زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :-

(Plant Cell and Tissue Culture)

يعتبر علم زراعة الخلايا والأنسجة النباتية (Plant Cell and tissue culture) من المجالات الحديثة الهامة المنتمية حديثا لعلم الوراثة وهو مجال تطبيقي سوف يحدث ثورة في مجال الزراعة حيث يهتم بتنمية أجزاء صغيرة من الأنسجة النباتية (Explant) يتراوح حجمها تقريبا بين عدة مليمات الى ما يقرب البوصة في الطول على عدد من البيئات الصناعية المعروفة المكونات وتحت ظروف بيئية متحكم فيها صناعيا ويتم هذا بغرض انقسام ونمو الخلايا وكذلك إعادة التشكل مرة أخرى في هذه الأنسجة لكي يتكون نمو من الخلايا (Callus) أو نبات كامل ثم يتم نقله وأقلمته للظروف البيئية الزراعية وبذلك يعطي بعض النباتات أو الأصناف ذات مميزات خاصة يستفاد منها استفادة كبيرة في مجال الزراعة .

وتعتبر الظروف البيئية التي يتعرض لها النسيج النباتي من أهم العوامل التي تؤثر على نجاح عملية الزراعة لهذه الأنسجة وهذه الظروف مثل الضوء (شدته - مدة التعرض له - موجاته) ودرجة الحرارة (هل هي ثابتة أو متغيرة حسب الليل والنهار) والرطوبة الملائمة التي لا تساعد على نموالكائنات الدقيقة وكذلك لا تساعد على سرعة جفاف البيئة . لقد أصبحت طريقة زراعة الخلايا و الأنسجة النباتية من الطرق الحديثة والهامة والمفيدة في مجال النبات وقد خرجت هذه الطريقة من دائرة الأبحاث الى دائرة التطبيق العملي ومن الحيز الضيق الى الأفق الأوسع وهو المجال التجاري .

فهذه الطريقة (التكنيك) تستخدم أساسا في الإكثار السريع للنباتات و ذلك للحصول على أكبر عدد ممكن من النباتات لا يمكن تحقيقه بأي طريقة من طرق التكاثر التقليدية و ذلك في أي وقت من السنة و في أقل وقت وأقل حيز ممكن ، ومن ثم يمكن إجراء عملية الخدمة بالنسبة للنباتات بسهولة ويسر . وقد مارس العلماء

Scanned by CamScanner

طريقة زراعة الخلايا والأنسجة في معامل خاصة تسمى معامل زراعة الأنسجة النباتية التي يجب أن يكون كل جزء فيها كامل النظافة والتعقيم وبه كل الأدوات والكيماويات والعمالة الفنية الماهرة والتي على درجة عالية من التدريب وكذلك باقي الإمكانيات المستخدمة لإنتاج النباتات من خلال زراعة الأنسجة . فعند زراعة جزء نباتي معقم على بيئة غذائية معقمة تحتوى على العناصر الغذائية التي يحتاجها النبات فإن هذه الخلية أو هذا الجزء الصغير من النبات ينمو ويتحول الى نبات كامل يطابق الأصل الذي أخذ منه ويكون الإنتاج بأعداد كبيرة والناتج من النبات الواحد يكون مجموعة النباتات تسمى سلالة ، والجينات في كل منها متشابهة ومطابقة للأصل ، هذا بخلاف التكاثر الجنسي الذي ينتج نباتات تختلف فيما بينها بدرجة أو بأخرى .

ولقد أستخدم هذا التكنيك منذ أكثر من نصف قرن من الزمان لإنتاج النباتات الخالية من الأمراض وخاصة الفيروسية وذلك بإستخدام تكنيك زراعة القمة المرستيمية بالإضافة الى إستخدام الحرارة أو الكيماويات لهذا الغرض . بجانب ما قام به العلماء في مجالات العلوم المختلفة، قام علماء تربية النبات باستنباط سلالات عالية الإنتاج ومقاومة للأمراض وأخرى تتحمل الملوحة والحرارة والجفاف باستخدام تكنيك زراعة الكالس . و تعد مزارع الأنسجة والخلايا والبروتوبلاست المرحلة الأولى والضرورية لتطبيق تقنية نقل الجينات المرغوبة الى المحاصيل الإقتصادية الهامة أو ما يعرف باسم الهندسة الوراثية .

ولقد أصبح في وقتنا الحاضر تكنيك زراعة الخلايا والأنسجة النباتية يستعمل بشكل روتيني و بنجاح فائق في مجالات كثيرة أخرى منها إنتاج الأجنة الجسدية و البذور المصنعة و كذا إنتاج النباتات الأحادية من المتك أو حبوب اللقاح وهذه هامة ومفيدة في مجال تربية النباتات وإنتاج نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية وذلك بزراعة الإندوسبرم على بيئات غذائية خاصة وهذه لها أهمية لمربى النبات . كما أن زراعة الأجنة الزيجوتية قبل أن تموت في مراحلها المبكرة فيما يطلق علية تكنيك إنقاذ وزراعة الأجنة وهذا يؤدى إلى المحافظة على مثل هذه الأنواع من التهجينات

Scanned by CamScanner

المتباعدة . وكذلك تم إنتاج ودمج بروتوبلاست من نوعين نباتين مختلفين لإنتاج هجين جديد (هجن جسدية) قد يكون عالي الإنتاجية أو مقاوم للأمراض يصعب الحصول عليه في الطبيعة أو بالطرق التقليدية للتهجين لوجود عديد من العوامل المانعة وغيرها .

وأيضا استخدمت تقنية زراعة الأنسجة والكالوسات ومعلقات الخلايا في الحصول على العديد من المركبات الكيماوية (الصيدلية) الهامة التي تستخدم في تركيب العديد من الأدوية الهامة والتي تستخدم في علاج كثير من الأمراض. ويعتبر تكنيك زراعة الأنسجة النباتية من الطرق الهامة لحفظ الأصول الوراثية حتى يكون تحت يد المربى السلالات والأصناف والأنواع (كبنك للجينات) والتي قد يحتاج إليها المربى في برامج التربية قبل أن تندهور أو تنقرض نتيجة تعرضها لظروف غير مناسبة.

مقدمة تاريخية :-

ان تطور علم زراعة الأنسجة يرتبط إرتباطاً وثيقاً مع ظهور نظرية الخلق فمنذ حوالي 250 عاماً أشار العالم Duhamel du Monceau's (1756) أحد الرواد في علم النبات الى مقدرة شجرة الدردار (Elm) على تكوين كالس على المناطق المجروحة بالساق وتلك الدراسة تعتبر بداية علم زراعة الأنسجة حسب ما ذكره العالم Gautheret (1985) . والجزء الأخر من بداية علم زراعة الأنسجة يعزى الى إكتشاف مقدرة الخلية النباتية على النمو والتكشف وتكوين نبات جديد ﴿ Totipotency ﴾ والتي توضح أن الخلية الواحدة قادرة على الإنقسام وتكوين العديد من الخلايا وكذلك الأعضاء . وأن تكون العديد من الخلايا والأعضاء من خلية واحدة هي خلية الزيجوت ليؤكد مقدرة هذه الخلايا على التكشف. ويضاف إلى ذلك مقدرة الخلايا الجرثومية لحبوب اللقاح على التكشف و تكوين نباتات كاملة و تفتقد الخلايا الحيوانية القدرة على التكشف وتكوين الأعضاء فعند زراعة خلية حيوانية فإنها تنقسم وتتكاثر وتكون بعض الخلايا أو أحد الأعضاء

Scanned by CamScanner

الذى أخذت منه وغالباً ما تفقد هذه الخلايا بعد فترة القدرة على الإنقسام لذلك يجب علينا أن نتفهم العلاقة بين الخلايا المختلفة للأعضاء المختلفة للكائن الحي .

قد يكون هناك العديد من العوامل التي تفرض سيطرتها على هذه الخلايا المتماثلة وراثيا للتكشف الى أعضاء وتراكيب وراثية مختلفة مورفولوجيا وهناك ملاحظة جديرة بالإهتمام قدمها العالم Vochting (1878) حيث إقترح أن القطبية (Polarity) هي التي تؤثر على تكشف الجزء النباتي ولقد وجد في تجربته الشهيرة على قطع من سوق النبات أن الأجزاء العلوية قادرة على إنتاج براعم خضرية وكذلك الأجزاء السفلية قادرة على إنتاج الجذور. هذا بالإضافة إلى أن تجارب التطعيم في الأشجار المختلفة التابعة لأجناس (Salix , Beta , Opuntia) أشارت إلى أن سلوك الطعم والأصل لا يتغير ولا يؤثر كل منهم على الأخر بواسطة الإلتصاق على الأقل من ناحية المحتوى الوراثي وذلك لأن المقدرة على التكشف هي صفة وراثية ولقد أضاف Wiesner (1884) أن قدرة الجزء النباتي أو الخلية على التكشف تخضع إلى النظام القطبي وأن حجم الجزء النباتي المستخدم قد يكون أحد العوامل المحددة للتكشف. ففي تجربة للعالم Rechinger (1893) عن طريق أخذ أجزاء من السيقان أو الجذور أو الأفرع ووضعها على تربة من رمل رطب أشار الى أن الأجزاء التي يزيد سمكها عن 20 ملم قادرة على إنتاج نباتات كاملة في حين أن التي يقل سمكها عن 1.5 ملم فشلت في النمو وهذه التجارب كانت الأساس الذي مهد لدراسة دور الزراعة المعملية لتفسير الأسس النظرية والتطبيقات العملية لعلم زراعة الأنسجة .

ومن التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة النباتية :-

1- **إكثار النباتات خضريا** :- استعملت زراعة الأنسجة النباتية خلال العشرين سنة الماضية في إكثار العديد من الأنواع النباتية المختلفة مثل بعض نباتات الزينة والظل ، أشجار وشجيرات الزينة . وبعض أنواع الفاكهة العصارية ، بعض

Scanned by CamScanner

محاصيل الخضر والتوابل ، أشجار الفاكهة والغابات على نطاق تجاري واسع نظرا لما تتمتع به هذه الطريقة من فوائد وخواص تميزها عن الطرق التقليدية للإكثار :

أ- إمكانية إنتاج أعداد كبيرة جدا من النباتات باستعمال جزء صغير من النبات الأم وخلال فترة قصيرة نسبيا .

ب - الإنتاج على مدار السنة بسبب سهولة السيطرة على الظروف البيئية في أماكن الإكثار .

ج - المحافظة على الصفات الوراثية للنبات المكثر .

د - تجنب التدهور الذي قد يصيب النباتات المكثرة بالطريقة الاعتيادية والتقليدية بسبب الإصابة بالأمراض المختلفة خاصة الأمراض الفايروسية .

هـ - الإكثار الخضري للنباتات التي يصعب إكثارها خضريا بالطرق التقليدية .

و - الاقتصاد في المساحة المخصصة للإكثار .

2- **وراثة وتحسين النبات** .

3- **إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفايروسية** .

4- **دراسة الأمراض النباتية المختلفة** .

5- **الحصول على المواد الثانوية من النباتات كالصناعات الدوائية وغيرها** .

6- **دراسة العمليات الحيوية في الأنسجة والخلايا النباتية** .

تعريف علم زراعة الأنسجة النباتية :-

يقصد بزراعة الأنسجة النباتية هو استخدام جزء من النبات قد يكون البذرة أو جزء من الجذر أو جزء من الساق أو جزء من الأوراق أو المتك أو حبوب اللقاح على بيئة مغذية غالبا ما تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى ومصدر للسكريات وغالبا ما يستخدم السكروز كبيئة مغذية وأحيانا تضاف بعض منظمات

Scanned by CamScanner

النمو مثل الاوكسينات لتشجع تكوين الجذورونموها والسايتوكاينينات لتشجيع التفريع ونمو الساق والهرمونات التي توجه النبات لتكوين نسيج الكالس .

أولا : مكونات مختبر زراعة الأنسجة النباتية :-

(Plant Tissue Culture Laboratory)

تجري زراعة الأنسجة النباتية تحت ظروف معقمة في معامل أو مختبرات خاصة تسمى (معامل أو مختبرات زراعة الأنسجة) ويجب أن تتوافر فيها شروط معينة وأن تجهز تجهيزا خاصا ويجب أن يكون المعمل خالي من جميع الكائنات الدقيقة الملوثة وأن يكون بعيدا عن الأماكن والطرق المتربة والتي يمكن أن تلوث المزارع والبيئات . إن إنشاء معمل لزراعة الأنسجة يعتمد في الأساس على نوعية وهدف الأبحاث والدراسات التي سوف تجرى داخل المعمل وكذلك الميزانية المعدة لإنشاء هذا العمل . بغض النظر عن نوع التقنية التي سوف تستخدم داخل المعمل إن كان الهدف منها على سبيل المثال إكثار النباتات أو إنتاج المركبات الثانوية أو إجراء تجارب التحسين الوراثي ونقل الجينات الهامة إلى النبات فلابد من توافر الركائز الأساسية للمعمل والتي تشتمل على ما يأتي:-

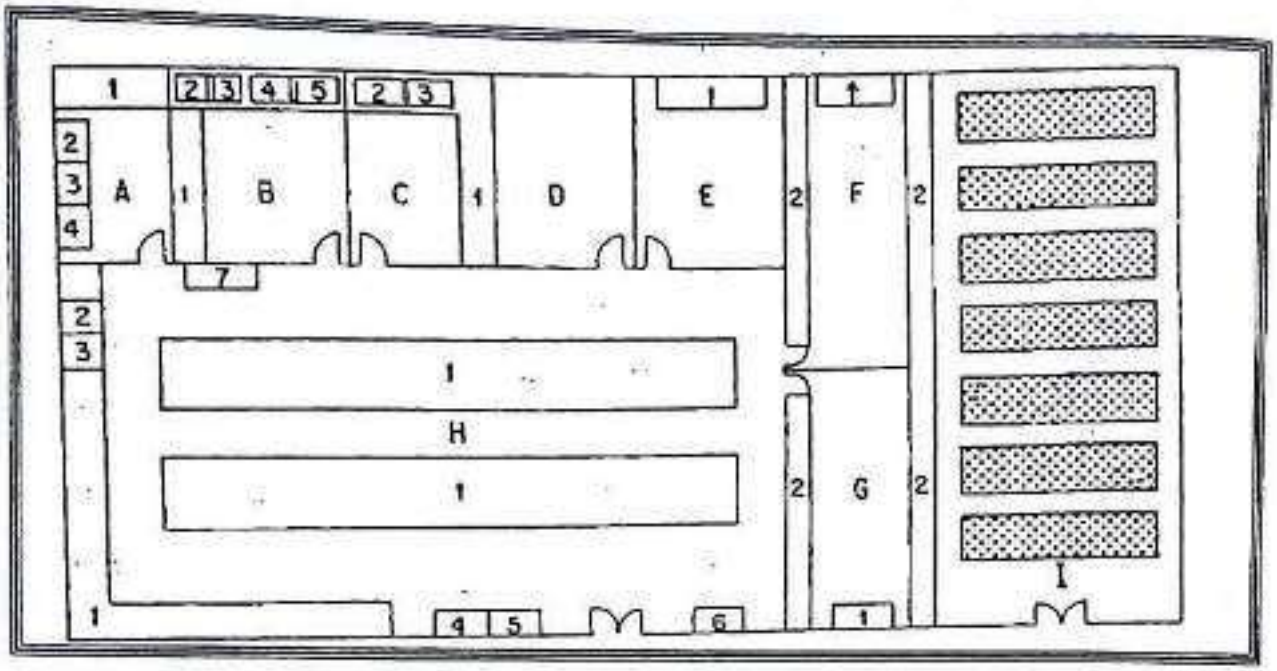
1- مكان للغسيل والتخزين .
2- مكان لإعداد البيئة وتعقيمها وتخزينها .
3- غرفة لإجراء عمليات التعقيم والزراعة .
4- غرفة للنمو مزودة بنظام للتحكم في الحرارة والضوء والرطوبة .
5- غرفة لإجراء عملية الملاحظة على النتائج .

ونستعرض هذه المكونات كالآتي:

1- **غرفة الغسيل ومخزن للأدوات** :- (Washing and Storage Room)

Scanned by CamScanner

يجب أن تشمل غرفة الغسيل مكان متسع به أحواض ذات صرف جيد مصنعة من الرصاص لمقاومة الأحماض والقلويات التي تستخدم داخل المعمل ومزودة بمصدر للمياه الساخنة والباردة فضلاً على وجود مناضد عمل يوضع عليها جهاز التقطير المزدوج (Duble distilled water). غسالة أطباق ،أحواض بلاستيكية وإستانلس لإجراء عملية النقع والشطف بها، مجفف هواني وفرش للغسيل ، يجب أن تكون الغرفة مزودة بجهاز شفط للأتربة لحماية الأدوات المغسولة من التلوث مرة أخرى . وسوف نقدم هنا احد الرسومات الهندسية لمعمل زراعة الأنسجة (شكل 1) .



شكل (1) رسم تخطيطي نموذجي لمعمل زراعة الأنسجة النباتية :

A- غرفة إعداد البيئات الغذائية والتعقيم 1- منضدة للمعمل 2- مكان جهاز التعقيم 3- حمام ماني 4- فرن للتعقيم الجاف

B- غرفة غسيل 1- منضدة معمل 2- حوض مزدوج للغسيل 3- مكان لمواد الغسيل وفرش الغسيل 4-مكان للتجفيف الهواني مثل الأرفف 5- مكان لفرن التجفيف.

C- غرفة مظلمة للتصوير 1- منضدة للعمل 2- ثلاجة وديب فريزر 3 - حوض للغسيل.

D-غرفة لتخزين الكيماويات والزجاجات.

E- غرفة الزراعة والنقل 1- الهود وهو جهاز منقى للهواء ويستخدم للزراعة وهو مزود بجهاز أشعة فوق بنفسجية تستخدم للتعقيم. Laminar-air flow cabinet

Scanned by CamScanner

F- غرف مزودة بنظام للتحكم في الحرارة والإضاءة وكذلك الفترة الضوئية . 1- جهاز رج 2- رفوف للزراعة .

G- المعمل الرئيسى مزود بكل من مناضد معمل ومكاتب 1- مكان للميكروسكوب 2-عدة موازين ومنها ما يقيس حتى (3-4 أرقام عشرية) 3- سخان ذو مغلب مغناطيسى 4- جهاز قياس الأس الأيدروجينى 5- مكان للأدوات المعملية 6- جهاز تقطير مياه مزدوج 7- مكان اتصال بين أ ، ب

H- مكان لعمليات الأقلمة والنقل خارج المعمل مزود بجهاز تحكم للحرارة والضوء والرطوبة .

مختبر زراعة الخلايا و الأنسجة النباتية :

مواصفات المختبر :-

أهم المواصفات التي يجب أخذها بنظر الاعتبار عند تأسيس و إنشاء مختبر زراعة الأنسجة والخلايا النباتية :

1. بعيد عن مصادر التلوث كالمصانع وأماكن حرق النفايات وغيرها .
2. أن يكون ذا تكييف مركزي لتجنب فتح الأبواب والشبابيك وعدم دخول الأتربة .
3. أن يكون أثاث المختبر من النوع الذي يسهل تنظيفه بصورة مستمرة .
4. أن يكون المختبر ذو مخازن كثيرة لاستخدامها في خزن أوعية الزراعة والزجاجيات .
5. يجب أن يتوفر في أي مختبر من مختبرات زراعة الأنسجة والخلايا النباتية ثلاثة أماكن منفصلة عن بعضها وذلك بسبب طبيعة العمل الذي ينجز فيها ويفضل أن تكون هذه الأماكن قريبة عن بعضها البعض ويسهل التنقل فيما بينها وأحيانا تكون متصلة ببعضها ما عدا غرفة التنمية التي تفصل بباب مستقل .

Scanned by CamScanner

وفيما يلي بعض الأدوات الموجودة في غرفة الغسيل ومخزن للأدوات :

أ - الأدوات الزجاجية :-

يجب أن تكون الأدوات الزجاجية من النوع المقاوم للحرارة (بايركس) ويكون أفضل إذا كانت غير قابلة للكسر أو الخدش. الطريقة المثلى لغسيل الأدوات الزجاجية عن طريق النقع في محلول Sodium dichromat-sulphoric acid الصوديوم داى كرومات حامض الكبريتيك لمدة 4 ساعات على الأقل ونظراً لخطورة حامض الكبريتيك على الجلد والعيون فإنه يستخدم الآن المحاليل المطهرة مثل (الكلوراكس) لمدة 16 ساعة نقع ثم تؤخذ الزجاجات وتشطف تحت ماء جارى من الصنبور ثم يعاد الشطف في ماء مقطر. إذا كان الغسيل ميكانيكياً في إحدى غسالات الأطباق فالأوعية الزجاجية تعامل بالمطهر على درجة 70 °م لمدة 5 - 10 دقائق . ولمزيد من النظافة تنقع في ماء ساخن لمدة 5 دقائق أخرى . ثم تشطف بواسطة ماء منزوع منه الأيونات المعدنية لمدة 3 دقائق ثم تشطف نهائياً بواسطة ماء مقطر. ولتجفيف الأدوات الزجاجة توضع الأوعية الزجاجية في فرن ذات درجات حرارة عالية أو أي مجفف هوائي ساخن وفي بعض الأحيان يوجد بعض من آجار البيئة ملتصق في بعض الأوعية فلا بد من إزالته بالماء الساخن أو وضعة في جهاز التعقيم لإجراء عملية سيولة للآجار قبل المعاملة بالمطهرات.

ب- الأدوات البلاستيكية :-

بدأ في الفترة الأخيرة استخدام العديد من الأدوات البلاستيكية في معامل زراعة الأنسجة تكون معقمة بالأشعة من إنتاج العديد من الشركات مثل (فالكون، كورننج ، نال جين ونال جية) وهذه الأدوات تكون الاستخدام مرة واحدة فقط ثم تعدم ولكن مع إرتفاع أسعار البلاستيك ظهر الإحتياج الى إنتاج أدوات بلاستيكية يمكن إستخدامها أكثر من مرة . هذه الأدوات يجب أن تشطف بواسطة أحد المطهرات متوسطة القوة وتنقع بعد ذلك في الماء الساخن ثم في الماء المقطر

Scanned by CamScanner

المعقم وتختلف الخطوات المستخدمة في الغسيل طبقاً لنوع وإستخدام الأدوات البلاستيكية ولكن تراعى الخطوات التالية لغسيلها:-

1- تشطف بإحدى المذيبات العضوية مثل الكحول - الأسيتون - الكلورفورم ولا تستخدم هذه مع البولى أكليرك) .

2- تغلي في محلول بيكربونات الصوديوم وهذه المعاملة لا ينصح باستخدامها مع الأدوات المصنعة من البولي إيثلين أو الأكليرك.

3- تنقع في محلول بيكربونات الصوديوم لمدة 4 ساعات على الأقل .

4- تنقع بعد ذلك في محلول حامض الهيدروكلوريك واحد عيارى لمدة 8 ساعات ثم في محلول حامض النتريك لمدة 3 ساعات أخرى ثم تشطف بعد ذلك بواسطة ماء مقطر ثم تجفف وتحفظ بعيداً عن الأتربة.

2- غرفة إعداد البيئات الغذائية (Media Preparation Room)

إن مكان إعداد البيئة الغذائية يجب أن يكون به الإستعدادات والفراغات اللازمة لتخزين الكيماويات و أدوات وأوعية الزراعة وكل الأدوات اللازمة لإعداد البيئة الغذائية مثل جهاز تسخين بمقلب - ميزان حساس - دوارق - كاسات - ماصات - جهاز قياس الأس الهيدروجيني pH حمام مائي - موقد بنزن مزودة بالغاز، فرن ميكروويف - جهاز تعقيم أوتوكلاف أو حلة طهي ذات ضغط عالي أو حلل عادية لطبخ وإعداد البيئة الغذائية وهناك أجهزة ضرورية مثل الثلاجات وجهاز رج - جهاز شفط أو تفريغ وذلك لتفريغ البيئة من الهواء - جهاز تجميد.

مكونات مختبر زراعة الأنسجة والخلايا النباتية :

1- مختبر التحضير : (Preparation laboratory)

تحضر فيه الأوساط الغذائية وكذلك تحضير النبات للزراعة وتقطيعه وإجراء التعقيم الأولي كما يتم غسل الأواني الزجاجية المستخدمة في الزراعة وإتلاف

Scanned by CamScanner

الزروعات القديمة والملوثة وتكون مساحة الغرفة أوسع من بقية الأماكن لتسهل حركة العاملين في المختبر .

أهم المستلزمات الواجب توفرها في مختبر التحضير :

أ- رفوف ومخازن كافية لخزن الزجاجيات والأجهزة المحدودة الاستخدام .

ب- مصادر الماء يجب توفرها ماء بارد و حار لاستخدامه في التنظيف والغسل كما يجب توفر أجهزة لتقطير الماء (Water distiller) وجهاز سحب الايونات من الماء (Water deionizer) . وهي تستخدم لتحضير الأوساط الغذائية .

ج - مغاسل ومصادر للغاز واخرى لخلخلة الضغط لإجراء عملية التعقيم السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة .

الجزء النباتي (Explant) : هو الجزء النباتي المستخدم في الزراعة النسيجية .

د- نقاط كهربائية متعددة ذات قوة 220 فولت لتشغيل الأجهزة الكهربائية المتعددة .

هـ- مناضد مختبرية لوضع الأجهزة المختبرية اللازمة لتحضير الأوساط الغذائية .

خزن المواد الكيميائية :

يتم وضع المواد الكيميائية في ظروف خاصة مع ملاحظة الظروف اللازمة لخزن هذه المواد مثلا الأملاح العضوية تخزن في درجة حرارة الغرفة ، منظمات النمو تخزن في ثلاجة بدرجة حرارة 4 م ، وقد يتطلب خزن محاليل أخرى على درجة حرارة (-20 م) لذلك يجب توفر ثلاجة ومجمدة في المختبر .

احتياجات تحضير الوسط الغذائي :

1- ميزان حساس .

2- جهاز قياس الأس الهيدروجيني : (Ph meter) .

3- حمام ماني .

4- خلاط لمزج الأوساط : (Mixer) وإذابتها مجهز بحرارة .

5- الاوتوكليف : (Autoclave) لتعقيم الأوساط الغذائية .

Scanned by CamScanner

6- دوارق حجمية وبيكرات وانابيب الزراعة وماصات واسطوانات مدرجة وتكون هذه الزجاجيات بأحجام مختلفة .

7- السيطرة على ظروف التكييف والتبريد مع ضرورة ترشيح الهواء المستخدم بـ (Filtration) وذلك للتخلص من أماكن الغبار .

8- نظام تهوية (Ventilation) جيد وذلك لتصريف روائح الكحول والأبخرة التي قد تنشا أثناء عملية الزراعة والتعقيم .

9- مصدر خلخلة الضغط لاستخدامه في منظومة التعقيم .

10- مغسل أو حوض لسكب السوائل المستخدمة في تعقيم الجزء النباتي .

11- مصادر للغاز والطاقة الكهربائية ومناضد لوضع الأجهزة المستخدمة بغرفة النقل .

2- غرفة النقل : Transfer room

غرفة الزراعة :- **Culture Room**

يمكن إجراء تقنيات زراعة الأنسجة بنجاح في مكان نظيف وجاف عند إتخاذ جميع الإحتياطات اللازمة لمنع دخول أى ملوثات الى الأدوات المستخدمة في الزراعة. إن أبسط الطرق في معامل زراعة الأنسجة هو إستخدام صندوق بلاستيك مغلق ومطهر جيداً بواسطة إستخدام الأشعة فوق البنفسجية . على أن تطهر أرضية الصندوق باستخدام كحول إيثانول 95 % وأيضاً يمكن إستخدام صندوق خشبي أو ما يطلق عليه (الهود) وله باب أمان من البلاستيك أو الزجاج يمكن فتحه وقفله ويجب أن يكون الباب مزود بمانعة للأتربة ستارة هوائية. ولأداء العمل داخل الهود يقوم الأخصائي بإدخال يديه داخل الهود ويؤدى العمل المطلوب منه مع مراعاة تعقيم يديه بالكحول قبل إدخالها الى مكان العمل داخل الهود وبطبيعة الحال فانه من الباب الزجاجي يمكنه مشاهدة ما يجريه داخل الهود . ويمكن إستخدام الهود في العمليات القليلة ولكن له سعة محدودة . وعند تقدم العمل في زراعة الأنسجة

Scanned by CamScanner

والاحتياج الى إجراء العديد من الأعمال داخل الهود ظهرت في الأسواق أنواع أخرى منه . أمكن إستخدام غرفة كبيرة معقمة بواسطة الـ UV بحيث يدخلها هواء منقى من الأتربة بواسطة مجموعة من الفلاتر مثل فلتر HEPA حيث تصل كفاءته من 99.97 الى 99 .99 % وهذه تقوم بعدم السماح للأتربة والكائنات الدقيقة بالنفاذ منه وهو يستخدم في معظم معامل زراعة الأنسجة وهو ما يطلق عليه (الهود) (Laminar air flow) وهو عبارة عن جهاز مزود بواسطة موتور صغير يدفع الهواء في أحد الفلاتر التي تحجز الأتربة العالقة الكبيرة الحجم ثم بعد ذلك يمر الهواء الى فلتر دقيق HEPA (ميكرون) µ 0.3 والهواء إما يدفع راسياً أو افقياً في منطقة العمل (الهواء القادم من منطقة الفلاتر يكون خالياً من الأتربة والبكتريا والفطريات) وسرعته حوالي 27 ± 3 م / دقيقة وهذه السرعة قادرة على إزاحة أي مصدر للتلوث الخارجي من أوراق او شعر أو أتربة عن منطقة العمل داخل الكابينة.

وهذا النوع من الكبائن متوفر بأسعار مختلفة وأحجام مختلفة يختار الباحث منها ما يناسب حجم العمل وسعة المكان الذي يعمل به وتيار الهواء داخل الكابينة لا يؤثر على موقد البنزين أو مصدر اللهب بها حيث السرعة المعتدلة للهواء المدفوع. وفي حالة المناطق الحارة والشبه حارة والجو الترابي ينصح باستخدام هذه الكابينة في غرف ذات أبواب مزدوجة وذلك لإطالة عمر الفلاتر وممنوع منعاً قاطعاً أن تواجه الكابينة باب أو شباك في الغرفة.

وكابينة زراعة الأنسجة النباتية (الهود) تستخدم كمكان معقم لزراعة الأنسجة والأعضاء النباتية في الأواني سواء (الزجاجية أو البلاستيكية المحتوية على البيئة المعقمة) ويجهز في الهود موقد بنزن أو موقد كحول ومشارط وملاقط معقمة وتحتوى كذلك حجرة الزراعة على ترولي وأسيتة لنقل الأواني الزجاجية التي زرعت إلي غرفة الحضانة ويوجد بابان لغرفة الزراعة أو ستارة هوائية للإقلال بقدر الإمكان من التلوث ويفضل الدخول في هذه الحجرة للأشخاص القائمين بالعمل فقط وذلك للإقلال من التلوث بقدر الإمكان .

Scanned by CamScanner

وفي هذه الحجرة يوجد بعض الحوامل الرأسية التي تحتوى على بعض الأرفف أو منضدة وذلك لوضع الأوعية المحتوية على البيئة والأوعية المحتوية على نباتات لإكثارها وكذلك الأوعية التي تحتوى على الماء المقطر المعقم الذي يستخدم في غسيل الأجزاء النباتية بعد عملية التعقيم في هايبوكلورات الصوديوم (الكلوروكس) أو كحول الإيثانول .

تعد هذه الغرفة من المرافق المهمة في مختبر زراعة الأنسجة والخلايا النباتية حيث يتم فيها استئصال الجزء المراد زراعته من النبات الأم ونقله إلى الوسط الغذائي وتحت ظروف معقمة .

ومن أهم الأجهزة التي توضع في هذه الغرفة :

1- منضدة التعقيم : (Laminar air flow cabinet) والتي تدفع هواء نقي خالي من الملوثات بعد مروره بعدة مرشحات ويتم بهذه المنضدة إجراء عمليات تعقيم النبات واستئصال الجزء المطلوب وزراعته على الأوساط الغذائية وتصميم هذه المنضدة بسيط جدا حيث تقوم مضخة صغيرة بدفع الهواء خلال مرشحات أسفنجية لمسك الجزيئات الكبيرة الحجم ويندفع باتجاه مرشحات دقيقة جدا لا تسمح بمرور الفطريات والبكتريا من خلاله وينصح بتشغيل المنضدة قبل 15 دقيقة قبل البدء العمل وينصح بتعقيم جو الغرفة بواسطة الأشعة فوق البنفسجية و تعزل الغرفة عن المحيط الخارجي وذلك باستعمال بابين متتاليين لضمان المحافظة على ظروف التعقيم .

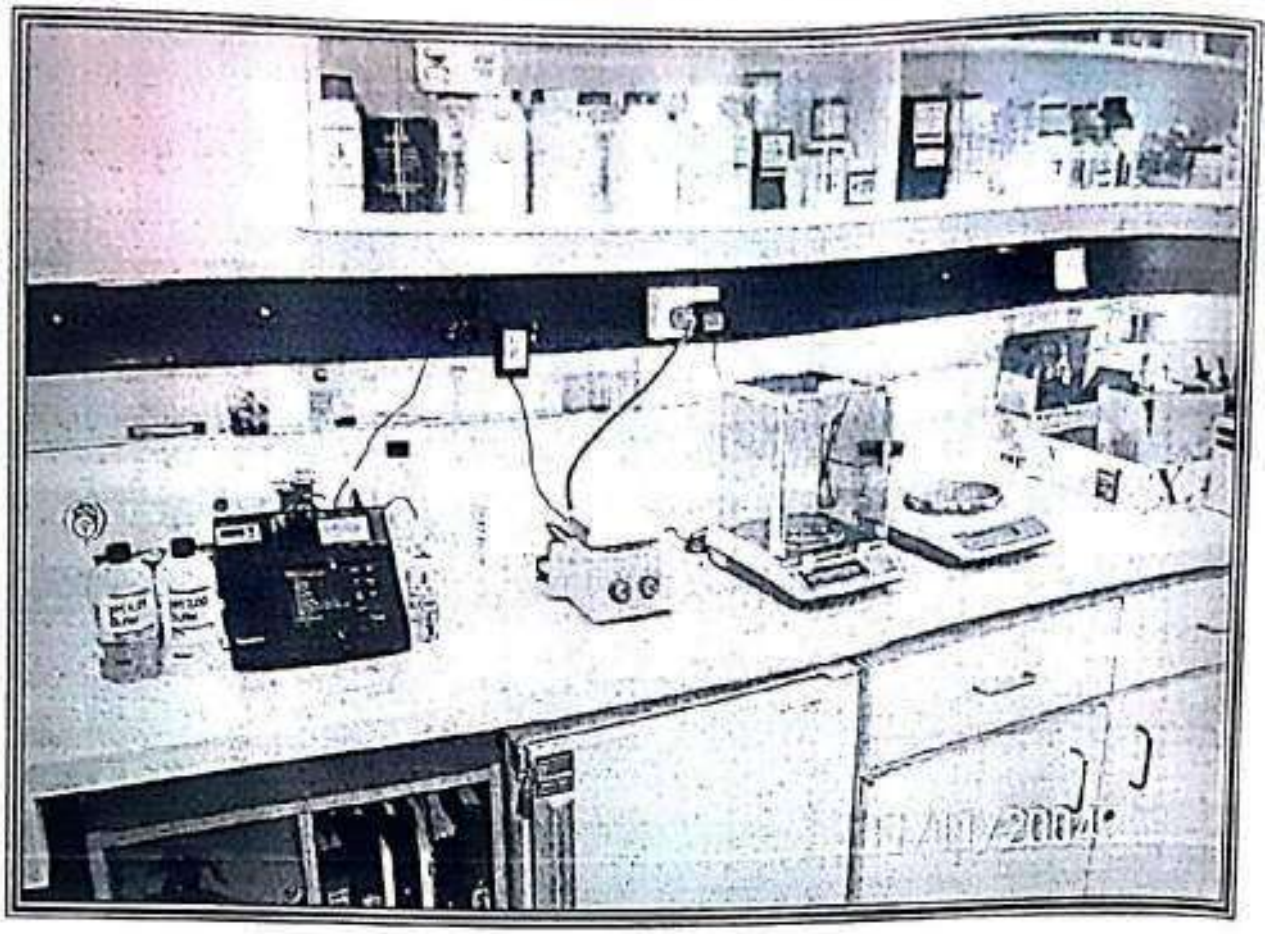
2- المجهر التشريحي : وذلك لاستخدامه بالعمليات الدقيقة كاستئصال القمة النامية أو الجنين بمراحل مبكرة أو متابعة عمليات اندماج البروتوبلاست و غيرها .

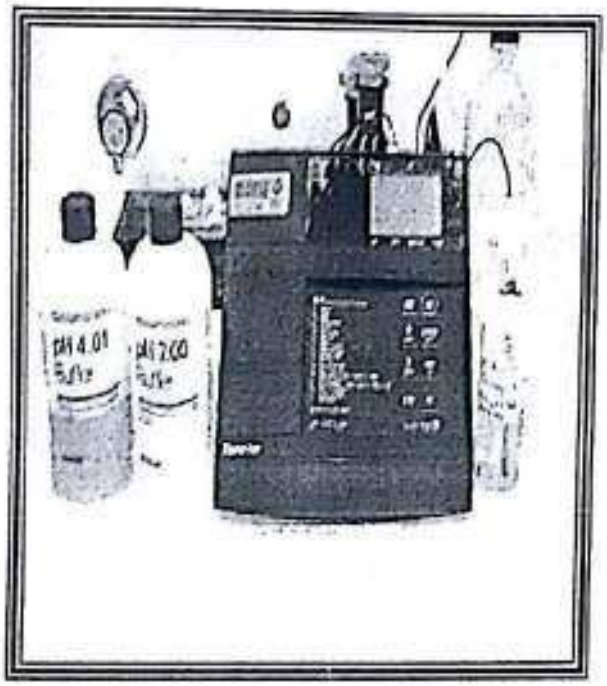
3- مصادر إضاءة جيدة في غرفة النقل .

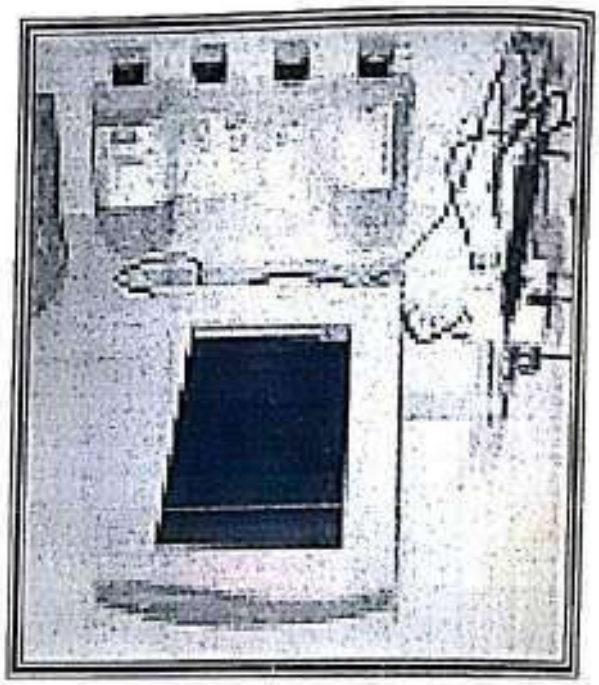
4- جهاز الطرد المركزي لإجراء عملية ترسيب الخلايا أو البروتوبلاست أو أي عملية أخرى مشابهة .

5- سكاكين وملاقط لإجراء عمليات التقطيع وأطباق بتري ومنظومة ماء معقم وساعة جدارية لحساب وقت التعقيم .

Scanned by CamScanner







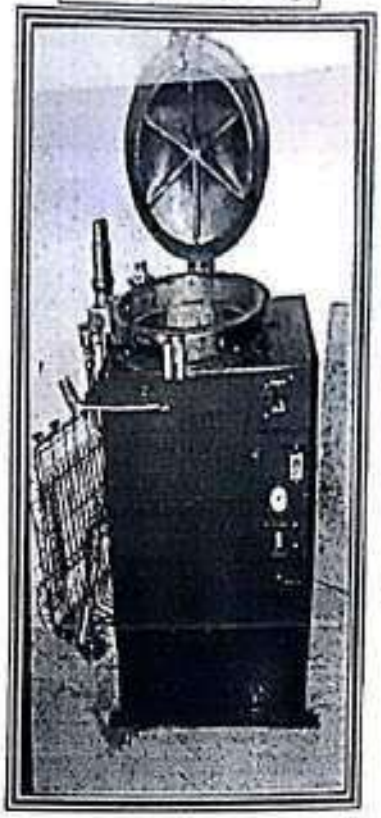
Major PTC Equipment

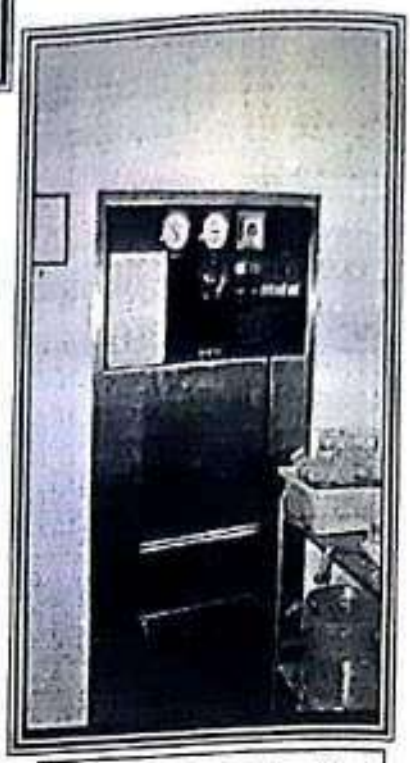
Scanned by CamScanner

AUTOCLAVES

medium-size
front-loading

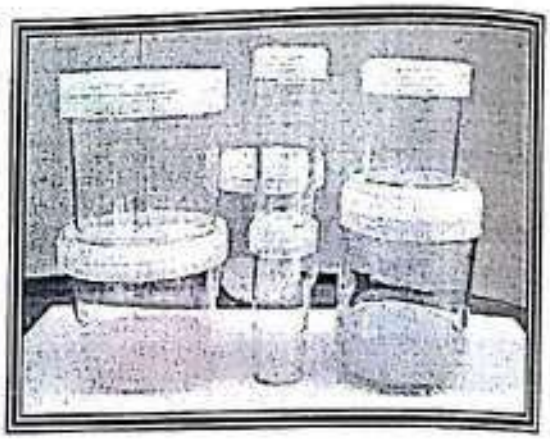
Top - loading

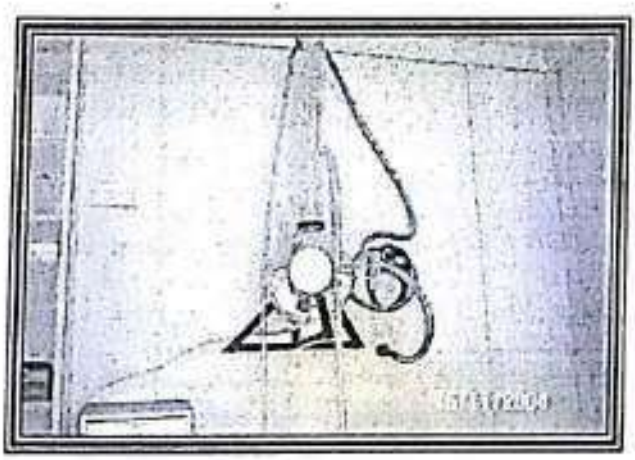


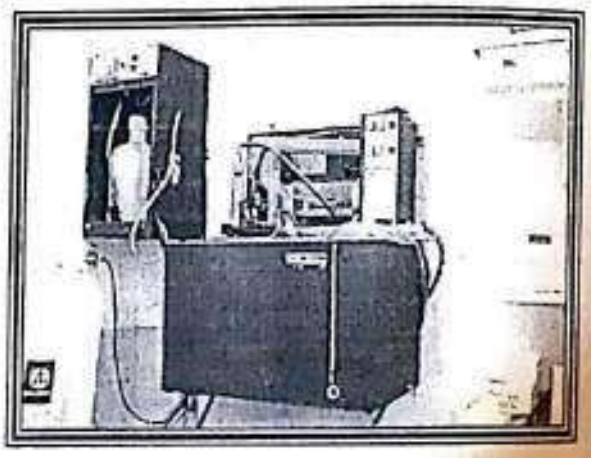


large, front-loading
(boiler outside wall)

Containers –Glass vs.
polycarbonate







أجهزة التقطير

Scanned by CamScanner

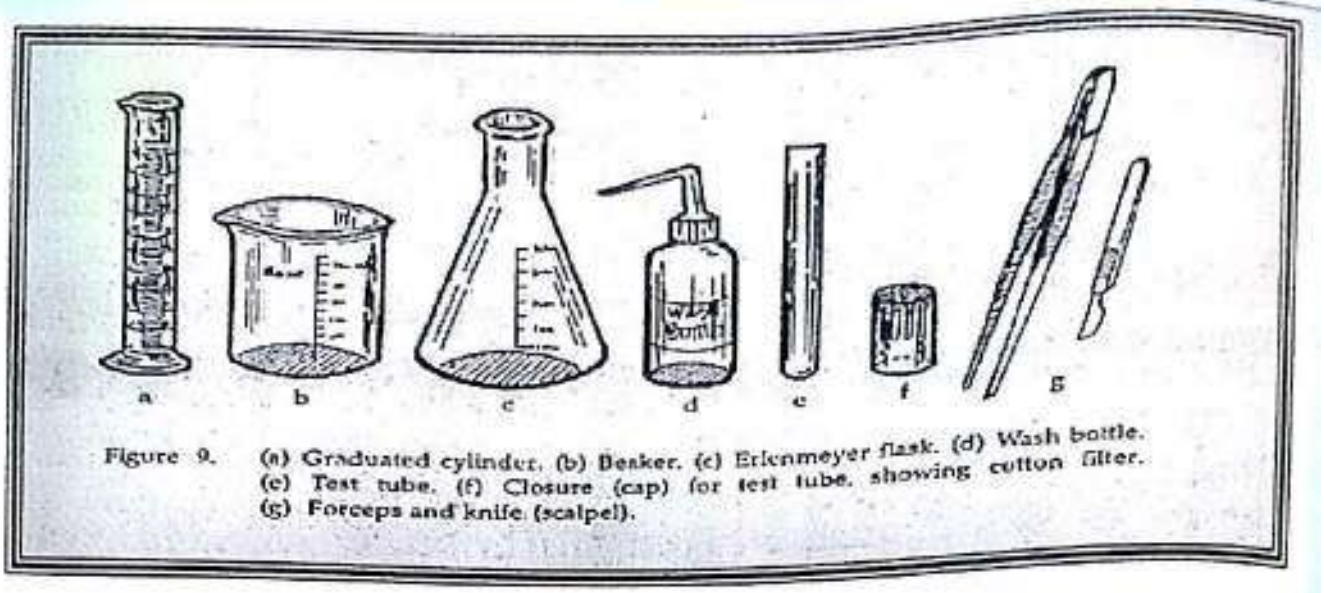
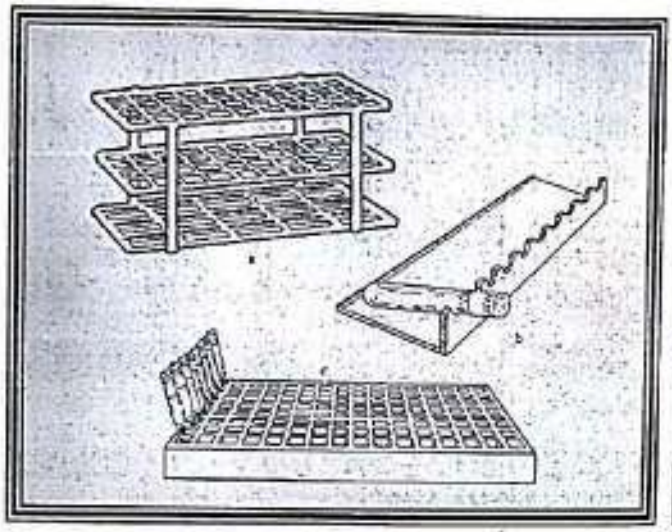
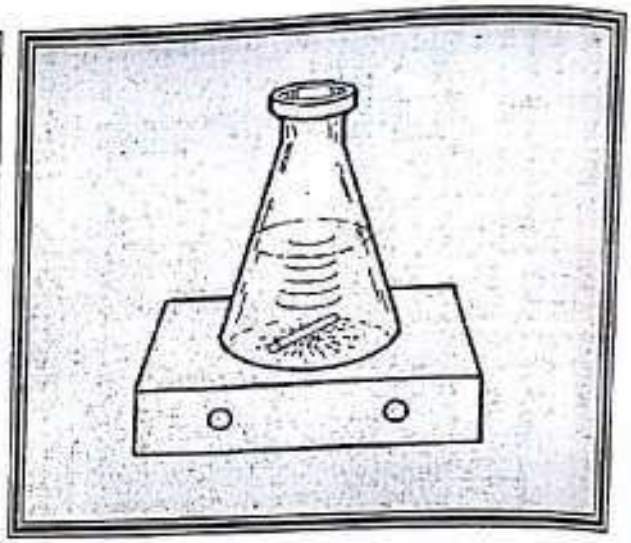
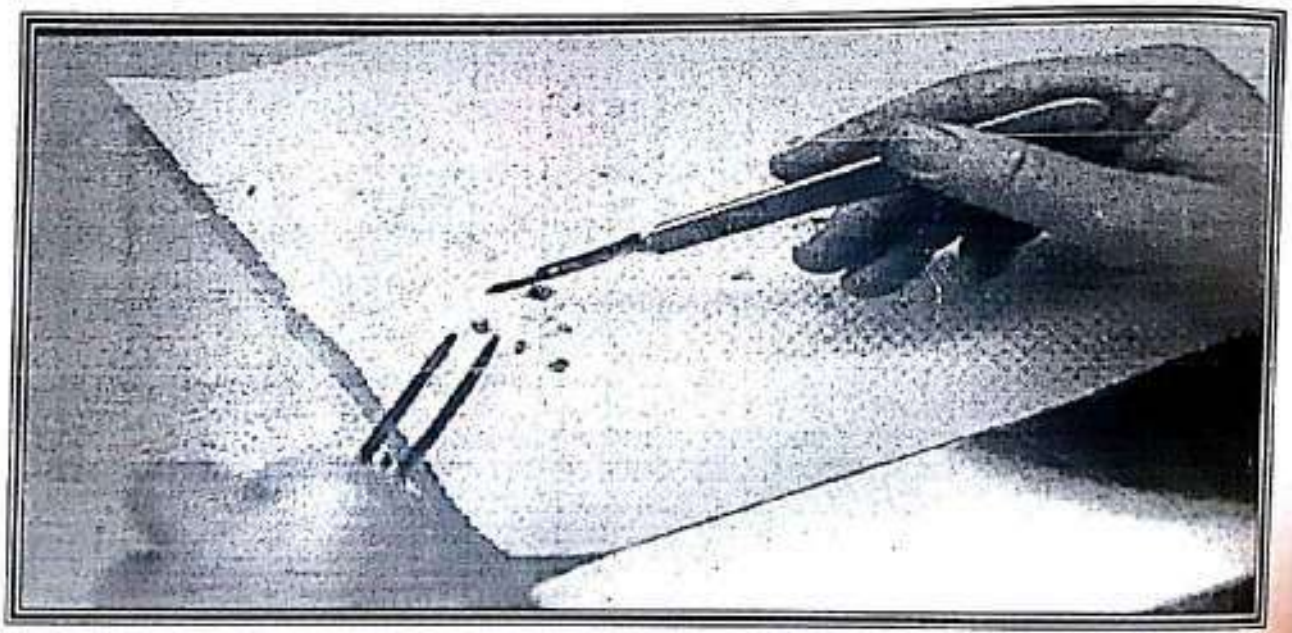


Figure 9. (a) Graduated cylinder, (b) Beaker, (c) Erlenmeyer flask, (d) Wash bottle, (e) Test tube, (f) Closure (cap) for test tube, showing cotton filter, (g) Forceps and knife (scalpel).

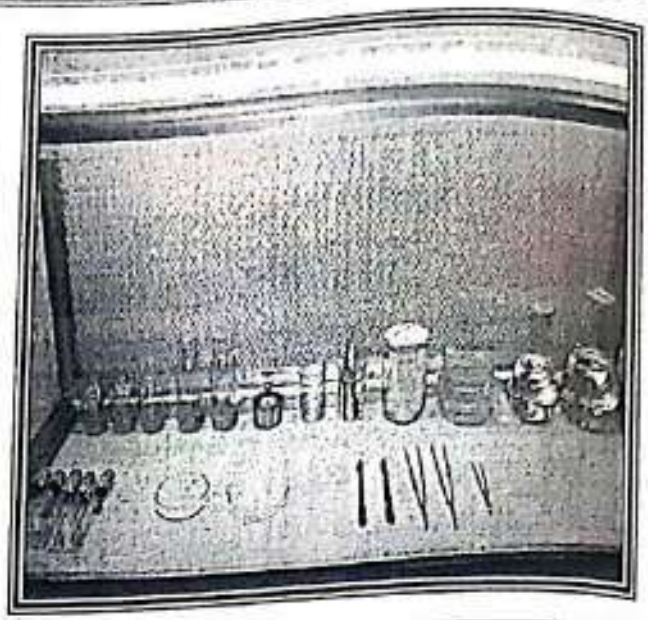


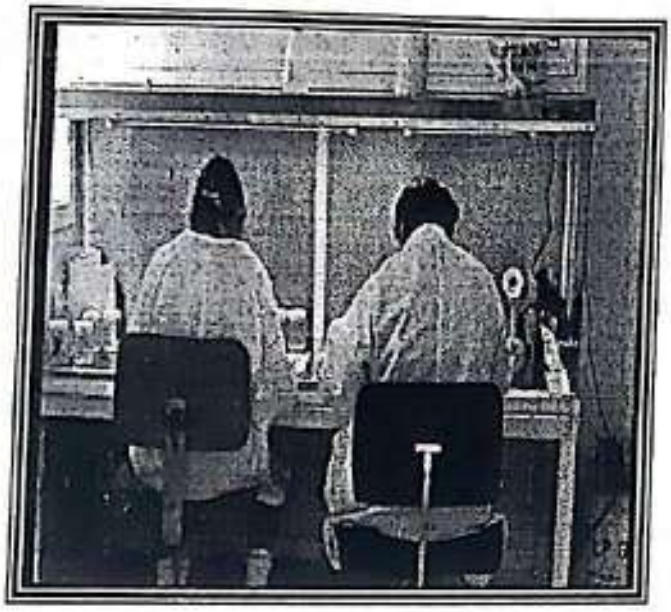


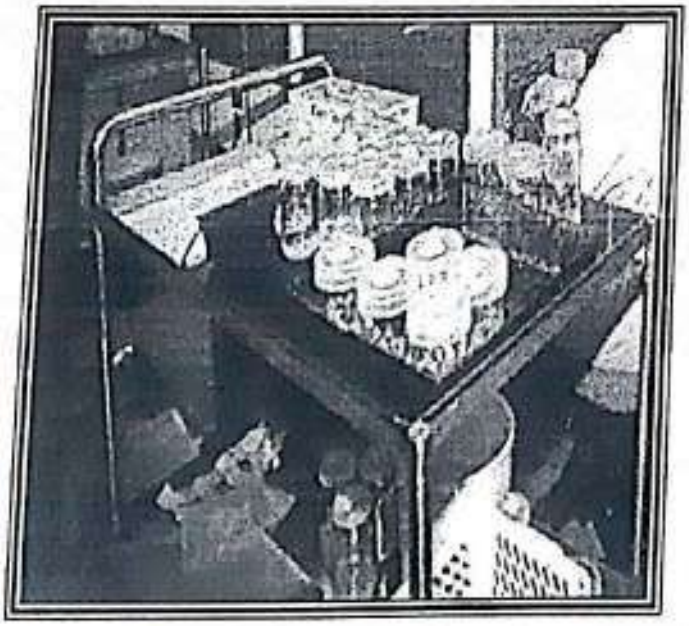


Scanned by CamScanner

صور توضح منضدة الزراعة وكيفية الزراعة في المختبر







Scanned by CamScanner

الحاويات المختلفة التي توضع فيها مكونات الوسط الغذائي

3- غرفة تنمية الزروعات :

غرفة التحضين :- **(Incubation Room)**

تؤثر العوامل البيئية كثيراً على عملية نمو المزارع وكذلك تكشفها ولذلك فإن جميع أنواع مزارع الأنسجة تحفظ في مكان يمكن التحكم بداخله في درجة الحرارة والضوء والرطوبة ودورة الهواء. إن مزارع البروتوبلاست أو المتوك والمزارع السائلة أكثر حاجة لظروف التحكم عن مزارع الكالوسات ولذلك يجب أن يوضع برنامج لدرجات الحرارة والإضاءة على مدار 24 ساعة.

Scanned by CamScanner

عموماً درجة الحرارة المثلى لنمو الكالوسات والمزارع 25 ± 2°م . أما عن درجات الإضاءة وطول الفترة الضوئية فإنها تتباين حسب النبات النامى في الغرفة وتنظيم فترة العمل عن طريق إستخدام ساعة أو منظم ميقاتي لذلك الغرض. وأغلب النباتات تنمو في ضوء خافت لا تزيد قوته عن واحد كيلو لوكس والبعض يحتاج إلى كثافة ضوئية عالية 5 إلي 10 كيلو لوكس وأحياناً تتطلب بعض المزارع النمو في إظلام تام . وعموماً فإن هذه العملية يمكن التحكم فيها من وقت لآخر حسب الغرض من البحث ونوع المزرعة النامية والنبات النامي.

أما النسبة المئوية للرطوبة داخل غرف النمو فإنها تتباين من 20 -98 % ويمكن التحكم فيها عن طريق أجهزة التحكم فى الرطوبة. وبالنسبة لأرفف النمو داخل الغرفة قد تكون من الزجاج أو من الخشب وكل رف مزود بوحدة إضاءة مستقلة عن الآخر وأحياناً توضع مروحة صغيرة على أحد جوانب الرف حتى يتم تنظيم توزيع الحرارة التي قد تنبعث عند استخدام وحدات الإضاءة ومن المفضل إستخدام وحدات إضاءة بيضاء باردة فلورسنت لا تصدر أي حرارة عند استخدامها أوأقل حرارة ممكنة من النوع (Cool White) وتوضع أوعية الزراعة إما مباشرة على الأرفف أو توضع في صوانى إما بلاستيكية أو من الألومنيوم لسهولة النقل والتعامل معها داخل المعمل.

في العادة توضع ورقة على أوعية الزراعة متضمنة بعض المعلومات الأساسية مثل نوع التجربة وتاريخ الزراعة ونوع النبات والمعاملة الغذائية التي بداخله. أحياناً تستخدم حضانات نمو كبيرة الحجم وفي داخل هذه الحضانات يمكن التحكم فيها أفضل من غرف النمو المجهزة. لابد من توفر مواصفات خاصة في حضانات النمو. إن انقطاع التيار الكهربائي وهذا وارد قد يؤدى الى توقف أو موت الخلايا خاصة النامية في المزارع السائلة على أجهزة الرج ولذلك لابد من توفر مولد كهربائي إحتياطى يعمل بمجرد فصل التيار الكهربائي الأساسي عن المعمل.

Scanned by CamScanner

قد تكون حضانات كهربائية مجهزة بالظروف البيئة المطلوبة لزراعة الأنسجة وبها أرفف تتحكم في إضاءتها ودرجة حرارتها بقدر الإمكان . وقد تكون حجرة نظيفة معقمة بقدر الإمكان يوجد بها (Stands) وهي عبارة عن حوامل رأسية يوجد بها رفوف مضاءة ومزودة بجهاز لضبط الوقت (Timer) (لضبط فترة الإضاءة) وهي غالبا 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات إظلام وتحتوى هذه الحجرة على أجهزة تكييف لضبط درجة الحرارة المطلوبة بقدر الإمكان وكذلك جهاز (Lux meter) لقياس الكثافة الضوئية كما تحتوى الحجرة أيضا على مرشحات هوائية وذلك لتجديد الهواء الداخلي للغرفة حيث أنها لايوجد بها شبابيك أو أي منافذ أخرى ماعدا باب واحد فقط لدخول وخروج النباتات والأشخاص. والـ (Stands) عبارة عن أربعة حوامل رأسية من الألوميتال أو الحديد بطول 5 و 2-3 أمتار وبها من 3 - 5 أرفف بين الرف والآخر 40 - 50 سم وهي مضاءة بلمبات الفلورسنت .

حيث يتم في هذه الغرفة تحضين الزروعات النسيجية في ظروف مسيطر عليها من درجة حرارة ورطوبة وضوء ولهذه الغرفة مستلزمات يجب توفرها من أهمها :

1- وجود مرشحات لتنقية الهواء الداخل الى الغرفة وتسمى (Air scruber).
2- جهاز لتنظيم درجات الحرارة (Thermostat) وذلك للحفاظ على الدرجة الحرارية والرطوبة والملائمة لتطور الزروعات وتختلف درجات الحرارة باختلاف النبات وتنظيم درجة الحرارة يتم حسب حاجة النبات من حيث تغيرها يوميا حيث أن درجة الحرارة لليل تختلف عن درجة الحرارة للنهار وكذلك حرارة الصيف تختلف عن حرارة الصيف .
3- مواقع معينة لوضع بعض الأجهزة الخاصة مثل أجهز الرج (Shakers) والتي تستخدم في تنمية المستنبتات الخلوية .

Scanned by CamScanner

4- رفوف لوضع الزروعات عليها : تختلف من حيث شدة الإضاءة وملاحظة تجنب عزل هذه الرفوف عن مصادر الضوء التي تثبت تحتها وذلك للسيطرة على درجات الحرارة الناشئة من هذه المصابيح وتوضع مفاتيح السيطرة على هذه المصابيح خارج الغرفة .

أما أهم الأجهزة التي تزود بها غرفة التنمية

1- أجهزة الرج : وتقسم الى رجاجات سريعة الحركة ورجاجات بطيئة الحركة

2- الحاضنات : (Incubator) وضع حاضنات خاصة يمكن السيطرة على درجات الحرارة والإضاءة فيها .

3- جهاز التوقيت : (Timer) يعمل بصورة تلقائية لتنظم فترة الإضاءة والظلام المطلوب .

4- مقياس لتسجيل درجات الحرارة (Thermograph) وذلك لمتابعة تغيرات درجات الحرارة أثناء النهار والليل .

5- جهاز تكييف : للحفاظ على درجات الحرارة والرطوبة .

6- مصابيح إضاءة فلورنسنت : توضع في أسفل الرفوف لكي توفر الإضاءة للزروعات .

7- جهاز إزالة الرطوبة : (Dehumidifier) لان الرطوبة الزائدة أو العالية تسبب زيادة التلوث بسبب ملائمتها لنمو الفطريات .

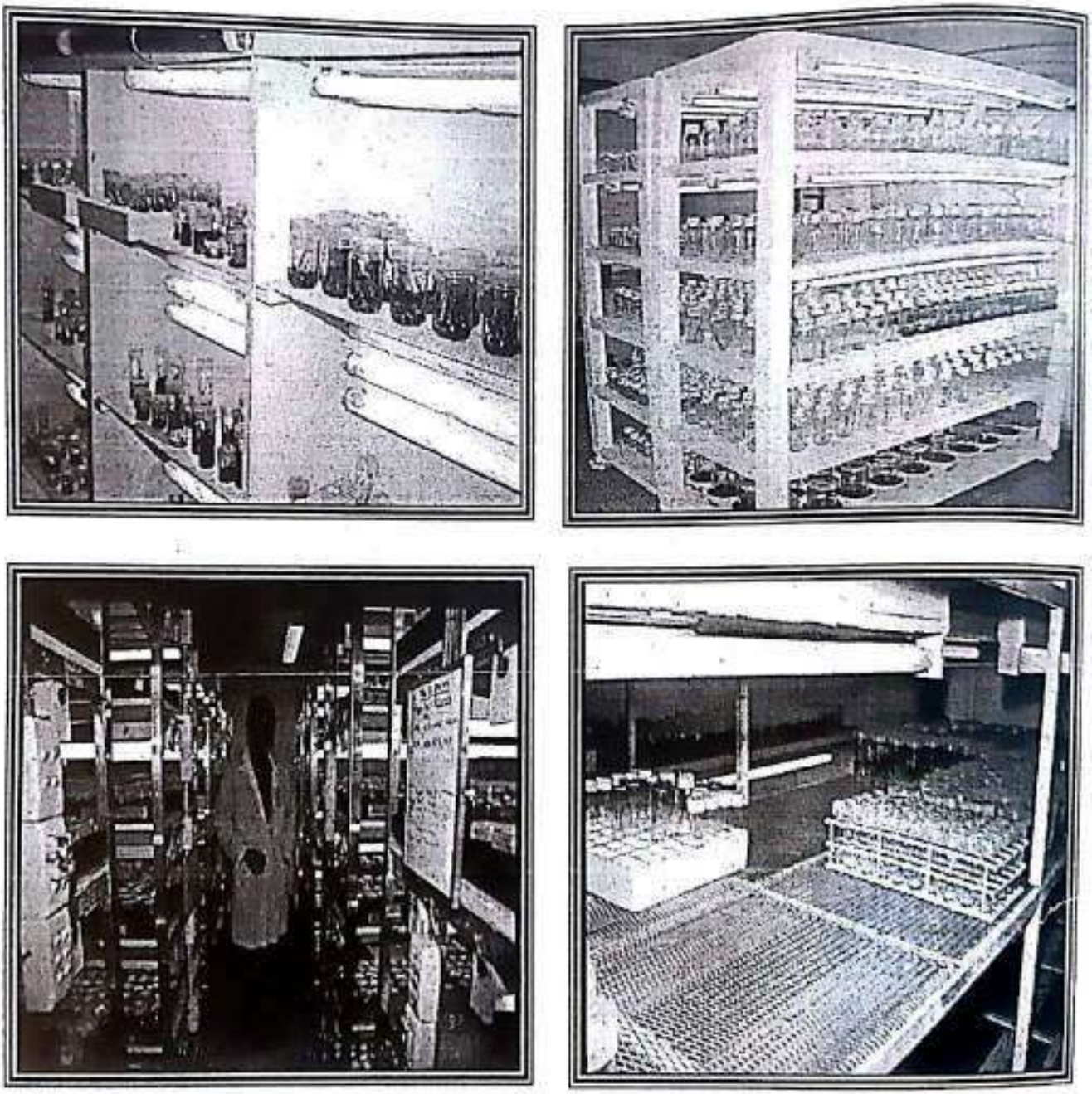
8- جهاز توفير الرطوبة : (Humidifier) لان قلة الرطوبة تؤدي الى سرعة جفاف الوسط .

Scanned by CamScanner

غرفة الغسل :-

يتم فيها إتلاف الزروعات القديمة وغسل الأواني المستخدمة في الزراعة وكذلك يمكن وكذلك يمكن أن يتم تحضير النبات كإزالة الأوراق والتقطيع الأولي والتعقيم الأولي ويجب أن يتوفر فيها مصادر الماء الحار والبارد والماء الخالي من الايونات وتجهز بمكانن الغسيل .

ويمكن وضع الاوتوكليف فيها ، والتخلص من الأبخرة والغازات المتصاعدة أثناء عملية الغسيل ويجب أن تجهز الغرفة بنظام تهوية جيد .



جوانب مختلفة من غرفة التنمية

Scanned by CamScanner

4- غرفة الملاحظة وجمع المعلومات :-

(Observation or Data Collection Area):-

تجرى متابعة النموات داخل الدوارق إما في غرفة النمو داخل الحضانات على فترات متقاربة متساوية حيث إنه يجب أن تكون المتابعة في نفس ظروف النمو ولذلك تفحص المزارع إما في غرفة النمو أو في الكابينة الهوائية المعقمة أو أي منطقة معقمة صالحة لتجديد ونقل المزارع بالنسبة للفحص الميكروسكوبي يمكن أن تأخذ المزارع الى حيث يوجد الميكروسكوب. النباتات الناتجة من الكالوسات أو من مزارع الأنسجة تنقل بعد ذلك إلى أصص صغيرة تحتوى على تربة صناعية مثل البيت موس والفيرموكوليت مكونة من عدة عناصر وتوضع في غرفة النمو ثم تنقل إلى الصوبة الزجاجية بعد ذلك مع دوام الفحص الدوري لها وتسجيل الملاحظات عن درجة الحرارة و الضوء والرطوبة.

البيت الزجاجي :

ويستخدم لحفظ النباتات التي تستخدم في الزراعة النسيجية وكذلك تربية النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ويجب توفر إنارة كافية في داخل البيت الزجاجي مع جهاز لتنظيم أوقات الضوء في الظلام وشدة الإضاءة كذلك جهاز لتنظيم درجات الحرارة والرطوبة ويفضل نصب جهاز الري المتقطع (mist) وكذلك جهاز لتعقيم التربة (Soil Sterilizer) .

الملحقات المكملة لمختبر زراعة الخلايا والأنسجة النباتية :

1- **مختبر تحليلي** : يستخدم هذا المختبر لإجراء دراسات تحليلية للنبات مثل تحليل الأنزيمات والبروتينات وبعض الدراسات الفسلجية أو إجراء الدراسات

Scanned by CamScanner

الوراثية لحساب عدد وتماثل الكروموسومات وكذلك تماثل النباتات الناتجة من زراعة الأنسجة فيما بينها ويحتاج هذا المختبر إلى الأجهزة التالية :

1 - أجهزة الهجرة الكهربائية :- (Electrophoresis)

2 - أجهزة الكروموتوكرافي :- (Chromatography)

3 - الموازين الحساسة :-

أما في الدراسات الوراثية فنحتاج إلى مجاهر مختلفة وملاقط ومشارط وشفرات ومصابيح كحولية وشرائح زجاجية وأغطيتها .

2- **غرفة لحفظ الأوساط الغذائية** : - تستخدم هذه الغرفة لخزن الأوساط الغذائية بصورة مؤقتة لحين استخدامها ويجب أن تكون نظيفة وتكون مجهزة برفوف ذات أبعاد محدودة ومنها ما يكون مائل بزاوية قدرها 45 م وذلك لكي تأخذ الأوساط الصلبة هذا الميل لزيادة المساحة السطحية للزراعة و يجب أن يتوفر في هذه الغرفة :-

1 - ساحبة هواء للتخلص من الحرارة عند وضع الأوساط المعقمة حديثا .

2 - مكيف للهواء للحفاظ على الدرجة الحرارية والرطوبة .

3 - **مخزن عام** : - يستعمل لخزن الزجاجيات والأدوات المستخدمة في تشريح النبات والمواد الاحتياطية الخاصة بالأجهزة .

أولا : حجرة الأقلمة :-

وهي حجرة تتوافر فيها أكياس أو بالات البيت موس - أصص صغيرة - أسبتة بلاستيكية توضع بها الأصص الصغيرة المنزرعة - أكياس بلاستيك - مناضد أو بنجات لحمل الأسبتة البلاستيكية - وسيلة للري ويفضل أن يكون الري بالرذاذ ويفضل أن يكون ضوء الغرفة باستخدام لمبات الفلورسنت أو تكون الإضاءة بضوء الشمس الغير مباشر .

Scanned by CamScanner

ثانيا : الصوب بأنواعها المختلفة :-

1 - الصوب البلاستيكية وهي الأكثر استعمالا وذلك لرخص ثمنها وتستخدم لتوفير الحرارة اللازمة لتربية ونمو وحماية النباتات من البرودة وخاصة برودة فصل الشتاء.

2- الصوب الزجاجية هي أجود أنواع الصوب حيث يتم فيها التحكم في كل الظروف البيئية من درجة الحرارة - الفترة الضوئية - والكثافة الضوئية وكذلك نسبة الرطوبة.

3- الصوب الخشبية وهذه تستخدم لإنماء نباتات الظل .

4- الصوب السلكية وهذه تستخدم لحفظ الأزهار الجافة التي سوف تستخرج منها البذور.

وتعمل هذه الصوب بحيث يتحكم في ضبط ظروفها البيئية باستخدام الكمبيوتر . الغرض من هذه الصوب هو توفير الحرارة المناسبة لنمو النباتات وخاصة في فصل الشتاء حيث يكون الجو ذو درجة حرارة منخفضة وخاصة أثناء الليل حيث يزيد انخفاض الحرارة . لذلك فإن هذه الصوب تدفأ ليلا باستخدام مدافئ خاصة وهذا مع النباتات التي تتأثر بانخفاض درجة الحرارة.

ثالثا : الحقل :-

يجب أن تكون تربة الحقل صفراء خفيفة جيدة الصرف غنية بالمادة العضوية خالية من الأملاح وكذلك خالية من الأمراض وخاصة النيماتودا وأمراض الذبول وأن يتوفر مصدر للري تكون المياه فيه خالية من الأملاح .

Scanned by CamScanner

بعض الملاحظات الرئيسية عند الغسيل واستعمال الزجاجات داخل معمل زراعة الأنسجة :-

1- الأدوات التي تستخدم أكثر من مرة داخل معمل زراعة الأنسجة يجب أن تفرغ من البيئات الغذائية بعد الانتهاء من العمل مباشرة وتنقع في الماء ولا يسمح أن تجف البيئات أو الأجار داخل الأوعية.

2- يجب أن تعزل الأدوات المستخدمة في الكيماويات مثل المطهرات والمذيبات العضوية بعيداً عن الزجاجات المستخدمة في الزراعة.

3- كل الأوعية التي حدث بها تلوث أو لاصقت أي من الملوثات يجب أن تعقم قبل الاستخدام مرة أخرى.

4- يجب إزالة أي ملصقات على الزجاجات أو أي بيانات بالحبر على أواني الزراعة قبل الغسيل عن طريق إستخدام الأسيتون أو الكحول.

5- الآجار أو البيئة الموجودة داخل الأوعية بعد الزراعة يجب أن تجمع و يتخلص منها بسرعة من المعمل إن كان هناك ملوثات يجب أن يعقم هذا الآجار داخل الأوتوكلاف قبل التخلص منه.

6- الأغطية البلاستيكية يجب أن تنقع في ماء مقطر ويحذر نقعها في محاليل الصابون أو المطهرات الكيماوية.

7- الأوعية الزجاجية المستخدمة في الزراعة يجب أن تعامل بمحلول حامضى لإزالة أي نوع من البروتينات على الجدر.

8- الأوعية الزجاجية المصنعة من السليكون يجب أن توضع منفصلة عن الأوعية الأخرى بالمعمل وغالباً ما تكون معلمة .

ما يجب مراعاته عند غسيل الأوعية الزجاجية :

1- يجب أن تنقع الأوعية الزجاجية في أحد المطهرات ذات تركيز 5 % لمدة ساعة على الأقل.

Scanned by CamScanner

2- في الغسيل الأوتوماتيكي لا توضع أي مطهرات وتبرمج الغسالات على أساس الشطف بالمياه العادية 5 مرات ثم بالماء المقطر مرة واحدة ويمكن أن تعامل الأدوات بالمحاليل المطهرة قبل وضعها في الغسالة.

3- الأوعية الزجاجية الكبيرة الحجم التي لا يمكن إدخالها في الغسالة يمكن أن تغسل خارجها عن طريق شطفها بماء الصنبور من 5 الى 6 مرات ثم بماء مقطر مرة واحدة.

4- إذا لم تتوفر إمكانيات الغسيل الميكانيكي فإن اي طريقة باستخدام ماكينة ذات فرش مختلفة الأحجام تؤدى الغرض.

ما يجب مراعاته عند الغسيل بالأحماض :

1- يجب أن يرتدى الشخص الذي يقوم بالغسيل قناع للوجه وكذلك قفاز..

2- يجب أن يتم الغسيل بالأحماض ونقع الأدوات الزجاجية في مكان مزود بآلة شفط للأبخرة.

3- يحذر إضافة الماء الى الحامض وعند التخفيف يضاف الحامض الى الماء .

4- يجب التخلص من بواقي الغسيل بالأحماض عند تحول المحلول الى اللون الأسود.

الصفات العامة للحضانات أو غرف النمو :-

1- درجات الحرارة بها تتراوح من 2 - 40 ° م.

2- التحكم في درجة الحرارة يجب أن يكون بمقدار ± 0.5°م .

3- يجب أن تكون ذات أمان بالنسبة للدرجة القصوى والدنيا من الحرارة .

4- يجب أن يكون بها مسجل دائم لدرجات الحرارة.

5- أن تكون ذات قدرة على البرمجة لمدة 24 ساعة بالنسبة للضوء والحرارة .

6- تتحمل أن يوضع بها إضاءة لأكثر من 10.000 لوكس .

Scanned by CamScanner

7- نسبة الرطوبة بها تتراوح من 20 - 98 % .

8- نسبة الرطوبة يكون التحكم فيها بمقدار ± 3 % .

9- أن يكون بها موزع للهواء بانتظام .

الأجهزة والأدوات التي يجب توافرها في معمل زراعة الأنسجة :-

أولا- قائمة بأهم الأدوات والأجهزة التي يجب أن تتوفر في معمل أو مختبر زراعة الأنسجة :-

1 - دوارق (Flasks) مخروطية بأحجام 100 و125 و250 مل و1 و5 لترات .

2 - دوارق معيارية بأحجام 500 مل و 1 و 2 و 3 لترات .

3 - مخابير مدرجة بأحجام 25 و50 و100 و500 مل ولتر واحد .

4 - ماصات مدرجة بأحجام 1 و 2 و 5 و 10 مل .

5 - ماصات باستير .

6 - أوعية الزراعة .

أ - أنابيب اختبار(Test tubes) تصنع من زجاج البايركس تتحمل عمليات التعقيم ولها أغطية شفافة تصنع من مادة Polypropylene لتتحمل درجات الحرارة العالية مع الضغط أثناء عملية التعقيم . وهذه الأنابيب تستخدم في الزراعة في المراحل الأولى مثل زراعة المرستيمات فيزرع كل مرستيم في أنبوبة أو ينقل إليها نبات النخيل بعد تكشفه من الكالوس.

ب - زجاجيات (قناني) بأحجام مختلفة منها الصغير والمتوسط والكبير لها أغطية بلاستيكية شفافة تتحمل عملية التعقيم وهذه تستخدم في المرحلة الثانية (مرحلة الإكثار).

Scanned by CamScanner

ج - ماجنتات باغطية بلاستيك شفافة تتحمل عملية التعقيم تستخدم في مرحلة الإكثار .

د - أطباق بترى وهي تصنع من الزجاج وهذه تعقم أو من البلاستيك وتباع معقمة وهذه لا تستعمل إلا مرة واحدة وهذه توضع بها نباتات البطاطس لحين تقسيمها أو لتفصيص نباتات الموز أثناء عملية الزراعة في كابينة زراعة الأنسجة (الهود) .

7 - جرادل بلاستيك لنقع الزجاجيات قبل غسيلها.

8 - ترمومتر (Digital Thermometer) لقياس درجات الحرارة داخل الحضانة أو غرفة الزراعة وذلك لضبط درجة الحرارة .

9 - فرن (Oven) لتجفيف الأوعية والزجاجيات وتعقيمها وعادة يتم التعقيم على درجة حرارة 180 °م لمدة 3 ساعات ولذلك يجب أن يعمل الفرن حتى 210°م على الأقل .

10 - سلال سلكية توضع بها أوعية البيئات الصغيرة (أنابيب إختبار) في أثناء تعقيمها في الأوتوكلاف والزجاجيات الصغيرة أثناء تجفيفها في الفرن .

11 - جهاز لنزع الأيونات من الماء (Water Deionizer) . وجهاز تقطير المياه و يفضل ما هو زجاجي و منه نحصل على مياه مقطرة خالية من الأملاح والرواسب .

12 - أوعية بلاستيكية بحجمي 10 و 20 لتر لتخزين الماء المقطر الناتج من جهاز التقطير.

13 - موازين (Balances) (موازين حساسة) أحدهما لوزن الكميات الصغيرة جدا حوالي3 أو 4 أرقام عشرية من الجرام لوزن الهرمونات والثاني رقمان عشريان لوزن الكميات الكبيرة نسبيا مثل السكر والأجار وأملاح البيئة المستخدمة.

Scanned by CamScanner

14 - سخان (Hot plate) مع قلاب مغناطيسي (Magnetic stirrer) لإذابة المركبات الكيميائية وإذابة الآجار .

15 - مضخة تفريغ لتسهيل عملية التعقيم بالترشيح .

16 - قنينات بلاستيك بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة .

17 - ثلاجة (Refregerator) لتخزين المركبات الكيماوية والمحاليل القياسية التي تحضر منها البيئات .

18 - ديب فريزر (Deep Freezer) لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول والهرمونات وبعض الإنزيمات ولبن جوز الهند .

19 - جهاز توليد بخار (Steamer) لإذابة الآجار والبيئات .

20 - جهاز (pH meter) لقياس وضبط الـ pH للبيئات والمحاليل ويقرأ اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين في محلول البيئة وقبل إضافة الآجار ويقرأ من مدى صفر إلي 14 pH . وهو للبيئة السائلة 5.2 to 5.5 وللبيئة الصلبة 5.8 to 5.6.

21 - أوتوكلاف (Autoclave) أو قدور طهي وهي أجهزة تعقيم بالبخار تحت ضغط تستخدم لتعقيم البيئات والماء المقطر ويكون التعقيم على درجة حرارة 121°م تحت ضغط جوى 1.5 to 1.2 كجم /سم2 أو 15 رطل / البوصة المربعة ولمدة ثلث ساعة (20 دقيقة) . الظروف السابقة (من حرارة وضغط) فدرجة الحرارة مع الضغط تعقم البيئة وبدون غليانها ثم بعد إنتهاء فترة التعقيم يلى ذلك فتح صنبور الضغط برفق وبيطئ حتى ينزل الضغط ولا يفتح فجأة فيتسبب في غليان البيئة وتطاير الأغطية وعند التأكد من نزول الضغط إلي الصفر وتركة فترة 5 - 10 دقائق بعدها يبدأ في فتح غطاء الأوتوكلاف واستخراج البيئة ووضعها لتبرد لحين إستعمالها. ويجب أن يكون هناك قفازات من الجلد أو من القماش السميك وذلك لرفع البرطمانات

Scanned by CamScanner

من الأوتوكلاف حيث تكون تلك الأواني ساخنة ومن الأوتوكلاف ما هو رأسي ومنه ما هو أفقي .

22 - أغشية مرشحات تعقيم ومواسكها لتعقيم المحاليل بالترشيح (مرشحات بكتيرية) .

23 - حقن بلاستيكية معقمة لغرض الاستعمال مع المحاليل المعقمة بالترشيح.

24 - عربات صغيرة (ترولى) مزودة بصوان مناسبة لنقل البيئات والأدوات من حجرة البيئة إلي حجرة الزراعة ونقل الأوعية التي زرعت ومن حجرة الزراعة إلي حجرة التحضين.

25 - لمبة (شعلة) كحول أو مصباح بنزن لتعقيم الأدوات وذلك بغمس الأدوات في الكحول ثم تعريضها للهب لتشتعل ويجب أن يكون العمل في مجال الشعلة لأنها تعقم المجال الذي حولها.

26- رشاشات صغيرة لرش الكحول المخفف 70% داخل الهود أو حجرة العزل وكذلك تعقيم القائم بالعمل . وكذلك تعقم بها القناني من الخارج قبل الإستخدام وأيضا تستخدم لري النباتات الصغيرة بالماء (رذاذ) أثناء عملية الأقلمة.

27- ملاقط (Forceps) كبيرة من الصلب الذي لا يصدأ ذات أطراف غير حادة لزراعة الأجزاء الكبيرة في الأوعية الكبيرة.

28- ملاقط (Forceps) من الصلب ذات أطراف حادة لنزع بشرة الأوراق .

29-ملاقط (Forceps) صغيرة لزراعة الأجزاء الصغيرة في الأوعية الصغيرة .

30 - إبر (Needels) دقيقة للتشريح .

31 - مشارط (Scalpels) حادة لتقطيع الأنسجة النباتية ومنها رقم 10 - 11 - 12 - 13.

Scanned by CamScanner

الجو المحيط بالهود) وبه لمبات فلورسنت وذلك لإضاءة الهود وقد يكون به مصدر لدخول الغاز الطبيعي وذلك بتوصيله بانبوبة غاز وقد يستخدم سبرتاية أو اي مصدر آخر لتعقيم أدوات العمل من مشارط وملاقط وخلافه .

39 - جهاز لصب البيئة بالكميات المطلوبة بكميات متساوية .

40 - الكيماويات الجاهزة (الكتس) مثل الخاصة باختبار (ELISA test) لاختبار الفيروس .

41 - جهاز (Reader) لقراءة الكتس و الميكروبليت (Micro plate) .

42 - المجفف وهو إناء زجاجي متين ذو غطاء زجاجي متين يحتوى على كلوريد الكالسيوم لإمتصاص الرطوبة بحيث يجعل داخل الإناء جاف وتوضع به الهرمونات والفيتامينات

والمواد الهامة التي يخشى من تميؤها ويوضع داخل الديب فريزر .

43 - حضانة (Incubator) مزودة بضابط لدرجة الحرارة وتعمل من 4 - 40° م ومزودة بوحدة إضاءة مع (Timer) لضبط فترات الإضاءة والإظلام وتتراوح شدة الإضاءة بها من 1000 إلى 10000 لوكس .

44 - حوامل الأنابيب (Raks) وهي تصنع من الخشب أو الألمنيوم أو البلاستيك وهي ذات ثقوب مختلفة تبعا لسمك الأنابيب وعادة تحمل من 12 أو 24 أو 36 انبوبة .

45 - حمام ماني (Water bath) عبارة عن إناء من الصلب الذي لا يصدأ ويوضع به الماء ويتم التسخين بواسطة الكهرباء ويستخدم لتسخين وغليان المواد التي لا يراد تعرضها للهب النار مباشرة.

46 - قفازات (Gloves) أحيانا تستعمل القفازات لمنع التلوث عن طريق اليدين أو لحماية بشرة اليدين من الكيماويات المستعملة في التطهير مثل الكحول

Scanned by CamScanner

الذي قد يسبب جفافها وكذلك من بعض المطهرات وتصنع هذه القفازات من البلاستيك الطري المقاوم للكيماويات.

47 - غطاء الرأس (Over head) حتى لا تسقط شعيرات من رأس القائم بالعمل.

48 - غطاء الفم (Mask) وذلك حتى لا تتاثر الأوعية المحتوية على البيئة المعقمة بعملية الشهيق والزفير أثناء عملية الزراعة وخاصة في حالة الإصابة بالإنفلوانزا .

49 - غطاء الحذاء (Over shoes) وهو من البلاستيك لارتدائه على الحذاء حتى لا تتأثر أرضية المعمل بما تحمله الأحذية من ملوثات ويجب أن يكون هناك حذاء مخصص للمعمل .

50 - مقياس لشدة الإضاءة (Lux meter) وهو جهاز يقيس شدة الإضاءة وبهذا يمكن ضبط الإضاءة المطلوبة وهذا يستعمل في غرف النمو والحضانات .

51 - الكيماويات (Chemicals) . وهي الكيماويات التي تستخدم وتساعد في تحضير البيئة وفي التعقيم .

52 - ستارة هوائية وهذه تركب على باب غرفة الزراعة لتمنع دخول الهواء من الخارج إلي الداخل عند فتح باب الغرفة.

53 - ورق ترشيح (Filter papers) وذلك لترشيح المحاليل التي تحتوى على رواسب .

توزيع الأجهزة على الغرف المختلفة للمعمل :-

أ- غرفة إعداد البيئات :- **(Media preparation)**

1- مصدر للماء والغاز والكهرباء .

2- جهاز شفط وتفريغ للغازات .

Scanned by CamScanner

3- سخان ماني أو مصدر حراري للتسخين .

4- سخان كهرباني من ذوات المقلب المغناطيسي .

5- زجاجيات أو أوعية جديدة غير قابلة للصدأ لإعداد البيئة وإذابتها.

6- جهاز تعقيم (أوتوكلاف) أو معقم بخار مضغوط .

7- جهاز لقياس الأس الأيدروجيني pH .

8- ميزان حساس (مليجرام) .

9- أدوات زجاجية (مخبار مدرج - دوارق - كاسات - ماصات) مختلفة الأحجام وأنابيب اختبار- أطباق بتري .

10- أنابيب للزراعة أو زجاجات للزراعة ذات فوهات مناسبة وأغطية مناسبة من القطن أو المطاط أو ورق الألمونيوم ، البلاستيك .

11- أدوات للنقل والتشريح والتقطيع مثل مقصات - مشارط - ملاقط - إبر تشريح وخلافه .

12- فرن هواني ذو درجة حرارة عالية لإذابة الأجار وقد يستخدم ميكرو ويف .

13- جهاز لنزع الأيونات من الماء وكذلك جهاز تقطير ماء مزدوج .

14- جهاز ترشيح وكذلك أغشية للترشيح والتعقيم عن طريق الترشيح .

15- الكيماويات اللازمة للبيئات الغذائية سواء على صورة جافة أو مخاليط جاهزة بما فيها منظمات النمو.

16- منظفات ومطهرات .

17- وعاء لغسل الماصات (مقاوم للأحماض) .

18- أرفف للتجفيف وتصفية المياه من الأدوات.

19- أماكن لتخزين الأدوات الزجاجية ، الكيماويات ، الماء المعقم وأشياء أخرى .

Scanned by CamScanner

ب- أدوات لا بد من توافرها أثناء عملية الزراعة والتجديد :-

1- كابينة زراعة الأنسجة وهذه تكون معقمة .

2- مصدر للهب مثل موقد بنزن .

3- ميكروسكوب .

4- كحول 95 % للتطهير والتعقيم .

5- أطباق زجاجية معقمة لاستخدامها عند القطع للأجزاء المعقمة .

6- محاليل مطهرة للأجزاء النباتية مثل محلول الهيدروكلوريد .

ج- أدوات رئيسية لابد من توافرها في المعمل :- (General equipment)

1- ثلاجة عادية وكذلك جهاز تجميد . حفظ عينات

2- غسالة أطباق أوتوماتيكية .

3- جهاز موزع للأبخرة المائية والرطوبة .

4- أساسيات معملية مثل - ترولى - أطباق بلاستيكية - وصوانى معدنية .

5- حوض مجهز لاستعماله في الغسيل بالأحماض والقلويات .

6- ميكروسكوب بسيط أو مركب .

7- أقلام للكتابة على الزجاج وأدوات ورقية لتسجيل النباتات عليها وبارافيلم لإحكام قفل الزجاجيات وخاصة عند نقلها من مكان الى آخر أو في حالة عرضها في معرض .

د- أجهزة بغرفة النمو :- (Growth room)

1- تتمتع بدرجة حرارة يمكن التحكم فيها ما بين 17 - 27° م .

2- مصدر كهربائى آخر بديل وذلك للإضاءة والحرارة .

3- أرفف لوضع الدوارق والزجاجيات المنزرع بداخلها الأنسجة .

Scanned by CamScanner

4- لمبات فلورسنت للإضاءة .

5- منظم للوقت للتحكم في ساعات الإضاءة .

6- جهاز رج .

7- منضدة لإجراء عملية الملاحظة وفحص المزارع .

8- أرفف لوضع المزارع السائلة عليها .

بالإضافة إلى ذلك مكان لإجراء عملية النقل والأقلمة للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ويمكن التحكم فيه بالحرارة والإضاءة والرطوبة على صورة صوب زجاجية أو غرف صغيرة.

التعقيم : Sterilization

الخطوات المتبعة لزراعة الخلايا و الأنسجة النباتية:

أولا: إختيار الجزء النباتي :-

1-اختيار النبات الأم :- **(Selective of mother plants)**

يجب أن يكون نبات الأم في حالة صحية جيدة وفي بداية نشاطه وذو صفات جيدة خالية من الأمراض خاصة الأمراض الفيروسية 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 والمتوك والمبيض والأجنة ونسيج النيوسيلة والإندوسبرم والفلقات والقشرة والنخاع والكمبيوم وهي الأجزاء المحتوية على مرستيمات أو أنسجة قابلة للتحول إلي الحالة المرستيمية ولكل نبات

Scanned by CamScanner

نسيج غالبا ما يكون أكثر ملائمة من غيرة. وهناك عدة إعتبارات من الواجب النظر اليها قبل إختيار الجزء الذي سيزرع وهي:

أ - الجزء النباتي المستخدم :- (Explant)

ويقصد به المنفصل النباتي (قمة نامية - قمة مرستيمية - جزء من الساق - جزء من الورقة - المتك .. الخ) .

ب - عمر المنفصل النباتي :- (Age of Explant)

عادة يفضل إستخدام المنفصل 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 بالجبريلين وفي بعض الأحيان يستخدم مركبات السايتوكاينين حيث يشجع ذلك على تكوين النموات الحديثة.

ج - حجم المنفصل النباتي :- (Size of Explant)

لقد وجد أنة كلما زاد حجم المنفصل 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 الفيروسية وقليل التلوث . وقد وجد El-Shobaky (1991) - أن طول المرستيم (0.1-0.25 مم) أدت إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروس من نباتات مصابة من البطاطس .

د - موسم الحصول على المنفصل النباتي :- (Season of Explant)

تكون الأعضاء النامية أكثر نشاطا في بداية موسم النمو (فصل الربيع) عن بقية فصول السنة .

Scanned by CamScanner

هـ – نوعية وجودة مصدر النبات :-(Quality of the ExplantSource)

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 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.
2) يوضع في كحول إيثانول 70 % لمدة نصف إلي واحد دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر.
3) يوضع في هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوروكس) 5 - 20 % لمدة ثلث ساعة 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 تجري 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 الذي يتشرب المحاليل وينقلها إلي الجزء المنزرع. ويفضل أن تكون البيئة المستخدمة في المراحل الأولى صلبة وقد تكون سائلة في المراحل التالية.

Scanned by CamScanner

- تحضين المزارع :- **(Incubation of the cultures)**

ويتم تحضين المزارع في حضانة أو في غرفة نمو Growth Chamber التي تحتوى على الـ Stands وهذه تحتوى على أرفف مضاءة توضع عليها المزارع والعوامل البيئية اللازم توافرها عند زراعة الأنسجة وهي رطوبة مناسبة للمحافظة على الأنسجة من الجفاف ودرجة حرارة مناسبة وإحتياجات ضوئية مناسبة. الإحتياجات البيئية المطلوبة هي:

أ - الإحتياجات 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 النيوسيلية والأجنة الخضرية العرضية من نسيج الكالوس 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 10000 لوكس . الكثافة الضوئية كانت مفيدة لإستطالة النباتات وزيادة عدد الأوراق وطول وعدد الجذور في البطاطس (El-Shobaky 1991) .

2 - الفترة الضوئية :- **(Photoperiod)**

تحتاج معظم المزارع إلي 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات إظلام وهناك البعض يحتاج إلى 12 ساعة إضاءة ومثلها إظلام وفي حالة الحصول على الميكروتيوبرز من البطاطس فإنها قد تحتاج إلي ضوء خافت أو إلي إظلام تام .

Scanned by CamScanner

ب - الإحتياجات الحرارية :- (Heat requirement)

في معظم الأحيان تكون درجة الحرارة 22 - 27°م هي أنسب درجة لنمو وزراعة الأنسجة بالنسبة لنباتات المناطق المعتدلة إلا انة في النباتات الإستوائية 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 كانت 18°م . درجة الحرارة 20 - 25 °م كانت مناسبة لزيادة عدد الأفرع والأوراق وطول وعدد الجذور لنباتات البطاطس النامية في أوعية الزراعة El - Shobaky (1991) .

ثالثا: عملية الأقلمة و الزراعة في التربة و الحقل للنباتات الناتجة :

بعد تمام تكون النباتات داخل القناني تأتى عملية الأقلمة :-

أقلمة النباتات :- (Acclimatization)

يجب تقسية النباتات قبل النقل وذلك بتعريض النباتات لشدة إضاءة عالية 10000 لوكس ثم نقل النباتات إلي أصص تحتوى على بيت موس والفيرمكوليت وتزرع النباتات تحت ضباب (Under mist) ويفضل تدفئة قاعدة أواني الزراعة فإن ذلك يشجع المجموع الجذري وتغذى ب ½ محلول هوجلاند أسبوعيا وبعد 3 - 4 أسابيع تنقل النباتات في الظل ثم تدريجيا في الجو الخارجي بأرض المشتل أما النباتات التي لها طور راحة مثل الكورمات فيجب إستيفاء درجات الحرارة لكسر طور سكونها. وفي هذه المرحلة تؤقلم النباتات في حجرة الأقلمة وتنقل إلي الصوبة أو الحقل وتزرع في تربة مكونة من البيت موس والرمل بنسبة 1 : 1 بالحجم وأحيانا يضاف بيرليت أو فوم لزيادة التهوية ثم ترش بعد ذلك بمحلول غذائي متكامل وأحيانا يستخدم هرمون تجذير لتشجيع تكوين مجموع جذري وغالبا ما تتم هذه العملية في حضانات مجهزة لذلك ومزودة بعدادات لدرجات الحرارة ليلا ونهارا وأخرى للرطوبة والإضاءة (شدة الإضاءة - عدد ساعات الإضاءة) وهذا على

Scanned by CamScanner

النطاق البحثي أما على النطاق التجاري فإنها تتم في صوب مجهزة لذلك وغالبا ما يستخدم نظام الري بالرش (الضباب) أو التغطية بأكياس البلاستيك. وهذه المرحلة هي الترجمة النهائية للعمل في مزارع الأنسجة وهي هامة للغاية ويجب ملاحظة أن لكل نبات طبيعة خاصة في الأقلمة.

الزراعة في البيت الزجاجي أو الحقل :- **(Greenhouse and Field)**

الهدف من هذه المرحلة هو إعداد النباتات بصورة صالحة للنقل للتربة حيث تتوقف طريقة الإكثار الناجحة باستخدام زراعة الأنسجة على الإعداد الجيد لهذه النباتات وذلك بتجذيرها حيث تزيد نسبة الأوكسين في البيئة في هذه المرحلة ويقل أو لا يضاف السيتوكاينين ويجب معرفة طبيعة النباتات فمثلا:

1 - النباتات التي لها دور سكون فيجب كسره بالتعرض لدرجات الحرارة المنخفضة لفترة زمنية معينة.

2 - بعض النباتات تعمل على تقليل كمية السكر والأملاح في البيئة وزيادة الإضاءة تنشط إنزيمات البناء الضوئى لزيادة الكفاءة التمثيلية للنباتات فيسهل أقلمتها.

3 - وفي بعض الأحيان تنقل النباتات مباشرة من المرحلة الثانية إلي التربة مباشرة مع إستخدام هرمونات التجذير.

للتعقيم دور أساسي في زراعة الأنسجة ونعني به القضاء على جميع الكائنات المجهرية التي تؤدي إلى هلاك الجزء المزروع حيث أنها :-

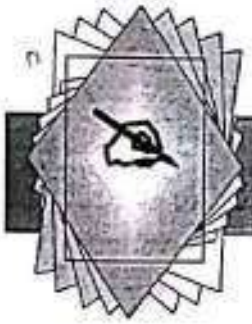
1 - تنمو بسرعة وتنافس الجزء المزروع على المواد الغذائية .

2 - تقوم بإفراز مواد سامة تؤدي الى موت الجزء النباتي المزروع لذا يجب الاهتمام بعملية التعقيم والقضاء على جميع مصادر التلوث .

Scanned by CamScanner

مصادر التلوث :

1- الأشخاص العاملين في المختبر يعتبر مصدرا رئيسيا للتلوث في حالة عدم الاهتمام بالعمل وعدم ارتداء غطاء الرأس أو واقيات الأنف .
2- الجزء المزروع (Explant) يعتبر من أهم مصادر التلوث في حالة عدم تعقيمه بصورة جيدة ولمدة كافية قبل زراعته .
3- الوسط الغذائي الغير المعقم بصورة جيدة وملاقط ومشارط وشفرات الزراعة والتي تعد من المصادر المهمة لإحداث التلوث .
4- الحاويات الزجاجية غير النظيفة مثل الدوارق وأنابيب الزراعة وأطباق بتري وقناني الزراعة تؤدي الى زيادة فرص حدوث التلوث .
5- محيط وجو غرفة الزراعة وما تحويه من الملوثات كالكائنات المجهرية و غيرها .
6- عدم تعقيم غرفة التنمية والسماح بالدخول لغير العاملين فيها .



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 المنيوم ثم توضع في فرن التعقيم .

Scanned by CamScanner

2- **التعقيم الحراري الرطب** :

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 . بعد 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 . كما يجب تجنب التعقيم لفترات طويلة لأنه يؤدي الى تحطم المركبات الكيمياوية الموجودة في وسط الزراعة .

3- **التعقيم بأشعة كاما** :

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 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.

Scanned by CamScanner

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 استنصاله 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 استنصال 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 الأوساط الغذائية :

تعقيم الأوساط الغذائية :

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** :- من أكثر الطرق المستخدمة لتعقيم الأوساط الغذائية في جهاز الاوتوكليف حيث يوضع الوسط الغذائي في دورق ثم يوضع في الجهاز ويجب تحديد الفترة الزمنية لأنها إذا كانت قليلة فسوف لن تقضي على جميع الأحياء المجهرية في حين تؤدي فترة التعقيم الطويلة الى تحلل بعض مكونات الوسط الغذائي وتتراوح فترة تعقيم الوسط 15 - 20 دقيقة .

2- **التعقيم البارد** : هناك مركبات تتأثر بالحرارة مثل الجبرلين والابسيسك أسيد والزياتين وبعض منظمات النمو لا يمكن تعقيمها بالحرارة لذلك ترشح

Scanned by CamScanner

بواسطة مرشحات دقيقة 0.22 مايكرون - 0.45 مايكرون ثم تضاف الى الوسط الغذائي قبل أن يتصلب .

التعقيم بالإشعاع : يستخدم لتعقيم بعض الأوساط الغذائية وهي طريقة ممكن اعتبارها خطرة وذلك لأنها تؤدي إلى تكسر العديد من الأحماض الامينية والفيتامينات والسكريات .

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 .

الوسط الغذائي : (Nutrient media)

إن نمو وتكشف الأنسجة النباتية في المعمل يمكن التحكم فيه عن طريق نوع وتركيب الوسط الغذائي مع العلم بأن الإحتياجات الأساسية للأنسجة النباتية تماثل الإحتياجات الأساسية للنباتات الكاملة. ومن خبرتنا العملية يتضح أن الإحتياجات الغذائية تتباين طبقاً لنوع النبات المنزرع ويجب عند إختيار البيئة الغذائية مراعاة الإحتياجات الفعلية لكل نبات منزرع عليها. فعلى سبيل المثال هناك بعض الأنسجة تنمو أفضل على وسط غذائي صلب عن النمو في وسط غذائي سائل والعكس صحيح ولقد بذلت محاولات عديدة خلال السنوات الماضية لإختيار أفضل المكونات

Scanned by CamScanner

للوسط الغذائي الذي يلائم كل نوع من الأنسجة أو الأعضاء للنمو والتكشف. وفي هذا الجزء سوف نتناول بالتفصيل مكونات الوسط الغذائي .

1 - تركيب الوسط الغذائي :- (Media Composition)

يتركب الوسط الغذائي عامة من مجموعة من العناصر المعدنية (عناصر كبرى وعناصر صغرى) بالإضافة الى مصدر للكربون وهو أحد السكريات وبعض المواد العضوية الأساسية مثل الأحماض الأمينية والفيتامينات وكذلك منظمات النمو بالإضافة الى الماء ومادة تصلب الوسط الغذائي مثل الآجار أو أحد مواد gelling agent وهناك بعض الأنسجة النباتية التي تستطيع النمو فقط على مخلوط العناصر المعدنية وليست بحاجة الى مصدر الكربون (سكر) ولكن معظم الأنسجة النباتية تحتاج الى إضافة بعض الفيتامينات والأحماض الأمينية ومنشطات النمو. في بعض الأحيان القليلة جداً يضاف بعض المواد المعقدة الى الوسط الغذائي.

هناك عدد من البيئات أو الأوساط الغذائية المتخصصة لكى يزرع عليها عضو نباتي معين أو نسيج معين. وعلى سبيل المثال أول وسط غذائي وضع لنمو الجذور كان بواسطة العالم White (1934). ولإنتاج أعضاء وتكشف أول نبتة في وسط غذائي كانت البيئة الموضوعة بواسطة Murashige and Skoog (M&S) (1962) و لنمو المزراع السائلة وضعت بيئة B5 بواسطة العالم Gamborg (1968) وبادخال بعض التعديلات والتحويرات في مكوناتها أصبحت مناسبة لنمو معلق البروتوبلاست. هناك العديد من البيئات المتخصصة فقط مثل N6 لنمو وتكاثر مزارع متوك النجيليات وهذه البيئة وضعت بواسطة العالم Chu (1978) ، وبيئة Nitsch's بوسطة العالمان Nitsch and Nitsch (1969) وكذلك أستخدمت هذه البيئة لنمو خلايا فول الصويا والبرسيم الأحمر وعديد من النباتات البقولية. وتتباين البيئات المختلفة في درجة النجاح حسب نسب وعدد العناصر الغذائية المكونة لها.

Scanned by CamScanner

جدول يوضح المكونات الأساسية لبعض البيئات المستخدمة في زراعة الأنسجة

إسم المكون	الكمية (ملجم / لتر)					
	White	MS	B_5	Nitsch's	N_6	E_1
عناصر كبرى						
$MgSO_4 . 7H_2O$	750	370	250	185	185	400
KH_2PO_4	-	170	-	68	400	250
$NaH_2PO_4 . H_2O$	19	-	150	-	-	-
KNO_3	80	1900	2500	950	2830	2100
$NH4NO_3$	-	1650	-	720	-	600
$CaCl_2 . 2H_2O$	-	440	150	-	166	450
$(NH_4)_2 SO_4$	-	-	134	-	463	-
عناصر صغرى						
H_3BO_3	1.5	6.2	3	-	1.6	3
$MnSO_4 . 4H_2O$	5.	22.3	-	25	4.4	-
$MnSO_4 . H_2O$	-	-	10	-	3.3	10
$ZnSO_4 . 7H_20$	3	8.6	2	10	1.5	2
$NaMoO_4 . 2H_2O$	-	0.25	0.25	0.25	-	0.25
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.01	0.025	0.025	0.025	-	0.025
$CoCl_2 . 6H_2O$	-	0.25	0.025	0.025	-	0.025
KI	0.75	0.83	0.75	-	0.80	0.80
$FeSO_4 . 7H_2O$	-	27.8	-	27.8	27.8	-
Na EDTA. $2H_2O$	-	37.3	-	37.8	37.8	-
EDTA Na ferric salt	-	-	43	-	-	43
Sucrose (g)	20	30	20	20	25	25
الفيتامينات						
Thiamine HCl	0.01	0.5	10	0.5	1	10
Pyridoxine HCl	0.01	0.5	1	0.5	0.5	1
Nicotinic acid	0.05	0.5	1	5.0	0.5	1
Myo-inositol	-	100	100	100	-	250
Glycine	3	2	-	2	-	-
Folic acid	-	-	-	0.5	-	-
Biotin	-	-	-	0.05	-	-
pH	5.8	5.8	5.5	5.8	5.8	5.5

Scanned by CamScanner

المراجع للبيئات المغذية الست المذكورة بالجدول:

White: White (1953) Am. J. Bot. 40, 517 – 524). **MS:** Murashige and Skoog (1962) Physiol. Plant. 15 : 473). **B_5:** Gamborg *et al.*(1968) Exp. Cell Res. 50: 151). **Nitsch's:**(Nitsch and Nitsch 1969) Sci., N. Y., 163: 85).**N_6:** Chu (1978); Pro. Symp. Plant Tissue Culture, Sci. Press, Peking P. 43). **E_1:** Gamborg *et al.* (1983). Plant Cell Rep. 2: 209).

وأحد مكونات البيئة الهامة هي منظمات النمو Growth Regulators

توجد أربعة مجاميع رئيسية لمنظمات النمو الهامة لمزارع الأنسجة وهى الأوكسينات - السيتوكينينات - الجبرلينات وحامض الأبسيسيك . إن نمو الخلايا والأنسجة وتكشفها الى البراعم الخضرية أو الى الجذور يكون واضحاً جلياً عند إضافة واحد أو أكثر من هذه المنظمات الى الوسط الغذائي وتتباين الإحتياجات المختلفة من منظمات النمو لتكوين الجذور أو تكوين البراعم الخضرية . والتي تتشابه مع نسب الهرمونات الموجودة أساساً في النبات الأصلي والتي تخلق به هذه الهرمونات ذاتياً وتضاف وتعقم أغلب هذه المنظمات بواسطة المرشحات البكتيرية نظرا لتكسرها بالحرارة العالية والضغط العالي (ظروف التعقيم) . وهذه المجموعات هي:

1- الأوكسينات :- (Auxins)

يوجد العديد من الأوكسينات التي تضاف الى الوسط الغذائي نذكر منها على سبيل المثال إندول حامض الخليك indole-3 - acetic acid ويرمز له (IAA) ، أندول حامض البيوتريك indole 3 butyric acid ويرمز له (IBA) وكذلك 2,4 - دى كلورفينوكسى أسيتيك أسد ويرمز له (2, 4 - D) 2 ، 4 dichlorophenoxy acetic acid. نفثالين حامض الخليك naphthoxy acetic acid ويرمز له (NAA) ويوجد IAA طبيعياً في الخلايا النباتية وهناك العديد من الأوكسينات التي تؤثر في مزارع الخلايا والأنسجة ومن أهمها:

Scanned by CamScanner

أ- الإندول أسيتيك أسد IAA :-

يشجع تكوين الجذور على النباتات وهذا المركب يجب إضافته بواسطة المرشحات البكتيرية لأن تعقيمه بواسطة الأوتوكلاف مع البيئة يؤدى إلي تكسيره وتقليل الإستفادة منة وكذلك يجب حفظة في زجاجة بنية أو قاتمة اللون لأنة يتأثر بالضوء ويضاف للبيئة في حدود 0.1 to 10 mg / L ويجب أن تحفظ البيئة المحتوية على هذا الهرمون في الإظلام التام حتى لا يتكسر وتقل الإستفادة منة ويلاحظ أن الأوكسين لا يذوب في الماء ويجب إذابتة أولا في كحول الإيثانول أو هيدروكسيد البوتاسيوم أو هيدروكسيد الصوديوم.

التحضير: يوزن 100 ملجم من حامض الإندول أسيتيك وتذاب في 2 مل هيدروكسيد الصوديوم 1 عيارى ثم يكمل الحجم إلي100 مل بالماء المقطر وفي هذه الحالة يكون 1 مل = 1 ملجم.

ولقد أستخدم هذا الأوكسين بنجاح لتكوين كالوسى نخيل البلح والفيكس كما أستخدم لإحداث الجذور (للتجذير) في نباتات الجربيرا والكوردالين ونباتات الموز.

ب -الإندول بيوتريك أسد IBA :-

من الأوكسينات الهامة التي تستخدم على نطاق واسع في مزارع الأنسجة النباتية بهدف تشجيع وتكوين الجذور وهذا الهرمون ثابت نسبيا بالمقارنة بحمض الإندول أسيتيك (IAA) حيث أنة يتحمل التعقيم ولا يتكسر بالحرارة أو الضوء ويذوب أيضا في كحول الإيثانول وهيدروكسيد الصوديوم ويحضر كالسابق.

ج- نفثالين أسيتيك أسد NAA :-

من المركبات الأوكسينية التي تستخدم بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لتكوين الكالوس وتشجع تكوين الجذور في المرحلة النهائية ويلاحظ أن الإتزان الداخلى للأوكسين والسيتوكاينين هو المحدد في جميع حالات نمو النبات وهذا الهرمون يذوب في كحول الإيثانول وكذلك هيدروكسيد الصوديوم ويحضر بإذابة

Scanned by CamScanner

100 ملجم منه في 2 مل هيدروكسيد الصوديوم 1 ع ثم يكمل الحجم إلي 100 مل بالماء المقطر وفي هذه الحالة يكون 1 مل = 1 ملجم. ويجب ملاحظة أن هذه الأوكسينات تتاثر تاثيرا كبيرا بال pH وكمية الأملاح بالبيئة. وكثيرا ما تذكر التركيزات بالملي مول والميكرو مول وفي هذه الحالة يجب تحويلها إلي مليجرام وميكروجرام طبقا للأتى:

التركيز بالميكروجرام = التركيز بالميكرومول × الوزن الجزيئي .

التركيز بالمليجرام = التركيز بالملي مول × الوزن الجزيئي .

د- 2 ، 4 داي كلورو فينوكسى أسيتك أسد :- "2, 4-D

(2,4-"Dichlorophenoxyacetic acid)

وهو يتميز بأن تاثيره قوى في تخليق الأجنة العرضية وتكوين الكالوس ولكنة يعتبر مطفر. وقد درست أهمية الأوكسينات فوجد مثلا أن IAA هام جدا وضروري لتصنيع DNA وإنقسام الخلية وقد وجد أنة بدون الأوكسين يحدث أن تتقسم الخلايا مرات قليلة ثم تموت وقد وجد أنة في مزارع نخاع الدخان أن إنقسام الخلايا يبدأ فورا بعد إضافة الأوكسين بالإضافة الى هذه الأنواع الرئيسية يوجد أوكسينات إخرى من أهمها:-

1-رابع كلورو فينوكسى حامض الخليك :-

4 – chlorophenoxy acetic acid (4- CPA)

أو بارا كلورفونكسى حامض الخليك :-

P – chlorophenoxy acetic acid (PCPA)

2، 4، 5 ثلاثى كلوروفينوكسى حامض الخليك:-

2,4,5 – Trichlorophenoxy acetic acid (2, 4,5 –T)

3- 2 مثيل – 4 كلوروفينوكسى حامض الخليك:-

2 – methy – 4 – chlorophenoxy acetic acid (MCPA).

Scanned by CamScanner

4- **أمينو، 3، 5، 6 ثلاثى كلور حمض البيكنولينيك** :-

4 amino - 3, 5, 6- trichloropicolinic acid (picloram.)

5- **6 ،3 داى كلورو – 2 ميثوأوكسى حامض البنزويك** :-

3,6 – dichloro – 2 – methoxy benzoic acid. (dicamba).

والأثر الرئيسى للأوكسينات هو التأثير الواضح على إنقسام الخلايا في الطبيعة والدور الرئيسى لهذه الهرمونات أنها تشارك بنشاط هام في عملية إستطالة السلاميات والسيقان وتكوين الجذور. وتتباين الأوكسينات في تأثيرها الفسيولوجى عن طريق قدرتها على التحرك خلال الأنسجة النباتية والإرتباط ببعض الخلايا. وحسب درجة إنحدار وتقوس الساق النباتية فإنة وجد أن 2,4-D يؤثر بحوالى من 8 - 12 مرة ضعف تأثير IAA مقارنة بتأثير PCPA, Picloram الذي يؤثر من (2-4 مرات) من تأثير IAA , 2, 4 - D , 2, 4, 5 - T وجد أنهم مؤثرين في عملية إنتاج الكالوسات.

2- **السايتوكاينينات** :- (Cytokinins)

إن مجموعة السيتوكينينات التي هى في الأصل مشتقات من الأدينين تقوم بدور فعال ونشط في إنقسام الخلايا وكذلك تحوير السيادة القمية وتكوين البراعم الجانبية. وهي من الهرمونات الهامة في مزارع الأنسجة النباتية والتي تساعد على إنقسام الخلايا وتكوين النموات الجانبية والمساعدة على الزيادة العددية أثناء إكثار النباتات وهذه الهرمونات تنشط تكوين الأفرخ والبراعم العرضية وتمنع تكوين الجذور خاصة عند إستعمالها بجرعات كبيرة ومنع تكوين الجذور يأتى من التأثير على الخلايا التي لاتنقسم والسيتوكينينات هي :-

أ - سايتوكينين طبيعي مثل :

1 - **الزياتين** :- وهو مرتفع الثمن جدا يحدث تضاعف في مزارع الأنسجة النباتية.

Zeatin) 6-(4hydroxy-3methyl-trans-2 butanylamino) purine

Scanned by CamScanner

2 - **زياتين رايبوزايد**:- Zeatin Riboside

3 - **أيزوبنتنايل أدينين** 2-ip:- يستخدم لإحداث التضاعف. 6- (y - y - dimethylamino) purine

ب - سايتوكاينين صناعي :-

وهذه المركبات عامة تذوب في حامض الهيدروكلوريك وتحضر بإذابة 100 ملجم من المادة في 2مل 1 ع من الحمض السابق (5 -10 نقطة) ثم يكمل الحجم إلي 100 سم^3 بالماء المقطر. وعامة تستخدم هذه المركبات بتركيز من 0.01 to 10 mg/L وهذه المواد ثابتة وتحفظ في الثلاجة وتعمل على إنقسام الخلايا وزيادة النموات الجانبية ويستخدم كذلك مع الأوكسين لتكوين الكالوس وذلك عند الإتزان بين الأوكسين والسيتوكينين وهذه المركبات مثل:

1- **الكاينيتين** Kinetin (6 **فورفورايل أمينو بيورين**) N – (2 furfurylamino)1– H – purine 6 amine

ويستخدم بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لإحداث التضاعف وتكوين الكالوس عند إتزانها مع الأوكسينات.

2 - **بنزايل أمينو بيورين** BAP benzylaminopurine -6 **يذوب في هيدروكسيد الصوديوم**.

3 - **البنزايل أدينين** BA- 6 benzyladinine **يذوب في هيدروكسيد الصوديوم**.

وعموما فإن هناك أهمية كبرى لنسبة الأوكسينات إلي السيتوكينينات وهذه النسبة تختلف من نبات إلي نبات آخر ومن نسيج إلي نسيج آخر ولكل حالة نسبة معينة تساعد على تكوين الكالوس أو تسمح بتكوين المجموع الجذري فزيادة نسبة السيتوكاينين إلي الأوكسين يشجع تكوين البراعم العرضية والخضرية وزيادة الأوكسين تسمح بتكوين الجذور وتعادل النسبة يسمح بتكوين البراعم الخضرية والجذرية معا.

Scanned by CamScanner

لقد وجد حديثاً أن هناك بعض مشتقات اليوريا مثل (DPU) والـ (CPPU) وبعض المشتقات الأخرى من diphenylurea تظهر نشاط مثل السيتوكينينات وتحتاج هذه المركبات الى مزيد من الدراسات على إستخدامها في مزارع الأنسجة لدراسة تأثيرها على نمو المزارع والخلايا وتعتبر نسبة وجود كل من الأوكسينات والسيتوكينينات في الوسط الغذائي من العوامل المؤثرة في عملية التكشف بالنسبة للخلايا والأنسجة المنزرعة. وينصح باستخدام بنسبة عالية من الأوكسينات الى السيتوكينينات في حالة الرغبة في تكوين الكالوس وكذلك تكوين الأجنة وتكوين الجذور والعكس يقود الى تكوين البراعم الخضرية ولقد لوحظ أنه عند إضافة الـ BA والـ 2,4 - D الى الوسط الغذائي بنسبة mg / l^{-1} 15 أدت الى ظهور وتكون الكالوس في مزارع Agrostis وعند إستخدامهم وإضافتهم بنسبة mg / l^{-1} 0.5 ساعدت على تكون البراعم وفي كلتا الحالتين نسبة الأوكسين الى السيتوكينين واحدة والطريقة التي تعمل بها السيتوكينينات ليست مفهومة بعد . ولكن وجد هناك إرتباط بين بعض المركبات والحمض النووي الريبوزي الناقل (tRNA) ولقد لوحظ أن السيتوكينينات أدت الى زيادة في تخليق الـ RNA ومن ثم زيادة في تخليق البروتينات والإنزيمات داخل الخلية.

3- الجبرلينات وحامض الأبسيسيك :- Gibberellins and AbscisicAcid

تستخدم هذه المجموعة من منظمات النمو في زراعة الأنسجة ولكن في أحوال قليلة. هذه المجموعة تستخدم أحياناً لتنشيط النمو وأحياناً تستخدم لتثبيط النمو. إن حمض الجبريليك GA_3 هو أكثر المجموعة انتشارا في الاستخدام في مزارع الأنسجة دون باقى العشرين نوعا المعروفة من الجبريلينات. وهذه المركبات في الحقيقة تؤدى الى زيادة في النمو ولكن بكثافة أقل وتشجع النباتات المتقزمة على النمو والإستطالة. أما بالنسبة لحامض الأبسيسيك فإنه قد يشجع النمو أو يثبطه حسب نوع النبات والتركيز المستخدم . وهو من العناصر المهمة في منظمات النمو والوظيفة الأساسية لحمض الجبرالين هو تشجيع إستطالة الخلايا وتميزها. ولقد وجد El-Shobaky (1991) أن إضافة 1/2- 2 ملجم من الجبرلين الى الوسط

Scanned by CamScanner

الغذائي أدت الى زيادة طول وعدد الأفرخ والجذور لعديد من أصناف البطاطس .
ولكن وجد أن له تاثير مانع في بعض الحالات فقد وجد أن الجبرالين الطبيعى الموجود في الفاصوليا كان مانعا لتكوين الجذور وهو أثر غير مباشر في منع أنقسام الخلايا ومن المؤكد حاليا أن الجبرالين قد يمنع تجذير العقل في كثيرمن النباتات وكذلك يمنع تكوين الجذور العرضية عندما أضيف إلي أعناق أوراق البيجونيا . مما سبق نجد أن هذه الهرمونات تستخدم بتركيزات قليلة جدا (ملجم/ لتر) ومنها ما يتكسر بالحرارة أثناء عملية التعقيم للبيئة ولذلك يفضل إضافة مثل هذه الهرمونات عن طريق المرشحات المعقمة . وقد وجد كذلك أنة في حالة التوازن بين نسبة الأوكسينات والسيتوكينينات فإنة ينتج براعم خضرية وجذور .

درجة حموضة الوسط الغذائي pH :-

تحتاج الخلايا والأنسجة المنزرعة إلى درجة الحموضة المناسبة للنمو وعند تحضير وإعداد الأوساط الغذائية يمكن تقدير درجة الحموضة وتعديلها إلى الدرجة المثلى للنمو والغرض من التجربة. تؤثر درجة الحموضة على درجة استخدام الخلايا للأيونات الموجودة في الوسط الغذائي . عموماً درجة الحموضة المثلى تتراوح بين 5 - 6 قبل إجراء عملية التعقيم . الدرجة العالية من الحموضة تؤدى إلى زيادة في صلابة الوسط الغذائي في حين الدرجات المنخفضة من الحموضة تؤدى إلى درجة صلابة أقل من المطلوبة بالنسبة للوسط الغذائي . والأس الأيدروجينى هو اللوغاريتم السالب لتركيز أيونات الهيدروجين الموجودة في المحلول المحضر ويقاس قبل إضافة الأجار ويتراوح رقم الحموضة من 5.2 to 5.4 في البيئة السائلة ومن 5.8 to 5.6 في البيئة الصلبة ويضبط pH بالمحلول المنظم (Buffer solution) وهو ذلك المحلول الذي يقاوم التغير في الـ pH ويقاس إلـ pH باستخدام جهاز إلـ (pH meter) ويلاحظ الآتي :

pH المنخفض عن 4.5 أو الأعلى من 7 يؤثر تأثيرا سيئا على نمو النباتات .

Scanned by CamScanner

تأثير انخفاض إل pH عن 4.5 فيحدث الآتي :-

1 - يتأثر ثبات IAA والجبرالين والثيامين والكالوسيوم بانتوثينيت .

2 - سيولة الأجار .

3 - نقل الإستفادة من أيونات الأمونيوم نظرا لقلة الإمتصاص .

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

وإذا زاد pH عن (8) فأنه يحدث الآتي :

1 - يزداد تصلب الأجار .

2 - ترسيب أملاح الفوسفات والحديد فتقل 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 فلا يستفيد منها النباتات.

6 - يزيد درجة تيسر المولبدنيم فيصبح سام للنباتات .

ويختلف الـ pH قبل وبعد التعقيم حيث تنخفض فيه الـ pH من 3 - 5 وحدة ويلاحظ أنة ينخفض أثناء نمو النباتات.

أنواع البيئات (حسب درجة تصلبها) :- **(Media types)**

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

1 - البيئة الصلبة :- **(Solid media)**

وهي البيئة المضاف إليها آجار وهو إما فيتاجيل أو جيلريت أو بكتو دفكو آجار فيصلبها وكمية الآجار حوالي من 2 - 7 جم/ لتر وهناك أنواع من الآجار

Scanned by CamScanner

تصلب البيئة عند 2 جم / لتر وأفضل رقم حموضة لهذه البيئة pH هو 5.7 وإذا كانت البيئة الصلبة في أنبوبة اختبار يجب وضعها بميل بزاوية 45 درجة قبل التصلب بعد الخروج من الأوتوكلاف مباشرة وذلك لزيادة سطح البيئة داخل أنابيب الإختبار .

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 النباتي مباشرة في البيئة أو إذا كان مرستيم فيحتاج إلي ركاب أو قنطرة من قطعة ورق ترشيح ويوضع المرستيم أعلى القنطرة ويصل إلية الغذاء عن طريق التشرب أو النشع 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 آجار أقل فهي لا تكون صلبة ولا سائلة.

المواد المصلبة للوسط الغذائي :- **(Solidifying Agents)**

تضاف المواد المصلبة إلى الوسط الغذائي للحصول على بينات 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 . والآجار 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 الآجار وهى كمية كافية لتصليب أو تدعيم الوسط الغذائي عند نفس الأس الأيدروجينى المستخدم في البيئة .

Scanned by CamScanner

في 45 مل ماء بالتسخين والتقليب حتى تمام الذوبان ثم نخلط المحلولان ثم يكمل المقدار الى 100 مل .

وكذلك تذاب كمية يوديد البوتاسيوم في 85 مل ماء ثم يكمل الى 100 مل .

أما باقي العناصر الصغرى تذاب مع بعضها في 70 مل ماء ثم تكمل الى 100 مل.

ومن ذلك يتضح أن العناصر الصغرى قسمت إلى ثلاث محاليل وعند تحضير لتر من بيئة يتم أخذ 1 مل من كل محلول.

كل المحاليل المركزة السابقة يجب أن تخزن في أوعية زجاجية في درجات حرارة منخفضة ويفضل الثلاجة. ومحلول الحديد يجب أن يحفظ في زجاجة ملونة غير منفذة للضوء. عند إستخدام المحاليل المركزة هذه لابد من إجراء عملية الرج جيداً وإستبعاد أي محاليل تحتوى على ترسيبات أو اي ملوثات فطرية نهائياً. تبذل عناية خاصة عند إستخدام لبن جوز الهند. محلول الأندوسبرم يرشح ويخزن في زجاجة ملونة بألوان معتمة وتحفظ في الديب فريزر على درجة - 20ºم والمحاليل الرئيسة لمكونات الوسط الغذائي

تحضير البيئة :- **Stocks and Media Preparation (MS)**

تشتمل تلك الخطوة إعداد Stocks من مكونات البيئة المختلفة (ذكرت سابقا) وتخزن على درجة حرارة 4- 5° م لحين إستخدامها في تحضير البيئات المطلوبة.

وتحضير البيئة يتم بالوضع الآتي (لتر بيئة) :

1- يوزن من 20 - 30 جم من السكروز أو حسب المطلوب.

2- يوزن 100 ملجم من الإينوزيتول.

3- توزن العناصر الكبرى كما موضح بجدول البيئات.

3- يؤخذ 1مل من كل من الثلاث محاليل السابقة الخاصة بالعناصر الصغرى وكذلك يتم إضافة الفيتامينات كما هو موضح بجدول البيئات.

4- توضع الهرمونات على حسب نوع الهرمون والتركيز المطلوب.

Scanned by CamScanner