأنقسام الميتوزي.

وإذا لم يحدث التكاثر الجنسي فيمكن حدوث التكاثر اللاجنسي Asexual وهو موجود بكثرة، وتاريخياً تم دراستة بالتفصيل ومن مظاهر التكاثر اللاجنسي في النباتات مغطاه البذور ما يسمي بالتكاثر اللاخصابي Apomixis وهو يحل محل التكاثر الجنسي .. وتاريخيا كان أول من قام بتقسيم التكاثر اللاخصابي العالم Winkler (1920) وأوضح بعض حالات منه

- تكاثر خضري Vegetative propagation هو تكاثر النبات باي عضو من اعضائه ما عدا الجنين الجنسي.

- الجنين اللاخصابى Agamospermy وهو تكوين جنين من أي خلية داخل النبات ما عدا الجنين الناشئ من التلقيح والاخصاب وبالتالي فان هذا الجنين يحتوي 2n ويشابه الأم في كل صفاتها ومن هذه الحالات

- الاجنة العرضية Adventatious embryos هذه الاجنة تنمو من خلايا النيوسيله أو اغلفه البويضة كما في نباتات كثيره.

- التوالد البكري Parthenogenesis وهو نمو البويضة الغير مخصبة 1n التي تتكشف الي جنين.

- التكاثر اللاجاميطي Apogamy ينشأ الجنين من خلايا الطور الجاميطي ما عدا البويضة.

- تعدد اجنه Polyembryos وهو تكوين اكثر من جنين بالاضافه الي الجنين الجنسي داخل الكيس الجنيني مثل ما يحدث في بعض اصناف المانجو.

- الكربلاء البكري Parthenocarpy وهو نمو الثمرة بدون اخصاب البويضة بعد تلقيحها مثل ما يحدث في الموز والعنب النباتي والبرتقال أبوسره.

وتعتبر الطرق السابقة مصدر من مصادر التباين الجسدي والجاميطي.

ونعود مرة اخري لدراسة التباينات الجسدية في النبات، فتاريخياً قد درس العالم Rhoads (1920) التباينات الجسدية في حبه الذره ولكن لصفة لون الاندوسبرم الاحمر أو القرمزي .. ووجد أن الحبة يمكن أن تكون منقطة أي أن بها بقع حمراء وأخري بيضاء .. اما صفة الأندوسبرم النشوي والسكري فقد درست بواسطة العالمه McClintock (1940) وأوضحت أن سبب حدوث تباينات جسدية في اندوسبرم حبة الذره حدوث تغيرات تركيبية من الناحية السيتولوجية للكروموسوم بالخلية الحية من نقص Deficiency أو اضافة Duplication أو انقلاب Inversion أو انتقال

Translocation وبالتالي فإن اي اختلافات مظهرية Phenotypic variations علي الانسجة المكونة للعضو النباتي سواء ورقة أو جذر أو ساق أو زهره يطلق عليها اختلافات جسدية Somaclonal variation. وسميت قديما بمسيات كثيرة استخدمها الباحثون في مجال تربية الفاكهة أشهرها الكيميرا Chimera ومعناها وجود فرد أو نبات يحتوي انسجتة علي خلايا مختلفة مظهرياً عن بعضها البعض .. مثلما يوجد بعض البقع الحمراء علي ثمار التفاح أو مثلما نشأ البرتقال بسره وغيره من الفواكه .. ويمكن أن يكون سبب التباين الجسدي هو حدوث طفره في الموقع الجيني .. كما أثبتها العالم Stadler (1942) حيث أنه يحدث طفرات في الجينات التي تحكم تكوين لون الاليرون القرمزي والاحمر وكذلك الاندوسبرم الاصفر المنكمش والغير منكمش، ونفس الظاهرة درسها العالم Harland في البقع اللونية الموجودة بقاعدة بتلات زهره القطن حيث يتميز القطن الامريكي بخلوه من هذه البقع، اما القطن المصري فيوجد به هذه البقع .. وفسرت الكيميرا بانه في بعض النباتات نجد أن البراعم الطرفية أو الابطية بها القمم النامية التي تتكون من طبقات ثلاثة تتشابة مع بعضها البعض، ثم تبدأ في مرحلة النمو والتشكل حيث تتميز الي اعضاء .. فنجد أن الطبقة الخارجية (١) تتميز الي طبقة البشرة، أما الطبقة (٢) فتكون الخلايا التناسلية (البويضات وحبوب اللقاح)، أما الطبقة (٣) فتكون اجزاء الجذر والساق الداخلية .. وطالما أن الخلايا تنقسم ميتوزيا لزيادة اعدادها في كل طبقة، فإن حدوث اي تباينات أو اختلافات وراثية يمكن أن تورث اذا كانت في خلايا طبقة رقم (٢) حيث أنها تكون الجاميطات بأنواعها، ولا تورث اذا كانت في طبقة (١) أو (٣) .. ولكن حاليا مع تطور تقنيات زراعة الانسجة والخلايا، يمكن توارث أي تباينات اذا كانت اصلا تغير في التركيب الوراثي.

بعد هذه المقدمة التاريخية نبدأ الآن في البحث عن مصادر التباينات الجسدية والجاميطية، وهل هناك اختلافات بينها أم لا؟؟ فكما هو ثابت علمياً أن مصادر التباينات يمكن اجمالها في المعادلة الاتية

.Phenotypic variance = Genotypic (G) + Envirnomental (V)+Interaction

$$VP=VG+VE+VGE$$

اذاً لتحليل التباينات عمليا يلزم دراسة تجزئة التباين المظهري بمكوناتة الثلاث .. ولذلك فأن الاجابة علي هذا السؤال الخاص بكيفية تحديد نسبة كل مكون من التباين يتوقف علي مستوي الدراسة العملية، فالمستوي الأول هو دراسات حقلية In vivo، والمستوي الثاني هو دراسات معملية In situ، المستوي الثالث هو مستوي تقنيات أنابيب الأختبارIn vitro، والمستوي الأخير وهو الأدق وخاصة مع تطور وامكانية دراسة كيفية تكون وتميز خلية نباتية واحدة عند زراعتها من خلال تقنية زراعة الانسجة والخلايا الي أن يتكون منها نبات كامل Regeneration .. وأيضاً تميز الخلايا الي أنسجة Differentiation حيث يمكن التحكم في كل مكون بيئي علي حده .. ولهذا لابد ان نتعرف علي البيئة، أي كل ما يحيط بالكائن الحي من مكونات كيميائية أو فيزائية، وأمثلة المكون الكيميائي المياه والأملاح والفيتامينات وغيرها والمكون الفيزيقي مثل الضوء، والحرارة، الكهرباء، المغناطيسية، الصوت. وحالياً هناك العديد من البيئات النباتية المسجلة والمعروفة. أما التباين الوراثي فيشمل تباين التركيب الوراثي ويحتوي هذا علي تباينات في عدة مستويات

- التعدد الكرموسومي Polyploidy أي تعدد المجموعة الكروموسومية من 4n مثل القمح والقطن، 6n مثل القمح

- التغيرات في العدد الكروموسومي Aneuploidy بنقص أو بزيادة أو انقلاب أو انتقال أحد الكروسومات وهذه حالات متكررة بكثرة في نباتات كثيرة
- طفرة في الكروموسوم مثل الزيادة والنقص والأنتقال والأنقلاب
- طفـرة في الجين Gene mutation لها عدة مستويات منها الطفرات علي مستوي جزيء DNA أو مستوي النيوكليتدات مثل زيادة أو نقص في نيوكليتيد وقد يكون سببها مؤثر خارجي (فيروس)، مثل اصابة النبات بفيروس كما حدث عند اصابة الذره بفيروس موزايك الشعير فان نسبة توارث لون الاليرون تختل وتصبح مختلفة تماماً عن النسبة المتوقعة من ألنباتات الغير مصابة بالفيروس .. أو قد يكون سببها ذاتي داخلي بدون مؤثر خارجي وهذه المجموعة المكتشفة حديثاً في نبات الذره منذ عده سنوات اطلق عليها الجينات القافزة Jumbing genes التي تسبب كسر كرموسوم رقم (٩) في الذره وبالتالي يتحول الجين الذي يفرز الانثوسيانين الي جين متنح وتظهر حالة الاندوسبرم الذي يحتوي علي خلايا نشويه وخلايا غير نشويه وقد شاهدت مكلنتوك هذا التغير منذ ستين عاما تقريبا، وتم عزل هذا الجين المسمي بنظام AC-DS (1980) وبعد ذلك تم عزل جينات أخري من كائنات حية أخري مثل الدروسفيلا في الحشرات، ومعظم هذه الجينات ذات تأثير متعدد Peliotropic علي الشكل النهائي للكائن فمثلا قد تتكون زهره مؤنثة علي الزهره المذكره للذره، أو يتكون قرن استشعار مكان الارجل في حشره الدروسفيلا وتسمي هذه النوعية من الطفرات (طفرة مثلية) Homeotic mutation وهذه حاله جديدة يمكن ظهورها وبكثرة في النباتات الناتجه عن زراعة الانسجة وقد وجد أن معدل النباتات المختلفة عن النبات الام في الشكل المظهري عالي جداً كلما زادت عدد مرات زراعة النسيج، مثلماً يحدث في اكثار نباتات الموز الخالي من الفيروس

جامعة ... مكتبة الزراعة ... المكتبة

بطريقه الاكثار السريع في معامل زراعة الانسجة، فعند النقله رقم ٧ أو ٨ يزيد نسبة النباتات المختلفة عن الصنف أو المواصفات وتظهر طفرات في الشكل المظهري بنسبة عالية ،وتسمي النمط المنحرف Off type مم يؤثر علي تكلفة المنتج وسعر بيع النبات الواحد وهناك محاولات عديدة الآن لبحث سبب هذه الظاهرة حيث أن في اكثار النباتات سواء الفاكهه أو الزينه أو خلافه لابد من تقليل نسبة ظاهرة التباين الجسدي أو الاستفاده منها كمصدر للطفرات .

تفاعل البيئة مع التركيب الوراثي. في هذا المجال نجد أن التركيب الوراثي طبقا لظاهرة تمييز الخلايا وتشكلها الي أعضاء يرجع اساساً الي تفاعل البيئة ومكوناتها السابقة مع الجينات الموجودة مما يسمح بالنسخ والترجمة أي يسمح بالتعبير الجيني Gene expression وهذا التعبير يكون كميا Quantitative أو نوعيا Qualitative وبالتالي لا يمكن قياس هذا التباين الا بأستخدام طرق In vitro مثل زراعة الخلايا والانسجة ولهذا فإنه يلزم للباحث التمييز بين دراستها في الخلايا الجسدية ودراسة الوراثة في الخلايا الجاميطية، حيث أن الخلية الجسدية بها نفس الجينات التي تحتويها الخلية التي انقسمت منها أما الخلايا التناسلية أو الجاميطية فلا تحتوي علي نفس الجينات أو الخلايا أي انها مختلفة التركيب الوراثي بالاضافة انها تحتوي علي نصف العدد الكروموسومي وبالتالي فان دراسة توارث اي تباينات تختلف عن دراسة اي تباينات وراثية عن طريق الجاميطات .. وهذا ما يقوم عليه دراسة علوم الوراثة في تفسير الاختلافات أو بمعني آخر ان الجاميطات الناتجة سواء كانت حبوب لقاح أو بويضات من نفس النبات الام هي مختلفة وراثياً عن بعضها البعض علي الاكثر بنسبة ٥٠٪. أما في الخلايا الجسدية الناتجة من عمليات الانقسام الميتوزي تكون نسبة التباين الوراثي صفر للزيجوت أو بدايه تميز الخلايا

الي انسجة واعضاء ونبات كامل أي إنها متشابهة التركيب الوراثي وتختلف في تعبير الجين Gene expression ومصدره الاساسي تفاعل البيئة مع التركيب الوراثي بمعني أن هناك جينات تعمل في الاوراق ولا تعبر عن نفسها في الجذر فليس هذا اختلاف التركيب الوراثي ولكن اختلاف في تعبير الجين من خلال عمليات النسخ Transcription والترجمة Translation حيث أنه من المعلوم علميا ان ٥٪ من DNA في الكائنات حقيقية النواه هو الذي يعبر عن نفسه اما الباقي فمظهره غير واضح Cryptic وهذا هو بدايه الاختلاق بين اعضاء النبات الواحد في الوظائف (جذر، ساق، ورقه) ومعني ذلك ان هناك جينات لا تنسخ ولا تترجم، وجينات تنسخ ولا تترجم وجينات تنسخ وتترجم ولكن تتباين في كميه المنتج ونوعه .. ويسمي ذلك تاريخياً الوراثة الموجهة Epigenetic variation

بدأت دراسة الوراثة الموجهة كمصدر من مصادر التباين في مزارع الخلايا والانسجة بواسطة العالمين Waddington (1957), Child (1941) فقد أوضح وادينجتون في دراستة عن علاقه الشكل الفراغي ودراسة الاسطح Topology واستراتيجية الجينات واعتمدت الدراسة في معظمها علي تفسيرات مبنية علي علوم الرياضيات البحته، ومنذ هذا التاريخ تأرجح هذا المصطلح بين مؤيد ومعارض، حتي بدأت الدراسة علي مستوي الخلية وزراعتها في انابيب الاختبار ثم تشكلها وتميزها الي نسيج وعضو وكائن حي، وظهرت تباينات مظهريه كثيرة علي مستوي النسيج الجسدي رغم ثبات التركيب الوراثي، حتي أوضح Meins (1983) ببحوثه التجريبية صحة الاعتقاد ان هناك فرق كبير بين التباين في التركيب الوراثي (طفرات) والتباين في التعبير الجيني .. وندلل علي هذا أنه في حاله الزراعة المكثفة للخلايا أو الانسجة أو النباتات يظهر احياناً اختلافات في الشكل المظهري

للنباتات وبالتالي يطرح السؤال التقليدي هل هذه الاختلافات ترجع الي تغيرات في التركيب الوراثي (وأبسط مستوي لها حدوث طفره) أو ترجع لتأثير البيئة أو لتفاعل الاثنين معاً. وبالتالي يقرر الباحث هل ينتخب فيها أم لا لأنه يهدف أولاً وأخيراً الي ثبات الصفة المنتخبة من جيل الي جيل.

وقبل الاجابة علي هذا لابد من تحليل ودراسة هذه التباينات التي تحدث للخلايا داخل النسيج النباتي أو الانسجة داخل العضو النباتي .. وخاصه حينما توجد تحت ظروف زراعتها داخل نظام In vitro أو أنابيب الاختبار، ولذا فإن دراسة ثبات الصفه Stability للشكل المظهري تتوقف علي نوعيه التباين Variance التي حدثت في الشكل المظهري وبالتالي يمكن أن يكون ثبات الصفه أو التباين دائم Permenent أو مؤقت Temporary وبالتالي يمكن تقسيم التباين المظهري طبقا لنوعية المؤثر.

أولاً مؤثرات واستجابة لعامل فسيولوجي Physiological response وهذا يتم بوجود ماده تستحدث فعل وتغير مورفولوجي معين، اما بالاضافة أو بالحذف من البيئة

A--(+)Inducer--B--(-)Inducer--A

هذا الفعل يتحول A الي B يكون غير ثابت الا بثبات الظروف البيئية الموجودة فيها الماده المستحثة والموجودة تحت الدراسة. وهذه التباينات غير مهمة في البحوث الوراثية لعدم استمراريتها بمفردها.

ثانيا التغيرات الثابتة والموروثة من جيل الي جيل حتي بعد ازاله فعل الماده المستحثة لهذا التغير

A--(+)Inducer--B--(-)Inducer--B

تميز بحدوث تغير يورث ويظل ثابت التوريث

Stable change___ Heritable status___Stable

وعملياً نجد أن خلايا النبات الواحد تختلف في وظائفها مثل النسيج الموصل (الخشب واللحاء) ونسيج البشره وهذا الاختلاف ليس في التركيب الوراثي ولكن اختلاف وتغير في التعبير الجيني .. يزداد هذا التغير والتباين بزيادة الزمن أي العمر أو بمعني آخر مراحل نمو النبات من طور البادره والطور الخضري الي الطور الثمري وهذا يتم اثناء العمليات المعروفه لتشكل الخلايا .. ويؤخذ في الاعتبار أيضا التحديد المسبق لوظيفة الخلية داخل النسيج الذى سوف يتكون منها. كما أن الخلايا سوف تعين أو تشكل فيما بعد وتكون خلية عمادية أو اسفنجية أو لحاء أو خشب.

ويمكن دراسة ثبات الصفات بأستخدام عدة تقنيات مثل الطرق الدقيقة لزراعة الخلايا Micro-method أو طريقة صب الاطباق Plating method ، وفى كلتا الحالتين لابد من الحصول علي خلايا منفرده في البيئات السائلة بعمل زراعة معلق خلايا Cell suspension ثم عزل الخلايا الفردية وزراعتها أو بزراعة البروتوبلاست Protoplast. وتنتهي هاتان التجربتان بتكوين المستعمرات نتيجة انقسام ونمو الخلية الاصلية. وبالتجربة وجد أن الخلايا النباتية لا يمكنها ان تنمو بصورة منفردة ولابد أن يكون هناك حد أدني من عدد الخلايا المجاورة لبعضها البعض حتي يتم الانقسام، ويطلق علي الحد الادني لعدد الخلايا المنفردة اللازمه للانقسام والنمو داخل الطبق الواحد بإسم كفاءه صب الاطباق

Clonning efficiency or plating efficiency

يمكن التعبير بان الكفاءه تزداد بزيادة عدد الخلايا المستخدمه. وجد العلماء

Griffs & Doughal (1965) ان كفاءه صب الاطباق تزيد بزيادة عدد الخلايا ولو ظهر خمس مستعمرات في الطبق الواحد فلا يمكن الحكم علي الاختلافات الجسدية لصغر العدد الموجود وعدم المقدرة الشخصية علي انتخاب هذا العدد البسيط، وتعتبر النتائج غير دقيقة، وتزيد دقه النتائج بزيادة عدد المستعمرات Clones ولهذا فإن هذا العامل هام جدا اذا اراد الباحث دراسة مصدر التباينات والتمييز بين ما هو وراثي (مثل الطفرات) وما هو بيئي أو تباين التعبير الجيني Epigenetic. ولهذا قام Meins (1975) بتجاربه لأثبات ماهية هذه التغيرات الوراثية الدائمة التي تحدث علي مستوي Epigenetic وكيف تورث وما هو الفرق بينها وبين التغير في التركيب الوراثي الذي سببه الطفرات ونلخصها في الجدول الآتى

الفرق بين خصائص الطفرات Mutation, Epigenetic

Character	Epigenetic	Classical mutation
directed	specific	not specific
reversibility	high rate	low rat
totipotent	must be	may be
genetic limitation	limited by genotype	not limited

ولهذا فإن في مجال زراعة الخلايا والانسجه ما يؤكد هذه الظاهرة فعلي سبيل المثال

١- يجب اضافة مصدر للكربون في البيئة المغذيه مثل السكروز للنسيج والخلية النباتية رغم ان النبات ذاتي التغذية Autotrophs.. فهل معني ذلك انه حدث

طفره وتحول النبات الي عضوي التغذيه Heterotrophs.. والاجابه علي ذلك بالنفي لأن هذه ظاهره عامه عند جرح النسيج أو العضو وزراعه المنفصل النباتي Explant وبالتالي تحول الخلية النباتية الي عضويه التغذية رغم وجود البلاستيدات وكل العوامل التي تساعد علي التمثيل الضوئي ولكن لا يحدث بناء ضوئي وهذه الظاهرة تحكم كل النباتات التي زرعت بنظام زراعه الخلايا والانسجه بغض النظر عن التركيب الوراثى وبالتالي فهي ليست طفره وانما تباين في التعبير الجيني.

٢- اضافة الهرمونات النباتية في البيئات المغذية لزراعة الانسجه والخلايا مثل الاكسينات والسيتوكينينات فرغم انها تصنع تلقائيا في النبات الكامل نجد أن الخلايا والانسجه تفقد القدره علي تصنيعها عند زراعه الخلايا والانسجه في بيئات مغذية ولهذا يتحول النسيج من ذاتي التغذيه الي غير ذاتي Auxotrophs وهذه ايضاً ظاهرة عامه وبالتالي فهي تغير في تعبير الجين ودليل ذلك اذ امكن للعالم Meins الحصول علي نسيج نباتي يفرز السيتوكينينات مرة أخري بعد تعريضه لدرجه حراره عاليه لفتره بسيطه وامكن للجنيات التي تصنع السيتوكينينات أن تعبر عن نفسها بالنسخ أو الترجمه وسمي بالنسيج المروض Habituated tissue ولهذا فكثير من هذه الظواهر توجد علي مستوي الخلية والنسيج والعضو بمعني أن كل منها قد يفقد تعبير كثير من الجينات ويقف لأسباب في النسخ أو الترجمه No expression ثم تستعيد القدره مره أخري عندما يحدث تشكل الخلايا والانسجه الي نبات كامل plant regeneration .. ومعني هذا ان تعبير الجين يتوقف علي الشكل الفراغي للعضو Organ topology والنسيج والخلية. وقد استنتج الباحثون بأن سابقة التحديد Pre-determination لوظيفة الخلية تتحدد طبقا لمكانها في الفراغ التي وجدت فيه اي طبقا لأتجاهها بغض النظر عن التركيب

الوراثي لها ولهذا فعند حدوث جرح في عضو نباتي أو انفصاله وزراعته يتغير وضعه الفراغي وبالتالي فأن هذا المعني بمفهومه البيولوجي هو تفاعل البيئة مع التركيب الوراثي الذي يتحدد بعنصرين هامين وهما عنصر المكان الذي يتحدد بالشكل الفراغي الذي وجدت فيه الجينات والخلية المحتويه علي هذا الجينات والزمان الذي يؤدي الي تباينات في تعبير الجين Variation in expression. ولهذا فأن من أهم فوائد التطبيق والاستفاده من دراسة التباينات هو التفرقة بين تباينات الخلايا الجسدية Somaclonal variation وتباينات الخلايا الجاميطية Gametoclonal variation.

– حيث أنه في الحالة الاولي تنتج نباتات ثنائيه العدد الكرموسومي أما الجاميطات المذكره أو المؤنثه فانها تنتج احاديه المجموعه الكرموسوميه ويكون الانتخاب ذو كفاءه عاليه في حالة استخدام التباين الجاميطي بدلا من التباين الجسدي حيث أنه يمكن مثلاً اختصار برامج انتاج الذره الهجين الي ٦٠٪ من عدد السنوات بدلاً من التلقيح الذاتي المستمر كطريقه تقليدية في انتاج السلالات النقية وانتاج التباين الجاميطي في الذره يكون بزراعه المتك Anther culture أو حبوب اللقاح Pollen culture أو عن طريق التوالد البكري ثم مضاعفه العدد الكروموسومي باستخدام المواد المحدثه للتضاعف مثل الكولشيسين وبالتالي في خلال ثلاث سنوات علي الاكثر يمكن الحصول علي سلالات وراثيه نقيه، بدلا من ٩-١٠ سنوات بطريقه التلقيح الذاتي المستمر.

- ان انتخاب الطفرات النباتية Plant mutation باستخدام التباين الجاميطي اكثر كفاءه ومباشرة وفعالة نظرا لوجود الحاله الاحاديه التي فيها يعبر كل جين عن نفسه فلا يوجد علاقه بين الجين واليله مثل إنعدم السياده Dominance او التنحي

وبهذا يمكن التعرف علي فعل بعض الجينات التي ينعدم فعلها اذا Ressesion .. وجدت في حالة خليط كما هو الحال في الخلايا الجسدية ومثال لهذا أنه عند توارث صفه وراثيه من الصنف (أ) الي الصنف (ب) فإن نباتات الجيل الاول تكون خليطه وراثيا ثم بالتلقيح الذاتي ينعزل منديليا في الجيل الثاني بحيث لا تزيد النباتات المتماثله وراثيا للصفه المتنحيه عن ٢٥٪ من عدد نباتات النسل الناتج ولكن باستخدام التباين الجاميطي مثل استخدام مزارع المتك لنباتات الجيل الاول فان الانعزال يكون بنسبة ٥٠٪ بالاضافة الي توفير الوقت ومساحات الارض المنزرعه وتقليل والتكلفه حيث يتم هذا في المعمل في المرحله الاولي لتكوين هذه النباتات، وبالتالي فان استخدام التباين الجاميطي افضل كثيراً لباحث الوراثه ومربي النبات في توفير عدد النباتات المستخدمة للانتخاب.

بالأضافه إلي أن انتاج طفرات في النباتات الأحاديه Haploid الناتجه من التباين الجاميطي ذو كفاءه عاليه ونسبتها أعلي خاصة حيث أن النباتات الأحاديه ذو كفاءه قويه في كشف الطفرات المقاومه للظروف المعاكسه Stresss condition مثل تحمل الملوحه والجفاف والحراره والبرودة ومقاومة سموم الفطريات. وبعد ذلك العرض النظري والتطبيقي نضرب أمثله من تجارب عمليه كثيره لانتخاب صفات مثل تحمل الملوحه علي مستوي الخلية ثم يفاجأ الباحث بأن النباتات التي تشكلت فقدت القدره والثبات لتحمل الملوحه بنفس مستوي الخلايا الجسدية التي نتجت منها أو أن الخلايا فقدت القدره علي التشكل أو القدره علي التميز Totipotency .. وهذه حاله عامه في كثير من الدراسات الحاليه كما حدث في محصول الطماطم والذره وأيضاً في التكاثر السريع في المحاصيل علي مستوي زراعة الأنسجه حيث نجد أن نسبة التباين للنباتات ذات النمط المنحرف Off-type الناتجه تزيد بزيادة

عدد Subculture ولابد أن يؤخذ هذا أيضاً في الأعتبار مستقبلاً للإنتخاب علي مستوي الخلايا الجسدية، وبالذات حينما تستخدم لانتاج بعض المواد الثانويه Secondary products مثل النباتات الطبيه والعطريه التي سوف تستخدم فيها الخلية النباتية وتزرع في مزارع متجدده Batch culture أو مزارع مستمره Continuous culture وبالتالي هناك مصدران محتملان للتباينات المظهريه .. الأول وراثياً ومصدره حدوث طفرات تلقائيه Spontaneous mutation والآخر محدث بواسطة Epigenetic نتجة تباينات التعبير الجيني ولابد من حسابهما احصائياً خاصة أن الأستثمارات مكلفه وضخمه جداً وأي أخطاء فيها تسبب خسائر فادحه وخاصة ونحن مقبلين علي استخدام هذه التكنولوجيا بعد عدة سنوات لإنتاج مركبات بكميات كبيره من النباتات الطبيه والعطريه والمضادات الحيويه بالطرق التقليدية باستخدام الكائن الحي كوحدة اساسية.

١٣

تكوين الأعضاء النباتية واقلمة النباتات
Organogenesis and plant acclimatization

بالرغم من تعدد واختلاف الأهداف من زراعة الأنسجة النباتية المختلفة علي بيئات مغذية ومن اختلاف معدل وصور استجابة الأنسجة المنزرعة ، فإن الهدف المشترك والنهائي هو انتاج نباتات كاملة لها القدرة علي المعيشة في الحقل تحت الظروف البيئية الطبيعية أو في الصوب الزراعية تحت الظروف المتحكم فيها .. هذا يذكرنا بنظرية العالم Haberlandt (1902) الذي توقع فيها مقدرة الخلية النباتية المنفصلة والمنزرعة علي بيئة مغذية من الانقسام والتطور لتعطي جنينا تركيبه يناظر تركيب النبات الكامل. بدون المقدره علي انتاج نباتات كاملة من الأنسجة المنزرعة علي بيئة مغذية فلا يعتبر هناك قيمة عملية من اندماج البروتوبلاست، البحث عن التراكيب الوراثية المتباينة بهدف استخدامها في تحسين الثروة النباتية، زراعة الخلايا الأحادية، زراعة القمم المرستيمية، انتاج أجنة جسدية. يعتبر انتاج نباتات كاملة من الأنسجة المنزرعة علي بيئة مغذية المرحلة النهائية لعديد من العمليات المتباينة والمعقدة التي تتضمن تشكيل الأعضاء النباتية المختلفة. من الحقائق التي لاجدال فيها أن زراعة الأنسجة النباتية والقدرة الكامنة للخلايا علي تكوين نباتات كاملة أتاحت الفرصة لدراسة كيفية تكوين الأعضاء النباتية والمراحل التطورية المختلفة التي يمر بها العضو النباتي وكذا العوامل التي تؤثر في تكوين الأعضاء

النباتية .. ونظراً للأهمية العظمي لعمليات تشكل الأعضاء النباتية علي الأنسجة النباتية المنزرعة علي بيئة مغذية فاننا سوف نتناول مراحل تطور الأعضاء النباتية المختلفة بدءاً من مراحلها المبكرة.

في تجارب مبكرة علي زراعة الأنسجة سجلت بعض الملاحظات علي تكوين أعضاء نباتية علي النسيج النباتي المنزرع علي بيئة مغذية، غير أنه لم تسجل أى معلومات خاصة بالعوامل التي تؤثر في حث النسيج علي تكوين الأعضاء المتباينة. بالرغم من أنه يمكن انتاج أجنة نباتية جسدية أو احادية علي الكالس أو الخلايا الأحادية المنزرعة علي بيئة مغذية، غير أن هذه الأجنة لا تعتبر من الأعضاء النباتية لكونها تركيب له كيان منفصل، حيث أن هذه الأجنة ليس لها اتصال وعائي بالنسيج الأم. يجب أن يكون واضحاً لدينا أن تكوين الأعضاء النباتية التي تشمل الجذور، السوق، الأوراق، الأزهار لايعتمد علي وجود معلومات سابقة في خلايا النسيج المنزرع مسئولة عن تكوين الأعضاء النباتية، بل تعتمد علي الحث الذاتي للخلايا لتقوم بمثل هذه الوظيفة تحت ظروف ما .. فمثلا نجد أن مجموعة صغيرة من خلايا الكالس المتكون علي بيئة مغذية تقوم بوظيفة انشاء عضو نباتي .. هذا العضو النباتي قد يكون جذر أو ساق أو ورقة أو زهرة وذلك تبعاً لنوع الحث الذي يصل اليها. بالرغم من الأهمية العظمي لفهم حث الخلية النباتية علي التطور في شكل محدد لتكون عضو نباتي مميز، غير أن هناك عقبات عديدة تحد من الوصول الي معلومات ثابتة وحقيقية .. عموماً فان تكون الخلايا المرستيمية يتضمن مرحلتين هامتين، في المرحلة الأولي يتم تحول خلايا الجزء النباتي المنزرع علي بيئة مغذية من خلايا مميزة الي خلايا غير مميزة، هذا يحدث مباشرة بعد فصل الجزء النباتي من النبات الأم وزراعته علي بيئة مغذية،

[stamp]

في هذه المرحله يزداد معدل انقسام الخلايا وبالتالي يتكون نسيج من الخلايا الغير مميزة، في المرحلة اللاحقة تتحول الخلايا الغير مميزة الي أنواع مختلفة من الخلايا المميزة التي بدورها تنشط وتتطور الي أعضاء نباتية.

تتكون الأعضاء النباتية من مراكز مرستيمية تنشأ بدورها من خلية واحدة أو مجموعة من الخلايا البارنشيمية .. وتتميز الخلايا المكونة للمراكز المرستيمية باحتوائها علي سيتوبلازم كثيف ونواه كبيرة الحجم مقارنة بنوي الخلايا الأخري. علي الرغم من أنه أصبح معلوماً الآن أن تكون المناطق المرستيمية يعتبر مطلب أساسي لتكوين الأعضاء النباتية، غير أنه لم يتم التعرف علي العوامل التى تؤثر في نشأة المناطق المرستيمية، عموما يمكن القول أن الأنقسام النشط لبعض خلايا الكالس والوضع البنائي للخلايا بعضها البعض قد يكون سبباً في انشاء موقع مرستيمي في نسيج الكالس .. هذه المنطقة المرستيمية تعمل علي جذب نواتج التمثيل الحيوي من الخلايا المجاوره وبالتالي توفير مصدر للطاقة للخلايا سريعة الأنقسام التي بدورها تكون الأعضاء النباتية Street (1977). عموماً يعتقد أنه يحدث تكوين الأعضاء النباتية من المراكز المرستيمية نتيجة للأستجابة لبعض المؤثرات التي تختلف وتتباين .. وتبعاً لنوع وطبيعة المؤثر فانه يتحدد نوع العضو النباتي المتكون علي نسيج الكالس.

١ تكوين الاعضاء Organogenesis

يعتبر تكون الجذور علي الأنسجة المنزعة علي بيئة مغذية أبسط مثال لتكوين الأعضاء النباتية، وهو أيضاً أكثرها شيوعاً في زراعة الأنسجة النباتية .. سجلت أول ملاحظة علي تكوين الجذور علي نسيج الكالس المتكون من زراعة جذور نبات

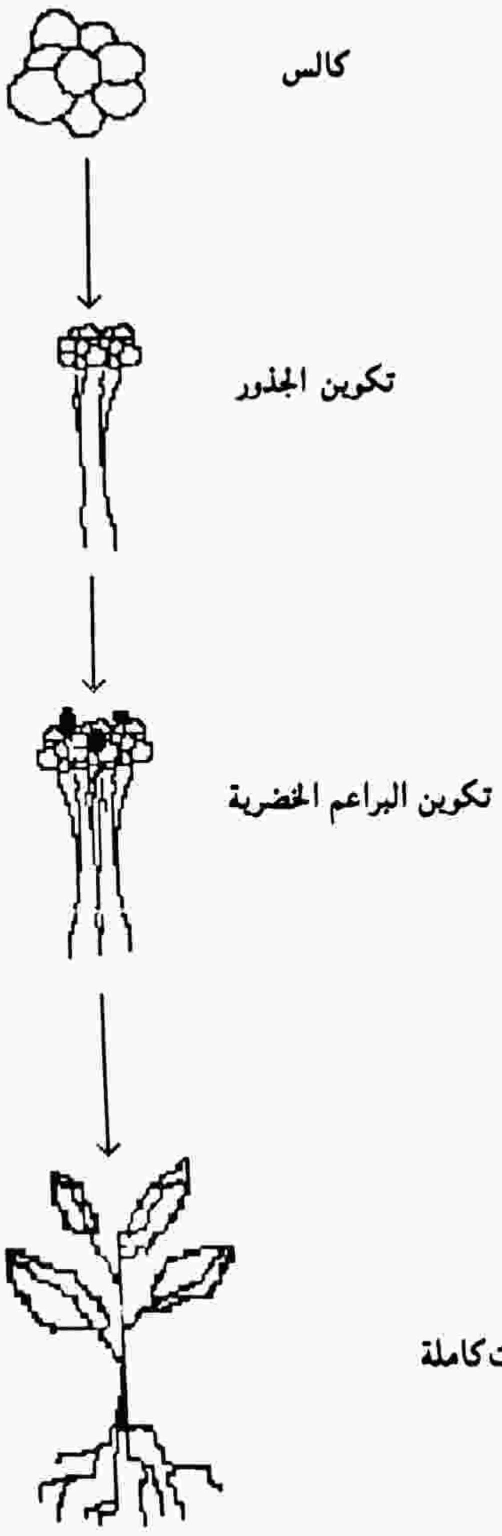
الجزر بواسطة العالم Nobecourt (1939) وتلي هذا ملاحظة تكون الجذور علي الأنسجة المنزرعة للعديد من الأنواع النباتية المختلفة وللأعضاء النباتية المختلفة، وهذا يعني أن تكون الجذور علي نسيج الكالس ليس مرتبطاً بزراعة عضو نباتي ما .. فقد تتكون الجذور علي الكالس الناتج من زراعة ساق، ورقة، جذر أو أي عضو آخر من الأعضاء النباتية. تنشأ الجذور موزعة علي سطح الكالس أو تتكون علي التراكيب الخلوية عديدة الخلايا في المعلقات الخلوية .. وتتشابة الجذور الناتجة في مزارع الأنسجة بتلك التي تنشأ علي البادرات الناتجة من البذرة. هناك عوامل عديده تؤثر في تكوين الجذور وهذه تشمل الأكسين، الكربوهيدرات، الفترة الضوئية، الكثافة الضوئية التي تستخدم أثناء الزراعة علي بيئة مغذية .. فلقد أثبتت التجارب العلمية إمكانية تكون الجذور علي النسيج المنزرع علي بيئة مغذية تحتوي اكسين، غير أنه في بعض الحالات وجد أن اضافة الأكسين الي البيئة المغذية يؤدي الي تثبيط تكون الجذور .. وفي حالات اخري يتطلب الأمداد ببعض المواد التي تضاد في تأثيرها تأثير الأكسينات وذلك لتنشيط تكون الجذور Thomas & Street (1970). من هذا يمكن القول أن العوامل والظروف الضرورية اللازمة لتشجيع التجذير تختلف تبعاً لأختلاف النوع النباتي .. فمثلاً قد تكون الظروف المثلي لتشجيع التجذير في نوع نباتي ما تكون مغايرة تماماً عن الظروف المناسبة لتجذير نوع نباتي آخر.

تتكون البراعم الخضرية التي تتطور الي نموات خضرية إما من المراكز المرستيمية علي الكالس النامي علي بيئة مغذية، او علي الكالس المتكون علي قواعد الجذور التي نشأت بدورها من مجموعة من الخلايا المرستيمية .. في هذه الحالة تتكون الجذور أولاً من التراكيب عديدة الخلايا في المعلقات الخلوية ويبقي الكالس علي

قواعد الجذور صغيراً في الحجم الي أن يتم توفير العوامل التي تنشط تكون البرعم الخضرى. ويلي هذا تكون نموات خضرية من البرعم المتكون علي قاعدة الجذور، وبهذا يتكون نبات كامل في البيئة المغذية ناشئاً من مجموعة خلايا غير مميزة (شكل ١٦). في دراسات متعددة في هذا المجال وجد أنه يمكن تنشيط تكوين النموات الخضرية علي الأنسجة المنزرعة علي بيئة مغذية بواسطة استخدام تركيب متوازن من الأكسين والسيتوكينين .. كما وجد في بعض الحالات انه من الافضل أن يستخدم أحد أو كلا من الأكسين والسيتوكينين من أجل تكوين براعم خضرية. مايزال هناك بعض الأنواع النباتية التي يصعب فيها تنشيط تكوين النموات الخضرية سواء باستخدام أو عدم استخدام منظمات النمو الأكسين والسيتوكينين، قد يرجع هذا الي أحد أو بعض الأسباب التالية

- حاجة النسيج المنزرع الي اضافة بعض الهرمونات الي البيئة المغذية، مثل اضافة حمض الجبراليك الذي ينشط تكون الأفرع الخضرية علي كالس نبات الكريثانثم.
- تراكم بعض الهرمونات بالنسيج النباتي حتي يصل تركيزها الي الحد الذى يؤدي الي تثبيط تكون النموات الخضرية.
- عدم ملائمة الظروف المحيطة مثل العناصر المغذية، العوامل البيئية من حرارة، ضوء وغيرها لتكوين النموات الخضرية علي النسيج المنزرع علي بيئة مغذية.

أشارت بعض الدراسات الي أهمية الجبرالينات والمواد المشابهة للجبرالين علي تكوين البراعم الخضرية، كما أثبتت أيضاً أهمية تراكم الكربوهيدرات خاصة النشا في النسيج النباتي الذي يتكون منه نموات خضرية .. تعتبر هذه النشويات هامه خلال المرحلة النشطة للخلايا أثناء تكوين الأعضاء النباتية .. وقد يرجع التأثير المثبط لحمض الجبراليك علي تكوين الأفرع الي أثره علي تقليل أو خفض الكمية المتراكمة



شكل (١٦) رسم توضيحي يبين مراحل تكوين نباتات كامله من البراعم المتكونه علي الجذور المنزرعة فى بيئة مغذية.

من النشويات في الخلايا Thorpe (1978). بالرغم من ان الاكسين والسيتوكينين لهما دوراً أساسياً في عملية تكوين الأعضاء النباتية، غير انه من الصعوبة تحديد التوازن الهرموني المناسب الذى يؤثر علي التركيب الوراثي المؤدي الي تكوين العضو من خلال النسيج النباتي المنزرع .. وعلي هذا يمكن القول أن مستويات الهرمونات المختلفة المستخدمة والمضافة الي البيئة المغذية يجب أن تكون في توازن تام مع مستويات الهرمونات الموجودة في النسيج النباتي بالأضافة الي الهرمونات المتكونة في الكالس النامي علي بيئة مغذية .. من هذا يتضح أن ايجاد التوازن الهرموني الملائم لتنشيط تكون عضو نباتي علي نسيج منزرع علي بيئة مغذية صناعية أمر عسير يحتاج الي اجراء العديد من التجارب التي يستخدم فيها تركيزات مختلفة من منظمات النمو المتباينة. بالرغم من أنه اجريت العديد من الدراسات علي تكوين الاعضاء النباتية علي النسيج المنزرع علي بيئة مغذية، غير أنه ما يزال يصعب وضع مفهوم عام حول العوامل التى تؤثر فى تكوين الأعضاء فى الأنواع النباتية المختلفة .. خاصة تلك التي تتعلق ببحث الخلايا علي تكوين الأعضاء.

الغالبية العظمي من الأنواع النباتية تفقد القدرة علي تكوين الأعضاء مع إطالة فترة بقائها علي بيئة صناعية، ولكن هذه الظاهرة ليست شاملة لجميع الأنواع، حيث أن هناك بعض الحالاتالتي لا تتكون فيها الأعضاء النباتية مطلقاً، بينما هناك حالات اخري ذات قدرة غير محدودة علي تكوين الأعضاء النباتية .. هذه القدرة ليست موقوتة بفترة زمنية محددة Reinert et al. (1961) كما أن هناك بعض الحالات التي لوحظ فيها بداية تكون الاعضاء بعد عدة سنوات من الزراعة علي بيئة مغذية Sacristan & Melchers (1969). يعزو التباين في المقدرة

علي تكوين أعضاء نباتية إلي عدم الثبات في التركيب الوراثي الذي بدوره يؤثر في القدرة علي تكوين الاعضاء المختلفة .. ولقد أثبتت التجارب العملية أن نسيج الكالس الناتج من زراعة قمم جذور نباتات البسله يفقد القدرة علي تكوين أعضاء نباتية بعد عدة أسابيع فقط من نقلة إلي بيئة مغذية، وهذا يرجع إلي تحول الخلايا من الحالة الثنائية الكروموسومات إلي خلايا متضاعفة في عدد الكروموسومات (1967) Torrey. قد يرجع عدم الثبات في التركيب الوراثي أيضاً إلي حدوث الطفرات الوراثية أو غياب بعض الكروموسومات أو مجموعة كروموسومية كاملة، هذا التغير في التركيب الوراثي لخلايا الكالس يتطلب ظروف مغايرة لتلك التي تتطلبها الخلايا الاصلية حتي يمكن حث الخلايا ذات الصفة الوراثية الجديدة علي تكوين أعضاء نباتية. بالرغم من أن هذا التفسير قد يكون مقنعاً من الناحية النظرية غير أنه لم يوضح لنا كيفية فقدان القدرة علي تكوين الاعضاء النباتية في بعض الأنواع النباتية التي تتميز بثبات التركيب الوراثي لخلايا الكالس المنزرع علي بيئة مغذية لفترة طويلة .. هذا يقودنا إلي إستعراض نظرية أخري يعتنقها كثير من الباحثين الذين ألحقوا هذه الظاهرة إلي التغير الفسيولوجي لخلايا نسيج الكالس .. فلقد وجد أن نسيج الكالس الذي فقد القدرة علي تكوين أعضاء نباتية يستعيد هذه المقدرة عند نقلة إلي بيئة مغذية أخري تحتوي علي تركيز مرتفع من النتروجين، هذا يشير إلي التغير الفسيولوجي لنسيج الكالس الذي يحدث معه تغير في متطلبات النسيج من بعض العناصر المكونة للبيئة المغذية الذي يعتبر بدوره مطلب أساسي لتكوين الأعضاء النباتية.

مع إختلاف النظريات في ظاهرة فقدان القدرة علي تكوين الأعضاء النباتية يمكن القول أن هذه القدرة ما هي إلا تعبير عن عمل جينات وراثية مميزة تحت ظروف

خارجية محددة .. ما لم تتوافر هذه الظروف فلا تعبر هذه الجينات عن صفتها ويقف تكون الاعضاء النباتية .. هذا لا يعني إجازة بعض النظريات عن الأخري ولكن يعني أهمية التوافق التام بين التركيب الوراثي والعوامل الخارجية المحيطة وإرتباطها بظاهرة تكوين الأعضاء النباتية علي بيئات مغذية فيما يعرف بظاهرة إحداث الصفات (epigenetic) وهذه بدورها تحتاج إلي المزيد من البحث والدراسة لأهميتها البالغة في فهم سلوك الخلية التي ما تزال تملك من القدرات ما لم تفصح عنه بعد.

٢. الاساس الخلوي لتكوين الأعضاء النباتية

Cellular basis for organogenesis

تعتبر دراسة كيفية عمل الجينات الوراثية التي تنظم عمليات التطور المتتابعة لتكوين الأعضاء النباتية ذات أهمية خاصه، وذلك نظراً للقيمة العلمية الفائقة للمعلومات المتحصل عليها بهدف الفهم والتحكم وتوجيه الخلية الي التطور في برنامج محدد للحصول علي تركيب مميز. كما أشرنا من قبل فان مقدرة الخلية علي انتهاج برنامج تطوري ما يتحدد بتأثير عدة عوامل علي الجهاز الوراثي للخلية .. نتيجة لتأثير هذه العوامل فانه يحدث تحول الخلية من برنامج وظيفي ما الى برنامج آخر، وهذا بلا شك يتبعه تغيير في التركيب الخلوي وفي العمليات الحيوية التي تحدث بالخلية والتي يرجع أساس تغيرها الي التغير في الأنزيمات المتكونة نتيجة للتغير في عمليات النسخ والترجمة. كما نعلم فان خلايا النبات الواحد لها تركيب وراثي متماثل، غير أن هذه الخلايا ذات التركيب المتشابه لها المقدرة علي تكوين جذور وفي حالات اخري أفرع وأوراق وغيرها من الأعضاء المختلفة .. هذا ليس من

الصعب تفسيره حيث أنه يرجع الي نشاط وتوقف عمل بعض الجينات الوراثية .. غير أن السؤال الذي نحن بصدده هنا هو فهم العوامل المؤثرة علي الجينات الوراثية التي بدورها تقود عمليات التطور المختلفة؟؟.. كما نعلم فإن الهرمونات تعتبر من العوامل الهامه التي تؤثر في تكوين الأعضاء النباتية المختلفة، فمثلاً نجد أن الأكسين ينشط تكوين الأحماض النوويه المختلفة في خلايا النسيج النباتي .. وهذا يشير الي تأثير الأكسين علي الجينات الوراثية بالخلية حيث أن تكوين بعض الأحماض النوويه ما هو إلا انعكاس مباشر لنشاط بعض الجينات الوراثية. من الجدير بالذكر أن تأثير الأكسين علي الجهاز الوراثي للخلية لا يعتبر تأثير مباشر حيث وجد أنه يرتبط ببعض المواد الوسيطة التي توجد بالنواه وليست علي الكروموسومات .. والماده المتكونة من هذا الأرتباط لها المقدرة علي احداث تأثير علي الجينات بالكروموسومات .. ولقد أمكن لبعض العلماء من عزل الماده الوسيطة التي تستقبل وترتبط بالأكسين وتسبب تغير في النشاط الجيني في وجود الأكسين (1969) Matthysse & Phillips. يعتبر وجود كل من الأكسين والسيتوكينين في البيئة المغذية بالمعدلات المناسبة من الأمور الهامه والمسئوله عن تكوين الأعضاء النباتية .. بينما نجد أن الأكسين ينشط عمليات النسخ فان السيتوكينين له دور في المساعدة علي المحافظة علي الحمض النووي المتكون من عمليات النسخ وبالتالي الكفاءه المرتفعة لعملية الترجمة.

٣. الأقلمة Acclimatization

استعرضنا في فصول هذا الكتاب الطرق والمراحل المختلفة التي يمكن بها الحصول علي نباتات كاملة من نسيج نباتي أو من خلية منفصلة ومستقلة منزرعة في بيئة

مغذية .. والآن وبعد الحصول علي نباتات كاملة فانه يجب أن تنقل هذه النباتات الي الصوب أو الي الحقل بهدف استكمال دورة حياتها .. هنا يجب الذكر أن عدد كبير من النباتات يفقد نتيجة للتغير في ظروف النمو، حيث تنقل النباتات الي ظروف بيئية غير متحكم فيها فضلاً عن خروجها من الجو المعقم الي جو غير معقم مليئ بالكائنات الحية الدقيقة. لهذا فانه يجب تجهيز هذه النباتات قبل نقلها الي الصوبة أو الحقل وذلك بهدف زيادة كفائتها علي المعيشة في الظروف الجديدة وبالتالي تقليل نسبة النباتات التي تفقد في هذه المرحلة. يطلق علي العمليات التي تجري علي النباتات خلال هذه المرحلة الأنتقالية والتي تتعلق باعداد النباتات للنقل لظروف الحقل بعمليات الأقلمة.

تتميز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية علي بيئة مغذية في ظروف معقمة ببعض الصفات المورفولجية، التشريحية، الفسيولوجية التي يصعب معها مواجهة الظروف القاسية .. فمثلاً امداد النباتات بما تحتاجه من مصدر للكربون في البيئة المغذية يقلل كفائتها في القيام بعملية التمثيل الضوئي، كما أن نموها في جو مشبع بالرطوبه يجعلها أقل تطوراً في وجود طبقة شمعية علي سطح الأوراق التي هي ذات أهمية خاصة في نباتات الحقل وذلك لتقليل فقد المياه بواسطة النتح وحماية النباتات من مهاجمة الكائنات الدقيقة المسببة للأمراض. سوف نستعرض هنا بالتفصيل بعض هذه الصفات لهذه النباتات وكيفية إجراء عملية الاقلمة لتهيئة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة من مواجهة الظروف القاسية بالحقل أو الصوبة الزجاجية.

١.٣ التركيب التشريحي للورقة Leaf anatomy

تتميز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة بأنها تحتوي أوراق غير سميكة مقارنة بالنباتات النامية في الحقل، هذا يرجع إلي الاختزال في عدد طبقات نسيج الميزوفيل الذي يحتوي بدوره علي العديد من الفراغات الهوائية بين خلاياه، كما أن حاجة النباتات النامية على بيئة مغذية إلي القيام بعملية التمثيل الضوئي أدي إلي عدم تطور الكلوروبلاست في خلايا الورقة .. فنجد أن الكلوروبلاست ذات تركيب بسيط وتفتقد التركيب الداخلي المتطور الذي يؤهلها للقيام بعملية التمثيل الضوئي. بالرغم من الاعتقاد في حدوث تغيير في التركيب التشريحي للأوراق أثناء الأقلمة، غير أنها ما تزال لا تحمل صفات مثيلتها علي النباتات النامية في الحقل .. هنا يجب الذكر أن الأوراق الجديدة المتكونة علي النبات بعد نقله إلي الصوبة أو الحقل تتشابة تشريحياً مع أوراق النباتات النامية بالحقل، بهذا فإن الأقلمة لا تعمل علي تعديل التركيب التشريحي للورقة بل تعمل علي تهيئة الخلايا الموجودة أصلاً بالورقة لتساعد في مواجهة الظروف القاسية .. فنجد مثلاً أنه لا يحدث تغيير في عدد طبقات الخلايا المكونه لنسيج الميزوفيل بالورقة ولكن يزداد حجم هذه الخلايا بدون أن يحدث تغيير في حجم الفراغات البينية بينها Donnelly et al. (1985), Fabbri et al. (1986) . تعتبر طبقة الكيوتيكل التي تتكون من مزيج من الكيوتين والشمع والتي تغطي الجزء الخضرى من النبات ذات أهمية خاصة في منع فقدان المياه من النبات .. بديهياً فان هذه الطبقة تقل أهميتها في النباتات الناميه في جو مشبع بالرطوبة ومحكم، حيث لايصبح هناك مخاطر من فقدان الماء .. نتيجة لهذا فان النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية تحتوي فقط علي طبقة رقيقة من هذه الطبقة الشمعية. عندما تنقل هذه

النباتات الي الصوبة أو الحقل فانها تفقد كميات كبيرة من الماء لعدم وجود الطبقة الشمعية وبالتالي تفقد النباتات. أثناء عملية الأقلمة يزداد سمك الطبقة الشمعية علي النمو الخضري للنبات وبذلك يقل معدل فقدان الماء من النبات وتزداد نسبة النجاح في نمو النباتات بالصوب أو الحقل Sutter & Langhans (1982). لا تعتبر طبقة الكيوتيكل هي التركيب الوحيد بالنبات الذي يعمل علي الحفاظ علي الماء، فهناك أيضاً الثغور التي تنتشر علي سطح الورقة، والتي من وظائفها تنظيم عملية فقد الماء للمحافظة علي النبات. وتشترك النباتات النامية علي بيئة مغذية في جو معقم محكم بأن ثغورها تكون مفتوحة طوال الوقت .. هذا يرجع الي عدم وجود مخاطرة لفقدان المياه من النبات نتيجة لنموها في جو مشبع بالرطوبة. عندما تنقل هذه النباتات الي ظروف الحقل مباشرة وبدون اجراء أقلمة فان ثغورها تستمر في وضع الأنفتاح وبذلك تفقد كمية كبيرة من الماء الذي معه تهلك النباتات .. أثناء عملية الأقلمة تستعيد نسبة كبيرة من الثغور مقدرتها الميكانيكية علي الأنغلاق والأنفتاح لمواءمة الظروف المحيطة، وفي نهاية فترة الأقلمة فان الأغلبية العظمي من الثغور الموجودة علي الورقة تكتسب كفاءة العمل التي تماثل نظيرتها علي النباتات النامية في الحقل أو الصوبة.

٣. ٢ البناء الضوئي Photosynthesis

البناء الضوئي هي العملية التي يقوم فيه النبات باستخدام الكربون والماء في وجود الضوء لتوفير مايلزمه من غذاء. تقل أو تنعدم كفاءة النباتات النامية علي بيئة مغذية في القيام بعملية البناء الضوئي وذلك بسبب توفر الكربوهيدرات في صورة سكروز وكذا لعدم توفر الأضاءة أو التبادل الغازي اللازم للقيام بعملية التمثيل

الضوئي. بهذا فان كفاءة النباتات علي المعيشة في ظروف الحقل أو الصوبة تعتمد علي مقدرتها علي التحول من الأعتماد الكلي علي البيئة المغذية الى الأعتماد علي عملية التمثيل الضوئي وتوفير الغذاء اللازم لاستمرار نموها. في تجارب عديدة علي كفاءة استخدام غاز ثاني اكسيد الكربون من الجو المحيط بالنباتات المنزرعه في بيئة صناعية، وجد ان النباتات لا تستهلك غاز ثاني اكسيد الكربون .. هذا يشير الي اعتماد النباتات كلياً علي الكربوهيدرات المضافة الي البيئة المغذية Grout & Aston (1978). ولقد وجد أيضاً أن الأوراق المتكونة علي بعض الأنواع النباتية خلال مرحلة الزراعة في بيئة مغذية صناعية ليست لها المقدرة علي القيام بعملية التمثيل الضوئي وذلك كما في نباتات الفراوله والقرنبيط Grout & Millan (1985) عموماً فان هذه لا تعتبر قاعدة عامة حيث وجد أن هناك بعض النباتات التي يمكنها تعديل مقدرتها علي التمثيل الضوئي أثناء عملية الأقلمة .. نتيجة لهذا التفاوت بين الأنواع النباتية فلقد اجري تقسيم النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة الي مجموعتين وذلك تبعاً للقدرة علي القيام بعملية البناء الضوئي Grout (1988) .. تضم المجموعة الأولي النباتات التي ليست لأوراقها المتكونة علي بيئة مغذية تحتوي سكروز المقدره علي القيام بعملية التمثيل الضوئي، كما أنها لا تكتسب هذه المقدرة عند النقل الي بيئة خالية من السكروز .. تقوم الأوراق المتكونة بامداد الأوراق الجديدة بالكربوهيدرات اللازمه وفي النهاية تتدهور وتفقد حيويتها. أما المجموعة الثانية تضم النباتات التي يمكن لأوراقها الناتجة من الزراعة علي بيئة مغذية تحتوي سكروز من التحول الي الأعتماد علي التمثيل الضوئي في توفير احتياجاتها من الكربوهيدرات.

٣. ٣ طرق الأقلمة Methods for acclimatization

كما أشرنا سابقاً ونظراً للصفات التشريحية والفسيولوجية للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية، والتي لا تؤهلها للمعيشة في ظروف الصوبة أو الحقل .. تجري عملية الأقلمة التي تتركز أساساً علي الخفض التدريجي لنسبة الرطوبة وزيادة معدلات الضوء وتشجيع النباتات علي القيام بالتمثيل الضوئي. ويمكن اجراء عملية الأقلمة للنباتات وهي مازالت نامية علي بيئة مغذية وذلك بواسطة تقليل نسبة الرطوبه في الجو المحيط .. هذا ينشط تكوين الطبقة الشمعية وبذلك يقل معدل فقد الماء من النباتات عند النقل الي الحقل .. وتجري هذه الطريقة بواسطة استخدام بعض المواد التي يمكن ان تمتص الرطوبة أو بواسطة خفض درجة حرارة التحضين Wardle el al. (1979), Maene & Debergh (1987) من الطرق الشائعة والسائد استخدامها في أقلمة النباتات ازالة غطاء اناء الزراعة لعدة ساعات يومياً وهذه الفترة تزداد تدريجياً حتي يمكن ازالة الغطاء تماماً لعدة ايام قبل نقل النباتات الي الحقل .. ولقد لوحظ زيادة سمك الطبقة الشمعية نتيجة لهذه المعاملة.

عموماً فان هناك بعض القواعد العامة التي يجب أن تتبع عند نقل النباتات حيث يراعي أن تغسل الجذور جيداً في ماء نظيف وذلك بهدف التخلص من بقايا البيئة المغذية التي تحتوي سكروز يعتبر بدوره مصدر لنمو وتكاثر الكائنات الدقيقة بالتربة ومهاجمة الجذر والقضاء علي النباتات .. ويفضل بعض الباحثين غسل النباتات بمحلول يحتوي مطهر فطري لتلافي أى مخاطرة من مهاجمة الفطريات للنبات المنقول الي تربة الزراعة.

وعلي النطاق التجاري يتم نقل النباتات الي التربة وتوضع في صوبة بلاستيكية يحافظ فيها علي توفير نسبة رطوبة مرتفعة بواسطة استخدام أجهزة الرش الرزازي

.. غير أن هذه الطريقة قد تعمل علي زيادة الرطوبة في التربة التي ينمو فيها النبات، كما أنها قد توفر الظروف الملائمة لنمو الفطريات والبكتريا والطحالب التي تهاجم النباتات وتقضي عليها في مراحل نموها المبكره. نظراً لعيوب هذه الطريقة تستبدل أجهزة الرش الرزازي بأجهزة الرش الضبابي التي أثبتت كفاءه عالية في نجاح عملية الأقلمة .. يجري تشغيل هذه الأجهزة علي فترات زمنية تتباعد تدريجياً حتي تتم عملية الأقلمة وعندها تنقل النباتات الي الحقل، وقد يلجأ البعض الي تعديل معدل النتح في النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة بالرش بمحلول جلسريد أو أندول بيوتريك آسيد، غير أن هذه الطريقة غير شائعة الأستعمال.

ومن الأمور الهامة التي يجب أن تراعي تعريض النباتات تدريجياً الي كثافة ضوئية مرتفعة حتي تصل في النهاية الي الكثافة الضوئية التي تعادل مثيلتها بالحقل الذي تنقل إليه النباتات .. ولقد وجد أن التعرض المباشر والغير متدرج لكثافة ضوئية مرتفعة تؤدي الي الحاق أضرار بالغة بالكلوروفيل وبالتالي عدم مقدرة النباتات علي القيام بعملية التمثيل الضوئي. في النهاية فانه يمكن القول أن طرق الأقلمة وكيفية اجراء الأقلمة للنباتات تختلف تبعاً للنوع النباتي المستخدم، لهذا فانه يجب أن يحدد أنسب طريقة لأقلمة النوع النباتي تحت الدراسة، وهذا يتأتي بالدراسة والتجربة والملاحظة للحصول علي نسبة مرتفعة من النباتات التي تنقل بنجاح الي ظروف الحقل.

١٤

تطبيقات معملية

Laboratorial practice

كثيراً ما يواجه العاملين في مجال زراعة الأنسجة النباتية بعض العقبات التي تؤثر علي لجاح العمل سواء البحثي أو للأنتاج التجاري .. ولما كان من الهام اتباع الأرشادات العامه التي يجب أن تراعي في سلوك العمل اليومي، فانا هنا نقدم من خلال الخبره الشخصية الناتجة من العمل للعديد من السنوات في معامل زراعة الأنسجة بعض الأرشادات العامه. نحاول أيضاً أن نعرض في شكل مبسط اجابات لبعض الأسئلة التي تواجه العاملين وتدور بخاطرهم أثناء اجراء التجارب المعملية ويحتاجون فيها الي اجابة فورية حتي يمكنهم مواصلة العمل بلا توقف .. لهذا فانا ننصح المهتمين بهذا المجال والعاملون في المعامل سواء البحثية أو التجارية من الأطلاع بدقه علي هذا الفصل من الكتاب والذي قد يتم الرجوع اليه أكثر من مره لاستبيان اجابة لسؤال قد يطرأ أثناء العمل.

١. تطبيقات معملية — Laboratorial practice

١. ١ التطهير السطحي — Surface disinfectin

تنحصر مصادر المنفصل النباتي في ثلاث مصادر طبقاً لطريقة زراعة النبات

- منفصل نباتي مأخوذ من نبات منزرع في التربة أو الحقل، هذه النوعية من

المصادر تمثل أعلي درجة من التلوث وذلك نتيجة وجودها في البيئة الطبيعية المثلة في التربة والماء والهواء .. وهذه يستلزم غسلها عدة مرات بماء جاري ثم تعقم سطحياً بمحلول مطهر مثل هيبوكلوريت الصوديوم أو الكلوراكس بتركيز ٢٥ر٥٪صوديوم هيبوكلوريت .. تغمر الأعضاء النباتية أو الجزء النباتي مده تتراوح بين ٥ دقائق الي ٢٠دقيقة أو أكثر طبقاً لنوعية الجزء النباتي. فاذا كانت بذور ذات قصرة صلبة مثل الحنظل والبرسيم فانها تحتاج الي حوالي عشرون دقيقة، أما الأجزاء النباتية الغضة مثل البادرات الناتجة من الأنبات فانه يجري تعقيمها لمدة ١٠-١٥ دقيقة ثم غسيلها بماء مقطر معقم عدة مرات.

- منفصل نباتي مأخوذ من بذور مستنبتة في ظروف معقمة، وهذه يمكن الحصول عليها بتعقيم السطح الخارجي للبذرة كما سبق، ثم غسيلها عدة مرات بماء مقطر معقم داخل كأس معقم أو طبق بتري .. ولزيادة الغمر فانه تغطي البذور أثناء التعقيم السطحي بورق قابل للتشرب، ثم تغسل بعد هذا كما سبق شرحه بالماء المقطر والمعقم وتزرع علي بيئة تحتوي ماء وآجار بنسبة ٨ر٪، وتحضن علي درجة الحرارة المناسبة للإنبات في الظلام .. وهذه الطريقة هي أفضل الطرق لتفادي التلوث.

- المصدر الثالث يتمثل في استخدام أجزاء نباتية من أشجار خشبية، حيث يكون التعقيم السطحي عديم الفاعلية ويرجع هذا إلي التلوث بالبكتريا الذي يكون سائداً في تعرجات الساق .. اذا استخدمت محاليل التعقيم السطحي مثل الكلوراكس بتركيزات مرتفعة ولفترة طويلة فانها قد تسبب تدمير النسيج النباتي .. ولما كانت المضادات الحيوية أكثر فاعلية ضد البكتريا السالبة والموجبة لجرام، فلقد وجد الباحثون أن أهم المجاميع الكيماوية الفعالة من المضادات الحيوية تنحصر

مـا بين Aminoglycoside ومنهـا الستربتومايسين و نيومايسين وجنتامايسين والفانكومايسين التي تمنع تخليق البروتين في خلايا البكتريا .. أما المجموعة الثانية فهي تتبع Quinone ومنها تتراسيكلين ومايتومايسين الذي يعمل علي وقف نمو البكتريا بطريقة بيولوجية اخري، أما المجموعة الثالثة فهي تتبع مجموعة Lactone ومنها اريثرومايسين الذي يمنع تكوين البروتين بالخلايا ونجد أن المضاد الحيوي Rifampicin يمنع عمليات النسخ .. وأخيراً المجموعة Peptid فانها تؤثر علي وظيفة الأغشية البلازمية ومنها مركب بولي مكسين وكذلك المضاد الحيوي بنسلين فانه يمنع تكوين جدار الخلية المنقسمة في البكتريا ويسبب موتها، ولهذا اجري اعداد عدة مخاليط من هذه الأنواع من المضادات الحيوية واستخدمت في مزارع الخلايا والأنسجة منها

1- 100 mg/L Cefatomine, 100 mg/L Tetracyclin, 25 mg/L Rafampcin and 25 mg/L Polymyxin

2- 25 mg/L Cefatomine, 25 mg/L Tetracyclin, 6 mg/L Rafampcin and 6 mg/L Polymyxin

وتستخدم المجموعة الأولي مع الأجزاء النباتية، وذلك باضافتها الي بيئة سائلة مع الرج لمدة تتراوح بين ٢٤ ساعة الي ٥ أيام .. وقد تطال فترة المعاملة الي عشرة أيام اذا كانت البيئة المغذية صلبة وذلك حتي ينتقل المضاد الحيوي الي داخل الجزء النباتي. ولقد وجد أن جميع المضادات الحيوية تذوب في الماء ماعدا Rifampicin الذي يجب أن يذاب في قطرات قليلة من (Dimethyl sulfoxide (DEMSO وتضاف المضادات الحيوية بعد تعقيمها بواسطة الفلتر إلي البيئة السائلة أو الصلبة علي حرارة حوالي ٤٠ درجة مئوية. واذا اضيفت في بيئة سائلة فانه يوضع الجزء

النباتي في البيئة مع المضاد الحيوي علي جهاز هزاز يضبط علي سرعة ٥٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ أيام .. عموماً فلقد وجد أن المجموعة الثانية أكثر فاعلية من المجموعة الأولي غير انه إذا لوحظ أي أثر سام للمضادات الحيويه المستعملة فانه يفضل ازالة Polymyxin من المخلوط وتقلل مدة التعريض .. ويمكن أن يستخدم المضاد الحيوي لمدة تصل الي حوالي ثلاثة شهور Yaung et al. (1983) وقد استخدمت بعض المعامل خليط آخر من المضادات الحيوية وهو محضر من المضادات الحيوية Carbeillinycin (1g/L) أو من Gentamycin (1g/L) واضافته الي المضاد الفطري Mystatin .. تستخدم المبيدات الفطرية بكثرة في معامل زراعة الأنسجة التي تتعامل مع تكاثر نباتات الموز والبطاطس بهدف انتاج نباتات بطريقة الاكثار السريع Rapid colonal propagation .. توضع كورمة الموز في محلول مبيد فطري مخفف طبقاً لارشادات وزارة الزراعة الخاصة بكتاب المكافحة لمعرفة نوع الفطر والمبيد والتركيز الذي يجب استخدامه، ثم يغسل عدة مرات ثم يعقم السطح الخارجي وتغسل عدة مرات بماء مقطر معقم ويستخدم أيضاً خليط جديد للتعقيم السطحي وهو عباره عن محلولكون من مطهر بنسبة ٢٠٪ ويضاف اليه ١ر٪ من Sodium Dedosyl Sulphate (SDS) لمدة ٥ دقائق ثم يغسل بماء مقطر معقم خمسة مرات لازالة آثار مادة SDS. يستخدم SDS لزيادة التوتر السطحي لإزالة أي ملوثات عالقة بالعضو النباتي بدلا من Tween أو غيره، ويمكن غمس الجزء النباتي المعقم سطحياً في كحول مطلق ١٠٠٪ لعدة ثواني، ثم يغسل عدة مرات بماء مقطر معقم. يفضل أن تقطع الأجزاء الملامسة للمحلول الذي يستخدم في التعقيم عند زراعتها بطول ١-٢مللي من كل الجوانب لانها تصبح متأثرة بسمية المادة المطهره المستخدمة .. كما أنه يفضل ألا تقل الأجزاء المنزرعة علي البيئات المغذية من ساق أو خلافه عن ١سم أو أكثر.

١. ٢ الزجاجيات Glasswares

لابد أن يكون نوع الزجاج الذي يحفظ به المحاليل الكيميائية مصنوع من الزجاج البيركس خالي من الصوديوم ويتحمل الحفظ والتخزين تحت درجة التجمد .. واذا كانت الزجاجيات ذات أغطية زجاجية فيجب أن تكون مصنفره أو يوضع جزء من ورقة بين الغطاء وفوهة الزجاجة حتي لا يلتصق الغطاء بفوهة الزجاجة، وقد يكتب عليها كل البيانات الخاصة بالمحلول بداخل الزجاجة. ويراعي أن تملأ الزجاجيات بحوالي ٦٠-٧٠٪ فقط من حجمها بالمحاليل المختلفة أو البيئة المغذية وذلك حتي لا تنفجر اذا ملئت بالكامل نظراً لأزدياد حجم الماء عند درجة التجمد وتوضع في الفريزر ويفضل عندئذ استخدام زجاجيات بلاستيكية .. وقد يستخدم بعض الزجاج الداكن حيث أن بعض المركبات تتأثر بالضوء. ويراعي أن تستخدم الأقلام التي لايذاب حبرها في الماء ويذاب حبرها في مذيب عضوي حتي لاتفقد الكتابة .. كما يفضل أن يكتب علي غطاء الألومونيوم وذلك تدعيماً للبيانات.

١. ٣ الكيماويات Chemicals

كما اشرنا من قبل في فصل سابق فانه لابد من استخدام كيماويات ذات نقاوه عالية مدون عليها نسبة الشوائب حتي يمكن أخذ هذا في الأعتبار فيما بعد .. بعض هذه الكيماويات يذوب في الماء مثل العناصر الكبري والصغري وهذه تعقم بالحرارة. أما الفيتامينات فبعضها يذوب في الماء وعلي سبيل المثال حمض النيكوتين والثيامين والبيرودوكسين والميو اينو سيتول، وبعضها الآخر يذوب بالتسخين الخفيف ثم يعقم بالامرار خلال فلتر .. أما الهرمونات النباتية فتضاف علي هيئة ٥٠ملليجرام من الهرمون مضافة الي ٩٧مللي ماء والي ٣مللي هيدروكسيد البوتاسيوم ..

ويمكن أن يذاب 2,4-D في حجم قليل من الكحول بتركيز ٧٠٪ أو كحول مطلق، ويضاف كل هرمون في الحجم السابق كل علي حدة ويعقم بواسطة الفلتر.
يتجنب ترسيب كل من الفوسفات خاصة مع عناصر الكالسيوم والماغنسيوم والحديد وذلك بعمل تركيزات منفصلة من كل منهم قبل خلطها معا .. يجب أن تحتوي طريقة تحضير العينة علي تفاصيل خاصة بطريقة التعقيم وطريقة التخزين وتركيز ايون الأيدروجين النهائي وتركيز المحاليل وأسماء العاملين الذين قاموا بالتحضير وتاريخ تحضير العينه. كما يراعي أن تشتري الكيماويات بعبوات صغيرة حتي لاتفقد ولاتتلف .. فمثلا اذا أردت شراء ١كيلو من مادة ما فانه يفضل أن تشتري أربع عبوات كل منها ربع كيلو بدلاً من شراء ١ كيلو في عبوه واحدة .. فاذا فتحت زجاجة لا تفسد الأخري. ويراعي أن يكون الوزن بواسطة ملعقة وزن Spatula وهذه الاخيرة يجب أن تكون نظيفة جافة .. تذاب الأملاح أولاً في حجم من الماء مقداره حوالي ٨٠٠مللي في كأس سعة ١ لتر، بعد اذابة الأملاح واحدا بعد الآخر تضاف الفيتامينات والهرمونات ويستخدم في هذا ماصات دقيقة الحجم ثم يكمل الحجم النهائي الي ١لتر ويضبط درجة تركيز ايون الهيدروجين.

١. ٤ نوع الآجار Type of agar

لايفضل أن يستعمل الآجار المستخدم في تحضير البيئات الخاصة بالبكتريا والفطريات وذلك نظراً لعدم جودته ولوجود مواد معيقة لنمو خلايا النبات، حيث أنه يحتوي علي نسبة عالية من المعادن الثقيلة .. بالاضافة الي أنه يوجد به بقايا من الصودا الكاويه نتيجة غسله أثناء تصنيعه. ومن التجربة وجد أن أجود انواع الآجار المستخدم Agar-glo او Phyto-agar ويستخدم بنسب تتراوح بين ٨ر٪ الي

١ر ٪ في البيئات الصلبة وقد يستخدم آجار Bactro اذا دعت الضـرورة. ومن المواصفات الأساسية للآجار المستخدم في مزارع الأنسجة النباتية خاصه عند عمل البيئات الشبه صلبة أن يكون درجة تصلبة أقل من ٤٠ درجة مئوية .. ولهذا فان هناك شركات استحدثت بعض المشابهات للآجار مثل Phytoagar, Plantagar بعض الشركات تستخدم النشا بدلا من الآجار في حالة اكثار نباتات الزينه والنباتات الخشبية والفاكهه وذلك لتقليل التكلفة، وذلك نظراً لارتفاع ثمن الآجار مقارنة بالنشا فتقل التكلفة وينخفض سعر المنتج. في حالة عمل بيئة صلبة يضاف الآجار الي البيئة بعد ضبط تركيز ايون الأيدروجين ويسخن ويقلب بمقلب مغناطيسي حتي يتم ذوبانه كاملاً ويصب في الحاويات .. فاذا كانت حاويات جربر سعة ١٠٠ مللي فانه يضاف ٢٠ مللي تقريباً في كل منها، وهذه تغطي بورق الألومونيوم بغطاء مضاعف وتعقم .. يراعي أن يكون سطح البيئة مائل حتي تتجمع قطرات المياه المكثفة علي البيئة في الجزء السفلي من سطح البيئة وبعيداً عن الانسجة النباتية المنزرعة. ويجب ألا تستخدم أغطية الألومونيوم مرة اخري لأنها تتأثر بالتعقيم .. وحتي وقتنا هذا فان معظم الأغطية البلاستيك تتحمل التعقيم مرتين أوثلاثة، ثم تتلف ومعه تزداد نسبة التلوث. أيضاً يجب أن يراعي تبادل الغازات بين الهواء الخارجي والنسيج المنزرع .. نظراً لأن مزارع الخلايا والأنسجة لها خاصية مختلفة عن مزارع البكتريا حيث أنها تمكث في حاويات مدة شهر تقريباً، فلابد من حدوث تبادل غازي بما لايسمح بدخول هواء ملوث داخل الحاويات ويلوث المزارع .. وهذا مأخوذ في الأعتبار في أنابيب زراعة الأنسجة ذات المواصفات الجيدة حيث توجد حافه للأنبوبة، كما أن الغطاء به مسافة تسمح بدخول الهواء دون تلوث.

١. ٥ ضبط تركيز ايون الايدروجين والمحافظة علي الالكترود

PH adjustment and electrode maintenance

يجب أن يترك الجهاز لمدة ١٥ دقيقة علي حرارة الغرفة قبل استخدامه، ويجب أن يستخدم محلول pH buffer المعاير، و هذا يشتري من الشركات في صورة محلول جاهز للأستعمال أو أقراص تذاب لتعطي محاليل ذات تركيز ايون الايدروجين ٤ ، ٧ ، ٩ ، ١١ وهذه تذاب في ١٠٠ مللي ويحفظ في الثلاجة للأستخدام .. كما يحافظ علي الالكترود بوضعه في محلول 0.2 NHCl ويراعى أن يغسل بالماء المقطر في كل مرة بعد الاستخدام .. يقاس درجة تركيز ايون الايدروجين مرة عند ٤ ثم ٩ ثم ٧ وذلك للتأكد من دقة القياس ويجري القياس بعد ضبط درجة حرارة الجهاز مع درجة حرارة الغرفة والبيئة مع التقليب المستمر للبيئة بمقلب مغناطيسي.

١. ٦ الحضانات والاضاءه	Incubators and lighteining

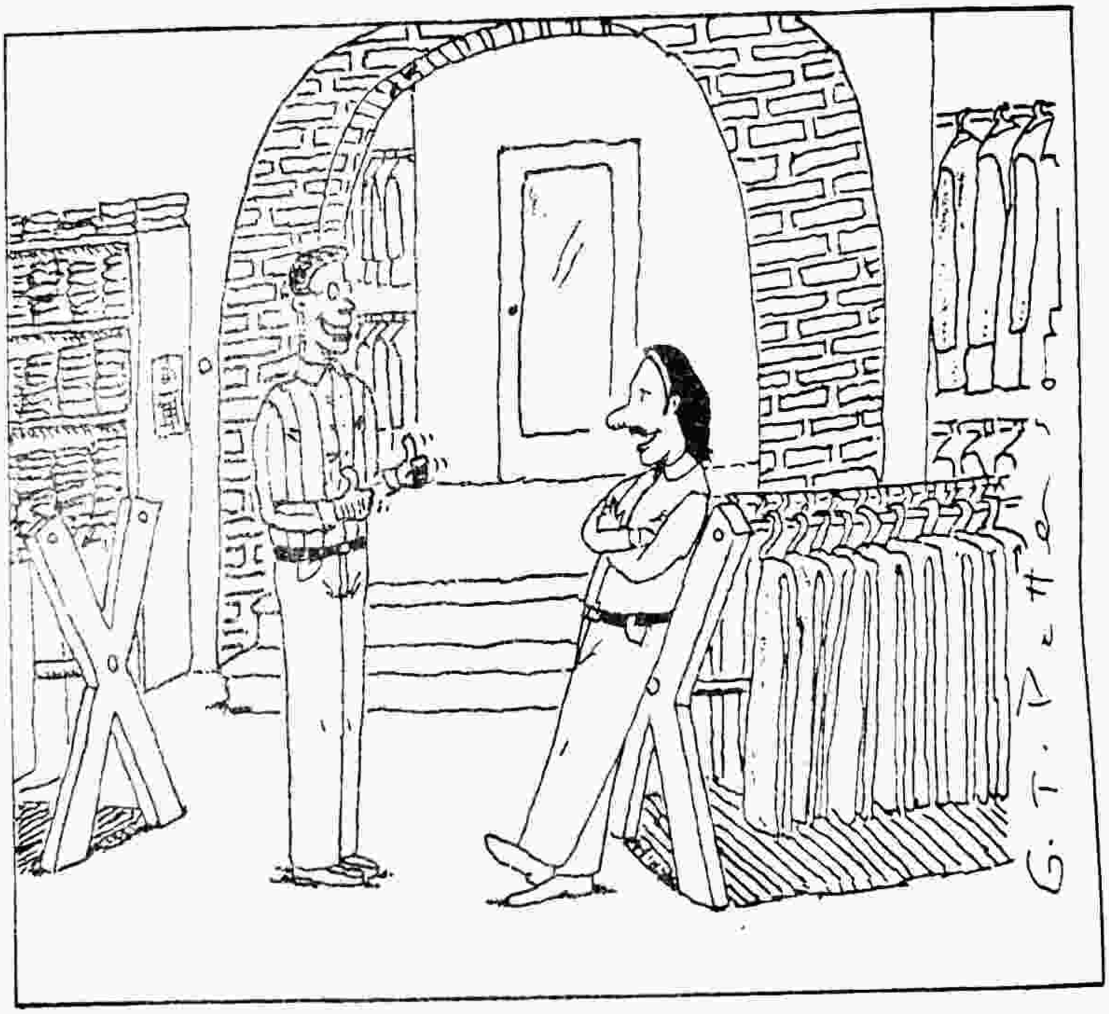
يجب أن تستخدم حضانات تبريد وتسخين تعمل بأستخدام ثاني أكسيد الكربون بدلاً من الماء الساخن أو الهواء الساخن. بعض الحضانات المستخدمه للتسخين لاتعمل في الصيف ويمكن شراء حجرة خاصه للنمو Growth chamber وهي غالية الثمن حيث أنها مزوده بأضاءة، ويمكن التحكم في شدة ومدة الاضاءة وكذا الحرارة .. هذا النوع مكلف ولهذا يمكن أن تستخدم أجهزة تكييف لتبريد وتسخين غرفه حجمها ٢متر مربع وبالتالي تقل التكلفه .. ولهذا يجب أن يفاضل بين الانواع الموجودة ومدي تحملها للتشغيل المستمر وعموماً يفضل استخدام أجهزة تكييف قوتها ٣حصان أو أكثر للتشغيل المتواصل . لتوفير درجة وفترة الاضاءه المناسبة

بداخل غرفة التحضين تستخدم بعض اللمبات التي يصل طولها الي ٦٠ سم وهذه توضع علي حوامل معدنية أو ارفف مع مراعاه وضع أجهزة التحكم خارج غرفة التحضين حتي لا تسبب ارتفاع الحرارة وكذلك لتلافي أي ماس كهربائي .. ويوجد لمبات خاصه تسمي Cool white lamp وهي لمبات لا ينتج عنها حرارة عالية .. وأحياناً يستخدم لمبات فلورسنتية ذات ألوان وهي متوفرة بكثرة، ويمكن التحكم في فترة الأضاءه بواسطة استخدام جهاز توقيت يضبط ليوفر عدد محدود من ساعات الأضاءه/الإظلام ويجب أن تقاس شدة الاضاءة وفترة الاضاءة بداخل غرفة التحضين علي فترات زمنية متعاقبة ومنتظمة للتأكد من عدم حدوث خلل قد ينتج عنه فقدان الزراعة الموجودة بداخل غرفة التحضير.

١. ٧ التلون البني Browning

يحدث هذا نتيجة الجروح أو أثناء تقطيع الأجزاء النباتية من الساق أو الورقة أو الجذر أو الثمرة أو البذرة أو حتي أجزاء الزهره لبعض العائلات النباتية مثل العائلة البقولية .. يتحول النسيج الي اللون البني الغامق أو الاسود ويموت النسيج الملامس لسطح البيئة .. وقد اجريت تجارب عديدة لمنع عمليات التحول الي اللون البني وذلك بغسل الأجزاء النباتية المراد زراعتها قبل أو بعد تقطيعها في محلول يحتوي ١٥٠ مللجرام من كل من حمض الستريك وحمض الاسكوربيك أو توضع لفترة زمنية محدودة مادة Polyvinylpyrolidone (PVP) بنسبة ٥ر٪ في البيئة ثم تعقم، وقد وجد أن الاظلام يقلل نسبة التلون باللون البني وأن الأضاءه تزيد من هذه الظاهرة .. وكذلك وجد أن إضافة نسبة من ملح الطعام الي البيئة المغذية تعمل علي خروج المواد المسببة للتلون من النسيج وتراكمها في البيئة التي تتحول الي اللون البني أواللون الأسود بدلاً من وجودها في النسيج المنزرع.

«حول حديث الجينات الوراثية النباتية»



HI, ZAK! BOTANY GENES LATELY?

إهداء الصديق Glen Petterson كندا

[library stamp]

١٥

التحليل الكمى على تجارب زراعة الأنسجة
Quantitative analysis on tissue-cultural experiments

١ مقدمة Introduction

يعبر عن النتائج المتحصل عليها من تجارب زراعة الأنسجة بواسطة التقديرات الكميه أو القياسات النوعيه ويعبر عن نمو الزراعة في فترة زمنية محددة سواء كالس أو خلايا منفصلة بواسطة الزيادة في عدد الخلايا، الزيادة في الحجم أو الوزن، التغير في المحتوي الكيميائي، التركيب الخلوي. هناك عديد من القياسات التي قد تستخدم في تقدير معدلات النمو غير أنه في هذا الجزء من الكتاب سوف نتناول القواعد الأساسية التي قد تستخدم لقياس معدل نمو الجذور، الكالس، الخلايا المعلقة ويمكن قياس الزيادة في طول الجذور المنزرعة علي بيئة مغذية علي فترات زمنية مختلفة بواسطة استخدام مسطره مدرجة توضع أسفل الدورق الذي يحتوي جذور نباتية ناميه في بيئة مغذية .. بذلك نتجنب تعريض الزراعة للتلوث. نظراً لأنه لايحدث تغليظ ثانوي في الجذور المنزرعة علي بيئة مغذية تظل مساحة القطاع العرضي ثابتة خلال فترة النمو ولهذا فان الزيادة في الطول تمثل قياس دقيق للتغير في الحجم أثناء النمو .. بالرغم من أن هذه الطريقة تهمل الجذور الثانويه التي تتكون أثناء الزراعة غير أن الخطأ الذي قد يحدث نتيجة لهذا في خلال فترة زمنية مقدارها سبعة أيام يعتبر ضئيل جداً ولايزيد

عن١٪. من الشائع استخدام قياس الوزن الطازج في تحديد معدل نمو الكالس علي بيئة مغذية، ويجبْ أن يشار هنا أنه لا يجوز استخدام نفس القيم المتحصل عليها في تقدير عدد الخلايا أو معدل انقسام الخلايا .. عادة مايكون الكالس المتكون محتوياً علي مراكز نشطه تنقسم فيها الخلايا بمعدلات سريعه، كما أنه يحتوي علي مناطق تحتوي خلايا ذات معدلات منخفضة من التمثيل الحيوي. يعتبر استخدام قياس الوزن الطازج للكالس طريقة سهلة للتعرف علي الزيادة في كتلة النسيج، كما يمكن متابعة الزيادة في وزن الكالس علي فترات زمنية مختلفة غير أنه يجب أن يراعي الحفاظ علي الكالس من التلوث ويجري هذا القياس تحت ظروف معقمة. يستخدم الوزن الجاف للكالس لتقدير النشاط الحيوي للخلايا المنزرعة علي بيئة مغذية، وعموما فانه هناك علاقة متوازية بين الوزن الطازج والوزن الجاف .. الزيادة في الوزن الجاف خلال وحدة زمنية محددة يعبر عنها بالفرق بين الوزن الجاف للكالس مقاساً عند نهاية التجربة والوزن الجاف للجزء النباتي مقاساً عند بداية التجربة، من البديهي معرفه أن الوزن الجاف للجزء النباتي عند بداية التجربة لايشير الي الجزء النباتي المنزرع فعلاً علي بيئة مغذية ويتحصل عليه من حساب متوسط الوزن الجاف لعدة أجزاء نباتية لها نفس أبعاد الجزء النباتي المنزرع فعلاً علي البيئة المغذية. يجب أن يستمر تجفيف العينة حتي يتحصل علي قيمه ثابتة خلال وزنتين متتاليتين، ويجب أن يراعي عدم اطالة فترة التجفيف حيث أنها تسبب تغيرات في النسيج وهذه بدورها تؤدي الي عدم الدقة في قياس الوزن الجاف .. ويمكن قياس الوزن الجاف في معلقات الخلايا بواسطة جمع الخلايا علي فلتر من النايلون المعلوم الوزن ثم التجفيف والوزن، عادة ينسب الوزن الطازج والوزن الجاف في الخلايا المعلقة الي السنتيمتر المكعب للبيئة المغذية المستخدمة. هناك طريقة

اخري تستخدم في زراعة الخلايا المعلقة فيها يقاس الحجم الأجمالي للخلايا في حجم معين من البيئة المغذية وذلك بواسطة استخدام جهاز الطرد المركزي لتجميع الخلايا معاً في القاع ويطلق علي هذا القياس مصطلح حجم الخلايا المتجمعة.

تستخدم في هذه الطريقة انبوبة جهاز طرد مركزي مدرجة حيث يمكن قياس حجم الخلايا النهائي وهي متجمعة في قاع الأنبوبة .. يستعمل لهذا أنبوبة معده خصيصاً لهذا الغرض تسع عينة حجمها ٤-٧سم وهي مقسمة الي وحدات مقدار كل منها ١ميكروليتر بقياس نهائي مقداره ٥٠ميكروميتر ويمكن تقدير حجم الخلايا المتجمعة بدقة مقدارها ١ر ميكروليتر. تختلف الظروف والسرعة التي تستخدم في الطرد المركزي تبعاً لنوع الخلايا المنزرعة، تستخدم سرعة مقدارها ...٢ لفة/دقيقة وذلك لمدة ٥دقائق في معلق الخلايا المنزرعة، غير أنه في بعض الحالات قد تستخدم سرعة مقدارها ١٥٠٠لفة/دقيقة وذلك لمدة ٣٠دقيقة بهدف الحصول علي قيمة ثابتة لحجم الخلايا المتجمعة لنفس النوع النباتي. يمكن الحصول علي الظروف المثلي التي تستخدم في هذا القياس بواسطة وضع العينة في جهاز الطرد المركزي لفترة زمنية وقياس حجم الخلايا المتجمعة، ثم توضع الأنبوبة مرة اخري في جهاز الطرد المركزي ويقاس الحجم مرة اخري .. تحت الظروف المثلي فانه يجب أن تكون القراءتين المتاليتين متساويتين، ويرجع الخطأ في تحديد حجم الخلايا المتجمعة في عينة ما الي

- الخطأ في تجهيز العينة من الخلايا المعلقة.
- عدم وضع العينة لفترة كافية في جهاز الطرد المركزي.
- التأخير في قياس حجم الخلايا المتجمعة الذي يرجع الي انتشار الخلايا في المعلق مرة اخري.

تعتبر الزيادة في عدد الخلايا المنزرعة مؤشرا هاماً للنمو، يعبر عن عدد الخلايا في زراعات الخلايا المعلقة اما بواسطة كثافة الخلايا أو تركيزها في السنتيمتر المكعب من البيئة المغذية .. غير أن فصل الخلايا عن بعضها البعض لتسهيل التعرف علي عدد الخلايا في العينة يعتبر من أهم الصعوبات التي تواجه هذه الطريق، هناك طريقة اخري تستخدم لفصل الخلايا عن بعضها البعض وفيها يستخدم مادة الكروميوم منفرده أو مخلوطة مع حمض الأيدوكلوريك، غير أنه يجب الحرص عند استخدام هذه الطريقة حيث أن اطالة فترة تعريض الخلايا لهذه المواد قد تسبب فقدها.

بعد أن تتم المعاملة بأحد هذه المواد لفصل الخلايا عن بعضها البعض تؤخذ عينة معلومة الحجم من الزراعة وتوضع علي شريحة الهيموسيتومتر ويجري عد الخلايا في هذه العينة بواسطة ميكروسكوب ضوئي .. يؤخذ متوسط ١٠ قراءات لتمثل عدد الخلايا في العينة ويحسب علي أساسها عدد الخلايا/سم.

يقاس الأنقسام الميتوزي الذي يمثل نسبة الخلايا المنقسمة في خلال فترة زمنية محددة، هذه النسبة تصل الي ٣-٥٪ في الخلايا التي تنمو سريعاً .. بالرغم من أن قياس الانقسام الخلوي الميتوزي في خلال فترة زمنية محددة يعتبر مفيداً في دراسة معدل نمو الخلايا غير أنه هناك العديد من العوامل التي تؤثر علي انقسام الخلايا الميتوزي، من أهم هذه العوامل الفترة الزمنية المطلوبة التي يتم فيها اكتمال الدورة الخلوية، فترة الأنقسام الميتوزي، نسبة الخلايا التي فقدت الحيوية ونسبة الخلايا التي لم تدخل في الدورة الخلوية بعد، درجة تفاوت الخلايا في الأنقسام المتزامن. ونظراً لأنه هناك عوامل عديدة تؤثر علي دقة هذا القياس فانه لايعتبر هذا القياس معبراً دقيقاً لنمو الخلايا في بيئة مغذية، ولذا يفضل أن تجمع عدة قياسات معاً لتعطي صورة كاملة ودقيقة عن نشاط الخلايا.

٢ تقدير الوزن الطازج Measurement of fresh weight

تستخدم أنسجة نباتية لتكوين الكالس من أحد النباتات، وينصح باستخدام نفس النباتات في التقدير الأول والثاني حيث يجري تقدير الوزن الطازج للعينة فانه يقدر الوزن الجاف لنفس العينة بعد تجفيفها .. يجري اعداد حوالي ٣٠ قطعة من النسيج النباتي حيث تؤخذ ٣ عينات علي فترات زمنية مختلفة كل عينة تحتوي ١٠ قطع منزرعة علي بيئة مغذية. يجري اعداد حوالي ١٠-١٥ جزء نباتي ذات أبعاد متشابهه تماماً للأجزاء النباتية المنزرعة علي بيئة مغذية، ليس من الضروري المحافظة علي هذه الأجزاء النباتية تحت ظروف معقمة. بعد أن تغمر الاجزاء النباتية في ماء مقطر توضع علي ورقة ترشيح في طبق بتري للتخلص من الماء الزائد، ويراعي أن يغطي الطبق حتي لايفقد مزيد من الماء. يوضع الجزء النباتي علي ورقة ألومونيوم معلومة الوزن ثم توزن العينة في ميزان حساس وتؤخذ القراءه لأقرب ١ر.ملليجرام، يجري حساب وزن العينات منفصله ثم يحسب المتوسط النهائي الذي يمثل الوزن الطازج للجزء النباتي الغير منزرع، يوزن ١٠ قطع من أجزاء نباتية بدأت في تكوين الكالس علي فترات زمنية مختلفة ٧ ، ١٤ ، ٢١ يوماً من الزراعة .. تنقل عينة الكالس من البيئة المغذية الي طبق بتري يحتوي علي ورق ترشيح للتخلص من الماء الزائد، ويراعي التخلص من بقايا الآجار التي قد تعلق بالعينة وتسبب خطأ في التقديرات .. يجري وزن الأجزاء النباتية التي تكون كالس كل منفصله عن الأخري باستخدام ورق الألومونيوم المعلوم الوزن، يحسب الوزن النهائي للعينات ومنها يحسب متوسط وزن العينات التي تجمع علي فترات مختلفة، يطرح الوزن الطازج للعينة الغير منزرعة من الوزن الطازج للعينة المنزرعة لكل فترة زمنية مختلفة وبذلك ينتج الوزن الطازج للكالس المتكون علي الجزء النباتي المنزرع.

٣ تقدير الوزن الجاف Measurement of dry weight

يمكن استخدام الأجزاء النباتية السابق استخدامها لتقدير الوزن الطازج للحصول علي قيم الوزن الجاف .. وفي حالة الحاجة الي اجراء زراعة خاصه فانه براعي استخدام نفس النوع النباتي ونفس البيئة المغذية التي استخدمت في تقدير الوزن الطازج وبذلك يمكن اجراء مقارنة بين الوزن الطازج المتحصل عليه سابقا وبين الوزن الجاف المتحصل عليه هنا. تؤخذ عينة علي فترات مختلفة ٧، ١٤، ٢١ يوماً من الزراعة علي بيئة مغذية تنشط تكوين الكالس. توضع العينة في ورق ألومونيوم معروف الوزن، التي توضع بدورها في طبق بتري، تجفف العينة علي حرارة ٦٠ درجة مئوية لمدة ١٢ ساعة. توضع العينة في مجفف يحتوي علي حبيبات سليكا لامتصاص الرطوبة، عندما تصل درجة حرارة العينة الي درجة حرارة الغرفة توزن ويدون الوزن الجاف، توضع العينة مرة اخري في فرن علي حرارة ٦٠ درجة مئوية ويكرر الوزن .. عندما تجفف العينة الي وزن ثابت فان القراءتين المتتاليتين تكونان متساويتين. يحسب الوزن الجاف للعينة بواسطة حساب الفرق بين الوزن المتحصل عليه ووزن ورق الألومونيوم .. يحسب متوسط الوزن الجاف للأجزاء النباتية العشرة التي جمعت في كل عينة وهذه تمثل الوزن الجاف للعينة عند الفترة التي جمعت عندها. تجفف وتوزن الأجزاء النباتية الغير منزرعة والمعد، كما أشرنا سابقاً في حساب الوزن الطازج غير أنه تتبع الخطوات السابقة لحساب الوزن الجاف للكالس، يكرر تجفيف العينة حتي نحصل علي وزنتين متتاليتين متساويتين، يحسب متوسط الوزن الجاف للأجزاء النباتية ومن القيم المتحصل عليها يمكن الحصول علي الوزن الجاف للكالس المتكون علي الأجزاء النباتية في المراحل المختلفة.

٤ تقدير كثافة الخلايا **Measurement of cell density**

يقاس معدل النمو في معلق الخلايا بواسطة تحديد كثافة أو عدد الخلايا في ١سم من البيئة المغذية أو بواسطة تحديد حجم الخلايا المندمجة، ويجب أن تكون الخلايا في مرحلة الأنقسام النشط كما أنها يجب أن تكون منفصلة وليست متجمعة .. في حالة وجود تجمعات خلوية يجب أن تعامل العينة بواسطة محلول كروميوم تراي اوكسيد لتسهيل فصل الخلايا عن بعضها البعض وبالتالي يسهل تحديد عدد الخلايا في العينة .

يجري هذا بواسطة اضافة ١٠سم من محلول كروميوم تراي اوكسيد بتركيز ٨٪ الي ٥سم من معلق الخلايا المنزرعة، تحضن العينة علي حرارة ٧٠ درجة مئوية لمدة دقيقتين ثم تترك لتبرد وترج جيداً لمدة ١٠ دقائق .

تفحص العينة بواسطة وضع نقطة علي شريحة زجاجية والفحص بالميكروسكوب الضوئي للتأكد من انفصال الخلايا، في حالة عدم انفصال الخلايا توضع العينة مرة اخري علي نفس درجة الحرارة لمدة١٠-١٥ دقيقة قبل أن تفحص مرة اخري.

قد يستخدم خليط من محلول كروميوم تراي اوكسيد بتركيز ١٠٪،حمض الأيدروكلوريك بتركيز ١٠٪. يخلط المحلولين بنسبة ١:١ ثم يستعمل الخليط مع معلق الخلايا المنزرعة بنسبة ١:١ أيضاً، وهناك أنواع عديده من الشرائح الميكروسكوبية التي اعدت خصيصا لتحديد عدد الخلايا في المعلقات الخلوية .. ومنها شريحة الهيموسيتوميتر.

ويرجع الأساس الذي تعتمد عليه هذه الطريقة إلي معرفة عدد الخلايا النباتية الموجودة في حجم معلوم من البيئة المغذية وهذا بدوره يُحسَب من عدد الخلايا الموجودة في ١٦ مربعًا التي تحتوي حجم مقداره ٠,١ مم٣ ومنها يمكن حساب عدد الخلايا في البيئة السائلة .

٥ تحديد حجم الخلايا المتجمعة Measurement of aggregated cells

ينقل حجم معلوم من معلق الخلايا الي أنبوبة مدرجة معدة خصيصاً للأستخدام في جهاز الطرد المركزي، ويفضل استخدام أنبوبة ذات جزء علوي متسع وجزء سفلي ضيق ومدرج وقد يحتاج الي تخفيف أو تركيز العينة .. توضع العينة في جهاز الطرد المركزي علي سرعة ٢٠٠٠ لفة/دقيقة لمدة ٥ دقائق، وقد تزاد الفترة الزمنية اذا وجد أنه ليس هناك حد فاصل بين الخلايا والمحلول .. ويراعي قراءة حجم الخلايا المتجمعة مباشرة بعد معاملة الطرد المركزي حيث أن التأخير قد يؤدي الي انتشار الخلايا في البيئة مرة اخري وبالتالي الحصول علي قراءة غير دقيقة. ويعبر عن حجم الخلايا المتجمعة في صورة عدد السنتيمتر المكعب للخلايا المتجمعة لكل سم من البيئة المغذية.

٦ تقدير معدل الانقسام الميتوزي للخلايا Measurement of mitotic index

يفضل استخدم معلق الخلايا المنزرعة لتحديد معدل الأنقسام الخلوي الميتوزي وذلك للصعوبة في تجهيز الكالس للحصول علي تقدير دقيق. هناك طرق عديدة للصبغ غير أنه في حالة استخدام طريقة كاربول-فيوشسين يجري اعداد ثلاثة محاليل مختلفة، يحتوي المحلول الأول علي ثلاثة جرامات من مادة فيوشسين مذابة في ١٠٠ سم من محلول ايثانول بتركيز ٧٠٪، أما المحلول الثاني يعد بواسطة اضافة ١٠ سم من المحلول الأول الي ٩٠سم من محلول فينول بتركيز ٥٪ .. يجب ألايستعمل المحلول الثاني بعد اسبوعين من اعداده، أى يفضل أن يستعمل وهو حديث التحضير .. ويتكون المحلول الثالث من اضافة ٤٥سم من المحلول الثاني الي ٦سم من حمض الخليك وهذا يضاف الي ٦سم من محلول

الفورمالدهيد بتركيز ٣٧٪ .. ويستعمل المحلول الأخير كصبغة كاربول فيوشسين، وينصح باستخدام ٢-١٠سم من المحلول الأخير الي ٩٠-٩٨ سم محلول حمض الخليك بتركيز ٤٥٪ الي ٨ر١ جرام سوربيتول .. ويجب الأشاره هنا الي أنه يفضل تحضير محلول الصبغة قبل الأستعمال بحوالي اسبوعين ويحفظ علي حرارة الغرفة وبهذا يتحصل علي نتائج جيدة. ينقل ٥سم من معلق الخلايا المنزرعة الي أنبوبة اختبار يضاف ١سم من خليط حمض الخليك بتركيز ٤٥٪، ايثانول بنسبة ١:٣، تنقل نقطة صغيرة تحتوي الخلايا المعاملة بالمحلول السابق الي شريحة زجاجية وتوضع نقطة من محلول صبغة كاربول فيوشسين، تعامل الخلايا بالصبغة لمدة خمسة دقائق ثم تغطي بغطاء شريحة زجاجية، ثم علي لهب وتغطي بورقة ترشيح لأزالة محلول الصبغة الزائد. تصبغ النوي باللون الأحمر وبذلك يسهل تمييزها تحت الميكروسكوب، يجري فحص حوالي ٥٠٠ نوي وتصنف الي نوي لا تتعرض للأنقسام واخري في مراحل مختلفة من الأنقسام ويجري حساب معدل انقسام الخلايا الميتوزي باستخدام هذه المعادلة.

معدل الأنقسام = عدد النويات المنقسمة/العدد الكلي للنويات × ١٠٠

٧ تقدير حيوية البروتوبلاست Fluorescein diacetate (FDA)

تستخدم صبغة فلوروسين-داي-ستات وذلك لتقدير حيوية البروتوبلاست .. تعتمد هذه الطريقة علي أن جزيء الصبغه يمكنه المرور خلال الغشاء البلازمي للخلايا الحية فقط حيث يحدث انشقاق له نتيجة فعل الأنزيمات .. ويتبقي جزئ الفلوروسين في الغشاء البلازمي للخلية حيث يمكن اختباروجوده بواسطة الفحص الميكروسكوبي. يمكن اجراء اختبار الحيوية بواسطة تحضير محلول من الصبغة

يحتوي ١-٥ ملليجرام/مللي آسيتون .. وهذا يحفظ في الظلام علي حرارة منخفضة .. يخلط ١ مللي من محلول الصبغة الي ١٠مللي من البيئة التي تحتوي البروتوبلاست، تترك لفترة ٥ دقائق ثم تفحص بعد ذلك بواسطة الميكروسكوب الذي يعكس اللون الفوسفوري للفلورسين ، وتحسب نسبة الحيوية من المعادلة الآتية

حيوية البروتوبلاست = عدد البروتوبلاست الحي/ العدد الكلي للبروتوبلاست × ١٠٠

[stamp]

References

Alfermann, A. and Reinhard, E. (1971). Isolation of anthocyanin-producing and non-producing cell lines of tissue cultures of Daucus carrotта. Experientia, 27: 353-354.

Ammirato, P. (1983). Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture, vol. 1, eds. Evans, D., Sharp, W., Ammirato, P. and Yamada, Y. pp. 83-123. MacMillan, New York.

Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of Tropaeolum majus and Lupinus albus. Am. J. Bot., 33: 301-318.

Ball, E. (1953). Hydrolysis of sucrose by autoclaving media: A neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. Bull. Torrey Bot. Club, 80: 409-411.

Bergmann, L. (1960). Growth and division of single cells of higher plants in vitro. J. Gen. Physiol., 43: 841-851.

Caplin, S. and Steward, F. (1948). Effect of coconut milk on the

growth of explants from carrot root. Science, 108: 655-657.

Carlson, P., Smith, H. and Dearing, R. (1972). Parasexual interspecific plant hybridisation. Proc. natl. Acad. Sci. USA, 29: 2292-2294.

Cocking, E. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. Nature, Lond., 187: 927-929.

Cocking, E. (1972). Plant cell protoplasts, isolation and development. Annu. Rev. Plant Physiol., 23: 29-50.

Constantin, M., Henke, R. and Mansur, M. (1977). Effect of activated charcoal on callus growth and shoot organogenesis in tobacco. In vitro, 13: 393.

Donnelly, D., Vidaver, W. and Lee, K. (1985). The anatomy of tissue cultured red raspberry prior to and after transfer to soil. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 4: 43-50.

Edelman, J. and Hanson, A. (1971). Secretion of photosynthetic products by carrot tissue cultures. Planta, 98: 97-108.

Einset, J. (1978). Citrus tissue culture. Stimulation of fruit explant cultuers with orange juice. Plant Physiol., 62: 885-888.

Ellis, B. (1982). Selection of chemically-variant plant cell lines for use in industury and agriculture. In: Application of plant cell and tissue culture in agriculture and industry, eds. Tomes, D., Ellis, B., Harney, P. Kasha, K. and Peterson, R., pp. 63-80. Univ. Guelph Guelph, Ontario.

Epstein, E., Kochba, J. and Neumann, H. (1977). Metabolism of indoleacetic acid by embryogenic and non-embryogenic callus lines of "Shamouti" orange. Z. Pflanzenphysiol., 85: 263-268.

Evans, P. and Cocking, E. (1977). Isolated plant protoplasts. In: Plant tissue and cell culture. ed. Street, H., pp. 103-135. Oxford, Blackwell Scientific Publication.

Fabbri, A., Sutter, E. and Dunstan, S. (1986). Anatomical changes in persistent leaves of tissue-cultured strawberry plants after removal from culture. Scientia Hort., 28: 331-337.

Gamborge, O., Miller, R. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., 50: 151-158.

Gamborg, O., Shyluk, J. and Kartha, K. (1975). Factors affecting the isolation and callus formation in protoplasts from shoot apices of Pisum sativum. Plt. Sci. Lett., 4: 285-292.

Gamborge, O., Murashige, T., Thorpe, T. and Vasil, I. (1976). Plant tissue culture media. In vitro, 12: 473-478.

Gautheret, R. (1937). Nouvelles recherches sur la culture de tissu cambial C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris 205: 572-574.

Gautheret, R. (1938). Sur le repiquage des cultures de tissu cambial de Salix capraea. C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris 206: 125-127.

/ Gautheret, R. (1939). Sur la possibilite de realiser la culture indefinie des tissu de tubercules de carotte. C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris 208: 118-121.

Giles, K. (1974). Complementation by protoplast fusion using-mutant strains of maize. Plant and Cell Physiol., 15: 281-285.

Grout, B. (1988). Photosynthesis of regenerated plantlets in vitro, and the stresses of transplanting. Acta Hort., 230: 129-135.

Grout. B. and Aston, M. (1978). Modified leaf anatomy of cauliflower plantlets regenerated from meristem culture. Ann. Bot., 42: 993-995.

Grout, B. and Millam, S. (1985). Photosynthetic development of micropropagated strawberry plantlets following transplanting. Ann. Bot., 55: 129-131.

Guha, S. and Maheshwari, S. (1964). In vitro production of embryos from anthers of Datura. Nature, 204: 497.

Guha, S. and Maheshwari, S. (1966). Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of Datura in vitro. Nature, 212: 97-98.

Haberlandt, G. (1902). Kuturversuche mit isolierten Pflanzenzel-

len. Sber. Akad. Wiss. Wien, 111:69-92.

Halperin, W. and Wetherell, D. (1964). Adventive embryony in tissue cultures of wild carrot, Daucus carota. Am. J. Bot., 51: 274-283.

Hanning, E. (1904). Physiology of plant embryos. I: The culture of Cruciferous embryos outside the embryo sac. Bot. Gaz., 62: 46-81.

Heberle-Bors, E. and Reinert, J. (1979). Androgenesis in isolated pollen cultures of Nicotiana tabacum: Dependence upon pollen development. Protopolasma, 99: 237-245.

Heinz, D. and Mee, G. (1971). Morphologic, cytogenetic, and enzymatic variation in Saccharum species hybrid clones, derived from callus tissue. Am. J. Bot., 58: 257-262.

Henshaw, G., Jha, K., Mehta, A., Shakeshaft, D. and Street, H. (1966). Studies on the growth in culture of plant cells. I. Growth pattern in batch propagated suspension cultures. J. Exp. Bot., 17: 362-377.

Jacobsen, E. and Sopory, S. (1978). The influence and possible recombination of genotypes on the production of microspore embryoids in anther culture of Solanum tuberosum and dihaploid hybrids. Theor. Appl. Genet., 52: 119-123.

Jones, J. (1979). Commercial use of tissue culture for the production of disease-free plants. In: Plant cell and tissue culture, eds. Sharp, W., Larsen, E., Paddock, E. and Raghavan, V. pp. 441-452. Ohio State Univ. Press, Columbus.

Kamada, H. and Harada, H. (1979). Studies on organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. Z. Pflanzenphysiol., 91: 255-266.

Kao, K. and Michayluk, M. (1974). A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta, 115: 355-367.

Klein, R. and Manos, G. (1960). Use of metal chelates for plant tissue cultures. Annl N. Y. Acad. Sci., 88: 416-425.

Kochba, J. and Spiegel-Roy, P. (1977a). Embryogenesis in gamma-irradiated habituated ovular callus of the "Shamouti" orange as affected by auxin and tissue age. Environ. Expt. Bot., 17: 151-159.

Kochba, J. and Spiegel-Roy, P. (1977b). The effect of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated callus of the "Shamouti" orange (Citrus sinensis). Z. Pflanzenphysiol., 81: 283-288.

Kochba, J., Lavee, S. and Spiegel-Roy, P. (1977). Differnences in peroxidase activity and isoenzyes in embryogenic and non-embryogenic "Samlouti" ornage ovular callus lines. Plant Cell Physiol., 18: 463-467.

Konar, R. and Nataraja, K. (1965). Experimental studies in Ranunculus sceleratus. Development of embryos from the stem epidermis. Phytomorphology, 15: 132-137.

Kotte, W. (1922a). Wurzelmeristem in Gewebekulture. Ber. Dtsch. Bot. Ges., 40: 269-272.

Kotte, W. (1922b). Kulturversuch isolierten Wurzelspitzen. Beitr. Allg. Bot., 2: 413-4340

Kurz, W. (1971). A chemostate for growing higher plant cells in single cell suspension cultures. Exp. Cell Res., 64: 476-479.

Laibach, F. (1925). Das Taubwerden von Bastardsmen und die kunsliche aufzucht fruch Absterbender Bastardembryonen. Z. Bot., 17: 417-459.

Lamport, D. (1964). Cell suspension cultures of higher plants: isolation and growth energetics. Exp. Cell Res., 33: 195-206.

Liau, D. and Boll, W. (1970). Callus and cell suspension culture of bushbean (Phaseolus vulgaris). Can. J. Bot., 48: 1119-1130.

Loo, S. (1945). Cultivation of excised stem-tips of asparagus in vitro. Am. J. Bot., 32: 13-17.

Lundergan, C. and Wood, N. (1980). Microwave sterilization of tissue culture media. Hortscience, 16: 417.

Maene, L. and Debergh, P. (1987). Optimalisation of the transfer of tissue cultured shoots to in vivo conditions. Acta Hort., 212: 335-348.

Mastrgelo, I. (1979). Protoplast fusion and organelle transfer. In: Nicotiana procedures for experimental use, ed., Durbin, R., pp. 65-73. Washington, D. C.: US Department of Agriculture Tech. Bull. No. 1586.

Mathysse, A. and Phillips, C. (1969). A protein intermediary in the interaction of a hormone with genome. Proc. natn. Acad. Sci. USA, 63, 397: 903.

Melchers, G. and Bergmann, L. (1959). Untersuchungen an kulturen von haploid geweben von Antirrhinum majus. Ber. dt. bot. Ges, 71: 459-473.

Melchers, G. and Labib, G. (1974). Somatic hybridisation of plant by fusion of protoplasts. I. selection of light resistant hybrids of "haploid" light-sensetive varities of tobacco. Mol. & Gen. Genetics, 135: 277-294.

Mizuno, K. and Komamine, A. (1978). Isolation and identification of substances inducing formation of tracheary elements in cultured carrot-root slices. Planta, 138: 59-62.

Mok, D., Mok, M. and Rabakoarihanta, A. (1978). Interspecific hybridization of Phaseolus vulgaris hybrid parent with Phaseolus lunatus hybrid parent and Phaseolus trifolius hybrid parent. Theor. Appl. Genet., 52: 209-215.

Monnier, M. (1978). Culture of zygotic embryos. In: Frontiers of plant tissue culture 1978. ed., Thorpe, T. pp. 277. University of Calgary Press, Calgary, Canada.

Morel, G. and Martin, G. (1952). Guerison de dahlias atteintes dune maladie a virus. Compt. Rend., 235: 1324-1325.

Morel, G. and Martin, G. (1955). Guerison de pomme de terre atteintes de maladies a virus. C. r. Acad. Sci., Paris, 41: 472-475.

Morrison, R. and Evans, D. (1987). Gametoclonal variation. Plant Breeding Rev., 5: 359-392.

Muir, W. (1953). Cultural conditions favouring the isolation and growth of single cells from higher plants in vitro. Ph.D. Thesis, University of Wisconsin, Madison, USA.

Muir, W., Hildbrandt, A. and Riker, A. (1954). Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. Science, 119: 877-887.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. Ann. Rev. Plt. Physiol., 25: 135.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco culture. Physiol. Plant., 15: 473.

Nagata, T. and Takebe, I. (1970). Cell wall regeneration and cell division in isolated tobacco mesophyll protoplasts. Planta, 92: 301-308.

Nickell, L. (1956). The continuous submerged cultivation of plant tissues as single cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 42: 848-850.

Nitsch, J. (1951). Growth and development in vitro of excised ovaries. Am. J. Bot., 38: 566-577.

Nitsch, J. (1969). Experimental androgenesis in Nicotiana. Phytomorphology, 19: 389.

Nitsch, C. (1974). La culture de pollen isole sur milieu synthetique. C. r. Acad. Sci., 278: 1031-1034.

Nitsch, C. and Norreel, B. (1973). Effet dun choc termique sur le pouvoir embryogene du pollen de Datura innoxia cultive dans lanthere ou isole de lanthere. C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, 276: 303-306.

Nobecourt, P. (1937). Culture en serie de tissue vegetaux sur milieu artificiel. C. r. hebd. Seanc. Acad. Sci. Paris, 205: 521-523.

Nobecourt, P. (1939). Sur la perennite et laugmentation de volume des cultures de tissus vegetaux. C. r. Soc. Biol., 130: 1270-1271.

Norstog, K. (1979). Embryo culture as a tool in the study of comparative and development morphology. In: Plant cell and tissue culture: Principales and applications. eds., Sharp, W., Larson, P., Paddock, E. and Raghavan, V., pp. 179. Ohio State University Press, Columbus.

Pojnar, E., Willison, J. and Cocking, E. (1967). Cell wall regeneration by isolated tomato fruit protoplasts. Protoplasma, 64: 460-480.

Power, J. and Cocking, E. (1971). Fusion of plant protoplasts. Sci. Progr., 59: 181-198.

Raghavan, V. (1976). Experimental embryogenesis in vascular plants. London, Academic Press.

Raghavan, V. (1976). Role of generative cell in androgenesis in henbane. Science, 191: 388-389.

Raghavan, V. (1977). Applied aspects of embryo culture. In: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture, ed., Reinert, J. and Bajaj, Y., pp. 375-397. Berlin: Springer-Verlag.

مراجع

Raghavan, V. (1980). Embryo culture. Int. Rev. Cytol. suppl. 11B: 209-240.

Rangan T. (1982). Ovary, ovule and nuclellus culture. In: Experimental of vascular plants.ed., Johri, B., pp. 105-129. Springer-Verlag, Berlin and New York.

Reinert, J. (1959). Uber die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebekulturen aus karotten. Planta, 53: 318-333.

Reinert, J., Backs-Husemann, D. and Zerman, H. (1971). Determination of embryo and root formation in tissue culture from Daucus carota. In: Les cultures de tissus de plantes, pp. 261-268. Coloques Internationaux du C.N.R.S. No. 193, Paris.

Robbins, W. (1922a). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. Bot. Gaz., 73: 376-390.

Robbins, W. (1922b). Effect of autolysed-yeast and pepton on growth of excised corn root tips in the dark. Bot. Gaz., 74: 59-79.

Robbin, W. and Hervey, A. (1974). Toxicity of water stored in polyethylene bottles. Bull. Torrey Bot. Club, 101: 287-291.

Sacristan, M. and Melchers, G. (1969). The caryological analysis of plants regenerated from tumorous and other callus cultures of tobacco. Mol. & Gen. Genetics, 105: 317-333.

Sangwan, R. (1983). Effect of exogenous amino acids on in vitro androgenesis of Dature. Biochem. Physiol. Pflanzen, 178: 415-422.

Schwann, T. (1839). Mikroskipische untersuchungen uber die uberreinstimmung in der structure und dem wachstume der tiere und Pflanzen. Leipzig: W. Englemann, Nr. 176, Oswalds Klassiker der exakten Wissenschaften, 1910.

Shabde-Moses, M. and Murashige, T. (1979). Organ culture. In: Nicotiana procedures for experimental use, ed., Durbin, R., pp. 40-51. Washington, D.C.: US Department of Agriculture Tech. Bull. No. 1586.

Sheat, D., Fletcher, B. and Street, H. (1959). Studies on the growth of excised roots. VIII. The growth of excised tomato roots supplied with various inorganic sources of nitrogen. New Phytol., 58: 128-141.

Siebert, M. (1976). Shoot initiation from carnation shoot apices frozen to -196C. Science, 191: 1178-1179.

Skoog, F. (1944). Growth and organ formation in toacco tissue cultures. Am. J. Bot., 31: 19-24.

Skoog, F. and Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-130.

/ Skoog, F. and Tsui, C. (1948). Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus culture in vitro. Am. J. Bot., 35: 782-787.

Smith, R. and Murashige, T. (1970). In vitro development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. Am. J. Bot., 57: 562-568.

Sondahl, M. and Sharp, W. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of Coffea arabica. Z. Pflanzenphysiol., 81: 395-408.

Sopory, S. and Maheshwari, S. (1976). Development of pollen embryods in anther cultures of Datura innoxia. II. Effects of growth hormones. J. Exp. Bot., 27: 58-68.

Steward, F. (1963). The control of growth in plant cells. Sci. Am., 209: 104-113.

Steward, F. and Shantz, E. (1956). The chemical induction of growth in plant tissue cultures. In: The chemistry and mode of action of plant growth substances. eds. Wain, R. and Wightman, F. pp. 165-186. Butterworths Ltd., London.

Steward, F. Caplin, S. and Miller, F. (1952). Investigation of growth and metabolism of plant cells. I New techniques for the investigation of metabolism, nutrition and growth in undifferentiated cells. Ann. Bot., 16: 58-77.

Steward, F. Mapes, M. and Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization from cultures grown from freely suspened cells. Am. J. Bot., 45: 705-708..

Steward, F., Mapes, M. and Smith, J. (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. Am. J. Bot., 45: 693-703.

Street, H. (1966). The nutrition and metabolism of plant tissue and organ cultures. In: Cells and tissues in culture, ed., Willmer, E. VIII, pp. 533-630. New York, Academic Press.

Street, H. (1969). Growth in organized and unorganized systems. In: Plant Physiology. A treaties, ed. Steward, F., pp. 3-224. New York, Academic Press.

Street, H. (1977). The anatomy and physiology of morphogenesis. Studies involving tissue and cell cultures. In: La culture des tissus des vegetaux. Resultats generaux et realizations practiques, ed., Gautheret, R., pp. 20-33. Paris, Masson.

Sunderland, N. and Dunwell, J. (1974). Pthways in pollen embryogenesis. In: Tissue culture and plant science, ed. Street, H., pp. 1-24. Cambridge University Press.

Sunderland, N. and Wicks, F. (1969). Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature, 224: 1227-1229.

Sutter, E. and Langhans, R. (1982). Formation of epicuticular wax and its effect on water loss in cabbage plants regenerated from shoot-tips culture. Can. J. Bot, 60: 2896-2902.

Thom, M., Maretzki, A., Komer, E. and Sakai, W. (1981). Nutrient uptake and accumulation by sugarcane cell cultures in relation to growth cycle. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1: 3-14.

Thomas, E. and Street, H. (1970). Organogenesis in cell suspension cultures of Atropa belladonna and Atropa bellasonna cultivar Lutea Doll. Ann. Bot., 34: 657-669.

Thorpe, T. (1978). Physiological and biochemical aspects of organogenesis in vitro. In: Forntiers of Plant Tissue Culture, Proc. 4th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture, ed Thorpe, T., pp. 49.

University of Calgary, Canada.

Torrey, J. (1967). Morphogenesis in relation to chromosomal constitution in long-term plant tissue cultures. Pysiologia Pl., 21:265-275.

Tulecke, W. (1959). The pollen culture of C.D. la Rue: a tissue from pollen of Taxus. Bull. Torrey Bot. Club, 86: 283-289.

Uchimiya, H. and Murashige, T. (1974). Evaluation of parameters of the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. Pl. Pysiol., Lancaster, 54: 115-116.

Vagera, J. and Havranek, P. (1982). In vitro regulation of androgenesis by iron ions and chela'e: A common property of two androgenic species (Nicotiana tabacum and Datura innoxia). Biol. Plant., 24: 282-289.

Van Overbeek, J., Conklin, M. and Blakeslee, A. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of very young Datura embryos. Science, 94: 350-3510.

Verma, D. and Dougall, D. (1979a). Biothynthesis of myo-inositol and its role as precursor of cell-wall polysacharides in suspension cultures of wild-carrot cells. Planta, 146: 55-62.

Verma, D. and Dougall, D. (1979b). Myo-inositol biosynthesis and glactose utilization by wild carrot suspension cultures. Ann. Bot., 43: 259-269.

Wardle, K., Quinilan, A. and Simpkins, I. (1979). Absicsic acid and the regulation of water loss in plantlets of <u>Brassica oleracea</u> regererated through apical meristem culture. Ann. Bot., 43: 745-752.

Went, F. and Thimann, K. (1937). Phytohormons. MacMillan co., New York.

Wenzel, G., Hoffman, F. and Thomas, E. (1977). Increased induction and chromosome doubling of androgenetic haploid rye. Theor. Appl. Genet., 51: 81-86.

Wetmore, R. and Rier, J. (1963). Experimental induction of vascular tissues in callus of angiosperms. Am. J. Bot., 50: 418-430.

White, P. (1932). Plant tissue culture: A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems. Arch. Exp. Zellforsch. Bespmders Gewebezuecht., 12: 602-620.

White, P. (1933). Plant tissue cultures: results of preliminary experiments on the culturing of isolated stem tips of Stellaria media. Protoplasma, 19: 97-116.

White, P. (1934). Potantially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. Plant Physiol., 9: 585-600.

White, P. (1937). Vitamin B1 in the nutrition of exiced tomato roots. Plant Physiol., 132: 793-802.

White, P. (1939). Potantially unlimited growth of excised plant callus in an artificial medium. Am. J. Bot., 26: 59-64.

Willison, J. (1976). Synthesis of cell wall by higher plant protoplasts. In: Microbial and plant protoplasts, eds., Peberd, J., Rose, A., Rogers, H. and Cocking, E. Academic Press, London.

Willison, J. and Cocking, E. (1972). The production of microfib-

rils at the surface of isolated tomato fruit protoplasts. Protoplasma, 75: 397-403.

Wilson, S., King, P. and Street, H. (1971). Studies on the growth in culture of plant cells. XII. A versatile system for the large scale batch or continuous culture of plant cell suspensions. J. Exp. Bot., 21: 177-207.

Withers, L. (1978). Freeze preservation of cultured cells and tissues. In: Frontiers of plant tissue culture 1978, ed., Thorpe, T., pp. 297-306. Calgary: International Association for Plant Tissue Culture.

Yeung, E., Thorpe, T. and Jensen, C. (1981). In vitro fertilization and embryo culture. In: Plant tissue cultrure: methods and applications in agriculture, ed., Thorpe, T., pp. 253-271. Academic Press, London.

Zaki, M. and Dickinson, H. (1991). Microspore-derived embryos in <u>Brassica</u>: The signifioance of division symmetry in pollen mitosis I to embryogenic development. Sex. Plant Reprod., 4: 48-55.

مراجع

Do you have complain ?

Please write your complain in the provided space

↓

complain form
. . . .
. . . .
. . . .

Please use eligible writing

كاريكاتير إهداء Hugh Blackborn كمبريدج بريطانيا

مرحلة إنشاء المزارع النسيجية ———— ١٠١
مرحلة تضاعف النسيج المنزرع ———— ١٠٤
الأجنة الجسدية ———— ١٠٤
تنشيط نمو البراعم العرضية ———— ١٠٤
تنشيط نمو الأفرع الجانبية ———— ١٠٥
مرحلة تكوين الجذور في البيئة المغذية ———— ١٠٥
مرحلة الأقلمة ———— ١٠٧
الاختلافات في النباتات الناتجة ———— ١٠٩

تكوين الكالس (ماجد زكي) ———— ١١١
مراحل تكوين الكالس ———— ١١٤
مصدر المادة النباتية ———— ١١٤
التطهير ———— ١١٥
فصل الجزء النباتى ———— ١١٦
البيئات المغذية ———— ١١٧
نشوء الكالس ———— ١١٨
اعادة زراعة الكالس ———— ١٢٠
المحافظة علي الكالس ———— ١٢١
طرق الزراعة ———— ١٢٢
البيئة الصلبة ———— ١٢٣
البيئة السائلة الساكنة ———— ١٢٤

Appendix 1

Composition of nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	MS	B5	White	Heller
Ammonium nitrate	1650			
Sodium nitrate				600
Potassium nitrate	1900	2500	80	
Calcium nitrate			300	
Calcium chloride	440	900		75
Magnesium sulphate	370	250	750	250
Sodium sulphate			200	
Potassium phosphate	170			125
Sodium phosphate		150	19	
Potassium chloride			65	750
Na EDTA	27.8	27.8	2.5	
Ferrous chloride	37.3	37.3		
Ferrous sulphate				
Manganese sulphate	22.3	10	7	0.1
Zinc sulphate	8.6	2	3	1
Boric acid	6.2	3	1.5	1
Potassium iodid	0.83	0.75	0.75	0.01
Sodium molybdate	0.25	0.25		
Copper sulphate	0.025	0.025		0.03
Cobalt chloride	0.025			
Nickel chloride				0.03
Alomenium chlorate				0.03
Myo inositol	100	100		
Nicotinic acid	0.5	1	0.5	
Pyridoxine	0.5	1	0.1	
Thiaminee	0.1	10	0.1	1
Glycine	1.88		3	
Sucrose	30g	20g	20g	20g
Ph	5.8	5.5	5.5	5.6

Appendix 6

Composition of some nutrient media commonly used in tissue culture (mg/L).

Constituent	Nickell	Nagata&Takebe	Murashige	Miller&Skoog
Potassium nitrate	202	950	80	80
Calcium nitrate	708.5		144	144
Magnesium sulphate	246.5	1233	72	72
Potassium chloride	149		65	65
Potassium phosphate	136	680	38	38
Ammonium nitrate		825	400	
Calcium chloride	441	220		
Magnesium chloride	203			
Glycine			2	
Tyrosine			150	

جدول يبين مكونات الأحماض الأمينية المختلفة

الحمض الأميني	الوزن الجزيئى	نسبة المكونات			
		الكربون	هيدروجين	أوكسجين	نيتروجين
Alanine	٨٩,٠٩٥	٤٠,٤٤	٧,٩٢	٣٥,٩١٧	١٥,٢٧٣
Arginine	١٧٤,٢٠٥	٤١,٣٦٥	٨,١٠٢	١٨,٣٦٩	٣٢,١٦٤
Aspartic acid	١٣٣,١٠٥	٣٦,٠٩٢	٥,٣٠٢	٤٨,٠٨٢	١٠,٥٢٤
Cystine	٢٤٠,٢٩	٢٩,٩٨٩	٥,٠٣٤	٢٦,٦٣٤	١١,٦٥٩
Diiodotyrosine	٤٣٣,٠١	٢٤,٩٦٢	٢,٠٩٥	١١,٠٨٥	٣,٢٣٥
Glutamic acid	١٤٧,١٣١	٤٠,٨١٤	٦,١٦٧	٤٣,٤٩٩	٩,٥٢١
Glycine	٧٥,٠٦٨	٣١,٩٩٨	٦,٧١٥	٤٢,٦٢٨	١٨,٦٦
Histidine	١٥٥,١٥٧	٤٦,٤٣٤	٥,٨٤٨	٢٠,٦٢٤	٢٧,٠٨٥
Hydroxyproline	١٣١,١٣١	٤٥,٧٩٤	٦,٩١٩	٣٦,٦٠٥	١٠,٦٨٢
Isoleucine	١٣١,١٧٣	٥٤,٩٣٥	٩,٩٩١	٢٤,٣٩٥	١٠,٦٧٩
Leucine	١٣١,١٧٣	٥٤,٩٣٥	٩,٩٩١	٢٤,٣٩٥	١٠,٦٧٩
Lysine	١٤٦,١٨٩	٤٩,٢٩٢	٩,٦٥٤	٢١,٨٨٩	١٩,١٦٤
Phenylalanine	١٦٥,١٨٧	٦٥,٤٣٥	٦,٧١٣	١٩,٣٧٢	٨,٤٨
Proline	١١٥,١٣١	٥٢,١٥٨	٧,٨٨١	٢٧,٧٩٤	١٢,١٧٦
Serine	١٠٥,٠٩٥	٣٤,٢٨٣	٦,٧١٥	٤٥,٦٧٣	١٣,٣٢٩
Threonine	١١٩,١٢١	٤٠,٣٢٩	٧,٦١٧	٤٠,٢٩٥	١١,٧٥٩
Tryptophan	٢٠٤,٢٣٢	٦٤,٦٨٩	٥,٩٢٦	١٥,٦٦٩	١٣,٧١٨
Tyrosine	١٨١,١٨٧	٥٩,٦٥٧	٦,١٢٠	٢٦,٤٩٢	٧,٧٣١
Valine	١١٧,١٤٧	٥١,٢٦٠	٩,٤٦٦	٢٧,٣١٦	١١,٩٥٨

١. ٦ الأجسام الصغيرة Microbodies

عضيه محاطة بغشاء مفرد تحوي مجموعة من الأنزيمات التي تنشط كثير من عمليات الأيض فمثلا في تفاعلات هدم الدهون ينتج مركب فوق اكسيد الهيدروجين وهو مركب سام. الا ان Peroxisomes هي نوع من الأجسام الصغيرة التي تحتوي انزيم الهيدوجين بيرو اكسيداز الذي يحلل H2O2 الي H2O, O2 وبالتالي يقلل من سمية هذا المركب ويحوله الي مواد نافعة أو تقوم بازالة سميتة .. وعموما هذه العضيات موجودة بكثرة في الكبد والكليه.

أما الخلية النباتية فيوجد بها نوعان أو طرازان من الأجسام الصغيره، الطراز الأول الموجود في الأوراق وتلعب دور في عملية التمثيل الضوئي أما الطراز الثاني فيسمي Glyoxysomes وهو موجود في بعض بذور النباتات حيث به انزيمات تحول الدهون أو الزيوت الي سكريات لتساعد البذور في الأنبات وبالتالي تعتبر الزيوت مصدر للطاقة في هذه النوعية من البذور نتيجة تحولها الي سكريات. وهذه العضيه الأخيرة لاتوجد في الخلية الحيوانية لأنها عضوية التغذية ولايمكنها تحويل الدهون الي سكريات ولهذا فان هذه العضيه موجودة بكثرة في بذور المحاصيل الزيتية.

١. ٧ الميتوكوندريا Mitochondria

توجد في الخلايا حقيقية النواه وتوجد بها أنزيمات السيتوكروم الخاصة بانتاج الطاقة حيث يتم فيها التفاعلات الكيماوية التي تساعد علي تحول الطاقة الكيماوية المخزنة في المركبات العضوية وتخزنها في مركب طاقة كيماوي آخر هو (ATP) وتستغل هذه الطاقة في عمليات كيماوية اخري من خلال عمليات التنفس وبالتالي فان التنفس يجب أن ينظر له أنه احد مصادر انتاج الطاقة.

وعدد وحدات الميتوكوندريا كثير في كل خلية، وخاصة في اعضاء الجسم النشطة

والتطهير، وهذا يختلف تبعاً للجزء النباتي المنفصل. عموماً فانه في حالة اعداد أجزاء من السوق، الورقة، أعضاء التخزين وغيرها من الأعضاء النباتية فانه يجري الغسيل تحت ماء جار لمدة ٣٠ دقيقة .. خاصة اذا كانت النباتات قد علق بها بعض بقايا التربة. ولقد وجد أنه من المفيد اجراء غسيل مبدئي لهذه الأجزاء النباتية في ماء وصابون قبل الغسيل في ماء جار، ووجد أن هذه المعاملة تؤدى الي زيادة فاعلية المطهرات المستخدمة.

بعض الأعضاء النباتية تتميز بوجود تركيب تشريحي ذات صفات خاصة تعمل علي صعوبة وصول المطهر الي السطح الخارجي، مثال ذلك وجود طبقة شمعية، شعيرات، قنوات، أشواك .. للتغلب علي هذه الصعوبة فانه يجري اضافة عدة قطرات من سائل صابوني الي المحلول المطهر وهذا يعمل علي تقليل التوتر السطحي وتسهيل اجراء عملية التطهير. من أهم المطهرات الشائع استعمالها في مجال زراعة الانسجة هيبوكلوريت الصوديوم، كما أنه قد يستخدم محلول كحولي للتطهير المبدئي السريع لمدة عدة ثوان قبل استخدام المحلول المطهر. بديهياً فان هذه الطريقة في التعقيم لا تؤثر علي التلوث بداخل النسيج وتبقي الكائنات الدقيقة بداخل النسيج المنزرع .. في حالة وجود تلوث داخلي فانه يجري اضافة مادة بينوميل (Benomyl) أو بنلات (Benlate) الي البيئة المغذية بتركيز ١٠ ملليجرام/لتر، يجري غمس النسيج المنفصل في محلول هذه المواد قبل اجراء عملية التطهير السطحي للنسيج المنفصل. بالرغم من أن البعض قد يقترح استخدام بعض المضادات الحيوية باضافتها الي البيئة المغذية غير أنه وجد أن هذه المضادات الحيوية قد تؤثر علي استجابة النسيج المنزرع ولهذا يفضل عدم استخدامها. اذا وجد بعض الكائنات الحية علي السطح الخارجي للنسيج المنزرع فان التلوث يظهر في خلال