# الباب السابع

# إنتاج نباتات أحادية فى المعمل
# *In vitro* Production of Haploids

## الأعضاء المذكرة فى النبات

هى مجموعة من الأسدية Stamens موجودة فى الزهرة. وتتكون السداه من خيط Filament ومتك Anther. ويتكون المتك من فصين كبيرين مفصولين من الداخل بحاجز. ويحتوى كل فص على حجرتين يفصلهما نسيج فاصل. ويحتوى كل فص على كيس جرثومى بداخله حبوب اللقاح. وجميع خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بين حجرات وجدر المتك هى خلايا جسمية ثنائية العدد الكروموسومى. بينما حبوب اللقاح هى خلايا أحادية العدد الكروموسومى. وينتج عن الزراعة المعملية للمتك نباتات ثنائية مصدرها خلايا الأنسجة الضامة والفاصلة بالمتك ونباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح. وتنشأ حبوب اللقاح فى المتك من خلايا أمية Pol-len mother cells موجودة فى الطبقات الداخلية لجدر الأكياس الجرثومية. وتنقسم الخلية الأمية انقساما اختزاليا Meiosis إلى خليتين أحاديتين Haploid، ويسمى دور الخليتين Dyad. ويتبع ذلك انقساما عاديا Mitosis ليكون أربع خلايا أحادية، ويسمى دور الأربع Tetrad. وبذلك ينتج عن كل خلية أمية واحدة أربع حبوب لقاح. ثم تتفكك خلايا حبوب اللقاح Pollen grains (Microspores) جاهزة للتلقيح والإخصاب. وحبة اللقاح خلية كروية أو بيضاوية أو مضلعة لونها أصفر غالبا لها جدار خارجى عادة سميك عليه تجاعيد وأشواك مميزة لكل نوع نباتى. وحبة اللقاح بداخلها مادة هلامية عكرة تحتوى على مواد غذائية فى صورة حبيبات. وقبل انتثار حبوب اللقاح من المتك تنقسم نواة حبة اللقاح إلى نواتين تتميز إحداهما بكثافة السيتوبلازم المحيط بها، وتسمى نواة جنسية Generative nucleus أو خلية

تناسلية وتبقى صغيرة بدون جدار، بينما النواة الأخرى كبيرة وتسمى نواة خضرية Vegetative nucleus.

## الأعضاء المؤنثة فى النبات

يمثل المتاع Gynaecium عضو التأنيث بالزهرة فى نباتات مغطاة البذور Angio-sperms. ويتكون المتاع من كربلة واحدة أو عدة كرابل. وتتركب الكربلة Carpel من جزء قاعدى يعرف بالمبيض Ovary ويعلو المبيض خيط رفيع يعرف بالقلم Style. ويوجد فى الطرف العلوى للقلم جزء منتفخ يسمى بالميسم Stigma. والميسم جسم كروى صغير وبرى أو أملس مغطى بطبقة لزجة لاقتناص حبوب اللقاح. ويحتوى المبيض على بويضة Ovule واحدة أو أكثر. وتقوم البويضة بوظيفة الخلية التناسلية الأمية، فيها ينشأ الجنين بعد الإخصاب أو هى الكيس الذى يحتضن الجنين بداخله. ولذلك تسمى البويضة علميا بالخلية الأمية للكيس الجنينى Embryo-sac mother cell مثلها مثل الخلية الأمية لحبوب اللقاح. وتتركب البويضة أساسا من نسيج النيوسيلة Nucellus محاطا غالبا بغطاء من الخارج متكون من غلاف أو غلافين ماعدا منطقة خاصة يتكون فيها النقير Micropyle وقد يكون نسيج النيوسيلة بدون أغلفة. وحيث إن البويضة وظيفتها تناسلية فلابد وأن تدخل فى انقسام اختزالى (ميوزى) لتكوين خليتين Dyad، ثم انقسام عادى (ميتوزى) للوصول إلى دور أربع الخلايا Tetrad، وهى النتيجة النهائية للانقسام الاختزالى. وتحتوى كل من الخلايا الأربع على نصف العدد الأصلى من الكروموسومات. ثم تهضم ثلاث من الخلايا الأربع وتبقى خلية واحدة فقط فى المبيض وتعتبر نواة أنثوية حقيقية تبدأ فى تكوين الكيس الجنينى. وتنقسم النواة الأنثوية الحقيقية إلى ثلاث انقسامات بطريقة الانقسام العادى Mitosis ليتكون بعدها ثمانى أنوية جميعها مختزلة، أى تحتوى على نصف عدد كروموسومات الخلية الجسمية. ويحدث بعدها توزيع للثمانى أنوية فى فراغ الكيس الجنينى، فتتجه ثلاث منها نحو أحد أقطاب الكيس الجنينى وتسمى بخلايا Antipodal. وتتجه ثلاث أخرى نحو القطب الآخر حيث تمثل خلية منهم الخلية الأنثوية الحقيقية True female egg

وتسمى الخليتان بالخلايا المنشطة Synergetic cells. وتبقى نواتان من ثمانى الأنوية، وهاتان تندمجان معا لتكونا نواة ثنائية العدد الكروموسومى وتسمى بالنواة المندمجة Fusion nucleus أو النواة القطبية Polar nucleus وبعد انتهاء هذا التوزيع يصبح الكيس الجنينى مؤهلا لاستقبال حبوب اللقاح. وزراعة البيضة معمليا قبل إخصابها يؤدى إلى إنتاج نبات أحادى العدد الكروموسومى. وبمضاعفة عدد الكروموسومات فيها تنتج نباتات مماثلة لنبات الأم. وزراعة المبيض أو البويضة أو الكيس الجنينى بجميع محتوياتهم سيؤدى إلى إنتاج نباتات مختلفة فى عدد الكروموسومات، إذ يؤدى إلى إنتاج نباتات ثنائية من الخلايا الثنائية ونباتات أحادية من الخلايا الأحادية.

## التلقيح والإخصاب

تنتقل حبة اللقاح إلى الميسم، وتسمى بعملية التلقيح Pollination. ثم تنبت حبة اللقاح مكونة أنبوبة لقاحية Germ tube تخترق نسيج الميسم ثم القلم متجهة نحو المبيض ثم الكيس الجنينى ثم البويضة. وعند بدء إنبات حبة اللقاح على الميسم أو قبل ذلك مباشرة تنقسم الخلية الجنسية (الذكرية) إلى خليتين Dyad. وعند وصول طرف أنبوبة اللقاح إلى البويضة تختفى عادة النواة الخضرية Vegetative nucleus. ثم تفرغ أنبوبة اللقاح محتوياتها فى الكيس الجنينى فتندمج إحدى الأنوية الذكرية مع البيضة (النواة المؤنثة الحقيقية)، ويسمى ذلك بالاندماج أو الإخصاب Fertilization، وتنتج نواة الزيجوت Zygote التى تحتوى على عدد من الكروموسومات يساوى الموجود فى الخلية الجسمية. أما النواة الذكرية الثانية فتندمج مع النواة المندمجة القطبية Polar nucleus وينتج عن هذا الاتحاد نواة واحدة هى نواة الإندوسبرم Endosperm تحتوى على ثلاثة أضعاف العدد الأساسى من الكروموسومات، لأنها تنشأ من اتحاد ثلاث أنوية تحتوى كل منها على نصف العدد الأساسى من كروموسومات الخلية الجسمية. وبانتهاء الإخصاب وتكوين الجنين (الزيجوت) واكتمال نمو الجنين يكون قد اكتمل تكوين البذرة.

### تعريف النباتات الأحادية Haploid plants

يعرف النبات الناتج من الطور الجرثومى Sporophyte (حبة لقاح أو بيضة) بأنه نبات أحادى Haploid عقيم تحتوى خلاياه على نصف العدد الكروموسومى الموجود فى الخلية الجسمية. والنبات الأحادى قد يكون مصدره حبة لقاح ويسمى نشوءا ذكريا Androgene-sis، أو مصدره بيضة غير مخصبة ويسمى نشوءا أنثويا Genogenesis أو نشوءا بكريا Par-thenogenesis; Apomixes. وتضاعف عدد الكروموسومات فى النباتات الأحادية يؤدى إلى إنتاج نباتات متضاعفة Polyhaploids أى إنها نباتات متضاعفة ومصدرها نباتات أحادية. وهى نباتات خصبة منتجة للبذور. وبدأت تجارب زراعة المتوك عام ١٩٧٠ على الأرز والقمح فى الصين، ثم امتدت التجارب إلى الذرة والشوفان والتريتيكال والتبغ والقطن وفول الصويا والشلجم والكرنب الصينى والفلفل وبعض الأشجار والشجيرات وكثير من نباتات الزينة. وشملت زراعة المتوك وحبوب اللقاح الآن أكثر من ١٧١ نوعا نباتيا ينتمون إلى ٦٠ جنسا و٢٦ عائلة نباتية. ومازالت تحتاج إلى مزيد من البحث لحل بعض الصعوبات التى تواجه إنتاج النباتات الأحادية لبعض المحاصيل.

## أهمية النباتات الأحادية

### ١- إنتاج سلالات نقية

يمكن الحصول على سلالات نقية بطرق تقليدية تشمل التهجين والتلقيح الذاتى أو الرجعى لعدة أجيال مع الانتخاب للتخلص من الصفات غير المرغوبة. ويؤخذ على هذه الطريقة أنها تحتاج إلى مجهود وفترة زمنية طويلة. بينما زراعة المتوك أو حبوب اللقاح أو البيضة فى المعمل يمكن إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى Haploid، فإذا عوملت النبتات المعملية الأحادية بالكولشسين يتضاعف عدد الكروموسومات فيها وتنتج سلالات ثنائية Dihaploid خصبة متجانسة Homozygous وثابتة وراثيا Isogenic فى وقت قصير. وقد أنتجت سلالة ذرة "Qun-Hua" بزراعة المتوك فى فترة تقل عشر سنوات بالمقارنة بإنتاج سلالة مماثلة فى التجانس بالطرق التقليدية.

وتميـزت هذه السـلالة بارتفاع المحصول وقدرة عالية علـى التوافق الهجينى حيث أدخلـت فى إنتاج ٦٢ هجينا، تميز منها ٥٦ هجينـا بارتفاع المحصول، وقد تفوق الهجين Qun (411 x Hua) عليهم جميعا (Wu, et al, 1980).

## ٢- استحداث تنوع وراثى فى النباتات الأحادية المتضاعفة

نباتات الأرز الناتجـة من الجيل الأول «F1» للهجين «Jili x Xian nong 5675» هى نباتات ثنائية غير متجانسـة لأنها تحتوى على جينات متجمعة من الصنفين. وبالزراعـة المعملية لحبوب لقاح الجيل الأول (F1) نتجت نباتات فى الجيل الأول (H1) مختلفـة فى تركيبها الوراثى. وبمضاعفة العدد الكروموسـومى لهذه النباتات ظهـرت ٧ تكوينـات وراثية، بعضها يحمل صفات الصنـف الأول وبعضها يحمل صفـات الصنف الثانى، والبعض الآخر جمع بين صفات الصنفين (Institute of genetics 1974, 1977b) (شكل ١).

**شكل (١) مقارنة بين برنامج تربية نباتات أحادية وبرنامج تربية تقليدية**

| برنامج تربية للنباتات الأحادية | برنامج تربية تقليدية |
|---|---|
| نبات الأم | نبات الأم X نبات الأب |
| ↓ | ↓ |
| زراعة حبوب لقاح أو متوك أو بيضة | F1 |
| ↓ | ↓ |
| ← إنتاج نباتات أحادية → | F2 - 5 |
| ↓ ↓ | التلقيح الذاتىأو |
| تضاعف ذاتى تضاعف بالكولشـين | التهجين الرجعى مع الانتخاب |
| ↓ ↓ | ↓ |
| ← ← H1 → → | ↓ |
| نباتات ثنائية متجانسة | F6 |
| ↓ | سـلالات ثابتة وراثيا |
| H2 | |

### ٣- استحداث أصناف جديدة من الأرز والقمح والتبغ

بزراعة متوك الجيل الأول الهجين (F1) من الأرز والقمح والتبغ تم الحصول على:

**( أ ) صنفين من الأرز** هما (Hua Yu No.-1) و(Hua Yu No.-2) يتميزان بمحصول مرتفع من الحبـوب (٧٥٠٠ كيلوجرام/ هكتار) ومقاومة اللفحة البكتيرية Bacterial blight والتأقلـم للبيئة بدرجة عالية. وصنفـين آخرين هما (Xin Xiu) و(Tang Huo No.-2) يتميزان بارتفاع المحصول .(Chen and Li, 1978)

**(ب) سـلالة جديدة من القمح الشـتوى** تسـمى (Jingdan-2288) تتميز بسنابل كبـيرة وارتفـاع محصول الحبوب وقوة نمو الأشـطاء ومقاومة مـرض الصدأ المخطط Stripe rust والبياض الدقيقى Powdery mildew وقصر السـاق ومقاومة الرقاد (Institute of genetics, China, 1977b).

**(جـ) الصنف** (Danyu No.-1) من التبغ متفوق بجـدارة على آبائه فى المحصول ومقاومة الأمراض. واسـتغرق ٣ سـنوات من زراعة حبوب لقاح الجيل الأول الهجين حتى تم توزيعه على المزارعين (Institute of Tobacco, Shantung, China, 1974a).

### ٤- رفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية

تحتوىالنباتات الأحادية على طاقم واحد من الكروموسومات، لذلك فإنها ثابتة وراثيا أى إن صفاتها السـائدة تظل سائدة والمتنحية تظل متنحية، والتعبير الوراثى للصفات الوراثية شـديد التباين. فمثلا تهجين الصنـف Sonora-62 من القمح ذات الحبـوب الحمراء مع الصنف Hongtu ذات الحبـوب البيضاء كانت حبوب الجيل الأول ($F_1$) الناتجـة حمراء اللون، لأن اللون الأحمر سـائد على اللون الأبيض. وفى الجيل ($F_2$) تم الحصول على ٤١٣ نبات منهم ٣١٣ نبات حبوبه حمراء و١٠٠ نبات حبوبه بيضاء، وكانت نسـبة الانعزال (٣,١: ١). وأوضحت هذه التجربة أن تربية النباتات الأحادية من الممكن أن ترفع كفاءة الانتخاب للصفات المتنحية مع سـهولة التخلص من الكايميرا (Institute of genetics 1974 , 1977b).

## ٥- إنتاج نباتات مذكرة

يمكـن الحصول على نباتات مذكرة من الذرة والأسـبرجس Asparagus. وتتميز نباتات الأسبرجس المذكرة على النباتات المؤنثة فى إنتاج محصول المهاميز (الطرف القمى من الساق وهو الجزء الصالح للغذاء)، كما أن النباتات المذكرة تعمر أطول من النباتات المؤنثة (Wu, et al, 1980).

## ٦- سهولة استحداث الطفرات فى المزارع الأحادية

يعتمـد نجاح تحسـين أى محصول على مقـدار التغييرات الوراثيـة المتوفرة مع انتخاب الأفضل من هذه التغييرات. ويعتبر الإشـعاع والمطفرات الكيميائية وسـائل ناجحـة فى إحداث تباينات وراثية. وتعتبر مزارع الكالس الغنية بالسـيتوكاينينات مصـدرا هاما أيضا للحصول على تباينات وراثية. وتيسـر زراعـة الخلايا الأحادية دراسـة وراثة الخلايا الجسـمية، لأنه فى بعض الحالات قد تكون للطفرة الخلوية Mutant cell lines أهمية خاصة. والطفرات الناتجة من معظم الخلايا الأحادية ليس لها تعبير جينى لأنها طفرات متنحية. ويمكن استخدام خلايا الكالس أحادية العدد الكروموسومى فى دراسة تأثير بعض المطفرات مثل الإشعاع والكيماويات، وقد تميزت فـى ذلك الخلية الأحادية وحبوب اللقاح على المتوك، حيث تؤدى زراعة المتوك إلى إنتاج نباتات أحادية Haploids بجانب نباتات مختلفة التضاعف. وتسـتخدم مزارع الخلايا الأحادية ومزارع البروتوبلاسـت بنجاح فـى عزل خلايا طافرة Mutant cell lines لأنـواع نباتيـة عديدة مقاومة للمضاد الحيوى ستربتومايسـين وطفرات مقاومة لمركب 5-Brqmodeoxy- uridine (Maliga, et al., 1973) وطفرات مقاومة لمركب-Me thionine sulfoximine وطفرات مقاومة لنيماتودا البطاطس وطفرات مقاومة لدرجات حرارة مختلفة (Wenzel and Uhrig, 1981). كذلك تم الحصول على طفرات بتعريض نبتات تبغ حديثة العمر، ناتجة من زراعة المتوك، إلى جرعات من ١,٥ إلى ٣ كيلوراد من أشعة جاما. وأظهرت هذه الطفرات نسبة عالية من التغييرات الوراثية فى الشكل

والحجم ولون الزهرة وبعضها كانت كايميرا مؤكدة. ونتجت طفرة أزهارها بيضاء بعد زراعة متوك نبات التبغ على بيئة مضاف إليها ١٠$^{-٦}$ مولر من مادة (Nitsch and Nitsch, 1969) N-3-Nitrophenyl-N-Phenylurea Nitsch. وقام Devreux and Sac-cardo (1971) بتعريض براعم زهرية للصنف Virginia Bright من التبغ *Nicotiana tabacum* إلى الجرعة واحد كيلوراد من أشعة X–. ثم زرعت المتوك بعد فصلها من الأزهار المشعة على بيئة غذائية وكانت النتيجة أن ظهرت تشوهات كروموسومية بنسبة ٦٪. كذلك بتطبيق زراعة المتوك أمكن استحداث تغييرات وراثية فى العديد من النباتات وانتخبت سلالات منها وأصبحت بعد ذلك أصنافا تجارية. فمثلا فى الصين استحدثت أصنافا جديدة من الأرز تسمى Tanfong-1 (Yin, et al., 1976) و Huagu-2وHuagu-1 ومن القمح تسمى Lunghua-1وHuapei-1 ومن التبغ تسمى Tanyu-1 (Hu, et al., 1978)و Tanyu-2و Tanyu-3. وفى اليابان استحدث صنف F-211 من التبغ مقاوم للذبول البكتيرى من خلال زراعة المتوك.

## إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح

### أهمية زراعة حبوب اللقاح

١– يفضل زراعة حبوب اللقاح لتجنب الصعوبات الناتجة عن صلابة جدر متوك بعض الأنواع النباتية.

٢– النباتات الناتجة من حبوب اللقاح متجانسة بعد تضاعف كروموسوماتها بالكولشسين، ولاينتج عنها انعزالات وراثية، وأن حوالى ٩٠٪ من السلالات الناتجة هى سلالات ثنائية لها تعبير جينى متجانس. بينما النباتات الناتجة من زراعة المتوك تحتوى على نباتات أحادية مصدرها حبوب اللقاح ونباتات ثنائية مصدرها جدر المتك والأنسجة الضامة به.

٣– تعطى حبوب اللقاح جنينا ذكريا مباشرة. وهذا يسهل الدراسة وتتبع التغيرات الوراثية والفسيولوجية والبيوكيميائية للأجنة الذكرية الناشئة مثل متابعة مراحل

تكويـن الأجنة من حبوب اللقـاح ابتداء من تكوين الخليـة الفردية Uninucleus، ودراسـة الامتصاص Uptake والتحور الوراثى Transformation وتأثير المطفرات مثل المطفرات الكيميائية والفيزيقية مثل أشعة جاما وأشعة –X.

## خطوات زراعة حبوب اللقاح Pollen grains culture

### فصل حبوب اللقاح

١– بالنسـبة للأزهار الكبيرة مثل أزهار الداتورا *Datura innoxia* والبيتونيا *Petunia hybrida*، تفصـل حبـوب اللقاح من متوك طازجـة. وتتم هذه الخطوة داخل كابينة معقمة.

٢– بالنسـبة للأزهار الصغيرة، تعقم البراعم الزهرية أو النورات تعقيما سطحيا. وتفصل المتوك وتوضع فى الدورق الزجاجى الخاص بجهاز المجنس Homogenizer يحتوى على بيئة سائلة ، ويفضل استخدام دوارق زجاجية نوع Potter-Elvehjem، وبذلـك يمكن الحصـول على حبوب لقاح معلقة فى بيئة سـائلة ومعها بقايا جدر المتك. ومن الضرورى بالنسـبة لنبات التبـغ *Nicotiana tabacum* زراعة المتوك فى بيئة سائلة لمدة ٤– ٦ أيام قبل فصل حبوب اللقاح. ويرشح المحلول لفصل حبوب اللقاح عن بقايا جدر المتك، ويسـتخدم لذلك قماش نايلون مسـاميته دقيقة تسـمح بمرور البيئة السائلة ومعها حبوب اللقاح فقط.

٣– توضـع حبـوب اللقاح المعلقة فى بيئة سـائلة فى جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة (g. x 10) لمدة أربع دقائق. ثم يتم التخلص من معظم البيئة السائلة إلا القليل منها المحتوى على حبوب لقاح متجمعة. ثم يضاف إليها بيئة سائلة طازجة لغسل حبـوب اللقـاح. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات مع الحرص على إضافة بيئة جديدة طازجة كل مرة لضمان حسن غسل حبوب اللقاح.

٤ – تنقل حبوب اللقاح مع كمية بسـيطة من البيئة السـائلة إلى دوارق الزراعة المعملية المحتوية على بيئة سـائلة طازجة، وقد تسـتخدم بيئـة صلبة طازجة بدلا

من البيئة السائلة. ويفضل فى حالة الزراعة فى بيئة سائلة استمرار تحريك دوارق الزراعة بصورة بطيئة لضمان انتشار حبوب اللقاح فيها، وإن كانت عملية تحريك دوارق الزراعة ليست ضرورية مع بعض النباتات مثل Datura والتبغ Nicotiana.

## تحفيز حبوب اللقاح

١- ثبت أن غياب منظمات النمو من البيئة يؤدى إلى تحفيز حبوب اللقاح لتكوين أجنة، بينما إضافتها للبيئة يؤدى إلى تكوين قليل من الكالس بجانب الجنين.

٢- لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* تستخدم بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية المذكورة فى بيئة Bourgin and Nitsch, 1967 (H) مضافا إليها الحديد لتحفيز حبوب اللقاح على النمو. ثم تنقل حبوب اللقاح بعد ذلك إلى بيئة طازجة مضافا إليها ٨٠٠ ملليجرام/ لتر جلوتامين Glutamine + ١٠٠ ملليجرام/ لتر سيرين Serine + ٥٠٠٠ ملليجرام/ لتر إينوسيتول Myo-Inositol + أملاح العناصر المعدنية بقدر يعادل أربعة أمثال تركيزها الأساسى فى البيئة الغذائية (H) (جدول ١).

٣- يمكن دفع حبوب لقاح الداتورا *Datura innoxia* للنمو بزراعتها فى بيئة تحتوى على أملاح العناصر المعدنية + ٢٪ سكروز ثم تحضن عند ٢٥- ٣٠°م، ويبدأ انقسام الخلايا بعد ٢٤ ساعة من الزراعة. وبعد ٧٢- ٩٦ ساعة يزداد انقسام الخلايا ويبدأ تخصصها وتكوين أجنة ثم تنمو الأجنة إلى نباتات.

٤- يزداد نشاط تكوين الأجنة من حبوب اللقاح أو المتوك كثيرا برفع تركيز السكروز وMyo-Inositol فى البيئة، حيث إن زيادة تركيز السكروز من ٠,٠٨٨ إلى ٠,١٨ مولر من العوامل الهامة لخروج النبتات من حبوب اللقاح والمتوك وله تأثير جيد على النمو وينظم الضغط الأسموزى للبيئة.

٥- التركيزات المرتفعة من أيونات الأمونيوم Amonium توقف تكوين الكالس الناتج من حبوب لقاح الشعير والأرز. وتحتوى بيئة (N6) على نسبة منخفضة من الأمونيوم وزيادة أيونات النيترات Nitrate. لذلك تعتبر بيئة (N6) هى أكثر البيئات

كفاءة بالمقارنة ببعض البيئات الأخرى المستخدمة فى زراعة متوك الأرز والنجيليات الأخرى (Chu, et al., 1975) (جدولى٢ و٣).

٦- يضاف أحيانا مستخلص درنات البطاطس إلى بيئة «Mille's medium» لزراعة متوك التبغ. واستحدثت بيئة «Potato II medium» تحتوى على ١٠٪ مستخلص بطاطس + ٥٠٪ من قوة العناصر الكبرى للبيئة «WH» + أملاح حديد + ثايمين Thiamine بالتركيز المذكور فى بيئة (MS). وزيادة نسبة الثايمين فى هذه البيئة يشجع إنتاج الكالس (Institute of Genetics, 1977b) (جدول ٤).

جدول (١) المكونات الأساسية لبيئات غذائية خاصة بزراعة المتوك وحبوب اللقاح (ملليجرام/لتر)

| المكونات | (MM) Modified Miller Chu, 1975 | (M) Miller 1963 | (0.5 MS) Murashige & Skooge 1962 | (H) Bourgin & Nitsch, 1967 | (K) Keller et al., 1975 |
|---|---|---|---|---|---|
| KNO3 | 2830 | 1000 | 950 | 950 | 2500 |
| $NH_2NO_3$ | - | 100 | 825 | 720 | - |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 463 | - | - | - | 134 |
| $Ca(NO_3)_2.4H_2O$ | - | 347 | - | - | - |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 166 | - | 220 | 166 | 750 |
| KCl | - | 65 | - | - | - |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 185 | 35 | 185 | 185 | 250 |
| $KH_2PO_4$ | 400 | 300 | 85 | 63 | - |
| $NaHPO_4.H_2O$ | - | - | - | - | 150 |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 4.4 | 4.4 | 11.2 | 25 | 10 |
| $H_2PO_4$ | 1.6 | 1.6 | 3.1 | 10 | 3 |

تابع جدول (١)

| المكونات | (MM) Modified Miller Chu, 1975 | (M) Miller 1963 | (0.5 MS) Murashige & Skooge 1962 | (H) Bourgin & Nitsch, 1967 | (K) Keller et al., 1975 |
|---|---|---|---|---|---|
| $ZnSO_4 . 7H_2O$ | 1.5 | 1.5 | 4.3 | 10 | 2 |
| KI | 0.8 | 0.8 | 0.4 | - | 0.75 |
| $Na_2MoO_4 . 2H_2O$ | - | - | 0.13 | 0.25 | 0.25 |
| $CuSO_4 . 5H_2O$ | - | - | 0.013 | 0.025 | 0.025 |
| $CoCl_2 . 6H_2O$ | - | - | 0.013 | - | 0.025 |
| $FeSO_4 . H_2O$ | 27.8 | - | 14 | - | - |
| $Na_2EDTA$ | 37.5 | - | 19 | 37.5 | - |
| NaFeEDTA | - | 32 | - | - | - |
| Sequestrene | - | - | - | Fe 330 | 40 |
| Thiamine- HCL | 1.0 | 0.1 | 0.05 | 0.5 | 10 |
| Pyridoxin- HCL | 0.5 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 1 |
| Nicotinic acid | 0.5 | 0.5 | 0.25 | 5.0 | 1 |
| Folic acid | - | - | - | 0.5 | - |
| Biotin | - | - | - | 0.05 | - |
| Glycine | 2 | 2 | 1 | 2 | - |
| Glutamine | - | - | - | - | 800 |
| m- Inositol | - | - | 50 | 100 | 100 |
| Sucrose x $10^3$ | 50 | 30 | 30 | 20 | 100 |
| pH | 5.8 | 6 | 5.5 | 5.5 | 5.8 |

جدول (٢) محتوى بيئة (N6) من العناصر والحديد والسكروز والأحماض الأمينية لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات (Chu, 1978)

| المكونات | التركيز | المكونات | التركيز |
|---|---|---|---|
| $(NH_4)2SO_4$ | 3.5 mM | FeSO4.7H2O | 5 mM (Solution) |
| $KNO_3$ | 0.03 M | Glycine | 0.027 mM |
| $KH_2PO_4$ | 3.0 mM | HCl-Thiamine | 3.0 µM |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.75 mM | HCl-Pyridoxine | 2.4 µM |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 1.13 mM | Nicotinic acid | 4.1 µM |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 0.02 mM | Sucrose | 0.15 M |
| $ZnSO_4.H_2O$ | 5.2 µM | Agar | 0.1 – 1.0% |
| $H_3BO_3$ | 0.025 mM | PH | 5.6 |
| KI | 4.8 µM | | |

□□□

جدول (٣) محتوى بيئة (N6) من الأكسينات والسيتوكاينينات
لزراعة متوك وحبوب لقاح النجيليات

| الهدف من الزراعة | مرحلة نمو حبوب اللقاح | السكروز (M) | إضافات هامة (M) | إضافات مفيدة (µM) |
|---|---|---|---|---|
| Callus induction: -Oryza sativa | -Middle or late uninuclear | 0.15 | 9.0 2,4-D | 5.4-11.0 NAA, 300-500 mg/l* |
| -Triticum, triticale, Secale | -Middle uni-nuclear | 0.23-0.29 | 9.0 2,4-D | *1.4-2.3 KIN, 500 mg/l LH, 0.55 mM myo-inositol, 0.4mg/l Vit. B, |
| -Zea mays | -Middle uni-nuclear | 0.35-0.44 | 9.0 2,4-D | * 2.3 KIN, 500 mg/l CH or LH, 0.5% activc carbon |
| Shoot from callus: -Oryza sativa | -Middle or late uninuclear | 0.15 | 0 | *2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN, |
| -Triticum, triticale, Secale | -Middle uni-nuclear | 0.23 | 0 | *2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN |
| -Zea mays | -Middle uni-nuclear | 0.23 | 0 | *2.9 IAA or 1.1 NAA, + 2.3-4.6 KIN |

تابع جدول (٣)

| إضافات مفيدة (μM) | إضافات هامة (M) | السكروز (M) | مرحلة نمو حبوب اللقاح | الهدف من الزراعة |
|---|---|---|---|---|
| | | | | Pollen embryo and plantlet |
| -- | 0 | 0.088 | -Middle or late uninuclear | -Oryza sativa |
| -- | 0 | 0.23 | -Middle uni-nuclear | -Triticum, triticale, Secale |
| -- | 0 | 0.35 | -Middle uni-Nuclear | -Zea mays |

c.f. Chu, 1978 * LH = Lactalbumin hydrolysate

جدول (٤) مكونات بيئة البطاطس Potato II medium لزراعة متوك القمح

| المكونات | التركيز | المكونات | التركيز |
|---|---|---|---|
| $(NH_4)2SO_4$ | 0.75 mM | FeSO4.7H2O | 0.1 mM (Solution) |
| $KNO_3$ | 9.9 m M | Aqueous potato | 10% |
| $KH_2PO_4$ | | medium | |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 1.5 mM | Glycine | - |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 0.51 mM | Na2EDTA . 2H2O | 0.11 mM |
| $MnSO_4.4H_2O$ | - | Thiamine-HCl | 3.0 μM |
| $ZnSO_4.H_2O$ | - | Pyridoxine-HCl | - |
| $H_3BO_3$ | - | Nicotinic acid | - |
| KI | - | Sucrose | 0.26 M |
| KCl | - | Agar | 0.1 – 1.0% |
| | 0.5 mM | PH | 5.8 |

c.f. Chu, et al., 1975

# طرق زراعة حبوب اللقاح

تزرع حبوب اللقاح مباشـرة فى أطباق بترى مثـل زراعة الخلايا الفردية ويمكن زراعتها معلقة فى بيئة سـائلة. وتستخدم إحدى الطرق الآتية لزراعة حبوب اللقاح وتكوين أجنة ذكرية Androgenesis.

## ١- طريقة الزراعة الحاضنة Nurse culture technique

تسـتخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح نبـات الطماطم *Lycopersicon esculentum*. حيث توضع المتوك على سـطح البيئة الغذائية الأساسـية الصلبة فى أطباق بترى ثم تغطى بقرص صغير من ورق الترشـيح. ثم تضاف قطرات من البيئة الغذائية المعلق بها حبوب اللقاح على أقراص ورق الترشـيح بمعدل ١٠ حبوب لكل قرص. ثم تحضن البيئة ومحتوياتها عند ٢٥°م مع وجود ضوء مستمر. وبعد ٢٨ يوما تقريبا تظهر عناقيد من خلايا خضراء بنسـبة ٦٠٪ من حبوب اللقاح المنزرعة، وهى مسـتعمرات خلوية أحادية العدد الكروموسومى. وثبت من هذه التجربة أنه لا يمكن إنتاج الخلايا الخضراء فى حالة زراعة حبوب اللقاح بدون وجود المتوك فى البيئة الغذائية. وبالرغم مـن نجاح هذه الطريقة فى زراعـة حبوب لقاح نباتات الطماطـم، إلا إن تطبيقاتها العملية ما زالت قاصرة على بعض الأنواع النباتية (Sharp, et al., 1972).

## ٢- طريقة القطرة المعلقة Hanging drop

تسـتخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقـاح الكرنب *Brassica oleracea* وحبوب لقـاح الهجـين "B. oleracea. x *B. alboglabra*" (Kameya and Hinata1970) ومضمونها:

– توضـع قطرة من البيئـة الغذائية مضاف إليها ماء جوز الهند، تحتوى القطرة على ٥٠– ٨٠ حبة لقاح، على غطاء شريحة زجاجية Cover ثم يوضع هذا الغطاء مقلوبا على شريحة زجاجية مقعرة.

– يفضل تثبيت عمود صغير من شمع البرافين وسط الشريحة المقعرة، ثم يثبت غطاء الشريحة الحامل للقطرة المعلقة مقلوبا على الشريحة المقعرة، ثم تثبت الشريحة المقعرة مع غطاء الشريحة بشمع البرافين وترج الشريحة بحركة دائرية لتحسين التهوية. وبعد أربعة أسابيع تتكون عناقيد من الخلايا المنبثقة من حبوب اللقاح.

### ٣– طريقة نيتش Nitsch, 1974; 1977 method

تستخدم هذه الطريقة لزراعة حبوب لقاح التبغ *Nicotiana tabacum* وتشمل الخطوات التالية:

– تفصل المتوك وتزرع فى بيئة سائلة تحت ظروف معقمة. ثم تحضن لمدة أربعة أيام عند ٢٧°م، بعدها تستخلص حبوب اللقاح من المتوك بواسطة جهاز المجنس Homogenizer، وتنقل إلى بيئة سائلة تحتوى على KNO3 (٨,٩ ملليمول) + NH4NO3 (٨,٩ ملليمول) + MgSO4,7H2O (٠,٧٥ ملليمول) + CaCL2 (١,٤٢ ملليمول) + KH2PO4 (٠,٥ ملليمول) + FeEDTA (١٠٠ ملليمول) + Glutamine (٥,٥ ملليمول) + Serine (٠,٩٥ ملليمول) + Myoinositol (٠,٠٣ مول) + Ze-atin (٠,٠٤٦ ميكرومول) + Indole Acetic Acid (IAA) (٠,٥٧ ميكرومول) + Sucrose (٠,٠٦– ٠,٢٣ مول).

– يرشح معلق الخلايا لفصل البيئة السائلة المحتوية على حبوب اللقاح والتخلص من بقايا جدر المتك، ثم يعامل الراشح المحتوى على حبوب اللقاح بالطرد المركزى لتكوين تجمعات عنقودية من حبوب اللقاح. ثم تفصل حبوب اللقاح وتغسل مرتين ببيئة سائلة باستخدام جهاز الطرد المركزى.

– تنقل حبوب اللقاح إلى بيئة سائلة طازجة لتكوين معلق خلايا كثافته حوالى٥٠٠٠ حبة لقاح/ ملليلتر.

– توزع أحجام متساوية (٢ ملليلتر) من معلق الخلايا فى طبقات رقيقة فى أطباق بترى صغيرة أو دوارق سعة ٢٥ ملليلتر. وتستخدم طريقة Bajaj, 1978a التالية إذا كان حجم معلق حبوب اللقاح صغيرا جدا.

### ٤- طريقة باجاج Bajaj (1978a) method

– توضع قطرة من السليكون فى وسط طبق بترى معقم من البلاستيك قطره ٥سنتيمتر. ثم يوضع غطاء شريحة مقاس ٢٢ X ٢٢ ملليمتر بحذر فوق قطرة السليكون.

– توضع قطرة ٢٥٠– ٥٠٠ ميكرولتر من معلق حبوب اللقاح فوق غطاء الشريحة باستخدام ماصة ميكرومترية. وتغطى الأطباق بواسطة غشاء Parafilm - M، ثم تحضن لمدة ٤– ٦ أيام تحت ضوء ضعيف (٥٠٠ لكس).

– تحضن الأطباق عند ١٤ ساعة ضوئية يوميا وشدة ضوئية ٢٠٠٠ لكس وحرارة ٢٨°م وتبقى حتى النهاية.

## عوامل إنجاح زراعة حبوب اللقاح

١– غسل حبوب لقاح نباتات التبغ والداتورا جيدا بعد فصلها من المتوك خطوة هامة للتخلص من المواد المانعة لإنباتها، وتعريضها للبرودة قد يؤدى إلى انقسام ميتوزى Mitosis طبيعى وتكوين أنوية خضرية وتناسلية طبيعية وزيادة حيويتها، وقد تسبب تشوهات فى الانقسام الميتوزى الأول وتثبيط مراحل تطور الجاميطات واختلاف فى إنتاج الأجنة الذكرية. ولذلك يوصى بعدم تعريض حبوب اللقاح للبرودة (Bajaj, 1978).

٢– تتكون الأجنة الذكرية من حبوب اللقاح المفصولة من نبات التبغ عند أية مرحلة من مراحل نمو حبوب اللقاح ابتداء من مرحلة وحيدة النواة Uninucleus والانقسام الميتوزى الأول First mitosis حتى الطور الأخير من تكوين النواتين Late binucleus. وتنخفض نسبة النجاح بدرجة كبيرة كلما تقدمت حبوب اللقاح فى العمر. وزراعة حبوب اللقاح وهى فى مرحلة متوسطة أو متأخرة من النمو وعندها تحتوى على نوية واحدة Mid- or late- Uninucleus– microspores تؤدى إلى الحصول على أفضل عائد من النباتات الأحادية. وحيث إن المتك الواحد يحتوى على جميع أطوار النمو المختلفة لحبوب اللقاح، ابتداء من مرحلة الخلايا الأمية

المنشـئة لحبوب اللقاح حتى مرحلة حبوب اللقاح كاملة النضج، فإن ذلك يؤكد إلى وجود تباين شديد فى النباتات الناتجة من زراعة المتك. وقد تأكد ذلك بزراعة متوك القمح ومحاصيل أخرى (He and Ouyang, 1980) (جدول ٥) .

جدول (٥) طور نمو حبوب اللقاح المناسب للزراعة المعملية

| Species | Pollen grain stage | References |
|---|---|---|
| - *Hordeum vulgare* | -Uninucleate or late uninucleate | -Clapham, 1971, Zhou & Yang, 1980 |
| - *Oryza sativa spp.* | -Mid or late uninucleate | -Guha et al., 1970, Wang et al., 1973 |
| | -Uninuclcate or late uniculate | -Ghua-Mukherjee, 1973 |
| - *Secalc cereal* | -Late uninucleate | -Sun, 1978 |
| - *Triticale* | -Uninucleate | -Sun, et al., 1973 |
| - *Triticum aestivum* | -Mid- or late uninucleate | -Ouyang,ct al., 1973, Pan & Gao, 1978 |
| - *T. aestivum x Agropyron glaucum* | -Late uninucleate | -Wang et al., 1973 |

## ٢ - زراعـة المـتوك Anther culture

### نباتات يمكن إكثارها بزراعة المتوك

تتميز طرق الزراعة المعملية للمتوك بأنها بسـيطة نسبيا وسريعة ولها كفاءة عالية فى إنتاج نباتات أحادية.

وأمكن إنتاج نباتات أحادية بزراعة متوك أو نباتات أحادية أو أنسـجة أحادية لنباتات عديدة مثل:

*Brassica campestris; Brassica oleracea; Brassica pekinensis; Brassica chinensis;*

*Lycopersicon spp.; Lycopersicon esculentum; Datura innoxia; Datura spp.;*

*Luffa echinata; Luffa cylindrica; Capsicum annum; Capsicum frutescens; Citrus limon; Citrus medica; Festuca arundinacea; Festuca pratensis; Nicotiana spp.; Populus spp.; Arachis spp.; Hyoscyamus spp.; Freesia spp.; Glycine max; Asparagus officinalis; Beta vulgaris; Fragraria virginiana; Sorghum vulgare; Saccharum sinensis; Tritical; Triticum aestivum; «T.aestivum x Agropyron glaucum»; Vicia faba; Vitis vinifera; Zea mays. Arabidopsis thaliana; Anemone spp.; Agropyron repens; Atropa belladonna;*
*Cassia fistula; Coffea arabica; Digitalis purpurea; Gladiolus; Hordeum vulgare ; Lilium spp.; Linum usitatissimum; Lotus corniculatus;*

## فصل وزراعة متوك نبات التبغ

نبـات التبغ من الأمثلة النموذجية لإنتـاج نباتات أحادية. وتنتخب المتوك غير الناضجـة لضمان احتوائهـا على حبوب لقاح وحيدة النـواة Uninucleus وهى فى مرحلة ما قبل الانقسام الميتوزى الأول (Zhou and Yang, 1980). ويمكن إجراء الآتى لإنتاج أجنة ذكرية Androgenesis.

١- تعقـم البراعم الزهرية فـى محلول هيبوكلوريت صوديـوم بتركز ١٪ (وزن/ حجم)، أو محلول كلوركس تجارى Clorox بتركيز ٥٪ (حجم/ حجم). ثم تغسـل البراعـم مرتين بماء مقطر معقم مرتين. وإذا فصلت البراعم الزهرية من نباتات نامية داخل صوبة محمية فلا تحتاج إلى تعقيم.

٢- تفصل المتوك بإحداث شـق من جانب واحد مـن البرعم الزهرى. ثم يضغط على الأسدية برفق لفصلها. ثم تفصل المتوك بحذر تام حتى لايحدث أى ضرر لها، وتستبعد المتوك التى حدث لها ضرر أثناء فصلها لأنها تميل عادة إلى تكوين كالس. ثم تجمع فى طبق بترى معقم وتزرع مباشرة على بيئة غذائية صلبة.

٣- تـزرع المتوك بمعدل ٥- ١٠ متوك فى الـدورف المخروطى مع مراعاة كثافة الزراعة المناسبة.

## الاحتياطات اللازمة لفصل وزراعة المتوك

١- تعتبر البراعم الزهرية المقفولة بعد تعقيمها سطحيا مصدرا جيدا للمتوك. حيث تـزال أوراق الكأس والتويج بحذر، مع الحـرص بعدم وصول مواد التعقيم إلى المتوك لتفادى الضرر الذى قد يحدث. وفى نباتات العائلة النجيلية مثل القمح والشعير تعقم السنبلة وهى مازالت متصلة بحامل السنبلة ثم تفصل السنبلة بعد تعقيمها.

٢- يفصل المتك تحت ميكروسـكوب إذا كان البرعم الزهرى صغيرا مثل نباتات Asparagus وBrassica. ويتـم ذلك بإزالة غلاف الزهرة Perianth فقط، والإبقاء على باقى أجزاء البرعم على اتصال مع الأسـدية. ولا يؤثر وجود بقايا أجزاء الزهرة فى البيئة الغذائية على طبيعة نمو حبوب اللقاح الموجودة داخل المتوك.

٣- فى حالة الأزهار والمتوك كبيرة الحجم تزال الأسـدية Stamens بأكملها مع الخيط الحامل لها، ثم توضع فى وضع أفقى ويفصل المتك من الخيط Filament بدقة وحرص. حيث لاتنتقل المواد الغذائية من البيئة الغذائية إلى المتك خلال الخيط وقد يسبب وجوده منع نمو حبوب اللقاح.

٤- تزرع المتوك بعد فصلها مباشـرة على بيئة مناسـبة صلبة أو سـائلة، بحيث يكون هناك اتصال مباشر بينها وبين البيئة الغذائية بما يضمن وصول المواد الغذائية إلى حبوب اللقاح. وزراعة المتوك فى بيئة سـائلة يجعلها تطفو على سطحها، لذلك يستلزم تثبيتها على جسر من ورق الترشيح.

٥- بالنسـبة للأزهار الكبيرة يمكن الحصول على كثافة جيدة من حبوب اللقاح بزراعة متك واحد/ ملليلتر بيئة سـائلة، حيث تعطى هذه الكثافة حوالى ٥ x ١٠$^{٤}$ حبة لقاح/ ملليلتر بيئة فى نبات *Datura innoxia* و٤ x ١٠$^{٤}$ حبة لقاح/ ملليلتر بيئة فى نبات *Nicotiana tabacum*. ويمكن زيادة عدد المتوك/ ملليلتر فى البيئة السـائلة بالنسبة للبراعم الزهرية الصغيرة للحصول على نفس الكثافة تقريبا.

٦- تنبـت حبوب اللقاح بعد ٣ - ٤ أسـابيع من زراعـة المتوك منتجة نبيتات أحادية لا تشـابه النباتـات الثنائية المأخوذة منها. وقد ينتـج المتك الواحد أعدادا

كبـيرة من النبتـات، ويفضل فصلها عن بعضها مباشـرة بعد تفتـح المتك. وفصل النبيتات فى هذه المرحلة المبكرة يساعد على فصلها ونقلها بسهولة إلى بيئة طازجة جديدة، بينما يؤدى التأخير فى فصل النبتات إلى تداخل وتشـابك جذورها داخل المتك المتفتح مما يؤدى إلى تكوين كالس وتكوين أعداد أخرى من الأفرع.

٧- تنقـل النباتات ذات المجموع الجذرىالجيـد إلى عبوات تحتوى على بيت موس ورمل. ويجب إزالة آثار الأجار جيدا من الجذور قبل النقل. ثم تنقل النباتات للصوبة لتبقى تحت الرى الرزازى (الضبابى) Mist irrigation لمدة عشرة أيام لإتاحة الفرصة لتكوين مجموع جذرى يقوم بوظيفته جيدا.

## البيئة الغذائية المناسبة لزراعة المتوك

تسـتخدم بنجـاح بيئـات White, 1963, Murashge and skoog, 1962 Nitsch Nitschm 1969, وغيرها من البيئات المشتقة منهم فى الزراعة المعملية لمتوك الدخان وقد أدخل عليها بعض التطويرات. ويعتبر الحديد من العناصر الهامة المضافة لبيئة المتوك. وتصنف الأنواع النباتية كالتالى:

### ١- أنواع نباتية لا تحتاج منظمات نمو

تعتـبر بيئـة Murashige and Skooge, 1962 (MS) والإضافـات التىأحدثهـا Nitsch, (1967) أساسـية لزراعة متوك وحبوب لقاح هذه المجموعة من النباتات. وإضافة الفيتامينات والحديد والسـكروز لهم أهمية فى تحفيز نمو وتكوين النبتات مـن حبوب اللقاح أو الكالس. ولا تحتاج هـذه المجموعة إلى منظمات نمو. وتتميز حبوب اللقـاح فيها أنها ثنائية الخليـة Bicellular. وتضم هذه المجموعة الأنواع النباتية الآتية:

*Datura innoxia ; Hyoscyamus niger ; Petonia hybrida; Nicotiana tabacum; N. sylvestris ; N. panculata ; N. knightiana.*

وإضافة الفحم النباتى النشـط تحت البيئة الصلبة فى وعاء زراعة المتوك يسـاعد علـى تكوين كالس جيـد وإنتاج أعداد كبـيرة من النبتات لقدرتـه على امتصاص المركبات المثبطة للنمو والمواد الضارة التى يفرزها جدار المتك (Nitsch, 1972, 1974) . والتركيـز الأمثل للسـكروز هو ٠,٢٦ مولر فى بيئة متوك القمـح و٠,٣٥ مولر لمتوك الذرة. ويفضل زيادة السـكروز فى بيئة متوك النجيليات بوجه عام من ٢- ٤٪ إلى ٨- ١٢٪، وزيادة السكروز فى بيئة متوك نباتات Barley وRapeseed وTriticalمن ٠,١٨ إلى ٠,٣٥ مولر .(Chen and Li, 1978) ويبين جداول (٢ و٣) البيئات المناسبة لزراعة حبوب اللقاح ومتوك النجيليات.

## ٢- أنواع نباتية تحتاج إلى منظمات نمو

تضـاف منظمـات النمـو إلى بيئات متـوك وحبوب لقاح هـذه المجموعة من النباتـات، وتختلف احتياجاتها باختلاف النوع والصنف النباتى. وتحتوى هذه الأنـواع على حبوب لقاح ثنائيـة Bicellular أو ثلاثية Tricellular الخلايا، مثل الأنـواع التابعة للأجناس *Tritical; Triticum; Oryza; Hordeum* . ويتكون الكالس إذا زرعت متوك هذه النباتات. وقد تنتج أجنة تنمو وتكون نباتات مثل *Brassica campestris* و*Asparagus officinalis*. والأوكسـينات هى أهم الهرمونات المؤثرة فـى طبيعة نمو المتوك، وحاجتها من السـيتوكاينين ومنظمات النمو الأخرى أقل كثيرا من حاجتها للأوكسينات. ومن الأكسينات مركبات عديدة أهمها:

. 3-Indole Acetic Acid (IAA). 3-Indole Butaric Acid (IBA). Naphthalene Acetic Acid (NAA). 2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T). 2,4-Dichloro-phenoxy
Acetic Acid (2,4-D). 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA).
4-Amino- 3,5,6-Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ومن السيتوكاينينات مركبات عديدة أهمها:

. 6-Benzyl Amino Purine (BAP). 6-Benzyl Adenine (BA).
Isopentenyl Adenine (IPA). 6-y-y-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip).

5-( 4-Hydroxy-3-Methyl-trans-2-Butenylamino) Purine (Zeatin).
6-Furfuryl - Amino Purine (Kinetin = KIN).

والأنواع النباتية التى تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثلاثية الخلايا Tricellular تحتاج إلى إضافة سكروز بنسبة ٥ – ١٥٪. بينما الأنواع التى تحتوى متوكها على حبوب لقاح ثنائية الخلايا Bicellular فيضاف السكروز بنسبة ٢ – ٥٪. والسكروز له تأثير منظم للضغط الأسموزى فى البيئة الغذائية. والتركيز العالى للسكروز ضرورى جدا لتحفيز متوك نبات *Brassica campestris* للنمو، حيث يضاف بتركيز ١٠٪ للبيئة + ٠,١ ملليجرامل‍تر من كل من 2,4-D NAA . ويضاف السكروز بتركيز ١٢٪ إلى بيئة متوك نبات الشعير *Hordeum vulgare*، وبتركيز ٦ – ٩٪ إلى بيئة الأجناس *Triticum; Tritical; Oryza* مضاف إليه ٢ ملليجرامل‍تر 2,4-D، وبتركيز ١٢٪ لمتوك الذرة *Zea mays* مضاف إليه ٢ ملليجرام/ لتر من Kinetin و-2,4 D. وتعتبر المكونات الأساسية لبيئة (MS) هى الأفضل للأجناس *Zea* و*Tritical* و *Triticum*. ولبيئة Miller (M) قبول واسع فى زراعة متوك الأرز ومتوك نباتات أخرى دون غيرها من البيئات. وقد حدثت بعض التغييرات على بيئة Miller (M) مثل زيادة تركيز النترات وتخفيض الأمونيوم، وعرفت هذه البيئة بعد تحديثها بالرمز (MM)، وتستخدم خاصة لزراعة متوك نبات *Brassica campestris* ويضاف مستخلص الخميرة وماء جوز الهند ومستخلص البطاطا والأحماض الأمينية Gluta-mine و Asparagine إلى مكونات البيئة (MM) لزيادة معدل نمو الكالس من حبوب اللقاح وتكشفه إلى أجنة. ويتم إنتاج النباتات من الكالس بإضافة تركيزات مختلفة من الهرمونات، وتخفيض السكروز إلى ٢ – ٣٪. وبتقدم عمر الكالس تنخفض قدرته بشدة على إنتاج نباتات كاملة. كذلك يمكن تغيير نوع وتركيز أملاح العناصر الغذائية فى البيئة. ويفضل قبل نقل النباتات الصغيرة من البيئة الغذائية إلى التربة أن تسبقه الزراعة فى بيئة سائلة ضعيفة تحتوى على أملاح العناصر الغذائية المذكورة فى بيئة White, 1963 + سكر مختزل بتركيز ٠,٥ – ١٪.

## تحضين المتوك وحبوب اللقاح

تحصن المتوك وحبوب اللقاح بعد زراعتها عند ٢٤–٢٨٠°م. وارتفاع الحرارة عن ٣٠°م تسبب اختلافا كبيرا فى إنتاج ونمو الكالس وعدد النباتات الناتجة منه. وكان ذلك مؤكدا بالنسبة لنباتات القمح ولفت الزيت. وأن النباتات المعملية الناتجة من متوك القمح المفصولة من سنبلة الفرع الرئيسى كانت أكثر من سنابل الأفرع الجانبية (Hu, et al, 1982). وتعريض متوك القمح والأرز ومحاصيل نجيلية أخرى لحرارة منخفضة ١– ٤°م لمدة ٤٨ ساعة قبل زراعتها يؤدى إلى زيادة تكوين الكالس وزيادة الاختلافات (Institute of Genetics,1977a) (جدول ٦). بينما لايوجد ما يشير إلى أهمية الضوء فى المرحلة الأولى من زراعة حبوب اللقاح ومتوك التبغ. ويفضل تعريض حبوب اللقاح والمتوك لفترة ظلام قصيرة جدا يتبعها ضوء مستمر لمدة ١٤ ساعة يوميا شدته ٢٠٠٠ لكس لتشجيع نمو النباتات من المتوك وزيادة عددها. بينما جاء فى مضمون بعض الأبحاث على نباتات *Hyoscyamus niger* و *Datura in-noxia* أن ١٦ ساعة ضوء فلوروسنت شدته ١٥٠٠ لكس Lux وحرارة ٢٨°م يعقبها ٨ ساعات ظلام وحرارة ٢٠°م أعطت أفضل عدد من النباتات. كما أن زيادة تركيز ثانى أكسيد الكربون والإيثلين داخل أوانى الزراعة يؤثر تأثيرا ضارا على نمو حبوب اللقاح وتكوين الأجنة. لذلك يضاف للبيئة ايدروكسيد بوتاسيوم لقدرته على امتصاص ثانىأكسيد الكربون ومركب Mercuric perchlo-rate لقدرته على امتصاص الإيثلين وإضافة ٨– ٤٠ ملليجرام/ لتر من 2-Chlo-roethyl– phosphonic acid (مادة منتجة للإيثلين) للبيئة تؤدى إلى تضاعف استجابة متوك الأرز *Oryza sativa* للنمو. ومضمون ذلك أن حبوب اللقاح والمتوك تختلف باختلاف نوع النبات فى احتياجها من الظروف الهوائية والغازية لتحفيز نمو وتكوين الأجنة وتكشفها.

جدول (٦) درجات الحرارة والمدة المناسبة لإنبات متوك بعض النجيليات

| Species | (°C) | Duration |
|---|---|---|
| Hordeum vulgare | 3 | 48 h. |
| Oryza sativa | 10 | 48 h. or 4 - 7 days |
| Secale cereal | 6 | 3- 15 days |
| Triticale | 3- 5 | 72 hr. |
| Triticun aestivum | 3- 5 | 48 hr. |

## منشأ الأجنة الأحادية Haploid embryogenesis

### ١- أجنة ذكرية المنشأ والتكوين Androgenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ فى المعمل من حبوب لقاح (جاميطات ذكرية) Microspores أو متوك بعد زراعتها فى المعمل. وينتج عنها نباتات أحادية. وتختلف هذه النباتات وراثيا وظاهريا عن نبات الأم الذى فصل منه حبوب اللقاح والمتوك. وتنشأ الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

### (أ) منشأ أجنة ذكرية من حبوب اللقاح Pollen embryogenesis

– تكوين مباشر للأجنة الذكرية Direct embryogenesis حيث تنتج أجنة أحادية العدد الكروموسومى مباشرة من حبوب اللقاح بدون الدخول فى مرحلة تكوين الكالس. وبعد ٣– ٤ أسابيع تظهر الأجنة فى صورة نموات أنبوبية تنمو وتتطور إلى نبتات أحادية العدد الكروموسومى.

– منشأ غير مباشر للأجنة Indirect embryogenesis حيث يتكون كالس أحادى العدد الكروموسومى من حبوب اللقاح. ثم يتكشف الكالس إلى أجنة أحادية ينتج عنه نباتات أحادية.

### (ب) منشأ أجنة ذكرية من المتوك Anther embryogenesis

حيث ينتج عن زراعة المتوك نباتات مختلفة المستوى فى التضاعف الكروموسومى. فالنباتات الناتجة من حبوب اللقاح تكون أحادية العدد الكروموسومى، والنباتات الناتجة من خلايا جدار المتك والخلايا الضامة تكون ثنائية العدد الكروموسومى لأنها خلايا جسمية. وتختلف الفترة اللازمة لخروج النبتات من المتك باختلاف الأنواع النباتية. فتحتاج متوك الدخان من ٣ إلى ٥ أسابيع، وتحتاج متوك نبات الأتروبا والأرز إلى ٨ أسابيع. والمتوك المحتوية على حبوب لقاح وحيدة النواة Uninucleus والمزروعة على بيئة (MS) يتحول لونها إلى اللون البنى خلال أسبوعين بدون ظهور أى نمو. وبعد أسبوعين آخرين تظهر نموات أنبوبية هى عبارة عن أجنة مصدرها حبوب اللقاح فى المتك، حيث تتطور بعد ذلك لتصبح نبتات أحادية العدد الكروموسومى Pollen embryogenesis. وقد يظهر عند الطرف القاعدى للمتك خلايا كالس تنمو حتى تغطى كل المتك وقد تنتج نبتات من الكالس ثنائية العدد الكروموسومى لأن مصدرها خلايا جسمية. وبعد ٦ أسابيع تقريبا يمكن نقل النباتات إلى التربة.

### ٢- أجنة أنثوية المنشأ والتكوين Genogenesis

هى أجنة أحادية العدد الكروموسومى تنشأ من بيضة غير مخصبة، وينتج عنها نبتات أحادية مختلفة وراثيا ومظهريا عن النبات الأم المفصول منه البيضة. وتنشأ هذه الأجنة الأحادية بإحدى طريقتين:

#### - نشوء الأجنة البكرية Parthenogenesis

قد تتكون نباتات أحادية تلقائيا بنسبة لا تزيد عن ٠,٠١٪ بدون تدخل الإنسان. وهى من الحالات النادرة التى تحدث فى بعض النباتات دون غيرها. ومصدر إنتاج الأجنة البكرية هو المبيض. فقد ينشط المبيض وينمو مكونا ثمرة تحتوى على بذور بدون اخصاب. وهذه البذور أحادية العدد الكروموسومى، وبزراعة هذه البذور فى

المعمل تنتج نباتات أحادية ضعيفة النمو صغيرة الحجم عقيمة وغير قادرة على الانقسام الاختزالى وتكوين خلايا تناسلية، لأنها تحتوى على كروموسومات غير متشابهة ولا تستطيع أن تكون أزواجا كروموسومية Bivalents، وهذه من خصائص المجموعة الكروموسومية الأحادية. وتتكون الأجنة الأحادية ذاتيا فى الطبيعة من خلال التكوين البكرى، أى بدون إخصاب، نتيجة لزيادة محتواها من هرمونات النمو وقد يحدث التلقيح وتنبت الأنبوبة اللقاحية من حبة اللقاح ولكنها تكون غير قادرة على استكمال نموها والنفاذ إلى المبيض وإتمام الإخصاب. ويكون دور حبوب اللقاح فى هذه الحالة هو تنبيه المبيض فقط لإفراز هرمونات النمو.

**- نشوء الأجنة من البيضة**

هى أجنة تنشأ من البيضة غير المخصبة (الجاميطة المؤنثة) بعد فصلها وزراعتها فى المعمل. وهى أجنة أحادية العدد الكروموسومى ينتج عنها نباتات أحادية لها نفس مواصفات الأجنة البكرية.

## بعض الممارسات الوراثية لإنتاج أجنة أحادية

**١- طريقة إقصاء الكروموسومات** Chromosomes elimination

تستخدم هذه الطريقة لإنتاج أجنة شعير أحادية العدد الكروموسومى Haploid بكفاءة عالية. وتعتمد هذه الطريقة على إدخال نوع الشعير *Hordeum bulbosum* فى تهجين مع النوع *Hordeum vulgare* لإنتاج هجين *"H. bulbosum x Hordeum vulgare"*. فتنمو أجنة الهجين لمدة ١٠ – ١٤ يوما من الإخصاب ثم تموت بعد اختفاء كروموسومات النوع *H. bulbosum*. فإذا فصلت أجنة الهجين مبكرا بعد ١٠ أيام من الإخصاب قبل موتها ثم زرعت على بيئة (B5) خالية من الأكسين 2,4-D فإنها تستمر فى النمو وتكون نباتات معظمها أحادية العدد الكروموسومى (n = 7)

Monoploid، تحتوى على كروموسومات النوع *Hordeum vulgare* فقط. وبمعاملة النباتات بالكولشسين تنتج نباتات ثنائية متجانسة من النوع *H. vulgare*. وتحتوى الخلية الجسمية للشعير ثنائية العدد الكروموسومى Diploid على ١٤ كروموسوما (2n = 14). والجاميطة المذكرة والمؤنثة هى خلايا أحادية Haploid تحتوى على نصف عدد الكروموسومات (n = 7). وباندماج الجاميطتين عن طريق التلقيح والإخصاب ينتج الهجين *H. vulgare» x «H. bulbosum* الذى تحتوى أجنته على ١٤ كروموسوما، أى أجنة ثنائية العدد الكروموسومى (2n = 14) وخاصية إقصاء Elimination كروموسومات النوع *H. bulbosum* بعد التهجين هى صفة وراثية بصرف النظر عن استخدامه كأب أو أم فى التهجين أو إذا كان ثنائيا Diploid أو رباعيا Tetraploid.

كذلك تم الحصول على نباتات قمح أحادى بتهجين قمح سداسى *Triticum aestivum (2n = 6X = 42)* مع شعير ثنائى *H. bulbosum (2n = 2X = 14)*. وقد حدث إقصاء (تخلص ذاتى) لكروموسومات النوع *H. bulbosum* وتكونت أجنة أحادية من القمح *T. aestivum* ( n = 3X = 21 ). وقد تميزت هذه الطريقة عن طريقة زراعة المتوك فى إنتاج نباتات أحادية العدد الكروموسومى من أى صنف تجارى من الشعير. ومعدل إنتاج النباتات الأحادية مرتفع جدا. كذلك يمكن الاستفادة من هذه الطريقة فى إنتاج نباتات أحادية متضاعفة Dihaploids من نباتات البطاطس *Sola-num tuberosum* الرباعية Tetraploids بواسطة تهجين النوع *Solanum tuberosum* بحبوب لقاح من النوع *S. phureja* الثنائى.

## ٢- زراعة الإندوسبرم Endosperm culture

تم الحصول على كالس وأجنة ونبتات ثلاثية التضاعف الكروموسومى Triploids بزراعة نواة الإندوسبرم المفصولة من الكيس الجنينى للموالح (3n = 27) بعد حوالى شهرين من الإخصاب. وقد تحقق ذلك بزراعة الاندوسبرم المفصول من الموالح *Citrus grandis* L. Osbeck صنف Bei Pei Pummels والنوع *C. sinensis* Osbeck صنف Chin- Cheng or-ange على بيئة غذائية (2 MT) مضافا إليها (GA3) بتركيز ٥,٧٧ – ٤٣,٣ ميكرومولر.

# العوامل المؤثرة فى تكوين الأجنة الذكرية

## Androgenesis

تنتــج أجنة ذكرية فى المعمــل بزراعة متوك بعض الأنواع النباتية التابعة للعائلة الباذنجانيــة Solanaceae والنجيلية Gramineae والصليبيــة Cruciferae. والعوامل المؤثرة فى إنتاج الأجنة الذكرية منها:

### ١- عمر النبات

يؤثر عمر النبات والمرحلة الفسيولوجية تأثيرا واضحا على تكوين الأجنة الذكرية. فالأزهــار المفصولة من نباتات حديثة العمر نسـبيا وفى بداية موســم التزهير تكون مناسبة لإنتاج أجنة ذكرية أكثر من البراعم الزهرية المفصولة من نباتات متقدمة فى العمر أو فى نهاية موسم التزهير.

### ٢- مرحلة نمو حبوب اللقاح

مرحلة نمو حبوب اللقاح من العوامل الهامة المؤثرة فى إنتاج أجنة ذكرية. فزراعة متــوك التبــغ والداتورا والهيوســيامس *Hyoscyamus* وهى فــى مرحلة تكون فيها حبوب اللقاح أحادية النواة Uninucleate تنتج نباتات أحادية العدد الكروموســومى فقط. بينما زراعة حبوب لقاح متقدمة فى العمر تعطى نباتات متعددة فى مســتوى التضاعف الكروموســومى، وكانت أفضل النتائج بالنســبة لنباتات التبغ والطماطم عندما كانت حبوب اللقاح فى مرحلة ثنائىالنواة Binucleate .

### ٣- الصدمات الحرارية Thermal shocks

الصدمات الحرارية المرتفعة أو المنخفضة أو المتبادلة مع بعضهما تظهر نجاحا فى تكوين الأجنة الأحادية فى مزارع المتوك وحبوب اللقاح، وقد تحقق ذلك فى نباتات

الداتـورا والطماطم والأتروبا والتبغ. والمعاملة الباردة التى يعقبها فترة قصيرة حرارة مرتفعة تؤدى إلى انقسام متكرر لحبة اللقاح. وتعريض متوك نبات الكرنب *Brassica* لحرارة ٣٠°م لمدة ٢٤ سـاعة أو ٤٠°م لمدة سـاعة واحدة كان له تأثير منشط لتكوين الأجنة الذكرية (Keller, et al. 1981). وقد فسـر ذلك بأن المعاملة الباردة لها تأثير غير مباشر فى زيادة عدد الأجنة الذكرية، والحرارة المنخفضة ٣– ٥°م تحافظ على حيوية حبوب اللقاح مدة طويلة وتؤخر شـيخوختها وتمنع اجهاضها. ويزداد بذلك عدد حبوب اللقاح القادرة على تكوين أجنة ذكرية (Bajaj 1978a). بينما الصدمات الحرارية تؤدى إلى تحلل الأنابيب الدقيقة Microtubules وتشتت خيوط المغزل من مكانها وتسبب انقسامات شاذة لنواة حبة اللقاح.

### ٤- الفحم النباتى Active charcoal

إضافة الفحم النباتى بنسـبة ٢٪ إلى البيئـة المزروعة بمتوك نبات التبغ يؤدى إلى زيـادة عدد الأجنة الذكرية مـن ١٥٪ إلى ٤٥٪ للصنف هافانا Havana، ومن ٤١٪ إلى ٩١٪ للصنف Badischer Burley. ويؤدى إلى زيادة عدد النباتات وسرعة نموها، ويؤدى أيضا إلى زيادة عدد الأجنة الذكرية للأنيمون Anemone والشـوفان Rye والبطاطـس. وينشـط تكويـن الأجنة الذكرية لنبات الجـزر فى حالة غياب الأكسـين من البيئة. وإضافة الأكسين للبيئة ينشـط تكوين الأجنة الذكرية لنبات التبـغ فـى حالة غياب الفحـم النباتى. وترجع أهمية الفحم النباتى فى تنشـيط وإنتـاج الأجنـة الذكرية لبعض الأنـواع النباتية إلى قدرته علـى امتصاص مركب 5- Hydroxymethyl furfural الناتـج من السـكروز أثناء تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وغيره من المركبات السـامة التى تسـبب موت الأجنة الذكرية النامية من حبوب اللقـاح. كما أن الفحم النباتى يقـوم بتنظيم امتصاص منظمات النمو الداخلية En-dogenous والخارجية Exogenous.

## طرق الحصول على أجنة أحادية من البيضة

### ١- زراعة بويضات غير مخصبة فى المعمل

هى وسيلة لإنتاج نباتات أحادية تحمل صفات الأم. ويتم ذلك بزراعة البيضة غير المخصبة. وقد أمكن إنتاج نباتات أحادية من نبات *Aerva tomentosa* بزراعة البراعم الزهرية أو السنابل غير المخصبة.

### ٢- تنبيه المبيض باستخدام حبوب لقاح غير مكتملة الحيوية

ينشط المبيض باستخدام حبوب لقاح غير كاملة الحيوية أو من أنواع بعيدة القرابة. وتعريض حبوب اللقاح لجرعات مناسبة من أشعة جاما أوالأشعة السينية يؤدى إلى خفض حيويتها بحيث يكون لها القدرة على الإنبات واختراق الميسم والقلم لمسافة محدودة ثم تموت قبل الوصول إلى الكيس الجنينى، وهذه المعاملة تعمل على تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة أحادية تحمل نصف عدد كروموسومات الأم. فإذا زرعت الأجنة مبكرا فى المعمل تنتج نباتات أحادية عقيمة لا تنتج بذورا إلا إذا تحولت إلى نباتات ثنائية بالكولشسين.

### ٣- تنبيه البيضة بالصدمة الحرارية Thermal shocks

قد تؤدى المعاملة الحرارية المفاجئة إلى تنبيه المبيض للنمو وتكوين أجنة بكرية بدون إخصاب. وبزراعة هذه الأجنة تنتج نباتات أحادية. وقد تحقق ذلك بتعريض نباتات الداتورا *Datura stramonium* إلى حرارة منخفضة أثناء الإخصاب، وتعريض نباتات التبغ إلى حرارة منخفضة أو مرتفعة، وتعريض نباتات الشوفان Rye إلى ٣°م. وفى جميع هذه الحالات تكون النباتات الناتجة فى المعمل أحادية عقيمة ناتجة أصلا من البيضة وتحتوى على كروموسومات البيضة فقط. ولإنجاح هذه التجربة يجب تعريض كل من البيضة وحبة اللقاح إلى نفس الصدمة الحرارية. وتسبب الصدمات الحرارية

المفاجئة إلى تغيير نظام انقسام نواة حبة اللقاح والبيضة. فقد وجد أن معاملة حبوب لقاح نبات *Hyoscyamus orientalis* بالبرودة فقط تفقدها القدرة على الإخصاب.

### ٤- تنبيه البيضة بالمعاملة الكيميائية Chemical treatment

تحدث بعض الكيماويات ظاهرة الأجنة البكرية Parthenogenesis، فلوحظ نشاط البيضة داخل الكيس الجنينى وانقسامها عدة انقسامات متتالية بعد حقن مبيض نبات البيتونيا بمركب بلفيتان Belvitan.، أو رش النباتات ببعض منظمات النمو مثل الإيثريل Ethrel التى تسبب عقما ذكريا ويبقى المبيض حيا ليكون ثمرة.

## الإخصاب المعملى In vitro fertilization

يواجه مربو النبات بعض الظواهر مثل عدم التوافق الذاتى Self- incompatibility وعدم التوافق الخلطى Cross-incompatibility. ويعنى ذلك عدم إنباتَ حبة اللقاح على الميسم وعدم حدوث إخصاب، وقد تنبت حبة اللقاح وتخرج منها أنبوبة لقاحية ولكنها لا تستطيع استكمال مسارها داخل القلم وتتوقف قبل الوصول إلى المبيض ولا يكتمل الإخصاب. وقد يحدث إخصاب لخلية البيضة ويتكون الجنين ولكنه يتوقف عن النمو ويموت مبكرا. ومضمون ذلك أن عدم التوافق يؤدى إلى عدم تكوين البذور. ولم تظهر فكرة الإخصاب المعملى داخل أنبوبة اختبار قبل ١٩٦٢. وفى الواقع أن المعلومات حول الإخصاب المعملى مازالت محدودة.

## طرق الإخصاب المعملى

### ١- إخصاب الميسم Stigma fertilization

فى هذه الطريقة تعقم الزهرة الخنثى تعقيما جيدا، مع الحرص بعدم ملامسة الميسم لمادة التعقيم لفترة طويلة حتى لا يؤدى إلى إزالة المادة اللزجة وعدم التصاق

حبوب اللقاح على الميسم. ويزرع المبيض المعقم على بيئة غذائية صلبة فى أنبوبة اختبار، ثم تنثر حبوب اللقاح من المتك على الميسم. وهذه الطريقة مماثلة للإخصاب الذى يتم فى الحقل. ويمكن استخدامها إذا كان المبيض يسقط مبكرا قبل النضج. ويعتبر إخصاب الميسم أفضل من إخصاب المشيمة لنبات التبغ وتستخدم هذه الطريقة بنجاح مع الأنواع:

*Antirrhinum majus; Pisum sativum; Lathyrus odoratus; Zea mays; Glycine max; Nicotiana rustica; Nicotiana tabacum; Petunia violaeea.*

### ٢- إخصاب المشيمة Placental fertilization

تفصل مشيمة محتوية على بويضات غير مخصبة من زهرة معقمة جيدا. ويتم ذلك تحت ستريوميكروسكوب ثم تزرع فى بيئة غذائية. وتعقم المتوك وهى فى مرحلة ما قبل الانفتاح مباشرة. وتستخدم المتوك التى تنفتح أثناء التعقيم، وينثر منها حبوب اللقاح قريبا من البويضات غير المخصبة. وينتظر حتى تنبت حبوب اللقاح وتخترق الكيس الجنينى Embryo-sac. وقد نجحت هذه الطريقة مع نباتات العائلة *Caryophyllaceae* والأنواع النباتية التابعة لجنس القطن *Gossypium* والذرة *Zea mays*.

## عوامل إنجاح الإخصاب المعملى

- أن تكون حبوب اللقاح والبويضات فى حالة فسيولوجية وتكوينية سليمة.
- يجب أن تتغير مكونات البيئة الغذائية بتغيير مرحلة النمو ابتداء من إنبات حبوب اللقاح والإخصاب ونمو الجنين، وقد يضاف إليها بعض المعقدات الطبيعية المناسبة لكل مرحلة.
- درجة حرارة التحضين قد تكون عاملا هاما لإنجاح عملية الإخصاب، فمثلا يحتاج البنفسج *Narcissus* إلى التحضين عند أقل من ٢٥°م ويحتاج الخشخاش *Papaver somniferum* للتحضين عند أكثر من ٢٥°م.
- ينجح إخصاب المشيمة أحيانا إذا كانت النباتات تحتوى بصورة طبيعية

علـى ظاهـرة عدم التوافق الذاتى. ومن أمثلة ذلـك التهجين بين نباتات نوعين من البيتونيا: *Petunia axillaris* و*Petunia hybrids*.

– ينجح التلقيح الخلطى أحيانا حتى ولو كان غير ناجح فى الحقل. وقد تم إنتاج نباتات هجن من نبات التبغ نوع *Nicotiana alata* بعد إخصاب البويضات فى أنبوبة اختبار بحبوب لقاح من نبات التبغ نوع *Nicotiana tabacum*.

## طرق مضاعفة العدد الكروموسومى

### ١– تضاعف العدد الكروموسومى بدون انقسام النواة Endomitosis

الخلايا الأحادية Haploids هى خلايا غير مستقرة أثناء الزراعة المعملية، وتميل دائمـا إلى مضاعفة العدد الكروموسـومى ذاتيا بدون انقسـام للنواة، فيتضاعف عدد الكروموسومات داخل النواة وتصبح خلية ثنائية.

### ٢– المعاملة بالكولشسين Cholchicine treatment

يسـتخدم الكولشسـين على نطاق واسع كمانع لتكوين خيوط المغزل Spindle والصفيحة الوسـطى Middle lamella بالخلية، فيتضاعف عدد الكروسـومات بها وتصبح خلية واحدة متضاعفة ينتج عنها نبات متضاعف Polyploid. وقد تم الاسـتفادة من هذا المركب للحصول على سـلالات ثنائية متجانسـة Homozygous lines من خلال الزراعـة المعملية لخلايا أو أنسـجة أحادية العدد الكروموسـومى. ويتـم ذلك بزراعة المتوك ومعاملـة النبتات الأحادية الناتجة- وهى مازالت متزاحمة ومحاطة بجدار المتك - بمادة الكولشسـين بتركيز ٠,٥٪ ولمدة ٢٤– ٤٨ ساعة ثم تغسل جيدا بعد إخراجها من المتك ثم يعاد زراعتها معمليا بعد فصلها عن بعضهـا. كذلك يمكن معاملة النباتـات الناضجة بعجينة من اللانولين Lanolin تحتوى على ٠,٤٪ كولشسين وتضاف إلى إبط الأوراق. وعند الحصول على نباتات ثنائية خصبة متجانسة يمكن استخدامها كسلالات نقية Inbred lines تدخل بعد ذلك فى إنتاج الهجن.

□□□