

## أساسيات مزارع الأنسجة

### 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 حيز مبرد 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 الزئبق، والمضادات الحيوية)، لتطهير العينات النباتية سطحياً.

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

- ١ - دوارق مخروطية بأحجام: ١٠٠، و ٢٥٠، و 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 غسلها
- ٨ - حجرة أو حيز خاص صغير مزود بالهواد الساخن، لتجفيف الأوعية، والزجاجيات بعد غسلها
- ٩ - فرن لتجفيف الأوعية والزجاجيات، وتعقيم الزجاجيات.
- ١٠ - لال سلكية، توضع بها أوعية البيئات الصغيرة فى أثناء تعقيمها، والزجاجيات الصغيرة فى أثناء تجفيفها.
- ١١ - جهاز لتقطير الماء
- ١٢ - أوعية بلاستيكية (بحجمى ١٠، و ٢٠ لترًا)، لتخزين الماء المقطر
- ١٣ - ميزانان، أحدهما لوزن الكميات الصغيرة، والثانى لوزن الكميات الكبيرة نسبياً
- ١٤ - قرص ساخن hot plate مع قلاب مغناطيسى magnetic stirrer، لإذابة المركبات الكيميائية
- ١٥ - مضخة تفرغ exhaust pump لتسهيل عملية التعقيم بالترسيح
- ١٦ - قنينات بلاستيكية بأحجام مختلفة لتخزين المحاليل سائلة أو مجمدة
- ١٧ - ثلاثة لتخزين المركبات الكيميائية، والمحاليل القياسية التى تحضر منها البيئات بالعينات النباتية
- ١٨ - مجمدة لتخزين المحاليل القياسية لفترات أطول، وبعض الإنزيمات. ولبن جوز الهند إلخ
- ١٩ - جهاز توليد بخار steamer، لإذابة الآجار والبيئات
- ٢٠ - جهاز قياس الـ pH لضبط الـ pH البيئات والمحاليل
- ٢١ - أوتوكليف (جهاز تعقيم بالبخر تحت ضغط)، أو قدور طهى تحت ضغط، لتعقيم البيئات
- ٢٢ - قرص ساخن مُنظَّم بالحرارة heat-regulated plate، للتعقيم بالبخر فى قدور 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 بصوان مناسبة؛ لنقل البيئات والأدوات.
- ٢٦ - حجرة محكمة الغلق Inoculation Chamber يتجدد فيها الهواء بعد ترشيحه، لاستخدامها في كل العمليات التي تجرى في ظروف معقمة.
- ٢٧ - لبة (شملة) كحول spirit lamp أو مصباح بنزين 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 بثره 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 ثنائي العينين binocular؛ لتجزئ النباتات المجهرية الحجم.
- ٣٨ - مكيفات هواء للمحافظة على درجة حرارة ثابتة لحجرة المزارع.
- ٣٩ - مزاز للمزارع السائلة.
- ٤٠ - مناخل من الصلب الذى لا يصدأ، ذات ثقوب بأقطار مختلفة؛ لفصل تجمعات الخلايا التي تكون بأحجام مختلفة.
- ٤١ - جهاز طرد مركزى صغير، لترسيب الخلايا؛ بغرض تحديد حجم النمو الخولى، 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.

## مكونات 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 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 ٠.٥ مللى مولار. وتتضمن النيتروجين، والفوسفور، والبوتاسيوم، والكالسيوم، والمغنيسيوم، والكبريت)، أم صغرى (وهى تلك التى تحتاجها النباتات بتركيزات لا تزيد عن ٠.٥ مللى مولار، وتتضمن الحديد، والمنجنيز، والبورون، والنحاس، والزنك، واليود، والمولبيدوم، والكوبالت).

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

وتتباين تركيزاته مختلف العناصر فى البيئات، كما يلى:

١ - النيتروجين غير العضوى يتراوح تركيزه بين ٠.٢٥ و ٦٠ مللى 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 البيئـة نحو الارتفاع - فى حالة تواجد كل النيتروجين فى صورة نتراتية - من جهة أخرى وعادة تستعمل النترات بتركيز ٢٥-٤٠ مللى مولار، والأمونيوم بتركيز ٢-٢٠ مللى مولار وعند استخدام الأمونيوم بتركيزات تزيد عن ٨ مللى مولار يتعين إضافة أى من

## أساسيات مزارع الأنسجة

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

٢ - يستعمل البوتاسيوم - عادة - بتركيز ٢-٢٦ مللى مولار، وغالباً على صورة ملح النترات أو الكلوريد.

٣ - يكفى - عادة - تركيز ١-٣ مللى مولار من كل من الكالسيوم، والكبريتات، والفوسفات، والمنيسيوم.

٤ - يستعمل الحديد في صورة مخلبية مع الـ diamine tetra acetic acid، حيث يبقى ميسراً حتى ولو ارتفع pH البيئة إلى ٨.٠.

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

N <sub>6</sub>	B <sub>5</sub>	MS	الملح
العناصر الكبرى (بالملى مولار)			
١,١	١,٠	٣	Ca
—	٢,٢	٦	Cl
٣١	٢٥	٢٠,١	K
٦,٦	٢	٢٠,٦	NH <sub>4</sub>
٢٨	٢٥	٣٩,٤	NO <sub>3</sub>
٢,٩٤	١,١	١,٢٥	PO <sub>4</sub>
٠,٢	—	١,٨	SO <sub>4</sub>
٠,٧٥	١,٠	١,٥	Mg
العناصر الصغرى (بالميكرومول)			
٢٦	٥٠	١٠٠	B
٠,١١	٠,١	٠,١١	Co
—	٠,١	٠,١	Cu
١	١	١	Fe
٤,٨	٤,٥	٥	I
١٩,٥	٦٠	٩٢,٥	Mn
—	١	١	Mo
٥,٢	٧	٣٠	Zn

## الكربون ومصادر الطاقة

بعد السكر والجلوكوز هد مصدرا الطاقة الرئيسيين المستعملين فى مزارع الأنسجة، ويمكن استعمال الفراكتوز، إلا أنه أقل كفاءة. يتحلل السكر فى البيئة - سريعا - إلى جلوكور وفراكتوز. حيث يستهلك الجلوكوز فى البداية ويليه الفراكتوز يستعمل سكرور - عادة - بتركيز ٢ ٥٪.

ومن بين المواد الكربوهيدراية الأخرى التى اختبر بأسيها اللاكتوز، والمالتوز، والجالاكتوز، والنتا، ولكنها كانت جميعا أقل كفاءة عن السكر والجلوكوز هذا وتحتوى معظم البيئات على الـ myo-inositol بتركيز حوالى ١٠٠ مجم/لتر، لاجل تحسير نمو الخلايا

## الفيتامينات

تقوم نباتات بتمثيل الفيتامينات التى تلزم لنموها وتطورها. إلا أن الخلاب النباتية فى المزارع تكون فى حاجة إلى مصدر للفيتامينات بعد فيتامين B<sub>1</sub> (الثيامين) ، الفيتاميد التى يحتم اضافها ويتحسن النمو بإضافة كل من حامض النيكوب و فيتامين B (بيريودوكسين) وبحوى بعض البيئات على الفيتامينات حامض البانتويك p pantothenic acid، والبيوتين، وحامض الفوليك. وبارا أمينو حامد لبرويك p-amino benoic acid، وكوريد 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 الجبريلينات، وحامض الأبسيسك، والإثيلين .. إلخ أقل أهمية ومن بين منظمات النمو المبيئة فى جدول (٢-٢)، فإن إندول حامض الخليك IAA، والزياتين هما الهرمونان الطبيعيان الوحيدان.

جدول (٢-٢) مظمات النمو المستخدمة في بيئات الزراعة.

الوزن الجزيئي	التركيب الكيميائي	الاسم
١٨٦.٦٠	$C_8H_7O_3Cl$	<i>p</i> -Chlorophenoxy acetic acid
٢٢١.٠٠	$C_8H_6O_3Cl_2$	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
١٧٥.٢	$C_{10}H_9NO_2$	Indole-3 acetic acid
٢٠٣.٢	$C_{12}H_{15}NO_2$	Indole-3 butyric acid
١٨٦.٢	$C_{12}H_{10}O_2$	$\alpha$ -Naptbalene acetic acid
٢٠٢.٣	$C_{12}H_{10}O_3$	$\beta$ -Naphthoxy acetic acid
١٨٩.١	$C_5H_5N_5 \cdot 3H_2O$	Adenine
٤٠٤.٤	$(C_5H_5N_5)_2 \cdot H_2SO_4 \cdot 2H_2O$	Adenine sulphate
٢٢٥.٢	$C_{12}H_{11}N_5$	Benzyl adenine
٢٠٣.٣	$C_{10}H_{13}N_5$	N-isopentylamino purine
٢١٥.٢	$C_{10}H_9N_5O$	Kinetin
٢١٩.٢	$C_{10}H_{13}N_5O$	Zeatin
٣٤٦.٤	$C_{19}H_{22}O_6$	Gibberellic acid
٢٦٤.٣	$C_{15}H_{20}O_4$	Abseisic acid
٣٩٩.٤	$C_{22}H_{25}NO_6$	Colchicine

ونعرض - فيما يلي - قائمة بأهم الأوكسينات الفاعلة الاستعمال في مزارع الأنسجة:

الاسم الكيميائي	الاسم العادي 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-naphthylacetic acid	NOA
4-amino-2,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram

كما تقدم - فيما يلي - قائمة بأهم الصيتوكينينات الشائعة الاستعمال في مزارع الأنسجة (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الاسم الكيميائي	الاسم العادي أو المختصر
6-benzylaminopurine	'BAP
[N <sup>6</sup> -(2-isopentyl)adenine]	~2iP (IPA)
6-furfurylaminopurine	'Kinetin
1-phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea	~Thidiazuron
4-hydroxy-3-methyl-trans-2-butenylaminopurine	~Zeatin

أ - محضر صناعياً.  
ب - طبيعي  
ج - substituted phenylurea-type

وتظهر في جدول (٣-٢) قائمة ببعض منظمات النمو الأخرى الأقل استعمالاً في مزارع الأنسجة

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

المركب	الاسم المختصر أو العادي	الوزن الجزيئي	الوظيفة/النشاط
Chlorocholine chloride <sup>a</sup>	CCC	158.1	مثبط لتمثيل حامض الجبيريليك
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N <sup>1</sup> -phenylurea <sup>a</sup>	4-CPPU	247.7	شبيه بالسيتوكينين
3,6-Dichloroanisic acid	Dicamba	221.0	أوكسين
2-Naphthoxyacetic acid	NOA	202.2	أوكسين
Phenylacetic acid <sup>a</sup>	PAA	136.2	أوكسين
4-Amino-3,5,6-trichloropicolinic acid	Picloram	241.5	شبيه بالأوكسين
Thidiazuron <sup>a</sup>	TDZ	220.2	شبيه بالسيتوكينين
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid	2,4,5-T	255.2	أوكسين
Zeatin riboside <sup>a</sup>	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 غالباً ما يثبط النمو الجانبي (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 استخداماً فى مزارع الأنسجة، وأكثرها كفاءة الـ 2,4-D. كما يستخدم كذلك كل من الـ NAA، والـ IAA، و IBA، والـ pCPA، والـ trichlorophenoxy acetic acid (اختصاراً: 2,4,5-T)، والبكلورام picloram، وهو 4-amino-3,5,6-trichloropicolinic acid

### السيتركينينات

تشتق السيتركينينات من الأدنين، ولها دور هام فى حث النمو الخضرى، وأكثرها استخداماً الكينتين، والبتريل أدنين (BA)، والبنزىل 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 الجدرى. كما أنها تحفز انمو الجانبي (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.

### الجبريلينات

تستخدم الجبريلينات - عادة - فى تجديد النمو النباتى، كما يعد الـ GA<sub>3</sub> ضرورياً لمزارع القمم الميرستيمية لبعض الأنواع. وعموماً .. فإن الجبريلينات تحث استطالة السيقان والنمو الميرستيمى وكذلك نمو البراعم فى البيئات، إلا أنها تثبط النمو العرضى لكل من الجذور والسيقان.

## حامض الأبسيسك

يعد حامض الأبسيسك ضرورياً لحث تكوين الأجنة في بيئات الزراعة (عن Chawla

٢٠٠٠)

## الإضافات العضوية

١ - النيتروجين العضوى :

تكون الخلايا المزروعة قادرة - عادة - على تمثيل كل الأحماض الأمينية الضرورية لها، إلا أنه غالباً ما تُفيد إضافة مصدراً للنيتروجين العضوى في صورة أحماض أمينية، مثل الجلوتامين والأسبارجين، وبعض النيوكليوتيدات، مثل الأدينين وفى حالة مزارع الخلايا تفيد كثيراً 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 مللى 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 (وتركيبتها بالمليجرام/لتر بين قوسين) هى كما يلى الجليسين (٢)، والأسبارجين (١٠٠)، والتيروزين (١٠٠)، والأرجانين (١٠)، والميستين *cysteine* (١٠)، وأحياناً يضاف - كذلك - كبريتات الأدينين *adenine sulphate* إلى بيئات الآجار بتركيز ٢-١٢٠ مجم/لتر للمساعدة فى عملية التكوين التشكلى *morphogenesis*.

٢ - الأحماض العضوية :

لا يمكن للخلايا النباتية الاعتماد على الأحماض العضوية كمصدر وحيد للكربون، إلا 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 مللى 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 ١ - ٠،١ و ١٠ جم/لتر، بينما يستخدم لبن جوز الهند - عادة - بتركيز ٢٪-٥٪ (حجم إلى حجم). وعموماً.. فإن الاتجاه الغالب هو نحو استخدام بيئات ذات مكونات محددة دون الاعتماد على إضافات من مستخلصات عضوية معقدة (عن Chawla ٢٠٠٠).

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

- ١ - يصفى اللبن (الإندوسبرم) من عدد كبير من ثمار جوز الهند، علماً بأن العدد الكبير للثمار يفيد في تقليل التباينات بين الثمار - في مكونات اللبن ويتعين عدم استعمال لبن أى ثمار يبدو عليه تغيرات في 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٪ حجماً بحجم (عن Dixon & Gonzales ١٩٩٤)

كذلك يستخدم الفحم النباتى المنشط بتركيز ٠،٢٪-٠،٣٪ (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.

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

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

### مركبات التجلُّ

إن مركبات التجلُّ gelling agents هي المسئولة عن تصلب بيئة الزراعة وتحويلها إلى جلّ، ويعد الآجار agar - الذى يُتَّحَصَل عليه من الأعشاب البحرية - هو أكثرها استعمالاً، وهو مركب عديد التسكر ذات وزن جزيئى مرتفع وعند إذابة الآجار فى الماء فإنه يكون جل يربط إليه الماء ويدمص المركبات، وكلما زاد تركيز الآجار كلف زادت قدرته على ربط الماء

يسعمل - عادة - المنتج Difco Bacto agar بتركيز ٠.٦% - ١.٠% (وزن إلى حجم)، ولكن تستعمل - كذلك - صوراً أخرى من الآجار، مثل الآجاروز agarose، والـ phytagar، والـ flow gara

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

وإلى جانب الآجار، فإنه قد تستعمل أحياناً البدائل التالية:

- ١ - الألجينيةت alaginate يستعمل خاصة فى مزارع البروتوبلاست
- ٢ - الجل رابت gelrite يستعمل - عادة - بتركيز ٢.٠%، وهو يجعل البيئات رائقة وشفافة، ويلزم لتكوينه الجل تواجد كاتيونات ثنائية الشحنة مثل الـ  $Mg^{++}$ ، والـ  $Ca^{++}$
- ٣ - البوليمر المخلوق biogel P200 وهو polyacrylamide.

صفا .. ويمكن الزراعة فى بيئة صائفة لا تحتوى على آجار، ويتم فيها توفير دعم هيكلي للنمو بإحدى الوسائل التالية:

- ١ - الصوف الزجاجى أو الصوف الصخرى أو الفوم.
- ٢ - فنطرة من ورق ترشيح توضع فى البيئة السائلة.

٣ - كرات زجاجية صغيرة

٤ - قطعة من الإسفنج الفسكوزي viscose sponge توضع تحت ورقة ترشيح لنحمل البيئة السائلة (عن Chawla ٢٠٠٠).

### وحدات التعبير عن التركيز في بيئات الزراعة

يعبر عن التركيز في بيئات الزراعة بإحدى طريقتين، كما يلي

١ - التركيز بالمليجرام في اللتر

يعبر عن التركيز بالمليجرام في اللتر (mg/l)، فمثلاً

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

$$10^{-7} = 0.1 \text{ mg/l}$$

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

٢ - التركيز المولارى :

يحتوى المحلول المولارى على عدد من جرامات المادة مساو لوزنها الجزيئى، 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  $10^{-6}$ mM

ويجرى التحويل من مللى مولار (mM) إلى جزء فى المليون (mg/l) كما يلي،

مثلاً الوزن الجزيئى للأوكسين 2,4-D هو: ٢٢١.٠

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

ويذا يحتوى اللتر من المحلول المللى 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 ٢٢١ ٠ مجم

كما يجرى التحويل من جزء فى المليون (mg/l) إلى مللى مولارى (mM) كما يلي،

مثلاً الوزن الجزيئى لـ  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  هو:

## التكنولوجيا الحيوية وتربية النباتات

$$147.018 = (16 \times 2) + (1,008 \times 4) + (30453 \times 2) + (40.08)$$

ولتحويل محلول كلوريد كالسيوم بتركيز 440 جزءاً في المليون إلى مللى مولارى

(mM)، تستخدم المعادلة

$$= \frac{10^6}{440} \times 2.99 \text{ مللى مولارى}$$

وبذا فإن 440 مجم/لتر كلوريد كالسيوم = 2.99 مللى مولارى

ويبين جدول (٢-٤) التركيز المولارى المقابل للتركيز بالجزء فى المليون بالنسبة لأهم منظمات النمو الشائعة الاستعمال فى مزارع الأنسجة

جدول (٢-٤). التحويل من مجم/لتر (mg/litre) إلى ميكرومول (uM) لبعض منظمات النمو الشائعة الاستعمال (عن Dixon & Gonzalez 1994).

$\mu\text{M}$								منظمات النمو
Zea	ZiP	K	BAP	IBA	IAA	2,4-D	NAA	M
219.2	203.2	215.2	225.2	203.2	175.2	221.0	186.2	Mg/litre
0.0005	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.0005	0.0004	0.0005	0.001
0.005	0.005	0.005	0.004	0.005	0.006	0.0045	0.005	0.001
0.023	0.025	0.023	0.022	0.025	0.028	0.023	0.027	0.005
0.046	0.049	0.046	0.044	0.049	0.057	0.045	0.054	0.01
0.228	0.246	0.232	0.222	0.246	0.285	0.226	0.27	0.05
0.456	0.492	0.465	0.444	0.492	0.570	0.452	0.54	0.10
1.14	1.23	1.16	1.11	1.23	1.43	1.13	1.34	0.25
2.28	2.46	2.32	2.22	2.46	2.85	2.26	2.69	0.50
4.56	4.92	4.65	4.44	4.92	5.71	4.52	5.37	1.0
22.81	24.61	23.23	22.20	24.61	28.54	22.62	26.85	5.0
45.62	49.21	46.47	44.4	49.21	57.08	45.25	53.71	10.0
114.05	123.03	116.17	111.01	123.03	142.69	113.12	134.26	25.0
228.10	246.06	232.34	222.02	246.06	285.39	226.24	268.53	50.0

NAA =  $\alpha$ -naphthaleacetic acid; 2,4-D = 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; IAA = indole-3-acetic acid; IBA = indole-3-butyric acid; BAP = 6-benzylaminopurine; K = kinetin; ZiP = N-isopentenylaminopurine; Zea = zeatin.

## أنسجيات مزارع الأنسجة

ويبين جدول (٢-٥) التركيب الكيميائي، والوزن الجزيئي لمختلف المركبات التي تدخل في تركيب البيئات المغذية، كما يبين جدول (٢-٦) الوزن الذري لمختلف العناصر التي تدخل في تكوين هذه المركبات (عن Ohojwari & Razdan ١٩٨٣، و Dixon ١٩٨٥، وجميعها معلومات يتعين الإلمام بها ليتمكن تحضير التركيزات المطلوبة من مختلف المركبات).

جدول (٢-٥): الوزن الجزيئي للمركبات الشائعة الاستخدام في بيئات مزارع الأنسجة.

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

جدول (٢-٦) الأوران الذرية للعناصر التي تدخل في تكوين بينات مزارع الأنسجة.

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

### تحديد البيئة المناسبة للزراعة

تجربة مستويات مختلفة من مختلف المركبات التي تدخل في تركيب بينات الزراعة

يتعين عند العمل على نبات جديد أن يبدأ الباحث بتحديد بيئة الزراعة المناسبة لهذا النبات ويفضل دائما تجريب ثلاثة مستويات - منخفضة، ومتوسط، ومرتفع - من الأنواع الأربعة من المركبات التي تدخل في تركيب بينات الزراعة (وهي المركبات المعدنية، والأوكسينات، والسيتوكينينات، والمغذيات العضوية)؛ وبذا فإن التجربة الأولى لتحديد أفضل بيئة للزراعة يمكن أن تتضمن ٨١ معاملة (جدول ٢-٧) ويلى ذلك إجراء تجارب أخرى أصغر؛ للتوصل إلى التركيز الأمثل من كل مركب، مع استعمال أنواع مختلفة من الأوكسينات والسيتوكينينات

## أساليبيات مزارع الأنسجة

جدول (٢-٧): المستويات المحفظة، والمتوسطة، والمرفعة لمختلف مكونات البيئات اللازمة لتحديد البيئة المثلى.

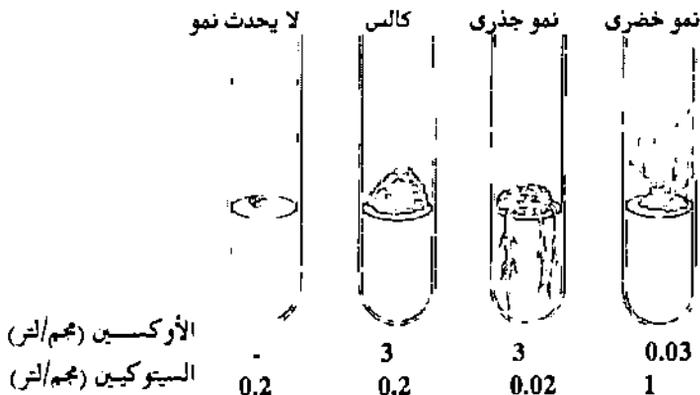
مدى التركيزات (مللي مول/لتر)			
مرتفع	متوسط	منخفض	المكونات
مركبات معدنية			
20	10	5	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
20	10	--	KNO <sub>3</sub>
--	--	0.1	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
2	1	--	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
--	--	1.9	KCl
3	2	1	CaCl <sub>2</sub>
3	1.5	0.5	MgSO <sub>4</sub>
0.15	0.05	0.01	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
0.1	0.05	0.01	MnSO <sub>4</sub>
0.04	0.02	0.001	ZnSO <sub>4</sub>
0.0015	0.0001	0.00001	CuSO <sub>4</sub>
0.001	0.0001	0.00001	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>
0.001	0.0005	0.0001	CoCl <sub>2</sub>
0.005	0.0025	0.0005	KI
0.1	0.05	0.01	FeSO <sub>4</sub>
0.1	0.05	0.01	Na <sub>2</sub> EDTA
0.01	0.001	0.0001	أو كسين
0.01	0.001	0.0001	سيتوكينين
مركبات عضوية			
0.6	0.3	0.1	Inositol
0.04	0.02	0.004	Nicotinic acid
0.006	0.003	0.0006	Pyridoxine HCl
0.04	0.002	0.0001	Thiamine HCl
0.001	0.0002	0.00004	Biotin
0.002	0.001	0.0005	Folic acid
0.005	0.001	0.0002	D-Ca-Pantothenate
0.01	0.001	0.0001	Riboflavin
0.01	0.001	0.0001	Ascorbic acid
0.01	0.001	0.0001	Choline chloride
0.12	0.06	0.01	L-Cysteine HCl
0.05	0.005	0.0005	Glycine
120	60	6	Sucrose

وإذا استخدم الآجار فى تحضير بيئات الزراعة (يكون استخدامه غالباً بنسبة ٨ ٪ - ١٠ ٪) وتجب مراعاة ما يحتويه الآجار من عناصر (خاصة الكالسيوم والمغنيسيوم والعناصر الدقيقة) على صورة شوائب (جدول ٢-٨)

جدول (٢-٨). المحتوى الكيميائى لأنواع آجار Difco المستخدمة فى مراوع الأنسجة

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

أهمية التوازن بين الأوكسين والسيتوكينين فى بيئات الزراعة يلعب التوازن بين مستوى الأوكسين والسيتوكينين فى بيئة الزراعة دوراً أساسياً فى نمو وتميز الأنسجة النباتية من الكالس، حيث تحفز النسب العالية من الأوكسين إلى السيتوكينين نمو الجذور، بينما تحفز النسب المنخفضة تكوين النموات الخضرية، هذا بينما تناسب النسب المثوية المتوسطة استمرار نمو الكالس دون تميز (شكل (٢-١)).



شكل (٢-١): تأثير تركيز الأوكسينات والسيتوكينينات - فى بيئة النمو - على تكوين الكالس، وتميز النموات الجذرية والخضرية.

## أمثلة لبعض البيئات القياسية الشائعة الاستعمال البيئات القياسية

توصل الباحثون إلى عدد من البيئات القياسية لاستخدامها في مزارع الأنسجة (جدول ٢-٩)، وهي التي يمكن إما استخدامها مباشرة، وإما بعد إدخال التعديلات المناسبة عليها، لتصبح أكثر ملاءمة للنوع النباتي المستهدف. ويبين جدول (٢-١٠) تركيز مختلف العناصر في كل من البيئات التي جاء ذكرها في جدول (٢-٩).

جدول (٢-٩): البيئات القياسية المستخدمة في مزارع الأنسجة<sup>(١)</sup>.

### البيئات (الكميات بالجزء في المليون)<sup>(ب)</sup>

المركبات	White's (ج)	Heller's (د)	MS (هـ)	ER (و)	B (ز)	Nitsch's (ح)	NT (ط)
غير العضوية							
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	--	--	1650	1200	--	720	825
KNO <sub>3</sub>	80	--	1900	1900	2527.5	950	950
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	--	75	440	440	150	--	220
CaCl <sub>2</sub>	--	--	--	--	--	166	--
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	750	250	370	370	246.5	185	1233
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	--	--	170	340	--	68	680
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	--	--	--	--	134	--	--
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	300	--	--	--	--	--	--
NaNO <sub>3</sub>	--	600	--	--	--	--	--
NaSO <sub>4</sub>	200	--	--	--	--	--	--
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	19	125	--	--	150	--	--
KCl	65	750	--	--	--	--	--
KI	0.75	0.01	0.83	--	0.75	--	0.83
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.5	1	6.2	0.63	3	10	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	5	0.1	22.3	2.23	--	25	22.3
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	10	--	--
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3	1	8.6	--	2	10	--
ZnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	--	--	8.6
Zn.Na <sub>2</sub> .EDTA	--	--	--	15	--	--	--
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	--	--	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO <sub>3</sub>	0.001	--	--	--	--	--	--
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.01	0.03	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	--	--	0.025	0.0025	0.025	--	--
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	--	--	--	--	--	--	0.03
AlCl <sub>3</sub>	--	0.03	--	--	--	--	--
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	--	0.03	--	--	--	--	--
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	--	1	--	--	--	--	--
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	2.5	--	--	--	--	--	--
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	--	--	27.80	27.8	--	27.8	27.8
Na <sub>2</sub> .EDTA.2H <sub>2</sub> O	--	--	37.3	37.3	--	37.3	37.3
Sequestrene 330Fe	--	--	--	--	28	--	--

تابع جدول (٢-٩):

البيئات (الكميات بالجزء في المليون) (ب)

المكونات	White's (ج)	Heller's (د)	MS (هـ)	FR (و)	B (ز)	Nitsch's (ح)	NT (ط)
العضوية	--	--	100	--	100	100	100
Inositol	--	--	0.5	0.5	1	5	--
Nicotinic acid	0.05	--	0.5	0.5	1	0.5	--
Pyridoxine HCl	0.01	--	0.5	0.5	1	0.5	--
Thiamine HCl	0.01	--	0.1	0.1	10	0.5	1
Glycine	3	--	2	2	--	2	--
Folic acid	--	--	--	--	--	0.5	--
Biotin	--	--	--	--	--	0.65	--
Sucrose	2%	--	3%	3%	2%	2%	1%
D-Mannitol	--	--	--	--	--	--	12.7%

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

(ب) أعطيت تركيزات المانيتول والسكروز كنسب مئوية.

(ج) بيئة هوايت White.

(د) بيئة هلر Heller.

(هـ) بيئة مراشيغ وسكوغ Murashige & Skoog.

(و) بيئة إيركسون Eriksson.

(ز) بيئة جامبورج Gamborg وآخرون.

(ح) بيئة نيتشه Nitsch.

(ط) بيئة ناجاتا وتاكيبا Nagata & Takeba.

جدول (٢-١٠). تركيز الأيونات في البيئات المائية في جدول (٢-٩)

البيئات

NT	Nitsch's	B5	ER	MS	Heller's	White's	الوحدات	الأيونات
19.69	18.40	25.09	33.79	39.41	7.05	3.33		NO <sub>3</sub>
10.30	9.00	2.00	15.00	20.62	--	--		NH <sub>4</sub>
29.99	27.40	27.03	48.79	60.03	7.05	3.33		Total N
5.00	0.50	1.08	2.50	1.25	0.90	0.138	mmol l <sup>-1</sup>	P
14.39	9.90	25.00	21.29	20.05	10.05	1.66		K
1.50	1.49	1.02	2.99	2.99	0.51	1.27		Ca
5.00	0.75	1.00	1.50	1.50	1.01	3.04		Mg
3.60	2.99	2.04	5.98	5.98	11.08	0.87		Cl

تابع جدول (٢-١٠).

البيئات							الوحدات	الأيونات
NT	Nitsch's	BS	ER	MS	Heller's	White's		
100.00	100.00	50.10	100.00	100.00	3.70	12.50	μmol l <sup>-1</sup>	Fe
5236.50	996.80	2079.90	1610.00	1730.00	1013.50	4502.00		S
202.00	202.00	1089.00	237.20	202.00	7966.00	2958.00		Na
100.00	161.80	48.50	10.00	100.00	16.00	24.20		B
100.00	112.00	59.20	10.00	100.00	0.40	22.40		Mn
36.83	34.70	7.00	37.30	30.00	3.40	10.40		Zn
0.10	0.10	0.10	0.01	0.10	0.10	0.04		Cu
1.00	1.00	1.00	0.1	1.00	--	0.007		Mo
0.10	--	0.10	0.01	0.10	--	--		Co
5.00	--	4.50	--	5.00	0.06	4.50		I
--	--	--	--	--	0.20	--	Al	
--	--	--	--	--	0.10	--	Ni	

كذلك نقدم في جدول (٢-١١) مزيداً من البيئات القياسية وتركيز مختلف المكونات فيها بالجزء في المليون.

جدول (٢-١١): البيئات القياسية المستخدمة في مزارع الأنسجة ومكوناتها<sup>(١)</sup> (عن Chawla ٢٠٠٠).

Chu	Gamborg	Gautheret	Murashige &	White	Nitch &	المكون
١٩٧٨ (N <sub>6</sub> )	١٩٦٨ (B <sub>3</sub> )	١٩٤٢	١٩٦٢ Skoog	١٩٦٣	١٩٥٦ Nitch	
--	--	--	--	٦٥	١٥٠٠	KCl
١٨٥	٢٥٠	١٢٥	٣٧٠	٧٢٠	٢٥٠	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
--	١٥٠	--	--	١٦.٥	٢٥٠	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O
١٦٦	١٥٠	--	٤٤٠	--	--	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
٢٨٣٠	٢٥٠٠	١٢٥	١٩٠٠	٨٠	٢٠٠٠	KNO <sub>3</sub>
--	--	--	--	--	٢٥	CaCl <sub>2</sub>
--	--	--	--	٢٠٠	--	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
--	--	--	١٦٥٠	--	--	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
٤٠٠	--	١٢٥	١٧٠	--	--	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
--	--	٥٠٠	--	٣٠٠	--	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
٤٦٣	١٣٤	--	--	--	--	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

تابع جدول (٢-١١)

Chu ١٩٧٨ (N <sub>٦</sub> )	Gamborg ١٩٦٨ (B <sub>٦</sub> )	Gautheret ١٩٤٢	Murashige & ١٩٦٢ Skoog	White ١٩٦٣	Nitch & ١٩٥٦ Nitch	المكون
—	—	٠.٠٥	—	—	—	NiSO <sub>4</sub>
٢٧.٨	—	٠.٠٥	٢٧.٨	—	—	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
-	-	٣	٢٢.٣	٧	٢	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O
٣.٣	١٠	—	—	—	—	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O
٠.٨	٠.٧٥	٠.٥	٠.٨٣	٠.٧٥	-	KI
—	٠.٠٢٥	—	٠.٠٢٥	—	—	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
—	—	٠.٢	—	—	—	Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
١.٥	٢	٠.١٨	٨.٦	٣	٠.٥	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
—	٠.٠٢٥	٠.٥	٠.٠٢٥	—	٠.٠٢٥	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
-	-	٠.١	-	-	-	BeSO <sub>4</sub>
١.٦	٣	٠.١٥	٦.٢	١.٥	٠.٥	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
—	—	١	-	—	-	N <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
—	٠.٢٥	—	٠.٢٥	—	٠.٠٢٥	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
—	—	—	—	٢.٥	—	Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>
٢٧.٣	—	—	٢٧.٣	—	—	EDTA disodium salt
—	٤٣	—	—	—	—	EDTA-Na ferric salt
—	١٠٠	—	١٠٠	—	—	m-inositol
١.٠	١.٠	٠.١	٠.١	٠.١	—	Thiamine
٠.٥	١.٠	٠.١	٠.٥	٠.١	-	Pyridoxine
٠.٥	١.٠	٠.٥	٠.٥	٠.٥	—	Nicotinic acid
-	-	٣	٢	٣	—	Glycine
—	١٠	—	—	١٠	—	Cysteine
٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٤٠٠٠	Sucrose

(أ) جميع القيم بالملليجرام في اللتر (جزء في المليون).

### تحضير المحاليل القياسية

يستعمل الماء المقطر في تحضير المحاليل القياسية لكل من العناصر الكبرى والصغرى والفيتامينات ومنظمات النمو، ويجب أن تكون المركبات الكيميائية المستخدمة من أعلى درجات النقاوة

١ - المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى:

تحضر المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى - عادة - بنحو ١٠ أضعاف إلى

## أساسيات مزارع الأنسجة

١٠٠ ضعف التركيز المطلوب من أى منها فى البيئات (جدول ٢-١٢). وعند إذابة العناصر فى الماء .. تجب إضافة كل مركب على انفراد لتجنب حدوث أى ترسيب وبالنسبة لمحلول العناصر الكبرى تتم إذابة كلوريد الكالسيوم منفرداً فى الماء، ثم يضاف إلى بقية المحلول لتجنب حدوث ترسيب.

جدول (٢-١٢): تحضير المحاليل القياسية لبيئة مورايشج وسكوج.

المكون	وسكوج (مجم/لتر)	التركيز فى مورايشج	التركيز فى المحلول	الحجم الذى يستعمل لكل لتر من البيئة (مل)
العناصر الكبرى (× ١٠)				
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	١٦٥٠	١٦٥٠٠	١٦٥٠٠	١٠٠
KNO <sub>3</sub>	١٩٠٠	١٩٠٠٠	١٩٠٠٠	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	٣٧٠	٣٧٠٠	٣٧٠٠	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	٤٤٠	٤٤٠٠	٤٤٠٠	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	١٧٠	١٧٠٠	١٧٠٠	
العناصر الصغرى (× ١٠٠)				
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	٦,٢	٦٢٠	٦٢٠	١٠
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	٢٢,٣	٢٢٣٠	٢٢٣٠	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	٨,٦	٨٦٠	٨٦٠	
KI	٠,٨٣	٨٣	٨٣	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	٠,٢٥	٢٥	٢٥	
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	٠,٠٢٥	٢,٥	٢,٥	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	٠,٠٢٥	٢,٥	٢,٥	
الحديد				
Fe.EDTA-Na salt	٤٠	—	—	
الفيتامينات				
Nicotinic acid	٠,٥	٥٠	٥٠	١
Thiamine HCl	٠,١	١٠	١٠	١٠,٢
Pyridoxine	٠,٥	٥٠	٥٠	١
مركبات أخرى				
Myo-inositol	١٠٠	—	—	
Sucrose	٣٠٠٠٠	—	—	
Agar	٨٠٠٠	—	—	

- لا تحضر محاليل قياسية منها.

٢ - المحاليل القياسية لمنظمات النمو:

لا يذوب أى من منظمات النمو فى الماء، وإنما تُذاب إما فى الكحول (كما فى ال-

## التكنولوجيا الحيوية الجوية وتربية النبات

pCPA، والـ 2,4-D، والـ GA<sub>3</sub>، وإما في محلول عياري واحد من أيدروكسيد الصوديوم (كما في الـ IAA، و IBA، و NAA $\alpha$ ، و الـ NOA، والـ BA، والـ 2iP، والكينتين، والزياتين، وحامض الأبسيسك). يجب أن يُذاب المركب في مليلترات قليلة من المذيب. ثم يضاف الماء ببطء للوصول إلى الحجم المطلوب.

وعندما يُرغب في تحضير تركيزات بالملليجرام في اللتر تفضل إذابة ٥٠ مجم في لتر للحصول على تركيز ٥٠ مجم/لتر

وعندما يُرغب في تحضير تركيز بالمللي مولار تفضل إذابة الكميّات الموضحة في جدول (٢-١٣) في ١٠٠ مل للحصول على تركيز ١ مللي مولار. وإذا احتوت بيئة الترعاه على تركيز ١٠ ميكرو مولار من منظم نمو ما (وإن كان 2,4-D) فإن

$$١ \text{ مللي مولار} = ٢٢١ \text{ مجم/لتر أو } ٠.٢٢١ \text{ مجم/مل}$$

$$\text{الكمية في } ١٠٠ \text{ مل من المحلول القياسي} = ١٠٠ \times ٠.٢٢١ = ٢٢.١ \text{ مجم}$$

$$\text{وبما أن } ١٠ \text{ ميكرومولار} = ٢٢١٠ \text{ ميكروجرام، أي } ٢.٢١٠ \text{ مجم}$$

إذا فإن الحجم الذي يلزم من المحلول القياسي هو ١٠ مل (لأن  $١٠ \times ٢٢.١ = ٢٢١$  مجم) (عن Chawla ٢٠٠٠)

جدول (٢-١٣) تحضير المخاليل القياسية لمظومات النمو

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
الوكسينات		
2,4-Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	٢٢.١
Indole-3 acetic acid	IAA	١٧.٥
Indole-3 butyric acid	IBA	٢٠.٣٢
$\alpha$ -Naphthalene acetic acid	NAA	١٨.٦٢
$\beta$ -Naphthoxy acetic acid	NOA	٢٠.٢٣
2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid	2,4,5-T	٢٥.٥٦
<i>p</i> -Chlorophenoxy acetic acid	<i>p</i> CPA	١٨.٦٦
Picloram	PIC	٢٤.١٢
البيوتوكينينات		
Adenine	Ade	١٨.٩١
Benzyl adenine or benzyl amino purine	BAP or BA	٢٢.٥٢

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
N-isopentenylamino purine	2iP	٢٠ ٣٣
Kinetin	KIN	٢١,٥٢
Zeatin	ZEA	٢١,٩٢
مركبات أخرى		
Gibberellic acid	GA <sub>3</sub>	٣٤,٦٤
Abscisic acid	ABA	٢٦,٤٣
Colchicine	Col	٣٩,٩٤

### خلط مكونات بيئة الزراعة وضبط الرقم الأيدروجيني (ال pH)

تجب إضافة مكونات بيئة الزراعة بنفس الترتيب الذى وردت به فى جدول (٢-١٢ و ١٣-٢)، بما فى ذلك منظمات النمو، ويضاف الماء إلى أقل من الحجم النهائى مباشرة، ثم يُضبط الـ pH إلى القيمة المطلوبة (مثلاً ٥.٨ فى بيئة MS) بإضافة نقطة بنقطة من أى من محلول ١ عيارى من أيدروكسيد البوتاسيوم، أو ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك، مع التقليب المستمر

وتحضر المحاليل العيارية لضبط الـ pH بحساب عدد جرامات المادة (أيدروكسيد البوتاسيوم أو حامض الأيدروكلوريك) فى ١٠٠ مل من المحلول، وهى تعادل الـ minimum assay للمادة (%). × كثافتها النوعية

ويبنى ذلك حساب العيارية، وهى عدد جرامات المادة فى اللتر/الوزن المكافئ

أما الوزن المكافئ فهو يساوى الوزن الجزيئى/الحموضة أو القاعدية

وفى حالة حامض الأيدروكلوريك فإن الـ minimum assay = ٤ ٣٥٪، والكثافة النوعية = ١.١٨، وبالتالي فإن عدد جرامات حامض الأيدروكلوريك فى ١٠٠ مل = ٤ ٣٥ × ١.١٨ = ٤١ ٧٧ جم.

أما الوزن المكافئ لحامض الأيدروكلوريك فهو: ٤٦ ٣٦ = ١/٣٦

وبذا يحضر محلول ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك بأخذ حجم قدرة = ٤١٧٧ : ٤٦٠ ٣٦، أى ١١.٥ مل وإكماله باناء إلى لتر واحد

ويلى ضبط الـ pH إكمال المحلول إلى حجمه النهائى

يتراوح الـ pH المناسب للنمو الخلوى فى البيئات بين ٥.٠ و ٦.٠، علمًا بأن النمو والتطور الطبيعيين يتوقفان عندما يكون الـ pH أعلى عن ٧.٠ أو أقل من ٤.٥ وتجدر الإشارة إلى أن عملية تعقيم البيئات فى الأوتوكليف تؤدي إلى خفض الـ pH بمقدار ٠.٣-٠.٥ وحدة. وإذا حدث انخفاض شديد فى pH البيئة أثناء الزراعة (تصبح البيئة سائلة) فإنه يتعين تجديدها، علمًا بأن ذلك الانخفاض قد يصل إلى ٠.٥ وحدة pH هذا وتؤدي زيادة الـ pH عن ٦.٠ إلى جعل البيئة صلبة أكثر مما ينبغي، بينما يؤدي انخفاضها إلى عدم تصلبها بشكل جيد (عن Chawla ٢٠٠٠).

### إضافة الآجار والتعقيم

يلى ضبط الـ pH إضافة الكمية المطلوبة من الآجار (مثلا ٦-٨ جم/لتر) أو أى مادة مماثلة. يسخن المحلول مع التقليب إلى حين ذوبان الآجار، ويعرف تمام الذوبان بأن يصبح المحلول تام الشفافية

يلى ذلك توزيع البيئة فى أوعية من الزجاج أو البولى بروبيلين، ثم يحكم إغلاقها بالقطن أو برفائق الألومنيوم

تعقم بيئة الزراعة فى الأوتوكليف لمدة ٢٠ دقيقة على ١٢١م تحت ضغط ١٥ رطل على البوصة المربعة (١٠٥ كيلو بسكال).

وإذا ما رغب فى إضافة هرمونات أو مركبات أخرى معقمة بالترشيح، فإنها تضاف مباشرة إلى البيئة المعقمة فى الأوتوكليف

تُبرد البيئة فى حجرة عزل laminar airflow على ٥٠-٦٠م، وتضاف الهرمونات من خلال مرشح millipore، أو أى مرشح آخر ذات ثقب بقطر ٠.٢٢ ميكرومتر.

وبعد التبريد يفضل حفظ البيئة على حرارة ٤-١٠م، مع تفضيل استعمالها بعد نحو ٣-٤ أيام من تحضيرها حتى يمكن تحديد ما إن كانت قد عمقت بصورة جيدة أم لا، حيث تظهر نموات الكائنات الملوثة للبيئات المعقمة جيدًا - خلال تلك الفترة؛ ويتمين حينئذ التخلص من تلك البيئات (عن Chawla ٢٠٠٠)

## 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 (ال 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 .
  - ج - مزارع الجذور root culture .
  - د - مزارع النيوسيلا nucellus culture .
  - هـ - مزارع الإندوسبرم endosperm culture .
  - ز - مزارع البويضات ovule culture .
  - ح - مزارع المبايض ovary culture .
  - ط - مزارع حبوب اللقاح pollen culture .
  - ى - مزارع المتوك anther culture .
  - ٦ - مزارع البروتوبلاست protoplast culture .

## الجزء النباتى المزروع والزراعة

الجزء النباتى المزروع (ال explant)

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

ويتأثر اختيار الجزء النباتي الأزرق للزراعة في البيئات بعيد من العوامل،  
نوجزها فيما يلي:

### ١ - عمر النسيج النباتي

من المعروف أن الأنسجة الأصغر عمراً - فسيولوجياً - تكون -- بصفة عامة - أكثر  
استجابة للزراعة في البيئات الصناعية. وفي كثير من الأحيان لا تكون الأنسجة المسنة  
خدائا كالس قادرة على إعادة التجديد كذلك فإن الأنسجة الأحدث تكون أسهل في  
تطهيرها سطحياً وأسرع في نموها واستنباتها بعد زراعتها

### ٢ - فصل النمو

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

### ٣ - حجم الجزء النباتي

القاعدة هي أنه كلما كان الجزء النباتي المزروع (ال explant) أصغر حجماً كلما  
ازدادت صعوبة زراعته؛ حيث يكون من الضروري تزويد بيئات الزراعة بمزيد من  
المكونات لنجاح الزراعة، بينما نجد أن الأجزاء النباتية الكبيرة غالباً ما تحوي على  
كميات أكبر من الغذاء المخزن بها وهرمونات تساعد في نموها في البيئات الصناعية

### ٤ - حالة النباتات التي تؤخذ منها الأجزاء التي تستعمل في الزراعة

يوصى دائماً بأخذ الأجزاء النباتية التي تستعمل في الزراعة من نباتات خالية تماماً  
من جميع الإصابات المرضية والحشرية ولم يسبق عرضها لأي تدبيري

### ٥ - الهدف من إنتاج مزرعة الأنسجة

نجد - على سبيل المثال - أنه عندما يكون الهدف هو الإكثار الدقيق فإن الـ  
explant المفضل يكون هو البرعم القمي أو الجانبي 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 في ظروف

معقمة مثالية لأجل إنتاج الكالس. هذا بينما تعد الأنسجة الورقية التي تؤخذ من تلك البادرات النامية في ظروف معقمة هي الأفضل لأجل عزل البروتوبلاست. وإنتاج نباتات أحادية أو كالس تفضل مزارع المتوك أو حبوب اللقاح

ويبين شكل (٢-٢) مختلف أنواع الأجزاء النباتية (ال explants التي يمكن استخدامها في مزارع الأنسجة

### التطهير السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة

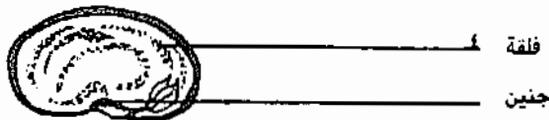
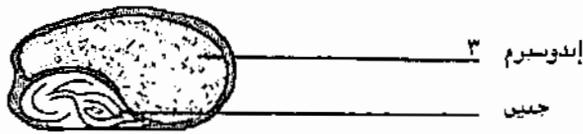
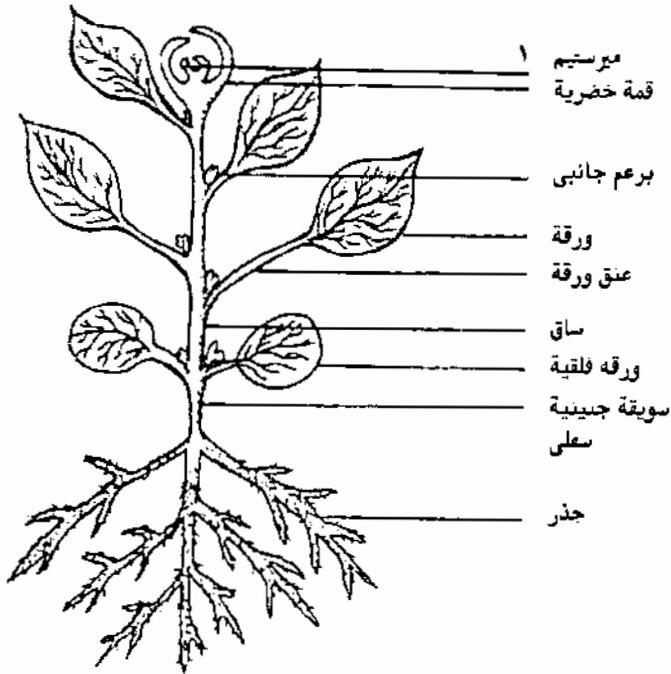
يمكن تلخيص طريقة التطهير السطحي لك explant المطلوب زراعته، فيما يلي

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

٢ - يقيد أحياناً شطف سريع بالكحول أو مسح النسيج بقطعة من الشاش المبلل بالكحول، وخاصة عندما تكثر الشعيرات بالنسيج أو يكون مغطى بغطاء شمعي سميك

٣ - يشطف الـ explant في محلول من الكلورين القاصر للألوان الذي يستعمل في تبييض الملابس، على أن يحضر المحلول للاستعمال أولاً بأول، ويفضل دائماً إضافة نقطة واحدة أو نقطتان من أى منظف صناعي 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 التجاري (مثل الكلوراكس) إلى مخبر زجاجي، وإكمال حجم المحلول إلى ١٠٠ مل. وعندما تجرى عملية التطهير في 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. ونظراً لأن محلول الكلورين يفقد فاعليته بمرور الوقت، لذا .. يلزم دائماً استعمال تحضيرات جديدة منه.

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



شكل (٢-٢) تخطيط يبين مختلف الأجزاء النباتية (explants) التي يمكن الحصول عليها من (١) النبات، (٢)، الرمرة، (٣) بكرة وحيدة الفلقة، (٤) بكرة ذات فلتين (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

هذا وتتباين الـ explants في مدى تحملها لتركيزات محلول الكلورين ومدة التعريض له، وفي مدى الحاجة لزيادة التركيز أو مدة التعرض للمحلول وبينما يكفي الأنسجة الرقيقة انغمس مدة ١٠ دقائق في محلول كلورين بتركيز ١٠٪، فإن بعض البذور قد تتطلب ٢٠-٦٠ دقيقة في محلول كلورين بتركيز ٣٠-٥٠٪ ويجب أن نتذكر أن أي سطح نباتي مقطوع مثل السيقان أو الأوراق سوف يُضار من عملية التعقيم السطحي تلك

ومن أهم المواد التي تستخدم في التطهير السطحي في مجال زراعة الأنسجة، ما يلي:

#### ١ - هيبوكلوريت الصوديوم

يتوفر هيبوكلوريت الصوديوم sodium hypochlorite (وهو NaOCl) في محلول ببييض الملابس التجاري بنسبة حوالى ٢٥ ٪ حجم بحجم وعموما يخفف محلول تبييض الملابس بالماء إلى ٥-٢٥ ٪ حجما بحجم، مع إضافة نقطتان من توين ٢٠ لكل ١٠٠ مل من المحلول المخفف وتتراوح مدة المعاملة - عادة - بين ٥، و ٣٠ دقيقة بنبعها اسطف بالماء المعقم خمس مرات ويجب تحضير محلول التطهير أولا بأول قبل الاستعمال نظرا لتطير غاز الكلور منه ويفيد ضبط pH محلول التطهير عند ٧٠ ياسعما ٥ مولار حامض أيديروكلوريك . يفيد ذلك في تقليل سرعة فقد غاز كلور منه

#### ٢ - هيبوكلوريت الكالسيوم

يحضر محلول هيبوكلوريت الكالسيوم calcium hypochlorite [وهو  $Ca(OCl)_2$ ] بتركيز ٨ ٪ (وزنا بحجم) للتطهير، وذلك بإذابة ٨ جم من المركب في لتر من الماء مع التقليب لمدة ٥ ١٠ دقائق، ثم يترك ليرسب منه ما لم ينوب. 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 الإيثيل أو كحول الأيزوبروبيل

يستعمل أي من الكحولين بتركيز ٧٠٪ حجما بحجم، حيث يسمح بأى منهما

السطح النباتي، كما قد يغمس فيهما الجزء النباتي 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 منفرداً، أو مع المعاملة بالمطهرات الأخرى. هذا .. إلا أن التفاعل بين هيبوكلوريت الصوديوم وفوق أكسيد الأيدروجين يعد ساماً للنسيج النباتي؛ ولذا يتعين شطف النسيج جيداً بالماء بين معاملي المركبين.

٥ - غاز الكلورين:

يعد غاز الكلورين فعالاً في تطهير البذور الجافة

٦ - داي كلوروايزوسيانوريت الصوديوم

يعد داي كلوروايزوسيانوريت الصوديوم sodium dichloroisocyanurate أقس سمية للأنسجة النباتية الحساسة لأي من هيبوكلوريت الصوديوم أو الكالسيوم، ولا يحتاج الأمر إلى شطف النسيج بالماء بعد المعاملة.

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

ويعطى جدول (٢-١٤) مزيداً من المعلومات عن المركبات المستخدمة في التطهير السطحي للأجزاء النباتية المستعملة في الزراعة

### تحضير مزارع الزراعة

يتم تحضير مزارع الأنسجة على أرفف في حجرات خاصة على درجة حرارة ثابتة تتراوح - غالباً - بين ٢١، و ٢٤م حسب نوع المزرعة والنوع النباتي المزروع. كما تكون تلك الأرفف مجهزة بلمبات فلورسنتية يمكن عن طريقها التحكم في شدة الإضاءة التي تعرض لها المزارع، ومدة التعريض اليومية للإضاءة.

هذا وقد استعملت وحدات اللكس lux والقدم شمعه foot candle للتعبير عن شدة الإضاءة، إلا أن الوحدات الأكثر قبولاً، هي

• الجول  $\text{Joule/m}^2$  ( $\text{J/m}^2$ )، وهي تعبير عن الطاقة الإشعاعية radiant energy لكل وحدة مساحة

• الواط  $\text{Watts/m}^2$  ( $\text{W/m}^2$ )، وهي تعبر عن الإشعاع irradiance

• الكثافة photon flux density هي المصطلح المفضل لوصف الطاقة المشعة المؤثرة في عملية البناء الضوئي photosynthetically active radiation، ويعبر عنها بالـ  $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ ، علماً بأن كل 1 mol من الفوتونات يساوي إبنشتاين Einstein (أو E) واحد.

وبذا . فإن وحدة الـ photon flux يمكن التعبير عنها هكذا

$$1 \text{ photon flux density} = uE/\text{m}^2/\text{s}$$

أو بصورة أخرى فإنها تساوي  $uE\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$

تبقى المزارع في الحضانات إلى أن يتم نقلها إلى أوعية مناسبة للزراعة، الأمر الذي سوف نتناوله بالشرح في الفصل الخاص بالإكثار الدقيق

### تجديد النمو في المزارع

يعد تجديد النمو regeneration من الأمور الأساسية في مزارع الأنسجة الناجحة، وإن لم يمكن تجديد النمو بطريقة يمكن الاعتماد عليها والتنبؤ بنتائجها، فإن جميع التقنيات التي تعتمد على ضرورة تكوين ميرستيم عرضي - بما في ذلك معظم طرق التحول الوراثي - يكون مصيرها الفشل. وعلى الرغم من ذلك، فإنه من المحتمل عدم وجود أي جانب آخر من التقنيات الحيوية أكثر اعتماداً على التركيب الوراثي مثلما تعتمد خاصية تجديد النمو (عن McCown ٢٠٠٣).

إن من أهم الأمور التي يجب الإلماء بها بخصوص عملية تجديد النمو، ما يلي:

١ - ننخفض كفاءة تجديد النمو كلما كان النسيج المستخدم في الزراعة أكبر

عمراً

- ٢ - تُعد الأجزاء القمية والمحيطية للأشجار والشجيرات هي الأكثر حداثة
- ٣ -- يفيد السيتوكينين BA (في كل من النبات الذي يُؤخذ منه الجزء المراد زراعته وفي بيئة الزراعة) في تسهيل العودة إلى الحداثة، ومن ثم سرعة تجديد النمو (عن Prierk ١٩٩٣)

جدول (٢-١٤) المركبات المستخدمة في تطهير الأجزاء الباتية المستخدمة في رراعات الأسجة (الـ explants) قبل رراعتها (عن Hartmann & Kester ١٩٨٣).

ملاحظات	مدا التخلص من بقاياها	مدة التخلص		المركب
		المعاملة (دقيقة)	التركيز (%)	
فعال جداً	سهل	٣٠-٥	١٠-٩	calcium hypochlorite
فعال جدا	سهل	٣٠-٥	٢	sodium hypochlorite
فعال ولكنه قد يكون سائاً للسيج البسي	سهل	١٠-٢	٢-١	bromine water
متوسط الفاعلية	سهل جداً	١٥-٥	١٢-١٠	hydrogen peroxide
قد يكون سائاً للسيج الببتي	صعب	١٠-٢	١-٠.١	mercuric chloride
فعال	سهل	٦٠-٣٠	٥٠-٤ مجم/لتر	antibiotics

(أ) يتوفر في مفعرات الألوان التجارية (المبييضات، مثل الكلوراكس) بسببة ١/٥,٢٥ - عادة - من التحضير السجاري، ويستخدم حدا التحضير - عادة - بسببة ١/٢٠ جم إلى حجم (اي جزء بحفير تحاري إلى كس ٤ أجزء ماء)، ولكن تركيز ١٠٪ قد يكفي لإجراء التعقيم المطلوب

ولتوضيح التباين بين الأنواع النباتية في مدى سهولة تجديد النمو فيها ..  
نستعرض - فيما يلي - بعض الدراسات في هذا المجال:

• اختلقت ثلاث سلالات مرباة داخلياً من الخيار في قدرتها على تجديد نموها (regeneration) في مزارع الأنسجة، معبراً عنها بنسبة النباتات المزروعة explants التي تجدد تكوين كالس جنيني embryogenic callus منها، ومتوسط عدد نباتات المزارع التي نجحت من كل explant تباينت السلالات الثلاث في قدرتها على تجديد

النمو ما بين ضعيفة، ومتوسطة، وعالية. وأوضحت الدراسات الوراثية أن تلك الخاصية لا تورث سيتوبلازمياً، وأن السلالتين المتوسطة والعالية في القدرة على التجديد احتوت كل منهما على زوجين من الجينات السائدة اللذان تحكما في تجديد النمو بالمزارع، وأنهما كانا مكملين لبعضهما البعض complementary، وربما كان بينهما تفاعل إضافي وقد احتوت السلالة ذات القدرة العالية على تجديد النمو على جين ثالث (Nadolska-Orczyk & Malepszy 1989).

● تميزت السلالة PI128644 من *L. chilense* بقدرة عالية على تجديد نموها في مزارع الأنسجة، وأمكن تجديد ثلاث معلمات RAPD كانت على علاقة وثيقة بخاصية القدرة العالية على تجديد النمو، وهى: OPA02-1، و OPA20-3، و  $inv^{ch}$  (Takushina وآخرون 1998).

● أظهر هجين الكرنب Matsunami أعلى كفاءة في تكوين الأجنة وفي تجديد النمو من الـ microspores، وذلك من بين 38 تركيباً وراثياً تم اختبارها. وتزيد كفاءة هذا الهجين في تكوين الأجنة بمقدار 5-10 أمثال أصناف الكرنب الأخرى (Kuginuki وآخرون 1999).

● أمكن تجديد النمو في عدد من أصناف الفلفل، وكذلك في كل من النوعين *Capsicum baccatum*، و *C. praetermissum*، بزراعة الأوراق — أى باستعمال leaf explants — حيث أعطت نموات أكثر مما أعطته زراعة السويقة الجنينية السفلى أو الأوراق الفلقية في جميع التراكيب الوراثية المستعملة. وقد شكل نوع الجزء النباتي المزروع 56.3% من التباينات التي شوهدت في معدل تجديد النمو. كذلك أدت إضافة البنزيل أدينين بتركيز 22 ميكرومولار إلى الحصول على أفضل تجديد للنمو (Christopher & Rajam 1996).

### مشكلة التزجج

يعتبر التزجج — أو التزجج — *vetrification* (أو *hyperhydricity*، و *hyperhydration*) من العيوب الفسيولوجية *disorders* التي تظهر على نباتات مزارع

الأنسجة، وفيها تصبح الأوراق نصف شفافة translucent. والسيقان منضخمة، ومشوّهة، وهشة (قابلة للكس). ولا يمكن لهذه النباتات تحمل عملية الشل في البيوت المحمية تنشأ هذه الحالة عندما تمتلئ المسافات البينية لخلايا الورقة بالماء بدلاً من الهواء، وغالباً ما يختفى النسيج العمادى من تلك الأوراق، التي تبدو مجمعة، وتفقر لتسمع الأديمى، وتقل فيها كثيراً أعداد الثغور، كما أن ما يوجد منها لا يعمل بصورة طبيعية يتباين مدى ظهور تلك الحالة بين الأنواع النباتية، والأصناف. وحتى بين سلالات الصنف الواحد

يمكن إرجاع هذه الحالة إلى عديد من العوامل، منها طريقة تحضير الجزء النباتى المستخدم فى الزراعة (ال explant)، ومكان وضعه فى بيئة الزراعة، وتركيب بيئة الزراعة، والعوامل البيئية (عن Schloupf وآخريين ١٩٩٥)

### مصادر إضافية فى مجال مزارع الأنسجة بصورة عامة

لمزيد من التفاصيل عن مزارع الأنسجة بصورة عامة راجع ما يلى

ملاحظات	المرجع
مزارع الخلايا والأنسجة	Paul (١٩٧٠)
مزارع الخلايا والأنسجة	Sala وآخرون (١٩٨٠)
مزارع الخلايا والأنسجة	Vasil (١٩٨٠)
مزارع الأنسجة وتطبيقاتها فى الزراعة	Thorpe (١٩٨١)
مزارع الخلايا والأنسجة	Reinert & Ycoman (١٩٨٢)
مزارع الأنسجة	Mantell & Smith (١٩٨٣)
شامل للموضوع	Bhojwani & Razdan (١٩٨٣)
عطى يتناول مجموعة من الأنواع المحسولة كل منها منفردة	Ammirato وآخرون (١٩٨٤)
مزارع الخلايا	Dixon (١٩٨٥)
شامل لكل من الأسس العامة والجوانب العملية	Dixon & Gonzales (١٩٩٤)
إنتاج مزارع الأنسجة على نطاق الواسع بهدف الإنتاج التجارى للمركبات التى تنتجها تلك المزارع	Scragg (١٩٩٨)

ملاحظات

مرجع عملى شامل ومختصر  
يتناول مزارع الأنسجة من كافة الوجوه  
التكنولوجيا الحيوية - وخاصة مزارع الأنسجة -  
وتطبيقاتها

المرجع

Smith (٢٠٠٠)  
الرفاعى والشويكى (٢٠٠٢)  
Trigiano & Gray (٢٠٠٥)