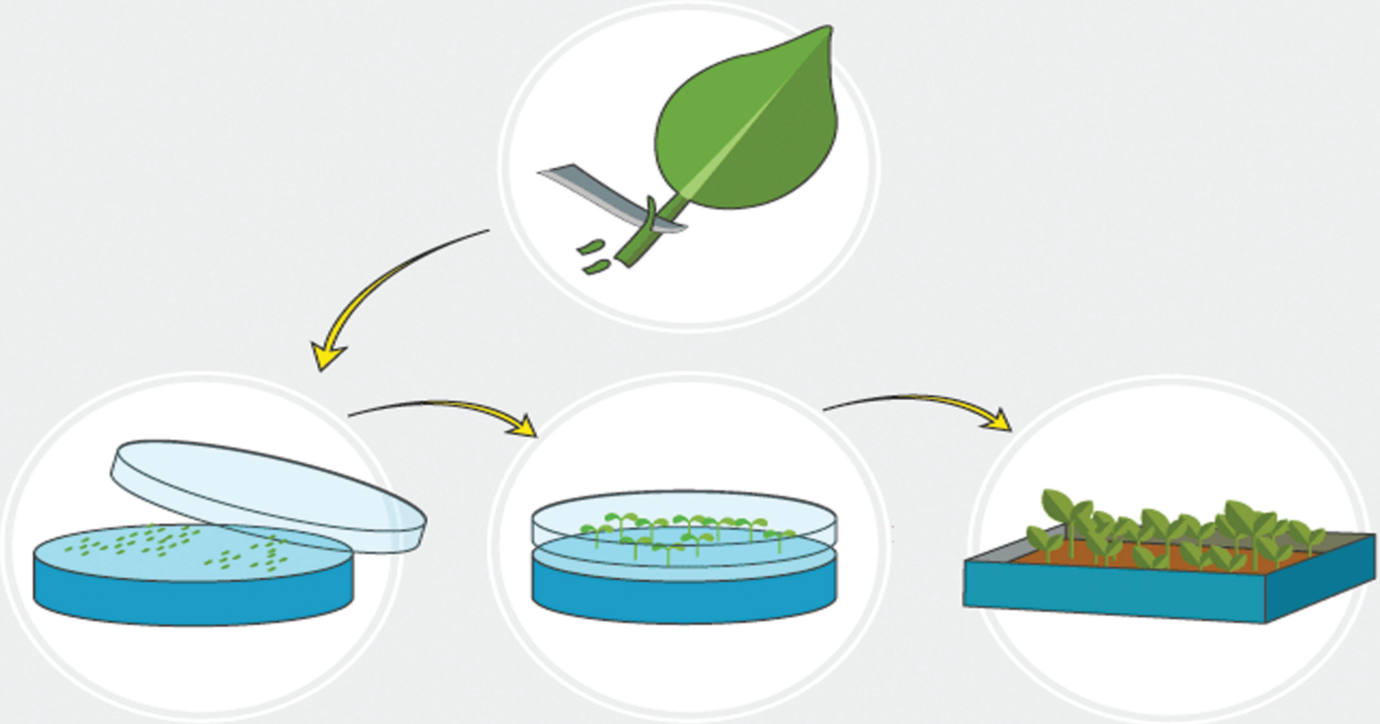
جامعة الدول العربية

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

دليل تقانات زراعة الأنسجة النباتية (النظرية والتطبيقية)

2023م



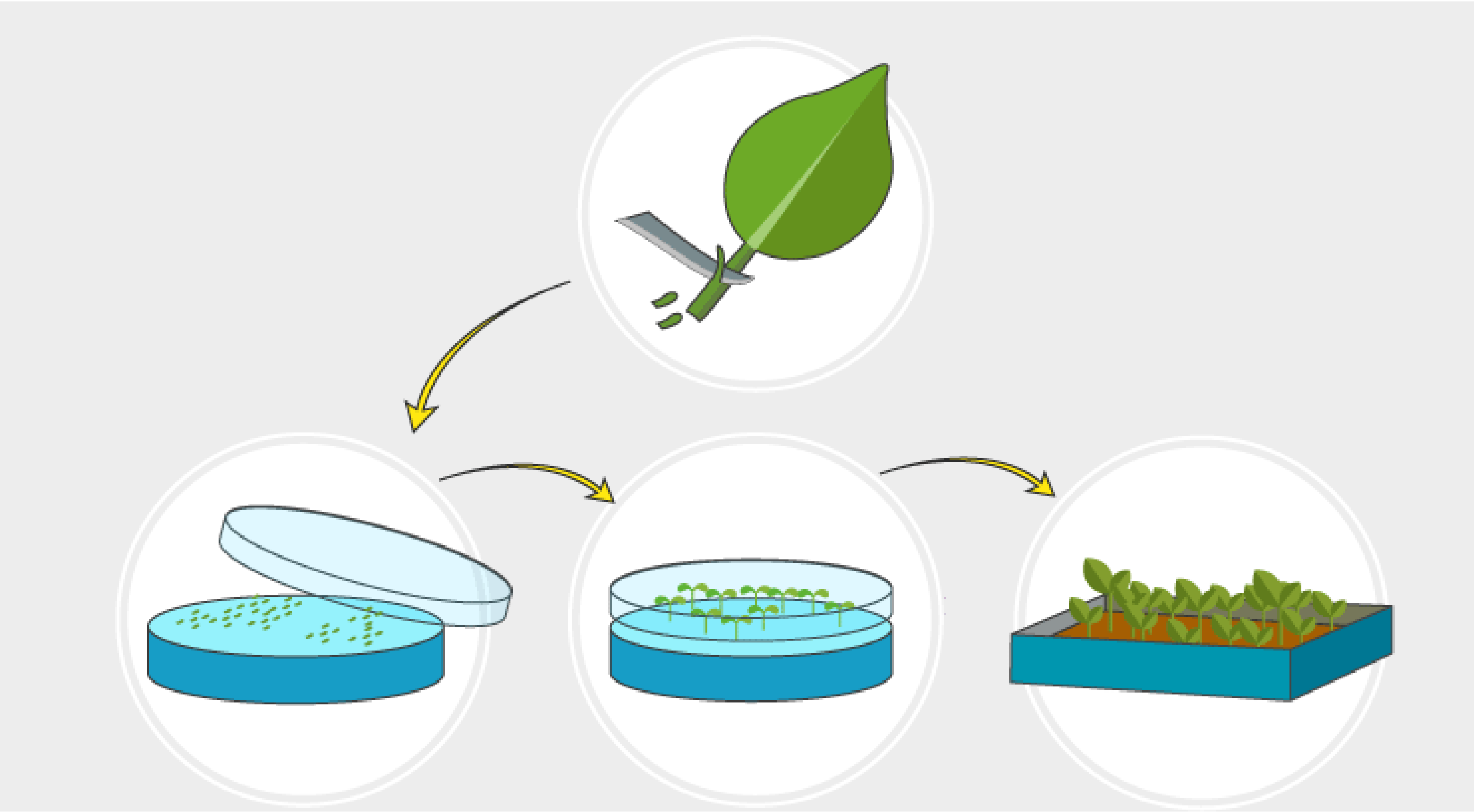
جامعة الدول العربية

المنظمة العربية للتنمية الزراعية

دليل تقانات زراعة الأنسجة النباتية

(النظرية والتطبيقية)

2023م



تقديم:

يمثل الأمن الغذائي هاجساً كبيراً لدى صناع القرار في كثيرٍ من الدول باعتباره من أهم التحديات الرئيسية التي تواجه العام ومنها وطننا العربي ،وبالرغم من توفر الموارد الطبيعية من الأراضي والمياه والموارد البشرية فإن الزراعة العربية لم تحقق الزيادة المطلوبة منها في إنتاج الغذاء وتحقيق الأمن الغذائي المطلوب ، لذلك فقد اهتمت المنظمة العربية للتنمية الزراعية بمفهوم الأمن الغذائي ،وركزت جهودها في سبيل الوصول بحالة الأمن الغذائي العربي إلى المستويات التي تحقق الرفاه الاجتماعي لشعوب الدول الأعضاء ،وذلك من خلال دعم الجهود العربية في هذا المجال وصولاً إلى توفير الغذاء للجميع وبالكمية والنوعية المطلوبتين وبصورة مستمرة من أجل حياة صحية وجيده.

وبالرغم من الجهود التي تبذلها الدول لتقليل حجم الفجوة الغذائية العربية إلا أن الفجوة الغذائية لا تزال تشكل هاجساً مقلقاً للكثيرين، وبالتالي تسعى الدول والمنظمات إلى إيجاد وسائل وسبل من شأنها زيادة الإنتاج والإنتاجية لمحاصيل الغذاء لمواجهة ذلك العجز في كمية الغذاء وتعتبر تقنية زراعة الأنسجة النباتية من أهم المجالات العلمية والتطبيقية المتطورة والتي من الممكن أن تساهم في حل مشكلة الطلب المتزايد على الغذاء ؛إذ بالإمكان من خلال هذه التقنية العمل على التحسين الوراثي والتهجين بسهولة على النباتات ويمكن لهذه التقنية أن تساهم في تحقيق الأمن الغذائي وحماية البيئة في آنٍ واحدٍ.

وقد عمدت المنظمة العربية للتنمية الزراعية إلى إعداد الدليل الاسترشادي لزراعة الأنسجة النباتية وذلك للحاجة إلى مزيد من الابتكارات لسد الفجوة الغذائية وزيادة الإنتاج والإنتاجية واستدامتها ، وإلى وجود مادة فنية باللغة العربية يستفيد منها الباحثون والمرشدون الزراعيون والمزارعون والمهتمون بتقنية زراعة الأنسجة ، ورغبة منها في رفد العاملين في القطاع الزراعي العربي بمادة علمية تطبيقية في مجال زراعة الأنسجة النباتية.

والمنظمة العربية للتنمية الزراعية تضع بين يدي المهتمين بالقطاع الزراعي العربي وبحالة الأمن الغذائي هذا الدليل ،والذي سيكون مرجعاً علمياً وتطبيقياً يستفيد منه الجميع ،ومتمنين أن يحقق هذا الدليل الهدف المرجو منه ،وأن يساعد العاملين في القطاع الزراعي في الوصل بالإنتاج والإنتاجية الزراعية إلى المستويات التي تحقق التنمية الزراعية والأمن الغذائي العربي .

والله من وراء القصد ،،،،

البروفيسور/ ابراهيم ادم احمد الدخيري

المدير العام

تمهيد:

بدأ الإهتمام بزراعة الأنسجة النباتية في الدول العربية في العقد الثامن من القرن العشرين بمختبرات بحثية صغيرة، ثم توسعت بعد ذلك في مجال تكاثر بعض المحاصيل الإقتصادية بالتركيز على نخيل التمر والموز والبطاطس. بجانب التكاثر، سعت بعض المختبرات في الدول العربية إستخدام بعض تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية، مثل، إنتاج نباتات خالية من الأمراض ونباتات مقاومة للعوامل المجهدة وبعض سبل الهندسة الوراثية في تحسين النباتات. تجدر الإشارة إلى أن تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية تتجاوز العشرات، وربما يسهم إستخدامها إستغلال موارد الدول العربية النباتية الهائلة خاصة البرية منها.

تم إعداد هذا الدليل للحاجة إلى تدريبات عملية على زراعة الأنسجة النباتية لتوضيح المفاهيم الرئيسة في التقنية بدأً من إختيار موقع المختبر والإنشاء والإحتياجات المعملية ثم توصيف إعداد الأوسط الغذائية وتجهيز الأجزاء النباتية المنفصلة للزراعة ومختلف تطبيقات زراعة الأنسجة النباتية. إستراتيجية تطوير هذا الدليل هي إبتكار تمارين أو تدريبات من النباتات المتوفرة على مدار العام ولا تتطلب التعامل مع مجموعة واسعة من المواد النباتية، ورغم ذلك، تمنح المتدرب الفرصة للتعامل مع مصفوفة متكاملة من المواد النباتية.

يحتوي الدليل على أربعة عشر فصلاً، وتم إدراج الجداول والأشكال والمراجع الخاصة بكل فصل في نهايته تيسيراً للمتابعة، خاصة إن المراجع تختص بالفصل المعين. من المهم قبل بداية أي تمرين أن يطلع المتدرب على الفصول 2–5 التي تتعامل مع إنشاء معمل زراعة الأنسجة، وإعداد الأوساط، والأجزاء النباتية المنفصلة (explant) وتقنية التعقيم والتلوث، ستكون المعلومات الواردة في هذه الفصول مطلوبة في التمارين التالية. كما إن بعض المواد النباتية الناتجة من تمارين، مثل، نسيج الكدب (callus tissues) يمكن أن تستخدم في تمارين لاحقة.

أخيراً، بعد شكر الله سبحانه وتعالى الشكر والثناء للمنظمة العربية للتنمية الزراعية لموافقتها على إعداد هذا الدليل لنشر المعرفة.

جدول المحتويات

تقديم	II
تمهيد	III
جدول المحتويات	IV
قائمة الجدول والملاحق والنماذج	XIV
قائمة الأشكال	XV
الفصل الأول	1
تاريخ زراعة الخلية النباتية History of Plant Cell Culture	1
مقدمة	1
السنوات المبكرة: The Early Years	2
عصر تطوير التقانات The Era of Techniques Development	3
الماضي القريب The recent past	6
سلوك الخلية Cell Behavior	6
تحوير وتحسين النباتات Plant Modification and Improvement	8
النباتات الخالية من العوامل الممرضة وتخزين الأصول الوراثية Pathogen-Free Plants and Germplasm Storage	10
التكاثر النسيلي Clonal Propagation	10
تشكيل المنتج Product Formation	11
العصر الحاضر The present era	12
المراجع	15
الفصل الثاني	30
إعداد وتجهيز مختبر زراعة الأنسجة النباتية Setup of a Tissue Culture Laboratory	30
مساحات العمل work areas	30
إعداد الأوساط الغذائية/منطقة حفظ البيانات	30
منطقة النقل المعقمة	31
منطقة الحاضنات المتحكم فيها بيئياً	32
المراجع	34
الفصل الثالث	36
مكونات وإعداد الوسط الغذائي	36
الأملاح غير العضوية	36
منظمات النمو النباتية	37
الأوكسينات	37
السايتوكينينات	38
الجبرلين	39

حامض الأبسيسيك	39
الفيتامينات	39
الكربوهيدرات	40
الهيكسيتول (الكحولات السداسية)	41
عامل التبلور	41
الأحماض الأمينية	42
المضادات الحيوية	43
المركبات الطبيعية المعقدة	44
درجة حموضة الوسط الغذائي	45
تحضير الوسط الغذائي	46
المراجع	56
الفصل الرابع	60
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	60
عوامل إختيار الجزء النباتي المنفصل	60
عمر الجزء النباتي المنفصل	60
الموسم	61
حجم الجزء النباتي المنفصل	61
نوعية النبات	61
الهدف	62
النمط الوراثي	62
تقنية التعقيم	62
التجربة العملية	64
إنبات البذور المعقمة	64
الغرض	64
مصدر البذور	64
تجهيز الوسط	64
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	65
أ) بذور الجزر، زهرة الشمس والقرنبيط	65
ب) بذور القطن	65
المراجع	68
الفصل الخامس	69
التلوث	69
مصادر التلوث الميكروبي:	69
1. الجزء النباتي المنفصل	69
مواد (عوامل) التعقيم	70

70	1. هيبوكلوريت الصوديوم ((Sodium hypochlorite (NaOCl)،
71	2. هيبوكلوريت الكالسيوم ((Calcium hypochlorite (Ca(Ocl)2).
71	3. إيثيل أو الأيزوبروبيل الكحول
71	4. بيروكسيد الهيدروجين ((H_2O_2) Hydrogen peroxide)
71	5. غاز الكلورين ((Cl_2) Chlorine gas)
71	6. ثنائي كلورو إيزوسيانورات الصوديوم (dichloroisocyanuric acid sodium (NaDCC) (salt
72	7. مبيد إيزوثيازولون الحيوي ((Isothiazolone biocide (PPM)
72	8. المضادات الحيوية المضادات الحيوية
72	9. كلوريد الزئبق ($HgCl_2$)
72	مصدر الجزء النباتي المنفصل
73	التلوث الميكروبي الداخلي
74	المعالجة المسبقة للجزء النباتي المنفصل للتحكم في الملوثات الميكروبية
74	طاقم العمل (الأفراد)
75	صندوق تدفق الهواء الصفحي
75	الحشرات
76	السيطرة على تلوث الحشرات
77	الأوساط الغذائية
77	أدوات التشريح
78	نظام تهوية الغرف
79	المراجع
82	**الفصل السادس**
82	تحفيز نسيج الكدب Callus Induction
83	إنشاء نسيج الكدب Callus Initiation
83	الغرض
84	تحضير وسط إنشاء نسيج الكدب
84	تجهيز الجزء النباتي المنفصل من بادرات الجزر
84	تجهيز الجزء النباتي المنفصل من ثمار الليمون
84	تجهيز الجزء النباتي المنفصل من أزهار القرنبيط
84	تجهيز الجزء النباتي المنفصل من أنسجة الجزر
85	ملاحظات
86	البيانات والأسئلة
86	إتجاه الجزء النباتي المنفصل
86	الغرض
86	تحضير الوسط

تجهيز الجزء النباتي المنفصل	87
الملاحظات	89
إنشاء زراعة خلايا الحبوب (المقتدرة) ذات الكفاءة Establishment of competent cereal cell cultures	88
الغرض	89
تحضير وسط تحفيز نسيج الكدب	89
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	89
البيانات والأسئلة	90
إختبار الملح خارج الجسم الحي	90
الغرض	90
تحضير الوسط	91
الجزء النباتي المنفصل	91
ا لبيانات والأسئلة	92
منحنيات النمو	93
طرق إنشاء منحنى النمو	93
تجربة القطن	94
الغرض	94
تحضير وسط منحنى نمو القطن	94
تجهيز الجزء النباتي المنفصل للقطن	95
الزراعة	95
تجربة التبغ	95
الغرض	96
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	96
تحضير الوسط الغذائي	96
تجهيز الجزء النباتي المنفصل للتبغ	97
الملاحظات	97
البيانات والأسئلة	97
التباين الخلوي من زراعات نسيج الكدب	98
الغرض	98
تحضير الوسط الغذائي	98
الجزء النباتي المنفصل	98
البيانات والأسئلة	99
المراجع	101
الفصل السابع	106
التجديد والتشكل Regeneration and Morphogenesis	106

التشكل الخاضع للرقابة: Controlled morphogenesis	107
تكوين الدرنات في البطاطس	107
الغرض	108
تحضير الوسط الغذائي	108
تجهيز الجز النباتي المنفصل	109
البيانات والأسئلة	109
تكوين الأجنة الجسدية	110
الغرض	110
تجهيز وسط تكوين أجنة الجزر الجسدية	110
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	111
الطريقة	111
البيانات والأسئلة	112
تجديد الأرز	112
الغرض	112
تحضير الوسط:	113
الإجراء	113
تحضير وسط تجديد نبات الأرز	113
الإجراء	113
البيانات والأسئلة	113
متطلبات السكون في الجزء النباتي المنفصل	114
الغرض	114
تحضير الوسط الغذائي	114
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	115
الأسئلة	115
المراجع	117
الفصل الثامن	121
الشجيرات الخشبية والأشجار	121
إكثار نباتات *Rhododendrons and Azaleas*	123
الغرض	123
تحضير الوسط الغذائي	124
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	124
دراسات متقدمة	124
الورود	125
الغرض	125
نحضير الوسط الغذائي	125

الجزء النباتي المنفصل	125
دراسات متقدمة	125
المراجع	127
الفصل التاسع	129
نباتات أحادية الصيغة الصبغية من زراعة المتك Haploid Plants from Anther Culture	129
زراعة متك الداتورا	131
الغرض	131
تحضير الوسط	131
ملاحظة	132
تجهيز الجزء المباتي المنفصل	132
الأسئلة	132
البنفسج الإفريقي	133
الغرض	133
تحضير الوسط الغذائي	133
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	133
الملاحظات	134
تقنية سحق الكروموسوم في قمة الجذر النامية	134
الأسئلة	134
التبغ (نبات الدخان)	135
الغرض	135
تحضير الوسط الغذائي	135
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	135
الملاحظات	136
الأسئلة	136
تقنية سحق المتك	136
المراجع	138
الفصل العاشر	143
إنقاذ الجنين Embryo Rescue	144
زراعة أجنة الذرة الحلوة	144
الغرض	144
تحضير الوسط الغذائي	144
تجهيز وزراعة جنين الذرة	145
الأسئلة	145
المراجع	147
الفصل الحادي عشر	150

زراعة القمة الإنشائية لإنتاج نباتات خالية من الفيروسات	151
عزل قمة البرعم الإنشائية	151
الغرض	151
تحضير الوسط الغذائي	151
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	152
الأسئلة	152
إنشاء نباتات خالية من الفيروسات والبكتيريا	153
الغرض	153
تحضير الوسط الغذائي	153
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	153
إكثار الثوم من قشور البصلة: Garlic propagation from bulb scales	154
الغرض	154
البيانات	155
المراجع	157
الفصل الثاني عشر	160
تكاثر نباتات الزينة التجاري خارج الجسم الحي	160
المرحلة الأولى	160
المرحلة الثانية	160
المرحلة الثالثة	161
المرحلة الرابعة	161
سرخس بوسطن (Boston Fern)	162
المرحلة الأولى	162
الغرض	162
تحضير الوسط	163
تجهيز اجزء النباتي المنفصل	163
ملاحظات	164
المرحلة الثانية	164
الغرض	164
تحضير الوسط	164
تجهيز اجزء النباتي المنفصل	165
ملاحظات	165
المرحلة الثالثة	165
الغرض	165
تحضير الوسط	165
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	166

166	النقل
167	سرخس ستاغهورن Staghorn Fern
167	الغرض
167	المرحلة الأولى
167	تحصير الوسط
168	تجهيز الجزء النباتي المنفصل
168	ملاحظات
169	المرحلة الثانية
169	تحضير الوسط
169	تجهيز الجزء النبتي المنفصل
169	ملاحظات
170	المرحلة الثالثة
170	تحضير الوسط
170	ملاحظات
170	البيانات والأسئلة
171	زراعة قمة البرعم التباتية
171	اللبخ(Ficus)
171	الغرض
171	المرحلة الأولى
171	تحضير الوسط:
172	تجهيز الجزء النباتي المنفصل
172	المرحلة الثانية
172	تحضير الوسط
172	المرحلة الثالثة
172	تحضير الوسط
173	تجهيز الجزء النباتي المنفصل
173	الأسئلة
173	كالانشوي Kalanchoe
173	الغرض
173	تحضير الوسط
174	تجهيز الجزء النباتي المنفصل
175	الأسئلة
175	البنفسج الأفريقي African Violet
175	الغرض
175	تحضير الوسط

تجهيز الجزء النباتي المنفصل	176
البيانات والأسئلة	176
الأنواع المهددة بالإنقراض	177
الصبار Cactus	177
الغرض	177
تحضير الوسط	177
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	178
المراجع	180
الفصل الثالث عشر	186
عزل وصهر المحتوى الخلوي Protoplast Isolation and Fusion	186
عزل وصهر المحتوى الخلوي النباتي	187
الغرض	187
النسيج النباتي	187
الإحتياجات	187
تحرير المحتوى الخلوي Protoplast Liberation	188
طريقة عمل بديلة لتحرير المحتوي الخلوي	189
إختيارية	189
تنقية المحتوى الخلوي	189
طريقة عمل بديلة لتنقية المحتوى الخلوي	190
التصبيغ حيوي	190
صهر المحتوى الخلوي	190
تحديد الناتج	191
تطوير بروتوكول عزل المحتوى الخلوي	192
المراجع	194
الفصل الرابع عشر	196
تحول النبات بواسطة البكتريا الأجرعية Agrobacterium-Mediated Transformation of Plants	196
قرص أوراق البتونيا أو التبغ	197
التسلسل	198
الغرض	198
تحضير الوسط	198
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	198
الزراعة المشتركة مع البكتيريا الأجرعية	199
تحول أو تحوير البراعم والقضاء على الأجرعية	199
مركزات المضادات الحيوية	199

تحضير الوسط	200
الإجراء	200
التجذير والإختبار المسبق للبراعم المتحولة	201
تحضير الوسط	201
الإجراء	201
قمة برعم البتونيا	202
الغرض	202
التسلسل	202
تحضير الوسط الغذائي	203
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	203
تحفيز البراعم	203
تحضير الوسط الغذائي	203
تجهيز الجزء النباتي المنفصل	203
تحويل قمة البرعم	203
تحضير الوسط الغذائي	203
التجذير	204
تحضير الوسط	204
ملاحظات	204
تسريب أوراق التبغ	205
الغرض	205
التسلسل (انظر الشكل 14.1).	205
تنمية البكتريا الأجرعية	205
تحضير وسط (YEP)	205
زراعة البكتريا الأجرعية	206
حصاد البكتريا الأجرعية	206
تحضير وسط التسريب (الإرتشاح)	206
الإجراء	206
تسريب أوراق التبغ	206
المراجع	209
فريق العمل	214

قائمة الجدول والملاحق والنماذج

جدول 2.1. الأواني، المواد والزجاجيات لكل محطة عمل بالمختبر	33
جدول 3.1. المركزات الخمسة للأملاح غير العضوية لوصفة موراشيجي وسكوج (1962)	47
جدول 3.2. وصفات أملاح غير عضوية لعدد من الأوساط القاعدية لزراعة الأنسجة النباتية (بالميليجرام في اللتر)	48
جدول 3.3. منظمات النمو الشائع إستخدامها في زراعة الأنسجة النباتية	49
نموذج 3.1. خطوات تحضير الوسط الغذائي	50
ملحق 3.1. بعض القياسات المفيدة المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية	51
ملحق 3.2. (أ) مراجعة نسب تحضير المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية	52
ملحق 3.2. (ب) مراجعة نسب تحضير المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتي	53
ملحق 3.2. (ت) طرق تخفيف المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية	54
ملحق 3.3. قائمة الشركات الخاصة بتوفير زراعة الأنسجة النباتية	55
جدول 8.1. مكونات وسط الأشجار الخشبية[1] مع 1.0 ميكرومول (2iP)	126
جدول 9.1. مكونات أملاح وسط زراعة متك البنفسج الأفريقي	137

قائمة الأشكال

شكل 4.1. رسم تخطيطي للأجزء النباتية المنفصلة من (I) نبات، (II) زهرة، (III) بذرة فلقة واحدة، (IV) بذرة فلقتين.	67
شكل 6.1. للحصول على أقسام من السويقة الجنينية، إقطع عرضياً 1.0 سم. توضع القطاعات العرضية الجزء الأعلى لأعلى والأسفل للأسفل والعكس. والقطاعات الطولية توضع السطح المقطوع لأعلى ولأسفل	100
شكل 6.2. مراحل نمو نسيج الكدب الخمسة. (1) مرحلة التباطؤ، تتهيأ الخلايا للإنقسام؛ (2) مرحلة النمو الأسي، المرحلة الأعلى من إنقسام الخلايا؛ (3) مرحلة النمو الخطي، تنخفض سرعة إنقسام الخلايا وتبدأ في التوسع؛ (4) مرحلة تباطؤ النمو؛ و(5) المرحلة الساكنة ويبقى عدد الخلايا ثابتاً	100
شكل 6.3. خذ عينتين كل 5 أيام وأرسم الوزن الجاف والرطب لإنشاء منحنى النمو	100
شكل 7.1. خلال عملية تكوين الأجنة الجسدية، تخضع الخلية الجسدية (الغير مشيجية) للتمايز لتكوين هيكل ثنائي القطبية يحتوي على محوري الجذير والسويقة. هذا الجنين الجسدي قادر على النضج والإنبات	116
شكل 7.2. زراعة اجزء القاعدي من حرشفة الأبصال.	116
شكل 10.1. قطاع طولي لحبة الذرة الشامي	146
شكل 11.1. (أ) قبة البرعم القمية كحزء نباتي منفصل لزراعة القمة الإنشائية، (ب) القمة الإنشائية بعد إستئصالها للنطعيم	156
شكل 11.2.إتباع هذه الخطوات لإكثار الثوم النسيلي وإنشاء زراعات خالية من الفيروسات	156
شكل 12.1. زراعة الطرف القمي من الساق الجارية (1.5 سم) لسرخس بوسطن.	179
شكل 12.2. إستئصال 6 أجزاء نباتية منفصلة من البنفسج الأفريقي: 4 من نصل الورقة (1 سم2) وأثنان من عنق الورقة (1 سم). أقطع الثمانية أقسام من الورقة وإضافة العرق الرئيسي بالقرب من القطاع المتطفر	179
شكل 13.1. الجزء (A) جدول عزل المحتوى الخلوي.تم إجراءت الخطوات المبينة في المربعات. يوضح الجزء (B) ترشسح نسيج كدب القطن: وضع 52 ميكرومتر غربال نايلون على فوهة كأس 10 مل مع الجزء الأسفل في الخارج. (from Smith, 2013	193
شكل 14.1. تشريب ورقة التبغ Tobacco leaf infiltration	208

الفصل الأول

تاريخ زراعة الخلية النباتية History of Plant Cell Culture

مقدمة

يشار إلى زراعة الخلايا والأنسجة النباتية (plant tissue culture) بالزراعة خارج الجسم الحي (in vitro propagation) أو الزراعة المعقمة (aseptic culture)، وهي أداة هامة في الدراسات الأساسية والتطبيقية وكذلك في التطبيق التجاري (Thorpe, 1990; 2007; Stasolla and Thorpe 2011). هذا وقد أوصى (Street, 1977) باستخدام مصطلح أكثر تقييداً لزراعة الأنسجة النباتية، كالزراعة المعقمة للخلايا والأنسجة والأعضاء، ومكوناتها تحت ظروف فيزيائية وكيميائية معلومة خارج الجسم الحي. وقد أورد (Gautheret, 1985) الخطوة المبكرة نحو زراعة الأنسجة النباتية التي كتبها (Henri-Louis Duhumel du Monceau in 1756) خلال دراستهم الرائدة على التئام الجروح في النباتات ملاحظة تشكيل نسيج الكدب. وقد أدت الدراسات المجهرية واسعة النطاق لتطور مستقل وشبه متزامن لنظرية الخلية لكل من (Schleiden, 1838) و(Schwann, 1839). وتقول هذه النظرية أن الخلية هي وحدة التركيب الوظيفية في الكائن الحي وبالتالي قادرة على التحكم الذاتي. تم اختبار هذه الفكرة من قبل عدد من الباحثين، إلا أن تجارب (Vöchting, 1878) في تشكيل نسيج الكدب على أقسام أو شرائح النبات ربما كانت الأكثر أهمية. وقد أوضح أن الجزء العلوي من شريحة الجذع تنتج دائماً براعم والجزء الأسفل ينتج نسيج كدب أو جذور مستقلة عن الحجم حتى الوصول إلى شريحة رقيقة جداً، وبهذا تم التعرف على التنامي القطبي حسب وظيفة الخلايا ومواقعها بالنسبة إلى حدود القطع.

اقترح (Haberlandt, 1902) –في خطابه أمام الأكاديمية الألمانية للعلوم في عام 1902– الأساس النظري لزراعة الأنسجة النباتية بناءً على تجاربه في زراعة الخلايا المفردة. ورأى حسب معرفته، بأنه لا توجد محاولات منهجية منتظمة لزراعة الخلايا الخضرية المعزولة من النباتات العليا. ومع ذلك، فإن نتائج تجارب هذه الزراعة ينبغي أن تعطي بعض الأفكار المهمة إلى امتلاك الخلية خصائص وإمكانات ككائن حي أولي. علاوة على ذلك، فإنه توفر معلومات حول العلاقات المتداخلة والتأثيرات التكميلية التي تتعرض لها الخلايا داخل الكائن الحي كله (Krikorian and Berquam, 1969). ولم ينجح التجريب مع خلايا ورقة التمثيل الضوئي المعزولة وخلايا متمايزة وظيفياً، ولكن مع ذلك تنبأ بأنه يمكن "زراعة الأجنة الاصطناعية بنجاح من الخلايا الخضرية". وهكذا أسس بوضوح مفهوم المقدرة الذاتية، وزيادة على ذلك أشار إلى أن "تقنية زراعة الخلايا النباتية المعزولة في محلول مغذٍ يسمح بالتحقيق في المشاكل الهامة من المنهج التجريبي الجديد". وعلى أساس هذه المخاطبة في عام 1902 والتجريب الرائد قبل وبعد ذلك، كان مبرراً كافياً ليصبح (Haberlandt) أب زراعة الأنسجة النباتية.

لمزيد من التفصيل على الأحداث الرائدة الأولى في زراعة الأنسجة النباتية راجع كتابات (White, 1963; Bhojwani and Razdan, 1983; and Gautheret, 1985).

السنوات المبكرة: The Early Years

نجح كلٌ من (Kotte, 1922) وهو طالب (Haberlandt) و(Robbins, 1922) في استخدام نهج مختلف في زراعة قمة الجذور المعزولة. وقد نجح (White, 1934a) في زراعة قمة جذور الطماطم المستمرة باستخدام أجزاء منفصلة تحتوي على خلايا إنشائية. وسمحت الدراسات اللاحقة بزراعة الجذور على وسط غذائي محدد بالكامل. وتم استخدام هذه الزراعات الجذرية في البداية للدراسات الفيروسية وفيما بعد كأداة رئيسية للدراسات الفسيولوجية (Street, 1969). وقد حققت أيضاً نجاحاً في زراعات البراعم (Loo, 1945; Ball, 1946).

وقد كانت بدايات زراعة الأجنة في السنين المبكرة من القرن العشرين، حيث نجح كل من (Hannig, 1904) في زراعة أجنة من العائلة الصليبية و(Brown, 1906) في زراعة أجنة الشعير (Monnier, 1995). وقد تلى ذلك النجاح في عملية إنقاذ الأجنة من بذور غير قابلة للحياة من التهجين بين (*Linum perenne* × *L. austriacum*) (Laibach, 1929). وقد استطاع (Tukey, 1934) السماح لتطور الجنين الكامل في بعض الأنواع من ذوات النضوج المبكر من أشجار الفاكهة، وبالتالي توفير واحدة من أولى التطبيقات للزراعة خارج الجسم الحي. وقد واجه (LaRue, 1936) ظاهرة الإنبات المبكر.

تم الحصول على أول زراعات الأنسجة النباتية بواسطة (Gautheret, 1934; 1935) من نسيج كامبيوم نبات (*Acer pseudoplatanus*). وقد نجح أيضاً باستخدام نفس الأجزاء المنفصلة في نباتات (*Ulmus campestre*, *Robinia pseudoacacia*, and *Salix capraea*) باستخدام وسط محلول (Knop's) المتصلب بالآجار مع إضافة جلوكوز وهيدروكلوريد السستيين. استطاع كل من (Gautheret, 1939) و(Nobécourt, 1939a) وفي وقت متزامن الحصول على تكوين نسيج كدب جذور نبات الجزر باستخدام أوكسين حامض الخليك وإضافة فيتمينات "ب". كما تمكن (White, 1939a) من الحصول على نسيج كدب من أنسجة الورم في هجين التبغ (*Nicotiana glauca* × *N. langsdorffii*)، والتي لاتحتاج إلى أوكسين ومقدرتها للنمو المستمر في الزراعة ويمكن دفعها للتمايز لبراعم وجذور. هذا، كل الأجزاء المنفصلة التي استخدمها أولئك الرواد شملت أنسجة إنشائية. وبذلك، وضعت هذه النتائج الأساس لزيادة كبيرة في استخدام الزراعات خارج الجسم الحي في العقود اللاحقة.

عصر تطوير التقانات The Era of Techniques Development

شهدت أربعينيات وخمسينيات وستينيات القرن الماضي تطورات كبيرة لتقنيات جديدة وتحسين التقانات المتاحة. فإن تطبيق ماء جوز الهند (حليب جوز الهند) من قبل (Van Overbeek *et al.*, 1941) سمح بزراعة الأجنة اليافعة والأنسجة المتمردة الأخرى، بما في ذلك ذوات الفلقة الواحدة. كذلك، تم إنشاء زراعات أنسجة الكدب لأنواع عديدة، بما في ذلك مجموعة متنوعة من نباتات ذات الفلقتين الخشبية والعشبية وعاريات البذور وكذلك إنشاء أنسجة الورم التاجي (Gautheret, 1985). أيضاً في هذا الوقت، تم التعرف على أن الخلايا في الزراعة خضعت لمجموعة متنوعة من التغييرات، بما في ذلك فقدان الحساسية لتطبيق الأوكسين أو التعود (habituation) (Gautheret, 1942; 1955) وكذلك التغير في الخلايا الإنشائية المتشكلة من نسيج الكدب (Gautheret, 1955; Nobécourt, 1955). وعلى الرغم من ذلك، فإن معظم تقنيات الزراعة خارج الجسم الحي المستخدمة اليوم تم تطويرها خلال هذه الفترة إلى حد كبير.

وأظهرت دراسات (Skoog and Tsui, 1948) أن إضافة الأدينين والمستويات العالية من الفوسفات سمحت بزراعة أنسجة اللب غير الإنشائية وإنتاج براعم وجذور فقط في وجود أنسجة وعائية. الدراسات اللاحقة باستخدام الأحماض النووية أدت لاكتشاف أول سايتوكينين (الكينتين) كناتج لانهيار الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) لحيوانات حوت الرنجة المنوية بالتسخين (Miller *et al.*, 1955). وبتوافر الكينتين ارتفع كذلك عدد الأنواع التي يمكن زراعتها لفترات طويلة، ولكن ربما الأهم من ذلك، أدى إلى التعرف بأن التوازن الخارجي للأوكسين والكينتين في الوسط أثر في مصير التشكل من أنسجة كدب التبغ (Skoog and Miller, 1957). إن المستوى العالي نسبياً من الأوكسين إلى الكينتين يؤدي إلى تكوين الجذور، والعكس إلى تكوين براعم، والمستوى المتوسط إلى تكاثر نسيج الكدب. وقد تبين عمل هذا النموذج من التشكل في أنواع نباتية عديدة (Evans *et al.,* 1981). تم اكتشاف سايتوكينينات داخلية بعد ذلك في العديد من الأنسجة، بما في ذلك ماء جوز الهند (Letham, 1974). بالإضافة إلى تشكيل البراعم أحادية القطب والجذور، وقد تم الإبلاغ عن تشكيل الأجنة الجسدية ذات القطبين (في نبات الجزر) لأول مرة بشكل مستقل من قبل (Reinert, 1958; 1959) و(Steward *et al.*, 1958).

وقد تحققت زراعة الخلايا المفردة (وكتل الخلايا الصغيرة) عن طريق هز وتحريك زراعات نسيج كدب نبات (*Tagetes erecta*) والتبغ ووضعها لاحقاً على ورق ترشيح فوق نسيج كدب مؤسس، لما يسمى بالزراعة الحاضنة (nurse culture) (Muir *et al.*, 1954; 1958). وفي وقت لاحق، أصبح من الممكن زراعة الخلايا المفردة في وسط نمت فيه بالفعل أنسجة مما يعرف بالوسط المتكيف (conditioned medium) (Jones *et al.*, 1960). كذلك، أدمج (Bergmann, 1959) خلية مفردة في طبقة 1.0 مم من وسط متصلب

حيث تشكلت بعض مستعمرات الخلية. وقد تم استخدام هذه التقنية بطريقة موسعة في استنساخ الخلايا وزراعة المحتوى الخلوي (Bhojwani and Razdan, 1983). ونجح (Kohlenbach, 1959) في زراعة خلايا عمادية (mesophyll) ناضجة متمايزة معزولة ميكانيكياً لنبات (*Macleaya cordata*) وتم تحفيزها في وقت لاحق لأجنة جسدية من نسيج الكدب (Kohlenbach, 1966). أن أول زراعة واسعة النطاق من الخلايا النباتية التي وردت في تقرير (Tulecke and Nickell, 1959) الذين زرعوا خلايا معلقة لنباتات (*Ginkgo*)، و(*Lolium*) و(holly) وتنميتها في زجاجيات مبللة سعة 20 لتر. تم استخدام ماء جوز الهند كمادة مضافة إلى وسط طازج، بدلاً من إستخدام وسط مكيف، وأدرك (Vasil and Hildebrandt, 1965) أخيراً حلم (Haberlandt) من إنتاج نبات كامل من التبغ من خلية واحدة مما أوضح مقدرة الخلايا الذاتية.

واستندت الأوساط الغذائية المبكرة التي تم استخدامها لتنمية الأنسجة النباتية على تركيبات المواد الغذائية للنباتات الكاملة، والتي يوجد منها الكثير (White, 1963)، ولكن محاليل (Knop’s) و(Uspenski and Uspenskia) قد تم استخدامها كثيراً وتوفر أقل من 200 ميليجرام في اللتر من جملة الأملاح. وقد ضاعف (Heller, 1953) تركيز الأملاح استناداً على دراسات في الجزر وأنسجة نبات (Virginia creeper)، كما زاد (Nitsch and Nitsch, 1956) تركيز الأملاح لحوالي 4 جرام في اللتر استناداً على عملهم في نبات (Jerusalem artichoke). ومع ذلك، فإن هذه التغييرات لم توفر النمو الأمثل للأنسجة، وتواتر الاحتياج لإضافات مواد معقدة، مثل خلاصة الخميرة، وهيدروليزات البروتين وماء جوز الهند. في مقاربة مختلفة على أساس فحص رماد نسيج كدب التبغ طور (Murashige and Skoog, 1962) وسط غذائي جديد. وكان تركيز بعض الأملاح 25 ضعفاً من محلول (Knop’s). وعلى وجه الخصوص، كان مستوى أيونات النترات (NO^{3-}) والأمونيوم (NH^{4+}) عالي جداً، وتمت زيادة مجموعة من المغذيات الدقيقة. وقد سمحت هذه الصيغة بزيادة أخرى في عدد من الأنواع النباتية التي تمت زراعتها في وسط معلوم يتكون من العناصر المغذية الكبرى والصغرى ومصدر كربون ونتروجين مختزل وفيتامين "ب" ومنظمات نمو (Gamborg *et al*., 1976).

نجح (Ball, 1946) من إنتاج نبيتات بزراعة القمة النامية من زوجين من مبتدئات الأوراق في نباتات (*Lupinus*) و(*Tropaeolum*)، ولكن لم يتم التعرف على أهمية هذه النتيجة حتى استخدم (Morel, 1960) هذا النهج للحصول على نبات سحلبية (orchids) خالي من الفيروسات، وأدرك قدرته على التكاثر النسيلي. وقد تم استغلال الإمكانات بسرعة، لا سيما مع نباتات الزينة (Murashige, 1974). وأظهرت دراسات (White, 1934b) المبكرة أن زراعة قمة الجذر كانت خالية من الفيروسات. في وقت لاحق لاحظ (Limmaset and Cornuet, 1949) أن عيار الفيروس في نسيج القمة الإنشائية كان منخفضاً جداً. وتم التأكد من ذلك بعد الحصول على نباتات داليا خالية من الفيروسات من نباتات مصابة بواسطة زراعة القمة النامية (Morel and

(Martin, 1952). وكان القضاء على الفيروس ممكناً لأن الأنسجة الوعائية، التي تتحرك فيها الفيروسات لا تمتد إلى قمة الجذر أو البرعم. وقد تم صقل هذه التقنية بواسطة (Quack, 1961) والآن تستخدم بشكل روتيني.

تم تطوير تقنيات زراعة أجزاء الزهرة والبذور خارج الجسم الحي خلال هذه الفترة. وكانت المحاولة الأولى لزراعة المبيض بواسطة (LaRue, 1942)، الذي حصل على نمو محدود من المبايض يرافقه تجذير العنيقات في العديد من الأنواع. مقارنة مع دراسات الأجنة، فإن نجاح زراعة البويضة محدود جداً. لقد تم توجيه دراسات زراعة كلاً من المبيض والبويضة أساساً لفهم العوامل التي تنظم الجنين ونمو الثمار (Rangan, 1982). وكانت أول زراعات الأنسجة النامية المستمرة من سويداء الذرة غير الناضجة (LaRue, 1949)؛ وفي وقت لاحق، تحقق تجديد النبيتات عبر تكوين الأعضاء في نبات (*Exocarpus cupressiformis*) (Johri and Bhojwani, 1965).

كان (Kanta *et al.*, 1962) من الرواد في التلقيح والتخصيب خارج الجسم الحي باستخدام نبات (*Papaver somniferum*). وينطوي هذا النهج على زراعة البويضات مع حبوب اللقاح في نفس الوسط وقد تم استخدامها لإنتاج هجن بين الأنواع وبين الأجناس (Zenkteler *et al.*, 1975). وفي وقت سابق، تحصل (Tuleke, 1953) مستعمرات خلية من حبوب لقاح نبات (*Ginkgo*) في الزراعة، وتحصل (Yamada *et al.*, 1963) على نسيج كدب أحادي الصيغة الصبغية من متك نبات (*Tradescantia reflexa*) كامل. ومع ذلك، كان حصول (Guha and Maheshwari, 1964; 1966) على نباتات أحادية الصيغة الصبغية من زراعات متوك نبات (*Datura innoxia*) قد فتح مجالاً جديداً للتخليق الذكوري. وقد تم الحصول على نباتات تبغ أحادية الصيغة الصبغية بواسطة (Bourgin and Nitsch, 1967) مما يؤكد المقدرة الذاتية لحبوب اللقاح.

لقد تم الحصول على المحتويات الخلوية النباتية (plant protoplast) أو الخلية دون الجدران الخلوية المعزولة ميكانيكياً من الأنسجة منفصلة السيتوبلازم من الجدار الخلوي قبل أكثر من 100 عام بوسطة (Klercker, 1892)، وتحقق الانصهار الأول بواسطة (Küster, 1909) (Gautheret, 1985). وعلى الرغم من ذلك، كانت هذه التقنية غير مستكشفة حتى استخدام إنزيم سيليوليز الفطر بواسطة (Cocking, 1960) إيذاناً ببدء عهد جديد. أدى توافر إنزيم تدمير الجدار الخلوي التجاري إلى الاستخدام الواسع وتطوير تقنية المحتوى الخلوي في سبعينيات القرن الماضي. وكان التوضيح الأول لمقدرة المحتوى الخلوي الذاتية بواسطة (Takebe *et al.*, 1971)، الذي حصل على نباتات تبغ من محتوى خلوي خلايا عمادية. وأعقب ذلك تجديد أول النباتات الهجين بين أنواع التبغ (*Nicotiana glauca* × *Nicotiana langsdorffii*) بواسطة (Carlson *et al.*, 1972).

أوضح (Braun, 1941) أن البكتريا الأجرعية المورمة يمكن أن تحفز الأورام في زهرة الشمس، وليس فقط في المواقع الملقحة، ولكن في نقاط بعيدة. وكانت هذه الأورام الثانوية خالية من البكتيريا ويمكن زراعة خلاياها من دون أوكسين (Braun and White, 1943). وأظهرت التجارب أيضاً أن أنسجة الورم التاجي الخالية من البكتيريا تتضمن أساس تحفيز الورم ((tumor-inducing principle (TIP))، الذي ربما كان جزيئاً كبيراً (Braun, 1950). وقد تم معرفة طبيعة (TIP) في سبعينيات القرن الماضي (Zaenen *et al.*, 1974)، ولكن تجربة (Braun, 1950) أصبحت أساس التحول القائم على البكتريا الأجرعية. تجدر الإشارة إلى أن اكتشاف (Ledoux, 1965) بأن الخلايا النباتية قد تستوعب وتدمج الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين مثير للجدل لأكثر من عقود من الزمان.

الماضي القريب The recent past

استنادا على توافر مختلف التقنيات خارج الجسم الحي التي تم مناقشتها أعلاه، فليس من المستغرب أن تبدأ في منتصف ستينيات القرن الماضي زيادة كبيرة في التطبيقات على مختلف المشاكل في البيولوجيا الأساسية والزراعة والبستنة والحراجة خلال سبعينيات وثمانينيات القرن الماضي. هذه التطبيقات يمكن تقسيمها تقسيماً مريحاً إلى خمسة مجالات واسعة، وهي: (أ) سلوك الخلية، (ب) تعديل وتحسين النبات، (ج) النباتات خالية من مسببات الأمراض وتخزين المادة الوراثية، (د) النشر النسيلي، و(هـ) تشكيل المنتج (Thorpe, 1990).

سلوك الخلية Cell Behaviour

يشمل سلوك الخلية الدراسات التي تتناول علم الخلايا، والتغذية، والأيض الأساسي والثانوي وكذلك التشكل وعلم أمراض الأنسجة المزروعة (Thorpe, 1990). وقد أجريت دراسات على هيكل وفسيولوجيا الخلايا الساكنة في الجزء النباتي المنفصل، والتغيرات في بنية الخلية المرتبطة بتحفيز الانقسام في هذه الأجزاء النباتية المنفصلة، وخصائص تطوير خلايا نسيج الكدب والخلايا المزروعة والمحتوى الخلوي التي تم إجراؤها باستخدام المجهر الضوئي والإلكتروني (Yeoman and Street, 1977; Lindsey and Yeoman, 1985; Fowke 1986, 1987). أظهرت دراسات علم الخلايا النووية السمات المشتركة من الخلايا المستزرعة وهي النسخ الداخلي (endoreduplication)، والانقسام الفتيلي الداخلي (endomitosis)، والتفكك النووي (nuclear fragmentation) (D’Amato, 1978; Nagl *et al.*, 1985).

كانت التغذية أحد الجوانب المبكرة التي تم التحقق عنها في زراعة الأنسجة النباتية كما تقدم سابقاً. وقد تم إحراز تقدم في زراعة الخلايا ذاتية التغذية الضوئية (Yamada *et al.*, 1978; Hüsemann, 1985). الزراعة خارج الجسم الحي، وخاصة الخلايا المعلقة أصبحت مفيدة جداً في دراسة كل من الأيض الأساسي والثانوي

(Neumann *et al.*, 1985). وبالإضافة إلى توفير المحتوى الخلوي الذي تم الحصول عليه من العضيات السليمة والقابلة للحياة للدراسة (على سبيل المثال، الفجوات، (Leonard and Rayder, 1985))، وقد تم استخدام معلقات الخلية لدراسة تنظيم النيتروجين غير العضوي واستيعاب الكبريت (Filner, 1978)، والتمثيل الغذائي للكربوهيدرات (Fowler, 1978)، وأيض تمثيل الكربون الضوئي (Bender *et al.*, 1985; Herzbeck and Hüsemann, 1985)، ويظهر بوضوح فائدة مزارع الخلايا لتوضيح مسار النشاط. وترتبط معظم النتائج على عمليات الأيض الثانوية التي تعتمد على إمكانات الخلايا المستزرعة لتشكيل المنتجات التجارية، ولكن قد أسفرت أيضا عن معلومات بيوكيميائية أساسية (Constabel and Vasil, 1987; 1988).

التشكل أو أصل التشكل هو مجال البحث والذي ارتبط بزراعة الأنسجة وأصبح واحد من المساهمات الكبيرة لزراعة الأنسجة سواء من حيث المعرفة والتطبيق الأساسية (Thorpe, 1990). وقد تم استخدام تكوين الخشب أو تشكيل عناصر القصيبات الخشبية لدراسة التمايز الخلوي (Roberts, 1976; Phillips, 1980; Fukuda and Komamine, 1985). ولا سيما إن تعظيم الاستفادة من نظام خلايا الزينيا العمادية وحيدة الخلية أدى إلى تحسن كبير في معرفة هذه العملية. النتائج الكلاسيكية لكل من (Skoog and Miller, 1957) على التوازن الهرموني لتكوين الأعضاء استمر في التأثير على الأبحاث حول هذا الموضوع، وقد تم دعم هذا المفهوم أكثر مؤخراً بتحول الخلايا مع التعديل بشكل مناسب بالبكتريا الأجرعية (T-DNA) (Schell *et al.*, 1982; Schell, 1987). ومع ذلك، فمن الواضح من الأدبيات أن هناك عدة عوامل إضافية، بما في ذلك مواد النمو النشطة الأخرى، تتفاعل مع الأوكسين والسيتوكينين لإحداث تكوين أعضاء إنشائي. (Thorpe, 1980). بالإضافة إلى ذلك تم استخدام الأجزاء النباتية المنفصلة الضخمة، مثل الفلقات، والسويقات السفلي ونسيج الكدب (Thorpe, 1980)، وخلايا الطبقات الرقيقة (السطحية) (Tran Thanh Van and Trinh, 1978; Tran Thanh Van, 1980) في الدراسات التشكلية التقليدية، وكذلك لإنتاج الأعضاء والنبيتات الناشئة في مئات من الأنواع النباتية (Murashige, 1974; 1979). وعلاوة على ذلك، فقد تم إجراء الدراسات الفسيولوجية والبيوكيميائية على تكوين الأعضاء (Thorpe, 1980; Brown and Thorpe, 1986; Thompson and Thorpe, 1990). المجال الثالث من التشكل، هو تكوين الأجنة الجسدية، الذي تطور أيضاً خلال في هذه الفترة وفي وقت مبكر من ثمانينيات القرن الماضي التي تم فيها الإبلاغ عن أكثر من 130 نوعاً لتشكيل الهياكل ثنائية القطبية (Ammirato, 1983; Thorpe, 1988). وقد تحققت الزراعة الناجحة مع الحبوب والأعشاب والبقوليات، والصنوبريات، التي كانت تعتبر في السابق من المجموعات المتمردة (recalcitrant groups). تطوير نظام الخلية المفردة إلى الجنين في الجزر (Normura and Komamine, 1985) سمح بالدراسات المعمقة لهذه العملية.

لعبت مزارع الخلايا دوراً هاماً في دراسة التفاعل بين النبات والميكروب، وليس فقط في تكوين الأورام (Butcher, 1977)، لكن أيضاً على الكيمياء الحيوية في تكاثر الفيروس (Rottier, 1978)، وتفاعل الفيتوتوكسين (Earle, 1978)، ومقاومة الأمراض، وخاصة المتضررة من الأليكسينات النباتية (Miller and Maxwell, 1983). ومن أهم الدراسات في هذا المجال استخدام البكتريا الأجرعية، وعلى الرغم من إنها تهدف أساساً إلى تحسين النباتات، فقد قدمت معلومات أساسية في التفاعل مع النبات والميكروب (Schell, 1987).

تحوير وتحسين النباتات Plant Modification and Improvement

خلال العقدين السابع والثامن من القرن العشرين تم استخدام طرق الزراعة خارج الجسم الحي على نحو متزايد كعامل مساعد لطرق التربية التقليدية لتعديل وتحسين النباتات. لقد تم استخدام تقنية التحكم في التلقيح خارج الجسم الحي على السداة، المشيمة أو البويضة لإنتاج الهجن بين الأنواع وبين الأجناس النباتية المختلفة، والتغلب على عدم التوافق الجنسي الذاتي، وتحفيز النباتات أحادية الصيغة الصبغية (Yeung *et al.*, 1981; Zenkteler, 1984). وتم استخدام الجنين، المبيض، وزراعات البويضة في التغلب على عدم الحيوية وإنتاج أحادية الصيغة الصبغية وسكون البذور والمشاكل ذات الصلة (Yeung *et al.*, 1981; Zenkteler, 1984). لقد لعبت تقنية إنقاذ الجنين دوراً هاماً في إنتاج الهجن بين الأنواع وبين الأجناس على وجه الخصوص (Collins and Grosser, 1984).

وبحلول أوائل 1980، كان قد تم الإبلاغ عن التكوين الذكوري في بعض من 171 من الأنواع، منها العديد نباتات المحاصيل الهامة (Hu and Zeng, 1984). وأفادت التقارير عن التكوين الأنثوي في نحو 15 نوعاً من النباتات، في بعض منها لم ينجح التكوين الذكوري (San and Gelebart, 1986). وإن قيمة احادية الصبغيات هذه في إنها قد تستخدم للكشف عن الطفرات واسترداد العافية في النباتات معادة التركيب الفريدة، حيث لا يوجد إخفاء للأليلات المتنحية. وكذلك، فإن إنتاج أحادية الصيغة الصبغية المزدوجة يسمح بإنتاج الهجن وإدماجها في برامج التربية.

وقد لعبت مزارع الخلايا أيضاً دوراً هاماً في تعديل وتحسين النباتات، كما أنها وفرت مزايا لعزل المتغيرات (Flick, 1983). وعلى الرغم من متغيرات أنسجة الزراعة كانت معروفة منذ أربعينيات القرن الماضي، على سبيل المثال، التعود، إلا أنها جرت محاولات للاستفادة منها في تحسين النباتات خلال السبعينيات. هذا الاختلاف الجسدي يعتمد على الاختلاف الطبيعي في عشيرة الخلايا، إما قبل الزراعة أو بتحفيز الزراعة، وعادة ما تم ملاحظتها في تجدد النبيتات (Larkin and Scowcroft, 1981). قد يكون الاختلاف وراثي أو متعلق بالنشؤ اللابنيوي (غير الوراثي) (Larkin *et al.*, 1985; Scowcroft *et al.*, 1987)، ولكن التغيرات في

النبيتات المتجددة لها الأهمية الزراعية والبستانية. قد كان من الممكن أيضا إنتاج مجموعة واسعة من الخلايا المتحولة في الزراعة (Jacobs *et al.*, 1987). وتشمل هذه خلايا تظهر الاختلافات البيوكيميائية ومقاومة المضادات الحيوية ومبيدات الأعشاب والإجهاد. بالإضافة إلى انتخاب الخلايا المحتاجة غذائياً (auxotrophs) وذاتية التغذية (autotrophs) ومتغيرة النظم التنموية في الزراعة، وغالباً ما يتطلب تطبيق عامل انتقائي في وجود المطفر. ومع ذلك، في عدد قليل من الحالات أصبح من الممكن تجديد النباتات ذات الصفات المرغوبة، على سبيل المثال، مقاومة مبيدات الأعشاب في التبغ (Hughes, 1983)، ومقاومة ميثيل التربتوبان في (*Datura innoxia*) (Ranch *et al.*, 1983).

بحلول عام 1985 أصبح من الممكن تجديد ما يقرب من 100 نوعاً من كاسيات البذور من المحتوى الخلوي (Binding, 1986). القدرة على صهر المحتوى الخلوي النباتي بمواد كيميائية مثل البولي إثيلين جلايكول (PEG Polyethyleneglycol) وفيزيائية (الصهر الكهربائي electrofusion) سمح بإنتاج نباتات الهجن الجسدية، وكانت المشكلة الرئيسية هي القدرة على تجديد النباتات من الخلايا الهجينة (Evans *et al.*, 1984; Schieder and Kohn, 1986). وقد تم استخدام صهر المحتوى الخلوي لإنتاج مجموعات فريدة من السيتوبلازم النووي. وأحد الأمثلة على ذلك، تم نقل البلاستيدات الخضراء من نبات (*Brassica campestris*) المشفرة لمقاومة الأترازين (تم الحصول عليها من المحتوى الخلوي) للمحتوى الخلوي لنبات (*Brassica napus*) بسيتوبلازم لنبات (*Raphanus sativus*) (الذي يمنح عقم الذكور السيتوبلازمي من الميتوكوندريا الخاصة به). النباتات المنتخبة احتوت على أنوية من نبات (*B. napus*) وبلاستيدات خضراء من نبات (*B. campestris*) وميتوكوندريا من نبات (*R. sativus*) وله الصفات المرغوبة لنبات (*B. napus*) ويمكن استخدامه كهجين لإنتاج البذور (Chetrit *et al.*, 1985). من المؤسف، لا يوجد إلا عدد قليل من هذه الأمثلة.

تم تحقيق التعديل الوراثي للنباتات عن طريق نقل الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) عن طريق نواقل مستقلة وغير مستقلة منذ أوائل ثمانينيات القرن الماضي. وتشمل طرق الناقلات المستقلة التثقيب (الخرق) الكهربائي (electroporation) (Deshayes *et al.*, 1985)، صهر الجسيمات الدهنية (liposome fusion) (Deshayes *et al.*, 1985)، فضلاً عن القصف الدقيق (microprojectile bombardment) عالي السرعة (biolistics) (Klein *et al.*, 1987). الأسلوب الأخير يمكن تنفيذه بالخلايا والأنسجة والأعضاء. وإن استخدام البكتريا الأجرعية في النقل بواسطة النواقل قد تقدم بسرعة كبيرة منذ تقارير التحول المستقر الأولى (DeBlock *et al.*, 1984; Horsch *et al.*, 1984). على الرغم من استخدام المحتوى الخلوي في التحولات المبكرة، فقد تم استخدام الأعضاء المتجددة مثل الأوراق والجذوع والجذور لاحقاً (Gasser

and Fraley, 1989; Uchimiya *et al.*, 1989). ركزت الكثير من الأنشطة البحثية على استخدام هذه الأدوات في هندسة الصفات الزراعية الهامة لمكافحة الحشرات والأعشاب الضارة، والأمراض النباتية.

النباتات الخالية من العوامل الممرضة وتخزين الأصول الوراثية

Pathogen-Free Plants and Germplasm Storage

على الرغم من أن استخدام تقانات النباتات الخالية من العوامل الممرضة وتخزين الأصول الوراثية خارج الجسم الحي قد لا تظهر علاقة بينهما، إلا إن الاستخدام الرئيسي للنباتات خالية من مسببات المرض هو لتخزين المواد الوراثية وحركة المادة الحية عبر الحدود الدولية (Thorpe, 1990). لقد تم استخدام القدرة على التخلص من الفيروسات النباتية، والبكتيريا، والفطريات عن طريق زراعة القمم الإنشائية على نطاق واسع منذ ستينيات القرن الماضي. هناك حاجة لهذا النهج خاصة للمواد المصابة بالفيروسات، حيث يمكن القضاء بنجاح على الفطريات والبكتريا بعوامل مبيدات البكتريا والفطريات (Bhojwani and Razdan, 1983). وغالبا ما تقترن زراعة القمة الإنشائية مع المعاملات الحرارية أو العلاج الكيميائي للقضاء على الفيروس (Kartha, 1981).

تقليديا، تم الحفاظ على الأصول الوراثية في شكل البذور، ولكن القدرة على تجديد نباتات كاملة من خلايا جسدية وخلايا مشيجية وقمم البراعم قد أدى إلى استخدامها للتخزين (Kartha, 1981; Bhojwani and Razdan, 1983). وقد تم تطوير ثلاثة مناهج خارج الجسم الحي للتخزين وهي:

- استخدام معيقات النمو (مثل: maleic hydrazide, B995, and ABA) (Dodds, 1989)،
- ودرجة الحرارة المنخفضة غير المجمدة (1–9°م) (Bhojwani and Razdan, 1983)،
- والحفظ بالتبريد (Kartha, 1981). في هذا النهج الأخير، تجميد معلقات الخلايا والقمم النامية والأجنة الجسدية والنبيتات الصغيرة بعد معالجتها بواقي التجميد وتخزينها في درجة حرارة النيتروجين السائل (حوالي −196°م) (Kartha, 1981; Withers, 1985).

التكاثر النسيلي Clonal Propagation

استخدام تقانة زراعة الأنسجة للتكاثر الخضري في النباتات هو التطبيق الأكثر استخداماً للتكنولوجيا. وقد تم استخدامه مع جميع الرتب النباتية (Murashige, 1978; Conger, 1981)، على الرغم من أن بعض المشاكل لا تزال بحاجة إلى حلول، مثل فرط التميؤ (hyperhydricity) وشذوذ النباتات (abberant plants). هناك ثلاث طرق يمكن من خلالها تحقيق الإكثار الدقيق. وهي تعزيز كسر البرعم الإبطي، وإنتاج براعم عرضية بشكل مباشر أو غير مباشر عن طريق نسيج الكدب، وتكوين الأجنة الجسدية بشكل مباشر أو غير مباشر على الأجزاء النباتية المنفصلة (Murashige, 1974; 1978). كسر البرعم الإبطي ينتج عدد قليل من النبيتات،

لكنها بشكل وراثياً عام مطابق للأصل أو صادق النمط (true-to-type)، بينما، تكوين الأجنة الجسدية لديه القدرة على إنتاج عدد أكبر من النبيتات ولكن تحفز عدد أقل من الأنواع النباتية. تجارياً، يتم إنتاج العديد من نباتات الزينة، أساساً عن طريق كسر البرعم الإبطي (Murashige, 1990). كذلك، توجد بروتوكولات على نطاق المختبر لفئات أخرى من النباتات، بما في ذلك المحاصيل الحقلية والخضر والفاكهة، والمزروعات، وأشجار الغابات، ولكن غالباً ما تكون تكلفة الإنتاج العالية هي العامل المحدد في استخدامها تجارياً (Zimmerman, 1986).

تشكيل المنتج Product Formation

تنتج النباتات العليا عدد كبير من المواد الكيميائية العضوية المتنوعة، وهي مهمة في الأدوية والمنتجات الصناعية. جرت أول محاولة لزراعة الخلايا النباتية واسعة النطاق لإنتاج المواد الصيدلانية بواسطة شركة (Charles Pfizer Company (U.S.)) في خمسينيات القرن الماضي. لكن فشل البحث المحدود ادى إلى تقليل زيادة مزيد من الجهد في هذا المجال في الولايات المتحدة الأمريكية، علماً العمل في ألمانيا واليابان، على وجه الخصوص، أدى إلى تطوير هذا المجال بحيث تم اعتباره أحد التطبيقات الصناعية المجدية لزراعة الخلايا بحلول عام 1978 (Zenk, 1978). وعلاوة على ذلك، بحلول عام 1987 أصبح 30 من نظم زراعة الخلية تنتج أفضل مركبات ثانوية من النباتات المنتجة لها (Wink, 1987). لسوء الحظ، فإن العديد من المنتجات النباتية الهامة اقتصادياً إما لم تتشكل بكميات كبيرة بما فيه الكفاية أو لم تنتج على الاطلاق بزراعات الخلية النباتية. تم اتخاذ نهج مختلف لتعزيز العوائد من المركبات الثانوية. ويشمل ذلك استنساخ الخلية والانتخاب المتكرر لسلالات ذات إنتاجية عالية من عشائر الخلايا غير المتجانسة (Zenk, 1978; Dougall, 1987) وباستخدام تقنية مقايسة الإنزيم المرتبط بالتشرب المناعي (ELISA) وتقنيات المقايسة الإشعاعية (radioimmunoassay techniques) (Kemp and Morgan, 1987). وثمة نهج آخر ينطوي على اختيار خطوط الخلايا الطافرة المفرطة للمنتج المطلوب (Widholm, 1987). وكذلك، ثبت تعزيز تشكيل المنتج الثانوي باستخدام العوامل غير الحيوية، مثل التشعيع بالأشعة فوق البنفسجية، والتعرض للحرارة أو البرودة وأملاح المعادن الثقيلة، والمثيرات الحيوية (biotic elicitors) النباتية والميكروبية الأصل (Eilert, 1987; Kurz, 1988). وأيضاً، تم فحص استخدام تكنولوجيا الخلايا المجمدة لتعزيز تشكل المنتجات الثانوية (Brodelius, 1985; Yeoman, 1987).

إن مركزية نجاح إنتاج المواد الفعالة بيولوجياً هي القدرة على زراعة الخلايا على نطاق واسع تجارياً. وجرى تحقيق ذلك باستخدام أنظمة مفاعل يحتوي على حاوية تقليب ومجموعة من المفاعلات التي تتحرك بالهواء (Fowler, 1987). بالنسبة لكثير من الأنظمة، فقد تمت محاولة عملية الزراعة في خطوتين (أو على مرحلتين)

(Beiderbeck and Knoop, 1987; Fowler, 1987). في المرحلة الأولى، يتم التشديد على نمو الخلايا السريع وتراكم الكتلة الحيوية، في حين تركز المرحلة الثانية على تركيب المنتج مع الحد الأدنى من انقسام أو نمو الخلية. ومع ذلك، بحلول عام 1987 كان المستقلب الثانوي الوحيد المنتج من زراعات الخلية هو نافثوكوينون شيكونين (naphthoquinone shikonin) (Fujita and Tabata, 1987).

العصر الحاضر The present era

خلال تسعينيات القرن الماضي وأوائل القرن الحادي والعشرين تم ملاحظة استمرار التوسع في تطبيق التقنيات خارج الجسم الحي لعدد متزايد من الأنواع النباتية. وقد تم استخدام تقنيات زراعة الأنسجة مع جميع أنواع النباتات، بما في ذلك الحبوب والأعشاب (Vasil and Vasil, 1994)، والبقوليات (Davey *et al.,* 1994)، ومحاصيل الخضر (Reynolds, 1994)، والبطاطس (Jones, 1994) وغيرها من نباتات الجذور والدرنات (Krikorian, 1994a)، والبذور الزيتية (Palmer and Keller, 1994)، والنباتات المعتدلة (Zimmerman and Swartz, 1994) والمدارية والاستوائية (Grosser, 1994) الفواكه ومحاصيل المزروعات (Krikorian, 1994b)، وأشجار الغابات (Harry and Thorpe, 1994)، وبطبيعة الحال، نباتات الزينة (Debergh, 1994). وكما سيتبين من هذه المخطوطات، أن تطبيق تقانة الزراعة خارج الجسم الحي قد ذهبت إلى ما وراء الإكثار وشملت جميع مناهج تقنية الزراعة خارج الجسم الحي التي لها صلة أو ممكنة لنوع معين من مشكلة أو مشاكل تجرى معالجتها. ومع ذلك، لم يتحقق سوى نجاح محدود لاستغلال الاختلافات الجسدية (Karp, 1994) أو في التجديد للنبيتات المفيدة من خلايا المتطفرة (Dix, 1994)؛ أيضا، إن الوعود المبكرة لتقانة المحتوى الخلوي لم تتحقق (Feher and Dudits, 1994). وقد تم إحراز تقدم جيد في توسيع نطاق تكنولوجيا الحفظ بالتبريد لتخزين المواد الوراثية (Kartha and Engelmann, 1994). كما تم إحراز تقدم في تكنولوجيا البذور الإصطناعية (Redenbaugh, 1993).

ظلت زراعة الخلية أداة هامة في دراسة بيولوجيا النبات. ووضح التقدم في بيولوجيا الخلية، على سبيل المثال، في دراسات الهيكل الخلوي (Kong *et al.*, 1998)، والتغيرات الكروموسومية في الخلايا المستزرعة (Kaeppler and Phillips, 1993)، وفي دراسات دورة الخلية (Komamine *et al.*, 1993; Trehin *et al.*, 1998). وقد سمحت الأدوات الفسيولوجية والبيوكيميائية لإعادة النظر في نمو الأورام النسيجية الجديدة في مزارع الخلايا خلال التعود (habituation) وفرط التميؤ (hyperhydricity) وربطها بالنمو السرطاني المحتمل في النباتات (Gaspar, 1995). كما ظلت زراعات الخلية أداة هامة للغاية في دراسة الأيض الأساسي؛ على سبيل المثال، استخدام معلقات الخلية لتطوير أنظمة النسخ خارج الجسم الحي (Suguira, 1997) أو تنظيم أيض الكربوهيدرات في المحورات الوراثية (Stitt and Sonnewald, 1995). وقد أدى تطوير تقنيات زراعة الخلايا

النباتات الطبية إلى التعرف على أكثر من 80 من إنزيمات قلويات التصنيع الحيوي (Kutchan, 1998). توجد معلومات مماثلة ناشئة عن استخدام زراعات الخلية للدراسات الجزيئية والكيمياء الحيوية في مجالات أخرى من الأيض الثانوي ولدت نشاط بحثي في الهندسة الأيضية في النباتات لإنتاج الأيض الثانوي (Verpoorte *et al.*, 1998).

لا زالت مزارع الخلايا أداة هامة في دراسة التشكل، على الرغم من أن الاستخدام الحالي للطفرات التنموية، وخاصة في نبات (*Arabidopsis*)، أضافت معلومات قيمة حول تطور النبات. أدت الدراسات الجزيئية، الفسيولوجية والبيوكيميائية إلى فهم عميق للتمايز الخلوي، خاصة تشكيل عناصر الخشيبات (tracheary element formation) (Fukuda, 1997)، تكوين الأعضاء (Thorpe, 1993; Thompson and Thorpe, 1997) وتكوين الأجنة الجسدية (Nomura and Komamine, 1995; Dudits *et al.*, 1995).

إن وسائل الإدخال الدقيق للجينات الأجنبية من النظم البيولوجية المتنوعة سمح بالتقدم في البيولوجيا الجزيئية لهندسة النباتات الوراثية. لقد لعبت ثلاثة اختراقات كبرى أدواراً رئيسية في تطوير تكنولوجيا التحول (Hinchee *et al.*, 1994). وتشمل هذه الاختراقات: أ) تطوير ناقلات المكوك (shuttle vectors) لتسخير القدرة على نقل الجين الطبيعي من البكتريا الأجرعية (*Agrobacterium*) (Fraley *et al.*, 1985)، ب) أساليب استخدام هذه النواقل للتحول المباشر للأجزاء النباتية المنفصلة المتجددة التي تم الحصول عليها من أعضاء النبات (Horsch *et al.*, 1985) تطوير الواسمات المختارة (selectable markers) (Cloutier and Landry, 1994). بالنسبة للأنواع الغير قابلة للتحول بواسطة البكتريا الأجرعية التحول، تم استخدام طرق فيزيائية وكيميائية وميكانيكية للحصول على الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) في الخلايا. مع هذه المقاربات الأخيرة، ولا سيما المقذوف الحيوي، أصبح من الممكن تحويل أي نوع من الأنواع النباتية والأنماط الوراثية.

قد كان الدافع وراء الموجة الأولى من الأبحاث في مجال التكنولوجيا الحيوية النباتية أساساً من شركات صناعات البذور والكيماويات الزراعية وقد تركزت على الصفات المحصولية التي لها صلة مباشرة لهذه الصناعات، وهي الرقابة على الحشرات والأعشاب الضارة، والأمراض النباتية (Fraley, 1992). في الوقت الحاضر، أكثر من 100 نوع من النباتات تم هندستها وراثياً، بما في ذلك ما يقرب من جميع محاصيل النباتات ذات الفلقتين الرئيسية وعدد متزايد من تلك ذوات الفلقة الواحدة وكذلك بعض النباتات الخشبية. وقد أدت البحوث في ذلك الوقت إلى تطوير أنظمة نقل الجينات الروتينية لأهم المحاصيل. بالإضافة إلى ذلك، التحسينات التقنية مما يزيد من كفاءة التحول، ويمتد التحول إلى نخبة الأصول الوراثية التجارية وتخفيض تكاليف إنتاج النباتات المعدلة وراثياً. الموجة المقبلة في مجال التكنولوجيا الحيوية الزراعية هي بالفعل في التقدم مع تطبيقات التكنولوجيا

الحيوية الزراعية التي تهتم بتجهيز الأغذية، والمواد الكيميائية المتخصصة، والصناعات الدوائية (Datta, 2007).

يمكن استخلاص أهمية التكنولوجيا الحيوية النباتية من مؤتمر التكنولوجيا الحيوية النباتية والبيولوجيا خارج الجسم الحي في القرن الحادي والعشرين. وقد تم وضع هذا الموضوع من خلال برنامج علمي ركز على أهم التطورات، سواء أساسية وتطبيقية، في مجالات زراعة الأنسجة النباتية والبيولوجيا الجزيئية وتأثيرها على تحسين النباتات والتكنولوجيا الحيوية (Thorpe and Lorz, 1998). وكانت عناوين المحاضرات العامة:

(1) إنجازات التكنولوجيا الحيوية النباتية والفرص على عتبة القرن ال21،

(2) نحو المحاصيل المستدامة عن طريق التعاون الدولي،

(3) إشارة المسارات في مقاومة الأمراض النباتية،

(4) المواد الغذائية الدوائية: التحصين عن طريق الفم مع النباتات المعدلة وراثياً

(5) التكنولوجيا الحيوية النباتية وجين التلاعب

(6) استخدام الجذور النباتية لعلاج البيئة والتصنيع الكيميائية.

هذه العناوين لا تظهر بشكل واضح فقط مكانة زراعة الأنسجة النباتية ولكن حيث التوجه كشريك على قدم المساواة مع البيولوجيا الجزيئية كأداة في بيولوجيا النبات الأساسية وفي مختلف مجالات التطبيق. في وقت لاحق دعمت المؤتمرات في ولاية فلوريدا، الولايات المتحدة الأمريكية (2002)، بكين، الصين (2006)، وسانت لويس، ميسوري، الولايات المتحدة الأمريكية (2010) هذا الرأي وأثبتت التطورات التي تبذل في هذه المناطق بشكل واضح (Datta, 2007; Stasolla and Thorpe, 2011). كما أشار (Schell, 1995) إلى التقدم في التكنولوجيا الحيوية النباتية التطبيقية بإنها مطابقة تماماً بل انها في الواقع تحفز التقدم العلمي الأساسي.

المراجع

Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. In D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture* (Vol. 1, pp. 82–123). New York: Macmillan.

Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stems tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and of *Lupinus albus* L. *American Journal of Botany*, 33, 301–318.

Beiderbeck, R., and Knoop, B. (1987). Two-phase culture. In F. Constabel, and I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 4, pp. 255–266). New York: Academic Press.

Bender, L., Kumar, A., and Neumann, K.-H. (1985). On the photosynthetic system and assimilate metabolism of Daucus and Arachis cell cultures. In K.-H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard (Eds.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (pp. 24–42). Berlin: Springer-Verlag.

Bergmann, L. (1959). A new technique for isolating and cloning cells of higher plants. *Nature*, 184, 648–649.

Bhattacharyya, J. and Chakraborty, A. (2015). Genetic transformation of cultivated sesame (*Sesamum indicum* L. cv Rama) through particle bombardment using 5-day-old apical, meristematic tissues of germinating seedlings. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture,* 123 (3): 455-466.

Bhojwani, S. S., and Razdan, M. K. (1983). *Plant tissue culture: Theory and practice*: Developments in crop science. Amsterdam: Elsevier

Binding, H. (1986). Regeneration from protoplasts. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 259–274). New York: Academic Press.

Bourgin, J. P., and Nitch, J. P. (1967). Obtention de *Nicotiana* haploides à partir de'étamines cultivées *in vitro*. *Annales de Physiologie Végétale*, 9, 377–382.

Braun, A. C. (1941). Development of secondary tumor and tumor strands in the crown-gall of sunflowers. *Phytopathology*, 31, 135–149.

Braun, A. C. (1950). Thermal inactivation studies on the tumor inducing principle in crown-gall. *Phytopathology*, 40, 3.

Braun, A. C., and White, P. R. (1943). Bacteriological sterility of tissues derived from secondary crown-gall tumors. *Phytopathology*, 33, 85–100.

Brodelius, P. (1985). The potential role of immobilisation in plant cell biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 3, 280–285.

Brown, D. C. W., and Thorpe, T. A. (1986). Plant regeneration by organogenesis. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 49–65). New York: Academic Press.

Butcher, D. N. (1977). Plant tumor cells. In H. E. Street (Ed.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 429–461). Oxford: Blackwell Scientific.

Carlson, P. S., Smith, H. H., and Dearing, R. D. (1972). Parasexual interspecific plant hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* U.S.A., 69, 2292–2294.

Chetrit, P., Mathieu, C., Vedel, F., Pelletier, G., and Primard, C. (1985). Mitochondrial DNA polymorphism induced by protoplast fusion in Cruciferae. *Theoretical and Applied Genetics*, 69, 361–366.

Cloutier, S., and Landry, B. S. (1994). Molecular markers applied to plant tissue culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 31P, 32–39.

Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187, 927–929.

Collins, G. B., and Grosser, J. W. (1984). Culture of embryos. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 1, pp. 241–257). New York: Academic Press.

Conger, B. V. (Ed.), (1981). *Cloning agricultural plants via in vitro techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Constabel, F., and Vasil, I. K. (Eds.), (1987). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. (Vol. 4). New York: Academic Press.

Constabel, F., and Vasil, I. K. (Eds.), (1988). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. (Vol. 5). New York: Academic Press.

Crossway, A., Oakes, J. V., Irvine, J. M., Ward, B., Knauf, V. C., and Shewmaker, C. K. (1986). Integration of foreign DNA following microinjection of tobacco mesophyll protoplasts. *Molecular and General Genetics*, 202, 179–185.

D’Amato, F. (1978). Chromosome number variation in cultured cells and regenerated plants. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 287–295). International Association of Plant Tissue Culture: Univ. of Calgary.

Datta, S. K. (2007). Impact of plant biotechnology in agriculture. In E. C. Pua, and M. R. Davey (Eds.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry Transgenics crops* IV (Vol. 59, pp. 1–31). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Davey, M. R., Kumar, V., and Hammatt, N. (1994). *In vitro* culture of legumes. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 313–329). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Debergh, P. (1994). *In vitro* culture of ornamentals. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 561–573). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

DeBlock, M., Herrera-Estrella, L., van Montague, M., Schell, J., and Zambryski, P. (1984). Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. *EMBO Journal,* 3, 1681–168

Deshayes, A., Herrera-Estrella, L., and Caboche, M. (1985). Liposome-mediated transformation of tobacco mesophyll protoplasts by an Escherichia coli plasmid. *EMBO Journal*, 4, 2731–2739.

Dix, P. J. (1994). Isolation and characterisation of mutant cell lines. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 119–138). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Dodds, J. (1989). Tissue culture for germplasm management and distribution. In J. I. Cohen (Ed.), *Strengthening collaboration in biotechnology: International agricultural research and the private sector* (pp. 109–128). Washington, D.C.: Bureau of Science and Technology, AID.

Dougall, D. K. (1987). Primary metabolism and its regulation. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 97–117). New York: A. R. Liss.

Dudits, D., Györgyey, J., Bögre, L., and Bakó, L. (1995). Molecular biology of somatic embryogenesis. In T. A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 267–308). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Earle, E. D. (1978). Phytotoxin studies with plant cells and protoplasts. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 363–372). Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture.

Eilert, U. (1987). Methodology and aspects of application. In F. Constabel, and I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 4, pp. 153–196). New York: Academic Press. Elicitation.

Evans, D. A., Sharp, W. R., and Bravo, J. E. (1984). Cell culture methods for crop improvement. In W. R. Sharp, D. A. Evans, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture* (Vol. 2, pp. 47–68). New York: Macmillan.

Evans, D. A., Sharp, W. R., and Flick, C. E. (1981). Growth and behaviour of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In T. A. Thorpe (Ed.), Plant tissue culture: *Methods and applications in agriculture* (pp. 45–113). New York: Academic Press.

Fehér, A., and Dudits, D. (1994). Plant protoplasts for cell fusion and direct DNA uptake: Culture and regeneration systems. In I. K. Vasil, T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 71–118). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Filner, P. (1978). Regulation of inorganic nitrogen and sulfur assimilation in cell suspension cultures. In T. A. Thorpe (Ed*.), Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 437–442). Univ. of Calgary: International Association Plant Tissue Culture.

Flick, C. E. (1983). Isolation of mutants from cell culture. In D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture* (Vol. 1, pp. 393–441). New York: Macmillan.

Fowke, L. C. (1986). Ultrastructural cytology of cultured plant tissues, cells. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 323–342). New York: Academic Press.

Fowke, L. C. (1987). Investigations of cell structure using cultured cells and protoplasts. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 17–31). New York: A. R. Liss.

Fowler, M. W. (1978). Regulation of carbohydrate metabolism in cell suspension cultures. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 443–452). Univ. of Calgary: Intl. Assoc. Plant Tissue Culture.

Fowler, M. W. (1987). Process systems and approaches for large scale plant cell culture. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 459–471). New York: A. R. Liss.

Fraley, R. (1992). Sustaining the food supply. *Biotechnology*, 10, 40–43

Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Eichholtz, D. A., Flick, J. S., Fink, C. L., Hoffmann, N. L., and Sanders, P. R. (1985). The SEV system: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation. *Biotechnology*, 3, 629–635.

Fujita, Y., and Tabata, M. (1987). Secondary metabolites from plant cells—pharmaceutical applications and progress in commercial production. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 169–185). New York: A. R. Liss.

Fukuda, H. (1997). Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 47, 299–325.

Fukuda, H., and Komamine, A. (1985). Cytodifferentiation. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 2, pp. 149–212). New York: Academic Press.

Furusaki S, and Takeda T. (2017). *Bioreactors for plant cell culture, reference module in life sciences.* Dordrecht: Elsevier. Pp. 245.

Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., and Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro*, 12, 473–478.

Gaspar, T. (1995). The concept of cancer in *in vitro* plant cultures and the implication of habituation to hormones and hyperhydricity. *Plant Tissue and Culture Biotechnology*, 1, 126–136.

Gasser, C. S., and Fraley, R. T. (1989). Genetically engineering plants for crop improvement. *Science*, 244, 1293–1299.

Gautheret, R. J. (1934). Culture du tissus cambial. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sc.*, 198, 2195–2196.

Gautheret, R. J. (1935). *Recherches sur la culture des tissus végétaux*. Ph.D. Thesis, Paris.

Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sc.*, 208, 118–120.

Gautheret, R. J. (1942). Hétéro-auxines et cultures de tissus végétaux. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 24, 13–41.

Gautheret, R. J. (1955). Sur la variabilité des propriétés physiologiques des cultures de tissus

végétaux. *Rev. Gén. Bot.*, 62, 5–112.

Gautheret, R. J. (1985). History of plant tissue and cell culture: A personal account. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 2, pp. 1–59). New York: Academic Press.

Grosser, J. W. (1994). *In vitro* culture of tropical fruits. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 475–496). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

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

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

Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber. Akad. Wiss. Wien., *Math.-Naturwiss. Kl., Abt.*, 1(111), 69–92.

Hannig, E. (1904). Uber die Kultur von cruciferen embryonen ausserhalb den embryosacks. *Bot. Ztg.*, 62, 45–80.

Harry, I. S., and Thorpe, T. A. (1994). *In vitro* culture of forest trees. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 539–560). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Heller, R. (1953). Recherches sur la nutrition minérale des tissus végétaux cultivé *in vitro*. *Annals Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.*, 14, 1–223.

Herzbeck, H., and Husemann, W. (1985). Photosynthetic carbon metabolism in photoautotrophic cell suspension cultures of Chenopodium rubrum L. In K.-H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard (Eds.), *Primary and secondary metabolism of plant cell culture* (pp. 15–23). Berlin: Springer-Verlag.

Hinchee, M. A.W., Corbin, D. R., Armstrong, C. L., Fry, J. E., Sato, S. S., Deboer, D. L., Petersen, W. L., Armstrong, T. A., Connor-Ward, D. V., Layton, J. G., and Horsch, R. B. (1994). Plant transformation. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 231–270). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., and Hoffmann, N. (1984). Inheritance of functional foreign genes in plants. Science, 223, 496–498.

Horsch, R. B., Fry, J., Hoffman, N., Walroth, M., Eichholtz, D., Rogers, S., and Fraley, R. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. Science, 227, 1229–1231.

Hu, H., and Zeng, J. Z. (1984). Development of new varieties via anther culture. In P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. Yamada (Eds.), Handbook of plant cell culture (Vol. 3, pp. 65–90). New York: Macmillan.

Hughes, K. (1983). Selection for herbicide resistance. In D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), Handbook of plant cell culture (Vol. 1, pp. 442–460). New York: Macmillan.

Hüsemann, W. (1985). Photoautotrophic growth of cells in culture. In I. K. Vasil (Ed.), Cell culture and somatic cell genetics of plants (Vol. 2, pp. 213–252). New York: Academic Press.

Jacobs, M., Negruitiu, I., Dirks, R., and Cammaerts, D. (1987). Selection programmes for isolation and analysis of mutants in plant cell cultures. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), Plant tissue and cell culture (pp. 243–264). New York: A. R. Liss.

Johri, B. M., and Bhojwani, S. S. (1965). Growth responses of mature endosperm in cultures. Nature, 208, 1345–1347.

Jones, M. G. K. (1994). *In vitro* culture of potato. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), Plant cell and tissue culture (pp. 363–378). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Jones, L. E., Hildebrandt, A. C., Riker, A. J., and Wu, J. H. (1960). Growth of somatic tobacco cells in microculture. American Journal of Botany, 47, 468–475.

Kaeppler, S. M., and Phillips, R. L. (1993). DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In vitro* Cellular Developmental Biology, 29P, 125–130.

Kanta, K., Rangaswamy, N.S. and Maheshwari, P. (1962). Test-tube fertilization in flowering plants. *Nature*, 194, 1214-1217.

Karp, A. (1994). Origins, causes and uses of variation in plant tissue cultures. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 139–151). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Kartha, K. K. (1981). Meristem culture and cryopreservation methods and applications. In T. A. Thorpe (Ed.), *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture* (pp. 181–211). New York: Academic Press.

Kartha, K.K. and Engelmann, F. (1994). Cryopreservation and germplasm storage. In: I.K. Vasil and T.A. Thorpe (Eds.). *Plant cell and tissue culture* (pp. 195-230). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Kemp, H.A. and Morgan, M.R.A. (1994). Cryopreservation and germplasm storage. In: I.K. Vasil and T.A. Thorpe (Eds.). *Plant cell and tissue culture* (pp. 195-230). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327, 70–73.

Kohlenbach, H. W. (1959). Streckungs- und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von Macleaya cordata (Wild.) R. Br. *Naturwissenschaften*, 46, 116–117.

Kohlenbach, H. W. (1966). Die Entwicklungspotenzen explantierter und isolierter Dauerzellen. I. Das Strechungs- und Teilungswachstum isolierter Mesophyllzellen von Macleaya cordata, *Z. Pflanzenphysiol*., 55, 142–157.

Komamine, A., Ito, M., and Kawahara, R. (1993). Cell culture systems as useful tools for investigation of developmental biology in higher plants: Analysis of mechanisms of the cell cycle and differentiation using plant cell cultures. In W. Y. Soh, J. R. Liu, and A. Komamine (Eds.), *Advances in developmental biology and biotechnology of higher plants* (pp. 289–310). Proceedings First Asia Pacific Conference on Plant Cell and Tissue Culture, Taedok Science Town, Taejon, Korea, 5–9 Sept. 1993. The Korean Society of Plant Tissue Culture.

Kong, L., Attree, S. M., Evans, D. E., Binarova, P., Yeung, E. C., and Fowke, L. C. (1998). Somatic embryogenesis in white spruce: Studies of embryo development and cell biology. In S. M. Jain, and P. K. Gupta (Eds.), *Somatic embryogenesis in woody plants* (Vol. 4, pp. 1–28). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Kotte, W. (1922). Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. Beitr. Allg. Bot., 2, 413–434.

Krikorian, A. D. (1994a). *In vitro* culture of root and tuber crops. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 379–411). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Krikorian, A. D. (1994b). *In vitro* culture of plantation crops. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 497–537). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Krikorian, A.D. and Berquam D.J. (1969). Plant cell and tissue cultures: The role of Haberlandt. *Botanical Review*, 35, 59–67.

Kutchin, T. M. (1998). Molecular genetics of plant alkaloid biosynthesis. In G. Cordell (Ed.), *The alkaloids* (Vol. 50, pp. 257–316). San Diego: Academic Press.

Kurz, W. G. W. (1988). Semicontinuous metabolite production through repeated elicitation of plant cell cultures: A novel process. In T. J. Mabry (Ed.), *Plant biotechnology* (pp. 93–103). Austin, TX: IC2 Institute.

Laibach, F. (1929). Ectogenesis in plants: Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *Journal of Heredity*, 20, 201–208.

LaRue, C. D. (1936). The growth of plant embryos in culture. *Bulletin of the Torrey Botany Club*, 63, 365–382.

LaRue, C. D. (1942). The rooting of flowers in culture. *Bulletin of the Torrey Botany Club*, 69, 332–341.

LaRue, C. D. (1949). Culture of the endosperm of maize. *American Journal of Botany*, 36, 798.

Larkin, P. J., and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197–214.

Larkin, P. J., Brettell, R. I.S., Ryan, S. A., Davies, P. A., Pallotta, M. A., and Scowcroft, W. R. (1985). Somaclonal variation: Impact on plant biology and breeding strategies. In P. Day, M. Zaitlin, and A. Hollaender (Eds.), *Biotechnology in plant science* (pp. 83–100). New York: Academic Press.

Ledoux, L. (1965). Uptake of DNA by living cells. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 4, 231–267.

Leonard, R. T., and Rayder, L. (1985). The use of protoplasts for studies on membrane transport in plants. In L. C. Fowke, and F. Constabel (Eds.), *Plant protoplasts* (pp. 105–118). Boca Raton, FL: CRC Press.

Letham, D. S. (1974). Regulators of cell division in plant tissues. The cytokinins of coconut milk. *Physiologia Planatrum*, 32, 66–70.

Limasset, P., and Cornuet, P. (1949). Recherche du virus de la mosaïque du Tabac dans les méristèmes des plantes infectées. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 228, 1971–1972.

Lindsey, K., and Yeoman, M. M. (1985). Dynamics of plant cell cultures. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 2, pp. 61–101). New York: Academic Press.

Loo, S. W. (1945). Cultivation of excised stem tips of Asparagus *in vitro*. *American Journal of Botany*, 32, 13–17.

Miller, S. A., and Maxwell, D. P. (1983). Evaluation of disease resistance. In D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture* (Vol. 1, pp. 853–879). New York: Macmillan.

Miller, C., Skoog, F., Von Saltza, M. H., and Strong, F. M. (1955). Kinetin, a cell division factor from desoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77, 1392.

Monnier, M. (1995). Culture of zygotic embryos. In T. A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 117–153). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer

Morel, G. (1960). Producing virus-fee cymbidium. *American Orchid Society Bulletin*, 29, 495–497.

Morel, G., and Martin, C. (1952). Guérison de dahlias atteints d'une maladie á virus. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sc.*, 235, 1324–1325.

Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., and Riker, A. J. (1954). Plant tissue cultures produced from single isolated plant cells. *Science*, 119, 877–878.

Muir, W. H., Hildebrandt, A. C., and Riker, A. J. (1958). The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. *American Journal of Botany*, 45, 585–597.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue culture. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135–166.

Murashige, T. (1978). The impact of plant tissue culture on agriculture. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 15–26, 518–524). International Association of Plant Tissue Culture: Univ. of Calgary.

Murashige, T. (1979). Principles of rapid propagation. In K. W. Hughes, R. Henke, and M. Constantin (Eds.), *Propagation of higher plants through tissue culture*: A bridge between research and application (pp. 14–24). U.S. Dept. of Energy: Tech. Information Center.

Murashige, T. (1990). Practice with unrealized potential. In P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp, and Y. P.S. Bajaj (Eds.), *Plant propagation by tissue culture Handbook of plant cell culture* (Vol. 5, pp. 3–9). New York: McGraw-Hill.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantrum*, 15, 473–497.

Nagl, W., Pohl, J., and Radler, A. (1985). The DNA endoreduplication cycles. In J. A. Bryant, and D. Francis (Eds.), *The cell division cycle in plants* (pp. 217–232). Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.

Neumann, K.-H., Barz, W., and Reinhard, E. (Eds.), (1985). *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures*. Berlin: Springer-Verlag.

Nitsch, J. P., and Nitsch, C. (1956). Auxin-dependent growth of excised *Helianthus tuberosus* tissues. *American Journal of Botany*, 43, 839–851.

Nobécourt, P. (1939a). Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.*, 130, 1270–1271.

Nobécourt, P. (1939b). Sur les radicelles naissant des cultures de tissus végétaux. *C. R. Seances Soc. Biol. Ses Fil.*, 130, 1271–1272.

Nobécourt, P. (1955). Variations de la morphologie et de la structure de cultures de tissus végétaux. Ber. Schweiz. *Bot. Ges*., 65, 475–480.

Nomura, K., and Komamine, A. (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology*, 79, 988–991.

Nomura, K., and Komamine, A. (1995). Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In T. A. Thorpe (Ed.), *In vitro embryogenesis in plants* (pp. 249–265). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Palmer, C. E., and Keller, W. A. (1994). *In vitro* culture of oilseeds. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 413–455). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Phillips, R. (1980). Cytodifferentiation. *International Review of Cytology*, Supplement, 11A, 55–70.

Potrykus, I., Shillito, R. D., Saul, M., and Paszkowski, J. (1985). Direct gene transfer: State of the art and future potential. *Plant Molecular Biology Report*, 3, 117–128.

Quack, F. (1961). Heat treatment and substances inhibiting virus multiplication in meristem culture to obtain virus-free plants. *Advances in Horticultural Science and their Application,* Proceedings of the 15th International Horticulture Raghavan, V. (1980). Embryo culture. International Review of Cytology, Supplement, 11B, 209–240.

Ranch, J. P., Rick, S., Brotherton, J. E., and Widholm, J. (1983). Expression of 5-methyltryptophan resistance in plants regenerated from resistant cell lines of *Datura innoxia*. *Plant Physiology*, 71, 136–140.

Rangan, T. S. (1982). Ovary, ovule and nucellus culture. In B. M. Johri (Ed.), *Experimental Embryology of Vascular Plants* (pp. 105–129). Berlin: Springer-Verlag.

Redenbaugh, K. (Ed.), (1993). Synseeds: *Applications of synthetic seeds to crop improvement*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Reinert, J. (1958). Utersuchungen die Morphogenese an Gewebekulturen. Ber. Dtsch. *Bot. Ges*., 71, 15.

Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 53, 318–333.

Reynolds, J. F. (1994). *In vitro* culture of vegetable crops. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 331–362). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Robbins, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Botanical Gazette*, 73, 376–390.

Roberts, L. W. (1976). *Cytodifferentiation in plants: Xylogenesis as a model system*. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press.

Rottier, P. J. M. (1978). The biochemistry of virus multiplication in leaf cell protoplasts. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 255–264). Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture.

San, L. H., and Gelebart, P. (1986). Production of gynogenetic haploids. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 305–322). New York: Academic Press.

Schell, J. (1995). Progress in plant sciences is our best hope to achieve an economically rewarding, sustainable and environmentally stable agriculture. Plant Tissue Culture *Biotechnology*, 1, 10–12.

Schell, J. S. (1987). Transgenic plants as tools to study the molecular organization of plant genes. *Science*, 237, 1176–1183.

Schell, J., van Montague, M., Holsters, M., Hernalsteens, J. P., Dhaese, P., DeGreve, H., Leemans, J., Joos, H., Inze, D., Willmitzer, L., Otten, L., Wostemeyer, A., and Schroeder, J. (1982). *Plant cells transformed by modified Ti plasmids: A model system to study plant development. In Biochemistry of differentiation and morphogenesis*. Berlin: Springer-Verlag. 65–73.

Schieder, O., and Kohn, H. (1986). Protoplast fusion and generation of somatic hybrids. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 569–588). New York: Academic Press.

Schleiden, M. J. (1838). Beiträge zur Phytogenesis. Müllers Arch. *Anat. Physiol*., 137–176.

Schwann, T. (1839). *Mikroscopishe Utersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstum der Thiere und Pflanzen*, No. 176. Berlin: Oswalds.

Scowcroft, W. R., Brettell, R. I. S., Ryan, S. A., Davies, P. A., and Pallotta, M. A. (1987). Somaclonal variation and genomic flux. In C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett, and D. D. Biesboer (Eds.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 275–286). New York: A. R. Liss.

Skoog, F., and Miller, C. O. (1957). *Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures in vitro*. Symposium of the Society of Experimental Biology, 11, 118–131.

Skoog, F., and Tsui, C. (1948). Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. American Journal of Botany, 35, 782–787.

Stasolla, C., and Thorpe, T. A. (2011). Tissue culture; historical perspectives and applications. In A. Kumar, and S. K. Sopory (Eds.), *Applications of Plant Biotechnology* (in press). Dordecht, The Netherlands Kluwer Academic PublishersCongress, 1958(1), 144–148

Steward, F. C., Mapes, M. O., and Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705–708.

Stitt, M., and Sonnewald, U. (1995). Regulation of carbohydrate metabolism in transgenics. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46, 341–368.

Street, H. E. (1969). Growth in organized and unorganized systems. In F. C. Steward (Ed.), *Plant physiology* (Vol. 5B, pp. 3–224). New York: Academic Press.

Street, H. E. (1977). Introduction. In H. E. Street (Ed.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 1–10). Oxford, UK: Blackwell.

Suguira, M. (1997). *In vitro* transcription systems from suspension-cultured cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 383–398.

Takebe, I., Labib, C., and Melchers, G. (1971). Regeneration of whole plants from isolated mesophyll protoplasts of tobacco. *Naturwissenschaften*, 58, 318–320.

Thompson, M. R., and Thorpe, T. A. (1990). Biochemical perspectives in tissue culture for crop improvement. In K. R. Khanna (Ed.), *Biochemical aspects of crop improvement* (pp. 327–358). Boca Raton, FL: CRC Press.

Thompson, M. R., and Thorpe, T. A. (1997). Analysis of protein patterns during shoot initiation in cultured *Pinus radiata* cotyledons. *Journal of Plant Physiology*, 151, 724–734.

Thorpe, T. A. (1980). Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects. *International Review of Cytology*, 11A, 71–111.

Thorpe, T. A. (1988). *In vitro* somatic embryogenesis. ISI Atlas of Science: *Animal and Plant Science*, 81–88.

Thorpe, T. A. (1990). The current status of plant tissue culture. In S. S. Bhojwani (Ed.), Plant tissue culture: *Applications and limitations* (pp. 1–33). Amsterdam: Elsevier.

Thorpe, T. A. (1993). Physiology and biochemistry of shoot bud formation *in vitro*. In W. Y. Soh, J. R. Liu, and A. Komamine (Eds.), *Advances in Developmental Biology and Biotechnology of Higher Plants* (pp. 210–224). The Korean Society of Plant Tissue Culture: Proceedings of the First Asia Pacific Conference on Plant Cells and Tissue Culture, Taedok Science Town, Taejon, Korea, 5–9 Sept. 1993.

Thorpe, T. A. (2007). *History of plant tissue culture. Molecular Biotechnology*, 37, 169–180.

Thorpe, T. A., and Lorz, H. (1998). IAPTC Congress in retrospect: IXth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Jerusalem: Israel. June 14–19, 1998. *Plant Tissue Culture Biotechnology* 4, 121–124.

Tran Thanh Van, K. (1980). Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. *International Review of Cytology*, Supplement, 11A, 175–194.

Tran Thanh Van, K., and Trinh, H. (1978). Morphogenesis in thin cell layers: Concept, methodology and results. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 37–48). Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture.

Trehin, C., Planchais, S., Glab, N., Perennes, C., Tregear, J., and Bergounioux, C. (1998). Cell cycle regulation by plant growth regulators: Involvement of auxin and cytokinin in the re-entry of Petunia protoplasts into the cell cycle. *Planta*, 206, 215–224.

Tukey, H. B. (1934). Artificial culture methods for isolated embryos of deciduous fruits. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 32, 313–322.

Tulecke, W. (1953). A tissue derived from the pollen of Ginkgo biloba. *Science*, 117, 599–600.

Tulecke, W., and Nickell, L. G. (1959). Production of large amounts of plant tissue by submerged culture. *Science*, 130, 863–864.

Uchimiya, H., Handa, T., and Brar, D. S. (1989). Transgenic plants. *Journal of Biotechnology*, 12,

Van Overbeek, J., Conklin, M. E., and Blakeslee, A. F. (1941). Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science*, 94, 350–351.

Vasil, I. K. (Ed.), (1984). Cell culture and somatic cell genetics of plants: *Laboratory procedures and their applications*. (Vol. 1). New York: Academic Press.

Vasil, I. K., and Thorpe, T. A. (Eds.), (1994). *Plant cell and tissue culture*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Vasil, I. K., and Vasil, V. (1994). *In vitro* culture of cereals and grasses. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 293–312). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer.

Vasil, V., and Hildebrandt, A. C. (1965). Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in micro cultures. *Science*, 150, 889–892.

Verpoorte, R., van der Heijden, R., ten Hoopen, H. J.G., and Memclink, J. (1998). Metabolic engineering for the improvement of plant secondary metabolite production. *Plant Tissue Culture Biotechnology*, 4, 3–20.

Vöchting, H. (1878). *Über Organbildung im Pflanzenreich*. Bonn: Max Cohen pub. Pp. 234..

White, P. R. (1934a). Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiology*, 9, 585–600.

White, P. R. (1934b). Multiplication of the viruses of tobacco and Aucuba mosaics in growing excised tomato root tips. *Phytopathology*, 24, 1003–1011.

White, P. R. (1939a). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, 26, 59–64.

White, P. R. (1939b). Controlled differentiation in a plant tissue culture. *Bulletin of the Torrey Botany Club*, 66, 507–513.

White, P. R. (1963). *The cultivation of animal and plant cells* (2nd ed.). New York: Ronald Press.

Widholm, J. M. (1987). Selection of mutants which accumulate desirable secondary products. In F. Constabel, and I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 4, pp. 125–137). New York: Academic Press.

Wink, M. (1987). Physiology of the accumulation of secondary metabolites with special reference to alkaloids. In F. Constabel, and I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 4, pp. 17–42). New York: Academic Press.

Withers, L. A. (1985). Cryopreservation of cultured cells and meristems. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 2, pp. 253–316). New York: Academic Press.

Yamada, T., Shoji, T., and Sinoto, Y. (1963). Formation of calli and free cells in a tissue culture of *Tradescantia reflexa. Botany Magazine*, 76, 332–339.

Yamada, Y., Fumihiko, S., and Hagimori, M. (1978). Photoautotropism in green cultured cells. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 453–462). Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture.

Yeoman, M. M. (1987). Techniques, characteristics, properties, and commercial potential of immobilized plant cells. In F. Constabel, and I. K. Vasil (Eds.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 4, pp. 197–215). New York: Academic Press.

Yeoman, M. M., and Street, H. E. (1977). General cytology of cultured cells. In H. E. Street (Ed.), *Plant tissue and cell culture* (pp. 137–176). Oxford, UK: Blackwell.

Yeung, E. C., Thorpe, T. A., and Jensen, C. J. (1981). *In vitro* fertilization and embryo culture. In T. A. Thorpe (Ed.), *Plant tissue culture: Methods and applications in agriculture* (pp. 253–271). New York: Academic Press.

Zaenen, I., van Larebeke, N., Touchy, H., Van Montagu, M., and Schell, J. (1974). Super-coiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains. *Journal of Molecular Biology*, 86, 109–1271–20.

Zenk, M. H. (1978). The impact of plant cell culture on industry. In T. A. Thorpe (Ed.), *Frontiers of plant tissue culture* 1978 (pp. 1–13). Univ. of Calgary: International Association of Plant Tissue Culture.

Zenkteler, M. (1984). *In vitro* pollination and fertilization. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 1, pp. 269–275). New York: Academic Press.

Zenkteler, M., Misiura, E., and Guzowska, I. (1975). Studies on obtaining hybrid embryos in test tubes. In H. Y. Mohan Ram, J. J. Shaw, and C. K. Shaw (Eds.), *Form, structure and function in plants* (pp. 180–187). Meerut, India: Sarita Prakashan.

Zimmerman, R. H. (1986). Regeneration in woody ornamentals and fruit trees. In I. K. Vasil (Ed.), *Cell culture and somatic cell genetics of plants* (Vol. 3, pp. 243–258). New York: Academic Press.

Zimmerman, R. H., and Swartz, H. J. (1994). *In vitro* culture of temperate fruits. In I. K. Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 457–474). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer

الفصل الثاني

إعداد وتجهيز مختبر زراعة الأنسجة النباتية Setup of a Tissue Culture Laboratory

يوصف هذا الجزء من الدليل بعض الاعتبارات العامة في إنشاء معمل زراعة الأنسجة في مؤسسة أكاديمية حيث يقتصر الأمر عادةً على تحقيق أفضل استخدام للمختبرات القائمة. وتم وصف تصميم مختبرات زراعة الأنسجة التجارية بواسطة (Kyte and Kleyn, 1996). يعد تحديد موقع معمل زراعة الأنسجة قراراً مهماً. ولتفادي التلوث في مختبرات زراعة الأنسجة النباتية يجب وضع الاعتبارات التالية:

1. تجنب وضع مختبر زراعة الأنسجة بجوار المختبرات التي تتعامل مع الكائنات الحية الدقيقة أو الحشرات أو المرافق التي يتم استخدامها لتخزين البذور أو المواد النباتية الأخرى.
2. يمكن أن يحدث التلوث من فتحات التهوية وحركة السير على الأقدام مشكلة، حيث تعمل حركة الأقدام على إزالة الشمع من الأرضيات وتثير الغبار الذي يساعد على انتشار الملوثات.
3. يجب أن تبقى منطقة زراعة الأنسجة نظيفة في جميع الأوقات. هذا مهم لضمان لزراعات نظيفة ونتائج قابلة للتكرار.
4. تجنب حفظ النباتات المزروعة في أوعية (أصص) في منطقة المختبر لأنها يمكن أن تكون مصدراً للعث والكائنات الحية الملوثة الأخرى.
5. تجنب العمل الحقول أو في البيوت المحمية مباشرة قبل دخول المختبر، لأن العث والحشرات يمكن أن تنتقل إلى المختبر من الشعر والملابس. ومن الأفضل يقوم الموظفون بالاستحمام وتغيير ملابسهم قبل دخول المختبر من الحقل أو البيت المحمي.

عند تصميم مختبر لاستخدام زراعة الأنسجة النباتية، يجب ترتيب مناطق العمل (إعداد الأوساط الغذائية/ تقييم الزراعة/ منطقة حفظ السجلات، ومنطقة النقل المعقمة، ومنطقة الزراعة التي يتم التحكم فيها بيئياً)، بحيث يكون هناك تدفق سلس لحركة المرور.

فيما يلي مخطط تفصيلي للمعدات الرئيسية والنشاط في كل مجال من مجالات العمل في المختبر.

مساحات العمل work areas

أ) إعداد الأوساط الغذائية/منطقة حفظ البيانات

I. طاولة عمل

II. مخارج للغاز

III. جهاز تدوير مغناطيسي (حار/بارد)

IV. ميزان تحليلي دقيق وميزان عادي
V. جهاز قياس الرقم الهيدروحيني
VI. ثلاجة تبريد (refrigerator) ومجمدة (deep freezer)
VII. جهاز تنقية المياه ونظام تخزين
VIII. منطقة الغسيل
IX. أماكن تخزين الأدوات الزجاجية والكيماويات
X. جهاز التسخين الضاغط المائي (Autoclave) (طنجرة الطبخ الضاغطة للكميات الصغيرة)
XI. طاولة منخفضة لمجاهر التشريح. (تجنب وضعها بجوار أجهزة التعقيم أو غيرها من المناطق عالية الرطوبة).
XII. كابينة غطاء الغازات (Fume hood).
XIII. خزانات المكتب والملفات
XIV. أجهزة الطرد المركزي الصغيرة التي توضع على سطح المكتب، مقياس الطيف الضوئي، الميكروويف (لدراسات التحويل وعزل المحتوى الخلوي).

يمكن تحضير الأوساط الغذائية بشكل ملائم على منضدة أو طاولة كيميائية معملية بالقرب منها مقياس الرقم الهيدروجيني والموازين والمغسلة. يجب وضع الكواشف ومحاليل المركزات على الأرفف أو في الثلاجة بجوار الطاولة. تعتبر عملية تنظيف الأواني الزجاجية عملية مستمرة لأن معدل دورانها مرتفع للغاية في العادة. يجب تعقيم أنابيب الزراعة التي تم استخدامها والتي تحتوي على وسط مستهلك لمدة 30 دقيقة على الأقل، والتخلص من المحتويات قبل الغسيل. يجب غسل الأواني الزجاجية المعقمة على الفور. يجب فرك الأواني الزجاجية بالفرشاة في ماء دافئ وصابون، وشطفها ثلاث مرات بماء الصنبور، وشطفها ثلاث مرات بالماء المقطر، ووضعها في مكان نظيف حتى تجف. بشكل عام، لا تقوم غسالات الأطباق بتنظيف الأوعية بشكل فعال، ويجب تنظيف أنابيب الاختبار يدوياً (الجدول 2.1). يعد المقعد المنخفض والطاولة وخزانة الملفات والمكتب ضرورياً لتقييم الزراعة وحفظ السجلات. كما يعد الكمبيوتر المكتبي أمراً مرغوباً جداً في كتابة التقارير.

ب) منطقة النقل المعقمة

I. جهاز تدفق الهواء الصفحي (Laminar air flow transfer hood) وكرسي مريح.
II. مجهر تشريح
III. مخارج الغاز
IV. أنابيب خطوط التفريغ
V. ملاقط وملاعق ومشارط وشفرات يتخلص منها بعد الاستخدام.

يعتبر استخدام غرفة منفصلة لجهاز تدفق الهواء الصفحي مثالياً. يجب تصميم هذه الغرفة بحيث يكون هناك تدفق هواء بضغط إيجابي وتهوية جيدة. من الأفضل أيضاً أن تكون هنالك نافذة تطل على الخارج أو إلى المختبر بحيث يمكن للفرد الذي يقضي ساعات طويلة في العمل في صندوق تدفق الهواء الصفحي أن يخفف من إجهاد العين في بعض الأحيان بالنظر إلى الخارج.

إن صندوق تدفق الهواء الصفحي عالي التكاليف، البديل يمكن توليفه وبالعدم يمكن ارتجال استخدام كابينة الغاز بعد نظافتها وتعقيمها جيداً وإنزال الباب الزجاجي بحيث يسمح فقط بإدخال يدي العامل للعمل والنقل. يجب عدم تشغيل كابينة الغاز أثناء العمل لأن ذلك يجذب الهواء الملوث من الغرفة فوق الزراعات وحاول ألا تكون هنالك حركة أقدام بالغرفة خلال عمليات الزراعة. كما يمكن استخدام صندق كارتون مغطاة بشرائح ورق القصدير أو بشرائح بلاستيكية ككابينة توظف كمنطقة عمل في هواء نظيف. هذا، ويمكن ربط فلاتر الترشيح في صندوق تخزين واستخدامه في الزراعة.

ت) منطقة الحاضنات المتحكم فيها بيئياً

تحتوي هذه الغرف على:

I. أرفف مزودة بإضاءة بمؤقت ودرجة حرارة يمكن التحكم فيها
II. 2 حاضنة تضبط فيها درجة الحرارة والوضوء
III. هزازات مدارية (Orbital shakers)

يجب تجنب ارتفاع نسبة الرطوبة الجوية في غرف الحاضنات، هذا وفي بعض الغرف توجد أجهزة إزالة الرطوبة (dehumidifiers) وغسيل الهواء (air scrubbers).

يتم حضانة معظم الزراعات في درجة حرارة تتراوح بين 25–27°م في 8/16 ساعات ضوء وظلام بمؤقت.

في كل التجارب الموصوفة في هذا الدليل تم استخدام أوضاع الزراعة القياسية:

الإضاءة من أنابيب قرولكس الضوئية (GroLux) أو من أنابيب ضوئية 4 قدم بيضاء باردة لاصقة (cool white 4-ft. Long fluorescent lamps) على ارتفاع 8 بوصة فوق الزراعات وبينهما 12 بوصة.

تختلف درجة الكثافة الضوئية حسب عمر أنابيب الإضاءة وما إذا كانت الزراعات معرضة للضوء مباشرة أو على جانب من الرف.

يمكن قياس الضوء بالشمعة الضوئية (أشعة الشمس حوالي 10000 شمعة ضوئية)

أو بالميكروإنستين في الثانية في المتر المربع (microeinsteins (µE) per second per square meter) ($\mu E \cdot sec^{-1} \cdot m^{-2}$).

$1\ \mu E \cdot sec{-}1\ \cdot m{-}2\ = 6.02 \times 10^{17}\ photons^{-1}\ \cdot m^{-2}$

عادة ما يتراوح مدى الإضاءة بين 40–200 شمعة ضوئية (fc) أو 20–100 ميكروإنستين في الثانية في المتر المربع ($20{-}100\ \mu E \cdot sec^{-1}\ \cdot m^{-2}$).

يستخدم جهاز قياس الضوء أو الأشعة الضوئية لقياس الضوء.

جدول 2.1. الأواني، المواد والزجاجيات لكل محطة عمل بالمختبر (المحطة تستوعب طالبين)

عدد	المادة	عدد	المادة
1	موقد	4	قوارير إيرلنماير (250،500،1000،2000 مل)
1	حامل ثلاثي القوائم	6	حاويات ماجنتا قوارير طعام أطفال
1	زوج قفازات السخان المائي الضاغط	8	رفوف مائلة
1	جهاز تسخين وتقليب مغناطيسي	3	أسطوانات مدرجة (500،1000، 100 مل)
1	لفة بارافيلم	1	فرشاة أظافر
1	ملعقة كبيرة	1	اسفنجة كبيرة
1	ملعقة مزدوجة الشق	6	كأس (50،100،250،600،1000 مل)
1	صندوق أعواد كبريت	5	ماصات أحجام مختلفة
1	مرشح ماصة	1	حامل أنابيب اختبار (25X150 مم)
1	حاوية ضغط الماء	6	قفازات طبية (لايتكس)
1	لفة رقائق ألمونيوم	10	طبق بتري
3	قوارير حجمية (100،250،1000 مل)		

المراجع

Aitken-Christie, J., Kozai, T., and Smith, M. A. L. (1994). Automation and environmental control in plant tissue cultures. Boston: Kluwer. Bajaj, Y. P. S. (Ed.), (1986). *Biotechnology in agriculture and forestry.* New York: Springer-Verlag. (42 different volumes on a range of topics in plant cell culture.)

Barz, W., Reinard, E., and Zenk, M. H. (Eds.), (1977). Plant tissue culture and its biotechnological application. New York: Springer-Verlag. Bennett, A. B., and O'Neill, S. D. (Eds.), (1991). *Horticultural biotechnology*. New York: Wiley.

Bhojwani, S. S., and Razdan, M. K. (1983). Plant tissue culture: Theory and practice. New York: Elsevier. Butcher, D. N., and Ingram, D. S. (Eds.), (1976). *Plant tissue culture*. Marietta, GA: Camelot.

Bonga, J. M., and VonAderkas, P. (1992). *In vitro* culture of trees. Boston: Kluwer. Cassells, A. C., and Gahan, P. B. (2006). *Dictionary of plant tissue culture*. New York, London, Oxford: Food Products Press® (imprint of the Haworth Press, Inc.).

Celis, J. (1998). Cell biology (2nd ed.). New York: Academic Press. Chupeau, Y., Caboche, M., and Henry, Y. (Eds.), (1989). *Androgenesis and haploid plants*. New York: Springer-Verlag.

Debergh, P. C., and Zimmerman, R. H. (Eds.), (1993). Micropropagation technology and application. Boston: Kluwer. DeFossard, R. A. (Ed.), (1976). *Tissue culture for plant* propagators. Armidale, Australia: University of New England Printery.

Dhawan, V. (Ed.), (1989). Applications of biotechnology in forestry and horticulture. New York: Plenum. Dixon, R. A. (1985). *Plant cell culture: A practical approach*. Oxford, England: IRL Press. Chapter 2 Setup of a Tissue Culture Laboratory 27

Dodds, J. H., and Roberts, L. W. (1985). Experiments in plant tissue culture (2nd ed.). New York: Cambridge Univ. Press. Gamborg, O. L., and Wetter, L. R. (Eds.), (1975). *Plant tissue culture methods*. Ottawa: National Research Council of Canada.

Kyte, L., and Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes: An introduction to micropropagation (3rd ed.). Portland, OR: Timber Press. Laimer, M., and Rucker, W. (2003). *Plant tissue culture*. New York: Springer-Verlag.

Liang, G. H., and Skinner, D. Z. (Eds.), (2004). Genetically modified crops, their development, uses, and risks. New York, London, Oxford: Food Products Press® (imprint of the Haworth Press, Inc.). Pierik, R. L. (2002). *In vitro culture of higher plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Pollard, J. W., and Walker, J. M. (Eds.), (1990). Plant cell and tissue culture. Clifton, NJ: Humana Press. Razdan, M. K. (2002). *Introduction to plant tissue culture*. Enfield, NH: Science Publishers.

Reinert, J., and Bajaj, Y. P. S. (Eds.), (1977). Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture. New York: Springer Verlag. Reinert, J., and Yeoman, M. M. (Eds.), (1982*). Plant cell and tissue culture: A laboratory manual*. New York: Springer-Verlag.

Rubenstein, I., Gengenback, B., Phillips, R. L., and Green, L. E. (Eds.), (1980). Genetic improvement of crops. Minneapolis: Univ of Minnesota Press. Stafford, A., and Warren, G. (Eds.), (1991). *Plant cell and tissue culture*. London: Open Univ. Press.

Sidig, M.S. (2019). Note on establishment of plant tissue culture laboratory. *Minstry of Agricultre and Forestry,* Khartoum, Sudan. Pp. 43.

Street, H. E. (Ed.), (1973). *Plant tissue and cell culture*. Berkeley: Univ. of CA Press.

Street, H. E. (Ed.), (1974). *Tissue culture and plant science*. New York: Academic Press.

Thorpe, T. A. (Ed.), (1978). Frontiers of plant tissue culture. Calgary: Univ. of Calgary. Thorpe, T. A. (2002). *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

Thorpe, T. A. (Ed.), (1995). *In vitro embryogenesis in plants*. New York: Academic Press.

Torres, K. C. (1988). *Tissue culture techniques for horticulture*. New York: Van Nostrand Reinhold.

Trigiano, R. N., and Gray, D. J. (1996). *Concepts and laboratory exercises in tissue culture of vascular plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.

Trigiano, R. N., and Gray, D. J. (2000*). Plant tissue culture concepts and laboratory exercises* (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

Vasil, I. K. (Ed.), (1980). *International review of cytology: Perspectives in plant cell and tissue culture* (Suppl. 11, Part A). New York: Academic Press.

Vasil, I. K. (Ed.), (1980). *International review of cytology: Advances in plant cell and tissue culture* (Suppl. 11, Part B). New York: Academic Press. Wetherell, D. F. (1985). Plant tissue culture. Burlington, NC: Carolina Biology Readers No. 142, Carolina Biological Supply Co.

الفصل الثالث

مكونات وإعداد الوسط الغذائي

يعد اختيار أو تطوير وسط الزراعة أمراً حيوياً لنجاح زراعة الأنسجة النباتية. لا يوجد وسط واحد يدعم نمو جميع الخلايا، وغالباً ما تكون التغييرات في الوسط ضرورية لأنواع مختلفة من استجابة النمو من جزء نباتي منفصل واحد. البحث في الأدبيات مفيد لاختيار الوسيط المناسب. أصدر (Garcia *et al.*, 2011) دليل مفيد لفحص تأثير منظمات النمو النباتية، وتركيب الأملاح في الوسط القاعدي بتحليل إحصائي للنتائج. وبالمثل، أصدر (Niedz and Evans, 2007) دليلاً لدراسة آثار أملاح موراشيجي وسكوج (1962) غير العضوية على نمو الجزء النباتي المنفصل. في حالة عدم توفر الأدبيات الخاصة بالنبات، فإن تطوير وسط غذائي مناسب يعتمد على التجريب والخطأ. يعتمد نهج تطوير الوسط على الغرض من زراعة الخلية. يمكن أن تكون العديد من الأوساط الموضحة في هذا الدليل بمثابة نقاط انطلاق مفيدة في تطوير وسط لغرض معين، سواء كان تحفيز تكوين نسيج الكدب، أو تكوين الأجنة الجسدية، أو زراعة المتك، أو تكاثر البراعم.

يتضمن الملحقان الأول والثاني (ملحق 1 و2) تحويلات مفيدة للقياس ومراجعة مشاكل إعداد المحاليل على التوالي. وتجد قائمة للموردين في ملحق 3.

يحتوي الوسط الغذائي بشكل عام على أملاح غير عضوية، ومركبات عضوية مثل منظمات النمو النباتية والفيتامينات والكربوهيدرات والهيكسيتول وعامل التبلور أو التصلب. بالإضافة يمكن أن يحتوي الوسط الغذائي على أحماض أمينية، مضادات حيوية أو مركبات طبيعية معقدة

الأملاح غير العضوية Inorganic Salts

تختلف وصفات الأملاح غير العضوية (Murashige, 1973; Huang and Murashige, 1976; Gamborg *et al.*, 1976; George *et al.*, 1987). فحص (Owen, and Miller 1992) بعناية وصفات أوساط زراعة الأنسجة النباتية الأكثر استخداماً ووجدوا أخطاء طفيفة في النشرات الأصلية. جداول 3.2 و3.3 توضح مكونات الأملاح غير العضوية لبعض الوصفات المستشهد بها. إن وصفة أملاح (Murashige and Skoog, 1962) هي الأكثر استخداماً (Smith and Gould, 1989) وستكون تركيبة الملح الرئيسية المستخدمة في تمارين هذا الدليل. تم تطوير تركيبة موراشيجي وسكوج (1962) للتأكد من عدم وجود زيادة في نمو الخلايا خارج الجسم الحي بسبب إدخال أملاح إضافية من مستخلصات الأنسجة النباتية التي تم اختبارها في ذلك الوقت. أكدت تركيبة موراشيجي وسكوج (1962) أن المغذيات غير العضوية لا تحدد نمو خلايا التبغ وأن

المكملات العضوية مثل مستخلص الخميرة وحليب جوز الهند وهيدروليزات الكازين والمستخلصات النباتية لم تعد مصادر أساسية للأملاح غير العضوية. أسس فهرس الاقتباس العلمي وصفة تركيبة موراشيجي وسكوج (1962) باعتبارها نموذجاً كلاسيكياً للاقتباس، حيث تم استخدامها على نطاق واسع في العديد من المنشورات حول زراعة الأنسجة النباتية. عدد قليل جداً من المقالات في علم النبات يمكن أن يقترب من هذه الورقة التي تم الاستشهاد بها بدرجة عالية.

السمة المميزة للأملاح غير العضوية في تركيبة موراشيجي وسكوج (1962) هي محتواها العالي من النترات والبوتاسيوم والأمونيوم مقارنة بتركيبات الأملاح الأخرى. يوضح جدول 3.1 محاليل وصفة موراشيجي وسكوج الخمسة لمركزات الأملاح غير العضوية. يتم تحضير مركز الملح بتركيز 100 مرة من تركيز الوسط النهائي، ويضاف كل مركز بمعدل 10 مل لكل 1000 مل من الوسط المراد تحضيره. يجب حماية مركز الحديد (NaFeEDTA) من الضوء عن طريق تخزينه في زجاجة بلون كهرماني أو بلف قارورة المخزون بورق الألمونيوم. يعزز استخدام مخزون الملح المركّز دقة وسرعة تحضير الأوساط.

من الأفضل تخزين مركزات الأملاح في الثلاجة حيث تحتفظ بثباتها لعدة أشهر. يتم تحضير المركزات دائماً بالماء المقطر زجاجياً أو منزوع المعادن ويتم وضع بطاقة واضحة على جميع المركزات وتاريخ تحضيرها. يجب دائماً استخدام المواد الكيميائية ذات الدرجة الكاشفية (reagent-grade chemicals) لضمان أقصى درجة من النقاء. يمكن دمج العديد من الأملاح لتقليل عدد محاليل المركزات. العوامل التي يجب مراعاتها في الجمع بين المركبات هي الثبات والقدرة على المشاركة. عادة ما يترسب مخزون النترات ويجب تسخينه حتى تذوب البلورات تماماً قبل الاستخدام. يجب التخلص من أي مخزون يبدو عكراً أو به رواسب في القاع.

منظمات النمو النباتية Plant Growth Regulators

يختلف نوع وتركيز منظمات نمو النبات المستخدمة وفقاً لغرض زراعة الخلايا. جدول 3.3 يوضح قائمة بمنظمات النمو النباتية الأكثر استخداماً واختصاراتها وأوزانها الجزيئية.

الأوكسينات Auxins

تتطلب الخلايا النباتية أوكسينات (IAA, NAA, 2,4-D, or IBA) للانقسام وإنشاء الجذور. تقمع الأوكسينات في التركيزات العالية التشكل. يستخدم أوكسين (2,4-D) على نطاق واسع لتحفيز نسيج الكدب، يتم استخدام أوكسينات (IAA, IBA, and NAA) لتحفيز تكوين الجذور. عادة ما يتم تحضير مخزون الأوكسين بوزن 10 ميليجرام من الأوكسين في دورق سعة 200 مل، يتم إضافة عدة قطرات (ليس أكثر من 0.3 مل) من (1

N NaOH or KOH) حتى تذوب البلورات، ثم إضافة 90 مل من الماء المقطر المزدوج سريعاً، وزيادة الحجم إلى 100 مل في دورق حجمي (Huang and Murashige, 1976)، يمكن أيضاً إذابة الأكسينات في 95٪ إيثانول وتخفيفها إلى الحجم المطلوب؛ ومع ذلك، فإن الإيثانول سام لأنسجة النبات. أملاح بوتاسيوم الأوكسين (K-salts of auxin) أكثر قابلية للذوبان في الماء (Posthumus, 1971).

يتم عمل مخزون جديد من مركز (IAA) أسبوعياً لأنه يتحلل بالضوء في غضون أيام قليلة (Yamakawa *et al*., 1979; Dunlap and Robacker, 1988)، وخلال عدة ساعات إلى بضعة أيام بواسطة أنسجة النبات (Epstein and Lavee, 1975). الأوكسينات ثابتة في الحرارة عند درجة 110−120°م لمدى ساعة (Posthumus, 1971; Yamakawa *et al*., 1979). ومع ذلك، يتم تدمير (IAA) بواسطة انخفاض الرقم الهيدروجيني والضوء والأكسجين والبيروكسيدات (Posthumus, 1971). الجدير بالذكر إن الأوكسينات الاصطناعية مثل (NAA و2,4-D) أكثر ثباتاً من أوكسين (IAA)، وهو الأوكسين الطبيعي.

السايتوكينينات Cytokinins

تحفز السياتوكينينات (kinetin, BA, zeatin, and 2iP) انقسام الخلايا، وتكاثر البراعم وتشكلها (Miller and Skoog, 1953; Miller, 1961). لمادة الثيديازورون (Thidiazuron (TDZ; N-phenyl-N1-(1,2,3-thiadiazol-5-ylurea) نشاط سايتوكينين وتستخدم تجارياً لإزالة أوراق القطن. إن الثيديازورون فعالاً بتركيزات منخفضة لتحفيز تكوين البراعم (Sankhla *et al*., 1996; Binzel *et al*., 1996; Murthy *et al*., 1998).

يتم تحضير مركز السايتوكينين بطريقة مماثلة لتلك الخاصة بمركزات الأوكسين، باستثناء إضافة (1 N HCl) وقطرات قليلة من الماء لتذويب البلورات (Huang and Murashige, 1976). عادة ما يتطلب تذويب البلورات بالكامل تسخين لطيف. يتم إضافة الماء المقطر المزدوج سريعاً لتجنب سقوط البلورات من المحلول، ثم يتم إكمال الحجم المطلوب في دورق حجمي. يمكن تخزين مركز السايتوكينين في الثلاجة لعدة أشهر. يمكن أن يكون هناك بعض التحلل الكيميائي الضوئي في التجارب طويلة المدى (Dekhuijzen, 1971). سايتوكينينات (kinetin and zeatin) ثابتة في درجات الحرارة العالية ولم يلاحظ تدهور المنتجات بعد ساعة من التسخين في درجة حرارة 120°م (Dekhuijzen, 1971)؛ بينما (2iP and BA) تكون ثابتة لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة 100°م.

الجبرلين Gibberellin (GA_3)

لا يستخدم حامض الجبرلين (GA_3) بتواتر في زراعة الخلية لأنه يعمل على تثبيط نمو نسيج الكدب وتحفيز تكوين الجذور العرضية بواسطة الأوكسين (Van Bragt and Pierik, 1971). ومع ذلك، فإنه مفيد في دراسات التشكل.

يتم تحضير مركز الجبرلين بإذابة البلورات في الماء وتعديل الرقم الهيدروجيني إلى 5.7، لأنه في الجانب القلوي يتحول الجبرلين لأيسومر (isomer) غير نشط وكما في الجانب الحمضي ودرجة الحرارة العالية يتحول أيضاً إلى شكل بيولوجي غير نشط (Van Bragt and Pierik, 1971). محاليل الجبرلين غير ثابتة حرارياً، وفي خلال 20 دقيقة في درجة حرارة 114°م ينخفض أكثر من 90% من نشاطه (Van Bragt and Pierik, 1971). يجب عمل مركز جديد من الجبرلين قبل إضافته للوسط من خلال التعقيم بالترشيح (filter sterization) أو بالتعقيم البارد.

حامض الأبسيسيك Abscisic acid (ABA)

حامض الأبسيسيك (ABA) هرمون نباتي يعمل على تساقط الأوراق والثمار والسكون ومفيد في زراعة الأجنة. فهو ثابت في الحرارة ولكنه حساس للضوء. يحدث التحول الجزئي لأيسومر حامض الأبسيسيك (2-cis) إلى أيسومر (2-trans) ذو الكفاءة البيولوجية الأقل في الضوء (Wilmar and Doornbos, 1971). يمكن تحضير المركز بالتذويب في الماء.

الفيتامينات Vitamins

الفيتامينات لها وظائف تحفيزية في تفاعلات الإنزيم. يعتبر الثيامين (B_1) من الفيتامينات المهمة للخلايا النباتية. تضاف الفيتامينات الأخرى، حمض النيكوتين (B_3) والبيريدوكسين (B_6)، إلى وسط زراعة الخلايا لأنها قد تعزز الاستجابة الخلوية. من الأفضل تخزين مركز الفيتامينات في المجمدة (freezer) ويمكن عمله بحيث يتم استخدام كمية 10 مل لكل لتر من الوسط المراد تحضيره.

تحتوي مركزات الفيتامينات المستخدمة في تمارين هذا الدليل على 5 ميليجرام من حمض النيكوتين و5 ميليجرام هيدروكلوريد البيريدوكسين (pyridoxine-hydrochloride) لكل 100 مل من الماء. يحتوي مركز الثيامين على 40 ميليجرام هيدروكلوريد الثيامين (thiamine-hydrochloride) في 1000 مل.

تركيبات الفيتامينات الشائعة الأخرى تتمثل في وصفات:

- (White, 1963; 1943)

التي تتكون من (بالمليجرام في اللتر):

0.5، حامض نيكوتين؛ 0.1، هيدروكلوريد بيرودوكسين ؛ و0.1، هيدروكلوريد ثيامين

- B_5 Gamborg (Gamborg *et al*., 1976)

التي تتكون من (بالمليجرام في اللتر):

100، أنوسيتول؛ 1.0، حامض نيكوتين؛ 1.0، هيدروكلوريد بيريدوكسين ؛ و10.0، هيدروكلوريد ثيامين

- Murashige and Skoog (1962)

التي تتكون من (بالمليجرام في اللتر):

100، أنوسيتول؛ 0.5، حامض نيكوتين؛ 0.5، هيدروكلوريد بيريدوكسين ؛ و0.1، هيدروكلوريد ثيامين.

يضيف معظم العاملون محاليل مركز الفيتامينات إلى الوسط قبل التعقيم؛ ولكن في بعض دراسات محددة عن الفيتامينات يجب تعقيمها بالترشيح (Ten Ham, 1971).

الكربوهيدرات Carbohydrates

الخلايا الخضراء في الزراعة عادة ما تكون غير نشطة ضوئياً وتتطلب مصدراً للكربون. يستخدم السكروز أو الجلوكوز بنسبة 2–5% (وزن/حجم) بشكل شائع في زراعة الخلايا. يمكن أيضاً استخدام مصادر الكربوهيدرات الأخرى، مثل الفركتوز والنشا.

ربما تستخدم مستويات أقل من الكربوهيدرات في زراعة المحتوى الخلوي، ولكن تستخدم مستويات أعلى لزراعة الجنين والمتك.

يؤدي التسخين في السخان المائي الضاغط لفترة طويلة إلى كرملة السكريات (التحول للون البني غير الأنزيمي) وتتفاعل مع مركبات الأحماض الأمينية (تفاعل مليارد Maillard reaction) (Peer, 1971; Ball, 1953). تحدث الكرملة عندما يتم تسخين السكريات وتتدهور ويتشكل مركب ميلانيودين (melanoidins) وهو بني اللون ومركب عالي الوزن الجزيئي يثبط نمو الخلايا. ويشير اللون الأصفر إلى البني الخفيف للوسط المعقم إن تم تسخينه لفترة طويلة ويجب إلقاء الوسط وإعادة تركيبه.

الهيكسيتول (الكحولات السداسية) Hexitols

تعتبر الكحولات السداسية ميوأنيستول (hexitol myo-inositol) مهمة في زراعات الأنسجة (Pollard *et al.*, 1961; Steinhart *et al.*, 1962). الميو–أنيسيتول هو هيكسيتول مثير للاهتمام يشارك في التخليق الحيوي للسيسليتول (cyclitol biosynthesis)، وتخزين المركبات متعددة الهيدروكسيل كاحتياطيات، وإنبات البذور، ونقل السكر، والتغذية المعدنية، والتمثيل الغذائي للكربوهيدرات، وهيكل الغشاء، وتشكيل جدار الخلية، والتوازن الهرموني، وفسيولوجيا الإجهاد (Loewus and Loewus, 1983). ويعتبر الميو–أنيسيتول أيضاً معززاً للنمو خارج الجسم الحي وقد يكون مصدراً للكربوهيدرات، لكن البعض يشعر أنه يحتوي على عمل يشبه الفيتامينات. المانيتول والسوربيتول عبارة عن هيكسيتول، وهما مادتان تناضحتان جيدتان لعزل المحتوى الخلوي.

عامل التبلور Gelling Agent

تجرى العديد من تجارب زراعة الأنسجة على نوع من الدعم الثابت ويتم استخدام عامل التبلور بشكل شائع. ومع ذلك، يمكن أن تشتمل الدعامات الثابتة على ورق الترشيح والقطن والقماش القطني والفيرميكوليت وأطواف غشاء خاصة بالوسط السائل. يمكن أن يؤثر نوع الآجار المستخدم في تصلب الوسط على استجابة التجارب (Griffis *et al.*, 1991; Debergh, 1983; Halquist *et al.*, 1983; Kacar *et al.*, 2010; Cassells and Collins, 2000). إن كان الآجار غير مغسول أو غير منقى، فإنه سيغير لون الوسط بشكل عام لأنه يحتوي على شوائب مختلفة. بما أن الآجار منتج مشتق من الأعشاب البحرية (seaweed)، فيمكن أن يكون له نشاط فسيولوجي على الأنسجة النباتية. في بعض الأحيان يمكن ملاحظة الاختلافات الدراماتيكية في الاستجابة النباتية من خلال تغيير العلامة التجارية للآجار المستخدم. ولتقليل مشاكل شوائب الآجار، يتم شراء آجار مغسول أو منقى.

يعتبر الجلريت (Gelrite) شفاف المظهر وهو عديد السكاريد ينتج عن تخمير من أنواع من (*Pseudomonas*) (Kang *et al.*, 1982)، وهو ثابت في تركيبته.

تستخدم التمارين الموضحة في هذا الدليل أنواع من مواد التبلور تشمل أنواع الآجار (TC agar, Difco-Bacto agar) والجيلرايت (Gelrite). يتم الحفاظ على حركة الآجار بعد تذويبه باللهب أو بجهاز التسخين إما بقضيب تحريك مغناطيسي أو عن طريق تحريك القارورة يدوياً. من الاحتياطات التي يجب أخذها في الاعتبار:

- عند تحريك القارورة التي تحتوي على الآجار المذاب يدوياً يستخدم قفازاً مقاوماً للحرارة على لأن القارورة يمكن أن تسخن بشدة.
- يجب أن يظل الآجار متحركاً وإلا سيحترق في قاع القارورة.

- يجب إذابة الآجار تماماً قبل توزيعه في أوعية الزراعة بحيث لا تكون هنالك حبيبات صغيرة من الآجار ظاهرة ملتصقة بجدار القارورة.
- أبعد القارورة عن الحرارة فوراً بعد ذوبان الآجار لأن الحرارة الزائدة بعد هذه النقطة ستؤدي إلى غليان الوسط خارج الدورق.
- يتم استخدام دورق مخروطي بحجم أكبر من حجم الوسط (مثل، دورق 2 لتر لوسط بحجم 1.0 لتر) لتفادي تدفق الوسط أثناء الغليان.

بعد تحضير الوسط يتم توزيعه في حاويات الزراعة بكميات محسوبة، ثم تغطيتها وتعقيمها. يمكن استخدام سحاحة التوزيع لملء حاوية الزراعة بدقة؛ ونظراً لسهولة كسر السحاحة وثمنها الباهظ، يمكن ملء حاوية واحدة بالكمية المقاسة بالماء واستخدامها كدليل لملء الحاويات المتبقية بالوسط يدوياً. من السهل سكب الوسط الساخن من دورق مخروطي في بسعة 400 إلى 600 مل قبل سكبه في أوعية الزراعة. تستخدم مختبرات زراعة الخلايا التجارية معدات أوتوماتيكية لتوزيع الأوساط لملء حاويات الزراعة بسرعة. يمكن أيضاً تذويب الآجار في السخان المائي الضاغط في دورق إيرلنماير مغطى برقائق الألمونيم لمدة 15 دقيقة عند 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع. وعندما يبرد عند اللمس، يتم توزيع الوسط بطريقة معقمة في حاويات معقمة داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي. إن تم استخدام هذه الطريقة، يمكن الحفاظ على الوسط في حمام مائي عند 40°م لكيلا يتصلب الآجار قبل التوزيع في الحاويات المعقمة.

عند استخدام الأوساط السائلة، يمكن تحريكها على نوع من الهزازات (shaker). كما تم ذكره سابقاً، يمكن أيضاً زراعة النباتات المستأصلة على وسط سائل ثابت عادةً على نوع من الدعامة مثل ورق الترشيح أو الأطواف الغشائية. ناقش (Preece, 2010) استخدام الوسط السائل الثابت للتكاثر الدقيق، وأشار إلى التفاعلات بين تركيز عامل التبلور والتوافر الغذائي، وفرط التميؤ (hyperhydricity)، ومعدلات التكاثر.

في الآونة الأخيرة، تم استخدام أنظمة المفاعلات الحيوية لزراعة الأجزاء النباتية المنفصلة، وهو عبارة عن بيئة معقمة تسمح بتبادل وسط الزراعة، فضلاً عن تنظيم إمداد الهواء ودرجة الحموضة ودرجة الحرارة. تحظى أنظمة المفاعلات الحيوية باهتمام كبير في التكاثر التجاري لنباتات الزينة لتقليل تكاليف العمالة (Hvoslef-Eide and Preil, 2004; Debnath, 2009; Fei and Weathers, 2011).

الأحماض الأمينية Amino Acids

الأحماض الأمينية والأمينات يمكن أن تكون مهمة جداً في التشكل. جميع أشكال الأحماض الأمينية من النوع (L-forms) هي الأشكال الطبيعية التي يستخدمها النبات. يساهم (L-tyrosine) في إنشاء البراعم (Skoog

and Miller, 1957)، و(L-arginine) في تسهيل عملية التجذير ويستخدم (L-serine) في زراعة البويغات الذكرية للحصول على نباتات أحادية الصيغة الصبغية. الأميدات، مثل، (L-glutamine) و(L-asparagine) تعمل في بعض الأحيان على تعزيز تكوين الأجنة الجسدية بشكل كبير.

كان يستخدم هايدروليزات الكازين (casein hydrolysate)، وهو إنزيم هضم بروتين الحليب (لا تستخدم الهضم الحمضي لبروتينات الحليب)، كمكون شائع في العديد من تركيبات الأوساط المبكرة حيث يوفر مزيجاً من الأحماض الأمينية لتعزيز استجابة الأنسجة. نظراً لأن الهضم الإنزيمي يمكن أن يؤدي إلى اختلافات طفيفة في تكوين الأحماض الأمينية، يفضل إضافة أحماض أمينية معينة لأنها ستحدد المكونات في الوسط بدقة أكبر. من الشائع اليوم فحص الأحماض الأمينية الفردية لمعرفة الاستجابة المرغوبة في الأنسجة.

المضادات الحيوية Antibiotics

بسبب مشاكل التلوث المفرط مع بعض الأجزاء النباتية المنفصلة، أضاف العديد من العاملين مبيدات الفطريات ومبيدات الجراثيم في وسط الزراعة (Thurston *et al.*, 1979). فحص (Walsh, 2003) المضادات الحيوية ومفعولها وأصلها ومقاومة المضادات الحيوية. بشكل عام، لم تكن هذه الإضافات مفيدة جداً لأنها يمكن أن تكون سامة للجزء المنفصل، ويمكن ظهور الملوثات مرة أخرى بمجرد إزالة مبيدات الفطريات أو البكتريا.

أثبتت تجارب التحول باستخدام البكتريا الأجرعية أنه من الضروري دمج المضادات الحيوية في الوسط. إن العديد من المضادات الحيوية ليست سامة للأجزاء النباتية المنفصلة، وفي نفس الوقت، تسيطر أو تقضي على البكتريا الأجرعية.

المضادات الحيوية الشائع استخدامها تشمل: تيمنتين (timentin)، كاربينيسيلين (carbenicillin) (500 mg/liter)، سيفوتاكسيم (cefotaxime) (300 µg/ml)، أوجمنتين (augmentin) (250 mg/liter).

المضادات الحيوية قابلة للذوبان في الماء، ويجب أن تكون طازجة، ويجب إضافتها إلى الوسط بعد التعقيم بالترشيح.

المركبات الطبيعية المعقدة Natural Complexes

تستخدم بعض الإضافات من المركبات الطبيعية المعقدة في الوسط الغذائية لأغراض مختلفة. تستخدم مضادات الأكسدة أحياناً إن كان هنالك تلون بني كثيف في الأجزاء النباتية المنفصلة، وتعمل على إعاقة تأكسد الجزء النباتي المنفصل.

أمثلة لمضادات الأكسدة

- حامض الستريك (citric acid)
- حامض الأسكوربيك (ascorbic acid)
- بايروقالول (pyrogallol)
- فلوروقلوسينول (phloroglucinol)

في بعض الأحيان، تستخدم المواد الممتزة (absorbents) إن كان تلون الوسط الغذائي والجزء النباتي كثيفاً. يتم استخدام اثنان من المواد الممتزة البولي فينيل بيروليدون ((polyvinylpyrrolidone (PVP)) والفحم المنشط المعادل الحمضي (0.1-0.3%) (Mohamed-Yasseen *et al.*, 1995 and Wann *et al.*, 1997). أورد (Saenz *et al.*, 2010) بيانات عن تأثير مصدر الفحم المنشط على نسيج الكدب الجنيني لجوز الهند. كما أشار (Thomas, 2008) إلى أن الفحم المنشط قد يعزز التشكل عن طريق إمتزاز المركبات المثبطة وتقليل المستقلبات السامة ونضح الفينول وتراكمه. يطلق الفحم المنشط المواد الموجودة بشكل طبيعي في الفحم والتي قد تعزز النمو. كما أنه يمتص الفيتامينات ومنظمات النمو النباتية من الوسط، وقد يطلقها تدريجياً إلى الجزء النباتي المنفصل. قد يكون هناك أيضاً تأثير مفيد للفحم النباتي بتسويد أو تغميق الوسط.

يستخدم المركب الطبيعي عندما يفشل الوسط المحدد في دعم استجابة نمو معين. عادةً ما تجعل إضافة المركبات الطبيعية المعقدة إلى الوسط الغذائي وسطاً غير محدد التركيب (undefined)، حيث من المتوقع حدوث اختلافات في المركبات المعززة للنمو أو المثبطة في هذه المركبات المعقدة.

بعض الأمثلة والتركيزات العامة لهذه المركبات الطبيعية تشمل:

- سويداء جوز الهند (coconut endosperm CM)، (10-20 حجم/حجم).
- مستخلص الخميرة (yeast extract YE)، (50-5000 ميليجرام في اللتر).

- مستخلص الشعير (malt extract ME)، (500 ميليجرام في اللتر).
- عصير الطماطم (tomato juice TJ)، (30%).
- عصير البرتقال (orange juice OJ)، (3-10%).
- لب الموز (banana pulp BP)، (150 جرام في اللتر).
- مستخلص البطاطس (potato extract PE) (Chia-chun *et al*., 1978).
- هيدرولزيت الكاسين (hydrolysate CH)، (30-3000 ميليجرام في اللتر)، (يستخدم إنزيم الهضم)
- مستحلب السمك (fish emulsion FE)، (ملعقة صغيرة في اللتر).

تم نشر الكثير عن المركبات الموجودة في حليب جوز الهند، وهو السويداء السائلة من جوز الهند (*Cocos nucifera*) غير الناضج. تم تقييم التركيب الكيميائي والخصائص البيولوجية لماء جوز الهند بما في ذلك السكريات والفيتامينات والمعادن والأحماض الأمينية والهرمونات النباتية (Yong *et al*., 2009).

ماء جوز الهند هو السائل من جوز الهند غير الناضج. عندما ينضج جوز الهند، يتحول السائل إلى مادة تشبه الهلام تسمى حليب جوز الهند. ويستخدم ماء جوز الهند في زراعة الأنسجة كحليب جوز الهند. يتم غلي حليب جوز الهند لترسيب البروتين، وتبريده، وتصفيته، وتخزينه مجمداً حتى الاستخدام. من الصعب بشكل عام، لا يمكن الحصول على حليب جوز الهند من جوز الهند في مراكز التسوق، حيث إنها ناضجة والسويداء صلب. يمكن شراء حليب جوز الهند من معظم موردي المواد الكيميائية.

درجة حموضة الوسط الغذائي Media pH

يتم تعديل الرقم الهيدروجيني لأوساط زراعة الأنسجة النباتية عموماً إلى 5.5-6.0. أقل من 5.5، لن يتماسك الآجار بشكل صحيح وأعلى من 6.0، قد يكون الهلام صلباً جداً (Murashige, 1973). عموماً ينخفض الرقم الهيدروجيني للأوساط بمقدار 0.6 إلى 1.3 وحدة بعد التعقيم (Sarma *et al.,* 1990). كما تسبب بعض زراعات الأنسجة النباتية انخفاضاً في درجة الحموضة بمرور الوقت، ويعزى ذلك إلى إنتاج الأحماض العضوية أو استهلاك النيتروجين. فحص (Owen *et al.,* 1991) تأثير مكونات الوسط الغذائي من أملاح غير عضوية ومصادر السكر وعامل التبلور والفحم المنشط وطريقة تخزين الوسط على الرقم الهيدروجيني، ووجد إن جميعها تؤثر.

يتم ضبط درجة حموضة الوسط بواسطة (0.1 N HC1) أو (0.1 NaOH) بواسطة قطارة طبية مع تحريك الوسط وذلك قبل إضافة الآجار.

تحضير الوسط الغذائي Medium Preparation

– يتم تحديد الوسط المراد تحضيره مسبقاً والتحقق من المكونات عند إضافتها إلى القارورة التي يتم تحضير الوسط فيها (من الأفضل تجهيز قائمة بالمكونات كما في نموذج 3.1.

– يجب الاحتفاظ بسجلات عن تاريخ تحضير الوسط والاستخدام.

– يتم دائماً استخدام الماء المقطر الزجاجي في تحضير الوسط، لا تستخدم ماء الصنبور أو الماء المقطر من الصنبور.

– يجب وضع بعض الماء في الدورق (حوالي 500 مل في حالة تحضير 1000 مل من الوسط) قبل إضافة محاليل المركزات؛ خلاف ذلك، سوف تتفاعل أملاح المركزات وتترسب.

– لا تسكب المركزات الزائدة مرة أخرى في حاوية محلول المركز الأصلي وكذلك السكروز أو الآجار الزائد في الحاوية الأصلية.

– يتم تنظيف الإنسكابات حول الموازين ومناطق العمل باستمرار.

– تتوافر مساحيق معبأة من أملاح موراشيجي وسكوج (1962) وأوساط أخرى، مما يلغي الحاجة إلى تحضير المركزات وقياس المكونات وتستخدم في الإنتاج التجاري.

– يحتوي ملحق 3.1. على قائمة من موردي أوساط زراعة الأنسجة النباتية ولوازمها. اتبع تعليمات الشركة المصنعة لاستخدامها.

جدول 3.1. المركزات الخمسة للأملاح غير العضوية لوصفة موراشيجي وسكوج (1962)[1]

Chemical	Concentration (g/liter stock)
Nitrate stock[2]	
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	165.0
Potassium nitrate (KNO_3)	190.0
Sulfate stock	
Magnesium sulfate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	37.0
Manganous sulfate ($MnSO_4 \cdot H_2O$)	1.69
Zinc sulfate ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.86
Cupric sulfate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	0.0025
Halide stock	
Calcium chloride ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	44.0
Potassium iodide (Kl)	0.083
Cobalt chloride ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)	0.0025
PBMo stock	
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	17.0
Boric acid (H3BO3)	0.620
Sodium molybdate ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$)	0.025
NaFeEDTA stock[3]	
Ferrous sulfate ($FeSO_2 \cdot 7H_2O$)	2.784
Ethylenediamineteraacetic acid, disodium salt (Na_2EDTA)	3.724

1. يستخدم 10 مل من المركز لعمل 1000مل من الوسط
2. يتم تذويب كل ملح على حدة في ماء دافئ وإضافتهم ليعض بعد الإذابة
3. يتم تذويب كل ملح على حدة في ماء دافئ وإضافتهم ليعض بعد الإذابة ووضعه في قارورة بلون كهرماني أو لف القارورة بورق الألمونيوم

جدول 3.2. وصفات أملاح غير عضوية لعدد من الأوساط القاعدية لزراعة الأنسجة النباتية (بالميليجرام في اللتر)[1]

Chemical	White (1963)	B5[2]	N6[3]	WP[4]
NH_4NO_3				400
$(NH_4)_2SO_4$		134	463	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	720	246	185	370
KCl	65			
KNO_3	80	2528	2830	
KH_2PO_4			400	170
K_2SO_4				990
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	19	150		
Na_2SO_4	200			
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$		150	166	96
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	300			
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$		37.2	37.2	37.2
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$		27.8	27.8	27.8
Fe2(SO4)3	2.5			
H_3BO_3	1.5	3	1.6	6.2
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$		0.025		
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.001	0.025		0.25
$MnSO_4 \cdot H_2O$		10		
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	7		4.4	22.3
MoO_3	0.0001			
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$		0.25		0.25
Kl	0.75	0.75	0.8	
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	3	2	1.5	8.6

[1]Owen and Miller (1992), [2]B_5, Gamborg *et al.* (1968), [3]N_6, Nitsch and Nitsch (1969)

[4]WP, Lloyd and McCown (1980).

جدول 3.3. منظمات النمو الشائع استخدامها في زراعة الأنسجة النباتية

منظم النمو	الاختصار	الوزن الجزيئي
Abscisic acid	ABA	264.3
Indole-3-acetic acid	IAA	175.2
Naphthaleneacetic acid	NAA	186.2
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.0
Indole-3-butyric acid	IBA	203.2
6-Furfurylaminopurine	Kinetin (kn)	215.2
6-Benzly-aminopurine	BA	225.2
N6 (^{2}-isopentenyl)-adenine	2iP	203.3
Trans-6-(4-hydroxyl-3-methylbut-2-enyl) amino purine	Zeatin	219.2
Gibberellic acid	GA_3	346.4
Thidiazuron or 1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5YL)-ure	TDZ	220.2

نموذج 3.1. خطوات تحضير الوسط الغذائي

Stock Culture of .. .. :   .. .. ml or equivalent

1.Inorganic Salts :-

-------- ml MS Nitrates
-------- ml MS Sulphates
-------- ml MS Halides
-------- ml MS PBMo
-------- ml MS NaFe EDTA
-------- ml MS $NaH_2PO_4.H_2O$ (17g/l)

2.Organic constituents :-

A. Carbohydrate ---- g Sucrose or ----- g ------------- (other Source)

B. Vitamines

--- ml Thiamine – HCl (stock ----mg/ml)
--- ml Pyridoxine – HCl (Stock----mg/ml)
--- ml Nicotinic acid (stock ----mg/ml)
--- ml Glycine (stock ---- mg/ml)
or
--- ml Vitamin stock
(--- mg/ml Thiamine – HCl ,---- mg/ml Pyridoxine – HCl ,
--- mg/ml Nicotinic acid , ---- mg/ml Glycine)

C. Inositol ----- mg

D. Auxines

--- ml IAA (stock --- mg/ml) , ----- ml IBA (stock ---- mg/ml)
--- ml NAA (stock --- mg/ml) ,----- 2,4-D (stock ------ mg/ml)
--- ml other (specify ----------------------- (stock -------- mg/ml)

E. Cytokinines

---- ml Kinetin (stock ----- mg/ml),
---- ml 2ip (stock ---- mg/ml),
---- ml other (specify ------------------------ (stock ------ mg/ml)

F. Gibberellins

---- ml GA_3 (stock ---- mg/ml).

G. Purines / Pyrimidines

---- g Adenine Sulphate . H_2O
---- g other (specify --)

H. Amino acids / Amides

---- g types (------------------------------)

3. Complex addenda

----g Activated charcoal (kind --------------------------------)
---- g Casein hydrolysate (kind --------------------------------)
---- g Other (specify --)

4. Dissolve to dilute to ---------- ml.

5. Adjust pH to ------
6. Dilute further to ------- ml .
7. Add -----g gelling agent (kind --)
8. Melt gelling agent ----min at 121°C and 1.05 kg/cm^2 .
   or Heat on hot plate for -----min. till the solution is clear.
9. Distribute ------- ml into -------------------------- (culture vessel)
10. Cap with --------------------------------- (closure type) .
11. Sterilize by autoclaving for -------------min. at 121°C and1.05 Kg/cm^2
12. Cool as ------- slant ------- not slant
13. Medium Prepared by --------------------------------- date---------------------------

ملحق 3.1. بعض القياسات المفيدة المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية

Length

1 inch = 25.4 millimeter (mm)
1 mm = 0.03937 inch

Temperature

32°F = 0°C
50°F = 10°C
68°F = 20°C 80°F
86°F = 30°C
212°F = 100°C

Concentration

$$\textbf{1 part per million} = \frac{1mg}{1\ kg} = \frac{1mg}{1 liter of\ water}$$

$$\textbf{number of moles} = \frac{weight\ in\ grams}{molecular\ weight}$$

$$\textbf{1 molar solution} = 1\ M = \frac{1\ mole\ of\ solute}{litre\ of solvent}$$

$$\textbf{1 millimolar solution} = 1\ mM = \frac{0.001\ mole\ of\ solute}{1\ litre\ of\ solvent}$$

$$\textbf{1 micromolar solution} = 1\ \mu M = 0.001\ \text{mM} = \frac{1X\ 10-6\ mole\ of\ solute}{1\ litre\ of solvent}$$

Weight

$$1gram\ (g\ or\ gm) = \frac{1}{453} lb$$

$$1milligram = \frac{1}{1000} g$$

ملحق 3.2. (أ) مراجعة نسب تحضير المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية

المحاليل بالنسبة المئوية

يتم التعبير في الأوراق المنشورة عن تركيزات السكروز ومبيض الكلور والآجار عادة كنسب مئوية. تركيز المذاب (آجار، كلور التبييض، والسكروز، وما إلى ذلك) في 100 مل من المحلول. يمكن التعبير عنها كوزن لكل حجم (w/v) أو كحجم لكل حجم (v/v).

أمثلة

- محلول مبيض كلور 10٪ (حجم/حجم) عبارة عن 10 مل من مبيض الكلور المخفف بالماء بحجم إجمالي 100 مل.
- تركيز آجار 8% (وزن/حجم) عبارة عن 8 جرام آجار مخفف لحجم إجمالي 100 مل.

مسائل

1- إذا كان وسط الزراعة يتطلب 4.5% (وزن/حجم) من السكروز، فما المقدار من السكروز الذي يمكن أن تضيفه لعمل وسط بحجم:

	الحجم المطلوب		الحل
أ	1.0 لتر	=	45 جرام
ب	500 مل	=	22.5 جرام
ت	250 مل	=	11.25 جرام
ث	10 مل	=	450 ميليجرام

كم هي كمية الآجار المطلوبة لعمل وسط بتركيز 1.0% لوسط بحجم:

أ) 1.0 لتر

ب) 20 مل

	حجم الوسط		وزن الآجار
أ	1.0 لتر	=	10 جرام
ب	20 مل	=	200 ميليجرام

2- يوجد 7.5 جرام من الآجار في 250 مل من الوسط. ما هي نسبة الاجار؟

الحل = 3%

3- إذا تم تخفيف 5 مل من الكلور المبيض إلى 50 مل، فما هي النسبة المئوية لمحلول مبيض الكلور؟

الحل = 10%

ملحق 3.2. (ب) مراجعة نسب تحضير المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية

المحاليل المولارية

يحتوي محلول بتركيز 1.0 مولار (1 M) على 1 مول من المذاب في 1 لتر من المحلول. المول (mole) هو عدد جرامات المذاب التي تساوي وزنه الجزيئي.

مسائل

1- محلول (IAA (MW = 175 بتركيز 0.01 مولار، كم يحتوي من عدد جرامات (IAA) في اللتر؟

الحل

1 مول = 175 جرام

175 جرام/اللتر = 1 مولار

17.5 جرام/ اللتر = 0.1 مولار

1.75 جرام/ اللتر = 0.01 مولار

2- في دراسة إجهاد ملحي تم إضافة 17 ميليمول (m*M*) من كلوريد الصوديوم (MW = 58) للوسط لاستحاثت جهد تناضحي.

أ) كم عدد جرامات كلوريد الصوديوم في 1 لتر من محلول بتركيز 17 ميليمولار (m*M*) من محلول كلوريد الصوديوم؟

الحل

17 ميليمولار = 0.017 مولار

0.017 مولار = س جرام كلوريد صوديوم / 58 وزن جزيئي

س جم = 0.017 * 58 = 0.986 جرام كلوريد صوديوم في اللتر

ب) ما هي النسبة المئوية (وزن/ حجم) لكلوريد الصوديوم في 1 لتر؟

الحل

0.986 جرام/1000 مل = 0.0986 جرام / 100 مل

= 0.0986 أو 0.1%.

3- إذا كنت تريد عمل 0.1 مولار من إندول حامض البيوتريك IBA ((MW = 203) في 1 لتر، كم تحتاج من الجرامات والمليجرامات؟

الحل

203 جرام/اللتر = 1 مولار

20.3 جرام/ اللتر = 0.1 مولار = 20300 ميليجرام/ اللتر

ملحق 3.2. (ت) طرق تخفيف المحاليل المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية

تخفيف محلول المركز

أسئلة

1- إن كنت تحتاج إلى 25 ميليجرام/اللتر (2,4-D) في 1 لتر من الوسط، ويحتوي مركز (2,4-D) على 10 ميليجرام/100 مل، كم من المركز تستخدم لعمل الوسط؟

الحل

10 ميليجرام/ 10 مل = 2.5 ميليجرام/ س

10 ميليجرام *س = 250 ميببجرام/مل

س = 25 مل

2- إذا كان لديك محلول مركز 15 ميليجرام/ 100 مل من مركز الجبرلين (GA_3)، وتحتاج إلى 1 ميليجرام (GA_3) في 25 مل، ما مقدار محلول المركز الذي تضيفه إلى 125 مل من الوسط؟

الحل

1 مل/ 25 مل = 2.5 ميليجرام/س

25 مل * س = 125 ميليجرام/ مل

س = 5 ميليجرام من مركز الجبرلين (GA_3) في 125 مل من الوسط

15 ميليجرام/ 100 مل = 5 ميليجرام/س

15 ميليجرام * س = 500 مل/ ميليجرام

س = 33.3 مل من محلول المركز

3- يوجد 2150 ميليجرام كينتين (MW = 215) في 1 لتر من الوسط، عبر عن هذا بالمولارية؟

الحل

2150 ميليجرام = 2.15 جرام

2.15 جرام/ 215 وزن جزيئي = 0.01 مول

0.01 مول/ لتر = 0.01 مولار

ملحق 3.3. قائمة الشركات الخاصة بتوفير معينات زراعة الأنسجة النباتية

توفر الشركات المواد الكيميائية لزراعة الخلايا والأوساط الغذائية والمضادات الحيوية والزجاجيات والمواد البلاستيكية والأجهزة وملحقات الأوساط ووسائل التدريس

BellCo Glass, Inc., www.bellcoglass.com
Bio-World, www.bio-world.com
Caisson Laboratories, Inc., www.caissonlabs.com
Carolina Biological Supply Company, www.carolina.com
Duchefa Biochemie, www.duchefodirect.com
Fisher Scientific, www.fishersci.com
Flow Laboratories, Inc., www.germfree.com
Hoechst Celanese Corporation, 1041 Route 202–206, Bridgewater, New Jersey 08807, 908.231.2000
Inotech Biosystems International, Inc., www.inotechintl.com
Li-Cor Biosciences, www.licor.com
Life Technologies, Inc., www.lifetechnologies.com
Millipore Corporation, www.millipore.com Osmotek
LTD, www.osmotek.com
Phenix Research, phenixresearch.com
PhytoTechnology Laboratories, www.phytotechlab.com
Plant Cell Technology, Inc., www.ppm4plant-tc.com
Sigma-Aldrich Company, www.sigmaaldrich.com
VWR Scientific, www.vwrsp.com

المراجع

Anderson, L., and Skoog, F. (1962). Growth promoting effect of cyclitols on spruce tissue cultures. *Plant Physiology*, 37, 60–66.

Ball, E. (1953). Hydrolysis of sucrose by autoclaving media, a neglected aspect in the technique of culture of plant tissues. Bulletin of the Torrey Botany Club, 80, 409–411.

Binzel, M. L., Sankhla, N., Joshi, S., and Sankhla, D. (1996). Induction of direct somatic embryogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Cell Reports*, 15, 536–540.

Caplin, S. M., and Steward, F. C. (1948). Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. Science, 108, 655–657. Cassells, A. C., and Collins, I. M. (2000). Characterization and comparison of agars and other gelling agents for plant tissue culture use. *Acta Hortic*, 530, 203–212.

Chia-chun, C., Tsun-wen, O., Hsu, C., Shu-min, C., and Chien-kang, C. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In *Proceedings of the symposium on plant and tissue culture* (pp. 51–55). Beijing: Science Press China (subsidiary of Van Nostrand-Reinhold, New York).

Debergh, P. C. (1983). Effect of agar brand and concentration on the tissue culture media. Physiologia Plantarum, 59, 270–276. Debnath, S. C. (2009). Characteristics of strawberry plants propagated by *in vitro* bioreactor culture and *ex vitro* propagation method. *Engineering in Life Sciences*, 9(3), 239–264.

Debnath, S. C. (2010). A scaled-up system for *in vitro* multiplication of thidiazuron-induced red raspberry shoots using a bioreactor. *Journal of Horticultural. Science and Biotechnology*. 85(2), 94–100.

Dekhuijzen, H. M. (1971). Sterilization of cytokinins. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), Effects of sterilization on components in nutrient media (pp. 129–132). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific. Dunlap, J. R., and Robacker, K. M. (1988). Nutrient salts promote light-induced degradation of indole-3-acetic acid in tissue culture media. *Plant Physiology*, 88, 379–382.

Epstein, E., and Lavee, S. (1975). Uptake and fate of IAA in apple callus tissue using IAA-1–14C. *Plant and Cell Physiology*, 16, 553–561.

Fei, L., and Weathers, P. J. (2011). From cells to field-ready plants: one-step micropropagation in a mist bioreactor. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Animal*, 47(1), S55–S55.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cellular Research*, 50, 151–158.

Gamborg, O. L., Murashige, T., Thorpe, T. A., and Vasil, I. K. (1976). Plant tissue culture media. *In vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, 12, 473–478.

Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E., Borges, G., and Mansur, E. (2011). Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106(1), 47–54.

George, E. F., Puttock, D. J. M., and George, H. J. (1987). *Plant culture media: Formulations and uses*. (Vol. 1). Reading, England: Eastern Press.

Griffis, J. L., Wedekind, H., and Johnson, S. (1991). Effects of several commercially available solidifying agents on *in vitro* growth of *Alocasia bellota* “Alicia.” *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 104, 303–308.

Haluist, J. L., Hosier, M. A., and Read, P. E. (1983). A comparison of several gelling agents and concentrations on callus and organogenesis *in vitro. In vitro*, 19, 248.

Hvoslef-Eide, T., and Preil, W. (2004). *Liquid culture systems for in vitro mass propagation of plants*. Dordrecht, The Netherlands: Springer.

Huang, L. C., and Murashige, T. (1976). Plant tissue culture media: Major constituents, their preparation and some applications. *TCA Manual*, 3, 539–548.

Kacar, Y. A., Bicen, B., and Varol, I. (2010). Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. *Genetics and Molecular Research*, 9(1), 416–424.

Kang, K. S., Veeder, G. T., Mirrasoul, R. J., Kaneko, T., and Cottrell, I. W. (1982). Agar-like polysaccharide produced by a Pseudomonas species: Production and basic properties. *Applied Environmental Microbiology*, 43, 1086–1091.

Lloyd, C., and McCown, B. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifilia, by use of shoot-tip culture. *International Plant Propagators Society Proceedings*, 30, 421–427.

Loewus, F. A., and Loewus, M. W. (1983). Myo-inositol: Its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology*, 34, 137–167.

Miller, C. O. (1961). Kinetin and related compounds in plant growth. *Annual Reviewof Plant Physiology*, 12, 395–408.

Miller, C. O., and Skoog, F. (1953). Chemical control of bud formation in tobacco stem segments. *American Journal of Botany*, 40, 768–773.

Mirza, M.T. and Khatir, S.S. (2019). Some media constiuents of plant tissue culture. *Pakistan journal of Biology,* 33, 63-69.

Mohamed-Yasseen, Y., Barringer, S., Schloupt, R. M., and Splittstoesser, W. E. (1995). Activated charcoal in tissue culture: An overview. *Plant Growth Regulator Society of America*, 23(4), 206–213.

Murashige, T. (1973). Sample preparations of media. In P. F. Kruse, and M. K. Patterson (Eds.), *Tissue culture methods and applications* (pp. 698–703). New York: Academic Press.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

Murthy, B. N.S., Murch, S. J., and Saxena, P. (1998). Thidiazuron: A potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 34, 267–275.

Niedz, R. P., and Evans, T. J. (2007). Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 43(4), 370–381.

Nitsch, J. P., and Nitsch, C. (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163, 85–87.

Owen, H. R., and Miller, R. A. (1992). An examination and correction of plant tissue culture basal medium formulations. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 28, 147–150.

Owen, H. R., Wengerd, D., and Miller, R. A. (1991). Culture medium pH is influenced by basal medium, carbohydrate source, gelling agent, activated charcoal, and medium storage method. *Plant Cell Reports*, 10, 583–586.

Preece, J. E. (2010). Micropropagation in stationary liquid media. *Propagation of Ornamental Plants*, 10(1), 183–187.

Peer, H. G. (1971). Degradation of sugars and their reactions with amino acids. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 105–113). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.

Pollard, J. K., Santz, E. M., and Steward, F. C. (1961). Hexitols in coconut milk: Their role in nurture of dividing cells. *Plant Physiology*, 36, 492–501.

Posthumus, A. C. (1971). Auxins. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 125–128). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.

Saenz, L., Herrera-Herrera, G., Uicab-Ballote, F., Chan, J. L., and Oropeza, C. (2010). Influence of form of activated charcoal on embryogenic callus formation in coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100(3), 301–308.

Sankhla, D., Davis, T. D., and Sankhla, N. (1996). *In vitro* regeneration of silktree (Albizzia julibrissin) from excised roots. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44, 83–86.

Sarma, K. S., Maesato, K., Hara, T., and Sonoda, Y. (1990). Effect of method of agar addition on post-autoclave pH of the tissue culture media. *Annals of Botany*, 65, 37–40.

Skoog, F., and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposium of the Society of Experimental Biology*, 11, 118–131.

Smith, R. H., and Gould, J. H. (1989). Introductory essay. In J. Janick (Ed.), *Classic papers in horticultural science* (pp. 52–90). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. Steinhart, C.,

Ten Ham, E. J. (1971). Vitamins. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 121–123). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific Bookshop.

Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631.

Thurston, K. C., Spencer, S. J., and Arditti, J. (1979). Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. *American Journal of Botany*, 66, 825–835.

Van Bragt, J., and Pierik, R. L. M. (1971). The effect of autoclaving on the gibberellin A3. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 133–137). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.

Walsh, L. (2003). *Antibiotics: Actions, origins, resistance*. Herndon, VA: ASM Press.

Wann, S. R., Veazey, R. L., and Kaphammer, J. (1997). Activated charcoal does not catalyse sucrose hydrolysis in tissue culture media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 50, 221–224.

White, P. R. (1943). *A handbook of plant tissue culture*. Lancaster, PA: Jaques Cattell Press.

White, P. R. (1963). *The cultivation of animal and plant cells* (2nd ed.). New York: Ronald Press.

Wilmar, J. C., and Doornbos, T. (1971). Stability of abscisic acid isomers to heat sterilization and light. In J. Van Bragt, D. A. A. Mossel, R. L. M. Pierik, and H. Veldstra (Eds.), *Effects of sterilization on components in nutrient media* (pp. 139–147). Wageningen, The Netherlands: Kniphorst Scientific.

Yamakawa, T., Kurahashi, O., Ishida, K., Kato, S., Kodama, T., and Minoda, Y. (1979). Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. *Agriculture and Biochemical Journal*, 43(4), 879–880.

Yong, J. W. H., Ge, Liya, Fei Ng, Yan, and Tan, Swee Ngin (2009). The chemical composition and biological properties of coconut (Cocos nucifera L.) water. *Molecules*, 14(12), 5144–5164

الفصل الرابع

تجهيز الجزء النباتي المنفصل Explant Preparation

الجزء النباتي المنفصل (explant) عبارة عن قطعة من نسيج نباتي تستخدم في زراعة الأنسجة. يمكن أن يتطور الجزء النباتي المنفصل إلى نسيج كدب (callus) كاستجابة للجروح ويتكون من خلايا غير منتظمة ومنقسمة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن إنتاج نسيج الكدب بدون جرح عن طريق إنبات بعض البذور على وسط يحتوي على منظم نمو نباتي مثل (2,4-D). تختلف خلايا نسيج الكدب من حيث الحجم والشكل والتصبغ وأحياناً في التعبير الوراثي (genetic expression). هذه الخلايا متمايزة بشكل كبير، حيث لديها فجوة مركزية كبيرة والنواة على الجانب. وهذا على النقيض من الخلايا الإنشائية غير المتمايزة التي تكون متساوية القياس، صغيرة، تفتقر إلى فجوة بارزة، وسيتوبلازمية، ولها نواة مركزية كبيرة. تنشأ الخلايا الإنشائية أحياناً في كتل نسيج الكدب ويشار إليها بمناطق شبيهة النسيج الإنشائي (meristemoid). يمكن أن ينتج النسيج شبه الإنشائي جذور أو براعم أو أجنة جسدية عرضية.

عوامل اختيار الجزء النباتي المنفصل

يجب مراعاة العوامل التالية في اختيار الجزء النباتي المنفصل:

1- العمر الفسيولوجي والتطوري لمصدر الجزء النباتي المنفصل (النبات الأم).
2- موسم الحصول على الجزء النباتي المنفصل
3- حجم وموقع الجزء النباتي المنفصل
4- نوعية المصدر النباتي
5- الهدف النهائي لزراعة الخلية
6- نمط النبات الوراثي

عمر الجزء النباتي المنفصل Explant Age

يعتبر عمر الجزء النباتي المنفصل مهماً، حيث إن النسيج اليافع عادة ما يستجيب أكثر في الزراعة خارج الجسم الحي. في كثير من الأحيان، لا يشكل النسيج الناضج نسيج كدب قابلاً للتجدد. بالإضافة إلى ذلك، إن النسيج اليافع جديد التشكل الأسهل في التعقيم السطحي وتشكيل زراعات نظيفة.

الموسم Season

يمكن أن يكون للموسم تأثيراً على التلوث واستجابة الزراعة. على سبيل المثال، البراعم والسيقان المأخوذة خلال موسم الانبثاق في الربيع حيث تكون أكثر استجابة من البراعم الساكنة. وبمرور الموسم من الربيع إلى الصيف والخريف ثم الشتاء فإن الجزء النباتي المنفصل لا يستجيب كما في الربيع للزراعة. يكون النسيج فسيولوجياً ساكناً إلا بعد أن توفر شروط كسر الكمون؛ في بعض الحالات، يمكن استيفاء حالة كسر الكمون في الزراعة بتبريد حراشف البصلات أو الأجنة لكسر السكون. بالإضافة إلى ذلك، تزداد معدلات التلوث أيضاً مع تقدم فصل الصيف؛ الخريف والشتاء يمكن أن يزيد تلوث إلى 100%.

حجم الجزء النباتي المنفصل Explant Size

حجم النباتي المنفصل له تأثير على استجابة الأنسجة. بشكل عام، كلما كان النباتي المنفصل أصغر حجماً، كلما صعبت زراعته. يجب أن يحتوي وسط الزراعة عادة على مكونات إضافية. من المحتمل أن تحتوي الأجزاء النباتية المنفصلة الأكبر حجماً على مزيد من احتياطيات المغذيات ومنظمات النمو النباتية لاستدامة الزراعات. أصدرت (Tran Thah Van, 1977) تقريراً مثيراً للاهتمام حول زراعة شرائح البشرة الرقيقة (thin layer culture) لأنسجة جذع التبغ وتفاوت الإمكانات التشكلية اعتماداً على ما إذا كان الجزء النباتي المنفصل مأخوذاً من قاعدة أو وسط أو أعلى الجذع. تحتوي النباتات على مستويات هرمونية مختلفة في جميع أنحاء النبات ويمكن أن يختلف مستوى منظمات النمو النباتية الداخلية اعتماداً على موقع الجزء النباتي المنفصل. كما أن الاختلافات الداخلية في توازن الهرمونات في الأنسجة يمكن أن تؤدي إلى استجابات متفاوتة في خارج الجسم الحي.

نوعية النبات Plant Quality

يُنصح بالحصول على أجزاء نباتية منفصلة من نباتات تتمتع بصحة جيدة مقارنة بالنباتات الخاضعة للإجهاد التغذوي أو المائي أو النباتات التي تظهر عليها أعراض المرض. في بعض الحالات، كما هو الحال عند إنشاء نباتات خالية من الفيروسات، يكون النبات الذي يتم الحصول على أجزاء نباتية منفصلة منه مصاباً بفيروس أو فيروسات متعددة.

الهدف Goal

يعتمد اختيار النسيج المستأصل على نوع الاستجابة المرغوبة من زراعة الخلية. يمكن استخدام أي قطعة من الأنسجة النباتية كجزء نباتي منفصل (شكل 4.1). على سبيل المثال، إذا كان التكاثر النسيلي هو الهدف، عادة ما يكون الجزء النباتي المنفصل برعماً جانبياً أو طرفياً. يتم استخدام قطع من الفلقة، السويقة الجنينة السفلية، الجذع، الأوراق، أو الجنين لتحفيز نسيج الكدب. أفضل الأجزاء النباتية المنفصلة لتحفيز نسيج الكدب هي أنسجة البادرات المنبتة تحت التعقيم أو النورات غير الناضجة. تعتبر أنسجة الأوراق من البذور المنبتة بطريقة معقمة مصدراً جيداً لعزل المحتوى الخلوي. يتم زراعة المتك أو حبوب اللقاح لإنتاج نباتات أحادية الصيغة الصبغية أو نسيج كدب.

سوف تستخدم التدريبات في هذا الكتاب مجموعة متنوعة من الأجزاء النباتية المنفصلة.

النمط الوراثي Genotype

من بين أي جنس نباتي، عادة ما تكون هناك اختلافات كبيرة في الأنماط الجينية أو الأصناف أو الأنواع واستجابتها في زراعة الخلية. بعض الأنماط الجينية لا تستجيب في الزراعة، أو متمردة (recalcitrant)، بينما يستجيب البعض الآخر بسهولة لإنتاج نسيج الكدب أو البراعم. يعد اختبار العديد من الأنماط الجينية لمحصول أو أنواع نباتات الزينة معياراً تجريبياً رئيسي لتحديد تلك التي ستستجيب في الزراعة.

تقنية التعقيم Aseptic Technique

يتطلب تعقيم الجزء النباتي المنفصل التعقيم السطحي قبل وضعه في آجار المغذيات للزراعة. يتم تحقيق ذلك بشكل عام عن طريق استخدام مبيض الكلور التجاري المخفف (diluted commercial chlorine bleach). بعض الأجزاء النباتية المنفصلة، مثل البذور الصغيرة جداً أو أبواغ (جراثيم) السرخس (fern)، يتم تعقيمها السطحي في أنابيب طرد مركزي مخروطية ومغطاة، وتتطلب طرداً مركزياً لتكوير (pellet) البذور وسكب المحاليل باستخدام ماصة. يتم لف الأجزاء النباتية المنفصلة التي تطفو على سطح المادة المعقمة في مربعات قماش قطني لمنعها من الطفو خارج الدورق أو أنبوب الاختبار عند تغيير المحاليل.

الطريقة العامة لتعقيم الجزء النباتي المنفصل كما يلي:

1- غسل الجزء النباتي المنفصل في ماء دافئ وصابون والشطف بماء الصنبور. يعتبر هذا الإجراء مفيد جداً لتعقيم السيقان، والأوراق، والقمة النامية المستأصلة من الحقل أو البيوت المحمية لأنها تزيل الملوثات السطحية.

2- في بعض الأحيان من المناسب الشطف أو المسح لفترة وجيزة بالكحول بقطعة قماش قطنية مبللة بالكحول خاصةً مع الأسطح المشعرة أو المغطاة بالشمع السميك.

3- غمس الجزء النباتي المنفصل في محلول الكلور المبيض الذي يجب تحضيره طازجاً دائماً. عادة ما تتم إضافة 1-2 قطرة من مستحلب توين-20 (Tween-20)، منظف أو أي عامل ترطيب آخر لكل 100 مل من محلول كلور التبييض.

- يتم تحضير محلول الكلور بنسبة 10% عن طريق إضافة 10 مل من مبيض الكلور إلى أسطوانة مدرجة وتخفيفها بالماء إلى 100 مل.

- عند التعقيم في أنابيب الزراعة، يتم صب محلول التعقيم في غطاء أنبوب الزراعة ثم في أنبوب الزراعة؛ وهذا يساعد على تطهير الغطاء.

- ضع يدك على الأنبوب وأخلطه. قم بغطاء وتحريكه من حين لآخر لمدة 5-30 دقيقة للتعقيم.

- يجب استخدام العبوات الصغيرة من محاليل كلور التبييض، لآن بمجرد فتح القنينة تتطاير المادة الفعالة (الكلور) ويفقد فعاليته.

4- يتم سكب محلول التعقيم وشطف النبات في ماء معقم ثلاث إلى خمس مرات داخل صندوق النقل المعقم.

يختلف إنشاء الزراعات النسيجية النظيفة من نسيج إلى آخر، وبذلك تختلف معاملات التعقيم من تركيز المادة المعقمة وفترة التعقيم حسب النسيج. فالأنسجة الرقيقة العصارية قد تحتاج إلى محلول تعقيم بتركيز 10% لتنظيفها. أبواغ السرخس قد تحتاج فقط 3.5% من المحلول لمدة 3-4 دقائق. بعض البذور قد تحتاج لمادة معقمة بتركيز 30-50% لمدة 20-60 دقيقة. يتسبب التعقيم السطحي في تلف أنسجة الأجزاء النباتية المقطوعة (مثل الجذع والأوراق) مما يستوجب إزالتها قبل الزراعة.

- التلوث الناتج عن الأنسجة المعقمة بشكل غير صحيح عادة ما تنشأ من الجزء النباتي المنفصل ويكون في الوسط ومجاوراً له.

- يظهر التلوث الناتج عن الاستخدام السيئ للتقنية، بشكل عام، على سطح الآجار بأكمله.

- يظهر تلوث الزراعات بالفطريات كنمو زغبي.
- يظهر التلوث البكتيري على شكل مستعمرات زهرية أو بيضاء أو صفراء ناعمة لامعة.
- إن كان التلوث نتيجة لرداءة التقنية، أو تلوث مرشحات صندوق تدفق الهواء الصفحي أو تعقيم الأوساط بشكل غير صحيح، فسيتم تناثره في الوسط.
- يظهر التلوث من الحشرات بشكل عام كمسارات عبر الوسط، والتي يمكن رؤيتها بسبب نمو البكتيريا أو الفطريات على مسارات الحشرات.

التجربة العملية

إنبات البذور المعقمة

الغرض

اكتساب الخبرة في تحضير الأوساط، وتعقيم الجزء النباتي المنفصل، وتقنيات الزراعة المعقمة، وإنشاء زراعات لتجارب تحفيز نسيج الكدب اللاحقة.

مصدر البذور

الجزر، زهرة الشمس، القرنبيط، القطن، أو أي بذور أخري من اختيارك.

تجهيز الوسط

وسط الإنبات (1 لتر أو ما يساويه)

1- صب 500 مل من الماء المقطر المؤين في قارورة إيرلنماير بحجم 2000 مل
2- أضف 10 مل من مركزات أملاح موراشيحي وسكوج الخمسة (nitrates, halides, NaFeEDTA, sulfates, and PBMo).
3- إكمال الحجم إلى 1000 مل ثم ضبط الأس الهيدروحيني إلى 5.7 باستخدام (1 N HCl or NaOH)
4- أضف 8 جرام للتر من الآجار وذوبه
5- توزيع 10 مل من الوسط لكل أنبوب اختبار (25 × 150 mm) وتغطيتها
6- يتم تجهيز الماء المقطر المعقم بوضع حوالي 100 مل في قارورة إيرلنماير بحجم 250 مل وتغطيتها

7-تعقيم الوسط والماء المقطر في السخان المائي الضاغط (Autoclave) لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كليلو جرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

أ) بذور الجزر، زهرة الشمس والقرنبيط

1- لف حوالي 10 بذور في مربع قماش قطني (8 × 8 سم) وأدخلهم في أنبوب اختبار (150 × 25 مم)

2- أشطف البذور بكحول (70%) لمدة 2-3 دقيقة ثم أسكب الكحول

3- أضف 20% من المادة المعقمة (20 مل مبيض كلور+ 80 ماء + قطرتين توين 20 وتغطية الأنبوب.

4- حرك الأنبوب لمدة 15 دقيقة بعناية بحيث لا تتدفق المادة النباتية المعقمة

5- أسكب محلول التعقيم وأشطف البذور 3 مرات تحت التعقيم داخل صندوق النقل المعقم باستخدام الماء المقطر المعقم

6- أخرج لفة البذور من الأنبوب وضعها في طبق بتري وفض اللفة وأزرع البذور في الوسط.

7- أغلق الأنبوب بالبارافيلم وأنقلهم لغرفة الحضانة.

تنبت بذور زهرة الشمس خلال أسبوع، بينما بذور الجزر خلال أسبوعين.

يمكن استخدام كل أجزاء البادرة لتحفيز نسيج الكدب خلال 1-3 أسابيع.

ب) بذور القطن

1- لف البذور في مربع قماش قطني (8 × 8 سم) وأدخلهم في أنبوب اختبار (150 × 25 مم)

2- أضف 20% من المادة المعقمة (20 مل مبيض كلور+ 80 ماء + قطرتين توين 20 وتغطية الأنبوب.

3- عقم لمدة 20 دقيقة

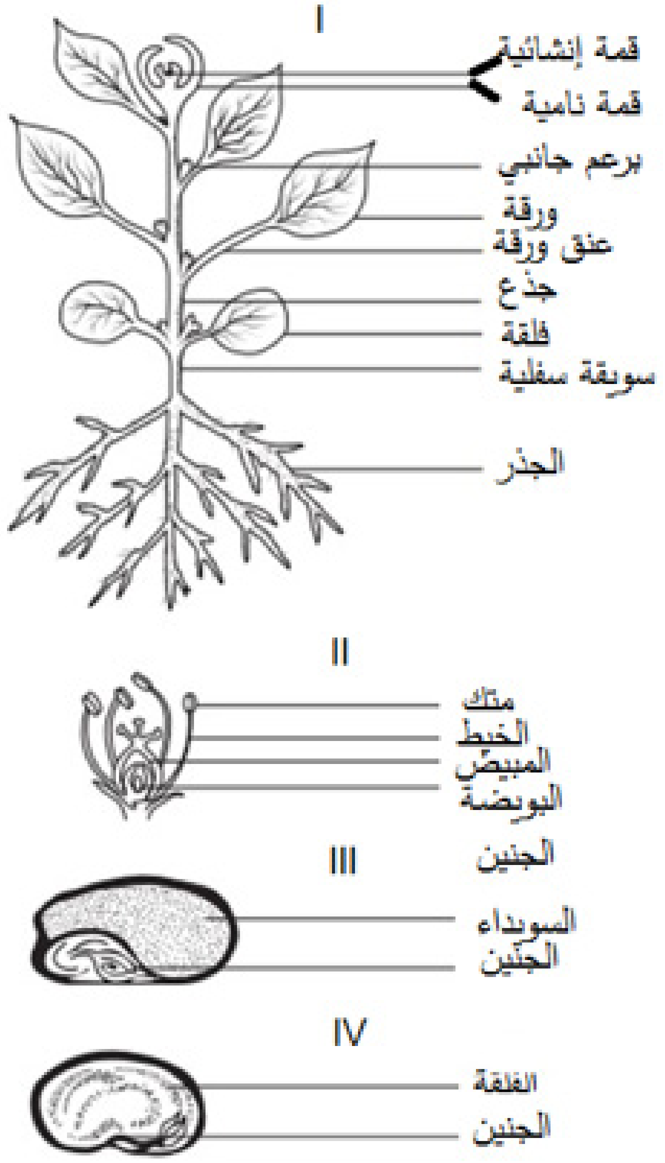
4- أسكب محلول التعقيم وأشطف البذور بالماء المقطر المعقم 3 مرات تحت التعقيم

5- أخرج لفة البذور من الأنبوب وضعها في طبق بتري وفض اللفة وأزرع البذور في الوسط

6- أغلف الأنبوب بالبارافيلم وأنقلهم لغرفة الحضانة.

توجد صعوبة في تعقيم بذور بعض أصناف القطن. في هذه الحالة، يتم إتباع البرتوكول التالي

- وضع البذور في حامض كبريتيك لمدة 15 دقيقة.
- شطف البذور بعد وضعها في قمع مقاوم للحامض
- فرك البذور في ماء صابوني دافئ
- أضف كلور التبييض بتركيز 50% لمدة 4–60 دقيقة والتحريك المستمر
- أشطف البذور بالماء المقطر المعقم 3 مرات تحت التعقيم ثم الزراعة



شكل 4.1 رسم تخطيطي للأجزاء النباتية المنفصلة من (I) نبات،(II) زهرة، (III)بذرة فلقة واحدة،(IV) بذرة فلقتين

المراجع

Beck, C. (2010). *An introduction to plant structure and development* (2nd ed.). Boston: Cambridge University Press.

Bell, A. D. (2008). *Plant form: an illustrated guide to flowering plant morphology*. Portland, London: Timber Press.

Cronquist, A. (1973). *Basic botany*. New York: Harper and Row.

Esau, K. (1988). *Plant anatomy* (3rd ed.). New York: Wiley.

Fahn, A. (1990). *Plant anatomy* (4th ed.). New York: Pergamon.

Tran Thanh Van, K. (1977). Regulation of morphogenesis. In W. Barz, E. Reinhard, and M. H. Zenk (Eds.), *Plant tissue culture and its biotechnological application* (pp. 367–385). New York: Springer-Verlag.

Weier, T. F., Stocking, C. R., and Barbour, M. G. (1970). Botany: An introduction to plant biology (4th ed.). New York: Wiley

الفصل الخامس

التلوث Contamination

يشكل إنشاء مزارع معقمة تحدياً كبيراً في بعض المواد النباتية. بالإضافة إلى ذلك، فإن العملية الأولية لتنظيف وتعقيم المواد النباتية، خاصة إذا كان النبات المصدر نادراً وكان الإمداد محدوداً، تكون مستهلكة للوقت ومكلفة. ليس فقط إمكانية إنشاء زراعات نظيفة مشكلة فحسب، بل يمكن أيضاً أن يكون الفقد اللاحق للمزارع بسبب تفشي إصابة الحشرات، الذي يؤدي إلى التلوث الفطري والبكتيري، أمراً مدمراً.

مصادر التلوث الميكروبي: Sources of microbial contamination

1. الجزء النباتي المنفصل
2. طاقم العمل أو الأفراد (العامين)
3. صندوق تدفق الهواء الصفحي
4. العث والنمل والحشرات الأخرى
5. الأوساط الغذائية
6. الأدوات
7. نظام التهوية

1. الجزء النباتي المنفصل

الجزء النباتي المنفصل أو قطعة الأنسجة النباتية التي يتم زراعتها غالباً ما تكون المصدر الرئيسي للملوثات. توجد كائنات دقيقة على السطح، في شقوق صغيرة، وبين الطبقات الخارجية لحراشف البصل، وأوراق البراعم النامية، وما إلى ذلك. يمكن أن تكون الأسطح المغطاة بالشمع السميك مثل العصارة وشعر البشرة (trichomes) محبساً ومقراً للكائنات الحية الدقيقة. بالإضافة إلى ذلك، فإن العديد من النباتات لديها تلوث ميكروبي داخل نظم الأوعية الناقلة، وبعض البذور (Donnarumma *et al*., 2011)، وفي المساحات بين خلايا الأوراق العمادية، وتجويف الأوعية الخشبية والمساحات بين الخلايا في نسيج الكدب (Miyazaki *et al*., 2011).

- لإزالة الملوثات السطحية، يتم غسل الجزء النباتي المنفصل مسبقاً بالماء الدافئ والصابون لإزالة الأوساخ والغبار ولتعزيز ملامسة المادة المعقمة.

- يتم استخدام عامل ترطيب مثل توين-20 (Tween-20) أو نظف مثل صابون غسيل الصحون، والذي يعمل كمنشط سطحي (surfactant). تستخدم عادة 1-2 قطرة من المادة الخافضة للتوتر السطحي لكل 100 مل من عامل التطهير.

- يتم تعزيز ملامسة عامل التعقيم مع الجزء النباتي المنفصل بالرج أو التحريك أو الهز خلال عملية التعقيم.

- لقد تم اقتراح أن المعالجة الصوتية (sonication treatment) أثناء التطهير لتعزيز تعقيم الجزء النباتي المنفصل. ويختلف وقت الصوتنة من دقيقتين للأنسجة الرخوة إلى 20 دقيقة للبذور.

- يستخدم التفريغ إن كان النسيج مغطى بالشعر في البشرة لإزالة فقاعات الهواء التي تتكون بين الشعيرات.

- يجب شطف عامل التعقيم من الجزء النباتي المنفصل بالماء المعقم 3-5 مرات.

- تحدد التجربة والخطأ أو المراجع الأدبية تركيز عامل التعقيم ومقدار وقت التعرض.

بشكل عام، من الأفضل استخدام محلول التعقيم الأقل تركيزاً لأقصر فترة زمنية للحصول على جزء النباتي منفصل نظيف، حيث سيؤدي ذلك إلى أقل قدر من الضرر للجزء النباتي. يمكن أن يتسبب عامل التعقيم في تلف الجزء النباتي المنفصل، ويجب إزالة الأنسجة التالفة قبل زراعة الجزء النباتي المنفصل.

مواد (عوامل) التعقيم Disinfestant Agents

1- هيبوكلوريت الصوديوم (Sodium hypochlorite (NaOCl))،

يوجد في مبيض الغسيل (laundry bleach) في شكل محلول 5.25% (حجم/حجم) تقريباً. يتم تخفيف مبيض الغسيل في الماء إلى 5-25% (حجم/حجم)، مع إضافة قطرتين من مستحلب توين 20 (Tween-20) لكل 100 مل. عادة ما تكون مدة المعاملة من 5 إلى 30 دقيقة تليها ثلاث إلى خمس مرات شطف بالماء المعقم. يجب أن تكون محاليل التبييض التجارية طازجة قبل استخدامها حيث يتبدد غاز الكلور. من الأفضل استخدام عبوات صغيرة من المبيض وتسجيل وقت فتحها على الزجاجة. بمرور الوقت، يتطاير غاز الكلور ويفقد المحلول فعاليته. من الأفضل ضبط درجة حموضة محلول التبييض إلى حوالي الرقم الهيدروجيني 7. الطريقة هي

تحضير محلول التبييض المخفف حديثاً التبييض وضبط الرقم الهيدروجيني إلى 7 باستخدام 5 مولار من حمض الهيدروكلوريك. في هذه الحالة سيخرج الكلور بسرعة أكبر في درجة الحموضة المنخفضة.

2- هيبوكلوريت الكالسيوم (Calcium hypochlorite (Ca(Ocl)2).

يستخدم بتركيز 8% (وزن/حجم) بخلط 8 جرام من هيبوكلوريت الكالسيوم في 1 لتر ماء والتقليب لمدة 5-10 دقائق، ثم يترك ليترسب ويصب المحلول ويخلط مع أجزاء متساوية من الماء)، تضاف قطرتين من توين-20 لكل 100 مل ومدة معالجة الأنسجة تتراوح بين 5-30 دقيقة حسب النسيج.

3- إيثيل أو الأيزوبروبيل الكحول Ethyl or isopropyl alcohol

يستخدم بتركيز 70% (حجم/ حجم) لمسح المادة النباتية قبل التعقيم، ويمكن استخدامه بغمس المادة النباتية فيه لمدة 1-5 دقيقة قبل أو بعد معالجة هيبوكلوريت الصوديوم أو الكالسيوم.

4- بيروكسيد الهيدروجين ((Hydrogen peroxide (H2O2)

مؤكسد قوي يستخدم بتركيز 10% (حجم/حجم) لمدة 1-30 دقيقة قبل الشطف بالماء المعقم بجانب معقمات أخرى أو بمفرده. التفاعل بين بيروكسيد الهيدروجين وهيبوكلوريت الكالسيوم سام لأنسجة النبات، لذلك من المهم شطف الجزء النباتي المنفصل تماماً إن تم استخدامهما مع بعض.

5- غاز الكلورين ((Chlorine gas (Cl2)

غاز الكلور فعال في تعقيم البذور. توضع البذور في طبق بتري داخل مجفف فراغي داخل كابينة الغاز. يتم فتح الجزء العلوي من طبق بتري جزئياً وضع 100 مل من الكلوركس في دورق داخل المجفف. يتم فتح الجزء العلوي من المجفف، ثم استخدام ماصة لإضافة 3.3 مل من حامض الهيدروكلوريك المركز ببطء في الكلوروكس، مع توخي الحذر حيث يشكل حمض الهيدروكلوريك طبقة فوق الكلوروكس (وهذا يسمح بالخلط البطيء) ثم قفل الجزء العلوي من المجفف على الفور. سيتم توليد غاز الكلور. بعد حوالي 16-18 ساعة، يتم فتح المجفف بحذر ويستخدم قضيباً زجاجياً لفك الجزء العلوي من طبق البتري، تغلق مقدمة كابينة الدخان مرة أخرى ليتبدد غاز الكلور لبضع ساعات. يتم غلق طبق بتري بالبارافيلم بإحكام ويتم تخزين البذور المعقمة حتى الاستخدام.

6- ثنائي كلورو إيزوسيانورات الصوديوم
(NaDCC) (dichloroisocyanuric acid sodium salt)

قد يكون (NaDCC) أقل سمية لأنسجة النبات الحساسة لهيبوكلوريت الصوديوم والكالسيوم ولا يلزم شطفه.

7- مبيد إيزوثيازولون الحيوي ((Isothiazolone biocide (PPM)

يحتوي على ميثيليوستيزول وكلورو ميثيل إيزوثيازول (methyliosthizole and chloromethylisothiazole) (Niedz, 1998) وهو منتج يمنع التلوث الميكروبي في مزارع الأنسجة النباتية وتقليله بشكل فعال. يتم استخدامه كنقع مسبق وكذلك يتم إضافته في وسط الزراعة. وورد إنه فعال، ولكن بتركيزات عالية ويمكن أن يكون ساماً للأنسجة النباتية. استخدم (Miyazaki *et al*., 2011) (PPM) تحت التسريب الفراغي (vacuum infiltration) للقضاء على الخلايا الداخلية البكتيرية من نسيج الكدب والبراعم. لقد ثبت أنه فعال أيضاً في السيطرة على بكتيريا النباتات الداخلية (Miyazaki *et al*., 2010).

8- المضادات الحيوية المضادات الحيوية مثل الجنتاميسين والأمبيسيلين (gentamicin and ampicillin)

مفيدة في تقليل تلوث الجزء النباتي المنفصل بعد التعقيم باستخدام الإيثانول والمبيض. يقضي استخدام محلول مضاد حيوي بتركيز يتراوح بين 50-100 ميليجرام في اللتر لغمس الأنسجة لمدة 30 دقيقة قبل الزراعة على بعض الكائنات الحية الدقيقة. استخدم الأمبيسيلين (ampicillin) للقضاء على الملوثات البكتيرية في زراعات البذور والأجنة أثناء الزراعة خارج الجسم الحي، ولم يكن له تأثيرات سامة على الجزء النباتي المنفصل، بينما كان للتتراسيكلين (tetracycline) تأثيرات سامة.

9- كلوريد الزئبق ($HgCl_2$)

مادة كيميائية شديدة الخطورة وورد استخدامها كمعقم موضعي للجزء النباتي المنفصل. قارن (Thompson *et al*., 2009) استخدام كلوريد الزئبق بتركيز 0.2% والمبيض المنزلي بتخفيف 1.5 في الماء، حيث وجدوا أن كلاهما متشابه في القضاء على الملوثات، لكن المبيض المنزلي أدى إلى تطور أفضل في تكوين البراعم، وأشاروا إلى مخاطر استخدام كلوريد الزئبق. ببساطة لا يوجد أي مبرر لاستخدام هذا المركب كمعقم سطحي؛ ومع ذلك، فإن الأدبيات الحالية لديها الكثير من المراجع التي تشير إلى استخدام هذا المركب. وفقاً لورقة بيانات سلامة المواد ((Material Safety Data Sheet (MSDS)، يجب الحذر في التعامل مع هذه المادة والتخلص منها.

مصدر الجزء النباتي المنفصل Explant Source

يعتبر فصل السنة، حيث يتم زراعة المادة النباتية (غرفة النمو، الصوبة الزجاجية، الحقل) وموقع الجزء النباتي المنفصل على النبات المصدر من العوامل المهمة في الحصول على زراعات نظيفة. المواد النباتية التي تكون في حالة نمو نشطة مثل القمة النباتية في الانبثاق الربيعي أنظف بشكل عام مقارنة بأنسجة النبات الساكنة. غالباً ما تكون المواد النباتية من الحقل أكثر تلوثاً بالمقارنة مع المواد النباتية المزروعة في غرفة النمو أو البيت

المحمي. في بعض الأحيان، يمكن أن يساعد إخراج المواد النباتية المحفوظة بوعاء من البيت المحمي (حيث الرطوبة العالية) ووضعها في المختبر أو المكتب (بيئة جافة) قبل أسابيع قليلة من أخذ الأجزاء النباتية المنفصلة من النبات في تقليل التلوث. عادة ما يكون تنظيف المواد النباتية التي تنمو في التربة (الجذور، الدرنات، البصلات) أو بالقرب من سطح التربة (السيقان الجارية، جذور، كورمات الأوركيد الأولية) أصعب في التنظيف من المواد النباتية الهوائية.

يمثل تنظيف رايزمات النباتات المائية تحدياً في إنتاج زراعات نظيفة. وقد تم الحصول على أجزاء نباتية منفصلة بتقسيم الرايزوم شرائح (عقد) متعددة ومعاملتها بحامض جبرلين (50–100 ميليجرام في اللتر) لتعزيز نمو البراعم. ويمكن استخدام البراعم 1–2 مم التي تطورت من الرايزوم كمصدر للأجزاء النباتية المنفصلة.

التلوث الميكروبي الداخلي Internal Microbial Contamination

من المألوف أن يحتوي الجزء النباتي المنفصل على كائنات دقيقة داخلية (Armstrong, 1973; Tabor *et al.*, 1991; Misaghi and Donndelinger, 1990;). في هذه الحالة، قد يكون من الصعب إنشاء زراعات نظيفة. عادة ما تكون الأجزاء النباتية المنفصلة سريعة النمو مثل القمم النامية، وبويضات الثمرة غير الناضجة، وأجزاء الزهرة الناضجة وغير الناضجة، وقمم السيقان الجارية أقل إحتمالاً لإيواء الملوثات الداخلية. بينما يمكن أن تحمل الأبصال، أو البراعم البطيئة النمو، أو البراعم الساكنة، والجذور، والكورمات، والرايزومات الأرضية، حمولة ثقيلة من الملوثات الخارجية والداخلية. يمكن إنبات البذور بطريقة معقمة لتوفير أجزاء نباتية منفصلة من الجذر، والسويقة الحنينية السفلية، والفلقة والبرعم.

من المثير للاهتمام، أورد (Abreu-Tarazi *et al.*, 2010) أن نباتات الأناناس البالغة من العمر خمس سنوات المكاثرة خارج الجسم الحي لا تظهر عليها أي علامات للتلوث علماً بأن بها كائنات دقيقة داخلية مثل (Actinobacteria, *Alphaproteobacteria* و *Petaproteobacteria*) في الجذور وأنسجة الأوراق. تم الكشف عن هذه الكائنات الحية باستخدام التقنيات الجزيئية لتغيير طبيعة هلام التدرج الكهربائي (molecular techniques of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)) وتفاعل البلمرة المتسلسل (polymerase chain reaction (PCR)). وبالمثل، أورد (Ulrich *et al.*, 2008) أن زراعات خلايا الحور والأراك والتنوب خارج الجسم الحي لمدة خمس سنوات على الأقل احتوت على كثافة عالية من البكتيريا الداخلية في الغالب في جنس (*Paenibacillus*)، وبعضها كان يحتوي على (*Methylobacterium, Stenotrophomonas,* و *Bacillus*).

بشكل عام، لم يثبت نجاح استخدام المضادات الحيوية أو مبيدات الفطريات في الوسط الغذائي. تحتاج المضادات الحيوية أيضاً إلى أن يتم تعقيمها بالترشيح وإضافتها إلى الوسائط المبرد لأنها تتأثر بالحرارة. يمكن أن تثبط المضادات الحيوية نمو بعض الكائنات الحية الدقيقة، ولكن عند إزالة المضاد الحيوي أو مبيد الفطريات، ستعاود الكائنات الحية الدقيقة الظهور مرة أخرى. يمكن أن تسبب هذه العوامل في قمع الأنسجة النباتية أو حتى قتلها. إن استخدام المضادات الحيوية كواسمات انتقائية في تحول النبات يعتمد على حقيقة أن المضاد الحيوي قاتل للأنسجة غير المحولة وأن الأنسجة المعدلة وراثياً التي تحتوي على جين مقاومة المضادات الحيوية هي فقط التي ستبقى وتنمو. في بعض الأحيان، إذا كانت هوية الكائن الدقيق معروفة مثل ما في تجارب التحول باستخدام البكتيريا الأجرعية الورمية، يمكن استخدام مضادات حيوية مثل (clavamox, augmentin, carbenicillin) ومضادات حيوية أخرى للقضاء أو السيطرة على فرط نمو البكتيريا الأجرعية على الجزء النباتي المنفصل بشكل فعال. أجرى (Thurston *et al.*, 1979) دراسة مستفيضة حول السمية النباتية لمبيدات الفطريات ومبيدات البكتيريا في زراعة الأوركيد، ووجدوا بعض التركيبات فعالة في السيطرة على التلوث. كما قام (Pollock *et al.*, 1983) بفحص وتقييم سمية أكثر من 20 مضاداً حيوياً على محتوى التبغ الخلوي.

المعالجة المسبقة للجزء النباتي المنفصل للتحكم في الملوثات الميكروبية

- يمكن أن تكون المعالجات الحرارية فعالة لبعض الفيروسات وكذلك الفطريات والبكتيريا.
- يمكن أحياناً تخليص البصيلات من التلوث الفطري الجهازي (*Fusarium sp*) عن طريق معالجة الأبصال حرارياً في حمام مائي ساخن لمدة ساعة واحدة في درجة حرارة 54°م (Hol and van der Linde, 1992).
- يمكن وضع النباتات المزروعة في الأصص في غرفة النمو تحت درجة حرارة 35-40°م لفترات زمنية محددة من أجل تخليص بعض النباتات مثل البطاطس من الفيروسات.

- قد تساعد معالجة المواد النباتية بمبيدات الفطريات (benlate أو benomyl بتركيز 5%) من قبل الزراعة في تقليل التلوث الفطري.

طاقم العمل (الأفراد) Personnel

لتقليل التلوث من الأفراد الذين يقومون بعمليات النقل المعقمة، من المهم إتباع الموجهات التالية:

1- غسل اليدين والأظافر والذراعين بالماء الدافئ والصابون بفرشاة أظافر.

2-إذا كان الفرد لا يرتدي قفازات معقمة، يجب أن يرش اليدين والذراعين بكحول 70%، مع الحرص الشديد على عدم الاقتراب من اللهب حتى تجف اليدين والذراعين في الهواء.

3- من الأفضل ارتداء أغطية الشعر والأقنعة ومعطف المختبر النظيف

4- يجب ألا يعمل الموظفون في البيوت المحمية أو الحقل قبل العمل في صندوق تدفق الهواء الصفحي، حيث يمكن حمل العث والملوثات الأخرى على الملابس والشعر.

5- يجب العمل في داخل صندوق النقل المعقم، وليس على الحافة الخارجية

6- يجب تقليل الحديث عند العمل في صندق النقل.

7- حاول أيضاً ألا تميل على حاوية الزراعة المفتوحة أو طبق بتري حيث يتم تشريح النبات.

صندوق تدفق الهواء الصفحي Laminar Air Flow Hood

صندوق تدفق الهواء الصفحي مفيد للغاية لأعمال النقل المعقمة. يعمل الجهاز على خلق تدفق هواء إيجابي تجاه العامل ويخلق تدفقاً للهواء النظيف فوق منطقة العمل. تعتبر مرشحات الهواء الجسيمات عالية الكفاءة (High efficiency particulate air (HEPA)) مطلقة أو خالية بنسبة 99.97% من جسيمات 0.3 ميكرومتر. توجد فلاتر مسبقة لتصفية الجسيمات الكبيرة إما في قاعدة أو أعلى الكابينة. يجب تنظيف المرشحات المسبقة وفقاً لجدول زمني منتظم اعتماداً على كمية الغبار في المختبر للحفاظ على عمر المرشحات باهظة الثمن. يتم تنظيف المختبر بممسحة المبللة وتجنب استخدام السجاد على أرضيات المختبر أو استخدام المكانس الكهربائية في النظافة.

الحشرات Insects

واحدة من أكبر المشاكل في معمل زراعة الأنسجة هي الإصابة بالحشرات، وخاصة العث (mites). هناك العديد من العث أنواع المختلفة (*Dermataphagoides pteronyssimus, Dermatafagoides farinae, and Tyrophagus putrescentiae*)، أو عث الغبار، والتي يمكن أن تكون مشكلة كبيرة. يمكن أن يعيش العث في مجاري الهواء والمرشحات ويوجد على الملابس والشعر. يتحرك العث في التيارات الهوائية. بشكل عام، يكون العث أكثر نشاطًا في وقت مبكر من المساء وينجذب إلى الرطوبة والمواد العضوية. يتغذى على الفطريات وليس المواد النباتية أو نسيج الكدب. دورة حياة العث حوالي أسبوعين. تتلوث الزراعات بسبب انتقال العث داخل وخارج أوعية الزراعة دون أن يتم ملاحظته حتى بعد بضعة أيام يرى المرء آثاره، من خلال مسار التلوث الفطري الذي ينتشر عن طريق أرجل العث. تدخل الحشرات إلى المختبر عن طريق الأفراد (على الشعر، والملابس، والأحذية، وما إلى ذلك)، أو المواد النباتية المعبأة، أو المواد النباتية الكبيرة، أو المختبرات المجاورة التي تعمل على الحشرات، أو تخزين كميات كبيرة من البذور أو المواد النباتية الجافة. يمكن أن تتلوث أنظمة مجاري الهواء، خاصةً بالفطريات.

السيطرة على تلوث الحشرات

تعتبر عملية إغلاق ولف حاويات الزراعة بالبارافيلم وسيلة مملة للغاية ولكنها فعالة لمنع الحشرات من الدخول في أوعية الزراعة. في بعض الأحيان، يتم وضع زراعات أطباق البتري في صناديق بلاستيكية أو أكياس تغلق بالزمام المنزلق (ziplock). يجب إغلاق حاويات الزراعة إذا كانت مشكلة الحشرات جارية للسيطرة عليها. يجب تعقيم الزراعات الملوثة على الفور. يستخدم البارافيلم عادة لتغليف أوعية الزراعة. تشير بعض الدراسات إلى استخدام مغلف قلاد (Glad-Wrap)، وهو فيلم بولي إيثيلين ذو نفاذية غاز جيدة للأكسجين وثاني أكسيد الكربون والإيثيلين ونفاذية منخفضة لبخار الماء مقارنةً بمغلف ساران (Saran-Wrap) وهم عبارة بوليمر مشرك البوليفينيليدين (polyvynilidene copolymer)، الذي له نفاذية غاز منخفضة. يمكن أن يؤدي أي نوع من أنواع المغلفات إلى حدوث مشاكل في النسخ المتماثل للبيانات بسبب الاختلافات في عدد طبقات وضيق اللفات. هذه المعلمات ستجعل نسب تبادل الغازات متغيرة. تسمح الحاويات التي يمكن إغلاقها بأغطية غشائية ذات فتحات تهوية بتبادل الغازات المتكرر واستبعاد الحشرات وتتوفر في بعض الشركات مثل (Gibco-BRL)، (Osmote) و(Sigma).

المبيدات الحشرية فعالة في قتل الحشرات وقد تمت مناقشة العديد من الإستراتيجيات وتمخضت عن بعض المقترحات مثل:

- رش رذاذ الذباب مع بيريثروم مثل (Raid) بعد الدوام قبل الإجازة الأسبوعية لمدة 6 أسابيع تقريباً، مع الانتباه بشكل خاص إلى زوايا الغرفة التي عادة ما تتراكم فيها الأتربة حيث يوجد العث. يجب أن يتم تهوية المختبر قبل دخول الأفراد إلى المختبر. بعد ذلك ، يجب رش المختبر مرة واحدة شهرياً للتحكم في عدم إعادة دخول الحشرات.
- رذاذ البنزيل بنزوات (Benzyl–benzoate) فعال أيضاً لمدة 3 أشهر.
- استخدام مبيدات العناكب مثل أكسيد الفينبوتين (fenbutatin oxide) وديفوكول (difocol). يمكن إضافة الديفوكول إلى وسط الزراعة أو استخدامه لتشبع سدادات حاويات الزراعة من القطن. يمكن وضع سدادات القطن المشبعة في وسط الزراعة مع الجزء النباتي المنفصل. بالإضافة إلى ذلك، يمكن وضع الورق المنقوع في هذه المواد الكيميائية على أرفف الزراعة.
- رش بمبيد العناكب مرة واحدة في الأسبوع.
- تعليق شرائط الآفات في غرفة الزراعة؛ أيضاً، استخدم ورق الأرفف المشرب بمبيد حشري.
- طلاء اللوحة الأساسية بمبيد حشري.
- يستخدم السجاد اللاصق عند الأبواب لإزالة الغبار والأوساخ عن الأحذية واصطياد الحشرات المهاجرة.

الأوساط الغذائية Media

يتم تعقيم أوساط زراعة الأنسجة عموماً عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع لمدة 15 دقيقة. هذا مناسب لأوعية الزراعة التي تحتوي على 10–1000 مل من الوسط السائل. سبق أن تم المناقشة حول تأثيرات التعقيم الحراري على المكونات المختلفة في وسط المغذيات في الفصل الثالث الخاص بإعداد الأوساط الغذائية. بعض مكونات الأوساط قابلة للتغير بالحرارة. يجب تعقيم هذه المواد بالترشيح (التعقيم البارد) باستخدام مرشحات غشائية بفتحات 0.22 ميكرون، وإضافتها إلى والوسط الغذائي بعد تعقيمه حرارياً وتبريده لدرجة حرارة مناسبة داخل صندوق النقل المعقم، وخلط الوسط جيداً ثم توزيعه في قوارير الزراعة المعقمة. (هذا الوصف ورد في الفصل الثالث).

أدوات التشريح Instruments

الأدوات الشائع استخدامها في تجهيز الجزء النباتي المنفصل تشمل الملاقط بأطوال مختلفة ومشارط ذات أحجام مختلفة للشفرات. يمكن تغليف الأدوات في عبوات ورق ألومنيوم أو وضعها في صينية أدوات من الفولاذ المقاوم للصدأ وتعقيمها في درجة حرارة 121°م لمدة 15–20 دقيقة أو وضعها في فرن جاف عند درجة حرارة 140–160°م لمدة 4 ساعات.

هناك عدة طرق مستخدمة للحفاظ على الأدوات معقمة أثناء استخدام الأدوات في صندوق النقل المعقم:

- أثناء العمل توضع الأدوات (المشارط والملاقط) في أنبوب اختبار يحتوي على 95٪ كحول مع عدم غمر حوالي ثلث الأداة في الكحول.
- يجب ألا يكون أنبوب الاختبار في حامل لأنه إذا انكسر الجزء السفلي من أنبوب الاختبار، فسوف ينتشر الكحول بسرعة ويشتعل ويتسبب في نشوب حريق.
- يمكن أن يساعد وضع الشاش القطني تحت حاوية الكحول أيضاً على منع انكسار الحاوية.
- يجب وضع أنبوب الاختبار في دورق أو كأس متين.
- يساعد وجود ماء في قاع الحاوية الذي يحتوي على أنبوب الاختبار على منع الحاوية من الانقلاب.
- يتم إشعال الأدوات لإزالة الكحول وتركها لتبرد قبل الاستخدام. في حالة اشتعال الأدوات، يجب ألا ترفع فوق مستوى الأصابع التي تمسك بها، فإن الكحول المحترق سوف ينساب على الأصابع، مما يسبب الحرق.
- يمكن أن يكون تطهير الأدوات من الكحول أمراً خطيراً، ويجب على المرء أن يكون حذراً للغاية لوضع أنبوب الاختبار الذي يحتوي على الكحول على جانب من صندوق النقل المعقم واللهب على الجانب الآخر.
- يجب ألا يوضع موقد الكحول أو بنسن بجوار الحاوية التي تحتوي على الكحول.

- يجب ألا تترك طالباً مبتدئاً بمفرده في أثناء العمل في صندق النقل المعقم؛ يجب الإشراف على الطالب بشكل صحيح في جميع الأوقات. تأكد دائماً من انتهاء احتراق الأدوات وتبريدها قبل إعادتها إلى الكحول.
- ذكر (Streiber et al., 1996) أن باكتيريا (Bacillus macerans)، يمكن أن يكون قابلة للحياة على الملقط بعد تخزينه في 95% من الإيثانول لعدة أسابيع. حتى أن البكتيريا ظلت حية بعد الاشتعال. يتم القضاء على البكتيريا فقط عن طريق التعقيم على 121°م لمدة 20 دقيقة أو عن طريق التسخين لمدة 6-8 ثوان في موقد بنسن. بالإضافة إلى ذلك، قد تنجو بعض أنواع البكتيريا مثل (Clavibacter) من احتراق الكحول. لهذه الأسباب، من الأفضل غسل الأدوات لإزالة بقايا المواد النباتية من السطح والتعقيم الدوري.
- تم اقتراح تعديل الرقم الهيدروجيني لهيبوكلوريت الصوديوم بالطريقة التالية:

– تحضير محلول 10% من فوسفات هيدروجين ثنائي البوتاسيوم (K_2HO_4) يضاف إليه 2 مل من محلول التبييض (حوالي 5% هيبوكلوريت الصوديوم، 5% من الكلور المتاح) إلى 96 مل من الماء المقطر، أضافة 2 مل من محلول (K_2HO_4) بتركيز 10% وينتج ذلك 100 مل من هيبوكلوريت مخفف إلى الرقم الهيدروجيني 7 في محلول فوسفات الصوديوم. والمادة سامة لأسطح النباتات المقطوعة والمواد النباتية الرقيقة؛ إلا إنها فعالة في قتل (*Bacillus*) عند 1000 جزء في المليون لمدة 30 ثانية على الأدوات. توضع الأدوات في هذا المحلول، وتغمس في الإيثانول، ثمُ شعل لتجف

- يعتبر معقم الخرزات (Bead sterilizer) اختيار ممتاز وفي غاية السلامة لتعقيم الأدوات حيث توضع فيه الأدوات لحوالي 10 ثواني في درجة حرارة 240°م. تنظف الخرزات 2-3 مرات في العام حسب تكرار الاستخدام. بعض العاملين أشاروا إلى أن الشفرات تصبح غير حادة أسرع من تعقيم الكحول.
- معقم الخرزات ذو كفاءة عالية لكنه يتسبب في تقصير العمر الافتراضي للأدوات بسبب الحرارة العالية التي تؤدي إلى اعوجاج الأدوات. يجب الحذر في رفع الأدوات من المعقم لأنها تكون ساخنة جداً وتسبب الحروق.

نظام تهوية الغرف Room Air Handling System

يمكن أن تصبح أنظمة تكييف الهواء مصدراً للتلوث الميكروبي والحشرات. يجب تنظيف مجاري مناولة الهواء وصيانتها بشكل صحيح ويجب استبدال المرشحات المسبقة التي تنفث الهواء إلى غرفة الزراعة بشكل متكرر.

المراجع

Abreu-Tarazi, M. F., Navarrete, A. A., Andreote, F. D., Almeida, C. V., Tsai, S. M., and Almeida, M. (2010). Endophytic bacteria in long-term *in vitro* cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR-DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 555–560.

Armstrong, D. (1973). Contamination of tissue culture by bacteria and fungi. In J. Fogh (Ed.), *Contamination in tissue culture* (pp. 51–64). New York: Academic Press.

Bugbee, W. M., Gudmestad, N. C., Secor, G. A., and Nolte, P. (1987). Sugar beet as a symptomless host for Corynebacterium sepedonicum. *Phytopathology*, 77, 765–770.

Bunn, E., and Tan, B. H. (2002). Microbial contaminants in plant tissue culture propagating. In K. Sivasithamparam, and K. W. Dixon (Eds.), *Microorganisms in plant conservation and biodiversity* (pp. 307–335). Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers.

DeBoer, S. H., and Copeman, R. J. (1974). Endophytic bacterial flora in *Solanum tuberosum* and its significance in bacterial ring rot diagnosis. *Canadian Journal of Plant Science*, 54, 115–122.

DeProst, G., Van Vaerenbergh, J., and Welvaert, W. (1980). Infections bacteriennes dans des cultures *in vitro*. Med. Fac. *Landbouw Rijksuniv Gent*., 45(2), 399–410.

Donnarumma, F., Capuana, M., Vettori, C., Petrini, G., Giannini, R., Indorato, C., and Mastromei, G. (2011). Isolation and characterization of bacterial colonies from seeds and *in vitro* cultures of Fraxinus spp. From Italian sites. *Plant Biology*, 13(1), 169–176.

Gagne, S. R., Rousseau, and., and Anton, H. (1987). Xylem-residing bacteria in alfalfa roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 33, 99–100.

Hol, G. M., and Van der Linde, P. C. G. (1992). Reduction of contamination in bulb-explant cultures of Narcissus by a hot-water treatment of parent bulbs. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 31, 75–79.

Hollis, J. P. (1951). Bacteria in healthy potato tissue. *Phytopathology*, 41, 350–366.

Knauss, J. F., and Miller, J. W. (1978). A contaminant, *Erwinia cartovora*, affecting commercial plant tissue cultures. *In vitro*, 14(9), 754–756.

Lukezic, F. L. (1979). *Pseudomonas corrugata*, a pathogen of tomato, isolated from symptomless alfalfa root. P*hytopathology*, 69, 27–31.

Meneley, J. C., and Stanghellini, M. E. (1974). Detection of enteric bacteria within locular tissue of healthy cucumbers. *Journal of Food Science*, 39, 1267–1268.

Meneley, J. C., and Stanghellini, M. E. (1975). Establishment of inactive population of *Erwinia cartovora* in healthy cucumber fruit. *Phytopathology*, 65, 670–673.

Misaghi, I. J., and Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free-cotton plants. *Phytopathology*, 80, 808–811.

Miyazaki, J., Tan, B. H., and Errington, S. G. (2010). Eradication of endophytic bacteria via treatment for axillary buds of *Petunia hybrida* using plant preservative mixture (PPM™). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102, 365–372.

Miyazaki, J., Tan, B. H., Errington, S. G., and Kuo, J. J. S. (2011). *Macropidia fuliginosa*: its localization and eradication from *in vitro* cultured basal stem cells. *Australian J. Bot*., 59(4), 363–368.

Niedz, R. P. (1998). Using isothiazole biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue cultures. *HortTechnology*, 8, 598–601.

Petit, R. E., Taber, R. A., and Foster, B. G. (1968). Occurrence of Bacillus subtilis in peanut kernels. *Phytopathology*, 58, 254–255.

Philipson, M. N., and Blair, I. D. (1957). Bacteria in clover root tissue. *Canadian Journal of Microbiology*, 3, 125–129.

Pollock, K., Barfield, D. G., and Shields, R. (1983). The toxicity of antibiotics to plant cell cultures. *Plant Cell Reports*, 2, 36–39.

Samish, Z., Etinger-Tutczynska, R., and Bick, M. (1963). The microflora within the tissue of fruits and vegetables. *Journal of Food Science*, 28, 259–266.

Sanford, G. B. (1948). The occurrence of bacteria in normal potato plants and legumes. *Science and Agriculture*, 28, 21–24.

Schreiber, L. R., Domir, S. C., and Gingas, V. M. (1996). Identification and control of bacterial contamination in callus cultures of *Ulmus americana*. *Journal of Environmental Horticulture*, 14(2), 50–52.

Sturdy, M. L., and Cole, A. L. J. (1974). Studies on endogenous bacteria in potato tubers infected by *Phytophthora erythroseptica* hybr. *Annals of Botany*, 8, 121–127.

Taber, R. A., Thielen, M. A., Falkinhan, J. O., III, and Smith, R. H. (1991). *Mycobacterium scrofulaceum*: A bacterial contaminant in plant tissue culture. *Plant Science*, 78, 231–236.

Tervet, J. W., and Hollis, J. P. (1948). Bacteria in the storage organs of healthy plants. *Phytopathology*, 38, 960–962.

Thompson, I. M., Laing, M. D., and Beck-Pay, S. L. (2009). Screening of topical sterilants for shoot apex culture *of Acacia mearnsii*.. *Southern Forests*, 71(1), 37–40.

Thurston, K. C., Spencer, S. J., and Arditti, J. (1979). Phytotoxicity of fungicides and bactericides in orchid culture media. *American Journal of Botany*, 66(7), 825–835.

Ulrich, K., Stauber, T., and Ewald, D. (2008). *Paenibacillus*: a predominant endophytic bacterium colonizing tissue cultures of woody plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 93(3), 347–351

الفصل السادس

تحفيز نسيج الكدب Callus Induction

إنشاء نسيج الكدب Callus Initiation

يجب تحفيز تشكيل نسيج الكدب من الجزء النباتي المنفصل الأساسي كخطوة أولى في العديد من تجارب زراعة الأنسجة،. قد يكون هذا الجزء النباتي المنفصل بادرات تم إنباتها تحت التعقيم أو جذور أو سيقان أو أوراق أو هياكل تناسلية معقمة تعقيماً سطحياً. نسيج الكدب (callus) هو نسيج الجروح ينتج إستجابة للإصابة، وهو عبارة عن تكاثر خلايا من المنطقة المصابة أو المقطوعة من الجزء النباتي المنفصل. يتكون نسيج الكدب، بشكل عام، من خلايا متفتتة وكبيرة ومجوفة ومتمايزة للغاية ولكنها غير منتظمة.

يمكن أن يكون نسيج الكدب صلباً ومضغوطاً، ويمكن أن يحتوي على مجموعات من عناقيد الخلايا الإنشائية الصغيرة. وهو، بشكل عام، خلايا إنشائية غير متمايزة لها القدرة على التجدد عن طريق الجنين الجسدي أو إنشاء العضو (غالباً تطور الجذور أو البراعم). لا تساهم جميع الخلايا في الجزء النباتي المنفصل في تكوين نسيج الكدب، والأهم من ذلك، أن أنواعاً معينة من خلايا نسيج الكدب مؤهلة لتجديد الهياكل المنظمة. لا يبدو أن أنواع أخرى من خلايا نسيج الكدب مؤهلة للتعبير عن القدرة الذاتية.

فحص (Wang *et al.*, 2011) نسيجياً تحريض نسيج الكدب من أجزاء نباتية منفصلة من نبات البرسيم، ووجدوا أن نسيج الكدب ينشأ من سطح الورقة المقطوع وعروق نصل الورقة. ومن المثير للإهتمام أن خلايا نسيج الكدب من الكامبيوم الإبتدائي (العروق) نادراً ما تشكل أجنة جسدية؛ في العديد من الأنواع النباتية، تنشأ الخلايا الكاملة القدرة من خلايا الكامبيوم الإبتدائية. خلايا أوراق البرسيم العمادية الوسطي (mesophyll) تتمايز إرتدادياً (dedifferentiated) لتشكيل أجنة جسدية. عادة ما يكون الاختيار البصري المجهري المبكر ضرورياً لتحديد نوع الخلية القابلة للتجديد. أورد (Naor *et al.*, 2011) نظرة ثاقبة للحصول على نسيج الكدب من عقد ساقية كجزء نباتي منفصل من نبات العنب المزروع في الحقل مقلوباً (يوضع في الوسط مع الجزء العلوي من النبات في الوسط والنهاية القاعدية في الأعلى) دون إضافة منظمات نمو نباتية. حيث يبدأ الجزء النباتي المستأصل تكاثر نسيج الكدب على الأرجح نتيجة لحركة الأوكسين القاعدية في الجزء النباتي المنفصل من الجذع.

يعد مستوى منظمات نمو النبات (أوكسين، سيتوكينين، جبريلين، إيثيلين، إلخ) عاملاً رئيسياً يتحكم في تكوين نسيج الكدب في وسط الزراعة. يمكن أن تختلف تركيزات منظمات نمو النبات لكل نوع نباتي كما يمكن أن تعتمد حتى على مصدر الجزء النباتي المنفصل أو نمط النبات الوراثي، والعمر، والحالة الغذائية، وما إلى ذلك. ظروف الزراعة (درجة الحرارة والضوء وطبيعة الوسط سائل أم صلب) هي أيضاً مهمة في تكوين وتطوير نسيج الكدب.

وبفحص ما تم إجراؤه من بحوث في العقد الأول من القرن العشرين يؤكد بأنه لا توجد طريقة جامعة (universal) للحصول بنجاح على مزارع نسيج الكدب من جميع أنواع النباتات. هناك الآلاف من المقالات العلمية التي تصف الأبحاث التي تستخدم أجزاء نباتية منفصلة متنوعة، وأوساط زراعة، ومستويات وتوليفات منظم نمو النبات، بالإضافة إلى إضافات أخرى لوسط الزراعة، وظروف الزراعة المتنوعة لحث تكوين نسيج الكدب وتجديده من أنواع نباتية معينة (Garcia *et al.*, 2011; Dhar and Joshi, 2005; Gao *et al.*, 2010; Irvani *et al.*, 2010).

توفر التدريبات الواردة في هذا الفصل خبرة في استخدام تقنيات متنوعة من الأجزاء النباتية المنفصلة، ومعرفة أنواع وظروف الزراعة المختلفة لمراقبة ودراسة استحثاث نسيج الكدب واكتساب الخبرة.

بمجرد إنشاء نسيج الكدب، يمكن استخدامه في مجموعة متنوعة من التجارب. سيتم استخدام زراعات نسيج الكدب في هذا الفصل لدراسة عزل المحتوى الخلوي، ونوع الخلية، والانتقاء الخلوي، وتكوين الجنين الجسدي، وتكوين الأعضاء، وإنتاج المنتجات الثانوية. بالإضافة إلى ذلك، يعد نسيج الكدب القابل للتجديد مفيداً كهدف للتحول الوراثي.

الغرض:

اكتساب الخبرة في تقنية التعقيم وتحفيز نسيج الكدب من أجزاء نباتية منفصلة متنوعة (بادرات، ثمار، نورات، جذر).

تحضير وسط إنشاء نسيج الكدب:

(لعمل واحد لتر مكافئ)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 1.0 مل من مركز الكينتين (10 ميليجرام/100 مل)

ح) 3.0 مل من مركز (2,4-D) (1.0 ميليجرام/100 مل)

خ) 1.0 مل من مركز الفيتامين

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل

4- ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

5- أضف 8 جرام/لتر آجار. وتغطية قارورة إرلنماير بورق ألمونيوم.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل من بادرات الجزر

1- وضع البادرات التي تم إنباتها بطريقة معقمة في طبق بتري معقم

2- قطع البادرات، وزراعة أنسجة الأوراق والجذع والجذور. لا يزال من الممكن استخدام البذور التي لم تنتج بادرات صغيرة إذا كان الجذر بارزاً إزالة غطاء البذرة وتقطيع البذرة لعدد من الأجزاء.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل من ثمار الليمون

1- الثمار الخضراء غير الناضجة أفضل من الثمار الناضجة. غسل الثمرة بالماء الدافئ والصابون. قطع أنسجة الساق والكأس التي قد تكون متصلة بالثمرة وإزالة الأنسجة الميتة في القشرة.

2- قطع الثمرة إلى أجزاء حوالي 1.0 سم.

3- التعقيم السطحي بوسطة مبيض الكلور (15% + قطرتان من توين-20 لكل 100 مل) لمدة 15 دقيقة. أشطف 3 مرات بالماء المقطر المعقم. الأقسام الوسطى من الثمرة قد تعطي أفضل أجزاء نباتية منفصلة.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل من أزهار القرنبيط

1- غسل الأزهار بالماء الدافئ والصابون.

2- التعقيم السطحي بواسطة مبيض الكلور (15% + قطرتان من توين-20 لكل 100 مل) لمدة 15 دقيقة. أشطف 3 مرات بالماء المقطر المعقم.

3- قطع الأنسجة التي أحرقها كلور التبييض.

4- أزرع أقسام الزهيرة، والزهور الفردية، والنسيج السويقي.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل من أنسجة الجزر

1- استخدم الجزر الطازج الذي لا تزال القمم الخضراء متصلة به.

2- ادعك الجذور بالماء الدافئ والصابون باستخدام فرشاة. واقطع البقع السيئة من الجذر.

3- قطع الجذر إلى أقسام 1.0 سم والتعقيم السطحي في 15% من كلور التبييض لمدة 15 دقيقة. أشطف ثلاث مرات في ماء معقم. إزالة الأنسجة المحروقة بواسطة الكلور.

الزراعة

ضع جميع الزراعات في مكان مظلم (درج أو خزانة) عند حوالي 27-30°م؛ سجل درجة الحرارة.

ملاحظات

1- يتم تسجيل الملاحظات مرة واحدة في الأسبوع على مدى 6 أسابيع.

2- يجب أن تتضمن الملاحظات ظروف الزراعة وتشكيل نسيج الكدب والتلوث.

3- من المهم جداً مراقبة الزراعات تحت مجهر التشريح مرة أسبوعياً لتسجيل الملاحظات وعمل الرسومات.

4- ينشأ نسيج الكدب من مناطق مختلفة من الجزء النباتي المنفصل، مثل نسيج الكامبيوم من جذر الجذر، بالإضافة إلى ذلك ، يمكن أن تتشكل أعداد كبيرة من الأجنة الجسدية بشكل مباشر من أجزاء بذور الجزر المنفصلة المجروحة.

5- العديد من هذه الأنشطة غير مرئية للعين المجردة، وخاصة الانقسامات الخلوية المبكرة وتضخم الجزء النباتي المنفصل.

6- في نهاية الأسابيع الستة، يمكن التضحية ببعض الزراعات ومراقبة الخلية وأنواع نسيج الكدب من خلال عمل حوامل رطبة على الشرائح والمراقبة تحت المجهر الضوئي.

7- يجب تضمين المناقشة كجزء من إدخال دفتر الملاحظات. يجب أن تتضمن المناقشة ما يلي:

أ) تعليق على تكوين نسيج الكدب استجابة لمصدر الجزء النباتي المنفصل.

ب) لماذا تشكل نسيج الكدب أو لماذا لم يتشكل؟.

ت) مقارنات استجابة مصادر الأنسجة المختلفة مثل نسيج الكدب المشتق من البذور مقابل الأنسجة الناضجة.

ث) تضمين الرسوم التوضيحية لنسيج الكدب ونوع الخلية في قسم الملاحظات.

يمكن استخدام مزارع نسيج كدب الجزر في إنشاء الزراعات المعلقة من تكوين الأجنة الجسدية ومنحنيات النمو ودراسات اختيار الخلايا المقاومة للملوحة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استخدام نسيج كدب الجزر لعزل الخطوط النقية لمختلف خطوط الخلايا المصطبغة.

يمكن أن يكون نسيج الكدب الناتج من القرنبيط والليمون نقطة انطلاق مشاريع الطلاب المتميزين.

البيانات والأسئلة

1- مراقبة وتسجيل التقدم الأسبوعي للأجزاء النباتية المنفصلة.

أ) تحديد ظهور تكوين نسيج الكدب على الجزء النباتي المنفصل.

ب) هل تستجيب جميع الأجزاء النباتية المنفصلة بطريقة مماثلة؟

ت) هل كل خلايا أنسجة الكدب متطابقة في المظهر؟

2- التعبير عن تركيزات منظم نمو النبات في الوسط بالجزء في المليون.

3- أحسب التركيز المولاري لمركزات محاليل للكينتين و(2,4-D)، وما هو تركيز منظمات النمو في الوسط؟

4- في الوقت الذي يحدده المدرب (4-6 أسابيع) يتم إزالة بعض نسيج الكدب وإعداد حامل مبلل على شريحة ولاحظ الخلايا تحت المجهر. أرسم الخلايا. لاحظ الاختلافات في أحجام وشكل الخلايا.

اتجاه الجزء النباتي المنفصل Explant Orientation

تؤثر المستويات الداخلية لمنظمات نمو النباتية ونقل الهرمون النباتي القطبي داخل الجزء النباتي المنفصل على تحفيز نسيج الكدب. في مرات عديدة، عند إجراء محاولات لنسخ أو إعادة عمل منشور سابقاً، فإن التفاصيل الصغيرة مثل، تجهيز الجزء النباتي المنفصل ووضعه على الوسط لا تذكر في قسم المواد وطرق العمل، مما يؤدى إلى استجابات مختلفة. بالنسبة لبعض النباتات إن هذا ليس مهماً؛ ومع ذلك، فإن في طريقة العمل، على سبيل المثال، تشير إلى وضع أقسام السويقة الجنينية السفلى على وسط الزراعة. سوف يوضح هذا التمرين الاستجابات المتفاوتة من السويقة الجنينية السفلى و/أو الجزء النباتي المنفصل اعتماداً على كيفية التقسيم ووضعه في الوسط. يمكن توقع تباين مماثل في استجابة الأجزاء النباتية الأخرى.

الغرض:

لبيان تأثير توجيه الجزء النباتي المنفصل على تحفيز نسيج الكدب في بادرات نباتات القطن وزهرة الشمس.

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو–إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز (NAA) (10 ميليجمرام/100 مل)

ح) 10 مل من مركز (2iP) (10 ميليجرام/100 مل)

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل

4- ضبط الأس الهيدروجيني 5.7±0.2

5- أضف 8 جم أجار TC أو أجار ديفكو–باكتو. غطاء بورق الألمنيوم.

6- التعقيم بالسحان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة عند 121 درجة مئوية وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100 × 20 مم).

8- تنبيه

(يستخدم وسط إنشاء نسيج الكدب الموصوف سابقاً في بداية هذا الفصل لزهرة الشمس).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- أقطع أقسام من السويقة الجنينية و/أو من بذور زهرة اشمس التي تم إنباتها تحت التعقيم (طريقة القطع مبينة في شكل 6.1).

2- زراعة الأجزاء النباتية المنفصلة ووضعها في الحاضنات.

3- تصميم التجارب لطرح الأسئلة التالية:

أ) هل يوجد اختلاف في وقت تحفيز نسيج الكدب وكمية النسيج من السويق الجنينية بالقرب من الورقة مقارنة مع قرب الجذر؟

ب) هل يوجد أي اختلاف في وقت وكمية نسيج الكدب بوضع الجزء النباتي المنفصل مقلوباً على الوسط؟

ت) هل يوجد أي اختلاف في تحفيز نسيج الكدب بوضع الجزء النباتي المنفصل الجزء الأيمن لأعلى أو مقلوباً على الوسط؟

ث) هل الأجزاء النباتية المنفصلة للفلقات تنتج نسيج كدب أكثر من السويقة الجنينية؟

ج) هل نسيج الكدب متطابق في المظهر؟

4- تمكن إعداد تجارب لاختبار معاملات أخرى، مثل، الزراعة المظلمة (الظلام التام مقابل الضوء)؛ درجات الحرارة؛ استخدام كامل أملاح موراشيجي وسكوج مقابل النصف؛ الخ). وفيما يتعلق بالجزء النباتي، يمكن إجراء تجارب في وضع الجزء النباتي المنفصل لاختبار استجابة نسيج الكدب.

الملاحظات

- يجب أن تتضمن الملاحظات (كل أسبوع لمدة 4 أسابيع) رسومات للأجزاء النباتية المنفصلة تشير إلى المساحات والكميات النسبية لإنتاج نسيج الكدب.
- مراقبة الزراعات تحت مجهر التشريح.
- يمكن أن تكون هذه الزراعات نقطة البداية لعزل خطوط الخلايا المصطبغة النقية بعد 6-8 أسابيع في الزراعة.

إنشاء زراعة خلايا الحبوب المقتدرة (ذات الكفاءة) Establishment of competent cereal cell cultures

تاريخياً، كان من الصعب إنشاء زراعات خلوية المقتدرة من النباتات أحادية الفلقة. في أواخر سبعينيات وثمانينيات القرن الماضي، أورد العديد من الباحثين تأثير النمط الجيني القوي على قدرة التجدد في الزراعة. وأثبت بعضهم أن التجدد من زراعة الذرة يتم التحكم فيه وراثياً بواسطة الجينات النووية (Hodges *et al*., 1986; Tomes and Smith, 1985). وقدم (Peng and Hodges, 1989) دليلاً على أن تجديد الأرز كان تحت سيطرة كل من الجينات النووية والسيتوبلازمية. تختلف القدرة على تكوين نسيج كدب قابل للتجدد في الذرة الرفيعة بين الأنماط الجينية، وكانت الصفة الوراثية بمثابة السمة السائدة (Ma *et al*., 1987)، والتي تعني ضمناً أن بعض الأصناف تفتقر إلى الجينات الخاصة بالتجديد في الزراعة. المشكلة مع مفهوم أن بعض الأصناف تفتقر إلى جينات التجديد هو أن الصنف الذي تم إنشاؤه غير قابل للتجديد في مختبر واحد، وتم الإبلاغ عنه لاحقاً أنه قابل للتجديد في مختبرات، مما يستبعد فكرة أن بعض الأصناف تفتقر إلى المعلومات الجينية اللازمة لتشكل زراعات قابلة للتجدد (Bhaskaran and Smith, 1990).

يبدو من المعقول أكثر أن الجينات النووية تشارك في السيطرة على استجابة الصنف لنوع منظم نمو نباتي وتركيزه في وسط الزراعة (Close and Gallagher-Ludeman, 1989). ومن ثم فإن الاختلافات بين الأصناف، من المحتمل أن تكون مرتبطة بالتغيرات في مستويات الهرمونات الداخلية (الذاتية)، وهي تنشأ وراثياً. الأجزاء النباتية المنفصلة (أي الأوراق، والجذور، والمتوك، والسيقان، وما إلى ذلك) من صنف واحد، أو حتى

بادرة نباتية، لا تستجيب بشكل مماثل في الزراعة على نفس الوسط. مرة أخرى، هذا على الأرجح بسبب التدرجات المتفاوتة في الهرمونات الداخلية (Wernicke and Brettell, 1982) وأنواع الخلايا (الخلايا الإنشائية مقابل الخلايا الأكثر تمايزاً) داخل النبات.

يجب إنشاء نسيج كدب الحبوب من أجزاء نباتية تحتوي على خلايا إنشائية. وتشمل هذه الأجزاء النباتية المنفصلة أجنة غير ناضجة يتم جمعها من النباتات المزهرة والبذور الناضجة أو أجزاء البادرات، بما في ذلك الأجزاء الإنشائية والقاعدية من الأوراق الصغيرة. العامل الثاني المهم هو الإختيار المرئي المبكر لنوع نسيج الكدب العقدي ذو اللون الأبيض البني إلى الأصفر (Bhaskaran and Smith, 1988; Heyser and Nabors, 1982). عادة ما يكون نسيج الكدب غير الجنيني متفكك، ومتبلور، أصفر إلى بني اللون (Abe and Futsuhara, 1985; Nabors *et al*., 1983)، وينمو بشكل بحيث يغطي نسيج الكدب الجنيني.

الغرض:

التعرف البصري واختيار نوع نسيج الكدب الجنيني من الأرز على وسط تحفيز نسيج الكدب (Peterson and Smith, 1991).

تحضير وسط تحفيز نسيج الكدب:

(لعمل واحد لتر مكافئ)

صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

1- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز الفيتامين (أنظر الفصل الثالث).

ح) 35 مل من مركز (2,4-D) (10 ميليجرام/100 مل)

2- ضبط الحجم إلى 1000 مل

3- ضبط الأس الهيدروجيني 5.7±0.2

4- أضف 4 جم آجار من نوع سيجما 1 أجاروز وتغطية القارورة بورق الألمنيوم.

5- التعقيم بالسحان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة عند 121 درجة مئوية وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100 × 20 مل).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

استخدام البذور الناضجة من الأرز، ويفصل صنف (Texas cultivar “Lemont.”) (يمكن فحص أصناف الأخرى لمقارنة اختلاف الاستجابة)

1- إزالة قشرة البذور والتعقيم السطحي في 70% إيثانول لمدة دقيقة متبوعاً بكلور التبييض 30%، ثم الشطف بالماء المقطر المعقم 5 مرات.

2- زراعة البذور في وسط تحفيز نسيج الكدب

3- حضانة الزراعات في الظلام في درجة حرارة 27-30°م.

4- بعد 2-3 أسابيع أفصل نسيج الكدب الجنيني (وهو ناعم، أبيض، متعرج) من نسيج الكدب غير الجنيني (الأصفر إلى الشفاف، الرطب، البلوري المظهر) باستخدام مجهر تشريح في صندوق تدفق الهواء الصفحي.

5- استخدم هذه المادة في تجارب تجديد الأرز.

البيانات والأسئلة

1. هل تم إنبات جميع البذور؟ كم كانت النسبة؟ هل كان التلوث مشكلة؟

2. استخدم واحدة من الزراعات لإعداد شريحة مبللة من الخلايا، وتسجيل الملاحظات.

3. هل أنشأت كل الزراعات نسيج كدب؟

4. إذا قمت بفحص عدد من أصناف الأرز، فهل هناك اختلافات بينها؟

اختبار الملح خارج الجسم الحي Salt Selection *In vitro*

يمكن أن تكون نظم زراعة الخلايا النباتية تجريبية مفيدة للغاية في الزراعة لعزل ودراسة استجابة المستوى الخلوي للضغوط البيئية المختلفة. ومع ذلك، يجب توخي الحذر في تحليل هذا النظام لأن استجابة كامل النبات للضغوط

البيئية هي مزيج لعديد من العوامل وأنشطة المستوى الخلوي قد لا تكون نظاماً دقيقاً يمكن التعميم منه لاستجابة نظام النبات بالكامل.

في كل الأحوال، يمكن أن تكون الدراسات على المستوى الخلوي مفيدة لدراسة آثار الأيونات (Na^{+1}, Al^{+3}, etc.) ومبيدات الأعشاب ومبيدات الآفات والسموم الناتجة عن مسببات الأمراض. استعرض (Rai *et al.*, 2011) الأدبيات حول الانتقاء الخلوي لتحمل الأملاح باستخدام كلوريد الصوديوم، ومقاومة الأمراض باستخدام السموم الفطرية، والضغوط اللاإحيائية مثل الجفاف، ودرجة الحرارة المنخفضة، والمعادن، والأشعة فوق البنفسجية. وتم تضمين إيجابيات وسلبيات ونجاحات هذه الإستراتيجيات على نطاق واسع في الاستشهادات الأدبية. يمكن استخدام العديد من الإستراتيجيات في هذه الأنواع من الدراسات. واحدة من هذه الإستراتيجيات هي فحص الخلايا للتسامح مع زيادة مستويات المركب واختيار الخلايا التي تتميز بمستويات عالية من التسامح في مستويات عالية من العامل الانتقائي في الوسط. في بعض الدراسات، يتم الاختيار بطريقة متدرجة، وذلك بزيادة تدريجية للعامل الانتقائي في الوسط عند كل زراعة فرعية. إذا كان من الممكن إعادة توليد النباتات، فربما تكون صفة المستوى الخلوي معززة للتسامح الكلي للإجهاد المحدد.

يمكن فحص خلايا من طرز وراثية مختلفة باختلافات معروفة في المعادن الثقيلة أو تسامح الملوحة لمعرفة إن كانت هذه الاختلافات قد تم الحفاظ عليها في الصنف الخلوي (Yeo and Flowers, 1983; Tal and Shannon, 1983). كثير من هذه الدراسات مركزة على تطوير فهم أفضل للتحكم وتنظيم الاستجابات الفسيولوجية على المستوى الخلوي.

الغرض:

لفحص مزارع نسيج كدب الجزر من أجل التسامح مع كلوريد الصوديوم.

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،
2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو–إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 2.0 ميليجرام قلايسين

ح) 10 مل من مركز الفيتامبن (أنظر الفصل الثالث).

خ) 3.5 مل من مركز (2,4-D) (10 ميليجرام/100 مل)

3- ضبط الحجم إلى 800 مل
4- تقسيم الوسط لأربعة أقسام متساوية (200 مل لكل قسم)
5- أوزن ما يلي من كلوريد الصوديوم

I. 0.0 كلوريد صوديوم
II. 0.2 جرام كلوريد صوديوم في اللتر = 0.05جرام في 250 مل
III. 1.6 جرام كلوريد صوديوم في اللتر = 0.4 جرام في 250 مل
IV. 6.0 جرام كلوريد صوديوم في اللتر = 1.5 جرام في 250 مل

6- أكمل حجم كل وسط لحجم 250 مل ثم ضبط الأس الهيدروجيني 5.7
7- أضف 1.5 جرام أجار لكل دورق. ذوب الآجار.
8- وزع 25 مل لكل أنبوب زراعة (150 × 25 مم). استخدم أغطية ملونة (لون واحد لكل معاملة).

الجزء النباتي المنفصل

تم إنشاء نسيج كدب الجزر في تمرين نسيج الكدب سابقاً. على كل طالب تحضير 5 أنابيب لكل معاملة لمجموع 20 أنبوباً.

1- أوزن 250±2 ميليجرام من نسيج الكدب للأنبوب لكل معاملة بمجموع 20 أنبوب. أوزن قطعة إضافية لاستخدامها في تحديد الوزن الأولي. في حالة عدم توفر ميزان في صندوق تدفق الهواء الصفحي، يتم تقسيم نسيج الكدب بالتساوي قدر الإمكان، يتم أخذ ثلاثة لأوزان البداية العشوائية الرطبة والجافة الأولية، وأزرع البقية.

2- يتم وضع نسيج الكدب على الوسط. كن حذراً أن نفس المقدار من كل قطعة نسيج كدب على اتصال مع الوسط.

3- ضع علامات وأوزن رقائق معدنية لتحديد الوزن الرطب والجاف. ضع نسيج الكدب لقياس الوزن الجاف على شريحة معدنية موزونة مسبقاً في فرن التجفيف لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 60°م.

4- في نهاية 4 أسابيع، تستخدم جميع الزراعات لقياس الوزن الرطب والجاف. قدم البيانات في شكل جدول ورسم بياني للأوزان الرطبة والجافة للأسابيع الأربعة.

البيانات والأسئلة

1- أوصف مظهر نسيج الكدب عند كل تركيز من كلوريد الصوديوم.

2- ما هو مستوى كلوريد الصوديوم الذي أدى إلى بقاء 50%؟

3- هل تعتقد أن الخلايا الحية ستعيش زراعة فرعية في نفس مستوى كلوريد الصوديوم أو مع مستوى أعلى من كلوريد الصوديوم؟

4- هل توجد علاقة بين الأوزان الرطبة والجافة لنسيج الكدب؟

5- إن كانت السمة التي يتم اختيارها ناتجة عن عدة جينات، فهل سيكون هذا مخطط قابل للتطبيق للحصول على نباتات تتحمل الإجهاد؟

منحنيات النمو

يتشابه معدل نمو نسيج الكدب في نواحي عديدة مع المنحنى السيني لمجموعات الكائنات الحية وحيدة الخلية. عادة ما تكون هناك خمس مراحل مثل هو مبين في الشكل 6.2. يختلف سلوك خلايا أنسجة الكدب كل مرحلة من النمو. يمكن أن يؤثر الوسط أيضاً على مدة بقاء نسيج الكدب في مرحلة معينة.

بالنسبة للعديد من الإجراءات التجريبية، من الضروري استخدام نسيج الكدب في نقطة تنموية محددة على طول منحنى النمو. عند فحص الكروموسومات، يجد المرء أكبر عدد من الخلايا في الطور الاستوائي (metaphase) خلال مرحلة النمو الأسي من النمو (exponential stage)، التي يوجد فيها انقسام وتكاثر سريع للخلايا. النمو والتطور أكثر وضوحا خلال المرحلة الخطية (linear stage) من النمو. بمجرد أن تدخل الزراعة المرحلة (4)، يحدث تباطؤ النمو، وينبغي أن تنقل الزراعات إلى وسط طازج جديد. بالإضافة إلى ذلك، عندما يتم فحص تكوين المنتج الثانوي، فمن الأهمية بمكان تحديد مرحلة النمو التي تنتج أكبر كمية من المنتج المطلوب.

يرجع تباطؤ النمو إلى استنفاد العناصر الغذائية، وجفاف الآجار، وإنتاج المنتجات الثانوية السامة، ونضوب الأكسجين في الجزء الداخلي من نسيج الكدب. بشكل عام، تتم الزراعة الفرعية للأنسجة التي تظهر بشكل صحي فقط. ومع ذلك، يتم فحص أنواع الخلايا المختلفة تحت مجهر تشريح في صندوق تدفق الهواء الصفحي. في كثير من الأحيان، تعتبر الخلايا بطيئة النمو البيضاء إلى السمراء المعتمة هي أنواع الخلايا المهمة التي يجب

أن يتم استخدامها لإنشاء خطوط الزراعة التي ستتجدد. في معظم الأحيان، خطوط الخلايا الخضراء سريعة النمو لا تتجدد.

طرق إنشاء منحنى النمو

يمكن إنشاء منحنى النمو باستخدام عدة طرق:

الطريقة الأولى:

التضحية بالزراعات على فترات زمنية مختلفة وأخذ الأوزان الرطبة والجافة. يتم تكرار الأوزان وحساب المتوسطات لإنشاء نقطة بيانات. جمع بيانات الوزن الرطب سريع، والأوزان الرطبة ترتبط عموماً بالأوزان الجافة عندما تكون قيمة الوزن الرطب أكبر من 0.5 جرام. يمكن إجراء عد الخلايا التي يتم فيها معالجة الخلايا بثالث أكسيد الكروم (chromium trioxide) (4%) عند درجة حرارة 70°م لمدة 2–15 دقيقة، مع تحريك هذا الخليط،

ويتم حساب الأجزاء على شريحة قياس كريات الدم الحمراء.

الطريقة الثانية:

هذه الطريقة لإنشاء منحنيات النمو للمزارع المعلقة عن طريق سحب أقسام تتراوح من 5 إلى 10 مل ويستخدم الطرد المركزي في أنبوب اختبار مخروطي متدرج. يتم قياس حجم الخلية المكورة.

كما يمكن –أيضاً– تحديد نمو الزراعة المعلقة عن طريق جمع 5 إلى 10 مل أقسام وتجميع الخلايا على ورق ترشيح مسبق الوزن في حامل مرشح ميليبور مع التفريغ. أغسل الخلايا بالماء ثم وضع ورق الترشيح في طبق بتري مسبق الوزن. يتم التجفيف في فرن لمدة 48 ساعة عند 60°م ويتم الوزن مرة أخرى.

تجربة القطن

الغرض:

للزراعات الفرعية وإنشاء منحنى نمو لنسيج كدب القطن (*Gossypium hirsutum* L.) (Price *et al.*, 1977). يمكن مقارنة أنواع مختلفة من الآجار والفحم النباتي للتنوع التجريبي في نمو الخلايا. كما يمكن أيضاً اختبار عوامل أخرى عديدة، مثل، الفيتامينات ودرجة الحرارة وشدة الضوء ومنظمات النمو النبات. (يمكن إضافة أفكار أخرى بالنظر إلى المراجع).

تحضير وسط منحنى نمو القطن:

(لعمل واحد لتر مكافئ لوسط منحنى نمو القطن).

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ميليجرام/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو–إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز (2iP) (10 ميليجرام/100 مل).

ح) 10 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الرقم الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 8 جرام من الآجار وذوبه.

5- وزع 25 مل في أنابيب اختبار (150 mm × 25) وتغطية الأنابيب.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة ودرجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع، والتبريد بميلان بزاوية 45°.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل للقطن:

1- تم إنشاء نسيج كدب القطن في تمرين اتجاه الجزء النباتي المنفصل. تستخدم زراعات يتراوح عمرها بين 4 إلى 6 أسابيع.

2- لا يحتاج نسيج الكدب إلى تعقيم لأن مصدره زراعات معقمة.

الزراعة

1- قسم نسيج الكدب إلى 23 قسم متساوية الحجم (بحجم حبة البازلاء).

2- ضع 20 قطعة من نسيج الكدب على وسط المغذيات، والحضانة في رف الزراعات.

3- ضع الأجزاء الثلاثة المتبقية من نسيج الكدب على قطعة من رقائق الأمونيوم الموسومة (حوالي 2 سم^2) مسبقة الوزن.

4- سجل الوزن الرطب ثم وضع العينة في الفرن لمدة 48 ساعة في درجة حرارة 60°م وسجل الوزن الجاف.

5- أحسب المتوسطات للوزن الرطب الابتدائي

تجربة التبغ

الغرض:

التعرف على الزراعة الفرعية وإنشاء منحنى نمو نسيج كدب التبغ (*Nicotiana tabacum* L.)،

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

تم بالفعل تحفيز إنشاء نسيج الكدب عن طريق إنبات البذور بطريقة معقمة على وسط يحتوي على أملاح موراشيجي وسكوج، 30جرام/اللتر سكروز، و8 جرام/اللتر آجار مع ضبط الرقم الهيدروجيني 5.7. بعد 3 أسابيع يتم قطع البادرات وزراعتها في وسط يحتوي على أملاح موراشيجي وسكوج و30 جرام/اللتر سكروز، 100 ميليجرام/اللتر ميوأنيزوتول، 0.5 ميليجرم/اللتر ثيامين، 0.9 ميكرومول كينتين، 11.4 ميكرومول (IAA) و8 جرام/اللتر آجار. ويتم حضانة الزراعات في الظلام في درجة حرارة 27-30°م. بعد 6 أسابيع، يتم فصل نسيج الكدب عن الجزء النباتي المنفصل وزراعته فرعياً لمدة 6 أسابيع على نفس الوسط لزيادة حجم نسيج الكدب.

يمكن إختبار العديد من الاختلافات التجريبية مثل تركيزات مختلفة من مركزات الأملاح غير العضوية لوصفة موراشيجي وسكوج الخمسة، إضافة 0.3% (وزن/حجم) فحم مغسول بالحامض للوسط، ومنظمات نمو مختلفة و/أو تركيزاتها.

تحضير الوسط الغذائي:

(لعمل واحد لتر مكافئ لمنحنى نمو التبغ).

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ميليجرام/لتر)

ت) 10 مل من مركز ميو–إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 2 مل من مركز (kinetin) (10 ميليجرام/100 مل).

ح) 20 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الرقم الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 8 جرام من الآجار وذوبه.

5- وزع 25 مل في أنابيب اختبار (150 × 25 مم) وتغطية الأنابيب.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقةً ودرجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع، والتبريد بميلان بزاوية 45°.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل للتبغ

كما في تجهيز الجزء النباتي المنفصل للقطن.

الملاحظات:

يتم مسح وإزالة الآجار بعناية باستخدام منشفة ورقية قبل وزن نسيج الكدب لقياس وزن نسيج الكدب فقط.

البيانات والأسئلة:

1- مراقبة وأخذ عينات في 0، 5، 10، 20، 30، 35، و40 يوم. يتم أخذ عينتين في كل نقطة للوزن الرطب والجاف.

2- يتم إنشاء منحنى نمو كما هو مبين في الشكل 6.3.

3- ما هو نوع التحليل الإحصائي المناسب لهذه البيانات؟

4- هل تنمو جميع الأجزاء النباتية المنفصلة بالتساوي؟ لماذا و لماذا لا؟

5- كم جزء في المليون لكل من (2IP) و(IAA) و()NAA و(kinetin) و(2,4-D) في الوسط وما هي مولارية كل منها؟.

6- هل توجد فروق بين منحنيات نمو القطن والتبغ؟

7- لو تم استخدام الفحم، هل كان هناك اختلاف في منحنى النمو؟ اشرح.

8- هل توجد علاقة أو ترابط بين أوزان نسيج الكدب الجافة والرطبة؟

التباين الخلوي من زراعات نسيج الكدب Cellular Variation From Callus Cultures

تتمتع مزارع الخلايا النباتية بإمكانية استخدامها لإنتاج منتجات قيمة عن طريق الاستخراج المباشر للمواد الابتدائية (precursor) المرغوبة من الخلايا أو الوسط أو التحول الأحيائي. وتشمل هذه المنتجات قلويات، ستيرويدات، أحماض أمينية وزيوت طيارة والصابونين. وتشمل المركبات النباتية الثانوية؛ المنشطات القلبية، والمركبات المضادة للأورام، والإستيرويدات، والمبيدات الحشرية، وعناصر النكهات. تقليدياً، يتم استخراج هذه المركبات من كل النبات. ومع ذلك، يمكن أن يكون هذا النهج مدمر ويستنزف العمالة بكثافة.

المزايا الرئيسية المحتملة لاستخدام مزارع الخلايا النباتية هي:

(أ) إمكانية إنتاج المركبات في ظل ظروف بيئية خاضعة للرقابة

(ب) خلو الزراعات من الإصابة بالميكروبات والحشرات.

(ت) يمكن التلاعب وتحسين إنتاج المركب.

(ث) خفض التكاليف بالأتمتة.

تحتوي مزارع نسيج الكدب عادة على خليط من الخلايا غير متجانسة الحجم، الشكل أو التصبغ أو التمثيل الغذائي أو عدد الكروموسومات. وهنالك اختلافات كثيرة غير مرئية. تنتج بعض مزارع نسيج الكدب خلايا متفاوتة في تلون المادة (التصبغ) مما يسمح بالفصل البصري لأنواع الخلايا المصطبغة وإنشاء خط خلية بلون موحد. في بعض الحالات، يمكن أن تكون هذه الخطوط المصطبغة تستخدم في عزل المستقلب الثانوي.

الغرض:

عزل وإنشاء خطوط خلايا موحدة الاصطباغ من أجزاء القطن والجزر المنفصلة

تحضير الوسط الغذائي

نفس إعداد الوسط لتمرين اتجاه الجزء النباتي المنفصل أو تحفيز نسيج كدب الجزر والقطن.

الجزء النباتي المنفصل

بعد 6-8 أسابيع من الحضانة، يجب تحدث اختلافات في تصبغ نسيج الكدب. أفصل بصرياً خطوط خلايا القطن الحمراء، الخضراء الداكنة، الخضراء الشاحبة أو الصفراء البيج أو خلايا الجزر ذات اللون البرتقالي العميق وزراعتها في وسط طازج.

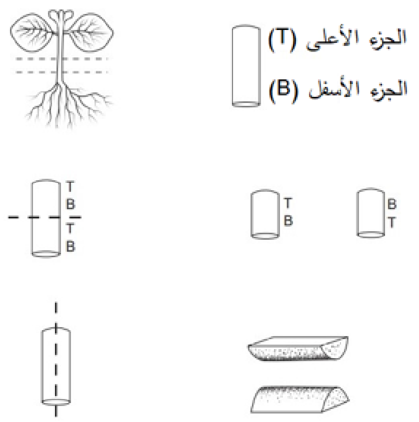
البيانات والأسئلة

1. هل تنمو خطوط الخلايا بمعدلات مماثلة؟

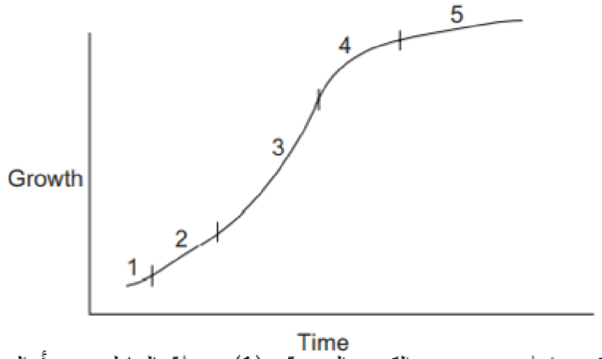
2. هل الخلايا الفردية في خطوط الخلايا المختلفة متطابقة في الحجم والشكل؟

3. هل تحدث تغيرات التصبغ مع مرور الوقت في خطوط الخلايا المختلفة؟

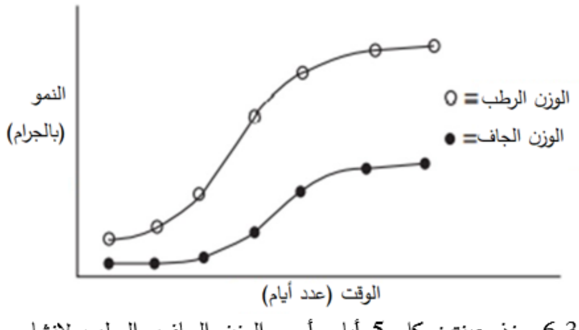
هناك العديد من المقالات المثيرة للاهتمام حول المنتجات الثانوية الناتجة عن مزارع الخلايا. للتعرف على الاختلافات في التمرين السابق، يُرجى الرجوع إلى المراجع.



شكل 6.1. للحصول على أقسام من السويقة الجنينية، إقطع عرضياً 1.0 سم. توضع القطاعات العرضية الجزء الأعلى لأعلى والأسفل للأسفل والعكس. والقطاعات الطولية توضع السطح المقطوع لأعلى ولأسفل
from Smith, R.H. (2013)



شكل 6.2. مراحل نمو نسيج الكدب الخمسة. (1) مرحلة التباطؤ، تتهيأ الخلايا للإنقسام؛ (2) مرحلة النمو الأسي، المرحلة الأعلى من إنقسام الخلايا؛ (3) مرحلة النمو الخطي، تنخفض سرعة إنقسام الخلايا وتبدأ في التوسع؛ (4) مرحلة تباطؤ النمو؛ و(5) المرحلة الساكنة ويبقى عدد الخلايا ثابتاً
from Smith, R.H. (2013)



شكل 6.3. خذ عينتين كل 5 أيام وأرسم الوزن الجاف والرطب لإنشاء منحنى النمو *from* Smith, R.H. (2013)

المراجع

Abe, T., and Futsuhara, Y. (1985). Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissue of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 121, 111–118.

Alicchio, R., Antonioli, C., and Palenzona, D. (1984). Karyotypic variability in plants of *Solanum melongea* regenerated from callus grown in the presence of culture filtrate of *Verticillium dahliae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 67, 267–271.

Bhaskaran, S., and Smith, R. H. (1988). Enhanced somatic embryogenesis in *Sorghum bicolor* from shoot tip culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 24, 65–70.

Bhaskaran, S., and Smith, R. H. (1989). Control of morphogenesis in *Sorghum* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and cytokinins. *Annals of Botany*, 64, 217–224.

Bhaskaran, S., and Smith, R. H. (1990). Regeneration in cereal tissue culture: A review. *Crop Science*, 30, 1328–1337.

Binarova, P., Nedelnik, J., Fellner, M., and Nedbalkova, B. (1990). Selection for resistance to filtrates of *Fusarium* spp. in embryogenic cell suspension culture of *Medicago sativa* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 22, 191–196.

Bohm, H. (1977). Secondary metabolism in cell cultures of higher plants and problems of differentiation. In M. Luckner, L. Nover, and H. Bohm (Eds.), *Secondary metabolism and cell differentiation* (pp. 105–123). New York: Springer-Verlag.

Close, K. R., and Gallagher-Ludeman, L. A. (1989). Structure–activity relationships of auxin-like plant growth regulators and genetic influences on the culture induction responses in maize (*Zea mays* L.). *Plant Science*, 61, 245–252.

Croughan, T. P., Stavarek, S. J., and Rains, D. W. (1981). *In vitro* development of salt resistant plants. *Environmental and Experimental Botany*, 21, 317–324.

D'Amato, F., Benniei, A., Cionini, P. G., Baroncelli, S., and Lupi, M. C. (1980). Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanisms for wide chromosome number variation in tissue cultures: Its implications for plantlet regeneration. In F. Sala, R. Parisi, R. Cella, and O. Ciferri (Eds.), *Plant cell cultures: Results and perspectives* (pp. 67–72). New York: Elsevier–North Holland.

DeFossard, R. A. (1974). Responses of callus from zygotal and micro-sporal tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) to various combinations of indole acetic acid and kinetin. *New Phytology*, 73, 699–706.

Dhar, U., and Joshi, M. (2005). Efficient plant regeneration protocol through callus for *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew. (Asteraceae): Effect of explant type, age and plant growth regulators. *Plant Cell Rep*., 24, 195–200.

Do, C. B., and Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9, 143–146.

Evans, D. A., Sharp, W. R., and Flick, C. E. (1981). Growth and behavior of cell cultures: Embryogenesis and organogenesis. In T. A. Thorpe (Ed.), *Plant tissue culture: Methods and application in agriculture* (pp. 45–100). New York: Academic Press.

Fukui, H., Tani, M., and Tabata, M. (1990). Induction of shikonin biosynthesis by endogenous polysaccharides in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports,* 9, 73–76.

Furuya, T., Koge, K., and Orihara, Y. (1990). Long term culture and caffeine production of immobilized coffee (*Coffea arabica* L.) cells in polyurethane foam. Plant Cell Reports, 9, 125–128.

Gao, J., Li, J., Luo, C., Yin, L., Li, S., Yang, G., and He, G. (2010). Callus induction and plant regeneration in *Alternanthera philoxeroides*. *Molecular Biology Reports*, 38(2), 1413–1417.

Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E., Borges, G., and Mansur, E. (2011). Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium, and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106, 47–54.

Gifford, E. M., and Nitsch, J. P. (1969). Responses of tobacco pith nuclei to growth substances. *Planta*, 85, 1–10.

Gorham, J., Wyn Jones, R. G., and McDonnell, E. (1985). Some mechanisms of salt tolerance in crop plants. *Plant and Soil*, 89, 15–40.

Greenway, H., and Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*, 31, 149–190.

Hartman, C. L., McCoy, T. J., and Knous, T. R. (1984). Selection of alfalfa (*Medicago sativa*) cell lines and regeneration of plants resistant to the toxin(s) produced by *Fusarium oxysporum F*. sp. *medicaaginis*. *Plant Science Letters*, 34, 183–194.

Heinstein, P., and El-Shagi, H. (1981). Formation of gossypol by Gossypium hirsutum L. cell suspension cultures. *Journal of National Producer*., 44, 1–6.

Helgeson, J. P., Kruger, S. M., and Upper, C. D. (1969). Control of logarithmic growth rates of tobacco callus tissue by cytokinins. *Plant Physiology*, 44, 193–198.

Heyser, J. W., and Nabors, M. W. (1982). Long-term plant regeneration, somatic embryogenesis and green spot formation in secondary oat (*Avena sativa*) callus. *Zeitschriftfuer Pflanzenphysiologie*, 107, 153–160.

Hodges, T. K., Kamo, K. K., Imbrie, C. W., and Becwar, M. R. (1986). Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Biotechnology*, 4, 219–223.

Irvani, N., Salouki, M., Omidi, M., Zare, A. R., and Shahnuzi, S. (2010). Callus induction and plant regeneration in *Dorem ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 100, 293–299.

Kendall, E. J., Qureshi, J. A., Kartha, K. K., Leung, N., Chevrier, N., Caswell, K., and Chen, T. H. H. (1990). Regeneration of freezing-tolerant spring wheat (*Triticum aestivum* L.) plants from cryoselected callus. *Plant Physiology*, 94, 1756–1762.

Lee, S. L., and Scott, A. I. (1979). The industrial potentials of plant tissue culture. *Developments in Industrial Microbiology*, 20, 381–391.

Liu, K. C. S., Yang, S. L., Roberts, M. F., and Phillipson, J. D. (1990). Production of canthin-6-one alkaloids by cell suspension cultures of *Brucea javanica* L. Merr. *Plant Cell Reports*, 9, 261–263.

Ma, H., Gu, M., and Liang, G. H. (1987). Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* L. Moench. Theoretical and *Applied Genetics*, 73, 389–394.

Mantell, S. H., and Smith, H. (1983). Cultural factors that influence secondary metabolite accumulations in plant cell and tissue cultures. *Seminar Series of the Society for Experimental Biology*, 18, 75–108.

Meredith, C. P. (1984). Selecting better crops from cultured cells. In J. P. Gustafson (Ed.), *Gene manipulation in plant improvement* (pp. 503–528). New York: Plenum.

Mok, M., Gabelman, W. H., and Skoog, F. (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucas carota* L. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 101, 442–449.

Nabors, M. W., Gibbs, S. E., Bernstein, C. S., and Meis, M. E. (1980). NaCl-tolerant tobacco plants from culture cells. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 97, 13–17.

Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A., and DeMott, K. J. (1983). Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta*, 157, 385–991.

Naor, V., Ziv, M., and Zahavi, T. (2011). The effect of the orientation of stem segments of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay on callus development *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106, 353–358.

Peng, J., and Hodges, T. K. (1989). Genetic analysis of plant regeneration in rice (*Oryza sativa* L.). *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 25, 91–94.

Peterson, G., and Smith, R. H. (1991). Effect of abscisic acid and callus size of American and international rice varieties. *Plant Cell Reports*, 10, 35–38.

Price, H. F., Smith, R. H., and Grumbles, R. M. (1977). Callus culture of six species of cotton (*Gossypium* L.) on defined media. *Plant Science Letters*, 10, 115–119.

Rai, M. K., Kalia, R. W., Singh, R., Gangola, M. O., and Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental* and *Experimental Botany*, 71(1), 89–98.

Reinert, J., and Yeoman, M. M. (Eds.), (1982). *Plant cell and tissue culture: A laboratory manual*. New York: Springer-Verlag.

Rines, H. W., and Luke, H. H. (1985). Selection and regeneration of toxin-insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoria*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 16–21.

Satoshi, A., and Kazunori, O. (2011). Production of phytochemicals by using habituated and longterm cultured cells. *Plant Biotechnology*, 28(1), 51–62.

Schroeder, C. A., and Davis, L. H. (1962). Totipotency of cells from fruit pericarp tissue *in vitro*. *Science*, 138, 595–119.

Skirvin, R. M. (1978). Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica*, 27, 241–266.

Smith, M. K., and McComb, J. A. (1983). Selection for NaCl tolerance in cell cultures of *Medicato sativa* and recovery of plants from a NaCl-tolerant cell line. *Plant Cell Reports*, 2, 126–128.

Smith, R.H. (2013). *Plant Tissue Culture Techniques and Experiments*. Elsevier. USA

Stavarek, S. J., and Rains, D. W. (1983). Mechanisms for salinity tolerance in plants. *Iowa State Journal of Research*, 57, 457–476.

Tal, M., and Shannon, M. C. (1983). The response to NaCl of excised, fully differentiated and differentiating tissues of cultivated tomato, *Lycopersicon esculentum*, and its wild relatives, *L. peruvianum* and *Solanum penillii*. *Physiologia Plantarum*, 59, 659–663.

Tomes, D. T., and Smith, O. S. (1985). The effect of parental genotype on initiation of embryonic callus from elite maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 70, 505–509.

Umetani, Y., Kodakari, E., Yamamura, T., Tanaka, S., and Tabata, M. (1990). Glucosylation of salicylic acid by suspension cultures of *Mallotus japonicus*. *Plant Cell Reports*, 9, 325–327.

Wang, P. J., and Huang, L. C. (1976). Beneficial effects of activated charcoal on plant tissue and organ culture. *In vitro*, 12, 260–262.

Wang, X.-D., Nolan, K. E., Irwanto, R. R., Sheahan, M. B., and Rose, R. J. (2011). Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: The fate of pluripotent and totipotent stem cells. *Annals of Botany*., 107(4), 599–609.

Wenzel, G., and Foroughi-Wehr, B. (1990). Progeny tests of barley, wheat, and potato regenerated from cell cultures after *in vitro* selection for disease resistance. *Theoretical and Applied Genetics*, 80, 359–365.

Witham, F. H. (1968). Effect of 2, 4-D on the cytokinin requirement of soybean cotyledon and tobacco stem pith callus tissues. *Plant Physiology*, 43, 1455.

Wernicke, W., *and* Brettell, R. I. S. (1982). Morphogenesis from cultured leaf tissue of *Sorghum bicolor*–culture initiation. *Protoplasma*, 111, 19–27.

Wysokinska, H., and Giang, N. T. X. (1990). Selection of penstemide and serrulatoloside producing clones in *Penstamon serrulatus* by small-aggregate cloning. *Plant Cell Reports*, 9, 378–381.

Yeo, A. R., and Flowers, T. J. (1983). Varietal differences in the toxicity of sodium ions in rice leaves. *Physiologia Plantarum*, 59, 189–195

الفصل السابع

التجديد والتشكل Regeneration and Morphogenesis

التجديد الفعال للنباتات السليمة من الأجزاء النباتية المنفصلة المزروعة خارج الجسم الحي، أو من زراعة نسيج الكدب، هو عبارة عن تسلسل حيوي في تنفيذ نهج التكنولوجيا الحيوية الناجحة في تحسين النبات. الحصول على نباتات كاملة من الجزء النباتي المنفصل أو من نسيج الكدب أو من الخلية المفردة أمراً أساسياً للحصول على النباتات المعدلة وراثياً، واختيار خلايا بسمات فريدة، والحصول على المتغيرات الجسدية، والتكاثر النسيلي السريع، وإنتاج نباتات خالية من الفيروسات، ونباتات أحادية الصيغة الصبغية و/أو متعددة الصبغيات، وعمليات إنقاذ الأجنة، بالإضافة إلى تخزين الأصول الوراثية.

تتنوع المسارات المتبعة في التجديد. من الناحية النظرية تحتوي جميع الخلايا القدرة الجينية لتوجيه تطورها إلى نبات كامل؛ أي لها المقدرة الذاتية. ومع ذلك، لا يبدو أن جميع الخلايا قادرة على التعبير عن المقدرة الذاتية. يتكون الجزء النباتي المنفصل من خلايا شديدة التباين مثل؛ الأوراق والجذع والجذور والأنسجة الزهرية. أشار (Palmer and Keller, 2010) إلى تكوين الأعضاء من البتلات المفردة من أزهار نبات (St John's Wort). إن الأجنة غير الناضجة، والأنسجة النباتية الإنشائية والخلايا الإنشائية الأخرى في نظام الأوعية الناقلة غير متمايزة. يتم تجريح الجزء النباتي المنفصل خلال عملية العزل للزراعة، وبذلك يتم تحفيز انقسام وتكاثر نسيج الكدب، بشكل عام، استجابة للجروح. وقد أشار (Sugiyama, 1999) إلى أن تجريح الجزء النباتي المستأصل يثير التمايز الارتدادي (dedifferentiation) في الجزء النباتي المنفصل. خلايا نسيج الكدب، بشكل عام، متمايزة، إلا إنها كتل خلايا غير منتظمة وهناك مناطق من الخلايا في نسيج الكدب قد تعود إلى الحالة غير المتمايزة أو الحالة الإنشائية لتجديد الأعضاء.

يمكن أن تتشكل المناطق الإنشائية داخل نسيج الكدب وتكون قادرة على تكوين البراعم، الجنين الجسدي، الجذور، وتكوين الأعضاء العرضي. يعتبر هذا بمثابة تكوين عضوي غير مباشر لأنه يحتوي على مرحلة وسيطة من تكوين نسيج الكدب. تكوين الأعضاء المباشر هو تكوين مناطق الإنشائية مباشرة من خلية الجزء النباتي المنفصل. لا توجد مرحلة تكوين نسيج كدب متداخلة، ويمكن أن تنشأ البراعم الجذور والأجنة الجسدية والمتوك والأزهار مباشرة من الجزء النباتي المستأصل. يمكن أن تنشأ براعم عن طريق تكوين الأعضاء المباشر وغير المباشر (Mallon *et al.*, 2011).

أنشأت تجارب (Skoog and Miller, 1957) المبكرة (تمت مناقشتها في الفصل الأول) المفاهيم الأساسية في تكوين الأعضاء من زراعات نسيج الكدب فيما يتعلق بنسبة الأوكسين إلى الكينيتين. النسب العالية من الأوكسين

إلى الكينتين تؤدي إلى تشكيل الجذور، والعكس يؤدي إلى تشكيل براعم، والنسب الوسطية تعزز تكاثر نسيج الكدب. من هذه البدايات حدث كثير من التقدم في أساسيات فسيولوجيا النبات والبيولوجيا الجزيئية (Meng *et al*., 2010) ومنظمات النمو النباتية (Werner *et al*., 2001): ومع ذلك، فإن العديد من الأصناف النباتية لا يزال متمرداً خارج الجسم الحي. أوضح (Iqbal *et al*., 2011) ظهور زيادة في الإمكانات الجنينية من أجزاء الورقة المنفصلة التي تم تجديدها سابقاً خارج الجسم الحي.

لمزيد من المناقشة حول هذه الموضوعات، يمكن الرجوع إلى الكتب المرجعية في هذه المجالات ومقالات مثل (Magyar-Tabori *et al*., 2010) والمراجع الواردة فيه و(Nordstrom *et al*., 2004)

تعد قواعد البيانات في عمليات البحث في المكتبات مصدراً لا يقدر بثمن للمعلومات الحالية حول الأدبيات المنشورة حول العديد من الأنواع النباتية وحالة الزراعة خارج الجسم الحي. هذه نقطة انطلاق قيمة لبدء دراسة زراعة الخلية لتأسيس الزراعات بنجاح.

توفر التدريبات التالية أساساً للدراسات حول التشكل خارج الجسم الحي.

التشكل الخاضع للرقابة: Controlled Morphogenesis

تكوين الدرنات في البطاطس Potato Tuberization

يعتبر إكثار نبات البطاطس من خلال زراعة نسيج القمة الإنشائية طريقة روتينية للحصول على النباتات الخالية من الفيروسات وإنتاج نباتات موثوقة خالية من الفيروسات (Wang and Hu, 1982; Zapata *et al*., 1995). تشكل الإصابة بالفيروسات في المحاصيل التي تكاثر خضرياً مشاكل حيث يمكن أنها تقلل الإنتاج إلى مستويات غير اقتصادية. تكون القمة الإنشائية للنباتات المصابة بشكل عام، خالية من الفيروسات و تحتوي على مستوى منخفض جداً من الفيروسات. يتم استئصال القمة الإنشائية في البطاطس، حوالي 0.3–0.6 ميليمتر من النباتات المزروعة في غرفة النمو وزراعتها على وسط مناسب لنمو الفروع. عندما يتم تجذير النبيتات، وتنقل إلى التربة والحفاظ عليها في بيوت محمية واقية من الحشرات حيث يتم اختبار خلوها من الفيروس. يتم تكاثر النباتات وانتاج بذور الدرنات على نطاق واسع في الحقول المعزولة حيث تقل فرص الإصابة بالعدوى مرة أخرى وتكون في الحد الأدنى. في العديد من مناطق العالم، يكاد يكون من المستحيل المكافحة الفعالة للحشرات. في مثل هذه المواقع، كما أن الأمراض الجهازية التي تنتقل عن طريق الحشرات، لا يمكن تفاديها. تم تطوير إستراتيجيات بديلة للحد من المشكلة.

إن تقنية التعامل مع استعادة العدوى في الحقول الخالية من الفيروسات هي إنتاج درنات البطاطس خارج الجسم الحي التي يمكن توزيعها بعد ذلك على المنتج مع قليل من التلوث أو خالية منه. وقد تمت دراسة هذه التقنية على نطاق واسع (Tovar *et al*., 1985; Hussey and Stacy, 1984) وأظهرت النتائج أهمية السيتوكينين وبعض الاحتياجات البيئية للتدرن (Mingo-Castro *et al*., 1974).

غالباً ما تكون الاهتمامات الرئيسية في تجارب زراعة الأنسجة النباتية هي الوسط الأمثل لزراعة الخلية، مثل الأملاح غير العضوية، ومجموعة منظمات النمو وتراكيزها. لا يتم الاهتمام بتأثيرات عوامل التبلور (gelling agents) المختلفة بشكل روتيني. يشتق الآجار وهو عديد السكاريد من مستخلصات الأعشاب البحرية. الجيلريت هو بديل الآجار يتم إنتاجه عن طريق التخمير الميكروبي ويشكل الجيلريت مادة هلامية شديدة الوضوح والشفافية.

الهدف من هذه التجربة هو مقارنة تأثيرات نوعين مختلفين من عوامل التبلور في تكوين درنات صنفين من البطاطس (*Russet Burbank*) و(*Superior*). وسيتم أيضاً فحص تركيز السكروز والكينتين اللذين من المؤكد لهما تأثير على التدرن.

الغرض

فحص تأثير عوامل التبلور على درنات البطاطس خارج الجسم الحي.

تحضير الوسط الغذائي

(لعمل واحد لتر مكافئ)

8- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،
9- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 60.5 مل من مركز الكينتين (40 ملجم/لتر).

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

10- ضبط الحجم إلى 1000 مل
11- ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.
12- تقسيم الوسط إلى جزأين متساوين (500 مل لكل).

أ) أضف 4 جرام آجار لأحد الأجزاء

ب) أضف 1 جرام جيلرايت للجزء الآخر.

13- إذابة مادة التبلور، وتوزيع الوسط في أنابيب اختبار (150 × 25 مم) وأغلق أنابيب الاختبار بأغطية ملونة لكل مادة

14- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

15- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

تجهيز الجز النباتي المنفصل

1- زراعة صنفين من البطاطس (Russet Burbank) و(Superior) ينموان تحت ظروف معقمة في حاويات ماجنتا (Magenta GA-7).

2- يتم إنشاء هذه الزراعات عن طريق أخذ عقل من البراعم المنبثقة من درنات البطاطس المشتراة من متجر المنتجات، بعد وضعها على حافة نافذة أو أي تظليل لتخضر وينشأ نمو البرعم من العين.

3- يتم استئصال البراعم التي يبلغ طولها حوالي 1 سم ويتم تنظيف سطحها بالماء والصابون، ثم غمسها في كحول (95%)، والتعقيم في 20% كلور مبيض لمدة 15 دقيقة، والشطف ثلاث مرات في ماء معقم.

4- إزالة الأنسجة التي أحرقها الكلور، ثم زراعة البراعم في وسط يحتوي على أملاح موراشيجي وسكوج (1962) بالإضافة إلى ميوأنيزوتول، 100ميليجرام في اللتر وسكروز 20 جرام في اللتر و8 جرام من الآجار وتوضع في الحاضنة.

5- تنمو البراعم لتكون سيقان خلال 6 أسابيع. يتم تجزئة البراعم المتفرعة لعقدتين في كل قسم وزراعتها في نفس الوسط لتكوين الدرنات والحضانة في الظلام في درجة حرارة 19°م. وللمقارنة يتم وضع بعض الزراعات في الضوء.

البيانات والأسئلة

حدد المعلمات التجريبية للقياس (الوزن، الطول، القطر، إلخ) في الجزء النباتي المنفصل الأولية وإعادة القياس بعد 4-6 أسابيع لتحديد تأثير عوامل التبلور وظروف الإضاءة على تكوين الدرنات خارج الجسم الحي.

كن مستعداً لمناقشة الأسئلة التالية:

1. هل يستجيب الصنفان بنفس الطريقة لعامل التبلور وظروف الزراعة؟

2. هل كان هناك فرق معنوي في تطور الدرنات النهائية بين المعاملات؟

تكوين الأجنة الجسدية Somatic Embryogenesis

تكوين الأجنة الجسدية هي عملية يتم من خلالها تمايز الخلايا الجسدية (غير المشيجية) لتشكيل بنية ثنائية القطبية تحتوي على كل من الجذر و قمة الساق. هذه الأجنة الجسدية تشبه الأجنة الزايجوتية ويمكن أن تنضج وتنبت (Steward *et al.*, 1958a; 1958b; Reinert, 1958; Kato and Takeuchi, 1963; McWilliam *et al.*, 1974; Nomura and Komamine, 1985). يوضح شكل 7.1 عملية تكوين الأجنة.

يتم وضع نسيج الكدب على وسط يحتوي على أوكسين لحث تكوين الأجنة الجسدية. يتم نقل الخلايا إلى وسط خالي من الهرمون بعد نبضة الأوكسين القصيرة لتنامي الجنين (Fujimura and Komamine, 1979; Borkird *et al.*, 1986). مجموعة خلايا الجزر بقطر 50–100 ميكرومتر، تحتوي على 10–20 من الخلايا الإنشائية الصغيرة كثيفة السيتوبلازم، ولديها قدرة عالية على التطور الجنيني (Raghavan, 1985; Sung *et al.*, 1984). تتطلب العملية أيضاً شكلاً مخفضاً من النيتروجين (قلايسين، جلوتامين، مستخلص الخميرة، أو الأمونيوم). نادراً ما ينتج عن استخدام النيتروجين في شكل النترات (NO^{-3}) أجنة فقط. لدى تضاعف النباتات من مزارع الخلايا عن طريق تكوين الأجنة الجسدية القدرة للحصول على أعلى معدلات الإنتاج النباتي في الزراعة. يمكن إنتاج الآلاف من الأجنة الجسدية في قارورة واحدة. ومع ذلك، فإن النضج الطبيعي لجميع هذه الأجنة في النباتات يمكن أن يكون مشكلة. قامت شركات البذور بالتحقيق في هذه العملية لإنتاج البذور الاصطناعية.

في هذا التمرين، ستتم الزراعة الفرعية للخلايا على وسط يحتوي على أوكسين ثم توضع على وسط خالي من الأكسين لتنمية الجنين.

الغرض:

تحفيز تكوين الجنين الجسدي من زراعات خلايا نسيج الكدب والخلايا المعلقة لنبات الجزر، وملاحظة تأثير كثافة التلقيح وأوكسين (2,4-D) على تكوين الأجنة الجسدية.

تجهيز وسط تكوين أجنة الجزر الجسدية

(لعمل واحد لتر مكافئ)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/ اللتر).

ت)10 مل من مركز ميو–إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث)25 جرام سكروز

3- ضبط الحجم إلى 800 مل

4- ضع 400 مل في 1000 مل دورق مخروطي موسوم بالحرف "أ" والبقية (400 مل) في دورق آخر ويوسم بالحرف "ب".

5- أضف 0.5 مل من مركز (2,4-D) (10 ميليجرام في اللتر) للدورق "أ".

6- أكمل الحجم لكل الدورقين إلى 500 مل

7- ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

8- تغطية الدورقين برقائق الألمونيوم والتعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع. أيضاً يتم تعقيم كأس مغطى بأربعة طبقات من الشاش القطني ويحكم قفله بالأربطة المطاطية أو خيط. يتم تغطية وتغليف الكأس برقائق الألمونيوم.

9- داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي وزع 20 مل في أطباق بتري بلاستيكية (20X100 مم) بعلامات (أ وب) أو 10 مل في أطباق بلاستيكية (15 × 60 مم).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

تم زراعة مزارع الجزر المعلقة على أملاح موراشيجي وسكوج (1962) مع إضافة؛ 30 جرام/ اللتر سكروز، و بالميليجرام في اللتر: 0.1، ثيامين؛ 0.5، حامض النيكوتين؛ 0.5، بيريدوكسين؛ 100، ميو–إينوزيتول؛ 0.3، (2,4-D). يتم حضانة الزراعات على جهاز هزاز دائري (حوالي 90 دورة في الدقيقة) عند 27–30°م وإضاءة 240 شمعة ضوئية لمدة 24 ساعة.

- لقد تم إنشاء نسيج الكدب الأصلي في تمارين "إنبات البذور المعقمة" و"إنشاء نسيج الكدب".
- انتظر من 2–3 أشهر لتحفيز نسيج الكدب والزراعات الفرعية لتجهيز هذا التمرين.

الطريقة

1- في داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي أدخل قارورة زراعة خلايا الجزر المعلقة بعد رشها بالكحول (70%) من الخارج وتركها لتجف.

2- أسكب محتويات الزراعة المعلقة بطريقة معقمة على الكأس المغطى بالشاش القطني لتترسب خلايا الجزر في الأعلى ثم أشطف الخلايا المترسبة 3 مرات بوسط خالي من هرمون (2,4-D) لإزالة أثره المتبقي من الخلايا.

3- استخدم ملعقة قياس كيميائية معقمة من الفولاذ المقاوم للصدأ لتلقيح أطباق بتري (أ) و(ب) بأثنين أو ثلاثة من كثافات تلقيح مختلفة. بشكل عام، كثافة كل من 103-105 من الكتل (50-100 ميكرومتر في القطر) هو لقاح مفضل لمستوى عالي من تكوين الجنين الجسدي. تحديد متوسط الوزن الطازج لكثافة اللقاح لإعطاء فكرة عن الوزن الطازج بالميليجرام. وقد تم ملاحظة ارتفاع إنتاج الأجنة عند 20-50 ميلجراماً من وزن نسيج الكدب الطازج لكل 20 مل من الوسط. ضع علامات على أطباق البتري وغلفها بالبارافيلم.

4- حضانة الزراعات في هزاز دائري في الظلام عند درجة حرارة 27-30°م.

البيانات والأسئلة

يلاحظ التأثير الكبير لكثافة التلقيح على حدوث تكوين الأجنة الجسدية. من الضروري أن يتم فحص الزراعات تحت المجهر المقلوب أو مجهر التشريح كل 1-4 أسابيع.

أ) أرسم مراحل التطور الجنيني ولاحظ متى ظهرت المراحل المختلفة.

ب) كم عدد المراحل التي تراها في الوسط؟

ت) هل الأجنة حرة الطفو أم أنها توجد في مجموعات؟

ث) كيف تحاول إنشاء نبيتات من هذه الأجنة الصغيرة؟

ج) هل كثافة التلقيح لها أي تأثير على التطور الجنيني الجسدي؟

ح) ما هو تأثير هرمون (2,4-D)؟

تجديد الأرز Regeneration of Rice

يعتبر الأرز محصول حبوب مهم للغاية، وتم إجراء دراسات مستفيضة حول زراعة الأرز وتكوين الأعضاء. يعتبر النمط الجيني والمرحلة التنموية لبذور الأرز من العوامل الرئيسية في تحفيز نسيج الكدب وإمكانية التجديد في أصناف الأرز (Zuraida *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2002; Zuraida *et al.*, 2010). وورد أن بذور الأرز والأجنة الناضجة وغير الناضجة أفضل خيار للجزء النباتي المنفصل للحصول على الزراعات الجينية. البذور الناضجة مصدر مناسب للجزء النباتي المنفصل لتوفره على مدار السنة؛ ومع ذلك، فإن البذور الناضجة لها حدود للأنماط الجينية المتمردة. استعرض (Zuraida *et al.*, 2011) العملية المتضمنة في تحسين وسط الجزء النباتي المنفصل وظروف الزراعة لتحسين استجابة النمط الجيني. نشر (Vega *et al.*, 2009) دراسة جيدة في تكوين أجنة الأرز الجسدية.

الغرض

التعرف على إمكانية التجديد لنوعين من نسيج كدب الأرز.

تحضير الوسط:

1 لتر مكافئ، وسط زراعة الأرز الفرعية.

الوسط هو نفس وسط إنشاء زراعة خلايا الحبوب ذات المقتدرة (ذات الكفاءة) (الفصل السادس) باستثناء إضافة 26 ميليجرام /اللتر حامض أبسيسك (ABA) وخفض (2,4-D) إلى 2 ميليجرام/اللتر. يمكن أن تتضمن الاختلافات التجريبية اختبار مستويات مختلفة من (ABA) مع إصافة مستويات مختلفة من (2,4-D) أو بدونها.

الإجراء:

يتم تحضير الأجزاء النباتية المنفصلة كما في " إنشاء زراعة خلايا الحبوب ذات الكفاءة" باستخدام نوعين من نسيج الكدب تم إنشاؤهم من الجزء النباتي المنفصل. زراعة كلا النوعين من نسيج الكدب باستخدام قطع صغيرة 10 ميليجرام. حضانة الزراعة في الظلام. بنهاية 3 أسابيع، يمكن زراعة نسيج الكدب على نفس الوسط أو نقله إلى وسط تجديد النبات.

تحضير وسط تجديد نبات الأرز

(ما يعادل 1 لتر مكافئ)

هذا الوسط هو نفس الوسط السابق باستثناء إزالة (ABA) و(2,4-D)

أضف 0.5 ميلجرام/اللتر (BA) و0.5 ميليجرام/اللتر (NAA).

الإجراء:

ضع الزراعة في الظلام لمدة أسبوع واحد ، ثم أنقلها إلى رف الزراعة. في غضون 4 أسابيع ستكون النباتات جاهزة للنقل إلى التربة.

البيانات والأسئلة

1- ما هو تواتر تكوين النبات؟
2- ما الوظيفة التي يمكن أن يؤديها هرمون (ABA) في تجديد النبات؟
3- هل شكل كلا النوعين من نسيج الكدب نباتات؟
4- ما الفرق بين صنفي الأرز من حيث تشكيل النبات؟

متطلبات السكون في الجزء النباتي المنفصل Dormancy Requirements of Explants

الغرض:

ملاحظة آثار التبريد على نمو النبات من حراشف البصلة

تحضير الوسط الغذائي

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،
2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/ اللتر).

ت) 10 مل من مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز الفيتامين

ح) 100 مل من مركز (BA) (10ميليجرام/100مل)

خ) 10 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/اللتر).

هـ) 2 ميلجرام قلايسين

و) 16 مل من مركز سلفات الأدنين (1 جرام/100مل)

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل وضبط الأس الهيدروجيني 5.7.
4- أضف 8 جرام آجار وذوبه
5- وزع 25 مل في أنابيب اختبار (150 × 25 مم) وتغطية الأنابيب.
6- التعقيم مدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.
7- يتم التبريد بميلان 45°.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- تتم إزالة قشور البصلة من نباتات النرجس أو النرجس البري التي أكملت الإزهار (Seabrook *et al*., 1976; Hussey, 1975).

2- قارن الأجزاء المنفصلة بين الأبصال التي تمت معاملتها بدرجة حرارة 11°م لمدة 6-8 أسابيع مع تلك الغير معاملة. أغسل الحراشف بالماء والصابون وأشطف تحت الماء الجاري لمدة 2 ساعة.

3- عقم سطحياً في 95% كحول لمدة 10 ثواني ثم 10% من كلور التبييض لمدة 20 دقيقة. أشطف 3 مرات بالماء المقطر المعقم.

4- تتم إزالة المناطق البعيدة والقريبة من حراشف البصلة ويتم تقطيع قاعدة الورقة غير الناضجة إلى أقسام بعرض 2 مم وطول 10 مم.

5- أدخل النهاية القاعدية في الآجار (شكل 7.2)

6- الحضانة في الرفوف

7- يمكن أن تشمل الاختلافات التجريبية اختبار تأثير 1000 ميليجرام/اللتر من هايدروليزات الكاسين في الوسط و/أو تراكيز مختلفة من (BA) و (NAA) في الوسط.

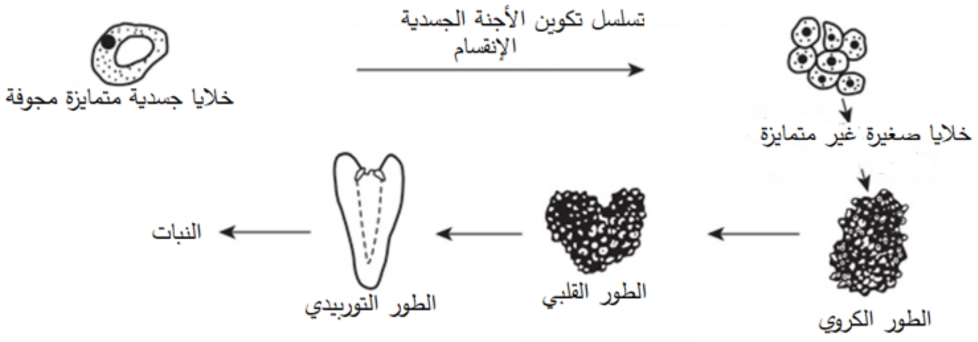
8- يمكن نقل البراعم إلى نفس الوسط السابق مع 2 ميليجرام في اللتر لكل من (BA) و(NAA) لتنمية السيقان.

9- يتم تجذير السيقان في وسط يحتوي على نصف تركيز أملاح موراشيجي وسكوج (1962) و20 جرام سكروز بدون هرمونات نباتية.

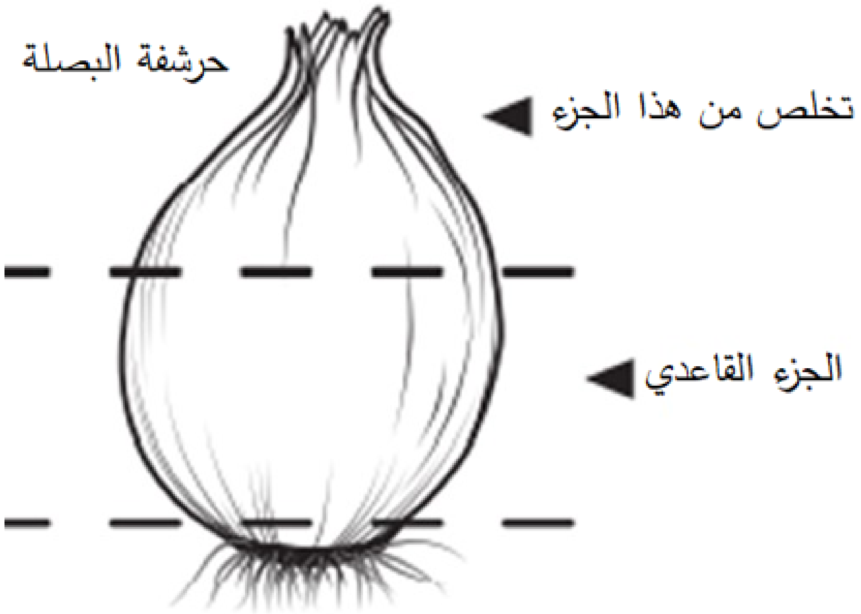
أورد (Seabrook *et al*., 1976) بأنه حصل على 2620 من أثنين من الأجزاء المنفصلة من قاعدة النبات، بينما بالطرق التقليدية، كان الحد الأقصى 50 بصيلة في عامين.

الأسئلة

1. كم عدد البراعم التي تطورت في كل جزء نباتي منفصل؟
2. هل نشأت البراعم من منطقة معينة على الجزء النباتي المنفصل؟
3. هل كان هناك أي اختلاف في عدد البراعم المتكونة بين الأبصال المعالجة بالبرودة وغير المعالجة بالبرودة؟ لماذا ؟
4 .إذا كان التلوث يمثل مشكلة، ناقش المصادر المحتملة للتلوث



شكل 7.1. خلال عملية تكوين الأجنة الجسدية، تخضع الخلية الجسدية (الغير مشيجية) للتمايز لتكوين هيكل ثنائي القطبية يحتوي على محوري الجذير والسويقة. هذا الجنين الجسدي قادر على النضج والإنبات *from* Smith, R.H. (2013)



شكل 7.2. زراعة اجزء القاعدي من حرشفة الأبصال.
from Smith, R.H. (2013)

زراعة الجزء القاعدي من حرشفة الأبصال

المراجع

Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis. In D. A. Evans, R. Sharp, P. V. Ammirato, and Y. Yamada (Eds.), *Handbook of plant cell culture: Techniques for propagation and breeding* (Vol. 1, pp. 82–123). New York: MacMillan.

Bianchi, R., Fambrini, M., and Pugliesi, C. (1999). Morphogenesis in *Helianthus tuberosus*: Genotype influence and increased totipotency in previously regenerated plants. *Biologia Plantarum*, 2(4), 515–523.

Bonga, J. M. (1977). Applications of tissue culture in forestry. In J. Reinert, and Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* (pp. 93–108). New York: Springer-Verlag.

Bonga, J. M. (1980). Plant propagation through tissue culture emphasizing wood species. In F. Sala, R. Parisi, R. Cella, and O. Ciferri (Eds.), *Plant cell cultures: Results and perspectives* (pp. 253–264). New York: Elsevier/North–Holland.

Borkird, C., Choi, J. H., and Sung, Z. R. (1986). Effects of 1, 2-dichloro-phenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot. *Plant Physiology*, 81, 1143–1146.

Bourque, J. E., Miller, J. C., and Park, W. D. (1987). Use of an *in vitro* tuberization system to study tuber protein gene expression. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 23, 381–386.

Cheng, T. Y. (1977). Factors affecting adventitious bud formation of cotyledon culture of Douglas fir. *Plant Science Letters*, 9, 179–187.

Cheng, T. Y. (1978). Clonal propagation of woody plant species through tissue culture techniques. *International Plant Properties Society*, 28, 139–155.

Durzan, D. J. (1980). *Progress and promise in forest genetics. Paperscience technology—The cutting edge*. Appleton, WI: Institute of Paper Chemistry (pp. 31–60).

Fujimura, T., and Komamine, A. (1979). Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in carrot cell suspension culture. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 95, 13–19.

Gautheret, R. J. (1966). Factors affecting differentiation of plant tissue *in vitro*. In W. Beerman (Ed.), *Cell differentiations and morphogenesis*. Amsterdam: North–Holland.

Halperin, W. (1969). Morphogenesis in cell cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 20, 395–418.

Hicks, G. S. (1980). Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Botany Review*, 46, 1–23.

Hussey, G. (1975). Totipotency in tissue explants and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. *Journal of Experimental Botany*, 26(91), 253–262.

Hussey, G., and Stacey, N. J. (1984). Factors affecting the formation of *in vitro* tubers of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Annals of Botany*, 53, 565–578.

Iqbal, M. M., Nazir, F., Iqbal, J., Tehrim, S., and Zafar, Y. (2011). *In vitro* micropropagation of peanut (*Arachis hypogaea*) through direct somatic embryogenesis and callus culture. *Int. J. Agric. Biol.*, 13, 811–814.

Kato, H., and Takeuchi, M. (1963). Morphogenesis *in vitro* from single cells of carrot root. *Plant and Cell Physiology*, 4, 243–245.

Konar, R. N., and Naagmani, R. (1974). Tissue culture as a method for vegetative propagation of forest trees. *New Zealand Journal of Forest Science*, 4, 279–290.

Krikorian, A. D., Dutcher, F. R., Quinn, C. E., and Steward, F. C. (1981). Growth and development of cultured carrot cells and embryos under space flight conditions. In W. R. Holmquist (Ed.), *Advances in space research* (COSPAR, 1980) (Vol. 11, pp. 117–127). New York: Pergamon.

Lee, K. S., Jean, H. S., and Kim, M. Y. (2002). Optimization of a mature embryos-based *in vitro* culture system for high-frequency somatic embryogenenic callus induction and plant regeneration from japonica rice cultivar. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71, 9–13.

Magyar-Tabori, K., Dobranszki, J., Teixeira da Silva, J. A., Bulley, S. M., and Hudak, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. Plant Cell Tiss Organ Cult, 101, 31–39.

Mallon, R., Rodriguez-Oubina, J., and Luz Gonzalez, M. (2011). Shoot regeneration from *in vitro* derived leaf and root explants of *Centaurea ultreiae*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture,* 106(3), 523–530.

McWilliam, A. A., Smith, S. M., and Street, H. E. (1974). The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Annals of Botany*, 38, 243–250.

Meng, L., Zhanag, S., and Lemaux, P. G. (2010). Toward molecular understanding of *in vitro* and in plant shoot organogenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29(2), 108–122.

Mingo-Castel, A. M., Negm, F. B., and Smith, O. E. (1974). Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiology*, 53, 798–801.

Mott, R. L. (1978). Tissue culture propagation of conifers. In K. Hughes, R. Henke, and M. Constatin (Eds.), *Propagation of higher plants through tissue culture* (pp. 125–133). Washington DC: US Technical Information Center.

Nomura, K., and Komamine, A. (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in carrot suspension culture. *Plant Physiology*, 79, 988–991.

Nordstrom, W., Tarkowski, P., Tarkowski, D., Norbaek, R., Astot, C., Dolezal, K., and Sandberg, G. (2004). Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceeding of National Academy of Science,* USA, 101, 8039–8044.

Palmer, C. D., and Keller, W. A. (2010). Plant regeneration from petal explants of *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(1), 91–100.

Raghavan, V. (1985). *Embryogenesis in angiosperms: A developmental and experimental study*. New York: Cambridge Univ. Press.

Reinert, J. (1958). Morphogenese und ihre Kontrolle an Gewebekulturen aus Karotten. *Naturwissenschaften*, 45, 344–345.

Seabrook, J. E. A., Cumming, B. G., and Dionne, L. H. (1976). *In vitro* induction of adventitious shoot and root apices on Narcissus (daffodil and narcissus) cultivar tissue. *Canadian Journal of Botany*, 54, 814–819.

Seabrook, J. E. A., and Cumming, B. G. (1977). The *in vitro* propagation of amaryllis (*Hippeastrum* spp Hybrids). *In vitro*, 13(12), 831–836.

Skoog, F., and Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symposium of the Society of Experimental Biology*, 11, 118–131.

Smith, S. M., and Street, H. E. (1974). The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucas carota* L.) are serially subcultured. *Annals of Botany,* 38, 223–241.

Sommer, H. E. (1975). Differentiation of adventitious buds on Douglas fir embryos *in vitro*. *Proceedings of the International Plant Properties Society*, 25, 125–127.

Sondahl, M. R., Caldas, L. S., Maraffa, S. B., and Sharp, W. R. (1980). The physiology of asexual embryogenesis. *Horticulture Review*, 2, 268–310.

Steward, F. C., Mapes, M. O., and Mears, K. (1958a). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *American Journal of Botany,* 45, 693–703.

Steward, F. C., Mapes, M. O., and Mears, K. (1958b). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705–708.

Sugiyama, M. (1999). Organogenesis *in vitro*. Current Opinion. *Plant Biolology*, 2, 61–64.

Sung, Z. R., Feinberg, A., Chorneau, R., Borkird, C., Furner, I., Smith, J., Terzi, M., LaSchiavo, R., Giuliano, G., Pitto, L., and Nutti-Ronchi, V. (1984). Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. *Plant Molecular Biology Reports*, 2, 3–14.

Tovar, P., Estrada, R., Schilde-Pentschler, L., and Dodds, J. H. (1985). Induction and use of *in vitro* potato tubers. *International Potato Center*, 13, 1–5.

Vega, R., Vasquez, N., Espinoza, A. M., Gatica, A. M., International Potato Center Melara, M. V. (2009). History of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* CU. 5272). *Review of Biological Tropicanae*, 57(i), 144–150.

Wang, P., Hu, C. (1982). *In vitro* mass tuberization and virus-free seed potato production. *Taiwan American Potato Journal*, 59, 33–37.

Warren, G. S., and Fowler, M. W. (1977). A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell cultures. *Plant Science Letters*, 9, 71–76.

Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., and Schmulling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of National Academy of Science*, 98(18), 10487–10492.

Westcott, R. J., Henshaw, G. G., and Roca, W. A. (1977). Tissue culture storage of potato germplasm: Culture initiation and plant regeneration. *Plant Science Letters*, 9, 309–315.

Zapata, C. C., Miller, J. C., and Smith, R. H. (1995). An *in vitro* procedure to eradicate potato viruses X, Y, and S from Russet Norkotah and two of its strains. *In vitro Cellular and Developmental Biology, Plant*, 31, 153–159.

Zuraida, A. R., Sur, R., WanZaliha, W. S., and Sreeramanan, S. (2010). Regeneration of Malaysian indica rice (*Oryza sativa* L.) variety MR 232 via optimized somatic embryogenesis system. *Journal of Phytology*, 2(3), 30–38.

Zuraida, A. R., Naziah, B., Zamri, Z., and Sreeramanan, S. (2011). Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 and 232 via somatic embryogenesis system. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1913–1921

الفصل الثامن

الشجيرات الخشبية والأشجار Woody Shrubs and Trees

تم استخدام الزراعة الدقيقة بشكل متكرر لإكثار شجيرات الزينة والأشجار، ومع ذلك، فإن استخدام هذه التقنية للمحاصيل الخشبية المعمرة غالباً ما تكون أكثر تعقيداً من التطبيقات الموازية للمحاصيل العشبية. يعود السبب الحقيقي لهذا الاختلاف بشكل عام إلى الصعوبة النسبية في زراعة النباتات المعمرة الخشبية الدقيقة مقارنة بالنباتات العشبية. يمكن للعديد من هذه المشاكل توضع تحت مصطلح "التمرد" (recalcitrance) ويمكن إرجاعها إلى عدد من العوامل، من أهمها دورة الحياة الخضرية المعقدة وبشكل عام نمو النباتات الخشبية البطيء (McCown, 2000). وتزيد عملية تعقيد الاستجابة والقدرة على التنبؤ في زراعة الأشجار المعمرة الدقيقة فترة السكون الموسمية القوية، والفترات المبرمجة والمحدودة لنمو البراعم الموسمي، والتغيرات الملحوظة في خصائص النمو عند تقدم دورة حياة النبات من المرحلة اليافعة لمرحلة النضج والبلوغ (juvenile to adult phases). على سبيل المثال، يمكن زراعة الأشجار والشجيرات بنجاح في الزراعات الدقيقة على المستوى التجاري فقط في المرحلة اليافعة (التشبيب) (rejuvenation) من دورة الحياة؛ وتكون هنالك صعوبة أو استحالة في إنشاء زراعات دقيقة من نفس النبات في مرحلة البلوغ من دورة حياته. وبالتالي، يجب استخدام مصادر نسيج البادرات لإنشاء الزراعات أو لفترة طويلة من التشبيب إما عن طريق معالجة النباتات المخزونة أو عن طريق الزراعة الفرعية المتسلسلة الدقيقة للبراعم النامية خارج الجسم الحي، ويجب إجراؤها قبل إنشاء زراعات صغيرة ناجحة. إن علم وظائف الأعضاء وراء هذا التمرد ليست مفهوماً تماماً، لكن الآراء المتعلقة بأساسها البيولوجي وطرق الحد من تأثيرها يمكن الحصول عليها من عدد من المراجعات (McCown, 1986; McCown and McCown, 1986; McCown, 2000).

غالباً ما تكون معدلات نمو البراعم والأنسجة الأخرى مثل نسيج كدب النباتات الخشبية المعمرة في الزراعة الدقيقة أبطأ مما يلاحظ في النباتات العشبية. يمكن أن يؤدي هذا النمو البطيء إلى تعقيد جميع مراحل الزراعة الدقيقة. من الصعب التغلب على تلوث الأنسجة المعزولة لأن الكائن الحي الملوث يمكن أن يتفوق بسهولة على أنسجة النبات بطيئة الاستجابة ويطغى على النسيج. قد يتطلب إنتاج الفسائل الدقيقة شهوراً من النمو بدلاً من أسابيع، مما يجعل اقتصاديات الاستنساخ خارج الجسم الحي أقل قابلية للقبول. إن تجديد الأعضاء العرضية بطيء نسبياً أيضاً، مما يعقد عملية استعادة النبتة من تجارب الهندسة الوراثية وزيادة تكلفة ومخاطر إنتاج التكاثر الدقيق.

يتم إنشاء معظم المحاصيل الخشبية في البداية في الزراعة الدقيقة باستخدام زراعة البراعم حيث يكون النهج تحفيز البراعم الإبطية هو الهدف الرئيسي. إن تم تحقيق نمو قوي من زراعات البراعم، تصبح هذه الزراعات

مخزوناً ملائماً يوفر الأنسجة للمعالجة التكنولوجية الحيوية أو البراعم الدقيقة من أجل الاستنساخ (McCown, 1985). هذا الاعتماد على زراعات البراعم كمصدر عام للأنسجة له مميزة تتمثل في القضاء على المشكلات المرتبطة بموسمية النمو، والسكون، وأوقات التأسيس الطويلة خارج الجسم الحي التي تواجه إعادة عزل الأجزاء النباتية المنفصلة من الأنواع الخشبية في كل مرة لأي تطبيق.

أحد الجوانب البارزة في زراعة براعم النباتات الخشبية المعمرة هي "الثبات" (stabilization). يشير الثبات إلى الفترة التي يتم فيها الحفاظ على البراعم بنشاط في الزراعة الدقيقة التي خلالها تتغير خصائص نمو البراعم إلى نوع من النمو أكثر تأقلماً مع بيئة الزراعة الدقيقة. في بداية الثبات (بعد العزل الأولي الناجح للسيقان أو البراعم)، يتسم نمو البراعم المبكر لتدفق النمو غير المنتظم الذي ينتج غالباً براعم صغيرة تظهر بأوراق كبيرة مشوهة. وغالباً ما يتم ملاحظة إنتاج نسيج الكدب المتزايد في هذه المرحلة المبكرة من الثبات. نظراً للزراعة الفرعية المنتظمة لأي براعم جديدة يتم إنتاجها في الزراعة الدقيقة، فإن مظهر نمو البراعم يتغير تدريجياً إلى مظهر يتسم بنمو متواصل وقابل للتكرار للبراعم المنتظمة ذات الأوراق الصغيرة؛ ومن الناحية المثالية يظهر فيها القليل من التكدب (callusing). إن أوضح مؤشر على اكتمال مرحلة الثبات هو إن كل زراعة فرعية تنتج نفس النوع من زراعة البراعم (معدل نمو منتظم ومستمر مظهر موحد للبراعم) كما هو واضح في الزراعة الفرعية السابقة. البراعم التي يتم حصادها من زراعات البراعم الثابتة هذه تستجيب بشكل أكثر اتساقا ونجاحاً للتجذير والتأقلم من مخزون البراعم الغير مستقرة. وبالمثل، فإن الأنسجة، الخلايا، والمحتوى الخلوي المعزولة من مزارع البراعم الثابتة تكون أكثر استجابة (Russell and McCown, 1986). تختلف الفترة المطلوبة لتحقيق الاستقرار بشكل كبير اعتماداً على النبات وتاريخه وعوامل أخرى. يتم الثبات في بعض الزراعات بعد 2-5 زراعات فرعية. زراعات أخرى تتطلب أكثر من 20 زراعة فرعية (أكثر من سنتين)، وفي نباتات أخرى مثل (*Quercus*) لم يتم فيها الثبات بنجاح في زراعة البراعم. وبالتالي، فإن تطبيق التكنولوجيا الحيوية والإكثار الدقيق على بعض المحاصيل النباتية الخشبية محدود.

بالرغم من هذه العيوب الواضحة، فقد نجح تطبيق الزراعة الدقيقة على مجموعة واسعة من الأشجار والشجيرات (Jain, 2003). هذا صحيح بشكل خاص مع تطبيق تقنيات التكاثر الدقيق. الأنواع الناجحة لها عدد من الخصائص المتشابهة. من الناحية البيولوجية، عادة ما تكون المحاصيل الناجحة من الأشجار والشجيرات التي تنمو بشكل أسرع. من الناحية الاقتصادية، تلك الاختيارات التي يمكن الادعاء بقيمتها العالية نسبياً في السوق يتم تسويقها بنجاح. تعتبر القيمة العالية أمراً بالغ الأهمية بما أن تكاثر الأشجار والشجيرات المنتجة بالإكثار الدقيق هي أغلى بكثير من نظيراتها من المحاصيل العشبية بسبب زيادة لطول فترة الإنتاج في الزراعة الدقيقة.

الأملاح المعدنية الأكثر استخداماً في زراعة المحاصيل الخشبية الدقيقة هي (Woody Plant Medium (WPM)) (Lloyd and McCown, 1980) الموضحة في جدول 8.1. تم تطوير الوصفة بعد أن تم اكتشاف أن الكثير النباتات الخشبية لا تتحمل نسبة الملح المرتفعة نسبياً ومستويات الكلوريد العالية الموجودة في وصفات مثل موراشيجي وسكوج (1962).

يعتبر التكاثر الدقيق أوسع تطبيقات الزراعة الدقيقة على الأشجار والشجيرات. تستند التدريبات التالية إلى بروتوكولات التكاثر الدقيق الناجحة المستخدمة في التطبيقات التجارية. يجب الإشارة إلى المشكلتين الرئيسيتين اللتين يمكن أن تتسبب في تعقيد استخدام النباتات المعمرة الخشبية في البيئة الأكاديمية وهما:

1. قد يكون من الصعب الحصول على المواد النباتية المناسبة للعزل. على النحو الأمثل، يجب أن تكون المادة في حالة نمو نشط ويتم الحصول عليها من البذور والشتلات، أو النباتات التي تم تكاثرها حديثاً. تم اختيار الأمثلة في هذه التمارين لأن المواد متاحة على مدار العام في معظم المناطق.

2. قد تكون استجابة الأنسجة بطيئة في الزراعة. وبالتالي إذا كان المطلوب إظهار جميع مراحل عملية الزراعة المصغرة، فقد يكون من المناسب بدء مجموعات طلابية مختلفة في خطوات مختلفة في عملية التكاثر الدقيق. على سبيل المثال، يمكن لبعض المجموعات أن تقوم بالعزل، وبعض المجموعات تقوم بالزراعة الفرعية والتكيف الأمثل باستخدام زراعات البراعم القائمة بالفعل، وتقوم مجموعات أخرى في تجذير وتأقلم من البراعم الدقيقة.

إكثار نباتات الرودودندرون والأزاليا *Rhododendrons and Azaleas*

هذه النباتات من عائلة (Ericaceae) وهي من أوائل الشجيرات الخشبية التي نجحت بشكل فعال في التكاثر الدقيق على النطاق التجاري (McCown, 1986; McCown and McCown, 1986; Eeckhaut *et al*., 2010; Economou and Read, 1984; Ettinger and Preece, 1985; McCowan and Lloyd, 1983). إن نباتات مثل (*Kalmia*) و(*hododendron*) و(*Vaccinium*) يتم تكاثرها الآن من خلال التكاثر الدقيق على نطاق واسع؛ وبعض يمكن استنساخها فقط تجارياً بالتكاثر الدقيق. أحد أسباب النجاح النسبي في التكاثر الدقيق في هذه النباتات هو سهولة ثبات الزراعات. عائلة (Ericaceae) كمجموعة لا تتحمل هرمون (BA) وأملاح موراشيجي وسكوج وكليهما يوقفان نمو البراعم. لهذا السبب، يتم استخدام (2iP) و(Zeatin) في وسط النباتات الخشبية (WPM) بشكل شائع.

الغرض:

إكثار نبات (*Rhododendron* sp.) عن طريق تكاثر البرعم الإبطي (زراعات البراعم).

تحضير الوسط الغذائي

الوسط الغذائي للنباتات الخشبية (WPM) مع 1.0 ميكرومولار (2iP) جدول 8.1.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- الحصول على نبتة نشطة النمو أو براعم من نبات أزاليا (azalea) أو عريضة الأوراق رودودندرون (rhododendron)، من الحديقة أو من نبات محفوظ بوعاء في بيت محمي. من الناحية المثالية، يتم اختيار البراعم التي تنشأ من منطقة السطح البني أو السطح الوسيط (interface) بين الجذر/البرعم (الطوق collar)، حيث ستكون هذه البراعم هي الأكثر حداثة. يتم عزل القمة النامية (قمة 2 سم) وقطعة من أسفل القمة حوالي 2 سم.

2- إزالة جميع الأوراق التي يمكن قطعها بسهولة من الساق.

3- التعقيم السطحي (مع التحريك الشديد) لمدة 10 إلى 15 دقيقة في 10% (حجم/حجم) من مبيض الكلور مع قطرتين لكل 100 مل من توين 20 والشطف ثلاث مرات بالماء المعقم.

4- اقطع الجذع إلى قطع جذعية فردية تحتوي كل منها على برعم قمي أو 1-3 عقد.

5- ضع كل جزء نباتي منفصل بطرفه القاعدي لأسفل في الوسط بحوالي ربع طوله.

6- الحضانة في طول نهار طويل (16-24 ساعة).

7- عند انبثاق السيقان من البراعم المتشكلة مسبقاً تتم إزالتها بمجرد وصولها لطول 1سم ووضعها في وسط جديد. تزيد إزالة قمم البراعم من التفرع. كرر هذا الإجراء بأسرع ما يمكن ولاحظ التغيير في جودة البراعم والاستجابة (الثبات) مع زيادة عدد الزراعات الفرعية.

دراسات متقدمة

بمجرد أن يتم إنشاء زراعات البراعم النشطة، يمكن إجراء تجارب توضح تأثير هرمون (2iP) على منحنى الاستجابة (0.0، 0.1، 1.0، 10، و40 ميكرومول) بالزراعة الفرعية في كل من هذه الأوساط.

يمكن حصاد البراعم الدقيقة التي لا يقل طولها عن 2 سم، ووضعها في الماء، ثم يتم زراعتها في وسط تجذير نظيف (على سبيل المثال، 1:1 الخث/ الفيرميكولايت أو الخث/ الرمل) في صندوق مغلق من البلاستيك الشفاف الرطب. يتم وضع الصناديق تحت ضوء غير مباشر في درجة الحرارة الغرفة وتستخدم القصاصات حسب الحاجة (ولكن لا تشبع الوسط). يمكن ملاحظة التجذير في غضون شهر.

الورود

بشكل عام، لا يتم استخدام التكاثر الدقيق على نطاق واسع للورود التي يمكن استنساخها بسهولة عن طريق العقل التقليدي أو عن طريق التطعيم. ومع ذلك، يتم استخدام التكاثر الدقيق لزيادة مخزون الاختيارات الجديدة بسرعة (Dubois *et al*., 1988; Hasegawa, 1979; Pati *et al*., 2005). يمكن أن يستخدم مخزون التكاثر الدقيق بعد ذلك في التكاثر التقليدي. كما يمكن زراعة النباتات في أواني صغيرة ويتم إزهارها مبكراً لإنتاج نباتات أوعية مزهرة فريدة من نوعها، والتي يمكن زراعتها واستخدامها كنباتات زينة داخلية وخارجية.

الغرض:

إكثار الورد (*Rosa* sp.) عن طريق تكاثر البرعم الإبطي (الزراعات النامية).

تحضير الوسط الغذائي:

أملاح موراشيجي وسكوج الغير عضوية، 30 جرام/اللتر سكروز، 100 ميليجرام/اللتر ميو إينوزيتول، فيتامينات موراشيحي وسكوج، 8 جرام /اللتر آجار TC مع 1 ميكرومول (BA).

الجزء النباتي المنفصل

1- الحصول على براعم تنمو بنشاط من الحديقة، البيوت المحمية، أو نبات محفوظ في وعاء.
2- المضي قدماً في هذه البراعم كما هو موضح سابقا لرودوديندرون.

دراسات متقدمة

بمجرد إنشاء زراعات براعم نشطة النمو، يمكن إجراء تجارب توضح تأثير منحنى الاستجابة (0.0، 1.0، 4.0، و10ميكرومول) بزراعة البراعم الفرعية في كل من هذه الأوساط.

يتم حصاد البراعم الصغيرة أقل من 2 سم ووضعها في الماء ثم زراعتها في وسط تجذير نظيف (على سبيل المثال، 1:1 الخث/الفيرميكولايت أو الخث/ الرمل) في صندوق مغلق من البلاستيك الشفاف الرطب. ضعها تحت ضوء غير مباشر في درجة حرارة الغرفة والري الضبابي حسب الحاجة (ولكن لا تشبع الوسيط).

يجب ملاحظة التجذير في غضون شهر.

جدول 8.1. مكونات وسط الأشجار الخشبية[1] مع 1.0 ميكرومول (2iP)

المركز	المكونات	جرام في اللتر[2]	ميليلتر في اللتر[3]	ميليجرام في اللتر[4]
A	NH_4NO_3	20.0	20	400
	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	27.8		556
B	K_2SO_4	49.5	20	990
C	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	19.2	5	96
D	KH_2PO_4	34.0	5	170
	H_3BO_3	1.24		6.2
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.05		0.25
E	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	74.0	5	370
	$MnSO_4 \cdot H_2O$	3.38		16.9
	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1.72		8.6
	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.005		0.025
F[5]	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5.5	7 5	27.8
	Na_2EDTA	7.45		37.3
G[6]	Thiamine · HCL	0.2	5	1.0
	Nicotinic acid	0.1		0.5
	Pyridoxine · HCL	0.1		0.5
	Glycine	0.4		2.0
H	Myo-inositol	20. 0	5	100
مكونات أخرى				جرام في اللتر
Sucrose				20
Calcium gluconate				1.3
Agar				3.0
Gelrite				1.1

ملاحظة: كل المركزات ما عدا (G) بكميات كبيرة ويتم تعقيمها. يضبط الرقم الهيدروجيني في الوسط للمستوى المطلوب (عادة 5.6) باستخدام (KOH) بعد إضافة الآجار.

[1] Lloyd, G. B., and McCown, B. H. (1980). International Plant Propagation Society, 30, 421–427

[2] تركيز المخزون (المركز)

[3] حجم المركز الذي يضاف للوسط

[4] التركيز النهائي في الوسط

[5] يتم تحضير المركز بإذابة كل مكون على حدة بنصف الحجم النهائي من الماء المقطر (يحتاج لتسخين) ثم يضافان لبعضهما ليكونا محلول أصفر

[6] يتم تعقيم هذا المركز بالترشيح ويحفظ مجمداً في عبوات 10–20 مل

[7] Zeldin, E. L., and McCown, B. H. (1986). Abstracts of the VIth IAPTC Congress, p. 57.

المراجع

Dubois, L. A. M., Roggemans, J., Soyeurt, G., and Devries, D. P. (1988). Comparison of the growth and development of dwarf rose cultivars propagated *in vitro* and *in vivo* by softwood cuttings. *Scientia Horticulturae*, 35, 293–299.

Economou, A. S., and Read, P. E. (1984). *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas. *HortScience*, 19, 60–61.

Eeckhaut, T., Janssens, K., De Keyser, E., and De Reik, J. (2010). Micropropagation of Rhododendron. *Journal of Methods in Molecular Biology*, 589, 141–152.

Ettinger, T. L., and Preece, J. E. (1985). Aseptic micropropagation of Rhododendron PJM hybrids. *Journal of Horticultural Science*, 60, 269–274.

Hasegawa, P. M. (1979). *In vitro* propagation of rose. *HortScience*, 14, 610–612.

Jain, S. M., and Ishii, K. (Eds.), (2003). Micropropagation of woody trees and fruits. springer *Forestry Sciences* (Vol. 75). p. 852 ISBN 978-1-4020-1135-1.

Lloyd, G., and McCown, B. (1980). Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, Kalmia latifolia, by use of shoot-tip culture. Combined *Proceedings of the International Plant Properties Society*, 30, 421–427.

McCown, B. H. (1985). From gene manipulation to forest establishment: Shoot cultures of woody plants can be a central tool. *TAPPI Journal*, 68, 116–119.

McCown, B. H. (1986). Woody ornamentals, shade trees, and conifers. In R. H. Zimmerman, R. J. Griesbach, F. A. Hammerschlag, and R. H. Lawson (Eds.), *Tissue culture as a plant production system for horticultural crops* (pp. 333–342). Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff.

McCown, B. H. (1989). Betula, the birches. In Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in agriculture and forestry*: Trees II (Vol. 5, pp. 324–341). New York: Springer-Verlag.

McCown, B. H. (2000). Recalcitrance of woody and herbaceous perennial plants: Dealing with genetic predeterminism. *In vitro Celular and Developmental. Biology-Plant*, 36, 149–154.

McCown, B. H., and Amos, R. (1979). Initial trials with commercial micropropagation of birch selections. *Combined Proceedings of the International Plant Properties Society*, 29, 387–393.

McCown, B. H., and Lloyd, G. B. (1983). A survey of the response of *Rhododendron* to *in vitro* culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2, 77–85.

McCown, D. D., and McCown, B. H. (1986). North American hardwoods. In J. M. Bonga, and D. J. Durzan (Eds.), 2nd ed. *Cell and tissue culture in forests. Case histories:*

Gymnosperms, angiosperms and palms (Vol. 3, pp. 247–260). Dordrecht, The Netherlands: Martinus Nijhoff.

Magnusson, V. A., Castillo, C. M., and Dai, W. (2009). Micropropagation of two elite birch species through shoot proliferation and regeneration. *Acta Hort*. (ISHS), 812, 223–230. http://www. actahort.org/books/812/812_28.htm.

Pati, P. K., Rath, S. P., Sharma, M., Sood, A., and Ahuja, P. S. (2005). *In vitro propagation of rose—a review*. Available on line at www.sciencedirect.com. (Biotechnology Advances, Elsevier), pp. 95–109.

Russell, J. A., and McCown, B. H. (1986). Culture and regeneration of *Populus* leaf protoplasts isolated from non-seedling tissue. *Plant Science*, 46, 133–142

الفصل التاسع

نباتات أحادية الصيغة الصبغية من زراعة المتك Haploid Plants from Anther Culture

الغرض من زراعة المتك وحبوب اللقاح هو إنتاج نباتات أحادية الصيغة الصبغية (haploids) من خلال تحفيز التكوين الذكوري (تطوير أحادية الصيغة الصيغية من الأمشاج الذكرية) في الخلايا أحادية الصيغة الصبغية لحبوب اللقاح غير الناضجة. وصف (Seguì-Simarro and Nuez, 2007; Raghavan, 1997) مراحل تنامي البويغات الذكرية باستخدام المجهر الضوئي والإليكتروني.

تتعدد أسباب أهمية النباتات أحادية الصيغة الصبغية، وأهمها امتلاك مجموعة واحدة فقط من الكروموسومات، وحتى الطفرات المتنحية يتم التعبير عنها ظاهرياً. يهتم مربو النباتات بشكل خاص بالنباتات أحادية الصيغة الصبغية إما تلقائية مضاعفة عدد الكروموسومات (2n) عن طريق الانقسام الفتيلي الداخلي (endomitosis) أو المعاملة الكيميائية بالكولكسين أو العوامل المضادة للانقسام الفتيلي (Dhooghe *et al*., 2011) لمضاعفة عدد الكروموسوم التي يمكن أن تؤدي إلى ظهور نباتات متماثلة اللواقح (homozygous plants). يمكن اختيار هذه النباتات للخصائص المرغوبة واستخدامها كأبوين هجينين دون الاحتياج إلى 3–5 أجيال لإنتاج خطوط مستقرة متماثلة اللواقح. بالإضافة إلى أهمية مضاعفة أحاديات الصيغة الصبغية في رسم الخرائط الجزيئية (Croser *et al*., 2006).

هنالك العديد من العوامل تؤثر على نجاح زراعة المتك، مثل، وضع النبات المانح الطبيعي كالحالة التغذوية والعمر الفسيولوجي، والظروف البيئية مثل درجة الحرارة والفترة الضوئية، والنمط الجيني (على الرغم من بعض الأنماط الجينية لا تستجيب) له أهمية قصوى. بشكل عام، المتوك من الأزهار التي تظهر مبكراً أكثر استجابةً. كما إن مرحلة حبوب اللقاح التنموية لها أهمية كبيرة، فعادة ما تكون مرحلة النواة الوحيدة هي الأكثر استجابة. وصف (Seguì-Simarro and Nuez, 2007) بالتفصيل نهجهم في تحديد مرحلة البويغة الذكرية التنموية مع حجم برعم الزهرة. كما أن هنالك عدد من المعاملات المسبقة إما لبرعم الزهرة (عموماً 5°م لعدد من الساعات أو الأيام) أو النبات بأكمله مما يعتبر ضرورياً في بعض الأنواع.

أوضح (Dunwell, 1976) تأثير كلاً من شدة وفترة الضوء في البيئة التي ينمو فيها النبات المانح، بالإضافة إلى درجة الحرارة والحالة الغذائية للنبات والوسط الغذائي على إنتاج النباتات من زراعة المتك. من الواضح سهولة معاملة النباتات المانحة المزروعة في البيوت المحمية من النباتات الأكبر حجماً مثل الأشجار والمواد النباتية المزروعة في الحقول. تعتبر مكونات الوسط الغذائي من الأملاح غير العضوية ومصدر الكربوهيدريتات وإضافة الفحم النباتي المنشط وتركيبات وتراكيز منظمات النمو بالإضافة المواد الهلامية للتصلب أمراً حاسماً. في

بعض الأحيان، تتطلب الزراعات الزراعة الفرعية وتغييرات في الوسط، بالإضافة إلى التغييرات في ظروف الزراعة من درجة حرارة وشدة وفترة الضوء. بالإضافة إلى ذلك، هناك تحديات الاستجابة المنخفضة للمتوك المزروعة، مما يتطلب أحياناً آلاف المتوك لكل معاملة، وإنتاج مستوى صبغيات مختلط (mixiploids)، والمشكلة الحقيقية هي نباتات المهق (albino) التي تنتج عن زراعة المتك.

بالنظر إلى كل هذه المعلمات للتحسين، عادة ما تبدأ عملية نجاح الحصول على العمليات بمراجعة الأدبيات من الأوراق المنشورة عن الأساليب الناجحة كما ورد عن (Gosal *et al*., 2010; Ferrie and Mollers, 2011; Sundar and Jawahar, 2010; Croser *et al*., 2006; Ferrie *et al*., 2011; Germanà, 2011a, b; Dunwell, 2010; Kim and Baeziger, 2005).

عندما تظهر النبيتات من المتك، يمكن أن تكون أحادية الصيغة الصبغية، أو ثنائية الصبغيات، أو بصيغة صبغية مختلطة، وينتج عنها في كثير من الحالات بلا صبغة (نباتات المهق). وجد (Luitel and Won Hee, 2011) نباتات الفلفل الحلو أحادية الصيغة الصبغية قصيرة وبثمار صغيرة مقارنة بالنباتات ثنائية الصيغة الصبغية. بشكل عام، النباتات أحادية الصيغة الصبغية صغيرة في الحجم (Dunwell, 2010; Smith *et al*., 1981; Norris *et al*., 1982) ولديها عدد أقل من الخلايا الحارسة. يمكن أن يتم تحديد الحالة الصبغية عن طريق قياس التدفق الخلوي (flow cytometry) (Seguì-Simarro and Nuez, 2007; Biswas *et al*., 2011)، أو باستخدام جهاز بارتك (Partec) لتحليل عداد الخلايا (Ferrie *et al*., 2011) أو عد الكرومسومات (Biswas *et al*., 2011). وقد حدد (Biswas *et al*., 2011) تماثل الزايجوتات في برتقال فالنشيا أحادي الصيغة الصبغية باستخدام 43 من علامات تكرار التسلسل البسيط (SSR). بشكل عام، يمكن مضاعفة الكروموسومات بغمر النبات الصغيرة في 0.5% (وزن/حجم) من محلول الكولكسين لمدة 24-48 ساعة متبوعة بالشطف بالماء المقطر المعقم. استعرض (Dhooghe *et al*., 2011) مضادات انقسام فتيلي أخرى تم استخدامها لمضاعفة الكروموسومات.

مراجعة الأدبيات الخاصة بأنواع نباتية معينة توفر نقطة انطلاق لتحديد:

- وسط الزراعة
- ظروف نمو النباتات التي تم أخذ المتك منها
- المتطلبات المحددة لمرحلة تطوير البويغة الذكرية للاستجابة المثلى
- معاملات ما قبل الزراعة لتعزيز الاستجابة
- حالات الضوء والظلام (الطيف الضوئي) ودرجة حرارة الزراعة
- تغييرات الوسط الضرورية خلال الزراعة

- معدل الزراعة المتوقع
- فصل أحادية الصبغيات من ثنائية الصبغيات متماثلة الزيجوت، وما إلى ذلك، والاختبار اللاحق وتحديد الأحاديات والثنائيات المتماثلة اللواقح.

توفر التعليقات العامة المذكورة أعلاه مستوى قاعدي لمعرفة إجراء التمارين التالية باستخدام المتوك المشتقة من النباتات التي ستستجيب لزراعة الخلايا. تستخدم في التمارين المواد النباتية التي تتوفر على نطاق واسع لتحديد المهارات الفردية في إعداد الوسط والتطهير السطحي واستئصال الجزء النباتي المنفصل (الاستئصال بعناية لتجنب الكدمات) وهي كافية لاستنبات أنواع نباتية أكثر صعوبة بنجاح.

زراعة متك الداتورا Datura Anther Culture

الغرض:

لفحص تأثير الفحم النباتي المنشط على استجابة المتك

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ) وسط متك الداتورا

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر).

ت) 40 جرام سكروز

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل.

4- ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

5- تقسيم الوسط جزأين متساوين (500 مل لكل).

ت) أضف لواحد من الأجزاء 4 جرام آجار بدون فحم نباتي

ث) أضف للجزء الآخر 4 جرام آجار و1.5 جرام فحم نباتي مغسول بالحامض (0.3% وزن/حجم).

ج) غطي فوهة القوارير بشريحة من ورق الألمونيوم.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع لمدة 15 دقيقة.

7- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

ملاحظة:

يمكن أن تشمل الاختلافات في هذه التجربة (أ) عدم استخدام آجار وتعويم المتوك في وسط سائل. (ب) معاملات التبريد (4–12°م لمدة 12–24 ساعة).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

يزهر نباتات الداتورا في غضون 8–10 أسابيع من إنبات البذور، لكن في هذه التجربة أترك النبات لفترة 8–12 أسبوعا لينمو النبات ويزهر.

1- حجم البرعم هو مؤشر لمرحلة تطور البويغة الذكرية. بشكل عام، إن حجم البرعم بين 4.6–6.0 سم يكون في مرحلة النواة الواحدة وهي المرحلة الأكثر استجابة.

2- أخذ عينة من البرعم ويوضع المتك على شريحة؛ ينقع في 1–2 قطرة من صبغة أسيتوكارمين (acetocarmine).

3- ادفع القطع الكبيرة من المتك إلى جانب وتسخين الجانب برفق بتمريره فوق اللهب. ضع غطاء الشريحة. يتم فحص الشريحة تحت المجهر الضوئي لتحديد مرحلة تطور البويغة الذكرية.

4- أغسل البراعم بالماء الدافئ والصابون. يتم التعقيم بمحلول كلور التبييض بتركيز 5% وقطرتين من توين 20 لكل 100 مل ثم الشطف 3 مرات بالماء المعقم.

5- إزالة الكأس وقطع البتلات والتقشير لكشف المتوك في البرعم.

6- اقطع الخيط برفق من قاعدة المتك

7- تتم الحضانة في غرفة الحضانة.

8- تظهر الاستجابة خلال 4–8 أسابيع.

الأسئلة:

أ) ناقش العوامل الأخرى التي قد تؤثر على استجابة البويغة الذكرية. وكيف بمكن زيادة استجابة المتك.

ب) كيف يمكن التأكد من أن النبات الذي تم الحصول عليه عن طريق زراعة المتك مشتق بالفعل من حبوب اللقاح؟

ت) ما هو تأثير إضافة منظمات نمو النبات إلى الوسط؟

ث) ما هي وظيفة الفحم النباتي المنشط في الوسط؟

البنفسج الإفريقي African Violet

الغرض:

زراعة متك البنفسج الأفريقي (*Saintpaulia ionantha*) لإنتاج نباتات أحادية الصيغة الصبغية ولمراقبة تأثير الصبغيات على حجم النبات والنمط الظاهري.

تحضير الوسط الغذائي:

(لعمل واحد لتر مكافئ) وسط متك البنفسج الأفريقي

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من مخزون المركزات المبينة في جدول 9.1.

ب) 346 ميليجرام $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$

ت) 64 ميليجرام KCl

ث) 30 جرام سكروز

ج) 50 مل من مركز IAA (10 ميليجرام/100 مل)

ح) 5.0 مل من مركز كينتين (10 ميليجرام/ 100مل

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 6.0.

4- أضف 8 جرام آجار والتذويب

5- وزع الوسط في أنابيب اختبار (25 × 150 مم) والتغطية.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع لمدة 15 دقيقة

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- يمكن الحصول على نباتات البنفسج الأفريقي الصحية في أي موسم من معظم المشاتل.

2- يتم اختيار أنواع النباتات غير المبرقشة لأن النباتات المبرقشة تبدو لا تستجيب في الزراعة.

3- اجمع براعم الزهور غير المفتوحة بطول 2-6 مم.

4- سجل حجم براعم الزهرة.

5- لف البراعم في مربعات من القماش القطني بمقياس 10 سنتيمترات مربعة.

6- التعقيم في كلور التبييض بتركيز 5% لمدة دقيقتين. ثم الشطف بالماء المعقم 3 مرات.

7- في طبق بتري معقم، يتم تشريح المتوك غير الناضجة، مع الحرص على عدم إصابة المتوك بكدمات أو إتلافها. ثم قطع الخيوط والتخلص منها وتكون المتوك جاهزة للزراعة ووضعها في الحاضنة.

الملاحظات:

أ) يجب أن تظهر المتوك الصغيرة في غضون 7-8 أسابيع. يتم إنتاج النباتات بواسطة 3-4% من المتوك المزروعة، لكنها قد تكون أو لا تكون أحادية الصيغة الصبغية. فعليه ضرورة فحص الكروموسوم للتأكد. إذا تم إتباع أسلوب جيد، يجب أن يكون التلوث منخفضاً (على سبيل المثال، 0-20%).

ب) بعد 2-3 شهور من الزراعة يمكن فصل النباتات بعناية من المتك ويوضع في طبق بتري معقم يحتوي على فيرميكيولايت مبلل لينمو أكثر. البديل لهذه المرحلة هو فصل النباتات المشتقة من المتك وإزالة الأوراق وزرعها على وسط التجذير الذي يحتوي على أملاح موراشيجي وسكوج + 2% سكروز + 100 ميليجرام في اللتر ميو-أنيزوتول + 0.6% آجار. ستتطور الجذور خلال 2-4 أسابيع ويتم نقلها إلى طبق بتري يحتوي على فيرميكيولايت ويمكن أن تنقل إلى أصيص يحتوي على خليط لزراعة البنفسج الأفريقي بعد 4-6 أسابيع. تنقل النباتات إلى وسط التجذير، وعادة ما يكون التجذير 100%.

عادة ما يتم تجذير الأوراق والبراعم المشتقة من المتك عند نقلها إلى وسط التجذير بنسبة تجذير تبلغ 100٪.

تقنية سحق الكروموسوم في قمة الجذر النامية Root Tip Chromosome Squash Technique

تستخدم هذه التقنية لتحديد مستوى الصبغية في نباتات البنفسج الأفريقي من زراعة المتك. يمكن أستخدام عقل الجذور (مثل نباتات البنفسج الأفريقي التي تم تجذيرها في ماء مقطر في محلول مغذي مخفف لمدة 2-3 أسابيع):

1- ضع قمة الجذر في حامض هيدروكلوريك (5 N) لمدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

2- أشطف ثلاث مرات في الماء المقطر.

3- نقع كل قمة جذر برفق في قطرة من 0.05 تولويدين أزرق (toluidine blue) محايد (buffered) عند درجة الحموضة 4.0 (0.1 مولار حامض الستريك، 0.2 مولار Na_2HPO_4.) يتوتر النسيج سريعاً ويسهل تصبيغها. يمكن السحق والملاحظة تحت المجهر.

الأسئلة

1. هل تعتقد أن تغيير درجة الحموضة من 5.5 إلى 6.0 سيؤثر على استجابة المتك؟

2. ما هي قيمة تخفيض الحجم في نبات المحاصيل البستانية؟

3. هل تعتقد أن الفحم المنشط المضاف إلى الوسط سيؤثر على استجابة المتك؟.

التبغ (نبات الدخان) Tobacco

الغرض:

زراعة متك نبات التبغ وملاحظة تطور النباتات أحادية الصيغة الصبغية.

تحضير الوسط الغذائي:

(لعمل واحد لتر مكافئ) وسط متك نبات التبغ.

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،
2- أخلط ما يلي:
أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج (نترات 0، هاليدات، سلفات، NaFeEDTA، PBMo)
ب) 2.5 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)
ت) 10 مل من مركز ميوأنيزتول (10ميليجرام/التر)
ث) 30 جرام سكروز
ج) 2 ميليجرام قلايسين
ح) 10 مل مركز فتتمينات
3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الرقم الهيدروجينيإلى 5.7.
4- أضف 8 جرام آجار وذوبه.
5- وزع 25 مل في أنابيب اختبار (150 × 25 مم) وغطها.
6- عقم في السخان المائي الضاغط في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.
7- لتجريب الاختلافات، اختبر 40 جرام سكروز و 0.1 ميليجرام/اللتر (IAA).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- اجمع براعم الأزهار غير المفتوحة في المرحلة التطورية التي تكون فيها التويج والكأس متساويان في الطول (0.8-3 سم). هذه المرحلة من تطور برعم الزهرة تكون البويغات الذكرية في مرحلة وحيدة النواة.
2- لف البراعم في شاش قطني 10 سم^2 وعقم في 20% من كلور التبييض لمدة 10 دقائق ثم أشطف 3 مرات بالماء المعقم.
3- عزل وزراعة المتك بعناية.
4- الحضانة في غرفة الحاضنات

الملاحظات

استخدم (Carlson, 1970) متوك في مرحلة الرباعيات المتأخرة (late-tetrad-stage) من نبات التبغ (*Nicotiana tabacum* (L.) var. “Wisconsin 38”) وتحصل على 12% استجابة من المتوك.

يعتبر عدد الثغور الموجودة في الجانب السفلي مؤشر جيد لتحديد المستوى الصبغي للنباتات التبغ المشتقة من المتك. فالنباتات أحادية الصيغة الصبغية تحتوي على نصف عدد الثغور في النباتات المانحة ثنائية الصيغة الصبغية في مساحة معينة من الورقة. لحساب عدد الثغور، إنزع قشرة رقيقة من البشرة ووضعها مباشرة على قطرة من الماء على شريحة مجهر وتغطيتها بغطاء الشريحة ثم إحصاء عدد الثغور في مجال الرؤية المحدد.

الأسئلة

1- لماذا لا توجد منظمات نمو النبات في هذا الوسط؟
2- ما هي ظروف الزراعة الأخرى التي يمكن فحصها لتعزيز استجابة المتك؟
3- كيف يمكن مضاعفة نبات تبغ أحادي الصيغة الصبغية مشتق من زراعة المتك؟
4- ما هو متوسط عدد الثغور في النبات الأم والنباتات المشتقة من المتك؟

تقنية سحق المتك Anther Squash Technique

لتحديد مرحلة تطور البويغة الذكرية (حبوب اللقاح) داخل المتك من الضروري فحص البويغات الذكرية.

1- أجمع المتوك من براعم الأزهار في مراحل مختلفة من التطور.
2- ضع المتوك في محلول 3:1 من الكحول وحمض الخليك لمدة 1-2 ساعة أو طوال الليل.
3- ضع المتك على شريحة نظيفة. أضف قطرة من 0.8% صبغة أسيتورسين (acetoorcein) في 40% حمض الخليك. (استخدم 1% أورسين (orcein) في 50% حامض خليك أو 1.0 جرام أورسين في 50 مل من حامض خليك مثلج. أغلي في دورق فوقه قمع وإزالته على الفور من الحرارة. يتم تبريد المكونات ثم أضف 50 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات. المركز (المخزون): يضاف إلى 100 مل من المحلول السابق 25 مل من الماء)
4- انقع الأنسجة برفق بواسطة مشرط.
5- إزالة الحطام الكبير بالمشرط.
6- تسخين الشريحة بلطف، مع الحرص على عدم حرقها. (ألمس الشريحة من الخلف لإختبار مدى سخونتها، فإن كانت حارة جداً فهي ساخنة وقد تتبخر الصبغة، أضف المزيد؛ أستمر لمدة 5-10 دقائق. وهذا يسمح بصبغة المادة النووية.
7- أترك الشريحة لمدة 5-10 دقائق.
8- ضع غطاء الشريحة فوق المادة.

9- ضع الشريحة على منشفة ورقية وأطوي المنشفة فوق الشريحة؛ وأهرس بلطف وبشكل متساوي بحيث لا تكسر غطاء الشريحة.

10- المراقبة تحت المجهر.

جدول 9.1. مكونات أملاح وسط زراعة متك البنفسج الأفريقي

المركب	المركز	وزن المركب المضاف
(A) KH_2PO_4	30 g/liter	300 mg
H_3BO_3	160 mg/liter	1.6 mg
(B) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	3.5 g/liter	35 mg
$MnSO_4 \cdot H_2O$	440 mg/liter	4.4 mg
$ZnSO_4$	150 mg/liter	1.5 mg
(C) KNO_3	100 g/liter	1000 mg
NH_4NO_3	100 g/liter	1000 mg
(D) Thiamine	10 mg/liter	0.1 mg
Glycine	200 mg/liter	2.0 liter
Nicotinic acid	50 mg/liter	0.5 mg
Pyridoxine	10 mg/liter	0.1 mg
(E) Kl 80 mg/liter	0.8 mg	
(F) Murashige and Skoog NaFeEDTA stock		

استخدم 10 مل من كل مركز

المراجع

Anagnostakis, S. L. (1974). Haploid plants from anthers of tobacco—Enhancement with charcoal. *Planta*, 155, 281–283.

Bayless, M. W. (1980). Cytology, chromosomal variation in plant tissue culture. In I. K. Vasil (Ed.), International review of cytology: *Perspectives in plant cell and tissue culture*. New York: Academic Press. (Suppl. 11, Part A).

Biswas, C. H., Amar, M. K. L., and XiuXin, M. H. (2011). Doubled haploid callus lines of Valencia sweet orange recovered from anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 415–423.

Burk, L. G., Gwynn, G. R., and Chaplin, J. F. (1972). Diploidized haploids from aseptically cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Heredity*, 63, 355–360.

Carlson, P. S. (1970). Induction and isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science*, 168, 487–489.

Chia-chun, C., Tsun-wen, O., Hsu, C., Shu-min, C., and Chien-kang, C. (1978). A set of potato media for wheat anther culture. In *Proceedings of the Symposium on Plant and Tissue Culture* (pp. 51–55). Beijing Science Press China (subsidiary of VanNostrand–Reinhold, New York).

Collins, G. B. (1977). Production and utilization of anther-derived haploids in crop plants. *Crop Science*, 17, 583–586.

Croser, J. S., Lülsdorf, M. M., Davis, P. A., Clarke, H. J., Bayliss, K. L., Mallikarjuna, N., and Siddique, K. H. M. (2006). Toward doubled haploid production in the Fabaceae: progress, constraints, and opportunities. *Critical Review in Plant Sciience*, 25, 139–157.

Dhooghe, E., Van Laere, K., Eeckhaut, T., Leus, L., and Van Huylenbroeck, J. (2011). Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 104, 359–373.

Dunwell, J. M. (1976). A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anthers of *Nicotiana tabacum*. *Environmental and Experimental Botany*, 16, 109–118.

Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants; origins and exploitation. *Plant Biotechnology J.*, 8, 377–424.

Ferrie, A. M. R., and Mollers, C. (2011). Haploids and doubled haploids in *Brassica* spp. For genetic and genomic research. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(3), 375–386.

Ferrie, A. M. R., Bethune, T. D., and Mykytyshyn, M. (2011). Microspore embryogenesis in Apiaceae. *Plant Cell Tissud and Organ Culture*, 104, 399–406.

Germanà, M. A. (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissud and Organ Culture*, 104, 283–300.

Germanà, M. A. (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30(5), 839–857.

Gosal, S. S., Wani, S. H., and Kang, M. (2010). Biotechnology and crop improvement. *Journal of Crop Improvement*, 24(2), 153–217.

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

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

Heberle–Bors, E., and Reinert, J. (1981). Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. *Protoplasma*, 109, 249–255.

Hughes, K. W., Bell, S. L., and Caponetti, J. D. (1975). Anther-derived haploids of the African violet. *Canadian Journal of Botany*, 53, 1422–1441.

Imamura, J., and Harada, H. (1980). Effects of abscisic acid and water stress on the embryo and plantlet formation in anther culture of Nicotiana tabacum Samsun. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 100, 285–289.

Johansson, L., Andersson, B., and Eriksson, T. (1982). Improvement of anther culture technique: Activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO_2 concentration. *Physiologia Plantarum*, 54, 24–30.

Kim, K.-M., and Baensiger, P. S. (2005). A simple wheat haploid and doubled haploid production system using anther culture. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 41, 22–27.

Luitel, S. S., and Won Hee, B. P. K. (2011). Agro-morphological characterization of anther derived plants in sweet pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Boogie). *Horticulture, Environment and Biotechnology,* 52(2), 196–203.

Maheshwari, S. C., Rashid, A., and Tyagi, A. K. (1982). Haploids from pollen grains—Retrospect and prospect. *American Journal of Botany*, 69, 865–879.

Marks, G. E. (1973). A rapid HCl toludine blue squash technique for plant chromosomes. *Stain Technology*, 48, 229–231.

Martineau, B., Hanson, M. R., and Ausubel, F. M. (1981). Effect of charcoal and hormones on anther culture of Petunia and Nicotiana. *Zeitschrift feur Pflanzenphysiologie*, 102, 109–116.

McComb, J. A., and McComb, A. J. (1977). The cytology of plantlets derived from cultured anthers of *Nicotiana sylvestria*. *New Phytology*, 79, 679–688.

Mii, M. (1980). Effect of pollen degeneration on the pollen embryogenesis in anther culture of Nicotiana tabacum L. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 99, 349–355.

Norris, R. E., Smith, R. H., and Turner, P. (1982). Phenotypic differences in haploid African violets. *In vitro*, 18, 443–446.

Raghaven, V. (1997). Molecular embryology of flowering plants. (pp. 1–69). New York: Lambridge University Press. Rashid, A., and Reinert, J. (1980). Selection of embryogenic pollen from cold-treated buds of *Nicotiana tabacum* var. Badischer Burley and their development into embryos in cultures. *Protoplasma*, 109, 161–167.

Rashid, A., and Reinert, J. (1981*). In vitro* differentiation of embryogenic pollen, control, control by cold treatment and embryo formation in the initiation of pollen cultures of *Nicotiana tabacum* var. Bradischer Burley. *Protoplasma*, 109, 285–294.

Reinert, J., and Bajaj, Y. P. S. (1977). Anther culture: Haploid production and its significance. In J. Reinert, and Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Applied and fundamental*

aspects of plant cell, tissue, and organ culture (pp. 251–264). New York: Springer-Verlag.

Reinert, J., Bajaj, Y. P. S., and Heberle, E. (1975). Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen. *Protoplasma*, 84, 191–196.

Sangwan-Norreel, B. S. (1977). Androgenic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain cultures of *Datura innoxia* Mill. *Journal of Experimental Botany*, 28, 843–852.

Segui-Simmarro, J. M., and Nuez, F. (2007). Embryogenesis induction, callogenesis, and plant regeneration by *in vitro* culture of isolated microspores and whole anthers. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1119–1132.

Smith, R. H., Kamp, M., and Davis, R. S. (1981). Reduction in African violet size through haploidy. *In vitro*, 17, 358–387.

Sopory, S. K., and Maheshwari, S. C. (1976). Development of pollen embryoids in anther cultures of *Datura innoxia*. II. Effects of growth hormones. *Journal of Experimental Botany*, 27, 58–68.

Sundar, A. N., and Jawahar, M. (2010). Efficient plant regeneration via somatic embryogenesis from anthers of *Datura stramonium* L. *International Journal of Agricultural Technology*, 6(4), 741–745.

Sunderland, N. (1974). Anther culture as a means of haploid induction. In K. J. Kasha (Ed.), *Haploids in higher plants: Advances and potential* (pp. 91–122). Guelph, Ontario, Canada: Univ. of Guelph Press.

Sunderland, N., and Wicks, F. M. (1971). Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. *Journal of Experimental* Botany, 22, 213–226.

Sunderland, N., and Roberts, M. (1979). Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Annals of Botany*, 43, 405–414.

Tomes, D. T., and Collins, G. B. (1976). Factors affecting haploid plant production from *in vitro* anther cultures of Nicotiana species. *Crop Science*, 16, 837–840.

Tyagi, A. K., Rashid, A., and Maheshwari, S. C. (1981). Promotive effect of polyvinylpolypyrrolidone on pollen embryogenesis in *Datura innoxia*. *Physiologia Plantarum*, 53, 405–406.

Weatherhead, M. A., Bordon, J., and Henshaw, G. G. (1978). Some effects of activated charcoal as an additive to plant tissue culture media. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 89, 141–147.

Weatherhead, M. A., Grout, B. W. W., and Short, K. C. (1982). Increased hapoid production in *Saintpaulia ionantha* by anther culture. *Scientia Horticulturae*, 17, 137–144.

Wernicke, W., and Kohlenbach, H. W. (1976). Investigation on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Zeitschrift fuer Pflanzenphysiologie*, 79, 189–198

الفصل العاشر

إنقاذ الجنين Embryo Rescue

تساعد الدراسات التي تستخدم الأجنة الزايجوتية غير الناضجة (immature zygotic embryos) الباحثين على اكتساب رؤية أعمق في نمو الجنين ونضج البذور. كان (Hanning, 1940) أول من أبلغ عن تطوير النبات من زراعة الأجنة المعزولة. أصبحت زراعة أجنة السحلبية (orchid) غير الناضحة مهمة في الحصول على هحن نادرة (Knudson, 1922). ثبت إن إنقاذ الأجنة بأنه أداة قيمة لمربي النباتات للحصول على هجن من تهجين النباتات التي يحدث فيها إجهاض الجنين.

توجد العديد من التقارير في الأدبيات التي تثبت فعالية هذه التقنية في برامج تحسين النبات. تم الحصول على هجين بين أنواع نباتات (*Salix*) و(*Populus*) بزراعة أجنة في مرحلة الطور القلبي (heart stage) غير الناضج والطور الفلقي المبكر (early cotyledonary stage) في وسط يحتوي على نصف مكونات أملاح موراشيجي وسكوج (1962) مع 3% سكروز إلى نباتات (Bagniewska-Zadworna *et al.*, 2011). وتم التحقق من هجين المادة النباتية بواسطة المجهر الإليكتروني الماسح وتدفق القياس الخلوي والتضخيم العشوائي لفحص الحمض النووي متعدد الأشكال. طور (Bang *et al.*, 2011) خط من الفجل الجديد غير مألوف بواسطة تقنية العقم الذكوري السيتوبلازمي ((CMS (cytoplasmic male sterility) باستخدام إنقاذ الأجنة. تم الحصول على أنواع هجينة من القطن بواسطة إنقاذ الأجنة (Bhuyar *et al.*, 2009). وقد حصل (Genovesi *et al.*, 2009) على هحن بين الصبغيات (interploid) من حشيشة القديس أوغسطين (St. Augustine) عن طريق زراعة الأجنة. وحصل (Eeckhaut *et al.*, 2007) على أنواع فريدة من عبور أو تهجين الأزاليا، حيث توجد حواجز ما قبل اللواقح وما بعد اللواقح في التهجين بين الأنواع بواسطة إنقاذها عن طريق زراعة الأجنة. تم استخدام تقنيات إنقاذ الأجنة لتفادي دورة البذور الطويلة وأمراض البذور الفطرية في تهجين نبات الخرشوف الشوكي (globe artichoke) (Cravero and Cointry, 2007).

تتضمن بعض المعايير التجريبية التي يتم فحصها بشكل عام تحديد حدوث مرحلة الإجهاض في النبات، وإنقاذ الجنين قبل حدوثه. كلما طالت مدة تطور الجنين في النبات كان من الأسهل عزل الجنين وزراعته بنجاح. عموما، كلما زاد عدد الأيام بعد التلقيح وقبل إجهاض الجنين تعتبر الأمثل لإنقاذ الأجنة. في بعض الأحيان، يتطلب إنقاذ الأجنة منظمات نمو نباتية مثل حامض الأبسسيك والجبرلين والكينتبن وحامض إندول الخليك. ربما يكون هنالك اختلاف في عدد الأجنة التي تستجيب إعتماداً الأنواع المهجنة (Bhuyar *et al.*, 2009)؛ فقد تم تنمية 9% فقط من أجنة الأزاليا المعزولة إلى بادرات (Eeckhaut *et al.*, 2007). فحص (Behzad, 2010) عوامل إنقاذ الأجنة بن الأنواع في الترمس، وجد 55-60 يوماً بعد التلقيح هي الأمثل، ونصف قوة الوسط القاعدي هي الأفضل، واستخدام منظمات نمو نباتية 1 ميليجرام في اللتر لكل من نافثلين حامض الخليك والكينتين.

يمكن استئصال الجنين من النبات وإنباته خارج الجسم الحي ليصبح نباتاً قابلاً للحياة. من الصعب زراعة الأجنة الزايجوتية الصغيرة خارج الجسم الحي، فعليه فإن الأجنة ما بعد الطور الكروي يمكن زراعتها بنجاح أكبر. عادة لا يكون وسط زراعة الأجنة معقداً، فإن أملاح وصفة موراشيجي وسكوج (1962) القاعدية مع الكربوهيدريتات في كثير من الحالات تدعم تطور الجنين إلى نبات.

تستخدم التمارين التالية المواد النباتية المتوفرة على نطاق واسع. في التمرين الأول، يتم اختبار تأثير حمض الأبسيسيك (ABA) على جنين الذرة الحلوة النامي. حمض الأبسيسيك (ABA) هو هرمون نباتي يوجد بشكل طبيعي في البذور ويشارك في سكون الجنين.

زراعة أجنة الذرة الحلوة Sweet corn embryo culture

الغرض:

توضيح تأثير حامض الأبسيسيك على نمو الجنين خارج الجسم الحي وتزويد المتدرب بالخبرة في مجال زراعة الأجنة.

تحضير الوسط الغذائي:

(1 لتر مكافئ، وسط زراعة جنين الذرة).

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق إيرلنماير 1000 مل.

2- أخلط ما يلي:

ا) 10 مل من مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: النترات، الهاليدات، الكبريتات، NaFeEDTA وPBMo

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)

ت) 40 جرام سكروز

3- أكمل الحجم إلى 800 مل

4- تقسيم الخليط إلى أربعة دوارق في كل منها 200 مل وتوسم بعلامات (أ)، (ب)، (ت) و(ث).

5- أضف مركز حامض الأبسيسيك (10 ميليجرام/100مل) على النحو التاي:

(أ) بدون حامض أبسيسيك

(ب) 0.25 مل من مركز الحامض

(ت) 2.50 مل من مركز الحامض

(ث) 25 مل من مركز الحامض

6- أضبط حجم كل دورق إلى 250 مل

7- أضبط الرقم الهيدروجيني إلى 5.7

8- أضف 2.0 جرام آجار لكل دورق وذوبه

9- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع. وعقم أيضاً أطباق بتري (20 × 100 مم) تحتوي على ورقة ترشيح مبللة لتستخدم في تشريح الأجنة.

10- ضع علامات على أطباق بتري (15 × 60 مم) بلاستيكية معقمة تمثل، (أ) الشاهد، (ب) 0.1 ميليجرام في اللتر حامض أبسيسيك، (ت) 1.0 ميليجرام في اللتر حامض أبسيسيك وُ(ث) 10 ميليجرام في اللتر حامض أبسيسيك.

11- وزع 10 مل لكل طبق بتري معقم

تجهيز وزراعة جنين الذرة

1- اختيار كوز ذرة طازج وخالي من الأمراض.

2- إزله الشعر (الحرير) والقشور.

3- إزالة كل الحبوب المفردة بعناية حتى لا تتلف القشرة الخارجية.

4- وضع الحبوب في كأس وغطي الكأس بقطعة قماش قطنية وأتركه تحت الماء الجاري لمدة 15 دقيقة.

5- أثناء شطف الحبوب، تدرب على تشريح الأجنة من حبوب غير معقمة.

6- بعد 15 دقيقة، قم بإزالة الحبوب من تحت الماء الجاري وإجراء التعقيم السطحي بكلور التبييض بتركيز 20% لمدة 15 دقيقة.

7- في داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي أشطف الحبوب 3 مرات بالماء المقطر المعقم.

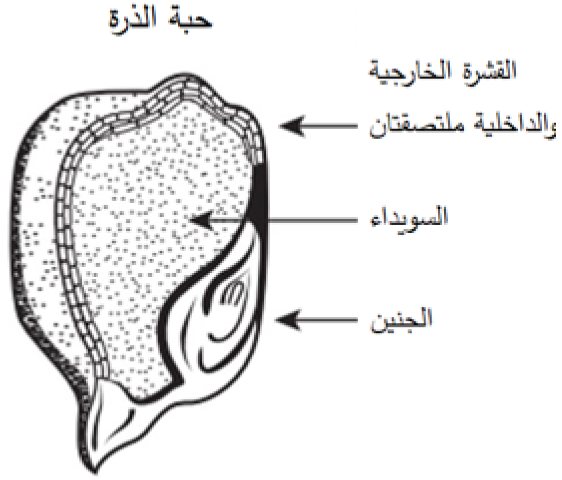
8- استئصال الجنين بعناية. أمسك الحبة بالملقط واستخدم مشرطاً لإزالة القشرة الخارجية. يظهر الجنين أصفر شاحب واضحاً في السويداء ذات اللون الأبيض الحليبي (الشكل 10.1).

9- زراعة الأجنة 1-10 في كل طبق بتري في وسط الزراعة والحضانة في الحاضنة ومراقبة الزراعات بعد 24، 48 و 72 ساعة.

الأسئلة

1- ما هو تأثير ABA على نمو أجنة الذرة المعزولة؟

2- ما هي وظيفة ABA في تطور الجنين؟



شكل 10.1. قطاع طولي لحبة الذرة الشامي

المراجع

Alvarez, M. N., Ascher, P. D., and Davis, D. W. (1981). Interspecific hybridization in Euphaseolus through embryo rescue. *HortScience*, 16, 541–543.

Arisumi, T. (1980). *In vitro* culture embryos and ovules of certain incompatible selfs and crosses among *Impatiens* species. *Journal of American Horticultural Science*, 105, 629–631.

Bagniewska-Zadworna, A., Zenkeler, M., Zenkeler, E., Wojciechowicz, M. K., Barakat, A., and Carlson, J. E. (2011). *Australian Journal of Botany*, 59(4), 382–392.

Bajaj, Y. P. S., Verma, M. M., and Dhanju, M. S. (1980). Barley × rye hybrids (Hordecale) through embryo culture. *Current Science*, 49, 362–363.

Bang, S. W., Tsutsui, K., Shim, S. H., and Kaneko, Y. (2011). Production and characterization of the novel CMS line of radish (*Raphanus sativus*) carrying *Brassica mauronum* cytoplasm. *Plant Breeding*, 130(3), 410–412.

Bennici, A., and Cionini, P. G. (1976). Cytokinins and *in vitro* development of *Phaseolus coccineus* embryos. *Planta*, 147, 27–29.

Behzad, H. (2010). Effects of the strength of basal medium and the plant growth regulators on the germination of ovules in interspecific crosses between *L. fomolongi x L. brownie*. *World Applied Science Journal*, 11(4), 429–433.

Bhuyar, S. A., Sakhare, S. B., Patil, B. R., and Rathed, T. H. (2009). Embryo rescue studies in interspecific hybrids of cotton. *Annals of Plant Physiology*, 23(2), 272–273.

Bridgen, M. P. (1994). A review of plant embryo culture. *HortScience,* 29(11), 1243–1246.

Cravero, V., and Cointry, E. (2007). Shortening the seed-to-seed cycle in artichoke breeding by embryo culture. *Plant Breeding*, 126(2), 222–224.

Dolezel, J., Novak, F. J., and Luzny, J. (1980). Embryo development and *in vitro* culture of *Allium cepa* and its interspecific hybrids. *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung*, 85, 177–184.

Eeckhaut, T. K., deHuylenbroeck, E., vanRiek, J., deBockstaele, J., and Van, E. (2007). Application of embryo rescue after interspecific crosses in the genus Rhododendron. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1), 29–35.

Genovesi, A. D., Jessup, R. W., Engelke, M. C., and Burson, B. L. (2009). Interploid St. Augustine grass (*Stenotaphrum secundatum* (Walt.) Kuntze) hybrids recovered by embryo rescue. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45(6), 659–666.

Gill, B. S., Waines, J. G., and Sharma, H. C. (1981). Endosperm abortion and the production of viable *Aegilops squarrosa* × *Triticum boecticum* hybrids by embryo culture. *Plant Science Letters*, 23, 181–187.

Goldstein, C. S., and Kronstad, W. E. (1986). Tissue culture and plant regeneration from immature embryo explants of barley. *Hordeum vulgare*. *Theoretical and Applied Genetics*, 71, 631–636.

Hannig, E. (1904). Physiologie pflanzliche Embryonen. I. Ueber die Kultur on Cruciferen Embryonen ausserhalb des Embryosacks. *Botanishe Zeitung*, 62, 45–80.

Knudson, L. (1922). Nonsymbiotic germination of orchid seeds. *Botanical Gazette*, 73, 1–25.

Ladizinsky, G., Cohen, D., and Muehlbauer, F. J. (1985). Hybridization in the genus Leas by means of embryo culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 70, 97–101.

Laibach, F. (1929). Ectogenesis in plants: Methods and genetic possibilities of propagating embryos otherwise dying in the seed. *Journal of Heredity*, 20, 200–208.

Mauney, J. R. (1961). The culture *in vitro* of immature cotton embryos. *Botanical Gazette*, 122, 205–209.

Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

Narayanaswami, S., and Norstog, K. (1964). Plant embryo culture. *Botany Review*, 30, 587–628.

Nickell, L. G. (1951). Embryo culture of weeping crabapple. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 57, 401–405.

Norstog, K., and Klein, R. M. (1972). Development of cultured barley embryos. II. Precocious germination and dormancy. *Canadian Journal of Botany*, 50, 1887–1894.

Phillips, G. C., Collins, G. B., and Taylor, N. L. (1982). Interspecific hybridization of red clover (*Trifolium pratense* L.) with *T. sarosiense* Hazsl. Using *in vitro* embryo rescue. *Theoretical and Applied Genetics*, 62, 17–24.

Raghavan, V. (1977). Applied aspects of embryo culture. In J. Reinert, and Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* (pp. 375–397). New York: Springer-Verlag.

Raghavan, V. (1980). Embryo culture. In I. K. Vasil (Ed.), *International review of cytology: Advances in plant cell and tissue culture*. New York: Academic Press. (Suppl. 11, Part B, pp. 209–240).

Raghavan, V., and Torrey, J. G. (1964). Effects of certain growth substances on the growth and morphogenesis of immature embryos of *Capsella* in culture. *Plant Physiology*, 39, 691–699.

Rangan, T. S., Murashige, T., and Bitters, W. P. (1968). *In vitro* initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*. *HortScience*, 3, 226–227.

Rappaport, J. (1954). *In vitro* culture of plant embryos and factors controlling their growth. *Botany Review*, 20, 201–225.

Rietsema, J., Satina, S., and Blakeslee, A. F. (1953). The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro. American Journal of Botany*, 40, 538–545.

Sinska, I., and Lewak, S. (1977). Is the gibberellin A4 biosynthesis involved in the removal of dormancy in apple seeds? *Plant Science Letters*, 9, 163–170.

Stafford, A., and Davies, D. R. (1979). The culture of immature pea embryos. *Annals of Botany*, 44, 315–321.

van Overbeek, J., Conklin, M. E., and Blakeslee, A. F. (1942). Cultivation *in vitro* of small *Datura* embryos. *American Journal of Botany*, 29, 472–477.

Williams, E. G., and de Lautour, G. (1980). The use of embryo culture with transplanted nurse endosperm for the production of interspecific hybrids in pasture legumes. *Botanical Gazette*, 14, 252–257

الفصل الحادي عشر

زراعة القمة الإنشائية لإنتاج نباتات خالية من الفيروسات Meristem Culture for Virus-Free Plants

تصاب العديد من النباتات بالفيروسات داخلياً، مما يقلل من قوة النمو وظهور النخر، وتجعد الأوراق، وتخطيط الأوراق أو الأزهار، وتناقص المحصول وموت النبات (Quak, 1977). لا توجد معالجة كيميائية لتخليص النبات من العدوى الفيروسية. ومع ذلك، لا تنتشر الفيروسات بشكل عام إلى النسل من خلال البذور. في النباتات التي يتم تكاثرها خضرياً مثل، البطاطس، الثوم، الأناناس، السحلبية، القرنفل، الموز، والفراولة يمكن أن ترتفع نسبة التلوث بالفيروسات.

يستخدم العلاج الحراري وزراعة القمة الإنشائية لتحرير النباتات التي يتم تكاثرها خضرياً من الفيروسات. فقمة البرعم الإنشائية وأول مجموعة من الأوراق الابتدائية في البرعم المتطاول، بشكل عام، غير متصلة بنظام الأوعية الناقلة في النبات، وبالتالي فهي خالية من الفيروسات التي تنتقل من خلال نظام الأوعية الناقلة. أجرى (Morel and Martin, 1952) العمل الرائد في إنشاء نباتات (*Dahlia*) خالية من الفيروسات باستخدام بزراعة القمة الإنشائية. يمكن الحصول على نباتات خالية من الفيروسات باستئصال الجزء النباتي المنفصل بعناية دون أن يتلوث بالنسغ من الأوراق الأكثر نضجاً أو الأنسجة الجذعية. تم استخدام هذه الطريقة لإخلاء العديد من المحاصيل البستانية والحقلية المهمة بشكل روتيني من التلوث الفيروسي. تزخر التقارير بالتأسيس الناجح لنباتات خالية من الإصابة بالفيروس في أنواع نباتية معينة. يستخدم أحياناً العلاج الحراري بمفرده أو مع استخدام زراعة القمة الإنشائية لتخليص أصناف البطاطس من الفيروسات (Zapata *et al.*, 1995; Zapata and Smith, 1998). يمكن وضع النباتات في غرفة النمو أو في الماء الساخن لإدارة المعالجة الحرارية. ستعمل الحرارة على تعطيل نشاط الفيروس (Matthews, 1991). وصف (Nesi *et al.*, 2011) الجمع بين العلاج الحراري وزراعة القمة الإنشائية لتحرير أبصال الزنبق (lilies) من نوعين من الفيروسات.

تم استخدام زارعة القمة الإنشائية بنجاح لتحرير نباتات الفيرودات (viroids) (أصغر من الفيروسات) ومسببات الأمراض النباتية (Hosokawa, 2008). وقد ذكر (Banerjee *et al.*, 2010) تحرير أنواع من نبات (*Artemisia*) من الفيتوبلازما (phytoplasma) باستخدام زراعة القمة الإنشائية. وتم اختبار النباتات الناتجة باستخدام تقنية (PCR) والفحص المجهري البصري، والتقييم البصري للسمات المورفولوجية لتكون خالية من الفيتوبلازما. تم تحرير نباتات الفراولة من مسببات مرض تعفن التاج (crown rot) من خلال زراعة النسيج الإنشائي (Whitehouse *et al.*, 2011).

إن عملية زراعة النسيج الإنشائي لا تحرر النباتات دائماً من الفيروسات؛ لذلك، يجب تأكيد إدعاءات النباتات الخالية من الفيروسات. من أجل التحقق من حالة الفيروس في النبات، تستخدم التقنيات التحليلية مثل: مقايسة الممتز (التشرب) المناعي المرتبط بالإنزيم (ELISA)، مقايسة الممتز المناعي المرتبط بساندويتش إنزيم مزدوج للأجسام المضادة (DAS-ELISA)، وتقنية النسخ العكسي لتفاعل البوليمريز المتسلسل الجزيئية (RTPCR) (Myouda et al., 2005; Shiraqi et al., 2010; Nesi et al., 2011; Youssef et al., 2009).

هناك التباس في الأدبيات فيما يتعلق بمصطلح زراعة النسيج الإنشائي. يتكون النسيج الإنشائي الحقيقي فقط من القبة القمية المعزولة دون الارتباط بأوراق ابتدائية مرئية. هذا من أصعب الأجزاء النباتية المنفصلة في الزراعة لصغر حجمه. أجرى (Smith and Murashige, 1970) زراعة أول نسيج إنشائي حقيقي معزول من كاسيات البذور وإنتاج نبات كامل. قبل ذلك كان الإعتقاد بأن القمة الإنشائية القمية المعزولة من كاسيات البذور لا تستطيع توجيه تطورها الخاص، بل تعتمد على الأوراق الابتدائية المجاورة والأنسجة الجذعية (Ball, 1946; 1960).

بشكل عام، يمكن إنشاء نبات خالي من الفيروسات بزراعة القبة القمية الإنشائية بالإضافة إلى أثنين إلى أربعة أوراق بدائية مجاورة. يتم اختيار قمة نامية في طور النمو السريع لتعزيز احتمالية البقاء على قيد الحياة. مثل هذه القمة سريعة النمو غالباً لا تكون مصابة بالفيروس. عادة ما يوجد الفيروس في الأوعية الناقلة، وفي القمة النامية سريعة النمو لا تكون متصلة بنظام الأوعية الناقلة. إن عزل النسيج الإنشائي والأوراق الابتدائية عملية شاقة للغاية تتطلب الصبر والمعرفة بالتشريح وموقع الجزء النباتي المنفصل المجهري. يتطلب نجاح عزل نسيج القمة النامية الإنشائي الممارسة العملية لإنشاء الزراعات. يجب توخي الحذر أثناء العزل حتى لا يتلف النسيج الإنشائي أو يجف. يجب إجراء القطع النهائي باستخدام أدوات دقيقة للغاية.

عزل قمة البرعم الإنشائية Isolation of the shoot apical meristem

الغرض:

اكتساب الخبرة في عزل نسيج القمة الإنشائية.

تحضير الوسط الغذائي:

(لعمل واحد لتر مكافئ لوسط القمة الإنشائية لنباتي (*Coleus*) (Smith and Murashige, 1982) و(*Tropaeolum*) (Ball, 1946))

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 1.0 مل من مركز (IAA) (10 ميليجرام/100 مل)

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل وضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام/لتر آجار. وتغطية قارورة إيرلنماير بورق ألمونيوم.

5- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- أجمع القمم النامية لنباتي (*Tropaeolum majus*) و(*Coleus blumei*) وأغسلهم بماء دافئ وصابون.

2- إزالة الأوراق الكبيرة ولف القمم في قماش قطني، ثم التعقيم بكلور التبييض (10%) لمدة 10 دقائق. أشطف ثلاث مرات بالماء المعقم.

3- وضع النسيج النباتي في طبق بتري معقم يحتوي على ورقة ترشيح مبلله لتجنب جفاف الأنسجة الحساسة أثناء العزل.

4- تحت المجهر يتم عزل قبة البرعم الطرفية دون تضمين الأوراق الابتدائية (شكل 11.1)

الأسئلة

1- ما السبب الذي قد يفسر عدم احتواء هذا الجزء النباتي المستأصل بشكل عام على العدوى الفيروسية؟

2- هل تعتقد أنه سيكون هناك اختلاف في معدل نجاح هذه التقنية إذا تم استخدام قمم براعم ساكنة بدلاً من النامية بسرعة؟

3- ما هو السبب الرئيسي لعدم نمو هذا الجزء النبات المنفصل الساكن؟

4- هل تضمن هذه التقنية نبتة خالية من الفيروسات؟

5- ما هي فهرسة الفيروسات، وعلى ماذا تدل؟

6- أفحص القمم تحت مجهر التشريح. هل تم إعادة تنظيمهم لتشكيل نسيج كدب؟ ما الذي يكبر أولاً؟

إنشاء نباتات خالية من الفيروسات والبكتيريا Establishing virus- and bacteria-free plants

الغرض:

زراعة قمة البراعم الإنشائية الصغيرة أو القبة القمية لنبات (*Diffenbachia*) (Knauss, 1976) للحصول على نباتات خالية من البكتيريا والفيروسات.

تحضير الوسط الغذائي:

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

3- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز $NaH_2PO_4.H_2O$ (17جرام في اللتر)

ح) 160 مل من مركز (2iP) (50 ميليجرام/500 مل)

خ) 20 مل من مركز (IAA) (10 ميليجرام/100 مل)

د) 2 ميليجرام قلايسين

ذ) 8 مل من مركز سلفات الأدنين (1 جرام/ 100 مل)

4- ضبط الحجم إلى 1000 مل وضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7

5- أضف 8 جرام/لتر آجار. وتغطية قارورة إيرلنماير بورق ألمونيوم.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- إزالة أوراق البرعم القمي الخارجية والغسل بماء دافئ وصابون.

2- ضع القمم في كأس مغطى بقماش قطني تحت الماء الجاري لمدة 2-3 ساعات.

3- لف الأجزاء النباتية المنفصلة في قماش قطني، ثم التعقيم بكلور التبييض (10%) لمدة 10 دقائق. أشطف ثلاث مرات بالماء المعقم.

4- عند تجهيز الجزء النباتي المنفصل أغمس الأدوات الكحول واشعلها ثم بردها.

5- أغمس الجزء النباتي المنفصل في محلول كلور التبييض (5%) ثم الشطف بالماء المعقم قبل الزراعة.

6- ضع الزراعات على رف الزراعة

إكثار الثوم من قشور البصلة: Garlic propagation from bulb scales

يعتبر الثوم من المحاصيل التجارية القيمة التي لا يمكن إنتاجها إلا بالطرق الإكثار الخضري لعقمه. العديد من أصناف الثوم التجارية مصابة بالفيروسات مما يؤدي إلى إنخفاض الإنتاجية. لذلك، فإن زراعة الأنسجة هي طريقة مفيدة لإنتاج ثوم خالي من الفيروسات.

الغرض:

التكاثر النسيلي وإنشاء نبات ثوم (*Allium sativum* L.) خالي من الفيروسات (AboEl-Nil, 1977; Bhojwani, 1980; Novàk, 1983) من فصوص البصلة.

تحضير الوسط الغذائي:

(1 لتر مكافئ لوسط قشور بصلات الثوم)

1- صب 500 مل في دورق مخروطي سعة 2000 مل ماء مقطر منزوع الأيونات.

2. اخلط ما يلي:

أ. 10 مل كل أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، الكبريتات، NaFeEDTA، وPBMo

ب. 2.5 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/لتر)

ت. 100 مل من مركز ميوأنيزيتول (10 جرام/ لتر)

ث. 30 جرام سكروز

ج. 10 مل من مركز الفيتامين

ح. 5 مل مركز (2iP) (10 ميليجرام/ 100 مل)

د. 2.4 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/100 مل)

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام آجار وذوبه.

5- وزع 25 مل لكل أنبوب اختبار (25 × 150 مم) وغطها.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- استخدام الثوم من مركز تسوق (12-20 فص لكل بصلة)، أفصل بين فصوص البصلة
2- التعثيم وتقسيم الفصوص (شكل 11.2)

أ. نقع كل فص في محلول 95% من الإيثانول لمدة 30 ثانية.

ب. عرضه للهب.

ت. وضع الفصوص في طبق معقم.

ث. إزالة الأوراق المغلفة المحروقة والجذور المحروقة.

ج. أفصل بالفتح أوراق التخزين اللحية.

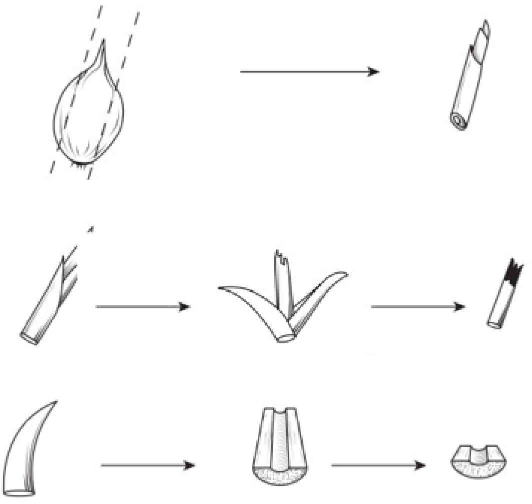
ح. استئصال البرعم من القرص وإزالة الأوراق الخارجية قم الزراعة في الوسط.

3. الحضانة في الرفوف.

البيانات

1. كم عدد النباتات التي تم الحصول عليها من الجزء النباتي المنفصل؟
2. ما هو متوسط عدد النباتات التي تم الحصول عليها؟
3. من أي منطقة نشأت البراعم؟

شكل 11.1. (أ) قبة البرعم القمية كحزء نباتي منفصل لزراعة القمة الإنشائية، (ب) القمة الإنشائية بعد إستئصالها للنطعيم



شكل 11.2.إتباع هذه الخطوات لإكثار الثوم النسيلي وإنشاء زراعات خالية من الفيروسات (*from* Smith, 2013)

المراجع

AboEl-Nil, M. M. (1977). Organogenesis and embryogenesis in callus cultures of garlic (*Allium sativum* L.). *Pl. Sci. Lettr*., 9, 259–264.

Ball, E. (1946). Development in sterile culture of stem tips and subjacent regions of *Tropaeolum majus* L. and *Lupinus albus* L. *Amer. J. Bot*., 33, 301–318.

Ball, E. (1960). Sterile culture of the shoot apex of *Lupinus albus* L. *Growth*, 24, 91–110.

Banerjee, S., Haider, R., Bagchi, G. D., and Samad, A. (2010). Regeneration of phytoplasma-free *Artemisia roxburghiana* Besser var. purpurascens (Jacq.) Hook. Plants using apical meristem culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103(2), 189–196.

Bhojwani, S. S. (1980). *In vitro* propagation of garlic by shoot proliferation. *Scientia Horticulturae,* 13, 47–52.

Bhojwani, S. S., and Razdan, M. K. (1986). Plant tissue culture: Theory and practice. New York: Elsevier.

Brettell, R. I. S., and Ingram, D. S. (1979). Tissue culture in the production of novel disease-resistant crop plants. *Biological Review*, 54, 329–345.

Gamborg, O. L. (2002). Plant tissue culture. Biotechnology milestones. *In vitro Cellualr and Deve;opmental Biology-Plant*, 38, 84–92.

George, F. F., and Sherrington, P. D. (1984*). Plant propagation by tissue culture*. Eversley, England: Exegtics.

Hollings, M. (1965). Disease control through virus-free stock. *Annual Review of Phytopathologu*, 3, 367–396.

Hosokawa, M. (2008). Leaf primordial-free shoot apical meristem culture: A new method for production of viroid-free plants. *Japanese Society of Horticultural Sciences*, 77(4), 341–349.

Kehr, A. E., and Schaeffer, G. W. (1976). Tissue culture and differentiation of garlic. *HortScience*, 11, 422–423.

Knauss, J. F. (1976). A tissue culture method for producing *Diffenbachia picta* cv. “Perfection” free of fungi and bacteria. Proc. *Florida State Horticultural Society*, 89, 293–296.

Matthews, R. E. F. (1991). Virus-free seed. In R. E. F. Matthews (Ed.), *Plant virology* (pp. 599–630). New York: Academic Press.

Morel, G. (1960). Producing virus-free *Cymbidiums*. *American Orchid Society Bulletin*, 29, 495– 497.

Morel, G. (1975). Meristem culture techniques for the long-term storage of cultivated plants. In O. H. Frankel, and J. G. Hawkes (Eds.), *Crop genetic resources for today and tomorrow* (pp. 327–332). New York: Cambridge Univ. Press.

Morel, G., and Martin, C. (1952). Guerison de dahlias atteints d'une maladie à virus. Comptes Rendus Hebdomadaires des *Seances de l'Academie des Sciences* (Paris), 234, 1324–1325.

Myouda, T., Sanada, A., Fuji, S., Natsuaki, K. T., Koshio, K., Toyohara, H., Kikuchi, F., and Fujimaki, H. (2005). Propagation of greater yam (*Dioscorea alata* L.) using shoot apex and nodal segment cultures combined with virus detection by RT-PCR. *Sabrao Journal of Breeding and Genetics*, 37(1), 65–70.

Nehra, N. S., and Kartha, K. K. (1994). Meristem and shoot tip culture: Requirements and applications. In I. K.Vasil, and T. A. Thorpe (Eds.), *Plant cell and tissue culture* (pp. 37–71). Amsterdam: Kluwer Academic Publishers.

Nesi, B., Lazzereschi, S., Pecchiolos, S., and Grasotti, A. (2011). Virus detection and propogation of virus-free bulbs from selected progenies of pollenless lilies. *Acta Horticulturae*, 900, 325–331.

Nishi, S., and Ohsaua, K. (1973). Mass production method of virus-free strawberry plants through meristem callus. *Japanese Agriultural Research Quarterly* (Tokyo), 7, 189–194.

Novàk, F. J. (1972). The changes in karotype in callus culture of *Allium sativum* L. *Caryologia*, 27, 45–51.

Novàk, F. J. (1983). Production of garlic (*Allium sativum* L.) tetraploids in shoot-tip *in vitro* culture. *Zeitschrift fuer Pflanzenzuechtung*, 91, 329–333.

Quak, F. (1977). Meristem culture and virus-free plants. In J. Reinert, and Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* (pp. 598–646). New York: Springer-Verlag.

Raychaudhuri, S. P., and Verma, J. P. (1977). Therapy by heat, radiation and meristem culture. In J. G. Horsfall, and E. Bowling (Eds.), *Plant disease: An advanced treatise* (pp. 177–189). New York: Academic Press.

Shabde, M., and Murashige, T. (1977). Hormonal requirements of excised *Dianthus caryophyllus* L. shoot apical meristem *in vitro*. *American Journal of Botany*, 64, 443–448.

Shiraqi, M. H. K., Baque, M. A., and Nasiruddin, K. M. (2010). Eradication of banana bunchy top virus (BBTV) through meristem culture of infected plant banana cv. *Sabri. Horticulture, Environment*, *and Biotechnology*, 51(3), 212. 221.

Smith, R. H., and Murashige, T. (1970). *In vitro* development of isolated shoot apical meristems of angiosperms. *American Journal of Botany*, 57, 562–568.

Smith, R. H., and Murashige, T. (1982). Primordial leaf and phytohormone effects on excised shoot apical meristems of *Cloeus blumei* Benth. *American Journal of Botany*, 69, 1334–1339.

Smith, R. H., and Park, S. H. (2001). Tissue culture for crop improvement. In M. S. Kang, (Ed.), *Quantitative Genetics, Genomics, and Plant Breeding* (pp. 189–196). New York: CABI.

Thorpe, T. A. (2007). History of plant tissue culture. *Molecular Biotechnology*, 37, 169–180.

Whitehouse, A. B., Govan, C. L., Hammond, K. J., Sargent, D. J., and Simpson, D. W. (2011).

Meristem culture for the elimination of the strawberry crow rot pathogen, *Phytophthora cactorum. Journal of Berry Research*, 1(3), 129–136.

Youssef, S. A., Al-Dhaher, M. M. A., and Shalaby, A. A. (2009). Elimination of grapevine fanleaf virus (GFLV) and grapevine leaf roll-associated virus-1 (GLRaV-1) from infected grapevine plants using meristem tip culture. *International Journal of Virology*, 5(2), 89–99.

Zapata, C., Miller, C., and Smith, R. H. (1995). An *in vitro* procedure to eradicate potato viruses X, Y, and S from Russet Norkotah and two if its strains. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 31, 153–159.

Zapata, C., and Smith, R. H. (1998). Freeing plants of viruses. In J. E. Celis, (Ed.), *Cell biology: A laboratory handbook* (pp. 455–489). New York: Academic Press

الفصل الثاني عشر

تكاثر نباتات الزينة التجاري خارج الجسم الحي *In vitro* Propagation for Commercial Production of Ornamentals

بدأ الاهتمام الواسع باستنساخ نباتات الزينة باستخدام زراعة الأنسجة النباتية في ستينيات القرن العشرين. كانت مشكلة مزارعي نبات القيربرا في جنوب كاليفورنيا هي إنتاج أزهار مختلطة الألوان عند الإكثار بالبذور، مما يجعل إنتاج أزهار ذات لون واحد أمراً صعباً. وبعد زيارة المزارعين لموراشيجي، طور موراشيجي بروتوكول لإكثار القيربرا النسيلي وبدأ ورش عمل لتدريب المزارعين في تطوير بروتوكولات لإكثار نباتات زينة معينة. في المقابل، قام المزارعون بتمويل ندوة وجلسات التكاثر الدقيق في الاجتماعات السنوية لجمعية البيولوجيا خارج الجسم الحي. سرعان ما أنشأ منتجو الزينة في جميع أنحاء الولايات المتحدة مختبرات لزراعة الأنسجة النباتية.

حدد (Murashige, 1974) المراحل الرئيسية في عملية التكاثر خارج الجسم الحي وهي:

المرحلة الأولى:

إنشاء الزراعات المعقمة. يمكن أن تكون هذه المرحلة صعبة في كثير من الأحيان بسبب التلوث وإنتاج المركبات الفينولية بواسطة النبات. ومع ذلك، فهدف المرحلة الأولى هو حيوية نمو الجزء النباتي المنفصل.

المرحلة الثانية:

هذه المرحلة لتكاثر عدد كبير من البراعم. بشكل عام، يعمل السيتوكينين على تعزيز إنتاج الفروع المتعددة من البراعم الإبطية الموجودة مسبقاً أو يتحقق التضاعف من الأجزاء النباتية المنفصلة من تكوين البرعم العرضية من الأوراق أو السيقان أو أعناق الأوراق. كذلك يمكن أن تؤدي الأجنة إلى معدل عالي من التكاثر. يمكن أن تصل الزراعات الفرعية في المرحلة الثانية لثلاث إلى ست زراعات. المزيد من الزراعات الفرعية تزيد من فرصة النباتات غير المرغوب فيها. يمكن أن يكون معدل الزراعة الفرعية لمادة المرحلة الثانية من 5–10 نباتات أو أكثر لكل نبات خلال 6–8 أسابيع. تتمثل المشكلة الحقيقية في هذه المرحلة تكوين نسيج الكدب أو حدوث نباتات شاذة أو تباين جسدي. من الأفضل التضاعف الإبطي في المرحلة الثانية لأن خطر إنتاج نباتات شاذة يكون منخفضاً للغاية مقارنة بمرحلة تكوين نسيج الكدب.

المرحلة الثالثة:

يتم في هذه المرحلة تجهيز النباتات للنقل إلى التربة. بشكل عام، يستخدم الأوكسين لتجذير البراعم المفردة. بالنسبة للعديد من النباتات، يمكن أن تتم إجراء هذه المرحلة في البيوت المحمية أو في تربة الزراعة. وقد سطر (Oinam *et al.*, 2011) لمحة عامة عن إنشاء الجذور العرضية، و(De Klerk, 2002) عن تجذير العقل الدقيقة.

المرحلة الرابعة:

هذه المرحلة إضافية للمراحل التي حددها موراشيجي (Murashige, 1974)، وهي الآن خطوة معترف بها في الإكثار. في هذه المرحلة، تتم إزالة العقل المجذرة من أنبوب الزراعة، وغسل الآجار برفق من الجذور. توضع النباتات في خليط زراعي بأصص وتحفظ تحت الظل ورطوبة عالية. عادة بعد أسبوعين، تتكيف النباتات ويمكنها تحمل المزيد من الضوء والرطوبة المنخفضة.

التكاثر خارج الجسم الحي، أو التكاثر الدقيق، له مزايا على التكاثر التقليدي في العديد من النباتات، ولكن ليست كلها. الفائدة الرئيسية هي التكاثر النسيلي، أو التكاثر اللاجنسي، الذي ينتج عنه نسخ متطابقة وراثياً من الصنف. يمكن اختيار النباتات المخزونة المرغوبة، وإنتاج آلاف النسخ المتطابقة. تشمل الفوائد الأخرى للتكاثر خارج الجسم الحي: التكاثر السريع، والحفاظ على النباتات الخالية من مسببات الأمراض، وتعزيز التفرع الإبطي للنباتات المشتقة، والإزهار المبكر، وإنتاج محصول متناسق، والإنتاج على مدار العام، والتعجيل بإدخال محصول جديد، واستنساخ النباتات الأنثوية المرغوبة فقط (نخيل التمر) أو نباتات الذكور (الهليون).

يمكن أن يسبب التزجج أو الشفافية أو فرط الماء (Vitrification or hyperhydricity) بمشاكل في التكاثر الدقيق (Rojas-Martinez *et al.*, 2010; Ivanova and Van Staden, 2010; Kevers *et al.*, 2004). من الصعب أن تنتج البراعم في هذه الحالة نباتات. براعم هذه النوعية من النباتات المكاثرة خارج الجسم الحي لها مظهر يشبه الزجاج. يتميز فرط التميؤ بوجود فراغات كبيرة بين الخلايا، وقليل من الشمع في الطبقة الخارجية، وثغور أقل على الأوراق، وبلاستيدات خضراء بعضيات صغيرة، ونقص في حبيبات النشا. استعرض (Preece, 2010) هذه الحالة بمناقشة عوامل التبلور وأنظمة استنبات الوسائط السائلة لتعزيز التكاثر الدقيق للعديد من أنواع النباتات والتأثيرات على فرط التميؤ.

تزخر الأدبيات عن التكاثر الدقيق بأمثلة عديدة لبروتوكولات محسنة لزراعة خلايا أنواع أو أصناف معينة. ولا يوجد حتى الآن بروتوكول واحد بسيط يمكن تطبيقه على تكاثر كل الأنواع النباتية المختلفة خارج الجسم الحي أو

حتى أصناف مختلفة من نوع واحد في بعض الأحيان. تعتبر مراجعة الأدبيات نقطة انطلاق، ومن المهم امتلاك خبرة مسبقة في مراحل التكاثر وزراعة الخلايا.

التدريبات التالية توضح بعض التقنيات المختلفة للتكاثر خارج الجسم الحي. تم تضمين العديد من المراجع العامة حول التكاثر في المختبر لأنواع نباتية مختلفة.

سرخس بوسطن (Boston Fern)

العديد من أنواع السراخس لها أهمية تجارية لاستخدامها في تنسيق الحدائق، والنباتات المنزلية، وتنسيق الأزهار. تقليدياً، تتكاثر السراخس إما من الأبواغ أو عن طريق التقسيم. على الرغم من أن التكاثر من الأبواغ يمكن أن يؤدي إلى تكوين العديد من النباتات، إلا أنه عملية بطيئة.

السرخس لها مرحلتان من النمو، يشار إليهما بتبادل الأجيال (alternation of generations)، في دورة نمو خضري ودورة تكاثر. ينتج عن إنبات البوغ طبقة من كتل صغيرة تشبه الطحالب تحتوي على الأعضاء الذكورية والأنثوية. ينتج عن إخصاب هذه الأطوار المشيجية تكوين النباتات البوغية أو النباتات المنتجة للأبواغ. يستغرق نمو النباتات البوغية عموماً من 2 إلى 4 أشهر من إنبات البوغ لتطور النبات البوغي.

يمكن استخدام التقسيم لإكثار الأنواع التي تتطور فيها الجذور وتشكل قواعد، وهذا إجراء سهل. ومع ذلك، فإن عدد أجزاء التكاثر محدود، والعديد من الأنواع ليس لديها هذا النوع من النمو.

تكاثر السرخس خارج الجسم الحي يتميز بالعديد من المزايا (Burr, 1976; Harper and Murashige, 1976; Murashige, 1974; Oki, 1981; Roberts, 1965; Wetherell, 1982). تتطابق النباتات الناتجة مع النبات الأم المختارة، وبالتالي فهي موحدة في الحجم والمظهر. تميل السراخس المزروعة خارج الجسم الحي أيضاً إلى أن تكون شجيرة وأكثر جاذبية من تلك التي تتكاثر في أحواض الزراعة. كمكافأة خاصة للمزارع التجاري، تنتج زراعة الأنسجة تكاثر السرخس الذي لا يمكن أن يعادله بالطرق التقليدية.

المرحلة الأولى

الغرض:

إنشاء الزراعات المعقمة لقمة سيقان سرخس بوسطن الجارية ومراقبة أساسيات التكاثر النسيلي السريع.

تحضير الوسط:

(150 مل مكافئ، لوسط المرحلة الأولى سرخس بوسطن).

1- صب 60 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 250 مل.

2- أخلط ما لي:

أ) 1.5 مل لكل من مركزات موراشيجي وسكوج؛ النترات، الكبريتات، الهاليدات، NaFeEDTA و PBMo

ب) 1.5 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/ اللتر.

ت) 1.5 مل من مركز ميوأنيزتول (10 جرام/ اللتر

ث) 4.5 جرام سكروز

3- ضبط الحجم 150 مل. ضبط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- وزع 5 مل من المحلول لعدد 30 أنبوب زراعة (25 × 150مم).

5- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرم في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

من غير المرجح أن تتلوث زراعات قمم سيقان السرخس الجارية أكثر من معظم الأجزاء النباتية المستأصلة الأخرى. يعزى ذلك إلى حد كبير إلى حقيقة أن أطراف السيقان الجارية لا تكون عادةً على احتكاك بالتربة (العديد منها في سلال معلقة) وبالتالي فهي خالية نسبياً من الملوثات قبل إنشاء الزراعات. لتقليل احتمال تلوث الزراعة، يوضع المخزون النباتي المصدر في بيئة جافة وباردة لعدة أسابيع قبل استئصال الجزء النباتي المنفصل. الغرف المكيفة مثالية لهذا الغرض.

من الأفضل أن يتم تداول دائماً قمم السيقان الجارية بعناية فائقة. المواد النباتية التالفة لن تنمو في وسط الزراعة، يتم اختيار نبات صحي يحتوي على العديد من السيقان الجارية تنمو من تاج سعف السرخس. يتم إزالة قمم السيقان الجارية نشطة النمو والمغطاة بشعر أبيض بطول حوالي 3 سم من النبات، ويتم غسلها بالماء الدافئ والصابون ثم شطفها. يتم تغليف قمم السيقان الجارية على دفعات من حوالي 12 في مربعات قماش قطني حتى لا تطفو خارج الحاوية أثناء التعقيم السطحي في 10% من محلول كلور التبييض لمدة 10 دقائق ثم الشطف 3 مرات بالماء المقطر المعقم. تتم إزالة الطرف 1.5 سم باستخدام ملقط ومشرط، وزراعة 1-3 منها في الأنبوب (شكل 12.1). هذا نسيج حساس لا تقرصه أو تسحقه بالملقط. تتم الحضانة في غرف الحضانة.

ملاحظات

بعد أسبوع واحد يتم تسجيل وإزالة الزراعات الملوثة. بعد 6-8 أسابيع سجل عدد النباتات المنتجة لكل قمة السيقان الجارية. ستتم زراعة كل من هذه النباتات المفردة في المرحلة الثانية من أجل التكاثر وزيادة نمو الجذور. تتكاثر سعف السرخس بشكل أفضل في وسط سائل في المرحلة الأولى. كميزة إضافية، فإن إغفال الآجار يقلل من تكلفة إعداد الوسط وسرعة تنظيف أنبوب الاختبار. يمكن الانتقال إلى المرحلة الثانية بعد حوالي 6-8 أسابيع.

المرحلة الثانية

الهدف من المرحلة الثانية هو تكاثر البراعم. في هذه المرحلة، من المهم اختيار زراعات صحية من المرحلة الأولى وإجراء الزراعة الفرعية للتضاعف السريع. يجب التخلص من البراعم ذات النمو الضعيف أو البطيء لأن النباتات المشتقة منها قد لا تكون قوية. يجب ألا يزيد عدد الزراعات الفرعية في المرحلة الثانية لأكثر من 4 مرات لتجنب الحصول على نباتات غير طبيعية. يتم استخدام الفوسفات الإضافية ($NaH_2PO_4. H_2O$) لوسط المرحلة الثانية لتعزيز نمو البراعم.

الغرض:

لإجراء الزراعات لقمم سيقان نبات السرخس الجارية على وسط المرحلة الثانية وملاحظة معدل التضاعف.

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط لمرحلة السرخس الثانية)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج؛ النترات، السلفات، الهاليدات، NaFeEDTA،و PBMo

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)

ت) 10 مل من مركز ميوأنيزتول (10 جرامات أللتر)

ث) 1.0 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/100 مل)

ج) 10 مل من مركز الكينتين (10ميليجرام/100 مل)

ح) 10 مل من مركز ($NaH_2PO_4.H_2O$) (17 جرام/اللتر)

3- أكمل الحجم 1000مل، ضبط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 8 جرام آجار وذوبه.

5- وزع 25 مل في أنابيب اختبار (25 × 150مم). التعقيم لمدة 15 دقيقة في درجة جرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

استخدم الجزء النباتي المنفصل في المرحلة الأولى.

أنقل الأجزاء النباتية المنفصلة إلى طبق بتري معقم والتقسيم.

ملاحظات

في غضون 3-5 أسابيع يجب أن تلاحظ المزيد من نمو البراعم في كل من الزارعات. في غضون 4-6 أسابيع يتم تطور الرايزومات من البراعم (جذوع بنية تحت الأرض). خلال هذه الأسابيع، تتكاثر الزراعات أيضاً ويستطيل السعف.

يمكن تكرار المرحلة الثانية بالزراعة الفرعية 3-4 مرات، إن كانت هناك حاجة لعدد كبير من النباتات. مرات. بعد 7 أسابيع من النمو، يتم تقسيم كل كتلة رايزوم إلى قطعتين وتقليم السعف بطول 15-20 مم. من المهم جداً ترك بعض الأجزاء الخضراء على كل كتلة. ضع كل كتلة في أنبوب من وسط المرحلة الثانية الطازج. ستنتج كل مزرعة متتالية مواد نباتية إضافية.

المرحلة الثالثة

الهدف من المرحلة الثالثة هو تجهيز المادة النباتية للزراعة في التربة. عند التعامل مع سرخس بوسطن، من الممكن حذف هذه المرحلة الإعدادية ونقل البراعم مباشرة من وسط المرحلة الثانية إلى خليط التأصيص. ومع ذلك، فإن القيام بهذه الخطوة يضمن تطوير مجموع جذري قوي.

الغرض:

لزراعة المرحلة الثالثة من نبات سرخس بوسطن.

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط المرحلة الثالثة لسرخس بوسطن)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج؛ النترات، السلفات، الهاليدات، NaFeEDTA، و PBMo

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)

ت) 10 مل من مركز ميوأنيزتول (10 جرامات/ للتر)

ث) 30 جرام سكروز

3- أكمل الحجم 1000مل، ضبط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 6 جرام آجار وذوبه

5- وزع 25 مل لكل أنبوب اختبار (25 × 150 مم) والتغطية.

6- التعقيم قي السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- إزالة كتل الرايزوم من وسط المرحلة الثانية وتقطيعها إلى مكعبات قياس 1 سم على كل جانب.

2- تقليم السعف بطول 15-20 مم.

3- ضع المادة النباتية في أنابيب الاستزراع أو الحاويات المحتوية على وسط المرحلة الثالثة. يتم تحديد عدد النباتات الموضوعة في كل حاوية حسب حجم الحاوية المستخدمة. يمكن أن تحتوي جرة ميسون (Mason jar) الموضوعة على جانبها على 50 نبتة، لكن يستوعب أنبوب الاختبار 1 أو 2. ادفع طرف الرايزوم تحت سطح الوسط، وترك السعف فوق السطح. متطلبات درجة الحرارة والضوء في هذه المرحلة هي نفسها متطلبات المرحلتين الأولى والثانية.

4- بعد إعادة زراعة المادة النباتية في وسط المرحلة الثالثة، يكتمل عادة تجذير وتطوير النبات في غضون 2-3 أسابيع، في هذا الوقت يمكن نقل النباتات إلى خليط الأصيص. ستكون الجذور مرئية بوضوح للنقل.

النقل

يستخدم نفس الإجراء لنقل النبيتات سواء من المزروعة في خليط التأصيص من المرحلة الثانية أو وسط المرحلة الثالثة. أغسل الآجار بعناية من النباتات بماء الصنبور. يشجع الآجار إن وجد على النبات نمو الفطريات، وربما قتل النباتات.

يتم فحص تأثير خلطات الأصص المختلفة على إنشاء ونمو السرخس المزروع. يلاحظ التباين في النمو. عندما تكون البراعم خالية من الآجار، ويمكن زرعها في مزيج التأصيص عن طريق صنع ثقب في المزيج بأداة حادة ووضع كرة الجذر بقوة في إناء الخليط. من المهم أن يكون للجذور اتصال وثيق بالخليط وأن تضغط التربة بقوة حول الساق. ويتم سقاية النبات بعد الزارعة. يجب حماية النباتات المحفوظة في الأصيص لمدة أسبوعين تقريباً أو حتى تظهر الجذور في الثقوب الموجودة في قاع الأواني. خلال هذا الوقت يجب أن تكون الأواني مغطاة بقطعة قماش أو شاش قطني وتوضع بالقرب من النوافذ أو تحت الأضواء الاصطناعية بكثافة إضاءة تبلغ 500-1000 شمعة ضوئية. يجب أن تبقى الرطوبة عالية خلال هذه الفترة عن طريق وضع الأواني على فراش رطب من الحصى أو تغطية كل وعاء منها بكيس بلاستيكي وربط الكيس بشريط مطاطي.

بعد أسبوعين، يتم خفض الرطوبة عن طريق فك البلاستيك حول الأصيص والسماح بدورة هواء أكبر. بعد 8 أسابيع تظهر الجذور من خلال الأصيص. يمكن نقل كل سرخس إلى أصيص أو سلة أكبر. يتم النقل النهائي بعد 3 أسابيع. يجب تغذية النباتات أسبوعيا بأسمدة متوازنة.

سرخس ستاغهورن Staghorn Fern

تعتبر الأنسجة المشيجية العقيمة الناتجة عن إنبات البويغات المعقمة مصدراً ممتازاً للجزء النباتي المنفصل لإنشاء زراعات السرخس (Bashe, 1973; Beckwith and Schroder, 1978; Flifet, 1961; Knaus, 1976; Spear, 1977). يمكن أن يبدأ الإنبات خلال 7 أيام في وسط الآجار ويظهر الثالوس (prothallia) (أول الطور المشيجي) في غضون 14 يوماً. تتزايد الكتل في الحجم بسرعة وتتطلب التقسيم والنقل اللاحق إلى وسط كل 6 أسابيع. الإنبات المعقم أفضل من الإنبات المعتاد على وسط البيتموس لأنه يتطلب عمالة أقل.

الغرض:

إنشاء زراعات سرخس (*Phatycerum bifurcatum*) من الأبواغ ومقارنة تقانتان في التضاعف على نطاق واسع (Hennen and Sheehan, 1978; Cooke, 1979).

المرحلة الأولى

تحضير الوسط:

(500 مل لتر مكافئ، وسط إنبات بويغات السرخس.

1- صب 250 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 1000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) 5 مل من كل مركزات أملاح موراشيج وسكوج: النترات، الكبريتات، الهاليدات، NaFeEDTA وPBMo

ب) 5 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/ اللتر).

3) ضبط الحجم على 500 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4) أضف 4 جم آجار.

5) التعقيم في الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6) وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيكي معقم (100 × 20 مم).

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- جمع البويغات من سرخس ستاغهورن (قرن الوعل) الناضج عن طريق كشط الأبواغ من الجانب السفلي من السعف في أنابيب بلاستيكية مدببة خاصة بأجهزة الطرد المركزي.

2) أغسل البويغات بإضافة الماء المعقم لكل أنبوب والطرد المركزي لمدة 5 دقائق ثم أسكب المادة الطافية.

3) أعد تعليق مكورة حبيبات البوغ في 2% من مجلول كلور التبييض مع قطرتين توين -20 لكل 100 مل وأخلط لمدة 10 دقائق.

4) الطرد المركزي باستخدام تقنية معقمة، صب محلول التبييض والشطف ثلاث مرات بالماء المعقم.

5) أعد تعليق حبيبات البويغات في 5 مل من الماء المقطر المعقم.

6) تلقيح الوسط بمعلق البوغ.

7) الحضانة في الظلام لمدة أسبوع واحد ثم النقل إلى الإضاءة.

ملاحظات

يظهر بوضوح الثالوس من الأبواغ خلال 4 أسابيع. بمجرد حدوث الإخصاب وتطور نبات البويغات الذكرية، يمكن تقسيم الطور البوغي الذكري وزراعته في وسط المرحلة الثانية.

المرحلة الثانية

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط س خس ستاغهورن المرحلة الثانية)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج؛ النترات، السلفات، الهاليدات، NaFeEDTA، PBMO

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)

ج) 10 مل من مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/اللتر)

د) 30 جم سكروز

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7

4- أضف 8 جم آجار وذوبه

5- وزع 25 مل لكل أنبوب اختبار (25 × 150 مم)، والتغطية.

6- التعقيم في الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- التبريد بميلان 45°.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

تقسيم زراعات المرحلة الأولى من نباتات الطور البوغي وحضانتها

ملاحظات

في غضون 6 أسابيع تقريباً، تتكاثر كل زراعة إلى كتلة من النباتات (20-40 نبات). فصل الزراعات لنباتات مفردة، أحسب عدد النباتات لكل زراعة. سيتم ضم هذه الزراعات لإنشاء المرحلة الثالثة (Cooke, 1979).

المرحلة الثالثة

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط مرحلة سرخس يتاغهورن الثالثة).

يتم استخدام وسط المرحلة الثانية من سرخس ستاغهورن (Staghorn) ثم الخطوات التالية من 3 إلى 9:

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- يتم تقسيم الوسط إلى أربع أقسام كل منها 250 مل.

5- أضف 2.25 جم آجار لكل منهما. تغطية كل قارورة بورق ألمونيوم.

6- التعقيم في الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- عندما يبرد الوسط إلى حوالي 40 درجة مئوية، ضع أقسام 250 مل في خلاط معقم للتجانس في داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي. ثم تتم إضافة المحتويات (مع فصل المواد النباتية من الآجار والتخلص من الآجار) من ثلاث حاويات زراعة من المرحلة الثانية من سرخس ستاغهورن.

8- أمزج لمدة 5 ثوان وصب 20 إلى 25 مل من الخليط في أطباق بتري بلاستيكية معقمة (20 × 100 مم).

9- ضع أطباق بتري على رف الحاضنة

ملاحظات

يظهر النمو خلال 3 أسابيع في جميع أعماق الوسط. في خلال شهرين تتحقق معدلات عالية من التضاعف. كل طبق بتري يحتوي على العديد من النباتات. أحسب عدد النباتات لكل طبق. يمكن غسل النباتات بسهولة من الآجار وتتم زراعتها في خليط الأصيص وتحفظ تحت رطوبة عالية لمدة أسبوعين. يكون معدل البقاء على قيد الحياة حوالي 80%.

البيانات والأسئلة

1- كم عدد النباتات التي تم فصلها عن زراعة المرحلة الثانية؟ وكيف؟ هل استغرق ذلك وقتاً طويلاً؟
2- ما هي مزايا تقنية التجانس (homogenization)؟

3- كم عدد أجزاء النبات التي تم زراعتها في كل طبق بتري؟ (عد الرقم على ربع من طبق البتري، وأضرب في أربعة.) وكيف تم تطوير العديد من السرخس، وكم استغرق من الوقت.

زراعة قمة البرعم النباتية Plant shoot tip culture

ثبت أن زراعة قمة الجذع في النبات بأنها واحدة من أكثر الزراعات استخداماً في تقنيات التكاثر النسيلي لنباتات الزينة. هذه الطريقة كثيفة العمالة حيث تصل نسبة العمالة إلى حوالى 60% من تكاليف الإكثار. وكانت هنالك محاولات محدودة للاستئصال الميكانيكي وزراعة البراعم عن طريق الروبوتات وأنظمة الزراعة الســـــــــائلة (McCown, 2003). تكاثر النباتات الخشبية هو التحدي الأكبر على وجه الخصوص.

اللبخ (*Ficus*)

الغرض:

إجراء زراعة قمة البرعم لتضاعف براعم اللبخ (*Ficus elastica*) الجانبية.

المرحلة الأولى

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط مرحلة اللبخ الأولى)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) 7.5 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: النترات والكبريتات، والهاليدات، وNaFeEDTA و PBMo

ب) 10 من مركز الثيامين (10 جرام/اللتر)

ت) 10 مل من مركز ميو-أنيزتول (10 جرام /اللتر).

ث) 10 مل من مركز ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (17 جرام/اللتر).

ج) 8 مل من مركز سلفات الأدنين (1 جرام/اللتر).

ح) 3 مل من مركز (IAA) (50 ميليجرام/ اللتر).

خ) 300 مل من مركز (2iP) (50 ميليجرام/500 مل).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 8 جرام من الآجار وذوبه.

5- وزع 25 مل في أنابيب زراعة (25 × 150 مم) وتغطيتها.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- إزالة قمم البراعم بطول 5-7 سم من النباتات المخزونة.

2- أغسل الأجزاء النباتية بالماء الدافئ والصابون، ثم التعقيم بمحلول كلور التبييض 10% والشطف 3 مرات بالماء المعقم.

3- إزالة الأوراق الخارجية وقطع الأنسجة الجذعية المحروقة بمادة التعقيم داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي.

4- حضانة الزراعات في رفوف غرف الحاضنات.

5- بعد 4-6 أسابيع يتم استخدام الزراعات النظيفة للمرحلة الثانية من الإكثار.

المرحلة الثانية:

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، لوسط المرحلة الثانية لنبات اللبخ)

الوسط الغذائي للمرحلة الثانية لإكثار اللبخ هو نفس وسط المرحلة الأولى ما عدا (IAA) المحذوف.

المرحلة الثالثة

تحضير الوسط:

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أغلط ما يلي:

أ) 5 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: النترات والكبريتات، والهاليدات، وNaFeEDTA و PBMo

ب) 5 مل من مركز الثيامين (10 جرام/اللتر)

ت) 5 مل من مركز ميو-أنيزتول (10 جرام /اللتر).

ث) 15 جرام سكروز

ج) 4 مل من مركز مركز سلفات الأدنين (1 جرام/100 مل)

ح) 2 مل من مركز (IAA) (10 ميليجرام/ 100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 500 مل. ضبط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 4 جرام من الآجار وذوبه.

5- وزع 25 مل في أنابيب زراعة (25 × 150 مم) وتغطيتها.

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

أفصل البراعم الفردية لزراعات المرحلة الثانية وأزرعها في وسط المرحلة الثالثة للتجذير. عندما تنمو الجذور، يمكن إزالة الجذع المتجذر من الزراعة، وغسلها لإزالة الآجار وتزرع في خليط التربة. يتم تغطية النبات للحفاظ على الرطوبة لمدة أسبوعين تقريباً حتى يتأقلم.

الأسئلة

1- ما هو الفرق بين المرحلة الأولى والمرحلة الثانية فيما يتعلق باستجابة نمو الجزء النباتي المنفصل؟

2- هل يتشكل نسيج الكدب في مزارع المرحلة الثانية؟

3- أي منطقة من الجزء النباتي المنفصل تؤدي إلى ظهور براعم جديدة؟

4- ما هو معدل التضاعف المحتمل في المرحلة الثانية؟.

الكالانشوي Kalanchoe

الغرض:

مراقبة تجدد البراعم العرضية من البرعم والساق وجزء الورقة المنفصل من نبات الكالانشوي ومراقبة تأثير الطرز الجينية على التجدد (Smith and Nightingale, 1979).

تحضير الوسط:

(1لتر مكافئ، لإنشاء براعم الكالانشوي)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: النترات والكبريتات، والهاليدات، وNaFeEDTA و PBMo

ب) 10 مل من مركز الثيامين (10 جرام/اللتر)

ت) 10 مل من مركز ميو–أنيزتول (10 جرام /اللتر).

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز الكينتين (10 ميليجرام/100 مل).

ح) 8 مل من مركز سلفات الأدنين (17 جرام/اللتر).

خ) 10 مل من مركز ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (17 جرام/اللتر).

د) 10 مل من مركز (IAA) (10 ميليجرام/100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام آجار وذوبه.

5- وزع 25 مل لكل أنبوب زراعة (25 × 150 مم).

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- يتم جمع أقسام الأوراق والساق وقمة براعم مخزون نبات الكالانشوي (*Kalanchoe bossfeldiana* Poelln). تتباين استجابة أصناف الكالانشوي المختلفة. قارن بين عدد من الأصناف.

2- أغسل الأجزاء النباتية المنفصلة من الأوراق والساق والقمم النباتية بالماء الدافئ والصابون لإزالة الغبار ثم الشطف.

3- لف المادة النباتية في مربعات من الشاش لمنعها من الطفو.

4- أنقل المادة النباتية الملفوفة إلى أنبوب اختبار أو كأس صغير ويتم التعقيم بمحلول كلور التبييض 15% مع إضافة قطرتين من توين–20 لكل 100مل، بحيث تغطي المادة المعقمة الأجزاء النباتية وتحرك الحاوية لمدة 10 دقائق.

5- في داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي، أسكب المادة المعقمة وأشطف 3 مرات بالماء المقطر المعقم.

6- أنقل المادة النباتية المغلفة إلى طبق بتري معقم وأفتح التغليف وأنقل قطعة من النسيج في كل مرة واحدة إلى طبق بتري نظيف وإزالة الأجزاء المتأثرة بمبيض الكلور (مناطق بيضاء).

7- أزرع أقسام من نصل الورقة (15×15 مم) والساق (15–20 مم)، القمم النباتية مع 2–4 أوراق ابتدائية (1–2 مم) في حاويات أنابيب الزراعة. ثم الحضانة.

الأسئلة

1- سجل ظهور البراعم العرضية من الأجزاء النباتية المستأصلة المختلفة أسبوعياً. ما هو متوسط عدد البراعم من الأجزاء النباتية المستأصلة المختلفة؟

2- أي من الأجزاء النباتية المنفصلة ينتج معظم البراعم؟

3- من أي منطقة ينشأ البرعم العرضي؟

4- ما الفرق بين استجابات الطرز الوراثية المختلفة من الكالانشوي؟

5- هل توجد فروق بين معدلات التلوث لمختلف الأجزاء النباتية المنفصلة؟.

البنفسج الأفريقي African Violet

الغرض:

إنشاء زراعات نظيفة للتكاثر النسيلي السريع وعزل أنماط ظاهرية مختلفة من أقسام من كايمرا أوراق البنفسج الأفريقي والأعناق (Bilkey *et al*., 1978; Norris *et al*., 1983; Start and Cummings, 1976).

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، وسط بنفسج أفريقي).

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل.

2- أخلط ما يلي:

أ) مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج: النترات والسلفات، والهاليدات، وNaFeEDTA و PBMo

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 ميليجرام/اللتر)

ت) 10 مل مركز ميو-أنيزتول (10 جرام /اللتر).

ث) 20 مل من مركز (IAA) (10 ميليجرام/100 مل).

ج) 20 مل من مركز الكينتين (10 ميليجرام/100 مل).

ح) 10 مل من مركز ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) (17 جرام/ للتر).

خ) 8 مل من مركز سلفات الأدنين (1 جرام/100 مل)

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام آجار وذوبه.

5- وزع 25 مل لكل أنبوب زراعة (25 × 150 مم).

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- التبريد بميلان 45°.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

1- إزالة الأوراق السليمة واليافعة من نباتات البنفسج الأفريقي باستخدام المشرط. استخدم أصنافاً مبرقشة بقطاعات اللون الأبيض أو الأحمر أو الأخضر الفاتح. سجل اسم صنف كل نبات.

2- أغسل الأجزاء النباتية المنفصلة بماء صابوني دافئ وأشطف بعناية حيث لا تحدث كدمات في المادة النباتية.

3- لف الأجزاء النباتية المنفصلة قي قماش قطني ووضعها في دورق سعة 250 مل مغطى بطبق بتري.

4- عقم النسيج في محلول كلور التبييض 10% لمدة 15 دقيقة.

5- أشطف النسيج ثلاث مرات في ماء مقطر معقم.

6- استأصل أجزاء نباتية منفصلة بحجم 1 سنتيمتر مربع من الأوراق وكذلك من أعناق الأوراق.

يأخذ المتدرب ستة أجزاء منفصلة من الأوراق السليمة، كما هو موضح في الشكل 12.2. اقطع القطاع الباهت من الورقة وازرع الأجزاء المنفصلة مع عرق الورقة الرئيسي المجاور للقطاع الطافر (حتى لو كان العرق أخضر).

7- ضع هذه الأجزاء النباتية المنفصلة على وسط البنفسجي الأفريقي.

8- الحضانة على رفوف غرف الحاضنات.

البيانات والأسئلة

مراقبة التقدم الأسبوعي للأجزاء النباتية المنفصلة. لاحظ الاختلافات في تطوير الأقسام.

1- هل هناك اختلاف في الاستجابة التشكلية بين أنسجة نصل الأوراق وأنسجة أعناق الورقة؟ إذا كان الأمر كذلك، ما هو الفرق؟

2- ما هي الكايميرا؟ لاحظ موقع ولون النبيتات الناشئة من القطاعات المختلفة.

3- ما الغرض من استخدام خطوط المهق النقية في أبحاث زراعة الأنسجة؟

4 - هل توجد فروق في الاستجابة بين الأصناف المختلفة. إلى ماذا تنسبهم؟

الأنواع المهددة بالانقراض

تتعرض العديد من مجموعات نباتات الصبار والنباتات آكلة اللحوم والعشائر النباتية المتوطنة الأصلية في جميع أنحاء العالم لخطر الانقراض بسبب تدهور الموائل والجمع الواسع من الحقول. تم جمع بعض النباتات النادرة من مواطنها الأصلية مما يعرض بقائها للخطر.

التكاثر التقليدي لبعض أنواع الصبار غير كافٍ لتلبية الطلب بسبب انخفاض الأعداد المقابلة للتعويض، وضعف إنبات البذور، ومراض التخميد (damping-off)، والعقم، والنمو البطيء. الجدير بالذكر، حوالي ربع نبات الصبار المستوطن نادرة.

العديد من النباتات التي يتم جمعها في الحقول لا تعيش في الزراعة. التكاثر الدقيق لهذه النباتات يمكن أن يوقف الاتجاهات نحو الانقراض.

قدم (Reed *et al.*, 2011) عدداً كاملاً من مجلة زراعة الخلية خارج الجسم الحي أحتوى على مقالات في الحفاظ على التنوع الحيوي وبقايا النباتات الصغيرة. كما وفر (Bunn *et al.*, 2011 Pence, 2011;) مراجع وتوجيهات للعمل مع مجموعات النباتات المهددة بالانقراض. بالإضافة إلى ذلك، تم مناقشة معلومات شاملة حول تخزين الأنسجة على المدى القصير والطويل وتكلفة إنشاء التكاثر والحفاظ على الأنواع المهددة بالانقراض.

الصبار Cactus

الغرض:

إنشاء زراعات معقمة من بادرات الصبار (Ault and Blacknon, 1985, 1987; Clayton *et al.*,1990; Johnson and Emino, 1979, 1979a; Mauseth, 1979; Smith *et al.*,1991; Mariateresa *et al.*,2010)

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، وسط المرحلة الأولى للصبار).

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل
2- أخلط 10 مل من مركزات موراشيجي وسكوج؛ النترات، الكبريتات، الهاليدات، NaFeEDTA و PBMo
3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جم آجار وذوبه.

5- وزع 25 مل لكل أنبوب مزرعة (25 × 150 مم) وتغطية الأنابيب.

6- التعقيم في الأوتوكلاف لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

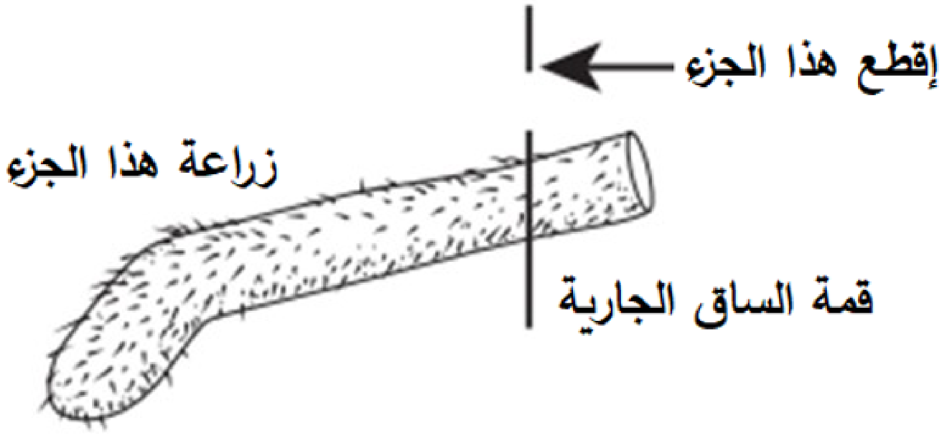
تجهيز الجزء النباتي المنفصل:

تعقيم البذور السطحي في 10% من محلول كلور التبييض لمدة 10 دقائق والشطف بماء مقطر معقم. وضع البذور على سطح وسط المرحلة الأولى للصبار. الحضانة في رفوف غرق الحاضنات.

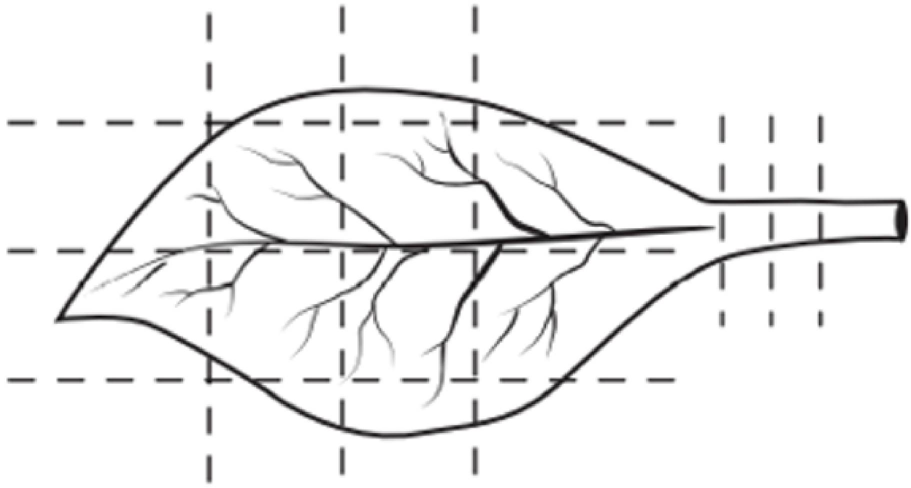
يمكن زراعة الأجزاء النباتية المنفصلة المعقمة الفرعية من البادرات المزروعة في وسط موراشيجي وسكوج مضاف إليه بالميليجرام في اللتر: 4، ثيامين؛ 100، ميوأنيزتول؛ 20000 بالإضافة إلى 44 ميكرومول (BA)، و0.5 ميكرومول (2,4-D) في أس هيدروجيني 5.7. يبدأ الصبار في التكاثر خلال 4 أسابيع ويمكن زراعته فرعياً في الوسط الموصوف.

لتكاثر البراعم، يمكن القيام بالزراعة الفرعية لقطع من نسيج الكدب حوالي 10 مم في القطر في الوسط السابق بدون (BA) و(.2,4-D). بعد 8 أسابيع تتطور براعم متعددة.

يمكن عزل البراعم وزراعة البراعم في وسط يتكون من نصف أملاح موراشيجي وسكوج بالإضافة إلى بالميليجرام في اللتر(0.4، ثيامين؛ 20000 سكروز؛ و 8000 آجار) يتم صب 10 مل من الوسط في أوعية (Magenta GA-7). يتم تعزيز التجذير بمجرد جفاف الوسط وخلال 8 أسابيع يتم تجذير معظم البراعم



شكل 12.1. زراعة الطرف القمي من الساق الجارية (1.5 سم) لسرخس بوسطن.
(*from* Smith, 2013)



شكل 12.2. إستئصال 6 أجزاء نباتية منفصلة من البنفسج الأفريقي: 4 من نصل الورقة (1 سم^2) وأثنان من عنق الورقة (1 سم). أقطع الثمانية أقسام من الورقة وإضافة العرق الرئيسي بالقرب من القطاع المتطفر (*from* Smith, 2013)

المراجع

Adams, R. M., Koenigsberg, S. S., and Langhans, R. W. (1979). *In vitro* propagation of *Cephalotus follicularis* (Australian pitcher plant). *HortScience*, 14, 512–513.

Adams, R. M., Koenigsber, S. S., and Langhans, R. W. (1979). *In vitro* propagation of the butterwort (*Pinguicula moranensis* H. B. K.). *HortScience*, 14, 701–702.

Arditti, J. (1977). Clonal propagation of orchids by means of tissue culture-A manual. In J. Arditti (Ed.), *Orchid biology, reviews and perspective* (1, pp. 203–293). Ithaca, NY: Cornell Univ. Press.

Ault, J. R., and Blackmon, W. J. (1985). *In vitro* propagation of selected native cacti species. *HortScience*, 20, 541(Abstr).

Ault, J. R., *and* Blackmon, W. J. (1987). *In vitro* propagation of *Ferocactus acanthodes* Cactaceae). *HortScience*, 22, 126–127.

Bashe, D. V. (1973). A simple method of initiating axenic cultures of pteridophytes from spores. *American Fern Journal*., 63, 147–151.

Beckwith, W. J., and Schroder, L. C. (1978). Growing ferns from spores. *Southern Florist and Nurseryman*, Dec., 28, 26–27.

Benson, L. (1977). Preservation of cacti and management of the ecosystem. In G. T. Prance, and T. S. Elias (Eds.), *Extinction is forever* (pp. 283–300). New York: New York Botanical Garden.

Bilkey, P. C., McCown, B. H., and Hildebrandt, A. C. (1978). Micropropagation of African violet from petiole cross-sections. *HortScience*, 13, 37–38.

Bristow, J. M. (1962). The controlled *in vitro* differentiation of callus from a fern, *Pteris cretica* L., into gametophytic or sporophytic tissue. *Developmental Biology*, 4, 361–375.

Bunn, E., Turner, S. R., and Dixon, K. W. (2011). Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*., 47(1), 188–200.

Burr, R. W. (1976). Mass propagation of ferns through tissue culture. *In vitro*, 12, 209–310.

Chen, S. Y., and Read, P. E. (1983). Micropropagation of Leatherleaf fern. *Proceedings of Florida State Horticultural Society*, 96, 266–269.

Clayton, P. W., Hubstenberger, J. F., and Phillips, G. C. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe cactinae. *Journal of American Horticultural Society*, 115, 337–343.

Cooke, R. C. (1977). The use of an agar substitute in the initial growth of *Boston* ferns *in vitro*. *HortScience*, 12, 339.

Cooke, R. C. (1979). Homogenization as an aid in tissue culture propagation of *Platycerium* and *Davallia*. *HortScience*, 14, 21–22.

Debergh, P. (1977). Symposium on tissue culture for horticultural purposes. *Acta Horticulturae*, 78, 6–9.

DeFossard, R. A. (1976). *Tissue culture for plant propagators*. Armidale, Australia: University of New England, Department of Continuing Education.

DeFossard, R. A. (1977). Tissue culture in horticulture-Perspective. *Acta Horticulturae*, 78, 450–455.

Evans, D. A., Sharp, W. R., and Flick, C. C. (1981). Plant regeneration from cell cultures. *Horticlture Review*, 3, 214–314.

Evenari, M. (1989). The history of research on white-green variegated plants. *Botany Review*, 55, 106–133.

Flifet, T. (1961). Growing ferns from spores. *American Fern Journal*, 51, 113–127.

Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., and Kanti Das, P. (2010). An elite protocol for accelerated quality-cloning in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46, 537–548.

Garcia, R., Pacheco, G., Falcao, E., and Borges, G. (2011). Influence of type of explant, plant growth regulators, salt composition of basal medium and light on callogenesis and regeneration in *Passiflora suberosa* L. (Passifloraceae). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106(1), 47–54.

Goncalves, S., Escapa, A. L., Grevenstuk, T., and Romano, A. (2008). An efficient *in vitro* propagation protocol for *Pinguicula lusitanica*, a rare insectivorous plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95(2), 239–243.

Gosal, S. S., Wani, S. H., and Kang, M. S. (2010). Biotechnology and crop improvement. *Journal of Crop Improvement*, 24(2), 153–217.

Harper, K., and Murashige, T. (1976). *Clonal multiplication of ferns in vitro*. Master's thesis, University of California, Riverside.

Hartmann, H. T., and Kester, D. E. (1975). *Plant propagation: principles and practices* (3rd ed.). Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

Hennen, G. R., and Sheehan, T. J. (1978). *In vitro* propagation of *Platycerium stemaria* (Beauvois) Desv. *HortScience*, 13, 245.

Hires, C. S. (1940). Growing ferns from spores on sterile nutrient media. *Journal of New York Botany Gardens*, 41, 257–266.

Hirsch, A. M. (1975). The effect of sucrose on the differentiation of excised fern leaf tissue into either gametophytes or sporophytes. *Plant Physiology*, 56, 390–393.

Holdgate, D. P. (1977). Propagation of ornamentals by tissue culture. In J. Reinert, and Y. P. S. Bajaj (Eds.), *Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture* (pp. 18–43). New York: Springer-Verlag.

Ivanova, M., and Van Staden, J. (2010). Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe plyphylla* Schonland ex Pillans. *Plant Growth Regulation*, 60(2), 143–150.

Iyyakkannu, S., Yeon, S. J., and Ryong, J. B. (2011). Micropropagation of *Hedera helix* L. “Mini”. Prop. *Ornamental Plants*, 11, 125–130.

Johnson, J. L., and Emino, E. R. (1979). *In vitro* propagation of *Mammilaria elongata*. *HortScience,* 14, 605–606.

Johnson, J. L., and Emino, E. R. (1979a). Tissue culture propagation in the Cactaceae. *Cactus and Succulent Journal*, 51, 275–277.

Kalinia, A., and Brown, D. C. W. (2007). Micropropagation of ornamental *Prunus* spp. and GF 305 peach, a Prunus viral indicator. *Plant Cell Reports*, 26(7), 927–935.

Kevers, C., Franck, R., Strasser, R. J., Dommes, J., and Gaspar, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: A typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 77, 181–191.

King, R. M. (1957). Studies in the tissue culture of cacti. *Cactus and Succulent Journal*, 29, 102–104.

De Klerk, G.-J. (2002). Rooting of microcuttings: Theory and practice. *In vitro Plant*, 38, 415–422.

Knaus, J. F. (1976). A partial tissue culture method for pathogen-free propagation of selected ferns from spores. *Proceedings of Florida State Horticulral Society*, 89, 363–365.

Krikorian, A. D. (1982). Cloning higher plants from aseptically cultured tissues and cells. *Biology Review*, 57, 151–218.

Kyte, L. (1987). *Plants from test tubes—An introduction to micropropagation*. Portland, OR: Timber Press.

Maheshwaramma, S., Reddy, D. L., and Reddy, S. S. (2008). Standardization of hormonal concentration and type of explants for the *in vitro* propagation of *Chrysanthemum* cv. CO-1. *Progress in Research*, 3(2), 163–165.

Mariateresa, C., Daniela, B., and Giuseppe, C. (2010). *In vitro* propagation of *Obregonia denegrii* Fric. (Cactaceae). *Propagation of Ornamental Plants*, 10(1), 29–36.

Mauseth, J. D. (1977). Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal*, 49, 80–81.

Mauseth, J. D. (1979). A new method for the propagation of cacti: Sterile culture of axillary buds. *Cactus and Succulent J*ournal, 51, 186–187.

Mauseth, J. D. (1976). Cytokinin and gibberellic acid induced effects on the structure and metabolism of shoot apical meristem in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 63, 1295–1301.

Mauseth, J. D. (1977). Cactus tissue culture: A potential method of propagation. *Cactus and Succulent Journal*, 49, 80–81.

Mauseth, J. D. (1982). A morphogenetic study of the ultrastructure of *Echinocereus engelmanii* (Cactaceae). IV. Leaf and spine primordia. *American Journal of Botany*, 69, 546–550.

Mauseth, J. D., and Halperin, W. (1975). Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polyacantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 62, 869–877.

McCown, B. H. (2003). Biotechnology in horticulture: 100 years of application. *HortScience,* 38(5), 1026–1030.

Miller, L., and Murashige, T. (1976). Tissue culture propagation of tropical foliage plants. *In vitro*, 12, 797–813.

Minocha, S. C., and Mehra, P. N. (1974). Nutritional and morphogenetic investigations on callus cultures of *Neomammillaria prolifera* Miller (Cactaceae). *American Journal of Botany*, 61, 168–173.

Morel, G. (1964). Tissue culture—A new means of clonal propagation in orchids. *Am. Orchid Society Bulletin*, 33, 473–478.

Morel, G. (1966). Clonal propagation of orchids by meristem culture. *Cymbidium Society News*, 20, 3–11.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annual Review of Plant Physiology*, 25, 135–166.

Naylor, E. E., and Johnson, B. (1937). A histological study of vegetative reproduction in Saintpaulia ionantha. *American Journal of Botany*, 24, 673–678.

Norris, R., Smith, R. H., and Vaughn, K. C. (1983). Plant chimeras used to establish *de novo* origin of shoots. *Science*, 220, 75–76.

Oinam, G., Yeung, E., and Kurepin, L. (2011). Adventitious root formation in ornamental plants: I. General overview and recent successes. *Propagation of Ornamental Plants*, 11(2), 78–90.

Oki, L. (1981). The modification of research procedures for commercial propagation of *Boston* ferns. In M. J. Constantin, R. R. Henke, K. W. Hughes, and B. V. Conger (Eds.), Propagation of higher plants through tissue culture: Emerging technologies and strategies *Proceedings of an International Symposium*, Knoxville, TN Environment and Experimental Botany, (21, pp. 397–413). London Pergammon Press (imprint of Elsevier).

Oldfield, S. (1985). Whither international trade in plants? *New Scientist*, 106, 10–11.

Pedhya, M. A., and Mehta, A. R. (1982). Propagation of fern (Nephrolepis) through tissue culture. *Plant Cell Reptorts*, 1, 261–263.

Pierik, R. L.M. (1979). *In vitro culture of higher plants*. Wageningen, The Netherlands: Ponsen en Looijen.

Pietropaolo, J., and Pietropaola, P. (1986). *Carnivorous plants of the world*. Portland, OR: Timber Press.

Pence, V. C. (2011). Evaluating costs for the *in vitro* propagation and preservation of endangered species. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47, 176–187.

Preece, J. E. (2010). Micropropagation in stationary liquid media. *Propagation of Ornamental Plants*, 10(4), 183–187.

Reed, B., Sarasan, V., Kane, M., Bunn, E., and Pence, V. C. (2011). Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. *In vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 47, 1–4.

Roberts, D. J. (1965). Modern propagation of ferns. *Proceedings International Plant Propagation Society*, 15, 317–321.

Rojas-Martinez, L., Visser, R. G. F., and deKlerk, G.-J. (2010). The hyperhydricity syndrome: Waterlogging of plant tissues as a major cause. *Propagation of Ornamental Plants*, 10(4), 169–175.

Rounsaville, T., Touchell, D., Ranney, T., and Blazich, F. A. (2011). Micropropagation of *Mahonia* “Soft Caress”. *HortScience*, 46(7), 1010–1014.

Sasaki, K., Endo, M., and Inada, I. (2004). Effects of sampling season of explants and growth stage of mother plants on the regenerative capacity in cultured shoot apices of *Chrysanthemum* (*dendranthema* X *grandiflorum* (Ramat.) Kitam.). *Journal of Japanese Society of Horticultural Sciences*, 73(1), 36–41.

Schnell, D. E. (1976). *Carnivorous plants of the United States and Canada*. Winston-Salem, NC: John F. Blair.

Sivanesan, I., Song, J. Y., Hwang, S. J., and Jeong, B. R. (2011). Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai— rare endemic ornamental plant. *Plant Cell. Tissue and Organ Culture* 105, 55–63.

Skoog, F., and Miller, C. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposium of Socirty of Expterimental Biology,* 11, 118–131.

Skoog, F., and Tsui, C. (1948). Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. *American Journal of Botany*, 35, 782–787.

Smith, R. H., and Nightingale, A. E. (1979). *In vitro* propagation of *Kalanchoe*. *HortScience*, 14, 20.

Smith, R. H., Burdick, P. J., Anthony, J., and Reilley, A. A. (1991). *In vitro* propagation of *Coryphantha macromeris* (Benson). *HortScience*, 26, 315.

Spear, E. J. (1977). Care of *Platycerium* sporelings. *Proceedings of Florida State Horticultural Sociences*, 90, 128–129.

Start, N. D., and Cummings, B. G. (1976). *In vitro* propagation of *Saintpaulia ionantha* Wendl. *HortScience*, 11, 204–206.

Wetherell, D. F. (1982). *Introduction to in vitro propagation*. Wayne, NJ: Avery.

Yam, T. W., and Arditti, J. (2009). History of orchid propagation: A mirror of the history of biotechnology. *Plant Biotechnology Reports*, 3(1), 1–5

الفصل الثالث عشر

عزل وصهر المحتوى الخلوي Protoplast Isolation and Fusion

المحتوى الخلوي (protoplast) هو خلية نباتية تم إزالة جدارها الخلوي الصلب ويحيط بها غشاء البلازما الرقيق فقط. تم استكشاف العديد من استخدامات المحتوى الخلوي (Horváth, 2009; Ko *et al*., 2006; Tamaru *et al*., 2002; Wu *et al*., 2009) أصبح من الممكن إنتاج الهجن الفريدة التي لا يمكن استحداثها عن طريق التهجين الجنسي وتطويرها من خلال اندماج المحتوى الخلوي بين نوعين مختلفين مثل، البطاطس والطماطم (Melchers *et al*., 1978; Power *et al*., 1980; Cocking *et al*., 1977; Gleba and Hoffman, 1980). بالإضافة إلى ذلك، فإن تحوير المحتوى الخلوي بالجينات الأجنبية إلى يؤدي تحسن ملحوظ في المحاصيل (Rhodes *et al*., 1988; Mazarei *et al*., 2008). يمكن أن يحدث استيعاب الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) المباشر بالتثقيب الكهربائي (electroporation) أو كيميائياً بواسطة البولي إيثيلين جلايكول (PEG)، مما ينتج النباتات المحورة وراثياً (Cocking, 1977; Datta et al., 1990; Fromm *et al*., 1986; Rhodes *et al*., 1988; Ren and Zhao, 2008). يمكن أن يكون المحتوى الخلوي مفيداً أيضاً في مقايسات التعبير العابر والمستقر (transient and stable expression assays) حيث يتم اختبار التركيبات الجينية في نظام النبات (Yoo *et al*., 2007; Zhang *et al*., 2008; Zhang *et al*., 2011).

يمكن دراسة المشاكل الفسيولوجية للخلية باستخدام المحتوى الخلوي (Galun, 1981) نظراً لعدم وجود جدار خلوي، وسهولة الوصول من خلال الغشاء البلازمي والتحقق من تركيبه الكيميائي (الدهون، البروتينات والإنزيمات) والخواص الفيزيائية (نقل المذاب عبر غشاء البلازما). يمكن عزل العضيات بشكل فردي من المحتوى الخلوي، مما يسمح بفحص انتقال المستقلبات بين الأجزاء المختلفة داخل الخلايا. فحص أثر المواد المضافة خارجياً على الخلية

تستخدم خلايا من مصادر مختلفة لعزل المحتوى الخلوي، مثل، نسيج الكدب، زراعات الخلايا المعلقة وأنسجة النبات. في الأنسجة النباتية، تعتبر الأوراق اليافعة مصدر ممتاز للخلايا. عند استخدام الأوراق، تتم إزالة البشرة وإن كان في الإمكان تعريض الخلايا العمادية لمحلول الإنزيم الذي تم إعداده ليسمح بهضم جدار الخلية. إذا لم يكن من السهل إزالة البشرة، يتم تقطيع الأوراق إلى شرائح صغيرة، مما يسمح لتعريض الطبقة العمادية. عادة ما تتم إزالة جدران الخلايا عن طريق الهضم الأنزيمي. تستخدم إنزيمات النقع (macerating enzyme) مثل

البكتنيز (pectinase) لفصل الأنسجة لخلايا مفردة. بينما تستخدم إنزيمات السيليوليز (cellulase) والهميسيليوليز (hemicellulase) لهضم الجدار الخلوي وتحرير المحتوى الخلوي.

عند استخدام الهضم الأنزيمي، من المهم الحفاظ على الجهد التناضحي لوسط الهضم في ظروف مثالية لمنع انفجار أو ذبول المحتوى الخلوي. ويتحقق ذلك عن طريق خلط الإنزيمات في محلول أملاح المغذيات والفيتامينات وتعديل الجهد التناضحي بالمانيتول، السوربيتول، أو مزيج من الأثنين. يجب تعديل الرقم الهيدروجيني لوسط الهضم لنشاط الإنزيم الأمثل ونمو الخلايا.

عزل وصهر المحتوى الخلوي النباتي Plant protoplast isolation and fusion

الغرض:

تعلم مبادئ وتقنيات عزل وصهر المحتوى الخلوي.

النسيج النباتي:

- نسيج كدب القطن (*Gossypium hirsutum*) بعد 14 يوم من النقل
- بتلات البنفسج الأفريقي (*Saintpaulia* sp.) ذات الأولوان الزاهية
- نسيج أوراق نبات التبغ (*Nicotiana benthamiana*)
- نسيج كدب بذور الأرز
- نسيج كدب القمح
- نسيج أوراق نبات (*thaliana Arabidopsis*)
- ثمار أو أوراق الطماطم

الاحتياجات:

1- محاليل الإنزيمات (التخزين في 4°م لمدة تصل إلى 10 أيام)

أ) القطن- 0.5% بكتنيز في 0.7 مولار مانيتول

ب) البنفسج الأفريقي- 1% سيليوليز؛ 0.5% بكتينيز في 0.7 مولار مانيتول

ت) الإنزيم البديل- 1% أونززوكا سيليوليز (Onozuka Cellulase) (R-10)؛ 0.4% (Onozuka Macerozyme)؛ 0.4 مولار مانيتول؛ 40 ميليمولار (MES-KOH) (pH 5.6)؛ 40 ميليمولار كلوريد بوتاسيوم؛ 20 ميليمولار كلوريد كالسيوم

2- 2 طبق بتري أو طبق واحد كبير

3- 2 كأس 30 مل

4- 45-55 ميكرون شبكة نايلون

5- 2 أنابيب الطرد المركزي مستديرة القاعدة

6- جهاز طرد مركزي منضدي

7- ماصات باستير

8- 0.7 مانيتول

9- شريحتان زجاجيتان مع غطاء

10- محلول بولي إثلين جلايكول (PEG)

أ) 10 مل 0.7 مولار مانيتول

ب) 5 جرام (PEG)

ت) 50 ميليمولار ($CaCl_2 \cdot H_2O$)

11- صبغة إيفان الزرقاء في 0.7 مانيتول

12- مجهر ضوئي

13- محلول (W5) (300 mM NaCl; 250 mM $CaCl_2$; 10 mM KCl; 10 mM glucose; 3 mM MES-KOH (pH 5.6)

14- محلول تخزين وسط موراشيجي وسكوج (وسط موراشيجي وسكوج السائل)

15- أنابيب طرد مركزي دقيقة سعة 1.5 مل

16- تجويف لتسريب الفراغ (Chamber for vacuum infiltration)

17- رقائق الألمنيوم

18- شريحة قياس كريات الدم الحمراء بلاستيكية (plastic hemocytometer)

تحرير المحتوى الخلوي Protoplast Liberation

يمكن أن يتطلب عزل المحتوى الخلوي فترة طويلة من الوقت. لهذا السبب، بعض الخطوات يجب إجراؤها قبل التمرين.

يوضح الشكل 13.1 مخططاً لجدول عزل المحتوى الخلوي.

1- أنبوب 5 مل من محاليل إنزيمات القطن والبنفسج الأفريقي في محلول في أطباق بتري بلاستيكية معقمة (60 × 15 مم) منفصلة.

2- تمزيق أثنين من بتلات البنفسج الأفريقي بعناية لكشف خلايا الزهرة الداخلية المصطبغة (الملونة). تعويم الأجزاء الممزقة في محلول إنزيم البنفسج الأفريقي. تغطية طبق البتري بورق الألمنيوم وضعه على هزاز (40 دورة في الدقيقة).

3- أنقل 500 ميليجرام من نسيج كدب القطن إلى محلول إنزيم القطن؛ يغطي برقائق ألمونيوم ويوضع على هزاز (40 دورة في الدقيقة).

طريقة عمل بديلة لتحرير المحتوي الخلوي

اختيارية:

بالنسبة لأنواع الأنسجة المتمردة، خاصة أوراق الطماطم، يعمل التعقيم القصير على تحسين إنتاجية عزل المحتوى الخلوي بشكل كبير. دقيقة واحدة في 70% إيثانول، 7 دقائق في 20% كلوروكس.

1- استخدم شفرة جراحية معقمة لتقطيع الأنسجة النباتية إلى شرائح أو مربعات دقيقة. بالنسبة للأنسجة الرقيقة جداً أو الضعيفة، يمكن إجراء هذه العملية والنسيج مغموراً في محلول التخزين (W5) أو (MS).

2- ضع 0.5-1.0 جرام من الأنسجة النباتية المقطعة في أنبوب جهاز طرد مركزي معقم دقيق 1.5 مل.

3- أملأ الفراغ المتبقي من الأنبوب بمحلول إنزيم بديل (حوالي 1-2 مل).

4- ضع الأنابيب مفتوحة في تجويف تسريب الفراغ والإخلاء لمدة 30 دقيقة.

5- إزالة الأنبوب من الفراغ، وأغلق الغطاء، والتغطية بورق الألمنيوم (أو قم باستبعاد الضوء من نسيج النبات). الحضانة مع الاهتزاز المعتدل لمقدار الأوقات المحددة التالية:

أ. أوراق الطماطم - 3 ساعات

ب. أوراق التبغ، ثمار الطماطم، نسيج كدب الأرز، نسيج كدب القمح، أوراق (*Nicotiana benthamiana*)، أوراق (*Arabidopsis thaliana* leaves) - 6 ساعات.

تنقية المحتوى الخلوي Protoplast Purification

1- بعد 14 ساعة، قم بترشيح المعلقات من خلال مصفى شبكة من النايلون 45-55 ميكرومتر في 3 كؤوس.

2- أشطف المصفي بمحلول مانيتول 0.7 مولار 5 مل.

3- صب المعلقات في أنابيب أجهزة طرد مركزي مستديرة القاع، وتشغيل جهاز الطرد المركزي بسرعة 100g لمدة 5 دقائق.

4- أسكب المادة الطافية وأعد تعليق مكورة المحتوى الخلوي برفق في 10 مل من محلول 0.7 مولار مانيتول.

5- الطرد المركزي عند 100g لمدة 5 دقائق إضافية، أسكب المادة الطافية، وإعادة تعليق المكورات في 1 مل من مانيتول 0.7 مولار.

طريقة عمل بديلة لتنقية المحتوى الخلوي

1- بعد الحضانة، قم بإزالة الرقائق من الأنبوب وقلبها برفق عدة مرات. افتح الأنبوب وحرّك الأنسجة برفق باستخدام ملقط معقم للمساعدة في تحرير المحتوى الخلوي من بقايا الأوراق.

2- تصفية محلول المحتوى الخلوي من خلال غربال شبكي ناعم. أغسل بقايا الأوراق على شبكة بواسطة 0.5 مل من محلول (W5).

3- تخزين محلول المحتوى الخلوي في 1.5 مل أنبوب طرد مركزي دقيق طوال الليل في درجة 4°م للسماح باستقرار المحتويات الخلوية في القاع بظهور طبقة خضراء كبيرة في القاع.

4- إزالة الإنزيم و(W5) الطافي من محلول المحتوي الخلوي المستقر باستخدام ماصة دقيقة. إعادة تعليق المحتوى الخلوي في محلول تخزين (MS).

التصبيغ الحيوي Vital Staining

1- ضع قطرة واحدة من كل معلق من المحتوى الخلوي على شرائح منفصلة؛ لا تضع غطاء الشريحة.

2- أضف قطرة واحدة من صبغة إيفانز الزرقاء إلى كل شريحة وراقبها على الفور تحت المجهر الضوئي.

3- أوصف مكان الصبغة. هل المحتوى الخلوي حي أم ميت؟ كيف عرفت ذلك؟

صهر المحتوى الخلوي Protoplast Fusion

1- ضع قطرة واحدة (50 ميكرولتر) من كل معلق محتوى خلوي في نفس طبق البتري البلاستيكي رج الطبق برفق للتأكد من خلط المعلق.

2- انتظر 5 دقائق حتى يستقر المحتوى الخلوي في القاع.

3- أضف ببطء (قطرة واحدة في كل مرة) لمجموع حجم 0.5 مل من محلول (PEG)، أولاً في الأطراف ثم إلى مركز قطرات المحتوى الخلوي المختلط.

4- بعد 15 دقيقة، أضف ببطء (قطرة واحدة في كل مرة) مجموع حجم 1 مل من 0.7 مولار محلول مانيتول لتخفيف محلول (PEG).

5- إرفع أحد طرفي الطبق وأغسل كتل المحتوى الخلوي الملتصقة بالبلاستيك مع ما يصل إلى 9 مل من 0.7 مولار مانيتول.

6- إزالة بقايا PEG والمانيتول من الطبق. أضف بضع قطرات من محلول مانيتول للخلايا المندمجة.

7- بعد 5 دقائق لاحظ المنتجات المنصهرة على المجهر المقلوب.

تحديد الناتج Yield Determination

إن كان المطلوب معلومات متعلقة بالإنتاجية لكل جرام من الأنسجة النباتية، فيجب تحديد كتلة الحاوية (أنبوب الطرد المركزي الدقيق أو طبق بتري) قبل الحضانة، وكذلك كتلة الأنسجة المراد هضمها وكتلة النسيج، ومحلول الإنزيم، ووعاء الحاوية بالكامل.

1- قياس كتلة أنبوب الطرد المركزي الدقيق الفارغ (بعد عمل علامة عليها).

2- قياس كتلة أنبوب الطرد المركزي الدقيق + الأنسجة النباتية.

3- بعد حضانة الأنسجة النباتية، يتم ترشيح محلول المحتوى الخلوي، وترسيبه وإعادة التعليق في محلول تخزين (MS)، وحساب كتلة الأنبوب ومحلول المحتوى الخلوي معاً.

4- إزالة 100 ميكرومتر بالضبط بعناية من محلول المحتوى الخلوي من الأنبوب باستخدام ماصة دقيقة. ينتج حساب الكتلة الجديدة بالفرق بين هذه الكتلة وتلك في الخطوة رقم 3 هو كتلة 100 ميكرولتر من محلول المحتوى الخلوي.

5- أضف 10 ميكرولتر من محلول المحتوى الخلوي المتجانس بلطف على مقياس عد خلايا الدم الحمراء (الهيموسيتومتر hemocytometer)، حسب تعليمات الشركة المصنعة.

6- أحسب تحت المجهر الضوئي، عدد الخلايا في كل جزء من شبكة مقياس الهيموسيتيمتر. الاكتفاء بعد ستة مكررات مختلفة من مربعات 0.25 مم × 0.25 مم. إذا كان ممكناً تصوير كل مربع تم اختياره للعد فهو من الممارسات الجيدة إمكانية ارجع إليه مستقبلاً. يجب إدراك أن بهذه الصور لا يمكن التقاط العدد الدقيق، حيث إن المحتوى الخلوي يقع على مستويات مختلفة، وبالتالي سيكون من المستحيل التقاطها بمستوى واحد من الصور. عند العد، يجب أن يؤخذ في الاعتبار؛ تغيير تركيز المجهر ضمن نطاق معين للحصول على أدق عدد من المحتوى الخلوي.

7- للحصول على قيمة لإنتاجية المحتوى الخلوي لكل جرام من الأنسجة النباتية، قم بتطبيق

الحساب العام التالي:

المحتوى الخلوي/جرام من النسيج = (متوسط عدد الخلايا/المربع × مجموع كتلة محلول المحتوى الخلوي المعاد تعليقه × 100 ميكرولتر /{حجم المربع × كتلة 100 ميكرولتر من محلول المحتوى الخلوي المعاد تعليقه}/كتلة نسيج النبات الأصلية.

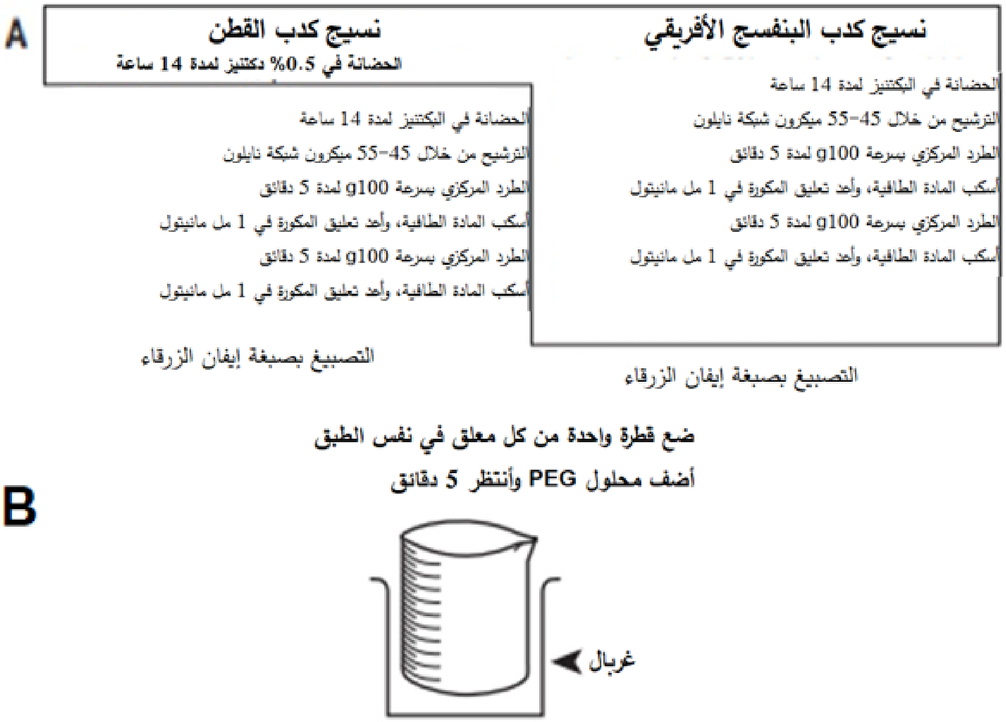
تطوير بروتوكول عزل المحتوى الخلوي Developing a Protoplast Isolation Protocol

الإجراءات المذكورة أعلاه قد تكون قابلة للتطبيق على مجموعة واسعة من الأنواع النباتية وأنواع الأنسجة، لكنها لا يمكن تغطية كل الاحتمالات. عزل المحتوى الخلوي تقنية يجب ضبطها وفقاً لكل نوع معين ويتم استخدامها حتى تكون فعالة حقاً. تحقيقا لهذه الغاية، تقدم الفقرة التالية دليلاً موجزاً لتطوير بروتوكول فريد ضروري عند التعامل مع نبات أو نسيج جديد.

هناك عدد من العوامل التي تؤثر على نجاح عزل المحتوى الخلوي وتشمل هذه:

- الأس الهيدروجيني
- الجهد التناضحي للإنزيم
- محاليل التخزين
- مدة الحضانة
- درجة الحرارة
- احتواء الحضانة
- ووجود أو عدم وجود الطرد المركزي.

ينصح الراغبون في تطوير تقنية عزل المحتوى الخلوي الخاصة بهم باستخدام الإجراءات المدرجة هنا كخط أساس لإجراء سلسلة من التجارب على كل المتغيرات، وبالتالي تحديد الشروط الأنسب لنوع معين من العزل الجديد. قد تتطلب بعض النباتات خطوات إضافية؛ الطماطم، على سبيل المثال، التي يجب تعريض أنسجتها للإيثانول والكلوروكس لفترة وجيزة قبل الهضم للحصول على أي ناتج هام للمحتوى الخلوي. وقد يكون المحتوى الخلوي أكثر صحة عندما يتم تحضينه في طبق بتري بدلاً من أنبوب الطرد المركزي الصغير؛ في حالات أخرى، قد يكون العكس هو الصحيح. الشروط الخاصة يجب تحديدها بشكل فردي.



شكل 13.1. الجزء (A) جدول عزل المحتوى الخلوي.تم إجراءت الخطوات المبينة في المربعات. يوضح الجزء (B) ترشسح نسيج كدب القطن: وضع 52 ميكرومتر غربال نايلون على فوهة كأس 10 مل مع الجزء الأسفل فى الخارج. (*from* Smith, 2013)

المراجع

Cassels, A. C., and Cocker, F. M. (1982). Seasonal and physiological aspects of the isolation of tobacco protoplasts. *Physiologia Plantarum*, 56, 69–79.

Cocking, E. C. (1960). A method for the isolation of plant protoplasts and vacuoles. *Nature*, 187, 927–929.

Cocking, E. C. (1972). Plant cell protoplasts—Isolation and development. *Annual Review of Plant Physiology*, 23, 29–50.

Cocking, E. C. (1977). Uptake of foreign genetic material by plant protoplasts. *International Review of Cytology*, 48, 323–343.

Cocking, E. C., George, D., Price-Jones, M. J., and Power, J. B. (1977). Selection procedures for the production of interspecies somatic hybrids of Petunia hybrida and Petunia parodii. *Plant Science Letters*, 10, 7–12.

Datta, S. K., Peterhans, A., Datta, K., and Potrykus, I. (1990). Genetically engineered fertile

indica-rice recovered from protoplasts. *BioTechnology*, 8, 736–740.

Finer, J. J., and Smith, R. H. (1982). Isolation and culture of protoplasts from cotton (*Gossypium klotzschianum* Anderss.) callus cultures. *Plant Science Letters*, 22, 147–151.

Fromm, M. E., Taylor, L. P., and Walbot, V. (1986). Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature*, 319, 791–793.

Galun, E. (1981). Plant protoplasts as physiological tools. *Annual Review of Plant Physiology*, 32, 237–266.

Gleba, Y. Y., and Hoffman, F. (1980). Arabidobrassica: A novel plant obtained by protoplast fusion. *Planta*, 149, 112–117.

Horváth, E. (2009). Protoplast isolation from Solanum lycopersiucum L. leaf tissues and their response to short-term NaCl treatment. *Acta Biologica Szegediensis*, 53, 83–86.

Ko, J. M., Su, J., Lee, S., and Cha, H. C. (2006). Tobacco protoplast culture in a polydimethylsiloxanebased microfluidic cannel. *Protoplasma*, 227, 237–240.

Mazarei, M., Al-Ahmad, H., Rudis, M. R., and Stewart, N. C. (2008). Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnology Journal*, 3, 354–359.

Melchers, G., Sacristan, M. D., and Holder, A. A. (1978). Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Research Communications*, 43, 203–218.

Pilet, P. E. (Ed.), (1985). *The physiological properties of plant protoplasts*. New York: Springer-Verlag.

Power, J. B., Berry, S. F., Chapman, J. V., and Cocking, E. C. (1980). Somatic hybridization of sexually incompatible petunias: Petunia parodii, Petunia parviflora. *Theoretical and Applied Genetics*, 57, 1–4.

Ren, Y.-J., and Zhao, J. (2008). Optimization of electroporation parameters for immature embryos of indica rice (*Oryza sativa*). *Rice Science*, 15, 43–50.

Rhodes, C. A., Pierce, D. A., Mettler, D. M., Mascarenhas, D., and Detmer, J. J. (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240, 204–207.

Shepard, J. R., Bidney, D., and Shahin, E. (1980). Potato protoplasts in crop improvement. *Science*, 208, 17–24.

Tamaru, Y., Ui, S., Murashima, K., Kosugi, A., Chan, H., Doi, R. H., and Liu, B. (2002). Formation of protoplasts from cultured tobacco cells and *Arabidopsis thaliana* by the action of cellulosomes and pectate lyase from Clostridium cellulovorans. *Applied and Environmental -Microbiology*, 68, 2614–2618.

Wu, F. H., Shen, S. C., Lee, L. Y., Lee, S. H., Chan, M. T., and Lin, S. C. (2009). Tape-*Arabidopsiss* andwich—A simpler Arabidopsis protoplast isolation method. *Plant Methods*, 5, 16.

Yoo, S. D., Cho, Y. H., and Sheen, J. (2007). Arabidopsis mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature Protocols*, 2, 1565–1572.

Zhang, W., Nilson, S. E., and Assmann, S. M. (2008). Isolation and whole-cell patch clamping of *Arabidopsis* guard cell protoplasts. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3, 1–8.

Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., Wang, P., Li, Y., Liu, B., Feng, D., Wang, J., and Wang, H. (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7, 30

الفصل الرابع عشر

تحوير النبات بواسطة البكتريا الأجرعية Agrobacterium-Mediated Transformation of Plants

توجد ثلاث طرق رئيسية لإدخال جينات أجنبية في النباتات؛ تشمل امتصاص الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين (DNA) المباشر بواسطة المحتوى الخلوي إما عن طريق (أ) التثقيب الكهربائي أو الامتصاص عن طريق تحفيز (PEG) أو (ب) القاذفات الحيوي (biolistics)، أو (ت) نقل الجينات بوساطة البكتريا الأجرعية.

وصف (Cocking, 1960) امتصاص الحمض النووي الأجنبي بواسطة المحتوي الخلوي. وأدت هذه التقنية إلى إنتاج نباتات ذرة وأرز معدلة وراثياً (Datta *et al.*, 1992; Rhodes *et al.*, 1988; Ren and Zhao, 2008; Zhang *et al.*, 2011). المشكلة في تطبيق هذه التكنولوجيا هو عدم وجود طرق روتينية للحصول على نباتات من المحتوى الخلوي للعديد من أنواع المحاصيل المهمة.

المقذوف الحيوي (biolistics) أو القصف الدقيق (microprojectile bombardment) تقنية أخرى مثيرة. تستخدم هذه الطريقة ناقلات دقيقة متسارعة (جزيئات الذهب أو التنجستن) لاختراق وتسليم الحمض النووي في الخلية (Klein *et al.*, 1988). ينتج عن تسليم الجسيمات التعبير الجيني في العديد من النباتات والأجزاء النباتية المختلفة. تم تحويل العديد من أنواع المحاصيل الهامة بشكل ثابت، شملت الذرة، الأرز والتبغ والذرة الرفيعة وفول الصويا (Assem and Hassan, 2008; Liu and Godwin, 2012; Lowe *et al.*, 2009; Rafiq *et al.*, 2006).

توضح التمارين التالية الطرق الثلاثة الرئيسة لإدخال جينات أجنبية إلى النباتات، بالتحويل بواسطة البكتريا الأجرعية (Ding *et al.*, 2009; Ibrahim *et al.*, 2010; Ozawa, 2009; Reyes *et al.*, 2010). البكتريا الأجرعية (*Agrobacterium*) هي بكتيريا شائعة في التربة يمكنها غزو الخلايا النباتية المجروحة وإدخال الجينات الأجنبية في جينوم الخلية النباتية. تم فحص تحوير قرص أوراق البتونيا وجزء قمة البرعم المنفصل. تم تطوير نظام قرص الأوراق بواسطة (Horsch *et al.*, 1985) ومثل اختراق تقني يسمح بنقل الجينات الأجنبية بشكل روتيني تقريباً في بعض النباتات ثنائية الفلقة، خاصة تلك الموجودة في العائلة الباذنجانية (البتونيا، التبغ والطماطم). تعمل هذه الطريقة مع أجزاء الورقة المنفصلة التي يمكن أن تتجدد عن طريق تشكيل البراعم العرضية. تغلب نظام قرص الورقة على المشاكل المتأصلة في أنظمة تحويل المحتوى الخلوي (أي فترة الزراعة الممتدة والصعوبة في تجديد النباتات من المحتوى الخلوي). ومع ذلك، فإن هنالك بعض القيود في نظام قرص الورقة. يمكن تجديد أنواع قليلة من المحاصيل من قرص الورقة، واحتمال تكوين تباينات جسدية من البراعم

العرضية (Larkin and Scowcroft, 1981)، وهي غير مرغوبة في التحول. لحسن الحظ، يمكن أن يكون نسيج الكدب، الفلقة، السويقة الجنينية السفلى، والأنسجة الجذعية والبذور، الأجنة الجسدية والقمة النامية الأنسجة المستهدفة للتحول بواسطة البكتريا الأجرعية.

في البداية، كان أحد القيود على نظام التحويل بواسطة البكتريا الأجرعية هو الشعور بأنها تقتصر على ذوات الفلقتين وبعض عاريات البذور وليست مفيدة في النباتات أحادية الفلقة (Potrykus, 1990). ومع ذلك، فقد ثبت في العقد الأول من القرن الحادي والعشرين قدرة البكتريا الأجرعية على نقل الجينات إلى نسيج النباتات أحادية الفلقة وإنتاج نباتات محورة وراثياً (Park *et al*., 1996, 2001; Chan *et al*., 1993; He *et al*., 2010; Hiei *et al*., 1994; Peng *et al*., 1995; Ranineri *et al*., 1990; Smith and Hood, 1995; Wu *et al*., 2007).

إلى جانب التمرين على نظام قرص الأوراق، هناك تمرين على استخدام جزء نباتي منفصل من قمة الجذع للتحوير الوراثي (Ulian *et al*., 1988; Park *et al*., 1996; Zapata *et al*., 1998; Gould *et al*., 1991). بهذا النهج يمكن القضاء على مشاكل التباين الجسدي ونقص القدرة على التجدد من أقراص الأوراق أو المحتوى الخلوي أو مزارع الخلايا.

تتطلب تمارين التحول استخدام مختبر تم إجازته حسب متطلبات ولوائح التعامل مع الكائنات المعدلة وراثياً.

في هذه التجارب سوف تستخدم البكتريا الأجرعية (EHA 101) التي تحتوي على بلازميد (*PGUS3*) وهو الجين المقاوم للكنامايسين (kanamycin) (*NPTII*) وبيتا–قلوكورونيديز (β-glucuronidase) (*GUS*).

قرص أوراق البتونيا أو التبغ Petunia or tobacco leaf disk

التسلسل Sequence

أ) الزراعة المسبقة لقرص ورقة البتونيا في وسط الزراعة لمدة يومين.
ب) تلقيح قرص الورقة بالبكتريا الأجرعية التي تحتوي على جينات أجنبية لمدة 15 ثانية إلى 1 دقيقة.
ت) الزراعة المسبقة لقرص الورقة في وسط الزراعة لمدة يومين.
ث) الزراعة لمدة 2–4 أسابيع على وسط قرص ورقة مضاد حيوي تكاثر البراعم.
ج) بعد أسبوعين يتم استئصال البراعم الفردية من الزراعات وضعها على وسط قرص الأوراق مضاد حيوي التجذير.

الغرض:

الحصول على نباتات نباتية معدلة وراثياً من نبات البتونيا (.*Petunia* sp) أو التبغ (*Nicotiana tabacum*) عن طريق الزراعة المشتركة لقرص الورقة مع البكتريا الأجرعية المورمة التي تحتوي على جينات أجنبية.

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ وسط الزراعة المسبق لقرص الورقة)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،
2- أخلط ما يلي:
أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).
ب) 10 مل من مركز ثيامين (40 ملجم/لتر)
ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)
ث) 30 جرام سكروز
ج) 1.0 مل من مركز (BA) (10 ميليجرام/100 مل)
ح) 1.0 مل من مركز (NAA) (1.0 ميليجرام/100 مل)
خ) 1.0 مل من مركز الفيتامين
3- ضبط الحجم إلى 1000 مل، ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.
4- أضف 8 جرام/لتر آجار أو 2 جرام جيلرايت. وتغطية قارورة إرلنماير بورق ألمونيوم.
5- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.
6- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100×20 مم) داخل صندوق النقل المعقم.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

1- إزالة كل الأوراق من البتونيا غسلها في ماء صابوني دافئ.
2- تعقيم الأوراق في 15% (حجم/حجم) من كلور التبييض لمدة 10 دقائق، ثم أشطف الأوراق بالماء المقطر المعقم 3-5 مرات.
3- استخدام المشرط أو مثقبة الأوراق المعقمة للحصول على أقسام الأوراق.
4- زراعة الأقراص في وسط الزراعة المسبقة لقرص الورقة لمدة يومين وحضانتها.

5- يتم الحصول على أنسجة الأوراق من نباتات التبغ أو البتونيا بإنبات البذور تحت التعقيم ويعتبر ذلك مصدراً ممتازاً لأقراص الأوراق ولا تتطلب تعقيم سطحي.

الزراعة المشتركة مع البكتريا الأجرعية Cocultivation with Agrobacterium

1- إزالة أقسام الأوراق بعد يومين ويتم الزراعة المشتركة لأقراص الأوراق المنتفخة فقط، حيث أن الغير منتفخة غير صالحة للزراعة.

2- ضع الأقراص في طبق بتري معقم يحتوي على البكتيريا الأجرعية التي تم إنشائها بالزراعة المعلقة قبل 1-2 يوم من الاستخدام.

3- الزراعة المشتركة لمدة 15 ثانية إلى دقيقة واحدة ويجب التأكد من أن الأقراص مغطاة من الأعلى والأسفل بمرق البكتريا الأجرعية (*Agrobacterium* broth).

4- التنشيف مهم جداً. يتم ذلك في طبق بتري يحتوي على ثلاث طبقات من ورق الترشيح الجاف. ارفع ورقة الترشيح العلوية وضع أقراص الأوراق فوق طبقتي ورق الترشيح السفليتين. ثم تغطية أقراص الأوراق بالورقة العليا. اضغط برفق لإزالة البكتيريا الزائدة. التلقيح الجيد يكون في الجزء الأخضر الداكن في خارج أقصى هامش 1.0 مم من قرص الورقة. إن كان كل القرص داكن الخضرة يعني أن عدوي البكتريا كبيرة وسيموت القرص.

5- إعادة زراعة الأقراص على وسط زراعة القرص الورقي النظيف.

6- حضانة الزراعات على رف الاستزراع لمدة 2-3 أيام.

تحول أو تحوير البراعم والقضاء على البكتريا الأجرعية

مركزات المضادات الحيوية

أ) مركز الكاربينيسللين (Carbenicillin):

أوزن 500 ميليجرام من الكاربينيسللين في كأس 200 مل، إضافة 100 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات. ضبط الأس الهيدوجيني 5.7 والتعقيم البارد بالترشيح قبل إضافته للوسط البارد.

ب) مركز الكانامايسن (kanamycin):

أوزن 100 ميليجرام من الكانامايسن في كأس 200 مل، إضافة 100 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات. ضبط الأس الهيدوجيني 5.7 والتعقيم البارد بالترشيح قبل إضافته للوسط البارد.

يمكن إجراء عملية التعقيم بالترشيح عن طريق وضع فلتر مليبور (Millipore) للاستعمال مرة واحدة (45 ميكرومتر) على مخرج حقنة (حجم 100 مل) وسحب محلول المركز في المحقنة. ويتم تعقيم المضاد الحيوي بالفلتر أثناء مروره بالمرشح في الوسط المبرد. اتبع تعليمات التصنيع لاستخدام المرشح.

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ وسط مضاد حيوي إكثار براعم قرص الورقة)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 من مركز (BA) (10 ميليجرام/10 مل)

ح) 1.0 مل من مركز (NAA) (10 ميليجرام/100لتر)

3- ضبط الحجم إلى 800 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام/لتر آجار

5- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6- وبعد تبريد الوسط المعقم بالتسخين وذلك بوضعه في حمام مائي في درجة حرارة 40°م لتجنب تصلب الوسط تتم إضافة المضادات الحيوية المعقمة بالترشيح داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي. يمكن أن يتراوح تركيز الكانامايسين بين 100-300 جرام/اللتر. يمكن أن تكون أكثر تحققاً في تحول البراعم عند تركيز 300 جرام /اللتر، ولكن عددها يكون قليل. إن تم تخفيض التركيز100 أو 200 جرام/اللتر إن إنتاج البراعم سيكون عالياً ولكن لا يتم تحول جزء منها.

7- الخلط الجيد للمحتويات.

8- صب بسرعة وتوزيع 10-20 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (60 × 15 مم).

الإجراء

1- أنقل مزارع قرص الأوراق إلى وسط تجذير المضاد الحيوي لقرص الأوراق.

2- كرر التنشيف بورق الترشيح عند نقل أقراص الأوراق لإزالة البكتيريا الزائدة. ستكون البراعم واضحة في غضون أسبوعين.

3- في 2-4 أسابيع، يتم نقل البرعم للزراعة والتجذير.

التجذير والاختبار المسبق للبراعم المتحولة Rooting and Pretesting for Transformed Shoots

تحضير الوسط:

(لعمل واحد لتر مكافئ وسط مضاد حيوي للتجذير)

1- صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات في دورق مخروطي سعة 2000 مل،

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

ب) 10 مل من ثيامين (40 ملجم/لتر)

ت) 10 مل مركز ميو-إينوزيتول (10 جم/لتر)

ث) 30 جرام سكروز

ج) 10 مل من مركز الفيتامين

3- ضبط الحجم إلى 800 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام/لتر آجار

5- التعقيم في السخان المائي الضاغط عند درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6- بعد تبريد الوسط المعقم بالتسخين أضف 100 مل من مركز الكاربنسيللين و100 مل من مركز الكانامايسين في داخل صندوق تدفق الهواء الصفحي.

7- الخلط الجيد

8- صب سريعاً للتوزيع 25 مل لكل طبق بتري معقم (100 × 20 مم)

الإجراء

1- استئصال البراعم في 2-4 أسابيع ووضعها مفردة على وسط المضاد الحيوي لتجذير قرص الأوراق

2- من المرجح أن تكون البراعم التي تكون جذور في الكاناميسين متحورة

3- يحدث الاختلاف في البراعم التي تم تجذيرها وتتم زراعتها في وسط مضاد تجذير قرص الأوراق بدون كاربنسيللين. يدل تكوين نسيج الكدب على تحول النسيج.

4- التحليل الجزيئي للنباتات الأم والنباتات الناتجة يمكن أن يقدم معلومات صحيحة عن التحول.

قمة برعم البتونيا *Petunia* shoot apex

الغرض:

الحصول على نباتات معدلة وراثيا من نبات البتونيا (*Petunia* sp.) بزراعة قمة برعم البتونيا مع البكتريا الأجرعية المورمة التي تحتوي على جينات أجنبية.

التسلسل

1- إنبات بادرات البتونيا تحت التعقيم.
2- استئصال قمة البراعم الإنشائية (قبة القمة وورقتين مبدئيتين) من بادرات بعمر واحد أسبوع.
3- الزراعة لمدة يومين في وسط تنامي البراعم.
4- التلقيح (حوالي 15 دقيقة) بالبكتريا الأجرعية والزراعة لمدة يومين في وسط تنامي البراعم طازج.
5- الزراعة لمدة 3–4 أسابيع في وسط المضاد الحيوي لإكثار براعم قرص الورقة.

تحضير الوسط الغذائي:

1- في دورق مخروطي سعة 2000 مل، صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات
2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل لكل من مركزات أملاح موراشيج وسكوج: نترات، هاليدات، كبريتات، (PBMo) و(NaFeEDTA).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.
4- أضف 8 جرام من الآجار وذوبه
5- وزع 50 مل في حاويات (Magenta GA-7) والتغطية.
6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

تعقيم بذور البيتونيا سطحياً في 10% كلور التبييض لمدة 10 دقائق ثم الشطف ثلاث مرات بالماء المعقم. يجب أن يتم ذلك في أنبوب جهاز طرد مركزي مخروطي الشكل مغطاة. زراعة البذور في حاوية (Magenta GA-7) وحضانة الزراعات.

تحفيز البراعم Shoot Induction

تحضير الوسط الغذائي:

(واحد لتر مكافئ وسط تنامي البراعم)

1- في دورق مخروطي سعة 2000 مل ، صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات.

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج؛ النترات، السلفات، الهاليدات، PBMo، NaFeEDTA

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 جرام/اللتر).

ت) 10 مل من مركز ميوأنيزتول (10 جرام/اللتر).

ث) 30 جرام سكروز.

ج) 1 مل من مركز (BA) (10جرام/100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 1000 مل. ضبط الأس الهيدروجيني إلى 5.7.

4- أضف 8 جرام من الآجار

5- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

6- وزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيكي معقم.

تجهيز الجزء النباتي المنفصل

تحويل قمة البرعم Shoot Apex Transformation

تحضير الوسط الغذائي:

(واحد لتر مكافئ وسط تنامي البراعم)

1- في دورق مخروطي سعة 2000 مل ، صب 500 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات.

2- أخلط ما يلي:

أ) 10 مل من كل مركزات أملاح موراشيجي وسكوج؛ النترات، السلفات، الهاليدات، PBMo، NaFeEDTA

ب) 10 مل من مركز الثيامين (40 جرام/اللتر).

ت) 10 مل من مركز ميوأنيزتول (10 جرام/اللتر).

ث) 30 جرام سكروز.

ج) 1 مل من مركز (BA) (10جرام/100 مل).

3- ضبط الحجم إلى 800 مل. 1بط الأس الهيدروجيني 5.7.

4- أضف 8 جرام آجار

6- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع.

7- عندما يبرد الوسط أضف مركزات المضادات الحيوية المعقمة بالترشيح: 100 مل كاربنسيللين و100 مل كانامايسن

8- أخلط الوسط ووزع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيكي معقم (100 × 25 مم)

التجذير Rooting

تحضير الوسط:

(1 لتر مكافئ، وسط المضاد الحيوي لتجذير قمة البراعم)

اتبع الإجراء الخاص بوسط المضاد الحيوي لتجذير قمة البراعم باستخدام أملاح موراشيجي وسكوج، 100 ميليجرام/اللتر كانامايسين و500 ميليجرام/ اللتر كاربنسيللين.

يتم التجذير في أنابيب اختبار (25 × 150 مم)

ملاحظات

- لاحظ عدد البراعم التي تتطور وتتجذر على وسط المضاد الحيوي.
- النمو على وسط المضادات الحيوية ليس سوى مؤشر أولي على التحول.

تسريب أوراق التبغ Tobacco Leaf Infiltration

الغرض:

التعبير العابر للبروتينات المرغوبة في أوراق التبغ مع البكتيريا الأجرعية التي تحتوي على الجينات الأجنبية لتحليل البروتين تحت الخلية السريع أو الصفات البيوكيميائية

التسلسل (انظر الشكل 14.1).

1- تنمية البكتريا الأجرعية في وسط (YEP) لمدة يوم واحد.
2- حصاد البكتريا الأجرعية وإعادة التعليق بوسط التسريب.
3- زراعة أقراص الأوراق في وسط الزراعة المسبقة لمدة 2-7.
4- تسريب أوراق التبغ والسماح لنمو النبات تحت الظروف الطبيعية لمدة 2-7 أيام للتعبير عن البروتين المرغوب.
5- يحب إجراء التحليل البيوكيميائي أو المجهري كل 24 ساعة بين 2-7 أيام بعد التسريب للحصول على أفضل النتائج.

تنمية البكتريا الأجرعية

تحضير وسط (YEP)

(1 لتر مكافئ لوسط (YEP))

1- في زجاجة متوسطة سعة 1000 مل، صب 800 مل من الماء المقطر منزوع الأيونات.
2- أخلط ما يلي:
أ)10 جرام مستخلص الخميرة
ب) 10 جرام ترايتون (trytone).
ت) 5 جرام كلوريد صوديوم
ث) 30 جرم سكروز
ج) 15 جرام أجاروز إن كنت تعتزم عمل وسط هلامي صلب
3- ضبط الحجم إلى 1000 مل
4- التعقيم في السخان المائي الضاغط لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة 121°م وضغط 1.05 كيلوجرام في السنتيمتر المربع

5- للوسط الصلب، يتم التبريد في حمام مائي في درجة حرارة 60°م ثم أضف المضادات الحيوية المناسبة. بعد خلط المضادات الحيوية بالتساوي مع الوسط، توزيع 25 مل لكل طبق بتري بلاستيك معقم (100 × 20 مم).

6- يتم تخزين الوسط السائل بعد التعقيم في درجة حرارة 4°م قبل الاستخدام.

زراعة البكتريا الأجرعية Culture of *Agrobacterium*

1- تخطيط مخزون البكتريا على الوسط الصلب بالمضاد الحيوي المناسب والحضانة في درجة حرارة 28°م لمدة يومين.

2- التقط مستعمرة واحدة وتلقيحها بـ 5 مل من وسط (YEP) السائل مع المضادات الحيوية المناسبة تنميتها عند 28°م لمدة يوم واحد على هزاز بسرعة 200 دورة في الدقيقة.

حصاد البكتريا الأجرعية Harvest of *Agrobacterium*

تحضير وسط التسريب (الارتشاح) Infiltration Medium Preparation

تحضير وسط الارتشاح: 50 مل مكافئ.

1- 10 مل من 50 ميليمولار كلوريد ماغنيسيوم

2- 5 مل من 0.5 ميليمولار (MES-KOH pH 5.6.)

3- 5 ميكرولتر من 1 مولار سيتوسيرنغون (acetosyringone)

4- أضف 35 مل من الماء المقطر إلى 50 مل

الإجراء

1- تكوير الخلايا بالطرد المركزي بسرعة 1000 g، 10 دقائق عند 4°م، إزالة المادة الطافية، أضف 5 مل من وسط التسريب وأعد التعليق. كرر العملية مرة أخرى لإزالة المضادات الحيوية التي تقتل الأنسجة بعد التسيريب.

2- ضبط OD 600 من البكتريا الأجرعية إلى 1.0.

3- تناول 200 ميكرولتر من البكتريا الأجرعية المعلقة في حقنة 1 مل (بدون إبرة).

تسريب أوراق التبغ Infiltration of Tobacco Leaves

1- تحريك نباتات التبغ الصحية التي يبلغ عمرها 6 أسابيع لنوعي التبغ (*Nicotiana tabacum*) و(*N. benthamiana*) من غرفة النمو.

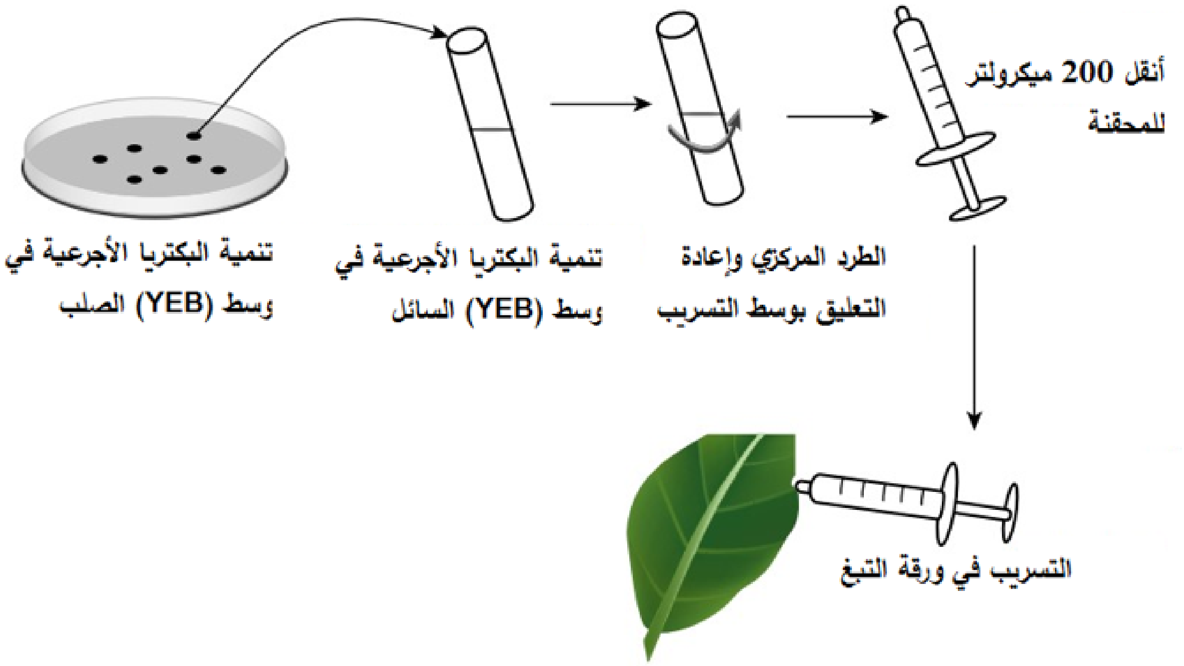
2- اختيار أوراق صحية وكاملة التمدد للتسريب. ضع علامة بعناية في المناطق التي سيتم اختراقها باستخدام قلم التحديد.

3- ضع طرف المحقنة على السطح المحوري للورقة في منطقة العلامة وأضغط برفق على المكبس مع الدعم المباشر للجانب المحوري من الورقة بإصبعك.

4- نظف البكتريا الأجرعية الزائدة المتبقية على سطح الأوراق والأصيص.

5- إرجاع النباتات إلى حجرة النمو والحضانة تحت ظروف النمو الطبيعية.

6- يتم التعبير عن البروتينات المطلوبة بشكل صحيح بعد يومين من النمو، وتحتاج إلى تتبعها كل 24 ساعة



شكل 14.1. تشريب ورقة التبغ Tobacco leaf infiltration
(*from* Smith, 2012)

Activat

المراجع

Assem, S. K., and Hassan, O. S. (2008). Real time quantitative PCR analysis of transgenic maize plants produced by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Journal of Applied Sciences Research*, 4, 408–414.

Caplan, A., Herrera-Estrella, L., Inze, D., Van Haute, E., Van Montagu, M., Schell, J., and Zambryski, P. (1983). Introduction of genetic material into plant cells. *Science*, 222, 815–821.

Chan, M. T., Chang, H. H., Ho, S. L., Tong, W. F., and Yu, S. M. (1993). Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α-amylase promoter/β-glucuronidase gene. *Plant Molecular Biology*, 22, 491–506.

Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., and Nester, N. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11, 263–271.

Christou, P., Swain, W. F., Yang, N. S., and McCabe, D. E. (1989). Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 86, 7500–7504.

Daniell, H., Vivekananda, J., Nielsen, B. L., Ye, G. N., Tewari, K. K., and Sanford, J. C. (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 87, 88–92.

Datta, S. K., Datta, K., Soltanifar, S., Donn, G., and Potrykus, I. (1992). Herbicide-resistant *Indica* rice plants from IRRI breeding line IR72 after PEG-mediated transformation of protoplasts. *Plant Molecular Biology*, 20, 619–629.

Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J. (1982). Plant cell transformation by *Agrobacterium* plasmids. In T. Kosuge, and C. Meredith (Eds.), *Genetic engineering of plants* (pp. 143–176). New York: Plenum.

Ding, L., Li, S., Gao, J., Wang, Y., Yang, G., and He, G. (2009). Optimization of Agrobacteriummediated transformation conditions in mature embryos of elite wheat. *Molecular Biology Reports*, 36, 29–36.

Fraley, R. T., Horsch, R. B., Matzke, A., Chilton, M. D., Chilton, W. S., and Sanders, P. R. (1984). *In vitro* transformation of Petunia cells by an improved method of co-cultivation with *A. tumefaciens* strains. *Plant Molecular Biology*, 3, 371–378.

Fraley, R. T., Rogers, S. G., and Horsch, R. B. (1986). Genetic transformation in higher plants. *Critical Reviews of Plant Science*, 4, 1–46.

Gordon-Kamm, W. J., Spencer, M. T., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., 'Brien, J. V., Chambers, S. A., Adams, W. R., Jr., Willetts, N. G., Rice, T. B., Mackey, C. J., Krueger, R. W., Kausch, A. P., and Lemaux, P. G. (1990). Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell*, 2, 603–618.

Gould, J., Devey, M., Ulian, E. C., Hasegawa, O., Peterson, G., and Smith, R. H. (1991). Transformation of Zea mays L. using Agrobacterium tumefaciens and the shoot apex. *Plant Physiology*, 95, 426–434.

He, Y., Jones, H. D., Chen, S., Chen, X. M., Wang, D. W., Li, K. X., Wang, D. S., and Xia, L. Q. (2010). Agrobacterium-mediated transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum cv Stewart) with improved efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 61, 1567–1581.

Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., and Kumashire, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6, 271–282.

Hinchee, M. A. W., and Horsch, R. B. (1986). Cellular components involved in the regeneration of transgenic Petunia hybrida. In D. A. Somer, B. G. Genenbach, D. D. Biesber, W. P. Hackett, and C. E. Green (Eds.), *VIth international congress of plant tissue and cell culture* (pp. 129). Minneapolis: University of Minnesota Press.

Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffman, N. L., Eichhlotz, D., Rogers, S. G., and Fraley, R. T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227, 1229–1231.

Ibrahim, A. S., El-Shihy, O. M., and Fahmy, A. H. (2010). Highly efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of elite Egyptian barley cultivars. *American–Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 4, 403–413.

Jefferson, R. A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. Plant *Molecular Biology Reports*, 5, 387–405.

Jefferson, R. A., Burgess, S. M., and Hirsch, D. (1986). Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 83, 8447–8451.

Jefferson, R. A., Klass, M., Wolf, N., and Hirsch, D. (1987). Expression of chimeric genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 193, 41–46.

Kartha, K. K., Chibba, R. N., Georges, F., Leung, N., Caswell, K., Kendall, K., and Qureshi, J. (1989). Transient expression of chloramphenicol acetyltransferase (CAT) gene in barley cell cultures and immature embryos through microprojectile bombardment. *Plant Cell Reports*, 8, 429–432.

Klee, H., Horsch, R., and Rogers, S. (1987). *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annual Review of Plant Physiology*, 38, 467–481.

Klein, T. M., Fromm, M., Weissinger, A., Tomes, D., Schaaf, S., Sletten, M., and Sanford, J. C. (1988). Transfer of foreign genes into intact maize cells with high-velocity microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85, 4305–4309.

Klein, T. M., Kornstein, L., Sanford, J. C., and Fromm, M. E. (1989). Genetic transformation of maize cells by particle bombardment. *Plant Physiology*, 91, 440–444.

Larkin, P. J., and Scowcroft, W. R. (1981). Somaclonal variation—Novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical and Applied Genetics*, 60, 197–214.

Li, J. F., Park, E., Arnim, A. G., and Nebenfuhu, A. (2009). The FAST technique: A simplified *Agrobacterium*-based transformation method for transient gene expression analysis in seedlings of Arabidopsis and other plant species. *Plant Methods*, 5, 6–21.

Liu, G., and Godwin, I. (2012). Highly efficient sorghum transformation. *Plant Cell Reports*, 31, 1–9.

Lowe, B. A., Prakash, N. S., Way, M., Mann, M. T., Spencer, T. M., and Boddupalli, R. S. (2009). Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA. *Transgenic Research*, 18, 831–840.

Morel, G. (1972). Morphogenesis of stem apical meristem cultivated *in vitro*: Applications to clonal propagation. *Phytomorphology*, 22, 265–277.

Morikawa, H., Iida, A., and Yamada, Y. (1989). Transient expression of foreign genes in plant cell and tissues obtained by a simple biolistic device (particle-gun). *Applied Micro Biotechnology*, 31, 320–322.

Ozawa, K. (2009). Establishment of a high efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation system of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Science*, 176, 522–527.

Park, S. H., Pinson, S. R. M., and Smith, R. H. (1996). T-DNA integration into genomic DNA of rice following *Agrobacterium* inoculation of isolated shoot apices. *Plant Molecular Biology*, 32, 1135–1148.

Park, S. H., Park, J., and Smith, R. H. (2001). Herbicide and insect resistant elite transgenic rice. *Journal of Plant Physiology*, 158, 1221–1226.

Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: An assessment. *BioTechnology*, 8, 535–542.

Rafiq, M., Fatima, T., Husnain, T., Bashir, K., Khan, M. A., and Riazuddin, S. (2006). Regeneration and transformation of an elite inbred line of maize (*Zea mays* L.), with a gene from *Bacillus thuringiensis*. *South African Journal of Botany*, 72, 460–466.

Raineri, D. M., Bottino, P., Gordon, M. P., and Nester, E. W. (1990). *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.). *BioTechnology*, 8, 33–38.

Ren, Y.-J., and Zhao, J. (2008). Optimization of electroporation parameters for immature embryos of indica rice (oryza sativa). *Rice Science*, 15, 43–50.

Reyes, F. C., Sun, B., Guo, H., Gruis, D., and Otegui, M. S. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of maize endosperm as a tool to study endosperm cell biology. *Plant Physiology*, 153, 624–631.

Rhodes, C. A., Pierce, D. A., Mettler, I. J., Mascernhas, D., and Detmer, J. J. (1988). Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science*, 240, 204–207.

Schrammeijer, B., Sijmons, P. C., van den Elzen, P. J. M., and Koekema, A. (1990). Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*. *Plant Cell Reports*, 9, 55–60.

Simpson, R. B., Spielman, A., Margossian, L., and McKnight, T. D. (1986). A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Molecular Biology*, 6, 403–415.

Smith, R. H., and Hood, E. E. (1995). *Agrobacterium tumefaciens* transformation of onocotyledons. *Crop Science*, 35, 301–309.

Sparkes, I. A., Runions, J., Kearns, A., and Hawes, C. (2006). Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature Protocol*, 1, 2019–2025.

Trinh, T. H., Mante, S., Pua, E. C., and Chua, N. H. (1987). Rapid production of transgenic flowering shoots and F1 progeny from *Nicotiana plumbaginifolia* epidermal peels. *Biotechnology*, 5, 1081–1084.

Ulian, E. C., Smith, R. H., Gould, J. H., and McKnight, T. D. (1988). Transformation of plants via the shoot apex. *In vitro Cellular and Developmental Biology*, 21, 951–954.

Wang, Y. C., Klein, T. M., Fromm, E., Cao, J., Sanford, J. C., and Wu, R. (1988). Transient expression of foreign genes in rice, wheat and soybean cell following particle bombardment. *Plant Molecular Biology*, 11, 433–439.

Wu, H., Doherty, A., and Jones, H. D. (2007). Efficient and rapid *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of durum wheat (*Triticum turgidum* L. var. durum) using additional virulence genes. *Transgenic Research*, 17, 425–436.

Zapata, C., Park, S. H., El-Zik, K. M., and Smith, R. H. (1999). Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex. *Theoretical andApplied Genetics*, 98, 252–256.

Zhang, Y., Su, J., Duan, S., Ao, Y., Dai, J., Liu, J., Wang, P., Li, Y., Liu, B., Feng, D., Wang, J., and Wang, H. (2011). A highly efficient rice green tissue protoplast system for transient gene expression and studying light/chloroplast-related processes. *Plant Methods*, 7, 30–43

فريق العمل

إعداد

البروفيسور/ الفاتح محمد مهدي أستاذ التقانة الحيوية الزراعية – كلية الزراعة – جامعة الخرطوم، جمهورية السودان

مراجعة

الأستاذ الدكتور / محمد عوض محمد شطناوي – كلية الزراعة التكنولوجية – جامعة البلقاء، المملكة الأردنية الهاشمية

الإشراف الفني

الدكتور / أحمد عبد الولي السماوي

المشرف على إدارة البرامج الفنية – المنظمة العربية للتنمية الزراعية

المراجعة اللغوية

الدكتورة / سعدية محمد شريف ابنعوف

المنظمة العربية للتنمية الزراعية
الخرطوم، جمهورية السودان، العمارات شارع 7
ص.ب: 474، الرمز البريدي 11111
هاتف: 83 /472176 183 249 +، فاكس: 471202 183 249 +
website:http://www.aoad.org E_mail:info@aoad.org