المحاضرة الثانية

الوسط الغذائي:

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,ا لبوتاسيوم, 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 , Vitamin E , Ascorbic acid .

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 بانPyruvate 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 Glutamineمحل 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 الكاناماسين 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 الـGA3 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 طبيعة 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 بتركيز0,5 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$^{-1}$).