بيئــــــــــة الزراعــــــــــــــــة

النبات الكامل هو الكائن الحي الوحيد الذي يستطيع أن يكون احتياجاته داخليا عن طريق عملية البناء الضوئي حيث يستطيع أن يحصل على ثاني أكسيد الكربون من الجو والماء من التربة مع العناصر المعدنية باستخدام الطاقة الضوئية يحولها إلى طاقة كيميائية يستخدمها خلال مجموعة من التفاعلات الكيماوية ليكون المواد الأساسية ( كربوهيدارت- بروتينات- لبيدات ) وأيضا يكون الهرمونات والفيتامينات والأحماض النووية والإنزيمات، كما ينتج عن عمليات التمثيل الغذائي داخل النبات مجموعة من المركبات الثانوية الهامة جدا. وهكذا يحدث بالنسبة للنباتات أو الأجزاء النباتية المنزرعة بداخل الأوعية الزجاجية بالمعمل.

البيئة:- بمفهوم بسيط هي الوسط الغذائي الذي يستخدم في زارعة الأنسجة والتي ينمي عليها أجزاء النبات المختلفة والمنزرعة بهدف الحصول منها على غرض معين .فقد يكون الهدف منها هو الحصول على الكالس أو الاستمرار في التكشف والانقسام حتى نحصل على نموات خضرية أو جذرية أو الاستمرار حتى تحصل على نبات كامل وهنا يجب أن نتعرف على مقومات البيئة الزارعية وهي كما يلي:

* العناصر الكبرى . Macro elements
* العناصر الصغرى Micro elements.
* الفيتامينات. Vitamins
* الأحماض الأمينية. Amino acid
* مصدر الطاقة أو الكربون . Carbohydrates
* الهرمونات النباتية. Plant hormones

ومن المعروف أن البيئة الغذائية المستخدمة لها أشكال مختلفة حسب الهدف من استخدامها فهناك البيئة الصلبة Solid medium أو شبه الصلبة Semi solid medium والتي يدخل في تركيبها الاجار. وهناك البيئات السائلة والتي تندرج تحت نوعين الأولى غير متحركة Stationary liquid medium والثانية المتحركة Agitated liquid medium والتي يستخدم معها جهاز الهزاز الكهربائي ويظل معها فترة التجربة وكل نوع منها له مميزاته وعيوبه ولكن في حالة استخدام البيئة السائلة يلزم وضع النبات على كوبري أو حامل معين يكون من ورق الترشيح ويتم غمره في البيئة ويوضع عليه الجزء النباتي المختار.

# مكونات البيئة الغذائية

أولا: العناصر الأساسية Basic Mineral Salts

وهي مجموعة من الأملاح غير العضوية، حيث يتطلب الوسط الغذائي لأنسجة النبات مصد اًر دائما من المركبات غير العضوية وتنقسم إلى قسمين:-

* العناصر الكبرى:-

وهي التي يحتاجها النبات بكميات غير قليلة وهي عبارة عن سبعة عناصر أساسية كالتالي:-

النيتروجين- الفسفور- البوتاسيوم- الكالسيوم– الصوديوم- الماغنسيوم- الكبريت.

مصادر النيتروجين لبيئة زراعة الانسجة هي.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| العنصر | تأثيرة | مصادرة وصور استخدامة |
| النيتروجين N | يؤثر على معدل نمو النبات وضروري لتكوين الكلوروفيل والقلويدات والاحماض النووية nuclic acids وهرمونات النمو والاحماض الامينية amino acids. | الامونيوم NH4  والنترات NO3 |
| الفسفور P | يتركز في الأجزاء المرستيمية وله دور في تنشيط الانزيمات وانقسام الخلايا. | فوسفات البوتاسيوم KH2PO4 , فوسفات الصوديوم (NaH2PO)4 |
| البوتاسيوم K | ضروري للانقسام الطبيعي للخلية وتكوين الكربوهيدرات والبروتينات. | على هيئة نترات بوتاسيوم 3KNO أو فوسفات بوتاسيوم 4KH2PO . ونادرا مايستعمل كلوريد البوتاسيوم KCl |
| الكبريت S | يوجد في بعض جزيئات البروتين. يشجع نمو المجموع الخضري والمجموع الجذري. | سلفات So4 |
| الكالسيوم Ca | يلعب دور فى نفاذية الجدار الخلوية ويسهل حركة الكربوهيدرات والاحماض الامينية خلال النبات ويشجع نمو الجذور. | يضاف فى البيئة فى صورة كلوريد الكالسيوم 2CaCl أو فى صورة نترات الكالسيوم 2(3Ca(NO |
| الماغنسيوم Mg | يعتبر العنصر الرئيسي في جزئ الكلوروفيل هام جدا كمنشط إنزيمى. نقصه يسبب شحوب الأوراق. | يضاف إلى البيئة فى صورة كبريتات الماغنسيوم 4Mg SO |
| الحديد Fe) | يدخل في تخليق الكلوروفيل ويشارك في عملية التمثيل الضوئي والتنفس. نقصه يسبب ضرر وشحوب في الأوراق. | ستخدم على هيئة كبريتات الحديدوز FeSo4 وبعد ان يتم خلطة بأملاح الصوديم وذلك يجعل الحديد اكثر صلاحية للنبات.  ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA) |

* العناصر الصغرى: -

وهي العناصر التي يحتاج النبات إليها بكميات صغيرة جد اً، بحيث لا تزيد عن بضع ملليجرمات ويطلق عليها أيض اً العناصر الأثرية وهي: الحديد-المنجنيز-الزنك-البورون-النحاس-المولبيديوم-اليود-الألمنيوم-الكلور. وقد ثبت أن هذه العناصر تعمل كمنشطات للأنزيمات.

|  |  |
| --- | --- |
| العنصر | مصادرة وصور استخدامة |
| البورون Boron | يضاف البورون لبيئة زراعة الانسجة بكميات صغيرة من Boric acid وحمض البوريك BO3H3 |
| موليبدم Molybdenum | ويضاف Mo لبيئة الزراعة فى صورة  O2H422MoO2Na موليبدات صوديم Sodium molybdate |
| المنجنيز Manganese | يضاف فى صورة سلفات المنجنيز Mn SO4 |
| الكوبالت Co | يضاف لمعظم أنواع البيئات بكمية لا تتجاوز 25 من ا لف مليجرام للتر في صورة كلوريد الكوبالت CoCl2 |
| زنك Zn | يضاف فى صورة كبريتات الزنك Zn SO4 |
| نحاس Cu | يعتبر إضافة 25 من ا لف ملليجرام لكل لتر بيئة فى صورة كبريتات النحاس O2H45CuSOكافيا لإمداد الجزء النباتى المزروع من عنصر النحاس 7- كلور Cl يضاف فى صورة كلوريد الكالسيوم CaCl2 لمعظم أنواع البيئات |
| الكلور Cl | على صورة كلوريد الكالسيوم Ca 2 Cl |
| يود Iodine | يضاف للبيئة فى صورة أيوديد البوتاسيوم KI |

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زارعة الأنسجة وخاصة بيئة موارشيج وسكوج سنة 1662م بأنها أدخلت لتحسين كفاءة نمو النباتات معمليا. أما بالنسبة للعناصر الصغرى فأننا نجد أن هذه العناصر لا توجد مفردة أبدا في الطبيعة لذا فهي توجد أما في الصورة المركبة مثل (كبريتات النحاس وكبريتات والزنك وكبريتات المنجنيز) تمثل المجموعة الخامسة في بيئة موارشجي وسكوج-1662. او على الصورة المخلبية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على الصورة المخلبية كمصدر للحديد في البيئة وذلك لمنع ترسيبه بالبيئة ويتم إذابته في صوديوم أدتا.

ثانيا : الفيتامينات: - Vitamins

تعمل الفيتامينات كعامل مساعد في النظم الأنزيمية، وهي مطلوبة بكميات قليلة جدا ومن أكثرها شيوعا الثيامين وهو أكثر الفيتامينات استخداما في مزارع الأنسجة النباتية، ومنها أيضا حمض النيكوتين والبيرودكسين والكالسيوم بنتوثيانيت ومايوانستول والذي يستخدم عادة بتركيز 111 ملليجرام/لتر وهي مادة منظمة حيوية والفيتامينات تتأثر بالحرارة لذا ينصح بتعقيم الفيتامينات من خلال المرشحات ثم إضافتها بالماصة بعد تعقيم البيئة وهي دافئة.

ثالثا : الأحماض الأمينية :- Amino Acid

عادة لا يضاف الأحماض الأمينية للوسط الغذائي في مزارع الأنسجة إلا بعض الحالات الخاصة والتي تقتضي بذلك. وعادة ما يستخدم المشابه L بدلا من D باستثناء الجليسين. وكما يفضل استخدام مخلوط من النيتروجين العضوي كازين هيدرولي ازت وهو مخلوط من الأحماض الامينية مرتبطة بروابط ببتيدية وقد يحتاج أحياناً لإضافة حمض أميني معين لإحداث تأثير فسيولوجي مطلوب مثل حمض الميثونين والذي له دور مؤثر في تخليق الايثيلين وله تأثير منبه أيضا.

ومن أهم الأحماض الأمينية التي تستخدم في مزارع الأنسجة منها على سبيل المثال الارجنين واليوريا وجلوتامين والاسبارجين والامونيا. واستخدام خليط منهم قد يسبب حدوث تداخل بينهما مما يؤدى إلى تثبيط نمو النبيتات معمليا. والاتجاه الحديث حالياً في مزارع الأنسجة النباتية هو تحديد مكونات كل وسط غذائي مع استبعاد استخدام المستخلصات الطبيعية غير النقية مثل الببتون ومولت ومستخلص الخميرة.

رابعا: الكربوهيدرات Carbohydrates

كل كائن حي يحتاج إلى مصدر للطاقة وذلك لإتمام جميع العمليات الحيوية بداخل الكائن الحي، وعليه فإن كل وسط غذائي يحتاج إلى السكريات ً والسكروز هو أكثر السكريات استعمالا وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتونى يتكون من (جلوكوز+ فركتوز). وتأثيره فعال جداً على النمو بعكس بعض السكريات الأخرى مثل المالتوز واللاكتوز. والسكروز متحمل الحرارة العالية عن السكريات الأخرى ويستخدم عادة ما يستخدم بتركيز من 2-5 % في الوسيط الغذائي لكي يساعد على تطور ونمو الأجزاء النباتية في زارعة الأنسجة واتمام عملية البناء الضوئي والذي قد لا يكون كافياً لإتمام تلك العملية كالزارعة في إظلام تام وبالتالي لا يكون النبات الكلوروفيل وتكون الأوراق بيضاء اللون. وهذا بالإضافة إلى أن تركيز ثاني أكسيد الكربون في الأنابيب غير كافي للتمثيل الضوئي. وعلى ذلك فإضافة السكر يكون بديل لمصدر الكربون والقيام بعملية البناء الضوئي داخل أوعية الزارعة على الوجه الأكمل. ويمكن استخدام السكر الموجود في الأسواق المحلية داخل معامل زارعة الأنسجة النباتية. مع الأخذ في الاعتبار ترشيح السكر بعد إذابته للتخلص من الشوائب العالقة به.

خامسا: منظمات النمو النباتية Plant Growth Regulators

نمو النبات هو محصلة لنمو جميع خلاياه وأنسجته وأعضائه وبالتالي فأننا نجد أن هناك مواد عضوية تنتج بداخل النبات تعمل على تنظيم النمو والتطور بداخل النبات يطلق عليها الهرمونات الطبيعية. وهذه المواد العضوية تتكون بكميات صغيرة جداً فى أماكن معينة من النبات ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لأحداث تأثيرها الفسيولوجي. وتنقسم الهرمونات النباتية إلى ثلاثة مجاميع هي المنشطة والمثبطة والموقفة للنمو وسوف نتكلم عن هذه المجموعات باختصار.

1. موقفات النمو Growth Position

وتستخدم عادة في حالة الغرض الحفاظ على صنف معين أو سلالة معينة لفترة من الزمن من 6:12 شهر، ولا تزيد عن ذلك حتى لا يحدث تدهور في النبات ومن أشهر هذه المجموعة هرمون السيكوسيل( CCC).

1. مثبطات النمو Growth Inhibitors

وهذه الهرمونات تضاف على البيئة لتبطئ من نمو النبات وفيها تم جميع العمليات الحيوية ولكن ببطء شديد والهدف منها تأخير النبات لفترة محددة حتى يتمكن من المرور بالظروف الغير ملائمة لنموه. حيث نلاحظ ذلك في الطبيعة عند تعرض النباتات لبعض الإجهاد أو الجفاف حيث ينتقل حمض الابسيسك (ABA) إلى الأوراق ويقوم بغلق الثغور لتقليل من عملية النتح بداخل النبات وبعد مرور هذه الظروف الغير الملائمة يرجع مرة أخرى إلى مكانه وبالتالي تعمل الثغور كما كانت في الظروف العادية المناسبة لنموه. أما في زارعة الأنسجة فقد يستخدم فى حالة تأخير خروج النبات لمرحلة الأقلمة لمدة لا تزيد عن ثلاثة أشهر بهدف بيعه فى الأسواق بسعر مناسب وهذا له علاقة بالعرض والطلب ومستلزمات السوق.

1. منشطات النمو Growth Activated

بوجه عام من الضروري إضافة عنصر أو أكثر من هذه المركبات لكي تساعد على النمو، فنحصل على نمو جيد للجزء النباتي المنزرع معملياً ويختلف الهرمون المضاف على حسب نوع النباتي ومرحلة نموه ونوع الجزء النباتي المستخدم فى الزارعة. وتنقسم إلى ثلاثة أقسام رئيسية هي:

1. الاوكسينات : Auxins

مثل: IAA, NAA, IBA, NOA, 2,4-D and 2,4,5-T

وهي مركبات تماثل في عملها تأثير الطبيعي فى النبات، حيث تعمل على استطالة النبات وتكوين الب ارعم وانفصال الأوارق عن النبات وانقسام الخلايا وانتحاء النبات والسيادة القمية وتساعد على تجذير النبيتات معملياً. ويعتبر NAA, IBA هما الأكثر استخداما فى عملية التجذير عن IAA لأنهم أكثر ثباتاً منه وأقل تأثير بالحرارة والضوء. كما يعتبرT & 2,4-D -5,4,2 الأكثر استعمالاً فى نمو الكالس وتكون الأجنة العرضية. وفى بعض الأحيان قد يقوم D-4,2 بوظيفة كلا من الاوكسينات والسيتوكينينات معاً كمصدر بديل لهم بالنبات.

1. السيتوكينينات : Cytokinins

مثــــــــــــــــــل BA, Kin, 2iP and Zin

وهي تعرف بهرمونات الاستطالة وانقسام الخلايا، حيث أن لها دورين أساسين في عملية الإكثار هي انقسام الخلايا وخارج البراعم. وقد يستخدم جوز الهند كبديل للسيتوكينينات في البيئة وبصفة عامة فقد وجد أن النسبة العالية للسيتوكين / الاوكسين تشجيع من انقسام الخلايا وتكوين النموات الخضرية، أما النسبة المنخفضة منها تشجع على تكوين الجذور. مع العلم بأن السيتوكينينات لا تقوم بتكوين الجذور على النبات منفردة بدون الاوكسينات. تذوب السيتوكينينات عند تحضيرها بالمعمل في حمص الهيدروكلوريك HCL (1عيارى) حيث يتم ذلك بوزن 1,1 جم من السيتوكينين المراد تحضيره ثم إذابته في HCL ثم استكماله إلى 111 ملى ماء مقطر، وبالتالي يكون قد تمت تحضيره بنسبة (1 هرمون: 1 ماء). أما بالنسبة الاوكسينات والجبريلينات فيتم تحضيرها بالمعمل بوزن 1,1 جم من الاوكسين المراد تحضيره ثم إذابته فى هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم KOH & NaOH (1عيارى) ثم استكماله إلى 111 ملى ماء مقطر، وبالتالي يكون قد تمت تحضيره بنسبة ( 1 هرمون : 1 ماء مقطر).

1. الجبريللينات Gibberelins (GA3)

وهو أكثر الجبريللينات شيوعاً حيث أن منه أكثر من 52 نوع. الجبريللين يشجع على نمو تكوين الجذور ونمو الأجنة، بالإضافة إلى أنه يكون عامل مساعد مع الاوكسينات وكذلك مع السيتوكينينات، وقد لا يكون مطلوب بصفته أساسيته. ويفضل استخدامه مع النباتات ذات النهار الطويل حيث يقوم بتعويضها عن ذلك معمليا. ومن هنا نلاحظ أهمية منظمات النمو فى التشكيل للنباتات الناتجة بزارعة الأنسجة. ومن العوامل المهمة أيضاً هي القواعد النيتروجينية مثل كبريتات الادنين.

وترجع أهمية كبريتات الادنين (4Adenine sulfate- AdSO) فى النقاط التالية:

1. يساعد على النمو.
2. يرفع معدل إكثار الب ارعم الابطية.
3. له تأثير مشابه لتأثير السيتوكينين.
4. له تأثير إيجابي على زيادة المساحة الورقية.
5. يشجع على تكوين الأفرع العرضية فى وجود السيتوكينينات.

ونلاحظ من الدراسات السابقة أهمية لبعض النباتات وعادة ما يستخدم بتركيز من 41-01 ملجم/لتر. وعلى الرغم من أن هناك نباتات أخرى لا تحتاج إلى إضافة بصفة مستمرة.

سادساً: الإضافات الأخرى:

1. الأجار Agre

مادة كربوهيدراتية عديدة تضاف للبيئة لإعطائها الصلابة بتركيز 6,1-1% ونحصل عليها من الطحالب البحرية. وله سببين أساسيين لاستخدام في البيئة هما الأول: خموله من الناحية الحيوية والثانية: سهولة إذابته عند التسخين وتصلبة عند درجة حرارة الغرفة. الآجار يتركب من وحدات من سكر اللاكتوز ويدخل فى استر مع الكبريتات، وهو سكر عديد غير متجانس يتكون من الاجروز والاجروبكتين.

1. الفحم النشط Activated charcoal

يستخدم الفحم النشط في مزارع الأنسجة النباتية لعدة أسباب منها:-

* امتصاص المواد المثبطة للنمو والتي تنتج بواسطة النسيج المنزرع من البيئة المغذية.
* امتصاص منظمات النمو مثل حيث أن هذه المواد لها قابلية عالية فى الارتباط بالفحم النشط.
* تحول البيئة المغذية من اللون الأبيض الشفاف إلى اللون الأسود كالتربة فى الطبيعة مما يساعد على تكوين الجذور. ذات قابلية عالية بالارتباط بالمواد الفينولية التي تنتج من الأنسجة المنزرعة.

1. درجة الحموضة: - pH

يعرف pH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهي الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج ال pH من صفر حتى 14 درجة وتكون نقطة التعادل عنpH = 7 أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي، أما الأعلى من ذلك فيكون الوسط قلوي (7-14). وال pH ضروري جد اً لتسهيل أيونات المعادن في البيئة وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالبا ما تكون حامضية إلى متعادلة حتى يكون جميع العناصر الغذائية في الصورة الميسرة لها تمكن النبات من الاستفادة منه دون حدوث أي ضرر عليه.

ويتم تقدير الـــ pH بطريقتين هما: -

1. جهاز pH meter

الذي يقيس تركيز أيون الهيدروجين عن طريق الألكترود، حيث أن هذا الإلكترود يكون حساس جد اً لأي تركيز من أيون الهيدروجين. ويتم وضعه في محلول قياس منظم لضبط درجة الحموضة للجهاز أولاً قبل قياس حموضة البيئة الغذائية ويتم ضبط درجة الحرارة للوسط الغذائي قبل ضبط ال pH لها مباشرة. ويتم ضبط الـ pH للوسط الغذائي باستخدام أي مادة قلوية مثل NaOH أو KOH (0.1 عياري) أو بأي مادة حامضية مثل حمض الهيدروكلوريك HCL (0.1 عياري). ويتم ذلك قبل التسخين مباشرة أي قبل إضافة الآجار إلى الوسط الغذائي وبعد معايرة البيئة.

1. أوراق pH

يستخدم في المحاليل المائية والبيئات وذلك بغمس طرف الورقة في المحلول، ثم يقارن اللون الناتج مع الألوان القياسية الموجودة في الدليل حيث أن كل درجة لون يقابلها قيمة معنية من pH

تابع تجربة توضح تشكل البادرات النباتية في الانابيب

Demonstration of "in vitro" Morphogenesis and Totipotency of Seedling Explants

الاسبوع الثاني:

فحص محتويات الاطباق التي تم نميت البذور عليها وملاحظة البادرات من غير فتح الطبق. تكمل التجربة إذا تأكدنا من خلو الاطباق من أي نمو فطري او بكتيري. تنقل الجزء النباتي المستأصل المراد استزراعه الى اطباق تحتوي على بيئات مختلفة.

طريقة اعمل:

1. يتم صب البيئات المختارة في الانابيب بحيث تصب بكمية تسمح لنمو البادرة داخلها تقريبا يتم صب البيئة الى نص انبوبة الاختبار.
2. تدخل الى جهاز الاوتوكليف ليتم تعقيمها.
3. تعقم الاطباق والاسطح داخل الهود مرة أخرى بالايثانول 70%. مع ملاحظة لبس القفازات المعقمة او تعقيم الايدي كما في التجربة السابقة.
4. تنقل الاطباق والأدوات (الملاقط والمشارط) بعد التعقيم الى الهود (غرفة النقل)
5. يتم ازالة ما تبقى من الايثانول من على الاسطح بواسطة اسفنجة جافة او قطن معقم.
6. يرفع غطاء الطبق الموجود في البادرات التي تم انباتها قليلا ويأخذ جزء من قمة الجذر بواسطة المشرط والملقط وينقل الى سطح البيئة المعقمة في الانابيب مع ملاحظة رفع الجزء النباتي المستأصل (explant) من الجهة المعاكس للقمة المرستيمية حتى لا تتعرض للضرر بواسطة الملقط.
7. يتم عمل نفس الطريقة للجزء النباتي المستأصل من المجموع الخضري ونقله الى أنبوب اخر.
8. ترجع الادوات الى الايثانول 70 %
9. توضع الانابيب على حامل خشبي ويتم غلقها لمنع التلوث.
10. تلاحظ الانابيب أسبوعيا وتسجل الملاحظات على الشكل الخارجي ولون الأوراق وقدرة النبات على التشكل وطول الساق وعدد التفرعات.
11. وملاحظة الاطباق يجب ان يشمل درجة الحرارة وجودة الإضاءة ,مدة التجربة وكثافة النمو.

جدول ملاحظة انابيب الزراعة:

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | المجموع الخضري | | المجموع الجذري | |
| البيئة المستخدمة | 1 | 2 | 1 | 2 |
| تغير في الطول |  |  |  |  |
| عدد التفرعات |  |  |  |  |
| القدرة على التشكل |  |  |  |  |
| اللون |  |  |  |  |