العوامل المؤثرة على إنتاج النواتج الثانوية لعملية التمثيل الغذائى

١- مكونات البيئة (الوسط الغذائى).

٢- الظروف البيئية:

أ- الضغط الاسموزى. ب- الضوء. جـ- المحتوى الغازى. د- درجة أيون الهيدروجين PH . هـ- المظهرات Elicitors .

٣- نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه.

١- مكونات البيئة:

- تختلف الاحتياجات الغذائية المشجعة على تخليق الفيتوكيماويات تبعا لنوع النبات ففى كثير من النباتات يدفع المستوى العالى من الأملاح على تكون تلك المركبات. فى حين وجد أن زيادة النيتروجين فى البيئة الغذائية يؤدى إلى نقص النواتج الثانوية حيث أدى زيادة النيتروجين إلى ٣% فى البيئة إلى تثبيط إنتاج مادة الشيكونين Shikonin .
- كما لوحظ أن زيادة الفوسفور مفيد فى إنتاج الفتيوكيماويات.
- ووجد أن زيادة نسبة السكر عن ٥% يسبب رفع الضغط الإسموزى فى الوسط الغذائى مما يسبب زيادة إنتاج المركبات الثانوية.
- كما أوضحت الدراسات إن إضافة منظمات النمو وخاصة الاكسينات تؤثر فى إنتاج الفيتوكيماويات وتشجعها.
- كما لوحظ أن إضافة المواد الطبيعية مثل مستخلص الخميرة ولبن جوز الهند والكازين يؤدى إلى زيادة الفيتوكيماويات الناتجة من الكرفس.

٢- الظروف البيئية:

أ- الضغط الاسموزى: أشار الباحث رومانى Romani ومساعدوه عام ١٩٧٩ عند زراعة معلقات خلايا الكمثرى يزداد إنتاج الإيثلين عند رفع الضغط الأسموزى للبيئة. كما لوحظ أن إضافة المانيتول وحمص الاسكوربيك بتركيزات عالية يؤدى إلى رفع الضغط الاسموزى للبيئة مما يسبب زيادة إنتاج القلويدات الناتجة من زراعة خلايا وأنسجة الفلفل.

ب- الضوء: وجد أن للضوء تأثير هام على إنتاج كثير من الإنزيمات المسئولة عن إنتاج الفيتوكيماويات الهامة فى النبات. وتؤثر كل من شدة الإضاءة ومدة الإضاءة فى إنتاج الصبغات عند زراعة خلايا الجذر. كما لوحظ أن صبغة الأنثوسيانين لا تتكون عند غياب الضوء.

جـ- المحتوى الغازى: وجد أن غازات وسط الزراعة لها تأثير هام على إنتاج المواد المكسبة للطعم فى التفاح والعنب ففى دراسة قام بها بعض الباحثين عام ١٩٨١ وجدوا أن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون فى وسط الزراعة أدى إلى زيادة إنتاج بعض المواد مثل الايثيل أسيتات إيثانول.

د- درجة أيون الهيدروجين (PH) : فى دراسة على معلقات نبات الفلفل الحار وجد أن درجة أيون الهيدروجين (PH) فى الوسط الغذائى لها تأثير هام على إنتاج القلويدات من خلايا النبات. كما وجد أن رفع الـ PH من ٤.٥ إلى ٥.٥ يزيد من إنتاج صبغة الانثوسيانين عند زراعة خلايا الجزر.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

هـ- المظهرات: Elicitors ويقصد بها مظهرات النواتج الثانوية مثل خلايا البكتريا والفطر الضعيفة. حيث أن مهاجمة الكائنات الميكروبية للخلايا النباتية تؤدى إلى زيادة تكوين النواتج الثانوية للتمثيل الغذائى مثل الزيوت العطرية والفينولات والقلويدات والتى تعتبر فى حقيقتها ذات نشاط مضاد للكائنات المرضية. ولكن هذا يحتاج إلى مزيد من الدراسة لتوضيح هذا الدور.

٣- نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه:

- حيث تختلف المركبات الثانوية الناتجة باختلاف نوع الجزء النباتى ومرحلة نموه فمثلاً زراعة أجزاء نباتية معينة مثل الأوراق أو الجذور لا تنتج مواد ثانوية إلا إذا أعطت نسيج كالسى ثم تخلقت نباتات على الكالس مثل الينسون، الشمر والنعناع.
- كما لوحظ أن كمية النواتج الثانوية تختلف باختلاف مرحلة نمو الجزء النباتى حيث أن نسيج الكالس أو معلقات الخلايا تعطى كمية كبيرة من النواتج الثانوية عن الكمية الناتجة من زراعة الأعضاء الكاملة مثل البراعم أو القمم النامية حيث أن هذه الأعضاء تتجه إلى الزيادة العددية أو التضاعف على حساب إنتاج الفيتوكيماويات.
- كما وجد أن كثير من الخلايا الغير متميزة لا تستطيع تخليق الفيتوكيماويات ولذلك كان حث الخلايا على التميز وتكوين الأعضاء من الأشياء الدافعة لتكوين تلك النواتج حيث وجد بعض الباحثين أن الكالس الغير متميز لنبات الاثروبا لا يكون قلويد الاتروبين والهيوسامين بينما أمكن تكوين تلك القلويدات عند تميز الكالس إلى جذور.
- كما وجد بعض الباحثين أن نسبة الزيت المأخوذة من الكالس نبات الكافور كانت أعلى عند أخذ الجزء النباتى من نبات فى مرحلة الطفولة.

استخدام زراعة الأنسجة فى خدمة مربى النبات

تخدم تقنية زراعة الأنسجة مربى النبات فى مجالات عديدة من أهمها ما يلى:

١- زراعة المتك أو حبوب اللقاح للحصول على نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية.

٢- زراعة الأجنة الناتجة من الهجن الجنسية البعيدة.

٣- إحداث التضاعف Polypoildy والحصول على الطفرات.

١- زراعة المتك وحبوب اللقاح Anther and pollengrains culture

قدم بعض الباحثين عام ١٩٧٤ أول تقرير عن زراعة المتوك وحبوب اللقاح ومن بعدهم استخدم العديد من الباحثين هذه التقنية فى إنتاج النباتات الأحادية فى العديد من النباتات مثل الداتورة والأرز والقمح والذرة والدخان والبطاطا والقطن وفول الصويا والفلفل وذلك بغرض التحسين الوراثى وإنتاج نباتات متماثلة Homozygous والتى تدخل فى برامج التهجين للحصول على قوة الهجين.

- **تقنية (تكنيك) الزراعة:** تعقم البراعم الزهرية قبل تفتحها ثم تفصل المتوك وتزرع على بيئة الأجار المناسبة السابق إعدادها. ويشترط أن تكون حبوب اللقاح داخل المتوك ناضجة حتى تنمو إلى أجنة دون أن تمر بمرحلة الكالس لأن الأجنة الناتجة من الكالس يمكن أن يكون بها تغيرات نتيجة لحدوث طفرات.
- أما عن زراعة حبوب اللقاح فبعد تعقيم البراعم الزهرية وقبل انتشار حبوب اللقاح مباشرة تنقل حبوب اللقاح بفرشاة معقمة من المتوك إلى محلول مغذى بحيث تكون كثافة حبوب اللقاح فى معلق البيئة ٤-٥×١٠^{٤} حبة لقاح لكل / ملل محلول.
- ثم يمرر هذا المحلول على فلتر ذو ثقوب دقيقة ثم يستقبل الراشح فى أنبوبة جهاز الطرد المركزى المعقمة وتطرد مركزيا بمعدل ١٠٠ لفة / دقيقة لمدة ٥ دقائق ثم يخلط معلق حبوب اللقاح مع كمية مساوية من البيئة الصلبة وتصب فى أطباق

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

بترى وتحضن على درجة حرارة ٢٥°م فتنمو حبوب اللقاح إلى أجنة خضرية مباشرة أو يتكون الكالس أولاً ثم ينقل على بيئة مناسبة لتخليق الأعضاء.

- وقد وجد أن جدار المتك يلعب دوراً هاماً فى تخليق الأجنة فقد أمكن بعد الباحثين من إنتاج نباتات أحادية المتك فى عملية تخليق الأجنة الخضرية من حبوب اللقاح وفيه يتم عمل شرائح من متوك الأزهار وتوضع على سطح البيئة الغذائية المناسبة وتوضـــ
على سطح البيئة الغذائية المناسبة ويوضع فوقها شرائح من ورق الترشيح ثم يتم إسقاط نقطة من معلق حبوب اللقاح بالماصة فتتلامس مع جدار المتك بشكل غير مباشر مما يشجع تكوين الأجنة العرضية من حبوب اللقاح.

البيئة المناسبة: Media

- تختلف الاحتياجات الغذائية لزراعة حبوب اللقاح والمتوك بإختلاف الأنواع والأصناف فالبعض يحتاج إلى بيئة بسيطة مثل متوك الدخان والتى تنمو على بيئة مكونة من سكر وحديد مخلبى فقط بينما البعض الآخر يحتاج إلى بيئة معقدة للغاية وعادة تستعمل بيئة White 1963, Nitsh 1969, M.S, 1962 وفيها يستخدم السكروز بنسبة تتراوح بين 2–3 % وقد يزيد إلى ٦% فى بعض النباتات.
- والسكر فى بيئة الزراعة يمد حبوب اللقاح بالكربوهيدرات ويقوم بدور منظم للضغط الأسموزى اللازم للحفاظ على حبة اللقاح دون انفجار. وقد وجد أن بعض النباتات تحتاج للسكروز بنسبة عالية للمحافظة على الضغط الأسموزى المناسب كما فى القمح يحتاج إلى سكروز بنسبة ٩%، الذرة ١٢% .
- وقد أشار الباحث Chaphan 1973 إلى أن التركيز العالى من أيون الأمونيوم يثبط من تكوين الأجنة عند زراعة حبوب اللقاح فى نبات الأرز. كما أشار نفس الباحث أن إضافة لبن جوز الهند إلى البيئة بنسبة ١٠–١٥% يفيد فى إنتاج الأجنة الخضرية من المتك.
- أما عن الأحماض الأمينية والفيتامينات والهرمونات (منظمات النمو): فقد أشار بعض الباحثين أن إضافة الإحماض الأمينية مثل الجلوتامين، السيرين، الاسبراجين، التيروسين بتركيزات ١–٣ × ١٠^{٣} يفيد فى تكوين الأجنة من المتك. كما أن إضافة الفتيامنيات مثل حمض الفوليك، الريبوفلافين٠.٥ جزء فى المليون والجليسين 0.2 ppm والبيوتين 0.5 ppm ضرورى لتكوين الأجنة من المتك. كما وجد أن إضافة الكينتين يقلل أو يثبط من تكشف الأجنة الخضرية ولذلك يضاف الأكسين منفرداً مثل IAA بتركيز (0.1–0.5ppm) ، NAA بتركيز (0.1–0.2ppm) . كما يمكن إضافة حمض الجيريلليك GA بتركيز (1.0ppm) للأسرع من تكوين ونمو الأجنة.

تحديد طور المتك: Anther stage

يمكن تحديد مراحل تكوين الجاميطات المذكرة باستعمال طريقة الاسيتوكارمن لمعرفة أنسب مرحلة يمكن أن تعطى الأجنة. وقد وجد أن تلك المرحلة تختلف باختلاف النبات فمثلاً فى القمح ثم إنتاج النباتات الأحادية من جميع مراحل تكوين حبوب اللقاح وهى:

PMC: Pollen mother cell. EUS: Early uninuclate stage.

IUS: Intermediate uninuclate stage. LUS: Late uninuclate stage.

أما عن الكالس فيتكون من جميع مراحل تكوين حبوب اللقاح ماعدا مرحلة Pollen mother cell (PMC).

- **بعض المعاملات التى تجرى على المتك قبل الزراعة لتشجيع تكوين الأجنة:**

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

١- أشار عدد من الباحثين على أن المعاملة بالحرارة الباردة للمتوك قبل الزراعة يشجع من تكوين الأجنة ويزيد من عدد حبوب اللقاح النامية لإنتاج الأجنة العرضية وذلك بتعريض البراعم الزهرية لدرجات حرارة 5°م لمدة ٧٢ ساعة أو 3°م لمدة ٤٨ ساعة.

٢- كما يمكن إعطاء صدمة للبراعم الزهرية بقطع أطراف النورات الزهرية قبل استعمال البراعم فى الزراعة.

٣- كما وجد بعض الباحثين عام ١٩٧١ أن تعريض البراعم الزهرية لأشعة جاما يشجع تكوين الأجنة من المتوك.

٤- كما أمكن تشجيع الأجنة من متك الطماطم عن طريق نقع البراعم الزهرية فى محلول 2,4-D بتركيز ١٠مجم/ لتر لمدة ٦ ساعات على درجة 4°م فى الظلام. ومما سبق نجد أن معاملات ما قبل الزراعة تشجع تكوين الأجنة.

- **الظروف البيئية المناسبة لتحضين الزراعات:** وجد أن تحضين الزراعات فى الظلام يشجع من تكوين الأجنة العرضية من المتك. وفى الطماطم تم تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٧ أيام ثم نقلت إلى إضاءة قدرها 6000lux لمدة ١٦ ساعة يومياً لمدة ١٥ أسبوع تتكون بعدها الأجنة.
- وفى الموالح وجد أن تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٧ أيام ثم إضاءة 500 LUX لمدة ١٦ ساعة يومياً يشجع تكوين الأجنة.
- وفى العنب وجد أن تعريض الزراعات للإظلام لمدة ٣٠ يوم ثم للإضاءة الطبيعية يشجع من تكوين الأجنة.

٢-زراعة الأجنة Embryo Culture

يعود تاريخ زراعة الأجنة إلى بداية القرن العشرين عندما أشار الباحث Honning عام ١٩٠٤ إلى إمكانية نمو الأجنة غير الناضجة والمستأصلة من البذرة إلى باردة كاملة. وبعد ذلك قام بعض الباحثين من زراعة أجنة الداتورة الهجين وبالتالى التغلب على صعوبة نمو إنبات البذور الناتجة من الهجين الجنسية.

- ومما هو معروف أنه كلما تباعدت درجة القرابة بين الآباء فإن فرصة نمو الأجنة تكون ضعيفة وبالتالى تموت أثناء تكوينها ولذلك تعزل هذه الأجنة فى مرحلة مبكرة بعد التلقيح
- وقد أمكن عزل الجنين الجنسى الهجين فى الموالح وزراعته على بيئة غذائية بسيطة تتكون من الأملاح والأجار فى حالة إذا كان الجنين كبير ومكتمل النمو. أما إذا كان الجنين صغير وغير مكتمل النمو فيتم استعمال بيئة أكثر تعقيداً.
- **وقد وجد من المفيد إضافة المواد الآتية لبيئة زراعة الأجنة:**

١- إضافة لبن جوز الهند بتركيز من ١٠-٢٥% .

٢- نسبة عالية من السكر للحفاظ على ضغط اسموزى مناسب.

٣- مادة منظمة للضغط الأسموزى للخلايا مثل سكر المانيتول والسربيتول.

٤- مستوى هرمونى ملائم مثل الجبريللين بتركيز ١- ١٠ ملجرام/ لتر.

- مع ملاحظة أن تعرض الأجنة لدرجة حرارة قدرها 26°م وإضاءة شدتها 1000 LUX لمدة ١٦ ساعة يومياً.

٣- إنتاج النباتات المتضاعفة باستخدام تقنية زراعة الأنسجة

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

إن زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات المتضاعفة كروموسومياً هدف هام لمربى النبات لأن إنتاجها فى الطبيعة يكون بنسبة ضئيلة مما يجعل إنتاجها صناعياً ضرورة وذلك باستعمال مادة الكولشيسين ولكن هذه الطريقة تؤدى لإنتاج نباتات متضاعفة فى أجزاء من النبات وليس فى كل أجزاء النبات.

- ولذلك فإن استخدام زراعة الأنسجة والخلايا لإنتاج النباتات المتضاعفة كروموسومياً قد تغلب على بعض المشاكل السابق ذكرها فى بعض النباتات مثل الجزر، الدخان- البطاطا.
- وتتلخص هذه التقنية فى الحصول على الكالوس النامى على بيئة غذائية بتركيز عالى من الأملاح والذى عادة ما يحدث التضاعف ثم تعزل الخلايا منفردة وتنمى على حدة لتكون سلالة خضرية Clone والتى ينتج عند نقلها على بيئة مناسبة نبات كامل متضاعف.
- وتتكون البيئة المناسبة من أملاح MS مضافاً إليها IAA والكينيتن بتركيز ٢ملجم/ لتر + الأينوسيتول بتركيز 300 ملجرام/ لتر.
- وفى بعض الأحيان يضاف الكولشيسين للبيئة لإحداث التضاعف فى خلايا الكالس ثم بعد ذلك يتكون الأفرخ (Shoots) من الكالس.
- ثم تنقل الأفرخ إلى محلول هو جلاند + ٣% سكروز فتتكون عليها الجذور ثم تنقل بعد ذلك إلى التربة بعد إجراء الأقلمة.
- وبعد ذلك يمكن اختبار هذه النباتات عن طريق عد الكروموسومات باستخدام طريقة الاسيتوكارمن.

زراعة معلقات الخلايا Cell suspension culture

تعتمد هذه التقنية على عزل الخلايا الغير متطورة أو الغير متميزة والتى يمكن أن تنقسم عند زراعتها على بيئة مناسبة ثم تتكشف إلى كالسى Callus أو تجمعات من الخلايا Agregates أو إلى أجنة كروية الشكل وذلك على حسب نوع الوسط الغذائى ثم ينتقل الكالس أو الخلايا المتجمعة أو الأجنة إلى الوسط المناسب للحصول على النبات الكامل.

- وباستخدام هذه التقنية تم انتخاب نباتات مقاومة للملوحة على مستوى الخلية بزراعة معلقات الخلايا ثم نقلها على بيئات (أوساط) تحتوى على ١% كلوريد صوديوم فيؤدى ذلك إلى موت بعض الخلايا وتبقى الخلايا التى تحمل تراكيب وراثية تقاوم الملوحة فيتم نقلها على بيئة جديدة لتكوين الأعضاء (أوراق وسيقان وجذور).

- كما تم انتخاب بعض النباتات المقاومة للأمراض حيث تم معاملة كالس الخس بحمض الأكساليك وهو السم الذى تنتجه الكائنات الدقيقة المسببة للمرض الذى يسبب تعفن وموت الخس، وبعد هذه المعاملة تموت بعض خلايا الكالس وتبقى خلايا أخرى مقاومة فيتم عزلها وأكثارها ونقلها إلى بيئة جديدة لتكوين نبات كامل مقاوم للأمراض.

- كما يتم مضاعفة العدد الكروموسومى عند معاملة معلقات الخلايا بالكولشيسين فحدث لها تضاعف وتكونت نباتات. ومما سبق ذكره يمكن عن طريق تقنية زراعة الخلايا تحقيق التالى:

١- الإنتخاب على مستوى الخلية حيث يمكن الحصول على ملايين السلالات الخضرية.

٢- استحداث الطفرات وعزلها. ٣-إحداث التضاعف.

خطوات زراعة الخلايا:

١- يتم الحصول على الكالس عن طريق زراعة الأجزاء النباتية على بيئة مناسبة لذلك.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٢- ينقل الكالس إلى قمع مغطى بقماش نايلون ثقوبه (٣٥٠-٤٠٠ ميكرون) ويتم الضغط على الكالس حتى يتم الحصول على راشح محتوى على الخلايا.

- ويمكن إحداث زيادة فى تفكك الخلايا عن طريق المعاملة بإنزيم البكتينز بمعدل ٠.١ - ٠.٤ مليجرام/ لتر لمدة ساعة مع وضعها على جهاز هزاز بمعدل ١٢٥ لفة / دقيقة فى الظلام.

٣- بعد الحصول على الخلايا الفردية توضع فى بيئة سائلة تحتوى على محلول منظم يحافظ على الضغط الأسموزى وعادة يضاف المانيتول أو السربيتول بمعدل ٣٠جرام/ لتر أو يستخدم الانزيتول بتركيز ٠.٢ جرام/ لتر.

٤- تزرع بعد ذلك الخلايا على بيئة M.S. ويلاحظ أن زيادة الأمونيا هام فى تخليق الأجنة. ووجد أن النيكل والكبريت والزنك هام لتكاثر وانقسام الخلايا.أما عن تركيز منظمات النمو فقد وجد أن إضافة IAA مع 2,4-D بتركيز ٢.٠ ملجرام/ لتر ومستوى منخفض من السيتوكيتين مناسب لنمو الخلايا.

٥- تتم إعادة الزراعة على بيئة جديدة بشرط ألا يقل عدد الخلايا عن $١٠^{٦}$/ ملل (٦٠ ألف خلية/ ملليتر) حتى لا تفقد الخلايا قدرتها على الانقسام.

مع ملاحظة أن عملية إعادة الزراعة تتم كل ثلاثة أسابيع.

- **التحضين:** تحضن الدوارق المحتوية على معلقات الخلايا على درجة حرارة 25-28° م وفى الظلام أو الضوء الخافت على حسب نوع النبات. ففى خلايا البطاطا وجد أن معدل النمو يزداد إذا عرضت معلقات الخلايا إلى إضاءة شدتها ١٠٠٠- ٢٠٠٠ LUX . وفى البازنجان وجد أن أفضل معاملة عند تعريض الخلايا إلى 1100 LUX لمدة ٢٢ ساعة يومياً.

زراعة البروتوبلاست

عن طريق زراعة البروتوبلاست يمكن إحداث التهجينات الجسمية على مستوى الخلية وذلك عن طريق إندماج البروتوبلاست المتحصل عليه من نباتين مختلفين.

- ويتم ذلك بزراعة أجزاء نباتية مناسبة Explants للحصول على نسيج الكالس Callus .
- يعامل نسيج الكالس بالإنزيم للتخلص من الجدار الخلوى ومن أكثر الانزيمات استخداماً هو إنزيم السيليوليز بتركيز يتراوح بين ٢-٤% فى وجود محلول المانيتول ٠.٦ مول لمدة ٤- ٦ ساعات ودرجة حرارة 30-33° م وعلى جهاز الهزاز Shaker .
- كما يمكن عزل البروتوبلاست من الأوراق دون الحصول على الكالس وذلك كما يلى:

عزل البروتوبلاست من الأوراق:

ويتم ذلك بإسلوبين: الأول يعرف باسم العزل فى خطوة واحدة وفيه تؤخذ أجزاء من بشرة الأوراق بعد تعقيمها وتقطع إلى شرائح رقيقة للغاية وتوضع فى طبق بترى وتعامل أنزيمياً وتوضع فى الظلام لمدة ثلاثة أيام مع ملاحظة أن المخلوط الانزيمى يختلف باختلاف نوع النبات. أما الأسلوب الثانى فيعرف باسم العزل فى خطوتين:

١- **الخطوة الأولى:** تؤخذ شرائح الورق ويوضع عليها المخلوط الإنزيمى ويضبط الـ PH على ٥.٨ ثم يرشح تحت تفريغ لمدة ٥ دقائق ثم ينقل الراشح على هزاز ذو حمام مائى درجة حرارته 25°م لمدة ١٥ دقيقة ثم يغير المحلول الانزيمى ويحضن لمدة ساعة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٢- **الخطوة الثانية:** تؤخذ الخلايا المنفصلة من الخطوة الأولى وتحضن لمدة ٩٠ دقيقة على درجة 30°م مع مخلوط أنزيمى ثم يطرد مركزياً بمعدل ١٠٠ لفة / دقيقة.

إنـدماج البروتوبلاسـت: بعـد عـزل البروتوبلاسـت يـتم عمـل دمـج البروتوبلاسـت للحصـول علـى النبـات الهجـين: ويـتم دمـج البروتوبلاست باستخدام عدة طرق هى:

١- الطريقة الميكانيكية. ٢-الطريقة الكيماوية. ٣-الطريقة الكهربية.

١- **الطريقة الميكانيكية:** وفيها يتم دمج البروتوبلاست تحت ميكروسكوب خاص وباستخدام ماصة خاصة تسمى Micropipette ثم ينقل على بيئة خاصة مناسبة لتكوين الجدار والأنسجة وتخليق النباتات الهجينة منها.

٢- **الطريقـة الكيماويـة:** وفيهـا تسـتخدم بعـض المـواد الكيماويـة التـى تسـاعد فـى عمليـة الـدمج مثـل نتـرات الصـوديوم أو نتـرات البوتاسيوم أو أيون الكالسيوم أو مادة البولى إيثلين جليكول (PEG) أو مادة الدكستران Dextran .

٣- **الطريقة الكهربية** : وهى من الطرق الحديثة يستخدم التيار الكهربى المنبعث من جهاز خاص وبطول موجى ٥١٤ نانوميتر وإشعاع ضوئى متطور مقداره mw400 حيث تساعد الشحنات المنبعثة من الجهاز فى دمج البروتوبلاست.

الزراعـة والتحضـين: بعد عزل البروتوبلاست ودمجه يزرع على بيئات مناسبة سائلة أو صلبة حيث يؤخذ ٢ ملل من معلق البروتوبلاست ويوضع فى طبق بترى معقم ويضاف عليه كمية مساوية من البيئة الغذائية المحتوية على ١.٢% آجار مع مستوى منخفض من الأملاح فى وجود المانيتول ونسبة عالية من أيون الأمونيوم، ٣% سكروز.

- يتم التحضين على درجة حرارة من 25-28°م وإضاءة شدتها 300 LUX لمدة يومين ثم ينقل إلى إضاءة شدتها LUX 3000 .
- وبعد ثلاثة أسابيع من الزراعة يبدأ ظهور مستعمرات خضراء وفى نهاية الأسبوع السادس تتكون مجموعات من الخلايا ثم تبدأ فى النمو ثم تعطى الكالس الذى يعطى نبات كامل بعد ذلك.

أقلمة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة

تعتبر زراعة الأنسجة من تقنيات الزراعة الحديثة المتطورة ولها أهمية كبيرة حيث تلعب دوراً هاماً فى الآتى:

١- إكثار بعض الأصناف عالية الجودة التى تتصف بندرة وغلاء شتلاتها أو فسائلها.
٢- الحصول على معدل عال من الإكثار يصل إلى بضعة آلاف من النباتات فى فترة زمنية قصيرة بدءاً من نبات واحد.
٣- النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مشابهة للنبات الأم.
٤- الحصول على نباتات خالية من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسية بزراعة المرستيم القمى.
٥- سرعة إكثار ونشر الأصناف المقاومة لبعض الأمراض والحشرات.
٦- استخدام تقنيات زراعة الأنسجة فى التحسين الوراثى حيث أمكن الحصول على بعض أصناف مقاومة للجفاف والظروف البيئية الصعبة كما فى العنب.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

ويدور موضوعنا فى هذا البحث حول الحصول على نباتات كاملة من زراعة الأنسجة لها القدرة على النمو فى الحقل تحت الظروف البيئية الطبيعية. وهذا ما يعرف بعملية الأقلمة.

أى تهيئة النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة لتتواءم مع الظروف الطبيعية المحيطة سواء فى الصوبة أو الحقل وهذه تعتبر المرحلة الأخيرة من المراحل التطورية التى تميز التكاثر بواسطة زراعة الأنسجة النباتية وهذه المراحل هى :

- مرحلة إعداد النباتات الأم. – مرحلة إنشاء المزارع النسيجية (بداية الزراعة)
- مرحلة التضاعف على البيئة المغذية (الزيادة العددية) – مرحلة تكوين الجذور
- **مرحلة الأقلمة:** ومرحلة الأقلمة تعتبر مرحلة هامة وحاسمة للحصول على نباتات كاملة مناسبة للنمو فى الصوبة أو الحقل حتى يمكننا الاستفادة من النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة.

ويجب على القائم بإجراء هذه المرحلة الإلمام بجميع التغيرات فى العمليات الفسيولوجية فى النباتات كذلك احتياجات النباتات النامية من زراعة الأنسجة حتى تتواءم مع الظروف الخارجية. كذلك يجب معرفة أن نباتات زراعة الأنسجة تتميز ببعض المواصفات الخاصة كمثال لهذه طبقة الكيوتيكل التى تغطى الورقة وتحد من فقد المياه من النبات تعتبر غير موجودة فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة لأن مثل هذه النباتات لا تحتاج إليها حيث أنه ليست هناك مخاوف من فقد المياه أثناء نموها فى جو ذو رطوبة مرتفعة بجانب أن ثغور النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة النباتية لا تعمل بكفاءة عالية وكذلك نجد أن معدل التمثيل الضوئى للنباتات النامية فى بيئات صناعية يعتبر ضئيلاً مقارنة بالنباتات النامية فى الصوب أو الحقول وبذلك يكون هناك مخاطر موت للنباتات عند نقلها إلى تربة صناعية فى الصوب أو الحقل حيث تنقل النباتات من البيئة المغذية ذات الظروف المتحكم فيها إلى تربة صناعية فى الصوب أو الحقل فى بيئة غير متحكم فيها لهذا تجرى عملية الأقلمة وذلك لتهيئة النباتات على النمو فى الظروف الطبيعية.

الأقلمة Acclimatization (Adaptation)

المقصود بها : هى عملية تجهيز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة قبل نقلها إلى الصوبة أو الحقل لزيادة قدرتها على المعيشة فى الظروف الجديدة ولتقليل الفاقد من النباتات فى هذه المرحلة.

أى هى تلك العمليات التى تجرى على النباتات خلال المرحلة الانتقالية والتى تتعلق بإعداد النباتات للنقل لظروف الحقل.

وهذه المرحلة تتم بعد الحصول على نباتات كاملة وبعد مرحلة التجذير Rooting فى زراعة الأنسجة حيث يجب أن تنقل هذه النباتات إلى الصوب أو الحقل بهدف استكمال دورة حياتها وتحقيق الهدف المنشود من زراعة الأنسجة.

ويجب معرفة أن عدد كبير من النباتات يفقد نتيجة للتغير فى ظروف النمو حيث أن النبات الناتج من زراعة الأنسجة نبات مرهف حيث تتوفر له جميع العوامل المساعدة على النمو وظروف بيئية متحكم فيها وبالتالى فإنه عند انتقاله إلى ظروف بيئية خارجية غير متحكم فيها وجو غير معقم فإن عدد كبير من النباتات يفقد لعدم قدرته على ملائمة البيئة الجديدة .

*** الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية لنباتات زراعة الأنسجة:**

هناك بعض الصفات المورفولوجية والتشريحية والفسيولوجية التى تميز النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة مما يصعب عليها مواجهة الظروف الخاصة.

ومن أهم هذه المميزات ما يلى:

١- قلة كفاءة التمثيل الضوئى فى النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة حيث يتوافر لها مصدر هرمون فى البيئة المغذية.

٢- قلة تطور الطبقة الشمعية على سطح الأوراق بسبب نموها فى جو مشبع بالرطوبة.

٣- عدم وجود ميكانيكية فتح وغلق الثغور.

وفيما يلى استعراض بعض هذه النقاط بالتفصيل:-

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner