الفصل الثاني

زراعة الأنسجة النباتية وتقنياتها المختلفة

2-1- مقدمة Introduction:

يسعى الإنسان دائما إلى اكتشاف أسرار الطبيعة عن طريق البحث العلمي ، واكتشاف الطرائق والتقنيات الحديثة التي تفيد في مواكبة التطور والتحديث في مختلف مجالات الحياة. تعد تقنيات زراعة الأنسجة النباتية مجموعة هامة من التقنيات الحديثة التي لعبت دورا ولاتزال لها أهمية كبيرة في تطوير وتحسين الإنتاج الزراعي في مجال العلوم النباتية بشكل عام وعلوم البستنة بشكل خاص.
تعود فكرة زراعة الأنسجة إلى العالم الألماني Hamberland عام (1902) عندما زرع بعض خلايا البشرة في وسط كنوب وبقيت على قيد الحياة عدة أشهر دون أن تبدي أي استجابة للإنقسام والنمو. وفي عام 1922 تمكن العالمان Kott et Roblins من الحصول على استطالة قمم جذرية في البندورة من عدة ميليمترات إلى 4-5 سم وبقيت في الوسط المغذي عدة أشهر ثم ماتت.
يعد العالم الأمريكي White عام (1932) أول من حصل على انقسام خلايا قمم من جذور البندورة بشكل غير محدود، كما تمكن العالم الفرنسي Gautheret عام (1934) من الحصول على نتائج مماثلة بدءا من زرع خلايا كامبيوم لبعض الأشجار الحراجية. يعد العالمان White و Gautheret أول من وضع أسس تقنيات زراعة الأنسجة النباتية . وتتالت الأبحاث والاكتشافات مع مرور الزمن. وقد استعملت المستخلصات النباتية والعصائر مثل سائل جوز الهند في زراعة الأنسجة لتنشيط النمو قبل اكتشاف الهرمونات النباتية. وقد استخدمت الهرمونات النباتية لأول مرة من قبل العالمين Skoog and Miller عام 1957 ، حيث أوصحا الدور الإيجابي لكل من الأوكسين والسيتوكينين في نمو أجزاء نباتية من التبغ المزروع في وسط مغذ بشكل معقم داخل الأنابيب.

وقد تمكن العالمان Morel and Martin عام 1958 من الحصول لأول مرة على نباتات سليمة من الفيروسات عن طريق زراعة المرستيم المأخوذ من نبات بطاطا مصاب بالفيروسات. وقد تمكنوا من وضع تقنية زرع المرستيم لأول مرة.
استطاع الباحث Hildebrand عام 1965 من الحصول على نباتات كاملة بدءا من زرع خلايا جنينية من التبغ في وسط مغذ سائل. وفي عام 1969 حصل العالمان Nitch and Nitch على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية بدءا من زرع حبوب لقاح لنبات التبغ. وقد قام العالم Garlson وزملاؤه عام 1972 من وضع تقنية لعزل البروتوبلاست وحصلوا على نباتات كاملة بدءا من دمج نوعين من البروتوبلاست من التبغ.
لقد تطورت تقنيات زراعة الأنسجة النباتية خلال العقدين الأخيرين تطورا كبيرا وشملت عددا كبيرا من النباتات، وتوسعت فوائدها التطبيقية في إكثار والتحسين النباتي واستنباط أصناف جديدة وإكثارها خضريا. ففي عام 1990 تم انتاج اكثر من 60 مليون نبات على مستوى فرنسا فقط باستخدام تقنيات زراعة الأنسجة النباتية المختلفة (Coudret,1991).
لاختيار الجزء النباتي والذي له علاقة مباشرة بزراعة النسج هو عمر النبات الأم فكلما كان النبات الأم فتي Juvenile كلما كانت قدرته كبيرة على النمو والإكثار بالنسج. والقدرة على التشكل والنمو تنخفض مع تقدم النبات بالعمر، حتى تصل إلى مرحلة التوقف في النباتات الهرمة، وهذا الأمر يلاحظ بشكل كبير في الأشجار الخشبية والحراجية.
إذا أردنا إكثار شجرة معمرة لتميزها في بعض الصفات الجيدة ، لا بد من إجراء عملية إعادة فتوة أو مايسمى تجديد فتوة Rejuvenation حتى تستعيد قدرتها على الإكثار والتجذير بالنسج.
تعد تقنيات زرع الأنسجة النباتية إحدى الطرائق الهامة في تجديد فتوة الأشجار المعمرة ، حيث تكتسب الأجزاء النباتية المزروعة بالأنابيب صفات النباتات الفتية مع زيادة عدد مرات النقل على الوسط المغذي والأمثلة كثيرة على ذلك. في البطاطا العنب ، الجربيرا وفي النخيل (Auge et al.,1984; AlMaarri,1995.) .

2-2- مفهوم زراعة الأنسجة النباتية:

يقصد بزراعة النسج ، زراعة أجزاء نباتية صغيرة تتراوح أبعادها بعدة ميكرونات وحتى 1-2 سم (عقل صغيرة ، براعم ، قمم نامية ، قمم مرستيمية ، حبوب لقاح ، خلايا مفردة وبروتوبلاست) في أوساط مغذية محددة التركيب بحيث تحوي كافة المتطلبات الغذائية اللازمة لنمو الأجزاء المزروعة، ثم توضع الأنابيب المزروعة في شروط جوية خاصة داخل غرف النمو لتحريضها على النمو والإكثار. يشترط أن تتم كافة عمليات الزرع في جو معقم وباستخدام أدوات ومحاليل وأجزاء نباتية معقمة.

إن المفهوم التقليدي للإكثار الخضري هو استخدام أجزاء نباتية في الإكثار بهدف الحصول على نباتات مشابهة تماما في الصفات المورفولوجية والوراثية والانتاجية لصفات النبات الأم التي أخذت منه الأجزاء النباتية.
أما المفهوم الحديث للإكثار الخضري باستخدام تقنيات زراعة النسج بانه ليس من الضروري دائما الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم . قد نحصل على نباتات مشابهة أو مغايرة في التركيب الوراثي للنبات الأم، ويعود ذلك حسب الأجزاء النباتية المستخدمة، وحسب الهدف من زراعة النسج وحسب الأوساط الغذائية المستخدمة. ففي تقنيات التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation يتم الحصول على نباتات مشابهة تماما بالتركيب الوراثي للنبات الأم . وفي زرع الكالوس Callus Culture أو حبوب اللقاح يمكن أن نحصل على نباتات مشابهة أو مغايرة في التركيب الوراثي للنبات الأم ولهذا السبب لهذه التقنيات أهمية في تربية والتحسين الوراثي للنبات.

2-3- طرائق زراعة الأنسجة النباتية :

تقسم تقنيات زراعة الأنسجة النباتية إلى مجموعتين من الطرائق :

2-3-1- طرائق الأكثار : تشمل كافة الطرائق التي يتم فيها استخدام أجزاء نباتية حاوية على أنسجة مرستيمية أو زراعة أنسجة نباتية تعطي أنسجة مرستيمية مباشرة دون المرور بمرحلة الكالوس . تشمل الطرائق التالية:

2-3-1-1- التكاثر الخضري الدقيق Micropropagation : تضم التقنيات التالية :

- زراعة العقل الصغيرة Microcuttings : بطول 1-2 سم وتحوي برعم جانبي أو طرفي.
- زراعة براعم وقمم نامية بحجم 1-5مم ولها عدة مسميات مثل Shoot apex cuture أو Apex culture أو Bud culture .
- زراعة المرستيم Meristem Culture. وهو بحجم من 0.1-1 مم.
- زراعة البراعم والأقراص الزهرية Bud flower culture ويتم زرع البراعم الزهرية او الأقراص الزهرية بأحجام مختلفة تختلف باختلاف الأنواع النباتية.

2-3-1-2- التطعيم المخبري الدقيق *In Vitro* Micrografting : ويتم فيه تطعيم قمم مرستيمية من نباتات موثوقة على بادرات بذرية بهدف الحصول على نباتات خالية من الأمراض الفيروسية أو لأهداف أخرى مثل دراسة التوافق بين الأصل والطعم.

2-3-1-3- تكوين الدرينات الدقيقة *In vitro* Microtuberization : وهي طريقة هامة تستخدم في إكثار بذار البطاطا بهدف الحصول على بذار خال من الأمراض الفيروسية. وهذه التقنية تستخدم في النطاق التجاري في كثير من دول العالم ، ويتم تكوين الدرينات الصغيرة داخل الأنابيب . ويتم زرع القمم المرستيمية في البداية وبعد التأكد من خلو النموات الناتجة من زراعة المرستيم من الفيروسات يتم بعدها انتاج الدرينات لتكون أمهات في انتاج البذار.

2-3-1-4- تكوين المباشر للبراعم Direct Organogenesis : ويتم زراعة أجزاء نباتية خالية من الأنسجة المرستيمية مثل زرع الأوراق أو أعناق أو سلاميات . ويتم تكوين براعم مباشرة وتتطور البراعم وتتكاثر لإعطاء نباتات كاملة.

2-3-1-5- الإكثار بالأجنة الخضرية Embryogenesis : ويتم زرع أجزاء نباتية قد تحوي أو خالية من الأنسجة المرستيمية. توجه الأجزاء المزروعة نحو تكوين الكالوس الجنيني أو تكوين الأجنة الخضرية مباشرة.

2-3-2- طرائق التحسين الوراثي:

ويتم فيها زرع أجزاء نباتية خالية من الأنسجة المرستيمية وتمر بمرحلة الكالوس عند تطورها . ومن هذه الطرائق :

2-3-2-1- زراعة الخلايا النباتية Plant Cell Culture : يتم زرع الخلايا النباتية ضمن معلق خلوي في أوساط مغذية سائلة ومتحركة ولهذة التقنية تطبيقات هامة في انتاج المركبات الثانوية والمواد الفعالة المستخدمة في صناعة الأدوية والصناعات التجميلية والتحويلية. ولها أيضا تطبيقات في تربية النبات والتحسين الوراثي.

2-3-2-2- زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture : البروتوبلاست هي خلية نباتية خالية من الغشاء البكتوسللوزي. ولها تطبيقات هامة في مجال تربية النبات والحصول على هجن خضرية متجانسة، وتعد إحدى طرائق الهندسة الوراثية.

2-3-2-3- زراعة المآبروحبوب اللقاح Anther and Grain Pollen Culture : ويتم زرع حبوب اللقاح بهدف الحصول على نباتات وحيدة الصيغة الصبغية والتي لها اهمية كبيرة في تربية النبات للمحاصيل المختلفة.

2-3-2-4- زراعة الكالوس Callus Culture : يتم الحصول على الكالوس من أجزاء نباتية مختلفة تحت تحريض هرموني وخاصة الD 4-2، ويتم إكثار الكالوس والعمل على تطوره للحصول على نباتات كاملة وتسمى عملية تطور الكالوس لتكوين نبات كامل بالRegeneration System . تعد عملية إكثار الكالوس بهدف

زيادة الخلط الوراثي للحصول على تراكيب وراثية جديدة قد تكون هامة في برنامج تربية النبات وهذا مايدعى بال Somaclonal Variation .

2-4- تطبيق تقنيات زراعة الأنسجة النباتية:

تحتاج تطبيق تقنيات زراعة الأنسجة النباتية إلى دقة وخبرة عالية وتوفر المخابر المجهزة والضرورية لتنفيذ العمل بنجاح. ويعزى السبب إلى وجود عوامل كثيرة تؤثر في نجاح تطبيق زراعة الأنسجة مثل عوامل الأوساط المغذية، عوامل البيئة وشروط غرف النمو، عوامل مرتبطة بالأنواع النباتية ، عوامل مرتبطة بالقائم على المشروع والخبرة ضرورية لنجاح المشروع، عوامل مرتبطة بالنظافة وعقامة المخبر إذ يعد التلوث العدو الأول لتقنيات زراعة الأنسجة النباتية لهذا السبب يجب أن تكون عوامل الأمان والنظافة في مخبر زراعة الأنسجة النباتية مثل غرفة العمليات الخاصة بالمشافي.

تعد تقنيات زراعة الأنسجة النباتية من الطرق الحديثة في الإكثار الخضري حيث تسمح بإنتاج أعداد كبيرة من النباتات المشابهة للنبات الأم والخالية من الأمراض وذات مواصفات عالية الجودة. كما تستخدم في مجال التحسين الوراثي .

إن الخطوط العريضة لكافة تقنيات زراعة الأنسجة النباتية متشابهة . تختلف من حيث الهدف والغرض ونوعية الطريقة المستخدمة ونوعية الجزء النباتي المستخدم وفي تركيب الأوساط المغذية اللازمة وفي شروط ومراحل الزرع.

وهنا سوف نلقي الضوء على الخطوات الأساسية العامة المشتركة بين جميع تقنيات زرع الأنسجة وسوف يتم معالجة خصوصيات كل طريقة عند دراستها فيما بعد كل على حدى.

تشمل الخطوط العريضة لتطبيق تقنيات زراعة الأنسجة الخطوات التالية:

1- تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها:
2- تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها
3- عزل الأجزاء النباتية وزراعتها
4- وضع العينات المزروعة في غرف النمو لحثها على النمو.

2-4-1- تحضير الأوساط المغذية وتعقيمها: تؤثر الأوساط المغذية بشكل مباشر في نجاح زراعة الأنسجة النباتية. تحتوي الأوساط المغذية على كافة العناصر الضرورية اللازمة لنمو وتطور العينات المزروعة. يختلف تركيب البيئات الغذائية بحسب النوع النباتي ، والجزء المزروع ، وحسب الهدف من زرع الأنسجة النباتية وحسب مرحلة الزراعة. يزداد تركيب الوسط المغذي تعقيدا كلما صغر حجم الجزء النبات
المزروع . يتألف الوسط المغذي بشكل عام من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى، ومصدر للطاقة وفيتامينات وأحماض آمينية وهرمونات نباتية وبعض المركبات العضوية أو المعدنية الأخرى التي تضاف إلى الوسط المغذي لأغراض محددة.

هذا وسوف يتم دراسة تفصيلية لمكونات الأوساط المغذية والاحتياجات الغذائية لزراعة الأنسجة النباتية في الفصل الثالث من هذا الكتاب.
تعبأ الأوساط المغذية بانابيب أختبار من نوع البيركس القابل للتعقيم وتغلق بسدادات معدنية اوبلاستيكية ، وتعقم في الأوتوغلاف تحت ضغط على درجة حرارة 115°م لمدة 30 دقيقة أو على درجة حرارة 121° م لمدة 15-20 دقيقة.

2-4-2- تحضير الأجزاء النباتية وتعقيمها: تختلف طريقة تحضير العينات النباتية لزراعة النسج بحسب النوع النباتي ، وحسب الهدف من زرع الأنسجة النباتية وحسب طبيعة وحجم الجزء النباتي المزروع.
تؤخذ العينات النباتية من أمهات مطابقة للنوع والصنف المراد زراعته، جيدة النمو وخالية من الأمراض. يفضل أن تكون الأمهات نامية في بيت محمي وخاضعة لبرنامج رش وقائي، لأن النباتات النامية بالحقل أو بالطبيعة تحوي تلوث أكبر بكثير من النباتات المرباة بالبيوت المحمية. وتكون حمولة الأجزاء الهوائية من الأحياء الدقيقة أقل بكثير من حمولة الأجزاء النباتية الأرضية. تعد عملية الحصول على عينات خالية من التلوث شرط أساسي لنجاح زراعة النسج.
تستخدم المواد الكيميائية والمطهرات في تعقيم العينات النباتية. توجد عدة مواد تستخدم بشكل واسع في التعقيم السطحي للعينات النباتية مثل :
- هيبوكلوريت الصوديوم (NaOcl) ، هيبوكلوريت الكالسيوم (Ca (Ocl)2)، الماء الأوكسيجيني، كلوريد الزئبق ، نترات الفضة ، برمنغنات البوتاسيوم ، الكحول وبعض المركبات الجاهزة مثل الDomestos والكلوروكس
(Jones et al.,1977; ALMaarri et al.,1986) .
تختلف تراكيز المادة الفعالة ونوع المادة الفعالة والفترة الزمنية باختلاف الأنواع النباتية وطبيعة العينات النباتية المستخدمة.
تقسم الأجزاء النباتية من حيث تحملها للتعقيم إلى :
- عينات قاسية تتحمل تراكيز عالية ولفترة زمنية طويلة مثل الأجزاء المتخشبة والبذور القاسية.
- اجزاء نصف غضة مثل النموات نصف غضة والبراعم الجانبية والنموات الغضة الطرفية والجذور الرفيعة وبعض البذور الغضة
- أجزاء غضة ورهيفة مثل الأوراق والوريقات المرستيمية وأعناق الأوراق.
وتجدر الإشارة اخيرا يجب وضع تقنية للتطهير السطحي تناسب كل نوع نباتي يراد زرعه داخل الأنابيب. ويجب أن تتم عملية التعقيم تحت شروط معقمة وباستخدام أدوات معقمة.

2-4-3- زراعة الأجزاء النباتية: تختلف طريقة فصل الأجزاء النباتية وزراعتها في الأوساط المغذية المحضرة سابقا ، حسب الجزء النباتي المزروع، حسب تقنية الأنسجة المستخدمة وحسب الهدف من زراعة النسج.

يتم عزل العينات النباتية وزرعها في غرف خاصة تدعى غرف العزل. يجب أن تكون هذه الغرف معقمة نظيفة معزولة ، وغير معرضة للتيارات الهوائية المباشرة، وخالية من النوافذ وغير قريبة من الممرات العامة في المخبر. توضع في غرف العزل أجهزة خاصة تؤمن العمل في جو معقم وتسمى أجهزة العزل الجرثومي Laminar air flux hood.

4- وضع الأنابيب المزروعة في غرف النمو: توضع الأنابيب المزروعة في غرف خاصة تسمى بغرف النمو growth room ، حيث يتم التحكم بالحرارة والإضاءة والرطوبة. يجب ان تكون غرف النمو نظيفة ومعزولة عن الجو الخارجي . وتزود باجهزة تحكم بالحرارة والإضاءة والرطوبة بحيث تؤمن الظروف الجوية المناسبة للنمو النباتي.

2-5- إنشاء مخبر لزراعة الأنسجة النباتية :

تتطلب زراعة النسج أماكن خاصة ، نظيفة ومحمية من عوامل الوسط الخارجي، لان عمليات الزرع في سائر مراحلها تتم ضمن ظروف معقمة. يجب ان تتوفر في المخبر الخاص بزراعة النسج جميع الأجهزة والمواد والأدوات الضرورية لتطبيق زراعة الأنسجة النباتية بكافة طرائقها. كما يتطلب إكثار النباتات بالأنسجة توافر شروط مناسبة لعملية التقسية حتى نستطيع أقلمة النباتات النسيجية مع الظروف الطبيعية وتتابع نموها في شروط طبيعية بعد نجاح عملية التقسية.

يجب توافر بيت زجاجي مجهز بكافة أجهزة التحكم بالحرارة والتهوية والرطوبة والإضاءة والتغذية المعدنية، ومعزول بشكل جيد عن الوسط الخارجي لمنع دخول الحشرات إلى داخله. يفيد البيت الزجاجي في عملية التقسية للنباتات النسيجية Vitoplants ، وفي عملية تربية الأمهات المراد إكثارها بالنسج.

تختلف مكونات مخبر زراعة الأنسجة النباتية بحسب التقنيات المتبعة وحسب الهدف من زراعة النسج وحسب الغرض من إنشاء المخبر هل هو بحثي أو انتاجي ، وحسب الأنواع النباتية والأعداد المراد انتاجها.