Sohag University
Faculty of Agriculture
Department of Genetics

جامعة سوهـــــاج
كليــة الزراعـــــــــة
قسم الوراثـــــــة

المحاضرة التاسعة

زراعة الانسجة والتكنولوجيا الحيوية

المستوي الثالث برنامج التكنولوجيا الحيوية

اعداد

د. احمد يوسف محمد
قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة سوهاج

الهجن السيتوبلازمية Cytoplasmic hybrids (Cybrids)

تحتوي الهجن الناتجة من التهجين الجنسي علي سيتوبلازم أحد الأبوين فقط (النبات الأم)، بينما تحتوي الهجن السيتوبلازمية علي خليط من سيتوبلازم كلا الأبوين. وبذلك فإن طريقة التهجين بين الخلايا الجسمية (التهجين الخضري) تسمح بدراسة التفاعل بين سيتوبلازم الأبوين. وتعرف الهجن السيتوبلازمية علي أنها هجن تحتوي علي سيتوبلازم خليط من كلا الأبوين ونواة أب واحد فقط . وبالرغم من ذلك ، فقد أظهرت نتائج تحليل المادة الوراثية الخاصة بالبلاستيدات أن كل هجين سيتوبلازمي يحتوي علي طراز واحد فقط من البلاستيدات (من أحد الأبوين) ولم يتم الحصول علي هجن سيتوبلازمية محتوية علي بلاستيدات كلا الأبوين.

طرق الحصول علي الهجن السيتوبلازمية:

١. اندماج بروتوبلاست طبيعي وآخر منزوع النواة.

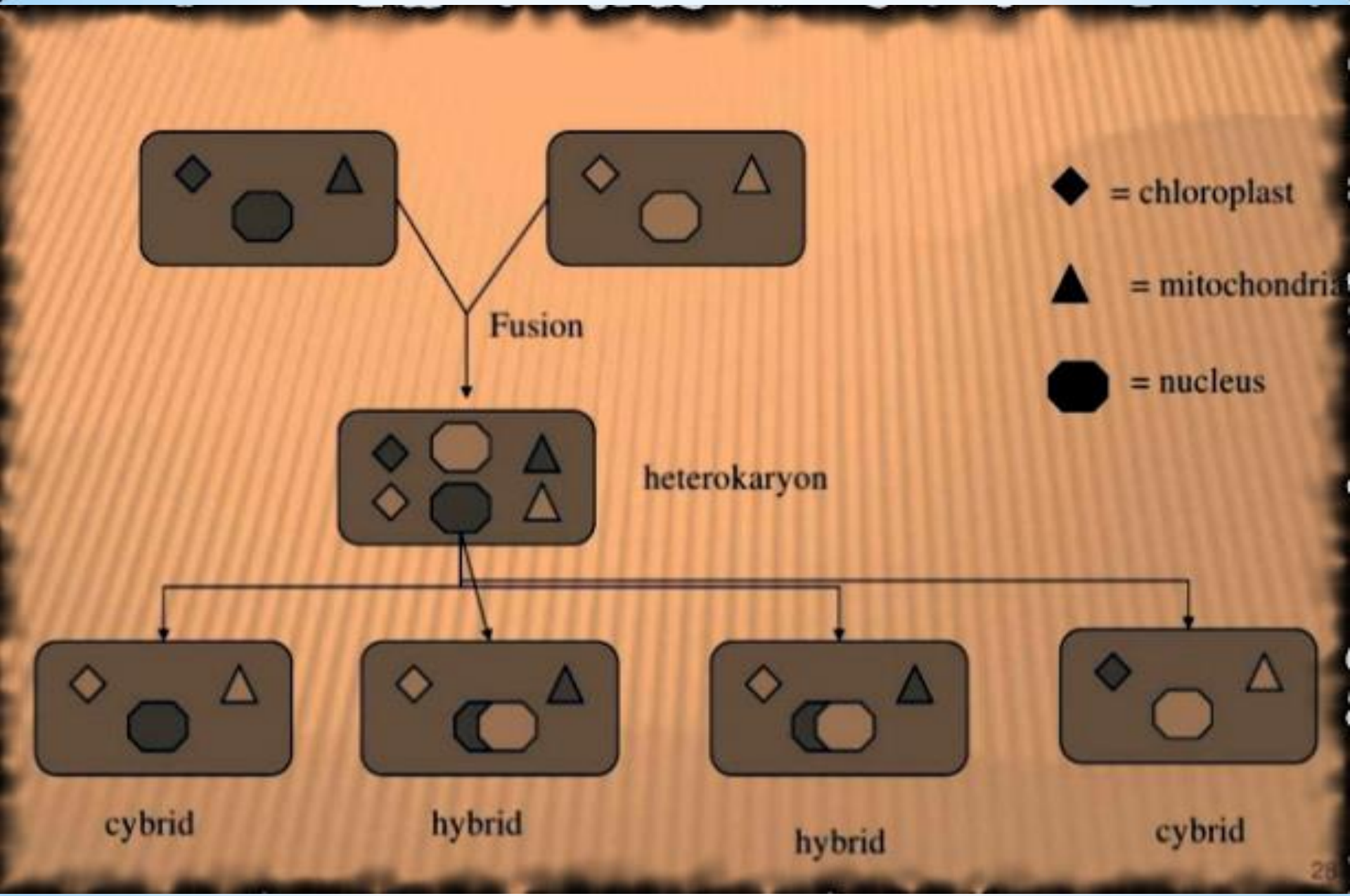
٢. اندماج بروتوبلاست طبيعي وآخر محتوي علي نوات غير حية.

٣. استبعاد أحد الأنوية بعد الحصول علي بروتوبلاست هجين.

٤. الأستبعاد الأنتخابي للكروموسومات في المراحل المتأخرة بعد الأندماج.

وعامة فيفضل استخدام طريقة اندماج بروتويلاست منزوع النواة ، حيث يحدث نزع لنواة البروتوبلاست المحتوي علي صفات سيتوبلازمية مرغوبة والبروتوبلاست الكامل (المحتوي علي نواة) من الأب الآخر. ويمكن الحصول بروتوبلاست منزوع النواة من بروتوبلاست متعادل الأسموزية في محلول 50%-5% بيركول عن طريق الطرد المركزي فائق السرعة (20000- 40000 لفة في الدقيقة).

لوحظ عند حدوث اتحاد بين خلايا البروتوبلاست المختلفة تكون مجموعة من الإحتمالات الممكنة التي قد تكون هجن خضرية (Somatic hybrids) أوهجن سيتوبلازمية (Cybrids)وكلاهما محتوي علي توليفات مختلفة من المكونات السيتوبلازمية .


= chloroplast
= mitochondria
= nucleus
Fusion
heterokaryon
cybrid
hybrid
hybrid
cybrid

المشاكل التي تحد من إستخدام دمج البروتوبلاست بهدف التحسين النباتي:

١. غياب الطريقة الفعالة في انتخاب الهجن الناتجة من اتحاد البروتوبلاست.

٢. عدم توازن النواتج النهائية بعد الإندماج ، مثل ظهور العقم والتشوه وعدم الثبات وبالتالي عدم الحيوية خاصة إذا كانت الآباء المشتركة في التهجين متباعدة تقسيمياً.

٣. حدوث بعض التغيرات والشذوذات الوراثية مثل نقص عددي للكروموسومات أو تعدد ناقص أو تغيرات في تركيب الكروموسومات أو أختلافات ناتجة من ظروف مزارع الأنسجة أو أنعزال لمكونات السيتوبلازم .

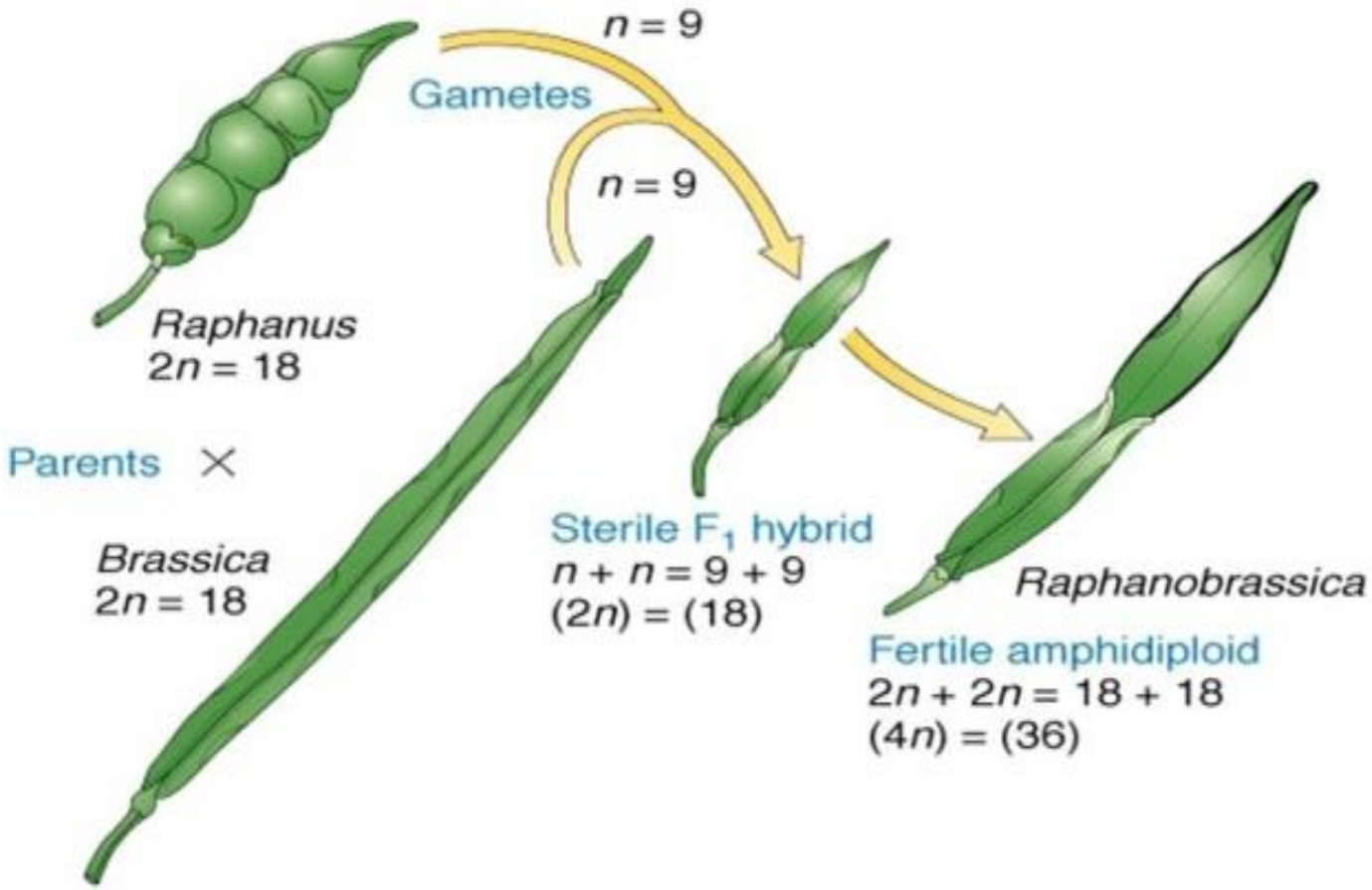
٤. ضعف الثبات الوراثي للخلايا الهجينة أثناء النمو وتكوين الكالوس.

٥. ندرة إمكانية الحصول علي نبات كامل ناتج من اتحاد البروتوبلاست، إلا في أنواع نباتية قليلة.

٦. فرصة الحصول علي الهجن السيتوبلازمية قليلة جداً ومحصورة في تهجينات معينة .

٧. في حالة نجاح التهجين الخضري بين نوعين غير متوافقين طبيعياً ، فإن الهجن الناتجة تميل بشدة إلي استبعاد كروموسومات أحد الأبوين في الأجيال المتتالية.

٨. التهجين بين نباتين ثنائيين ينتج عنه نبات (amphidiploids) غير مرغوبة في برامج التربية ويمكن التغلب على ذلك بتهجين خلايا أحادية.


n = 9
Gametes
n = 9
Raphanus
2n = 18
Parents ×
Brassica
2n = 18
Sterile F1 hybrid
n + n = 9 + 9
(2n) = (18)
Raphanobrassica
Fertile amphidiploid
2n + 2n = 18 + 18
(4n) = (36)

الإكثار الخضري الدقيق Micropropagation

يعرف الإكثار الخضري الدقيق علي إنه عبارة عن تقنية خاصة بزراعة الإنسجة الهدف منها هو انتاج أعداد كبيرة من نسخ متطابقة من نبات معين باستخدام جزء نباتي من النبات الأم (المصدر). وأبسط طريقة لعمل الإكثار الخضري الدقيق هو استخدام نسيج ميرستيمي من نبات ناضج ، حيث يتم فصله وزراعته تحت ظروف معقمة في بيئة غذائية مناسبة تحتوي علي العناصر المعدنية والفيتامينات الأساسية وتوليفة مناسبة من منظمات النمو. تعمل منظمات النمو كما سبق الذكر علي استحثاث النسيج المنزرع وتساعد علي تكشف الأعضاء والأنسجة المرغوب الحصول عليها. وفي الغالب يتم في البداية دفع الأجزاء النباتية إلي تكوين سوق shoots ثم فصلها ونقلها لبيئة تجذير حيث تتكون مناشئ الجذور وينموالنبات بالكامل. وتكون جميع النباتات الناتجة منماثلة وراثيا وتشبه النبات الأم.

وللإكثار الخضري الدقيق ميزه فعالة في إمكانية انتاج العديد من النباتات متماثلة التركيب الوراثي في فترة زمنية قصيرة جداً بالمقارنة بالطرق التقليدية للإكثار الخضري . بالإضافة إلي ما لها من ميزة في التحول الوراثي عن طريق مضاعفة وإكثار النباتات الناتجة من عملية التحول الوراثي ونقل الجينات. تم تطبيق تقنية الإكثار الخضري الدقيق في العديد من النباتات ، أكثرها نباتات الزينة . ولكن تطبق التقنية الآن بشكل روتيني في إكثار الكثير من محاصيل الحقل الهامة وأشجار الفاكهة.

التحول الوراثي Genetic transformation :

تعرف عملية التحول الوراثي علي أنها إدخال وحشر تتابع المادة الوراثية الخاص بالجين المنضاعف (المرغوب نقله) داخل جينوم العائل ، بهدف دفعه للتعبير عن نفسه وإنتاج البروتين المرغوب. ومن المهم جداً أن تتم عملية الحشر داخل الكروموسومات النباتية للعائل ، وذلك اضمان إنتقاله من الخلايا المتحولة إلي باقي خلايا النسيج الناتج عبر الإنقسام الميتوزي أثناء النمو، وفي هذه الحالة يطلق علي التحول الوراثي بإنه ثابت (Stable transformation) ، وهذا يعني أن الخلايا المتحولة (التي نجحت في استقبال الجين الغريب) يمكن أن تتكشف وتنتج نبات كامل تحتوي كل خلية منه علي الجين المرغوب.

أما في حالة عدم حشر الجين في كروموسومات النبات فبإمكانه التعبير عن نفسه أيضاً ولكن لفترة زمنية محدوده فيما يعرف بالتحول الوراثي العابر أو المؤقت (Transient transformation).

أهمية تقنية الإكثار الخضري الدقيق :

١. إكثار النباتات التي يصعب إكثارها بالطرق التقليدية (خضرياً) مثل نبات الأوركيد Orchid .

٢. إكثار النباتات التي تأخذ وقت طويل جداً في برامج التربية، خاصة النباتات مفتوحة التلقيح كالأشجار وتعتبر وسيلة لمنع حدوث الاختلافات الوراثية غير المرغوبة الناتجة من التلقيحات الخلطية.

٣. إكثار النباتات المصابة بأمراض معينة يصعب التخلص من المرض وإنتاج نباتات خالية من الأمراض والحفاظ علي الأصول الوراثية للنبات.

تطبيق تقنية الإكثار الخضري الدقيق علي المستوي التجاري:

تستخدم تقنية الإكثار الخضري الدقيق علي المستوي التجاري في إكثار العديد من النباتات وإنتاج أعداد هائلة متجانسة في وقت قصير. وحيث أن ما يستخدم من النبات الأصلي أجزاء صغيرة فهذا يعني أن النبات المصدر سيظل باق دون إلحاق أي ضرر به. وغالباً ما تكون الأجزاء المستخدمة عبارة عن قمم نامية أو براعم جانبية أو أجزاء من الأوراق والسوق والجذور. وبعد الحصول علي الأفرع الخضرية يتم تجديد المزرعة Subculture بهدف مضاعفة أعداد النباتات الناتجة. ويعتبر انتاج النباتات علي المستوي التجاري من تقنية الإكثار الخضري الدقيق عملية مكلفة ومجهدة وتحتاج في البداية لخبرة حتي يتم الحصول علي نظام إنتاجي تجاري يعمل بشكل روتيني. وبالرغم من التكلفة العالية لهذه التقنية مقارنة بطرق الإكثار التقليدية ، إلا أن هناك بعض النقاط التي تعوض التكلفة وتجعلها فعالة ومنها:

١. سرعة عملية الإكثار: حيث يمكن الحصول علي أعداد ضخمة من النباتات في وقت قصير جداً.

٢. إكثار النباتات مرتفعة السعر: مثل الأوركيدات ونباتات الزينة وبعض النباتات النادرة يعطي لها قيمة.

٣. إمكانية تخزين النباتات ونقلها من مكان لمكان بسهولة.

٤. العائد السريع من عملية الإكثار يعوض التكلفة.

وتستخدم التقنية في إكثار العديد من النباتات علي المستوي التجاري لإنتاج نباتات لها صفات زراعية إقتصادية هامة مثل الإنتاجية العالية وصفات الجودة وتحمل الإجهادات البيئية ومقاومة الآفات والأمراض. ومن أمثلة النباتات التي يتم إكثارها علي المستوي التجاري في العالم : الموز – نخيل الزيت – نخيل البلح – الأوركيد – نباتات الزينة – نخيل جوز الهند.

الخطوات العامة لتقنية الأكثار الخضري الدقيق

تتم عملية الإكثار الخضري الدقيق إما بشكل مباشر فيما يعرف بالـ Direct organogenesis أو بشكل غير مباشر عنطريق المرور بالكالس أولاً. وتستخدم في ذلك الهرمونات النباتية في صورة توليفات من الأوكسين والسيتوكاينين. وعامة تتلخص خطوات تقنية الإكثار الخضري الدقيق في أربعة نقاط :

١. مرحلة البدء (التوطيد) Establishment stage :

يتم فيها اختيار الجزء النباتي المستخدم في الزراعة (Explant) وفصله من النبات المصدر وتعقيمه بطرق مناسبة ثم زراعته علي بيئة غذائية صلبة تحت ظروف مناسبة. والهدف من هذه الخطوة هي تمهيد للجزء النباتي وتجهيزه لكي يستعد للمراحل التالية.

٢. مرحلة الإكثار (التضاعف) Multiplication stage :

ينقل الجزء النباتي النامي من بيئة البدء إلي بيئة أخري تدفعه إلي تكوين أفرع خضرية. وغالباً ما تحتوي البيئة علي مستويات عالية من السيتوكاينين منفرداً أو مع نسبة ضعيفة من الأوكسين. وفي معظم الأحيان يتم تكرار هذه المرحلة عدة مرات عن طريق تجديد المزرعة Subculture للجزء النباتي الأساسي، كما يمكن تقسيم الأفرع الخضرية الحديثة واستخدامها كأجزاء نباتية مما يساعد في مضاعفة العدد المتحصل عليه من النباتات.

٣. مرحلة التجذير Rooting stage :

يتم نقل الأفرع الخضرية بعد فصلها من الجزء النباتي وزراعتها علي بيئة غذائية تحتوي علي تركيزات من الأكسين لدفعها لتكوين جذور عرضية. ويختلف مستوي ونوع الأوكسين المستعمل في البيئة علي حسب النبات المستخدم. وهناك بعض النباتات سهلة التجذير والتي لا تحتاج لإضافة أكسين للبيئة بالمرة. وغالباً ما يتم تحضين زراعات التجذير في الإظلام لفترة معينة لتشجيع تكوين الجذور. ومن المعروف أن عملية تكوين الجذور تحتاج في البداية إلي تركيز عال من أكسين قوي وذلك لتشجيع خروج مناشئ الجذور ولكن يجب عندها نقل الأفرع الخضرية علي بيئة غذائية أخري بها تركيز منخفض من الأكسين أو بيئة خالية من الأوكسين حتي تتم استطالة الجذور. ويمكن الاستغناء عن عملية استبدال البيئة الغذائية عن طريق استعمال أكسين حساس للضوء مثل أندول حمض الخليك IAA الذي يتم استخدامه بتركيز مرتفع مع التحضين في الإظلام مما يشجع خروج مناشئ الجذور يتم بعذها تحضين نفي البيئة في الضوء فيتكسر الأوكسين وتستطيل الجذور مباشرة.

٤. مرحلة الأقلمة Acclimatization stage :

يتم إخراج الأفرع الخضرية المحتوية علي جذور جيدة من البيئة الغذائية وزراعتها في تربة معينة. ويفضل في البداية غسيل الجذور جيداً للتخلص من آثار البيئة الغذائية وغمسها أيضاً في مضاد فطري مناسب لتجنب نمو الفطريات ثم الزراعة مباشرة في تربة مناسبة، في الغالب تكون خليط من الرمل والبيتموس والطمي. ويجب معاملة النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة معاملة خاصة لأنها تكون في البداية ضعيفة وليس لها القدرة علي تحمل البيئة الخارجية مباشرة. كما يجب أن يتم ري النباتات في البداية بمحلول مغذي (هوجلاند-١ أو ٠.٢٥ تركيز بيئة MS). كما يفضل في البداية تغطية النباتات بعد زراعتها في التربة بأكياس أو أغطية بلاستيكية شفافة لتوفير قدر كاف من الرطوبة . كما يمكن استعمال رزاز الماء في ذلك. يجب أن تتم عملية الأقلمة بحرص وتدريجياً لضمان عدم فقد النباتات ، إلي أن تصل النباتات للزراعة في الحقل.

مثال : الإكثار الخضري الدقيق في الجوافة:

من المعروف أن نبات الجوافة من النباتات مفتوحة التلقيح وبالتالي يحدث إنعزالات وراثية أثناء تكوين حبوب اللقاح والبويضات. وحيث أن الطريقة الشائعة في إكثار الجوافة تتم عن طريق زراعة البذور فهذا يعني عدم تجانس النسل واختلاف صفاته عن النبات الأم. لذا كان الحل البديل هو استخدام الإكثار الخضري ، والطرق التقليدية من الإكثار الخضري كالتطعيم وإنتاج العقل والترقيد وغيرها تكون صعبة في الجوافة وتحتاج لخبرة بالإضافة للعدد المحدود من النباتات المتحصل عليه . لذلك فإن تقنية زراعة الأنسجة كانت هي الحل الأمثل لإكثار الطرز الجيدة من أشجار الجوافة والتي تمتلك صفات الجودة.

تكوين الأجنة الخضرية Somatic embryogenesis

تمتلك الخلية النباتية القدرة علي التطور والتكشف تحت ظروف معينة لتتحول في النهاية لنبات كامل فيما يعرف بالـ Totipotency . ومن ضمن التعبيرات المختلفة لقدرة الخلية النباتية علي التكشف ، هو القدرة علي التحول والتكشف للأجنة Embryos التي يمكن إنتاجها من خلايا مفردة من الأنسجة الجسمية أو من مزارع الكالس. ويطلق علي عملية تكوين الأجنة الخضرية من الخلايا الجسمية اسم Somatic embryogenesis . ويمكن تنمية الأجنة الناتجة معمليا لتمر بعملية الإنبات والتكشف وتتحول إلي نبات كامل. ظهر أول وصف لإنتاج أجنة خضرية عام ١٩٥٨ من العالم Steward وكان علي نبات الجزر. ومنذ ذلك الوقت بدأ تطوير وعمل العديد من البروتوكولات الخاصة بإنتاج الأجنة الخضرية في العديد من النباتات.

تكشف النباتات عن طريق تكوين الأجنة الخضرية:

عادة ما يتم اكثار النباتات عن طريق الأجنة الزيجوتية التي تنتج من التلقيح والإخصاب لحبة اللقاح والبويضة ليتكون الجنين ويتطور ثم يكون قادر علي الإنبات وتكوين النبات الكامل ، وتعرف هذه العملية بتكوين الجنين الزيجوتي Zygotic embryogenesis التي تمثل نقطة البداية في دورة حياة النبات. لا يقتصر تكوين الأجنة في النبات علي إخصاب حبة اللقاح للبويضة، ويمكن أن تتكون الأجنة خضرياً بصورة طبيعية من خلال نمو البويضات غير المخصبة أو من نمو نسيج الكيس الجنيني للبويضة وفي هذه الحالة تتكون أجنة خضرية متماثلة مع النبات الأم مثل ما يحدث في نبات المانجو.

ومن خلال تقنية زراعة الأنسجة يمكن انتاج الأجنة الخضرية من خلية واحدة أو مجموعة خلايا جسمية ، كما يمكن تكوين أجنة أحادية ناتجة من زراعة حبوب اللقاح غير الناضجة . وفي جميع الحالات يجب استخدام توليفة خاصة من منظمات النمو وبعض المعاملات اللازمة لإنتاج الأجنة وتكشفها. وتتحكم طبيعة النسيج المستخدم وظروف الزراعة في تكوين الأجنة الخضرية إما بشكل مباشر من خلايا مفردة أو بصورة غير مباشرة عن طريق انتاج الكالس الجنيني .

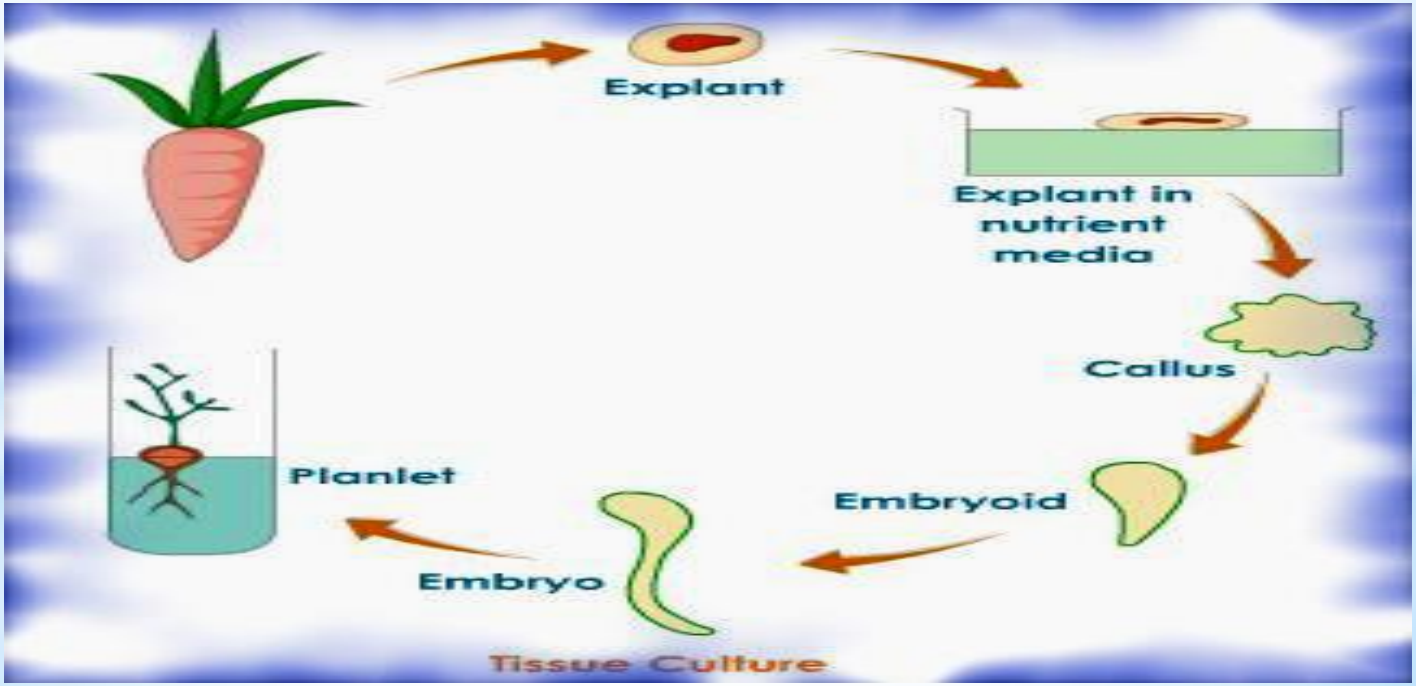
وتتميز النباتات الناتجة من عملية تكوين الأجنة الخضرية بالتماثل التام فيما بينها. وبالتالي ، فهذه التقنية تعتبر فعالة في إنتاج العديد من النباتات بشكل يفوق الإكثار الخضري الدقيق التقليدي الخاص بتكوين الأعضاء organogenesis ويفيد ذلك في إكثار النباتات المنتخبة لصفة معينة أو النباتات الناتجة من عملية التحول الوراثي . ويتم إنتاج الأجنة الخضرية من خلايا الكالس عن طريق التحكم في ظروف الزراعة . وعلي سبيل المثال تتلخص خطوات تكوين الأجنة الخضرية في نبات الجزر في التالي:

١. توطيد طريقة لإنتاج الكالس من أنسجة الساق المأخوذة من البادرات الحديثة النمو وتنميتها تحت ظروف معقمة.

٢. نقل خلايا الكالس إلي بيئة منخفضة المحتوي من الأوكسين.

٣. تخفيف معلق الخلايا وتقليل كثافتها.

والشكل التالي يوضح عملية تكون الأجنة الخضرية في الجزر:



ومن الملاحظ أنه ليس لجميع الخلايا في مزرعة ما أو كالس معين القدرة علي تكوين أجنة بنفس الدرجة . حيث يحدث تنافس بين الخلايا لها استعداد في تكوين الأجنة فيما يعرف بالتجمع ما قبل الجنيني للخلايا Pro-embryogenic cell masses (PEMs) . وتتميز هذه الخلايا بحجمها الصغير نسبياً في كثافة السيتوبلازم ومحتواها العالي من حبيبات النشا ، في حين أن الخلايا غير الجنينية تكون كبيرة في الحجم وبها فجوات كبيرة وعديدة. ويمكن استعمال هذه السمات في انتخاب الـ PEMs عن طريق عمل تصفية وتنقية لمعلقات الخلايا واستبعاد الخلايا غير الجنينية.

مراحل تطور الجنين الجسمي :

يمر الجنين الجسمي بمراحل تطورية تشبه لحد كبير المراحل التي يمر بها الجنين الزيجوتي.

وتتلخص مراحل الجنين الجسمي فيما يلي:

١. الكروي Globular stage :

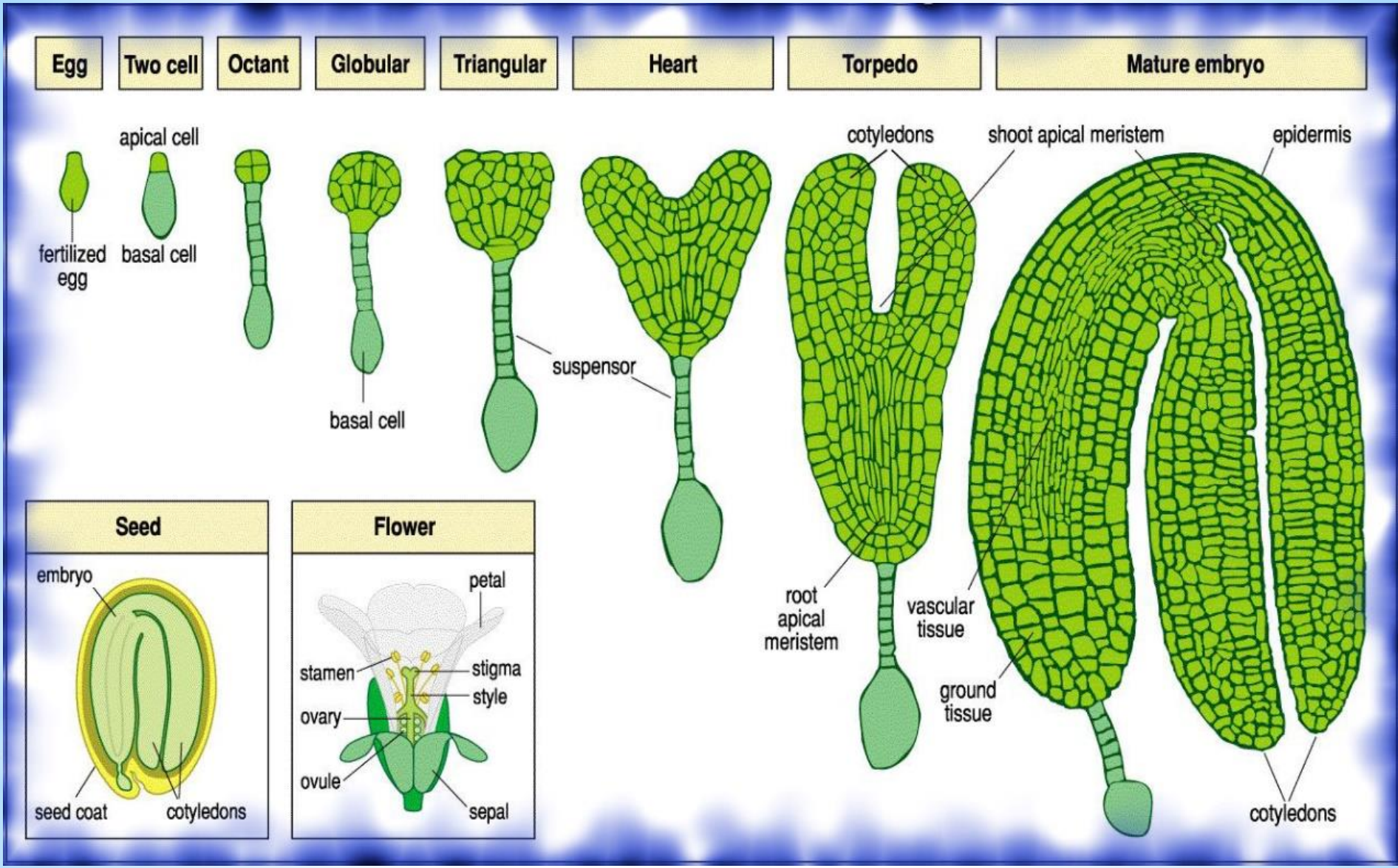
يأخذ الجنين الشكل الكروي حيث تتكشف هذه المرحلة من خلايا الـ PEMs خلال ٥-٧ أيام من نقل الزراعات لبيئة ذات محتوي منخفض من الأوكسين. وبعد حوالي يومين أو ثلاثة أيام من النمو المتجانس الأبعاد تبدأ المرحلة الكروية في أخذ شكل غير منتظم ليتحول الجنين إلي المرحلة التالية.

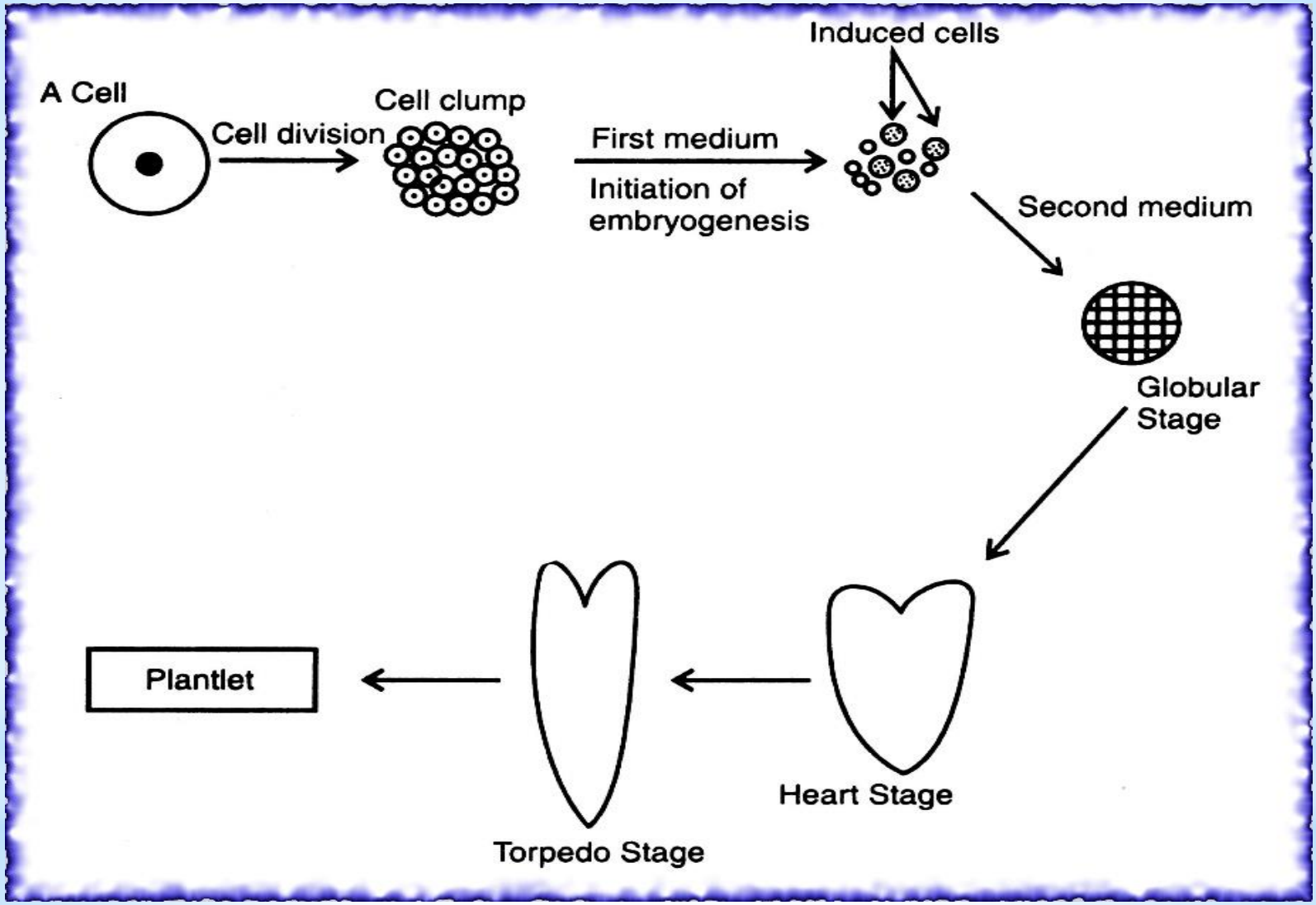
٢. القلبي Heart stage :

يتحول شكل الجنين نتيجة الأنقسام والنمو الغير متجانس ليعطي شكلاً يشبه القلب وذلك عن طريق تكوين فلقتين صغيرتين.

٣. الطوربيد Torpedo stage :

تتميز هذه المرحلة باستطالة خلايا الساق التحت فلقية وتكوين الجذور الأولية.


Egg
Two cell
Octant
Globular
Triangular
Heart
Torpedo
Mature embryo
apical cell
fertilized egg
basal cell
basal cell
suspensor
cotyledons
shoot apical meristem
epidermis
root apical meristem
vascular tissue
ground tissue
cotyledons
Seed
embryo
seed coat
cotyledons
Flower
petal
stamen
stigma
style
ovary
ovule
sepal


A Cell
Cell division
Cell clump
First medium
Initiation of embryogenesis
Induced cells
Second medium
Globular Stage
Heart Stage
Torpedo Stage
Plantlet