

زراعة الأنسجة Culture Tissue

مقدمة :-

يعتبر علم زراعة الأنسجة من المجالات الحديثة الهامة المنتمية حديثاً لعلم الوراثة وهو مجال تطبيقي سوف يحدث ثورة في مجال الزراعة حيث يهتم بتنمية أجزاء صغيرة من الأنسجة النباتية Explant والحيوانية يتراوح حجمها تقريباً بين عدة مليمترات إلي ما يقرب من البوصة في الطول علي بيئات صناعية معروفة المكونات وتحت ظروف بيئية متحكم فيها صناعياً ويتم هذا بغرض انقسام ونمو الخلايا وكذلك إعادة التشكل مرة أخرى في هذه الأنسجة لكي يتكون لدينا نمواً من الخلايا Callus أو كائن كامل [نبات كامل] ثم يتم نقله وأقلته للظروف البيئية الزراعية وبذلك يعطي بعض النباتات أو الأصناف ذات مميزات خاصة يستفاد منها استفادة كبيرة في مجال الزراعة وهذا يتم إنجازه في جيل أو جيلين وبذلك لا نلجأ إلي برامج التربية التقليدية التي قد تستغرق من ١٠ - ١٥ عام .

وتعتبر الظروف البيئية التي يتعرض لها النسيج من أهم العوامل التي تؤثر علي نجاح عمليات زراعة الأنسجة وهذه الظروف مثل الضوء (شدته - مدة التعرض له - موجاته) ودرجة الحرارة (هل هي ثابتة أو متغيرة حسب الليل والنهار) والرطوبة (ملائمة فلا تساعد علي نمو الكائنات الدقيقة وكذلك لا تساعد علي سرعة جفاف البيئة) .

ولقد حقق المتخصصون في هذا المجال تقدم كبير في زراعة الأنسجة النباتية لما تمتاز به الخلايا النباتية من قدرة علي إعادة الشكل مرة أخرى .

لكن التقدم في مجال زراعة الأنسجة الحيوانية يواجه بعض الصعوبات حيث أن الخلايا الحيوانية ليست لها القدرة علي إعادة الشكل مرة أخرى .

تعريف علم زراعة الأنسجة :-

يقصد بزراعة الأنسجة استخدام جزء من النبات قد يكون البذرة أو جزء من الجذر أو جزء من الساق أو جزء من الأوراق أو المتك أو حبوب اللقاح علي بيئة مغذية غالباً ما تحتوي علي العناصر الكبرى والصغرى ومصدر للسكريات وغالباً ما يستخدم السكروز كبيئة مغذية وأحياناً تضاف بعض من منظمات النمو مثل الأكسينات لتشجيع تكوين الجذور ونموها والسيبتوكوينينات لتشجيع نمو الساق والهرمونات التي توجه النبات لتكوين نسيج Callus وهو عبارة عن مجموعة من خلايا منتظمة أو غير منتظمة ونعني بكلمة منتظمة أي أنها خلايا متشابهة لا يمكن تمييز خلايا خاصة بالجذر أو الساق أو الأوراق - وزراعة تلك الخلايا المفككة علي بيئة مغذية يمكن الحصول علي أفراد تشبه النبات الأم الأصلي في تركيبها الوراثي بكميات كبيرة في أوقات قصيرة .

وتتم هذه الطريقة تحت ظروف معقمة حيث أن البيئات المستخدمة تكون موطن خصب للكائنات الدقيقة .

أهداف استخدام زراعة الأنسجة :-

١ - Propagation - Rapid clone

إكثار النباتات خلال مزارع الأنسجة يمكن أن يحقق :-

أ - التتابع :-

النباتات المنتجة من نشاط القمم المرستيمية تكون من الناحية الوراثة مطابقة تماماً للنسيج الأم المأخوذة منه القمم المرستيمية مما يؤدي إلي المحافظة علي الصفات الوراثة - وإنتاج نباتات بهذه الكيفية إحدى مميزات النكاثر الخضري للمحافظة علي السلالات .

" Clone " سلالة - هي النباتات الناتجة بدون تغير وراثي من فرد بمعنى أنها سلالة من نبات واحد دون تغير في الصفات الوراثية أي أن جميع النباتات متشابهة وراثياً .

ب - السرعة - Rapid :-

فترة كل خطوة من خطوات زراعة الأنسجة تتراوح من ٤ - ٦ أسابيع فقط .

ج - إنتاج أعداد كبيرة في فترة قصيرة . production Mass.

تبادل وحفظ التراكيب الوراثية (الأنواع) :-

Germplasm Storage and exchange

أ - يمكن خلال زراعة الأنسجة تبادل الأصناف الجديدة والقديمة بين الدول دون الخوف من انتشار الأمراض من الدول المصدرة إلي الدول المستوردة فمثلاً ظهور صنف جديد في منطقة أو دولة ما قد تقف إجراءات الحجر الزراعي والخوف من انتشار الأمراض عائقاً في سبيل نشر هذا الصنف ولكن عن طريق زراعة الأنسجة يمكن التغلب علي هذا العائق .

ب - حفظ التراكيب الوراثية يعتبر هدف عظيم بالنسبة لعلماء التربية حيث يمكنه حفظ أنواع معينة أو أصناف معينة في أنابيب تحفظ في ثلاجات لإيقاف نموها حتى يحتاج إليها في عمليات التربية والتجهيز المختلفة وذلك بدلاً من زراعتها في الحقل مباشرةً والمحافظة عليها في الحقل الذي يتطلب كثيراً من الوقت والجهد فضلاً عن إمكانية فقدها في أي لحظة بسبب الظروف البيئية والحيوية في الحقل .

إنتاج نباتات خالية من مسببات الأمراض خاصة الفيروسية منها :-

Production of pathogens [mainly virus] - free plants

من المعروف أن بعض النباتات التي يتم إكثارها خضرياً تكون عرضة للإصابة بالأمراض الفيروسية والتي تنتقل من خلال وسائل الإكثار ومن أهم الأمثلة :- البطاطس - الثوم - الفراولة - وغيرها . لذلك فمن خلال مزارع الأنسجة يتم زراعة جزء صغير جداً ٠,٢ - ٠,٥ ملليمتر . هذا الجزء غالباً خالي من الفيروس حتى في النباتات المصابة بالفيروس لعدم احتوائه علي أوعية vessless وبطئ حركة الفيروس في المنطقة النشطة . النباتات الناتجة من هذا الجزء هي نباتات خالية من مسببات الأمراض وبذلك يمكن توفير ملايين الدولارات التي تستخدم في استيراد شتلات من مناطق باردة حيث لا ينمو الفيروس .

إنتاج العديد من المركبات العضوية والأمصال :-

Pharmacology, Vaccines

كثير من النباتات الطبية والعطرية تنتج مواد عضوية ذات أهمية خاصة طبية وصناعية مثل :-

الداتورا - السكران - الدجينالس - الريحان - النعناع .

يزرع أجزاء منها لإنتاج نسيج الكالوس CALLUS الذي نستخلص منه المادة الفعالة بدلاً من اللجوء إلي زراعة النبات .

مثال :- إنتاج الكاكاو معملياً

تستخدم مزارع الأنسجة في إنتاج العديد من الأمصال Vaccines بنفس الأسلوب .

مكونات معمل زراعة الأنسجة :-

يتكون معمل زراعة الأنسجة من ٤ حجرات هي :-

١ - حجرة المطبخ area Kitchen :-

تتم في هذه الغرفة غسيل جميع الأدوات المستخدمة في هذه الأنسجة مثل الزجاجات ، أطباق بتري ، المخابير ، الماصات وغيرها من الأدوات الزجاجية حيث تغسل بالماء (ماء مقطر مرتين) D.D.W فقط ولا يستخدم الصابون مطلقاً .

٢ - حجرة الزراعة Room Cultivation :-

ويتم في هذه الغرفة زراعة الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء في البيئات .

٣ - حجرة النمو Room Growth :-

يتم في هذه الحجرة نمو الأجزاء المزروعة في البيئات ويجب توفر الظروف التالية في هذه الحجرة :-

حرارة ٢٥° م

ضوء ١٦ ساعة ضوء فلورسنت أبيض وذلك لأنه يوجد به جميع أطوال موجات الضوء كما أنه لا يؤدي إلي ارتفاع درجة الحرارة .

٤ - حجرة التفريد Room Mist :-

في هذه الحجرة يتم تفريد النباتات النامية من الزجاجات أو أطباق تيري في بيت موسى أو تربة معقمة تماماً تحت ظروف متحكم فيها .

وبعد ذلك تجرى له عملية أقلمة ثم ينقل إلي الصوبة أو إلي الأرض المستديمة مباشرة .

وعملية التفريد هذه تكسب النباتات النامية القوة والتحمل للظروف الطبيعية كي تستطيع الاستمرار في الحياة عند نقلها إلي التربة .

طرق نقل النباتات المزروعة :-

١ - نضع الأصيل في صوبة حتي يصبح متأقلم ونعمل علي رش رزاز متقطع لمدة أسبوع

٢ - ننكس إناء زجاجي علي الأصيل في اليوم الأول يكون الإناء محكم وبعد مرور ٢٤ ساعة نرفع الغطاء فترة وجيزة ثم نعيد تنكيسه وهكذا وفي كل مرة نرود فترة رفع الغطاء حتى يتأقلم النبات .

الظواهر المصاحبة لعملية الأقلمة :-

نتيجة عملية الأقلمة تحدث العديد من التغيرات الكيميائية والفسولوجية والمورفولوجية

أولاً التغيرات الكيميائية والفسولوجية :-

١ - زيادة نسبة الماء المرتبط غير الحر .

٢ - زيادة نسبة السكر المختزل وغير المختزل وقلة النشا .

تحول البروتينات إلي أحماض أمينية .

ثانياً التغيرات المورفولوجية :-

- زيادة الطبقة الشمعية علي الأوراق للحماية من البرودة .

القوام الجلدي للأوراق .

نقص الحجم ، حجم الأوراق يقل .

زيادة نسبة المادة الجافة .

قلة نسبة الماء القابلة للتجمد نتيجة ارتفاع الضغط الأسموزي .

الأجزاء النباتية المستخدمة في زراعة الأنسجة Explants :-

تتنوع الأجزاء النباتية المستعملة في زراعة الأنسجة وذلك علي حسب :-

نوع النبات - هدف الدراسة .

فقد نستخدم :-

القلم النامية للبراعم - الجذور - أي جزء من الورقة - برعم جانبي - جزء من الحزم الوعائية للجذور - أو يتم استخدام المتك أو حبوب اللقاح المعزولة أو الأجنة المعزولة عقب التلقيح والإخصاب أو نستخدم البويضات أو المبيض كله وما يحمله من بويضات بعد إزالة أغلفة المبيض .

ويشترط في الجزء النباتي المستخدم :- قدرته علي الانقسام الميتوزي حيث يعتبر اختبار الجزء النباتي المستعمل وكذلك مرحلة نمو هذا الجزء ذات أهمية كبيرة في زراعة الأنسجة وفي جميع الأحوال يجب تعقيم الجزء النباتي المستخدم قبل البدء في زراعة الأنسجة ومن أبسط الطرق المستخدمة في التعقيم هي غمس النسيج في كحول لعدد قليل من الثواني ثم يعامل بمحلول كلوراكس ٥ - ١٥ % لمدة ٥ - ٢٠ دقيقة .

طرق التعقيم في زراعة الأنسجة :-

تختلف طريقة التعقيم حسب الجزء المراد تعقيمه كالتالي :-

١ - يتم تعقيم المعمل كلياً بالفورمالين .

٢ - يتم تعقيم الأدوات الزجاجية والمعدنية علي درجة حرارة ١٦٠ م لمدة ٤ ساعات في الأوتوكلاف .

أو في الفرن مباشرة علي درجة ٢٠٠ م لمدة ٤ - ٢٤ ساعة .

٣ - يتم تعقيم البيئة في الأوتوكلاف علي درجة حرارة ١٢١ م وضغط ١٥ ضغط جوي لمدة ١٥ دقيقة .

ولا يمكن تعقيم البيئة في الفرن مباشرة لعد وجود ضغط به حيث أن الضغط هو الذي يقوم بالتعقيم وقتل الميكروبات وليست الحرارة .

الهرمونات ومنظمات النمو يتم تعقيمها بواسطة المرشحات وهي لها أشكال وطرق مختلفة في التعقيم :-

فبعض منها عبارة عن إناء زجاج من أعلى ومن أسفل إناء آخر وبالمنتصف المرشح حيث يتم وضع الهرمونات أو منظمات النمو أعلى فيحدث لها ترشيح وفصل الميكروبات خلال المرشح ثم تتجمع في الإناء السفلي .

الأجزاء النباتية :-

يتم تعقيمها بالكوراكس (هيبو كلورات صوديوم) ٥ % لمدة ١٥-٢٠ دقيقة .

أو بتركيز ١٠ % - ٢٠ % لمدة ١٠ - ٣٠ دقيقة . أو باستخدام الكحول ٧٠ % لمدو ١ - ٥ دقائق

أو باستخدام الكحول المطلق ٩٠ % لمدة ثواني ثم الغسيل بالماء المقطر مرتين عدد ٢ - ٣ مرات .

البذور :- يتم تعقيمها بنترات الفضة أو محلول السليمانى .

ملحوظة :-

يمكن استخدام المضادات الحيوية عندما يكون النبات مصاباً من الداخل كوسيلة للتعقيم ويكون النبات المصاب هام جداً فيستخدم المضادات الحيوية مثل الأيسيمين واسع المفعول ومدى استخدامه ٥٠ - ١٥٠ ميكروجرام /م^٣ .

مكونات البيئة الغذائية المستعملة في زراعة الانسجة :-

يجب أن تتوفر في البيئة الغذائية المستخدمة في زراعة الانسجة المكونات التالية:-

١ - مصدر طاقة :-

وهو عبارة عن أنواع السكريات المختلفة كالكروز والجليكوز وتعتبر هذه السكريات مصدر الكربون أيضاً .

٢ - مصدر الأملاح :-

مثل الكالسيوم والصوديوم والماغنسيوم وK وهي من العناصر الرئيسية في البيئة التي يتغذى عليها النبات النامي ونقص أي من العناصر قد يؤدي إلي ضعف النبات وقد يؤدي بحياته.

٣ - مصدر الفيتامينات :-

مثل الثيامين Thiamin ، وفيتامين B ، وحمض الأسكوربيك (فيتامين C) .

٤ - الأحماض الأمينية :-

والمواد العضوية مثل الكازين المحلل أنزيمياً ، الجلوتامين .

٥- الهرمونات (منظمات النمو) :-

أ - أوكسينات :-

وهي هرمونات نباتية تسبب كبر وزيادة الخلايا في الحجم وتتشط تكوين الجذور وتتحكم في نمو وتكوين البراعم مثل أندول أسيتك أسيد D₂,٤ .

ب - سيتوكاينين :-

وهي هرمونات نباتية يختص بانقسام الخلايا وزيادة نموها وتشكلها وتميزها مثل الكاينين وهي تشجع تكوين المجموع الخضري .

٦- مركبات طبيعية :-

مثل كازين اللبن ، لبن جوز الهند ، مستخلص الخميرة .

٧- الأجار :-

وتستخدم في حالة ما إذا كانت البيئة المطلوبة نصف صلبة .

٨- يجب مراعاة ضبط ال pH البيئة الغذائية في مدى ٥,٥ - ٥,٨ وهو أنسب التركيزات لاستفادة جميع الأجزاء النباتية من العناصر الغذائية الموجودة في البيئة وكذلك لإتمام جميع العمليات الفسيولوجية بنجاح .

أضرار الحرارة المرتفعة علي البيئة الغذائية :-

تختلف الكيماويات المستخدمة في البيئة الغذائية في تأثيرها بدرجة الحرارة العالية .

حيث تؤثر درجة الحرارة تأثيراً كبيراً علي منظمات النمو كالتالي :-

الجبرلينات :-

يتكسر الجبرلين بنسبة ٩٠ % في الأوتوكلاف علي درجة حرارة ١٢١ ° م لمدة ١٥ دقيقة وتحت ١٥ ض . ج .

الأوكسينات :-

2.4.D , IAA , NAA تتحمل الحرارة مع أن IAA لا يتأثر بالتعقيم في الأوتوكلاف تحت الظروف العادية إلا أنه خاضع للانحلال بالعوامل الأخرى مثل ال pH حيث أن تغير ال pH يسرع من تحلل IAA .

السيتوكيتينيات :-

لا يتأثر المحلول المائي من الكاينين والزيثين والبنزليدينين بدرجات الحرارة العالية .

من ناحية أخرى فإن تعريض الصورة الغير نشطة من مادة Substituted purine ولدرجات الحرارة العالية أثناء تعقيمها في الأوتوكلاف فإنها تتحول إلي الصورة النشطة Nb Substituted purine تساعد في تكوين الكالوس .

لا تؤثر الحرارة العالية علي حامض الأبسيسك ولكن يؤثر عليه الضوء .

الثايمين Hcl عند غليانه علي درجة حرارة 110° م في محلول مائي يتكسر بسرعة عندما يصل ال PH إلي ٥,٥ .

أنثوسيانات الكالسيوم لا يمكن تعقيمه بالحرارة العالية وذلك لسرعة تكسره بالحرارة .

السكروروز الثنائي هو أكثر الكربوهيدرات استخداماً في البيئة يتحلل التعقيم في الأوتوكلاف ليعطي مخلوط من D جليكوز ، D فركتوز . بالإضافة إلي ذلك فإن التعقيم الحراري قد يكون له تفاعلات وسيطة داخل البيئة بين الكربوهيدرات والأحماض الأمينية .

البيروكسين يتحلل بسرعة بالحرارة العالية .

تجهيز معمل زراعة الأنسجة :-

يجب توفير الأجهزة التالية في معمل زراعة الأنسجة :-

١ - جهاز تقطير الماء :-

الماء المستخدم في زراعة الأنسجة لابد أن يكون مقطر مرتين Double destile water ويمكن الحصول عليه من جهاز تقطير الماء مرتين وقوته ٢٠٠,٠٠٠ أوم / ساعة .

شروط الماء المستخدم في زراعة الأنسجة :-

١ - خالي من الشوائب حتى لا يحدث تلوث للبيئة .

٢ - خالي من الأملاح المعدنية حتى لا يؤدي ذلك لتغير pH البيئة وبالتالي تصبح سامة للنبات .

٣ - أن يكون الماء مقطر مرتين D.D.W .

وعن طريق جهاز وهو عبارة عن عمود من الراتنجات به شحنة موجبة وأخرى سالبة وذلك لجذب الأملاح الموجودة في الماء وبالتالي تقطيره أو عن طريق الأسموزية وهو عبارة عن غشاء يوضع بداخل أسطوانة يوجد بخارجها تركيز عالي وبداخلها تركيز منخفض فيتم بذلك الاتحاد مع الأملاح التي توجد بالماء وبالتالي تقطيره .

وتعد الطريقة الأولى أكثر الطرق استخداماً وأفضلها .

ملحوظة :-

يمكن استخدام ماء الأمطار في زراعة الأنسجة .

٢ - الميزان :-

يجب توفير ميزان بمعمل زراعة الأنسجة وأن تكون حساسية الميزان

٢-٥ ملليجرام ويزن حتى ٥٠ جرام أي حساسية الميزان حتى الرقم العشري الثالث .

٣ - جهاز لضبط ال pH :- Meter pH :-

حيث انه لابد أن يكون pH البيئة المستخدمة يتراوح من ٥,٥ - ٥,٨ ويجب أن تكون حساسية الجهاز ١,٤ P.P.m

ويستخدم لضبط pH البيئة محلول Hcl مخفف (١ ع) لخفض ال pH عندما يكون الوسط قلوي .

ويضاف KOH لرفع ال PH عندما يكون الوسط حامضي .

ملحوظة :-

تستخدم KOH بدلاً من NaOH حتى يستفيد النبات من عنصر البوتاسيوم كما أنه عنصر غير سام بالنسبة للنبات .

٤ - جهاز سخان ومقلب :-

يستخدم السخان لتسيح أو لانصهار الأجار في حالة البيئات الصلبة حتى يسهل صبه ويستخدم المقلب في إذابة المحاليل وهو عبارة عن مغناطيس يمكن استخدامه أيضاً في تقليب الأجار حتى لا يلتصق ويأخذ اللون الأسود ، وكذلك في إذابة المحاليل والكيماويات ويستخدم أيضاً في تقليل التلوث الموجود علي الأجزاء النباتية .

٥- أجهزة تنظيف الأجزاء النباتية :-

تتم عملية تنظيف الأجزاء النباتية بإحدى الطرق التالية :-

أ - وضع الأجزاء النباتية في كأس وتغطيته بشاش أو سلك وفتح الصنبور عليه .

ب - عن طريق استخدام المقلب .

ج - عن طريق إحداث موجات فوق صوتية تحدث ذبذبات شديدة الأجزاء النباتية وبالتالي تنظيفها .

د - عن طريق غمس الأجزاء النباتية في الكحول ٩٥ % لمدة ثواني ثم وضعها في محلول كلوراكس ١٥ % لمدة ١٥ دقيقة وبعد ذلك توضع في ماء مقطر ثلاث مرات للتخلص من أثر الكلوراكس .

٦- أجهزة صب البيئة :-

تستخدم هذه الأجهزة في صب البيئة في أطباق بتري أو الزجاجات التي يتم الزراعة فيها وتختلف هذه الأجهزة عن بعضها ويوجد منها عدة أشكال :-

أ - أحد هذه الأجهزة عبارة عن حقنة زجاجية كبيرة مدرجة تنتهي هذه الحقنة بخراطمين أحدهما لشطف البيئة والأخرى لصبها في الأطباق وذلك علي حسب الحجم المطلوب .

ب - يوجد جهاز كهربائي لصب البيئة وهو ينتهي أيضاً بخراطمين أحدهما لشطف البيئة والأخر لصبها في الأطباق ويتم التحكم في الحجم المطلوب وجوده ميكانيكياً .

٧- أجهزة تعقيم البيئة :-

يتم تعقيم البيئة في الأوتوكلاف علي درجة حرارة ١٢١ °م وتحت ضغط جوي ١٥ ض. ج ١٥ Psi لمدة ١٥ دقيقة .

٨- الهزاز الدائري :-

يستخدم الهزاز الدائري في الاستعمالات التالية :-

أ - الزراعة المائية مثل زراعة الجذور والأقرص الورقية .

ب - فصل الخلايا من الكالوس بوضعه في محلول مائي .

ج - زراعة الخلايا علي الميكروفيلم في البيئة المائية .

يستخدم هذا الجهاز في حدود Y. R . B ١٠٠

٩ - آلة غسيل الأدوات :- Dishwasher :-

يتم فيها غسل معظم الأدوات الزجاجية مثل أطباق بتري ، الماصات ، المخابير ، الزجاجات ، وغيرها من الأدوات الزجاجية المعدنية .

ويستعمل في الغسيل ماء مقطر مرتين ولا يستخدم الصابون مطلقاً .

١٠ - الثلاجة :-

وتستخدم الثلاجة في تخزين البيئات ، الكيماويات ، المحاليل المغذية ، ويفضل وجود حجرة كاملة للتخزين .

١١ - ميكروسكوب :- Microscope :-

وهو يستخدم في حالات نادرة مثل انصهار البروتوبلاست ويستخدم أيضاً لفحص الخلايا والأنسجة .

١٢ - الهود :- Hood Transfer :-

وهو المكان التي تتم فيه زراعة الأجزاء النباتية ويجب أن يكون معقم ١٠٠% .

١٣ - الأرفف :- Shelves :-

يستخدم الأرفف في وضع الأدوات عليها مثل الأدوات الزجاجية والمعدنية .

١٤ - فرن :-

وذلك لتجفيف الأوعية والزجاجات وتعقيمها علي درجة ٢٠٠° م

لمدة ٤ - ٢٤ ساعة .

١٥ - الأدوات الزجاجية والمعدنية :-

دوارق مخروطية بأحجام مختلفة

دوارق معيارية بأحجام مختلفة

مخابير مدرجة بأحجام مختلفة

ماصات مدرجة بأحجام مختلفة

أطباق بتري ، وزجاجات بأحجام مختلفة للزراعة فيها .

ملاقط كبيرة ذات أطراف غير حادة للزراعة .

ملاقط ذات أطراف حادة لنزع بشرة الأوراق .

ابر تشريح .

ما هي الإرشادات الهامة التي يجب مراعاتها في معمل زراعة الأنسجة :-

هناك بعض الأمور الهامة التي يجب أن تؤخذ في الاعتبار عند المعمل في مجال زراعة الأنسجة :-

١ - يجب عدم تقريب الكحول من اللهب لأنه سريع الاشتعال .

٢ - يجب عدم استنشاق هيبوكلوريد الصوديوم لأنه سام جداً .

٣ - يحظر عدم إطالة النظر إلي لمبة Ultraviolet لأنها تسبب العمى .

٤ - الاحتراس عند التعقيم بمحلول السليمانى لأنه شديد السمية .

يجب الاحتراس عند استعمال الكيماويات لأنها شديدة السمية .

ينصح بغسيل الأسطح غسيلة جيداً بالكحول ٧٠ % أكثر من مرة وذلك لتقليل التلوث .

ينصح بأن تكون الملابس التي يرتديها من يقوم بالزراعة نظيفة لتقليل التلوث .

يجب تعقيم المعمل كله تعقيماً جيداً لضمان خلوه من الميكروبات قبل بدء العمل .

تعقيم الأدوات المعدنية بالكحول وتعريضها للهب حتى الاحمرار لتقليل أي ميكروبات توجد عليها .

تعقيم الهود جيداً قبل الزراعة .

أن يكون الماء المستعمل في زراعة الأنسجة مقطر مرتين ومعقم حتى نضمن خلوه من الميكروبات والأملاح .

تعقيم الأيدي باستمرار أثناء الزراعة لضمان التعقيم التام .

ينصح باختبار الهود قبل الزراعة فيه للتأكد من خلوه من التلوث .

التأكد من التعقيم التام لأدوات الزراعة والبيئات والأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة لضمان نجاح العمل .

ينصح بعدم التحدث أثناء الزراعة تجنباً للتلوث .

ينصح بعد إمرار الأيدي فوق مكان الزراعة تجنباً للتلوث .

كيفية اختبار التلوث الموجود في الهود :-

لمعرفة مدى نظافة الهود وملاءمته للزراعة به نضع بداخله عدد من أطباق تيري بكل منها بيئة مغذية وتوزع الأطباق في أماكن مختلفة من الهود ونتركها لفترة معينة ثم نكشف عنها لمعرفة وتقدير مدى تلوث البيئات بكل طريق .

ظاهرة Habituation :-

هي تأثير مباشر لنمو الأجزاء النباتية المزروعة علي بيئة غذائية بها أحد الهرمونات (مثل السيبتوكابينينات) حيث يحدث له تشبع وعند نقله هالي بيئة جديدة ليس بها هذا الهرمون فإنه بنمو جيداً كما لو كان بالبيئة

هذا الهرمون وتسمى هذه الظاهرة بظاهرة التعدد .وتسلك الأجزاء النباتية هذا السلوك في مرة واحدة فقط أما لو نقلت إلي بيئة أخرى مرة ثانية وكانت هذه البيئة خالية من الهرمون فإنها لا تسلك نفس السلوك السابق .

مثال :-

عند تنمية القطع الساقية للبطاطس في بيئة بها بنزيرل أدنين يتكون بها جذور وعند تنمية الجذور في بيئة سائلة خالية من البنزيرل أدنين فإن المناطق التي يحدث بها جرح تكون كالوس علي الجذور وتسمى هذه

مجالات زراعة الأنسجة

مزارع الخلايا Cell culture :-

تعتبر أول خطوة في عمل مزارع الخلايا هي عزل الخلايا المفردة وتتم عملية عزل الخلايا المفردة إما بالوسيلة الميكانيكية وإما أنزيمياً من الأعضاء النباتية وإما تؤخذ من نسيج كالوس نامي .

يلي هذه الخطوة زراعة الخلايا المفردة علي البيئة المناسبة ، وتعد طريقة برجمان من أكثر الطرق شيوعاً في زراعة الخلايا المفردة ويراعي في هذه الطريقة أن يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة .

وتتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا علي تركيز الهرمونات في بيئة النمو حيث انه قد يكون النمو متميز أي يتكون نموات خضرية أو جذرية أو كليهما أو قد يكون النمو غير متميز أي تتكون كتلة من الخلايا تسمى كالوس Callus .

وينتج الكالوس من أي نسيج نباتي متميز . بوضع الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا في بيئة تحتوي علي تركيز مرتفع من الأوكسين وتركيز منخفض من السيبتوكينين حيث يتكون الكالوس عند ذلك ويمكن أن يستمر في النمو إما علي صورة كتل متعددة الخلايا في البيئات الصلبة أو علي أشكال تجمعات صغيرة من الخلايا في البيئات السائلة .

ومع استعمال تركيز مرتفع من السيبتوكينين ومنخفض من الأوكسين فإنه يمكن أن تتكون الجذور والسيقان والأوراق .

تكوين الأجنة الجسمية في مزارع الخلايا:-

يجب توفر شروط معينة لتكوين الأجنة الجسمية في مزارع الخلايا وهذه الشروط تتعلق بمنظمات النمو وخاصة السيبتوكينينات ، والأوكسينات ، ومصدر النيتروجين فمثلاً في مزارع الجذور تتكون الكالوس عندما تكون البيئة في الأوكسين وعند نقل هذه الخلايا إلي بيئة ذات تركيز منخفض أو خالية من الأوكسين فإنه تتميز الأجنة الكاملة .

أما مصدر النيتروجين في البيئة فيكون في صورة مختزلة مثل كلوريد أمونيوم أو نترات بوتاسيوم .وتكوين الأجنة يتطلب حد أدنى من أيون الأمونيا داخل الخلايا ويتحقق ذلك بوجود تركيز منخفض من الامونيا أو تركيز مرتفع من النترات في البيئة ويجب توفير تركيز عالي من البوتاسيوم والأيزيد الأكسجين الذائب عن ٥,٥مليجرام /لتر لأن التركيز العالي يشجع تكوين الجذور.

أهمية مزارع الخلايا أو الأنسجة في تربية النبات :-

يمكن الاستفادة من مزارع الأنسجة أو الخلايا في تربية النبات كالتالي :-

يمكن الحصول علي الاختلافات الوراثية التي يحتاج إليها المربي في برامج التربية من مزارع الأنسجة فمثلاً:-

-تعتبر مزارع الخلايا مصدراً هاماً للطفرات التي تعتبر أحد مصادر التصنيفات الوراثية وذلك لأن كل خلية لها القدرة علي أن تصبح فرد جديد وبالتالي احتمالات الحصول علي طفرات يكون كبير .

ولقد لوحظت هذه الطفرات في مزارع محاصيل الخس،الثوم،الأرز،غيرها.

٢-يمكن عن طريق مزارع الأنسجة انتخاب نباتات مقاومة للأمراض والظروف البيئية الغير مناسبة فمثلاً:-

-أمكن انتخاب صنف طماطم يتحمل تركيزات مرتفعة من الملوحة كذلك أمكن انتخاب سلالات خلايا مقاومة للملوحة من مزارع الخلايا لعدة محاصيل مثل الفلفل ، البرتقال ، الأرز ، القلقاس .

-كذلك أمكن إنتاج سلالات مقاومة للفيروس من نبات الدخان من مزارع الخلايا .

مزارع المتوك culture Anther

تفيد مزارع المتوك في إنتاج نباتات أحادية Haploid من حبوب اللقاح إما من خلال تكوين أجنة أو من خلال تكوين الكالوس .

ما يراعى عند عمل مزارع المتوك :-

١ - يجب أن تؤخذ المتوك من نباتات حديثة الإزهار ويكون ذلك في مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة .

لذلك يفضل زراعة النباتات التي تؤخذ منها المتوك في ظروف متحكم فيها بيئياً ليتمكن الربط بين المظهر الخارجي للبرعم الزهري والمرحلة المناسبة لتكوين حبوب اللقاح .

٢ - يجب تطهير البراعم الزهرية المنتخبة بأحد المطهرات المناسبة ثم تفصل الأسدية كاملة (متك + خيط) وتوضع في طبق بتري معقم .

٣ - يجب ان تسحق أحد المتوك في صبغة أسيتوكارمن لإختبار مرحلة تكوينه فإذا كانت المرحلة مناسبة تفصل بقية المتوك عن الخيوط وتوضع أفقياً في بيئات زراعية .

٤ - يجب الحذر والحرص عند فصل وزراعة المتوك حتى لا تحدث أضراراً لها حيث أن تجريحها يؤدي إلي تحفيز تكوين كالوس من خلال جدر المتوك وهي خلايا ثنائية .

٥- يجب تحصين مزارع المتوك من الضوء لمدة ١٢ - ١٨ ساعة وعلي درجة حرارة ٢٨ ° م بالتبادل مع فترة ظلام مدتها ٦ - ١٢ ساعة علي درجة حرارة ٢٢ ° م ، بعد ٣ - ٨ أسابيع يبدأ تفتح المتوك وتحولها إلي اللون البني وذلك بسبب ضغط الكالوس المتكون من حبوب اللقاح علي المتوك أو بسبب النباتات الصغيرة التي تنمو فيها .

٦- تفصل النباتات المفردة أو النموات الخضرية المتكونة من الكالوس بعد أن يصل ٣ - ٥ سم وتنقل إلي بيئة مناسبة لتكوين الجذور ثم بعد ذلك تنقل النباتات التي تكونت جذورها إلي أصص صغيرة معقمة .

أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح :-

١ - ترجع أهمية هذه المزارع إلي الحصول علي نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية إما من خلال تكوين الأجنة أو تكوين الكالوس ويفيد ذلك في الآتي :-

أ - تستخدم النباتات الأحادية في الحصول علي نباتات ثنائية أصيلة من المحاصيل الخلطية التلقيح وذلك بمعاملتها بالكوليثيشين .

وذلك يوفر من ٦ - ٨ أجيال للتربية الذاتية .

ب - تفيد النباتات الأحادية في الحصول علي مختلف حالات التعدد الكروموسومي الغير تام .

٢ - تفيد مزارع المتوك في التعرف علي الطفرات المنتخبة بسهولة .

٣ - استخدمت مزارع المتوك في إنتاج أصناف محسنة لبعض المحاصيل في وقت قياسي مثل القمح - الأرز - الشعير .

٤ - إنتاج أصناف هجين من الهليون جميع نباتاتها مذكرة .

مزارع الأندوسبرم culture Endosperm :-

تفيد مزارع الأندوسبرم في إنتاج نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية حيث أن الأندوسبرم نسيج ثلاثي n^3 ينتج من اندماج إحدى الخليتين التتاسليتين لحبة اللقاح مع نواتا الكيس الجنيني . ويتم الحصول علي النباتات الثلاثية عن طريق تكوين براعم من الأندوسبرم مباشرة أو عن طريق الكالوس . ويجب ملاحظة أن الأندوسبرم الكامل النمو لا يصلح للزراعة لذلك يجب مراعاة عزل الأندوسبرم بعد مدة معينة من التلقيح وهي تختلف من نوع إلي آخر فمثلاً في الذرة ٨ - ١١ يوم وفي الأرز من ٤ - ٧ يوم . ومن النباتات التي تتجح فيها زراعة الأندوسبرم البقدونس - الأرز - الكمثرى .

التلقيح في مزارع المبايض والبويضات :-

يستخدم مصطلح *pollination in vitro* في جميع الحالات التي توضع فيها حبوب اللقاح مباشرة علي البويضات المفصولة في بيئة صناعية أو علي مياسم الأزهار التي فصلت ووضعت في بيئة صناعية أو علي البويضات التي فصلت من مشيمتها في بيئة صناعية .

تعريف مزارع البويضات :-

هي المزارع التي يتم فيها زراعة البويضات منفصلة أو نزع البويضات من المشيمة في بيئة صناعية *Ovule culture* .

مزارع المبايض :-

هي الخالة التي يتم فيها زراعة المياسم الأزهار في بيئة صناعية *Ovule culture* .

يتم خص الأمهات قبل تفتح الأزهار بيومين ثم تكتس وتجمع الأزهار المخصية بعد تفتحها بيوم أو اثنين حيث يزال الكأس والتويج ويغمس المتاع في كحول ٧٠% لمدة ثواني ثم يغسل جيداً بالماء المقطر ثم يزال الميسم والقلم وجدار المبيض وبذلك تبقى المشيمة والبويضات وقد تزرع البويضات الاثنتان معاً في حالة مزارع المبايض يزرع الميسم كاملاً .

يتم جمع متوك غير منفتحة من الآباء وتحفظ في طبق تيري معقم إلي أن تنفتح حيث تنقل حبوب اللقاح بحرص وتوضع علي البويضات المزروعة او علي المياسم أو المشيمة .

ويكون الهدف من هذه المزارع الحصول علي بذور مكتملة التكوين ونجحت هذه الطريقة مع الطماطم - الفاصوليا - الشليك .

أهمية مزارع المبايض والبويضات :-

- ١ - إنتاج نباتات أحادية من خلال التوالد الذاتي .
- ٢ - يتم التغلب علي حالات عدم التوافق الذاتي والخلطي في مزارع البويضات حيث يتم إزالة أنسجة المبيض الأمية المسؤولة عن عدم التوافق .
- ٣ - التغلب علي مشاكل العقم في بعض الهجن النوعية البعيدة .
- ٤ - الحصول علي بذور مكتملة التكوين .

مزارع الأجنة :- cultures Embryo :-

تفيد مزارع الأجنة في التغلب علي مشاكل الإخصاب في التلقيحات البعيدة ويتحكم في نجاح مزارع الأجنة عاملان هما :-

- ١ - عملية فصل الأجنة الصغيرة
 - ٢ - تحديد بيئة الزراعة المناسبة
- كما يجب فصل الأجنة قبل أن تبدأ في التدهور والاختفاء كما في حالات الهجن النوعية البعيدة التي يحدث بها عدم توافق بين الجنين النامي والأندوسبيرم ، وتحدد مرحلة فصل الجنين المناسبة بعدة أيام من التلقيح .
- ونظراً لأن الأجنة تكون محاطة بأنسجة المبيض لذا فإنها لا تكون عرضة للتلوث ولا تحتاج إلي تعقيم ويكتفي بتطهيرها سطحياً .

وعملية فصل الأجنة تحتاج إلي مجهر حتى تتم عملية الفصل بدقة .

ثم تزرع هذه الأنسجة في البيئة المناسبة حتى يكتمل نموها بعد الزراعة ثم تنمو بعد ذلك إلي نباتات صغيرة تنقل بعناية إلي أصص معقمة .

ولقد أمكن زراعة أجنة بعض الهجن النوعية للجنس Brassica حيث تم حصاد مبايض الأزهار الملقحة في الوقت المناسب وتعقم ثم بعد ذلك تقطع طولياً ثم تنقل إلي بيئة مغذية علي جهاز هزاز حيث أدت الحركة الدائمة للبيئة المغذية إلي خروج عدد من الأجنة من مبايض الأزهار .

أهمية مزارع الأجنة :-

- ١ - إمكانية الحصول علي الهجن البعيدة التي يستحيل الحصول عليها أو إنتاجها بالطرق العادية مثل هجن أجناس الفاصوليا ، الكرنب ، الطماطم .
- ٢ - إنتاج النباتات الأحادية بسبب الاستبعاد الكروموسومي الذي يحدث أحياناً بعد التهجينات البعيدة ، ثم يقوم المربي بمضاعفة الكولوشيسين فيتجمع لديه عدد كبير من النباتات الأصلية المختلفة وراثياً وبالتالي يمكن الانتخاب لأفضلها ليصبح صنف جديد .
- ٣ - تقصير دورة التربية وذلك بالتخلص من حالات سكون البذرة التي قد تمتد إلي شهور .
- ٤ - إكثار بعض النباتات التي لا تنبت بذورها .

مزارع البروتوبلاست :- Protoplast culture :-

تعرف مزارع البروتوبلاست علي انها زراعة الخلايا بدون جدرها الخلوية.

تفيد مزارع البروتوبلازم في عملية دمج البروتوبلازم Protoplasm fusion عند الرغبة في إجراء تهجينات نوعية بعيدة وكذلك عملية إدخال أجزاء غريبة من DNA أو بكتريا أو فيروسات معينة في الهندسة الوراثية حيث يتم عزل البروتوبلازم عن الجدر الخلوية ويزرع في بيئة مناسبة ويتم هذا بواسطة أنزيم السليوليز الذي يحفز من مزارع الفطر .

تعد الأوراق الحديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلازم حيث يظهر النسيج النباتي المستعمل سطحياً ثم تسلخ بشرة الورقة أو يقطع الجزء النباتي إلي أجزاء صغيرة ويوضع في محلول الأنزيمات ويفضل أن تكون المعاملة بالأنزيمات الهاضمة تحت تفريغ لإسراع عملية تحلل الأنزيمات بين الخلايا وتستمر المعاملة بالأنزيمات ٢/١ ساعة إلي ساعة . ثم تزرع علي البيئة الملائمة ويفضل أن تكون سائلة وتظهر الجدر السليوزية حول البروتوبلازم بعد ٢ - ١٤ يوم . ونجحت هذه الطريقة في العائلة الباذنجانية كالفلفل - الباذنجان - البطاطس .

أهمية مزارع البروتوبلازم :-

- ١ - يمكن الاستفادة منها في الإكثار وعزل السلالات الفطرية .
- ٢ - دمج بروتوبلازم الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها وهو يعد وسيلة فعالة لإجراء التهجينات البعيدة .
- ٣ - إدخال صفة العقم الذكري السيتوبلازمي في النباتات .
- ٤ - الحصول علي نباتات وراثية يمكن الاستفادة منها في تحسين النباتات وخصوصاً العقيمة منها .
- ٥ - إدخال أجزاء من DNA أو البكتريا أو الفيروسات في الهندسة الوراثية .

تعريف البروتوبلاست :-

هو عبارة عن خلايا منزوعة الجدر السليوزية إما عن طريق الأنزيمات (Cellulase) أو بطرق أخرى .

مزارع القمة الخضرية المرستيمية :-

يستفاد منها في إنتاج نباتات خالية من الفيروس ويعد ذلك أمر بالغ الأهمية في المحاصيل خضرية التكاثر والتي ينتقل فيها الفيروس تلقائياً مع الأجزاء الخضرية المستخدمة في التكاثر .

وبالرغم من أن النباتات قد تكون مصابة جهازياً بالفيروس إلا أن القمة المرستيمية تكون خالية غالباً أو تحتوي علي عدد قليل جداً من الفيروسات وذلك للأسباب التالية :-

- ١ - خلو القمة المرستيمية من الأنسجة الوعائية التي يكون انتقال الفيروس فيها سريع .
- ٢ - يكون النشاط الأيضي في القمة المرستيمية غالباً بدرجة يقل معها تكاثر الفيروس .
- ٣ - نظم المقاومة لتكاثر الفيروس تكون أعلي في الأنسجة المرستيمية عن أي نسيج آخر .
- ٤ - التركيز العاليي للأوكسين في القمم النامية يثبط نشاط الفيروس .

ولهذه الأسباب فإن زراعة القمم المرستيمية تؤدي إلي إنتاج نباتات خالية من الفيروس .

ويكون طول القمة المرستيمية ٢٥٠ ميكرون وعرضها ١٠٠ ميكرون ولصعوبة فصل هذه القمة فإنه تستعمل القمة النامية كلها .

ويطلق علي المزارع في هذه الحالة shoot Tip Culture

وتعطي هذه المزارع أيضاً نباتات خالية من الفيرس في أغلب الأحيان .

والذي يحدد مستويات النجاح في هذه العملية هي الدقة في فصل القمة النامية بدون الأضرار بها وكذلك في اختيار البيئة المناسبة للزراعة التي يجب أن تكون محفزة لتكوين الجذور والأوراق من القمم المزروعة .

ملحوظة :-

البيئة الصلبة تشجع تكوين الكالوس وهو أمر غير مرغوب في هذه المزارع ويجب ملاحظة أنه كلما زاد حجم القمة المرستيمية كلما زادت فرصة تمييز نباتات منها أما القمة المرستيمية الصغيرة فإنها تنتهي بتكوين بذور وكالوس فقط وقد لا تتكون جذور .

وعلي ذلك فالقاعدة العامة هي أن تكون القمم المرستيمية صغيرة بحيث تكون نباتات خالية من الفيروس وكبيرة بحيث تسمح بإعطاء نباتات كاملة

من ضمن فوائد زراعة القمة النامية (القمة الخضرية) Apical . M . T . C

الإكثار الخضري السريع للنباتات الممتازة لإجراء التجارب عليها أو بيعها في الأسواق .

مزارع الإكثار الدقيق :-

يستفاد من مزارع الإكثار الدقيق في إنتاج سلالات خضرية تحتوي علي عشرات الآلاف من النباتات الصغيرة خلال فترة وجيزة .

ويفضل دائماً استخدام القمة المرستيمية لأنها تكون خالية من الفيرس كما يجب استخدام أجزاء صغيرة من ساق النبات تحتوي كل منها علي عقد وبرعم جانبي وذلك كلأن البراعم الجانبية المفصولة من الأشجار لا تنمو بمفردها لذلك فإن النسيج الأمي الموجود معه يساعده علي النمو . كما أن البراعم الجانبية تتحمل التعقيم عن البراعم الطرفية .

ويحدث الإكثار الدقيق في المزارع بوحدة من ثلاث طرق :-

١ - من خلال الكالس :-

متعد هذه الطريقة من أسرع طرق الإكثار الدقيق إلا أن هذه الطريقة غير مفضلة للأسباب التالية :-

أ - لأن الكالس غير ثابت وراثياً حيث تظهر به حالات مختلفة من التضاعف الكروموسومي .

ب - لم يتميز الكالس إلي نموات نباتية في العديد من المحاصيل الهامة .

٢ - من خلال تكوين البراعم العرضية :-

يقصد بالبراعم العرضية تلك البراعم التي تتكون مباشرة من العضو النباتي دون أن يفصل بينها نسيج كالوس .

وتتكاثر أعداد كبيرة من المحاصيل الاقتصادية بهذه الطريقة .

٣ - من خلال تحفيز التفرع الجانبي :-

يتم تحفيز التفرع الجانبي في المزارع بتوفير السيتوكينين بها بتركيز معين إما مع الأكسين أو بدونه حيث يؤدي توافر السيتوكينين بالمزرعة إلي نمو البراعم الجانبية التي تكون في القمم المرستيمية التي تنمو من البراعم المزروعة ثم تنمو البراعم الجانبية التي تكون في القمم المرستيمية الجديدة وهكذا . ويؤدي استمرار هذه العملية لعدة مرات إلي تكوين كتلة من النموات الجديدة .

ثم يلي ذلك نقل هذه النموات إلي بيئة أخرى تختلف في مكوناتها الهرمونية حتى تتم عملية التجذير وبع تكوين الجذور تنتقل هذه النباتات إلي أصص معقمة بحرص تام ويجب رعايتها تماماً حتي يتم نقلها إلي البيوت المحمية .

بعض التعريفات الهامة في مجال زراعة الأنسجة

١ - زراعة المتوك (حبوب اللقاح) والبويضات :- Pollen, Anther and ovule culture

الهدف منها الحصول علي نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية يطلق عليها Haploid وهذه النباتات تفيد في المجالات التالية :-

١ - الحصول علي نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية نقية وثابتة وراثياً وذلك بمضاعفة النباتات ال Haploid باستخدام الكوليكتيسن وهذا يوفر الوقت والجهد (١٢ عام علي الأقل) المبذول في الطرق العادية .

٢ - استعادة بعض النباتات الهجين التي بها نسبة من العقم الذكري لخصوبتها (كما في بعض نباتات الأرز)

٣ - تستخدم مزارع المتوك في إنتاج أصناف هجين من الهليون جميع نباتاتها مذكرة فقط .

٤ - انتخاب الطفرات المنتخبة والتي تغطي بالجين السائد في النباتات الخلطية .

٥ - يمكن عمل الخريطة الكروموسومية مباشرة حيث يمثل النبات الأحادي جاميطة واحدة .

٦ - إنتاج نباتات لها سيتوبلازم خاص وذلك بزراعة النباتات التي تحتوي علي سيتوبلازم .

٢ - نباتات أحادية المجموعة الصبغية :- Haploid plants

تتميز بأنها (n) أي بها نصف العدد الكروموسومي ويتم الحصول عليها من زراعة المتوك أو حبوب اللقاح .

وتفيد هذه النباتات في مجال تربية النباتات حيث عن طريقها :-

١ - يتم الحصول علي نباتات خالية من الأمراض وخاصة الفيروسية .

٢ - يتم الحصول علي نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية نقية وثابتة وراثياً .

٣ - معلق الخلايا :- suspension Cell

وهو عبارة عن زراعة الخلايا المراد إجراء تجارب عليها في بيئة سائلة مما يسهل زراعة هذه الخلايا أو حقنها داخل أي كائن حي .

٤ - Batch culture

يقصد به زراعة بعض الأجزاء النباتية في حجم ثابت في بيئة الزراعة .

٥ - زراعة الكالوس : - culture Callus

الكالوس :- هو عبارة عن تجمع بروتوبلازمي من خلايا غير مميزة أو غير مشكلة (أي توجد جذور وسيقان وأوراق) [غير منتظمة] .

فوائد استخدام زراعة الكالوس :-

أ - يعتبر الكالوس مصدر للاختلافات الوراثية الكروموسومية التي تزيد بزيادة عمر مزرعة الكالوس .

ب - انتخاب نباتات مقاومة للملوحة بتعريض الكالوس إلي المؤثرات المختلفة .

ج - الحصول علي نباتات خالية من الفيروس .

د - استخلاص بعض المواد الخاصة بصناعة الأدوية أو الصناعات الغذائية كمستخلص نبات الفلفل الأخضر .

هـ - يستخدم في الإكثار الخضري السريع للنباتات المنتخبة حيث أن زراعة الكالوس يعطي عدد كبير من النباتات في وقت قصير .

ما يراعي عند إنتاج الكالوس :-

١ - مراعاة الدقة عند استخدام الجزء النباتي المستخدم .

٢ - توفير البيئة المناسبة والظروف البيئية المناسبة لزراعة الكالوس .

٣ - مراعاة الدقة في عزل والمحافظة علي الكالوس للتجارب الأخرى .

٦- زراعة الخلايا : - culture Cell :-

هي عبارة عن زراعة الخلية في معلق الخلايا علي بيئة مناسبة في طبق بتري وتنمية هذه الخلية .

٧ - إنصهار أو إندماج البروتوبلاست : - Protoplast fusion

وذلك يفيد في إنتاج هجين من خلال التهجينات بين الأنواع النباتية البعيدة وراثياً أي لا يتم بينها تلقيح وإخصاب في الطبيعة ويسمي الهجين الناتج (Somatic hybrids) ، (Vegetative hybrids) ، (Cybrides) ويتم ذلك بنزع الجدر السليلوزية .

٨ - نقل الجينات : - Transf Gene

عبارة عن نقل جين حامل لصفة معينة في السلسلة الكروموسومية إلي نبات آخر ممتاز في صفاته ولكن ينقصه هذه الصفة ويتم ذلك من خلال الهندسة الوراثية حيث يتم نقل جين من كائن حي إلي كائن حي آخر وتعتبر هذه العملية سلاح ذو حدين .

٩ - Somaclonal variation

يقصد به الاختلافات الموجودة ببعض النباتات النامية من خلايا جسمية علي بيئات زراعة الأنسجة .

١٠ - زراعة الأجنة :- culture Embryo

زراعة الأجنة تفيد في الحالات التي يفشل فيها الجين في الإنبات والنمو وتتم زراعتها علي بيئات مناسبة غذائية لاستكمال نموه وإعطاء نباتات كاملة وحدث ذلك في بعض أصناف الطماطم .

١١ - تخليق الأجنة :- genesis Embryo

تفيد في الحالات التي يفشل فيها الإنبات نتيجة عدم تكوين الإندوسبيرم أو الأوراق الفلقية المحتوية علي الغذاء اللازم لنمو الجين .

مثل الهجين الناتج من نبات الراي والشعير حيث وجد أن أجنة هذا الجين لا تستطيع الإنبات والنمو وتم زراعتها علي بيئات غذائية مناسبة وأمكن الحصول منها علي نباتات كاملة .

١٢ - تخليق الأعضاء النباتية :- Organo genesis

يقصد بها الحصول علي نباتات كاملة مميزة من زراعة خلية أو أي نسيج نباتي آخر ، وتفيد في حالة إكثار النباتات التي لا تنتج بذور . وذلك من خلال تنمية أحد الخلايا علي بيئة غذائية مناسبة تحتوي علي التركيز المناسب من الأوكسين والسبتوكاينين بحيث يسمح هذا التركيز بنمو أو تكوين كلاً من المجموع الجذري والمجموع الخضري حيث أن :-

زيادة تركيز السبتوكاينين في البيئة تؤدي إلي تكوين مجموع خضري فقط .

زيادة تركيز الأوكسين في البيئة تؤدي إلي تكوين مجموع جذري فقط .

الخلايا التي لها القدرة علي إعطاء جذور وسيقان تتميز بالآتي :-

١ - السيتوبلازم بها مركز .

٢ - كبر حجم حبيبات النشا .

٣ - الخلايا بها نواة كبيرة الحجم عن النواة الموجودة في الخلية العادية .

١٣ - الإخصاب في أنابيب :- pollination in vitro

للتغلب علي مشاكل الإخصاب المتعلقة بوجود عائق في الميسم بوضع البويضات مع حبوب اللقاح .

١٤ - الحصول علي نباتات خالية من الأمراض :- Apical culture to obtained diseases free plants

الحصول علي نباتات خالية من الفيروسات والأمراض من الأشياء الهامة عند تقييم النباتات قبل عمل التهجينات لمعرفة صفاتها التي قد تختفي نتيجة الإصابة للفيروس أو الأمراض .