الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture technique
المادة باللغة العربية	تقنية زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	أنمار كامل مبارك
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Tools and Techniques for P. T. C
عنوان المحاضرة باللغة العربية	أدوات وتقنيات P. T. C.
رقم المحاضرة	الثانية
المصادر والمراجع	George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008).** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/Plant%20Propagation%20by%20Tissue%20Culture%203rd%20Edition.pdf
	Pierik, R. L. M. (1997).** *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer
	Reed, B. M. (2008).** *Plant Tissue Culture: Techniques *and Experiments
	https://biot202.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf

الاوساط الغذائية
Nutrient Media

جميع الاوساط الغذائية تحتوي على كل المغذيات المطلوبة من قبل النبات الكامل لكن بنسب معينة وتراكيز معينة حسب الغرض منها ومرحلة النمو وحجم الجزء النباتي ونوع وكمية الوسط ومرحلة تطور النمو وهدف انشاء الزروعات .

وأن اكتشاف منظمات النمو النباتية وتزايد المعرفة فيما يخص العناصر الغذائية الصغرى والفيتامينات ساهمت بشكل كبير في تطور الاوساط الغذائية.

وفي بداية تاريخ زراعة الانسجة كان الوسط الغذائي الرائج آنذاك هو Knop's solution وبعدها كان White media اما الاكثر رواجا الى يومنا هذا فهو MS المقترح في عام 1962.

بصورة عامة ، جميع الاوساط الغذائية تحتوي على املاح معدنية ومصدر كاربون (عادة السكروز) والفيتامينات ومنظمات النمو النباتية.

مكونات الوسط الغذائي

الاحتياجات الغذائية الذي يوفرها الوسط الغذائي تختلف باختلاف الجزء المزروع و المرحلة التطورية للجزء المزروع ونوع النبات ولكن بصورة عامة يمكن حصر مكونات الوسط الغذائي بالتالي:

1- المكونات اللاعضوية Inorganic nutrients

2- المكونات العضوية Organic nutrients

3- منظمات النمو النباتية Plant growth regulators

4- مكونات اخرى Other substances

1- المكونات اللاعضوية Inorganic nutrients

وهي الاملاح التي تضاف للوسط الغذائي لتجهيز الجزء المزروع explant بالعناصر الغذائية الاساسية للنمو والتطور وتشمل:

1- العناصر الكبرى

N P K Mg Ca S

2- العناصر الصغرى

Fe Cu Zn Mn B I Mo Co

2- المكونات العضوية Organic nutrients

1- الكابوهدرات (مصدر للكاربون) : يعد من المكونات الأساسية للوسط الغذائي ويستخدم السكروز مصدرا للطاقة حيث يتحلل الى مركبات بسيطة وينتج أثناء التحلل تحرر ATP الذي يستخدمه الجزء المزروع في فعالياته الحيوية ويضاف بنسب تختلف حسب نوع النبات ويتراوح بين 2 - 5 % مثل الكلوكوز والفركتوز والمالتوز والسكروز يمكنها جميعا ان تكون مصدر للكاربوهدرات ولكن بصورة عامة يستعمل السكروز حيث يتحول بسرعة الى كلوكوز وفركتوز.

2- الفيتامينات: تعد من المكونات العضوية للوسط الغذائي وأكثر الفيتامينات شيوعاً هو الثيامين (Thiamine).حيث تضاف كعوامل مساعدة لعمل الانزيمات co-enzymes وتضاف بكميات قليلة جداً ومن أهم الفيتامينات التي تضاف لأوساط الزراعة:

الثايمين Thiamine او vitB1

حامض النيكوتين Nicotinic acid او vitB8

ج- البيريدوكسين Pyridoxine او vitB6

3- الاحماض الامينية ومصادر النايتروجين العضوية:

تعتبر من المكونات الأساسية للأوساط الغذائية وخاصة التي تستعمل لاستحداث التمايز وتستخدم الاحماض الامينية كمصدر للنايتروجين المختزل عند عدم وجود كفاية من النايتروجين في الوسط الغذائي وتشمل

1- التايروسين Tyrosine لتحفيز نشوء الاعضاء خاصة الساق

2- الارجنين Arginine للتجذير

3- السيرين Serine في استحداث الاجنة الجسمية

4- الاسبارجين Asparigine لاستحداث الكالس

4- منظمات النمو :

تعد من المكونات الحرجة للأوساط الغذائية حيث أن تأثيرها مباشر على الجزء المزروع من منظمات النمو المستخدمة

لذ فإن بعض الانسجة النباتية تحتاج الى السايتوكاينين بجانب الاوكسينات في الوسط الغذائي لكي تنمو بصورة جيدة .

وقد استخدم الكاينتين بصورة واسعة في نمو الكالس في الاوساط الغذائية للعديد من النباتات وكانت فعاليته تعود الى التأثير المتداخل بينه وبين الاوكسينات IAA و داي كلورو فينوكسى أسيتك أسد (Dichlorophenoxyacetic acid - 2,4-D) .

ان ديمومة واستمرار الكالس في الوسط الغذائي قد يتطلب وجود بعض الاحماض الامينية مثل glycine او خليط من الاحماض الامينية وعادة يضاف على شكل casein hydrolysate . وكذلك قد يتطلب وجود الفيتامينات في هذه الاوساط الغذائية بصورة مستمرة . ومن منظمات النمو المستخدمة في زراعة الأنسجة النباتية هي

أ- الاوكسينات : هي عبارة عن مجموعة من الأحماض العضوية ذات وزن جزيئي عالي تستخدم بتراكيز قليلة جدا لتحدث تأثيرا كبيرا في الجزء المزروع من هذه الاوكسينات المستخدمة **2,4-D , NAA , IBA , 2,4,5-T** وتستخدم الاوكسينات بتراكيز تتراوح بين 0,3- 10 ملغم / لتر .

ب – السايتوكاينينات : عبارة عن قواعد عضوية ذات أوزان جزيئية عالية ومن السايتوكاينينات التي تستخدم في زراعة الأنسجة الكاينتين والبنزل أدنين والزياتين وتستعمل السايتوكاينينات بتراكيز أعلى قليلا من السايتوكاينينات تتراوح بين 0,03- 10 ملغم / لتر وأهميتها تحفيز نشوء الساق والأوراق وكذلك تحفيز نشوء الكالس بوجود الاوكسينات .

ج- الجبرلينات : هي اقل استخداماً من الاوكسينات و السايتوكاينينات وهي تحفز نشوء الأعضاء وأحياناً تساهم في تحفيز نشوء الكالس وتستخدم بتراكيز واطئة تتراوح بين 0,01- 1 ملغم / لتر ويصل عدد الجبرلينات الى أكثر من 60 نوع أهمها **GA3 و GA4 و GA7** .

د- الابسيسك أسيد والاثيلين : تستخدم في نطاق محدود وخاصة في تنظيم عمليات النمو .

5- الهكسيتول والانوسيتول (Hexitol وInositol) :

يضاف الهكسيتول والانوسيتول إلى الأوساط الغذائية لزيادة نمو الكالس واستحداث الأعضاء .

6- المستخلصات الطبيعية :

وتشمل مستخلصات من النبات تؤدي إضافتها للوسط الغذائي إلى تحفيز نمو الجزء المزروع لاحتوائها على مواد فعالة تعمل على تحفيز وزيادة النمو والنشاط في الخلايا أو النسيج والجزء النباتي المزروع وهذه المواد مثل حليب جوز الهند (الذي يمثل السويداء السائلة للثمار الغير الناضجة) لب الموز وعصير الطماطة والبرتقال ومستخلص الخميرة والبروتينات الذائبة.

7- مواد تصلب الوسط الغذائي :

وهي المواد التي تساعد على جعل الوسط الغذائي شبه صلب لمنع الجزء المزروع من الانغماس فيه وبالتالي يؤدي إلى موته ومن أكثر المواد المستخدمة الاكَار وهو مستحضر متعدد السكريات من بعض أنواع الطحالب البحرية ومن أهم أسباب استخدامه :-

1- خامل من الناحية العضوية .

2- سهولة ذوبانه عند التسخين .

3- تصلبه بدرجة حرارة الغرفة .

زراعته تعتمد بالدرجة الأساس على ظروف الزراعة وليس على مصدر النبتة .

8- الفحم النشط Activated charcoal

يستخدم الفحم النشط في مزارع الأنسجة النباتية لعدة أسباب منها:-

1 - امتصاص المواد المثبطة للنمو والتي تنتج بواسطة النسيج المنزرع من البيئة المغذية.

2 - امتصاص منظمات النمو حيث أن هذه المواد لها قابلية عالية في الارتباط بالفحم النشط.

3 - تحول البيئة المغذية من اللون الأبيض الشفاف إلى اللون الأسود كالتربة في الطبيعة مما يساعد على تكوين الجذور.

4 - ذات قابلية عالية بالارتباط بالمواد الفينولية التي تنتج من الأنسجة المزروعة.

درجة الحموضة PH

يعرف الـ PH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهي الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج الـPH من صفر حتى 14 درجة وتكون نقطة التعادل عن pH= 7 أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي، والأعلى من ذلك فيكون الوسط قلوي (7-14) . والـPH ضروري جد ا لتسهيل أيونات المعادن في البيئة وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالبا ما تكون حامضية إلى متعادلة حتى يكون جميع العناصر الغذائية في الصورة الميسرة لها لتمكن النبات من الاستفادة منه دون حدوث أي ضرر عليه.

ويتم تقدير الـPH بطريقتين هما:

أ- جهاز pH-meter:

الذي يقيس تركيز أيون الهيدروجين عن طريق الألكترود، حيث أن هذا الألكترود يكون حساس جداً لأي تركيز من أيون الهيدروجين. ويتم وضعه في محلول قياس منظم لضبط درجة الحموضة للجهاز أولاً(معايرة) قبل قياس حموضة البيئة الغذائية ويتم ضبط درجة الحر ار ة للوسط الغذائي قبل ضبط الـPH لها مباشرة.

ب- أوراق PH:

يستخدم في المحاليل المائية والبيئات وذلك بغمس طرف الورقة في المحلول، ثم يقارن اللون الناتج مع الألوان القياسية الموجودة في الدليل حيث أن كل درجة لون يقابلها قيمة معنية من pH .

أنواع البيئات (حسب درجة تصلبها) Media types

يوجد ثلاثة أنواع من البيئات وهم البيئة الصلبة والبيئة السائلة والبيئة الشبيهة بالصلبة.

1 – البيئة الصلبة Solid media

وهي البيئة المضاف اليها آجار وهو إما فيتاجيل أو جيلريت أو بكتو دفكو آجار فيصلبها وكمية الآجار حوالي من 2 – 7 غم/ لتر وهناك أنواع من الآجار تصلب البيئة عند 2غم/ لتر وأفضل رقم حموضة لهذه البيئة pH هو 5.7 واذا كانت البيئة الصلبة في أنبوبة إختبار يجب وضعها بميل بزاوية 45 درجة قبل التصلب بعد الخروج من الأوتوكليف مباشرة وذلك لزيادة سطح البيئة داخل أنابيب الاختبار.

2 – البيئة السائلة Liquid media

وهي البيئة التي لا يضاف اليها آجار وأفضل رقم حموضة pH هو 5.5 وعند زراعة مثل هذه البيئة إما أن يوضع الجزء النباتى مباشرة في البيئـة أو إذا كان مرستيم فيحتاج إلي ركاب أو قنطرة من قطعة ورق ترشيح ويوضع المرستيم أعلى القنطرة ويصل إلية الغذاء عن طريق التشرب وفي حالة زراعة الكالوس على البيئة السائلة يحتاج إلي هزاز Shaker لتجديد الهواء (التهوية) وجعل البيئة السائلة تصل إلي كل جزء من أجزاء النسيج.

3 – البيئة شبة الصلبة Semi-solid media

وهي البيئة التي يكون بها كمية آكار أقل فهي لاتكون صلبة ولا سائلة.

تضاف المواد المصلبة إلى الوسط الغذائي للحصول على بيئات صلبة حتى يمكن الزراعة عليها. وتموت الخلايا إذا زرعت في بيئة سائلة ثابتة حيث إنها تسقط داخل البيئة السائلة وتفقد الأوكسجين اللازم لتنفسها. وتعمل المواد المصلبة للوسط الغذائي على إتاحة فرصة للنمو على أسطح الوسط الغذائي ويعتبر الآجار من أفضل المواد المصلبة للوسط الغذائي وهو مستخلص من بعض الأعشاب البحرية. والآكَار عبارة عن معقد من السكريات وللأهمية نذكر هنا أن الآجار أو الجلاتين لا يتفاعل مع مركبات الوسط الغذائي. وكذلك لا تستطع الإنزيمات النباتية هدم هذه المركبات وتحليلها وتظل صلبة طول مدة النمو على مختلف درجات الحرارة. عادة يستخدم الآجار بنسبة 2-7 جم/لتر على حسب نوع الآكَار وهى كمية كافية لتصليب أو تدعيم الوسط الغذائي عند نفس الرقم الهيدروجينى المستخدم في بيئة الوسط.

أما بالنسبة لمادة الجيلاتين فإنها تستخدم بتراكيز أعلى 10% لتصلب الوسط الغذائي ولكن لا تستخدم بكثرة لأنه يتحول إلى مادة سائلة عند درجة حرارة أعلى من 25°م بالإضافة إلى ذلك هناك العديد من المواد التي يمكن استخدامها في عملية تصلب الوسط الغذائي نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر Gelrite, Phytagel, alginate, methacel يوجد في الأسواق الآن نوع من الأكاروز النقي والذى يستخدم فى مزراع البروتوبلاست ومزراع الخلية الواحدة. أيضاً هناك طرق بديلة لحمل الخلايا في الوسط الغذائي السائل مثل استخدام ورق سلوفان أو ورق ترشيح أو استخدام رغاوى البولي إثيلين. وعموماً فإن درجة النمو بالنسبة للأنسجة لا تعتمد أساساً على نوع النسيج والنوع النباتي المستخدم. ويعتبر الفيتاجيل من أفضل المواد المصلبة للبيئة حيث أنهُ يستخدم بتركيز منخفض 2غم/لتر وهو شفاف أي خالي من الشوائب (El-Shobaky 1991).

تأثير إنخفاض ال pH عن 4.5 فيحدث الآتى:

1 – يتأثر ثبات IAA والجبرالين والثيامين والكالوسيوم بانتوثيانيت.

2 – سيولة الآجار.

3 – تقل الإستفادة من أيونات الأمونيوم نظرا لقلة الإمتصاص.

4 – أيونات الحديد والمنجنيز تصبح في الغالب في صورة ذائبة بكميات كبيرة تجعلها سامة للنبات.

واذا زاد pH عن (8) فإنه يحدث الآتى:

1 – يزداد تصلب الآجار.

2 – ترسيب أملاح الفوسفات والحديد فيقل الإستفادة منها.

3 – صعوبة نمو الجذور في بيئة الآجار المتصلب.

4 – تتأثر الهرمونات ومنظمات النمو الموجودة في البيئة.

5 – يقل درجة تيسر النحاس والحديد والمنجنيز والزنك فلايستفيد منها النباتات.

6 – يزيد درجة تيسر المولبدنيم فيصبح سام للنباتات.

إعداد البيئات Media Preparation

إعداد البيئات الغذائية في مجال زراعة الأنسجة قد يكون من أكثر العناصر استهلاكاً للوقت. ولذلك توجد في الأسواق الآن بيئات غذائية جاهزة على صورة مخلوط جاف من العناصر الكبرى والصغرى أو بقية المكونات الأخرى. وأبسط هذه الطرق أن تذاب هذه الكمية في كمية من الماء. يذاب السكر والآگار في كمية أخرى من الماء مع إجراء عملية إذابة ساخنة للآگار ثم تضاف بعض المكونات العضوية الأخرى مثل الفيتامينات ومنظمات النمو ثم تضاف الكميات معاً وتكمل إلى 1 لتر ويقدر الأس الهيدروجيني قبل ذلك ثم يجرى لها عملية التعقيم. على العموم تستخدم البيئات السابقة التجهيز في عملية الإكثار الخضري عن طريق زراعة الأنسجة ولكن في حالة التجارب العلمية يفضل تحضير البيئات في المعمل من مخاليط الأملاح على أن يوزن كل ملح على حدة ثم يذاب في كمية من الماء ثم تجرى إذابة جميع العناصر المطلوب إضافتها في التجربة حسب نوع الوسط الغذائي المستخدم وهذه عملية صعبة جداً. ولقد وجد بديل لهذه العملية على أن تحضر محاليل مُركزة (Stocks) بكميات كبيرة من هذه المحاليل والعناصر بكميات مضاعفة ثم عند إعداد البيئة نأخذ من هذه المحاليل الكميات اللازمة لإعداد الوسط الغذائي.

الطرق التقنية في الزراعة Culture Techniques

اقتبست الطرق التقنية في استئصال وزراعة الانسجة والخلايا النباتية من الطرق المستخدمة في زراعة الاحياء المجهرية. واحدث الطرق لزراعة الخلايا النباتية تكون مشابهه في تفاصيلها مع تلك التي تستخدم في زراعة الاحياء المجهرية.

الاوساط الغذائية الصلبة Solid Media

ان الاسلوب التقني الاولي الذي استخدم في زراعة الخلايا النباتية اعتمد على اوساط غذائية صلبة لاحتوائها على الاگر agar او الجيلاتين لجعل الوسط الغذائي صلبا او ذو قوام هلامي. ومؤخرا استعمل انواع من الاكريل مايد acrylamide.

الاكَر * اكثر المواد شيوعا في جعل الوسط الغذائي ذو قوام هلامي صلب. * يضاف الى الوسط الغذائي بتركيز1% (وزن/حجم). * وهنالك انواع عديدة من الاكَر لكن افضلها هو Difco Nobel حيث يعتبر هذا النوع من انقى الانواع.

اما الانواع الاخرى فيمكن استعمالها في العمل الروتيني الاعتيادي على الرغم من احتمال وجود بعض الشوائب فيها الا انها غير مؤثرة في الوسط الغذائي. ويمكن استخدام طرق مختبرية عديدة لتنقية مادة الاكر.

الجيلاتين * من المواد غير شائعة الاستعمال في اعطاء القوام الهلامي للوسط الغذائي، * ويستخدم بمعدل 1% (وزن/حجم). كما انه يمكن استخدام مادة اخرى تسمى Biogels لإعطاء القوام الهلامي للوسط الغذائي.

محدودية استخدام الاوساط الصلبة في البحوث واللجوء الى الاوساط السائلة لأسباب ومنها

(1) محدودية الاستفادة من الوسط الغذائي الصلب فعند زراعة الكالس او اي جزء نباتي في وسط غذائي صلب فان الجزء النباتي الملامس لسطح الوسط الغذائي هو الذي يستفاد من مكونات الوسط الغذائي دون الاجزاء الاخرى.

ان ذلك يؤدي الى عدم التكافؤ في الاستفادة من مكونات الوسط من قبل الجزء النباتي او الكالس ككل مما يؤدي الى عدم تكون منطقة انتقال لمحتويات الوسط بين الوسط الغذائي والجزء غير الملامس له.

(2) انغمار قاعدة الجزء النباتي في الوسط الغذائي الصلب يؤدي الى حدوث انحسار في تبادل الغازات.

(3) وفي حالة الكالس تظهر ظاهرة الاستقطاب Polarization بفعل الجذب الارضي اضافة الى اختلاف التعرض للضوء.

(4) صعوبة نقل الاجزاء النباتية المزروعة في الوسط الصلب الى وسط غذائي سائل دون احداث بعض الاضرار ولو انها بسيطة للأنسجة المراد نقلها

(5) صعوبة القيام بقياس ابعاد الجزء النباتي المزروع حيث يتطلب ذلك غمر ادوات القياس في الوسط الغذائي الصلب.
(6) اما قياس سرعة او معدل التنفس بطريقة Warburg او بطريقة Pulse-chase فهي الاخرى لا يمكن القيام بها في الاوساط الغذائية الصلبة.

الاوساط الغذائية السائلة غير المتحركة Stationary Liquid Media

ان زراعة الانسجة النباتية في اوساط غذائية سائلة غير متحركة Unshaken لها فوائد للوسط الغذائي الصلب، بل وتمتاز بان ما يُحدث من تأثيرات متداخلة لمكونات الوسط الغذائي الصلب لا يحدث في الوسط الغذائي السائل غير المتحرك (الثابت).

الطريقة تتطلب ورقة ترشيح عديم الرماد تستخدم لتثبيت الاجزاء النباتية على السطح العلوي من سطح الوسط الغذائي السائل مع مراعاة وجود فسحة هوائية في انبوب او دورق الزراعة. * يعمل ورق الترشيح على ايصال العناصر الغذائية من الوسط الغذائي الى الجزء النباتي من جهة وعلى بقاء الجزء النباتي في الهواء من جهة اخرى.

الاوساط الغذائية السائلة المتحركة Agitated Liquid Media

ان زراعة الاجزاء النباتية في الاوساط الغذائية السائلة المتحركة يقضي على غالبية النقاط السلبية التي ترافق زراعة الاجزاء النباتية في الاوساط الغذائية السائلة غير المتحركة. حيث تصبح الاجزاء النباتية بتماس مع الوسط الغذائي السائل

المميزات

(1) تبادل الغازات (2)القضاء على ظاهرة الاستقطاب للأجزاء النباتية بفعل الجاذبية الارضية (3) القضاء على ظاهرة نقص بعض العناصر في الوسط الغذائي او التي قد تظهر على الاجزاء النباتية نتيجة لتجمعها وعدم انتشارها. (4) امكانية استخدامه لزراعة الاجزاء النباتية في التجارب التي تستخدم فيها العناصر المشعة.

مكونات الوسط الغذائي المستخدم في الزراعة النسيجية :-

المكونات اللاعضوية تشمل :

أ- العناصر الكبرى : تحتاجها كل النباتات لذلك لابد من إضافتها فى بيئة زراعة الأنسجة النباتية وعددها سبع عناصر وهى:

1- النيتروجين (N) : يؤثر على معدل نمو النبات وضروري لتكوين الكلوروفيل والقلويدات والأحماض النووية nuclic acids وهرمونات النمو والأحماض الأمينية amino acids .

2- الفسفور (P) : ويتركز فى الأجزاء المرستيمية إلا أن دوره غير معروف بالضبط ويرجح أن له دور فى تنشيط الإنزيمات . يستخدم فى بيئات زراعة الأنسجة في صورة فوسفات البوتاسيوم (KH2PO4) أو فوسفات الصوديوم .

3- البوتاسيوم (K) : ضرورى للإنقسام الطبيعى للخلية وتكوين الكربوهيدرات والبروتينات. يضاف فى البيئة على هيئة نترات بوتاسيوم KNO3 أو فوسفات بوتاسيوم KH2PO4 ،

4- الكبريت (S) : يوجد في بعض جزيئات البروتين . يشجع النمو الجذرى والخضرى . يضاف فى بيئة الزراعة في صورة سلفات (SO4).

5- الكالسيوم (Ca) : يلعب دور فى نفاذية الجدار الخلوى ويسهل حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية خلال النبات كما أنه يشجع نمو الجذور. يضاف فى البيئة فى صورة كلوريد الكالسيوم CaCl2 .

6- المغنسيوم (Mg) : يعتبر العنصر المركزى فى جزئ الكلوروفيل . هام جدا كمنشط إنزيمى . نقصه يسبب شحوب الأوراق . يضاف إلى البيئة فى صورة كبريتات المغنسيوم Mg SO4 .

7- الحديد (Fe) : يدخل فى تخليق الكلوروفيل ويشارك فى عملية التمثيل الضوئى والتنفس. نقصه يسبب إصفرار وشحوب الأوراق .

ب- العناصر الصغرى: بالإضافة إلى العناصر الكبرى هناك عناصر ضرورية يحتاجها النبات ولكن بكميات ضئيلة جدا قد تكون سامة للنبات إذا أضيفت بكميات زائدة عن المطلوب .

1- البورون Boron يضاف البورون (B) لبيئة زراعة الأنسجة بكميات صغيرة منBoric acid حامض البوريك 3 . H3BO

2- موليبدم Molybdenum ضرورى للنمو الطبيعى للنبات ويضاف (Mo) لبيئة الزراعة فى صورة Sodium molybdate موليبدات صوديم Na2MoO4.2H2O .

3- المنجنيز Manganese يضاف فى صورة سلفات المنجنيز Mn SO4 .

4- الكوبالت Co يضاف لمعظم أنواع البيئات بكمية لاتتجاوز 25 من الألف مليجرام للتر في صورة كلوريد الكوبالت 2 CoCl .

5- زنك Zn يضاف فى صورة كبريتات الزنك Zn SO4 .

6- نحاس Cu يعتبر إضافة 25 من الألف ملليجرام لكل لتر بيئة فى صورة كبريتات النحاس CuSO45H2O كافيا لإمداد الجزء النباتي المزروع من عنصر النحاس .

7- كلور Cl يضاف فى صورة كلوريد الكالسيوم CaCl2 لمعظم أنواع البيئات .

8- يود Iodine يضاف للبيئة في صورة أيوديد البوتاسيوم (KI) .

الطرق الرئيسية للتعقيم داخل مختبرات زراعة الأنسجة :

1- التعقيم الحراري الجاف :- (Dry heat Sterilization)

تستخدم هذه الطريقة لتعقيم الأدوات الزجاجية والأواني المعدنية المصنوعة من الحديد غير القابل للصدأ والمواد الأخرى التي لا تتضرر بدرجات الحرارة المرتفعة يستعمل لهذا الغرض أفران التجفيف الاعتيادية والتي تعمل بالغاز أو الكهرباء . يتم التعقيم على درجة حرارة 160 م لمدة أربع ساعات ، ويجب لف الأدوات والأوعية المراد تعقيمها بورق ألمنيوم ثم توضع في فرن التعقيم .

2- التعقيم الحراري الرطب :wet heat sterilization

يستعمل جهاز التعقيم (Autoclave) والذي يعمل بوجود بخار الماء وضغط مناسب . يتم التعقيم على درجة حرارة 121م وضغط مقداره 1.04 كغم / سم^2 لمدة 20 دقيقة ، يجب أن يبدأ التوقيت بعد أن تصل درجة الحرارة داخل الجهاز الى 121 م وبعد انتهاء فترة التعقيم يجب أن يترك الجهاز بحيث يعود الضغط إلى المستوى الاعتيادي حيث أن التخفيف المفاجئ للضغط يؤدي إلى غليان السائل وخروجه من الوعاء الموجود فيه .

3- التعقيم بأشعة كَاما :Sterilization with gamma rays

تعتمد على قابلية الأشعة الكهرومغناطيسية على قتل الأحياء المجهرية والدقيقة وبدا التعقيم بالإشعاع وخاصة للمواد المصنوعة من البلاستيك .

4- التعقيم باستعمال المواد الكيمياوية : (تعقيم الجزء النباتي)

أي إزالة الكائنات الدقيقة كافة والتي تنمو على السطح الخارجي للجزء النباتي المستخدم في زراعة الأنسجة كالبكتريا والفطريات وغيرها وتشمل عملية التعقيم السطحي :

1- غسل الجزء النباتي بالماء والصابون السائل لعدة مرات لإزالة الأتربة والأوساخ العالقة به .

2- الغسل بالماء المقطر والمعقم عدة مرات ثم إضافة مواد التعقيم وهي :

(هايبوكلورات الصوديوم ، هايبوكلورات الكالسيوم ، كلوريد الزئبق ، كحول اثيلي ، بيروكسيد الهيدروجين ، ماء البروم) .

وعموما الوقت اللازم للتعقيم يتناسب عكسيا مع تركيز المادة المستخدمة للتعقيم ويفضل استخدام تركيز قليل من المادة الفعالة ولمدة زمنية أطول ولزيادة كفاءة التعقيم يمكن استخدام جهاز خلخلة الضغط وذلك لزيادة اختراق مواد التعقيم الى داخل الجزء النباتي فتزداد بذلك كفاءة التعقيم .

أما إذا كان الجزء النباتي ملوث بأحياء مجهرية فهناك عدة طرق للقضاء على مثل هذه الملوثات منها :

1- المعاملة بالحرارة : يعامل الجزء النباتي بالحرارة قبل استئصاله حيث يتم حفظ النبات بدرجة حرارة 34-40 م لعدة أيام وهذه الطريقة فعالة للقضاء على البكتريا والفطريات وبعض الرواشح .

2- وضع النبات في الظلام : قبل استئصال الجزء المراد زراعته حيث أنها تسبب زيادة استطالة النبات وان السرعة في النمو تنجي القمة النامية من الإصابة بالمسبب المرضي .

3- استخدام المضادات الحيوية : مثل الجنتامايسين والامبيسيلين .

4- استخدام نباتات ناتجة من الزراعة النسيجية .

تعقيم الزجاجيات والمواد البلاستيكية :

يمكن أن تعقم الزجاجيات والمواد البلاستيكية بعدة طرق من أهمها :

1- التعقيم بالبخار بواسطة الاوتوكليف (Autoclave) على درجة حرارة 121 م .

2- التعقيم الجاف بالفرن على درجة حرارة 160 م لمدة 2 – 4 ساعات للزجاجيات .

3- استخدام اللهب عند فتح فوهة وعاء الزراعة .

4- الكحول الاثيلي تركيز 70 % .

5- اوكسيد الاثيلين تركيز 1.5 غم / لتر .

6- استخدام هايبوكلورات الصوديوم .

يغسل الجزء النباتي المستعمل تحت تيار من ماء الحنفية لمدة ساعة أو أكثر وهذه تقلل من نسب التلوث إلي درجة كبيرة وإذا كان السطح الخارجي مغطى بطبقة شمعية فإن غسيل الجزء المنفصل بإحدى مساحيق الغسيل يساعد على جعل السطح الخارجي أكثر قابلية للبلل.

1) يوضع في كحول إيثانول 70 % لمدة نصف إلى واحد دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر.

2) يوضع في هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوروكس) 5 - 20 % لمدة ثلث ساعة مع الرج والتقليب المستمر .

3) يغسل بالماء المقطر المعقم 4-5 مرات للتخلص من آثار المادة المعقمة وبعدها يصبح الجزء النباتي قابل للزراعة .

اعداد بيئة زراعة الأنسجة النباتية

اسم البيئة المستخدمة في الزراعة :

بيئة MS : تستخدم لنمو المجموع الخضري والجذري .

خطوات اعداد البيئة (الوسط الغذائي) :

* يتم وزن 4.43 غرام من بيئة MS.
* نذوبها في 1 لتر من الماء المقطر بواسطة جهاز التقليب.
* نضيف الهرمونات التالية :

mL 0.5 = 2.4-D

- mL 2.5 = N.A.A

- mL 0.5 = Kientine

* نضيف 7 غرام من الآجار .
* نضيف 30 غرام 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.

هناك عدة طرق لتعقيم الوسط الغذائي :-

بما أن الوسط الغذائي يحتوي على معظم المواد الغذائية اللازمة لنمو الأحياء المجهرية الدقيقة لذلك يجب تعقيم الوسط الغذائي قبل الزراعة وهناك عدة طرق منها :-

1- التعقيم بالبخار(التعقيم الحراري الرطب) :- من أكثر الطرق المستخدمة لتعقيم الأوساط الغذائية في جهاز الاوتوكليف حيث يوضع الوسط الغذائي في دورق ثم يوضع في الجهاز على درجة حرارة 121م وضغط 1.5 كغم/سم^2

ويجب تحديد الفترة الزمنية لأنها إذا كانت قليلة فسوف لن تقضي على جميع الأحياء المجهرية كما يجب تجنب التعقيم لفترات طويلة لأنه يؤدي الى تحطم المركبات الكيمياوية الموجودة في وسط الزراعة وتحلل بعض مكونات الوسط الغذائي مما يعرضها للفقد أو التكسير بكميات كبيرة وتتراوح فترة تعقيم الوسط 15 – 20 دقيقة وقد تصل الى نصف ساعة حسب الكمية المراد تعقيمها. مما يسمح بالقضاء على الملوثات

ومن مميزات التعقيم بالبخار :-

السرعة – البساطة - القضاء على الملوثات خاصة الفيروسات

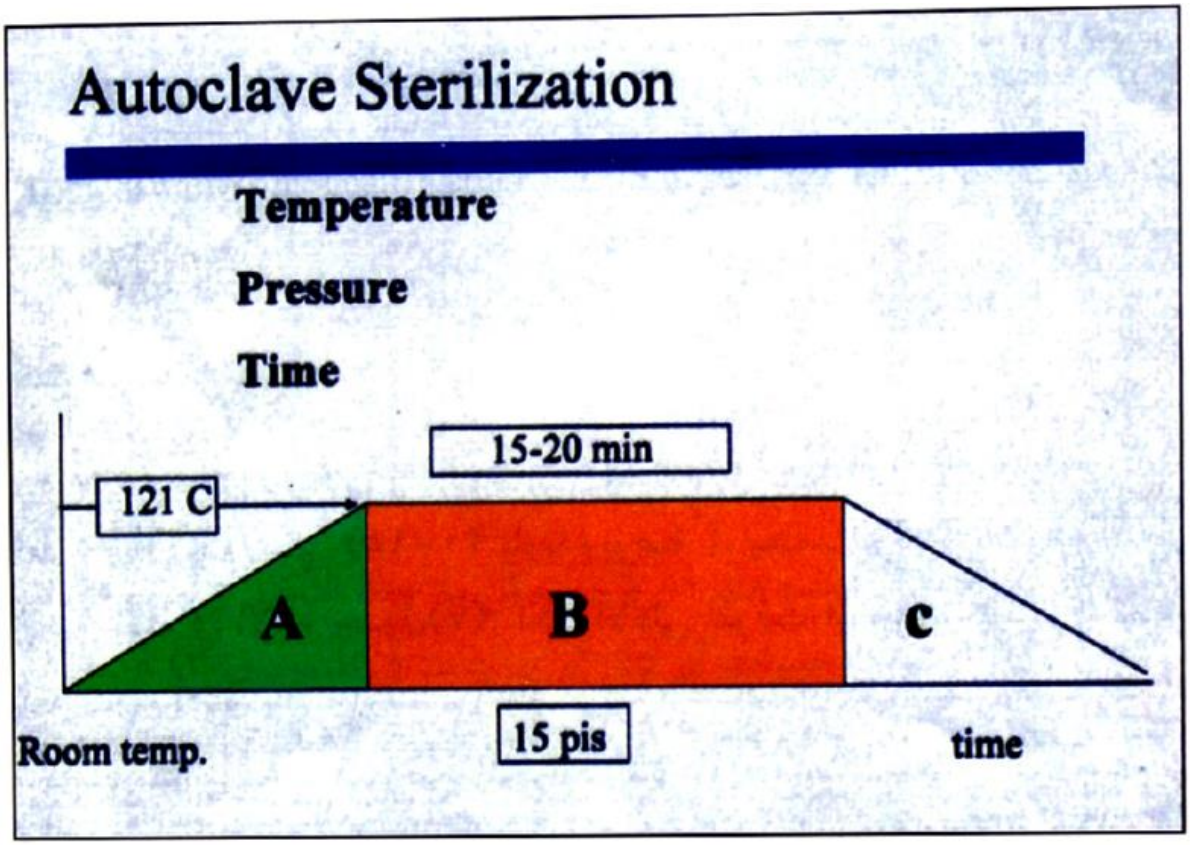
أما عيوبه فهي :-.

* 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



شكل يوضح عناصر التعقيم الأساسية باستخدام الأوتوكلاف في تعقيم البيئات

A: فترة ارتفاع الضغط ودرجة الحرارة

B: فترة التعقيم الفعلية تحت درجة الحرارة والضغط

C: فترة الانتهاء من التعقيم

2- التعقيم البارد Cold sterilization (عن طريق الترشيح) : هناك مركبات تتأثر بالحرارة العالية مثل الجبرلين وحامض الابسيسك أسيد والزياتين وبعض منظمات النمو الأخرى والفيتامينات ومضادات الاكسدة والتي لا يمكن تعقيمها بالحرارة لذلك ترشح بواسطة مرشحات دقيقة ذات قطر 0.22 – 0.45 مايكرون ثم يتم اضافتها على البيئة الصلبة بعد تسخينها وتعقيمها عندما تكون على درجة حرارة من 37-40 م، 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 Radiation sterilization :-

يمكن استخدام بعض الإشعاعات في تعقيم الوسط الغذائي بالرغم من خطورته ولا ينصح باستخدام إلا 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 كَاما التي تستخدم في تعقيم البيئات والأوعية البلاستكية والأنابيب ..... الخ، أما على كابينة الزراعة (الهود) فيستخدم لمبة الأشعة فوق البنفسجية (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 الكيمياويات.

2 - تعقيم الأدوات المستخدمة لتجنب التلوث.

3- حفظ بعض المحاليل كالحديد في زجاجيات بنية اللون منعا لتحليلها .

4 -تحضير الهرمونات النباتية والفيتامينات وأملاح المعادن الصغرى و حفظها 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 للتمكن من وزن المعادن ذات الأوزان الصغيرة جداً.

7 يراعي استخدام بلاستك ناعم أو كأس زجاجي للوزن فيه وعدم استخدام أور اق حتى تكون ملساء و يتم 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 الأكَار 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 و يتم 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 .

Mini *Incu*-Shaker

جهاز Shaker

جهاز تقليب الاوساط السائلة بصورة منتظمة ووقت منظم

جداول توضح الستوكات وكمياتها بالإضافة الى جداول منظمات النمو وتراكيبها وأنواعها والتراكيز المستخدمة منها

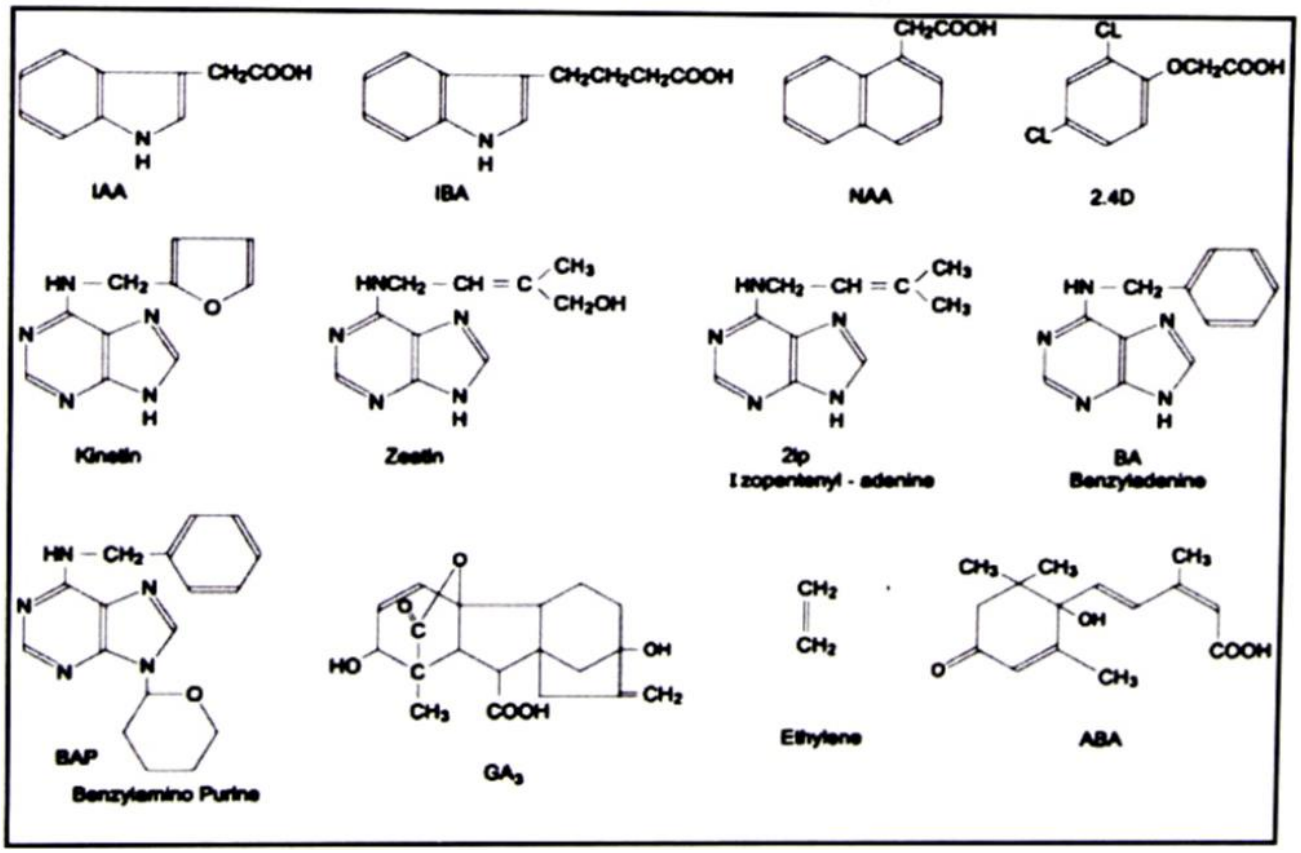
(للإطلاع)

Check List for 1 liter of medium:

Stock solution A	20 ml
Stock solution B	20 ml
Stock solution C	5 ml
Stock solution D	5 ml
Stock solution' E	5 ml
Stock solution F	5 ml
Stock solution G	5 ml

Stock solution	Constituents	(g/liter)	to make up 1 liter of MS medium
A	NH_4NO_3	82.5	20
B	KNO_3	95.0	20
C	H_3BO_3	1.24	5
	KH_2PO_4	34.0	
	KI	0.166	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.05	
	$CoC_{l2}.6H_2O$	0.005	
D	$CaC_{l2}.2H_2O$	88.00	5
E	$MgSO_4.7H_2O$	74.00	5
	$MnSO_4.4H_2O$	4.46	
	$ZnSO_4.7H_2O$	1.72	
	$CuSO_4.5H_2O$	0.005	
F(*)	Na_2.EDTA	7.45	5
	$FeSO_4.7H_2$	5.57	
G	Thiamin HCl	0.2(**)	5
	Nicotinic acid	0.1	
	Pyridoxine. HCl	0.1	
	Glycine	0.4	

البيئة الغذائية	الضغط الأسموزي (بار)
White (للأملاح)	٠,٤٣
White (للسكر)	١,٤٦
Heberlandt (للأملاح)	٠,٦٧
Heberlandt (للسكر)	١,٤٦
Heller (للأملاح)	٠,٩٦
Heller (للسكر)	٤,٠٥
Murashige and Skoog (للأملاح)	٢,٢٧
Murashige and Skoog (للسكر)	٢,٢٠



جدول رقم (1) تركيب الاوكسينات المختلفة

Product Name	Molar Equivalence		Solution Preparation					
	Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz-ation*	Working Conc. (mg/L)
p-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)	186.6	5.36	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	221	4.53	—	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Sodium salt	243	4.12	Water	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	175.2	5.71	EtOH/1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid Sodium salt	197.2	5.07	Water	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid methyl ester	189.2	5.29	—	—	2-8°C	2-8°C	—	—
Indole-3-acetyl-L-aspartic acid	290.3	3.45	0.5N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
Indole-3-butyric acid (IBA)	203.2	4.90	EtOH/1N NaOH	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Indole-3-butyric acid Potassium salt (K-IBA)	241.3	4.14	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
alpha-Naphthaleneacetic acid Free acid (NAA)	186.2	5.37	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
beta-Naphthoxyacetic acid Free acid (NOA)	202.2	4.95	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
Phenylacetic acid (PAA)	136.2	7.34	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-50.0
Picloram	241.5	4.14	DMSO	—	RT	2-8°C	CA	0.01-10.0
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	255.5	3.91	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.01-5.0
2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid (TIBA)	499.8	2.00	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.05-5.0

***CA** = coautoclavable with other media components. **F** = filter sterlize. **CA/F** = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.

جدول رقم (2) تركيب السيتوكينينات المختلفة

Product Name	Molar Equivalence		Solution Preparation					
	Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz-ation*	Working Conc. (mg/L)
Adenine Free base	135.1	7.40	1.0 HCl	Water	RT	2-8°C	CA	50-250
Adenine hemisulfate Hemisulfate salt	184.2	5.43	Water	—	RT	2-8°C	CA	50-250
6-Benzylaminopurine (BA)	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine Hydrochloride	261.7	3.82	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine (BA)	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (BPA)	309.4	3.23	EtOH	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU)	247.7	4.04	DMSO	—	2-8°C	2-8°C	F	0.001-1.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
1,3-Diphenylurea (DPU)	212.3	4.71	DMSO	—	RT	2-8°C	F	0.1-1.0
Kinetin	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin Hydrochloride	251.7	3.97	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea	220.2	4.54	DMSO	—	RT	2-8°C	CA/F	0.001-0.05
trans-Zeatin Free base	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Zeatin	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin Hydrochloride	255.7	3.91	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin riboside	351.4	2.85	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0

***CA** = coautoclavable with other media components. **F** = filter sterlize. **CA/F** = coautoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.

جدول رقم (3) تركيب بعضي منظمات النمو الأخرى

Product Name	Molar Equivalence		Solution Preparation					
	Mol. Wt.	µM for 1mg/L	Solvent	Diluent	Powder Storage	Liquid Storage	Steriliz-ation*	Working Conc. (mg/L)
(±)-cis,trans-Abscisic acid (ABA)	264.3	3.78	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Ancymidol	256.3	3.90	DMSO	—	2-8°C	-0°C	CA/F	1.0-10.0
Chlorocholine chloride (CCC)	158.1	6.33	Water	—	RT	2-8°C	F	up to 500
3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dicamba)	221.0	4.52	EtOH/Water	—	2-8°C	2-8°C	F	0.01-10.0
Gibberellic acid (GA_3)	346.4	2.89	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellic acid Potassium salt (K-GA_3)	384.5	2.60	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellin A_4 Free acid (GA_4)	332.4	3.01	EtOH	—	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
(±)-Jasmonic acid	210.3	4.76	EtOH	—	2-8°C	-0°C	F	0.01-100.0
Phloroglucinol	126.1	7.93	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	up to 162
N-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate)	169.1	5.91	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	F	—
Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide	160.2	6.24	Water	—	2-8°C	2-8°C	CA/F	0.1-10.0

*CA = co-autoclavable with other media components. F = filter sterilize. CA/F = co autoclavable with other media components, however, some loss of activity may occur. This can be compensated for by increasing component concentration. Component may be filter sterilized.