المحاضرة العاشرة

تحضير البيئة الزراعية في المختبر (العملي)

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 .