المحاضرة الحادية عشر

الخطوات المتبعة لزراعة الخلايا والأنسجة النباتية (العملي)

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.