

الفصل السابع عشر

زراعة الأنسجة

أمور عامة

مختبر زراعة الأنسجة

تجرى زراعة الأنسجة تحت ظروف معقمة فى مختبرات خاصة ، يجب أن تتوفر فيها شروط معينة ، وأن تجهز تجهيزاً خاصاً ، فيجب أن يحتوى المختبر على غرفة خاصة لتحضير البيئات ، وأخرى لزراعة الأنسجة وثالثة لحضانة المزارع وحفظها . ويجب أن يزود المختبر بقائمة طويلة من مختلف أنواع الزجاجيات ، والمركبات الكيميائية ، والحضانات ، والأدوات ، والأجهزة المختبرية العادية (التي تتوفر - عادة - فى مختبرات أمراض النبات) ، بالإضافة إلى حيزٍ مبرّد مناسب فى الثلاجات لتخزين المزارع والبيئات . ويتعين أن يكون المختبر منيعاً ضد الأتربة ، التى يمكن أن تلوث المزارع والبيئات فى حالة انتشارها فى هواء المختبر . كما يجب أن تتوفر فى المختبر الأفران التى تستخدم فى تعقيم الزجاجيات ، وأوتوكليف لتعقيم البيئات ، ومختلف أنواع المطهرات السطحية (مثل هيبوكلوريد الصوديوم أو الكالسيوم ، وفوق أكسيد الأيدروجين ، وبنترات الفضة ، وكلوريد الزئبق ، والمضادات الحيوية) ، لتطهير العينات النباتية سطحياً

وفيما يلي قائمة بأهم المعدات التي يجب أن تتوفر في مختبر زراعة الأنسجة :

- ١- بوارق مخروطية بأحجام : ١٠٠ ، و ٢٥٠ أو ٥٠٠ مل ، و ١ ، و ٥ لترات .
- ٢- بوارق معيارية بأحجام : ٥٠٠ ، ل ، و ١ ، و ٢ ، و ٢ لترات .
- ٣- مخابير مدرجة بأحجام : ٢٥ ، و ٥٠ ، و ١٠٠ ، و ٥٠٠ مل ، و لتر واحد .
- ٤- ماصات مدرجة بأحجام : ١ ، و ٢ ، و ٥ ، و ١٠ مل .
- ٥- ماصات باستير .
- ٦- أوعية مزارع (أنابيب المزارع ، وزجاجات بأحجام مختلفة لها أغطية «بقلاروظ» ، وأطباق بتري) .
- ٧- «دلاء» بلاستيكية لنقع الزجاجيات قبل غسلها .
- ٨- حجرة أو حيز خاص صغير مزود بالهواد الساخن ؛ لتجفيف الأوعية ، والزجاجات بعد غسلها .
- ٩- فرن لتجفيف الأوعية والزجاجيات ، وتعقيم الزجاجات .
- ١٠- سلال سلكية ، توضع بها أوعية البيئات الصغيرة في أثناء تعقيمها ، والزجاجيات الصغيرة في أثناء تجفيفها .
- ١١- جهاز لتقطير الماء .
- ١٢- أوعية بلاستيكية (بحجمي : ١٠ ، و ٢٠ لترًا) ؛ لتخزين الماء المقطر .
- ١٣- ميزانان ؛ أحدهما لوزن الكميات الصغيرة ، والثاني لوزن الكميات الكبيرة نسبيًا .
- ١٤- قرص ساخن hot plate مع قلاب مغناطيسي magnetic stirrer ؛ لإذابة المركبات الكيميائية .
- ١٥- مضخة تفريغ exhaust pump لتسهيل عملية التعقيم بالترشيح .
- ١٦- قنينات بلاستيكية بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة .
- ١٧- ثلاجة لتخزين المركبات الكيميائية ، والمحاليل القياسية التي تحضر منها البيئات ، والعينات النباتية .
- ١٨- مجمدة لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول ، وبعض الإنزيمات ، ولبن جوز الهند ... إلخ .
- ١٩- جهاز توليد بخار steamer ؛ لإذابة الأجار والبيئات .

- ٢٠- جهاز قياس الـ pH لضبط pH البيئات والمحاليل .
- ٢١- أوتوكليف (جهاز تعقيم بالبخار تحت ضغط) ، أو قنور طهى تحت ضغط ؛ لتعقيم البيئات .
- ٢٢- قرص ساخن منظم الحرارة heat - regulated hot plate ؛ للتعقيم بالبخار فى قنور الطهى تحت ضغط .
- ٢٣- أغشية مرشحات تعقيم ومواسكها ؛ لتعقيم المحاليل بالترشيح .
- ٢٤- حقن بلاستيكية معقمة ؛ لغرض الاستعمال مع المحاليل المعقمة بالترشيح .
- ٢٥- عربة صغيرة مزودة بصوانٍ مناسبة ؛ لنقل البيئات والأدوات .
- ٢٦- حجرة محكمة الغلق Inoculation chamber يتجدد فيها الهواء بعد ترشيحه ؛ لاستخدامها فى كل العمليات التى تجرى فى ظروف معقمة .
- ٢٧- لمبة (شعلة) كحول spirit Lamp أو مصباح بنزن bunsen burner ؛ لتعقيم الأدوات باللهب .
- ٢٨- رشاشة صغيرة atomizer ؛ لرش الكحول داخل حجرة العزل والتلقيح .
- ٢٩- زجاجات ذات أغطية «بقلووظ» ؛ لتعقيم العينات النباتية .
- ٣٠- حامل للأدوات المعقمة .
- ٣١- ملاقط كبيرة ذات أطراف غير حادة للزراعة والتلقيح .
- ٣٢- ملاقط ذات أطراف حادة ؛ لنزع بشرة الأوراق .
- ٣٣- إبر دقيقة للتشريح .
- ٣٤- مشارط لتقطيع الأنسجة النباتية .
- ٣٥- ملاوق لزراعة الأنسجة .
- ٣٦- مثقاب فلين لأخذ عينات أسطوانية من الأنسجة بحجم ثابت .
- ٣٧- مجهر ثنائى العينين binocular ؛ لتجزئ النباتات المجهرية الحجم .
- ٣٨- مكيفات هواء للمحافظة على درجة حرارة ثابتة لحجرة المزارع .
- ٣٩- هزاز للمزارع السائلة .
- ٤٠- مناخل من الصلب الذى لا يصدأ ، ذات ثقوب بأقطار مختلفة ؛ لفصل تجمعات الخلايا التى تكون بأحجام مختلفة .
- ٤١- جهاز طرد مركزى صغير ، لترسيب الخلايا ؛ بغرض تحديد حجم النمو الخلوى ،

ولتنظيف البروتوبلازم .

٤٢- هيموسيتوميتر Haemocytometer لعدّ الخلايا .

٤٣- شرائح زجاجية ذات تجويف : لتعليق المزارع السائلة فى أثناء فحصها .

٤٤- شرائح زجاجية عادية وأغطية شرائح : لعمل تحضيرات مجهرية من الخلايا

والأنسجة .

٤٥- مجهر لفحص الخلايا والأنسجة .

بيئات الزراعة

يجب أن تتوفر فى بيئات الزراعة Culture Media كافة الاحتياجات الغذائية والهرمونية التى تلزم الأنسجة وتميزها . وتختلف هذه الاحتياجات -كثيراً- ليس فقط من نوع نباتى إلى آخر ، وإنما أيضاً من جزء إلى آخر فى النبات الواحد ؛ وعليه .. فإنه يلزم عند العمل على نبات جديد أن يبدأ الباحث بتحديد البيئة المناسبة لهذا النبات . وقد أمكن التوصل إلى عدد من البيئات القياسية (جدول ١٧-١) ، التى قد يمكن استخدام أى منها مباشرة ، أو بعد إدخال التعديلات المناسبة عليها ؛ لتصبح أكثر ملاءمة للنوع النباتى الذى يعمل عليه المربى . ويبين جدول (١٧-٢) تركيز مختلف العناصر فى كل من البيئات التى جاء ذكرها فى جدول (١٧-١) .

ويفضل دائماً تجريب ثلاثة مستويات - منخفض ، ومتوسط ، ومرتفع - من الأنواع الأربعة من المركبات التى تدخل فى تركيب بيئات الزراعة (وهى المركبات المعدنية ، والأوكسينات ، والسيتوكينينات ، والمغذيات العضوية) ؛ وبذا .. فإن التجربة الأولى لتحديد أفضل بيئة للزراعة .. يمكن أن تتضمن ٨١ معاملة (جدول ١٧-٣) . ويلي ذلك إجراء تجارب أخرى أصغر ؛ للتوصل إلى التركيز الأمثل من كل مركب ، مع استعمال أنواع مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات . وإذا استخدم الآجار فى تحضير بيئات الزراعة (يكون استخدامه غالباً بنسبة ٠,٨% - ١,٠%) .. تجب مراعاة ما يحتويه الآجار من عناصر (خاصة الكالسيوم والمغنيسيوم والعناصر الدقيقة) على صورة شوائب (جدول ١٧-٤) . هذا .. ويستخدم فى تحضير بيئات الزراعة محاليل قياسية ، يحتوى كل منها على تركيزات عالية نسبياً لعدد من المركبات الكيمائية ، كما هو مبين فى جدول (١٧-٥) بالنسبة لبيئة Murashige & Skoog .

جدول (١٧ - ١) : البيانات القياسية المستخدمة في مزارع الأنسجة (١)

المكونات	البيئات (الكميات بالجزء في المليون) (ب)						
	White's (ج)	Heller's (د)	MS (هـ)	ER (و)	B (ز)	Mitsch's (ح)	NT (ط)
غير العضوية							
NH ₄ NO ₃	—	—	1650	1200	—	720	820
KNO ₃	80	—	1000	1500	2537.5	900	900
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	—	75	440	440	150	—	220
CaCl ₂	—	—	—	—	—	160	—
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	750	250	370	370	216.5	185	1233
KH ₂ PO ₄	—	—	170	140	—	68	680
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	—	—	134	—	—
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	300	—	—	—	—	—	—
NaNO ₃	—	600	—	—	—	—	—
Na ₂ SO ₄	200	—	—	—	—	—	—
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	19	125	—	—	150	—	—
KCl	65	750	—	—	—	—	—
KI	0.75	0.01	0.83	—	0.75	—	0.83
H ₂ BO ₃	1.5	1	6.2	0.63	3	10	6.2
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	5	0.1	22.3	2.23	—	25	22.3
MnSO ₄ · H ₂ O	—	—	—	—	10	—	—
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	3	1	8.6	—	2	10	8.6
ZnSO ₄ · 4 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	8.6
Zn · Na ₂ · EDTA	—	—	—	15	—	—	—
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	—	—	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO ₃	0.001	—	—	—	—	—	—
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.01	0.03	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	—	—	0.025	0.0025	0.025	—	—
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	—	—	—	—	—	—	0.03
AlCl ₃	—	0.03	—	—	—	—	—
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	—	0.03	—	—	—	—	—
FeCl ₃ · 6 H ₂ O	—	1	—	—	—	—	—
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	—	—	—	—	—	—
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	—	—	27.8	27.8	—	27.8	27.8
Na ₂ · EDTA · 2 H ₂ O	—	—	37.3	37.3	—	37.3	37.3
Sequestrene 330Fe	—	—	—	—	28	—	—
العضوية							
Inositol	—	—	100	—	100	100	100
Nicotinic acid	0.05	—	0.5	0.5	1	5	—
Pyridoxine HCl	0.01	—	0.5	0.5	1	0.5	—
Thiamine HCl	0.01	—	0.1	0.5	10	0.5	1
Glycine	3	—	2	2	—	—	—
Folic acid	—	—	—	—	—	0.5	—
Biotin	—	—	—	—	—	0.05	—
Sucrose	2%	—	3%	4%	2%	2%	1%
D-Mannitol	—	—	—	—	—	—	12.7%

(أ) لم تعط بيانات منظمات النمو وبيئات الزراعة الخاصة لحالات معينة .

(ب) أعطيت تركيزات المانيتول والسكروز كنسب مئوية .

(ج) بيئة هوايت White .

(د) بيئة هالر Heller .

(هـ) بيئة مراهج وسكوج Murashige & Skoog .

(و) بيئة إيركسون Eriksson .

(ز) بيئة جامبورج Gamborg وآخرين .

(ح) بيئة نيتشه Nitsch .

(ط) بيئة ناجاتا وتاكيبا Nagata & Takeba .

جدول (١٧-٢) : تركيز الأيونات في الشبكات البنية في جبل (١٧-١)

الأيونات	المجموع	الشبكات						
		White's	Heller's	MS	ER	B ₁	Nitsch's NT	
NO ₃		3.33	7.05	39.41	33.78	25.00	18.40	10.69
NH ₄		—	—	20.62	15.00	2.00	9.00	10.30
Total N		3.33	7.05	60.03	48.79	27.03	27.40	29.99
P	mmol l ⁻¹	0.138	0.90	1.25	2.50	1.08	0.50	5.00
K		1.66	10.05	20.05	21.29	25.00	9.90	14.39
Ca		1.27	0.51	2.99	2.99	1.02	1.49	1.50
Mg		3.04	1.01	1.50	1.50	1.00	0.75	5.00
Cl		0.87	11.08	5.98	5.98	2.04	2.99	3.00
Fe		12.50	3.70	100.00	100.00	50.10	100.00	100.00
S		4502.00	1013.50	1730.00	1610.00	2079.90	996.80	5236.50
Na		2858.00	7056.00	202.00	237.30	1089.00	202.00	202.00
B		24.20	16.00	100.00	10.00	48.50	161.80	100.00
Mn		22.40	0.40	100.00	10.00	59.20	112.00	100.00
Zn	μmol l ⁻¹	10.40	3.40	30.00	37.30	7.00	34.70	36.83
Cu		0.04	0.10	0.10	0.01	0.10	0.10	0.10
Mo		0.007	—	1.00	0.1	1.00	1.00	1.00
Co		—	—	0.10	0.01	0.10	—	0.10
I		4.50	0.06	5.00	—	4.50	—	5.00
Al		—	0.20	—	—	—	—	—
Ni		—	0.10	—	—	—	—	—

جدول (١٧ - ٣) : المستويات المنخفضة ، والمتوسطة ، والمرتفعة لمختلف مكونات البيئات اللازمة لتحديد البيئة المثلى .

المكونات	مدي التركيزات (ملي مول / لتر)		
	منخفض	متوسط	مرتفع
مركبات معدنية			
NH ₄ NO ₃	5	10	20
KNO ₃	—	10	20
KH ₂ PO ₄	0.1	—	—
NaH ₂ PO ₄	—	1	2
KCl	1.9	—	—
CaCl ₂	1	2	3
MgSO ₄	0.5	1.5	3
H ₃ BO ₃	0.01	0.05	0.15
MnSO ₄	0.01	0.05	0.1
ZnSO ₄	0.001	0.02	0.04
CuSO ₄	0.00001	0.0001	0.0015
Na ₂ MoO ₄	0.00001	0.0001	0.001
CoCl ₂	0.0001	0.0005	0.001
KI	0.0005	0.0025	0.005
FeSO ₄	0.01	0.05	0.1
Na ₂ ·EDTA	0.01	0.05	0.1
أوكسين	0.0001	0.001	0.01
سيتوكاينين	0.0001	0.001	0.01
مركبات عضوية			
Inositol	0.1	0.3	0.6
Nicotinic acid	0.004	0.02	0.04
Pyridoxine HCl	0.0006	0.003	0.006
Thiamine HCl	0.0001	0.002	0.04
Biotin	0.00001	0.0002	0.001
Folic acid	0.0005	0.001	0.002
D-Ca-Pantothenate	0.0002	0.001	0.005
Riboflavin	0.0001	0.001	0.01
Ascorbic acid	0.0001	0.001	0.01
Choline chloride	0.0001	0.001	0.01
L-Cysteine HCl	0.01	0.05	0.12
Glycine	0.0005	0.005	0.05
Sucrose	6	60	120

جدول (١٧ - ٤) : المحتوي الكيميائي لأنواع أجار Difco المستخدمة في مزارع الأنسجة .

المكونات	Bacto-agar	Noble-agar	Purified-agar
Ash	4.5%	2.6%	1.75%
Calcium	0.13%	0.23%	0.27%
Barium	0.01%	0.01%	0.01%
Silica	0.19%	0.26%	0.09%
Chloride	0.43%	0.18%	0.13%
Sulphate	2.54%	1.90%	1.32%
Nitrogen	0.17%	0.10%	0.14%
Iron	11.00 mg l ⁻¹	11.00 mg l ⁻¹	11.00 mg l ⁻¹
Magnesium	285.00 mg l ⁻¹	260.00 mg l ⁻¹	695.00 mg l ⁻¹
Copper	5.00 mg l ⁻¹	7.50 mg l ⁻¹	20.00 mg l ⁻¹

جدول (١٧ - ٥) : المحاليل القياسية المستخدمة في تحضير بيئة

مراشج وسكوج Murashige & Skoog (١)

المكونات	الكمية (مجم / لتر)
المحلول القياسي الأول	
NH ₄ NO ₃	33 000
KNO ₃	38 000
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	8800
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	7400
KH ₂ PO ₄	3100
المحلول القياسي الثاني	
KI	166
H ₃ BO ₃	1240
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	4460
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1720
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	50
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	6
(ب) المحلول القياسي الثالث	
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5330
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	7400
المحلول القياسي الرابع	
Inositol	20 000
Nicotinic acid	100
Pyridoxine HCl	100
Thiamine HCl	100
Glycine	400

(أ) لتحضير لتر من البيئة .. يستخدم ٥٠ مل من المحلول القياسي الأول ، و٥ مل من كل من

المحاليل القياسية الثاني ، والثالث ، والرابع .

(ب) أذب كلاً من المركبين - علي انفراد - في ٤٥٠ مل ماء مقطراً مع التسخين والتقليب ، ثم اخلط

المحلولين ، وعدل الـ pH إلي ٥.٥ ، ثم أضف ماء مقطراً ، إلي أن يصل الحجم النهائي إلي لتر .

ويبين جدول (١٧-٦) التركيب الكيميائي ، والوزن الجزيئي لمختلف المركبات التي تدخل في تركيب البيئات المغذية ؛ كما يبين جدول (١٧-٧) الوزن الذري لمختلف العناصر التي تدخل في تكوين هذه المركبات . ولزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Dixon (١٩٨٥) ، و Ohojwani & Razdan (١٩٨٣) .

مزارع الخلايا

يُعد عزل خلايا مفردة أولى الخطوات في عمل مزارع الخلايا Cell Cultures . وتجري هذه الخطوة إما بالوسائل الميكانيكية ، وإما إنزيمياً من الأعضاء النباتية الكاملة ، وإما تؤخذ الخلايا من نسيج كالوس callus tissue نام من أسطح معقمة لأجزاء نباتية مزروعة . ويلي ذلك .. زراعة الخلايا من المعلق . وتعد طريقة برجمان Bergmann (شكل ١٧-١) أكثر الطرق شيوعاً لزراعة الخلايا المفردة . ويراعى فيها أن يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة . ويبين شكل (١٧-٢) خطوات إنتاج نبات دخان من خلية مفردة ، بينما يعطى جدول (١٧-٨) تركيب بيئتين مناسبتين لزراعة خلايا مفردة من النسيج الوسطى (الميزوقيل) للورقة .

وتتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات في بيئة النمو ؛ حيث قد يكون النمو متميزاً Differentiated ، أو غير متميز Undifferentiated . ويعنى بالنمو المتميز تكوين نموات خضرية ، أو جنور ، أو كليهما ، بينما يعنى بالنمو غير المتميز تكوين كتلة من الخلايا تسمى كالس Callus .

ينتج الكالس - عادة - من أي نسيج نباتي متميز (مثل الأوراق ، والسيقان والجنور) ؛ بوضع الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا (explant) في بيئة تحتوي على تركيز مرتفع نسبياً من الأوكسين ، وتركيز منخفض نسبياً من السيتوكينين ، حيث يتكون الكالس حينئذ ، ويمكن أن يستمر في النمو بعد ذلك ، إما على صورة كتل متعددة الخلايا multicellular masses في البيئات الصلبة ، وإما على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا small cell aggregates في البيئات السائلة النوارة (أي التي توضع على أجهزة تتحرك بأوعية المزارع حركة دورانية) . ومع استعمال تركيزات مرتفعة من السيتوكينينات وتركيزات منخفضة من الأوكسينات في بيئة النمو .. فإنه يمكن - أحياناً - تحفيز تكوين