أنواع مزارع الأنسجة

تقسم مزارع الأنسجة tissue culture إلى الأنواع التالية

١ - مزارع البذور seed culture.

ترجع أهمية مزارع البذور إلى ضرورة استعمالها عندما تؤخذ الأجزاء النباتية المستعملة فى مزارع الأنسجة (الـ explants) من نباتات تُنتج فى البيئات، وكذلك عند إكثار الأوركيد orchid

٢ - مزارع الأجنة embryo culture.

٣ — مزارع الخلايا cell culture

٤ — مزارع الكالس callus culture.

٥ — مزارع الأعضاء organ culture . وهى قد تكنى باسم العضو المزروع، مثل.

أ — مزارع الميرستيم meristem culture.

ب — مزارع القمة الخضرية shoot tip culture

جـ — مزارع الجذور root culture.

د — مزارع النيوسيلة nucellus culture.

هـ — مزارع الإندوسبرم endosperm culture

ز — مزارع البويضات ovule culture.

حـ — مزارع المبايض ovary culture

ط — مزارع حبوب اللقاح pollen culture.

ى — مزارع المتوك anther culture.

٦ — مزارع البروتوبلاست protoplast culture.

الجزء النباتى المزروع والزارعة

الجزء النباتى المزروع (الـ explant)

يطلق اسم explant على أى قطعة من النسيج النباتى يتم فصلها من النبات الأصلى لأجل زراعتها فى بيئة الزراعة فى مزارع الأنسجة

ويتأثر اختيار الجزء النباتى الأنسب للزراعة فى البيئات بعديد من العوامل، نوجزها فيما يلى:

١ — عمر النسيج النباتى

من المعروف أن الأنسجة الأصغر عمرًا — فسيولوجيًا — تكون -- بصفة عامة — أكثر استجابة للزراعة فى البيئات الصناعية. وفى كثير من الأحيان لا تكوّن الأنسجة المسنة خلايا كالس قادرة على إعادة التجديد كذلك فإن الأنسجة الأحدث تكون أسهل فى تطهيرها سطحيًا وأسرع فى نموها واستنباتها بعد زراعتها

٢ - فصل النمو

نجد أن البراعم أو النموات التى تؤخذ فى فصل الربيع - عندما تكون فى مرحلة النمو القوى — تكون أكثر استجابة للزراعة فى البيئات عن البراعم الساكنة، فالأنسجة الساكنة لا تستجيب للزراعة إلاّ بعد انتهاء حالة السكون فيها كذلك فإن معدلات التلوث تزداد مع تقدم فصل الصيف، وقد تصل إلى ١٠٠٪ فى فصلى الخريف والشتاء

٣ - حجم الجزء النباتى

القاعدة هى أنه كلما كان الجزء النباتى المزروع (الـ explant) أصغر حجمًا كلما ازدادت صعوبة زراعته؛ حيث يكون من الضرورى تزويد بيئات الزراعة بعديد من المكونات لنجاح الزراعة، بينما نجد أن الأجزاء النباتية الكبيرة غالبا ما تحتوى على كميات أكبر من الغذاء المخزن بها وهرمونات تساعدها فى نموها فى البيئات الصناعية

٤ — حالة النباتات التى تؤخذ منها الأجزاء التى تستعمل فى الزراعة

يوصى دائما بأخذ الأجزاء النباتية التى تستعمل فى الزراعة من نباتات خالية تماما من جميع الإصابات المرضية والحشرية ولم يسبق تعرضها لأى حدٍّ بيئى

٥ — الهدف من إنتاج مزرعة الأنسجة

نجد - على سبيل المثال — أنه عندما يكون الهدف هو الإكثار الدقيق فإن الـ explant المفضل يكون هو البرعم القمى أو الجانبى أو القمة الخضرية ولأجل إنتاج الكالس يفضل استعمال أجزاء من القلقات أو السويقة الجنينية السفلى أو الساق أو الأوراق أو الجنين، وتعد أنسجة البادرات الناتجة من البذور المزروعة فى ظروف

معقمة مثالية لأجل إنتاج الكالس. هذا بينما تعد الأنسجة الورقية التى تؤخذ من تلك البادرات النامية فى ظروف معقمة هى الأفضل لأجل عزل البروتوبلاست. ولإنتاج نباتات أحادية أو كالس تفضل مزارع المتوك أو حبوب اللقاح

ويبين شكل (٢-٢) مختلف أنواع الأجزاء النباتية (الـ explants التى يمكن استخدامها فى مزارع الأنسجة

التطهير السطحى للأجزاء النباتية المستخدمة فى الزراعة

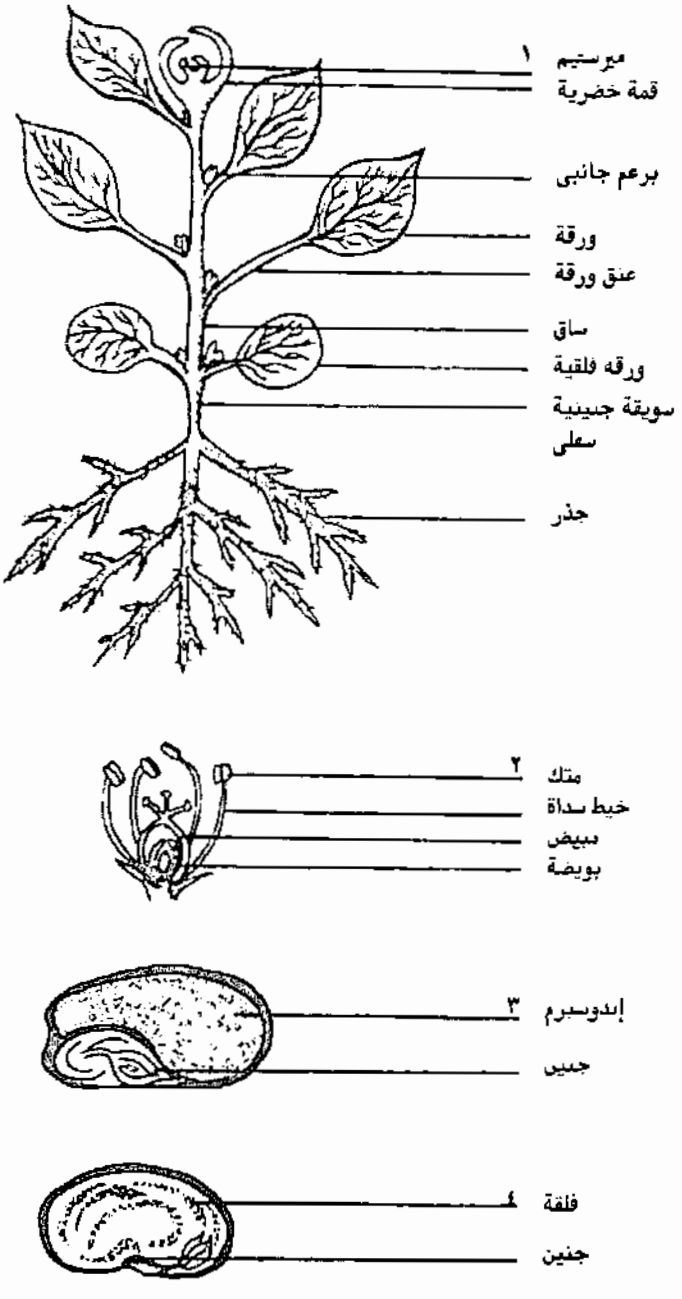
يمكن تلخيص طريقة التطهير السطحى للـ explant المطلوب زراعته، فيما يلى

١ — يغسل الـ explant فى ماء دافئ بالصابون، ثم يشطف بماء الصنبور عدة مرات. وتعد هذه الخطوة ضرورية ومفيدة بالنسبة لكل من الساق، والأوراق، والقمة الخضرية، حيث تؤدى إلى التخلص من الملوثات السطحية

٢ - يفيد أحيانًا شطف سريع بالكحول أو مسح النسيج بقطعة من الشاش المبلل بالكحول، وخاصة عندما تكثر الشعيرات بالنسيج أو يكون مغطى بغطاء شمعى سميك

٣ — يشطف الـ explant فى محلول من الكلورين القاصر للألوان الذى يستعمل فى تبييض الملابس، على أن يحضر المحلول للاستعمال أولا بأول، ويفضل دائمًا إضافة نقطة واحدة أو نقطتان من أى منظف صناعى سائل أو أى مادة مبللة wetting agent، مثل توين ٢٠ tween 20 لكل ١٠٠ مل من محلول التطهير يحضر محلول التطهير بتركيز ١٠٪ بإضافة ١٠ مل من محلول الكلورين التجارى (مثل الكلوراكس) إلى مخبار زجاجى، وإكمال حجم المحلول إلى ١٠٠ مل. وعندما تجرى عملية التطهير فى أنابيب زجاجية يتعين تطهير أغطية الأنابيب كذلك، مع رج محتوى الأنبوبة من الـ explant ومحلول الكلورين برفق على فترات واستمرار ذلك لمدة ٥-٣٠ دقيقة. ونظرا لأن محلول الكلورين يفقد فاعليته بمرور الوقت، لذا .. يلزم دائمًا استعمال تحضيرات جديدة منه.

٤ — يصفى محلول التطهير، وتشطف الـ explant بالماء المعقم ٣-٥ مرات، مع إجراء تلك الخطوة فى غرفة عزل hood



شكل (٢-٢) تخطيط يبين مختلف الأجزاء النباتية (explants التى يمكن الحصول عليها من (١) النبات، (٢)، الزهرة، (٣) بذرة وحيدة الفلقة، (٤) بذرة ذات فلقتين (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

هذا وتتباين الـ explants فى مدى تحملها لتركيزات محلول الكلورين ومدة التعريض له، وفى مدى الحاجة لزيادة التركيز أو مده التعريض للمحلول فبينما يكفى الأنسجه الرقيقة الغمس لمدة ١٠ دقائق فى محلول كلورين بتركيز ١٠٪، فإن بعض البذور قد تتطلب ٢٠-٦٠ دقيقه فى محلول كلورين بتركيز ٣٠-٥٠٪ ويجب أن نتذكر أن أى سطح نباتى مقطوع مثل السيقان أو الأوراق سوف يُضار من عمليه التعقيم السطحى تلك

ومن أهم المواد التى تستخدم فى التطهير السطحى فى مجال زراعة الأنسجة، ما يلى:

١ - هيبوكلوريت الصوديوم

يتوفر هيبوكلوريت الصوديوم sodium hypochlorite (وهو NaOCl) فى محلول تبييض الملابس التجارى بنسبة حوالى ٢٥ ٥٪ حجم بحجم وعموما يخفف محلول تبييض الملابس بالماء إلى ٥-٢٥٪ حجما بحجم، مع إضافة نقطتين من توين ٢٠ لكل ١٠٠ مل من المحلول المخفف وتتراوح مدة المعامله - عادة - بين ٥، و ٣٠ دقيقه يتبعها السطف بالماء المعقم خمس مرات ويجب تحضير محلول التطهير أولا بأول قبل الاستعمال نظرا لتطاير غاز الكلور منه ويفيد ضبط pH محلول التطهير عند ٧٠ باستعمال ٥ مولار حمض أيدروكلوريك يفيد ذلك فى تقليل سرعة فقد غاز الكلور منه

٢ - هيبوكلوريت الكالسيوم

يحضر محلول هيبوكلوريت الكالسيوم calcium hypochlorite [وهو $Ca(OCl)_2$] بتركيز ٨ ٠٪ (وزنا بحجم) للتطهير، وذلك بإذابة ٨ جم من المركب فى لتر من الماء مع التقليب لمدة ٥ ١٠ دقائق، ثم يترك ليرسب منه ما لم يذوب. ثم يؤخذ الرائق ويضاف له حجم مماثل من الماء، ويضاف إلى المحلول الناتج نقطتان من توين ٢٠، وتعامل به الأنسجة النباتية المطلوب تطهيرها لمدة ٥ -٣٠ دقيقة

٣ - كحول الإثيل أو كحول الأيزوبروبيل

يستعمل أى من الكحولين بتركيز ٧٠٪ حجما بحجم، حيث يمسح بأى منهما

السطح النباتى، كما قد يغمس فيهما الجزء النباتى لمدة دقيقة واحدة إلى خمس دقائق قبل أو بعد تطهيره بهيبوكلوريت الصوديوم.

٤ — فوق أكسيد الأيدروجين:

يعتبر فوق أكسيد الأيدروجين hydrogen peroxide (وهو H_2O_2) مادة مؤكسدة قوية يمكن استعمالها بتركيز ٣-١٠٪ حجم بحجم لمدة دقيقة إلى ثلاث دقائق قبل الشطف بالماء المعقم منفردًا، أو مع المعاملة بالمطهرات الأخرى. هذا .. إلاّ أن التفاعل بين هيبوكلوريت الصوديوم وفوق أكسيد الأيدروجين يعد سامًا للنسيج النباتى؛ ولذا يتعين شطف النسيج جيدًا بالماء بين معاملتى المركبين.

٥ — غاز الكلورين:

يعد غاز الكلورين فعّالاً فى تطهير البذور الجافة

٦ — داى كلوروأيزوسيانوريت الصوديوم

يعد داى كلوروأيزوسيانوريت الصوديوم sodium dichloroisocyanurate أقل سمية للأنسجة النباتية الحساسة لأى من هيبوكلوريت الصوديوم أو الكالسيوم، ولا يحتاج الأمر إلى شطف النسيج بالماء بعد المعاملة.

هذا وتتوفر مركبات أخرى تفيد فى الحد من التلوث، مثل مركب isothiazolone biocide ومضادات الحيوية. مثل الجنتاميسين gentamicin، والأمبسللين ampicillin (عن Smith ٢٠٠٠).

ويعطى جدول (٢-١٤) مزيدًا من المعلومات عن المركبات المستخدمة فى التطهير السطحى للأجزاء النباتية المستعملة فى الزراعة

تحضين مزارع الزراعة

يتم تحضين مزارع الأنسجة على أرفف فى حجرات خاصة على درجة حرارة ثابتة تتراوح — غالبًا — بين ٢١، و ٢٤م حسب نوع المزرعة والنوع النباتى المزروع، كما تكون تلك الأرفف مجهزة بلمبات فلورسنتية يمكن عن طريقها التحكم فى شدة الإضاءة التى تعرض لها المزارع، ومدة التعريض اليومية للإضاءة.