الباب الخامس عشر
مزارع الأنسجة Tissue Culture

تعريف مزارع الأنسجة:

هى عبارة عن زراعة أى جزء من النبات أو أى نسيج معين من النبات أو حتى أى خلية مفردة من النبات أو بروتوبلاست عارى أى عديم الجدار وذلك على بيئات صناعية فى المعمل وذلك لإنتاج أعضاء أو أجزاء معينة من النبات مثل الساق أو الجذر أو أنسجة معينة مثل نسيج callus الكلس أو حتى النبات الكامل ويكون ذلك فى ظروف معقمة تماماً.

مقدمة تاريخية عن مزارع الأنسجة:

يعتبر Hiberlandetسنة ١٩٠٢ أول من حاول زراعة خلية واحدة على بيئة صناعية ولم يتمكن من زراعة خلية واحدة منفردة وباءت جميع محاولاته بالفشل.

ويعتبر Whiteسنة ١٩٣٤ أول من نجح فى عمل مزارع للأنسجة وذلك بزراعة الجذور لنبات الطماطم على بيئة صناعية. أمكن إنتاج جذوراً أكبر حجماً وأكثر عددا.

تمكن Gauthert سنة١٩٣٩ من زراعة جزء من نسيج نبات الصفصاف من ساق النبات وإنتاج نسيج الكلس callus وقد أمكن بعد ذلك عمل تجارب كثيرة وإنتاج نسيج الكلس من نباتات كثيرة منها جذر نبات الجزر.

نسيج الكلس callus هو عبارة عن كتلة من خلايا رقيقة الجدر يوجد فى أجزاء منها خلايا مرستيمية تنقسم لتزيد من حجم نسيج الكلس. وبمعاملات معينة يمكن لنسيج الكلس أن يتميز إلى أنسجة النباتات المختلفة فمنه يتكون نسيج الخشب ونسيج اللحاء وقد يتكون منه خلايا كلورانشيمية.

تمكن Miller و Skoogسنة١٩٥٤ من زراعة أجزاء من نخاع ساق نبات الدخان وقد أمكن إثبات أنه توجد مركبات خاصة تساعد على تكوين الجذور والسيقان من خلايا النخاع على بيئات صناعية.

وكان ذلك نتيجة لتجاربهما على مجموعة من المركبات لاختيار تأثيرها فى إنقسام الخلايا. وقد أمكنهما بإستعمال عينة من الحيوانات المنوية لنوع من الأسماك يشابه سمك

الرنجة وقد كانت هذه العينة محفوظة لمدة أكثر من سنة أن تسبب هذه العينة إنقسام خلايا النخاع وتشكيل الجذور والسيقان وذلك مع مركبات أخرى. وعند إستعمال عينة حديثة لهذه الحيوانات المنوية لم تعطى هذا التأثير على الإطلاق.

وقد استنتجا أن نواتج تحلل الحيوانات المنوية وهى غنية بالـ DNAينتج عنها مركب يسبب إنقسام الخلايا ونتيجة لذلك فقد قاما بإستخلاص حيوانات منوية من عينة حديثة وبدلاً من الإنتظار لمدة طويلة لتحليلها فقد قاما بوضعها فى جهاز الأوتوكلاف autoclaveلتعقيمها ولكى تتحلل فى درجة الحرارة العالية والضغط العالى.

وقد أمكن بالفعل إثبات أن ناتج التحلل يسبب إنقسام الخلايا وتكوين الأعضاء المختلفة وقد قاما بالكشف فى هذه العينات عن المركب الناتج من تحلل الـ DNA والمسئول عن إنقسام خلايا النبات فقد إتضح أنه مركب يسمى kinetin وهو يعتبر أول مركب استخدم فى تشجيع إنقسام خلايا النبات بدرجة ملحوظة ونتيجة لذلك أمكن إكتشاف مركبات كثيرة بعد ذلك تساعد على إنقسام خلايا النبات وسميت المركبات المسئولة عن ذلك السيتوكينينات Cytokininsولذلك يعتبر Miller و Skoog أول من أثبتوا وجود مركب ذو فاعلية كبيرة فى إنقسام خلايا النبات وفى اكتشاف السيتوكينينات وذلك نتيجة لتجاربهما لعمل مزارع للأنسجة وذلك لنسيج من نخاع ساق نبات الدخان.

Muir و Ricker سنة١٩٥٤ قد أمكنهما النجاح فى زراعة خلية واحدة وهو مافشل فيه Hiberlandet سنة ١٩٠٢.

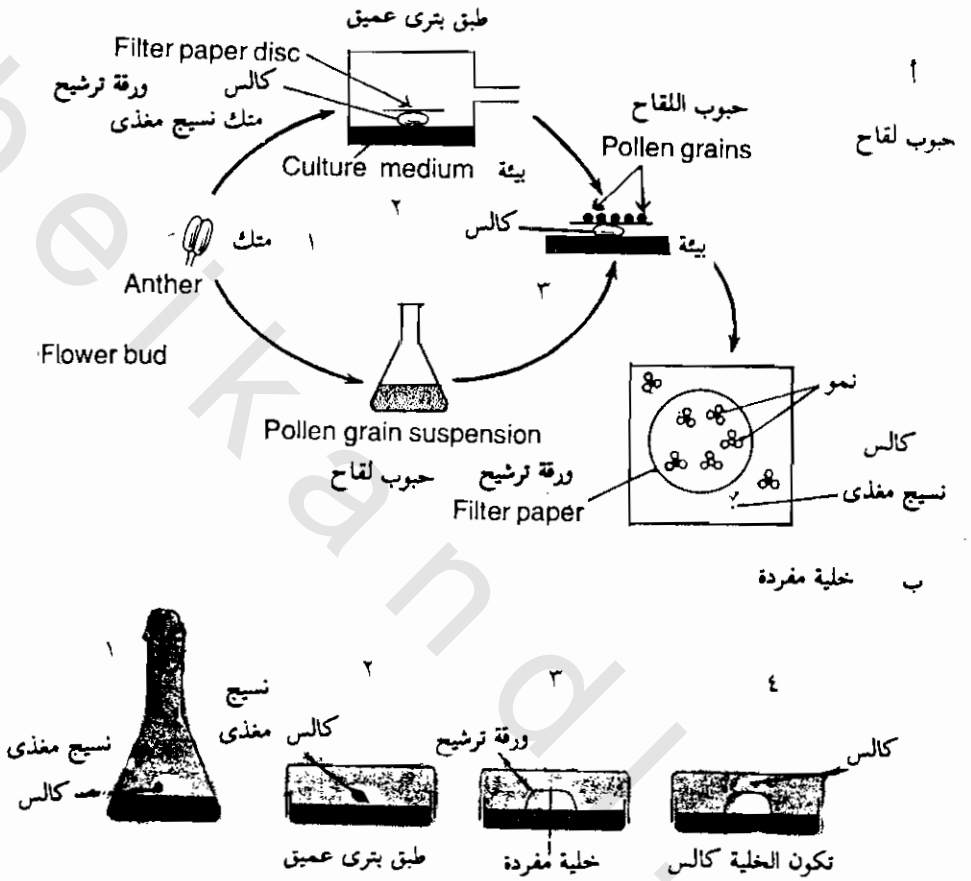
وقد كان ذلك بعمل paper raft techniqueحيث قاما بإستعمال نسيج مغذى nurse tissueلمساعدة الخلايا المفردة على الإنقسام وذلك بوضع النسيج المغذى فى طبق عميق ثم وضع عليه ورقة ترشيح ووضع على ورقة الترشيح الخلية المفردة ويتم تغطية هذا الطبق بغطاء وكل ذلك فى ظروف معقمة. فقد أمكن لهذه الخلية أن تنقسم وتكون نسيج الكلس Callus ذو حجم كبير نسبياً نتيجة لتغذيتها من المكونات الموجودة فى النسيج المغذى حيث تنتشر هذه المركبات من النسيج المغذى عبر ورقة الترشيح إلى الخلية المفردة. والنسيج المغذى هو عبارة عن جزء من نسيج نباتى حى(شكل ١١١) أو نسيج كالس.

تمكن Guhaسنة١٩٦٦ من زراعة المتك على بيئة صناعية وذلك لنبات الداتورة وقد نتج من المتك نبات صغير وكان النبات أحادى الأساس الكروموسومى وتسمى هذه النباتات الصغيرة plantlet.

تمكنت Nitsch و Bowrgin سنة١٩٦٧ من إنتاج نباتات من حبوب لقاح مفرده لنبات

الدخان. أى أنه أمكن إنتاج نبات صغير من حبة اللقاح ثم يكبر فى الحجم ويصبح نبات كامل ولكنه يكون أحادى الأساس الكروموسومى حيث أنه ناتج من حبة لقاح.

تمكن Takeba سنة ١٩٧٠ من زراعة بروتوبلاست عارى للخلايا النباتية أى خلايا عديمة الجدر وذلك لنبات الدخان وأمكنه بذلك إنتاج نباتات كاملة.



(شكل ١١١) طريقة paper raft technique

obeikandl.com

الظروف الواجب مراعاتها عند زراعة الأنسجة:

١ـ **التعقيم** : ـ عند إجراء تجارب مزارع الأنسجة يجب أن تكون الظروف معقمة تماماً فيجب أن تكون جميع الأدوات المستعملة من أطباق بترى وأنابيب ودوارق معقمة تماماً وأن يكون العمل فى ظروف بيئية معقمة تماماً يمكن إستخدام حجرات عزل خاصة بذلك.

٢ـ **البيئات** : ـ يجرى تنمية الأجزاء المختلفة من الأنسجة النباتية على بيئات صناعية خاصة ويجب أن يتوفر فيها الشروط الآتية (جدول ١٤) : ـ

١ـ أن تحتوى البيئة على مصدر للكربون وعادة يكون سكر الجلوكوز أو سكر السكروز.

٢ـ يجب أن تحتوى البيئة على مصدر للآزوت وقد يكون المصدر ملح بسيط مثل النترات وقد يكون عبارة عن مركب عضوى مثل الببتون أو أحماض أمينية مثل الجليسين أو حامض أسبارتك أو حامض جلوتاميك.

٣ـ فى حالات كثيرة تحتاج البيئة إلى وجود فيتامينات وهى فيتامينات مجموعة فيتامين ب المركب مثل الريبوفلافين riboflavine ـ البيوتين biotin ـ الثيامينthiamine

.para amino benzoic acid - nicotinic acid -pyridoxine

٤ـ فى كثير من الأحوال تحتاج البيئة إلى إضافة مركبات عبارة عن منظمات للنمو ومنها الهرمونات ومثال لذلك الجبريللينات مثل حامض الجبريلليك ـ اندول حامض الخليك أو الكينيتين.... إلخ من هذه المركبات.

٥ـ يجب أن يكون pH البيئة مناسب لنوع النسيج أو العضو المراد تكوينه.

٦ـ يمكن أن تضاف للبيئة أيضاً مصدر للعناصر اللازمة للنبات وذلك يكون فى صورة أملاح مثل النترات والكبريتات والكلوريد والفوسفات وتعتبر هذه الأملاح مصدر للعناصر الأساسية اللازمة للنبات.

وفى ظروف معينة يحتاج إلى وجود إضاءة وخاصة عند إنتاج المجموع الخضرى مثل الأوراق، والأفرع الخضرية حيث يلزم لاتمام تكوينها تكون الكلوروفيل والذى يلزم لتمام تكوينه الضوء.

يمكن أستعمال البيئات فى صورة سائلة كما يمكن أستعمالها فى صورة شبه صلبة وذلك بأضافة الآجار للبيئة بنسبة ٢٠ جرام فى اللتر.

جميع الأنسجة النباتية التى يجرى زراعتها يجب أن يتم تعقيمها أولاً قبل الزراعة وذلك بغمرها فى محاليل معينة معقمة مثل هيبوكلوريد الصوديوم أو الكالسيوم ـ نترات الفضة ـ فوق أكسيد

الأيدروجين يدH أو الكلوراكس Chlorax وهو مركب ينتج الكلور ويستعمل فى التعقيم حيث يعتبر الكلور من العناصر المعقمة.

ويمكن أن يستخدم أيضاً محلول السليمانى وهو عبارة عن كلوريد الزئبقيك وعادة يستعمل بتركيز ١,٪ أى (١) جرام/ لتر ماء ولكن يعتبر هذا المركب الأخير شديد التأثير وقد لايفضل فى بعض المعاملات.

وفى جميع الحالات وبعد غمر الجزء من النسيج النباتى فى محلول معقم فيجب غسيله فى ماء مقطر معقم عدة مرات وذلك للتخلص من الآثار الضارة لهذه المحاليل المعقمة التى قد يكون لها أثر ضار على النسيج النباتى أثناء تنميته.

مما سبق يتضح أنه لابد من توافر كيماويات معينة فى معامل مزارع الأنسجة ونتيجة لأن تحضير البيئات يأخذ وقت طويل فقد تم فى كثير من الأحوال عمل بيئات مخلوطة بتركيزات مناسبة تستعمل مباشرة بدلاً من تحضير البيئة ومثال لذلك بيئة Skoog وبيئة Muarashige.

ويجب أن يتوفر أيضاً أجهزة تعقيم « الأوتوكلاف » autoclave ـ أفران ـ حضانات ـ الأدوات الزجاجية ـ ميكروسكوبات ـ عدسات أو ميكروسكوبات بسيطة ـ أجهزة قوة طاردة مركزية ـ يجب أن تتوفر مصادر الإضاءة ومنها الأشعة فوق البنفسجية ـ حجرات معقمة.

بعض المصطلحات المستعملة فى مزارع الأنسجة

Plantlet (١)

هو عبارة عن النبات الصغير الذى ينتج من مزارع الأنسجة الذى ينتج من أى جزء من النبات أو من حبة اللقاح أو من خلية واحدة أو بروتوبلاست واحد.

Embryoid(٢) شبه الجنين

هو عبارة عن الجنين الناتج من مزارع الأنسجة وذلك يتميز عن الجنين الناتج من التلقيح والإخصاب فى دورة النبات العادية حيث أنه باستعمال مزارع الأنسجة ولإنتاج النبات الكامل فإن النسيج المستعمل ينقسم ليكون شبه الجنين كتلة كروية الشكل تتميز لتكون شكل قلبى ثم شكل طوربيدى torpedo shaped ثم يتكون بعد ذلك النبات الصغير(شكل ١١٥).

Totipotent cells (٣)

هى عبارة عن خلايا لها القدرة على الإنقسام وتكوين الأنسجة والقدرة على تكوين نبات كامل.

(٤) الكلس Callus

هو عبارة عن كتلة من نسيج ذو خلايا رقيقة الجدر يكبر فى الحجم نتيجة لوجود خلايا مرستيمية فى داخل هذا النسيج أو على سطحه.

قد يكون نسيج الكلس صلب أو هش وذلك تبعاً لنوع النبات ونوع النسيج.

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

توجد أنواع عديدة لمزارع الأنسجة وهى كما يأتى :ـ

(١) مزارع الجذور Root Culture

وفيها يؤخذ جزء من القمة النامية للجذر ويزرع على بيئة صناعية ويمكن تطبيقه فى كثير من النباتات حيث يزداد هذا الجزء فى الطول ويكون جذور ثانوية. أول من نجح فى ذلك White على جذور الطماطم (شكل ١١٢).

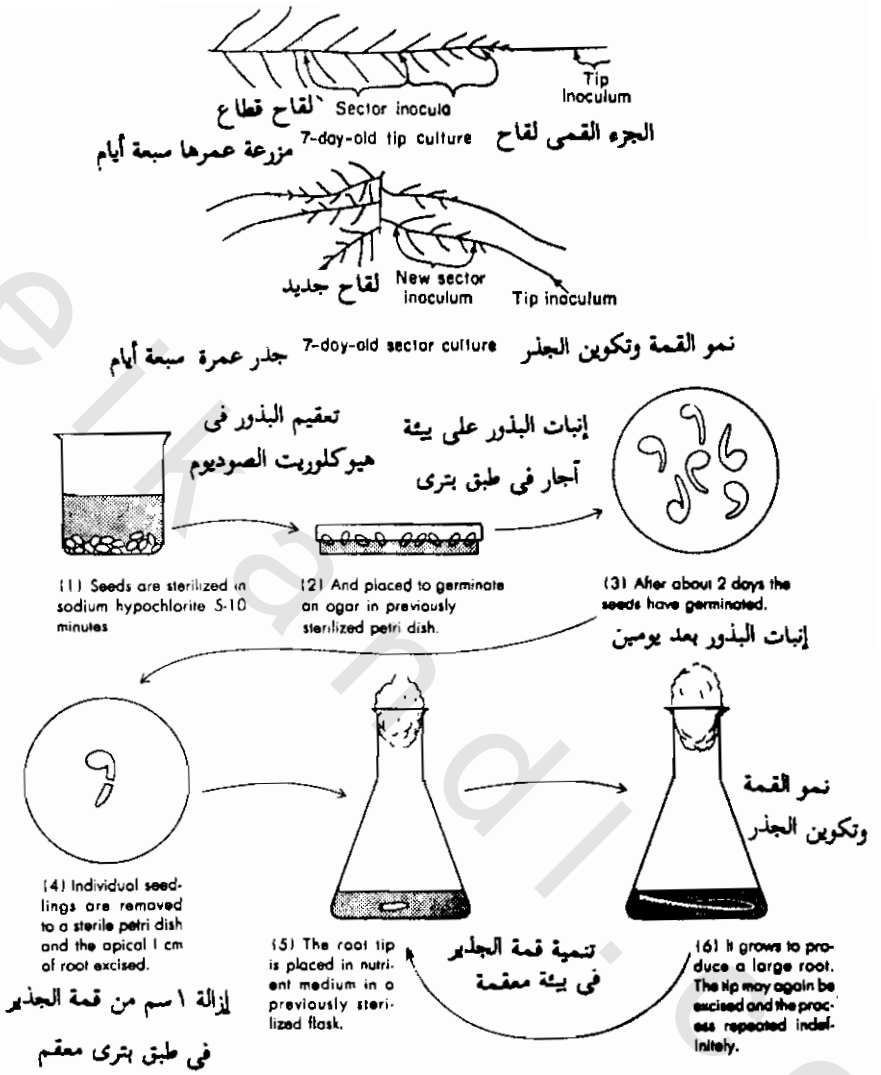
(٢) مزارع القمة النامية للساق Stem Apex Culture

وفيها تؤخذ القمة النامية للساق وتوضع على بيئة صناعية فيحدث نمو لهذا الجزء ويمكن أن يعطى ساق وعليه أوراق.

وقد أمكن عمل ذلك بالنسبة لنبات الاسبرجس حيث أن البيئة الصناعية تتكون من أملاح بسيطة ولكن فى نباتات أخرى تحتاج البيئة إلى إضافة مركبات عضوية ومنظمات للنمو وفيتامينات(شكل ١١٣).

ويمكن أن تستخدم مزارع القمة النامية للساق فى استعمالات إقتصادية كثيرة حيث أمكن زراعة نبات الأوركيد *Cymbidium* وإكثاره بهذه الطريقة. ومن المعروف أن بذور نباتات الأوركيد صغيرة الحجم رهيفة وتحتاج لعناية خاصة لزراعتها وإلى ظروف بيئية معقمة وأمكن التغلب على ذلك بإكثار هذا النبات بواسطة مزارع الأنسجة حيث تؤخذ القمة النامية وتزرع على بيئة صناعية فينتج نسيج الكلس ويتكون على نسيج الكلس نتوءات أو بروزات صغيرة كل نتوء أو بروز يسمى protocorm ويفصل هذا النتوء ويزرع على البيئة فيعطى نبات كامل (شكل١١٤).

ويمكن بتفصيص نسيج الكلس إلى هذه البروزات الكثيرة من إنتاج نباتات كثيرة كما أن التركيب الوراثى لهذه النباتات يكون معروف وبذلك تعطى أزهار جميلة الشكل ومرغوبة وذات



(شكل ١١٢): مزارع الجذور فى الطماطم.

أ – لقاح القطاع ولقاح القمة . ب – خطوات أداء التجربة.

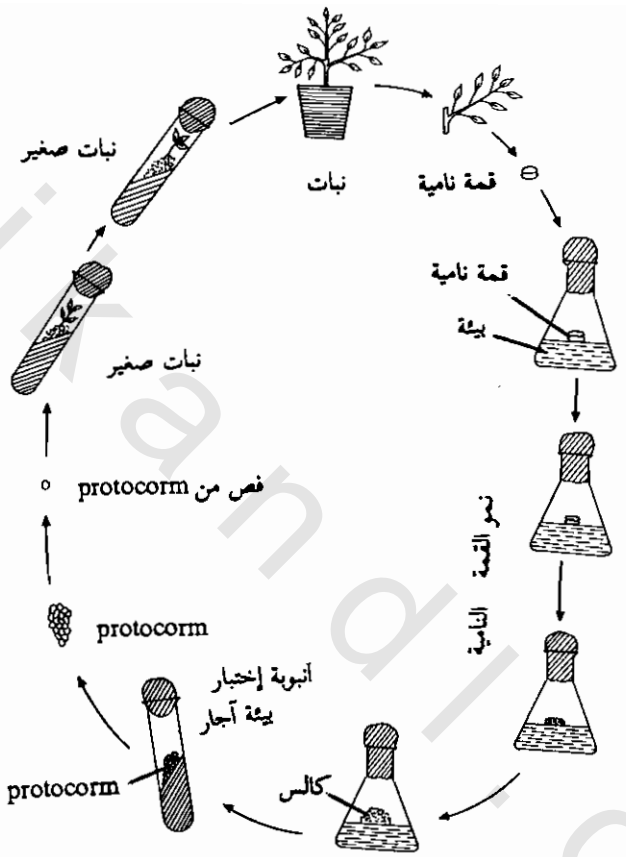
تعقيم البذور فى هيوكلوريت الصوديوم

إنبات البذور على بيئة آجار فى طبق بترى

إنبات البذور على بيئة آجار فى طبق بترى

إنبات البذور

(شكل ١١٣) : خطوات زراعة قمة نامية للأسبرجس.



(شكل ١١٤): خطوات زراعة الأنسجة لأوركيد *Cymbidium*

قيمة إقتصادية عالية بينما فى حالة الزراعة العادية وحيث أن التلقيح فى الأوركيد يكون خلطى فيمكن أن تنتج تراكيب وراثية غير مرغوبة وذلك فى حالة الزراعة بالبذور.

ولذلك حالياً يجرى إنتاج نباتات وأزهار هذا الأوركيد بطريقة زراعة الأنسجة وهى تعتبر أسهل وأرخص وسريعة نسبياً وتعطى نباتات ذات تركيب وراثى مرغوب وذلك بالمقارنة بطريقة الزراعة بالبذرة.

مميزات هذه الطريقة:

١ـ سهولة إجرائها ورخص تكاليفها.

٢ـ تعطى نباتات ذات تركيب وراثى مرغوب محدد معروف.

٣ـ الحصول على أزهار مرغوبة الشكل

تستعمل طريقة زراعة القمة النامية للساق حالياً بطريقة إقتصادية وعلى نطاق تجارى واسع فى إنتاج نباتات إقتصادية خالية من الفيرس وأول من أستعمل هذه الطريقة وأمكن تطبيقها علمياً وتجارياً هو العالم الفرنسى Morel أثناء تجاربه على نبات الداليا فإتضح أن نباتات الداليا المصابة بالفيرس لاتكون نباتات سليمة أو حتى أزهار مرغوبة ولذلك فقد قام بفصل القمة النامية للنبات لأنه فى المعتاد أن النبات المصاب بالفيرس لايوجد الفيرس فى منطقة الجزء العلوى من القمة النامية وهى المنطقة الخالية من أى أنسجة وعائية مثل الخشب واللحاء وعند زراعة هذه القمة النامية الخالية من الفيرس على بيئة صناعية فقد أمكن إنتاج نباتات خالية من الفيرس تماما.

قد أمكن تطبيق هذه الطريقة على القمة النامية لنبات البطاطس لإنتاج درنات بطاطس خالية من الفيرس حيث تستعمل القمة النامية بما تحمله من بدائى ورقتين فقط.

ولإنتاج كميات كبيرة من درنات البطاطس فإنه يتم زراعة هذه النباتات الصغيرة فى صوب محكمة الغلق تقاوم فيها الحشرات تماماً وذلك لإنتاج كميات كبيرة من الدرنات والتى تكون خالية من الفيرس.

وحالياً تستعمل هذه الطريقة فى إنتاج تقاوى البطاطس فى كثير من الدول بطريقة إقتصادية حيث توجد معامل وشركات متخصصة لإنتاج درنات بطاطس خالية من الفيرس ناتجة من مزارع الأنسجة.

وقد أمكن حالياً تطبيق هذه الطريقة على نباتات أخرى كثيرة وعلى سبيل المثال لاعلى سبيل الحصر نبات قصب السكر ـ الموز ـ الفراولة.

وفى حالات أخرى تجرى نفس الطريقة ولكن قبل أخذ القمة النامية من النبات يجرى رفع درجة الحرارة فى الجو المحيط.

وتتبع هذه الطريقة فى بعض النباتات مثل نبات القرنفل حيث يتم رفع درجة حرارة الجو تدريجياً إلى حوالى ٣٧م أو ٣٨م ويستمر على هذه الدرجة لمدة اسبوعين وفى رطوبة نسبية عالية ٩٠٪ أو تزيد ثم يجرى بعد ذلك أخذ القمة النامية من هذه النباتات وزراعتها على بيئة صناعية لإنتاج نباتات قرنفل ذات صفات مرغوبة وخالية من الفيرس.

وعامة فإن معاملة النباتات بدرجة حرارة كما سبق ذكره تفيد فى بعض الأحيان فى مقاومة الفيرس أو الحد من تكاثر الفيرس فى النبات وبذلك فإن القمة النامية تكون خالية تماماً من الفيرس.

(٣) مزارع الورقة Leaf Culture

يمكن نزع أوراق صغيرة من القمة النامية للنبات وزراعتها على بيئة صناعية فإن الورقة تكبر فى الحجم وذلك كما فى النبات السرخسى *Osmunda* حيث أن الورقة تكبر فى حجمها وتشابه الورقة العادية إلا أنها تكون أقل سمكاً.

وفى هذه الحالة لابد من وجود إضاءة مناسبة ليتكون الكلوروفيل فى الورقة بالطريقة العادية.

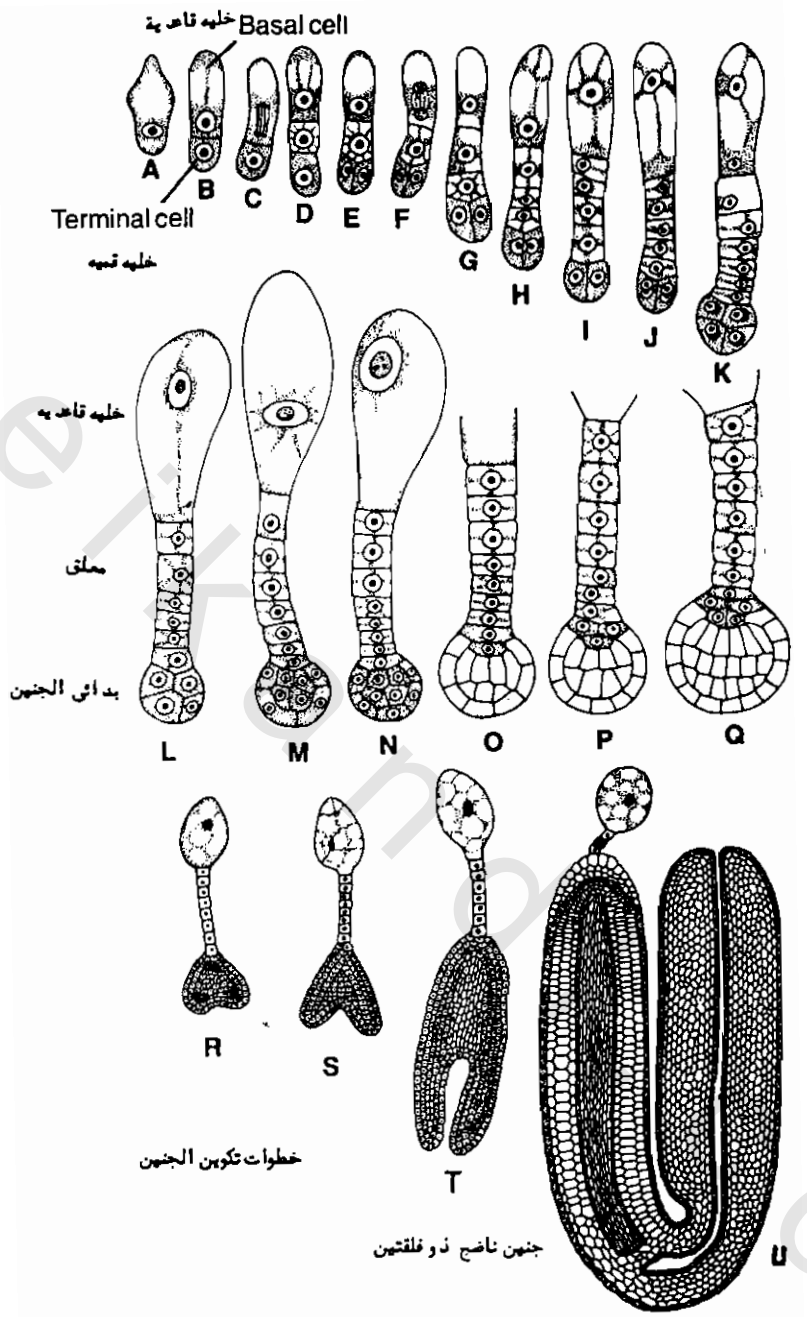
(٤) مزارع الأزهار Flower Culture

تؤخذ البراعم الزهرية الصغيرة وتزرع على بيئة صناعية فيتكون على البيئة أزهار ومثال لذلك نبات الخيار(نبات الخيار وحيد الجنس) فيمكن أخذ البراعم الزهرية المذكرة أو البراعم الزهرية المؤنثة وعند زراعة هذه البراعم على البيئة الصناعية تكبر فى الحال وتكون أزهاراً مذكرة أو أزهاراً مؤنثة تبعا لنوعها وعادة يضاف للبيئة فى هذه الحالة منظمات النمو.

(٥) مزارع البويضات Ovule Culture

قد أمكن عمل هذه الطريقة فى بعض النباتات ومنها نبات الخشخاش *Papaver* حيث تم أخذ البويضات الصغيرة أثناء تكوينها من مبيض الزهرة وزراعتها على بيئة صناعية فتكون بويضة كاملة مستعدة للإخصاب وقد أمكن أيضاً وضع حبوب اللقاح فى البيئة فيحدث تكوين لأنابيب اللقاح من حبوب اللقاح ويتم إختراق أنبوبة اللقاح للبويضة ويحدث الإخصاب ويتكون الجنين.

ويمكن فى هذه الطريقة نجاح عملية الإخصاب فى الحالات التى لايوجد فيها توافق بين حبوب اللقاح والبويضات ويكون ذلك نتيجة لعدم قدرة حبوب اللقاح على إختراق أنسجة الميسم



(شكل ١١٥): خطوات تكوين الجنين وشبه الجنين.

أو القلم أو للطول الزائد للقلم أو لسرعة موت أنابيب اللقاح أو عدم كفاءتها فى إختراق الميسم والقلم حتى تصل فى وقت مناسب إلى البويضة.

ميزة هذه الطريقة:

١ـ للتخلص من مشاكل عملية التلقيح.

٢ـ تقريب حبوب اللقاح من البويضات ليحدث التزاوج.

(٦) مزرعة الجنين(مزارع الأجنة) Embryo Culture

فى هذه الحالة يتم نزع الجنين من داخل البويضة فى أثناء تكوينه ثم زراعته على بيئة صناعية ويمكن أن يتكون الجنين الكامل النمو والذى يتكون منه نبات كامل بعد ذلك وكلما نزع الجنين من البويضة فى أطوار متأخرة أى أنه أكثر نضجاً كلما كان إحتياج هذا الجنين لبيئات أبسط فى تركيبها والعكس صحيح(شكل ١١٥).

فعند نزع الجنين فى بداية مراحل تكوينه فإنه يحتاج إلى بيئات خاصة تحتوى على مركبات كثيرة ويمكن تسمية هذه الطريقة بإسم طريقة إنقاذ الجنينembryo rescue technique.

وتوجد معامل متخصصة تقوم بهذه الطريقة بكفاءة عالية ومثال لذلك معمل الدكتورة Nitsch نتش فى فرنسا.

وتفيد هذه الطريقة فى تنمية الأجنة خارج البويضات والبذور وتفيد عندما لايوجد توافق بين الجنين ونسيج الاندوسبرم حيث لايتمكن الجنين فى أثناء تكوينه داخل البويضة من التغذية من نسيج الاندوسبرم وبذلك لايكتمل نموه ولايمكن لهذه البذرة عند زراعتها أن تكون نبات.

أو نتيجة لعدم تكون نسيج الإندوسبرم بطريقة مناسبة وفى هذه الحالة فإن نزع الجنين من داخل البذرة فى أثناء مراحل تكوينها وزراعته على البيئة سيعطى جنين كامل يتكون منه بادرة ونبات كامل بعد ذلك.

ميزة هذه الطريقة:

تفيد هذه الطريقة كثيراً على وجه الخصوص فى تربية النبات عند جدوث تهجينات بين الأنواع فى داخل الجنس الواحد حيث يكون التهجينات بين هذه الأنواع غير متوافقة تماماً ويوجد فرصة كبيرة لظهور عدم توافق بين الجنين والأندوسبرم ويكون مربى النبات فى إحتياج إلى هذه الأجنة الجديدة فى تكوينها الوراثى فيلجأ إلى embryo rescue technique.

ومن أمثلة النباتات التى تستعمل فى هذه الطريقة أنواع أجناس

Hordeum الشعير ـ *Brassica* الكرنب ـ *Linum* الكتان ـ *Allium* البصل والثوم والكرات. حيث تحدث تهجينات بين الأنواع داخل الجنس الواحد.

ملحوظة: ـ بعد الإخصاب أى بذرة لابد أن يوجد بها نسيج الاندوسبرم وتكون البذرة خالية من الاندوسبرم(لاإندوسبرمية) عندما مايكون الجنين شره جداً فيتغذى على الإندوسبرم بسرعة فائقة، نسيج الاندوسبرم نسيج مغذى للجنين.

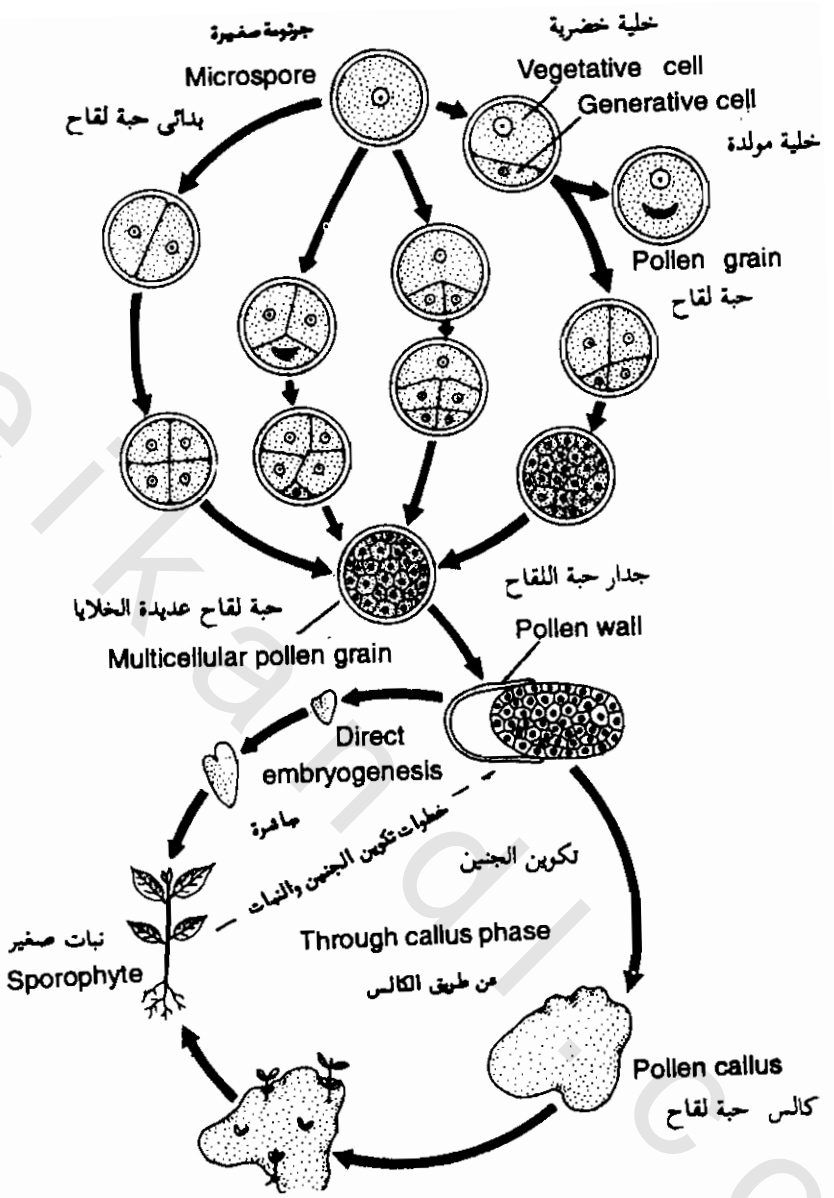
(٧)مزرعة حبوب اللقاح Pollen Grain Culture

تزرع حبوب اللقاح على بيئات صناعية ويمكن أن يتكون من حبة اللقاح نبات كامل ولكنه يكون أحادى الأساس الكروموسومى حيث أن حبوب اللقاح تكون أحادية الأساس وفى هذه الحالة يحدث أن خلية حبة اللقاح تنقسم ليتكون منها خليتان ثم ٤ خلايا ثم ٨خلايا وهكذا ثم تتكون كتلة من الخلايا داخل حبة اللقاح هذه الكتلة من الخلايا تضغط على جدار حبة اللقاح وتسبب تمزقه ثم تستمر الخلايا فى إنقسامها ويتكون شبه الجنين قلبى الشكل ثم الطوربيدى الشكل ومن شبه الجنين الأخير يتكون النبات الكامل(شكل ١١٦).

وقد إستخدمت هذه الطريقة إقتصادياً فى إنتاج نباتات تبغ(الدخان) مقاومة لمرض الذبول.

لشرح هذه الطريقة: من المعروف أنه يوجد نبات به زوجين من العوامل الوراثية لمقاومة فطر معين وأن أحد سلالات هذا النبات تحتوى على التركيب الوراثى AA bb وأن هذه السلالة مقاومة لبعض سلالات الفطر المسبب لمرض الذبول فى الدخان وأن السلالة النباتية الأخرى تتكون منaa·BB وهذه السلالة من النبات تكون مقاومة لمجموعة أخرى من السلالات الفطرية ويكون عامل المقاومة هنا A وB وللحصول على نباتات مقاومة لجميع سلالات الفطر فإنه طبيعياً يجرى عمل تلقيح بين هاتين السلالتين.

AAbb	x	aaBB	
	AaBb		F1
AABB	:	تراكيب أخرى	F2
1		15	



(شكل ١١٦) : خطوات زراعة حبوب اللقاح فى نبات ذو فلقتين

معنى ذلك أن كل ١٦ نبات به نبات واحد فقط مقاوم لجميع سلالات الفطر بدرجة أصيلة (أصيل فى المقاومة)(شكل ١١٧).

أما فى حالة إستعمال حبوب اللقاح من نباتات الجيل الأول F1 يحدث أثناء تكوين حبوب اللقاح إنعزال فيتكون ٤ تراكيب من حبوب اللقاح هى

AB Ab aB ab

وعند إنتاج نباتات من حبوب اللقاح وفى هذه الأثناء يجرى مضاعفة عدد الكروموسومات فى حبوب اللقاح هذه وذلك بإضافة مادة الكولشيسين فتنتج نباتات ثنائية الأساس الكروموسومى وهى كالآتى: -

AABB AAbb aaBB aabb

1 : 1 : 1 : 1

نسبة هذه التراكيب هى ١ : ١ : ١ : ١

الأبوين AAbb × aaBB *parents*

الجيل الأول AaBb F_1 *hybrid*

حبوب اللقاح Microspores	AB	aB	Ab	ab
AB	AABB	AaBB	AABb	AaBb
aB	AaBB	aaBB	AaBb	aaBb
Ab	AABb	AaBb	AAbb	Aabb
ab	AaBb	aaBb	Aabb	aabb

egg cells خلايا البيضة

(شكل ١١٧): قطعة الشطرنج فى حالة التهجين أو التزاوج بين نباتين فى الجيل الثانى.

من هنا يتضح أن نسبة النباتات المقاومة والأصيلة فى زوجى العوامل الوراثية هى ١ : ٣ ومن هنا يتضح أن النسبة المرغوبة من النباتات فى حالة إستعمال حبوب اللقاح أكبر من النسبة فى حالة التلقيح بالنباتات العادية وهذه أول ميزة.

وبالإضافة إلى ذلك يجرى إختبار هذه النباتات الناتجة فى حقل ملوث بالسلالات الفطرية المسببة للمرض فإن جميع النباتات الناتجة فى حالة زراعة حبوب اللقاح تكون مقاومة بحالة أصيلة بزوجى العوامل الوراثية وأن جميع النباتات التى تموت تكون غير مقاومة.

أما فى حالة زراعة النباتات الناتجة من التهجين العادى فإن بعض النباتات التى تعيش وتقاوم المرض تكون مقاومة ولكن بحالة غير أصيلة.

وبالطبع يفضل أن يكون توزيع النباتات على المزارعين للنباتات المقاومة بحالة أصيلة AABB وهى الناتجة من مزارع حبوب اللقاح وهذه ثان ميزة.

الميزة الثالثة لمزارع حبوب اللقاح فى هذه الحالة هو أن إنتاج هذه النباتات يستغرق وقت أقل من إنتاج النباتات بالطريقة العادية.

ولقد استخدمت بالفعل هذه الطريقة فى اليابان لإنتاج نباتات من الدخان مقاومة لمرض الذبول بطريقة زراعة حبوب اللقاح.

(٨) مزارع الكلس Callus Culture

تعريف الكلس Callus:

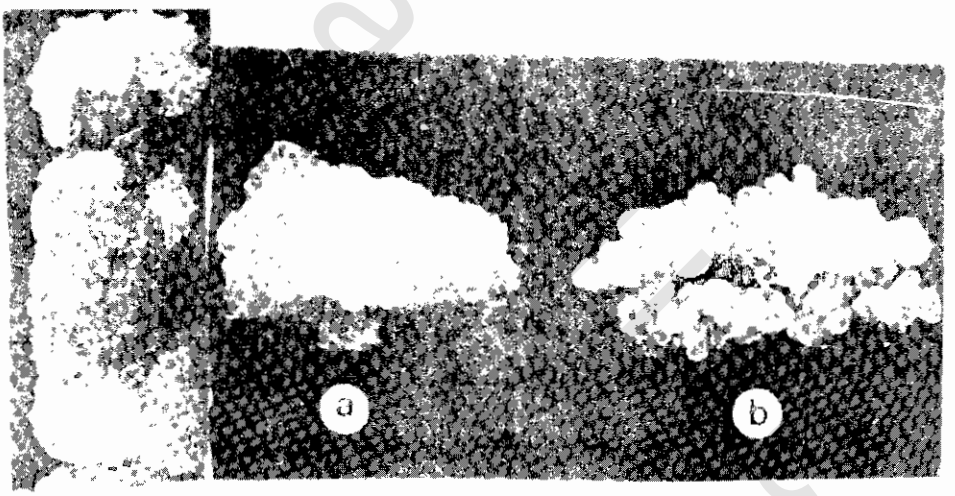
هو عبارة عن كتلة من خلايا رقيقة الجدر يتخللها خلايا مرستيمية قد تكون هذه الخلايا المرستيمية على سطح نسيج الكلس كما فى نبات الشقيق وقد تكون فى داخل نسيج الكلس كما فى الكلس الناتج من الساق القرصية للبصل وقد يكون نسيج الكلس هش وقد يكون صلب وقد يكون أملس وقد يكون ذو نتوءات وفى حالة وجود الضوء فإنه يمكن أن تتكون فى الخلايا بلاسيتدات خضراء وتصبح خلايا كلورانشيمية.(شكل ١١٨).

وفى حالة المعاملة بمركبات معينة مثل منظمات النمو يمكن أن تتميز خلايا نسيج الكلس إلى اللحاء والخشب. وفى بعض الحالات قد يتكون فى نسيج الكلس وفى داخل الخلايا فجوات عصارية ملونة ويصبح الكلس ملون وذلك كما فى نبات *Haplopappus* وحيث ينتج الكلس من بتلات الأزهار لهذا النبات وأن هذه البتلات تكون ملونة. وهذه الصبغات الملونة عبارة عن صبغة الأنثوسيانين anthocyanine.

بعض الصفات الخاصة لنسيج الكلس:

يمكن أن يستعمل نسيج الكلس فى مزارع الأنسجة فى إنتاج نباتات أو أجزاء أو أعضاء نباتية ولكن من المعروف أن نسيج الكلس فى حالات كثيرة يكون غير ثابت من ناحية التركيب الكروموسومى أى من الناحية الوراثية حيث إنه كثيراً مانجد أنه يوجد فى نفس نسيج الكلس خلايا تختلف فى عدد الكروموسومات ويوجد أيضاً فى بعض الخلايا حالات Chromosomal abberations ومنها التضاعف duplication والنقص deletion والإنقلاب inversion والانتقال translocation وحالات أخرى وهى التضاعف polyploidy و aneuploidy وهى التضاعف فى عدد الكروموسومات أو قلة وزيادة الكروموسومات حيث نجد أن الخلية الثنائية تصبح رباعية وقد تصبح سداسية.

أما فى حالات التضاعف aneuploidy الناقص فتنشأ حالات مختلفة منها على سبيل المثال وليس على سبيل الحصر حالات نقص كروموسوم واحد 2n-1 monosomic ونقص ٢ كروموسوم 2n-2 nullisomic وقد يزيد النقص 2n-3 و 2n-4 و 2n-5 وهكذا وقد يزيد عدد الكروموسومات واحد ويسمى 2n+1 trisomic وقد يزيد عن ذلك ولذلك فإن جميع هذه الإختلافات فى أنواع الخلايا توجد فى نسيج الكلس.



بصل كاسافا Cassava كريزانثيمم Chrysanthemum

(شكل١١٨): نسيج الكلس فى نباتات مختلفة

ولذلك لايفضل فى بعض الأحيان إستعمال الكلس فى إنتاج نباتات جديدة لإختلافه الكبير فى التركيب الوراثى فى الخلايا المكونة لهذا النسيج.

إنتاج نباتات من نسيج الكلس:

تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى إنتاج بعض النباتات ومثال لذلك إنتاج نبات الجزر من جزء من جذر النبات حيث يتم قطع الجذر ويؤخذ جزء صغير من داخل الجذر ويوضع على بيئة مناسبة فيتكون نسيج الكلس من هذا الجزء من الجذر. ويؤخذ نسيج الكلس ويوضع فى جهاز يشبه جهاز الطرد المركزى أو يوضع فى دوارق مخروطية ويعرض لهز مستمر على الـ shakerفينتج عن ذلك تفتت نسيج الكلس أو أجزاء منه ويكون ذلك فى محلول مناسب وبذلك يتكون معلق -s us pensionبه مجاميع من خلايا الكلس وعند زراعة مجاميع من هذه الخلايا على بيئة مناسبة فإنها تكون شبه الجنين القلبى ثم شبه الجنين الطوربيدى ثم يتكون من الأخير النبات الصغيرplantlet(شكل١٢٠ أ). ومنه يتكون النبات البالغ ومن ذلك يتضح إنه يمكن عمل دورة الحياة لنبات الجزر بالطريقة العادية بزراعة البذور وبزراعة الأنسجة.

(٩) مزارع الخلية الواحدةSingle Cell Culture

هو عبارة عن زراعة خلية مفردة فقط

كيفية الحصول على خلية مفردة:

يجرى الحصول على خلايا منفردة بطرق عديدة وعامة تختلف بإختلاف النبات فيمكن هز مزارع الكلس حيث يسبب ذلك فصل لمجاميع من الخلايا أو خلايا مفردة ثم تجرى عملية sieving نخل لهذه المجاميع أو الخلايا المفرده الناتجة فنحصل فى النهاية على خلايا مفردة.

وفى بعض الحالات الأخرى تجرى بأخذ نسيج الورقة وبعد إزالة نسيج البشرة من الورقة وتقطيع الورقة إلى أجزاء ووضعها فى بيئة سائلة مع الرج أو الهز فيحدث إنفصال لخلايا الورقة ويتكون محلول به نسبة من الخلايا المفردة c ell suspension culture وذلك كما فى نباتplumpuppy . وقد يكون بأخذ جزء من الورقة وطحنها فى محلول مناسب بواسطة هون خزفى فيمكن أن ينتج عن ذلك كثير من الخلايا المفردة كما فى أوراق الفول السودانى حيث نحصل على محلول به نسبة كبيرة من الخلايا المفردة ويمكن أن تطبق نفس القاعدة على الأفرع المتورقة لنبات الإسبرجس حيث يمكن الحصول على خلايا مفردة بطريقة الطحن. وفى حالات أخرى كثيرة يمكن معاملة النسيج النباتى بأنزيمات محللة للمركبات البكتينية حيث تسبب هذه

الأنزيمات تحليل المركبات البكتينية التى تسبب إلتحام خلايا النسيج النباتى، ونتيجة لذلك تنفصل الخلايا عن بعضها ونحصل على نسبة من الخلايا المفردة.

تاريخ زراعة الخلية الواحدة :

كما سبق القول فإن العالم Hiberlandet سنة١٩٠٢ أول من حاول زراعة خلية واحدة على بيئة صناعية ولكنه فشل ولم يتمكن من زراعتها.

ثم تمكن Ricker&Muir سنة١٩٥٤ من زراعة خلية واحدة وذلك بعمل paper raft technique والذى سبق شرحه وفيه استعمل نسيج مغذى لمساعدة الخلايا المفردة على الإنقسام وذلك بوضع النسيج المغذى فى طبق عميق ثم نضع عليه ورقة ترشيح ونضع على ورقة الترشيح الخلية المفردة ويتم تغطية هذا الطبق بغطاء فأمكن لهذه الخلية المفردة أن تنقسم نتيجة لأخذها المواد الغذائية من النسيج المغذى عبر ورقة الترشيح(شكل ١١١).

ولكن بعد ذلك أمكن زراعة الخلية الواحدة على بيئة صناعية دون الإحتياج إلى نسيج مغذى وعادة تحتوى هذه البيئة الصناعية على كثير من المركبات وأصبح من السهل حديثاً زراعة خلية واحدة على بيئة صناعية.

التطبيق الإقتصادى لزراعة خلية واحدة:

تمكن العالم Carlson من إستعمال هذه الطريقة لإنتاج نباتات مقاومة للأمراض ومثال لذلك أنه قام بإستعمال خلية مفردة أى خلايا مفردة من داخل نسيج المتك وذلك من الخلايا الأمية لحبوب اللقاح أو المكونة لحبوب اللقاح وأن كل خلية تكون أحادية وقد عرض هذه الخلايا لمركب يسبب طفرات وهو مركب ethyl methan sulphonate حيث سبب هذا المركب طفرات فى بعض الخلايا وبدلاً من أن تكون هذه الخلايا prototrophe فإنها أصبحت auxotrophe.

auxotrophe تحتاج دائماً إلى مركبات أكثر من الـ prototrophe فى البيئة حيث أن الـ prototrophe تحتاج إلى بيئة ذات تركيب معين وأن الـ auxotrophe هى عبارة عن خلايا تحتاج إلى مركب أو أكثر يضاف للبيئة السابقة لكى تنمو وذلك نتيجة لحدوث طفرات تؤثر على تكوين الخلايا وتجعلها غير قادرة على تكوين مركب أو أكثر ولذلك تحتاج الخلايا لهذه المركبات فى البيئة لأنها فقدت القدرة على تخليقها ذاتياً وذلك بالمقارنة بالخلايا prototrophe .

يدخل مركب bromo deoxyuridine ـ 5 فى الخلايا المنقسمة فقط لأنه يدخل فى تكوين الـ DNA . توضع الخلايا فى بيئة الأساس التى تحتوى على مركب bromo

deoxyuridine ـ 5فإن الخلايا العادية الغير متطفرة prototrophe تنقسم لأن هذا المركب يدخل في تركيب DNA الخلايا المنقسمة فقط دون الساكنة وبتعريض هذه الخلايا للضوء فإنها تموت لأن هذا المركب يحتوى على البروم السام. ثم تنقل جميع هذه الخلايا إلى بيئة الأساس مضاف إليها مركبات عضوية غنية التركيب مثل casien hydrolysate، yeast extract فإن الخلايا العادية prototrophe لاتنمو لأنها قد قتلت وأما الخلايا المطفرة auxotrophe فإنها تنمو وتكون نسيج الكلس وبتجزىء نسيج الكلس وإختباره على بيئة أساس بها حامض أمينى أو أكثر أو فيتامين أو أكثر أو حامض نووى فقد أمكن إنتاج خلايا ينقصها الحامض الأمينى الأرجينين أو الليسين أو البرولين أو فيتامين البيوتين أو البارا أمينو بنزويك اسيد para amino benzoic acid أو الحامض النووى hypoxanthine ويمكن التعرف على ذلك بنقل الكلس على بيئة أساس+ أرجينين وهكذا.

ففى حالة نمو الكلس على هذه البيئة يعنى أن هذا الكلس ينقصه تكوين الأرجنينين وعند تجربة مركب آخر بالنسبة لأنواع الكلس التى لم تنمو يمكن التعرف على حالات النقص المختلفة من هذه الحالات المختلفة للخلايا auxotrophe. ومن ذلك أمكن إنتاج نباتات عادية ينقصها تخليق فيتامين أو أكثر أو حامض أمينى أو أكثر أو حامض نووى.

وقد أمكن لـ Carlson من هذه التجارب من إنتاج نباتات من نسيج الكلس حيث يتكون شبه الجنين القلبى الشكل ويضع فى البيئة مادة الكولشيسين لعمل التضاعف فيكون الجنين تركيبه(2n) ثم يتكون شبه الجنين الطوربيدى الشكل ومنه يتكون نبات كامل 2n مقاوم لمرض wild fire وهو مرض هام مؤثر على نبات التبغ (الدخان) والذى يسببه البكتيريا *Pseudomonas tabaci* حيث أمكنه بهذه الطريقة إنتاج نسيج كلس مقاوم لسم هذه البكتيريا والمسئولة عن حدوث المرض وقتل النبات وهو يسمى سم tabtoxin ومن هذا الكلس المقاوم لهذا السم أمكنه إنتاج نبات مقاوم لهذا المرض.يتم وضع السم السابق فى البيئة.

تمكن Binding and Binding سنة١٩٦٩ بنفس الطريقة ومن حبوب اللقاح لنبات البيتونيا *Petunia hybrida* إنتاج نسيج كلس مقاوم للمضاد الحيوى streptomycin resistant.

(١٠) مزارع البروتوبلاست Protoplast Culture

يمكن الحصول على مزارع البروتوبلاست وذلك بعد تخليص البروتوبلاست من جدار الخلية ويمكن ذلك بإحدى طريقتين: ـ

(١) الطريقة الأولى:

يجرى معاملة الخلايا بمحلول زائد التركيز قليلاً من mannitol أو sorbitol بتركيز حوالى ٧,١٢ حيث يسبب هذا المحلول بلزمة مبتدئة للخلايا حيث يبتعد البروتوبلاست قليلاً عن الجدار الخلوى ويفضل mannitol أو sorbitol عن محلول السكروز أو كلوريد الصوديوم فى عمل البلزمة حيث أنه يكون تأثيره خفيف على الخلايا ولايؤثر بدرجة كبيرة على التفاعلات الحيوية فى الخلايا.

يتم قطع الجدار الخلوى بواسطة جهاز خاص يسمى micromanipulator الجهاز مكون من عدسة و موس. يتم قطع الجدار الخلوى بواسطة الموس ويتم فصله ثم يتم تحرر البروتوبلاست من الجدار (شكل ١١٩).

(٢) الطريقة الثانية:

يمكن معاملة الخلايا ببعض الأنزيمات المحللة للمركبات البكتينية والأنزيمات المحللة للسليلوز حيث يتم تحليل الجدار ويتحرر السيتوبلازم ويصبح حراً.توجد مخاليط جاهزة لذلك.

أنواع الحويصلات vesicles:

فى أثناء إجراء عملية البلزمة وقطع الجدار وأثناء تحرر البروتوبلاست من الجدار تتكون حويصلات حيث ينبعج غشاء الإكتوبلاست للداخل مكوناً حويصلات صغيرة وهذه الحويصلات تنفصل عن غشاء الإكتوبلاست وتصبح موجودة بداخل الخلية ويوجد نوعين من الحويصلات هما :

plasmolytic vesicles وهى التى تتكون أثناء حدوث عملية البلزمة المبتدئة.

pinocytotic vesicles وهى تتكون فى أثناء الخطوات التى تلى ذلك.

مما سبق يتضح أن البروتوبلاست العارى عديم الجدار يمكن أن يتميز بخاصية الخلية الحيوانية وهى تكوين الحويصلات وإنتقالها إلى داخل الخلية.

كما وجد أيضاً أن للبروتوبلاست العارى للخلايا النباتية يمكنه أن يلتقم جزئيات صلبة مثل ferritin و thorium oxide وجزئيات الفيرس وتصبح هذه الجزئيات موجودة بداخل الخلايا.

وقد يمكن تطبيق هذه الظاهرة إقتصادياً حيث تجرى محاولات لجعل الخلايا تلتقم بكتيريا العقد الجذرية وبذلك تثبت هذه الخلايا النيتروجين الجوى وبذلك تتمتع هذه الخلايا بصفة موجودة فقط فى نباتات العائلة البقولية دون نباتات العائلات الأخرى. لكن حتى الآن لم ينجح

أحد فى عمل ذلك. يمكن الآن عمل هذه الحويصلات صناعياً من lipoproteins.

يختلف البروتوبلاست فى شكله وحجمه ولونه تبعاً لنوع الخلايا المأخوذة منها ففى حالة الخلايا الكلورانشيمية يكون البروتوبلاست لونه مخضر وبه فجوة عصارية واضحة، وفى حالة الخلايا الملونة أو بتلات الأزهار فإن البروتوبلاست يكون ملون، وفى حالة خلايا البشرة فإن البروتوبلاست يكون غير مخضر ويختلف حجم البروتوبلاست بإختلاف نوع الخلايا المأخوذ منها.

ومما هو جدير بالذكر أنه فى كثير من الحالات فى مزارع البروتوبلاست يكون البروتوبلاست شديد القدرة على تكوين جدار خلوى ويتكون هذا الجدار بسرعة كبيرة وهذه أحد الصعوبات التى توجد فى مزارع البروتوبلاست حيث أنه بعد إزالة الجدار فإن البروتوبلاست يكون جدار خلوى بسرعة كبيرة نسبياً وتصبح خلية بدلاً من البروتوبلاست. يمكن أيضاً عمل تزاوج بين بروتوبلاست وآخر وفى بعض الحالات يحدث التزاوج بين بروتوبلاست وآخر بسهولة كبيرة وذاتياً وبسرعة كبيرة.

ولكن فى بعض الحالات يحدث التزاوج بين البروتوبلاست بصعوبة نسبياً وفى هذه الحالة نحتاج إلى إضافة نترات الصوديوم حيث تساعد على التزاوج بين البروتوبلاست، ولكن يستعمل فى الأغراض العملية وبكفاءة كبيرة مركب البولى إثيلين جليكولpolyethylene glycol حيث أن هذا المركب له كفاءة عالية فى المساعدة على تزاوج البروتوبلاست.

وعامة التزاوج بين بروتوبلاست نفس النبات يكون أسهل من التزاوج بين بروتوبلاست نباتين من صنفين مختلفين أو من نوعين مختلفين أو من جنسين مختلفين.

التطبيق الإقتصادى لظاهرة تزاوج البروتوبلاست:

يمكن تطبيق ظاهرة تزاوج البروتوبلاست إقتصادياً وقد أجريت تجارب فى هذا الصدد فمن المعروف أن مرض التبقع البنى فى الفول المتسبب عن الفطر *Botrytis fabae* يسبب خسائر جسيمة فى كثير من الدول التى تزرع نبات الفول ومنها مصر. ولايوجد أصناف مقاومة بالمعنى المفهوم لهذا المرض فى الفول العادى *Vicia faba*. ولكن وجد أن french beans وأسمها العلمى *Vicia narobensis* فيها صفة المقاومة لهذا المرض فعند عمل التهجين بين بروتوبلاست من *Vicia faba* وبروتوبلاست من *Vicia narobensis* يمكن الحصول على بروتوبلاست وبالتالى نبات مقاوم لمرض التبقع البنى فى الفول حيث أن التهجين بين هذين النوعين بالطريقة العادية يحتاج إلى وقت كما إنه صعب الحدوث.

طريقة إنتاج نباتات دخان هجين غير حساسة للضوء بواسطة مزارع الأنسجة:

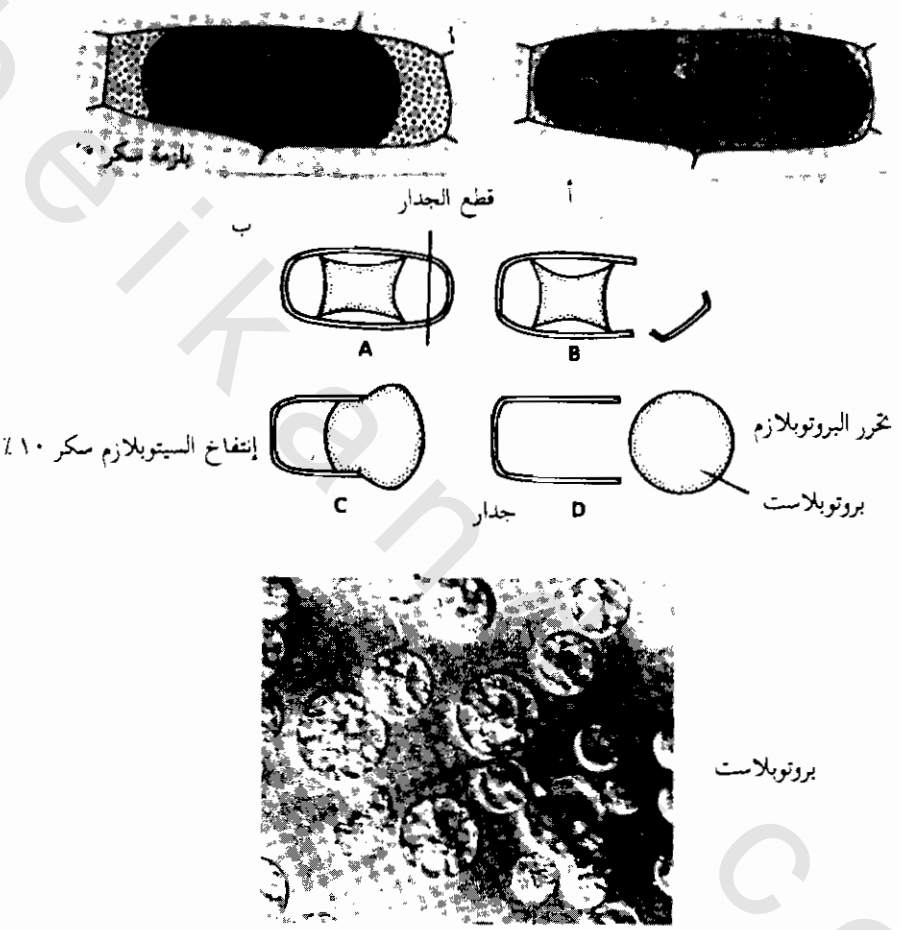
فى هذه الطريقة نبدأ بنبات حساس للضوء حيث أنه فى درجة الضوء العادى وهى10000 Lux يكون النبات ضعيف ولايأخذ اللون الأخضر ويصبح لونه مصفر أو أخضر باهت ويكون تركيب هذا النبات VV أو SS ثم يؤخذ من أزهار هذا النبات المتك عن طريق الخلايا الأمية بحبوب اللقاح PMS.

ومن هذه الخلايا الأمية لحبوب اللقاح يتكون رباعى حبوب اللقاح ثم يتكون من هذا الرباعى حبوب اللقاح ويتكون من حبة اللقاح على البيئة كتلة من الخلايا تتميز على البيئة إلى شبه جنين قلبى الشكل ثم طوربيدى الشكل ومن هذا يتكون النبات الصغير وتركيبهV أو Sوهذا النبات الصغير يكون haploid أحادى الأساس الكروموسومى أى أنه V أو S وليسVV أو SS لأنه ناتج من حبوب اللقاح.

ثم يؤخذ هذا النبات الصغير الأحادى الأساس الكروموسومى وينمى فى درجة ضعيفة من الإضاءة وهى 800 lux حيث تصبح البادرة والنبات المتكون فى الإضاءة الضعيفة ولأنه حساس للضوء يكون اللون الأخضر العادى وهذه حالة طريفة وهى حالة عكسية لما هو شائع فى جميع النباتات حيث أن جميع النباتات العادية فى وجود الإضاءة العادية يكون لونها أخضر وفى حالة الإضاءة الضعيفة يحدث لها شحوب ضوئى وتصبح خضراء باهتة أو مصفرة ولكن العكس صحيح فى هذه الحالة لأننا بدأنا بالنباتات الحساسة للضوء حيث أنه فى درجة الإضاءة العادية تكون خضراء باهتة وفى درجة الإضاءة المنخفضة تكون خضراء عادية اللون.

ومن هذه النباتات يؤخذ جزء من نسيج الورقة ومن الخلايا الكلورانشيمية لنسيج الورقة يؤخذ البروتوبلاست أى يتم عمل مزارع البروتوبلاست على بيئة مناسبة (جدول ١٤) ثم يحدث التزاوج بين البروتوبلاست V × البروتوبلاست S ليتكون كتلة من الخلايا ويتكون نبات هجين-SV hete rozygous ولأن هذا النبات غير متماثل أى خليط فى تركيبه الوراثى heterozygous يتميز بأنه نبات عادى.

ففى درجة الإضاءة العادية وهى 10000 lux يكون نبات عادى وذلك عكس الأبوين VV ، SSحيث أن كل من الأبوين homozygous متماثل التركيب الوراثى. وبالفعل عندما أجرى تنمية البروتوبلاست فقط دون تزاوج فقد نتج نبات أحادى haploid من مزارع البروتوبلاست تركيبه V أو S ويكون هذا النبات ضعيف مصفر لأنه حساس للضوء العادى(شكل١٢٠) وهكذا يمكن إنتاج نبات خليط فى تركيبه الوراثى بالتهجين العادى وبمزارع الأنسجة.

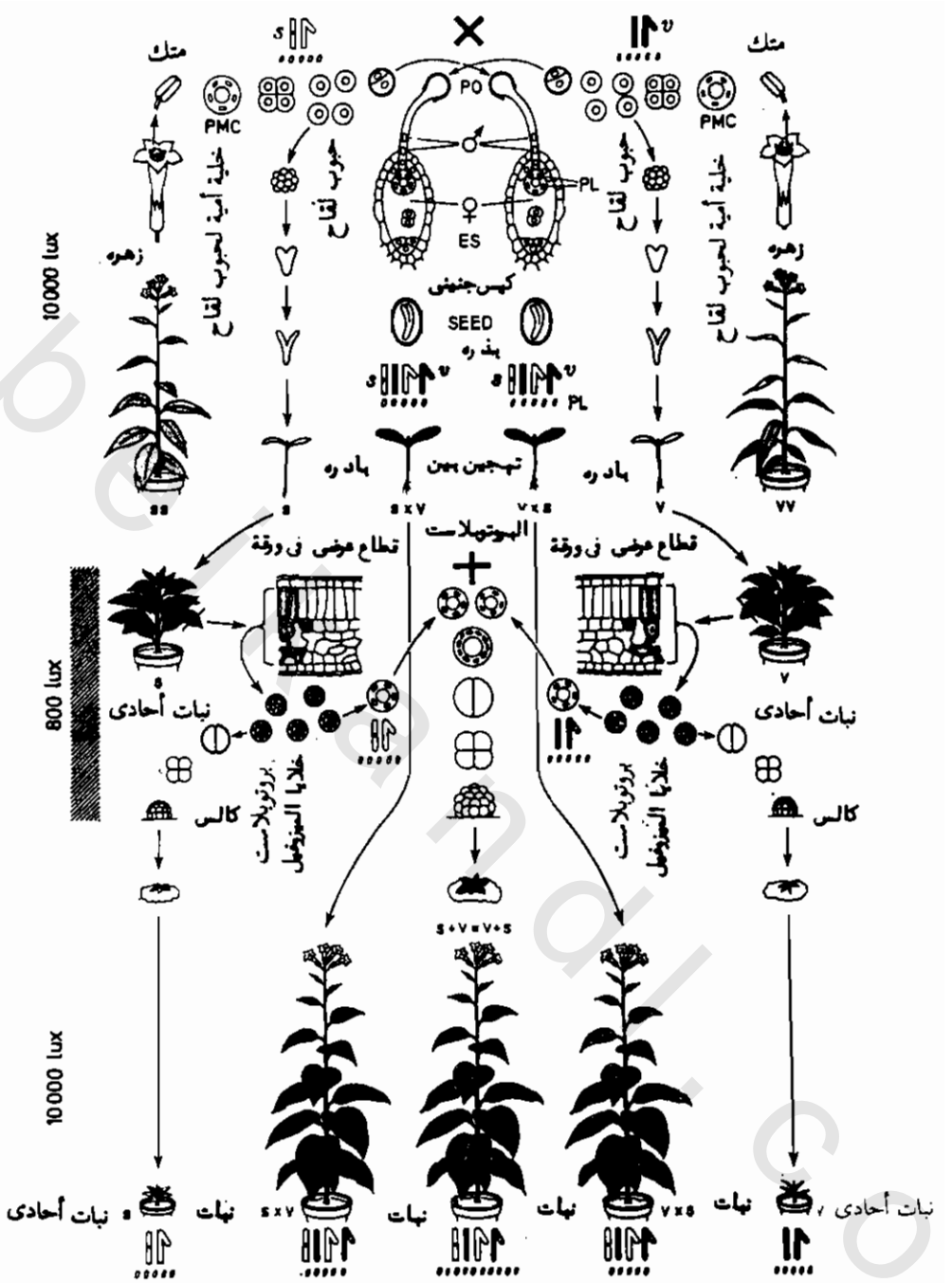


بروتوبلاست

(شكل ١١٩) : خطوات فصل البروتوبلاست من الجدار فى خلية بصل .

أ – خلية بها بلزمة مبتدئة.

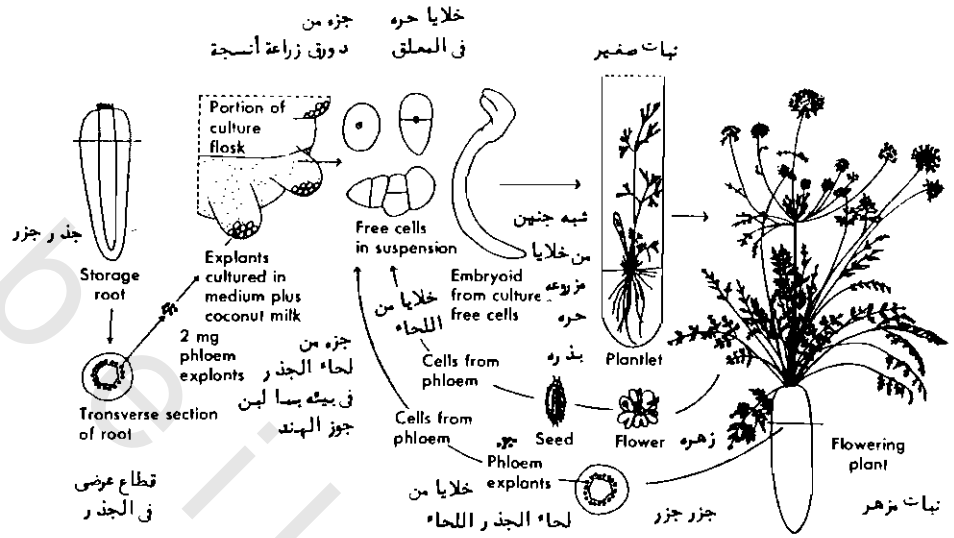
ب – خطوات فصل البروتوبلاست.



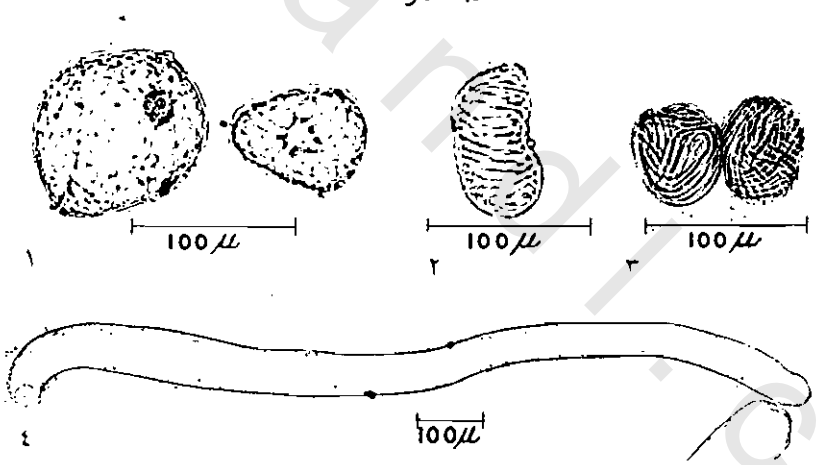
(شكل ١٢٠) : التهجين فى نبات التبغ وبإستعمال مزارع الأنسجة.

(جدول ١٤) : بيئة تستعمل فى مزارع البروتوبلاست

المكـــــونات	التركيز (ملليجرام/لتر)
أملاح معدنية	
كبريتات الأمونيوم	٧٩٠
نتـــرات الكالسيوم	٢٩٠
كبريتات المغنسيوم	٧٣٠
كلـوريد بوتاسيوم	٩١٠
نتـــرات بوتاسيوم	٨٠
نتـــرات صوديوم	١٨٠٠
كبريتات صوديوم	٤٥٠
فوسفات صوديوم ثنائية الأيدروجين	٣٢٠
حامض بوريك	١,٥
كبريتات نحاس	٠,٠٢
كلوريد المنجنيز	٦
يوديد البوتاسيوم	,٧٥
كبريتات الزنك	٢,٦
حامض المولبديك	٠,٠٠١٧
كلوريد الحديديك	٣,١
أثيليت ثنائى الأمين رباعى الخلات الصوديومى EDTA	٨
فيتامينات وأحماض أمينية	
ميسو إينوسيتول *meso* - inositol	١٠٠
جليسين	٣
ثيامين	٠,١
كلوريد البيريدوكسين	٠,١
حامض nicotinic	٠,٥
منظمات النمو	
2,4 - D	٠,١٥
كينتين	٠,١٥
مصدر الكربون	
سكروز	٢٠ جرام
آجـــــار	٢٠ جرام



خلايا مفردة



خلايا ١ و ٤ تصلح لمزارع الأنسجة خلايا ٢ و ٣ لا تصلح لمزارع الانسجة

(شكل ١٢٠أ) : تكوين نبات الجزر عن طريق مزارع الانسجه (جذور) .