تقانات تربية وتحسين النبات Plant Breeding and improvements

ان التقانات التَّي اتبعها الباحثون فَي مجال تربية وتحسين النبات منذ البداية ولحد الان يمكن تقسيمها **الى ثلاث مستويات هَي:**

1 - **تقانات تحسين النبات على مستوى النبات ككل**

Plant improvement techniques at whole plant level

تعتبر من اقدم الطرق التَّي عرفها الانسان لتحسين محاصيله ومنها.

طريقة الانتخاب Selection : قام المزارعون منذ القدم بانتخاب النباتات المتميزة بجمع بذورها واكثارها.

بالإضافة الى ذلك هناك عدة طرق يتبعها مربو النبات في تحسين النبات مثل طريقة الادخال او الاستيراد والاقلمة Plant Introduction and Acclimatization إذ يتم ادخال انواع نباتية من منطقة زراعتها الاصلية الى منطقة جديدة والعمل على اقلمتها ولعدة اجيال لكي تتكيف مع الظروف البيئية الجديدة.

طريقة التهجين Hybridization وهَي من اهم الطرق المستخدمة لإيجاد التغايرات الوراثية Genetic variations والتي تجري بين الاصناف التابعة للنوع الواحد Inter Varietals H. وقد تجري بين الانواع التابعة للجنس الواحد Inter Specific H. وقد يجري بين الاجناس التابعة للعائلة الواحدة Inter Generic H. ويشمل التهجين النباتات الذاتية والخلطيه التلقيح على حد سواء.

الطفرات الوراثية Genetic Mutations احداث التغير المفاجئ في التركيب الوراثَي للفرد على مستوى جزيئة DNA او تسلسل نيوكليوتايدي في جين معين.

كل هذه الطرق يجري اتباعها للحصول على التغايرات الوراثية التي تعطيً فرصة لمربَي النبات لجمع التراكيب الوراثية) الجينات (الموجودة فَي نباتات عديدة فيً نبات واحد).

رافقت العاملين في هذا المجال العديد من المعوقات منها:

١. فشل حالات التضريب ما بين الانواع Inter Species crosses وخاصة المتباعدة منها.
٢. يتم فيها نقل مجاميع من الجينات فَي كل عملية تهجين والتَّي لا تكون جميعها مرغو ب بنقلها وقسم منها يؤدي الى ظهور صفات غير جيدة.
٣. برنامج التربية بهذه الطريقة يكون طويل وقد يستغرق على الاقل 7-8 اجيال لتثبيت الصفة وهذا يعتبر مكلف ويسبب ضياع للوقت.

٢- **تقانات تحسين النبات على المستوى الخلوي**

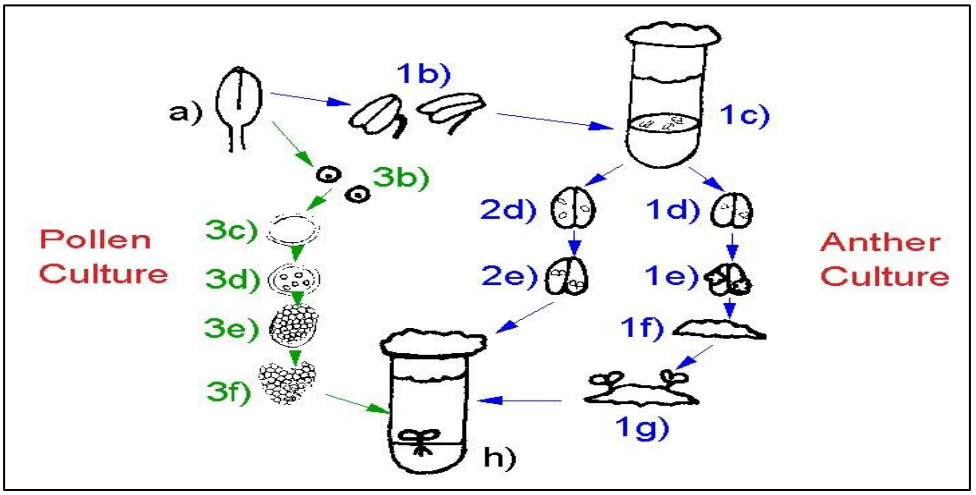
Plant improvement techniques at the cellular level

لجأ العديد من الباحثين ومنذ منتصف القرن الماضي الى محاولة التغلب على بعض المشاكل والمعوقات التَّي تواجه مربَي النبات وذلك من خلال زراعة المتوك وحبوب اللقاح Anther and Pollen culture او زراعة المبيض Ovary culture والتَّي توفر امكانية الحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية Haploid

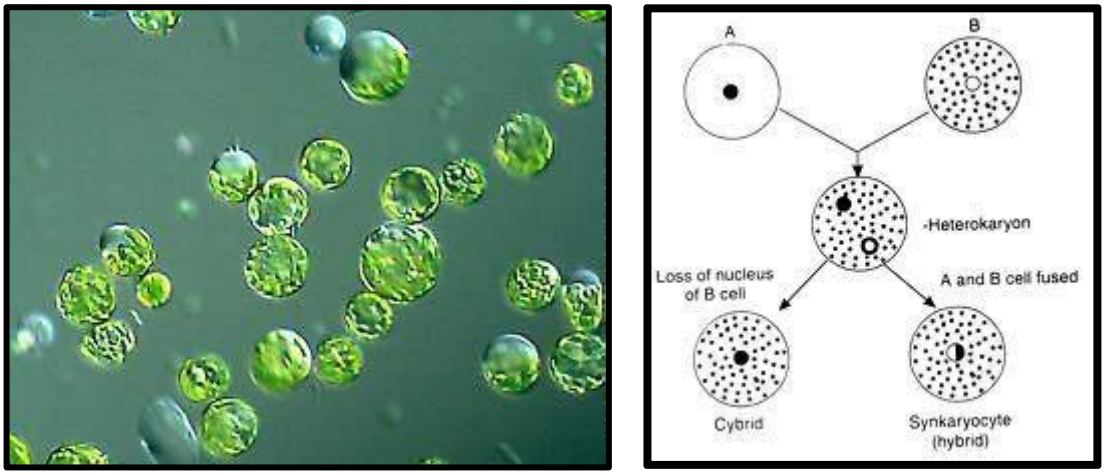
Plant وبمضاعفة العدد الكروموسومي للنباتات الناتجة يمكن الحصول على نبات نقي 100% في صفاته الوراثية (شكل2).

كما تشمل هذه التقنية زراعة الاجنة Embryo culture التي تمكن من الحصول على نباتات من تضريبات لا تعطي بذوراً قابلة للإنبات في الطبيعة كالتضريب بين الانواع والاجناس. ولعل اكثر التطبيقات اهمية في الوقت الحاضر هو دمج البروتوبلاست لخليتين نباتيتين مزال جدارها الخلوي لإنتاج خلية هجينة تمتلك صفات كلا من الخليتين الام شكل 3.

كما يمكن استحداث الطفرات الوراثية في مزارع الخلايا النباتية وانتخاب الخلايا المطفرة وتطويرها الى نبات كامل وادخالها في برامج التربية المختلفة.



شكل(2): يمثل زراعة المتك او حبوب اللقاح نسيجاً لإنتاج نباتات نقية وراثياً



A (B)

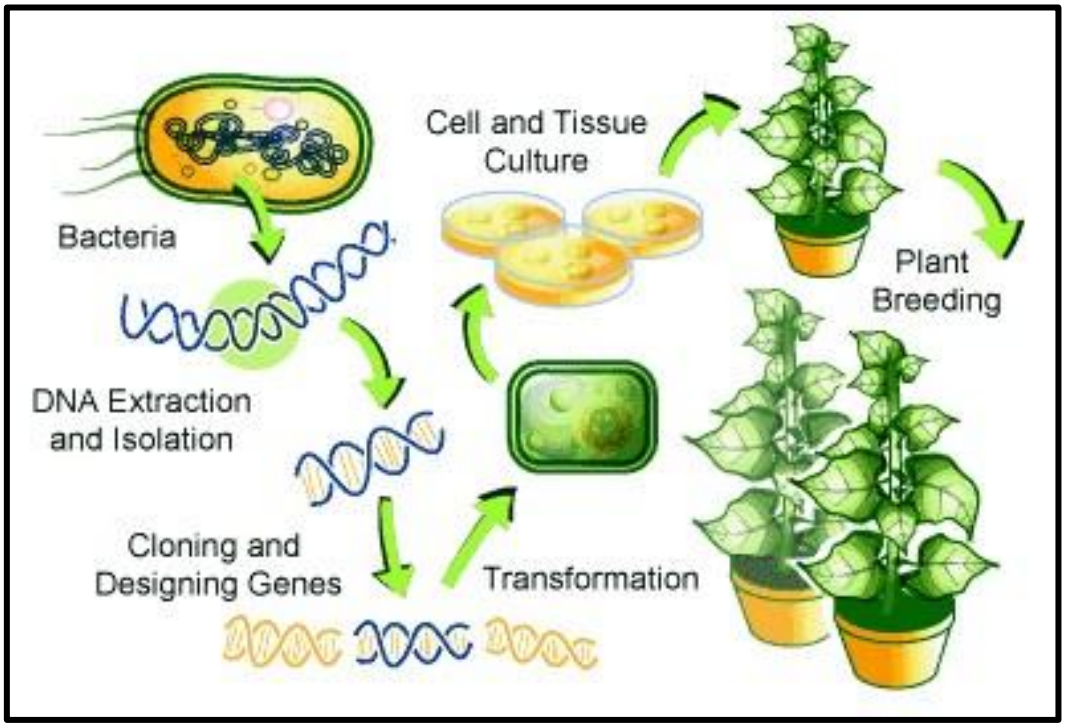
(شكل3) A يمثل خلايا البروتوبلاست المعزولة، (شكل B) عملية الدمج بين نوعين مخلفين من البروتوبلات ونواتج الاندماج

3 ـ تقانات تحسين النبات على المستوى الجزيئي

Plant Improvement techniques at the molecular level

ان التطور الكبير في علم البايلوجيا الجزيئية Moleculear biology فِي السنوات الاخيرة قد وفر للعلماء القدرة على نقل الجينات من اي كائن مثل نبات،حيوان ،بكتريا ، فيروس وادخالها الى كائنات اخرى، وبهذه الطريقة نكون قد تجاوزنا حاجز النوع. والكائن الذي يتم تغير مادته الوراثية يسمى كائن محور وراثياً Genetically Modified Organism (GMOs).

ان تقانات الهندسة الوراثية وفرت نقل جين واحد فقط وهو الجين المعنِّي بالصفة المرغوبة بين النباتات وبالتالِّي وفرت الوقت وبشكل كبير جداً مما سهل مهمة مربِّي النبات فِّي جهودهم وفتح الافاق الرحبة امام عصر جديد يتم فيه انتاج الاصناف المحسنة والمتفوقة لتوفير الغذاء للشعوب (الشكل4).



الشكل(4) انتاج نباتات محورة وراثياً بواسطة تقنية Recombinant DNA

تقنية زراعة الأنسجة Technology Culture Tissue

تقنية زراعة الأنسجة وهي زراعة الخلايا في أوعية زراعة تحت الظروف المعقمة in vitro وذلك فى معامل خاصة بزراعة الأنسجة. ومن تطبيقاتها:-

١. إستخدام الخلايا الثديية في الكشف على كفاءة الأدوية بدلاً من الحيوانات مما يعكس الأمان والدقة.
٢. العلاج الخلوي.
٣. إنتاج العقاقير النباتية من الخلايا مباشرة بدلاً من النباتات.
٤. إكثار وتضاعف الأنسجة النباتية في المعمل.

اساسيات زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية

Basics of plant cells, tissues and organs culture

نبذة تاريخية:

يقصد بتقانة زراعة الانسجة النباتُية Plant tissue culture عزل الخليَّة او النسيُج او العضو النباتي وزراعته ونموه وتطوره خارج الجسم الحي في اوساط غذائُية اصطناعُية معقمة وتحت ظروف محددة من حُيث الحرارة والضوء.

يتفق الباحثون على ان الباحث الالماني **G. Haberlandt** هو اول من حاول عزل خلايًا مفردة من النسُيج المتوسط لأوراق بعض النباتات وزراعتها على اوساط غذائية بسُيطة.
نُشرت نتائج هذه الابحاث في سنة 1902 والتي اشارت الى ان الخلاًيا المعزولة تمكنت من البقاء حيَّة مع زُيادة في حجمها الا انها لم تتمكن من الانقسام، وفسر ذلك الى غُياب عامل النمو الذي افترض انه مجموعة من الانزُيمات اسماها في حُينها انزُيمات النمو Growth enzymes التَّي تفرزها خلاًيا اخرى لتشجع انقسام الخلاًيا المزروعة. على الرغم من فشل هذا العالم، كما ظن في حُينها الا ان تجربته اصبحت من اهم الركائز التي تستند عليُها تقنية زراعة الانسجة النباتيَّة، اذ اطلق هذا العالم مفهوم الطاقة الكامنة الذاتيَّة للخلاًيا **Totipotentiality** الذي يعني ان كل خلُية من خلاًيا النبات لها القابليَّة على النمو والتطور الى نبات كامل مشابه للنبات الام اذا ما توفرت لها الظروف المناسبة من حُيث الحرارة والضوء والرطوبة فضلا عن المواد المغذُية.

وبعد مرور سنتُين تمكن الباحث Hannig من عزل اجنة بالغة مستأصلة من بذور بعض نباتات العائلة الصلُيبيَّة وزراعتها على اوساط غذائيَّة مسجلاً اول نجاح لزراعة الاجنة.

وبعدها فَي سنة 1934 نشر الباحث White تقريراً عن امكانيَّة عزل جذور بادرات الطماطة وزراعتها واستمرار نموها في وسط غذائَّي سائلٌ يتكون من مجموعة من الاملاح اللاعضوُيَّة والسكروز وخلاصة الخمُيرة وبهذا سجل اول زراعة للجذور.

لكن الطفرة الحقيقُية في هذا المضمار تلت اكتشاف وتشخيص اول هورمون نباتً طبيعي هو الاوكسين اندول حامض الخليك IAA من قبل الباحث Kogl وفريق عملة. اذ ادى أضافته الى الوسط الغذائي الى انقسام الخلايا وتكوُين الكالس.
ثم لاحظ الباحث Van ورفاقه في 1941 ان اضافة حلُيب جوز الهند الى الوسط الغذائَّي يحفز نمو الاجنة وتطور الكالس في نبات الداتورا، واصبح الاعتقاد السائد باحتواء حلُيب جوز الهند على عامل محدد هو المسؤول عن عمليَّة انقسام الخلاًيا وتكوين مستعمرات الكالس.
بدأت معظم الدراسات تركز على تشخُيص هذه المواد الفعالة، الى ان تمكن الباحث Miller وجماعته عام 1955 من فصل اول سأيتوكاينيُن من حيامن سمك الرنكة.
فَي عام 1957 اطلق Miller وزميلة Skoog فرضيَّة تحكم الهرمونً بتكوُين الاعضاء الجذور والسُيقان وذلك عن طريُق الموازنة بُين الاوكسيُن والسأيتوكأينين وبعدها اصبح بالإمكان الحصول على نباتات كاملة واعتماد هذه الطرُيقة كأحدي طرق الا كثار الخضري .

فقد تمكن الباحث Thimann سنة 1958 من التغلب على السيادة القمية Apical dominance عن طريق اضافة تراكيز عالية من السأتوكأنين وبالتالي تحفيز نمو بادئات البراعم الموجودة في اباط الاوراق في القمم النامية وتطورها الى افرع جديدة ممكن عزلها وتجذيرها بصورة منفردة.

وفي السنة ذاتها تمكن الباحث Steward وجماعته من تحفيز نشوء الاجنة اللاجنسية Asexual embryos من انسجة الجزر وتطورها فيما بعد الى نبات كامل ذو تركيب وراثي مطابق للنبات الام.

شهدت الستينات من القرن العشرين تطوراً ملحوظاً في زراعة الاعضاء فقد تمكن Morel من عزل وزراعة القمة النامية التي تعد وسيلة فعالة للإكثار والحصول على نباتا خالية من الفأيروسات،

كما سجل Guha في 1964 اول نجاح في زراعة المتوك التي تمكن من الحصول على نباتات تحوي نصف العدد الاصلي من الكروموسومات والتي من خلال مضاعفتها بمادة الكولشسين يمكن الحصول على نباتات نقية وراثياً.

ثم جاء نجاح العالم Cocking في عزل البروتوبلاست وزراعته على اوساط غذائية ليفتح افاقاً جديدة في مجال تربية وتحسين النبات.

فقد نجح الباحث Carlson وجماعته من تحقيق اول تهجين لاجنسي بين الاصناف وذلك بدمج البروتوبلاست لصنفين من التبغ. في حين سجل اول تهجين بين بروتوبلاست جنسين مختلفين عام 1978 عندما تمكن الباحث Melchers وجماعته من دمج بروتوبلاست الطماطة والبطاطا.

ساهمت بحوث العديد من الباحثين في مناطق مختلفة من العالم من توظيف التقنيات المختلفة لزراعة الانسجة لخدمة الزراعة والصناعة وتحويلها الى واقع تطبيق ملموس،

ولعل من الانصاف ان نذكر الباحث Murashige الذي ساهم كثيراً في نشر هذه التقنية وكان للوسط الغذائي الذي حدده في عام 1962 مع استاذة المشرف Skoog الاثر الكبير في تطور التقنيات المختلفة لزراعة الانسجة، و سمي هذا الوسط اختصاراً MS الذي ظهر فيما بعد انه يمكن استخدامه لمعظم النباتات.

استحداث ونمو الكالس Initiation and growth of callus

يطلق مصطلح الكالس على الخلايا البرنكيمية تكون سائبة غير منتظمة الشكل تنشأ من الخلايا المرستيمية meristematic cell للأنسجة النباتية. يعتمد استحداث الكالس بدرجة كبيرة على نوع القطع النباتية explant ومصدرها، إذ تعد الانسجة الفتية الاكثر احتمالاً لإنتاج الكالس، التي تم الحصول عليها من البادرات والافرع الفتية حديثة التكوين او البراعم وقمم الجذور والاجنة النامية وكذلك من اجزاء الزهرة والدرنات والابصال، إذ فضلا عن احتوائها هذه الاجزاء على الخلايا المرستيمية النشطة فهي غنية بالخلايا البرنكيمية الغير متمايزة، وقد يكون لمحتواها العالي من الهورمونات النباتية الطبيعية والتي بتداخلها وتوازنها مع منظمات النمو المضافة خارجياً الى الوسط الغذائي، تحفز الخلايا المتمايزة على ان تفقد تمايزها وتعاود الانقسام منتجة خلا يا وتجمعات غير منتظمة اطلقنا عليها سلفاً الكالس. كما يعتمد استحداث الكالس على ظروف خاصة مثل درجة الحرارة والضوء و المواد الغذائية ومنظمات النمو.. الخ.

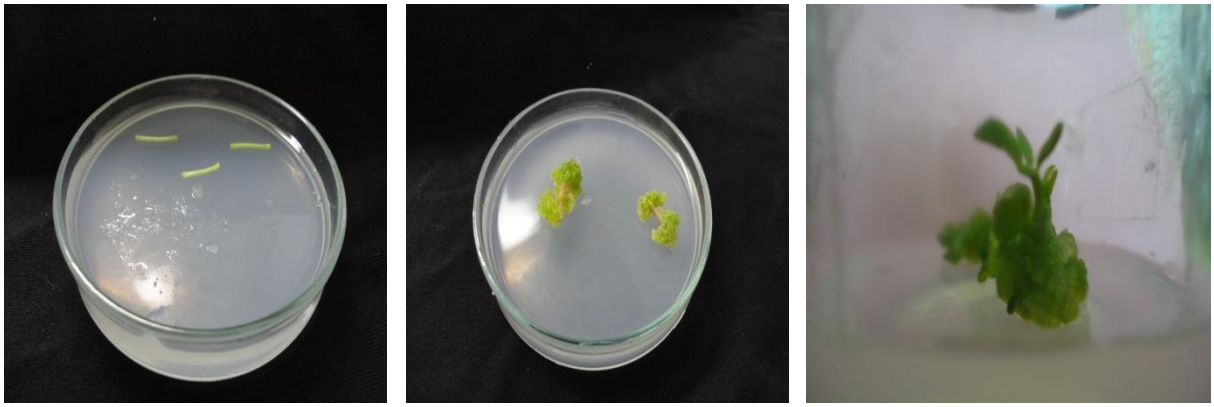
مراحل استحداث الكالس:

تمر خلاًيا القطعة النباتًية خلال استحداث ونمو الكالس بتغًيرات معًينة هًي التغًير فًي الحجم والعدد والتركًيب فضلا عن الزًيادة الكبًيرة فًي بعض العملًيات البنائًية المهمة. وعموماً تمر عملًية استحداث الكالس فًي مراحل ثلاث هًي:

١. مرحلة التحفًيز Induction ًيبقى عدد الخلاًيا وحجمها ثابتاً فًي هذه المرحلة ، وتحدث فًي الخلاًيا تغًيرات مهمه واساسًية تهًيئها لمرحلة الانقسام مثل زًيادة العملًيات البنائًية المختلفة مثل عملًيات بناء البروتًين Protein synthesis وانقسام الحامض النووي DNA ، وًيعتمد الوقت اللازم لهذه المرحلة على نوع نسًيج القطعة النباتًية والوسط الغذائًي والظروف البيئًية.

٢. مرحلة الانقسام Division تنقسم الخلاًيا مكونة كتلة من الخلاًيا تغطًي معظم اجزاء القطعة النباتًية تدرً جياً، إذ لا تستجًيب الخلاًيا بصورة متساوًية لعملًية التحفًيز وذلك بسبب وضعها على الوسط الغذائًي فالخلاًيا الخارجًية للنسًيج تحفز وتنقسم فقط مكونة كتلة من الخلاًيا تحًيط بالخلاًيا غًير المنقسمة وخاصة فًي مناطق الجروح لذا ًيتم عمل هذه الجروح على القطعة النباتًية المزروعة بواسطة المشرط قبل الزراعة وًيعود بدء الانقسام فًي الخلاًيا الخارجًية الملامسة للوسط الغذائًي، الى عدة عوامل متداخلة مع بعض، وهذه العوامل هًي توفر الاوكسجًين بكمًيات كبًيرة لتساعد على حث عملًية التنفس لتوفًير الطاقة اللازمة لعملًية الانقسام ووفرة العناصر الغذائًية بسبب التماس المباشر مع الوسط لتوفًير المادة الاساسًية لغالبًية الفعالًيات الحًيوًية التًي تحتاجها عملًية الانقسام.

٣. مرحلة التمأًيز Differentiation بعد عملًية الانقسام تمر الخلاًيا بمراحل بناء نشطة تعود اساساً الى الانقسامات المتكررة للخلاًيا ، وفً هذه المرحلة تحدث تغًييرات عكسًية تتضمن تحول الخلاًيا المنقسمة الى خلاًيا مرستًيمًية مكونة كتل خلوًية غًير منتظمة فًي مناطق انقسام الخلاًيا فقط، تتحول في ما بعد الى خلاًيا متمأًيزة تؤدي فًي النهاًية الى تكوًين النبات الكامل. لا ًيوجد هناك مؤشر ًفصل بًين المراحل المختلفة، فقد ًيحدث الانقسام والتمأًيز اثناء المرحلة الثانًية او الثالثة.



(A) (B) (C)

شكل ًيمثل المراحل استحداث ونمو وتمأًيز الكالس فًي نبات الحلبة:

(A) قطع من السًيقان على الوسط الغذائً. (B) استحداث الكالس بعد مرور شهر من الزراعة .(C) تمأًيز الكالس وظهور الاوراق الحقًيقًية.

الطرق التقنية في زراعة الكالس

هناك العدٌد من طرق استحداث ونمو الكالس تعتمد على نوع القطعة النباتٌية والوسط المستخدم للزراعة وتشمل:

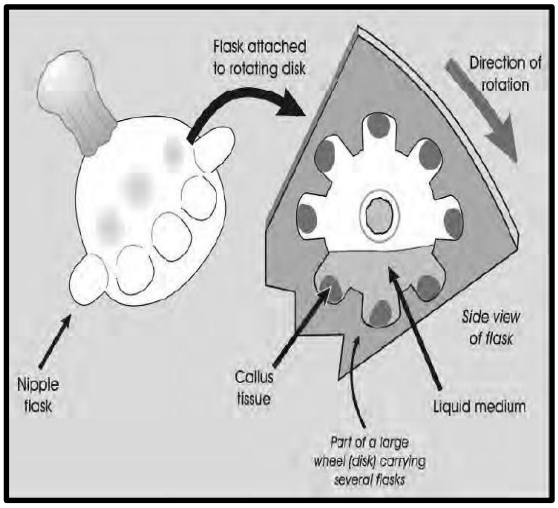
١. **الزراعة على الوسط الغذائي الصلب Culture on solid medium** تعد الزراعة على الاوساط الصلبة من اولى التقنٌيات التٌي استعملت لاستحداث وزراعة الكالس وذلك لسهولتها وعدم حاجتها الى اجهزة مختبرٌية معقدة وكذلك الى امكانٌية استحداث الكالس من القطع النباتٌية فٌي حٌيز صغٌير . ومن اكثر المواد المستعملة لتصلٌيب الوسط الاكار Agar وفٌي بعض الاحٌيان مادة الجلاتٌين. ٌعاب على هذه الطرٌيقة انتقال المواد الغذائٌية الى الجزء النباتً بشكل غٌير متساوي حٌيث تكون الفرصة افضل للجزء الملامس للوسط للاستفادة من المواد الغذائٌية مقارنة بالأجزاء البعٌيدة عن الوسط، وقد تتداخل الشوائب التٌي تحتوٌيها بعض انواع الاكار غٌير النقٌية مع مكونات الوسط الغذائٌي ، كما ان طمر جزء من القطعة النباتٌية فٌي الوسط قد ٌؤدي الى توزٌيع غٌير متساوي للتبادل الغازي بٌين الوسط والكالس المتكون علٌية، اضافة الى تعرض الكالس بعد اكتماله الى ظاهرة الاستقطاب Polarization بفعل الجاذبٌية الارضٌية وكذلك التعرض للضوء، كما وتعد صعوبة نقل الكالس دون حدوث بعض الأضرار له من المساوئ المهمة.

٢. **الزراعة على الوسط الغذائي السائل الثابت Culture on Stationary liquid medium** فٌي هذه الطرٌيقة توضع الانسجة فوق قطعة من ورق الترشٌيح تكون جسراً بٌين الوسط الغذائٌي السائل والجزء النباتٌي، بذلك تعمل ورقة الترشٌيح كموصل للمواد الغذائٌية من الوسط الغذائٌي الى الانسجة المزروعة مع بقاء الجزء النباتٌي معرض للهواء بصورة مباشرة، ومن فوائدها عدم وجود الشوائب التً قد تحتوٌيها بعض انواع الاكار،كما تسمح الطرٌيقة الجزء النباتٌي بالقٌيام بعملٌية التنفس وتبادل المواد الغذائٌية بسهولة.

٣. **الزراعة في الاوساط الغذائية السائلة المتحركةAgitated liquid culture medium** تكون مكونات الوسط السائل مشابهه للطرٌيقة السابقة الا ان هذه الاوساط تكون متحركة الٌياً وتعد هذه الطرٌق المثلى لتنمية الكالس لتجنب المساوئ التٌي تعانيً منها طرٌيقة الزراعة على الاوساط الصلبة. وتوجد طرٌيقتان للزراعة فٌي هذه الاوساط هٌي :

الغمر المستمر: فٌي هذه الطرٌيقة تغمرالانسجة النباتٌية فٌي الوسط الغذائٌي السائل مع تحرٌيكهما الياً حركة دورانٌية وتحدد مدة الدوران ما بٌين 20-250 دورة / دقٌيقة ، ومن الامور التيٌ ٌجب ان نراعٌيها فٌي هذه الطرٌيقة هٌي تحدٌيد حجم الوسط الغذائٌي السائل بصورة دقٌيقة من اجل توفٌير محٌيط غازي لتأمٌين التهوٌية الكافٌية، إذ ٌجب انٌ ٌشغل الوسط ما بٌين 15-20 % من حجم الوعاء الكلً.

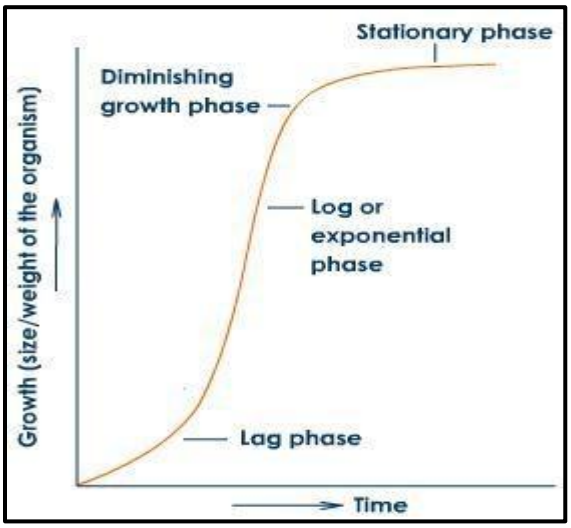
الغمر المؤقت : من اكثر الطرق ملائمة لزراعة انسجة الكالس ففٌي هذه الطرٌيقة تغمر الانسجة النباتٌية فٌي الوسط الغذائً لفترة معٌينة وتعرض الى الهواء فٌي فترة اخرى حٌيثٌ ٌضمن ذلك تهوٌية كافٌية وغمر جٌيد للنسٌيج المزروع. إذ تستعمل طرٌيقة الانابٌيب المتقلبة المثبتة بشكل متوازي على اقراص تدور من الاعلى الى الاسفل ولٌيس على محورها الطولً بمعدل دورة واحدة فٌي الدقٌيقة على محور موضوع بزاوٌية 12 ْ.



شكلٌ مثل الجهاز الدوار وشكل اوعٌية الزراعة والٌية الدوران والزراعة

قياس نمو الكالس واعادة زراعة الكالس

تعتمد مدة استحداث الكالس على عوامل عدة منها نوع القطعة النباتٌية ونوع النبات وتركٌيز منظمات النمو ونوع الوسط الغذائٌي...الخ. فتتبأٌين النباتات فٌي مده الاستحداث بٌين عدة أٌام كما فٌي نبات زهرة الشمس وعدة اشهر كما فٌي النخٌيل ، وٌحتاج الكالس عادة الى مدة زمنية مناسبة بعد استحداثه لٌينمو وٌيصل الى الحجم المناسب لإعادة زراعته بدون تقطٌيع Reculture او بعد تقسٌيمة الى قطع مناسبة Subculture وتتراوح هذه المدة ما بٌين الاسبوعٌين الى الستة اسابٌيع ٌتم تحديٌدها من خلال قٌياس نمو الكالس بإحدى طرق القٌياس



شكل ٌيمثل منحنى النمو لنسٌج الكالس

شكلٌ يمثل تنمّية الكالس لإنتاج مركبات الأيض الثانوية الفعالة طبّياً

زراعة الخلايا المعلقة Cell suspension cultures

ان التقنّية المتبعة فَي استحداث المعلقات الخلوّية تشابه الى درجة كبٌ ٌرة تلك المستعملة فً نمو العدٌيد من الاحٌياء المجهرٌية، إذ ٌتم استحداث المعلقات الخلوّية من خلال نقل قطعة من نسٌيج الكالس الهش الى وسط غذائً سائل، إذ ٌنغمر هذا الكالس فَي داخل الوسط السائل لذا

توجب التحرٌيك المستمر للوسط بوسائل مختلفة لتوفٌير الاوكسجٌين وبالتالً تفادي اختناق الخلاٌيا وموتها ، فضلا عن توزٌيع الخلاٌيا بشكل منتظم داخل الوسط. وٌيفضل استعمال الكالس الهش فَي انشاء المعلقات الخلوّية وذلك لان الخلاٌيا المكونة له تكون غٌير مترابطة مع بعضها البعض وبالتالً امكانٌية تفككها الى تجمعات خلوّية صغٌيرة او حتى خلاٌيا مفردة من خلال التحرٌيك للوسط الغذائً .

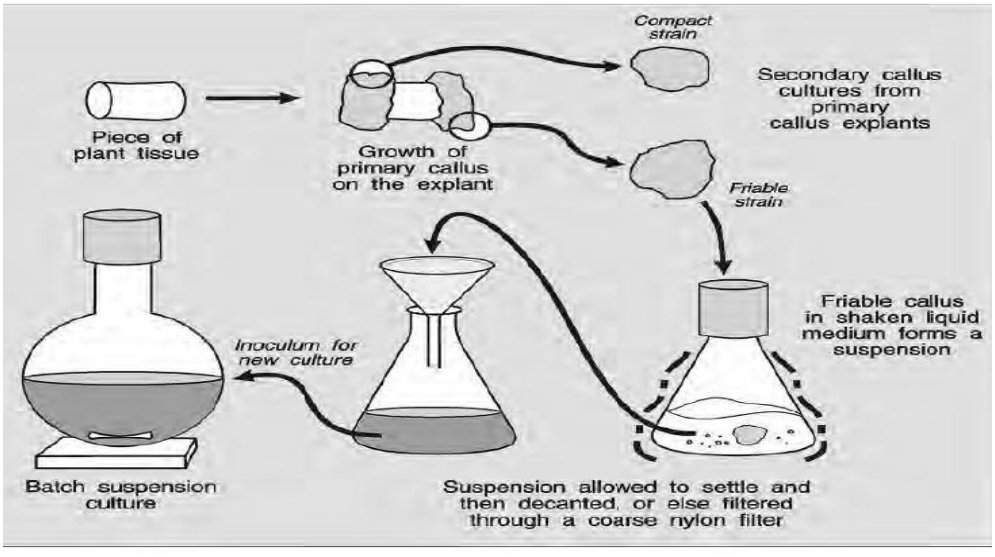


Fig. 1.8 Typical steps in the initiation of callus and suspension cultures.

وتستعمل عادة الاوساط الغذائٌية نفسها المستعملة فَي استحداث الكالس ولكن بحالتها السائلة، والتَي خلالها تمر الخلاٌيا فَي المزارع الخلوّية بأطوار مختلفة من النمو متخذة فً مسار نموها منحنى النمو بشكل (S) ،

فعند وضع الخلاًيا المنشئة للمزارع الخلوًية فً الوسط الغذائً ٌتوقف نموها لمدة زمنًية وتدعى هذه المدة بفترة الفتورlag phase وذلك لتأقلمها على الظروف الجدًيدة، ثم ٌيتبع ذلك زًيادة اسًية فًي عدد الخلاًيا وزًيادة خطيًة فًي مجامًيع الخلاًيا log phase يعقب ذلك انخفاض ملحوظاً فيً معدل الانقسامstationary phase وبعدها تتوقف الخلاًيا عن الانقسام وتدخل الخلا يا مرحلة التوقف decline وذلك نتًيجة استنزاف المواد الغذائًية وتراكم المواد الأيضًية الثانوًية الضارة بنمو الخلاًيا . وللحفاظ على حًيوًية المزرعة الخلوًية ٌيجب اعادة زراعة الخلاًيا قبل مرحلة توقف الانقسام، وذلك من خلال أًيقاف حركة دوران المزارع الخلوًية والسماح للخلاًيا بالركود ، ثم ًيتم التخلص من الوسط الغذائً القدًيم بالسكب الهادئ واستبداله بوسط غذائًي جدًيد .

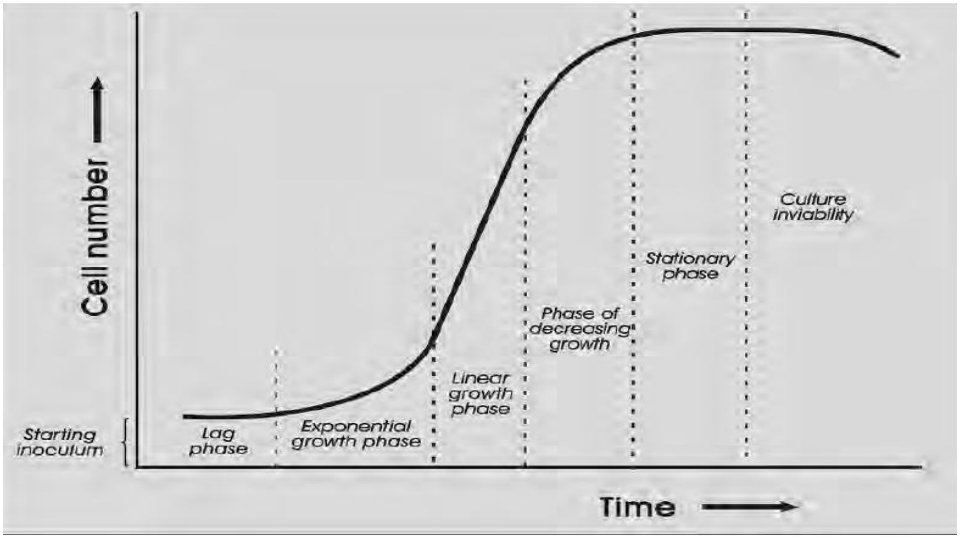


Fig. 1.4 Diagram showing the phases of growth in batch suspension culture.

وتعد كثافة الخلاًيا الحرجة Critical cell density من اهم العوامل المؤثرة فًي عملًية زراعة الخلاًيا المعلقة فًي الوسط السائل او على الوسط الصلب الجدًيد،والتًي تعرف بانها اصغر كمًية لقاح لكل حجم من الوسط ٌيمكن ان يبدا منها تنشئة مزرعة جدًيدة منتج، وتحتاج زراعة المعلقات الخلوًية بكثافات منخفضة الى وجود عناصر غذائًية ومواد معقدة التركًيب لتحفًيز الخلاًيا على الانقسام والنمو، لذا ٌستخدم الوسط المكًيف Conditioned medium وهو الوسط الذي نمًيت علًيه بعض الانسجة) كنسًيج الكالس(سابقاً والذي وصلت خلاًياه مرحلة افراز المواد المشجعة للنمو والتيً تفرز خارجاً الى الوسط الغذائً، والتًي تؤثر بشك فعال على نمو الخلاًيا المفردة او الكتل الخلوًية الصغًيرة. ومن النقاط المهمة التًي ٌجب مراعاتها فًي استخدام الوسط المكًيف هو استخدامه فًي مرحلة بقاء عدد الخلايا ثابتاً، وعدم استعماله فًي مرحلة بعد التوقف من النمو لتفادي افرازات الخلاًيا من المواد الضارة فضلا عن استنزاف المواد الغذائًية. كذلك ٌيمكن تحفًيز الخلاًيا المزروعة بكثافات منخفضة على الانقسام والنمو بزراعتها بالقرب من نسًيج حاضن Nurse tissue او زراعتها علًيه باستعمال جسر ورقً من ورق الترشًيح ٌيسمح بانتقال المواد الغذائًية والمواد المشجعة للنمو من النسًيج الحاضن الى الخلاًيا المفردة.

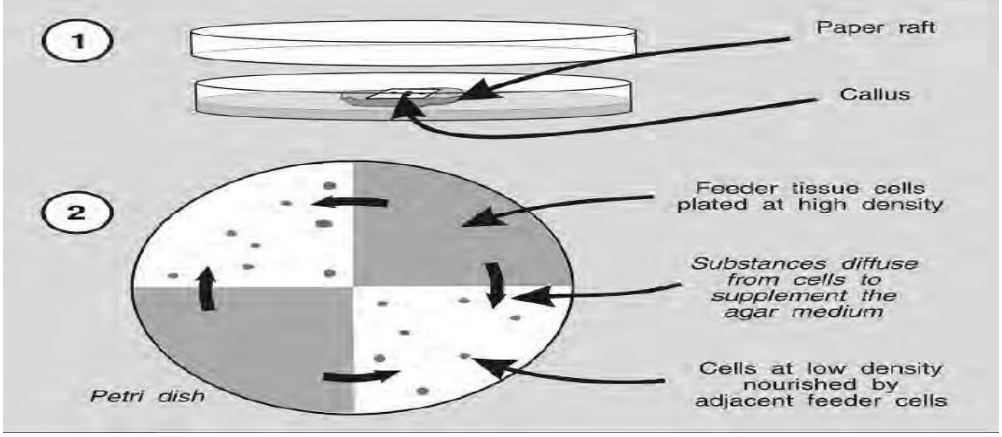


Fig. 1.10 Two methods of assisting the growth of cells plated at low density.

Initiation of suspension cultures مصدر تنشئة مزارع الخلايا المعلقة

تستعمل عادة انسجة مختلفة من اجل استحداث المزارع الخلوّية منها:

١. نسّيج الكالسCallus tissue : ٌيعد من افضل المصادر لاستحداث المزارع الخلوّية لنموه تحت ظروف معقمه، ولا تحتاج عملّية فصل الخلاّيا الى اضافة مواد قد تؤثرعلى حّيوّية ونشاط الخلاّيا. وّينقل عادة 2- 4 غم من الكالس الهش غّير المتمأيز الى اوعّية ملائمة تحوي 100 مل من الوسط الغذائً السائل، والتّي ّتم تحرّيكها باستمرار باستعمال وسّيلة مناسبة، إذ ّيؤدي التحرّيك الى توفّير ضغط معتدل على خلاّيا الكالس مما ّساعد على تفككها الى كتل خلوّية صغّيرة وخلاّيا مفردة، وتوزّيعها بشكل منتظم فً الوسط ، فضلا عن توفّير تبادل غازي مناسب بّين الخلاّيا والوسط الغذائً.

٢. النسّيج المتوسط Mesophyll للأوراق، وتوجد طرّيقتان لفصل الخلاّيا من هذه الانسجة متضمنة :

- ✓ الطرّيقة الانزيمّية Enzyme method تستعمل مستحضرات انزّ مّية خاصة تعمل على اضعاف الجدران الخلوّية وتحطّيم الصفّيحة الوسطى بّين الخلاّيا النباتّية، من سلبّيات هذه الطرّيقة اقتصار استعمالها على انواع نباتّية معّينة ،واحتّياج الخلاّ ًا المفصولة الى حمأية ازموزّية دقّيقة، كما ّيؤدي تعرض الخلاّيا الى محاّليل انزّيمّية الى ضرر قسم من الخلاّيا مما ّؤثر على نشاطها ونموها.
- ✓ الطرّيقة المّيكانّيكّية Mechanical method تستعمل هذه الطرّقة لفصل الخلاّيا مّكانّيكاً بسلخ طبقة النسّيج المتوسط باستعمال مشرط دقّيق وتنقل الى وسط سائل. كما ّيمكن ان تفصل الخلاّيا بسحق قطع الاوراق فً محلول ّحوي كلورّيد المغنسّيوم ومحلول منظم من حامض الهّيدروكلورّيك Tris-HCl buffer ذا 7.8 pH ، ثم ترشح الخلاّيا وتغسل مع الوسط الغذائً فً جهاز الطرد المركزي على سرعة بطّيئة. تمتاز هذه الطرّيقة بعدم تعرضها التأثّيرات الضارة وعدم حاجتها الى حمأية ازموزّية .