ويبين جدول (١٧-٦) التركيب الكيمائي ، والوزن الجزيئى لمختلف المركبات التى تدخل فى تركيب البيئات المغذية ؛ كما يبين جدول (١٧-٧) الوزن الذرى لمختلف العناصر التى تدخل فى تكوين هذه المركبات . ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Ohojwani & Razdan (١٩٨٣) ، و Dixon (١٩٨٥) .

مزارع الخلايا

يُعد عزل خلايا مفردة أولى الخطوات فى عمل مزارع الخلايا Cell Cultures . وتجرى هذه الخطوة إما بالوسائل الميكانيكية ، وإما إنزيميًا من الأعضاء النباتية الكاملة ، وإما تؤخذ الخلايا من نسيج كالوس callus tissue نامٍ من أسطح معقمة لأجزاء نباتية مزروعة ويلى ذلك .. زراعة الخلايا من المعلق . وتعد طريقة برجمان Bergmann (شكل ١٧-١٠) أكثر الطرق شيوعًا لزراعة الخلايا المفردة . ويراعى فيها أن يكون تركيز الخلايا المفردة فى البيئة السائلة ضعف التركيز النهائى 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 (الميزوفيل) للورقة .

وتتوقف طبيعة النمو فى مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات فى بيئة النمو ؛ حيث قد يكون النمو متميزاً Differentiated ، أو غير متميز Undifferentiated . ويُعنى بالنمو المتميز تكوين نموات خضرية ، أو جذور ، أو كليهما ، بينما يُعنى بالنمو غير المتمير تكوين كتلة من الخلايا تسمى كالس Callus .

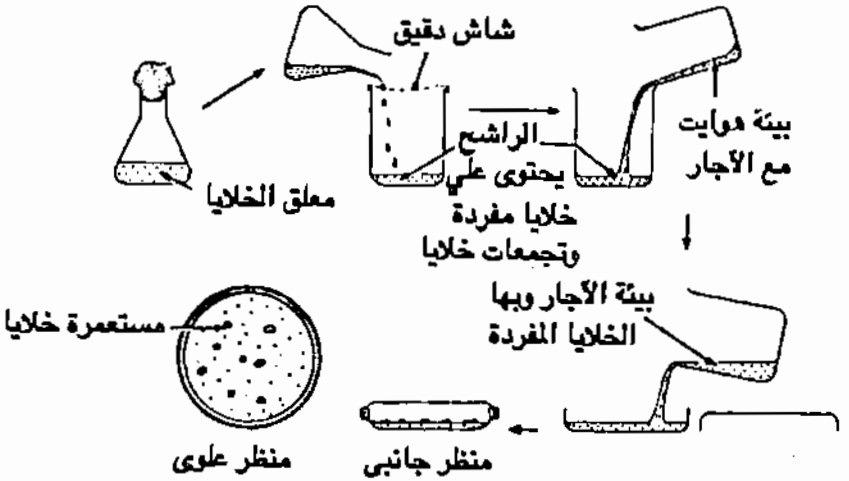
ينتج الكالس - عادة - من أى نسيج نباتى متميز (مثل الأوراق ، والسيقان والجذور) ؛ بوضع الجزء النباتى الذى تؤخذ منه الخلايا (explant) فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيًا من الأوكسين ، وتركيز منخفض نسبيًا من السيتوكينين ، حيث يتكون الكالس حينئذ ، ويمكن أن يستمر فى النمو بعد ذلك ، إما على صورة كتل متعددة الخلايا multicellular masses فى البيئات الصلبة ، وإما على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا small cell aggregates فى البيئات السائلة الدوارة (أى التى توضع على أجهزة تتحرك بأوعية المزارع حركة دورانية) . ومع استعمال تركيزات مرتفعة من السيتوكينينات وتركيزات منخفضة من الأوكسينات فى بيئة النمو .. فإنه يمكن - أحياناً - تحفيز تكوين

جدول (١٧ – ٦) : الوزن الجزيئي للمركبات الشائعة الاستخدام في بيئات مزارع الأنسجة .

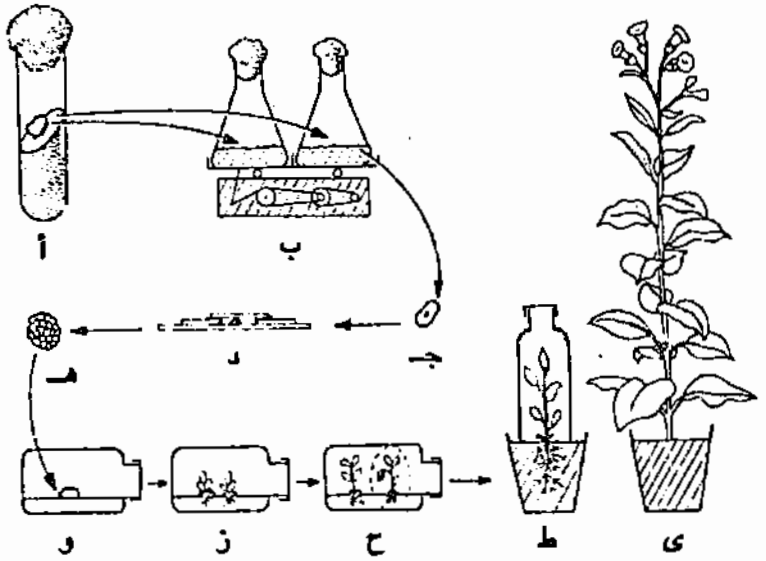
المركب	التركيب الكيميائي	الوزن الجزيئي
العناصر الكبرى		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	132.15
Calcium chloride	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236.16
Magnesium sulphate	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen *ortho*-phosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen *ortho*-phosphate	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	156.01
العناصر الصغرى		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	287.54

جدول (١٧ – ٧) : الأوزان الذرية التي تدخل في تكوين بيئات مزارع الأنسجة .

العنصر	الرمز	الوزن الذري
Aluminium	Al	26.98
Boron	B	10.82
Calcium	Ca	40.08
Carbon	C	12.011
Chlorine	Cl	35.457
Cobalt	Co	58.94
Copper	Cu	63.54
Hydrogen	H	1.008
Iodine	I	126.91
Iron	Fe	55.85
Magnesium	Mg	24.32
Manganese	Mn	54.94
Molybdenum	Mo	95.95
Nickel	Ni	58.71
Nitrogen	N	14.008
Oxygen	O	16.00
Phosphorus	P	30.975
Potassium	K	39.10
Sodium	Na	22.99
Sulphur	S	32.066
Zinc	Z	65.38



شكل (١٧ – ١) : طريقة Bergmann لزراعة الخلايا المفردة .

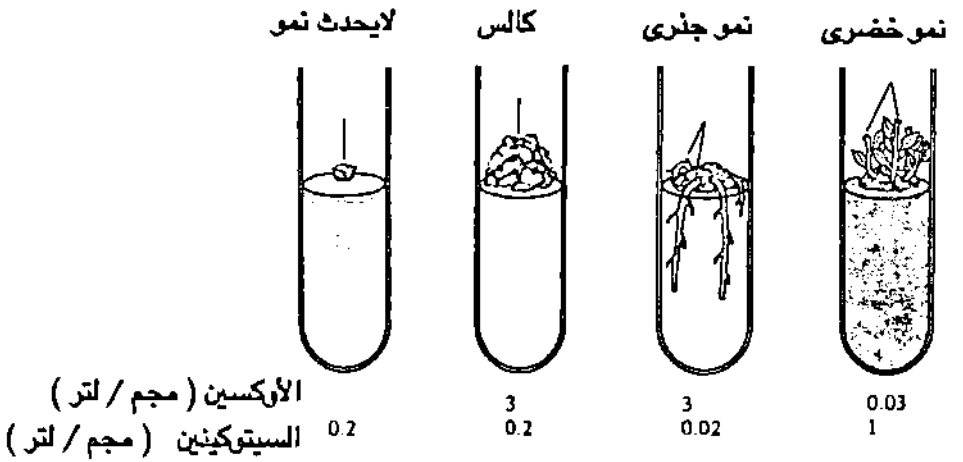


شكل (١٧ – ٢) : تكوين نبات دخان من خلية مفردة : (أ) كالس نامٍ من قطعة صغيرة من النبات أخذت من النخاع ، (ب) عملية نقل قطعة صغيرة من الكالس إلى بيئة سائلة فى دوارق زجاجية ووضعها على هزاز ، (جـ) تفكك الكالس إلى خلايا مفردة ، (د) نقل الخلية المفردة جـ من الدورق ووضعها فى نقطة من بيئة الزراعة فى حيز صغير خاص microchamber ، (هـ) نسيج صغير تكون من الخلية المفردة من خلال عدة انقسامات متتالية ، (و) عملية نقل النسيج هـ إلى بيئة شبه صلبة حيث ينمو إلى كالس كبير ، (ز ، ح) تتميز النباتات ، (ط ، ى) تنمو النباتات إلى مرحلة النضج عند نقلها إلى أصص .

جدول (١٧ – ٨) : تركيب بيئتين مناسبتين لزراعة خلايا مفردة من ميزوفيل الأوراق .

المكونات	البيئة والكميات (مجم / لتر)	
	Rossini	Joshi and Ball
KNO_3	950	—
KCl	—	750
NH_4NO_3	725	—
$NaNO_3$	—	600
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	187	250
$CaCl_2$	169	—
$CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$	—	112
KH_2PO_4	69	—
$NaH_2PO_4 \cdot 2\,H_2O$	—	141
NH_4Cl	—	5.35
$MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	12.5	—
$MnCl_2 \cdot 4\,H_2O$	—	0.036
H_3BO_3	5	0.056
$ZnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	5	—
$ZnCl_2$	—	0.15
$NaMoO_4 \cdot 2\,H_2O$	0.125	0.025
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0.0125	—
$CuCl_2 \cdot 2\,H_2O$	—	0.054
$CoCl_2$	—	0.02
$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$	13.9	—
$FeCl_3 \cdot 6\,H_2O$	—	0.5
Na·EDTA	18.6	—
Disodium salt of ethylene dinitrilotetraacetic acid	—	0.8
Glycine	2	—
Nicotinic acid	5	—
Pyridoxine HCl	0.5	—
Thiamine HCl	0.5	—
Biotin	0.05	—
Folic acid	0.5	—
Casein hydrolysate (acid hydrolysate, acid and vitamin free)	—	400
m-Inositol	100	—
BAP	0.1	—
Kinetin	—	0.1
2,4-D	1	1
Sucrose	10 000	20 000
pH	5.0	?

نموات متميزة إلى سيقان وأوراق وجذور شكل (١٧-٣) ، أو تكوين أجنة عرضية تنمو بذورها إلى نباتات كاملة بعد ذلك . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الخلايا والتمييز منها .. يراجع Helgeson (١٩٨٠) ، و Evans وآخرون (١٩٨١) .



شكل (١٧ – ٣) : تأثير تركيز الأوكسينات والسيتوكينينات – فى بيئة النمو – على تكوين الكالس ، وتميز النموات الجذرية والخضرية .

تكوين الأجنة الجسمية

تتكون الأجنة الجسمية Somatic Embryos ، أو Embryoides فى مزارع الخلايا عندما تتوفر لها شروط معينة ، تتعلق بمنظمات النمو (خاصة الأوكسينات والسيتوكينينات) ، مع توفر مصدر النيتروجين ، وبعض العوامل الأخرى ؛ ففى مزارع خلايا الجزر (شكل ١٧-٤) يتكون الكالس عندما تكون البيئة غنية بالأوكسين (يستعمل عادة الأوكسين ٢ ، ٤ –د بتركيز ٠,٥ – ١,٠ جزءاً فى المليون) ؛ وإذا نقلت تجمعات من هذه الخلايات الميرستيمية إلى بيئة ذات محتوى شديد الانخفاض من الأوكسين (حوالى ٠,٠١ – ٠,١ جزءاً فى المليون) ، أو خالية تماماً منه .. فإنه تتميز فيها أجنة كاملة .

ويبدو أن وجود الأوكسين فى البيئة الأولى ضرورى لتكوين الأجنة فى البيئة الثانية ؛ لأن الأنسجة التى تبقى دائماً فى بيئة خالية من الأوكسين لاتتكون بها أجنة . أما مصدر النيتروجين فى البيئة .. فيفضل أن يكون على صورة مختزلة ؛ مثل كلوريد الأمونيوم