

الباب الرابع

البيئة الغذائية Nutritional Medium

صور البيئات الغذائية Forms of media

١- بيئة صلبة Soli medium

هى بيئة تحتوى على آجار أو جيلاتين أو Biogels لإكسابها قواما هلاميا. ويفضل استخدام آجار نقى مثل Difco- Nobel. ويضاف الآجار بتركيز ٠,٦-١٪ (وزن/ حجم) أو الجيلاتين بتركيز ١٪ (وزن/ حجم).

٢- بيئة سائلة Liquid medium

هى بيئة لا تحتوى على آجار ويفضلها كثير من الباحثين فى الزراعة العملية بدلا من البيئة الصلبة.

٣- بيئة ثنائية المظهر Double Phase medium

الاستعمال المنفرد للبيئة الصلبة أو السائلة فى الزراعة العملية قد يظهر التزجج Verification لذلك تستخدم بيئة مزدوجة المظهر. وتجهز هذه البيئة بصب بيئة تحتوى على آجار فى قاع وعاء الزراعة، ثم تزرع عليها المادة النباتية، ثم يصب فوقها بيئة سائلة تحتوى على نفس مكونات البيئة الصلبة ولكنها بدون آجار. وبذلك تكون المادة النباتية متواجدة بين بيئة صلبة وبيئة سائلة يحتويان على نفس المكونات الغذائية. وبهذه الطريقة يسهل تغيير الجزء السائل من البيئة كلما تطلب ذلك ببيئة سائلة أخرى معاملة ولكنها طازجة.

مقارنة بين البيئة الصلبة والسائلة

- ١- بعض الأنواع النباتية تنمو جيدا فى بيئة سائلة مثل نباتات العائلة -Brome-liaceae، بينما ينمو البعض الآخر بصورة جيدة فى بيئة صلبة.
- ٢- تحتاج الأجزاء النباتية المزروعة فى بيئة سائلة إلى إمداد جيد من الهواء نظرا لانغماسها فى البيئة. لذلك تثبت الأوعية المزروعة على هزاز كهربائى لرجها بالسرعة المطلوبة حتى لا تصاب الأجزاء النباتية بالضرر.
- ٣- انخفاض معدل استفادة الجزء النباتى أو الكالس من مكونات البيئة الصلبة، حيث إن سطح الجزء النباتى الملامس للبيئة الصلبة هو المستفيد فقط. بينما تستطيع جميع أسطح الجزء النباتى المنغمس فى البيئة السائلة امتصاص العناصر الغذائية ومنظمات النمو لوجود تماس مباشر مع البيئة.
- ٤- تتركز الإفرازات Exudates الخارجة من الأجزاء النباتية فى مكان واحد على البيئة الصلبة مما يؤدي إلى إحداث الضرر أو الإطغار للنموات الجديدة. بينما تنتشر هذه الإفرازات فى البيئة السائلة بالرج، وبذلك يكون لها تأثير أقل ضررا على النموات.
- ٥- عدم استفادة الجزء النباتى المنغمس تحت سطح البيئة الصلبة من تبادل الغازات. بينما الرج المستمر للبيئة السائلة يساعد على تبادل الغازات واستفادة الجزء النباتى المنغمس فيها من مكونات البيئة الغذائية.
- ٦- صعوبة تخليص الجذور من البيئة الصلبة سالمة بدون أضرار، بينما يسهل تخليصها من البيئة السائلة.
- ٧- سهولة تسجيل مقاييس النمو وسرعة التنفس للنموات النامية على بيئة سائلة.
- ٨- ظاهرة الاستقطاب Polarization الناتجة عن تأثير الجاذبية الأرضية تكون واضحة على الكالس المنزوع على بيئة صلبة، بينما ليس لها تأثير واضح على الكالس المنزوع فى بيئة سائلة.
- ٩- عدم انتظام انتشار الضوء بين النباتات النامية على بيئة صلبة يؤثر على نموها، بينما يكون انتشار الضوء أفضل فى حالة البيئة السائلة.

١٠- يكون انقسام الخلايا وتكثفها ونموها أسرع على البيئة السائلة.

حركة البيئة السائلة

١- بيئة سائلة ساكنة (Stationary liquid medium (Immobile media)

هي طريقة شائعة الاستعمال فى إنتاج المواد الأيضية الثانوية -Secondary metabolites وفى زراعة البروتوبلاست. وتكون البيئة السائلة ساكنة لتحسين انقسام ونمو الخلايا ومنع إحداث الضرر بها. وتساعد على انتخاب الطفرات والهجن الناتجة من اندماج البروتوبلاست بسهولة.

٢- بيئة سائلة متحركة (Agitated liquid medium)

يساعد استمرار حركة البيئة السائلة على وجود تماس مباشر بين سطح الجزء النباتى مع البيئة، وتعظيم استفادته من تجانس انتشار العناصر الغذائية والغازات فى البيئة، واختفاء أعراض نقص العناصر واختناق الجذور، وتساعد حركة البيئة على انتشار الإفرازات السامة فى البيئة وعدم تركيزها فى منطقة الجذور. ويستخدم هزاز كهربائى أو مقلب مغناطيسى لتحريك البيئة السائلة. ويثبت على الهزاز دوارق مخروطية كبيرة، يحتوى كل منها على ٢٠٪ من سعته بيئة سائلة، ويعمل الجهاز بسرعة ٥٠ - ١٠٠ دورة/ الدقيقة. بينما يثبت على المقلب المغناطيسى دوارق مخروطية سعة ١٥٠ مللى، يحتوى الواحد منها على ١٥ مللى بيئة سائلة، ويعمل بسرعة ٢٥٠ دورة/ دقيقة. وللحصول على نتائج ممتازة يجب تجديد البيئة كل ١٠ أيام تقريبا.

٣- بيئة سائلة دوارة

تستخدم فى هذه الطريقة عجلة دوارة يثبت عليها دوارق مخروطية محتوية على أجزاء نباتية منزوعة فى بيئة سائلة. وتدور العجلة بسرعة دورة واحدة/ دقيقة مما

يؤدى إلى انتقال البيئة الغذائية من طرف الدورق إلى الطرف الآخر تاركة الجزء النباتى منغمسا فى البيئة الغذائية؛ ثم فى تماس معها، ثم معرضا للهواء مما يتيح فرصة لتبادل الغازات. وتستخدم هذه الطريقة فى زراعة الكالس وعديد من الأنواع النباتية.

ماكينات هزازة ودوارة

تستخدم ماكينات هزازة Shakers ودوارة Rotating machines لإسراع نمو الخلايا والأنسجة النباتية والكورومات الأولية (الكريمات) Protocorms والمرستيمات المزروعة فى بيئة سائلة. ويستمر تشغيل هذه الماكينات لتنشيط تبادل الغازات ما بين الأكسجين وثنائى أكسيد الكربون وتقليل تأثير الجاذبية الأرضية وتجانس توزيع العناصر الغذائية والهرمونات وانتشار الإفرازات السامة فى البيئة السائلة. ومن هذه الماكينات:

(أ) ماكينات بطيئة الحركة

منها ماكينات دوارة بطيئة الحركة مثل عجلة أوركيد Orchid wheel وماكينة ستيفارد Steward machine، وتتحرك بسرعة ٢ - ٤ دورة/ دقيقة، ومنها ماكينات دوارة أكثر سرعة مثل انجهاز الهزاز الدوار Rotary shakers، ومنها ماكينات تجمع بين النوعين السابقين. وهذه النوعية من الماكينات تسمح للأنسجة المرستيمية أو الكورومات الأولية للأوركيد باستمرار البقاء فى البيئة السائلة. وتختلف هذه الماكينات فى درجة انحدار المنضدة المثبت عليها أوانى الزراعة. فمثلا ميل منضدة عجلة الأوركيد ٤٥° بينما ميل منضدة ماكينة ستيفارد ١٢ - ١٥°. وتستخدم مع ماكينات ستيفارد دوارق زجاجية كبيرة الحجم مستديرة القاع ذات زوائد أنبوبية فى المحيط القاعدى لها تساعد على تثبيتها. وتستخدم مع عجلة الأوركيد أنابيب اختبار توضع فى سلة أنابيب أو دوارق مخروطية ١٠٠ مليلتر أو دوارق أصغر منها تثبت بمشدات خاصة Clamps.

(ب) دولاب دوار Rotator wheel

يثبت عليه دوارق مخروطية زجاجية ذات زوائد Nipples أنبوبية في المحيط القاعدي لها. وتزرع الأجزاء النباتية في الزوائد الأنبوبية. ويحتوى الدورق الواحد سعة لتر على عشرة زوائد أنبوبية. ويحتوى الدورق ٢٥٠ مليلتر على ثمانية زوائد أنبوبية. وتساعد حركة دوران الدولاب بمعدل ١-٢ دورة/ الدقيقة على انتقال البيئة السائلة من جهة إلى أخرى داخل الزوائد الأنبوبية وبذلك يتحسن تبادل الغازات فيها خصوصا إذا كان غطاء الأنبوبة من القطن. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح في زراعة أنواع نباتية مختلفة.

(ج) هزاز بسطح مستو Platform shaker

يستخدم هذا الجهاز لتفكيك الأجزاء النباتية إلى خلايا منفردة وتنشيط نموها وتكاثرها. ويستخدم لهذا الجهاز دوارق سعة ١٠٠-١٠٠٠ مللى تثبت بكليسات على السطح المستوي للجهاز. وتعتبر الدوارق سعة ١٠٠ مللى المحتوية على ٢٠-٢٥ مللى بيئة أو الدوارق سعة ٢٥٠ مللى المحتوية على ٧٠ مللى بيئة هي الأمثل لمعظم التجارب، على أن تغلق فوهة الدورق بسدادة قطن أو ورق ألومنيوم. ويعمل الحهاز بسرعة ٣٠-١٥٠ دورة/ دقيقة. ويجب أن تكون الحركة تتابعية مدارية منتظمة تقدر من ٢-٤ سم. ويجب تأمين استمرار عمل الجهاز بدون انقطاع نتيجة إخفاق في ميكانيكية الجهاز أو قطع التيار الكهربائي. ويجب توفير الظروف المناسبة للنمو مثل الحرارة والعناصر الغذائية وغيرها؛ وتتوفر الآن دوارق تتحمل الحرارة ومزودة بمدخل ومخرج لتسهيل إضافة بيئة طازجة وإخراج البيئة القديمة فى أى وقت أثناء التشغيل. وتوجد أنبوبة لتبادل الغازات يمرر فيها الهواء الداخل للدورق خلال مرشحات تعقيم لمنع التلوث ويساعد على انتشار الخلايا بانتظام فى البيئة الغذائية. كما يوجد مدخل لقياس حموضة البيئة لتجنب التغيرات المحتمل حدوثها أثناء فترة التجربة.

معلق الخلايا Cell suspension

تحضير معلق الخلايا

يحضر معلق الخلايا بزراعة خلية فردية أو مجموعة من الخلايا فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار بهدف تفكيك وإكثار الخلايا. ويمكن المساعدة فى تفكيك الخلايا بالضغط الخفيف على الجزء النباتى الغض أو أجنة أو كالس باستخدام قضيب زجاجى ثم زراعتها فى بيئة سائلة. وتستخدم دوارق مخروطية لها زوائد أنبوبية جانبية تحتوى على بيئة سائلة. وتزرع الخلايا النباتية أو أجزاء من الكالس داخل الزوائد الأنبوبية. وتثبت الدوارق على قرص دوار يتحرك بسرعة دورة واحدة/ الدقيقة. وبذلك تتكاثر الخلايا ويزداد عددها فى البيئة بعد فترة من الحركة المستمرة (Steward and Shantz, 1956). ويستخدم فى ذلك جهاز هزاز ذات سطح مستو. وتنمو الخلايا وتتكاثر مع استمرار رج البيئة السائلة أثناء فترة الحضانة التى تستغرق 21- 28 يوما مع المحافظة على تبادل الغازات وتجانس توزيع الخلايا فى الوسط الغذائى. لذلك فإن دراسة مكونات البيئة السائلة والمحافظة على حموضتها فى اتجاه نقطة التعادل لها أهمية كبيرة فى تسهيل تجزئة وتفكيك خلايا الكالس المتجمعة وتجانس انتشار الخلايا وتماسها المباشر مع البيئة السائلة.

تثبيت الخلايا فى البيئة السائلة

يمكن تنشيط النمو فى بيئة سائلة بدون استخدام أية وسيلة للتثبيت، حيث تعمس الخلايا والأنسجة فى بيئة غذائية مع استمرار الرج بهزاز كهربائى لتوفير التهوية الجيدة. وفى حالة عدم توفير جهاز الرج يمكن استخدام إحدى الطرق الآتية لتثبيت الخلايا:

١- استخدام ورق ترشيح خالٍ من الرماد Ashless filter paper

تعلق كبارٍ من ورق الترشيح فوق سطح بيئة سائلة غير متحركة. ثم تثبت الأجزاء النباتية أو التجمعات الخلوية المتعددة على السطح العلوى لورقة الترشيح. ويساعد ورق الترشيح على إمداد الخلايا أو الجزء النباتى بالبيئة الغذائية ويحافظ على إبقائها فى الهواء فيسهل لها تبادل الغازات.

٢- استخدام قطع اسفنج Viscose sponge تحت ورق ترشيح

تستخدم كبارٍ من ورق الترشيح كحامل للمادة النباتية. و يضاف قطعة اسفنج تحت ورقة الترشيح. وفى هذه الطريقة يمكن إعادة استخدام المواد المستعملة، وإجراء الزراعة الثانوية بعد تغيير البيئة الغذائية وبدون تغيير الإناء المستخدم فى الزراعة. وتسهل هذه الطريقة فحص النموات واستبعاد غير الصالح منها، ويمكن نقل البادرات الناتجة بسهولة إلى التربة كما تتميز بأنها تحتاج إلى كميات أقل من المواد الغذائية.

٣- الغمس Embedding

تغمس الخلايا أو البروتوبلاست فى مركبات مثل جيل بوليمر Polymeric gel أو جيل الجينات الكالسيوم Calcium alginate gel أو Agar أو Agarose. ويعتبر الجينات الكالسيوم من المركبات غير السامة بينما Polyacrylamide غالبا تكون سامة ولا يفضل استخدامها.

٤- الاصطياد الداخلى Entrapment

تستخدم فى هذه الطريقة مناخل أو أعشبية ليفية مسامية Hollow-fiber membrane أو فومات مسامية Pre-formed plastic foams أو صوف زجاجى Glass wool أو صوف صخرى Rock wool. كذلك تستخدم ألياف أنبوبية مصنوعة

من خلات السليلوز Cellulose acetate أو سليكون متعدد الكربونات Silicone polycarbonate. وترتب هذه الأغشية على هيئة حزم متوازية عند طرف الألياف الأنبوبية المحتوية على الخلايا، فيتم اصطياد الخلايا في المسافات البينية للأغشية اللبيفية وتمر البيئة الغذائية السائلة في فراغات الألياف. وتستخدم شبكة من مادة Polyurethane foam لاصطياد الخلايا حيث تنمو في صورة تجمعات خلوية مع الاحتفاظ بحيويتها كاملة.

٥- التثبيت على كرات زجاجية

تعلق الخلايا على كرات زجاجية داخلها فجوة هوائية تساعدها على الطفو فوق البيئة السائلة.

الزراعة الثانوية لمعلق الخلايا

عندما يصل أحد العناصر المكونة للبيئة الغذائية إلى مرحلة الاستنزاف يصبح هو المتسبب في انخفاض سرعة نمو وانقسام الخلايا، وتكون هذه الفترة هي المناسبة للبدء في الزراعة الثانوية المتكررة للخلايا. وتتم الزراعة الثانوية باستخدام ماصات أو حقن لنقل أحجام محددة من معلق الخلايا إلى بيئة سائلة طازجة تحتوى على نفس المكونات للبيئة السابقة. ويفضل أخذ الكميات المطلوب زراعتها من السطح العلوى لمعلق الخلايا.

مراحل انقسام الخلايا المعلقة

١- مرحلة تلكؤ الانقسام The lag phase

يحدث عقب الزراعة في بيئة سائلة دخول الخلايا في مرحلة سكون حركى مع زيادة نشاط فيولوجى. وتبدأ هذه المرحلة بسلسلة من عمليات التمثيل الغذائى تتهى بعدها الخلايا للانقسام الميتوزى. ويحدث أثناء مرحلة التمثيل

الغذائى زيادة القدرة الاختزالية وإنتاج مركبات ATP والكربوهيدرات كمصدر للطاقة. لذلك يعتبر إضافة السكر للبيئة هاما جدا كمصدر للطاقة. حيث يتم أكسدة السكر بواسطة دورة تحلل الجلوكوز Glycolysis ودورة البنتوز Pentose Phosphate pathway ودورة حمض ترأى كربوكسيليك Tricarboxylic acid وتزداد سرعة تمثيل البروتينات والأحماض النووية. كما تتأثر بشدة حالة ثبات مستوى إنزيم mRNAs بما تحتويه البيئة الغذائية من الأكسين ونشاط إنزيم Phenylala-nine ammonia lyase.

٢- مرحلة انقسام الخلايا Cell division phase

فى هذه المرحلة تبدأ الخلايا فى الانقسام وتستمر فى الانقسام حتى يصبح واحدا أو أكثر من عناصر البيئة هو السبب فى ببطه أو توقف الانقسام. وفى تجربة زرعت خلايا القمعة النامية لنبات الخرشوف Jerusalem artichoke وحضنت عند ٢٥ م. وبعد سبعة أيام زاد عدد الخلايا بمقدار ١٠ أضعاف العدد الذى بدأ به. وخلال هذه الفترة زادت كمية الأكسجين المستهلك فى التنفس، وزاد ثبات الحمض النووى RNA خلال ثلاثة الأيام الأولى من الزراعة المعملية، وزادت سرعة تمثيل البروتين نسبيا وانخفاض المواد الثانوية المثلثة مع تغير بسيط فى حجم الخلايا وتميزت باحتوائها على فجوات صغيرة ولم يحدث لها تكشف.

٣- مرحلة الثبات العددي Stationary-phase

تنخفض بوضوح سرعة انقسام الخلايا عندما يصل كثافتها مرحلة الثبات العددي فى البيئة السائلة، وينخفض تنفسها وتمثيل الحمض النووى RNA وتمثيل البروتين مع زيادة عدد الخلايا المحتوية على فجوات عسارية. ويرتبط توقف الخلايا عن الانقسام بزيادة تجمع بعض المركبات الأيضية الثانوية مثل بعض القلويدات والأنثوسيانينات والفينولات والأنثراكوينون. وثبت أن ظهور

المركبات الأيضية الثانوية يكون مصحوبا بتكثف محدود لخلايا نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae خصوصا إذا لم تستبدل البيئة الغذائية ببيئة حديثة التجهيز. فمثلا إذا لم تجدد زراعة الكالس الخاص لنباتى *Atropa belladonna* و *Hyoscyamus niget* بعد نهاية أربعة الأسابيع الأولى من الزراعة قد يكون ذلك سببا فى تنشيط نمو الجذور والسوق وتكوين نموات تشبه الأجنة خلال الأسابيع الأربعة التالية. وفى المرحلة الأخيرة من طور الثبات العدى للخلايا Late stationary-phase قد تتكون الأجنة وتتكون مركبات Tropane alkaloids مثل Atropine وكثير من مركبات Hyoscyamine و Scopolamine. وتتجمع هذه المركبات فى التكوينات الخلوية المتكشفة وقد تتجمع فى التجمعات الخلوية البسيطة. وقد تظهر بعض التكشفات الخلوية وبعض الأعضاء النباتية بعد أن تصبح العناصر الغذائية وقد قاربت على النفاذ من البيئة الغذائية. ويتأثر ظهور هذه التكشفات بتمثيل مواد ثانوية مشابهة لما تنتجه النباتات الكاملة. وتعد هذه ظاهرة طبيعية تبين أن سلامة تكوين المواد الأيضية الثانوية مرتبط بسلامة التركيب البنائى للخلايا.

الكثافة الحرجة للخلايا المعلقة

تعرف الكثافة الحرجة للخلايا بأنها أقل كثافة من الخلايا يجب حقنها فى البيئة السائلة لى تبدأ فى النمو والانقسام بصورة جيدة. فقد يؤدى زراعة عدد قليل من خلايا الكالس فى بيئة سائلة إلى فشلها فى استعادة قدرتها على الانقسام، وقد تنمو هذه الخلايا وتنقسم بسرعة إذا زرعت بكثافة أكبر فى بيئة غذائية معادلة. لذلك فإن تقدير الكثافة الحرجة للخلايا فى البيئة السائلة عند بدء التجربة له أهمية. وتتهيا الخلايا سريعا للانقسام عقب زراعتها فى البيئة السائلة، ويزداد عددها بتعدد انقسامها حتى ترتفع كثافة الخلايا فى المعلق. عندئذ تبدأ سرعة انقسام الخلايا فى الانخفاض تدريجيا نتيجة تراحمها. ويمكن أن يكون واحد

أو أكثر من عناصر البيئة الغذائية هو المحدد لهذا الانقسام والوصول إلى مرحلة الثبات العددي للخلايا Stationary phase. وعند هذه المرحلة يستلزم إجراء الزراعة الثانوية Sub-culturing بهدف زيادة عدد الخلايا بما يكفي واحتياج العمل. ويمكن رسم خط بياني يوضح العلاقة بين معدل نمو الخلايا أثناء فترة التحضين ابتداء من فترة ما بعد الزراعة مباشرة حتى الوصول إلى مرحلة ثبات عدد الخلايا. ويفضل إجراء الزراعة الثانوية بأخذ عينات من معلق الخلايا قبل وصولها إلى مرحلة الثبات أو عقب وصولها إلى هذه المرحلة مباشرة بدون تأخير للمحافظة على حيوية الخلايا وقدرتها على النمو والتكاثر. وتحديد مرحلة الثبات العددي للخلايا يكون وفقا للعدد الأولي للخلايا عند بدء الزراعة وسرعة نموها. ويفضل أن يكون التركيز الأولي للخلايا ما بين $0.5 - 2.5 \times 10^6$ خلية/سم³. ويزداد هذا التركيز أثناء فترة الحضانة فيصبح $1 - 4 \times 10^6$ خلية/سم³. و يعنى ذلك أن جميع الخلايا انقسمت بمعدل 4-6 مرات فى فترة 18-25 يوما. وإذا تم سحب عينة من الخلايا لإعادة زراعتها فإن الفترة اللازمة لبلوغها التركيز المذكور تصل إلى 6-9 أيام فقط.

تقدير عدد الخلايا المعلقة

لقياس عدد الخلايا فى السنتمتر المكعب يستلزم إضافة حجم واحد من معلق الخلايا إلى حجمين من محلول 0.8% ثالث أكسيد الكروميك Chromium trioxide. ثم ترفع درجة حرارة المحلول إلى 70°م لمدة 2-15 دقيقة. وتحدد هذه الفترة الزمنية تبعا لمرحلة نمو الخلايا فى البيئة الغذائية. بعدها يترك الخليط ليبرد ثم يهز بقوة لمدة 10 دقائق فى جهاز هزاز. ويفضل إضافة البكتين إلى معلق الخلايا للحصول على نتائج أفضل. ويخفف محلول الخلايا بمعدل مناسب لكى تصبح الخلايا سهلة العد والفحص تحت المجهر. ويتطلب الفحص المجهرى استخدام شرائح زجاجية تحتوى على ثلاث قنوات يصل عمقها إلى 1200 ميكرومتر حيث يكون هذا العمق مناسباً لمعظم خلايا الأنواع النباتية المختلفة. وتنقل عينة من معلق الخلايا إلى

الشريحة وتترك فترة لى تهدأ الخلايا وتثبت. ويمكن تحديد عددها تحت المجهر بقوة تكبير ١٠٠ مرة. ثم يتم حساب عدد الخلايا فى قناة واحدة تختار عشوائيا من القنوات الثلاث بالشريحة. ويكرر ذلك لخمس شرائح تحتوى على عينات من نفس معلق الخلايا تحت الاختبار. ويجب أن تحتوى القناة الواحدة على ٥ - ١٠ خلايا، فإذا كان حجم القناة الواحدة يساوى ٠,٩٩ ميكرو لتر (µl) فإنه يمكن حساب عدد الخلايا على أساس واحد سنتيمتر مكعب.

توجيه الخلايا المعلقة نحو النمو والتطور

تنشط سلسلة من العمليات الحيوية والفسىولوجية أثناء نمو الخلايا. فتمتص الخلايا حاجتها من البيئة الغذائية وتقوم أيضا بإفراز مواد أيضا. وتتأثر البيئة بكل من ظاهرتى الامتصاص والإفراز. ويتأثر بالتالى سرعة انقسام الخلايا واتجاه نموها. ويمكن توجيه الخلايا إلى النمو والتطور بتغيير المحتوى الغذائى للبيئة. والعلاقة المتوازنة للأكسين والسيتوكاينين فى البيئة لها تأثير على تكشف الكالس. فزيادة تركيز السيتوكاينين (KIN) بالنسبة للأكسين (IAA) فى البيئة الغذائية يؤدي إلى كشف ونمو الأفرع من الكالس. وزيادة تركيز الأكسين بالنسبة للسيتوكاينين يشجع تكوين الجذور. والتركيزات غير المتوازنة من السيتوكاينين والأكسين يؤدي إلى اضطراب النمو أى لا يتكشف منه نموات خضرية ولا جذور. وهذه هى القاعدة العامة لعدد كبير من الأنواع النباتية لتوجيه النمو نحو تكوين نموات خضرية أو جذرية، وتختلف الأنواع النباتية فى احتياجاتها المثلى للأكسينات والسيتوكاينينات، كذلك المكونات الأخرى للبيئة الغذائية لها أهمية فى تحديد مسار النمو. وفى الواقع أن ميكانيكية تأثير منظمات النمو لم تتضح بعد. ويعتمد نشاط الخلايا الناتج عن تواجد منظمات النمو والمكونات الأخرى بالبيئة الغذائية على العمر الفسىولوجى للخلايا المزروعة وأصل النسيج المأخوذ منه الجزء النباتى وطول مدة بقاءه فى المعمل (Skoog and Miller, 1957).

المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحديد المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحتوى البيئة الغذائية على حوالى ٢٠ مركبا. وتتكون أساسا من ماء وسكر وعناصر معدنية ومنظمات نمو (جدول ١). ويفضل الرجوع إلى الدراسات السابقة لتحديد البيئة المناسبة للنبات تحت الدراسة بدلا من إجراء سلسلة اختبارات لتحديد البيئة وتركيز كل مكون فيها، وقد يستغرق ذلك فترة زمنية طويلة. لذلك يجب أن تبدأ التجارب الأولية بثلاثة تركيزات (منخفض، متوسط، مرتفع) على عناصر البيئة للنبات تحت الاختبار كالتى:

- السكروز: يحضر عادة بتركيزات ١٪ و ٢٪ و ٤٪.

- العناصر المعدنية: تستخدم بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962 كأساس

تحضر منها تركيزات ٢٥٪ و ٥٠٪ و ١٠٠٪ من قوة العناصر المعدنية المذكورة بها.

- الأكسينات مثل: Indole-3-Butyric Acid (IBA) ويحضر بتركيزات ٠,٠١

و ٠,٥، وه ملليجرام/ لتر.

- سيتوكاينينات مثل: 6-Benzyl Adenine (BA) وتحضر بتركيزات ٠,٠١ و ٠,٥،

وه ملليجرام/ لتر.

فإذا كان المطلوب إجراء تجارب أولية على ٤ عوامل هي: السكروز والعناصر المعدنية و (IBA) و (BA). ويحضر من كل مركب فى ثلاثة تركيزات. فيكون عدد التراكيب المطلوب تحضيرها هي $4 = 3 \times 2 \times 2$ تركيبة. لذلك تجرى تجارب زراعة الأنسجة على ٨١ تركيبة غذائية. واختيار أفضلها من حيث تأثيرها على سرعة النمو وجودته. وبهذا يتم الوصول إلى الهدف فى أقصر فترة ممكنة. وقد يستلزم إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد التركيز الأمثل من الأكسين أو السيتوكاينين. فإذا ثبت من التجربة الأولى أن أفضل تركيز مثلا هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر. فيفضل إجراء سلسلة اختبارات أخرى تحتوى على تركيزات أقل وأعلى من ٠,٥، مثل ٠,١، ٠,٣، ٠,٥، ٠,٨، ١ ملليجرام/ لتر. وقد يستلزم إجراء سلسلة اختبارات أخرى إذا تغير نوع المحصول.

جدول (١) المكونات الرئيسية للبيئات الغذائية المستخدمة في الزراعة العملية

الماء				
مواد عضوية	عناصر معدنية			
	كبرى	صغرى		
سكريات	Fe	حديد	N	نيتروجين
أحماض أمينية	Zn	زنك	P	فوسفور
فيتامينات	Mn	منجنيز	K	بوتاسيوم
منظمات نمو:	Cu	نحاس	Ca	كالسيوم
Auxins	B	بورون	Mg	ماغنسيوم
1- أوكسينات	Co	كوبالت	S	كبريت
Cytokinis				
2- سيتوكاينين				
Gibberellins	Ni	نيكل		
3- جبرلين				
Abscisic acid	Al	ألومنيوم		
4- حمض أبسيسيك				
Ethylene	Mo	موليبدينم		
5- إيثلين				
مستخلصات نباتية:				معقدات طبيعية:
Casin hydrolysate				- مستخلص خميرة
كازين				- لبن جوز الهند
Pepton	PH	رقم الحموضة		
بيببتون				
Trypton				
تريببتون				

أهمية مكونات البيئة الغذائية

١- الماء Water

الماء من أهم المركبات في البيئة الغذائية لأنه الوسط الذي تذوب فيه جميع المكونات، ويستلزم استخدامه في صورة مقطرة ومعقمة بدرجة عالية. ويفضل استخدام

جهاز من الزجاج البيركس Pyrex لتقطير الماء مرتين. خصوصا لمزارع البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب تنظيف جهاز التقطير من الداخل بصورة منتظمة للتخلص من الرواسب والشوائب العالقة بالجهاز والمحافظة على جودة الماء المقطر. ويلحق بجهاز التقطير جهاز مزيل للأيونات De-ionizer. ويفضل البعض استخدام أغشية أسموزية لترشيح وتنقية الماء المقطر بهدف مزيد من النقاوة والتعقيم. ويخزن الماء المقطر فى أوانٍ من البولييثين Polythene، حيث يمكن أن تنطلق من جدر الأوانى الزجاجية إلى الماء المقطر آثار من الرصاص والصوديوم والزنك التى يحتويها الزجاج كشوائب. وإذا كان لابد من استخدام الزجاج لتخزين الماء فيجب أن يكون من النوع البيركس.

٢ - السكر Sugar

السكروز من المركبات الهامة جدا الذى يتم تمثيله طبيعيا فى النبات. ولا بد من تواجده فى البيئة الغذائية لأهميته كمصدر للطاقة فى تكوين النموات الجديدة. وترجع أهميته إلى عدم كفاءة النباتات المعملية فى بناء السكريات نتيجة ضعف الكلوروفيل وضعف الإضاءة. أو إطالة فترة الظلام التى تتعرض لها النباتات المعملية أحيانا مما يساعد على توقف البناء الضوئى تماما. كما أن تركيز ثانى أكسيد الكربون الناتج عن تنفس النباتات المعملية يكون محدودا وغير كاف لعملية التمثيل الضوئى (George, Pierik, 1997; 1993). ومن الناحية العملية يصعب إمداد البيئة بغاز ثانى أكسيد الكربون، وزيادة تركيزه داخل الأوانى المزروعة يؤدى إلى تسمم النباتات. ويضاف السكروز للبيئة بنسبة ١ - ٥٪. وقد يستخدم الجلوكوز والفركتوز والمالتوز والجالاكتوز والسكريات الكحولية مثل الجلسرول والسوربيتول. ويعتمد تركيز السكروز المضاف للبيئة على نوع وعمر النبات النامى. فالأجنة الصغيرة جدا تحتاج إلى نسبة عالية من السكروز. وزيادة تركيز السكروز فى البيئة عن التركيز الأمثل يؤدى إلى تدهور النموات نتيجة تثبيط عملية التمثيل الكربونى وتثبيط تكوين الكلوروفيل والسكروز المتوفر فى السوير ماركت مناسب لارتفاع نقاوته إذ يحتوى على ٩٤,٩٩٪ سكروز

و ٠,٠٢٪ ماء و ٠,٠٤٪ سكريات أخرى مثل الفركتوز والجلوكوز. وتعقيم البيئة بالأوتوكلاف قد يحدث تغييرات للسكريات. كما أن زيادة رقم حموضة البيئة عامل هام فى إحداث هذه التغيرات. وتساعد زراعة أجزاء جذرية فى البيئة على إحداث تغيير فى السكروز نتيجة نشاط إنزيم الإنفرتيز Invertase المفرز من خلايا الجذر. واختلفت آراء الباحثين حول تأثير تعقيم السكر بالأوتوكلاف. ويستخدم السكروز فى زراعة البروتوبلاست للحفاظ على الضغط الأسموزى للبيئة الغذائية وحماية البروتوبلاست من الانفجار. ويضاف السوربيتول Sorbitol أو السكروز بتركيز ٠,٢٣ مولر للحفاظ على البروتوبلاست فى البيئة الغذائية. ويعتبر السوربيتول أفضل مصدر للكربوهيدرات فى البيئات الخاصة بزراعة أنسجة نباتات العائلة الوردية Rosaceae. ويستخدم السكروز بدلا من السوربيتول مع بعض الأنواع التابعة للعائلة الوردية. ومن ناحية أخرى تنمو أنسجة بعض النباتات مثل الخوخ صنف Reliance فى وجود السوربيتول بصورة أفضل بالمقارنة بالسكروز.

٣ - الأملاح المعدنية Mineral salts

تشمل الأملاح المعدنية على العناصر الضرورية الكبرى وهى النيتروجين والفوسفور واليوتاسيوم والكالسيوم والمغنسيوم والكبريت، ونقصها يسبب موت النبات. والعناصر الضرورية الصغرى وهى الحديد والمنجنيز والنحاس والزنك والبيورون والمزليبيدوم والكلور والكوبالت. ويؤثر نقصها على انتظام سير العمليات الحيوية فى النبات، ولا تكون سببا مباشرا فى موت النبات.

وتعتبر بيئة (MS) Murashige and Skoog (1962) من أكثر البيئات استعمالا فى الزراعة العملية. وتستجيب لها معظم النباتات بسهولة. وقد تكون بيئة (MS) غير مناسبة لنمو بعض النباتات ذات الحساسية الشديدة للتركيزات المرتفعة من العناصر مثل نباتات *Rhododendron; Gerbera; Kalmia* وبعض النباتات الخشبية؛ لذلك قد تستخدم تركيزات مخففة من بيئة (MS) أو تستخدم بيئة أخرى منخفضة فى العناصر المعدنية مثل بيئة (Lloyd and Mc Cown, 1980; Woody Plant Media

(WPM) Grattapaglia and Machado, 1998). ويفضل تحضير الأملاح باستخدام تركيز الأيونات بالمليمولر. وتعدد البيئات وتختلف فى محتواها من العناصر بما يتناسب مع اختلاف حساسية النباتات تحت التجربة. وتعتبر بيئة (MS) غنية فى الأملاح، بينما بيئة Knops فقيرة فيها. ويحتاج النبات ٢-٢٦ مليمول/ لتر بوتاسيوم، و١-٥ مليمول/ لتر من كل من الفوسفات (H_2PO_4) والكالسيوم (Ca^{++}) والمغنسيوم (Mg^{++}) والكبريتات (SuO_4). ويعتبر الحديد من العناصر الهامة فى البيئة لتأثيره المباشر على نمو وتكشف الأجزاء النباتية المزروعة. ويجب تواجد الحديد والعناصر المعدنية الأخرى فى صورة قابلة للامتصاص. مع العلم بأن أملاح الحديد فى صورة سترات Citrate وطرطرات Tarttrate صعبة الذوبان فى الماء وترسب بعد تحضيرها فى البيئة الغذائية. بينما تميزت بيئة (MS) بوجود الحديد فى صورة مركب Fe-EDTA؛ وهو من المركبات المخيلية المفضلة بالمقارنة بأملاح الحديد الأخرى لأهميته فى تنشيط تكوين الأجنة والنموات، ويؤخذ عليه عدم الثبات فى البيئة بعد تعقيمها بالأوتوكلاف؛ حيث يتحد مع مركبات أخرى ويرسب بعد عدة أيام. لذلك يفضل عليه مركب FeNa- EDTA لاحتوائه على الحديد والصوديوم.

ويضاف النيتروجين إلى معظم البيئات فى صورة أمونيا (NH_4^+) أو نترات (NO_3). فإذا كانت كمية النيتروجين المطلوب إضافتها للبيئة ١٢-٦٠ مليمولر فيجب أن يكون تركيز الأمونيا ما بين ٦-٤٠ مليمولر. وتمتص معظم النباتات النترات بصورة أفضل من الأمونيا، بينما تمتص بعض النباتات الأمونيا بصورة أفضل من النترات. وامتصاص النبات لأيونات الأمونيا يؤدي إلى انخفاض رقم حموضة البيئة وإسالة الآجار ويؤدي بالتالى إلى امتصاص النيتروجين فى صورة نيتريت (NO_2). وفى أنواع نباتية عديدة وجد أن للنيتروجين المختزل تأثيره واضحا على نمو الأجزاء النباتية فى المعمل. وأن أيون الأمونيا (NH_4) فى صورة كلوريد أمونيا NH_4Cl أو نترات أمونيا NH_4NO_3 يحقق نموا جيدا لكالس نباتى الكمثرى والتفاح. وإضافة

الأحماض الأمينية وخاصة الأسبرجين Asparagine أو الجلوتامين Glutamine إلى البيئة في وجود الأمونيا لم يُعطِ أية زيادة ملحوظة في النمو. (Nitsch, et al., 1970) ويدخل النيتروجين في تركيب الأحماض الأمينية والبروتين والكوروفيل والأحماض النووية (RNA ; DNA). ويدخل النيتروجين في تركيب الإنزيمات التي تعتبر عاملا حيويا هاما تزيد من سرعة التفاعلات الحيوية بالخلية النباتية، ويدخل في كثير من الهرمونات النباتية مثل الأكسينات التي تحتوى على حلقة الإندول مثل (IAA) والسيتوكاينينات مثل الكاينتين (KIN) والبنزايلى أدينين (BA). ويساعد الأكسين على نمو النباتات وتكوين الجذور وكسر السكون وينشط السيتوكاينين تكوين الأفرع والتكاثر وزيادة عدد النباتات.

ويدخل الفوسفور في تكوين الفوسفوليبيدات والأحماض النووية ومركبات جلوكوز-1-فوسفات وأدينوزين ثلاثى الفوسفات (ATP) وأدينوزين ثنائى الفوسفات (ADP) وأدينوزين أحادى (AMP) وجميعها مركبات تمد الخلية بالطاقة. بينما يدخل الماغنسيوم فى تركيب الكلوروفيل ويعمل على زيادة اللون الأخضر فى النبات. وغيابه يؤدى إلى اصفرار النباتات ولا تستكمل دورة حياتها. ويؤدى نقص الكالسيوم فى النبات إلى عدم تكوين الصفيحة الوسطى Middle lamella أثناء انقسام الخلية واصفرار النبات وإصابة القمة النامية بالقرح Necrosis وظهور ظاهرة التزجج Vertification فى النباتات العملية. ولا يستطيع النبات استكمال دورة حياته فى غياب عنصر الكالسيوم. والبوتاسيوم من العناصر الضرورية للنبات لأنه يساعد على امتصاص الماء وانتقال السكريات. ولم يعرف حتى الآن المركبات التى يدخل البوتاسيوم فى تركيبها. ويؤدى غياب البوتاسيوم كلية إلى فقد النبات قدرته على تكملة دورة حياته. والكبريت من العناصر الضرورية ويدخل فى تركيب بعض الأحماض الأمينية مثل السيستين والسيستائين والميثيونين وجلوتاثيون. ويساعد الكبريت على إتمام تفاعلات الأكسدة والاختزال ولا يستطيع النبات تكملة دورة حياته فى حالة غيابه كليا.

٤- الأجار Agar

يستخلص الأجار من حشائش البحر Seaweeds فى صورة حبيبات Pellets. ثم ينظف وينقى للتخلص من المواد السامة. ويوضح جدول (٢) محتوى بعض أنواع الأجار من الشوائب العضوية وغير العضوية. ويستخدم الأجار كمادة غروية فى معظم البيئات الغذائية. والأجار من مشتقات السكريات المتعددة Polysacchrides ذات الوزن الجزيئى الكبير. وله القدرة على ربط جزيئات الماء فيحول البيئة السائلة إلى غروية. ويخفض ظاهرة التزجج نتيجة انخفاض نسبة الرطوبة الممتصة. ويضاف آجار Difco Bacto Agar إلى البيئة الغذائية بتركيز ٠,٦، ٠,٨، ١٪. وللأجار القدرة على الارتباط بجزيئات الماء وادمصاص المركبات الكيميائية بالبيئة. وزيادة تركيز الأجار إلى ١٪ فى البيئة يؤدي إلى تصلب البيئة جدا ويصعب ثبات الجزء النباتى عليها نتيجة انخفاض الماء الميسر بالبيئة الغذائية مما يؤخر تكوين الجذور وانخفاض التلامس بين المادة النباتية والبيئة الغذائية مما يؤدي إلى انخفاض قدرتها على امتصاص الماء والعناصر الغذائية. وإذا استخدم الأجار بتركيز أقل من ٠,٤، ١٪ تصبح البيئة غير متماسكة Sloppy خصوصا إذا كان رقم الحموضة منخفضا أيضا. بينما إذا استخدم التركيز ٠,٦، ١٪ وظلت البيئة غير متماسكة لذلك يجب الرجوع إلى تصحيح حموضة البيئة، لأن رقم الحموضة إذا كان أقل من ٤,٥ - ٤,٨ يؤدي إلى عدم تماسك البيئة. ومضمون ذلك أن نمو المادة النباتية يتأثر بنوع الأجار وتركيزه، لذلك يفضل استخدام آجار نقى وعالى الجودة. ويوضح جدول (٣) محتوى آجار Difco من العناصر. وبالرغم من وجود أنواع أخرى معروفة من الأجار مثل Flow agar; Gibco phytagar إلا إنه يفضل زراعة البروتوبلاست أو الخلايا الفردية فى آجار نقية جدا مثل الأجاروس Agarose. ويمكن استبدال الأجار بمركبات أخرى مثل:

- البولييمرات الصناعية Synthetic polymers مثل البيوجيل Biogel P٢٠٠. وهو عبارة عن حبيبات بولى أكريليميد Polyacrylamide pellets.

- الجينات الصوديوم Sodium alginate ويستخدم فى زراعة البروتوبلاست .
ومواد من السليولوز المتبلور (CCA) Cellulose crystallite aggregate ولها أهمية خاصة فى تكوين جذور القنبيط.

- معقد الجيل رايت Gelrite وهى مادة غروية عالية النقاوة، تتكون من سكريات عديدة مثل الجلوكورونيك Glucuronic والجلوكوز والرامنوز Ramnose وأرثو أسيتيل ميوتيز O-Acetyl moieties. ومعقد Gelrite قادر على تكوين جيل لامع فى وجود ملح المائدة. وتعتمد قوة هذا الجيل على نوع الملح المضاف. فالكاتيونات الثنائية مثل الماغنسيوم (0.1% سلفات ماغنسيوم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) والكالسيوم تعطى جيلا أقوى من الجيل المضاف إليه أيونات أحادية التكافؤ مثل الصوديوم أو البوتاسيوم. ويحتاج Gelrite إلى حرارة وتوفير كاتيونات ليكون القوام غرويا. ويوصى باستخدام ٢.٠٪ جيل رايت. ويؤخذ عليه أنه يحتوى على آثار من مركبات فينولية قد تسبب سمية للنبات الناتجة فى العمل.

- مادة نشوية تستخلص من نبات *Nephrolepis exaltata* تستخدم بتركيز ١٢ جرام/ لتر بيئة، وتذوب فى الماء بدون استخدام حرارة.

جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشوائب العضوية وغير العضوية

الآجار المكونات	Bacto agar%	Noble agar%	Purified agar%
Ash	4.5	2.16	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

جدول (٣) محتوى Difco Bacto Agar من العناصر

العناصر	التركيب (جزء في المليون)
Cadmium	0.5 - 0.0
Chromium	0.1 - 0.0
Manganese	0.5 - 0.1
Zinc	10.0 - 0.0
Copper	1.5 - 0.5
Iron	5.0 - 1.5
Lead	0.5 - 0.0
Magnesium	430.0 - 210.0

٥- معقدات طبيعية Natural complex

هى معقدات طبيعية مثل عصائر الطماطم والبرتقال والعنب والأناناس وماء جوز الهند والوز المنهروس ومستخلص الخميرة ومستخلص المولت. وتحتوى هذه المعقدات ومستخلصاتها على تركيزات عالية من السكريز وعناصر غذائية ومركبات هامة أخرى يستلزم دراستها لمعرفة مكوناتها وعلاقتها بتنشيط النمو. فقد وجد أن زراعة أنسجة مفصولة من نباتات الموالح على بيئة مضافا إليها ١٠٪ عصير برتقال قد نمت بكفاءة تعادل ستة أضعاف مثيلتها التى لا تحتوى على عصير برتقال، وتعادل مثيلتها التى تحتوى على ١٠٪ سكرورز (Einset, 1978). كذلك ثبت أن ماء جوز الهند يحتوى على مركبات عديدة مثل Myoinositol الذى يدخل فى تركيب البيئات الغذائية كمنشط للنمو، ويدخل أيضا فى بناء الفوسفوليبيدات والمواد البكتينية فى الجهاز الخلوى وفى بناء الغشاء البلازمى. ويضاف Myoinositol إلى بيئة أنواع نباتية

عديد مثل البلارجونيوم *Pelargonium hortorum* بتركيز ٥٠ - ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ويعتبر هاما جدا لنمو كالس نبات *Faxonus pennsylvanica* وتكشف كالس نبات *Hawoethia*. ويساعد ماء جوز الهند على نمو وتكشف الأنسجة النباتية المزروعة فى المعمل لأنواع نباتية عديدة مثل أجنة نبات الداتورا ونخاع نبات التبغ ومرستيم القمّة النامية لنبات *Pharbitic nil*. ويحتوى ماء جوز الهند على مركبات عديدة لها أهميتها فى انقسام الخلايا مثل *Diphenylurea* والسيتوكاينين الطبيعي *Zeatin* ومركب مشابهة للكينيتين (*KIN*) وهو أحد مركبات السييتوكاينينات. كما يحتوى على العديد من الأحماض الأمينية الحرة مثل فينيل ألانين *Phenyl alanine* الذى له دور فعال فى انقسام خلايا نبات فول الصويا. ويضاف ماء جوز الهند للبيئة الغذائية بمعدل ٥٠ - ١٥٠ مليلتر/ لتر (٣ - ١٥٪). وتعتمد الكمية المضافة من ماء جوز الهند على عمر الثمرة حيث يتغير تركيبه بتقدم عمر الثمرة. وإضافة ماء جوز الهند مع الأكسجينات للبيئة الغذائية يؤدي إلى انقسام سريع للخلايا. كذلك ثبت أن ماء ثمار جوز الهند الناضجة يحتوى على سيتوكاينين يسمى *9-β-D-Ribofura-nosylzeatin* ولذلك يستخدم السييتوكاينين فى حالة عدم توفر ماء جوز الهند. كما يحتوى على نيتروجين مختزل له تأثير منشط قوى لنمو الأنسجة النباتية المختلفة. ويستخلص ماء جوز الهند بثقب الثمار بواسطة مثقاب كهربائى. ويجمع الماء من كل ثمرة على حدة فى كأس مستقل. ويختبر السائل للتأكد من صلاحيته. ثم يجمع الماء من الثمار السليمة ويرشح خلال شاشة جين. ويعقم الراشح بالأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ١٢١°م ثم يترك ليبرد طول الليل. ثم يرشح فى صباح اليوم التالى، ويحفظ فى وعاء بلاستيك ذات غطاء قلاووظ عند ٢٠°م.

٦ - معقدات طبيعية أخرى

تستخدم بعض المعقدات الطبيعية الأخرى كمصادر للنيتروجين حيث تحتوى على أحماض أمينية وفيتامينات مثل كازين *Casein-hydrolysate* ويضاف بتركيز ١ - ٠,١ جرام/ لتر. والبيتون *Peptone* ويضاف بتركيز ٢٥ - ٠,٣ جرام/ لتر. والتربتون *Tryp-*

tone ويضاف بتركيز ٠.٢٥ - ٢ جرام/ لتر. ومستخلص المولت Malt extract ويضاف بتركيز ٠.٥ - ١ جرام/ لتر. ومستخلص الخميرة Ycast extract ، ويضاف بتركيز ٠.٢٥ - ٢ جرام/ لتر. وتستخدم الخميرة لاحتوائها على نسبة مرتفعة من فيتامين B .

٧- معقدات متنوعة Miscellaneous compounds

(أ) أمينات متعددة Polyamines

تستخدم هذه المركبات لتشجيع خلايا الكالس على تكوين الأجنة. ومن هذه المركبات Putrescine; Spermidine; Spermine. ولوحظ زيادة مركبات Spermidine Putrescine طبيعيا في أجنة نبات الجزر ونبات *Medicago sativa* أثناء نموها، وإضافة مثبط البولي أمينات Polyamines inhibitor يتوقف تكوين الأجنة، وبإضافة أى مركب من الأمينات المتعددة تستأنف الأجنة نشاطها. ويتواجد مركب Putrescine مترامنا مع بدء تكوين أجنة الجزر. وتساعد الأمينات المتعددة أيضا في تكوين الجذور العرضية. ومضمون ذلك أن الأمينات المتعددة والإنزيمات المرتبطة بنشاطها لها أهمية في انضباط النمو وتطوره، ولها أهمية كبيرة أيضا في حفظ الأنسجة والأصول الوراثية النادرة لفترات طويلة للاستفادة بها مستقبلا. ويبدو أن مركب Putrescine مشتق من الحمض الأميني L-Arginine. وأن الأمينات المتعددة لها القدرة على منع تحويل الميثيونين Methionine إلى إيثيلين Ethylene. والتوازن الداخلي بين الإيثيلين والأرجينين والأمينات المتعددة له دور هام في انضباط تكوين الأجنة الجسمية (Rugini and Wang, 1986).

(ب) مركب فينايل يوريا ومشتقاته Phenylurea and its derivatives (DPU)

يعتبر مركب (DPU) مثبطا لإنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينينات، لذلك يعمل (DPU) على زيادة نشاط السيبتوكاينينات (Horgan, 1986). ويعتبر إنزيمي

Thidiazol ureas (Thidiazuron); Pyridyl ureas ومشتقاتهما من أكثر المركبات نشاطا وفاعلية، ويعادل نشاطهما ١٠ آلاف مرة قدر نشاط (DPU)، كما أنهما أكثر نشاطا من الزايتين Zeatin (سيتوكاينين طبيعي). وينشط انزيم Thidiazuron نمو الأفرع لنباتات أشجار خشبية عديدة، ويؤدي تركيز ٠.٠٥ - ٠.١ ميكرومولر من انزيم Thidiazuron إلى زيادة ملحوظة في عدد أفرع نبات *Celtis occidentalis* أكثر بالمقارنة بتركيز ٤ - ١٠ ميكرومولر من مركب (Meyer and (BA) Kernsh, 1986). لذلك يجب أن تنال هذه المركبات اهتمام الباحثين.

(ج) الأدينين Adenine

يضاف الأدينين في صورة سلفات أدينين Adenine sulphate لسهولة ذوبانه في الماء. ويضاف بمعدل ٢ - ١٢٠ ملليجرام/ لتر للبيئة سابقة التجهيز الموجودة في الأسواق (Nitsch, et al., 1967; Skoog and Tsui, 1948). ويشجع الأدينين تكوين الأفرع على أجزاء نباتية متعددة.

٨ - الأكسينات والسيتوكاينينات

تعرف الهرمونات Hormons بأنها مركبات عضوية يتم تمثيلها في النباتات الراقية بصورة طبيعية. وهي مركبات يظهر أثرها المنشط والمنظم في النبات عندما يكون تركيزها منخفضا. وفي الأسواق الآن توجد منظمات نمو صناعية ماثلة للمركبات الطبيعية في تأثيرها الفسيولوجي (Picrik, 1997). ويطلق على المركبات الطبيعية والصناعية اسم منظمات نمو Growth regulators لأهميتها الكبيرة في تنظيم نمو النبات وتطوره وتوزيع المركبات المثلثة في النبات وانقسام الخلايا وزيادة عددها وحجمها. وللأكسينات Auxin والسيتوكاينينات Cytokinin أهمية كبيرة في الزراعة العملية. ومن المستحيل نجاح زراعة الأنسجة في المعمل بدون منظمات نمو سواء كانت موجودة طبيعيا في النسيج أم مضافة للبيئة الغذائية. والالتزان بين منظمات النمو المضافة للبيئة ومنظمات النمو الموجودة طبيعيا في الجزء النباتي

له أهمية كبيرة فى تنظيم النمو وتكوين الشكل الخارجى للنموات. وعلى ذلك فالأجزاء النباتية التى تحتوى طبيعياً على قدر كاف من الأكسين أو السيتوكاينين لا تحتاج إلى إضافة مثل هذه المركبات إلى البيئة. والأنسجة الحديثة Juvenile لها القدرة على الانقسام وإنتاج نموات جديدة بدون إضافة منظمات نمو للبيئة لاحتوائها طبيعياً على منظمات نمو. بينما تحتاج الأنسجة البالغة Adult إلى إضافة منظمات نمو للبيئة لتنشيط خلاياها على الانقسام. وطبقاً لاحتياج النبات تقسم البيئات إلى بيئة يضاف إليها أكسينات فقط وبيئة يضاف إليها سيتوكاينينات فقط وبيئة يضاف إليها (أكسينات + سيتوكاينينات) وبيئة لا تحتاج إلى إضافة منظمات نمو. ويعتبر (Skoog and Miller, 1957) أول من أوضح العلاقة بين تركيز الأوكسينات والسيتوكاينينات وأهمية التوازن بينهما فى البيئة الغذائية وأثر ذلك على طبيعة نمو وتكشف الأنسجة المزروعة. وتختلف النسبة بينهما باختلاف النوع النباتى. ويتم التعرف إلى النسبة المثلى من خلال البحث والتجربة. وتحتاج كثير من الأنسجة النباتية بشكل رئيسى إلى السيتوكاينينات فى حين لا يعتمد البعض الآخر على وجودها. وقد تبين أن احتياج الأنسجة النباتية إلى السيتوكاينينات هى صفة وراثية. ويعتبر المعدل الطبيعى فى جميع البيئات الأساسية لمزارع الأنسجة بالنسبة هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر سيتوكاينين + ٥ ملليجرام/ لتر IAA فإذا زاد تركيز الأكسين IAA يتكشف الكالس إلى جذور، وإذا انخفض تركيز الأكسين وزاد السيتوكاينين يتكشف الكالس إلى أفرع وأوراق جديدة ونباتات جديدة ذات سوق وأوراق وجذور.

وعند تحضير البيئة تذاب الأكسينات IAA; IBA; NAA فى الماء، وتكون أسهل فى الإذابة إذا كانت فى صورة ملح بوتاسيوم. ويمكن إذابتها أيضاً فى صورتها الحامضية فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم. ويمكن إذابة السيتوكاينينات أيضاً فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم، بينما يذاب الجبرلين فى الماء. وتخزن محاليل IAA والكينيتين فى الظلام لأنها غير ثابتة فى الضوء، بينما IBA; NAA; 2,4-D; BA تكون أكثر ثباتاً فى وجود

الضوء. ويفقد مركب IAA نشاطه في محلوله المائي تدريجيا بإطالة فترة التخزين، كما يفقد نشاطه أيضا بواسطة إنزيمات البيروكسيداز Peroxidase والإندول أسيستيك أسيد أوكسيداز IAA-Oxidase.

٨-١- الأكسينات Auxins

تضاف الأكسينات غالبا للبيئة لتنشيط نمو الكالس وتكوين الجذور العرضية. وتؤدي التركيزات المنخفضة من الأكسينات إلى تكوين الجذور العرضية، بينما التركيزات المرتفعة منها تمنع تكوين الجذور وتؤدي إلى تكوين الكالس. وتثبط نمو السوق العرضية والإبطية لعدم قدرتها على كسر السيادة القمية، كما أنها تثبط تكوين الأجنة في معلق الخلايا. وتعمل الأكسينات على استطالة الخلايا وانتفاخها وانقسامها وانتظام التكوين الظاهري للنموات خصوصا إذا كانت في اتزان مع السيتوكاينين (Pierik, 1997). وتتأثر الأكسينات كثيرا برقم الحموضة وكمية العناصر بالبيئة الغذائية. وتشمل الأكسينات العديد من المركبات أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA); 3-Indole Butaric Acid (IBA);

2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T); Naphthalene Acetic Acid (NAA);

2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D); 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA);

4-Amino- 3,5,6- Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ويعتبر (IAA) من الأكسينات الضعيفة ويتكون طبيعيا في النبات ويخلق صناعيا. ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠,٠١ - ١٠ ملليجرام/ لتر. وتعتبر الأكسينات الصناعية مثل (IBA ; NAA ; 2,4-D) من الأكسينات القوية وتضاف للبيئة بتركيز ٠,٠٠١ - ١٠ ملليجرام/ لتر. (Torres, et al., 2001) ويرشح مركب (IAA) قبل إضافته للبيئة الغذائية باستخدام مرشحات بكتيرية لأن تعقيمه بالأوتوكلاف يؤدي إلى تكسيره وتقليل فاعليته. ويحفظ في زجاجات بنية لأنه يفسد بالضوء. كذلك تحفظ البيئة المحتوية على (IAA) في ظلام تام حتى لا تفسد فاعليته. وتعمل الإضاءة على

تكسير هذا الأكسين في البيئة الغذائية بعد ١٤ ساعة من التحضين. كذلك يتأثر (IAA) بالحموضة والأملاح. ويلاحظ أن هذا الأكسين لا يذوب في الماء ويجب إذابته أولاً في كحول إيثانول أو هيدروكسيد البوتاسيوم. ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام (IAA) في هيدروكسيد بوتاسيوم تركيز واحد عيارى ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب بالماء المقطر.

ويستخدم (D-2,4) بتركيز عالٍ كمبيد حشائش وبتراكيزات منخفضة في مزارع الأنسجة للمساعدة على تكوين الكالس بالاتزان مع السيتوكينين. ويستخدم (D-2,4) في مزارع الأنسجة في نطاق محدود لأنه يساعد على إحداث الطفرات ويثبط أحياناً عملية التمثيل الضوئي، ولتجنب ذلك يوصى باستخدام مركب TCP بدلاً من D-2,4. بينما لا تسبب (IAA, NAA) هذه الآثار. وتختلف نباتات الفلقة الواحدة عن نباتات الفلقتين في استجابتها لتأثير (D-2,4). ويرجع ذلك إلى قدرة نباتات الفلقة الواحدة على امتصاص (D-2,4) وقدرة هذه المادة على تغيير السلوك الفسيولوجي حيث تمنع تكوين الصفيحة الوسطى Middle lamella وتتلفها أثناء انقسام الخلايا. وثبت أن الأكسين (CPA) هو الأقل تأثيراً بالمقارنة بالأكسينات (D-2,4; T-2,4, 5). وبمقارنة بالأكسين (IAA) وجد أن (D-2,4) يحفز النمو بمقدار ٨-١٢ مرة، وأن (T-2,4, 5) يحفز النمو بمقدار ٤ مرات، بينما (CPA) يحفز النمو بمقدار مرتين فقط.

ويستخدم الأكسين (NAA) بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لتكوين الكالس أو تكوين المجموع الجذري في المرحلة النهائية، ويعتبر أقل تأثيراً من IAA من حيث القدرة على إيقاف أو منع تكشف الأجزاء النباتية. والتركيزات المخففة من NAA تؤدي إلى تنشيط تكوين الجذور لبادرات العائلة (*Brme*-Picirik, et al., 1984 *liaceae*). ويلاحظ أن الاتزان الداخلى للأكسينات والسيتوكينينات هو المحدد في جميع حالات نمو النبات.

ويذوب NAA في الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم، ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام من الهرمون في هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز واحد عيارى، ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب (في هذه الحالة يكون سنتيمتر واحد مكعب يعادل

واحد ملليجرام). بينما يذاب 2,4-D فى كميات قليلة من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH). ويخفف المحلول بعد ذلك بإضافة الماء المقطر للوصول إلى الحجم المطلوب. وقد يستخدم مركب Dimethyl sulfoxide لإذابة الهرمونات فيه. واندول حمض البيوتريك (IBA) من الأوكسينات الهامة المستخدمة على نطاق واسع فى مزارع الأنسجة النباتية بهدف تكوين المجموع الجذرى. وهذا الهرمون ثابت نسبياً بالمقارنة بمركب (IAA)، حيث إنه يتحمل التعقيم ولا يتأثر بالحرارة أو الضوء، ويذوب أيضاً فى كحول الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم. ويتم تحضيره مثل تحضير مركب IAA.

٨-٢- السيتوكينينات Cytokinins

السيتوكينينات مركبات عضوية مشتقة من الأدينين Adenine (أمينوبورين Aminopurine). ولها دور هام فى انقسام الخلايا ونمو أنسجة النبات وتؤثر على العديد من العمليات الفسيولوجية مثل تأخير الشيخوخة Senescence للخلايا وتنشيط حركة العناصر المعدنية ونضج الكلوروبلاست وضبط التكوين المورفولوجى للنبات (Torres, et al., 2001). كما أن للسيتوكينين القدرة على تثبيط السيادة القمية وتنشيط نمو الأفرع الجانبية وكسر طور السكون، وتثبط نمو الجذور (George, 1993). ومن أكثر السيتوكينينات استخداماً 2iP, BA, KIN (Pierik, 1997). ويذاب الكاينيتين (KIN) فى الماء، ثم يعقم فى أوتوكلاف تحت ضغط بخارى واحد كيلوجرام/سم² لمدة عشرة دقائق. ويذوب الكاينيتين و(BA) فى قليل من حمض اليبيدروكلوريك ٠.١ عيارى. وتشمل السيتوكينينات:

6-Benzyl Amino Purine (BAP); 6-Benzyl Adenine (BA); Isopentenyl adenine (IPA); 6-γ-γ-Dimethyl ally Amino Purine (2 ip); 6-Furfuryl- Amino Purine (Kinetin);

5-(4-Hydroxy-3-Methyl- trans-2- Butenylamino) Purine (Zeatin).

أهمية التوازن بين الأكسينات والسيتوكاينينات

الاتزان بين الأكسين والسيتوكاينين مطلوب غالبا لانتظام تكوين السوق والجذور العرضية. ففي مرحلة الزراعة الثانوية يجب أن يكون مستوى السيتوكاينين أعلى من الأكسين، بينما ينشط تكوين الجذور إذا كان الأكسين في مستوى أعلى من السيتوكاينين، وقد يكون وجود السيتوكاينين في البيئة غير ضروري أحيانا (Torres, et al., 2001) (شكل ١).

تركيز الأكسين		تركيز السيتوكاينين
+++++	تكوين الجذور على العقل	منخفض +
+++++	تكوين الكالس في نباتات أحادية الفلقات	+
+++++	أول مرحلة في تكوين الأجنة	++
++++	تكوين الجذور العرضية من الكالس	++++
++++	تكوين الكالس في نباتات ثنائية الفلقات	++++
+++	تكوين أفرع عرضية	+++++
+ منخفض	نمو أفرع إبطية من ساق نبتة مزروعة	مرتفع +++++

شكل (١) تأثير توازن الأكسين: السيتوكاينين على النمو والتكشف

٨-٢- الجبرلين Gibberellins

يؤدي إضافة (الجبرلين + الأكسين) إلى استطالة الخلايا والسلاميات ونمو المرستيمات. ويضاف الجبرلين للبيئة لكسر سكون الأجنة والبراعم والبذور والدرنات وغيرها. ويثبط الجبرلين تكوين ونمو الجذور. وتضاف الجبريلينات (GA7 + GA3) لبعض مزارع الأنسجة، و(GA3) هو من أكثر المركبات استعمالاً، والجبريلينات حساسة جداً للحرارة حيث يؤدي تعقيمها بالأوتوكلاف إلى تحطيم ٩٠٪ من نشاطها البيولوجي.

٩- منظمات نمو أخرى

٩-١- أوليجوسكارين Oligosaccharins

تدخل الأوليجوسكارين في تركيب جدر الخلايا وتنظم سرعة النمو وتكشف الجذور والأزهار ونمو البراعم الخضرية، ولها أهمية في حماية النبات ضد بعض الأمراض وتغييرات الظروف البيئية.

٩-٢- حمض الأبسيسيك Abscisic acid (ABA)

ثبت أن حمض الأبسيسيك له تأثير سلبي على مزارع الأنسجة وعلى نمو الكالس وتكوين الجنين.

٩-٣- الإيثيلين Ethylene

الأجزاء النباتية هي المصدر الرئيسي للإيثيلين المتجمع في أوانى الزراعة، والأوعية البلاستيكية مصدر آخر للإيثيلين. ويزداد تجمعه خلال الأيام الخمسة الأولى من الزراعة ثم ينخفض بعد ذلك. ويؤدي زيادة تجمعه إلى تثبيط نمو وتكوين الأعضاء النباتية. ووضع أنبوبة تحتوى على برمنجانات بوتاسيوم داخل وعاء الزراعة يؤدي إلى التخلص من حوالى ٧٠٪ من الإيثيلين. ولإيثيلين دور هام في تكوين الأبصال (Van Aartrijk, et al. 1986).

٩-٤ فلوروجلويسينول Phloroglucinol

هو مركب فينولي له تأثير مثبط لإنزيم IAA-Oxidase المسئول عن تحلل الأوكسين IAA. لذلك فإن له القدرة على تنشيط النمو وتكوين السوق. ويؤدي إضافة فلوروجلويسينول مع IAA إلى البيئة إلى تنشيط نمو الجذور.

٩-٥ مركبات فينائل يوريا Diphenyl urea compounds

تستخدم هذه المركبات بدلا من السيتوكاينينات بهدف تنشيط النموات الجانبية. حيث تقوم هذه المركبات بوقف نشاط إنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينين. وبالتالي تحتفظ الخلايا بمستواها الداخلي من السيتوكاينين التي لها أهمية في عمليات التضاعف الكروموسومي.

١٠- فيتامينات Vitamins

معظم النباتات قادرة على تمثيل الفيتامينات إلا إنه لم يدرس الاحتياج الفعلي للأجزاء النباتية من الفيتامينات. ويضاف واحد أو أكثر من الفيتامينات لتحفيز النمو. حيث ثبت أن حامض الفوليك وحمض (PABA) يحفزان النمو ولكنهما غير أساسيين في البيئة. وأن الثيامين Thiamine-HCl أساسي لنمو كالس نبات التبغ. وحمض الأسكوربيك لا يحتاجه النبات ولكنه يشجع على النمو فقط في غياب أو انخفاض تركيز الثيامين. ويضاف حمض الأسكوربيك كمركب مضاد للأكسدة وحماية الأجزاء النباتية من الاسوداد (جدول ٤).

جدول (٤) التركيز المناسب من الفيتامينات

الفيتامين	التركيز / لتر
Thiamin (Vitamin B1)	5 - 0.1
Riboflavin (Vitamin B2)	10 - 0.1

تابع جدول (٤)

الفيتامين	التركيز/ لتر
Pyridoxin (Vitamin B6)	1 - 0.1
Panthenic acid	2.5 - 0.5
Folic acid	0.5 - 0.1
Nicotinic acid	5 - 0.1
Para-Aminobenzoic acid (PABA)	1 - 0.5
Myo-inositol	200 - 100
Ascorbic acid (Vitamin C)	100 - 1
Biotin (Vitamin H)	1 - 0.1
Tocopherol (Vitamin E)	50 - 1

١١ - أحماض أمينية Amino acids

الأحماض الأمينية لها أهميتها إذا كان النبات غير قادر على بناء البروتين بالقدر الكافي لاحتياجه. ويضاف الكازين Casein hydrolysis للبيئة كمصدر للأحماض الأمينية بنسبة ٠,٥ - ٠,١٪. ويضاف غالبا Tyrosine; Glycine; L-Asparagine; L-Glutamine كمصادر إضافية للأمونيا بمعدل ١٠٠ ملليجرام/ لتر. وقد يضاف سلفات الأدينين Adenine sulfate إلى البيئة لتحسين النمو وتكوين الأفرع. ويضاف Biotin; Glycine كمصادر للنيتروجين العضوى.

١٢ - الفحم النباتى النشط Activated charcoal

ينتج الفحم النباتى بتفحيم الخشب عند حرارة مرتفعة فى وجود بخار الماء.

ويحتوى الفحم على فراغات بينية دقيقة جدا تجعل مساحة المسطح الفعال به كبيرة وقادرة على ادمصاص جميع المواد السامة والغازات. ويحتوى الفحم النباتى على ٩٥-٩٩٪ فحم نشط، لذلك يفضل الفحم النباتى عن الفحم الحيوانى. ويفضل استخدام الفحم نباتى النوع Merck No. 2186، ويضاف للبيئة بتركيز ٢،٠-٣٪ (وزن/ حجم) ومن أهم مميزاته: إكساب البيئة لونا غامقا فتصبح مناسبة لنمو الجذور وامتصاص:

- الصبغات السامة الملونة الناتجة من المركبات القينولية مثل الميلانين وغير الملونة الأخرى.

- المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية المنفصلة من الموز والأشجار الخشبية.

- المركبات العضوية مثل منظمات النمو والإيثلين والفيتامينات والحديد والزنك وغيرها.

- مركب Hydroxy methyl furfural (HMF) الناتج من انحلال السكرز أثناء التعميم.

- مركب فينيل حمض الخليك Phenyl acetic acid وحمض البنزويك Benzoic acid التى تنتجها النباتات النامية فى المعمل.

- يساعد على انتظام وثبات رقم حموضة البيئة الغذائية.

ويضاف الفحم النباتى للبيئة كحافز لنمو وتكوين الأعضاء Organogenesis والأجنة Embryogenesis لأنواع عديدة مثل تكوين الأجنة من متوك الأنيمون Anemone والتبغ Nicotiana والفيوناريا Funaria والأوركيدات Orchids وأجنة نخيل البلح والقمم النامية لنبات الزنجبيل Ginger والبصل والجزر البرى، بينما يعتبر مثبطا لنمو فول الصويا وكالس نبات التبغ (Ammirato, 1983).

البيئات الغذائية شائعة الاستعمال

تتكون البيئات أساسا من أصلاح العناصر الأساسية الكبرى والصغرى مضافا إليها سكرز كمصدر كربونى ومواد أخرى مثل الفيتامينات والأحماض الأمينية

والأوكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين والركب المخلبي EDTA وبعض المستخلصات الطبيعية مثل ماء جوز الهند وخلصات الخميرة وعصير الطماطم وغيرها. وقد تكون مكونات البيئة المناسبة لتحفيز جزء نباتي معين ليكون كالس ليست من الضرورة أن تكون مناسبة لتكشف النموات الخضرية والجذرية من هذا الكالس. كما أن مكونات البيئة السائلة المناسبة لنمو جزء نباتي معين لا يعنى أن تكون مناسبة لإحداث نفس الأثر إذا كانت بيئة صلبة. وتستخدم عديد من البيئات فى معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتختلف هذه البيئات فى مكوناتها ومن أشهر هذه البيئات:

١- بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962

وهى من أشهر البيئات الغذائية، وتستخدم بكثرة فى معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتستخدم لتحفيز الأجزاء النباتية على النمو وتكوين نباتات كاملة لاحتوائها على نسب عالية من النيتروجين والبوتاسيوم. كذلك تستخدم بيئة (MS) لإجراء التجارب عليها عندما يكون الاحتياج الفعلى للنبات غير معروف وأن النبات غير حساس للتركيزات المرتفعة من العناصر. فإذا كان النبات حساساً للأملاح فيستخدم خليط العناصر الغذائية الكبرى والصغرى لبيئة Heller, 1953، وإذا كان النبات حساساً جداً للأملاح فتستخدم بيئة Knop, 1884.

٢- بيئة White (WH), 1963

وتتميز باحتوائها على تركيزات منخفضة جداً من النيتروجين والبوتاسيوم بحيث لا يتناسب مع إحداث نمو جيد للكالس والخلايا النباتية. وعلى الباحث أن يدخل بعض التغييرات المناسبة على تركيز هذين العنصرين بما يناسب نوع النبات تحت التجربة (جدول ٥).

٢ - بيئة (B5), 1976, Gamborg, et al.

استخدمت لأول مرة في زراعة خلايا نبات فول الصويا، وتتميز بارتفاع نسبة النيتروجين والبوتاسيوم. وتستخدم بعد إضافة (2, 4- D) للبيئة بهدف تحفيز الخلايا على الانقسام والتكاثر السريع.

جدول (٥) مكونات بيئة (WH) White من العناصر الصغرى والكبرى

Conc. mg/l	Micro-elements	Macro-elements	Conc. mg/l
FeSO ₄ .7H ₂ O	-	KNO ₃	80
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	288
MnSO ₄ .4H ₂ O	4.55	NH ₄ NO ₃	-
MnSO ₄ .H ₂ O	-	(NH ₄) ₂ SO ₄	-
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2.67	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	19
H ₃ BO ₃	1.5	KH ₂ PO ₄	-
KI	0.75	KCl	70
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.001	CaCl ₂ .2H ₂ O	-
Na ₂ EDTA	-	MgSO ₄ .7H ₂ O	737
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	-	Na ₂ SO ₄	200
MoO ₃	0.0001		
CoSO ₄ .6H ₂ O	-		

ارشادات عامة عند تحضير البيئة

١- تحضر محاليل مركزة من جميع الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والهرمونات التي تدخل في تركيب البيئة الغذائية (جداول ٦-١٠). ويفضل ترشيح هذه المحاليل باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) قبل حفظها. وتحضر العناصر الكبرى والصغرى كل على حدة بكميات تكفي مستقبلا لعدة تحضيرات من البيئة. وتخزن هذه المحاليل في ظلام في غرفة عادية. ويوجد في الأسواق مخلوط من العناصر الكبرى والصغرى سابقة التجهيز وتسمى تجاريا MS-salts، على أن تتبع الإرشادات المسجلة على العبوة لتجنب بعض المشاكل مثل سرعة الترسيب.

٢- تحفظ المحاليل المركزة بعيدا عن الأتربة ومصادر التلوث عند ٢-٤°م، مع مرعاة عدم تكوين رواسب أو تغيير لونها. ويجب استخدام هذه المحاليل في فترة لا تزيد عن ٣٠ يوما.

٣- تجزأ محاليل الفيتامينات ومنظمات النمو المركزة في أنابيب اختبار، تحتوى كل أنبوبة على القدر المطلوب إضافته للبيئة عند تحضيرها ثم تخزن الأنابيب عند (-٢٠°م) لحين وقت استعمالها لضمان سلامة محتوى الأنابيب من التلوث. وتحفظ المحاليل المركزة لإندول حمض الخليك (IAA) في مكان مظلم عند ٢-٤°م.

٤- تضاف خلاصة الخميرة والسكر والإنزيمات إلى البيئة عند تحضيرها. ويضاف ٠,٦-١٪ آجار عند تحضير البيئة الصلبة، ويفضل أن يكون الآجار على هيئة مسحوق.

٥- يرشح لبن جوز الهند عقب استخراج من الثمار ثم يعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند (-٢٠°م) لسرعة فساده

٦- قبل تعقيم المركبات سريعة التلف بالأوتوكلاف يفضل ترشيحها أولا باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) ثم تعقم باستخدام مرشحات التعقيم Millipore MF filters

مسامية ($0.22 \mu\text{m}$). وعند ترشيح المحاليل المخففة جدا من منظمات النمو خلال مرشحات التعقيم يفضل التخلص من الكمية الأولى من الراشح لاحتمال إدمصاص جزء من الهرمون على سطح المرشحات مما يسبب انخفاض تركيزه.

٧- تكتب جميع البيانات على الأواني المحتوية على المحاليل مثل اسم المادة وتركيزها وتاريخ التحضير وأى بيانات تضمن سلامة المحاليل واستخدامها قبل فسادها وقد جودتها.

٨- إذا كان المطلوب استخدام بيئات صلبة أو سائلة مثل البيئات المستخدمة فى زراعة الأجنة فتوضع أنابيب الاختبار على مسطح مائل عقب تعقيمها واستخراجها من الأوتوكلاف عند $45 - 50^\circ\text{C}$.

٩- يستخدم ماء خالٍ من الأيونات De-ionized water بدلا من استخدام مياه الصنبور لارتفاع محتواه من أيونات الكالسيوم الذى يترسب فى قاع الأوتوكلاف.

١٠- يجب تحديد زمن التعقيم ودرجة الحرارة اللازمة للتعقيم. وقد تستخدم بكتيريا *Bacillus stearothermo- phillis* كدليل بيولوجى للتعرف على سلامة التعقيم حيث تموت بعد $12 - 15$ دقيقة من التعقيم عند 121°C .

خطوات تحضير البيئة الغذائية

١- تحضر العناصر الكبرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 1).

٢- تحضر العناصر الصغرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 2).

٣- يحضر محلول يحتوى على حديد مخلبى Fe-Chelate بمفرده فى لتر واحد.

٤- يوضع دورق زجاجى يحتوى على 500 مليلتر ماء مقطر على مسطح ساخن لتسخين الماء، ثم تضاف إليه الكمية المطلوبة من السكر، ويرفع المحلول مباشرة عن السخان بمجرد وضع السكر.

٥- يضاف إلى محلول السكر الكميات المطلوبة من العناصر الكبرى والعناصر الصغرى والحديد المخلى مع التقليب الجيد، ثم يوضع بعد ذلك على المسطح الساخن حتى الغليان.

٦- تضاف الأحماض الأمينية المطلوبة بالتركيز المحدد لها. وتختلف نوعها وكميتها باختلاف نوع النبات.

٧- تضاف الفيتامينات للبيئة خصوصا فيتامين (B₁) لأهميته حيث لا يتم تخليقه في النبات، وذلك بالتركيز المحدد للنبات تحت التجربة. وقد لا يستلزم إضافة فيتامينات إذا كانت أجزاء ورقية أو خلايا أو كلوروبلاست لأنها تحتوي على فيتامينات مخلقة ذاتيا.

٨- يضاف أحيانا بعض المعقدات الطبيعية مثل لبن جوز الهند وعصير الطماطم وعصير البرتقال ومستخلص الخميرة ومستخلص النشا والكازين لقدرتها العالية على تنشيط النمو.

٩- تضاف منظمات النمو (الأكسيفات والسيتوكاينينات) عادة بتركيزات منخفضة جدا مع مراعاة الاتزان بينهما ونسبة الإضافة حسب الهدف من الزراعة. وقد يضاف الجبرلين لبعض البيئات إذا كان له أهمية.

١٠- تضبط حموضة البيئة عند ٥.٧ - ٥.٨ باستخدام جهاز pH-meter ويستخدم في ذلك محاليل مخففة من هيدروكسيد صوديوم وحمض هيدروكلوريك. ثم يضاف الآجار عند تحضير البيئة الصلبة فقط. ويخلط الآجار مع ماء بارد مع التقليب الجيد ثم يضاف إلى البيئة. ويجب عدم إضافة الآجار أثناء غليان الماء حتى لا يحدث طبخ زائد له ويسبب تأثيرات ضارة. ويفضل إضافة الآجار باستخدام قمع مع الحرص بعدم تكوين تكتلات في المحلول أو حدوث فوران أو رغاوى. ثم يستكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر.

١١- توزع البيئة المحضرة على أواني الزراعة (أنابيب، دوارق مخروطية، برطمانات). ويراعى انتظام توزيع البيئة الغذائية ومنع التصاقها بالجدار الداخلى أو الخارجى.



جدول (٦) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من الأيونات

Medium Component	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM
N-Total	10.942	16.036	7.058	27.385	76.756	27.336	60.017
NH ₄ ⁺	-	7.567	-	8.994	2.028	2.608	20.612
NO ₃ ⁻	10.942	8.469	7.058	18.391	24.728	24.728	39.405
H ₂ PO ₄ ⁻	1.837	1.837	0.906	0.500	1.087	2.608	1.249
K ⁺	4.310	1.837	10.060	9.897	25.815	24.728	20.042
Ca ²⁺	4.234	4.234	0.510	1.496	1.163	1.360	2.993
Mg ²⁺	1.014	1.014	1.014	0.751	1.014	1.623	1.501
SO ₄ ²⁻	1.014	4.789	1.014	0.751	2.028	1.623	1.501
Na ⁺	-	-	7.964	-	-	-	-
Cl ⁻	-	-	11.080	2.991	2.325	2.721	5.986

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Helder, 1953. 4. Nitsch, 1972.
 5. Gamborg, et al, B5, 1976. 6. Schenk & Hildebrandt, SH, 1972.
 7. Murashige & Skoog, MS, (1962)

جدول (٧) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الكبرى
(مليجرام/لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
KNO ₃	250	-	-	950	2500	2500	1900
NaNO ₃	-	-	600	-	-	-	-

تابع جدول (٧)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
Ca(NO ₃) ₂ . 4H ₂ O	1000	1000	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	-	720	-	-	1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	500	-	-	134	-	-
H ₂ PO ₄ NH ₄	-	-	-	-	-	300	-
H ₂ O NaH ₂ PO ₄	-	-	125	-	150	-	-
KH ₂ PO ₄	250	250	-	68	-	-	170
KCl	-	-	750	-	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	-	-	75	220	150	200	440
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	250	250	185	250	400	370

جدول (٨) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الصغرى
(ملليجرام/ لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
FeCl ₃ . 6H ₂ O	-	-	1.0	-	-	-	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	-	-	-	27.8	27.8	15.0	27.8
MnSO ₄ . 4H ₂ O	-	25.0	0.1	13.2	13.2	13.2	22.3

تابع جدول (A)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	-	7.5	1.0	2.0	2.0	1.0	8.6
H ₃ BO ₃	-	-	1.0	3.0	3.0	5.0	6.2
KI	-	-	0.01	0.75	0.75	1.0	0.83
CuSO ₄ · 5H ₂ O	-	-	0.03	0.025	0.025	0.2	0.025
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	-	-	-	0.25	0.25	0.1	0.25
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	-	0.025	0.025	0.1	0.025
NiCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	0.03	-	-	-	-
AlCl ₃	-	-	0.03	-	-	-	-
Na ₂ EDTA	-	-	-	37.3	37.3	20.0	37.3

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. H  ller, 1953. 4. Nitsch, 1972.
5. Gamborg, et al. (B5), 1976. 6. Schenk and Hildebrandt (SH), 1972.
7. Murashige and Skoog, (MS), 1962

جدول (٩) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الكبرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	MS mg/l	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
KNO ₃	18.8	1900.0	25.0	2500.0	0.8	80.0
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	-	-	-	-	1.2	288.0

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
$\text{CaSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	100.0	27.8	100.0	27.8	-	-
$\text{e}^-(\text{SO}_4)$	0.1	-	-	-	6.3	2.5
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	60.0	10.0	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	100.0	22.3	-	-	29.8	6.55

جدول (١٠) محتوى بعض النباتات البيئات من العناصر الصغرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
H^+NO_3	20.0	1650.0	-	-	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	-	1.0	134.0	-	-
$\text{aH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-	-	1.1	150.0	0.12	19.0
H_2PO_4	1.25	170.0	-	-	-	-
Cl	-	-	-	-	0.9	65.0
$\text{aCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.0	440.0	1.0	150.0	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.5	370.0	1.0	250.0	3.0	737.0
a_2SO_4	-	-	-	-	1.4	200.0

تابع جدول (٩)

تابع جدول (١٠)

Medium Component	MS mM	MS mM	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	-	-	60.0	10.0	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	30.0	8.6	7.0	2.0	9.3	2.67
H ₃ BO ₃	100.0	6.3	50.0	3.0	25.0	1.5
KI	5.0	0.83	4.5	0.75	4.5	0.75
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.1	0.025	0.1	0.025	0.004	0.001
Na ₂ EDTA	100.0	37.3	100.0	37.3	-	-
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	1.0	0.25	1.0	0.25	-	-
MoO ₃	-	-	-	-	0.007	0.0001

الاحتياطات الواجبة عند تحضير البيئة

١- يجب أن تكون جميع المواد الداخلة في تركيب البيئة الغذائية نقية، وتستخدم ملعقة نظيفة معقمة لكل مادة. ثم تعاد عبوات المركبات الكيميائية إلى أماكن حفظها بعد غلقها جيدا.

٢- توجد في الأسواق بيئات غذائية جاهزة التحضير تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى وحديد مخلي. ويفضل استخدامها لأسباب اقتصادية وتوفيراً للوقت والمجهود.

٣- تحضر البيئة باستخدام المحاليل المركزة للعناصر الكبرى والعناصر الصغرى التي سبق تحضيرها. ويوزن الآجار والسكر عند الحاجة إليهما. وتحضر محاليل منظمات النمو والفيتامينات قبل الاستخدام مباشرة.

٤- قد تتكون رواسب بمحاليل العناصر الكبرى والصغرى أثناء التخزين حتى ولو كان التخزين بارداً. وتسبب الرواسب مشاكل كثيرة. ومحاولة إعادة إذابتها بالحرارة أو الغليان قد يؤدي إلى تغيير تركيزها في المحلول نتيجة فقد الماء بالبخار، وفي هذه الحالة يفضل التخلص منها وإعادة تحضيرها.

٥- يفضل معاملة البيئة الغذائية بالبخار بدلاً من الغليان لإذابة الآجار، حيث إن المعاملة بالبخار تكون أكثر أماناً وتقلل من حدوث تحلل كيميائي غير مرغوب فيه.

٦- المواد التي تتأثر بالحرارة مثل الفيتامينات ومنظمات النمو تضاف بعد تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وتبريدها لدرجة حرارة ٤٥-٥٠ م°، وتستخدم المرشحات المعقمة Filter-sterilization لتعقيمها.

٧- قد يضاف للبيئة الغذائية فحم نباتي نشط للاستفادة من قدرته على امتصاص الغازات السامة التي تتجمع حول جذور النباتات، على أن يضاف للبيئة قبل التسخين أو بعد التسخين مع التقليب الجيد حتى يتجانس تماماً مع البيئة الغذائية. ثم تعقم البيئة في الأوتوكلاف عند ١٢١ م° و١,٥ ضغط جوى ولدة ١٥-٢٠ دقيقة.

٨- في حالة الضرورة تخزين البيئة الغذائية بعد تحضيرها، مع مراعاة تجنب تخزينها لمدة طويلة للمحافظة على ثبات المركبات الكيميائية الداخلة في تكوينها ومنع التبخير الشديد للماء منها.

٩- توزع البيئة في الأواني وهي دافئة ثم تترك للتجمد، مع مراعاة وضع أنابيب الاختبار في وضع مائل حتى تتجمد البيئة. وتحفظ الأواني المحتوية على بيئة غذائية عند ٥ م° لحين زراعتها.

١٠- تغطى الأنابيب والدوارق بورق ألومنيوم بعد صب البيئة الغذائية فيها.

خلق الأواني بعد زراعتها

تعلق الأوعية بعد زراعتها لمنع تلوثها وجفافها، مع المحافظة على سهولة تبادل الغازات داخل الوعاء مع الجو الخارجي، وتجنب نقص الأكسجين ومنع تراكم

غازات ثاني أكسيد الكربون والإيثيلين داخلها. ويجب أن تتوفر هذه المواصفات في جميع أغشية الأنابيب والدوارق. ويستخدم في غلق أواني الزراعة العملية ما يلي:

- ١- سدادات قطن صوفى Cotton wool وهي تستخدم بكثرة ويتم تشكيلها يدوياً، ولها أهميتها في المعامل التجارية. وتوجد ماكينات لتشكيل هذه السدادات بالحجم والمواصفات المطلوبة. ويجب ألا تتعرض هذه السدادات إلى اللهب بعد الحقن لأن الصوف الزجاجي الصناعي يعطى عند حرقه مواد ضارة وخطيرة.

٢- سدادات Steristop مسامية يمكن دفعها داخل الأنبوبة.

٣- غطاء ألومنيوم Aluminum cap يثبت على فوهة الإناء بكلبس.

٤- ورق الألومنيوم Aluminum foil يستخدم خاصة للدوارق المخروطية الكبيرة.

٥- غطاء من الزجاج الشفاف Transparent glass تمتاز بإعادة تعقيمها.

٦- غطاء حلزوني Screw cap يستخدم لتغطية الأنابيب والدوارق ذات الفوهة الحلزونية. وعند استخدامها يجب ألا تكون محكمة الغلق حتى لا تمنع تبادل الغازات بين داخل الأنبوبة وخارجها.

٧- سدادات فوم Foam plugs.

٨- شرائح فيتا فيلم Vita film رقيقة وأنواع أخرى مثل Para film; Polypro- film; Pylcne film; PVC plastic film، ويجب أن تسمح هذه المواد بتبادل الغازات ولا تسمح بخروج بخار الماء.

احتياطات غلق الأواني بعد زراعتها

١- يؤدي الغلق المحكم إلى تجمع ثاني أكسيد الكربون والإيثيلين داخل أواني الزراعة ويمنع تبادل هذه الغازات بالهواء الجوى. وزيادة تركيز هذه الغازات داخل الأواني له تأثير سام على النوات بداخلها. والأغشية المصنوعة من ورق (الألومنيوم+ البوليبروبيلين Polypropylene) لها مضارها حيث إنها غير منقذة للغازات، بينما الأغشية المصنوعة من البوليبروبيلين نفاذة للغازات ولا تنفذ بخار الماء.

٢- تعتبر الأنابيب والصناديق والأغطية البلاستيكية مصدرا لغاز الإيثيلين خصوصا إذا كانت محكمة الغلق.

٣- تؤدي زيادة الرطوبة داخل الأواني المزروعة إلى ظهور ظاهرة التزجج .
Verification.

٤- الأغطية الزجاجية وغيرها من الأغطية الصناعية الشفافة تسمح بنفاذ الضوء من أعلى، بينما الأغطية القطنية وأوراق الألومنيوم غير منقذة للضوء.

تقدير تركيز مكونات البيئة الغذائية

يقدر تركيز المواد الداخلة في مكونات البيئة الغذائية بطرق عديدة منها:

١- النسبة بالحجم Volume percentage وتستخدم عادة عند استخدام محاليل طبيعية مثل ماء جوز الهند وعصير الطماطم، ويحضر ماء جوز الهند بمعدل ٥٠ مليلتر + ٩٥٠ مليلتر ماء مقطر.

٢- النسبة بالوزن Weight percentage وتستخدم عادة عند تحضير الآجار والسكريات والأملاح المعدنية. ويتم تحضيرها بإذابة الوزن المطلوب بالجرام من المادة في حجم معلوم من البيئة الغذائية.

٣- المولر Molar ويستخدم التركيز بالمولر عادة عند تحضير منظمات النمو. والمول الواحد يساوي الوزن الجزيئي للمركب مقدرًا بالجرام. والمولر يساوي واحد مول من المادة مذابة في لتر. فمثلا:

(أ) طريقة حساب المولر للأكسين IAA.

واحد مولر لركب IAA = الوزن الجزيئي بالجرام / لتر = ١٧٥,١٨ جرام / لتر.

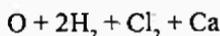
واحد ملليمولر (mM) IAA = ٠,١٧٥١٨ جرام / لتر.

واحد ميكرومولر (μM) IAA = ٠,٠٠٠١٧٥١٨ جرام / لتر = ٠,١٧٥١٨

ملليجرام / لتر.

(ب) طريقة حساب المولر لركب كلوريد الكالسيوم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

يحسب الوزن الجزيئي لمركب $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، وذلك بجمع الأوزان الذرية للعناصر الداخلة في المركب:



الوزن الجزيئي = $40,08 + 2 \times 35,453 + 2 \times 1,008 + 16,00 \times 2 = 147,018$

واحد مولر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = الوزن الجزيئي بالجرام / لتر = $147,018$ جرام / لتر.

واحد ملليمولر $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (mM) = $0,147018$ جرام / لتر.

واحد ميكرومولر IAA (μM) = $0,000147018$ جرام / لتر = $0,147018$

ملليجرام / لتر.

٤- ملليجرام / لتر (mg l^{-1}) Milligram/ L (مستخدم هذا المعيار عند تحضير

منظمات النمو فمثلا:

١٠^{-٦} = واحد ملليجرام / لتر و $10^{-٦} = 0,1$ ملليجرام / لتر.

٥- ميكروجرام / لتر ($1 \mu\text{g l}^{-1}$) microgram/ L

واحد ميكروجرام / لتر يساوي $0,001$ ملليجرام / لتر.

٦- جزء في المليون (PPM) Part per million

جزء واحد في المليون يساوي واحد ملليجرام / لتر.

١٠^{-٦} = ملليجرام / لتر (mg l^{-1}) و $10^{-٦} = 0,1$ جرام / لتر (g l^{-1})

ويفضل استخدام المولر في مجال فسيولوجيا النبات، فمثلا يصعب مقارنة

النشاط الفسيولوجي لتركيز واحد ملليجرام IAA / لتر مع ملليجرام واحد IBA / لتر

لاختلافهما في عدد الجزيئات في اللتر. بينما مقارنة ميكرومولر واحد IAA مع

ميكرومولر واحد IBA يكون مقبولا لاحتواء المحلولين على نفس العدد من جزيئات

المادتين. ومسجل في الجداول التالية الوزن الذرى للعناصر الداخلة في البيئة

(جدول ١١)، والأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى (جدول ١٢)

والسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى (جدول ١٣) والأكسيدات والسيتوكينينات

والجبرلين (جدول ١٤).

جدول (١١) الأوزان الذرية للعناصر الداخلة في البيئات الغذائية

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

جدول (١٢) الأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى للبيئة الغذائية

Compound		Atomic Weight
1- Macro-elements		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	132.15

تابع جدول (۱۲)

Compound		Atomic Weight
Calcium chloride	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	147.02
Calcium nitrate	$\text{Ca}(\text{NH}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	236.1
Magnesium sulphate	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.47
Potassium chloride	KCL	74.55
Potassium nitrate	KNO_3	101.11
Potassium dihydrogen Orthophosphate	KH_2PO_4	136.09
Sodium dihydrogen Orthophosphate	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.01
2- Microelements		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	237.93
Cupric sulphate	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	249.68
Manganous sulphate	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	241.95
Zinc sulphate	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	287.54

تابع جدول (١٢)

Compound		Atomic Weight
Sodium EDTA	Na ₂ -EDTA	372.25
Ferrous sulphate	FeSO ₄ .7H ₂ O	278.03
Ferric-sodium EDTA	FeNaEDTA	367.07

جدول (١٣) الأوزان الجزيئية للسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى

Compound	Molecular Weight
1 - Sugers and Alcoholic sugars	
Fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180.15
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	180,15
Manitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	182.17
Sorbitol (C ₆ H ₁₄ O ₆)	182,17
Sucrose (C ₁₂ H ₁₁ O ₁₂)	342,31
2- Vitamins	
Ascorbic acid (Vit. C)	176,12
Biotin (Vit. H)	244,31
Calcium pantothenate (Ca salt of Vit. B1)	476,63
Cyanocobalamine (Vit. B1)	1357,64

تابع جدول (١٣)

Compound	Molecular Weight
L-Cystein HCL	157,63
Folic acid	441,40
Inositol	180,16
Nicotinic acid Or Niacin (Vit.B3)	123,11
Pyridoxine HCL (Vit. B4)	205,64
Thiamine HCL (Vit. B1)	337,29
Glycine	75,07
L - Glutamine	146,15
3- Other compounds	
Abscissic acid	264,31
Colchicine	399,43
Phloroglucinol	126,11

جدول (١٤) الوزن الجزيئي للأكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
1- Auxins	
p-Chlorophenoxy Acetic Acid (p-CAA)	186.59

تابع جدول (۱۴)

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
2,4-Dichloro Acetic Acid (2,4-D)	221.04
Indole 3-Acetic Acid (IAA)	175.18
3-Indole Butyric Acid (IBA)	203.23
-Naphthalene Acetic Acid (NAA)	186.20
β -Naphoxy Acetic Acid (NOA)	202.20
2- Cytokinins / Purins	
Adenine (AD)	189.13
Adenine sulphate (ADSO ₄)	404.37
G-Bezyl Adenine (BA) or 6- Benzyl Amino Purin (BAP)	225.20
N-Isopentenyl Amino Purine (2-ip)	203.3
6- Furfurylamine purine (Kinetin)	215.21
6-Benzylamino -9-Tetra- hydropyranil-H-purine	309.40
6-(4 Hydroxy-3-Methylbut- 2-enylamino) purine	219.20
3- Gibberellin	
Gibbrellic Acid (GA ₃)	346.37