كلية العلوم

القسم : علم الحياة

السنة : الرابعة

المادة : تغذية ونمو

المحاضرة : السابعة/نظري/د.ريم

{{ مكتبة A to Z }}

Facebook Group : مكتبة A to Z

2025

يمكنكم طلب المحاضرات برسالة نصية (SMS) أو عبر (What's app-Telegram) على الرقم 0931497960

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة طرطوس – كلية العلوم
قسم علم الحياة

زراعة الأنسجة النباتية

مفهوم زراعة الأنسجة النباتية ومراحل تطورها:

استفاد الباحثون من أهم صفة تتصف بها الخلايا النباتية وهي القدرة على العودة عن التمايز لتبدأ بالانقسام من جديد وإعطاء فرد كامل ومن هنا تمكن الباحثون من عزل خلايا منفردة أو جزء نباتي وزرعها على أوساط صنعية تؤمن لها ما ينقصها من غذاء ومنظمات نمو نباتية ونجحوا في الحصول على أفراد جديدة حاملة لصفات النبات الأم وبهذه الطريقة تم الحصول على أعداد كبيرة من النباتات بدءاً من جزء نياتي وفي مساحة صغيرة من المختبر وأطلق على هذه الزراعة بزراعة الأنسجة النباتية ***In vitro*** **culture**.

إذا يقصد بزراعة الأنسجة النباتية زراعة أي جزء صغير ومعقم من أجزاء النبات المختلفة مثل القمة الميرستيمية أو جزء من الورقة أو الساق أو جزء من الجذر أو الأعضاء التكاثرية وغيرها في أنابيب اختبار أو ارلنمايرات أو أطباق زجاجية حاوية على بيئة مغذية معقمة (صلبة أو سائلة)، وتتم عملية الزراعة في ظروف معقمة داخل غرفة خاصة بزراعة الأنسجة (Laminar Flow Hood) (الشكل 1)، ومن ثم تحضن الزراعات في حاضنة نمو نباتية Plant Growth Room ضمن شروط خاصة من درجة الحرارة والشدة والكثافة الضوئية والرطوبة ولمدة محددة من الضوء والظلام (الشكل 2).

يتم اختيار الجزء النباتي لاستخدامه في هذه التقانة وفقاً للهدف المرجو من ذلك حيثُ تزرع البراعم القمية والبراعم الجانبية وكذلك العقد الساقية على أوساط مغذية وبوجود تراكيز هرمونية مناسبة للإكثار السريع كونها تحوي نسجاً ميرستيمية، وتعد أسرع عمليات الإكثار. ويمكن زراعة القمم الميرستيمية للساق أو الجذر أو زراعة القطع الورقية وقطع من الساق لبادرات حديثة النمو بهدف الحصول على الكالوس ومن ثم تحريضها لإنتاج نباتات جديدة أو استخدامها لإنتاج مركبات الاستقلاب الثانوي.

المخبر والأجهزة اللازمة لزراعة الأنسجة النباتية:

يمكن تطبيق زراعة الانسجة النباتية بسهولة فائقة مقارنة مع التقانات الحيوية النباتية الأخرى إذا توفر المخبر اللازم والأيدي الخبيرة في شروط من التعقيم الكامل ويجب ان يحتوي المخبر على:

1- فرن لتعقيم الأدوات المخبرية.
2- ميزان حساس
3- زجاجيات وأدوات مخبرية إضافة للمواد الكيميائية.
4- جهاز تقطير Distiller
5- جهاز تعقيم للأوساط المغذية والأدوات Autoclave.
6- مقياس PH.
7- حاضنة نمو نباتية.

8- جهاز رجاج Shaker.

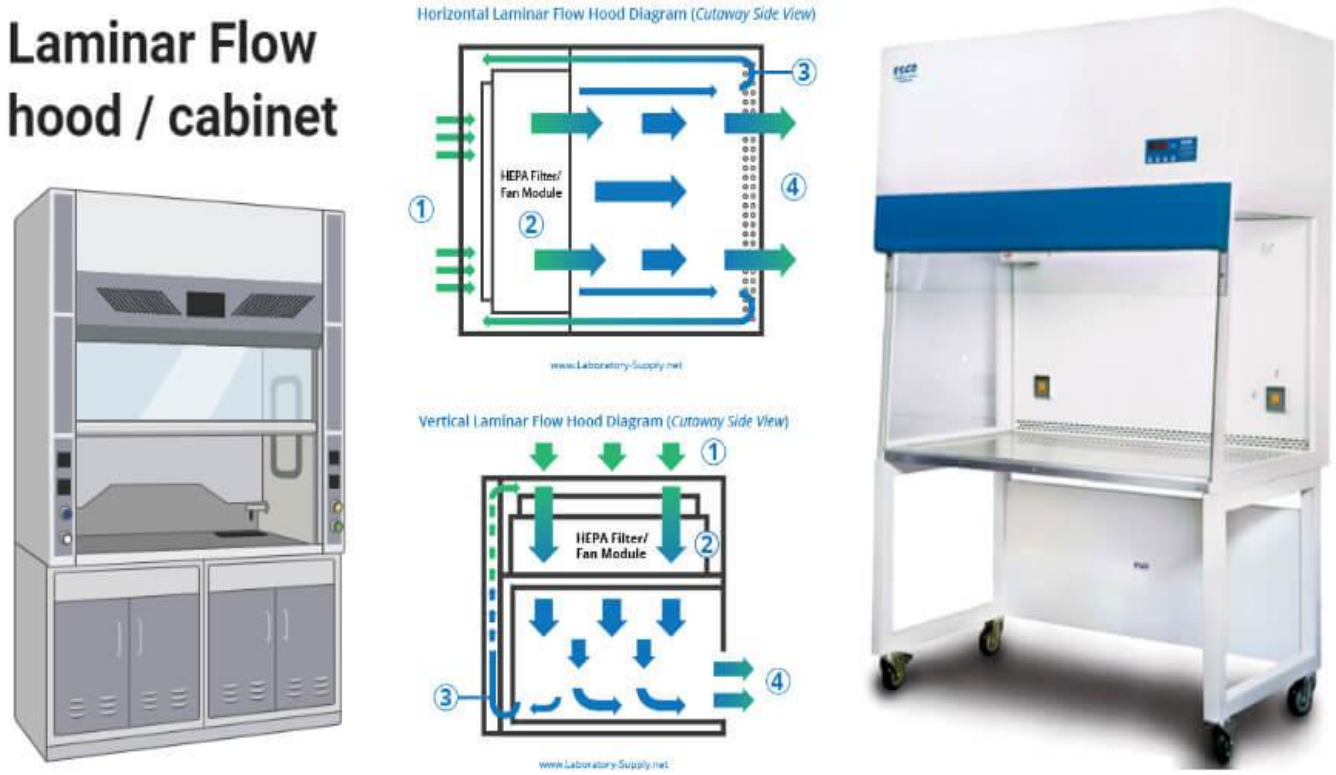
9- جهاز تنقية الهواء المجهز بـ UV للتعقيم.

ولكي يتم العمل بنجاح في مخبر زراعة الأنسجة النباتية يجب أن يكون مؤلفاً من ثلاثة أجزاء وهي:

1- جزء الإعداد والتحضير وفيه يتم تحضير الأوساط الصنعية وتحضير النبات اللازم للزراعة.

2- جزء التعقيم وفيه يتم العمل ضمن شروط تامة من التعقيم ويتم ذلك تحت جهاز تعقيم وتنقية الهواء LAMINAR FLOW HOOD.

3- الجزء الثالث الخاص بغرف النمو النباتية وتكون مجهزة بالإضاءة والحرارة والرطوبة المناسبة مع إمكانية التحكم بكل منها بما يناسب التجارب.



الشكل 1: غرفة زراعة الأنسجة النباتية (غرفة تنقية الهواء)

الشكل 2: حاضنة النمو النباتية.

إن نجاح عملية زراعة الأنسجة النباتية يعتمد على عوامل وراثية وعوامل أخرى مثل العمر الفيزيولوجي للعضو النباتي وكذلك حجم الجزء النباتي ودرجة تعقيم الجزء النباتي وصحة عملية التعقيم. لذلك نذكر الخطوات الصحيحة لتعقيم الجزء النباتي قبل الزراعة وهي:

1- تغسل المادة النباتية جيداً بالماء في حال جمعت من الطبيعة وتترك تحت الصنبور ما لا يقل عن ساعة للتخلص من آثار التلوث الخارجي.
2- نضع الجزء النباتي في محاليل معقمة ومن أهم المحاليل المستخدمة في هذه الخطوة هيبوكلوريت الكالسيوم أو الصوديوم ويختلف زمن وضعها في المحلول وفقا لنوع الجزء النباتي المستخدم بالزراعة.
3- بعد ذلك تنقل المادة النباتية إلى الماء المقطر والمعقم لعدة مرات.
4- نقطع الجزء النباتي الذي نريد زراعته إلى أجزاء صغيرة حسب الحجم المطلوب.

5- نزرع الأجزاء بعد ذلك في أنابيب اختبار أو أطباق بتري تحوي الأوساط المغذية المناسبة وحسب الهدف من الزراعة، ويتم العمل في غرفة التنقية الهوائية وفي بيئة معقمة إلى جانب اللهب الناري للتأكد من خلو الجو المحيط بالعمل من أي ملوثات.

6- توضع العينات في الشروط الفيزيائية والبيئية المناسبة للنمو وهذه الشروط تختلف باختلاف النوع النباتي والجزء النباتي المستخدم.

7- تتم مراقبة التجربة وبعد وصولها لزمن معين نلاحظ تشكل الجذور أو البراعم أو الكالوس ويمكن فصل البراعم وإعادة استنباتها كل على حدا الشكل 3 والشكل 4). ونتركها لتصل إلى حجم معين ومن ثم ننقلها إلى أرلينات تحتوي على الوسط المغذي نفسه وبعد وصولها إلى الحجم المطلوب ننقلها إلى غرف التقسية (أي غرف تشبه بيئتها الحقيقة ولكن مع تغطيتها بأكياس نايلون حتى تكتسب المقدرة على مقاومة العوامل الخارجية) ويمكن بعد أن تنمو وتصبح قادرة على التكيف مع الوسط الخارجي وضمن ظروف نمو جديدة أن تنقل إلى أصص الزراعة ومن ثم إلى الحقل.

إنَّ أول من وضع مفهوم زراعة الأنسجة النباتية هو العالم الألماني Heberlandet (1902) ويعد مؤسس علم زراعة الأنسجة النباتية حيث تمكن من عزل الخلايا ومكاثرتها على وسطٍ مغذٍ يحتوي سكر الغلوكوز والببتون ومحلول Knop مستخدماً خلايا النسيج المتوسط لأوراق نبات اللاميون الأرجواني *Lamium purpureum* من الفصيلة الشفوية، وخلايا البتلات لنبات ورد النيل *Eicchorina crassipes*، وخلايا الشعيرات الساقية من نبات *Tradescantia* من الفصيلة Commelinaceae ولقد أوضح أن هناك تبايناً في احتياجات الخلايا إلى العناصر الغذائية التي يجب أن تتوفر في بيئة الزرع، ولكنه لم ينجح في تحريض الخلايا والأنسجة المزروعة لتشكيل نباتات كاملة.

كان العالم Haning(1904) أول من تمكن من الحصول على نباتات كاملة من زراعة أنسجة الأجنة والتي أصبحت مؤخراً من أهم الطرائق المتبعة في زراعة الأنسجة وتطبيقاتها.

ونجح العالم Simon(1908) في الحصول على براعم خضرية وجذور من الكالوس (كتلة خلوية غير متمايزة)، ويعد أول من حوَّل زراعة الأنسجة إلى عملية إنتاج النباتات مخبرياً، بينما كان العالمان Kotte من ألمانيا و Robbins من الولايات المتحدة الأمريكية (1922) أول من عملا على زراعة الخلايا الميرستيمية الموجودة في القمم النامية أو في البراعم الخضرية.

بعد اكتشاف أول هرمون نباتي وهو حمض الاندول الخلي 3-Indol acetic acid (IAA) من قبل Went(1926)، نجح العالم White من أمريكا عام 1934 في تنمية جذور نبات البندورة باستمرار في مزارع الأنسجة ولكنه لم يحصل إلا على الجذور وكان الفضل له في اكتشاف أهمية إضافة فيتامين B1 (ثيامين) إلى الوسط المغذي عندما أضاف مستخلص الخميرة الغني بهذا الفيتامين إلى الوسط الذي استخدمه في تجاربه وكانت بيئة White واحدة من أشهر الأوساط المغذية المستخدمة في زراعة الأنسجة في ذلك الوقت.

نجح بعد ذلك Gautheret (1934) من فرنسا بالتزامن معwhite من أميركا في إنتاج الكالوس من زراعة خلايا نبات الجزر، ومن ثم استطاع Van-Overbeec *et al.* (1941) تحفيز تشكل الكالوس عند زراعة أجنة نبات الداتورة على وسطٍ مغذٍ أضيف إليه حليب جوز الهند coconut milk، وكانت هذه المرحلة إحدى المراحل المهمة في تطور زراعة الأجنة لأنها أسست لإنتاج العديد من الهجن عن طريق استخدام مزارع الأنسجة، وتوالت بعد ذلك الأبحاث التي تناولت تشكيل الكالوس في مزارع الأنسجة على نطاق واسع بإضافة الأوكسينات أو حليب جوز الهند.

تطورت الأبحاث المتعلقة بزراعة الأنسجة النباتية لأهداف مختلفة بعد اكتشاف الـ Kinetin من قبل Skoog (1948) الذي استخدمه مع الأُوكسين لتحريض تشكل الأعضاء النباتية المختلفة، وتمكن Morel and Marten (1955–1952) من الحصول على أول نبات كامل خالٍ من الفيروسات باستخدام تقانة زراعة الميرستيم، وبدأ يتوضح دور السيتوكينينات كمنظمات نمو تنشِّط عمليات الإنقسام الخلوي في أوائل الخمسينات وبالتحديد 1952 عندما قام Miller بشرح العلاقة بين الأوكسينات والسيتوكينينات، ثم كان لاكتشاف أنماط السيتوكينينات من قبل Carlos (1955) دوراً مهماً في استبدال حليب جوز الهند بالكينيتين، وأصبح من الممكن تنمية النباتات في وسط غذائي معروف التركيب بعد ذلك .

بيَّن Skoog and Miller (1955) أهمية العلاقة بين الأوكسينات والسيتوكينينات لنمو النبات، من خلال توضيح أهمية التوازن الهرموني للتشكل المورفولوجي لأنسجة نبات التبغ الذي ينتج عنه النموات الخضرية أو الجذور العرضية أو الكالوس، حيث تزداد نسبة السيتوكينينات في مرحلة تكوين البراعم وتزداد الأوكسينات في مرحلة تكوين الجذور وتتكون الكالوس بوجود نسب متساوية من النوعين.

توالت الأبحاث العلمية بعد اكتشاف الأوساط المغذية الملائمة لزراعة الأنسجة النباتية في العديد من دول العالم وأصبحت تقانة زراعة الأنسجة النباتية أداة فعالة في مجالات متعددة، كالصيدلة والزراعة والطب والبيولوجيا وعلوم الأغذية وغيرها، وأصبحت هذه التقانة أداة مساعدة للأنشطة الاقتصادية المختلفة والتي تعود بمردود جيد على البشرية حيث يمكن من خلال استخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية في الزجاج *In vitro* التغلب على الكثير من الصعوبات التي تعترض تنمية وإكثار النباتات وزراعتها حقلياً وخاصة الشروط البيئية المحيطة بها، وتحسين نوعية مركبات الاستقلاب الثانوي التي تحتويها تلك النباتات وبالتالي فعاليتها الحيوية، ويمكن من خلال زراعة الأنسجة النباتية تنمية عدد كبير من النباتات المهمة طبياً واقتصادياً والحفاظ على التنوع الوراثي لها وإنتاج المادة النباتية المرغوبة على مدار العام وبكمية ونوعية أفضل.

الأوساط المغذية المستخدمة في الزراعات النسيجية

يعود التقدم الذي حدث في زراعة الأنسجة النباتية لتحسين تركيب الوسط المغذي حيث استخدم أول وسط لتكوين الجذور من قبل White (1934)، واستخدم محلولknop لأول مرة من قبل Gautheret (1939) ، ومن ثم تمكن Murashige and Skoog (1962) من تطوير الوسط المغذي اللازم لنمو نبات التبغ وتكوين الكالوس، وقد نجحا في تعديل وسط

صلب مناسب لتكوين خلايا الكالوس ويعد من أهم الأوساط المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية، ويمكن استخدامه مع بعض التعديلات على مستوى الهرمونات وبعض العناصر المعدنية ليصبح مناسباً للعديد من النباتات الشكل 3.

Components	Chemical formula	Weight ($mg.l^{-1}$)
Macronutrients		
Ammonium Nitrate	NH_4NO_3	1650
Potassium Nitrate	KNO_3	1900
Calcium Chloride Anhydrate	$CaCl_2 2H_2O$	440
Magnesium Sulphate Anhydrate	$MgSO_4 7H_2O$	370
Potassium Phosphate Monobasic	$KH_2.PO_4$	170
Micronutrients		
Boric Acid	H_3BO_3	6.20
Potassium Iodide	KI	0.83
Manganese Sulphate. $4H_2O$	$MnSO_4.4H_2O$	22.30
Zinc Sulphate. $7H_2O$	$ZnSO_4.7H_2O$	8.60
Molybdic Acid (Sodiumsalt).$2H_2O$	$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25
Cupric Sulphate. $5H_2O$	$CuSO_4 5H_2O$	0.025
Cobalt Chloride. $6H_2O$	$CoCl_2.6H_2O$	0.025
Chelated Iron		
Sodium Ethylene Diamine Tetraacetate	Na_2-EDTA	33.6
Ferrous Sulfate. $7H_2O$	$FeSO_4 7H_2O$	27.8
Vitamins		
Thiamine. HCL	$C_{12}H_{17}CIN_4OS.HCL$	0.1
Nicotinic Acid (Free Acid)	$C_8H_{11}NO_3.HCL$	0.5
Pyrodoxine. HCl	$C_6H_5NO_2$	0.5

الشكل 3: مكونات الوسط المغذي المعدني للعالمين MURASHIG AND SKOOG

يتم اختيار الوسط الغذائي لزراعة ونمو الأنسجة النباتية بناءً على المتطلبات الغذائية للنوع النباتي، فقد أُستخدم في البداية محلولKnop من قبل Gowtheret (1942)، وكان العالم White (1943) أول من درس تأثير الأوساط المغذية في زراعة الأنسجة ومن ثم قام العالمان Skoog و Tsui (1945) بطرح فكرة استخدام الهرمونات النباتية المضافة إلى الوسط المغذي، وطور ذلك العالم Miller (1955)، كما أشار Skoog و Miller إلى دور الهرمونات في تكوين الأعضاء النباتية.

تقدم بعد ذلك وتطور مفهوم زراعة الأنسجة وتطبيقاتها بشكل سريع، بفضل تحسين نوعية الوسط المغذي، حيث استخدم Murashige & Skoog (1962) وسطهما المغذي المعدني MS والذي يعد من أوسع وأكثر بيئات زراعة الأنسجة استخداماً (الجدول في الشكل 3)

وتتكون البيئات الغذائية عموماً من:

الأملاح المعدنية (المركبات غير العضوية):

يشار إلى العناصر المعدنية التي يحتاجها النبات بكميات أكبر من 0.5 ميلي مول بالعناصر الكبرى Macroelements وتشمل ستة عناصر رئيسية وهي: النيتروجينN، الفوسفورP، البوتاسيوم K، الكالسيوم Ca، المغنيزيوم Mg والكبريت S. وأما التي يحتاجها النبات بكميات أقل من 0.05 ميلي مول فيطلق عليها اسم العناصر الصغرىMicroelements وبالرغم من أن هذه العناصر تضاف إلى الوسط المغذي بكميات قليلة إلا أنها ضرورية جداً لحياة النبات ونموه، تشمل هذه العناصر على الحديد Fe، المنغنيزMn، التوتياء Zn، البورن B، النحاس Cu و المولبيديوم Mo.

تضاف العناصر المعدنية إلى الوسط المغذي على شكل مركبات ملحية ومن ثم تنطلق الشوارد من هذه الأخيرة بمجرد حلها في الماء.

بعض الأملاح التي تعد مصدرا للعناصر المعدنية الكبرى والصغرى		
KNO3	Fe(SO4)3	MnSO4.H2O
KH2PO4	Fe(SO4).7H2O	MnSO4.4H2O
CaCL2.H2O	FeCL2.8H2O	
NaNO3	Fe.EDTA	
NaH2PO4.H2O	**MgSO4.H2O**	
NH4NO3	CoCL2.6H2O	
NH4)2SO4	CuSO4.5H2O	
Na2.EDTA.H2O	H3BO3	
NaMoO4.H2O	KI	

المركبات العضوية:

تتنوع المركبات العضوية التي تضاف إلى الوسط المغذي ونذكر منها مصادر الكربون والتي يمثلها السكروز في معظم الأوساط المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية ويمكن أن يُستخدم المالتوز ولكن بشكل أقل، ويضاف إلى الأوساط المغذية أيضاً الفيتامينات Thiamine.HCL, Nicotinic acid, Pyridoxine, Myo-inositol والحموض الأمينية مثل الغليسين و السيستين و الغلوتامين و التيروزين التي تظهر الحاجة إليها في أوساط زراعة الأنسجة لكون الخلايا والأنسجة النامية على الأوساط المغذية قد تركب بعضاً منها ولكن بكميات ضئيلة غير كافية لإتمام عملياتها الحيوية، وهي تساهم في سرعة نمو وتمايز الأنسجة المزروعة مخبرياً وكذلك تحريض تشكُّل الكالوس.

المركبات العضوية	الهرمونات النباتية المستخدمة	
حمض النيكوتين (النياسين) (فيتامين B3) سكاروز غلكوز بيوتين (فيتامين B7) حمض الفوليك (فيتامين B9) ثيامين HCL (فيتامين B1) بيرودوكسين HCL (فيتامين B6) غلايسين اينوزيتول C6H12O6	**الأوكسينات:** IAA حمض الأندول الخلي 2,4-D دي كلورو فينوكسي حمض الخل **الستوكينينات:** KIN الكينيتين BAP 6- بنزيل امينو بيورين **الجبريللينات:** GA3 حمض الجبريللين	ويضاف الآغار – آغار إلى الوسط المغذي الصلب

الهرمونات (منظمات النمو) النباتية

أحدثَ اكتشاف الهرمونات النباتية ثورة في تطوير زراعة الأنسجة، حيث يمكن من خلالها التحكم بمختلف العمليات الفيزيولوجية التي تجري في النبات بدءاً من مراحل الإنبات وحتى التشكل، والتمايز الخلوي إلى أنسجة ومن ثم أعضاء. تُنتج الهرمونات في القمم النباتية وتضبط عمليات النمو والتمايز للنبات الأصل، وعند زراعة الأجزاء النباتية على الأوساط المغذية بهدف الإكثار أو الحصول على الكالوس تكون كمية الهرمونات الداخلية للأجزاء المزروعة غير كافية لتنشيط

عمليات النمو والتمايز، لذلك لابد من إضافة الهرمونات النباتية بتراكيز محددة تختلف من نوع نباتي لآخر وكذلك من جزء نباتي لآخر للنبات ذاته.

يعود تمايز الخلايا وظهور الأعضاء النباتية في الأنسجة المزروعة إلى تراكيز الأوكسينات و السيتوكينينات المضافة إلى وسط الزراعة، حيث بيَّن العديد من الدراسات إلى أن زيادة نسبة السيتوكينين إلى الأوكسين تُحرض تكوين البراعم العرضية و النموات الخضرية، بينما تتشكل الجذور بزيادة نسبة الأوكسين، وتُحرض النسب المتساوية المشتركة من كليهما على تشكل الكالوس أو البراعم والجذور معاً، وقد تتشكل الكالوس بزيادة نسبة الأوكسين إلى السيتوكينين أو بالعكس، ويتوقف ذلك على النوع النباتي.

تحتل الهرمونات النباتية المستخدمة في عمليات الإكثار الأهمية الأكبر من بين العوامل المؤثرة في نوعية مركبات الاستقلاب الثانوي التي تتشكل في النباتات، وذلك كونها تحرض على تشكل أنزيمات خاصة تلعب دوراً رئيساً في تركيب المواد الفعالة في النبات.

ونذكر فيمايلي أهم الهرمونات النباتية التي تضاف إلى مختلف الأوساط الزرعية:

الأوكسينات:

بعد اكتشاف أحد أنواع الأوكسينات الشائع الاستخدام في مزارع الأنسجة النباتية وهو حمض الاندول الخلي IAA (Indol acetic acid) من قبل went (1926)، قام بتجريبه كل من went و Gautheret وتبين أن الهرمون يعمل على تنشيط الانقسام في منطقة الكامبيوم لنبات *Acer pseudoplatanus* ، وتوالت الأبحاث المختلفة التي أضيفت بها العديد من أنماط الأوكسينات إلى الأوساط المغذية المستخدمة في زراعة الأنسجة إما بهدف الإكثار الخضري أو تحريض تشكل الكالوس. ومن الأوكسينات الشائعة أيضاً؛ نفتالين حمض الخل NAA وهو يستخدم بكثرة في مزارع الأنسجة ويشجع على تحريض تشكل الجذور في المراحل الأخيرة من الزراعة، ومركب 2,4 ثنائي كلوروفينوكسي حمض الخل (2,4-Diclorophynoxy acetic acid) (2,4-D)، والذي يقوم بدورٍ مهمٍ في تحريض تشكل الكالوس عند العديد من الأنواع النباتية، كما يؤدي إلى تشكل الطفرات الخلوية ومن هنا تأتي أهميتُه في الحث على تشكيل مركبات استقلاب جديدة في مزارع الأنسجة قد لا تكون موجودة في النبات الأم. والدور المعروف للأوكسين هو تحفيز النمو والانقسام الخلوي وكذلك تحريض تشكل الجذور على الأجزاء النامية.

السيتوكينينات:

تعد السيتوكينينات من الهرمونات المهمة المستخدمة في أوساط زراعة الأنسجة النباتية وتعمل هذه الهرمونات على تنشيط النموات العرضية وتشكل البراعم الخضرية وتمنع تكون الجذور عندما تستخدم بتراكيز مرتفعة وهي من مشتقات الأدنين، و تلعب دوراً فعالاً في تنشيط انقسام الخلايا النباتية.

يتم استخدام السيتوكينينات بشكل مشترك مع الأوكسينات بتراكيز تختلف من نبات لآخر ومن نسيج لآخر حيث استخدم الكينيتين KIN بكثرة مع الأوكسينات لتحريض تشكل الكالوس عند مختلف الأنواع النباتية، وكذلك البنزيل أمينو بيورينBAP 6-benzylaminopurine، والبنزيل أدينين BA (6-benzyadinine).

أشار العديد من الأبحاث إلى نجاح عملية الإكثار الدقيق وتشكل الكالوس عند مختلف الأنواع النباتية عند إضافة الهرمونات ومن أهمها السيتوكينينات والتي تلعب دوراً مهماً في تشكيل البراعم الجديدة، ويكون لاستخدامها وبشكل مدروس لوحدها أو بالاشتراك مع الأوكسينات دوراً مهماً في تنظيم الأنشطة الفيزيولوجية التي ترافق عمليات النمو والتطور في النباتات، حيث وُجد أن هناك ارتباطاً وثيقاً بين بعض أنماط السيتوكينينات والحمض النووي الريبي الناقلtRNA الذي ازداد تركيبه مع أنماط أخرى من RNA الأمر الذي يؤدي لزيادة في تركيب البروتينات وبالتالي الأنزيمات داخل الخلية.

- بعض التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة النباتية مخبرياً

استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للإكثار:

تستخدم زراعة الأنسجة النباتية كأسرع الوسائل لإكثار النباتات بتكلفة منخفضة وأعداد كبيرة وذلك من خلال الحصول على عدد كبير من النباتات في حيز محدود من المختبر وانطلاقاً من جزء نباتي واحد، ودون التقيد بموسم زراعي معين وفي أي وقت من العام.

بيَّن العلماء أهمية إضافة الهرمونات النباتية للوسط وآلية عملها في تنشيط وتسريع عملية تشكيل **الجذور والبراعم الجديدة** عند العديد من النباتات مثل نبات *Merwilla plumbea* حيث لوحظ أن عدد البراعم النباتية المتشكلة على الأجزاء المزروعة ازداد بوجود تراكيز مختلفة من السيتوكينينات بالمقارنة مع الوسط الشاهد.

تمكن آخرون من إكثار النوع *Ocimum gratissimum* خلال 45 يوماً أيضاً من زراعة **العقد النباتية** والحصول على عدد جيد من البادرات الجديدة.

يعد الحصول على نباتات كاملة عن طريق **إكثار البراعم الخضرية** (الشكل 4) أسرع طرق الإكثار النباتي والذي يمكن أن يستغرق نحو شهر أو أقل بدءاً من عملية زراعة القطع النباتية وصولاً إلى النبات الكامل. حيث تمكَّن العلماء من تحريض تشكيل الكالوس عند نبات *Ricinus cominus* بزراعة الأوراق الفلقية وقطع من الجذور على الوسط MS بوجود تراكيز مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات ومن ثم تحريضها لإعادة إنتاج نباتات جديدة، وكذلك استطاع بعضهم أن يحصل على براعم جديدة من كالوس نبات *Pagostemon gablin* الناتجة من زراعة القطع الورقية على الوسط MS المضاف إليه (2,4-D–BAP-BA) بتراكيز مختلفة وأعطت تلك البراعم نباتات جديدة بعد أربعة أسابيع من إنتاجها.

تستخدم زراعة الأنسجة **لحفظ الأصول الوراثية** للعديد من الأنواع النباتية ولفهم ذلك نذكر أنه قد تم حفظ أربعة طرز وراثية مختلفة من نبات النعناع ومكاثرتها باستخدام تقانة زراعة الأنسجة النباتية وذلك بزراعة القطع الورقية أو الساق أو

العقد أو القمم الميرستيمية، وكذلك مكاثرة وحفظ أنواع متعددة من النباتات المهمة طبياً في الفلورا الفلسطينية *Mentha spicita* L. *Pimipnella anisum* , *Salvia palestina* , *Gandelia tournefortii* والعمل إكثارها والحصول على بادرات جديدة من زراعة البراعم والعقد الساقية وكذلك من زراعة القطع النباتية المختلفة والحصول على الكالوس وبالتالي توفير المادة النباتية الخام مخبرياً.

الشكل 4: إكثار البراعم الخضرية للحصول على نباتات كاملة مع حفظ الأصول الوراثية.

- **إنتاج الكالوس وتطبيقاتها:**

تستخدم تقانة زراعة الأنسجة النباتية في الزجاج في الدراسات الحديثة للحصول على الكالوس (الشكل 5) وهي كتلة من الخلايا الجنينية غير المتمايزة ناتجة من زراعة الأجزاء النباتية على الأوساط المغذية بوجود تراكيز مشتركة من الأوكسينات و السيتوكينينات والتي تختلف وفقاً لنوع النبات والجزء النباتي المستخدم.

الشكل 5: كالوس ناتجة عن زراعة قطع ساق نباتي على الوسط MS + أوكسين 1مغ/ل 2,4-Dو ستوكينين 0.5مغ/ل BAP

يمكن استخلاص المواد الفعالة من الكالوس لاستخدامها في مكافحة عدد من العوامل الممرضة للنبات والإنسان، وأيضا يمكن حفظ المادة الوراثية للنباتات المهمة اقتصادياً وطبياً من خلال الحصول على الكالوس وحفظها على أوساط مغذية مع التجديد المستمر، ومن ثم تحريضها على التمايز لإنتاج نباتات جديدة عند اللزوم.

نذكر مثلا دراسات أجريت في عامي 2007 و2011 م على إكثار وتنمية نبات *Ricinus communis* بدءاً من الوريقات الفلقية وذلك بزراعتها على الوسط MS المزود بـ 8% أغار و3% سكاروز وتراكيز مشتركة من الأوكسينات و السيتوكينينات وثم الحصول على الكالوس واستخدم الإيتانول و الميتانول لاستخلاص مركبات الاستقلاب الثانوي من الأنسجة المزروعة ودراسة فعاليتها ضد عدد من الميكروبات مثل الفطر *Candida albicans*

أجريت دراسات حديثة في الأعوام 2011 و2012م لمكاثرة أنواع نباتية متعددة مهمة طبياً واقتصادياً لحفظها كبنوك وراثية وإنتاج مركبات استقلاب ثانوية جديدة خاصة عند تشكل الكالوس والأعضاء النباتية بالتحريض الهرموني وحددت تلك المركبات باستخدام جهاز الكروماتوغرافيا السائلة أو الغازية.

استخدمت الأوراق الفتية أو الأجنة الناضجة للحصول على الكالوس أيضا في الأعوام 2013 و2018م على الوسط MS المضاف إليه تراكيز مختلفة من الهرمونات النباتية (NAA, BAP, IAA, 2,4-D, Kin) عند عدد من الأنواع النباتية مثل نبات الداتورة من النوع *Physalis minima* ونبات القمح من النوع *Triticum aestivum* ونبات فول الصويا *soybean*.

- **إنتاج المركبات الطبيعية والمواد الطبية:**

تستخدم بعض النباتات كمصادر للحصول على كثير من المواد الفعالة (الفيتوكيماويات) مثل القلوئيدات، الستيروئيدات، الكحولات، الفينولات والتربينات؛ وجميعها مركبات ناتجة من عمليات الاستقلاب الثانوي للعديد من النباتات الطبية والعطرية، وتدخل هذه المواد في صناعة الأدوية والعطور ومستحضرات التجميل والمنظفات ومنكهات الأغذية وغيرها.

يمكن استخدام مزارع الأنسجة النباتية وتحضير المعلقات الخلوية منها لتصبح وسيلة أسرع لإنتاج مركبات الاستقلاب الثانوي، فقد قام بعض العلماء عام 2000م و 2008م بزيادة كمية مادة ginsenoside من تنمية وتحريض خلايا المعلق الخلوي لنبات *Panax ginseng*، كما ساهموا بزيادة كمية المنتول في خلايا المعلق الخلوي لنبات النعناع *Mentha piperita* الناتج من زراعة خلايا الكالوس لأوراق النبات، وذلك عند تحفيز خلايا المعلق على الإنتاج بتزويدها بالمغذيات وكان متوسط زيادة الإنتاجية 278مغ، وتراوحت زيادة نسبة المنثول في خلايا المعلق الخلوي للنعناع إلى 92 و 110 مغ/ل بالمقارنة بـِ 77مغ/ل في خلايا النبات الطبيعي.

أجريت دراسات حديثة لإكثار وتنمية النباتات المهمة اقتصادياً وطبياً في الزجاج بغرض الحصول على كتلة أكبر من المادة النباتية لتشكل ركيزة جيدة يتم انطلاقاً منها تحضير مركبات كيميائية تستخدم في عمليات المكافحة الحيوية والصناعات

الطبية والصيدلانية، فقد استخدم بعض العلماء عام 2001م العقد النباتية للنعناع الفلفلي لإكثارها مخبرياً على الوسط المغذي MS باستخدام تراكيز مختلفة من الهرمونات الساقية، ولوحظ أن النباتات الناتجة من عمليات المكاثرة وكذلك الأنسجة المزروعة احتوت على نسب مرتفعة من الفلافونوئيدات والبولي فينول والكاروتينات. كما تمكن آخرون عام 2013م من إيجاد طريقة بديلة لإنتاج المركبات الفعالة لنبات *Justicia genddarussa* وذلك من خلال إنتاج الكالوس على الوسط MS بوجود الهرمونات NAA, BAP، واستخلاص مركباته الفعالة بالإيتانول و الميتانول، حيث سجلت نسبة جيدة للمركبات الفينولية 183مغ/غ لكالوس الساق في المستخلص الميتانولي، و17.39مغ/غ للفلافونوئيدات في المستخلص الايتانولي لكالوس الأوراق و 145 ميكروغرام/غ لمضادات الاكسدة في المستخلص الميتانولي لكالوس الساق. واستطاع بعضهم عام 2017م زيادة كمية المركبات الفعالة (Limonene, Pulegone, Isomenthone) في كالوس نبات *Agathasoma betula* مقارنة بالنباتات النامية طبيعيا أثناء مكاثرة النبات مخبريا على الوسط المغذي MS بوجود تراكيز مختلفة من BA, NAA, 2,4-D.

- **الحصول على نباتات خالية من الأمراض وخاصة الفيروسية:**

تصاب أغلب المحاصيل الزراعية بالعديد من الأمراض التي تسببها الفطريات، الجراثيم، النيماتودا والفيروسات، وغالباً تكون الإصابة بالمرض غير مميتة للنبات ولكن تؤدي لانخفاض القدرة الإنتاجية ونوعية المنتج الزراعي.

تنتقل الكثير من المسببات المرضية عن طريق التكاثر الخضري في حين يمكن للفيروسات أن تسبب العدوى عن طريق التكاثر الخضري والتكاثر الجنسي، ويعد التخلص من العدوى المرضية من أهم العوامل الضرورية لتحسين الإنتاج كماً ونوعاً، فبينما يمكن معاملة النباتات المصابة بالجراثيم والفطريات بالمبيدات الجرثومية أو الفطرية للقضاء عليها أو التخفيف من الإصابة، فإن النباتات المصابة بالفيروسات يصعب معالجتها كيميائياً.

توفر زراعة الأنسجة الميرستيمية فرصة جيدة للحصول على نباتات خالية من الإصابات الفيروسية، ويعود ذلك إلى أن الخلايا في النسج الميرستيمية خلايا جنينية تنمو وتنقسم بمعدل أسرع من انقسام الفيروس، كما أن المحتوى العالي من الهرمونات النباتية في القمم الميرستيمية يساعد على تثبيط عملية تكاثر الفيروسات، بالإضافة إلى أن الفيروسات تتحرك في خلايا النبات عبر الأجهزة الوعائية والتي غالباً ما تكون غائبة في القمم النامية.