٩- **موازين حساسة:** لوزن الكيماويات وتزن حتى أربع أرقام عشرية.

١٠ - **جهاز تقطير مياه :** ويفضل أن يكون من الأجهزة التى تقوم بتقطير الماء مرتين.

١١- حمام مائى Water bath . ١٢- مقلب مغناطيسى Magnetic steirrer .

١٣- مقياس لشدة الإضاءة LUX Meter . ١٤- ميكروسكوب ضوئى: لفحص الزراعات.

١٥- ثلاجة: لحفظ المحاليل والكيماويات.

الكيماويات: ولابد أن تكون نقية Pure ومصدر صناعتها معلوم ومنها الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والأجار والسكر والفحم النشط والمواد الطبيعية .... الخ.

بيئة زراعة الأنسجة
Tissue culture media

تختلف البيئة المناسبة لزراعة الأنسجة تبعاً لإختلاف النسيج المستعمل وطوره أو مرحلة النمو. ويوجد العديد من البيئات الغذائية التى تعطى للباحث فرصة الاختيار من بينها. وبصفة عامة تتركب البيئة الغذائية من:

١- الأملاح الغير عضوية: Inorganic salts

وتشمل العناصر الكبرى مثل النيتروجين، البوتاسيوم، الفسفور، الماغنسيوم، الكبريت، والعناصر الصغرى مثل الحديد، المنجنيز، النيكل، الكوبالت، الزنك، النحاس، البورون، المولبيدنم.

وهناك العديد من مخاليط الأملاح المعروفة مثل:

Murashing and skoog (MS), White, Nitseh and Nitsch وهذه المخاليط الثلاثة السابقة تناسب معظم النباتات وخاصة M.S ويمكن للباحث إضافة أى عناصر أخرى يراها ضرورية لنجاح الزراعات مثل زيادة تركيز الفوسفور بإضافة فوسفات الصوديوم الإحادية بتركيز 170 ملليجرام/ لتر.

٢- السكريات: Sugars : حيث يستخدم السكروز أو الجلوكوز والفركتوز والمانوز والمالتوز وهذه تستخدم بتركيزات تختلف باختلاف الجزء النباتى ومرحلة النمو فمثلا تركيز 2-4 % ملائمة لزراعة الأجنة، ٥% مناسبة لزراعة القمم النامية، ٧.٥% مناسبة لبيئة التطعيم الدقيق.

٣- الفيتامينات Vitamins :

وهى إحدى المكونات الهامة فى البيئة وعادة يستخدم فيتامين B1 (الثيامين) والبيروركسين وحمض النيكوتين والريبوفلافين، والبيوتين. كما يستعمل الاينوسيتول بتركيز ١٠٠ جزء فى المليون سواء كان فى صورة Myo أو Meso .

٤- الأحماض الأمينية Amino acid :

ومنها الارجنين وحمض الاسبارتيك وحمض الجلوتاميك والتبروزين وترجع أهميتها إلى زيادة نمو الكالس.

٥- المواد الطبيعية : Nutural compounds

وهذه المواد لا تستعمل إلا إذا فشلت البيئات فى إنماء النسيج أو عند الرغبة فى زيادة النمو لأن هذه المواد تحتوى على العديد من الفيتامينات والأحماض الأمينية ومن أهمها :

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

الكازين- صويا ببتون- مستخلص الخميرة والشعير- لبن جوز الهند- اندوسبرم الذرة- لب الموز- عصير البرتقال- عصير الطماطم..... الخ.

٦- منظمات النمو: Growth regulators :

تعتبر منظمات النمو من أهم مكونات البيئة وبدونها قد لا نحصل على أى نجاح من زراعة الأنسجة والأعضاء والخلايا وتشمل منظمات النمو المستخدمة كل من :

- الاكسينات Auxins مثل 2,4-D, NAA, IAA .
- السيتوكينينات Cytokinins مثل الكينتين، الزيتين، BA .
- الجبريللينات Gibrellins مثل GA3 .

وترجع أهمية هذه المنظمات إلى دورها فى انقسام واستطالة الخلايا وكذلك قدرتها على تكشف الأعضاء المختلفة والتوازن بينها له دور هام جداً فى نوع النمو الناتج هل هو نمو Shoot أم جذر Root أم كالوس أم أجنة جسمية Samatic embryos .

إجراءات زراعة الأنسجة

١- تحضير البيئة وتعقيمها Stocks and media prepration .
٢- اختيار نبات الأم Selective of mother plants .
٣- اختيار الجزء النباتى Selective of explant .
٤- تعقيم المنفصل النباتى Sterelization and washing of explant .
٥- نقل الجزء النباتى لسطح البيئة Transfer of the explant to suitable the media .
٦- التحضين فى ظروف مناسبة In cubation of the environment .
٧- تكوين النموات الخضرية Proliferationof shoots .
٨- تكوين الجذور على النموات Transfer of shoots to rooting medium .
٩- تقسية النباتات قبل نقلها للتربة Hardening of plants .

وفيما يلى نبذة عن كل إجراء من هذه الإجراءات:

١- تحضير البيئة:

- تشمل تلك الخطوة إعداد Stocks من مكونات البيئة المختلفة وتخزينها على درجة ٤-٥°م لحين استعمالها وذلك لتوفير الجهد اللازم لوزن هذه المكونات كل مرة بحيث تجدد هذه الـ stocks كل شهر. ويجب أن نأخذ فى الاعتبار أن بعض مكونات البيئة تذوب فى الماء وبعضها لا يذوب فى الماء مثل الكينتين يذوب فى محلول قلوى، BA يذوب فى Hcl والاكسين يذوب فى الكحول أو KOH .
- تخلط مكونات البيئة معاً وتكمل إلى لتر أو إثنين حسب المطلوب بالماء المقطر ثم توضع على المقلب المغناطيسى.
- يضبط الـ PH بإضافة نقط من NaoH 0.1 عيارى أو Hcl ٠.١ عيارى حتى تصبح البيئة ذو PH 5.7± 0.1 وقد تصل إلى PH 6 عند زراعة الجذور.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

- يضاف الأجار بتركيز 0.6 إلى ١% ويذاب على حمام مائى درجة حرارته ١٠٠ °م لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة ثم يضاف الفحم حسب الحاجة ثم توزع البيئة على الأنابيب أو الدوارق المعقمة مسبقاً ثم تغطى وتوضع فى الاتوكلاف للتعقيم.
- تعقم البيئة فى الأوتوكلاف على درجة حرارة ١٢١° م وضغط ١كجم/سم٢ لمدة ١/٤ ، ١/٣ ساعة على حسب حجم البيئة فى الدوارق مع ملاحظة عدم فتح الجهاز إلا بعد نزول الضغط تدريجياً إلى الصفر لأن ذلك قد يسبب غليان البيئة وتطايرها وتطاير الأغطية وكسر الأنابيب والدوارق.
- ويجب مراعاة أن GA_3 يعقم بالترشيح (الفلتر) لأنه يهدم بالحرارة ولذلك يضاف بعد خروج الأنابيب من الأوتوكلاف وبعد أن تصل درجة حرارتها إلى ٥٠°م .
- كما يجب ألا يزيد حجم البيئة داخل الأنبوبة أو الدورق عن الثلث حتى يسمح بالتهوية الجيدة.

٢- **اختيار النبات الأم:** يجب أن يكون النبات الأم فى حالة صحية جيدة وفى بداية نشاطه وذو صفات جيدة وخالى من الأمراض خاصة الفيروسية ويجب أن يكون خرج من طور السكون وخاصة الفواكه المتساقطة- الأبصال- الكورمات- الدرنات.

٣- **اختيار الجزء الذى يستخدم فى الزراعة:** الأجزاء التى تستخدم فى الزراعة هى القمم النامية- الجذور - السيقان - أجزاء الأزهار- أجزاء الثمار- البراعم الأبطية- الأجنة- السويقة الجنينية- نسيج النيوسيلة- الاندوسبرم- الفلقات- النخاع- أجزاء من الأوراق. وكل نبات يؤخذ منه Explant مناسب لزراعة الأنسجة.

- وهناك عدة اعتبارات من الواجب النظر إليها قبل اختيار الجزء المزروع وهى: نوع العضو الذى سيؤخذ منه النسيج- الحالة الفسيولوجية للعضو المأخوذ منه الجزء المزروع- موسم أخذ الجزء النباتى - حجم الجزء المستعمل- العمر الفسيولوجى للمنفصل النباتى وأخيراً الحالة العامة للنبات.

٤- **تعقيم الجزء النباتى:** يغسل الجزء النباتى المستعمل تحت تيار من ماء الصنبور لمدة ساعة للتقليل من التلوث إلى درجة كبيرة ثم تنقع الأنسجة فى كحول إيثايل ٧٠% لمدة ٥ دقائق ويجب ألا تزيد عن ذلك حتى لا يحدث جفاف للجزء النباتى Dehydration . ثم تغمس الأنسجة فى محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز ١% لمدة ٥-٣٠ دقيقة حسب نوع النسيج مع إضافة نقطتين من مادة Tween 20 لزيادة فعل مادة التعقيم. ثم تغسل الأنسجة بماء مقطر معقم ثلاث مرات حتى يتم التخلص من كل آثار محلول التعقيم.

- **تعقيم البذور:** تعقم البذور فى محلول برومين بتركيز ١% لمدة ٥ دقائق ثم تغمس فى محلول الصوديوم هيبوكلوريت ١% لمدة ١٥-٣٠ دقيقة مع استخدام مادة ناشرة ويمكن تعقيم البذور فى محلول كلوريد الزئبق بتركيز 0.1% لمدة ٣٠ دقيقة. وقد تغمس البذور فى كحول ٩٥% ثم تحرق سريعاً على لهب فيتم التعقيم السطحى للبذور.

٥- **نقل الجزء النباتى المعقم إلى سطح البيئة:**

- يتم نقل الجزء النباتى المعقم على سطح البيئة المعقمة مسبقاً فى الأوتوكلاف باستخدام أدوات معقمة وفى حيز معقم وهو جو كابينة التعقيم (الهود) Laminer air flow .
- وعادة يكون الوسط الغذائى (البيئة) فى ثلاث صور هى الصورة الصلبة أو شبه الصلبة والسائلة ويختلف ذلك باختلاف نوع الجزء النباتى المستخدم والغرض من الزراعة فمثلاً نبات الأسبرجس، الجربيرا تنجح زراعتها على البيئة الصلبة. كما وجد أن كالسى الدخان يتخلق عند نقله من على بيئة صلبة إلى بيئة سائلة.
- ويجب أن تزود كابينة الزراعة بمصدر للهب لتعقيم الأدوات المستخدمة فى الزراعة حتى تقلل أو نمنع التلوث تماماً.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٦- **التحضين فى ظروف بيئية مناسبة للمزرعة:** العوامل أو الظروف البيئية اللازم توافرها عند زراعة الأنسجة النباتية هى الإضاءة المناسبة والحرارة المناسبة والرطوبة المناسبة للحفاظ على الأنسجة من الجفاف والموت.

- **الاحتياجات الضوئية:** يجب النظر للاحتياجات الضوئية لمزرعة الأنسجة من حيث طول الفترة الضوئية Day lenth وشدة الإضاءة Light intensity باهتمام كبير لأن ذلك يساعد على نشأة وتخليق الأعضاء Intiation .

- ويرجع صعوبة تكشف الأعضاء فى بعض الزراعات الغير ناجحة إلى عدم تعرضها لشدة الإضاءة المناسبة. ولقد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج فى شدة الإضاءة من ٣٠٠-٣٠٠٠ Lux وفى مرحلة بدايات الجذور يلزم التدرج من ١٠٠٠-٣٠٠٠ Lux .
- أما بالنسبة لفترات الإضاءة والإظلام فإنها تختلف أيضاً باختلاف النباتات ومرحلة الزراعة وقد وجد أن معظم الزراعات يناسبها ٦ ساعات إضاءة، ٨ ساعات إظلام وهناك بعض الزراعات تحتاج لظروف خاصة مثل نبات الجزر فإنه يحتاج إلى ١٢ ساعة إضاءة/ يومياً والقنبيط يحتاج إلى ٩ ساعات.
- كما يراعى أن تكون الإضاءة فى غرفة النمو Growth chamber أو غرفة التحضين مصدرها لمبات الفلوروسنت البيضاء إلا إذا احتاجت بعض النباتات غير ذلك.
- **الاحتياجات الحرارية:** فى معظم الأحيان تكون درجة حرارة ٢٧ °م هل أنسب درجة لنمو الأنسجة فى النباتات الاستوائية. وتكشف الأعضاء يكون بصورة أفضل فى درجات حرارة تتراوح بين ٢٧-٣٥ °م.
- وفى نبات الدخان وجد أن الدرجة المناسبة هى من ١٨-٣٣ °م.

٧- **تكوين النموات الخضرية:**

- اكتشف Skoog & Miller 1969 أن التوازن الهرمونى بين الاكسين والسيتوكينين هو الذى يتحكم فى تكوين النموات الخضرية أو الجذور من كالوس نبات الدخان. ولذلك فإن تكون النموات الخضرية shoots يلزمه وجود مستوى عالى من السيتوكينين فى البيئة مع مراعاة ظروف التحضين فى غرفة النمو كما سبق ذكره.
- كما ذكر أن نمو الكالوس يحتاج إلى محتوى متوازن من الأكسين والسيتوكينين فى البيئة.

٨- **تكوين الجذور:** بعد تكوين النموات الخضرية يتم نقلها على بيئة ذات مستوى مرتفع من الأكسين لتشجيع تكوين الجذور ويختلف بتركيز الاكسين إلى السيتوكينين فى بيئة الزراعة باختلاف نوع النبات.

- وذكر بعض الباحثين أن وجود الجبريللين فى بيئة الزراعة يثبط تكوين الجذور مع ملاحظة ظروف التحضين حيث لوحظ أن الإظلام يشجع تكوين الجذور أو وضع الفحم النباتى النشط فى البيئة والتى تزرع فيها النموات ويعطيها المظهر الغامق يشجع من نمو الجذور.

٩- **تقسية (أقلمة) النباتات قبل نقلها للتربة:** وتعتبر هذه الخطوة من أهم مراحل زراعة الأنسجة لأنها تحدد نجاح هذه التقنية من عدمه. وعادة تنقل النباتات الناتجة من بيئة التجذير إلى بيئة سائلة تتكون من الأملاح والسكر وبعض الفيتامينات والفحم النشط.

- كما يتم تعريض النباتات لشدة إضاءة عالية فترفع إلى 10000 Lux .
- ثم تنقل النباتات إلى أصص أو أكواب بلاستيك بها بيئة مكونة من بيت موس وفيرموكلايت وتوضع تحت وحدة الرى الرزازى Under mist مع تدفئة قواعد الأصص وتغطية النباتات بالبلاستيك الشفاف وأحداث ثقوب تدريجية فى هذا الغطاء ثم تتم إزالته تماماً.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

- تروى النباتات بمحلول هوجلاند مرة فى الأسبوع وذلك لمدة ٣-٤ أسابيع ثم تنقل النباتات إلى الظل ثم إلى الجو الخارجى فى المشتل.

استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للتكاثر

الإكثار الخضرى من أهم طرق الإكثار بالنسبة للكثير من النباتات وخاصة أشجار الفاكهة والنباتات التى لا تكون بذور. ويستخدم فيها الأبصال والدرنات والكورمات والتطعيم وتكوين الجذور على العقل بالإضافة إلى زراعة الأنسجة والخلايا.

وتختلف زراعة الأنسجة عن طرق الإكثار التقليدية فيما يلى:

١- صغر حجم الجزء النباتى المستخدم فى الإكثار.
٢- تتم الزراعة على وسط غذائى صناعى (بيئة صلبة- شبه صلبة- بيئة سائلة).
٣- تتم الزراعة تحت ظروف معقمة وتحت ظروف بيئية مناسبة.
٤- يمكن إنتاج إعداد كبيرة من النباتات فى فترة قصيرة.
٥- خلو النباتات الناتجة من الأمراض وخاصة الفيروسية.
٦- سهولة الاحتفاظ بتلك النباتات وتخزينها لحين الحاجة إليها.
٧- انخفاض تكلفة الإنتاج على المدى البعيد وخاصة عند إنتاج نباتات الزينة والفاكهة غالية الثمن.
٨- يمكن إنتاج النباتات فى أى وقت دون الارتباط بموسم زراعى معين.

- **وتتبع الطرق (الأساليب) التالية لإكثار النباتات باستخدام زراعة الإنسجة:**

١- إنتاج الكالوس: Callus Production
٢- تكوين الأفرع (النموات) الخضرية الجانبية: Axillary branching .
٣- تكوين الأجنة الجسمية: Somatic embryogenesis .

وفيما يلى شرح لكل طريقة من هذه الطرق بالتفصيل:

١- إنتاج الكالوس: وفى هذه الطريقة يزرع الجزء النباتى Explant للحصول على نسيج الكالوس خلال المرحلة الأولى ثم تنقل على بيئة جديدة تركيبها مختلف من حيث المستوى الهرمونى والفيتامينات لتكوين النموات الخضرية العرضية على الكالوس خلال المرحلة الثانية ثم ينقل كل نمو منفرداً على بيئة جديدة تركيبها مختلف لتكوين الجذور خلال المرحلة الثالثة ثم تتم تقسية النباتات تمهيداً لنقلها للتربة خارج المعمل.

- **البيئة المستخدمة Media** : يفضل أن تكون البيئة غنية بالأكسين ١-١٠ مليجرام/ لتر وخاصة 2-4-D لدوره الواضح فى إنتاج الكالوس مع مستوى منخفض من السيتوكينين صفر- ٠.١ مليجرام/ لتر ويفضل استخدام Benzyle adenine (BA) وذلك لتكوين الكالوس.
- ولتكوين النموات الخضرية ينقل الكالوس على بيئة تحتوى على مستويات متكافئة من الاكسين والسيتوكينين ٣-٢ مليجرام لتر أو على بيئة محتواها مرتفع من السيتوكينين ومنخفض من الاكسين حسب نوع النبات.
- كما يفضل خلال هذه المرحلة إضافة سلفات الأدينين [١٥٠ مليجرام/ لتر] وإضافة الكازين [٥٠٠-١٠٠٠مليجرام/لتر] لأنها تساعد على تكوين النموات الخضرية.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

- ولتكوين الجذور على النموات يجب أن تحتوى البيئة على مستوى مرتفع من الأكسين ويستعمل IAA بتركيز ١٠ مليجرام/ لتر أو IBA بتركيز 0.1-3.0 مليجرام / لتر .
- وفى بعض الأحيان تحتوى البيئة على نصف أو ربع أو ثلث تركيز الأملاح وإضافة الفحم النشط.
- **وفى هذه الطريقة يتم إنتاج عدد كبير من النباتات ولكن لها بعض العيوب مثل:**

١- تغير فى صفات النباتات الناتجة لحدوث تضاعف فى خلايا الكالوس.

٢- استخدام 2,4-D يسبب حدوث طفرات قد تكون غير مرغوبة كما فى نخيل البلح.

٢- **تكوين النموات الخضرية الجانبية:** وفى هذه الطريقة تزرع القمم النامية بطول 1-5 مم أو أجزاء من الساق أو الجذر أو الورقة وتزرع على بيئة ذات مستوى منخفض من الاكسين والسيتوكينين (٠.٠١ - ٠.١ مليجرام/ لتر IBA) و (٠.٠٥ - ٠.٥ مليجرام/ لتر BA) أو على بيئة محتواها متوسط من الاكسين والسيتوكينين (٢ ملجيرام/ لتر NAA) و (٢ ملليجرام/ لتر kinetin) . حيث تنمو الأجزاء النباتية إلى أفرخ shoots ثم تنقل النموات على بيئة جديدة لإحداث التضاعف أى زيادة عدد النموات الجانبية.

- ثم ينقل كل نمو منفرداً على بيئة التجذير ثم إحداث الأقلمة كما سبق ذكره فى الطريقة الأولى.

٣- **تكوين الأجنة الجسمية:** ويتم تكوين الأجنة الجسمية على خلايا الكالوس أو على الجزء النباتى مباشرة حيث يمكن إنتاج ما يقرب من ١٠٠٠ جنين لكل جرام من الخلايا المزروعة.

- وفى هذه الطريقة تزرع الأجزاء النباتية على بيئة ذات مستوى منخفض من منظمات النمو (١-١٠ مليجرام من 2,4-D + 0-0.1 مليجرام/ لتر من BA) فتتكون مبادئ خروج الأجنة الجسمية (العرضية).
- فى المرحلة الثانية تنقل الأجنة العرضية المتكونة على بيئة تساعد فى زيادة عدد الأجنة وهذه يزداد فيها تركيز السيتوكينين عن الاكسين زيادة كبيرة (1.0:100). كما يفضل خلال هذه المرحلة إضافة مستخلص الشعير بتركيز 500-1000 مليجرام/ لتر وكذلك إضافة سلفات الأدينين بتركيز ١٠ مليجرام/ لتر وزيادة تركيز النيتروجين والبوتاسيوم.
- ثم بعد ذلك تنقل الأجنة المتكونة على بيئة بسيطة متكونة من الأملاح والسكر والفيتامينات ولا يضاف منظمات نمو وفى بعض الأحيان يضاف الجير يللين لزيادة نمو الأجنة.
- وبعد ذلك تتبع نفس الخطوات السابق ذكرها فى الطريقة الأولى وقد تغلف الأجنحة وتخزن أو تنقل لمكان آخر.

استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات الخالية من الفيروس

يتم الحصول على نباتات خالية من الفيروس باستخدام تقنية زراعة الأنسجة بالأساليب الآتية:

١- زراعة القمة النامية Shoot tip culture .

٢- التطعيم الدقيق Shoot tip micrografting

٣- نشأة الأجنة النيوسيلية Initiation of nucilear embryos

وفيما يلى شرح لكل أسلوب من هذه الأساليب:

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

١- **زراعة القمة النامية:** القمم النامية عادة ما تكون خالية من الفيروس لأن معدل نموها يكون أسرع من معدل تكاثر الفيروس كما أن الفيروس ينتقل ببطء خلال القمة النامية لخلوها من أنسجة الخشب ولذلك تؤخذ القمم النامية بأطوال 0.2-0.5 مم مع ١-٣ من مبادئ الأوراق Leaf primordial. ويمكن أن تعامل القمم بالجيريللين قبل أخذها حتى تستطيل ثم تقطع ويمكن قتل الفيروس بوضع القمم النامية فى ماء درجة حرارته من 30-40° م . ثم يتبع معها نفس التقنية السابق ذكرها فى استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة للإكثار.

٢- **التطعيم الدقيق بالقمة النامية:** وفى هذه الطريقة تتم زراعة بذور الأصل المراد التطعيم عليه بعد تعقيمها وغسلها بالماء المقطر على بيئة مكونة من أملاح M.S دون إضافة أى منظمات نمو.

- ويمكن الحصول على القمم النامية اللازمة للتطعيم من النموات الحديثة بالأشجار المنزرعة فى البستان أو الصوب ثم تعقم وتغسل بالماء المقطر وذلك داخل كابينة الزراعة.
- تنقل البادرات الناتجة من زراعة البذور داخل كابينة الزراعة ثم نقوم بعمل قطع على شكل حرف T مقلوبة ثم توضع القمة النامية داخلها وذلك باستخدام أدوات معقمة ثم تغلق الأنابيب وتحضن داخل غرفة النمو تحت ظروف بيئية مناسبة حتى تمام الالتحام بين الأصل والطعم ونمو الطعم إلى Shoot ثم يجرى لها عملية الأقلمة ونقلها إلى الصوبة ثم إلى المشتل ثم إلى الأرض المستديمة بعد وصولها إلى الحجم المناسب.
- وقد نجحت هذه التقنية فى إكثار العديد من أشجار الفاكهة مثل الموالح (الحمضيات).

٣- **نشأة وإنتاج الأجنة النيوسيلية:** تنتج الأجنة الخضرية النيوسيلية طبيعياً فى العديد من النباتات مثل بعض أنواع الموالح وبعض أصناف المانجو ولكن يصعب تكوينها فى النباتات وحيدة الجنين. ولإنتاج مثل هذه الأجنة من نسيج النيوسيلة هدف هام حيث أن هذه الأجنة تكون خالية من الفيروس.

- ويتم ذلك بالحصول على ثمار غير ناضجة (بعد حوالى ١٠٠- ١٢٠ يوم من التلقيح والإخصاب) ثم تعقم سطحياً وتستخرج منها البذور ثم ينزع منها الجنين الجنسى ثم يزال النسيج النيوسيلى ويزرع على بيئة غذائية معقمة سبق إعدادها حيث تتكون الأجنة مباشرة على نسيج النوسيلة أو يتكون الكالوس أولاً ثم تتكون عليه الأجنة النيوسيلية بعد ذلك.
- وقد وجد أن الاكسين (NAA) بتركيز ٠.١ مليجرام/ لتر يشجع تكوين الأجنة. كما وجد أن التركيز المنخفض من السيتوكينين (٠.٠١ مليجرام/ لتر) يشجع تكوين الأجنة والتركيز العالى يثبط إنتاجها.
- كما وجد أن مستخلص الشعير بتركيز 500-1000 جزء فى المليون والأدينين سلفات بتركيز ٢٥-١٠٠ جزء فى المليون يشجع على تخليق الأجنة العرضية على نسيج النيوسيلة.
- كما لوحظ أن تعريض الزراعات لدرجة حرارة ثابتة ٢٧ °م وإضاءة خافتة ١٠٠ قدم/ شمعة يشجع تكوين الأجنة من الينوسيلة.

إستخدام زراعة الأنسجة فى إنتاج المواد العلاجية والطبيعية

تستخدم الكثير من النباتات كمصدر للحصول على كثير من الفيتوكيماويات مثل القلويدات، الجلوكسيدات، الكحولات والفينولات وهى جميعها مركبات ثانوية لعمليات الأيض الغذائى داخل النبات وهذه النباتات تعرف بالنباتات الطبية والعطرية. وهذه المواد الطبيعية تستخدم فى العديد من الصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل ومكسبات الطعم والرائحة للصناعات الغذائية.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

وعلى سبيل المثال فإن المواد العطرية التى تستخرج من النباتات فى العالم تعادل ما قيمته أكبر من ١.٥ مليون دولار سنوياً مما يظهر أهميتها الكبيرة.

- **ويعترض استخلاص تلك المركبات كثير من المشاكل أهمها:**

١- النباتات الطبية العطرية تنتج فى مواسم محددة وليس طول العام فهى غالباً نباتات عشبية غير معمرة.
٢- اختلاف نسب تلك المواد الثانوية تبعاً لتغير الظروف البيئية المؤثرة فى إنتاجها.
٣- تعرض النباتات للأمراض والآفات فى المزرعة.
٤- الحاجة إلى مساحات كبيرة من الأرض لزراعة تلك النبات.
٥- تحتاج إلى جهد كبير لإنتاجها وجمعها ونقلها إلى مصانع الاستخدام.

- ولذلك تم التفكير فى استخدام تقنية زراعة الأنسجة للحصول على هذه المركبات دون التعرض للمشاكل السابق ذكرها. حيث أشار بعض الباحثين إلى إمكانية استخدام زراعة الأنسجة للحصول على الفيتوكيماويات وذلك بزراعة أجزاء تختلف باختلاف النبات مثل المريستيمات، الجذور، الأوراق وأنسجة الثمار الغير ناضجة لأن النبات الطبى والعطرى لا يقوم بإنتاج المادة الفعالة من كل الأجزاء بل من جزء معين مثل إنتاج المانيتول من أوراق النعناع ومادة الأتروبين من جذور نبات الأتروبا وزيت الياسمين من أزهار الياسمين.
- ولذلك تزرع الأجزاء النباتية Explants لإنتاج كتل من الخلايا المعروفة باسم الكالس Callus . وكذلك بزراعة معلقات الخلايا من تلك النباتات.
- وكانت أول الدراسات التى تناولت إمكانية الحصول على الفيتوكيماويات مثل الزيوت العطرية ما قام بها بعض الباحثين عام ١٩٧٦ من زراعة الأنسجة الغير متميزة لنبات البابونج.
- كما قام بعض الباحثين عام ١٩٧٨ من إنتاج الزيت العطرى من زراعة شرائح من أوراق وسيقان نبات الكافور.
- كما تمكنت إحدى الشركات اليابانية عام ١٩٨٣ من استخدام تقنية زراعة الأنسجة تجارياً لإنتاج صبغة الشيكانين الحمراء.

إنتاج مكسبات الطعم باستخدام زراعة الأنسجة

- مكسبات الطعم فى الفواكه عبارة عن مركبات تتكون أثناء نضج الثمار عندما يتحول التمثيل الغذائى فى الثمرة ناحية الهدم Catabolism حيث توجد كميات قليلة من الدهون والكربوهيدرات والبروتينات حيث تحول تدريجياً إلى رائحة الثمار وطعمها المميزان لها. ولذلك فى معظم الحالات نجد أن هذه المواد لا تتكون فى الخلايا الغير مخلقة.

- وقد اقترح بعض الباحثين عام ١٩٨٣ أنه لم يكن فى الإمكان تكوين الزيوت العطرية من زراعة أنسجة الليمون، الخوخ، الزبدية، التفاح لغياب الغدد الزيتية الضرورية لبناء وتراكم الزيوت العطرية.

- كما أكد بيكر Becker عام ١٩٨٤ هذه النتيجة وقال أنه لم يتمكن من الحصول على الزيوت العطرية بكلس نبات الينسون والنعناع الفلفلى إلا عند تخليق النباتات على الكالوس وإنتاج الزيوت العطرية من هذه النباتات.

- ولكن تمكن بعض الباحثين من استخلاص بعض المواد من كالوس الكاكاو وكالوس النعناع والفلفل. وبصفة عامة فإن النواتج الثانوية لعملية التمثيل تتأثر ببعض العوامل.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner