مكونات بيئات الزراعة

يجب أن تتوفر فى بيئات الزراعة Culture Media كافة الاحتياجات الغذائية والهرمونية التى تلزم الأنسجة وتميزها. وتختلف هذه الاحتياجات — كثيرًا — ليس فقط من نوع نباتى إلى آخر، وإنما أيضا من جزء إلى آخر فى النبات الواحد

ونقدم — فيما يلى — عرضا لأهم المكونات التى تدخل فى تحضير بيئات الزراعة (عن Chawla ٢٠٠٠)

الأملاح غير العضوية

يجب أن تتوفر فى بيئات مزارع الأنسجة جميع العناصر الضرورية للنمو النباتى، سواء أكانت عناصر كبرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات تزيد عن ٥ ٠ ملى مولار. وتتضمن النيتروجين، والفوسفور. والبوتاسيوم، والكالسيوم. والمغنيسيوم، والكبريت)، أم صغرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات لا تزيد عن ٥ ٠ ملى مولار، وتتضمن الحديد، والمنجنيز، والبورون، والنحاس، والزنك، واليود، والموليبدنم، والكوبالت).

عند إذابة الأملاح المعدنية فى الماء فإنها تتحلل وتتأين، وتعد الأيونات — وليست الأملاح — هى العامل النشط فى مختلف البيئات، ولذا فإن المقارنة بين البيئات يجب أن تعتمد على تركيز محتواها من مختلف الأيونات (جدول ٢-١)

وتتباين تركيزات مختلف العناصر فى البيئات، كما يلى:

١ - النيتروجين غير العضوى يتراوح تركيزه بين ٢٥، و ٦٠ ملى مولار، مع ضرورة تواجد جزء — ولو يسير — من النيتروجين الكلى على الصورة الأمونيوميه (صورة النيتروجين المختزل). لحاجة النمو النباتى لها من جهة، ولتجنب اتجاه pH البيئة نحو الارتفاع — فى حالة تواجد كل النيتروجين فى صورة نتراتية — من جهة أخرى وعادة تستعمل النترات بتركيز ٢٥-٤٠ ملى مولار، والأمونيوم بتركيز ٢-٢٠ ملى مولار وعند استخدام الأمونيوم بتركيزات تزيد عن ٨ ملى مولار يتعين إضافة أى من

الأحماض العضوية الخاصة بدوره TCA – مثل أحماض الستريك، والماليك، والصكّنيك – إلى البيئة

٢ – يستعمل البوتاسيوم – عادة – بتركيز ٢–٢٦ ملى مولار، وغالبًا على صورة ملح النترات أو الكلوريد.

٣ – يكفى – عادة – تركيز ١–٣ ملى مولار من كل من الكالسيوم، والكبريتات، والفوسفات، والمغنيسيوم.

٤ – يستعمل الحديد فى صورة مخلبية مع الـ diamine tetra acetic acid، حيث يبقى ميسرًا حتى ولو ارتفع pH البيئة إلى ٨,٠.

جدول (٢–١): تركيز مختلف الأملاح غير العضوية فى بعض بيئات مزارع الأنسجة.

الملح	MS	B_5	N_6
العناصر الكبرى (بالملى مولار)			
Ca	٣	١,٠	١,١
Cl	٦	٢,٢	—
K	٢٠,١	٢٥	٣١
NH_4	٢٠,٦	٢	٦,٦
NO_3	٣٩,٤	٢٥	٢٨
PO_4	١,٢٥	١,١	٢,٩٤
SO_4	١,٨	—	٠,٢
Mg	١,٥	١,٠	٠,٧٥
العناصر الصغرى (بالميكرومول)			
B	١٠٠	٥٠	٢٦
Co	٠,١١	٠,١	٠,١١
Cu	٠,١	٠,١	—
Fe	١	١	١
I	٥	٤,٥	٤,٨
Mn	٩٢,٥	٦٠	١٩,٥
Mo	١	١	—
Zn	٣٠	٧	٥,٢

الكربون ومصادر الطاقة

تعد السكروز والجلوكوز هما مصدرا الطاقة الرئيسيين المستعملين فى مزارع الأنسجة، ويمكن استعمال الفراكتوز، إلاّ أنه أقل كفاءة. يتحلل السكروز فى البيئة — سريعا — إلى جلوكوز وفراكتوز، حيث يستهلك الجلوكوز فى البداية ويليه الفراكتوز. يستعمل السكرور - عادة - بتركيز ٢ ٥٪.

ومن بين المواد الكربوهيدراتية الأخرى التى اختبر تأثيرها اللاكتوز، والمالتوز، والجالاكتور، والنشا، ولكنها كانت جميعا أقل كفاءة عن السكروز والجلوكوز هذا وتحتوى معظم البيئات على الـ myo-inositol بتركيز حوالى ١٠٠ مجم/لتر، لاجل تحسين نمو الخلايا

الفيتامينات

تقوم النباتات بتمثيل الفيتامينات التى تلزم لنموها وتطورها. إلاّ أن الخلايا النباتية فى المزارع تكون فى حاجة إلى مصدر للفيتامينات بعد فيتامين B_1 (الثيامين)، الفيتامينات التى تحتاج اضافتها ويتحسن النمو بإضافة كل من حامض النيكوتين وفيتامين B_6 (البيريدوكسين) وتحتوى بعض البيئات على الفيتامينات حامض البانتوثنك pantothenic acid، والبيوتين، وحامض الفوليك، وبارا أمينو حامض البنزويك *p*-amino benoic acid، وكلوريد الكولين choline chloride، والريبوفلافين riboflavine، وحامض الأسكوربيك

منظمات النمو

تعد الأوكسينات والسيتوكينينات أهم فئات منظمات النمو المستعملة فى بيئات مزارع الأنسجة، بينما الفئات الأخرى، مثل الجبريللينات، وحامض الأبسيسك، والإثيلين .. إلخ أقل أهمية ومن بين منظمات النمو المبينة فى جدول (٢-٢)، فإن إندول حامض الخليك IAA، والزياتين هما الهرمونان الطبيعيان الوحيدان.

جدول (٢-٢) منظمات النمو المستخدمة فى بيئات الزراعة.

الاسم	التركيب الكيميائى	الوزن الجزيئى
p-Chlorophenoxy acetic acid	$C_8H_7O_3Cl$	١٨٦.٦٠
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	$C_8H_6O_3Cl_2$	٢٢١ ٠٠
Indole-3 acetic acid	$C_{10}H_9NO_2$	١٧٥ ٢
Indole-3 butyric acid	$C_{12}H_{15}NO_2$	٢٠٣,٢
α-Naptbalene acetic acid	$C_{12}H_{10}O_2$	١٨٦.٢
β-Naphthoxy acetic acid	$C_{12}H_{10}O_3$	٢٠٢,٣
Adenine	$C_5H_5N_5.3H_2O$	١٨٩,١
Adenine sulphate	$(C_5H_5N_5)_2.H_2SO_4.2H_2O$	٤٠٤,٤
Benzyl adenine	$C_{12}H_{11}N_5$	٢٢٥ ٢
N-isopentenylamino purine	$C_{10}H_{13}N_5$	٢٠٣ ٣
Kinetin	$C_{10}H_9N_5O$	٢١٥ ٢
Zeatin	$C_{10}H_{13}N_5O$	٢١٩ ٢
Gibberellic acid	$C_{19}H_{22}O_6$	٣٤٦,٤
Abscisic acid	$C_{15}H_{20}O_4$	٢٦٤ ٣
Colchicine	$C_{22}H_{25}NO_6$	٣٩٩,٤

ونعرض – فيما يلى – قائمة بأهم الأوكسينات النافعة الاستعمال فى مزارع الأنسجة:

الاسم الكيميائى	الاسم العادى أو المختصر
2,4-dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D
2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T
2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid	Dicamba
Indole-3-acetic acid	IAA
Indole-3-butyric acid	IBA
2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid	MCPA
1-naphthylacetic acid	NAA
2-naphthyloxyacetic acid	NOA
4-amino-2,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram

كما نقدم – فيما يلي – قائمة بأهم السيتوكينينات الشائعة الاستعمال في مزارع الأنسجة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الاسم العادى أو المختصر	الاسم الكيميائى
[أ]BAP	6-benzylaminopurine
[ب]2iP (IPA)	[N^6-(2-isopentyl)adenine]
[أ]Kinetin	6-furfurylaminopurine
[جـ]Thidiazuron	1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea
[ب]Zeatin	4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine

أ – محضر صناعيًا.

ب – طبيعى

جـ – substituted phenylurea-type

وتظهر فى جدول (٢–٣) قائمة ببعض منظمات النمو الأخرى الأقل استعمالا فى مزارع الأنسجة

جدول (٢–٣): منظمات نمو نباتية أخرى أقل استعمالاً فى مزارع الأنسجة (عن Dixon & Gonzalez ١٩٩٤).

المركب	الاسم المختصر أو العادى	الوزن الجزيئى	الوظيفة/النشاط
Chlorocholine chloride[a]	CCC	158.1	مثبط لتمثيل حامض الجبريلليك
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea[a]	4-CPPU	247.7	شبيه بالسيتوكينين
3,6-Dichloroanisic acid	Dicamba	221.0	أوكسين
2-Naphthoxyacetic acid	NOA	202.2	أوكسين
Phenylacetic acid[a]	PAA	136.2	أوكسين
4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram	241.5	شبيه بالأوكسين
Thidiazuron[a]	TDZ	220.2	شبيه بالسيتوكينين
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.2	أوكسين
Zeatin riboside[a]	ZR	363.4	سيتوكينين

a = يوصى بتعقيمه بالترشيح

الأوكسينات

إن من أهم تأثيرات الأوكسينات تحفيزها للانقسام الخلوى وتكوين الكالوس، فهو يسبب انقسام الخلايا واستطالتها وانتفاخ الأنسجة، وتكوين الجذور العرضية، كما أنه غالبًا ما يثبط النمو الجانبى (الإبطى) والنمو الخضرى العرضى. وفى التركيزات المنخفضة من الأوكسينات يسود تكوين الجذور العرضية، بينما يتوقف تكوين الجذور العرضية ويتكون الكالوس فى التركيزات العالية.

وأكثر الأوكسينات استخدامًا فى مزارع الأنسجة، وأكثرها كفاءة الـ 2,4-D، كما يستخدم كذلك كل من الـ NAA، والـ IAA، و IBA، والـ *p*CPA، والـ trichlorophenoxy acetic acid (اختصارًا: 2,4,5-T)، والبكلورام picloram، وهو 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid

السيتوكينينات

تشتق السيتوكينيات من الأدنين، ولها دور هام فى حث النمو الخضرى، وأكثرها استخدامًا الكينتين، والبتريل أدنين (BA)، والبنزيل أمينو بيورين (BAP)، والـ (2iP) isopentenyladenine، وجميعها تحفز الانقسام الخلوى إذا ما أضيفت مع أحد الأوكسينات وفى التركيزات العالية (١-١٠ مجم/لتر) .. فإنها تحفز النمو الخضرى العرضى وتثبط النمو الجذرى. كما أنها تحفز النمو الجانبى (الإبطى) بتقليلها للسيادة القمية

وتخزن المحاليل القياسية للكينتين وإندول حامض الخليك فى زجاجات غير منفذة للضوء (أو زجاجات مغطاة بورق أسود) وتحفظ فى الظلام لأنها لا تكون ثابتة فى الضوء.

الجبريللينات

تستخدم الجبريللينات — عادة – فى تجديد النمو النباتى، كما يعد الـ GA_3 ضروريًا لمزارع القمم الميرستيمية لبعض الأنواع. وعمومًا .. فإن الجبريللينات تحث استطالة السيقان والنمو الميرستيمى وكذلك نمو البراعم فى البيئات، إلا أنها تثبط النمو العرضى لكل من الجذور والسيقان.

حامض الأبسيسك

يعد حامض الأبسيسك ضروريًا لحث تكوين الأجنة فى بيئات الزراعة (عن Chawla ٢٠٠٠)

الإضافات العضوية

١ – النيتروجين العضوى:

تكون الخلايا المزروعة قادرة – عادة – على تمثيل كل الأحماض الأمينية الضرورية لها، إلاّ أنه غالبًا ما تُفيد إضافة مصدرًا للنيتروجين العضوى فى صورة أحماض أمينية، مثل الجلوتامين والأسبارجين، وبعض النيوكليوتيدات، مثل الأدنين وفى حالة مزارع الخلايا تفيد كثيرًا تزويد البيئة بنحو ٠,٢–١,٠ جم/لتر من الـ casin hydrolysate، وفى بعض الحالات قد يحل الـ L-glutamine بتركيز يصل إلى ٨ ملى مولار (١٥٠ مجم/لتر) محل الـ casein hydrolysate.

عند إضافة الأحماض الأمينية إلى بيئة الزراعة فإنه يجب استعمالها بحرص إذا إنها قد تصبح مثبطة للنمو. وعادة .. فإن الأحماض الأمينية التى تضاف إلى البيئات (وتركيزها بالملليجرام/لتر بين قوسين) هى كما يلى الجليسين (٢)، والأسبارجين (١٠٠)، والتيروزين (١٠٠)، والأرجانين (١٠)، والسيستين cysteine (١٠)، وأحيانًا يضاف – كذلك – كبريتات الأدنين adenine sulphate إلى بيئات الآجار بتركيز ٢–١٢٠ مجم/لتر للمساعدة فى عملية التكوين التشكُّلى morphogensis.

٢ – الأحماض العضوية:

لا يمكن للخلايا النباتية الاعتماد على الأحماض العضوية كمصدر وحيد للكربون، إلاّ أن إضافة أحماض دورة الـ TCA، مثل الستريك، والماليك، والصكّنيك، والفيوماريك تسمح بنمو الخلايا النباتية على الأمونيوم كمصدر وحيد للنيتروجين ويمكن للخلايا تحمل تركيزات تصل إلى ١٠ ملى مولار من الحامض. كذلك فإن إضافة حامض البيروفيك تحفز نمو الخلايا المزروعة بكثافة منخفضة.

٣ - مركبات معقدة

اختبرت إضافة عديد من المستخلصات، مثل الـ protein hydrolysate، ومستخلص الخميرة، ومستخلص المولت malt extract (مستخلص الشعير المستنبت)، ولبن (إندوسبرم) جوز الهند، وعصير البرتقال، وعصير الطماطم، وقد كانت أكثرها فائدة الـ protein hydrolysate ولبن جوز الهند. ويتعين تجنب استخدام التركيزات العالية من تلك الإضافات حتى لا تضر بالنمو. ويتراوح التركيز المناسب — عادة — بين ٠,١ و ١٠ جم/لتر، بينما يستخدم لبن جوز الهند — عادة — بتركيز ٢٪-٥٪ (حجم إلى حجم). وعمومًا .. فإن الاتجاه الغالب هو نحو استخدام بيئات ذات مكونات محددة دون الاعتماد على إضافات من مستخلصات عضوية معقدة (عن Chawla ٢٠٠٠).

صفا ويحضر محلول لبن جوز الهند للاستعمال في مزارع الأنسجة، كما يلي:

١ — يصفى اللبن (الإندوسبرم) من عدد كبير من ثمار جوز الهند، علمًا بأن العدد الكبير للثمار يفيد فى تقليل التباينات بين الثمار — فى مكونات اللبن ويتعين عدم استعمال لبن أى ثمار يبدو عليه تغيرات فى لونه أو رائحته

٢ يتم التخلص من بروتين اللبن بغليه لمدة ١٠ دقائق.

٣ — يرشح الناتج باستعمال ورق ترشيح Whatman No 1

٤ — يتم إجراء التعقيم فى الأوتوكليف بعد تجزئة الراشح إلى كميات لا يزيد حجم كل منها عن ١٠٠ مل.

٥ — تخزين الناتج على حرارة —٧٠م لحين الحاجة إليه.

٦ — عند الاستعمال يفكك اللبن المجهز ويضاف إلى بيئة الزراعة بتركيز حوالى ١٠٪ حجما بحجم (عن Dixon & Gonzales ١٩٩٤)

كذلك يستخدم الفحم النباتى المنشط بتركيز ٠,٢٪-٣ ٠٪ (وزن إلى حجم) عندما تشكل المركبات الفينولية مشكلة فى مزارع الأنسجة، حيث يفيد الفحم — كذلك — فى ادمصاص الصبغات البنية والسوداء الضارة، وفى تثبيت الـ pH.

وإلى جانب الفحم النباتى المنشط، فإن الـ polyvinylpurrolidone (بتركيز ٢٥٠-١٠٠٠ مجم/لتر)، وحامضى الستريك والأسكوربيك (بتركيز ١٠٠ مجم/لتر لكل منهما) تستعمل فى منع أكسدة الفينولات.

وأحيانًا يضاف المركب الفينولى phloroglucinol لتثبيط الإنزيم IAA oxidase المسئول عن تحلل الـ IAA

مركبات التجلُّل

إن مركبات التجلُّل gelling agents هى المسئولة عن تصلب بيئة الزراعة وتحولها إلى جلّ، ويعد الآجار agar — الذى يُتحصل عليه من الأعشاب البحرية — هو أكثرها استعمالاً، وهو مركب عديد التسكر ذات وزن جزيئ مرتفع وعند إذابة الآجار فى الماء فإنه يكون جل يربط إليه الماء ويدعص المركبات، وكلما زاد تركيز الآجار كلما زادت قدرته على ربط الماء

يستعمل — عادة — المنتج Difco Bacto agar بتركيز ٠,٦-١٠٪ (وزن إلى حجم)، ولكن تستعمل - كذلك صورا أخرى من الآجار، مثل الآجاروز agarose، و الـ phytagar، والـ flow gara

قد يضر استعمال تركيزات عالية من الآجار فى بيئات الزراعة، حيث تؤدى إلى شده تصلب البيئة وعدم سماحها بانتشار العناصر المغذية إلى الأنسجة

وإلى جانب الآجار، فإنه قد تستعمل أحيانًا البدائل التالية:

١ الألجينيت alaginate يستعمل خاصة فى مزارع البروتوبلاست

٢ — الجل رابت gelrite يستعمل — عادة — بتركيز ٠,٢٪، وهو يجعل البيئات رائقة وشفافة، ويلزم لتكوينه الجل تواجد كاتيونات ثنائية الشحنة مثل الـ Mg^{++}، والـ Ca^{++}

٣ — البوليمر المخلق biogel P200 وهو polyacrylamide.

هذا .. ويمكن الزراعة فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار، ويتم فيها توفير دعم فيزيائى للنمو بإحدى الوسائل التالية:

١ — الصوف الزجاجى أو الصوف الصخرى أو الفوم.

٢ — قنطرة من ورق ترشيح توضع فى البيئة السائلة.

٣ – كرات زجاجية صغيرة

٤ – قطعة من الإسفنج الفسكوزى viscose sponge توضع تحت ورقة ترشيح لتحمل البيئة السائلة (عن Chawla ٢٠٠٠).

وحدات التعبير عن التركيز فى بيئات الزراعة

يعبر عن التركيز فى بيئات الزراعة بإحدى طريقتين، كما يلى

١ – التركيز بالملليجرام فى اللتر

يعبر عن التركيز بالملليجرام فى اللتر (mg/l)، فمثلاً

10^{-6} = 1.0 mg/l or 1 part per million (ppm)

10^{-7} = 0.1 mg/l

10^{-9} = 0.001 mg/l or 1 ug/l

٢ – التركيز المولارى:

يحتوى المحلول المولارى على عدد من جرامات المادة ساو لوزنها الجزيئ، فمثلاً

1 molar (M) = the molecular weight in g/l

1mM = the molecular weight in mg/l or 10^{-3}M

1uM = the molecular weight in ug/l or 10^{-3}mM

ويجرى التحويل من ملى مولار (mM) إلى جزء فى المليون (mg/l) كما يلى:

مثلاً الوزن الجزيئى للأوكسين 2,4-D هو: ٢٢١,٠

إذا فإن اللتر من محلول مولارى من الـ 2,4-D يحتوى على ٢٢١ جرامًا

وبذا يحتوى اللتر من المحلول الملى مولارى (1mM) من الـ 2,4-D على ٠,٢٢١ جم، أى ٢٢١ مجم

كما يحتوى اللتر من المحلول الميكرومولارى (1uM) من الـ 2,4-D على ٠,٠٠٠٢٢١ جم، أى ٠,٢٢١ مجم

كما يجرى التحويل من جزء فى المليون (mg/l) إلى ملى مولارى (mM) كما يلى:

مثلا الوزن الجزيئ لـ $CaCl_2\ 2H_2O$ هو: