المحاضرة الاولى

المقدمة

أشتق المصطلح **In vitro** أساسا من الكلمة اللاتينية **Vitirium** والتي تعني الزجاج وقد ترجمت الى العربية بمسميات عديدة أهمها الزراعة خارج الجسم الحي أو الزراعة داخل الأنابيب الزجاجية. اعتمدت فكرة زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات على فكرة اقترحت أساسا من قبل **Sholden** و **Shoan** 1839 م أسماها **TOtipotency**, اذ اقترحا بأن كل خلية حية مفصولة من كائن حي لها قابلية الانقسام والتطور بمعزل عن الكائن الحي المفصولة عنه فيما اذا توفرت لها ظروف الانقسام والتطور والنمو. تبنى الفكرة لاحقا العالم الالماني عام **Vogtich** 1878م مقترحا ما أسماه بنظرية الخلية **Cell theory** معتبرا بأن الخلية هي وحدة الشكل والوظيفة في الكائن الحي أخذ هذا العالم عقلا(**Cuttings**) من نبات الصفصاف(**Willow**) وقطعها الى قطع صغيرة مفترضا بأن قطع ساق الصفصاف بإمكانها ان تنتج براعما واوراقا بغض النظر عن حجمها . وفي عام 1902 م افترض العالم النباتي **Gottib Haberlandt** بأن الخلايا النباتية لها القدرة على الانقسام وتكوين نبات كامل (**Totipotent**) مستندا ولأول مره على أساس زراعة أنسجة النبات ومحاولا أن يبرهن بأن أعضاء او أنسجة وحتى الخلايا المفردة قد تنتج نباتات كاملة فيما لو زرعت تحت ظروف مناسبة. كانت تلك المحاولات سببا لبداية علم جديد بدأ أولى اطلالاته في عام 1934 م على يد عالم النبات الامريكي **Philip White** حينما نجح في زراعة أطراف جذور نبات الطماطة على وسط غذائي عززه بمستخلصات الأعفان وفيتامينات معقد**B**. وبعد خمس سنوات وبعمل منفصل عن الذي أجراه هذا العالم تمكن الباحثان الفرنسيان **Nobecourt** و **Gauthent** اضافة الى الأمريكي وايت من تنشئة مزارع نسيجية نباتية ناجحة بعد ان اضافوا أندول حامض الخليك (**IAA**) ومجموعة فيتامينات **B** الى الأوساط الغذائية, تلتها الكثير من الانجازات في هذا المجال .

ونظرا لأهمية هذا العلم لذا فقد توسعت تطبيقاته خلال عقد التسعينات من القرن الماضي والعقد الأول من هذا القرن وكانت هناك اضافات جديدة تسجل يوميا مما جذب العديد من الباحثين للعمل في هذا المجال. وحديثا اقترنت زراعة خلايا وأنسجة النبات بمواضيع تكنولوجيا الدنا (**DNA technology**) . وساهمت في امداد الثورة الزراعية الخضراء بمحاصيل تمتاز بوفرة الحاصل وجودة النوعية وخلوها من المسببات المرضية وفي انتاج المركبات الصيدلانية المهمة. حيث يمكن تلخيص تلك التطبيقات كما يلي :

1. الاكثار السريع والواسع للأنواع النباتية عامه والنادرة والمهددة بالانقراض عالية الجودة بمدة قصيرة وتحت ظروف مسيطر عليها.

2. انتاج الهجن الجسمية (**Somatic hybrids**) ذات التطبيقات المهمة في تحسين النبات.
3. انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية وخاصة الفيروسية منها مما يساهم في زيادة الانتاج الزراعي في وحدة المساحة.
4. انتاج نباتات من الأنواع ذات البذور صعبة الانبات(**Recalcitrant**) ومن تلك التي لا تكون بذورا أو تكون بذور مجهضة(**Aboited ceeds**) ساهم ذلك في التوسع بزراعة تلك النباتات وتقليل كلفة انتاجها.
5. تحفيز وزيادة التغاير الوراثي(**Genetic variation**).
6. التركيب الدقيق(**Nicrografting**) للأنواع عالية الجودة على اصول منتخبة.
7. التجميد الفائق وخزن المصادر الوراثية النباتية لفترات زمنية مختلفة من خلال تأسيس بنوك الجينات في أماكن محددة وتحت ظروف مسيطر عليها ومن ثم اعادة اخلافها.
8. انتاج النباتات المحورة وراثيا وراثيا من خلال تقانات هندسة الخلية, النسيج أو العضو وراثية.
9. انتاج البذور الصناعية من الأجنة الجسمية بما يحقق زيادة الانتاج وتحسين نوعية.
10. انتاج نباتات مقاومة للأمراض المختلفة والآفات بما فيها الحشرية والادغال.
11. انتاج نباتات مقاومة للإجهادات البيئية المختلفة من جفاف وملوحة وغيرها.
12. السيطرة البيولوجية كتحفيز نشوء الأعضاء النباتية المرغوبة والتزهير المبكر.
13. حفظ الأجنة وحبوب اللقاح لفترات زمنية طويلة مما يساهم في زيادة التنوع الاحيائي.
14. التغلب على ظاهرة عدم التوافق في التهجينات غير المتوافقة.
15. امكانية اجراء التهجينات الجسمية الواسعة من خلال دمج بروتوبلاستات من أنواع نباتية مختلفة.
16. توفر المزارع النسيجية فرصة لإنتاج مركبات الايض المختلفة تحت ظروف مسيطر عليها وبكيات وفيرة على مدار السنة.

فوائد زراعة الأنسجة النباتية

نطلق هنا مصطلح زراعة أنسجة النبات مجاز ليشتمل زراعة أي جزء من النبات ابتداء من الخلية المفردة والبروتوبلاست مرورا بأنسجة الكالس والمعلق الخلوي وانتهاء بأعضاء النبات

والأجنة وحتى البذور اذا ما زرعت داخل أوعية الزراعة المعقمة, لذا فان المقصود ليس زراعة نسيج نباتي حصرا. أجمع مختصو التقانة الاحيائية بأن مجال زراعة الأنسجة النباتية هو الأكثر سرعة في التطور مقارنة مع مجالات التقانات الاحيائية الاخرى بالنظر لكثرة نتاجاته التي يتداولها الناس حاليا وصنع ثورة خضراء بعد تحسين النبات كما ونوعا. وسعت المعارف التي جناها مختصو التقانة الاحيائية من زراعة انسجة النبات مداركهم في مجالات شتى منها الايض ,النمو ,التمايز والتشكل في الخلايا النباتية. اضافة الى انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية واستثمار التقانة في انتاج مئات المركبات المهمة وخاصة في مجال الصناعة الدوائية .

أنواع مزارع أنسجة النبات

توجد تقانات مختلفة لزراعة النبات نسيجيا مبنية أساسا على الجزء النباتي كما يلي:

1- **مزارع الكالس (Callus culture)** ويشمل زراعة نسيج متخصص متمايز لجزء نباتي والذي يفقد تمايزه خارج الجسم الحي ليكون كتلة من الخلايا تسمى الكالس.
2- **زراعة العضو غير المتخصص(Unorganized organ culture)** ويشمل عزل خلايا او انسجة او جزء من عضو وزراعتها خارج الجسم الحي لتكون كالس.
3- **زراعة الخلية(Cell culture)** ويشتمل على زراعة خلايا مفردة يتم الحصول عليها من نسيج جزء نباتي او كالس والتي غالبا ما نتج في مزارع المعلقات الخلوية.
4- **زراعة البروتوبلاست (Protoplast culture)** النبات عبارة عن خلية عارية من الجدار الخلوي.

المحاضرة الثانية

الأوساط الغذائية Culture media

يرجع نمو وتطور الخلايا وأنسجة وأعضاء النبات الى محتوى الاوساط الغذائية من المغذيات ولذلك فاختيار الوسط الغذائي المناسب قد يكون مفتاح النجاح في تقانات زراعة أنسجة النبات يتضمن الوسط الغذائي عموما العناصر التي يحتاجها النبات الكامل في نموه والتي يصنع منها احتياجاته واحتياجات أغلب الكائنات الحية الأخرى منها مع ملاحظة بأن الأجزاء النباتية النامية خارج الجسم الحي تكون معتمدة في غذائها على مكونات الوسط **Heterotrophic** ولا تستطيع تصنيع غذائها كما يفعل النبات النامي في الحقل.

انواع الاوساط الغذائية

يعتمد محتوى الوسط من المغذيات على عاملين رئيسيين, أولهما النوع النباتي وثانيهما نوع المادة النباتية المزروعة سواء كانت خلية , نسيج , عضو او بروتوبلاست. الأوساط على نوعين اما صلبة(**Solid**) أو سائلة (**Liquid**) في طبيعتها واختيار اي منها على مقدار استجابة ذلك النوع النباتي والجزء النباتي المفصول منه للنجاح في مزارعه النسيجية. والتي يمكن اختصارها كما يلي:

1-**وسط وايت(Whites mediu)** استعمل منذ فترة طويلة وكان قد طور أساسا لمزارع الجذور وتم تحويره اما بزيادة أو تقليل العناصر الداخلة في تركيب الوسط وقد تكون اضافة او حذف لبعض منها.

2-**وسط موراشيك وسكوك (Murashige and Skoog, MS)** تم عمل التوليفة الغذائية لهذا الوسط أساسا لتحفيز تكوين الأعضاء واخلاف النبات من الأنسجة المزروعة. يعد من أكثر الأوساط استعمالا وتم تحويره بتوليفات مختلة ليناسب أغلب النباتات المزروعة نسيجية.

3-**وسط كامبروك (Gamborg, B5)** صممت توليفة الوسط أساسا لمزارع أنسجة الكالس والمعلقات الخلوية وأصبح يستعمل في زراعة البروتوبلاست.

4-وسط **N6** :عمل توليفه العالم **Chu** ليكون مناسب لزراعة متوك محاصيل الحبوب أساسا ويستعمل حاليا في أنواع اخرى من المزارع.

5-وسط نيش(**Nistchs**) يستعمل في الغالب في مزارع المتوك وحبوب اللقاح .

الأوساط الصناعية والطبيعية

عندما يتكون الوسط الغذائي من مكونات كيميائية معلومة و محددة يسمى بالوسط الغذائي الصناعي أو التركيبي واذا احتوى على مركبات كيميائية غير محددة أو غير معلومة المكونات

بدقة مثل عصير الفاكهة ومستخلصات الخضراوات فيسمى بالوسط الطبيعي ,عموما يسود استعمال الأوساط التركيبية مزارع أنسجة النبات عدا بعض الاستثناءات ولأجزاء نباتية محددة.

مكونات الأوساط Constituens of media

يحتاج النبات في تغذيته ووظائفه الفسلجية الى العديد من العناصر والتي يجب تجهيزها الى الوسط الزرعي للمزارع النسيجية ولكل عنصر وظيفته التي يساهم فيها, يحتوي الوسط الغذائي على المكونات التالية:

أولا: المغذيات غير العضوية (Inorganic nutrients)

ثانيا: مصادر الكربون والطاقة (Carbon and energy sources)

ثالثا: الاضافات العضوية (Organic supplements)

رابعا: منظمات النمو (Growth regulators)

خامسا: مصلبات الوسط (Solidifying agents)

أولا: المغذيات غير العضوية(Inorganic nutrients)

تتألف من المغذيات الكبرى (بتراكيز اكثر من ($0.5\ mmol.1^{-1}$) والصغرى (بتراكيز اقل من $0.5\ mmol.1^{-1}$) تجهز تلك المغذيات الكبرى والصغرى من مدى واسع من الأملاح المعدنية (العناصر). تتفرق وتتأين الأملاح المعدنية عند اذابتها بالماء وعليه قد يشارك عنصر واحد قادم من أكثر من مركب فعلى سبيل المثال , تأتي ايونات البوتاسيوم(k^+) في وسط **MS** من مساهمة ملحي KNO_3 و KH_2PO_4 بينما يأتي NO_3^- من KNO_3 و NH_4NO_3 , وتشمل على كلا مما يأتي:

1-المغذيات الكبرى(Macronutrients) : تشتمل على العناصر الرئيسية الستة التي تدخل في أوساط مزارع النبات وهي (النتروجين,الفسفور,البوتاسيوم,الكالسيوم,المغنيسيوم,الكبريت). يتراوح التركيز المثالي لأغلب الزروعات من النتروجين والبوتاسيوم حوالي $25mmol.1^-$, بينما تتراوح تراكيز الكالسيوم, الفسفور, الكبريت والمغنيسيوم ضمن مدى$mmol.1^-$(3-1) تكون املاح النايتريت والامونيوم سوية مصدرة للنتروجين .

2-المغذيات الصغرى(Micronutrients): بالرغم من اضافتها الى الأوساط بتراكيز قليلة جدا ,الا أنها ضرورية جدا لنمو الخلايا والأنسجة النباتية . تشتمل على (الحديد, المنغنيز ,الزنك, البورون ,النحاس ,المولبدنيوم) من بين العناصر الصغرى , تكون الحاجة الى الحديد حرجة جدا , لذلك تضاف اشكال من الحديد والنحاس المخلبية(**Chelated**) الى الأوساط.

ثانيا: مصادر الكربون والطاقةCarbon and energy sources

تعتمد الخلايا النباتية والانسجة المزروعة على مكونات الوسط في غذائها ,لذلك تستهلك الكربون المضاف الى الوسط كمصدر للطاقة .يفضل السكروز مصدرة للطاقة وخلال عملية تعقيم الاوساط بالمؤصدة , يتحلل السكروز الى كلوكوز وفركتوز. تستهلك الخلايا النباتية المزروعة الكلوكوز اولا ومن ثم الفركتوز وتكون كفاءة الكلوكوز مثل كفاءة السكروز بينما الفركتوز اقل كفاءة ويمكن تجهيز الوسط بالكلوكوز والفركتوز مباشرة بدلا من السكروز .

ثالثا: الاضافات العضويةOrganic supplements وتشتمل على الفيتامينات الامينية ,الحوامض العضوية ,المستخلصات العضوية, الفحم النشط والمضادات الحيوية .

الفيتامينات: تتمكن خلايا وأنسجة النبات المزروعة (كما هوه الحال في النبات الكامل) من تصنيع الفيتامينات ولكن بكميات اقل من احتياجاتها ولا تعزز من نموها بالكامل .لذلك يستوجب الامر اضافتها للوسط الغذائي لتحقيق نمو جيد للخلايا. و تشتمل تلك على **Thymine , Riboflavin , Nicotinic acid , Biotin , Ascorbic acid , Vitamin E** .

2-الاحماض الامينية : بالرغم من قابلية الخلايا المزروعة على تصنيع الأحماض الامينية لحد ما, وجد بأن اضافتها الى الوسط الغذائي يحفز نمو الخلايا وتكاثرها . تستهلك الخلايا النباتية الأحماض الامينية مثل **Glutamine , Aspatine , Arginine , Cystine** باعتبارها مصادر للنتروجين العضوي أسهل بكثير من النتروجين اللاعضوي.

3-الحوامض العضوية :تساهم الاحماض العضوية مثل Citric acid **, Malate acid , Fumarate** , كمركبات وسطية في دورة كريس وبذلك تشجع من نمو الخلايا المزروعة .وجد بان**Pyruvate** يزيد من سرعة نمو الخلايا.

4-المستخلصات العضوية: يضيف الكثير من الباحثين المستخلصات العضوية الى أوساط الزراعة مثل مستخلص الخميرة , متحلل الكازائين , ماء جوز الهند ,عصير البرتقال ,عصير الطماطم ومستخلص البطاطا الواقع يحبذ تجنب اضافة المستخلصات العضوية بسبب التغاير العالي في كمية ونوعية عوامل تشجيع النمو المتوفرة فيها ولتداخلاتها المعقدة مع مكونات الوسط الاخرى .اتجه العديد من الباحثين حديثا على احلال بعض المركبات العضوية بدلا منها مثل احلال **Aspatine** بدلا من مستخلص الخميرة واحلال **Glutamine** محل مستخلصات الفاكهة.

5-الفحم النشط: يحفز اضافة الفحم النشط الى الوسط من نمو وتمايز أنواع محددة من الخلايا مثل الجزر والطماطم , يزيل أو يقلل من بعض من المركبات السامة أو المثبطة التي يفرزها النسيج النباتي الى الوسط مثل المركبات الفينولية من خلال ادمصاصه لها. بالمقابل, لوحظ

تثبيط الفحم المنشط لزروعات معينة مثل انسجة التبغ وفول الصويا غالبا ما يرجع السبب الى ادمصاص الفحم المنشط لمنضمات النمو.

6-المضادات الحيوية: من الضروري أحيانا اضافة مضادات حيوية وخاصة الستربتومايسين او الكانامايسين الى الوسط لمنع نمو الكائنات المجهرية وبتراكيز منخفضة . يفضل تجنب اضافتها قدر المستطاع بسبب تأثيرها المثبط لنمو الخلايا.

رابعا: منضمات النمو Growth regulators

عبارة عن مركبات عضوية طبيعية تشجع على نمو الخلايا النباتية ونشوئها وتمايزها الى نباتات. قسمت منضمات النمو التي تضاف الى الأوساط الغذائية الى أربع انواع عامة , تشمل الاوكسينات, السايتوكاينينات ,الجبرلينات, وحامض الانفصال(**ABA**) .اثبتت تلك المركبات أهميتها التي لا تستغني عنها في تشجيع نمو وتمايز وتكوين الأعضاء في مزارع انسجة النبات.

1-**الاوكسينات** : تحفز الاوكسينات على انقسام الخلايا ,استطالتها ونشوء الكالس على الاجزاء النباتية في التراكيز العالية وكذلك تحفز على تكوين الجذور في التراكيز الواطئة

2-السايتوكاينينات: تحفز على انقسام الخلايا, التمايز الى أفرع وتكوين الأجنة الجسمية تحفز السايتوكاينينات تصنيع **RNA** وبذلك فهي تحفز من نشاط البروتينات عموما والانزيمات خصوصا في الانسجة المزروعة .

3-الجبرلينات: شخصت العشرات من الجبرلينات كمنظمات نمو ومن بينها ال**GA3.** الأكثر استعمالا .والذي يشجع نمو الخلايا المزروعة ويسرع من نمو الكالس ويحفز النبيتات القصيرة على الاستطالة . باستطاعة الجبرلينات تشجيع او تثبيط المزارع النسيجية اعتمادا على النوع النباتي وغالبا ما تثبط ظهور الجذور العرضية والنموات الخضرية.

حامض السقوط(ABA): يمكن تحفيز أو تثبيط نمو الكالس بإضافة **ABA** الى الوسط اذ يعتمد ذلك بشكل كبير على طبيعية النوع النباتي . تبرز أهميته في تحفيزه نشوء الاجنة الجسمية .

خامسا: مصلبات الوسط

يتطلب تحضير أوساط صلبة أو نصف صلبة اضافة مواد صلبة(**Solidifying agents**) وتسمى أحيانا(**Gelling agents**) في واقع الحال تمسك عوامل التصليب الجزء النباتي وتجعله مستقرة ومن أهم هذه المصلبات كالاتي:

1-**الأكار**:مركب متعدد السكريات يتم الحصول عليه من أدغال تنمو في البحار وهو الأكثر شيوعا كمصلب للوسط لا يتفاعل مع مكونات الوسط ولا تهضمه الانزيمات النباتية وثابت تحت درجة حرارة حضن الزروعات .يضاف الى الوسط بتركيز **0,5** الى 1% ليصبح الوسط هلامي

2-**الجيلاتين:** يضاف الى الوسط بتراكيز عالية تصل الى 10% مع نسبة نجاح محدودة بسبب ذوبانه في درجات الحرارة المنخفضة (2,5 م) وبذلك يفقد خواصه كمصلب للوسط.

3-**مصلبات أخرى:** تستعمل مصلبات متنوعة اخرى على نطاق ضيق مثل الأكاروز النقي والجيلرايت .من المفيد استعمال مصلبات صناعية وتكوينها هلام بتراكيز منخفضة نسبية (1.0-2.5 غم لتر$^{-1}$).

تحضير الأوساط الغذائية

الطريقة المتعارف عليها في تحضير الأوساط تقتضي تحضير محاليل خزينة مركزة من 10 الى 100 مرة وتستعمل مواد كيميائية عالية النقاوة وماء مقطر في اذابتها , تخزن المحاليل الخزينة في عبوات زجاجية أو بلاستيكية تحت ظروف التجميد وتستعمل حين الحاجة ,مع هذا انتجت الشركات المتخصصة أوساط مختلفة على شكل مسحوق جاهزة للاستعمال بعد اذابتها مما وفر الوقت والجهد واستبعاد احتمالية الخطأ الذي قد يحصل نتيجة تحضير الأوساط وتوفير اليد العاملة .

اختيار الوسط المناسب :

من المعتاد استعمال مكونات الوسطين **MS** أو **B5** من أجل انتخاب وسط مناسب للجزء والنوع النباتي المطلوب زراعته نسيجيا , واذا لم يكونا كفوئين فيتم استبدالهما بوسط اخر . يتم عادة اختبار 3 – 5 تراكيز من منظمات النمو وبتوليفات مختلفة وانتخاب التوليفة الأفضل عند حصول استجابة . ولا بد من التأكيد على ضرورة استعمال الكيميائيات عالية النقاوة وضبط التراكيز المستعملة ,اذ أن اي خطا يسبب في خسارة كبيرة علما بأن أغلب منظمات النمو لا تذوب في الماء المقطر ويجب اذابتها في الكحول أو **NAOH** يتم عمل محاليل خزينة من مكونات الوسط عند الرغبة في تحضير الوسط داخل المختبر.

ضبط الاس الهيدروجيني(PH of the medium):

يكون **PH** الوسط المناسب لأغلب المزارع النسيجية ضمن المدى 5الى6 .ينخفض عموما بعد التعقيم البخاري بحوالي0.3 الى 0.5 وحدة. يضبط**PH** الوسط عند تحضيره وقبل التعقيم الى القيمة المناسبة وليس هناك ضرورة لإضافة دوارئ **(Buffers)** للمحافظة على قيمته تتوقف الخلايا النباتية عن النمو في قيم**PH** تزيد عن 7.0 وتقل عن 4.5 ويستبدل الوسط في حالة انخفاض قيمتها ويصبح الوسط اكثر صلابة عند وصولها الى 6.0 وصعودا ولا يتصلب الوسط اذا انخفضت الى اقل من 5.

تعقيم الاوساط: يتم تعقيم الاوساط الغذائية بعد اكمال تحضيرها في مؤصدة (**Autoclave**) على درجة حرارة 121 م وضغط 10 باسكال (**psi**) لمدة 20 دقيقة بالرغم من احتمالية رفع درجة الحرارة والضغط والوقت حسب حجوم الأوساط الداخلة الى التعقيم . تعقم منظمات النمو والمواد العضوية الحساسة للحرارة العالية بالفلترة بوحدة المليبور ذات الاقطار0.45 أو 0.22 مايكروميتر ومن ثم تضاف الى الوسط بعد تعقيمه وقبل تصلبه ويخلط جيدا ويترك لحين اكمال التصلب على درجة حرارة المختبر.

المشاكل المرافقة لزراعة الكالس والمعلق الخلوي:

الاسمرار Browning: يتحول لون الوسط والزروعات الى لون قهواني مائل الى السواد . يرجع ذلك الى مجموعة أسباب أهمها تسرب فينولات من الجزء النباتي المقطوع والمزروع على الوسط الغذائي مما يسبب في تغيير لونه وينتشر كذلك في الجزء النباتي وخلايا الكالس المستحثة . الفينولات عبارة عن مركبات كيميائية لها حلقة أروماتية وفيها واحده أو اكثر من مجموعة الهيدروكسيل .تميل الفينولات للذوبان بالماء وتتحد عموما مع السكر مكونة كلايكوسيدات وتتمركز في الغالب في فجوات الخلية, أهم المركبات الفينولية هي , **Coumurin , Resorcinol , Pyrogallic acid , Salicylic acid , Countrin , Doparnine , Chlorogenic acid , Cinnamic acid , Hydroxylbenzoic** وغيرها. تتسبب تلك المركبات الفينولية بشكل رئيس عن تفاعلات الاسمرار وتسبب في هلاك الزروعات. ينتج عن أكسدة الفينولات ومركبات الكوينينات(**Quinins**) الضارة بالنسيج النباتي . يعالج الاسمرار الناتج من أكسدة الفينولات نتيجة نشاط انزيمات **Polyphenolacec** بالمعاملة بمواد مضادة للأكسدة مثل حامضي الستريك والاسكوربيك وبتراكيز 100-150ملغم/لتر بعد تنقيع الأجزاء النباتية في محاليلها لعدة دقائق. ووجد بأن خليط محلول مكون من 1.0 غم من سترات البوتاسيوم و 0.25 غم من السترات بعد اذابتها في 10 مل من الماء المقطر المعقم وتخفيف التركيز ليكون المحلول الخزين بتركيز0.125% ذات فعالية مضادة للأكسدة والتخلص من الاسمرار عند تنقيع الأجزاء النباتية لعدة دقائق وبمدى من التراكيز تتراوح من 0.1-0.5 ملغم/مل. يلجأ الكثير من العاملين الى شطف الأجزاء النباتية في ماء حنفية جاري للتقليل من محتواها الفينولي والقسم الاخر ينقع الأجزاء النباتية لفترات قد تصل الى 24 ساعة قبل تعقيمها سطحيا وزراعتها وخاصة للأنواع النباتية ذات المحتوى العالي من المركبات الفينولية مثل أنسجة النخيل , وبصورة عامة توجد الكثير من الطرق المتبعة للتخلص من مشكلة الاسمرار واختيار الانسب منها تحدده بعض العوامل منها نوع النبات , طبيعة المركبات الحاوية عليها , نوع الجزء المأخوذ من النبات, نوع الوسط المستعمل. ومن أهم تلك الطرق ما يلي:

1- الغسل والتنقيع للأجزاء النباتية بالماء لحين تسرب أكبر كمية ممكنة من المركبات الفينولية.

2- تجنب اضافة النتروجين والكلوريد الى الوسط لأن الاجهاد الذي تسببه يحفز انتاج الفينولات وبذلك تكون المعاملة بمضادات الأكسدة قليلة التأثير في منع الاسمرار.

3- استعمال أجزاء نباتية في مرحلة الحداثة **(Juvenile)** وتجنب القديمة.

4- النقل المتكرر للجزء النباتي أو الكالس مع بداية ظهور الاسمرار الى وسط جديد.

5- اضافة الفحم المنشط الى الوسط

6- الشطف بمضادات الأكسدة واضافتها الى الوسط بمقدار 100-150 ملغم/لتر من حامضي الستريك والاسكوربيك ولمدة 5 دقائق.

7- استعمال أوساط غذائية سائلة بدل الصلبة وبسرع اهتزاز واطئة (حوالي100rpm) بحيث تحافظ على كيان الكالس داخل الوسط السائل.

8- تجنب تجريح الجزء النباتي أكثر من المطلوب.

9- نشوء الزروعات في الظلام لتجنب كافة تفاعلات الأكسدة الضوئية **(Photooxidation)**. وخاصة في السبعة أيام الاولى ويفضل في ذات الوقت حضنها على درجة حرارة منخفضة حوالي 4م.

10-تعزيز الوسط بنترات البوتاسيوم (KNO_3) بدل نترات الأمونيوم وتقليل التركيز بشكل تدريجي.

11-عدم غلق أنابيب الزراعة اغلاق محكم والسماح للزروعات بالتبادل الغازي اذ يقلل ذلك من تراكم الأثيلين و CO_2.

المحاضرة الثالثة

مزارع الكالس(Callus cultures)

الكالس كتلة من الخلايا غير المتخصصة وغير المنتظمة وتلك الكتلة أساسا عبارة عن نسيج ورمي (**Tumor**) يتكون على جروح الأنسجة والأعضاء المتمايزة. خلايا الكالس برنكيمية في طبيعتها وليست متجانسة تماما, اذ يلاحظ عند الفحص المجهري وجود كمية قليله من الانسجة المتمايزة بجوار الحجم الكبير من الأنسجة غير المتمايزة. يمكن ملاحظه أنسجة كالس وقد تكونت على أنسجة نباتات غير مزروعة نسيجية وخاصه عند قطع وزراعة عقل النباتات في التربة حيث ينشأ الكالس أولا من مناطق قطع العقلة أو الجذر.

الأجزاء المستعملة في نشوء مزارع الكالس

تكون مادة الشروع في الأجزاء النباتية في نشوء مزارع الكالس من أنسجة متمايزة مفصولة من أي جزء من النبات (جذر, ساق, ورقة, ورقة حرشفية, متك , زهرة وغيرها). يحتوي الجزء النباتي في الغالب على أنسجة بمراحل مختلفة من الانقسام الخلوي والتهيئة للتخصص لأعضاء ذات وظائف متنوعه فاذا ما احتوى الجزء النباتي على خلايا مرستيمية عندئذ تكون معدلات انقسام الخلايا وتضاعفها سريعة. لذلك يمكن اختيار القمة النامية كمصدر لنشوء الكالس والاستفادة منه لأغراض مختلفة أو اكثار النبات خضريا بالطريقة غير المباشرة أي باختلاف الكالس الى أفرع ونبيتات.

تحفيز نشوء الكالس

من المعتاد في أغلب التجارب ان تكون الخطوة الاولى هي استحاث الكالس للنشوء من الجزء النباتي الذي سبق وان تم اختياره او من بادرات بذور قد عقمت وزرعت في الوسط الغذائي المناسب. ويجب الاخذ بنظر الاعتبار ليست كل خلايا النبات مؤهلة (**Competent**) لان تكون كالسة بل غالبا ما تكون الخلايا المرستيمية باستطاعتها تكوين تراكيب منتظمة ومن ثم نبات كامل. بينما الخلايا الاخرى غير المؤهلة ولا تعبر عن وجود طاقتها الكامنة (**Totipotency**) فتفشل في الاخلاف وتكوين نبات كامل. يمكن فحص وانتخاب الخلايا تحت المجهر الخاص بالقطع (**Visual selection under dissecting microscope**) مره كل اسبوع وتسجيل الملاحظات.

ينشا الكالس من مناطق مختلفة على الجزء النباتي مثل أنسجة كامبيوم الجذور وقد تظهر العديد من الاجنة الجسمية مباشرة محيطة بالبذرة عند زراعتها كجزء نباتي. تحصل العديد من النشاطات غير المرئية بالعين المجردة اثناء نشوء الكالس ولا تظهر الا بعد سته أسابيع ككتلة

من نسيج الكالس ويمكن تحديد انواع تحفز مزارع في النشوء من خلايا المعلق الخلوي خاصة في الدراسات المتعلقة بالأجنة الجسمية , منحنيات نمو الكالس, تجارب الانتخاب مثل تحمل الاجهادات, عزل الخطوط الخلوية النقية ذات الصبغات وغيرها. تحتوي مزارع الكالس خليط من الخلايا غير المتجانسة في الحجم, الشكل, اللون, العمليات الايضية, العدد الكروموسومي وغير ذلك. يظهر قسم من الخلايا حاملا صبغات بالوان مختلفة مما يسهل من عزلها وانتقاء خطوط خلايا ذات لون واحد.

تحتوي أحيانا تلك الخطوط على مواد أيض ثانوية مفيدة. تؤثر مستويات الهرمونات الداخلية **(Endogenous hormones)** وخاصية النقل القطبي للهرمون داخل الجزء النباتي في تحفيز نشوء الكالس على ذلك الجزء. لعل من أهم العوامل المؤثرة في نشوء الكالس والتي درست بشكل مستفيض, تراكيز منظمات النمو المجهزة الى الوسط والتي تختلف باختلاف النوع النباتي ونوع الجزء النباتي الظروف البيئية والتغذوية هي الاخرى لها دور مهما في نشوء الكالس في الزروعات النسيجية للخلايا تحت المجهر الضوئي.

منحنى نمو الكالس

تشابه أنسجة الكالس في نموها الكائنات المجهرية أحادية الخلية يتخذ منحنى نمو الكالس شكل حرف او ما يسمى المنحنى السيني **Signoid** ويمر نمو الكالس بخمس مراحل. تختلف سلوكية تركيب وبايوكيميائية خلايا الكالس عند مرورها في مراحل النمو الخمسة (المرحلة الأسية, المرحلة اللوغاريتمية , المرحلة الخطية, مرحلة التباطؤ, مرحلة التوقف), اذ هناك خلايا متباينة في ملامحها المظهرية والفسلجية في كل مرحلة. تؤثر مكونات الوسط في مده الكالس في مرحلة ما لذلك من الضروري التعامل مع مزارع كالس بمرحلة تطورية محددة.

بينت الدراسات المتعلقة بفحص الهيئة الكروموسومية **(Karyotyping)** لخلايا الكالس دخول اغلب الخلايا في الطور الاستوائي خلال المرحلة الأسية من نمو الخلايا حيث سرعه الانقسام وزيادة كمية الكالس. تنقل خلايا الكالس الى وسط جديد في نهاية المرحلة الخطية وقبل دخولها مرحلة التناقص **(Decelerating)** مع ملاحظة نقل الكالس الذي يبدو بصحه جيدة واستبعاد الكتل التي يظهر عليها الاسمرار. تفضل مزارع الكالس بطيئة النمو ذات اللون الابيض غير الشفاف لأغراض الاخلاف واستبعاد كتل الكالس الخضراء السريعة النمو لكونها لا تتمايز الى أعضاء.

يجب تحديد مرحلة نمو الكالس التي تعطي أكبر كمية من مركبات الأيض الثانوي أو المركب المطلوب والتي غالبا ما تكون مرحلة توقف النمو نتيجة استنفاذ مغذيات الوسط, تصلب الأكار , تراكم مركبات وسطية سامة واستنفاذ Co من داخل الكالس. يستوجب تحديد منحنى نمو الكالس

التضحية بمكررات من المزارع وعلى فترات زمنية منتظمة وتسجيل اوزان الكالس الرطب والجاف بعد ازالة بقية الأكار.

أساسيات زراعة الكالسPrinciples of callus culture

من أجل نجاح تحفيز الكالس على النشوء وبنجاح من الضروري مراعاة ما يلي :

تحضير جزء نباتي معقمه سطحية وجاهزة للزراعة, انتخاب الوسط المناسب والتوليفة من منظمات النمو , حضن الزروعات تحت ظروف مسيطر عليها من ضوء وحرارة و رطوبة وغيرها. تفضل الأجزاء النباتية وهي في طور الحداثة وتلك المفصولة من البادرات و النموات الخضرية الحديثة والبراعم. تستجيب أنواع اخرى مختلفة من الاجزاء النباتية لنشوء الكالس مثل أطراف الجذور, نسيج اللحاء, الأجنة المتطورة, أجزاء الزهرة والورقة , الثمار , الدرنات , الأبصال وغيرها مع مراعاة استبعاد الخلايا الملكننة (**Lignified**) . تدخل خلايا الكالس في ثلاث مراحل تطورية (أ) الاستحثاث (**Induction**) (ب) انقسام الخلايا (**Cell division**) (ج) بدء التمايز (**Differentiation**) . تتحفز وتزداد عمليات الايض داخل الخلايا في المرحلة التطورية الأولى والتي يعتمد على طولها على الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي, المتطلبات التغذوية , المحتوى الهرموني الداخلي, النقل القطبي لمنظمات النمو, اضافة الى العوامل البيئية. ونتيجة لزيادة معدلات أيض الخلية, يزداد تراكم الخلية من العوامل المشجعة على الانقسام لتكون كتلة خلوية بأعداد كبيرة من الخلايا. تكون الخلايا السفلية في تماس مع الوسط والاعلى منها تتغذى من انتشار المغذيات من الخلايا الواقعة اسفلها. يبدأ تمايز الخلايا في المرحلة الثالثة عندما تبدا مسالك حيوية معينة بالتعبير حيث بداية تراكم مواد الايض الثانوي. يظهر احيانا الكالس بالوان مختلفة (اصفر, اخضر, ابيض) في هذه المرحلة مع عدم استقراريه وراثية (**Genetic instability**) ينتج عنها تغايرات مظهرية قد تعزي الى عوامل تطورية فوق وراثية (**Epidgenetic**) او وراثية. قسم الكالس (**Subculture**) بعد وصوله لحجم مناسب لفتره قد تصل الى 21–28 يوم واذا كانت الكتلة صغيرة, يعاد نقلها الى وسط جديد (**Reculture**) لإتاحة الفرصة لها بالوصول الى حجم مناسب. يعاد زراعة الكالس عموما على وسط جديد بفترة تتراوح من 3 الى 4 اسابيع بتقسيم قطع الكالس الى اوزان 250–500 ملغم تحصل حاله من التطبع (**Habituation**) كنتيجة لاستمرار نمو الكالس في وسط الادامة بوجود منظمات النمو حيث تتمكن قطع الكالس وبمرور الزمن من النمو في وسط خال من المنظمات وهذا ما يطلق عليه بالتطبع الهرموني (**Hormone habituation**) ومن الصعب التمييز بين نوعي الكالس العادي والمتطبع للنمو دون هرمونات عدا قابلية الأخير للنمو من

دونها . يفيد ذلك بتقليل أو حذف كلف منظمات النمو وتقليل خطوات العمل والتخلص من احتمالية الخطأ في تحضير تراكيز المنظمات وغيرها من الفوائد.

منظمات النمو

تؤثر ولحد كبير اضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي في استحثاث الكالس على النشوء . واعتمادا على طبيعة الجزء النباتي وهيئته الوراثية ومحتواه الداخلي من الهرمونات, يتطلب احتياجه من منظمات النمو الى ثلاثة مجاميع , اما أوكسينات فقط, أو سايتوكاينينات فقط أو توليفة من الاثنان.

تطبيقات مزارع أنسجة الكالس

تكون مزارع الكالس بطيئة النمو في وسط مستقر **(Static)** مما يسمح بإجراء العديد من الدراسات المتعلقة بالنمو, التمايز والايض وغيرهما وكما مبين أدناه:

1. دراسة الاحتياجات الغذائية للنبات من خلال دراستها على المستوى الخلوي اولا.
2. دراسة تمايز الخلايا والأعضاء والعمليات الفسيولوجية والجزيئية المرافقة لها.
3. نشوء مزارع المعلقات الخلوية والبروتوبلاست والحصول على خلايا مفردة.
4. التحري والاستفادة من التغايرات الجسمية الناتجة من الاخلاف غير المباشر من الكالس.
5. سهلت خلايا الكالس كثيرة في اجراء التحولات الوراثية **(Genetic transformation)** لسهولة عزل الخلايا المفردة منها وهندستها وراثية.
6. وظفت مزارع الكالس في دراسة وانتاج مركبات الايض الاولي والثانوي وتنظيمهما.

(المحاضرة الرابعة)

خطوات إنشاء معمل زراعة الأنسجة Establishment of tissue culture lab

تجهيز معمل زراعة الأنسجة : Laboratory Organization

ا- غرفة الاستقبال : Reception room

وهي غرفة بعد مدخل المعمل مباشرة، وتستخدم كاستراحة للعاملين بالمعمل ولاستقبال الضيوف وكذلك لإتمام الأعمال الإدارية الخاصة بالمعمل . ويحذر على غير العاملين المرور من تلك الغرفة والدخول للمعمل إلا لغير العاملين به، أما بالنسبة للعاملين فيتم استبدال الملابس وارتداء البلطو وواقي القدم ثم الدخول للمعمل، وتشمل هذه الغرفة على مكتب للإدارة ودولاب لحفظ الأوراق ومكان لاستقبال الضيوف وكذلك مكان مخصص لاستبدال الملابس به.

2- غرفة البداية: Introduction room

وهي حجرة يتم فيها إعداد الأجزاء النباتية المراد زراعتها من النباتات المراد إكثارها معمليا. حيث يتم إجراء عملية التعقيم الأولية عليها ويكون بها كابينة زراعة (هود) ودواليب زراعة بدون إضاءة لتحضين تلك الأجزاء بعد زراعتها على البيئة المخصصة لذلك في مدة لا تتجاوز الشهر،

3 - مكان الغسيل : Washing area

يجب احتواء المعمل على أحواض غسيل كبيرة لسهولة الغسيل ويفضل أن يكون مغطى بطبقة من الرصاص (لمقاومته للأحماض والقلويات) وبه مصدر دائم للماء العذب، ويستخدم الصابون السائل دائما في التخلص من الشوائب وقد يستخدم حامض الكبريتيك للتخلص من الشوائب الصعبة.

4 - غرفة تحضير البيئة المغذية : Medium preparation room

وهي غرفة يتم فيها تجهيز واعداد البيئة المغذية المراد زراعة الجزء النباتي عليها. وتتكون حجرة البيئة من بنشات لتسهيل عملية إعداد البيئة وعلى أرفف ودواليب لتخزين الكيماويات والزجاجيات المستخدمة دائما.

5- غرفة التحضين : Incubation room

وهى عبارة عن غرفة صغيرة الحجم بها دواليب بدون إضاءة، يتم تحضين البيئة بها بعد تجهيزها على درجة حرارة الغرفة لمدة من 4-7 أيام وذلك للتأكد من خلوها من الفطريات والبكتريا قبل الزراعة عليها مباشرة.

6- غرفة الزراعة : Culture room

تعتبر هذه الغرفة أهم غرف معمل زراعة الأنسجة وأشدها تعقيما. وتتكون من :-

1- كابينة زراعة (هود) منها الفردي والزوجي، على حسب عدد العاملين عليها. ويكون الهواء الخارج من الهود أفقيا وليس رأسيا.

2- ستائر هوائية عند الباب ذات ضغط أعلى من الضغط الخارجي بـ $^1/_2$ أو $^1/_4$ بار لعدم السماح بمرور أي حشرة طائرة داخل الغرفة.

3- (UV) لزيادة التعقيم وتستخدم فقط قبل الزراعة بأكثر من ساعة ولمدة 10-15 دقيقة.

4- فلتر لتغير الهواء الداخلي للغرفة مما يساعد على تقليل الميكروبات.

5- دولاب من الخشب لحفظ الأدوات المستخدمة في عملية الزراعة .

6- المشارط والملاقيط (أدوات التشريح) مصنعه من الأستانلي استيل لمنع الصدأ .

7- علبة استانلي استيل لتعقيم أوراق التشريح بها.

8- عربة متحركة لسهولة النقل والحركة بين غرفة الزراعة وغرفة النمو مصنعة من الاستانلي استيل يتم استخدامها في نقل البيئات والنباتات المنزرعة.

9- كرسي متحركة للهود .

10- تكييف بالغرفة لتسهيل عملية التنفس على العاملين بالزراعة.

7- غرفة النمو : Growth room

وهي عبارة عن دواليب للزراعة بها إضاءة (غالبا ما تكون 16 إضاءة/ 8 ظلام) ويكون لها لوحة مفاتيح من الخارج، للتحكم في عدد ساعات الإضاءة وتشغيل التكييف والأجهزة التي بالداخل من الخارج دون الدخول وخصوصا عند تشغيل (UV) . وتحتوي على فلاتر لتغيير الهواء الداخلي وستائر هوائية فقط ولا يفضل استخدام UV في غرفة النمو حيث يؤثر ذلك على النباتات المزروعة بها. وغرفة النمو والزراعة لها ملابس خاصة بها غير التي تستخدم في

حجرة تحضير البيئة. وهذه الملابس لا يتم الخروج بها من تلك الغرفة. وهذا بالإضافة إلى مكان مخصص لتخزين الكيماويات والزجاجيات والأدوات في مخزن خاص .

(المحاضرة الخامسة)

مكونات بيئات زراعة الأنسجة

بيئـــة الزراعـــة : Culture Medium

النبات الكامل هو الكائن الحي الوحيد الذي يستطيع أن يكون احتياجاته داخليا عن طريق عملية البناء الضوئي، حيث يستطيع أن يحصل على ثاني أكسيد الكاربون من الجو والماء من التربة مع العناصر المعدنية باستخدام الطاقة الضوئية يحولها إلى طاقة كيميائية يستخدمها خلال مجموعة من التفاعلات الكيماوية ليكون المواد الأساسية (كاربوهيدرات- بروتينات- لبيدات) وأيضا يكون الهرمونات والفيتامينات والأحماض النووية والإنزيمات، كما ينتج عن عمليات التمثيل الغذائي داخل النبات مجموعة من المركبات الثانوية الهامة جداً. وهكذا يحدث بالنسبة للنباتات أو الأجزاء النباتية المزروعة بداخل الأوعية الزجاجية بالمختبر.

البيئة : بمفهوم بسيط هي الوسط الغذائي الذي يستخدم في زراعة الأنسجة والتي ينمى عليها أجزاء النبات المختلفة والمزروعة بهدف الحصول منها على غرض معين. فقد يكون الهدف منها هو الحصول على الكالس أو الاستمرار في التكشف والانقسام حتى نحصل على نموات خضرية أو جذرية أو الاستمرار حتى تحصل

على نبات كامل وهنا يجب أن نتعرف على مقومات البيئة الزراعية وهي كما يلي:-

1- العناصر الكبرى Macro elements

2-العناصر الصغرى Micro elements

3- الفيتامينات Vitamins

4- الأحماض الأمينية Amino acid

5- مصدر الطاقة أو الكربون Carbohydrates

6- الهرمونات النباتية Plant hormones

ومن المعروف أن البيئة الغذائية المستخدمة لها أشكال مختلفة حسب الهدف من استخدامها فهناك البيئة الصلبة Solid medium أو شبه الصلبة Semi solid medium والتي يدخل في تركيبها الاجار.

وهناك البيئات السائلة والتي تندرج تحت نوعين الأولى غير متحركة Stationary liquid medium والثانية المتحركة Agitated liquid medium والتي يستخدم معها جهاز الهزاز الكهربائي ويظل معها فترة التجربة وكل نوع منها له مميزاته وعيوبه ولكن في حالة استخدام البيئة السائلة يلزم وضع النبات على حامل معين يكون من ورق الترشيح ويتم غمره في البيئة ويوضع عليه الجزء النباتي المختار.

مكونات البيئة الغذائية

أولا / العناصر الأساسية: Basic Mineral Salts

وهي مجموعة من الأملاح غير العضوية، حيث يتطلب الوسط الغذائي لأنسجة النبات مصدراً دائما من المركبات غير العضوية وتنقسم إلى قسمين:-

العناصر الكبرى :-

وهي التي يحتاجها النبات بكميات غير قليلة وهي عبارة عن سبعة عناصر أساسية كالتالي: - النيتروجين- الفسفور- البوتاسيوم- الكالسيوم- الصوديوم- الماغنسيوم- الكبريت.

العناصر الصغرى:-

وهي العناصر التي يحتاج النبات إليها بكميات قليلة جداً، بحيث لا تزيد عن بضع ملليجرامات و وهي: الحديد- المنجنيز- الزنك- البورون- النحاس- المولبيدنيوم -اليود- الكلور وقد ثبت أن هذه العناصر تعمل كمنشطات للأنزيمات.

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة وخاصة بيئة موراشيج وسكوج (MS) سنة 1662 م بأنها أدخلت لتحسين كفاءة نمو النبيتات مختبريا.

أما بالنسبة للعناصر الصغرى فأننا نجد أن هذه العناصر لا توجد منفردة أبدا في الطبيعة لذا فهي توجد أما في الصورة المركبة مثل كبرتيات النحاس وكبريتات والزنك وكبريتات المنجنيز, أو على الصورة المخلبية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على الصورة المخلبية كمصدر للحديد في البيئة وذلك لمنع ترسيبه بالبيئة .

ثانيا / الفيتامينات : Vitamins

تعمل الفيتامينات كعامل مساعد في النظم الأنزيمية، وهي مطلوبة بكميات قليلة جدا ومن أكثرها شيوعا الثيامين وهو أكثر الفيتامينات استخداما في مزارع الأنسجة النباتية، والفيتامينات تتأثر بالحرارة لذا ينصح بتعقيم الفيتامينات من خلال المرشحات ثم إضافتها

بالماصة بعد تعقيم البيئة وهي دافئة.

ثالثا / الأحماض الأمينية : Amino Acid

عادة لا تضاف الأحماض الأمينية للوسط الغذائي في مزارع الأنسجة إلا في بعض الحالات الخاصة والتي تقتضي بذلك. وقد يحتاج أحياناً لإضافة حامض أميني معين لإحداث تأثير فسيولوجي مطلوب مثل حمض الميثونين والذي له دور مؤثر في تخليق الايثيلين وله تأثير منبه أيضا.

ومن أهم الأحماض الأمينية التي تستخدم في م ا زرع الأنسجة منها على سبيل المثال الارجنين والجلوتامين و الاسبارجين . واستخدام خليط منهم قد يسبب حدوث تداخل بينهما مما يؤدى إلى تثبيط نمو النبيتات مختبريا. والاتجاه الحديث حالياً فى مزارع الأنسجة النباتية هو تحديد مكونات كل وسط غذائي مع استبعاد استخدام المستخلصات الطبيعية غير النقية مثل مستخلص الخميرة.

رابعا / المواد الكربوهيدراتية : Carbohydrates

كل كائن حي يحتاج إلى مصدر للطاقة وذلك لإتمام جميع العمليات الحيوية بداخل الكائن الحي، وعليه فإن كل وسط غذائي يحتاج إلى السكريات كمصدر للكربون والطاقة، والسكروز هو أكثر السكريات استعمالاً وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتونى يتكون من (جلوكوز + فركتوز). وتأثيره فعال جداً على النمو بعكس بعض السكريات الأخرى مثل المالتوز واللاكتوز. والسكروز يتحمل الحرارة العالية على عكس السكريات الأخرى ويستخدم عادة ما يستخدم بتركيز من 2-5 % في الوسط الغذائي لكي يساعد على تطور ونمو الأجزاء النباتية الأنسجة واتمام عملية البناء الضوئي والذي قد لا يكون كافياً لإتمام تلك العملية كالزراعة فى ظلام تام وبالتالي لا يكون النبات الكلوروفيل وتكون الأوراق بيضاء اللون. وهذا بالإضافة إلى أن تركيز

ثاني أكسيد الكربون في الأنابيب غير كافي للتمثيل الضوئي. وعلى ذلك فإضافة السكر يكون بديل لمصدر الكاربون والقيام بعملية البناء الضوئي داخل أوعية الزراعة على الوجه الأكمل.

ويمكن استخدام السكر الموجود في الأسواق المحلية داخل معامل زراعة الأنسجة النباتية. مع الأخذ في الاعتبار ترشيح السكر بعد إذابته للتخلص من الشوائب العالقة به.

خامسا : منظمات النمو النباتية : – Plant Growth Regulators

نمو النبات هو محصلة لنمو جميع خلاياه وأنسجته وأعضائه وبالتالي فأننا نجد أن هناك مواد عضوية تنتج بداخل النبات تعمل على تنظيم النمو والتطور بداخل النبات يطلق عليها الهرمونات الطبيعية. وهذه المواد العضوية تتكون بكميات صغيرة جداً في أماكن معينة من النبات ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لأحداث تأثيرها الفسيولوجي. وتنقسم الهرمونات النباتية إلى ثلاثة مجاميع هي المنشطة والمثبطة والموقفة للنمو وسوف نتكلم عن هذه المجموعات باختصار.

1– موقفات النمو : Growth Position

وتستخدم عادة في حالة الغرض الحفاظ على صنف معين أو سلالة معينة لفترة من الزمن من 6–12 شهر، ولا تزيد عن ذلك حتى لا يحدث تدهور في النبات ومن أشهر هذه المجموعة هرمون السيكوسيل (CCC).

2 – مثبطات النمو : Growth Inhibitors

وهذه الهرمونات تضاف على البيئة لتبطئ من نمو النبات وفيها تتم جميع العمليات الحيوية ولكن ببطئ شديد والهدف منها تأخير النبات لفترة محددة حتى يتمكن من المرور بالظروف الغير ملائمة لنموه. حيث نلاحظ ذلك في الطبيعة عند تعرض النباتات لبعض الإجهاد أو الجفاف حيث ينتقل حمض الابسيسك (ABA) إلى الأوراق ويقوم بغلق الثغور لتقليل من عملية النتح بداخل النبات وبعد مرور هذه الظروف الغير الملائمة يرجع مرة أخرى إلى مكانه وبالتالي تعمل الثغور كما كانت في الظروف العادية المناسبة لنموه.

أما في زراعة الأنسجة فقد يستخدم في حالة تأخير خروج النبات لمرحلة الأقلمة لمدة لا تزيد عن ثلاثة أشهر بهدف بيعه في الأسواق بسعر مناسب وهذا له علاقة بالعرض والطلب ومستلزمات السوق.

3 – منشطات النمو : Growth Activated

بوجه عام من الضروري إضافة عنصر أو أكثر من هذه المركبات لكي تساعد على النمو، فنحصل على نمو جيد للجزء النباتي المنزرع مختبرياً ويختلف الهرمون المضاف على حسب النوع النباتي ومرحلة نموه ونوع الجزء النباتي المستخدم في الزراعة. وتنقسم إلى ثلاثة أقسام رئيسية هي:

أ- الاوكسينات : Auxins

مثـــــل IAA, NAA, IBA, NOA, 2,4-D and 2,4,5-T

وهى مركبات تماثل في عملها التأثير الطبيعي في النبات، حيث تعمل على استطالة النبات وتكوين البراعم وانفصال الأوراق عن النبات وانقسام الخلايا وانتحاء النبات والسيادة القمية وتساعد على تجذير النبيتات مختبرياً.

ويعتبر NAA, IBA هما الأكثر استخداما في عملية التجذير عن IAA لأنهم أكثر ثباتاً منه وأقل تأثراً بالحرارة والضوء. كما يعتبر 2,4-D & 2,4,5-T الأكثر استعمالاً في نمو الكالس وتكون الأجنة العرضية.

وفى بعض الأحيان قد يقوم 2,4-D بوظيفة كلا من الاوكسينات و السايتوكاينينات معاً كمصدر بديل لهم بالنبات.

ب- السيتوكينينات : Cytokinins

مثـــــل BA, Kin, 2iP and Zin

وهى تعرف بهرمونات الاستطالة وانقسام الخلايا، حيث أن لها دورين أساسين في عملية الإكثار هي انقسام الخلايا واخراج البراعم. وقد يستخدم جوز الهند كبديل للسايتوكاينينات فى البيئة وبصفة عامة فقد وجد أن النسبة العالية للسايتوكاينين/ الاوكسين تشجيع من انقسام الخلايا وتكوين النموات الخضرية ، أما النسبة المنخفضة منها تشجع على تكوين الجذور. مع العلم بأن السيتوكينينات لا تقوم بتكوين الجذور على النبات منفردة بدون الاوكسينات.

ج- الجبرلينات : Gibberelins (GA_3)

وهو أكثر الجبرلينات شيوعاً حيث أن منه أكثر من 52 نوع. الجبرلين يشجع على نمو تكوين الجذور ونمو الأجنة، بالإضافة إلى أنه يكون عامل مساعد مع الاوكسينات وكذلك مع السايتوكاينينات، وقد لا يكون مطلوب بصفته أساسيته. ويفضل استخدامه مع النباتات ذات النهار الطويل حيث يقوم بتعويضها عن ذلك مختبريا.

سادساً: الإضافات الأخرى:

1 - الآجار : Agar

مادة كاربوهيدراتية عديدة تضاف للبيئة لإعطائها الصلابة بتركيز 0,6-1 % ونحصل عليها من الطحالب البحرية. وله سببين أساسيين لاستخدامه في البيئة هما الأول: يعتبر خامل من الناحية الحيوية. والثانية: سهولة إذابته عند التسخين وتصلبه عند درجة حرارة الغرفة.

2 - الفحم النشط : Activated charcoal

يستخدم الفحم النشط في مزارع الأنسجة النباتية لعدة أسباب منها:-

1- امتصاص المواد المثبطة للنمو والتي تنتج بواسطة النسيج المنزرع من البيئة المغذية.

2- امتصاص منظمات النمو حيث أن هذه المواد لها قابلية عالية في الارتباط بالفحم النشط.

3- تحول البيئة المغذية من اللون الأبيض الشفاف إلى اللون الأسود كالتربة في الطبيعة مما يساعد على تكوين الجذور.

4- ذات قابلية عالية بالارتباط بالمواد الفينولية التي تنتج من الأنسجة المزروعة

درجة الحموضة PH

يعرف الـ PH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهي الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج الـPH من صفر حتى 14 درجة وتكون نقطة التعادل عن pH =7 أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي، أما الأعلى من ذلك فيكون الوسط قلوي (7-14). والـPH ضروري جد اً لتسهيل أيونات المعادن في البيئة

وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالبا ما تكون حامضية إلى متعادلة حتى يكون جميع العناصر الغذائية في الصورة الميسرة لها لتمكن النبات من الاستفادة منه دون حدوث أي ضرر عليه.

ويتم تقدير الـPH بطريقتين هما:

أ- جهاز pH-meter :

الذي يقيس تركيز أيون الهيدروجين عن طريق الألكترود، حيث أن هذا الألكترود يكون حساس جداً لأي تركيز من أيون الهيدروجين. ويتم وضعه في محلول قياس منظم لضبط درجة الحموضة للجهاز أولا قبل قياس حموضة البيئة الغذائية ويتم ضبط درجة الحرارة للوسط الغذائي قبل ضبط الـPH لها مباشرة.

ب- أوراق PH :

يستخدم في المحاليل المائية والبيئات وذلك بغمس طرف الورقة في المحلول، ثم يقارن اللون الناتج مع الألوان القياسية الموجودة في الدليل حيث أن كل درجة لون يقابلها قيمة معنية من pH.

(المحاضرة السادسة)

اعداد بيئة زراعة الأنسجة النباتية

اسم البيئة المستخدمة في الزراعة :

بيئة MS : تستخدم لنمو المجموع الخضري والجذري .

خطوات اعداد البيئة :

* نوزن 4,43 جرام من بيئة MS .

*نذوبها في 1 لتر من الماء المقطر بواسطة جهاز التقليب.

* نضيف الهرمونات التالية :

- **2.4-D = 0.5 mL**
- **N.A.A = 2.5 mL**
- **Kientine = 0.5 mL**

* نضيف 8 جرام من الآجار .

* نضيف 30 جرام من السكروز (مصدر مغذي).

* نقيس PH (لابد أن يكون الرقم الهيدروجيني للبيئة = 5.8).

* توزع البيئة بعد ذلك في فلاسكات 500 مل ثم نغطيها بقطن .

* تعقم البيئة بوضعها في الأوتوكليف .

*نصبها في أطباق بتري ونضعها بالثلاجة بعد ذلك إلى حين استخدامها في الزراعة النسيجية.

تعقيم البيئة المغذية

نظرا لاحتواء الوسط المغذي على معظم العناصر الغذائية اللازمة لنمو الكائنات الدقيقة كالبكتريا والفطريات والخمائر وغيرها. فإن عملية التعقيم للوسط المغذي قبل زراعة الجزء النباتي عليه ضروري جدا للحفاظ عليه من هذه الملوثات التي تنافسه على الغذاء وتفرز مواد سامة تؤدي إلى موته وهلاكه.

وهناك عدة طرق لتعقيم الوسط المغذي هي :-

1- التعقيم بالبخار : Autoclaving

وهو أكثر الطرق استعمالا في مختبرات زراعة الأنسجة وأسهل في الاستعمال حيث يتم ذلك عن طريق جهاز يسمى بالأتوكليف (حلقة التعقيم) حيث يتم وضع الوسط المغذي في أوعية ثم وضعه في الجهاز على درجة حرارة 121 م وضغط جوي 1,5 كجم/سم^2 ولمدة 20 دقيقة وقد تصل الى نصف ساعة على حسب الكمية المراد تعقيمها. مما يسمح بالقضاء الملوثات. وفي نفس الوقت لا تسمح بتعريض الوسط المغذي بما يحتويه من مكونات حساسة لدرجة الحرارة العالية إلى الفقد أو التكسير بكميات كبيرة.

ومن مميزات التعقيم بالبخار:-

السرعة – البساطة – القضاء على الملوثات خاصة الفيروسات .

أما عيوبه فهي :-

* يمكن أن يحدث تغير في حموضة الوسط المغذي .
* تكسير بعض المكونات خاصة الحساسة للحرارة كالفيتامينات والهرمونات النباتية والمضادات الحيوية والأنزيمات .
* السكروز: حيث ينكسر إلى وحدتين من السكر الأحادي فركتوز وجلوكوز. وزيادة التعقيم يؤدي إلى تكوين مواد سامة للنسيج النباتي) .
* المستخلصات النباتية : تفقد نشاطها .
* الجبرليك : أكثر من 90 % منه يحدث له فقد في قدرته على التفاعل .

2- التعقيم البارد : Cold sterilization

هناك بعض المركبات التي تتأثر بالحرارة العالية مثل الجبرلين والزياتين وحامض الابسيسك وبعض منظمات النمو الأخرى التي لا يمكن تعقيمها في الأتوكليف. لذا يتم تعقيمها أولاً في المرشحات الغشائية ذات قطر 0,22 – 0,45 ميكرون، ثم اضافتها على البيئة الصلبة بعد تسخينها وتعقيمها عندما تكون على درجة حرارة من 37-40م, أما في البيئة السائلة يتم إضافتها بعد أن تصل إلى درجة حرارة الغرفة.

مميزات هذه الطريقة:-

الحفاظ على المواد التي تتأثر بالحرارة العالية دون حدوث أي تغير بها.

أما عيوب هذه الطريقة:-

أدمصاص المواد على الفلتر حيث يتم مرور بعض جزئيات الفيروسات من الفلتر و تحتاج هذه الطريقة إلى وقت طويل وليس ببساطة التعقيم في الأتوكليف.

3- التعقيم الإشعاعي : sterilization Radio

يمكن استخدام بعض الإشعاعات في تعقيم الوسط الغذائي بالرغم من خطورته ولا ينصح باستخدام ألا في أضيق الحدود، حيث أنها تؤدي إلى تكسير العديد من الأحماض العضوية والفيتامينات وتؤدي إلى تكوين مواد سامة في الوسط الغذائي نتيجة لتكسير السكر والأحماض الأمينية. وهذا بالإضافة إلى تكلفتها العالية مثل أشعة جاما تستخدم في تعقيم البيئات والأوعية البلاستكية والأنابيب ..... الخ، أما على كابينة الزراعة (الهود) فيستخدم لمبة الأشعة الفوق بنفسجية (UV) وذلك للقضاء على أي كائنات حية داخل هذا المكان ويتم تشغيلها قبل الزراعة بأكثر من ساعة ولمدة لا

تزيد عن 10 – 20 دقيقة

الشروط الواجب إتباعها في تحضير وحفظ البيئات :-

1-تحضر البيئة المغذية من أنقى أنواع الكيماويات.

2 – تعقيم الأدوات المستخدمة لتجنب المتلوث.

3 -حفظ بعض المحاليل كالحديد في زجاجيات بنية اللون منعا لتحليلها . -

4- تحضير الهرمونات النباتية والفيتامينات وأملاح المعادن الصغرى وحفظها في الثلاجة ويعمل بها عند وضعها على البيئة المغذية.

5-التأكد من درجة حموضة البيئة لأهميته في نجاح نمو البيئات على البيئة المغذية.

6- استخدام ميزان حساس 4 أرقام عشرية لتمكن من وزن المعادن ذات الأوزان الصغيرة جدا.

7 يراعي استخدام بلاستيك ناعم أو كأس زجاجي للوزن فيه وعدم استخدام أوراق حتى تكون ملساء ويتم نقل الوزن بالكامل.

8 -يضع الباحث أمامه سجل مدون فيه مكونات البيئة المطلوب تحضيرها بالكميات المطلوبة لكل مركب .

9- يتم تحضير الهرمونات والفيتامينات بكميات قليلة لا تتعدى 200 مل حتى لا يحدث لها فقد أو تكسير أو قد تتعرض لأحد الملوثات فتفقد الكمية كلها.

10- يستخدم الماء المقطر في البيئة المغذية من الماء العذب.

11- حفظ المحاليل في الثلاجة على درجة حرارة 4 م.

12- كمية الأجار في البيئة الصلبة تتراوح ما بين 0,6 – 1 %,

13 –لا توجد بيئة واحدة صالحة لكل أنواع الاستعمال في مزارع الأنسجة .

14 –أي مادة جديدة مستخدمة لابد من اختبارها حتى تثبتها ويتم استعمالها .

15 – جميع البيئات لابد أن تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى بنسب ثابتة .

16 الاوكسينات تشجع على النمو والتجذير أما السايتوكاينينات تعمل على النمو وتكوين البراعم.

17- البيئات الزراعية التجارية تعتبر المناسبة في أغلب الأحيان لتفادي الخطأ التجريبي .

الخطوات المتبعة لزراعة الخلايا و الأنسجة النباتية

أولا: اختيار الجزء النباتي:

1- اختيار النبات الأم Selective of mother plants

يجب أن يكون النبات الأم في حالة صحية جيدة وفي بداية نشاطه وذو صفات جيدة خالية من الأمراض خاصة الأمراض الفايروسية ويجب أن يكون قد خرج من طور الراحة إذا كان له طور راحة مثل الدرنات والأبصال

2 -اختيار الجزء الذي يزرع Selective of an explant

الأجزاء التي تستخدم هي القمم النامية للسيقان والجذور وأجزاء الزهرة وأجزاء من الثمار والبتلات والبذور وحبوب اللقاح و المتوك و المبيض والأجنة ونسيج والإندوسبرم و الفلقات والقشرة والنخاع و الكمبيوم وهي الأجزاء المحتوية على مرستيمات أو أنسجة قابلة للتحول إلي الحالة المرستيمية ولكل نبات نسيج غالبا ما يكون أكثر ملائمة من غيرة. وهناك عدة إعتبارات من الواجب النظر اليها قبل اختيار الجزء الذى سيزرع وهي:

أ -الجزء النباتى المستخدم Explant

ويقصد به المنفصل النباتي (قمة نامية –قمة مرستيمية– جزء من الساق– جزء من الورقة المتك.. الخ).

ب- عمر الجزء النباتي Age of Explant

عادة يفضل استخدام الجزء النباتي صغير السن وفي بعض الأحيان يفضل إجراء عملية التطويش لتكوين نموات حديثة أكثر نشاطا عند زراعتها ويمكن كذلك الحصول على النموات الحديثة القوية بإجراء عمليات التطعيم (الأصل الصغير بالطعم من النبات الكبير) وكذلك معاملة النباتات بالجبرلين وفي بعض الأحيان يستخدم مركبات السايتوكاينين حيث يشجع ذلك على تكوين النموات الحديثة.

ج- حجم المنفصل النباتي Size of Explant

لقد وجد أنه كلما زاد حجم الجزء النباتي كانت نسبة النمو أعلى في معظم الحالات وكذلك يكون معدل التضاعف أعلى ولكن يعاب على هذه الطريقة أن نسبة التلوث تكون عالية وكذلك زيادة الإصابة الفيروسية بينما في بعض الحالات يفضل أن يكون حجم المنفصل النباتي صغير حتى يكون خالي من الأمراض وخاصة الأمراض الفايروسية وقليل التلوث.

د- موسم الحصول على الجزء النباتي Season of Explant

تكون الأعضاء النامية أكثر نشاطا في بداية موسم النمو (فصل الربيع) عن بقية فصول السنة.

هـ – نوعية وجودة مصدر النبات Quality of the Explant Source

يجب أن يكون مطابقا للأصل تماما وفي حالة نمو جيدة وخالي من الأمراض.

ثانيا: عملية التعقيم و الزراعة للجزء النباتي:

تعقيم الجزء المستعمل Sterilization of the Explant

بعد الحصول على الجزء النباتي من مصدره الأمهات تجرى عليه عملية التعقيم كالآتي:

1- يغسل الجزء النباتي المستعمل تحت تيار من ماء الحنفية لمدة ساعة أو أكثر وهذه تقلل من نسب التلوث الى درجة كبيرة وإذا كان السطح الخارجي مغطى بطبقة شمعية فإن غسيل الجزء المنفصل بإحدى مساحيق الغسيل يساعد على جعل السطح الخارجي أكثر قابلية للبلل.

2 – يوضع في كحول إيثانول 70 % لمدة نصف الى واحد دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر.

3- يوضع في هايبوكلورات الصوديوم (الكلوروكس) 20 % لمدة 10- 30 دقيقه مع الرج والتقليب المستمر.

4 –يغسل بالماء المقطر المعقم 4–5 مرات للتخلص من آثار المادة المعقمة وبعدها يصبح الجزء النباتي قابل للزراعة. (الخطوات من 2 حتى 4 تجرى داخل الهود).

زراعة الجزء المستعمل على سطح البيئة Culture of the explant

يتم زراعة النسيج المستعمل بعد تعقيمه على سطح البيئة المعقمة المحضرة سابقا باستخدام أدوات معقمة وهذه الزراعة تتم داخل هود معقم وهذا في حالة البيئة الصلبة أما اذا كانت البيئة سائلة فيوضع الجزء النباتي المستخدم على ركاب منغمس في البيئة ويسمى (قنطرة) وهي من ورق الترشيح الذى يتشرب المحاليل وينقلها إلي الجزء المنزرع. ويفضل أن تكون البيئة المستخدمة في المراحل الأولى صلبة وقد تكون سائلة في المراحل التالية.

***تحضين المزارع Incubation of the cultures**

ويتم تحضين المزارع في حضانة أو في غرفة نمو Growth Chamber التي تحتوى على ال Stands وهذه تحتوى على رفوف مضاءة توضع عليها المزارع والعوامل البيئية اللازم توافرها عند زراعة الأنسجة وهي رطوبة مناسبة للمحافظة على الأنسجة من الجفاف ودرجة حرارة مناسبة واحتياجات ضوئية مناسبة. الاحتياجات البيئية المطلوبة هي:

أ –الاحتياجات الضوئية Light requirement وتشتمل على:

1 –الكثافة الضوئية Light intensity

تحتاج الأنسجة النباتية التي تم زراعتها في أوعية تحتوى على بيئة مغذية إلي ضوء لمساعدتها على نشأة وتخليق الأعضاء Initiation فالضوء ينظم عمليات التشكل Morphogenetic processes فهو يساعد على تكوين مبادئ الجذور والسوق وتخليق الأجنة من نسيج الكالس ولعل صعوبة تكشف الأعضاء في بعض الزراعات الغير ناجحة يرجع إلي عدم تعرضها لشدة الإضاءة المناسبة وقد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج في شدة الإضاءة من 1000 إلي 3000 لوكس وهناك بعض المزارع تحتاج إلي 10000لوكس. الكثافة الضوئية كانت مفيدة لإستطالة النباتات وزيادة عدد الأوراق وطول وعدد الجذور فى البطاطس .

2– الفترة الضوئية Photoperiod

تحتاج معظم المزارع إلي 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات ظلام وهناك البعض يحتاج إلى 12 ساعة إضاءة ومثلها ظلام .

ب- الإحتياجات الحرارية Heat requirement

في معظم الأحيان تكون درجة الحرارة 22-27 م هي أنسب درجة لنمو مزارع الأنسجة بالنسبة لنباتات المناطق المعتدلة إلا أنه في النباتات الاستوائية ونباتات المناطق الحارة يكون تكشف الأعضاء بصورة أفضل في درجات حرارة تتراوح ما بين 27-35 م وقد وجد أن أفضل درجة حرارة للبراعم الخضرية على نبات الدخان كانت18 م. درجة الحرارة 20 - 25م كانت مناسبة لزيادة عدد الأفرع والأوراق وطول وعدد الجذور لنباتات البطاطس النامية في أوعية الزراعة.

(المحاضرة السابعة)

طرق الإكثار الدقيق

ان أهم وأبسط طرق الإكثار الدقيق :

1 -زراعة المرستيم culture Meristem-tip

2 -زراعة البرعم الطرفي culture Shoot-tip

3 -زراعة البرعم الجانبي culture Axillary (lateral) bud

4- زراعة العقدة Single node culture

مراحل إكثار النباتات بطريقة زراعة الأنسجة:

المرحلة الاولى : إعداد الجزء المستخدم في التكا ر وزراعته في بيئة معقمة

المرحلة الثانية : مرحلة التضاعف

المرحلة الثالثة : مرحلة التجذير

المرحلة الرابعة : مرحلة ا قلمة والنقل للبيئة الخارجية

المرحلة الأولى : تعتبر هذه المرحلة من أهم مراحل زراعة الانسجة حيث يتم فيها فصل النسيج النباتي تحت روف التعقيم وزراعته في بيئة صناعية ثم حفظه في حاضنات تحت درجة حرارة ورطوبة وإضاءة معينة في المختبر .

المرحلة الثانية : الهدف منها زيادة إعداد النباتات في المعمل حيث تنقل النباتات النامية إلى بيئة أخرى ذات تركيب كيميائي معين لتشجيع تكوين فروع جديدة للنباتات ويتم تكرار هذه العملية حتى نحصل على الأعداد المطلوبة من النباتات .

المرحلة الثالثة : إعادة زراعة النباتات و نقلها من المختبر إلى البيت المحمي التابع للمختبر لإعادة أقلمتها في التربة حيث تستخرج النباتات من الأنابيب ثم تزرع في سنادين صغيرة تحتوى على رمل وتربة زراعية مع تغطيتها بالبلاستيك الشفاف للحفاظ على الرطوبة ثم يزال هذا الغطاء تدريجيا .

المرحلة الرابعة :

مرحلة اقلمة والنقل للبيئة الخارجية ، وفيها يكون جاهزا للتوزيع على المزارعين لإعادة زراعة الشتلات في الحقول .

طرق تعقيم العينات النباتية

مصادر حدوث التلوث

1 –مسببات الامراض النباتية والتي تصيب الاجزاء الداخلية.

2 –التعقيم الغير كافي للبيئة الغذائية .

3 –الهواء الغير معقم.

4 –عمال الابحاث.

طريقة اعداد العينة النباتية للزراعة:

1 –الغسيل بالماء الجاري والتخلص من البقايا النباتية والتربة .

2–نضعها في كحول اثيلي 70 % لمدة دقيقة ، مع الاخذ بالاعتبار ان تركيز 96 % من الكحول يسبب جفاف للنسيج بدرجة كبيرة .

3– نضعها في هايبوكلورات الصوديوم (كلوركس) 20 % لمدة10 –30 دقيقة للتعقيم ولمنع تكون الفقاقيع .

4–نغسلها بماء مقطر ومعقم 3 مرات لإزالة بقايا هايبوكلورات الصوديوم .

5– نقطع الجزء النباتي إلى أجزاء صغيرة بواسطة مشرط معقم باللهب بعد وضع كحول 96%.

اسباب حدوث الاصابة للنسيج بعد التعقيم السطحي :

1 –الاصابة الداخلية.

2 –تلوث منضدة العمل و الادوات المختبرية .

3 –الكحول الذي تجرى به عملية التعقيم.

4 –الانابيب التي بها البيئات قد تتلوث من الخارج لذلك ينصح بعد التعقيم ان تحفظ الانابيب في مكان معقم.

5– ارضية حجرة المختبر تمثل مصدرا للتلوث.

العزل والزراعة واعادة الاستزراع subculturing

اهم اسباب اعادة الاستزراع :

1 –استنفاذ مكونات البيئة الغذائية نتيجة لنمو القطع النباتية عليها.

2 -جفاف البيئة الغذائية ويكون هذا بسبب ارتفاع تركيز الاملاح والسكريات .

3 -النمو النباتي قد يكون اكبر من الانابيب والدورق تماما .

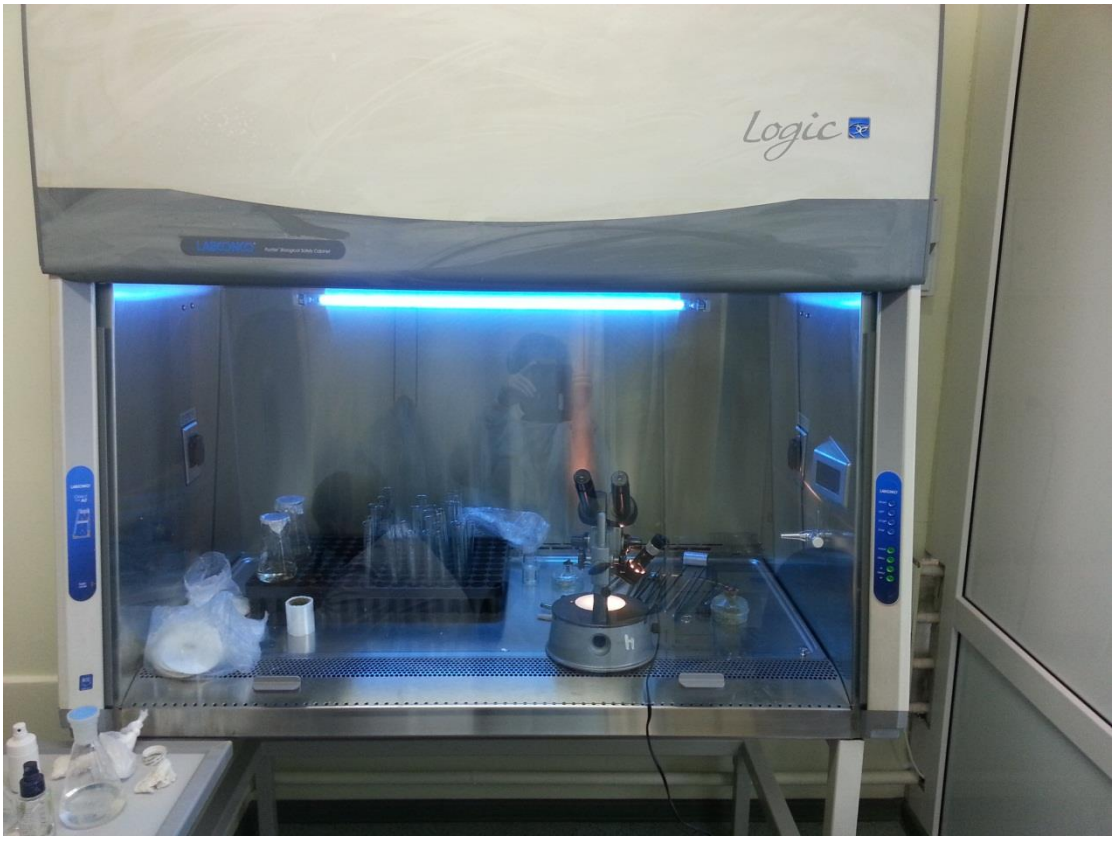
4 -احتياج الجزء النباتي إلى حالة من اعادة تكاثره خضريا.

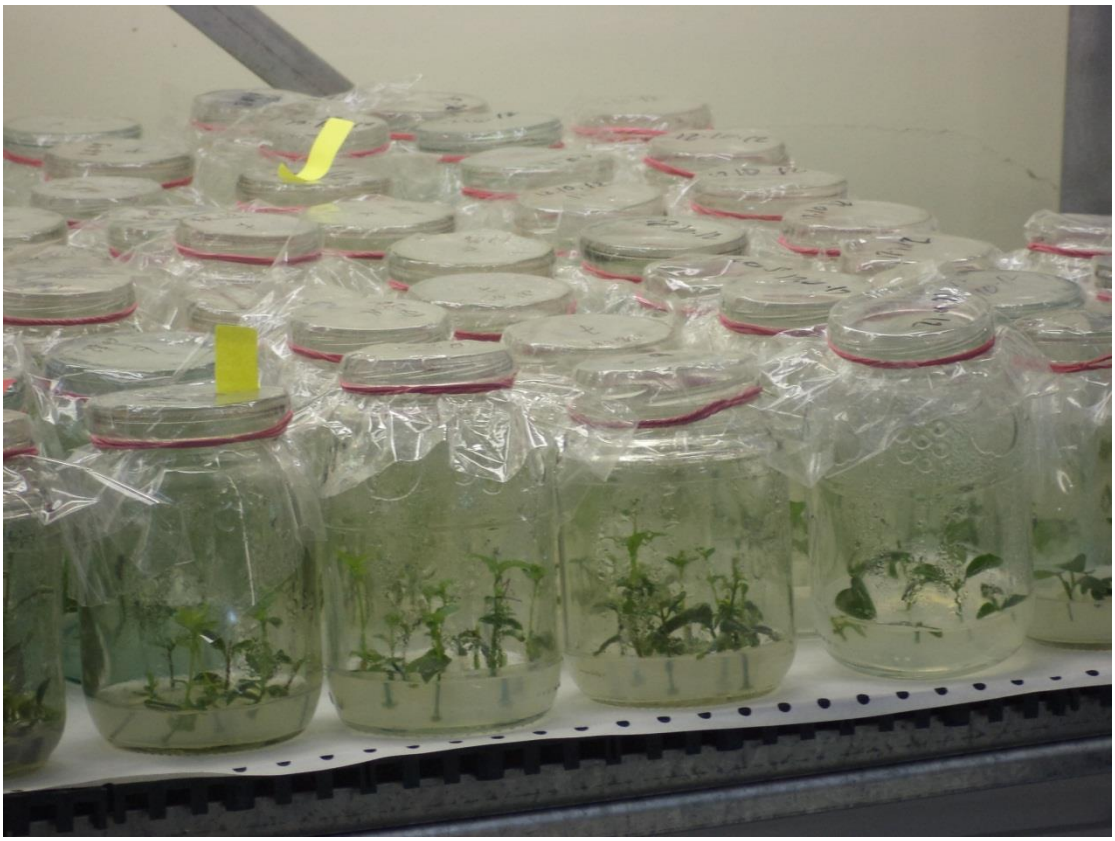
5- ظهور تلون بني او اسود في البيئة الغذائية خلال الاسابيع الاولى .

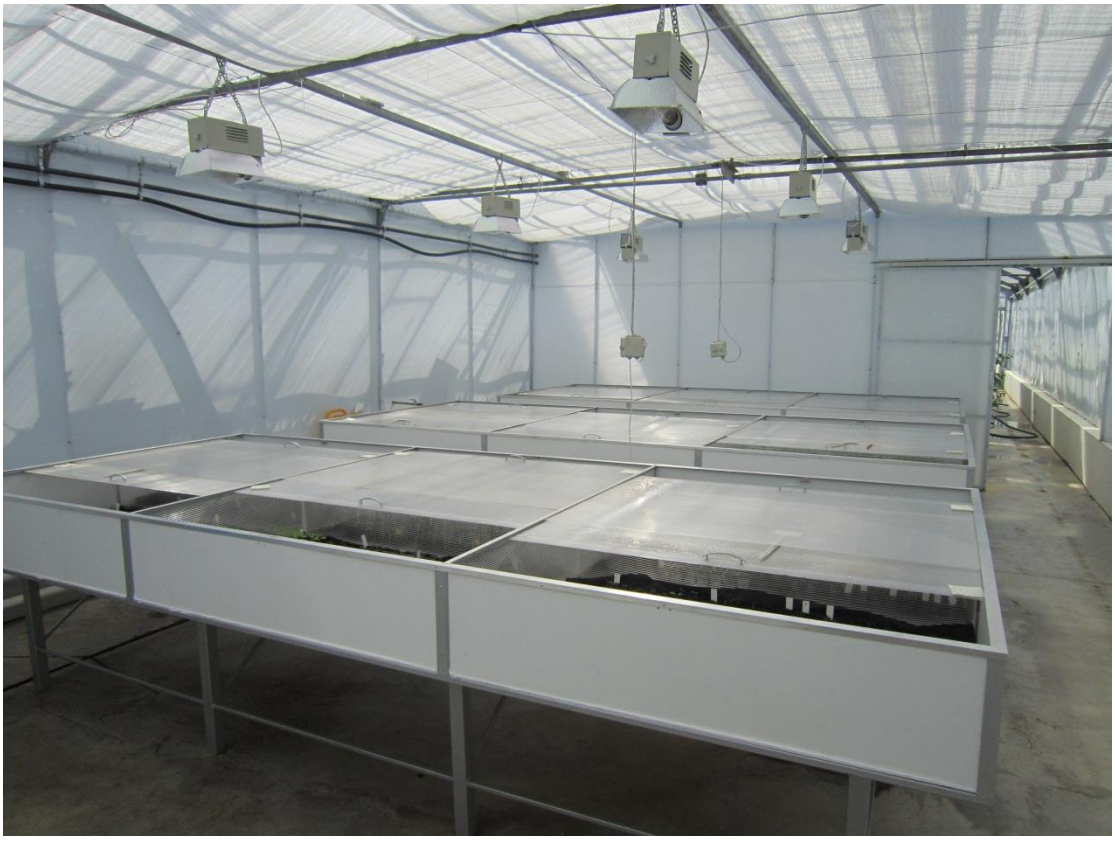
6- قد يكون النقل إلى بيئة جديدة نتيجة احتياجات معينه.

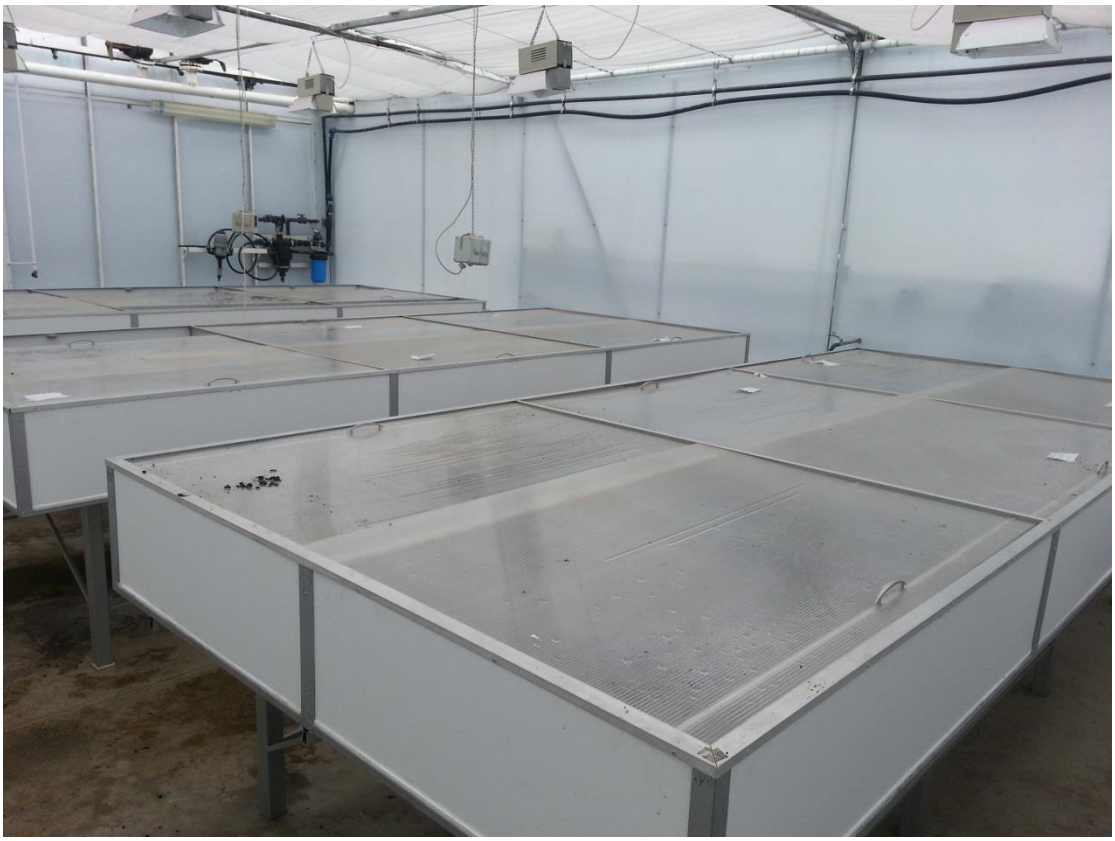
7- قد يكون النقل نتيجة تحول البيئة الصلبة إلى سائلة بسبب تغير درجة الحموضة.

Logic


Logic







المصادر:

1- اساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية. 1988. جامعة بغداد . الدكتور محمد عباس سلمان.

2- زراعة الانسجة والخلايا النباتية . الدكتور فيصل رشيد الكنافي .1987. جامعة الموصل.

3- توفيق الرفاعي وسمير عبد. 2007. زراعة الأنسجة والاكثار الدقيق للنبات. المكتبة المصرية للطباعة والنشر . الإسكندرية.

4- زراعة الانسجة النباتية . جامعة الملك سعود . قسم النبات, الاستاذ الدكتور فكري فهمي.