

المشاكل التي تواجه مزارع الأنسجة النباتية

أولاً: التلوث (Contamination)

يُعتبر التلوث الفطري والبكتيري من أهم المشاكل التي تقابل مزارع الأنسجة النباتية والتي تمثل عقبة كبيرة في سبيل الحصول على مزارع نظيفة خالية من التلوث الميكروبي، ولذلك يجب وضع بيان عن المشاكل والأسباب التي تؤدي للتلوث ومحاولة التغلب عليها مع إتباع طرق منع التلوث مثل التأكد من سلامة أجهزة تعقيم البيئة (الضغط – درجة الحرارة – الفترة اللازمة للتعقيم) ، أجهزة الهود – الفلاتر – ملابس الفنيين وغير ذلك (Boxus and Terzl, 1988, Herman, 2004, Odutayo et al, 2007).

مصادر التلوث

- ١) التلوث الناتج من المنفصل النباتي (**Explant**) حيث التعقيم السطحي غير الجيد.
- ٢) التلوث الناتج من الوسط الغذائي ، حيث التعقيم غير الكفاء في الأوتوكلاف.
- ٣) التلوث الناتج من الزجاجيات وأدوات الزراعة.
- ٤) التلوث الناتج من الأجهزة المستخدمة في تحضير البيئة
- ٥) التلوث الناتج من الجو المحيط من هواء وتراب وجراثيم البكتيريا والفطر.
- ٦) التلوث الناتج من الحشرات – يمكن مسح الأرفف في غرفة التحضين بمبيد حشري مخفف.
- ٧) التلوث الناتج من الفنيين العاملين في مجال زراعة الأنسجة حيث يراعى النظافة العامة بالمعمل.
- ٨) التلوث الناتج من الماء العادي غير المعقم.
- ٩) إستخدام محاليل تعقيم ليست بالتركيز الملائم أو فاقدة الصلاحية لزيادة فترة إستخدامها أو من مصادر غير مضمونة.
- ١٠) المياه المستخدمة في غسيل النسيج غير معقمة.
- ١١) التلوث الناتج من الكيماويات المستخدمة (من مصادر غير معروفة).

قد تكون البكتيريا ملوثة للمزرعة ولكن غير نامية وبالتالي غير مرئية وقد يكون عدم نموها راجع إلى وجود عوامل مثبطة في البيئة منها التركيز العالي من الأملاح والسكريات وحموضة البيئة غير الملائمة (pH) أو إفراز المنفصل النباتي المجروح مواد معوقة لنمة الميكروب. في بعض الأحيان يظهر التلوث بعد عدة نقلات في البيئات الجديدة مما يؤدي إلى خسائر وفقد للمزارع بأكملها وخاصة في المعامل التجارية التي قد لا تستطيع تفسير هذا التلوث الفجائي الذي حدث.

وفيما يلي الإحتمالات المرجحة للتلوث المفاجئ في مزارع الأنسجة:

- ١) عدم كفاءة التعقيم ويتم فحص الأوتوكلاف والتأكد من درجة الحرارة والضغط بواسطة الفنيين المختصين بالصيانة وأيضاً هناك دلائل توضع مع التعقيم للتأكد من سلامة التعقيم على هيئة أوراق خاصة تتغير لونها بعد التعقيم الجيد.
- ٢) قد يرجع السبب إلى وجود بكتيريا داخلية في النسيج الذي تم زراعته (Explant) إستعادت نشاطها بعد فترة فظهر التلوث.
- ٣) عدم الكشف الدوري على الفلاتر في الـ (Hood) وعدم الإعتناء بالتعقيم السطحي لمنضدة الجهاز.
- ٤) عدم التعقيم الجيد للأدوات المستخدمة في النقل.
- ٥) عدم الفحص الجيد للزراعات قبل النقل إلى بيئة جديدة ويمكن الإستعانة بعدسات مكبرة تحت إضاءة كافية للفحص الجيد للزراعات بواسطة فنيين مدربين.

هناك بعض النقاط التي يجب أن توضع في الإعتبار عند إستخدام جهاز الـ (Hood):

- ١) الفلتر الذي يشكل العامل الأساسي في الجهاز يجب المحافظة عليه جيداً حيث إنه ذات طبيعة هشة سهلة الكسر والتلف.
- ٢) يستخدم في تعقيم منضدة الجهاز كحول الإيثانول أو الأيزوبروبانول ويجب الإبتعاد عن إستخدام الميثانول لخطورته على الإنسان.
- ٣) يمكن إستخدام اللهب الكحولي في تعقيم الأدوات داخل الجهاز ولكن يمكن أيضاً إستخدام جهاز تعقيم الأدوات الكهربائي مثل الـ (Bacti - Cinerator) وهو يقوم بالتعقيم على درجة مرتفعة جداً ١٦٠٠ ف لمدة ٥ ثوان وفي هذه الحالة يستخدم طقمان من الأدوات حتى نعطي فرصة لأن تبرد الأدوات بالقدر الكافي للإستخدام الآمن.
- ٤) الإمتناع عن وضع أي عوائق بين فلتر الجهاز ومنطقة إجراء عمليات القطع ونقل الأنسجة داخله.
- ٥) يجب الحرص على العمل قريباً من فلتر الجهاز وبعيداً عن جسم القائم بالعمل.
- ٦) إستخدام قفاز جراحي وكذلك تغطية الرأس والفم لمنع التلوث.

إضافة المضادات الحيوية للبيئة:

تضاف أحياناً إلى البيئة الغذائية بعض المضادات الحيوية لإيقاف نشاط الكائنات الدقيقة وأهمها البكتيريا الموجودة بالجزء النباتي المزروع (Young et al, 1984, O'Neil, 2001) إلا أنه يجب الأخذ في الإعتبار أن هذه

المركبات الكيماوية لها بعض الضرر لنمو الأجزاء النباتية وتكثفها ولذلك يفضل إضافتها فقط عند الضرورة كما أنه يجب أن يتم تعريف البكتيريا المسببة للتلوث قبل الشروع في إختيار المضاد الحيوي الملائم وأيضاً مراعاة التركيز الملائم لكل مركب حيوي وكما يحدث في حالة الإستخدام لفترة طويلة قد يتكون سلالات من البكتيريا تقاوم أنواع معينة من المضادات الحيوية.

تحسين طريقة التعقيم:

- 1) يمكن رفع كفاءة التعقيم السطحي للأنسجة النباتية باستخدام بعض الطرق التالية:
- 1) إستخدام مضخة ماصة للهواء تعمل إما بالهواء أو بالكهرباء للتخلص من الفقاعات الهوائية بين النسيج والمحلول والتي تعوق وصول المحلول المطهر إلى جميع أجزاء النسيج.
- 2) إضافة مادة (**Detergent**) مثل (**Tween 20**) أو الصابون لزيادة إنتشار المحلول
- 3) هز النسيج في المحلول باستخدام جهاز هزاز (**Shaker**)
- 4) تكرار التعقيم عدة مرات.
- 5) الغسيل الأخير باستخدام تركيز منخفض من المطهر بدلاً من المياه المعقمة قبل الزراعة.

ثانياً: ظهور اللون البني بمزارع الأنسجة النباتية:

يحدث تلوين للبيئة عند زراعة عدد كبير من النباتات وخاصة الأشجار والشجيرات طالما زرع المنفصل النباتي في البيئة، وينتج هذا التلوين من أكسدة المركبات الفينولية عند تفاعلها مع مكونات البيئة ويتحول اللون إلى بني أو أرجواني حول النسيج وقد ينتشر في البيئة (**Compton and Preece, 1986**).

ويوجد مدى واسع من المركبات الفينولية في النبات وهذه المركبات موجودة في كل النسيج النباتي وفي بعض النباتات تقع هذه المركبات في خلايا خاصة تسمى (**Tannin Idioblasts**) أو في الفجوات الخلوية (**Vacuoles**) ومعظم المواد الفينولية إما أن تكون:

- فلافونيد مع مجموعة هيدروكسيل لمجموعة فعالة
- مركبات محتوية على حلقة عطرية بها 6 ذرات كربون ومجموعة جانبية على الحلقة المحتوية على واحد أو ثلاثة ذرات كربون والمحتوية على مجموعة كربوكسيل نشيطة.

وتزيد المركبات الفينولية نمو الخلية وتقلل من تخليق البروتين ووجود مزيد من السكر في بيئة الزراعة يساعد على زيادة تخليق المركبات الفينولية وهذه المركبات هامة للنبات وتتأكسد لتكوين كينون الذي يتبلر بسرعة ويرتبط بالبروتين. وتمنع مركبات البولي فينول إزالة مجموعة الكربوكسيل الموجودة في إندول حامض الخليك (**IAA**) ولذلك يشجع النمو، بينما تشجع الفينولات الأحادية إزالة مجموعة الكربوكسيل وهذا يفسر أهمية الدور الذي تلعبه الفينولات في الإتران الهرموني للنباتات.

وفي مزارع الأنسجة النباتية تتأكسد الفينولات بواسطة إنزيمات البيراكسيديز أو بواسطة إنزيمات البولي فينول أكسيديز والمركبات المتأكسدة تثبط النشاط الإنزيمي وتؤدي إلى موت المنفصل النباتي وهذه تسمى بمصطلح تثبيط ذاتي أو تلقائي (**Auto Inhibition**) لأن المنفصل النباتي يثبط نموه ويتوقف هذا على ماهية هذه

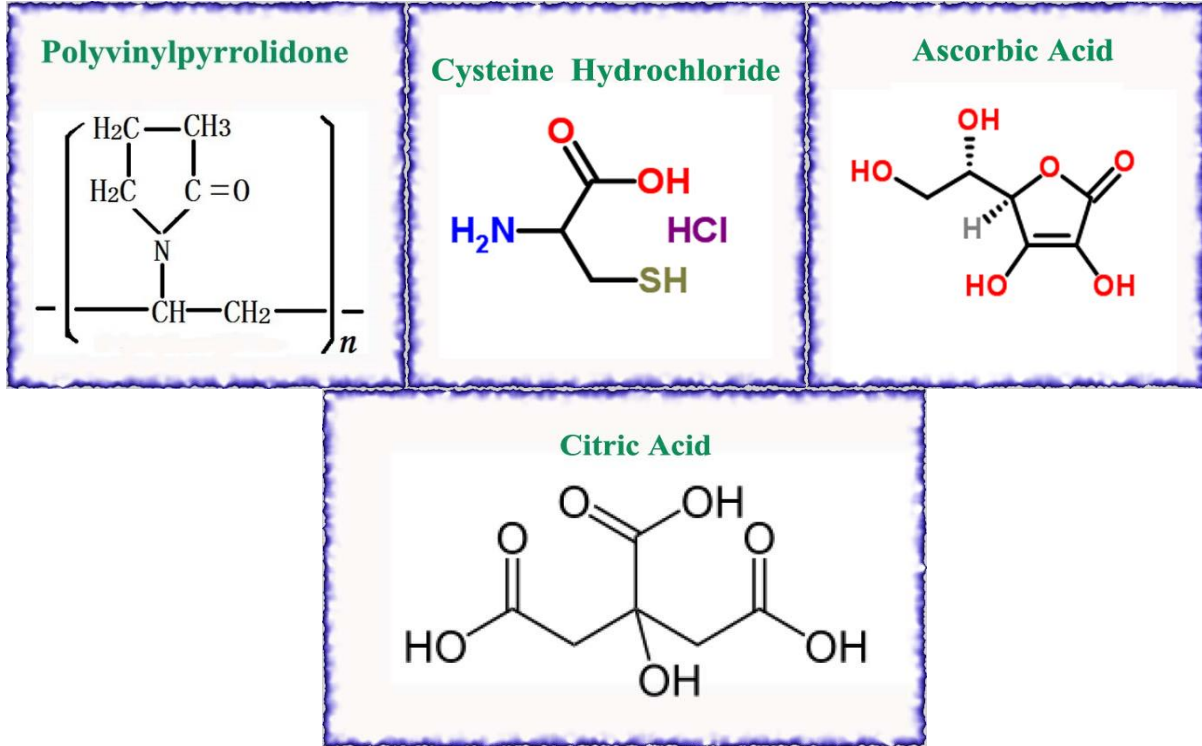
المركبات وكيفية تأثيرها على الأنسجة وأثرها وتأثيرها على الأنسجة التي حولها مما يؤدي إلى تدهور الأنسجة وتلوينها باللون البني وتموت (Compton and Preece, 1986, Debergh and Zimmerman, 1991).

الطرق المتبعة لتقليل المواد الفينولية بالبيئة:

- ١) صغر المنفصل النباتي فيجب أن يكون الجزء المجروح صغيراً بقدر الإمكان في المنفصل النباتي حيث تستخدم أدوات حادة جداً للقطع.
- ٢) استخدام مضادات الأكسدة إما بنقع الأجزاء النباتية فيها أو في البيئة أو كليهما معاً حيث إن مضادات الأكسدة لا تمنع تكوين المواد الفينولية ولكنها تمنع بلمرتها (بلمرة الكينون) وهذا يقلل الفرصة للفينولات للتفاعل مع البروتين. كما يلاحظ أن بعض المواد المضادة للأكسدة أحسن من الأخرى.

المواد المستخدمة لتقليل من عمليات الأكسدة:

- ١) بولي فينيل بيروليدون (**polyvinylpyrrolidone**)
- ٢) سيستين هيدروكلوريد (**cysteine hydrochloride**)
- ٣) حامض الستريك (**citric acid**)
- ٤) حامض الأسكوربيك (**ascorbic acid**)



تقليل الأملاح في البيئة:

من المعروف أن البيئة ذات التركيز المنخفض من الأملاح يقلل بها المواد الفينولية كما أن خفض معدل النيتروجين في البيئة يؤثر على مستوى المواد الفينولية ويحد منها.

تأثير منظمات النمو في البيئة:

تعمل منظمات النمو وخاصة الأوكسين والسيبتوكينين على زيادة مستوى المواد الفينولية، وعند إزالتها من البيئة أو تخفيض التركيز تتحسن النباتات حيث يأخذ المنفصل النباتي الفرصة لخفض مستوى المواد الفينولية ثم ينتقل بعد ذلك إلى بيئة تحتوي على منظمات النمو.

دور الفحم المنشط:

يساعد الفحم النباتي النشط على تقليل كمية المواد الفينولية المفروزة في البيئة وذلك بإدمصاصها كما يدمص بعض مركبات البيئة وخاصة الهرمونات.

مستوى الإضاءة:

إن خفض مستوى الإضاءة يقلل من تحليل المركبات الفينولية والدراسات على هذا الموضوع قليلة وربما لا يكون للإضاءة تأثير كبير.

نقع المنفصل النباتي:

وذلك في ماء معقم لعدة ساعات بعد فصله ثم يلي ذلك زراعته في بيئة تحتوي على القليل من الأملاح لخفض تأثير المركبات الفينولية

النقل السريع للنبات:

وذلك بنقل النسيج إلى بيئة طازجة على فترات متقاربة حتى يمكن تقليل التلوين ولكن هذه الطريقة مكلفة إلى حد كبير حيث يزيد من إستهلاك البيئات المغذية وما يتعلق بها من عمليات الإعداد. مما سبق نرى أن هناك معاملة أو أكثر من المعاملات سابقة الذكر تصلح للتغلب على مشكلة المواد الفينولية ، وفي معظم الحالات هذا النوع من مشاكل التلوين تتأثر بطرق الحل السابقة.

ثالثاً: إحتراق القمة النامية (Shoot tip Necrosis – Tip burn):

يعتبر إحتراق القمة النامية من العيوب الفسيولوجية الشائعة المتعلقة بمزارع الأنسجة النباتية، حيث يحدث إصفرار للقمة ويؤدي في النهاية لإحتراق القمة النامية وموتها، ويشجع ذلك على نمو البراعم الجانبية. ولعلاج هذه الظاهرة فقد نصح العلماء بالآتي:

- (١) زيادة تركيز الكالسيوم في البيئة
- (٢) زيادة التبادل الغازي في أوعية الزراعة باستخدام فلاتر في أغطية الأوعية.

رابعاً: الظاهرة الزجاجية (التزجج) (Vitrification):

لوحظ بعض المشاكل الفسيولوجية لمحاصيل الصوبات فيما يسمى بالظاهرة الزجاجية أو التزجج أو البلب بالماء أو يمكن إستخدام لفظ الهشاشة (Ziv, 1991) ، وتزيد هذه الظاهرة خصوصاً عند نقص الكالسيوم، وتزيد عامة بالعوامل التي تساعد على زيادة نمو المجموع الجذري على حساب المجموع الخضري (Van Berkel, 1981) وفي المعمل بين العالم (Debergh, 1983) بأن هذه الظاهرة تؤدي إلى إستطالة النباتات ويعقب ذلك زيادة الماء حيث تكون عسيرة وتتميز بالهشاشة ثم أخيراً تصفر النباتات أو تكون شبه شفافة حيث بين ديبرج أن العوامل الآتية تؤثر على تكوين هذه الظاهرة:

- (١) نوع النبات المأخوذ منه المنفصل النباتي (Donor Plant).
- (٢) حجم وعاء الزراعة لوحظ أنه كلما كان كبيراً قلت الظاهرة.
- (٣) نوعية البيئة – صلابة أم سائلة.
- (٤) المعاملة بدرجات الحرارة المنخفضة ٣ - ٤ م.
- (٥) تركيز النترات والكلوريدات والكالسيوم في البيئة.
- (٦) السيتوكينين: نوعيته وتركيزه – فقد وجد أن إزالة البنزيل أدينين من البيئة يقلل من تكوين هذه الظاهرة.
- (٧) إستخدام السيكوسيل في البيئة أو مضادات الأوكسينات.
- (٨) تركيز الكربوهيدرات.

ولقد بين العالم البلجيكي ديبرج (Debergh et al, 1992) أن مادة الأجار هي المسؤولة عن الظاهرة الزجاجية حيث أنها تؤثر على جهد الماء ، وكان تصحيح تركيزات الأجار في البيئة العامل الحكم في علاج هذه الظاهرة حيث لوحظ أنه بزيادة كمية الأجار تقل الظاهرة الزجاجية (Vitrification) ولقد وصف أن أوراق النباتات ذات الظاهرة الزجاجية بأنها عريضة وسميكة وعسيرة و غضة أو متجعدة ذات تشوهات واضحة وذلك من خلال نقص عمليات اللجننة للأوعية والخلايا وكذلك تضخمها.

خامساً: الإختلافات الوراثية (Somaclonal Variation):

من المعروف حالياً أن هناك إختلافات وراثية تظهر في الخلايا غير المتشكلة (الكالس) وكذلك البروتوبلاست والأنسجة المختلفة أيضاً في الصفات المورفولوجية للنباتات الناتجة. ومعظم الإختلافات الوراثية قد ترجع إلى التغيرات في عدد وتركيب الكروموسومات.

ويمكن الإستفادة من الإختلافات الوراثية التي تظهر على النباتات الناتجة من زراعة الخلايا الجسمية على بيئة غذائية داخل المعمل (**in vitro**) ومن الممكن إحداث تغييرات وراثية بمعدلات عالية في الأصناف الإقتصادية بدون إجراء تهجينات مع تراكيب وراثية أخرى وبالتالي ممارسة إجراء عملية الإختخاب بين النباتات الناتجة. وقد إستخدم إحداث الطفرات معملياً في تحسين محاصيل عديدة (*Novak and Brunner, 1992, Encheva et al, 2003*).

تفسير نشأة الإختلافات الوراثية (Somaclones):

لقد تم نشر عدد من الإحتمالات بواسطة كثير من الباحثين لتفسير نشأة الإختلافات الوراثية بين النباتات الناتجة من زراعة الخلايا الجسمية (الأوراق الفلقية، الجذر ، الساق، مزارع البروتوبلاست) ويمكن تلخيص هذه الإحتمالات في النقاط التالية:

- (١) طفرات جينية.
- (٢) تغيرات في أجزاء الكروموسوم.
 - (أ) النقص (**Deletion**)
 - (ب) الإضافة (**Duplication**)
- (٣) تغيرات ترتيبية للجينات على الكروموسوم وتشمل:
 - (أ) الإنتقالات الكروموسومية
 - (ب) الإقلابات الكروموسومية
- (٤) تغيرات عديدة في المجموعة الكروموسومية وتشمل:
 - (أ) عديد الأنوية (**Polyploidy**)
 - (ب) وحيد النواة (**Aneuploidy**)

التغيرات على مظهر النباتات الناتجة

أشار عديد من العلماء والباحثين إلى أن النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة بغض النظر عن مصدر النسيج أو الطريقة المتبعة للحصول عليه إن هذه النباتات قد تكون مختلفة من ناحية المظهر الخارجي (*Skivuin and Janick, 1978*). قد يكون الإختلاف في لون وشكل الزهرة، كما قد يحدث في تركيب ووظيفة الثغور بالنباتات.

قسم (Ibrahim,2003) الاختلافات المظهرية في نباتات الموز الناتج عن الإكثار الدقيق إلى أربع مجموعات: المجموعة الأولى تشمل تغير في الحجم الطبيعي للنباتات سواء كانت بالتقزم أو زيادة في طول النبات. المجموعة الثانية يندرج تحتها تغير في شكل الورقة وتشوهها وعدم تماثل نصفي الورقة. المجموعة الثالثة يحدث بها تغير في اللون الطبيعي للورقة فيظهر موزيك بالورقة وهو غير ما قد يسببه المرض الفيروسي أو زيادة في صبغة الأنثوسيانين. المجموعة الرابعة تغير في لون الساق الكاذبة وقد تتحول إلى اللون الأسود. وقد أرجعت الدراسة السبب في الاختلافات المظهرية إلى زيادة عدد مرات الإكثار المعلمي (**Subcultures**) ولزيادة تركيز (**BA**) في البيئة وأوضحت الدراسة أيضاً أن صنف الموز واليمز (**Williams**) أكثر ثباتاً من ناحية التباين الوراثي عن صنف جرانندان. وقد أرجع البعض زيادة حدوث الاختلافات إلى زيادة تركيز منظمات النمو في البيئة وخاصة السيٲوكينين.