الفصل السابع عشر

زراعـــة الأنسجـة

أمور عامة

مختبر زراعة الأنسجة

تجرى زراعة الأنسجة تحت ظروف معقمة فى مختبرات خاصة ، يجب أن تتوفر فيها شروط معينة ، وأن تجهز تجهيزا 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 الكيمائية ، والحضانات ، والأدوات ، والأجهزة المختبرية العادية (التى تتوفر – عادة – فى مختبرات أمراض النبات) ، بالإضافة إلى حيّز مبّرد 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 ، ونترات الفضة ، وكلوريد الزنبق ، والمضادات الحيوية) ؛ لتطهير العينات النباتية سطحياً

وفيما يلى قائمة بأهم المعدات التى يجب أن تتوفر فى مختبر زراعة الأنسجة :

١- دوارق مخروطية بأحجام : ١٠٠ ، و ٢٥٠ أو ٥٠٠ مل ، و ١ ، و ٥ لترات .

٢- دوارق معيارية بأحجام : ٥٠٠ مل ، و ١ ، و ٢ ، و ٣ لترات .

٣- مخابير مدرجة بأحجام : ٢٥ ، و ٥٠ ، و ١٠٠ ، و ٥٠٠ مل ، ولتر 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 «بقلاووظ» ، وأطباق بترى) .

٧- «دلاء» بلاستيكية لنقع الزجاجيات قبل غسيلها .

٨- حجرة أو حيز خاص صغير مزود بالهواد الساخن ؛ لتجفيف الأوعية ، والزجاجات بعد غسيلها .

٩- فرن لتجفيف الأوعية والزجاجيات ، وتعقيم الزجاجات .

١٠- سلال سلكية ، توضع بها أوعية البيئات الصغيرة فى أثناء تعقيمها ، والزجاجيات الصغيرة فى أثناء تجفيفها .

١١- جهاز لتقطير الماء .

١٢- أوعية بلاستيكية (بحجمى : ١٠ ، و٢٠ لترًا) ؛ لتخزين الماء المقطر .

١٣- ميزانان ؛ أحدهما لوزن الكميات الصغيرة ، والثانى لوزن الكميات الكبيرة نسبيًا .

١٤- قرص ساخن hot plate مع قلاب مغناطيسى magnetic stirrer ؛ لإذابة المركبات الكيمائية .

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 التى 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 فرن طهى تحت ضغط ؛ لتعقيم البيئات .

٢٢- قرص ساخن مُنَظم بالحرارة heat - regulated hot plate ؛ للتعقيم بالبخار فى فرن 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 «بقلاووظ» ؛ 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 لايصدأ ، 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 أيضًا 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 دائمًا 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) . ويلى 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 غالبا 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 نسبيًا لعدد من المركبات الكيميائية ، كما هو مبين فى جدول (١٧-٥) بالنسبة لبيئة Murashige & Skoog .

جدول (١٧ – ١) : البيئات القياسية المستخدمة في مزارع الأنسجة (أ)

المكونات	البيئات (الكميات بالجزء في المليون) (ب)						
	White's (جـ)	Heller's (د)	MS (هـ)	ER (و)	B (ز)	Mitsch's (ح)	NT (ط)
غير العضوية							
NH_4NO_3	–	–	1650	1200		720	825
KNO_3	80	–	1900	1900	2527.5	950	950
$CaCl_2.2H_2O$	–	75	440	440	150	–	220
$CaCl_2$	–	–	–		–	166	
$MgSO_4.7H_2O$	750	250	370	370	246.5	185	1233
KH_2PO_4	–	–	170	340		68	680
$(NH_4)_2SO_4$	–	–	–	–	134		–
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300	–	–			–	–
$NaNO_3$	–	600	–	–	–		–
Na_2SO_4	200	–	–	–	–		
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	125	–	–	150		
KCl	65	750	–	–			
KI	0.75	0.01	0.83	–	0.75		0.83
H_3BO_3	1.5	1	6.2	0.63	3	10	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	5	0.1	22.3	2.23	–	25	22.3
$MnSO_4.H_2O$	–	–	–	–	10		
$ZnSO_4.7H_2O$	3	1	8.6	–	2	10	
$ZnSO_4.4H_2O$	–	–	–	–			8.6
$Zn.Na_2.EDTA$	–	–	–	15		–	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	–	–	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO_3	0.001	–	–	–	–		
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.03	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	–	–	0.025	0.0025	0.025		–
$CoSO_4.7H_2O$	–	–	–	–	–	–	0.03
$AlCl_3$	–	0.03	–	–	–		
$NiCl_2.6H_2O$	–	0.03	–	–	–	–	–
$FeCl_3.6H_2O$	–	1	–				
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	–	–	–	–	–	–
$FeSO_4.7H_2O$	–	–	27.8	27.8	–	27.8	27.8
$Na_2.EDTA.2H_2O$	–	–	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	–	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 .

(جـ) بيئة هوايت White .

(د) بيئة هلر Heller .

(هـ) بيئة مراشج وسكوج Murashige & Skoog .

(و) بيئة إيركسون Eriksson .

(ز) بيئة جامبورج Gamborg وآخرون .

(ح) بيئة نتشه Nitsch .

(ط) بيئة ناجاتا وتاكيبي Nagata & Takeba .

جدول (١٧ – ٢) : تركيز الأيونات في البيئات المبينة فى جدول (١٧ – ١) .

الأيونات	الوحدات	البيئات						
		White's	Heller's	MS	ER	B_1	Nitsch's	NT
NO_3	mmol l^{-1}	3.33	7.05	39.41	33.79	25.00	18.40	19.69
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		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	µmol l^{-1}	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		2958.00	7066.00	202.00	237.20	1080.00	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		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_4NO_3	5	10	20
KNO_3	—	10	20
KH_2PO_4	0.1	—	—
NaH_2PO_4	—	1	2
KCl	1.9	—	—
$CaCl_2$	1	2	3
$MgSO_4$	0.5	1.5	3
H_3BO_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_2MoO_4	0.00001	0.0001	0.001
$CoCl_2$	0.0001	0.0003	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	0.06	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 (أ) .

المكونات	الكمية (مجم / لتر)
المحلول القياسي الأول	
NH_4NO_3	33 000
KNO_3	38 000
$CaCl_2.2H_2O$	8800
$MgSO_4.7H_2O$	7400
KH_2PO_4	3400
المحلول القياسي الثاني	
KI	166
H_3BO_3	1240
$MnSO_4.4H_2O$	4460
$ZnSO_4.7H_2O$	1720
$Na_2MoO_4.2H_2O$	50
$CuSO_4.5H_2O$	5
$CoCl_2.6H_2O$	5
المحلول القياسي الثالث (ب)	
$FeSO_4.7H_2O$	5530
$Na_2EDTA.2H_2O$	7460
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 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 .

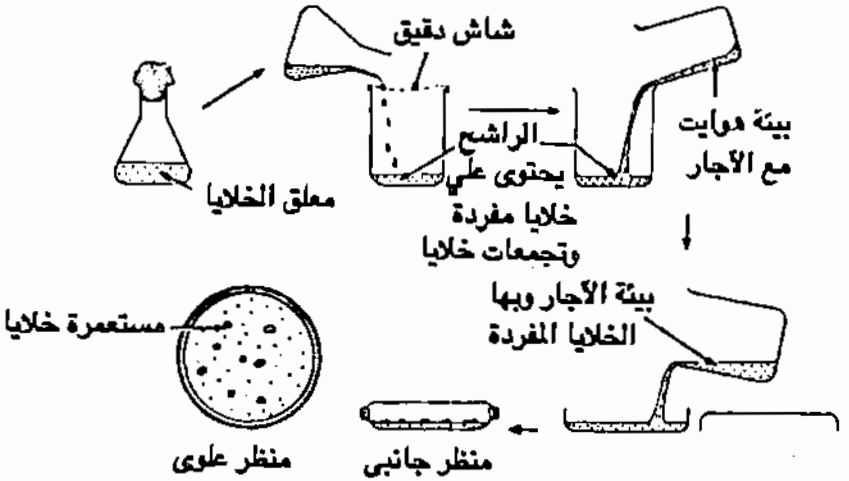
ينتج الكالس - عادة - من أى نسيج نباتى متميز (مثل الأوراق ، والسيقان والجذور) ؛ بوضع الجزء النباتى الذى تؤخذ منه الخلايا (explant) فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيًا من الأوكسين ، وتركيز منخفض نسبيًا من السيتوكينين ، حيث يتكون الكالس حينئذ ، ويمكن أن يستمر فى النمو بعد ذلك ، إما على صورة كتل متعددة 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 .

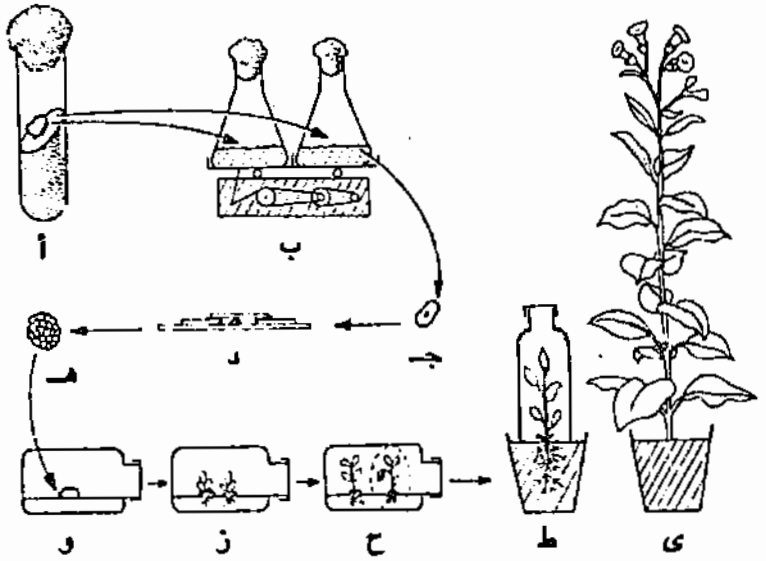
المركب	التركيب الكيميائي	الوزن الجزيئي
العناصر الكبرى		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	132.15
Calcium chloride	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	236.16
Magnesium sulphate	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCl	74.55
Potassium 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	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	249.69
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 .

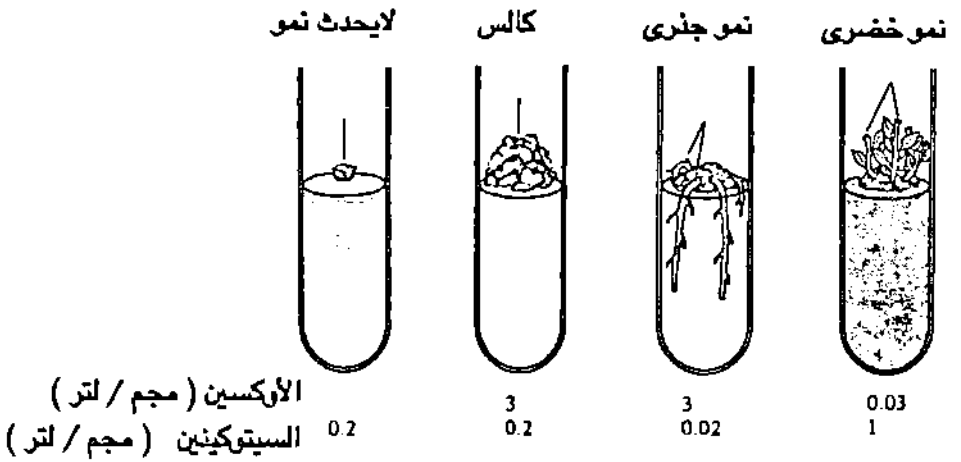


شكل (١٧ – ٢) : تكوين نبات دخان من خلية مفردة : (أ) كالس نامٍ من قطعة صغيرة من النبات أخذت من النخاع ، (ب) عملية نقل قطعة صغيرة من الكالس إلى بيئة سائلة فى دوارق زجاجية ووضعها على هزاز ، (جـ) تفكك الكالس إلى خلايا مفردة ، (د) نقل الخلية المفردة جـ من الدورق ووضعها فى نقطة من بيئة الزراعة فى حيز صغير خاص 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 .

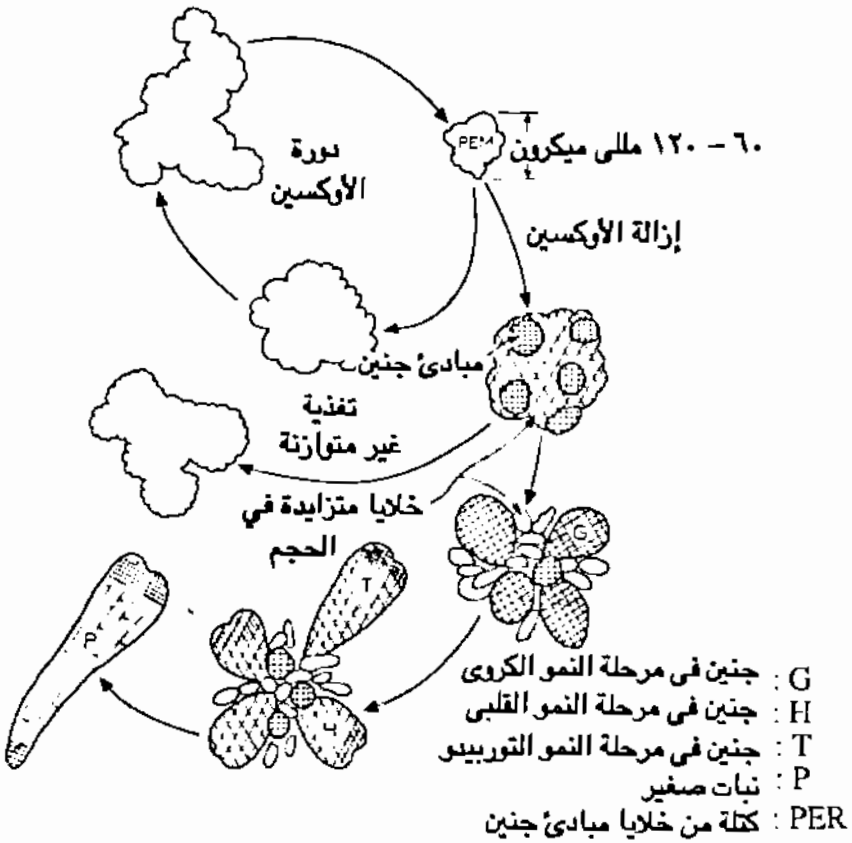
تكوين الأجنة الجسمية

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

NH_4Cl منفردة ، أو مع نترات البوتاسيوم KNO_3 . ومردّ ذلك أن تكوين الأجنة يتطلب حداً أدنى من أيون الأمونيا NH_4^+ داخل الخلايا ؛ وهو ما لايتحقق إلاّ إذا توفر أيون الأمونيا بتركيز منخفض (٢,٥ ملى مول/لتر) ، أو أيون النترات NO_3^- بتركيز مرتفع (٦٠ ملى مول/لتر) فى البيئة . ومن الشروط الأخرى الضرورية لتميز الأجنة توفر تركيز عالٍ من البوتاسيوم (٢٠ ملى مول/لتر) فى البيئة . وألا يزيد تركيز الأكسجين الذائب عن ١,٥ مجم/ لتر ؛ لأن التركيز الأعلى من ذلك يشجع على تكوين الجنور .

وتجدر الإشارة إلى أن الأجنة المتكونة فى مزارع الخلايا تبقى على اتصال سيتوبلازمى مع الخلايا المجاورة لها فى البيئة خلال المراحل الأولى لتكوين الأجنة ، ولاتنفصل عنها إلا فى مراحل متأخرة حينما يصبح الجنين مكوناً من عدة خلايا . وتكمل



شكل (١٧ – ٤) : تخطيط يبين مراحل تكوين الأجنة الجسمية فى مزارع الخلايا المعلقة للجزر .

الأجنة نموها وتنبت مباشرة فى نفس البيئة ، إلا أن الأنواع -التى تحتاج بذورها إلى المعاملة بالبرودة لكى تنبت- تتطلب نفس المعاملة ؛ حتى تنبت أجنتها الجسمية المتكونة فى البيئات . هذا .. ويطلق على القدرة الموروثة فى الخلايا النباتية لإنتاج نباتات كاملة - حتى بعد أن تكون هذه الخلايا قد تميزت نهائيًا فى جسم النبات الذى أخذت منه - اسم Totipotency .

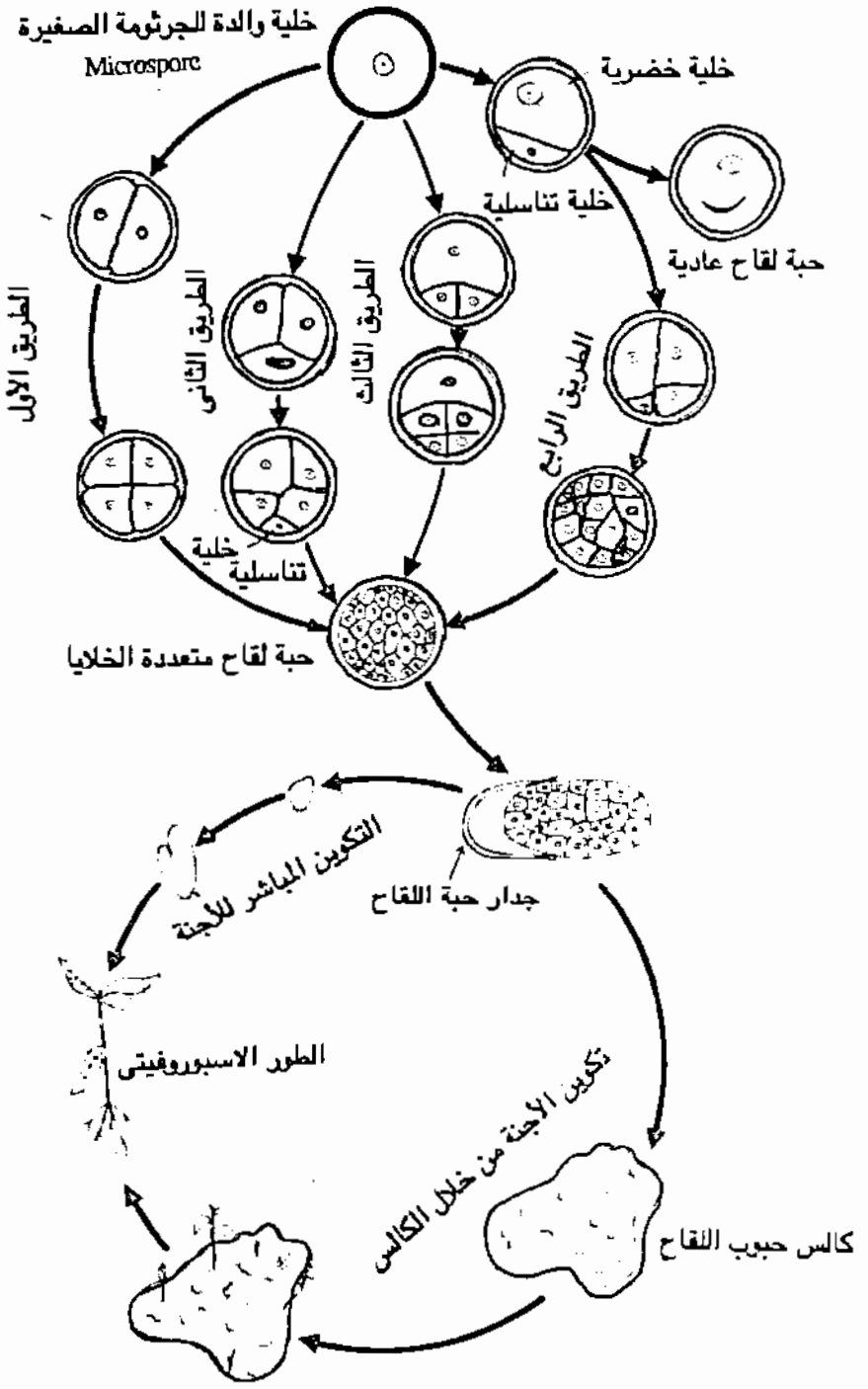
هذا .. وقد أمكن إنتاج أجنة جسمية فى أنواع أخرى من المزارع لعدة أنواع محصولية ، ومن أمثلتها ما يلى :

المحصول		العضو أو النسيج النباتى المستخدم كمصدر للجنين الجسمى
الشيف	*Allium schoenoprasum*	النواتان المساعدتان فى الكيس الجنينى
الرجلة	*Portulaca oleracea*	الإندوسبرم
الشليك البرى	*Fragaria vesca*	النواتان المساعدتان
الفلفل من النوع	*Capsicum fruescens*	الجنين
الفلفل	*C. annuum*	المتوك
الهندباء	*Cichorium endivia*	الجنين
الكوسة	*Cucurbita pepo*	السويقة الجنينية العليا - الفلقات
الهليون	*Asparagus officinalis*	السويقة الجنينية العليا - الأوراق - المتوك -الساق - الجنين - البروتوبلازم - الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم	*Lycopersicon esculentum*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الطماطم البرية	*L. pimpinellifolium*	الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة
الجزر	*Daucus carota*	الجنين - نسيج الكالس - السويقة الجنينية العليا - الأوراق - أعناق الأوراق - اللحاء - البروتوبلازم - الجذور - السيقان
الفينوكيا	*Foeniculum vulgare*	الساق - الجنين

ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Tisserat وآخرون (١٩٧٩) .

مزارع المتوك

تفيد مزارع المتوك Anther Culture (أو anther androgenesis) فى إنتاج نباتات أحادية من حبوب اللقاح .. إما من خلال تكوين الأجنة Pollen Embryogenesis ، وإما من خلال الكالس Pollen Callusing (شكل ١٧-٥) . ويجب أن تؤخذ المتوك من نباتات حديثة الإزهار ، ويكون ذلك فى مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة ؛ لذا .. فإنه تفضل دائماً زراعة النباتات التى تؤخذ منها المتوك فى ظروف بيئية متحكم



شكل (١٧ – ٥) : تخطيط يبين نشأة النباتات الأحادية من حبوب اللقاح فى مزارع المتوك . يمكن أن تسلك الخلية الوالدة للجرثومة الصغيرة ، أيا من الطرق الأربعة المبينة فى الشكل لتكوين حبة لقاح متعددة الخلايا ، وهى التى يمكن أن تنتج بدورها جنيناً مباشرة ، أو تنتج الطور الأسبوروفيتى من خلال النمو الكالوسى .

فيها ، ليمكن الربط – إلى حد ما – بين المظهر الخارجى للبرعم الزهرى ، والمرحلة المناسبة لتكوين حبوب اللقاح . وتُطَهَّر البراعم الزهرية المنتخبة سطحيًا بأحد المطهرات المناسبة ، ثم تفصل منها الأسدية كاملة (المتوك مع خيوطها) ، وتوضع فى طبق بترى معقم . يسحق أحد المتوك فى صبغة أسيتوكارمن لاختبار مرحلة تكوينه ، فإذا كان فى المرحلة المناسبة .. فإن بقية المتوك تفصل من خيوطها ، وتوضع أفقيًا على بيئة الزراعة .

ويجب توخى الحرص حتى لاتحدث أية أضرار للمتوك فى أثناء تداولها ؛ لأن تجريحها يحفز – غالباً – تكوين كالوس من خلايا جدر المتوك .. وهى خلايا ثنائية . تحضَّن مزارع المتوك غالباً فى الضوء (٥٠٠٠ – ١٠٠٠٠ لكس lux/م٢) لمدة ١٢ – ١٨ ساعة على درجة حرارة ٢٨°م بالتبادل مع فترة إظلام ، مدتها ٦ – ١٢ ساعة على حرارة ٢٢°م . تتحول جدر المتوك – تدريجيًا – إلى اللون البنى ، ثم تتفتح فى خلال ٣ – ٨ أسابيع ؛ بسبب الضغط الداخلى للكالس المتكون من حبوب اللقاح ، أو بسبب النباتات الصغيرة Plantlets التى تنمو منها . تفصل النباتات المفردة أو النموات الخضرية المتكونة عن الكالس ، بعد أن يصل طولها إلى نحو ٣–٥ سم ، وتنقل إلى بيئة مناسبة للنمو الجذرى . ويلى ذلك .. نقل النباتات التى تكونت جذورها إلى أصص صغيرة معقمة .

هذا .. ولاتوجد بيئة واحدة تناسب زراعة متوك جميع الأنواع النباتية . ويبين جدول (١٧–٩) تركيب ثلاث من البيئات التى تستخدم فى مزارع المتوك فى النجيليات ، علماً بأن بيئة البطاطس –١ تحتوى على ٢٠٪ مستخلصاً مائياً لدرنات البطاطس ، بينما تحتوى بيئة البطاطس – ٢ على ١٠٪ من هذا المستخلص . وتعد البيئة الثالثة (N6) أفضل من البيئتين الأخريين . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع المتوك وحبوب اللقاح .. يراجع Nitsch (١٩٧٥) ، و Sink & Padmanabhan (١٩٧٧) ، و Sunderland (١٩٨٠) ، و Chu (١٩٨٢) ، و Dunwell (١٩٨٥) .

مزارع الإندوسبرم

يعد الإندوسبرم نسيجًا ثلاثياً (٣ن) ، يتكون من تزاوج إحدى النواتين التناسليتين الأحاديتين فى حبة اللقاح مع النواتين القطبيتين الأحاديتين فى الكيس الجنينى لتكوين نواة الإندوسبرم الابتدائية ؛ لذا .. فإن مزارع الإندوسبرم Endosperm Culture تفيد فى إنتاج نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية ، ويتم ذلك إما بتكوين براعم من

جدول (١٧ – ٩) : تركيب ثلاث بيئات لزراعة متوك النجيليات .

المكونات	البيئات (مجم / لتر)		
	N6	البطاطس – ١	البطاطس – ٢
KNO_3	2830	—	1000
$(NH_4)_2SO_4$	463	—	100
KH_2PO_4	400	—	200
KCl	—	—	35
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	185	—	125
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	166	—	—
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	—	—	100
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27.2	—	—
Na·EDTA	37.2	—	—
Fe·EDTA	—	10^{-4} mol l^{-1}	10^{-4} mol l^{-1}
H_3BO_3	1.6	—	—
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	4.4	—	—
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1.5	—	—
KI	0.8	—	—
Thiamine HCl	1.0	1.0	1.0
Pyridoxine HCl	0.5	—	—
Niacin	0.5	—	—
Glycine	2.0	—	—
2,4-D	2.0	1.0	1.5
Kinetin	—	0.5	0.5
Potato extract	—	20%	10%
Sucrose	50 g	90 g	90 g
Agar	10 g	6 g	6 g

الإندوسبرم مباشرة ، وإما بعد تكوين نسيج كالس ؛ أما تكوين الأجنة .. فلم يتأكد بعد فى مزارع الإندوسبرم .

ويتعين عزل الإندوسبرم الذى يُراد زراعته بعد مدة معينة من التلقيح ، تختلف من نوع إلى آخر ؛ فهى – مثلا – ٨ –١١ يوماً فى الذرة ، و ٤ – ٧ أيام فى الأرز ؛ بينما لايصلح الإندوسبرم المكتمل النمو للزراعة . وقد نجح إنتاج النباتات الثلاثية من مزارع الإندوسبرم فى عدد محدود نسبيًا من النباتات ، منها – على سبيل المثال – الأرز ، والكمثرى ، والبقدونس ، وبعض أنواع الجنس *Citrus* . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الإندوسبرم .. يراجع Johri وآخرون (١٩٨٠) .

التلقيح فى مزارع البويضات ومزارع المبايض

يستخدم المصطلح *In vitro* Pollination لوصف جميع الحالات التى توضع فيها حبوب اللقاح – مباشرة – على البويضات المفصولة فى بيئة صناعية (*In vitro* Ovular Pollination .. أو ما أطلق عليه اسم التلقيح فى أنبوبة الاختبار (Test - Tube Fertillization) ، أو على البويضات المفصولة مع مشيمتها فى بيئة صناعية (*In Vitro* Placental Pollination) أو على مياسم الأزهار ، التى فصلت أمتعتها ، ووضعت فى بيئة صناعية (*In vitro* Stigmatic Pollination) . وتسمى المزارع فى الحالتين الأولى والثانية باسم مزارع البويضات Ovule Culture ، بينما يطلق على النوع الثالث اسم مزارع المبايض Ovary Culture . وتفيد هذه المزارع فى التغلب على المشاكل السابقة للإخصاب فى التلقيحات البعيدة .

تخصى الأمهات قبل تفتح الأزهار بيومين ، وتكيس ، ثم تنقل الأزهار المخصية إلى المختبر بعد موعد تفتحها الطبيعى بيوم أو يومين ؛ حيث يزال الكأس والتويج ، ويغمس المتاع وعنق الزهرة – إن وجد – سريعاً فى ٧٠٪ كحولاً ، ثم يطهران سطحيًا بأحد المطهرات المناسبة ، ويغسلان جيداً بماء مقطر معقم . يُزال بعد ذلك كل من الميسم والقلم وجدار المبيض .

تستخدم المشيمة الكاملة التى تحمل البويضات فى حالات التلقيح المشيمى Placental Pollination . وقد تقطع المشيمة إلى أجزاء ، يحمل كل منها عدداً من البويضات ، كما قد تزال المشيمة كلية فى حالات تلقيح البويضات Ovular Pollination . أما فى حالات التلقيح الميسمى Stigmatic Pollination .. فإن متاع الزهرة يبقى بأكمله ، ويعقم سطحه الخارجى جيدًا ، على ألا يلامس المطهر سطح الميسم وربما لايحتاج متاع الزهرة إلى التعقيم إن كان مغلفا بصورة جيدة ، كما فى الذرة .

وتجمع متوك غير متفتحة من الآباء ، وتحفظ فى طبق بترى معقم إلى أن تتفتح ؛ حيث تنقل حبوب اللقاح بحرص ، وتوضع على البويضات المزروعة ، أو على مشيمتها ، أو على مياسم المبايض المزروعة حسب الحالة .

هذا .. ويكون الهدف النهائى من هذه المزارع هو الحصول على بذور مكتملة التكوين

من مزارع البويضات ، سواء أكانت البويضات بمشيمة ، أم كانت دون مشيمة ، والحصول على ثمار -كاملة ناضجة تحتوى على بذور مكتملة التكوين من مزارع المبايض . وقد أمكن إنتاج بذور عدد من الهجن النوعية بواسطة مزارع البويضات بنوعيها ، كما أمكن الحصول على ثمار ناضجة فى البيئات الصناعية من مزارع المبايض لعدد من المحاصيل الزراعية ، منها : الشليك ، والطماطم ، والدخان ، والفاصوليا ، والجركن ، إلا أن الثمار كانت أصغر من نظيرتها التى تتكون طبيعيًا على النبات .

تعد البيئة المناسبة للزراعة أهم العوامل التى تتحكم فى نجاح مزارع البويضات والمبايض .. علماً بأن البيئة يجب أن تناسب إنبات حبوب اللقاح ، إلى أن يتم الإخصاب ، ثم تطور البويضات المخصبّة إلى بذور كاملة تحتوى على أجنة مكتملة التكوين . هذا .. ولايعد إنبات حبوب اللقاح فى البيئات الصناعية مشكلة ؛ لأنها تنبت بسهولة ، كما يكون إنبات حبوب اللقاح طبيعيًا على الميسم وداخل القلم - بعيداً عن بيئة الزراعة - فى مزارع المبايض . أما نمو البذور .. فإن له متطلبات خاصة ؛ ويبين جدول (١٧-١) تركيب واحدة من أكثر البيئات استعمالاً فى مزارع البويضات الملقحة وهى بيئة نتشه المحورة . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع البويضات والمبايض .. يراجع Zenkteler (١٩٨٠) .

جدول (١٧ - ١٠) : تركيب واحدة من أكثر البيئات استعمالاً في مزارع البويضات الملقحة

المكونات	الكميات (مجم / لتر)
$CaNO_3 \cdot 4\,H_2O$	500
KNO_3	125
KH_2PO_4	125
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	125
$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0.025
Na_2MoO_4	0.025
$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	0.5
$MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$	3.0
H_3BO_3	0.5
$FeC_6O_7H_8 \cdot 5\,H_2O$	10.00
Glycine	7.5
Ca-Pantothenate	0.25
Pyridoxine·HCl	0.25
Thiamine·HCl	0.25
Niacin	1.25
Sucrose	50 000
Agar	7000

مزارع الأجنة

استخدمت مزارع الأجنة Embryo Cultures من قِبَل مربى النباتات منذ أكثر من نصف قرن . وتفيد هذه المزارع فى التغلب على المشاكل اللاحقة للإخصاب فى التلقيحات البعيدة . وتعد عملية فصل الأجنة الصغيرة ، وتحديد بيئة الزراعة المناسبة أهم عاملين يتحكمان فى نجاح مزارع الأجنة . كما يجب فصل الأجنة قبل أن تبدأ فى التدهور degeneration والاختفاء فى حالات الهجن النوعية البعيدة التى يحدث فيها عدم توافق بين الجنين النامى والإندوسبرم . وتتحدد المراحل المناسبة لفصل الأجنة بعدد الأيام من التلقيح . أما البيئة المناسبة .. فهى تختلف من نوع إلى آخر . ويبين جدول (١٧-١١) أربع بيئات ، استخدمت فى زراعة أجنة الشعير ، وهى تحتوى - بالإضافة إلى ما هو مبين فى الجدول - على المكونات التالية :

١- البيئة B - II : تحتوى على ١ جم حامض ماليك مذاب فى ٥٠ مل ماء ، مع تعديل الـ pH إلى ٥,٠ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم .

٢- البيئة C - 17 : تحتوى على ٥٠٠ مجم حامض ستريك مذاب فى ٥٠ مل ماء مع تديل الـ pH إلى ٥,٣ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم ؛ و ٢٠٠ مجم من سترات ثلاثى البوتاسيوم تضاف إلى البيئة مباشرة ، مع تعديل pH البيئة إلى ٥,٥ ؛ باستعمال أيدروكسيد البوتاسيوم المعقم بالترشيح .

٣- البيئة C - 21 : تحتوى على ٥٠ مجم حامض ستريك مذابة فى ٥٠ مل ماء ، مع تعديل الـ pH إلى ٥ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم ، وإضافتها إلى البيئة النهائية ، مع تعديل الـ pH فيها إلى ٥,٥ ؛ باستعمال أيدروكسيد البوتاسيوم المعقم بالترشيح ؛ و ٢٥٠ مجم سترات ثلاثى البوتاسيوم ، تضاف إلى البيئة النهائية مع تعديل الـ pH إلى ٥,٥ .

٤- البيئة C - 45 : تحتوى على ٣٠٠ مجم حامض ماليك مذابة فى ٥٠ مل ماء يحتوى على ٣٠٠ مجم حامض ستريك مع تعديل الـ pH إلى ٥,٠ باستعمال أيدروكسيد الأمونيوم .

ونظراً لأن الأجنة تكون محاطة بأنسجة المبيض ؛ لذا .. فإنها لاتكون معرضة للتلوث ، ولاتحتاج إلى تعقيم ويكتفى بتطهيرها سطحياً . ويحتاج فصل الأجنة الصغيرة إلى

جدول (١٧ – ١١) : تركيب بعض البيئات المستخدمة في مزارع أجنة الشعير .

المكونات	البيئات (مجم / لتر)			
	B-II	C-17	C-21	C-45
عناصر كبري				
KNO_3	—	300	300	900
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	740	250	—	400
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	740	325	300	300
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	60
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	—	100	—	75
KCl	750	150	300	—
KH_2PO_4	910	150	500	170
$Ca(NO_3)_2$	—	—	500	300
NH_4NO_3	—	200	—	500
عناصر صغري				
KI	—	0.10	—	—
H_3BO_3	0.5	0.5	15.0	1.0
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	3.0	0.5	—	5.0
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.25	—	5.0
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.025	0.012	—	0.25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025	0.012	—	0.012
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.012	—	0.012
Ferric citrate	10	3	20	20
Fe-EDTA	—	17.5	10	28
فيتامينات				
Nicotinamide	—	—	—	1.0
Thiamine HCl	0.25	0.25	10	10
Pyridoxine HCl	0.25	0.25	—	1.0
Inositol	50	50	150	100
Ca-pantothenate	0.25	0.25	—	—
Glycine	—	0.75	—	—
Ascorbic acid	—	0.5	—	1.0
أحماض أمينية				
Glutamine	400	—	—	600
Glutamic acid	—	150	300	—
Alanine	50	30	—	100
Cysteine	20	—	—	—
Arginine	10	20	50	—
Leucine	10	10	—	—
Phenylalanine	10	20	—	—
Tyrosine	10	—	—	—
Aspartic acid	—	30	100	100
Proline	—	50	50	—
Valine	—	10	—	—
Serine	—	25	25	50
Threonine	—	10	—	100
Lysine	—	10	—	—
Sucrose	34 000	60 000	45 000	45 000
Agar (Difco)	6000	—	—	—
pH	5	5.5	5.5	5.8

الاستعانة بالمجهر . ويكتمل نمو الأجنة بعد زراعتها ، ثم تنمو معطية نباتات صغيرة ، يتم نقلها بعناية إلى أصص معقمة . وجدير بالذكر أن الأجنة الصغيرة لاتكمل تكوينها ، وإنما تنمو إلى كالس فى بعض الحالات ، ثم تتميز فيه بعد ذلك نباتات صغيرة . يحدث ذلك – على سبيل المثال – فى الذرة إذا زرعت الأجنة بعد حوالى ١٨ يوما من التلقيح .

وقد تمكن Harberd (١٩٦٩) من زراعة أجنة بعض الهجن النوعية فى الجنس *Brassica* بطريقة سهلة ، إذ قام بحصاد مبايض الأزهار الملقحة فى الوقت المناسب ، وعقّمها سطحيًا ، وقطعها طوليًا ، ثم نقلها إلى بيئة مغذية على جهاز هزاز . أدت الحركة الدائمة للبيئة المغذية إلى خروج عدد من الأجنة من المبايض ؛ حيث نمت فى البيئة المغذية بدرجة مماثلة لما يحدث عند اتباع الطرق الأخرى الأكثر صعوبة .

وأمكن كذلك زراعة أجنة الهجين النوعى *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* قبل اكتمال تكوينها بزراعة البذور غير المكتملة التكوين المحتوية على هذه الأجنة فى بيئة خاصة . أنتجت البذور نسيج كالس ، تميزت فيه نباتات كانت ثنائية أو رباعية المجموعة الكروموسومية ؛ مما يدل على أنها لم تنشأ من نسيج الإندوسبرم الثلاثى . كما استدل على أن هذه النباتات كانت هجنا نوعية من صفات النوع *L. peruvianum* الذى استخدم كمصدر لحبوب اللقاح ، التى ظهرت فى الهجن ؛ مثل : وجود صبغة الأنثوسيانين (حيث استخدمت سلالة من الطماطم خالية من الأنثوسيانين كأم فى التهجين) ، وشكل الأوراق ، والأزهار ، والثمار ، بالإضافة إلى عقم النباتات الهجين (Thomas & Pratt ١٩٨٢) . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الأجنة .. يراجع Raghavan (١٩٨٠) .

مزارع البروتوبلازم

تعد مزارع البروتوبلازم Protoplast Culture (مزارع الخلايا بدون جدرها السيلولوزية) ضرورية لكل من عملية دمج البروتوبلازم Protoplasm fusion – عند الرغبة فى إجراء تهجينات نوعية بعيدة – وعملية إدخال أجزاء غريبة من الحامض النووى دى إن أى DNA ، أو عضيّات خلوية Cell Organells أو بكتيريا ، أو فيروسات معينة فى حالات

الهندسة الوراثية . ومن الضرورى – لتحقيق ذلك – عزل البروتوبلازم عن الجدار الخلوى ، وزراعته فى بيئة تسمح بتكاثره ، ثم بتميز نباتات كاملة منه .

يفصل الجدار الخلوى السيليلوزى عن البروتوبلازم بسهولة ؛ بواسطة إنزيم السليولين Cellulase الذى يحضر من مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria* . وقد ظهرت منذ عام ١٩٦٨ تحضيرات تجارية من إنزيمى ماسيروزيم macerozyme ، وسليولين ، واستخدمت بتعريض قطع من النسيج النباتى للإنزيم الأول – ماسيروزيم – لفصل الخلايا عن بعضها ، ثم إضافة الإنزيم الثانى – سليولين – لهضم الجدر الخلوية ، ولكن تفضل إضافتهما معًا فى آن واحد .

وقد ظهرت بعد ذلك عدة تحضيرات تجارية أخرى من الإنزيمات التى تستخدم فى مزارع البروتوبلازم (جدول ١٧-١٢) . وأمكن بواسطة هذه الإنزيمات فصل البروتوبلازم عن الجدار الخلوى فى أية خلية نباتية لم تتلجنن جدرها ، أيًا كان النسيج الذى أخذت منه . ويعد إنزيم بكتنيز Pectinase ضروريًا لتحليل الصفيحة الوسطى وفصل الخلايا عن بعضها .

تعد الأوراق حديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلازم . يُطَهر النسيج النباتى المستعمل سطحيًا ، ثم تسلخ بشرة الورقة ، أو يقطع الجزء النباتى المستخدم إلى أجزاء صغيرة ، قبل وضعه فى محلول الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية . وتفضل أن تكون المعاملة بالإنزيمات الهاضمة تحت تفريغ ، لإسراع عملية تخلل محلول الإنزيمات بين الخلايا . كما يفيد -أيضًا- تحريك الأنسجة المعاملة بوضعها فى جهاز هزاز فى أثناء المعاملة . وتتراوح فترة المعاملة بالإنزيمات من نصف ساعة إلى ٢٠ ساعة .

تتشابه بيئات مزارع البروتوبلازم مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير ، وتفضل البيئات السائلة ، مع مراعاة الدقة فى ضبط الضغط الآسموزى للبيئة . يبدأ تمثيل الجدر الخلوية حول البروتوبلازم بمجرد فصل الإنزيمات عنه . ويظهر أول الدلائل على تكوين الجدر السيليلوزية بعد نحو ٢ – ٤ أيام من زراعة البروتوبلازم ، بينما تبدأ معظم الانقسامات الخلوية بعد ٧ – ١٤ يوماً من الزراعة ، ويؤدى ذلك إلى تكوين نسيج كالس . ويبين جدول (١٧-١٣) تركيب إحدى البيئات المستخدمة فى مزارع البروتوبلازم .

جدول (١٧ – ١٢) : بعض الإنزيمات المتوفرة تجارياً ، والتي تستخدم في عزل البروتوبلازم .

الإنزيم	الكائن المنتج للإنزيم	الشركة المنتجة
Cellulase R-10	*Trichoderma viride*	Kinki Yokult Mfg. Co. Ltd., 8-12, Shingikancho, Nishinomiya, Japan
Meicelase-P	*Trichoderma viride*	Meiji Seiki Kaisha Ltd., No. 8, 2-Chome, Kyobashi, Chuo-Ku, Japan
Hemicellulase H-2125	*Rhizopus* sp.	Sigma, München
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.	Kinki Yokult Mfg. Co. Ltd.
Pectinase (purified)	*Aspergillus niger*	Sigma Chem. Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, U.S.A.
Pectolyase Y23	*Aspergillus japonicus*	Seishin Pharm. Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama, Nagareyama-shi, Chiba-ken, Japan
Pectinol	*Aspergillus* sp.	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Philadelphia, PA 19105, U.S.A.
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*	Sigma Chem. Co.
Driselase	*Irpex lactes*	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan

وعلى الرغم من كثرة وتنوع الأنواع النباتية التى أعطت نمو كالس فى مزارع البروتوبلازم .. إلا أن معظم الأنواع التى حدث فيها تميز (أى نمت فيها النباتات من مزارع البروتوبلازم) كانت من العائلة الباذنجانية . وتشمل القائمة التى تميزت فيها نباتات من مزارع البروتوبلازم : الفلفل ، والبطاطس ، والباذنجان ، والدخان ، والبيتونيا ، وأنواع أخرى قليلة من العائلات المركبة ، والصليبية ، والنجيلية ، والزنبقية ، والبقولية وغيرها .

ولمزيد من التفاصيل عن مزارع البروتوبلازم .. يراجع Vasil (١٩٧٦) ، و Hanke (١٩٨٠) ، و Vasil & Vasil (١٩٨٠) و Power & Chapman (١٩٨٥) .

جدول (١٧ – ١٣) : بيئة لزراعة البروتوبلازم .

المكونات	الكمية (مجم / لتر)	المكونات	الكمية (مجم / لتر)
Mineral salt			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	600	$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.00
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	300	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0.025
Sequestrene 330 Fe[c]	28	$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	0.025
Sugars			
Glucose	68 400	Mannose	125
Sucrose	125	Rhamnose	125
Fructose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Mannitol	125
Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH_4OH)			
Sodium pyruvate	5	Malic acid	10
Citric acid	10	Fumaric acid	10
Vitamins			
Inositol	100	Biotin	0.005
Nicotinamide	1	Choline chloride	0.5
Pyridoxine-HCl	1	Riboflavin	0.1
Thiamine-HCl	10	Ascorbic acid	1
D-Calcium pantothenate	0.5	Vitamin A	0.005
Folic acid	0.2	Vitamin D_3	0.005
p-Aminobenzoic acid	0.01	Vitamin B_{12}	0.01
Hormones	Soybean x barley	Soybean x pea or *N. glauca*	
2,4-D	1	0.2	
Zeatin	0.1	0.5	
NAA	—	1	
Vitamin-free casamino acid[d]	125 mg l^{-1}		
Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)	10 ml l^{-1}		

مزارع القمة الخضرية الميرستيمية

يستفاد من مزارع القمة الخضرية الميرستيمية Meristem Shoot Tip Culture فى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية ، ويعد ذلك أمراً بالغ الأهمية فى المحاصيل التى تتكاثر خضرياً ، والتى تنتقل فيها الفيروسات تلقائيا مع الأجزاء الخضرية المستخدمة فى التكاثر .

وبرغم أن النباتات قد تكون مصابة جهازياً بالفيروسات .. إلا أن القمة النامية تكون غالباً خالية تماماً من الفيروسات ، أو لاتحتوى إلا على قليل جداً منها ؛ ويرجع ذلك إلى الأسباب الآتية :

١- خلو القمة الميرستيمية من الأنسجة الوعائية التى يكون انتقال الفيروسات فيها سريعاً ، بينما يكون انتقالها خلال الروابط البروتوبلازمية أبطأ من سرعة نمو القمة النامية .

٢- يكون النشاط الأيضى فى الخلايا الميرستيمية عالياً بدرجة يقل معها تكاثر الفيرس فيها .

٣- تكون نظم المقاومة لتكاثر الفيروسات أعلى فى الأنسجة الميرستيمية مما فى أى نسيج آخر .

٤- قد يثبط التركيز العالى للأوكسين الطبيعى فى القمة النامية نشاط الفيروسات فيها .

ولهذه الأسباب كلها .. فإن فصل القمة الميرستيمية وزراعتها فى بيئة صناعية يؤدى إلى إنتاج نباتات خالية من الإصابات الفيرسية . وقد استخدمت هذه التقنية تجارياً ، لإنتاج نباتات خالية من الفيرس من عديد من الأنواع النباتية ؛ مثل : الشليك ، والبطاطس ، والبطاطا ، والروبارب ، والكاسافا ، والكرسون المائى ، واليام ، وقصب السكر ، والتفاح ، والموز ، وعديد من نباتات الزينة التى تتكاثر خضرياً .

ويفضل استعمال مصطلح مزارع القمة الميرسيتيمة Meristem - Tip Culture فى حالة استعمال القمة الميرستيمية فى الزراعة (شكل ١٧-٦) ، وهى التى يكون عرضها - عادة - حوالى ١٠٠ ميكرون ، وطولها حوالى ٢٥٠ ميكروناً . وبرغم أن هذا الجزء ينتج

شكل (١٧ – ٦) : القمة الميرستيمية كما تبدو بعد ١٢ ساعة من زراعتها .

- غالباً – نباتات خالية من الفيرس .. إلا أنه قد يصعب فصله ؛ لذا .. تستعمل – أحياناً– القمة النامية كلها ، وهى التى يكون عرضها –عادة ١٠٠ ميكرون ، وطولها ٥٠٠ ميكرون . ويطلق على المزارع فى هذه الحالة اسم Shoot - Tip Culture ، وهى تنتج كذلك نباتات خالية من الفيرس فى أغلب الأحيان (شكل ١٧–٧) . تفصل القمم النامية تحت المجهر . ويعتبر فصل القمة النامية سريعًا – دون إحداث أضرار بها – من أهم مقومات نجاح مزارع القمة الميرستيمية . هذا .. بالإضافة إلى أهمية بيئة الزراعة التى يجب أن تكون محفزة لتكوين الجنور والأوراق من القمم الميرستيمية المزروعة . ويبين جدول (١٧–١٤) تركيب عدد من البيئات التى استخدمت فى مزارع القمة الميرستيمية . وبرغم سهولة الزراعة فى بيئة شبه صلبة تحتوى على الأجار .. إلا أنها تحفز تكوين الكالس فقط ، وهو أمر غير مرغوب فيه فى هذه المزارع .

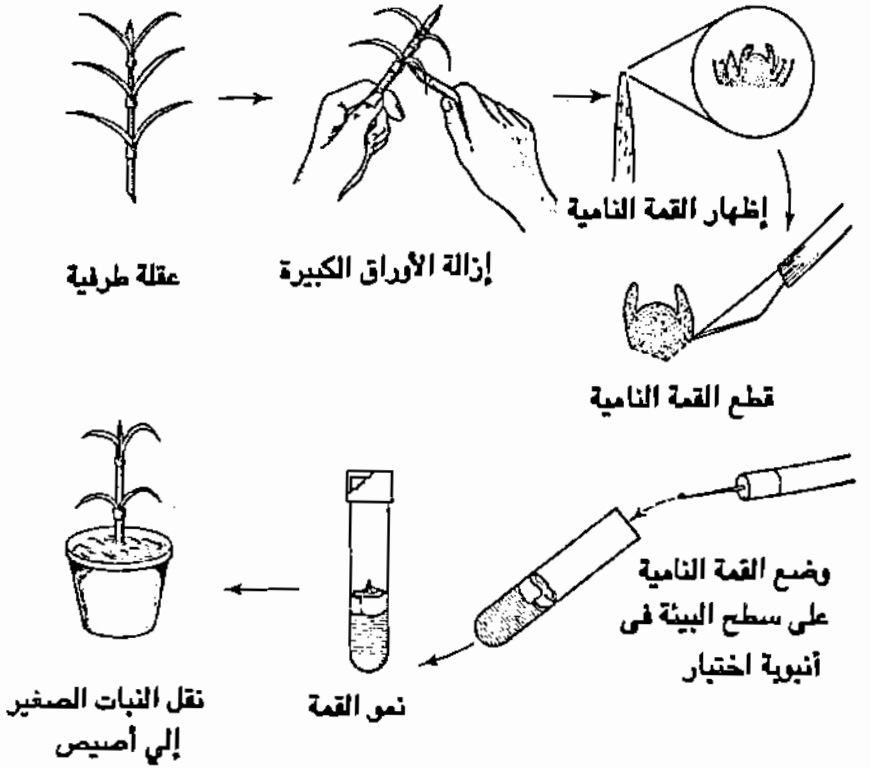
وتزداد فرصة تميز النباتات فى المزرعة كلما ازداد حجم القمة الميرستيمية المزروعة ؛ ذلك لأن القمم الصغيرة تنتهى غالباً بتكوين جنور وكالس ، وربما لاتعطى جنوراً ألبتة إن كانت صغيرة جداً ، فى حين أن القمم الخضرية الكبيرة ربما تكون خالية من الفيرس ؛ لـذا .. فإن القاعدة هى أن تكون القمم الميرستيمية المزروعة صغيرة بالقدر الذى يضمن خلوها من الفيرس ، وكبيرة بالقدر الذى يسمح بتميزها إلى نباتات مكتملة النمو .

وقد وجد أن النباتات المصابة جهازيًا بالفيروسات تعطى عند زراعة أى من أنسجتها المصابة خلايا كالس ، تختلف فى محتواها من الفيرس ، وأمكن الحصول على نباتات خالية من الفيرس من خلايا الكالس السليمة فى هذه المزارع . كذلك .. وجد أن نسبة النباتات الخالية من الفيرس كانت أعلى بكثير من النباتات التى تميزت من الكالس فى مزارع القمة الميرستيمية عما فى النباتات التى تميزت من القمة الميرستيمية مباشرة . وربما يرجع السبب فى ذلك إلى أن سرعة تكاثر الفيرس تكون أقل من سرعة تكاثر الخلايا فى نسيج الكالس . هذا .. إلا أن كثيراً من الأنواع النباتية الهامة لم تتميز فيها نباتات من نسيج الكالس ، كما أن هذا النسيج لايكون ثابتاً وراثيًا .

ولمزيد من التفاصيل عن مزارع القمة الميرستيمية .. يراجع Langhans وآخرون (١٩٧٧) ، و Ingram (١٩٨٠) .

مزارع الإكثار الدقيق

يستفاد من مزارع الإكثار فى إنتاج سلالات خضرية تحتوى على عشرات الآلاف من النباتات الصغيرة خلال فترة وجيزة . ويفضل دائمًا استخدام القمة الميرستيمية ؛ لكى تكون النباتات المنتخبة خالية من الفيروسات . أما إن لم يكن ذلك ضروريًا .. فإنه يمكن استعمال أجزاء صغيرة من ساق النبات ، تحتوى كل منها على عقدة وبرعم جانبى (nodal segments) ؛ ذلك لأن البراعم الجانبية المفصولة بمفردها من الأشجار البالغة لاتنمو فى معظم الحالات ، بينما يساعد النسيج الأمى الموجود مع البرعم الإبطى فى هذه العقل (nodal cuttings) على نمو البرعم . وتتحمل البراعم الجانبية عمليات التعقيم أفضل من البراعم الطرفية . ويمكن استعمال أى جزء نباتى آخر فى التكاثر الدقيق إذا أمكن دفعه لتكوين براعم عرضية ، سواء تكونت من خلال نسيج الكالس ، أم بدونه .



شكل (١٧ – ٧) : زراعة القمة النامية Shoot Tip Culture فى القرنفل .

وتستخدم لهذا الغرض أجزاء من الجذور ، والسيقان ، والأوراق .. ويتوقف الاختيار على قدرة العضو النباتى على تكوين براعم عرضية .

يحدث التكاثر الدقيق فى المزارع بواحدة من ثلاث طرق ، وهى :

١– من خلال الكالس :

إن القدرة الفائقة للخلايا النباتية على التكاثر فى المزارع وإنتاج نسيج كالس .. تعطى فرصة كبيرة لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات من هذه الخلايا لدى حدوث التميز النباتى بها. ويحدث التميز إما بتكوين الجذور والنموات الخضرية مباشرة ، وإما من خلال تكون الأجنة الجسمية ، ويعد الإكثار من خلال نسيج الكالس أسرع طرق الإكثار الدقيق ، إلا أن

جدول (١٧ – ١٤) : تركيب بعض البيئات التي استخدمت ، من قبل باحثين مختلفين في مزارع القمة الخضرية الميرستيمية ، لأنواع مختلفة من النباتات .

المكونات	البيئات (مجم / لتر)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
NH_4NO_3	—	—	—	—	—	60	60	—
KNO_3	125	125	125	200	125	—	—	125
$(NH_4)_2SO_4$	—	—	—	—	1000	—	—	—
KCl	—	—	—	—	1000	80	80	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	—	500	500	—	—	—	—	—
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	500	—	—	800	500	170	170	600
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	125	125	125	200	125	240	240	125
KH_2PO_4	125	125	125	200	125	40	40	125
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	—	—	—	—	1	—	—	—
Fe-citrate	—	—	—	—	5	5	—	—
$Fe(SO_4)_3$	—	25	—	—	—	—	27.8	25
Na_2-EDTA	—	—	—	—	—	—	37.3	—
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$		0.8		—	0.1	—	22.3	1
$ZnSO_4 \cdot H_2O$		0.04		0.2	1	0.05	8.6	0.05
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$		0.025		0.3	—	—	—	0.025
$MnCl_2 \cdot H_2O$		—		1.8	—	0.4	—	—
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	(10 drops of	0.025	(10 drops of	—	—	—	0.025	0.025
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Berthelot	0.025	Berthelot	0.08	0.03	0.05	0.025	0.025
$AlCl_3$	soln.)[b]	—	soln.)[b]	—	0.03	—	—	—
$H_2MoO.H_2O$		—		0.02	—	0.02	—	—
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$		—		—	—	—	0.025	—
KI		0.25		—	0.01	—	0.83	0.25
H_3BO_3		0.025		2.8	1	0.6	6.2	0.025
Myo-inositol	0.1	0.001	0.1	—	100	0.1	0.1	—
Ca-pantothenate	10	0.001	10	—	1	10	10	—
Nicotinic acid	1	—	1	5	1	1	1	—
Pyridoxine-HCl	1	—	1	1	1	1	1	—
Thiamine-HCl	—	0.001	—	1	1	1	1	1
Biotin	0.1	0.001	0.01	—	0.01	0.01	0.01	—
Cystein	—	0.001	10	—	1	10	10	—
Adenine	—	—	—	—	0.1	5	5	—
$AdSO_4$	—	—	—	—	—	—	—	8
Casein hydrolysate	—	—	1	—	—	1	1	—
Sucrose	20 000	—	20 000	30 000	20 000	—	—	—
Glucose	—	40 000	—	—	—	10 000	30 000	40 000

هذه الطريقة غير مفضلة ؛ لما هو معروف عن الكالس من عدم ثباته الوراثى ؛ حيث تظهر به حالات مختلفة من التضاعف الكروموسومى ، كما أن الكالس لم تتميز به نموات نباتية فى عديد من المحاصيل الهامة إلى الآن ؛ وتعد هذه الطريقة هى الوحيدة المستخدمة لإكثار أنواع مهمة مثل الموالح ، والنخيل ، والقهوة .

٢- من خلال تكوين البراعم العرضية :

على الرغم من أن النباتات التى تتميز من أنسجة الكالس تعد عرضية المنشأ .. إلا أنه يعنى بالبراعم العرضية .. تلك التى تتكون من العضو النباتى مباشرة ، دون أن يفصل بينهما نسيج كالس . وتتكاثر أعداد كبيرة جداً من النباتات الاقتصادية بهذه الطريقة .

٣- من خلال تحفيز التفرع الجانبى :

يتم تحفيز النمو الجانبى فى المزارع بتوفير السيتوكينين بها بتركيز معين ، إما مع الأوكسين ، وإما بدونه . ويؤدى استمرار توفر السيتوكينين فى المزرعة إلى نمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمة الميرستيمية التى تنمو من البراعم المزروعة (أى من الـ nodal segments) ، ثم تنمو البراعم الجانبية التى تتكون فى القمم الميرستيمية الجديدة .. وهكذا يؤدى استمرار هذه العملية - لعدة مرات - إلى تكون كتلة من النموات الجديدة . وبرغم توقف تكاثر المزرعة الواحدة بهذه الطريقة بعد فترة .. إلا أنه يمكن استمرار التكاثر - فى هذه المرحلة - بنقل أجزاء من المزرعة إلى مزارع أخرى جديدة ؛ وبذلك .. يمكن استمرار التكاثر إلى مالانهاية ، إلى درجة أنه يمكن - على سبيل المثال - إنتاج من ١٥-٢٥ مليون نبات شليك من نبات واحد فى العام ؛ لأن كل نبات يكون قادرا على إنتاج ١٠ نباتات جديدة كل أسبوعين .

تعد عملية التجنير ضرورية فى الحالات التى لاتنمو فيها النباتات من الأجنة الجسمية ، بينما توجد الجذور- طبيعياً - فى حالة التميز من الجنين الجسمى الذى يحتوى - بطبيعته - على جذير . ولإحداث التجنير .. يلزم نقل النموات المتكونة إلى بيئة أخرى ، تختلف فى مكوناتها الهرمونية عن بيئة التكاثر . ويكون نقل النموات الخضرية - عادة - إلى هذه البيئات وهى بطول حولى ١ سم ، ثم تنقل النباتات بعد أن تتكون جذورها إلى أصص معقمة بحرص تام ، وتتعهد بالرعاية إلى أن تكبر ،

حيث تنقل بعد ذلك إلى البيوت المحمية .

ويبين جدولا (١٧-١٥) ، و (١٧-١٦) تركيب بيئات الإكثار الدقيق لكل من نخيل التمر ، والشليك على التوالي -كمثالين- علما بأن البيئات المناسبة تختلف كثيراً من نبات إلى آخر .

ولمزيد من التفاصيل عن أساسيات مزارع الإكثار الدقيق .. يراجع Hussey (١٩٨٠ ، ١٩٨٣) ، و Wetherell (١٩٨٢) ، و Hartmann & Kester (١٩٨٣) .

جدول (١٧ - ١٥) : بيئات الإكثار الدقيق لنخيل التمر .

المكونات	البيئة (مجم / لتر)	
	من خلال الكالس	من خلال الأجنة الجسمية
مركبات غير عضوية		
NH_4NO_3	1650	1650
KNO_3	1900	1900
$CaCl_2$	322	322
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	181	181
KH_2PO_4	170	170
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	170	170
KI	0.83	0.83
H_3BO_3	6.2	6.2
$MnSO_4 \cdot H_2O$	16.9	16.9
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	8.6	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25	0.25
$CuSO_4$	0.016	0.016
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025	0.025
FeNa-EDTA	36.7	36.7
مركبات عضوية		
Inositol	100	100
Thiamine HCl	0.4	0.4
منظمات نمو		
2,4-D	100	—
2-ip	3	—
فحم منشط eutralized charcoal	3000	3000
أجار	0.8%	0.8%
سكروز	3%	3%

جدول (١٧ - ١٦) : بيئات الإكثار الدقيق للشليك .

المكونات	البيئات (مجم / لتر)		
	التهيئة	التكاثر	التجذير
مركبات غير عضوية			
KNO_3	250	250	250
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	250	250	250
KH_2PO_4	250	250	250
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4\ H_2O$	1000	1000	1000
KI	0.83	0.83	0.83
H_3BO_3	6.2	6.2	6.2
$MnSO_4 \cdot 4\ H_2O$	16.9	16.9	16.9
$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	8.6	8.6	8.6
$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0.25	0.25	0.25
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0.025	0.025	0.025
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	27.8	27.8	27.8
$Na_2 \cdot EDTA$	37.3	37.3	37.3
مركبات عضوية			
Inositol	100	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5	0.5
Thiamine HCl	0.1	0.1	0.1
Glycine	2	2	2
منظمات نمو			
BAP	0.1	1	—
IBA	1	1	1
GA_3	0.1	0.1	—
جلوكوز	4%	4%	4%
آجار	0.8%	0.8%	0.8%

مصادر إضافية

لمزيد من التفاصيل عن أساسيات مزارع الأنسجة .. يمكن الرجوع إلى المصادر التالية التي تتناول الموضوع بشكل عام : Paul (١٩٧٠) ، و Murashige (١٩٧٤) ، و Ingram & Butcher (١٩٧٦) ، و Amer . Soc . Hort . Sci (١٩٧٧) ، و Helgeson (١٩٨٠) ، و Sala وآخرون (١٩٨٠) ، و Vasil (١٩٨٠) ، و Thorpe (١٩٨١) ، و Reinert & Yeoman (١٩٨٢) ، و Bhojwani & Razdan (١٩٨٣) ، و Mamtell & Smith (١٩٨٣) ، و Dixon (١٩٨٥ أ ، ١٩٨٥ ب) .