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.

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.