الكلية	القانون
القسم	القانون
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture
المادة باللغة العربية	زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	
اسم التدريسي	محمد رجب كامل علي العسافي
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Requirements for establishing tissue culture laboratories
عنوان المحاضرة باللغة العربية	متطلبات انشاء مختبرات زراعة الانسجة
رقم المحاضرة	2
المصادر والمراجع	**الرفاعي,** عبدالرحيم توفيق وسمير عبد الرزاق الشوبكي (2007). زراعة الانسجة والاكثار الدقيق للنبات, المكتبة المصرية للطباعة والنشر , الطبعة الأولى , كلية الزراعة – جامعة المينا – جمهورية مصر العربية
	المختار, سراب عبد الهادي (2020). زراعة الانسجة النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة – جامعة كربلاء . العراق.

محتوى المحاضرة

متطلبات انشاء مختبرات زراعة الانسجة

لغرض انشاء اي مشروع لزراعة الانسجة فان ذلك يتطلب مجموعة من المستلزمات الاساسية لتنفيذ ونجاح العمل ويعتمد ذلك على حجم المشروع والهدف المطلوب تنفيذه وفيما يلي المتطلبات الاساسية لأنشاء مركز متخصص لزراعة الانسجة:-

اولا -البنايات

تعتمد مساحة البنايات والمرفقات الملحقة بها على حجم المشروع والهدف منه وعلى العموم تكون موزعة كما يلي:-

1- **الادارة**

وتشمل غرف المكتب الخاصة بإدارة المشروع والمنتسبين والعاملين فيه ويفضل ان تكون هذه البناية منفصلة عن بناية العمل الفني بحيث تكون المراجعات والزيارات لبناية الادارة فقط وعدم الدخول الى بناية العمل الفني لغرض المحافظة على النظافة والتعقيم وسرية العمل.

UNIVERSITY OF ANBAR

2- **بناية العمل الفني وتشمل-:**

أ.-مختبر اعداد الاوساط الغذائية وتوزيعها في اوعية الزراعة وتعقيمها وتكون مجهزة لهذا الغرض ويتوفر فيها العديد من الاجهزة مثل-:

.-الثلاجة - **Refrigerator** حمام مائي **Bath water.**

-الخلاط المغناطيسي - **sterrer Megnetic** المعقام **Autociave**

-الميزان الحساس**Digital balance** - الفرن الكهربائي.**Oven**

-الملاقط **forceps** الكبيرة والصغيرة - الابر **Needles** الدقيقة للتشريح.

-انابيب او زجاجيات للزراعة - جهاز ال .**Ph meter**

-مصدر للماء والغاز والكهرباء - المنظفات والمطهرات.

-جهاز التقطير.**Distilling apparatus of water**

-غسالة اطباق اوتوماتيكية. **Washing machine**

-المجهر الالكتروني**Electronic microscope.**

-دولاب لحفظ الكيمياويات او الزجاجيات. **Cupboard**

-مشارط **Scalpels** حادة لتقطيع الانسجة النباتية.

-القفازات **Gloves** تستعمل لمنع التلوث عن طريق اليدين او حماية البشرة من الكيمياويات والمواد الضارة الاخرى.

ب -غرفة اجراء الزراعة النسيجية ويوجد فيها اجهزة تعقيم الهواء (الهود **Laminar airflow hoods**) والتي يتم فيها استئصال وزراعة الاجزاء النباتية في الاوساط الغذائية ويجب ان تتوفر فيها شروط النظافة والتعقيم التام ولا يسمح بدخول غير العاملين اليها.

ج -الحاضنات وهي غرف خاصة بتحضين الزروعات وتحتوي على رفوف مزودة بإنارة خاصة وتكون الحرارة فيها مسيطر عليها.

3- **البيت الزجاجي** والظلل الخاصة بعملية الاقلمة.

4- **غرف الصيانة** والمخازن والمولدات الكهربائية وغيرها.

ثانيا -الكادر

يتطلب اي مشروع لزراعة الانسجة كادر اداري وفني متخصص يعتمد على حجم المشروع ومتطلباته.

ثالثا -الاجهزة والمعدات

وتشمل مجموعة متنوعة من الاجهزة الخاصة بزراعة الانسجة ومعدات الزراعة فضلا عن زجاجيات مختلفة لتحضير الاوساط الغذائية وتوزيعها وقناني خاصة لتوزيع الاوساط الغذائية فيها وغيرها من المواد.

رابعا -المواد الكيمياوية

وتشمل مجموعة متنوعة من الكيمياويات الخاصة بتحضير الاوساط الغذائية والفحوصات السيرولوجية ومواد التعقيم والمبيدات وغيرها من المواد.

ومن الجدير بالذكر انه يمكن انشاء مختبر صغير لزراعة الانسجة من غرفتين ,**الاولى** تكون عامة لتحضير الاوساط الغذائية وتوزيعها وتعقيمها ويمكن عزل جزء منها لغرض وضع جهاز اجراء عملية الزراعة النسيجية (**الهود**) اما الغرفة **الثانية** فتكون خاصة لتحضين الزروعات فيها.

العوامل المؤثرة في زراعة الانسجة النباتية

يعتمد نجاح الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي وتطوره اللاحق على العديد من العوامل المختلفة فمنها ما يتعلق بالوسط الغذائي ومنها ما يتعلق بالجزء المزروع او الظروف البيئية التي يتم حفظ المزروعات فيها **وكما يلي-:**

1- **الوسط الغذائي**

تستعمل زراعة الانسجة اوساط غذائية مختلفة حسب الانواع النباتية وحسب الصنف ضمن النوع الواحد ونوع الجزء المزروع والهدف من الزراعة .وتشترك جميع الاوساط الغذائية بالمتطلبات الاساسية من حيث الاملاح المعدنية ومصدر الطاقة ولكنها تختلف بتراكيز هذه المكونات ونوع منظمات النمو والفيتامينات والاحماض الامينية المضافة الى الوسط الغذائي .وقد توصل الباحثون في هذا المجال الى خلطات مختلفة من المكونات العضوية واللاعضوية والفيتامينات وغيرها من الاضافات لتكون الاساس في تحضير الوسط الغذائي .

ومن اشهر الاوساط الغذائية المستخدمة على نطاق واسع في زراعة الانسجة هي-:

وسط Murashige و.Skoog ((1962

وسط.White ((1963

وسط Gamborg واخرون 1968)) ويعرف هذا الوسط باسم.B5

بالإضافة الى العديد من الاوساط الغذائية الاخرى .وتختلف هذه الاوساط في تراكيز الاملاح الرئيسية والثانوية المحضرة منها وكذلك في تركيز بعض المركبات العضوية ومنظمات النمو ونوع تركيز مصدر الطاقة (**السكر**) واستعمال مادة الاكار (**Agar**) بشكل واسع لتصليب الوسط الغذائي واكسابه القوام الهلامي ويستخدم البعض مادة النشأ لهذا الغرض في حين تستخدم الاوساط السائلة في زراعة الخلايا المعلقة. (**Suspension culture**)

كما ان لنوع السكريات وتراكيزها في الوسط الغذائية تأثير كبير على الانواع النباتية المزروعة فيه الكالس وفيما يخص منظمات النمو فأنها تعتبر من العوامل المحددة لتكوين الاعضاء النباتية من انسجة الكالس فمن الملاحظ ان زيادة تركيز السايتوكاينين عن الاوكسين تؤدي الى تكوين النموات الخضرية بينما في العكس من ذلك يؤدي الى تكوين الجذور وعند التوازن بينهما سوف يستمر نمو الكالس وتضاعفه دون حدوث تمايز فيه الى اعضاء .وفي بعض الحالات لوحظ ان وجود الجبرلين يؤدي الى تثبيط تكوين الاعضاء النباتية .اما وجود الاحماض الامينية في الوسط الغذائي فانه يؤدي الى زيادة تكوين الاعضاء النباتية في الانسجة المزروعة .ومن الجدير بالذكر ان اضافة خليط من الاحماض الامينية قد يؤدي الى تثبيط نمو الانسجة المزروعة وربما يكون ذلك بسبب التداخل والتضاد الذي يحصل بين الاحماض المستخدمة.

وتؤثر في الوسط الغذائي عدة عوامل نذكر منها-:

أ.-تركيز ايون الهيدروجين PH)) في الوسط الغذائي

يؤثر تركيز ايون الهيدروجين في امتصاص العناصر الغذائية من قبل الجزء المزروع في الوسط الغذائي وان افضل **PH** لنمو الانسجة والاجزاء النباتية المزروعة يقع بين **6 – 5** ويتم تعديل ال **PH** للأوساط الغذائية الى الحد المطلوب قبل تعقيمها .ومن الجدير بالذكر ان الاكار يتأثر بال **PH** فعندما يكون اقل من **5** يصبح الوسط الغذائي رجراجا ولا يتم تثبيت الجزء النباتي فيه بصورة صحيحة وعندما يكون اعلى من **6** يكون الوسط صلب جدا مما يعيق انتشار العناصر الغذائية الى الجزء النباتي بسهولة.

ب -الحالة الغازية

تعتبر تهوية الوسط الغذائي من الامور الاساسية والمهمة في نجاح زراعة الانسجة خاصة عند الزراعة في اوساط سائلة وفي هذه الحالة يتم تزويد المزارع في الاوساط السائلة بالهواء من خلال الرج او استخدام مضخات خاصة لهذا الغرض مع مراعاة ظروف التعقيم التام .وقد يؤدي تراكم الغازات في اوعية الزراعة الى التأثير السلبي على نجاح الزراعة النسيجية .قد يتراكم الاثيلين في اوعية الزراعة مما يتطلب التخلص منه وهذا يتطلب ان تكون اوعية الزراعة بمواصفات تسمح بالتنافذ دون ان تسمح بدخول الملوثات الى داخل الاوعية.

2- **درجة الحرارة**

تؤثر درجة الحرارة على العمليات الفسيولوجية في النبات تأثير كبيرا ,حيث انها تتحكم بالعمليات الحيوية والكيميائية كما انها تؤثر في عمليات امتصاص الماء والاملاح وعملية فقدان الماء عن طريق النتح ,حيث تؤدي درجات الحرارة العالية الى زيادة معدل فقد الماء .لذا تعتبر درجة الحرارة عاملا رئيسيا من العوامل المحددة لتطور الجزء النباتي المزروع والتكوين الظاهري له .وبصورة عامة فان تنمية الاجزاء النباتية على درجة حرارة**25 م** يعتبر مناسبا لمعظم النباتات مع وجود بعض الاستثناءات التي يتطلب تنميتها في درجات حرارة اعلى او اقل من ذلك .ومن الملاحظ ان الاجزاء النباتية المفصولة في مرحلة السكون لا تظهر استجابة جيدة للزراعة النسيجية ما لم تستوفي احتياجاتها الحرارية اللازمة لأنهاء السكون من خلال تعريضها الى درجات حرارية منخفضة كافية لهذا الغرض.

3- **الضوء**

لا تحتاج الانسجة المزروعة في المراحل الاولى للضوء بكميات كبيرة لكونها لا تقوم بعمليات التمثيل الضوئي بل تعتمد على ما يوفره الوسط الغذائي المزروعة فيه من مصدر الطاقة (**السكريات**) وفي المراحل الاخرى يعتبر الضوء عاملا مهما للسيطرة على عملية التكوين الظاهري للأنسجة وتكوين الاجنة الجسمية (**الخضرية**) وكذلك تكوين المجموع الخضري .كما انه من الضروري تعريض النباتات للإضاءة في مرحلة تهيئة النباتات لعملية الاقلمة قبل نقلها في اوعية الزراعة النسيجية الى البيت الزجاجي ويختلف تأثير الضوء على نمو وتطور الانسجة المزروعة تبعا **لاختلاف ما يلي-:**

أ .-طول الفترة الضوئية

يختلف تأثير الفترة الضوئية على تكوين الاعضاء النباتية حسب اختلاف النباتات وان تعريض الاجزاء النباتية المزروعة الى **16** ساعة اضاءة في اليوم يعتبر مناسبا لمعظم النباتات الا ان هناك حالات تنمو فيها الزروعات بشكل افضل في الظلام كما في حالة مزارع الكالس .وان استجابة الاجزاء النباتية المزروعة لطول الفترة الضوئية يعتمد على التغير الحاصل في مستويات الاوكسينات والسايتوكاينينات الداخلية.

ب -طول الموجة الضوئية

من خلال البحوث والدراسات وجد بأن **الضوء الابيض** يؤدي الى تحفيز تكوين البراعم ,في حين ان **الضوء الاحمر** يحفز تكوين الازهار بينما وجد ان الظلام والاشعة **الحمراء البعيدة Infra – red**)) تحفز تكوين الجذور .بينما لوحظ ان **الضوء الازرق** يحفز نشوء النموات الخضرية في لب نبات التبغ.

ج -شدة الاضاءة

من الشائع استخدام الاضاءة في المرحلتين الاولى والثانية (**النشوء والتضاعف**) من مراحل الاكثار باستخدام تقنية زراعة الانسجة وعادة ما تستخدم شدة اضاءة **1000** لوكس خلالهما ,في حين انه قد يتطلب زيادة شدة الاضاءة في المرحلة الثالثة **(مرحلة التجذير)** وربما تصل شدة الاضاءة فيها الى **10000**لوكس.

4- **الجزء النباتي**

يعتبر الجزء النباتي من العوامل الاساسية والمهمة في نجاح زراعة الانسجة ويتأثر نجاح الجزء المزروع على عدة عوامل منها-:

أ.-حجم الجزء النباتي Explant size

تزداد فرصة نجاح الجزء النباتي المزروع في الوسط الغذائي كلما ازداد حجمه سواء كان قمة نامية او كالس او غير ذلك .وقد اكدت العديد من الدراسات زيادة فرصة نجاح القمة النامية المزروعة كلما احتوت على عدد اكبر من بادئات الاوراق .ويكون حجم الجزء النباتي عاملا محددا في حالة انتاج نباتات خالية من المسببات المرضية وخاصة الفايروسية حيث انه من المعروف ان الفيروسات تزداد بزيادة حجم الجزء النباتي من ناحية اخرى فان عدد الافرع الناتجة من زراعة القمة النامية يتأثر بحجم

الجزء المزروع فمثلا وجد ان زراعة القمة النامية لنبات الداوودي بطول **0.2 – 0.1** ملم قد اعطت فرعا واحدا في حين ان القمة النامية المزروعة بحجم **1.2 – 0.5** ملم قد اعطت افرعا عديدة.

ب -مصدر الجزء النباتي Source of the explant

تمتاز الخلايا النباتية بالقدرة والكفاءة على التكوين الجنيني ومن الملاحظ ان هذه القدرة تختلف باختلاف النسيج النباتي ضمن النبات الواحد وباختلاف الانواع النباتية .حيث ان الخلايا قد تفقد قابليتها على التكوين الجنيني الا اته بالإمكان حثها على استعادة القدرة على تكوين الاعضاء النباتية وتختلف هذه القدرة باختلاف الاعضاء النباتية .لقد لوحظ ان خلايا انسجة الكالس الناتجة من الجذور في بعض كونت جذورا فقط في حين ان خلايا الكالس الناتجة من انسجة خضرية كالأفرع او الاوراق لنفس النبات كونت افرع فقط.

ج -العمر الفسيولوجي The physiological Age

للأنسجة الفتية قابلية لاستعادة التكوين الظاهري مقارنة بالأنسجة الاكبر عمرا سواء كانت هذه الانسجة مستأصلة من نباتات عشبية او خشبية.

د -موعد اخذ الجزء النباتي The date of excising the Explant

يؤثر موسم اخذ الجزء النباتي ومرحلة نمو النبات الام في نجاح نمو وتطور الجزء المزروع ,حيث ان استئصال الاجزاء النباتية في موسم النمو والنشاط يمنحها فرصة اكبر للنمو والتطور مقارنة بتلك المستأصلة في فترة السكون.

5- التركيب الوراثي Genotype

يلعب التركيب الوراثي للأنواع النباتية والاصناف ضمن النوع الواحد دورا كبيرا في مدى استجابة الاجزاء النباتية للزراعة النسيجية حيث ان هناك اصناف سهلة الاكثار خضريا في حين ان هناك اصناف اخرى ضمن نفس النوع صعبة الاكثار .**وقد يعزى سبب ذلك الى اختلاف المحتوى الهرموني في ما بينها** والذي ينعكس بدوره على احتياجاتها لمنظمات النمو المضافة الوسط الغذائي لأحداث نمو معين.

6- التعقيم Sterilization

ان الوسط الغذائي المستخدم في زراعة الانسجة يعتبر ملائما جدا لنمو المسببات المرضية .وعليه فان عملية تعقيم الاجزاء النباتية تعتبر ضرورية جدا لمنع نمو وتكاثر هذه المسببات واتي فيما لو تواجدت فأنها سوف تنافسه على الغذاء وتقوم بهاجمته مما يتسبب في موته .وقد تكون عملية التعقيم السطحي غير فعالة للتخلص من الكائنات الحية المتواجدة داخل النسيج المزروع.

7- الحالة الفسيولوجية للنبات الام Physiological state of the mother plant

تلعب الحالة الفسيولوجية للنبات الام دورا كبيرا في سلوك الجزء المزروع ,فمثلا ان الجزء النباتي المأخوذ من اشجار بالغة غالبا ما يتطلب وسطا غذائيا يختلف في مكوناته عن الوسط المستخدم لزراعة الاجزاء المأخوذة من الاشجار في طور الحداثة.