المصادر

1. أساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية /المؤلف : أ.د. محمد عباس سلمان /كلية الزراعة / جامعة بغداد 1988م
2. المفاهيم الرئيسية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية /المؤلف :أ.د. عبد المطلب سيد محمد و د. مبشر صالح عمر /كلية العلوم / جامعة الموصل 1990م
3. زراعة الانسجة والخلايا النباتية د. فيصل /كلية الزراعة /جامعة الموصل 1989م

****

س/ماهي زراعة الانسجة والخلايا ؟
-هي عملية استئصال خلية او نسيج او عضو او جزء من عضو من النبات وتعقيمه وزراعته على اوساط غذائية صناعية معقمة

*تعود بدايات زراعة الانسجة والخلايا النباتية الى محاولات العالم Haberlandt في عام 1901 والذي ذكر عدد من افتراضات من بحثه الذي نشر في عام 1902 وتضمن نتائج محاولته في زراعة الخلايا المفردة خارج الجسم الحي in vitro (داخل الزجاج) من هذه الفرضيات ان توقف نمو الخلايا النباتية لا يعود الى فقدانها القابلية على النمو وانما سبب محفز معين في انسجة النبات الاخرى او بجزء منها وافترض نفس الباحث وجود هرمونات النمو والتي اطلق عليها انزيمات النمو مفترضة انها تتحرر من نوع معين من الخلايا وتحفز نمو وتطور الخلايا الاخرى.

وبناء على الملاحظات التي ذكرها العالم عام 1901 حول تحفيز الانبوب اللقاحي لحبة اللقاح لنمو البويضة والجنين وقد اقترح ايضا هابرلانت زراعة خلايا خضرية مع انبوب اللقاح مع قطرة من محلول غذائي واشار أيضا الى امكانية استخدام مستخلصات الخلايا الخضرية من النبات او غيرها لزراعة الخلايا المفصولة.

*ومنذ نشر البحث منذ 1902 وحتى عام 1934 لم يحصل اي تطور في زراعة الانسجة النباتية , في عام 1922 حقق كل من Robini في الولايات المتحدة الامريكية و Kott في بريطانيا كل على أنفراد نجاح محدود في تنمية أطراف الجذور المفصولة خارج الجسم الحي .

*في عام 1934 نشر العالم White أول تقرير ناجح عن تنمية أطراف الجذور لنبات الطماطة بصورة مستمرة ولإزالة جذور هذا النبات تنمى من قبل طلابه في مختبرات المملكة المتحدة .

**من أهم الاكتشافات التي حدثت في منتصف الثلاثينيات من القرن الماضي والتي دفعت علم زراعة الأنسجة النباتية بخطوات كبيرة:-
1.أكتشاف الأوكسين كمنظم نمو طبيعي في النبات.
2.معرفة أهمية فيتامين B في نمو النبات.

*في عام 1951 قام العالم Winkler ومساعدوه بأنشاء مزرعة أجنة نبات الداتورة وفي عام 1957 وضع Miller & Skoog فرضية التحكم الهرموني لتكوين الاعضاء حيث أوضحى أن تمايز الأفرع والجذور في مزارع الكالس لنبات التبغ يمكن التحكم به من خلال تغير النسبة بين الأوكسين والسايتوكاينين في الوسط الغذائي ولا تخلو أطروحة دكتوراه أو رسالة ماجستير في مجال زراعة الأنسجة النباتية من الإشارة الى هذان العالمان.

*في التطورات الأخرى من خلال القرن الماضي النجاح الذي حققه العالم Skoog عام 1960 في زراعة البروتوبلاست في وسط زراعي صناعي , ثم استخدمت هذه التقنية في نطاق تجاري من خلال زراعة أطراف الفروع المفصولة من بعض النباتات.

*ثم نجح باحثان Martin & Moreland عام 1952 تمكنا من أنتاج نباتات خالية من الأمراض الفايروسية , ثم قام Murashingبتكثيف العمل والجهود في أكثار النباتات الراقية لاسيما بعد أن قام بتثبيت المكونات الأساسية للوسط الغذائي

University of Diyala College of Agriculture

وبالتعاون مع العالم Skoog في عام 1962 أذ سميه هذا الوسط بوسط MS (Murashing & Skoog) أذ يعتبر وما زال الوسط الأساسي المستخدم لأكثار النباتات نسيجياً أذ يوجد العشرات من الأوساط الغذائية الأخرى المحورة في هذا المجال.

س/ ماهي التطبيقات العملية المختلفة لزراعة أنسجة النبات خارج الجسم الحي in vitro ؟

ج/1. تربية النبات وحفظ المصادر الوراثية:- يتم هذا التطبيق من خلال :-

أ. زراعة الخلية Cell Culture

ب. دمج البروتوبلاست Protoplast Fusion

ج. زراعة حبة اللقاح والمتك Microspor and anther culture

د. زراعة الأجنة والبويضات والمبايض

2. أنتاج نباتات سليمة من الأصابات المرضية:- وتوجد هناك عدة طرق للتخلص من هذه الأمراض والفيروسات

أ. زراعة قمة الساق Shoot tip culture

ب. تطعيم القمة النامية خارج الجسم الحي Shoot tip crafting culture

ج. زراعة المرستيم القمي للساق Shoot Apical Meristem Culture

3. أنتاج العقاقير الطبية والمركبات الثانوية:- تتم هذه الطريقة بعدة وسائل منها

أ. زراعة الجذور Root Culture

ب. زراعة المستنبتات الخلوية Cell Suspotion Culture

ج. زراعة الكالس Callus Culture

4. الأكثار السلالي السريع Micro propagation وهناك ثلاث طرق رئيسية للأكثار

أ. تكوين البراعم العرضية Adventitions Bud Formation

ب. تكوين التفرعات الجانبية Axillary Branches

ج. تحفيز الأجنة اللاجنسية (الجسمية) Somatic Embrygenesis

University of Diyala-College of Agriculture

العوامل المؤثرة في نجاح الزراعة النسيجية

/. مكونات الوسط الغذائي :- وتشمل

أ. الأملاح المعدنية
ب. الفيتامينات
ت. الأحماض الأمينية
ث. pH الوسط الغذائي وتتراوح بين 5.7-5.8
ج. مصدر الكاربون /أستخدم السكروز بشكل أساسي وأحياناً الكلوكوز أو الفركتوز ,لأن النبات رمي التغذية فيحتاج الى الكاربون الجاهز.
ح. الماء .

2. ظروف الحضن (الخزن) :-وتشمل

أ. درجة الحرارة وتكون 25م + - 2 م .

ب. الأضاءة /وتستخدم مصادر صناعية للأضاءة (النيون) باللون الأبيض على الأغلب شدة أضاءة 1000_2000 لوكس ولمدة أضاءة 16 ساعة ثم 8 ساعات ظلام وبالتناوب.

ج. التهوية والرطوبة .

3. نوع النبات /تختلف الأنواع النباتية بأستجابتها للزراعة النسيجية فمنها من يستجيب بصورة سريعة ومنها من لا يستجيب أطلاقاً وبين ذلك تختلف الأنواع فيما بينها وهي تعتبر صفة وراثية في النبات .

4. الحالة الفسيولوجية للنبات الأم /تؤثر بشكل كبير فالنباتات النامية بظروف صعبة وقاسية تقل أستجابته للنمو نسيجياً قياساً بالنبات النامي بظروف مثالية .

5. نوع المنفصل النباتي /يؤثر في أستجابة نسيج النمو ويتم أختيار نوع النسيج حسب أهداف الزراعة .

University of Diyala College of Agriculture

م/ الأكثار الدقيقي للنبات Plant Micropropagation

أو أكثار النبات بالزراعة النسيجة Propagation Of Plant By tissue Culture

* أن أكثر أستعمالات زراعة الأنسجة بالوقت الحاضر هو أكثار النبات خضرياً على نطاق تجاري بأستخدام أنسجة من النبات كأطراف الفروع, البراعم الجانبية الساكنة, الأوراق, الدرنات وغيرها من الأعضاء النباتية والأنسجة.

وبنيت هذه التقنية على الأسس الأتية:-

1. ظاهرة أعادة التكوين في الخلايا النباتية Totipotency / وهي أن كل خلية تمتلك المعلومات الوراثية وعوامل النمو الأخرى والتي تؤهلها بأن تعطي نبات كامل .
2. أمكانية الحصول على نباتات عديدة بزراعة أجزاء صغيرة من النبات.

وهناك أربعة مراحل رئيسية تتبع عادة عند أكثار النباتات بهذه الطريقة وقد تكون خمسة مراحل في بعض النباتات وهي:-

أ. مرحلة النشوء Initiation stage /وهي مرحلة تهدف الى أنشاء مزرعة نسيجية معقمة باقية على قيد الحياة.
ب. مرحلة التضاعف Multiplication stage /تهدف هذه المرحلة الى اخلاف الأفرع بأعداد كبيرة.
ت. مرحلة الأستطالة Elongation stage /هذه المرحلة تقتصر على بعض النباتات كالنخيل أذ يتم من خلاله تحفيز الأفرع الناتجة الى الأستطالة قبل التجذير.
ث. مرحلة التجذير Rooting stage .
ج. مرحلة الأقلمة Acclamitezation stage

أولاً /مرحلة أنشاء الزراعة النسيجية:-

تهدف هذه المرحلة الى أختيار الجزء النباتي أو المنفصل النباتي explant ومن ثم يعقم ويزرع على أوساط غذائية معقمة ويحضن في وقت النمو وبذلكيمكن الحصول على مزرعة نسيجية معقمة ومستجيبة للنمو.

*أن أهم متطلبات أختيار النبتة يعتمد بدرجة رئيسية على طريقة الأكثار ولأجل زيادة عدد الأفرع الجانبية المتضاعفة يفضل زراعة أجزاء نباتية تحتوي على براعم خضرية كاملة فأذا كان الهدف أنشاء نباتات خالية من الأمراض الفايروسية نختار الطرف المرستيمي بحيث لايزيد طول الجزء النباتي عن 4ملم وعند خيار الجزء النباتي يتم تعقيمه سطحياً بأستخدام المحاليل المطهرة مثل هايبوكلورات الصوديوم NaOcl بعد تخفيفه بالماء أوكلوريد الزئبق $HgCl_2$ أو الكحول بعد تخفيفه أوبيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 بتركيز يصل أحياناً الى 0.5% أو الحرارة ,ويعتمد تركيز المحلول المعقم ومدة بقاء النسيج فيه على نوع المنفصل النباتي ومصدر النبات الأم وتغسل النبيتات المعقمة بالماء المقطر المعقم عدة مرات لأزالة المادة المعقمة قبل زراعة الجزء النباتي على الأوساط الغذائية والتي تكون صلبة أو سائلة وأن درجة غمر الجزء النباتي للأوساط الغذائي يعد عاملاً مؤثر في موازنة المواد الغذائية والأوكسجين الذي يحصل عليه الجزء النباتي المزروع كما أن نوع الغطاء الزجاجي يؤثر في عملية التبادل الغازي بين محيط الزراعة وخارجه.

ثانياً /مرحلة التضاعف:-

تعتبر هذه المرحلة الأكثر اهمية وحرجاً أذ يتقرر فيها عملية الأكثار كما يعتمد عليها عدد النباتات الكلية الناتجة كذلك نوعيتها وفي هذه المرحلة يتم أكثار الجزء النباتي الذي تتم زراعته في المرحلة الأولى النشوء. وهناك ثلاث مسارات رئيسية للأكثار لهذه المرحلة.

أ. تشجيع نمو الكالس على الجزء المزروع وأنتاج الأفرع من خلال تحفيز البراعم العرضية أو أنتاج الأجنة الجسمية من الكالس أذ يمكن انتاج الكالس من خلال استخدام منظمات النمو النباتية واضافتها الى الوسط الغذائي لاسيما الاوكسينات والسايتوكاينينات اذ ان لها دور كبير في تحفيز نشوء الكالس ومن ثم زراعة الكالس المستحث على اوساط غذائية مجهزة

University of Diyala-College of Agriculture

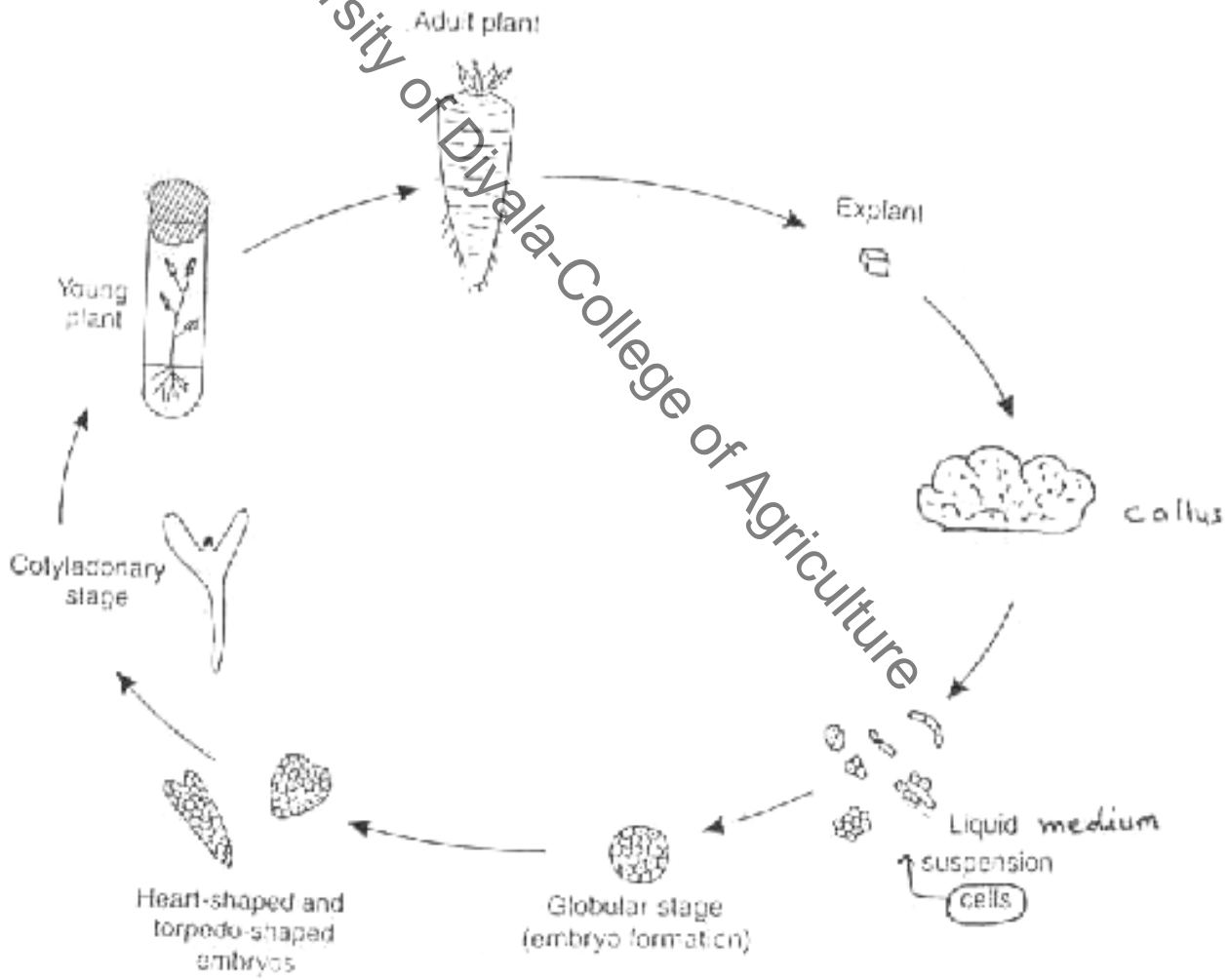
بالأوكسين أو السايتوكانين أو كلاهما بنسب معينة (في نشوء الكالس عادة تكون نسبة الأوكسين أعلى من السايتوكانين في حين تخصص الكالس الى براعم عرضية أو أجنة جسمية تكون نسبة السايتوكانين أعلى من الأوكسين) وبعد زراعتها على هذه الأوساط تحفز نشوء البراعم العرضية وتفصل وتزرع على أوساط غذائية جديدة لتتطور الى أفرع ويتم تجذيرها بصورة مفردة أو ينقل الكالس الى أوساط تشجع تكوين الأجنة الجسمية Somatic embryo أو Embrygenesis والتي تدخل الى مرحلة الأقلمة بعد نموها.

**من مميزات هذا المسار:-

هو الأنتاج الواسع للنباتات بأعداد كبيرة ويعاب عليها هو أن النباتات الناتجة قد تكون متغايرة وراثياً عن النبات الأم بسبب أن الكالس معرض لحدوث ظاهرة التضاعف الكروموسومي وبذلك تحتاج النباتات الناتجة من هذه الطريقة الى فحص جيني للتأكد من السلامة الوراثية لهذه النباتات ومشابهتها للنبات الأم.

*وقد أستغلت هذه الصفة من قبل مربو النبات أذ تم أنتاج نباتات جديدة من خلال زراعة الكالس هذه النباتات مقاومة للملوحة أو لظروف الأجهاد أو ذات أنتاج عالي لبعض الأنواع النباتية.

م/مراحل الأكثار المختلفة للنباتات الناتجة من الزراعة النسيجية



University of Diyala-College of Agriculture

م/تكوين البراعم العرضية Advantions Buds

هي البراعم التي تتكون من أي مكان عدا أطراف الأفرع وأباط الأوراق كما تطلق هذه التسمية على البراعم التي تنشأ من نسيج الكالس وهنا تتم الأشارة الى البرعم العرضي الذي يتكون في أي جزء نباتي عدا نسيج الكالس (الطريقة المباشرة) مثل الأقراق والسيقان والجذور وتعتمد هذه الطريقة أساسآ على البراعم العرضية التي تتكون على الأجزاء النباتية والتي تكون أفرع لاحقآ ومن خلال زراعتها على أوساط غذائية ملائمة في الظروف المثالية وأن هذه الطريقة تعد مفضلة في أكثار النباتات قياسآ بالطريقة الأولى (زراعة الكالس) وذلك لوجود الثبات الوراثي والنباتات تكون متجانسة وراثيآ مع مراعاة أحتمالية أن يكون الأنقسام الخلوي المرافق لعملية تكون البراعم قد حفز نشوء الكالس ثم تكون البرعم من الكالس وليس من الخلايا النباتية وفي هذه الحالة يحتاج البرعم أو النبات الناتج الى فحص جيني.

م/ تكوين الأفرع الجانبية Axillary Buds

تعتمد هذه الطريقة أساسآ على القضاء على ظاهرة السيادة القمية وذلك لتحفيز نمو البراعم الجانبية من خلال اضافة تراكيز معينة من السايتوكانين الى الوسط الغذائي مما يؤدي الى تفتح البراعم الجانبية وتكوين الأفرع.

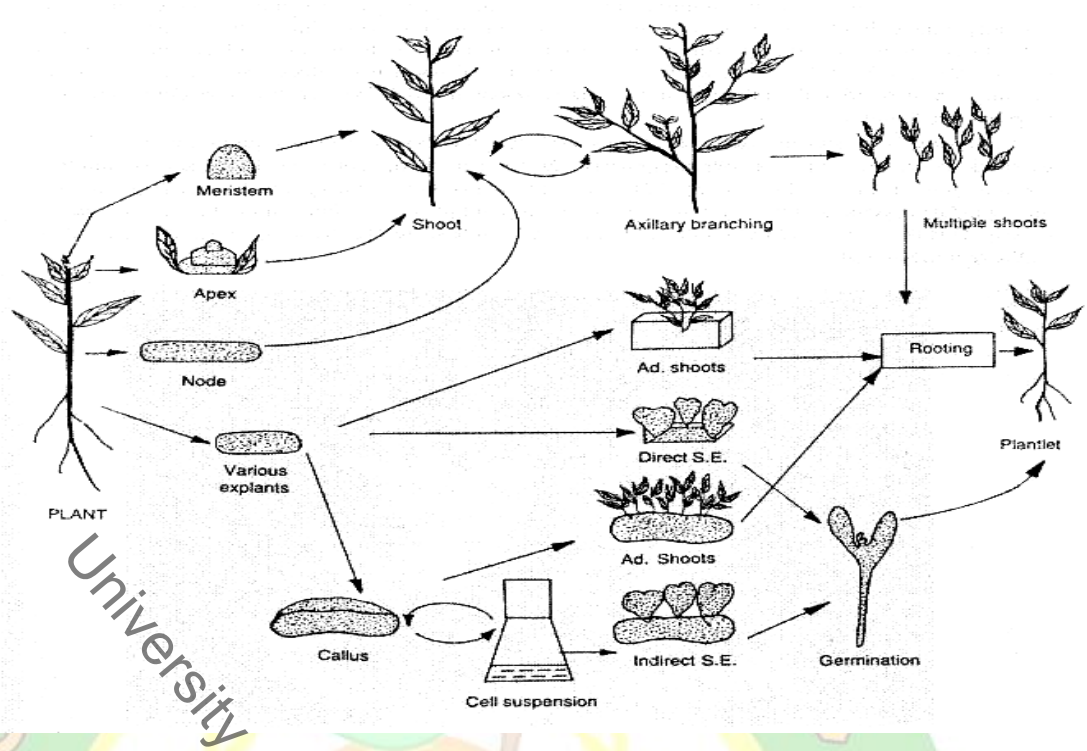
ثالثآ /مرحلة التجذير Rooting stage :-

تحتوي الأجنة الجسمية التي تكونت من خلال الكالس أو من خلايا القطعة النباتية مباشرةآ على جذير وتتطور الى نبيتات صغيرة بعد زراعتها مباشرةآ في الوسط الملائم ونادرآ ما تدخل الأجنة الجسمية في سكون بعد البلوغ ولاتحتاج معاملات خاصة في أنباتها ونموها ويمكن أن تدخل بعد نموها في المرحلة الأخيرة من الأكثار (التقسية والأقلمة) في حين تفتقر الأفرع الناتجة من البراعم العرضية أو البراعم الأبطية النامية على أوساط التضاعف تفتقر الى الجذور ولذلك تنقل هذه الافرع بعد فصلها وتجزئتها الى أوساط غذائية أخرى جديدة مجهزة بالأوكسين بتراكيز معينة (في أغلب الأحيان) وذلك لتشجيع نشوء الجذور العرضية ونموها على هذه الأفرع ويمكن في بعض الحالات تجذير هذه الافرع في ظروف الظلة أو البيت الزجاجي المكيف.

رابعآ / مرحلة الأستطالة Elanation stage :-

هي مرحلة تسبق مرحلة التجذير للأفرع أذ تكون النبيتات الناتجة من مرحلة التضاعف قصيرة وغير صالحة للتجذير أذ تنقل الى أوساط جديدة مجهزة بمنظمات النمو كالجبرلين لتحسين أطوال هذه الفروع.

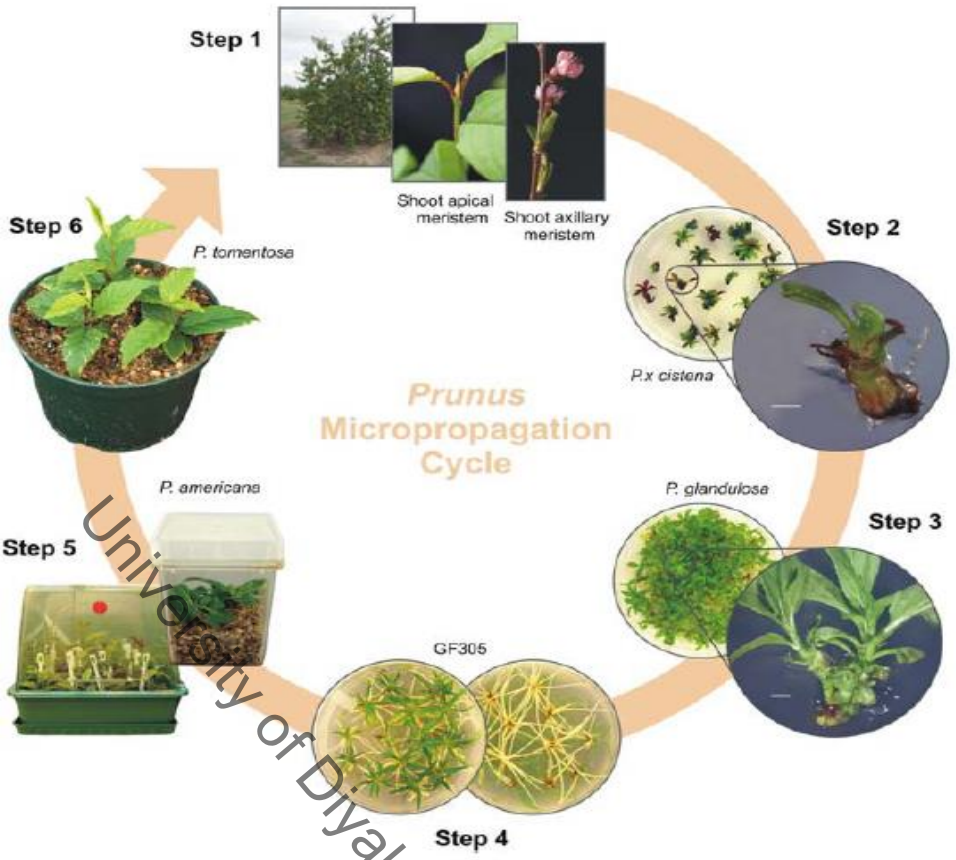
University of Diyala-College of Agriculture



University of Diyala College of Agriculture

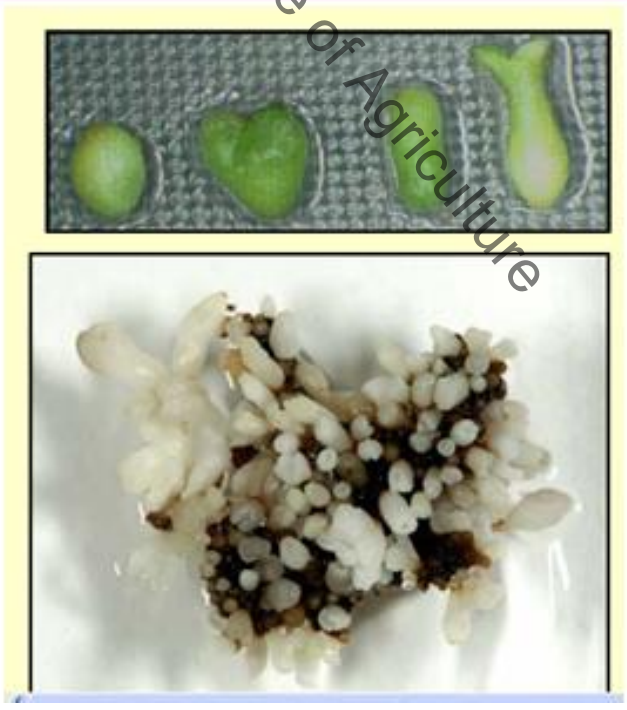
خامساً /مرحلة الأقلمة Acclamitezation stage تقسم هذه المرحلة الى مرحلتين :-

1. **مرحلة التقسية / تكون النبيتات النسيجية الناتجة من مرحلة التجذير أو الأجنة لاتمتلك طبقة كيوتكل أو تكون هذه الطبقة ضعيفة جداً أو مخلخلة أن وجدت ويكون النبات رمي التغذية ولايقوم بعملية التركيب الضوئي وحتى أن قام بذلك فأن نواتج هذه العملية ضعيفة جداً تكاد تكون معدومة لذلك يحتاج النبيت الى أعادة تنهيله ليكون قادراً على النمو طبيعياً في ظروف الحقل من خلال أعادة بناء طبقة الكيوتكل وترشيح عملية التركيب الضوئي ولكي تتم عملية التقسية نقوم برفع النبيتات من الاوساط الغذائية وغسلها بالماء الجاري لإزالة بقايا الوسط الغذائي والأكار وأزالة النموات الخضرية الزائدة عن الحاجة ووضع جذور النبات في محلول مطهر (مبيد فطري) لوقاية الجذور من الفطريات ثم تزرع هذه النبيتات في أصص بلاستيكية أو فخارية تحوي على أوساط زراعية معقمة (التربة النهرية, الرمل, البتموس, البرلايت, الفرميكيولايت وغيرها) ثم نقوم بتغطية الأصص بعد ريها بأغطية بلاستيكية لحفظ المحتوى الرطوبي وتوضع تحت أضاءة أعلى من الأضاءة السابقة لتصل الى 10000 لوكس وذلك لتنشيط التركيب الضوئي بعد مرور أسبوع تقريباً نقوم بتثقيب الأغطية البلاستيكية بثقوب صغيرة ومتباعدة وبعد مرور أسبوع أخر يتم زيادة عدد الثقوب تدريجياً كل يومين الى أن يتم رفع الأغطية البلاستيكية تماماً بعد مرور 3-4 أسابيع وتحتاج النبيتات خلال هذه الفترة ال سقي حسب الحاجة وقد تسقى خلال الأسبوع الثاني أو الثالث بمياه تحتوي على أملاح الوسط الغذائي بنصف أو ربع القوة.**
   ***النباتات الناتجة والباقية على قيد الحياة تحتاج الى عملية أقلمية.**
2. **مرحلة الأقلمة / تنقل النباتات الناتجة من مرحلة التقسية الى البيت الزجاجي ويتم ريها وتسميدها بأنتظام وتحسين نموها وتبقى لمدة شهرين ثم تنقل الى الضلة الخشبية لتستكمل عملية الأقلمة أيضاً لمدة شهرين لتصبح جاهزة للنمو في ظروف الحقل المكشوف.**



University of Diyala-College of Agriculture

ج- استحداث الاجنة الجسمية



م/أستحثاث نمو الكالس وزراعته Initation and Growth of Callus

يطلق على الخلايا البرنكيمية غير منتظمة الشكل السائبة مصطلح الكالس وهو يختلف عن الكالوس Callos والذي هو مواد كاربوهيدراتية متصلبة تقوم بأفرازها بعض أنواع النباتات كالأشجار, والكالس ينشأ عادة من الخلايا المرستيمية ويمكن تحفيز الخلايا غير المرستيمية (المتخصصة) على الأنقسام والغاء التخصص لتكوين الكالس.

من الناحية النظرية يمكن القول بأن النسيج الحي ذي الخلايا المتعددة له القدرة على أعطاء الكالس غير المتخصص وذلك عند وضع الجزء المقطوع منالنبات على وسط غذائي مناسب مجهز بمنظمات النمو عادة السياتوكانين والأوكسين.

س/ ماهي العوامل المؤثرة في أستحثاث الكالس ونموه ؟

ج/يعتمد بدرجة كبيرة على نوع النبات ونوع المنفصل النباتي ومكونات الوسط الغذائي والمغذيات والهرمونات وروف الحضن (الحرارة والضوء) والحالة الفسيولوجية للنبات الأم وهذه العوامل نفسها تؤثر في لون وقوام الكالسالناتج.

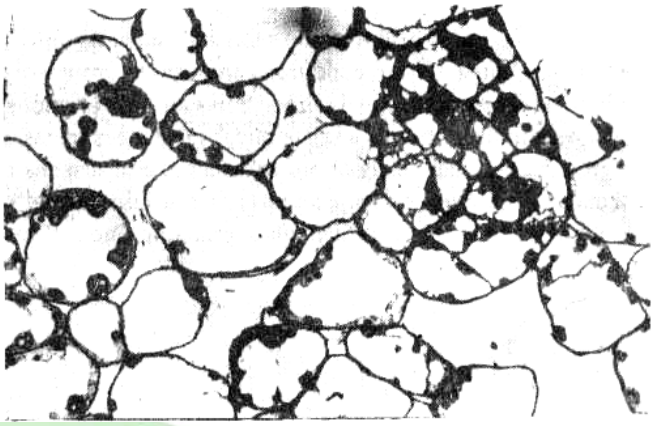
***تعد نباتات ذوات الفلقتين أسهل من ذوات الفلقة الواحدة زأكثر أستجابة لأستحثاث الكالس ونموه وقد حققت نجاحات كبيرة في أستحثاث الكالس من أجزاء مختلفة ونباتات عديدة وكذلك تمكن الباحثون من تنمية خلايا مفردة أو مجاميع خلوية من الكالس وقد أستخدمت هذه التقنية بشكل واسع في مجالات عديدة منها أكثار النباتات تجاريآ لقابلية الكالس على أنتاج براعم عرضية وأجنة بأعداد كبيرة كذلك يستخدم في مجال تطفير النباتات خارج الجسم الحي لأنتاج نباتات ذات صفات وراثية جديدة يستخدم في مجال أنتاج العقاقير الطبية والمركبات الصناعية تجاريآ كما يمكن تضمين الكالس في DNA والبكتريا والفايروسات في أبحاث الهندسة الوراثية وغيرها من الدراسات العلمية المهمة المتعلقة في الأنقسام الخلوي والتمايز والأمتصاص والتمثيل الغذائي.**

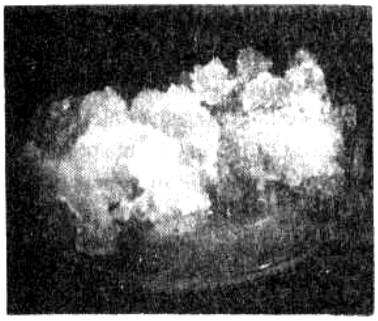
م/ المظهر الخارجي والتركيب الخلوي لأنسجة الكالس

يختلف الكالس المتكون في لونه ومظهره الخارجي وصلابته على نوعية القطعة النباتية ونوع النبات ويتأثر ذلك بمكونات الوسط الغذائي ويكون الكالس أما مفكك هشآ كما في كالس نبات زهرة الشمس ومعظم النباتات العشبية أو يكون صلبآ ذا قوام متماسك كما في كالس نبات البنجر, أما عن لون الكالس فيكون عديم اللون أو أخضر فاتح بأحتوائه على صبغات أشباه الكلوروفيل أو ذو لون أصفر لأحتوائه على صبغة الكاروتين والفلايفونين ولون الكالس يعتمد أساسآ على نوع القطعة النباتية وعوامل أخرى ذكرت سابقآ.

ويشير التشريح الداخلي بأنسجة الكالس على أنه مكون من خلايا مختلفة في الشكل أما تكون صغيرة متماسكة عديمة المسافات البينية أو تكون متوسطة مفككة بوجود مسافات بينية كبيرة ويحتوي الكالس النشط في نموه على خلايا كبيرة ذات فجوات وخلايا صغيرة عديمة الفجوات تكون موزعة في مناطق معينة وظيفتها الأنقسام وزيادة نمو الكالس.

University of Diyala-College of Agriculture





س/ ماهي العوامل التي تجعل خلايا الكالس تعاني من تغايرات وراثية وفسلجية مهمة؟

ج/ 1. طول عمر الكالس ,بزيادة عمر الكالس يزداد أحتمال التغير الوراثي والفسلجي.

2. عدم أمكانية زراعة الكالس وتأخير نقله الى أوساط جديدة يزيد من فر صة حصول التغاير الوراثي.

3.مكونات الوسط الغذائي ,لاسيما منظمات النمو أذ أن النمو السريع جدآ للكالس ممكن أن يحفز التضاعف الكروموسومي

4. العامل الوراثي ,أذ أن بعض النباتات لها القابليةعلى التضاعف الكروموسومي diploid وأنواع أخر أكثر ثباتية.

****أن وجود ظاهرة التضاعف الكروموسومي في أنسجة الكالس تعد مشكلة تواجه مربي النبات ؟ وللتخلص من هذه الظاهرة يمكن زراعة الخلايا المعلقة لأنتخاب الخلايا الأكثر ثباتية وراثيآ.**

س/ ماهي الطرق التقنية في زراعة الكالس؟

ج/1. الوسط الغذائي الصلب Solid Culture Medium

يعد الوسط الصلب من أول الأوساط المستخدمة في أستحثاث الكالس ومن أكثر المواد المستعملة في تصليب الوسط الغذائي هو الأكار Agar وهو مستخلص من بعض أنواع الطحالب البحرية يضاف الى الوسط الغذائي بمعدل 6-8 غم/لتر وهناك أنواع عديدة من الأكار تختلف في درجة نقاوتها أذ يحتوي على بعض الشوائب والتي قد تؤثر على أنتقال المواد الغذائية ويمكن التخلص من هذه الشوائب بغسل الأكار بمادة الكلوروفورم ويمكن أستخدام مواد أخرى لتصليب الوسط مثل الجيلاتين , أن أضافة الأكار الى الوسط الغذائي هو لجعله قادرآ على حمل الجزء النباتي كي لايغرق في الوسط الغذائي ويموت وليس له أي فائدة أخرى.

****من عيوب هذه الطريقة:-**

1. **وجود الشوائب في الأكار والتي قد تؤثر سلبآ في نمو النبات.**
2. **أنتقال المواد الغذائية الى الجزء النباتي يكون غير متساوي أذ أن الجزء الملامس للوسط تكون له فرصة الأستفادة من المواد الغذائية مقارنة بالأجزاء البع8يدة عن الوسط الغذائي.**
3. **غمر القطعة النباتية في الوسط الصلب تؤدي الى توزيع غير متساوي للغازات (Co2,O2) بين الوسط والكالس المتكون عليه.**
4. **تتعرض الكالس الى ظاهرة الأستقطاب بفعل الجاذبية الأرضية وكذلك بالتعرض الى الضوء.**
5. **صعوبة نقل الكالس والأجزاء النباتية المزروعة عليه الى وسط آخر دون حدوث بعض الأضرار.**

University of Diyala-College of Agriculture

2.الوسط الغذائي السائل Lequid Culture Medium

أن مكونات الوسط الغذائي السائل هي نفسها مكونات الوسط الغذائي الصلب ماعدا خلوها من الأكار. هناك طريقتان للزراعة في الوسط السائل:-

أ. الوسط الغذائي السائل الثابت/ تعد هذه الطريقة غير شائعة الأستعمال قياساً بالطرق الأخرى وأستخدمت لأول مرة في عام 1949م من قبل الباحثان Heller & Coutheret أذ يتم فيها زراعة الكالس فوق قطعة من ورقة الترشيح الموضوعة فوق الوسط السائل أذ تعمل كموصل للمواد الغذائية بين الكالس والوسط الغذائي وكذلك تعمل على تثبيت الأنسجة النباتية مع بقاء الجزء النباتي معرض للهواء بصورة مباشرة.

****من مميزات هذه الطريقة:-**

1. **عدم وجود الأكار للتخلص من الشوائب المحتملة مع الأكار.**
2. **يمكن قياس عملية التنفس وتبادل المواد الغذائية بين النسيج والوسط الغذائي وعمليات البناء التي تحدث داخل النسيج بسهولة مقارنة بالزراعة على الوسط الصلب.**

ب. الوسط الغذائي السائل المتحرك/ مكونات الوسط في هذه الطريقة مشابهة للسابق (السائل الثابت) والمختلف هنا أن القطعة النباتية داخل الوسط الغذائي والذي يتم تحريكه بواسطة أجهزة هزازه خاصة وعملية التحريك يسيطر عليه آلياً وتعد هذه الطريقة مثلى لتنمية الكالس وذلك لتجنب المساوى للطريقة الثابتة أذ يتم التبادل الغازي والحصول على المواد الغذائية بصورة مثلى نتيجة تحريك الوسط الغذائي وكذلك القضاء على ظاهرة الأستقطاب بفعل الجاذبية الأرضية وتسمى خلايا الكالس المزروعة على وسط سائل بالخلايا المعلقة Cell Suspension كونها تعلق في الوسط الغذائي أثناء عملية التحريك وقد طورت هذه التقنية من قبل شركات صناعة الأدوية وغيرها أذ صنعت منها أجهزة تحكم متطورة متحكمة بالكمبيوتر سميت بالمفاعل الحيوي Biorectorc أذ يتم فيها السيطرة على مكونات الوسط الغذائي والتبادل الغازي بشكل آلي لتكون الخلايا المزروعة دائماً في طور النمو الأسي.

م/ فسيولوجيا أستحثاث الكالس

أستحثاث الكالس من القطعة النباتية من العمليات المهمة في تقانات النبات الحديثة وتمر قطعة النبات بثلاثة مراحل رئيسية للوصول الى الأعضاء المتخصصة من خلال تحفيز نشوء الكالس.

1. **مرحلة التحفيز Induction stage /تمر قطعة المنفصل النباتي بتغيرات معينة بعد زراعته على الوسط الغذائي الملائم لنشوء الكالس أذ يحدث تغير في تركيب الخلايا وزيادة كبيرة في بعض العمليات البنائية المهمة مثل بناء البروتين والحوامض النووية ويبقى عدد الخلايا وحجمها ثابت. وأن مدة هذه المرحلة تعتمد على عدة عوامل أهمها:- نوع النبات, نوع المنفصل النباتي, مكونات الوسط الغذائي والحالة الفسيولوجية للنبات الأم هذه العوامل تؤثر في الحالة التي يصل الى التحفيز.**

2. **مرحلة الأنقسام Divisio stage /تأتي هذه المرحلة بعد مرحلة التحفيز أذ يحدث تغير متتابع في الفعاليات الحيوية للخلايا في مرحلة التحفيز لتنتهي بعملية أنقسام الخلايا وتكوين كتل من خلايا الكالس على القطعة النباتية مع ملاحظة أن ليست جميع خلايا القطعة النباتية تعطي نفس الأستجابة فالخلايا الخارجية للنسيج فقط هي التي تتحفز وتنقسم مكونة كتلة من الخلايا البارنكيمية التي تحيط بالخلايا غير المنقسمة وخاصة في مناطق الجروح على القطعة النباتية.**

س/ ماهي العوامل المحفزة لأنقسام الخلايا المحيطية للقطعة النباتية لاسيما في مناطق الجروح ؟

ج/ينشأ الكالس من مناطق الجروح بسبب تحرر عوامل الأنقسام في المناطق المجروحة للقطعة النباتية وأن أنقسام الخلايا في محيط القطعة النباتية الملامسة للوسط الغ1ائي فأن هذه الخلايا تحصل على الغذاء من الوسط الغذائي والأوكسجين من الهواء المحيط بالقطعة النباتية.

University of Diyala-College of Agriculture

*هناك بعض النباتات تفرز المركبات الفينولية بمستويات عالية عند فصل الأنسجة منها وأن هذه المركبات الفينولية تفرز من المنفصل النباتي سوف تتأكسد ويحصل الأسوداد البني Browning والذي يؤدي الى تقليل الأستجابة النسيجية للنمو وحتى موت النسيج ولذلك نلجئ الى معالجة الجزء النباتي وذلك بنقعه بمحلول حامضي الستريك والأسكوربك بتركيز 100غم/لتر لكل منهما في ماء بارد بدرجة حرارة الثلاجة ولمدة 15 دقيقة فور فصل الأجزاء النباتية من النبات الأم كمايمكن أضافة الفحم المنشط الى الوسط الغذائي بنسبة2-3% أذ يقوم الفحم بأدمصاص الأفرازات الفينولية الناتجة من القطعة النباتية ومنعها من التأكسد.

3. مرحلة التخصصDeferentia stage /تتحول الخلايا المرستيمية للكالس الى خلايا متمايزة أذ تبدء بتوسع خلايا معينة وتمايز آخر ينتهي بتكوين مبادئ نشوء الأجنة أو الأعضاء ولايوجد هناك مؤشر يفصل ربين المراحل المختلفة في عملية أستحثاث الكالس ونموه وتخصصه.

م/ أعادة زراعة الكالس Reclture Callus

يحتاج الكالس بعد أستحثاثه لينمو ليصل الى الحجم المناسب ويحتاج هذا الكالس النامي الى أعادة زراعة بعد مرور مدة معينة (2-6 أسابيع) وأن عدم أعادة زراعة الكالس يؤدي الى أضرار فسيولوجية في نمو وتطور الخلايا مما يؤدي الى توقف نمو الكالس أو حتى موتهبسبب أستنزاف المواد الغذائية في الوسط الغذائي وجفافه وتراكم النواتج النهائية للفعاليات الحيوية للخلايا حتى تصل الى مستويات سامة وبذلك يجب أعادة زراعة الكالس على أوساط جديدة أو تقسيمه الى أجزاء صغيرة (0.5 غم) وزراعته على أوساط جديدة Subculture .

كما موضح بالشكل الآتي:-

University of Diyala-College of Agriculture

ويمكن قياس الزيادة الحاصلة بنمو الكالس من خلال زيادة حجم الكالس وزيادة الوزن الطري والوزن الجاف وكذلك ممكن قياس زيادة معدل النمو من خلال قياس الزيادة في الأحماض النووية DNA و RNA .

م/ أنتاج مركبات الأيض الثانوي Secondary Metabolities Production

هي أحدى نواتج الخلية غير الأساسية والتي لا تدخل ضمن الفعاليات الأيضية الأساسية والضرورية لنمو وتطور الخلية نفسها والنبات وعماية التركيب الضوئي والتنفس وبناء البروتينات والدهون وغيرها. من هذه المركبات (الفينولات, القلويدات, الكلوكوسايد, التربينات, الفلافينات والعطور وغيرها...) .

ينتج النبات هذه المركبات لأغراض متعددة منها كوسيلة دفاعية بحماية النبات من الظروف القاسية والملوحة ومهاجمت الآفات كالحشرات وتغذية الحيوانات عليها أو لأنتاج العطور أو لأنتاج عطور جذب الحشرات وغيرها من الأهداف الأخرى.

تعد النباتات المصدر الرئيسي لأنتاج العديد من المركبات ذات الأستخدامات الطبية وأن بعض هذه النباتات عند زراعتها خارج الجسم الحي في أوساط زراعية معينة (يتم تحوير الوسط الغذائي حسب نوع المادة المستخرجة ونوع النبات) تنتج هذه المواد ويتم جمعها وتنقيتها والأستفادة منها.

***النباتات النامية في ظروف الحقل in vivo تكون منتجة لهذه المواد لكن أستخلاصها يكون صعب وأن أنتاج هذه النباتات نسيجياً وأستخلاص هذ المركبات منها يكون أسهل من الناحية التقنية.**

س/ ماهي مزايا أنتاج مركبات الأيض الثانوي نسيجياً(*in vitro*)؟

ج/ 1. كمية ونوعية المنتج تكون أكثر ثباتية في حالة الأنسجة المزروعة نسيجياً لأنها لا تتأثر بالظروف البيئية كالحرارة والرطوبة والإضاءة ونوع التربة.

2. أمكانية جدولة الإنتاج بسبب سهولة التحكم والسيطرة على الظروف المختبرية.

3. مشكلة تلوث الإنتاج تكون معدومة لأن الزروعات تكون نامية في ظروف معقمة.

4. أمكانية زيادة الإنتاج لهذه المواد عن طريق تضمين الوسط الغذائي بالمركبات الهادئة لأنتاج هذه المواد أو عن طريق المعالجة الوراثية للأنسجة المزروعة (أدخال جينات مسؤلية عن أنتاج المركبات المطلوبة عن طريق الهندسة الوراثية) للحصول على خلايا ذات إنتاجية عالية لهذه المركبات.

5. الزراعة في المختبر يوفر فرضة جيدة للإنتاج الواسع لهذه المركبات من النباتات.

س/ ماهي السلبيات المحتملة لأنتاج المركبات الثانوية نسيجياً؟

ج/ 1. في زراعة الأنسجة ليست كل الخلايا المزروعة تنتج هذه المواد بسبب توقف النشاط الجيني لأنتاج هذه المواد على المستوى الخلوي.

2 .في زراعة الأنسجة تبقى الأنسجة المزروعة في الحالة المرستيمية غير المتمايزة سوى كانت أنسجة كالس أو معلقات خلوية (خلايا معلقة) وأن هذه الأنسجة المتمايزة مثل انسجة الغدد في النعناع والغدد العطرية في الأزهار والقنوات الزيتية في الكرفس وغيرها من الأنسجة (مع ملاحظة وجود بعض الأستثناءات التي بينت أن أنتاج بعض المركبات من أنسجة الكالس أعلى من أنسجة النبات النامي في الحقل).

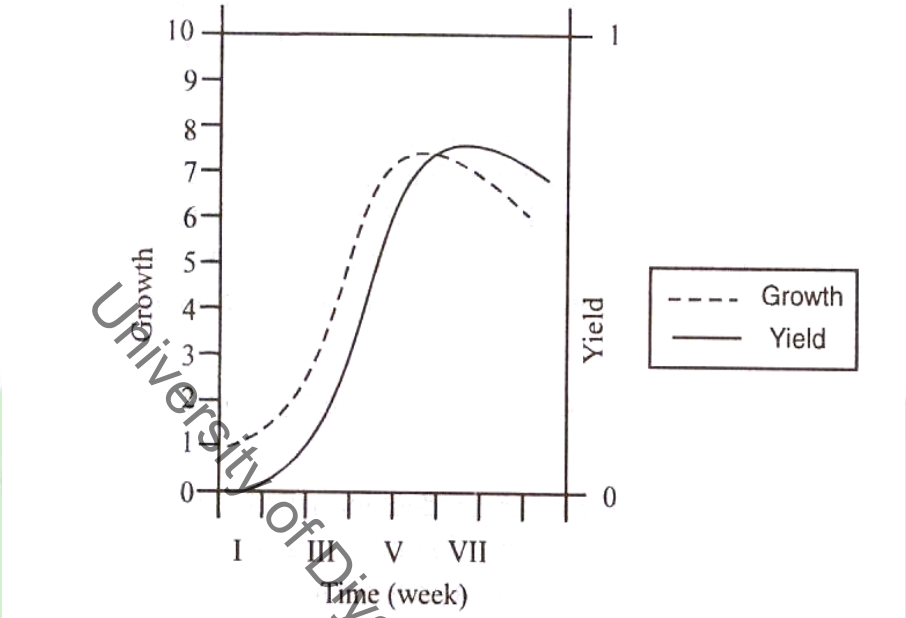
3 .جاهزية البادئات اللازمة لأنتاج هذه المركبات في الوسط الغذائي قد تكون واطئة خاصة على المستوى الخلوي مما يؤدي الى أنخفاض حاد في المنتجات الثانوية.

4 بعض متطلبات النمو النمو للنباتات النسيجية مثل ظروف الحضن مثل الحرارة والأضاءة وبعض مكونات الوسط الغذائي كوجود منظمات النمو والتي تعد ضرورية لنمو هذه الأنسجة هذه العوامل قد تؤثر سلباً في أنتاج بعض المركبات .فعلى سبيل المثال التراكيز العالية من الأوكسين 2,4,D في الوسط الغذائي يقلل أنتاج المركبات الثانوية وكذلك الحال في التراكيز العالية من الفوسفات والنايتروجين.

5 طور النمو للخلايا في مرحلة الأنقسام تؤثر في أنتاج المركبات الثانوية فيزداد الأنتاج في طور الأستقرار مقارنة مع طور الأنقسام السريع.

كما مبين بالشكل الآتي:-

University of Diyala-College of Agriculture



University of Diyala-College of Agriculture

شكل (13-2): نمو وحاصل المركبات الثانوية خلال فترة زمنية يوضح هيئة المنحنى على شكل حرف s.

م/ خطوات أنتاج المواد الثانوية

أنتج المواد الثانوية عبر المسارات الأيضية الثانوية خارج الجسم الحي يكتسب أهمية في مال التقانات الأحيائية وتتزايد هذه الأهمية بأستمرار نتيجة تنافس الشركات العالمية على أنتاج هذ المواد بأنتاج الأدوية والمواد الصناعية أذ تقوم هذه الشركات بأنتاج خطوط خلوية Cell Line التي تتميز بأنتاج كميات كبيرة من هذه المواد الطبية.

هناك طريقتان أساسيةمتبعة لأنتاج الخطوط الخلوية ذات الأنتاجية العالية:-

1. **أستئصال خلية واحدة Single Cell Cloning / نظرياً فأن أستئصال خلية واحدة هي طريقة أفضل لعزل الخلايا التي تنتدج بكميات كبيرةمن المواد الثانوية ومن عيوبها ظهور مجموعة من الخلايا غير المتجانسة لاحقاً بسبب حالة التعدد الكروموسومي diploid أوأسباب أخرى معينة.**
2. **أستئصال مجموعة من الخلايا Grop Cell Cloning / هذه الطريقة أكثر شيوعاً من الطريقة السابقة وأفضل منها وتشمل الخطوات الأتية:-**

أ. **أستحداث تكوين الكالس.**

ب. **أنتخاب مجاميع من الخلايا المتخصصة في أنتاج المركبات المطلوبة.**

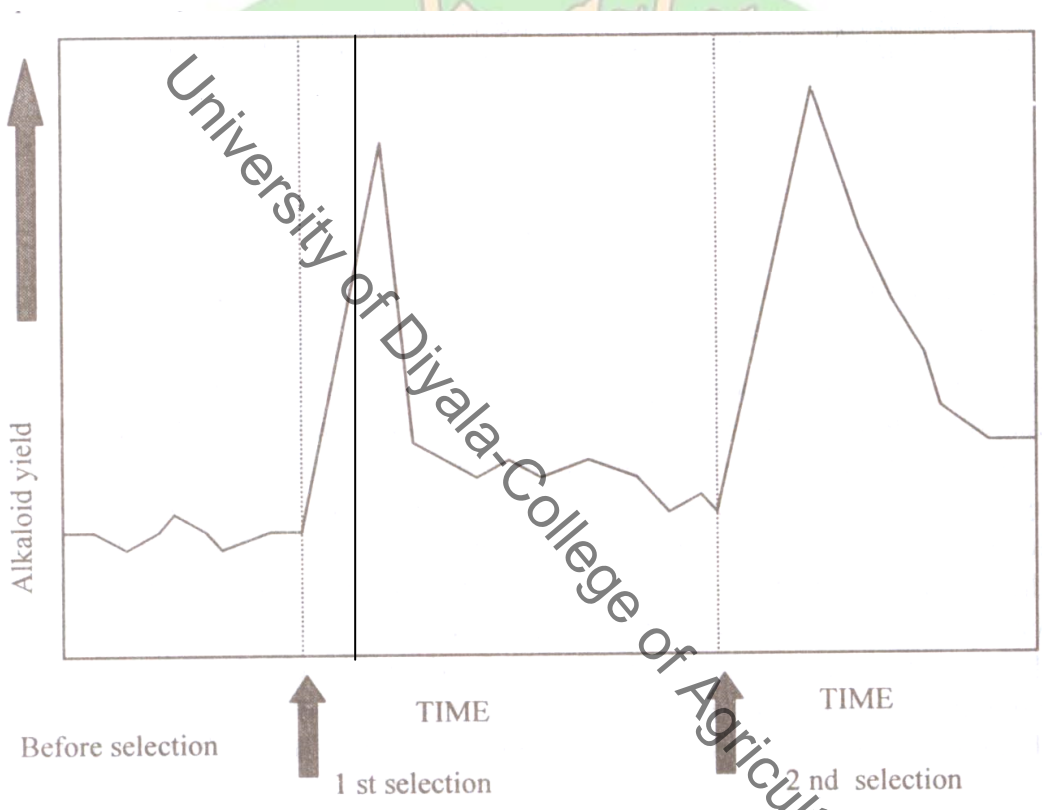
ت. **زراعة المجاميع الخلوية المنتجة بهدف أكثارها.**

ث. **تقسيم المجاميع المنتجة الى نصفين الأول يعاد زراعته Subculture والنصف الثاني يستخدم في أنتاج المركبات الثانوية.**

ج. أعادة أنتخاب المجموعة الخلوية المنجة وأكثارها لضمان المحافظة على الأتاج العالي.
ح. التأكد من ثبات الأنتاج في المجاميع المنتخبة بأعادة الزراعة للكالس في المجاميع المنتخبة وأكثارها.

*يجب المحافظة والأستمرار بعملية الأنتاج للخلايا المنتجة لضمان الأنتاج العالي والتخلص من الخلايا التي تفقد قابليتها على ألانتاج.

المخطط الأتي يوضح مراحل أنتاج المركبات الثانوية خارج الجسم الحي:-



University of Diyala-College of Agriculture

شكل (13-8): تأثير الانتخاب السلالي المتكرر في حاصل القلويديات لسلالات خلايا وأداؤها خلال اعادة الزراعة المتعاقبة لاحظ حصول زيادة في حاصل القلويديات مباشرة بعد الانتخاب.

م/ عزل وزراعة البروتوبلاست Isolation and Culture Of Protoplast

س/ ماهو البروتوبلاست؟

ج/هو عبارة عن خلية منزوعة الجدار الخلوي ونتيجة لازالة الجدار فأن الحاجز بين البروتوبلازم والبيئة الخارجية هو الغشاء البلازمي والذي يتم من خلاله انتقال المواد الذائبة من الخلية النباتية واليها, ويجب وضع البروتوبلاست المنزوع في وسط غذائي ذو اوزموزية متعادلة (iso tonic) كما هو الحال في الخلايا الحيوانية للحفاظ عليها من التلف أذ أن وضع الخلايا المفصولة في محلول ذو أوزموزية عالية يحصل أنكماش للبروتوبلاست أما أذا وضع البروتوبلاست في أوزموزيه منخفضة للمحلول المنظم يحصل أنتفاخ للبروتوبلاست وقد ينفجر, من المواد المستخدمة في تنظيم الأوزموزية في الأوساط الزراعية هي (السكروز, السوربيتول, المانيتول).

س/ ماهي تطبيقات عزل وزراعة البروتوبلاست ؟

ج/

1. **يمكن حث البروتوبلاست المعزول على الأندماج للحصول على نباتات هجينة جسمية Cybrid من خلال دمج بروتوبلاستين أو أكثر للحصول على الهجن الجسميةHeterocaryon**
2. **دراسة نمو وتطور الجدار الخلوي في الأبحاث المتعلقة بفسيولوجيا النبات وبيان العوامل المؤثرة في بناء الجدر.**
3. **يمكن تضمين البروتوبلاست بمكونات الخلية المختلفة كـDNA, المايتوكوندريا والبلاستيدات كذلك أدخال البكتريا والفايروسات في بحوث وقاية النبات في الهندسة الوراثية.**
4. **يمكن أستخدام هذه التقنية في أنتاج هجن مقاومة لروف معينة كأن تكون ملوحة أو أصابة مرضية معينة.**

س/ ماهي المصادر النباتية المستخدمة في عزل البروتوبلاست؟

أو / هل جميع خلايا النبات متاحة لعزل البروتوبلاست؟

ج/ نعم, جميع خلايا النبات الحية متاحة لعزل البروتوبلاست لكن تقنياً جميع الأنسجة تختلف فيما بينها في عملية العزل من حيث صعوبة العزل ويمكن بيان هذه الأنسجة المستخدمة هذا المجال وحسب سهولة فصلها. وكما يأتي:-

1. **<u>خلايا ميزوفيل الأوراق/</u> تعد هذه الخلايا مفككة وتحتوي مسافات بينية ويمكن فصلها بسهولة لأنتاج البروتوبلاست.**
2. **<u>المزارع الخلوية (المعلقة)/</u> تعد المزارع الخلوية سريعة النمو من أكثر المصادر ملائمة لعزل البروتوبلاست وعادة ترشح المزارع الخلوية عبر مرشحات خاصة للتخلص من كتل الخلايا الكبيرة قبل البدء بعملية الفصل.**
3. **<u>الجذور والأعضاء الخازنة/</u> أستعملت الجذور والأعضاء الخازنة كجذور البطاطا ودرناتها والبصل وغيرها من النباتات يعاب على هذه المصدر عند أستخدام الطريقة الأنزيمية للأستخلاص أنها تحتاج مدة أطول من أستخلاص البروتوبلاست من السيقان.**
4. **<u>حبوب اللقاح/</u> تم فصل البروتوبلاست من حبوب اللقاح في العديد من النباتات أذ أن حبوب اللقاح تتوفر بأعداد كبيرة جداً ومتجانسة وراثياً وتوفر فرصة جيدة لدراسة الطفرات والتغيرات الخلوية المختلفة وأن الدمج الطبيعي بين بروتوبلاستين معزولين من حبوب اللقاح يؤدي الى تكوين هجين طبيعي لعدد مضاعف من الكروموسوم (2n), أما جدار الخلايا لحبة اللقاح فيكون معقد من الناحية التركيبية ويكون مقاوم للأنزيمات الهاضمة لذلك يجب أن تعالمل حبوب اللقاح بـمواد مؤكسدة خاصة قبل التحضين بالمحاليل الأنزيمية وأن المرحلة التطورية لحبة اللقاح في النبات الأم تعتبر مؤثرة في نجاح الفصل والزراعة لحبة اللقاح ومن الأفضل أستخدام حبوب لقاح في مرحلة الخلية الأمية لحبة اللقاح أو في مرحلة الرباعيات.**

وعموماً يمكن القول أن البروتوبلاست يمكن فصله من جميع أجزاء النبات الحية الأ أن نجاح العملية يعتمد بدرجة كبيرة على نوع النبات والحالة الفسيولوجية له.

University of Diyala-College of Agriculture

م/ طرق فصل البرتوبلاست

أولآ/ الطريقة الميكانيكية

يتم خلال هذه الطريقة عزل الخلايا المراد فصل بروتوبلاستها وتوضع في محلول يعمل على تحفيز أنكماش البروتوبلاست ثم يجري قص الجدار الخلوي يدوياً وتحت الفحص المهري ثم يعمد الى أنهاء أنكماش البروتوبلاست وسحب البروتوبلاست بواسطة أبر خاصة ويختصر أستخدام هذه الطريقة على الخلايا الحاوي على فجوات كبيرؤة لسهولة أحداث الأنكماش الضروري لعملية الأستئصال (العزل) يمكن الحصول على هذه الأنسجة من الأجزاء الخازنة مثل الجذور والأوراق الحرشفية.

مزايا هذه الطريقة

عدم تعرض البروتوبلاست المعزول الى العمل الأنزيمي والذي قد يؤثر سلباً في حيوية البروتوبلاست المعزول.

مساوئ هذه الطريقة

تحتاج الى جهد ووقت للحصول على البروتوبلاست المعزول فضلآ عن أن كمية البروتوبلاست المعزول تكون قليلة ولا يمكن أستخدام هذه الطريقة لفصل البروتوبلاست من الخلايا المرستيمية البالغة.

ثانياً/ الطريقة الأنزيمية

في هذه الطريقة يتم أضافة بعض الأنزيمات الهاضمة السيلوليز والبكتنيز التقي تقوم بهضم الجدار الخلوي أذ يقوم أنزيم السيلوليز بهضم السليلوز وأنزيم البكتنيز بهضم مادة البكتين لتحرير البروتوبلاست من الجدار , أن تركيز المحلول الأنزيمي ومدة الحضن للخلايا لاالموضوعة في المحلول يعتمد على نوع النبات ونوع النسي المستخدم, على سبيل المثال فأن تركيز 2% من أنزيم السليلوز مع 3% من أنزيم البكتين الى 40-50 دقيقة تعد كافية لفصل البروتوبلاست من الأنسجة للعديد من النباتات مع أنها غير ملائمة للأنسجة الخازنة.

مزايا هذه الطريقة

أنها تعطي بروتوبلاست مفصول بأعداد كبيرة ويمكن أستخدامها بمدى واسع من النباتات والأنسجة المختلفة وسهولة أجرائها.

مساوئ هذه الطريقة

قد تتضرر نسبة من البروتوبلاست المفصول.

م/ تنقية البروتوبلاست

يحوي المحلول الناتج من فصل البروتوبلاست بالطريقة الأنزيمية على بقايا الخلايا المختلفة وخاصة البلاستيدات الخضراء والخلايا التي لم يتم هضم جدرانها والبروتوبلاست المهشمة جزئياً بالأضافة الى البروتوبلاست السليم ويتم التخلص من هذه الشوائب بطرق مختلفة أذ تضاف محاليل لغسل البروتوبلاست ويجري ترسيب هذه المواد بواسطة جهاز الطرد المركزي ويجب مراعاة أوزموزية المحلول أثناء عملية التنقية للمحافظة على حيوية البروتوبلاست.

م/ أختبار حيوية البروتوبلاست

من المهم جداً بعد فصل البروتوبلاست وتنقيته معرفة نسبة البروتوبلاست غير المتضررة والحية من أجل نجاح زراعته على الوسط الغذائي, ومن هذه الطرق:-

1. **الجريان السايتوبلازمي.**
2. **أستعمال صبغة أيفان الزراقاء. Evan Blue**

University of Diyala-College of Agriculture

3. قياس فعالية التنفس والبناء الضوئي.
4. قياس التغير في الحجم,

م/ طرق زراعة البروتوبلاست

طورت العديد من الطرق لزراعة البروتوبلاست في السنوات الماضية وتعتمد كل طريقة علة نوعية البروتوبلاست والغرض من زراعته ومن هذه الطرق:-

1.الزراعة على الأكار/ في هذه الطريقة تزرع البروتوبلاست مباشرة بعد الفصل أو أن البروتوبلاست المفصولة تزرع في أوساط غذائية سائدة من أجل تكوين الجدار الخلوي وبعدها تزرع على طبقة من الأكار والخطوات المتبعة عادة في هذه الطريقة هي مزج البروتوبلاست المفصولة مع وسط الزراعة بنسبة 1% ويكون الوسط حاوي على الأكار وبدرجة حرارة 40-45 م ثم يأخذ كمية قليلة من الخليط الحاوي على الأكار والبروتوبلاست وتنشر فوق سطح الوسط الغذائي الصلب أو تنشر مباشرة في أطباق البتري وبعد مرور مدة سوف ينمو البروتوبلاست مكونآ أنقسامات خلوية على مواقع مختلفة من الأكار المتصلب بعد أ نخفاض درة حرارته.

كما في الشكل الاتي:-

2.الزراعة في القطرة/ تستخدم هذه الطريقة عادة في زراعة البروتوبلاست في المعلق الخلوي توضع قطرة من البروتوبلاست المعلق في الوسط الغذائي حيث توضع هذه القطرة في حفرة في الشرائح المعدة لهذا الغرض ويمنع التبخر من هذه القطرة بوضع القليل من الزيت حول غطاء الشريحة والذي يغطي هذه القطرة وعادة توضع الشرائح في أطباق بتري حاوية على محلول المانيتول لموازنة الرطوبة الداخلية.

كما في الشكل الأتي:-

3.الزراعة في الغرف الدقيقة/ تستخدم هذه الطريقة بصورة شائعة في زراعة البروتوبلاست المفصولة ويمكن من خلال هذه الطريقة ملاحظة التطور في نمو البروتوبلاست من خلاله وهناك عدة تصاميم معتمدة لهذه الغرف والمهم في هذه الطريقة أن البروتوبلاست يوضع في غرف مهيئة لهذا الغرض ويوضع الزيت الطبيعي كغطاء لمنع التبخر. وقد وجد في دراسات حديثة أن أستخدام صبغ الأظافر بدل الزيت كان أفضل في منع التبخر ونجاح الزراعة.

كما في الشكل الأتي:-

م/ نمو البروتوبلاست

بعد زراعة البروتوبلاست في الطريقة الملائمة وعلى الوسط الغذائي الملائم يبدء تكون الجدار الخلوي بحدود 2-3أيام بعدها تحدث عملية تحفيز للأنقسام الخلوي لتكوين مجموعة من الخلايا المنقسمة والتي تكون الكالس وهذا الكالس يستحث لأنتاج الأعضاء أو الأجنة.

University of Diyala-College of Agriculture

م/ أنتاج نباتات خالية من الأمراض الفايروسية

تصاب العديد من النباتات خاصة المكثرة خضرياً بواحدة أو أكثر من المسببات المرضية فعلا سبيل المثال نبات الشليك (الفراولة) تهاجم بـ62 فايروس وأحياء المايكروبلازما مما يجعل من الضروري تبديل النبات الأم سنوياً بنباتات سليمة وقد لاتؤدي الأصابة الفايروسية الى موت النباتات فالعديد منها لاتظهر أعراضه على النبات وأن وجود هذه الفايروسات يعمل على تقليل الحاصل وخفض نوعيته وقد بينت بعض الدراسات أن كمية الحاصل أزدادت بنسبة 300% بعد أستبدال الأمهات المصابة بأخرى سليمة.

أن الفايروسات لاتنتقل عن طريق البذور وبذلك يمكن الحصول على نباتات سليمة من أمهات مصابة من خلال زراعة البذور الأ أن المشكلة في ذلك أن بعض النباتات المكثرة بالبذور وتختلف وراثياً عن النبات الأم كما أن هناك العديد من النباتات لاتعطي بذوراً في القطر (العراق) ونظراً لأن معظم النباتات البستنية تكثر بوسائل خضرية لذا يصبح من الضروري أختيار نباتات سليمة خالية من الأصابات المرضية وجعلها كنبات وأكثارها خضرياً.

/طرق أنتاج النباتات الخالية من الفايروسات

1. <u>المعاملة الحرارية/</u> يتم معاملة النبات الأم بدرجات حرارة تصل الى 38م بأستخدام الهواء الحار بوضع هذه النباتات في صور خاصة وترفع درجة الحرارة تدريجياً لحين الوصول الى هذه الدرجة ويمكن أستخدام الماء الحار أذ توضع فيه الأنسجة المراد زراعتها نسيجياً بعد فصلها عن النبات أذ يمكن القضاء على الكثير من الفايروسات في هذه الطريقة ومدة التعرض تعتمد على نوع النبات ونوع النسيج ومن العوامل المهمة في نجاح هذه الطريقة أن يكون النبات بصحة جيدة لكي يستطيع مقاومة أرتفاع درجات الحرارة وأن يكون التعرض بالتدريج ومع ذلك وجد أن العديد من الفايروسات تقاوم درجات الحرارة العالية وتصبح هذه الطريقة غير فعالة.

2. <u>زراعة المرستيم القمي/</u> أستخدمت هذه الطريقة في أنتاج العديد من السلالات الخالية من الأصابة الفايروسية أذ يتم أستئصال المرستيم القمي بطول لايتجاوز 1ملم وزراعته على أوساط غذائية مناسبة ليتم أنتاج نباتات سليمة من الأصابة الفايروسية وقد بينت العديد من الدراسات نجاح وكفاءة هذه الطريقة للتخلص من الفايروسات وكلما كان حجم المرستيم المفصول صغيراً قلت أحتمالية تواجد الفايروسات فيه وزادت معه نجاح زراعته والعكس صحيح, وبذلك يكون حجم المرستيم المفصول صغيراً بدرجة يكون خالي من الفايروسات وكبيراً بدرجة يعطي نسبة نجاح معقولة وهناك بعض الدراسات التي أجريت بينت وجود أحتمالية لعدم التمكن من القضاء على الفايروسات بنسبة 100%.

س/ ماهي الأسباب المحتملة لخلو المرستيم القمي من الفايروسات؟

ج/

أ. عدم وجود الأنسجة الوعائية في الأنسجة المرستيمية بوصفها ممراً لأنتقال الفايروسات عبرها في أنسجة النبات.
ب. المستويات العالية من الأوكسين في قمة النبات قد تثبط تضاعف الفايروس.
ت. الفعالية البنائية العالية في الخلايا المرستيمية النشطة الأنقسام لاتسمح للفايروس بالتضاعف.
ث. المجموعة المبطلة لفعالية الفايروسات في جسم النبات أذا توفرت فأنها تكون بأعلى فعاليتها في المرستيم مقارنة بالمناطق الأخرى.

3. <u>زراعة الكالس/</u> ليس كل الخلايا الموجودة في كالس مشتق من أنسجة مصابة تحمل المسبب المرضي فقد وجد أن 40% من الخلايا المفردة المفصولة ميكانيكياً من كالس نبات التبغ المصاب بفايروس TMV تحتوي على الفايروس وقد تأكد فعلياً خلو الخلايا من الفايروس من خلال توالد العديد من النباتات الخالية من هذا الفايروس من الكالس المستحث من نبات مصاب كما وتم توالد النباتات الخالية من الفايروس من كالس متكون على طرف الفرع في العديد من الأنواع النباتية.

*أن السببين الرئيسيين المحتملة لخلو بعض خلايا الكالس من الفايروس هي:-

أ. عدم قدرة الفايروس مجارات التوالد السريع للخلايا المنقسمة أثناء نمو الكالس.

University of Diyala-College of Agriculture

ب. أكتساب بعض الخلايا مقاومة فايروسية من خلال التغيير في المكونات الوراثية في الخلية.
*قد لوحظ أن الخلايا المقاومة للأصابة الفايروسية قد توجد متجاورة مع خلايا حساسة في الأنسجة الأم.

*يمكن التخلص من الفايروسات بأستخدام أكثر من طريقة أي تعرض النبات الأم لدرجة الحرارة ثم زراعة المرستيم القمي لأنتاج النباتات بشكل مباشر أو تحفيز نشوء الكالس وتخصصه بالطرق غير المباشرة.

University of Diyala-College of Agriculture

م/ زراعة حبوب اللقاح والمتوك

يعد الحصول على سلالات متجانسةمن النباتات خطوة أساسيةفي العمليات البستنية لمربي النبات ويتم ذلك بأجراء عملية التلقيح الذاتي لعدة أجيال لضمان الحصول على مستوى معين من التجانس الوراثي لهذه النباتات وبتطور زراعة الأنسجة أصبح بالأمكان الحصول على نباتات تحوي على نصف العدد الكروموسومي لمدة قصيرة مقارنة بالطرق التقليدية المتبعة وتكون هذه النباتات عقيمة ويمكن تحويلها الى نباتات خصبة بمضاعفة عدد الكروموسومات بأستخدام مادة كولشسين.
تعود نجاح هذه الزراعة الى عام 1953م أذ تمكن الباحث Tulecke من تحفيز تكون الكالس من حبوب اللقاح ويحمل نصف العدد من الكروموسومات وفي هذه الحالة يحور نمو حبة اللقاح لتكوين الأنبوب اللقاحي الى الأنقسام الخلوي وأعادة تمايز خلاياه الى أجنة تنمو فيما بعد الى نباتات كاملة.

س/ ماهي العوامل المؤثرة في زراعة المتك وحبوب اللقاح ؟
ج/ 1.مرحلة الأنقسام الأختزالي لحبة اللقاح.
2.الحالة الفسلجية للنبات الأم.
3.مكونات الوسط الغذائي.
4.ظروف الحضن.

*أن نجاح هذه الطريقة لازال يواجه بعض الصعوبات أذ أن الكثير من النباتات لم تستجيب لهذه الزراعة لذلك لجئ العديد من الباحثين الى زراعة المتك بالكامل أذ ينشق هذا المتك بعد مرور 4-6 أسابيع ليظهر الكالس أو في بعض الأحيان تظهر أجنة مباشرة من حبوب اللقاح.
ومن محاذير هذه الطريقة:- هو أن النبيتات قد تنشأ من جدار المتك بالأضافة الى نشوءها من حبوب اللقاح أذ تحمل العدد الكامل من الكروموسومات وبذلك يصعب تميزها وفصلها.

س/ ماهي العوامل المؤثرة على تكوين النباتات من زراعة المتك وحبوب اللقاح؟
ج/1. مرحلة تكون حبة اللقاح/ تعد المرحلة المثلى لزراعة حبوب اللقاح وتتباين بأنواع النباتات ولاتوجد مرحلة مثلى لجميع النباتات فقد تكون قبل الأنقسام الأعتيادي الأول أو بعده لبعض النباتات مثل نبات التبغ في حين في نبات الشعير تكون الزراعة مبكرة جداً في مرحلة الخلية الخلية الواحدة.

2.عامل جدار المتك/ تفشل حبوب لقاح بعض النباتات في تكوين الأجنة عند زراعتها دون جدار المتك حتى في المراحل المثلى لتطورها وأن حاجة حبوب اللقاح الى أن تتطور الى أجنة لايعتمد على وجود جدار المتك لنفس النوع وأنما يمكن الأستعاضة عنه بجدار متك مأخوذ من نبات آخر وكذلك ود أن أضافة خلاصات جدار المتك له تأثير مشابه لوجود المتك في تطور حبة اللقاح.

3.نوع النبات والظروف البيئية/ تختلف النباتات فيما بينها في أستجابة حبوب اللقاح لها للنمو أذ يكون قسم منها مستجيب والقسم الأخر لا يستجيب وهي صفة وراثية وأن الظروف التي ينمو فيها النبات الأم تؤثر في حالته الفسلجية وفي أستجابة هذا النبات للزراعة وبذلك فأن النباتات التي يراد زراعة حبوب اللقاح منها يجب أن تخضع الى عناية خاصة كي تعطي نتائج جيدة.

University of Diyala-College of Agriculture

م/ مشاكل زراعة الأنسجة

تقسم المشاكل التي تواجه المزارع النسيجية الى:-

1. **المشاكل العامة**
2. **المشاكل الفسيولوجية**

أولاً/ المشاكل العامة:- وتشمل

1. **التـــــلوث Contamination / وينتج التلوث من أشياء عدة (مصادر التلوث) وهي:-**

أ. **تلوث ناتج من المنفصل النباتي explant**
ب. **التلوث الناتج من الزجاجيات وأدوات الزراعة**
ت. **التلوث الناتج من الأجهزة المستخدمة في تحضير الأوساط**
ث. **التلوث الناتج من الجو المحيط من هواء وأتربة وجراثيم**
ج. **التلوث الناتج من الفنيين العاملين في مجال زراعة الأنسجة**
ح. **التلوث الناتج من أجهزة التعقيم مثل الأوتوكليف**
خ. **التلوث الناتج من عدم نقاوة الكيمياويات المستخدمة**

2. **تعاني بعض النباتات من عدمقدرتها على تكوين الجذور**
3. **صعوبة أقلمة النبيتات النسيجية وموت قسم من هذه النباتات**
4. **بعض النباتات تحتاج وقت طويل أو تجد صعوبة في تكوين الكالس مثل التفاح والثوم ويكون هذا الكالس أن تمكن الباحثون من أنتاجه صعب التخصص**
5. **حدوث تغيرات في التركيب الوراثي للنسيج النباتي أبتداءآ من التعقيم والقطع والزراعة على البيئة.**

ثانياً/ المشاكل الفسيولوجية/ تتعرض مزارع الأنسجة النباتية لبعض المشاكل الفسيولوجية التي لابد من علاجها.

1. **أصفرار القمة النامية Shoot tip necrosis**
2. **الظاهرةالزجاجية Vitrification – Glassiness**
3. **ظاهرة التلون البني Browning**

1. **أصفرار القمة النامية/تعد هذه الظاهرة من العيوب الفسيولوجية الشائعة المتعلقة بمزارع الأنسجة ويؤدي هذا الأصفرار الى:-**

أ. **موت القمة النامية**
ب. **بالحالات الشديدة تتحول الأفرع المتضاعفة الى اللون البني ثم تموت**

***وقد أقترح من بعض الباحثين سبب الأصفرار:-**

1. **أستخدام الأغطية الشديدة الأحكام بأوعية الزراعة يعمل على تراكم الغازات ويقل معدل التنفس حيث تتراكم الأحماض الأمينية والأوكزالات أذ تتحرر الأوكزالات مع الكالسيوم وتجعله غير متوفر للنبات فتظهر أعراض نقص الكالسيوم ويحدث الأصفرار.**
2. **وجد معدل النتح يقل في الأوعية محكمة الغلق أذ يبطئ من أنتقال الكالسيوم للأنسجة النامية.**

لعلاج ظاهرة الأصفرار نقوم بما يأتي:-

1. **زيادة تركيز الكالسيوم في البيئة.**
2. **زيادة التبادل الغازي في أوعية الزراعة وذلك بتقليل شدة الأحكام.**

University of Diyala-College of Agriculture

2.الظاهرة الزجاجية/يسبب الضغط الجذري بعض المشاكل الفسيولوجية للمحاصيل المزروعة في بيئات مكيفة فيما يسمى بالظاهرة الزاجية أو البلل بالماء وتزداد هذه الظاهرة عند نقص الكالسيوم وتزداد الظاهرة بالعوامل التي تساعدعلى نمو المجموع الجذري على حساب المجموع الخضري أذ تصبح النباتات عصيرية ثم تصفر هذه النباتات وقد تموت.

من العوامل التي تؤثر في هذه الظاهرة هي:-

1. **نوع النبات المأخوذ منه الجزء النباتي.**
2. **حجم وعاء الزراعة, الحجم الكبير يزيد من هذه الظاهرة.**
3. **نوع البيئة (الوسط الزراعي) صلبة أم سائلة, البيئة السائلة تزيد من الظاهرة.**
4. **نوعية وتركيز السايتوكانين في الوسط الغذائي, فقد وجد أن البنزاين أدنين في البيئة يزيد من الظاهرة.**
5. **تركيز الكاروبوهيدرات.**

***بينت بعض الدراسات أن مادة الأكار هي المسؤلة عن الظاهرة الزجاجية أ أنه يؤثر في جهد الماءوبزيادة تركيز الأكارفي البيئة كان عامل أساسي في زيادة هذه الظاهرة, وقد لوح على النباتات المصابة بهذه الظاهرة أن أوراقها عريضة وسميكة وعصيرية وغضة أو متجعدة ذات تشوهات واضحة بسبب نقص عمليات اللكننة للأوعية والخلايا.**

3. **التلون البني/ يحدث تلون البيئة (الوسط الزراعي) باللون البني عند زراعة عدد من النباتات نسيجياً وينتج هذا التلون من أكسدة المركبات الفينولية غير الملونة الى ملونة ذات لون بني أو أرجواني ونتيجة الأكسدة تتكون مادة Guinones التي تعتبر سامة للأنسجة والتي قد تؤدي الى موتها ويعتقد الباحثون أن التثبيط الناتج من اللون البني يرجع الى ربط الفينولات مع البروتين ومع ذلك تفقد الأنسجة نشاط بعض الأنزيمات أو تعمل كمعاون أنزيمي لبعض أنزيمات الأكسدة من IAA والاوكسديز والبيروكسديز وغيرها.**

س/ ماهي الطرق المتبعة لتقليل المواد الفينولية في البيئة (الوسط الزراعي) ؟

ج/

1. **صغر حجم المنفصل النباتي فيجبأن يكون الجزء المزروع صغيراً بقدر الأمكان في المنفصل النباتي وتقليل الجرح مع أستخدام أدوات حادة جداً للقطع.**
2. **أستخدام مضادات الأكسدة أما بنقع الأجزاء النباتية فيها أو في البيئة أو كليهما أذ تعمل مضادات الأكسدة على منع بلمرة الكيتون في الفينول وهذا يقلل فرصة تفاعل الفينول مع البروتين, وتستخدم عدة مواد لهذا الغرض منها:-**

أ. **بولي فينيل بيروليدونPVP**
ب. **سستين هايدروكلوريد**
ت. **حامض الأسكوربك (فيتامين C) 100ملغ/لتر**
ث. **حامض الستريك 100ملغ/لتر**

3. **تقليل الأملاح في البيئة (الوسط الزراعي) أذ أن تقليل الأملاح ومنها النايتروجين يقلل من تأثير الفينولات.**
4. **تقليل وجود الهرمونات في الوسط الغذائي أذ أن وجود الأوكسين والسايتوكانين يزيد من المواد الفينولية وأن رفعها من الوسط يقلل الضرر لحين أنتهاء هذه الأفرازات لتنقل بعدها الى وسط يحوي الهرمونات.**
5. **دور الفحم المنشط أذ وجد أن أضافته للوسط الغذائي بمقدار 1-3 غم/لتر يقلل المواد الفينولية وذلك بأدمصاص هذه الفينولات.**
6. **مستوى الأضاءة وجد أن تقليل الأضاءة يقلل من بناء المركبات الفينولية .**
7. **النقل السريع للنبيتات المزروعة على أوساط طازجة جديدة حتى أنتهاء أفراز هذه الفينولات.**

University of Diyala-College of Agriculture