

مقرر الانسجة النباتية (العملي) 472 نبت

أ. هلا الربيعة أ. العنود الفغم

محتويات المقرر

- المعمل الاول: مقدمة
- المعمل الثاني : اعداد و تعقيم البيئة المغذية
- المعمل الثالث : تجربة توضح تشكل البادرات النباتية في الانابيب (الجزء الاول) + مكونات البيئة الزراعية
- المعمل الرابع : تابع تجربة توضح تشكل البادرات النباتية في الانابيب
- المعمل الخامس والسادس : تأثير الهرمونات على نمو الانسجة النباتية في بيئة زراعة الانسجة
- المعمل السابع : زراعة الانسجة النباتية (تجربة تشكل الكالوس من النسيج النباتي)
- المعمل الثامن : فوائد زراعة الانسجة

المعمل الاول

مقدمة

تقنية زراعة الأنسجة النباتية مهمة واساسية لكثير من البحوث الاكاديمية وكثير من الجوانب التطبيقية لعلوم النبات. في السابق، تم استخدام تقنية زراعة الأنسجة النباتية في الابحاث الاكاديمية الخاصة بملاحظة انتشار وانتاج الهرمونات في الاعضاء النباتية. ولكنه حاليا لم يقتصر على هذا النوع من الابحاث بل أصبح من التقنيات المهمة في الهندسة الوراثية وبحث الاحياء الجزيئية وتتبع الجينات. وكذلك التطبيقات الزراعية مثل انتاج نسخ متماثلة من نباتات معدلة وراثيا. وهكذا، كانت تقنيات زراعة الأنسجة ولا تزال بارزه في المجالات الأكاديمية والتطبيقية لعلوم النبات.

متطلبات معمل زراعة الانسجة:

1. الترتيبات العامة

تخصيص مكان معلوم وثابت في المعمل لأجراء تجارب زراعة الانسجة لا يستخدم لغيره من التجارب المختلفة. ترتيب جميع ما تحتاجه التجربة من اجهزه وتسهيلات بشكل متجاور او بشكل خط (مثل، اعداد وسائل ارشادية تختص بالنظافة، توفير مكان مخصص لغسل الأواني الزجاجية، واجهزة التعقيم، المجاهر، والادوات الخاص بنقل العينات المعقمة) وذلك لتسهيل جميع العمليات وتعزيز النظافة.

2. الزجاجيات:

تخصيص أواني زجاجية لا تستخدم لغير تجارب زراعة الانسجة. غسل الأواني الزجاجية بالمنظفات داخل المختبر ثم تشطف عدة مرات بماء الصنبور والشطف الاخير يكون بالماء النقي. 3. اجهزة تقنية المياه.

يجب استخدام المياه عالية النقاوة في إجراءات زراعة الأنسجة مثل المياه المقطرة او المياه منزوعة الايونات. يجب عدم تخزين المياه تفاديا لاحتمال تلوثها، ولكن يجب استخدامها على الفور. الصيانة الدورية ورصد معدات تنقية المياه ضرورية.

4. الانسجة النباتية المراد اكثارها.

النباتات المستخدمة في زراعة الأنسجة تحتاج إلى أن تكون في صحة جيدة وبنشاط متزايد. اما النباتات المعرضة لاجهاد وخاصة لاجهاد المائي فلا يفضل استخدامها في زراعة الانسجة. وافضل النباتات المستخدمة هي تلك الخالية من الامراض واصابات الحشرات النامية في البيوت المحمية (الصوبة) حيث

انها اسرع في التعقيم. البذور التي يمكن بسهولة تعقيم اسطحها هي ايضا مناسبة لزراعة الانسجة وكذلك زراعتها لاحقا في الصوبة لتجارب اخرى.

5. اجهزة التعقيم

جوهر تقنية زراعة الانسجة هو ارتفاع مستوى التعقيم وابعاد غزو الكائنات الدقيقة خلال الإجراءات التجريبية. إذا كانت الأنسجة المعقمة المتوفرة، ويتم ذلك باستخدام ادوات معقمة وتوفير ظروف التعقيم خلال مرحلة نقل العينات الزراعية لتجنب التلوث الداخلي. حيث يجب تعقيم البيئات والاجهزه والادوات المستخدمة في البدايه في جهاز التعقيم الاوتوكليف عند (121 C) 15Ibs/inch^2 لمدة 15 دقيقة. استخدام الادوات البلاستيكية التي تستخدم لمره واحدة من شأنه ان يقلل من التلوث. ويمكن إجراء النقل تحت ظروف التعقيم المستخدمة في معامل التلقيح البكتيري مثل التلبيب الكحولي للاوت. ويجب تعقيم الاسطح او المكان المراد العمل به بواسطة احد المعقمات الشائعة مثل ايثيل الكحول و / أو chlorox.

المعمل الثاني اعداد و تعقيم البيئة المغذية

نظرا لاحتواء الوسط المغذي على معظم العناصر الغذائية اللازمة لنمو الكائنات الدقيقة كالبكتريا والفطريات والخمائر وغيرها. فإن عملية التعقيم للوسط المغذي قبل زراعة الجزء النباتي عليه ضروري جدا للحفاظ عليه من هذه الملوثات التي تنافسه على الغذاء وتفرز مواد سامة تؤدي إلى موته وهلاكه.

وهناك عدة طرق لتعقيم الوسط المغذي هي :-

Autoclaving

(1) التعقيم بالبخر :-

وهو أكثر الطرق استعمالا في معامل زراعة الأنسجة وأسهل في الاستعمال حيث يتم ذلك عن طريق جهاز يسمى بالأوتوكلاف (حلقة التعقيم) حيث يتم وضع الوسط المغذي في أوعية ثم وضعه في الجهاز على درجة حرارة 121°م وضغط جوي 1,5 كجم/سم² = 1,5 رطل/بوصة المربعة ولمدة 20 دقيقة وقد تصل إلى نصف ساعة على حسب الكمية المراد تعقيمها. مما يسمح بالقضاء على معظم الملوثات. وفي نفس الوقت لا تسمح بتعريض الوسط المغذي بما يحتويه من مكونات حساسة لدرجة الحرارة العالية إلى الفقد أو التكسير بكميات كبيرة.

ومن مميزات التعقيم بالبخر :-

السرعة- البساطة- القضاء على الملوثات خاصة الفيروسات .

أما عيوبه فهي :-

- يمكن أن يحدث تغير في حموضة الوسط المغذي .

- تكسير بعض المكونات خاصة الحساسة للحرارة كالفيتامينات والهرمونات النباتية والمضادات الحيوية والأنزيمات .

- السكروز: حيث ينكسر إلى وحدتين من السكر الأحادي فركتوز وجلوكوز. وزيادة التعقيم يؤدي إلى كرملة السكر وتكوين مواد سامة للنسيج النباتي (مادة الفورفورال).
- المستخلصات النباتية : تفقد نشاطها .
- الجبريلك : أكثر من 90 % منه يحدث له فقد في قدرته على التفاعل .

(2) التعقيم البارد : Cold sterilization

هناك بعض المركبات التي تتأثر بالحرارة العالية مثل الجبريللين والزياتين وحمض الالبسيسك وبعض منظمات النمو الأخرى التي لا يمكن تعقيمها في الأتوكلاف. لذا يتم تعقيمها أولاً في المرشحات الغشائية ذات قطر 0,22 – 0,45 ميكرون، ثم أضافتها على البيئة الصلبة بعد تسخينها وتعقيمها عندما تكون على درجة حرارة من 37 - 40°م، أما في البيئة السائلة يتم إضافتها بعد أن تصل إلى درجة حرارة الغرفة.

مميزات هذه الطريقة:-

الحفاظ على المواد التي تتأثر بالحرارة العالية دون حدوث أي تغير بها.

أما عيوب هذه الطريقة:-

أدمصاص المواد على الفلتر- مرور بعض جزئيات الفيروسات من الفلتر- تحتاج هذه الطريقة إلى وقت طويل وليس ببساطة التعقيم في الأتوكلاف.

(3) التعقيم الإشعاعي :- Radio sterilization

يمكن استخدام بعض الإشعاعات في تعقيم الوسط الغذائي بالرغم من خطورته ولا ينصح باستخدام ألا في أضيق الحدود، حيث أنها تؤدي إلى تكسير العديد من الأحماض العضوية والفيتامينات وتؤدي إلى تكوين مواد مساحية في الوسط الغذائي نتيجة لتكسير السكر والأحماض الأمينية. وهذا بالإضافة إلى تكلفتها العالية مثل أشعة جاما تستخدم في تعقيم البيئات والأوعية

البلاستيكية والأنابيب الخ، أما على كابينة الزراعة (الهود) فيستخدم لمبة الأشعة فوق بنفسجية (UV) وذلك للقضاء على أي كائنات حية داخل هذا المكان ويتم تشغيلها قبل الزراعة بأكثر من ساعة ولمدة لا تزيد عن 10ق.

الشروط الواجب إتباعها في تحضير وحفظ البيئات :-

- 1- تحضر البيئة المغذية من أنقى أنواع الكيماويات.
- 2- تعقيم الأدوات المستخدمة لتجنب الملوثة.
- 3- حفظ بعض المحاليل كالحديد في زجاجيات بنية اللون منعا لتحليلها .
- 4- تحضير الهرمونات النباتية والفيتامينات وأملاح المعادن الصغرى وحفظها في الثلاجة ويعمل بها عند وضعها على البيئة المغذية.
- 5- التأكد من درجة حموضة البيئة لأهميته في نجاح نمو البيئات على البيئة المغذية.
- 6- استخدام ميزان حساس 4 أرقام عشرية لتمكن من وزن المعادن ذات الأوزان الصغيرة جدا.
- 7- يراعى استخدام بلاستيك ناعم أو كأس زجاجي للوزن فيه وعدم استخدام أوراق حتى تكون ملساء ويتم نقل الوزن بالكامل.
- 8- يضع الباحث أمامه سجل مدون فيه مكونات البيئة المطلوب تحضيرها بالكميات المطلوبة كل مركب على حدا.
- 9- يتم تحضير الهرمونات والفيتامينات بكميات قليلة لا تتعدى 200 ملي حتى لا يحدث لها فقد أو تكسير أو قد تتعرض لأحد الملوثات فتفقد الكمية كلها.
- 10- يستخدم الماء المقطر في البيئة المغذية من الماء العذب.
- 11- حفظ المحاليل في الثلاجة على درجة حرارة 4°م.

- 12- كمية الأجار في البيئة الصلبة تتراوح ما بين 0.6 - 1 % ، أما الجيل رايت لا يتعدى 0.2 % في الوسط المغذي.
- 13- لا توجد بيئة واحدة صالحة لكل أنواع الاستعمال في مزارع الأنسجة .
- 14- أي مادة جديدة مستخدمة لأبد من اختبارها حتى تثبتها واستعمالها .
- 15- جميع البيئات لابد أن تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى بنسب ثابتة .
- 16- الاوكسينات تشجع على النمو والتحذير أما السيتوكينينات تعمل على النمو وتكوين البراعم.
- 17- البيئات الزراعية التجارية تعتبر المناسبة في أغلب الأحيان لتفادي الخطأ التجريبي .

الخطوات المتبعة لزراعة الخلايا و الأنسجة النباتية

أولاً: إختيار الجزء النباتي:

1- إختيار نبات الأم Selective of mother plants

يجب أن يكون نبات الأم في حالة صحية جيدة وفي بداية نشاطه وذو صفات جيدة خالية من الأمراض خاصة الأمراض الفيرسية ويجب أن يكون قد خرج من طور الراحة إذا كان له طور راحة مثل الدرنات والأبصال.

2- إختيار الجزء الذي يزرع Selective of an explant

الأجزاء التي تستخدم هي القمم النامية للسيقان والجذور وأجزاء الزهرة وأجزاء من الثمار والبتلات والبذور وحبوب اللقاح والمتوك والمبيض والأجنة ونسيج النيوسيلا والإندوسبرم والفلقات والقشرة والنخاع والكمبيوم وهي الأجزاء المحتوية على مرستيمات أو أنسجة قابلة للتحويل إلى الحالة المرستيمية ولكل نبات نسيج غالبا ما يكون أكثر ملائمة من غيره. وهناك عدة إعتبرات من الواجب النظر إليها قبل إختيار الجزء الذي سيزرع وهي:

أ - الجزء النباتي المستخدم Explant

ويقصد به المنفصل النباتي (قمة نامية-قمة مرستيمية-جزء من الساق-جزء من الورقة-المتك.. الخ).

Age of Explant

ب - عمر المنفصل النباتي

عادة يفضل استخدام المنفصل النباتي صغير السن وفي بعض الأحيان يفضل إجراء عملية التطويع لتكوين نموات حديثة أكثر نشاطا عند زراعتها ويمكن كذلك الحصول على النموات الحديثة القوية بإجراء عمليات التطعيم (الأصل الصغير بالطعم من النبات الكبير) وكذلك معاملة النباتات بالجبريلين وفي بعض الأحيان يستخدم مركبات السيتوكاينين حيث يشجع ذلك على تكوين النموات الحديثة.

Size of Explant

ج - حجم المنفصل النباتي

لقد وجد أنه كلما زاد حجم المنفصل النباتي كانت نسبة النمو أعلى في معظم الحالات وكذلك يكون معدل التضاعف أعلى ولكن يعاب على هذه الطريقة أن نسبة التلوث تكون عالية وكذلك زيادة الإصابة الفيروسية - بينما في بعض الحالات يفضل أن يكون حجم المنفصل النباتي صغير حتى يكون خالي من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسية وقليل التلوث. وقد وجد El-Shobaky (1991) - أن طول المرستيم (0.1-0.25 مم) أدت إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروس من نباتات مصابة من البطاطس.

Season of Explant

د - موسم الحصول على المنفصل النباتي

تكون الأعضاء النامية أكثر نشاطا في بداية موسم النمو (فصل الربيع) عن بقية فصول السنة.

هـ - نوعية وجودة مصدر النبات Quality of the Explant Source

يجب أن يكون مطابقا للأصل تماما وفي حالة نمو جيدة وخالي من الأمراض.

ثانيا: عملية التعقيم و الزراعة للجزء النباتي:

تعقيم الجزء المستعمل Sterilization of the Explant

بعد الحصول على الجزء النباتى من مصدره الأمهات تجرى عليه عملية التعقيم كالآتى:

(1) يغسل الجزء النباتى المستعمل تحت تيار من ماء الحنفية لمدة ساعة أو أكثر وهذه تقلل من نسب التلوث إلي درجة كبيرة وإذا كان السطح الخارجى مغطى بطبقة شمعية فإن غسيل الجزء المنفصل بإحدى مساحيق الغسيل يساعد على جعل السطح الخارجى أكثر قابلية للبلل.

(2) يوضع في كحول إيثانول 70% لمدة نصف إلي واحد دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر.

(3) يوضع في هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوروكس) 20% لمدة 10-30 دقيقة مع الرج والتقليب المستمر.

(4) يغسل بالماء المقطر المعقم 4-5 مرات للتخلص من آثار المادة المعقمة وبعدها يصبح الجزء النباتى قابل للزراعة. الخطوات من 2 حتى 4 تجرى داخل الهود.

Culture of the explant

زراعة الجزء المستعمل على سطح البيئة

يتم زراعة النسيج المستعمل بعد تعقيمه على سطح البيئة المعقمة المحضرة سابقا باستخدام أدوات معقمة وهذه الزراعة تتم داخل هود معقم وهذا في حالة البيئة الصلبة أما اذا كانت البيئة سائلة فيوضع الجزء النباتى المستخدم على ركاب منغمس في البيئة ويسمى (قنطرة) وهي من ورق الترشيح الذى يتشرب المحاليل وينقلها إلي الجزء المنزرع. ويفضل أن تكون البيئة المستخدمة في المراحل الأولى صلبة وقد تكون سائلة في المراحل التالية.

Incubation of the cultures

- تحضين المزارع

ويتم تحضين المزارع في حضانة أو في غرفة نمو Growth Chamber التي تحتوى على ال Stands وهذه تحتوى على أرفف مضاءة توضع عليها المزارع والعوامل البيئية اللازم

توافرها عند زراعة الأنسجة وهي رطوبة مناسبة للمحافظة على الأنسجة من الجفاف ودرجة حرارة مناسبة وإحتياجات ضوئية مناسبة. الإحتياجات البيئية المطلوبة هي:

أ - الإحتياجات الضوئية **Light requirement** وتشتمل على:

1 - الكثافة الضوئية **Light intensity**

تحتاج الأنسجة النباتية التي تم زراعتها في أوعية تحتوى على بيئة مغذية إلى ضوء لمساعدتها على نشأة وتخليق الأعضاء Initiation فالضوء ينظم عمليات التشكل Morphogenetic processes فهو يساعد على تكوين مبادئ الجذور والسوق وتخليق الأجنة النيوسيلية والأجنة الخضرية العرضية من نسيج الكالوس ولعل صعوبة تكشف الأعضاء في بعض الزراعات الغير ناجحة يرجع إلى عدم تعرضها لشدة الإضاءة المناسبة وقد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج في شدة الإضاءة من 1000 إلى 3000 لوكس وهناك بعض المزارع تحتاج إلى 10000 لوكس. الكثافة الضوئية كانت مفيدة لإستطالة النباتات وزيادة عدد الأوراق وطول وعدد الجذور فى البطاطس (1991 El-Shobaky).

2 - الفترة الضوئية **Photoperiod**

تحتاج معظم المزارع إلى 16 ساعة إضاءة و 8 ساعات إظلام وهناك البعض يحتاج إلى 12 ساعة إضاءة ومثلها إظلام وفي حالة الحصول على الميكروتيوبرز من البطاطس فإنها قد تحتاج إلى ضوء خافت أو إلى إظلام تام.

ب - الإحتياجات الحرارية **Heat requirement**

في معظم الأحيان تكون درجة الحرارة 22 - 27°م هي أنسب درجة لنمو مزارعة الأنسجة بالنسبة لنباتات المناطق المعتدلة إلا أنه في النباتات الإستوائية ونباتات المناطق الحارة يكون تكشف الأعضاء بصورة أفضل في درجات حرارة تتراوح ما بين 27 - 35°م وقد وجد أن أفضل درجة حرارة للبراعم الخضرية على نبات الدخان كانت 18°م. درجة الحرارة 20- 25°م كانت مناسبة لزيادة عدد الأفرع والأوراق وطول وعدد الجذور لنباتات البطاطس النامية فى أوعية الزراعة (1991) El-Shobaky.

تجربة اعداد وتعقيم بيئة M.S لزراعة الانسجة النباتية

اسم البيئة المستخدمه في الزراعة :

بيئة MS : تستخدم لنمو المجموع الخذري والجذري .

خطوات اعداد البيئة :

- نوزن 4.43 جرام من بيئة MS.
- ندوبها في 1 لتر من الماء المقطر بواسطة جهاز التقليب.
- نضيف الهرمونات التالية :
- $\text{mL } 0.5 = 2.4-D$
- $\text{mL } 2.5 = \text{N.A.A}$
- $\text{mL } 0.5 = \text{Kientine}$
- نضيف 8 جرام من الآجار .
- نضيف 30 جرام من السكر (مصدر مغذي).
- نقيس PH (لابد أن يكون الرقم الهيدروجيني للبيئة = 5.8).
- توزع البيئة بعد ذلك في فلاسكات 500 مل ثم نغطيها بقطن وقصدير
- تعقم البيئة بوضعها في الأوتوكلاف .
- نصبها في أطباق بتري ونضعها بالثلاجة بعد ذلك إلى حين استخدامها في زراعة النسيجية.

المعمل الثالث

تجربة توضح تشكل البادرات النباتية في الانابيب (الجزء الاول) + مكونات البيئة الزراعية

بيئة الزراعة

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 (كربوهيدرات- 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 زراعة 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 الكشف والانقسام حتى نحصل على نموات خضرية أو جذرية أو الاستمرار حتى تحصل على نبات كامل وهنا يجب أن نتعرف على مقومات البيئة الزراعية 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

أولاً: العناصر الأساسية Basic Mineral Salts

وهي مجموعة من الأملاح غير العضوية، حيث يتطلب الوسط الغذائي لأنسجة النبات مصدر آر 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	تأثيره	مصادره وصور استخدامه
النيتروجين N	يؤثر على معدل نمو النبات وضروري لتكوين الكلوروفيل والقلويدات والاحماض النووية nuclic acids وهرمونات النمو والاحماض الامينية amino acids.	الامونيوم NH_4 والنترات NO_3
الفسفور P	يتركز في الأجزاء المرستيمية وله دور في تنشيط الانزيمات وانقسام الخلايا.	فوسفات البوتاسيوم KH_2PO_4 ، فوسفات الصوديوم $(NaH_2PO_4)_4$
البوتاسيوم K	ضروري للانقسام الطبيعي للخلية وتكوين الكربوهيدرات	على هيئة نترات بوتاسيوم KNO_3 أو فوسفات بوتاسيوم

والبروتينات. KH_2PO_4 . ونادرا مايستعمل كلوريد البوتاسيوم KCl		
سلفات SO_4	يوجد في بعض جزيئات البروتين. يشجع نمو المجموع الخضري والمجموع الجذري.	<u>الكبريت S</u>
يضاف في البيئة في صورة كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ أو في صورة نترات الكالسيوم $Ca(NO_3)_2$	يلعب دور في نفاذية الجدار الخلوية ويسهل حركة الكربوهيدرات والاحماض الامينية خلال النبات ويشجع نمو الجذور.	<u>الكالسيوم Ca</u>
يضاف إلى البيئة في صورة كبريتات الماغنسيوم $MgSO_4$	يعتبر العنصر الرئيسي في جزئ الكلوروفيل هام جدا كمنشط إنزيمي. نقصه يسبب شحوب الأوراق.	<u>الماغنسيوم Mg</u>
ستخدم على هيئة كبريتات الحديدوز $FeSO_4$ وبعد ان يتم خلطة بأملاح الصوديوم وذلك يجعل الحديد اكثر صلاحية للنبات. ethylene-diamine tetraacetic acid (EDTA)	يدخل في تخليق الكلوروفيل ويشارك في عملية التمثيل الضوئي والتنفس. نقصه يسبب ضرر وشحوب في الأوراق.	<u>الحديد Fe</u>

• العناصر الصغرى: -

وهي العناصر التي يحتاج النبات إليها بكميات صغيرة جداً، بحيث لا تزيد عن بضع ملليجرامات ويطلق عليها أيضاً أ 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 BO_3H_3
مولبيدم Molybdenum	ويضاف Mo لبيئة الزراعة في صورة $O_2H_422MoO_2Na$ مولبيدات صوديوم Sodium molybdate
المنجنيز Manganese	يضاف في صورة سلفات المنجنيز $Mn SO_4$
الكوبالت Co	يضاف لمعظم أنواع البيئات بكمية لا تتجاوز 25 من ألف مليجرام للتر في صورة كلوريد الكوبالت $CoCl_2$
زنك Zn	يضاف في صورة كبريتات الزنك $Zn SO_4$
نحاس Cu	يعتبر إضافة 25 من ألف مليجرام لكل لتر بيئة في صورة كبريتات النحاس O_2H_45CuSO كافياً لإمداد الجزء النباتي

المزروع من عنصر النحاس 7- كلور Cl يضاف فى صورة كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ لمعظم أنواع البيئات	
على صورة كلوريد الكالسيوم $Ca_2 Cl$	الكلور Cl
يضاف للبيئة فى صورة أيوديد البوتاسيوم KI	يود Iodine

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زراعة 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 موارشيج وسكوج-1662. او على الصورة المخيلية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على الصورة المخيلية 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 بنتوثانيت 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 بيتيدية وقد يحتاج أحيانا 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 الارجرين واليورينا وجلوتامين والاسبارجين والامونيا. واستخدام خليط منهم قد يسبب حدوث تداخل بينهما مما يؤدي إلى

تشيط نمو النبيتات معملها. والاتجاه الحداث حالها فمزارع الأنسجة النباتية هو تحديق مكونات كل وسط غذائي مع استبعاد استخدام المستخلصات الطبعية غير النقية مثل الببتون ومولت ومستخلص الخميرة.

رابعاً: 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 استعمالاً وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتوني 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 زراعة الأنسجة وإتمام عملية البناء الضوئي والذي قد لا يكون كافياً لإتمام تلك العملية كالزراعة في إظلام تام وبالتالي لا يكون النبات الكلوروفيل وتكون الأوراق بيضاء اللون. وهذا بالإضافة إلى أن تركيز ثاني أكسيد الكربون في الأنابيب غير كافٍ للتمثيل الضوئي. وعلى ذلك فإضافة السكر يكون بديل لمصدر الكربون والقيام بعملية البناء الضوئي داخل أوعية الزراعة على الوجه الأكمل. ويمكن استخدام السكر الموجود في الأسواق المحلية داخل معامل زراعة الأنسجة النباتية. مع الأخذ في الاعتبار ترشيح السكر بعد إذابته للتخلص من الشوائب العالقة به.

خامساً: منظمات النمو النباتية Plant Growth Regulators

نمو النبات هو محصلة لنمو جميع خلاياه وأنسجته وأعضائه وبالتالي فإننا 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 في أماكن معينة من النبات ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لأحداث تأثيرها الفسيولوجي. وتنقسم الهرمونات النباتية إلى ثلاثة مجاميع هي المنشطة والمنشطة 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 السيكونيل (CCC).

2. 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 في حالة تأخير خروج النبات لمرحلة الأقامة لمدة لا تزيد عن ثلاثة أشهر بهدف بيعه في الأسواق بسعر مناسب وهذا له علاقة بالعرض والطلب ومستلزمات السوق.

3. 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 في 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 في النبات، حيث تعمل على استطالة النبات وتكوين الب ا ر ع م وانفصال الأوراق عن النبات وانقسام الخلايا وانتحاء النبات والسيادة القمية وتساعد على تجذير النبيتات معملياً. ويعتبر NAA, IBA هما الأكثر استخداماً في عملية التجذير عن IAA لأنهم أكثر ثباتاً منه وأقل تأثير بالحرارة والضوء. كما يعتبر 2,4-D & 2,4,5-T الأكثر استعمالاً في نمو الكالس وتكون الأجنة العرضية. وفي بعض الأحيان قد يقوم 2,4-D بوظيفة كلا من الاوكسينات والسيتوكينينات معاً كمصدر بديل لهم بالنبات.

2. السيتوكينينات : Cytokinins

مثل BA, Kin, 2iP and Zin

وهي تعرف بهرمونات الاستطالة وانقسام الخلايا، حيث أن لها دورين أساسيين 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 تشجع من انقسام الخلايا وتكوين النموات

الخشيرية، 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 (1 عيارى) حيث يتم ذلك بوزن 1،1 جم من السيتوكينين المراد تحضيره ثم إذابته في HCL ثم استكماله إلى 111 مللى 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 (1 عيارى) ثم استكماله إلى 111 مللى ماء مقطر، وبالتالي يكون قد تمت تحضيره بنسبة (1 هرمون : 1 ماء مقطر).

3. الجبريلينات (GA₃) Gibberelins

وهو أكثر الجبريلينات شيوعاً حيث أن منه أكثر من 52 نوع. الجبريلين 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 معملياً. 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 (Adenine sulfate- AdSO₄) 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 1،6-1% 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. الأجار يتركب من وحدات من سكر اللاكتوز ويدخل في استر مع الكبريتات، وهو سكر عديد غير متجانس يتكون من الاجروز والاجروبكتين.

2. الفحم النشط Activated charcoal

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

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

3. 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 عن $pH = 7$ أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي، أما الأعلى من ذلك فيكون الوسط قلوي (7-14). وال pH ضروري جداً لتسهيل أيونات المعادن في البيئة وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالباً 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 الـ pH بطريقتين هما:-

A. جهاز pH meter

الذي يقيس تركيز أيون الهيدروجين عن طريق الألكترود، حيث أن هذا الإلكترود يكون حساس جداً 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 (1.0)

عيارى) أو بأى مادة حامضية مثل حمض الهيدروكلوريك (HCL 1.0 عيارى). ويتم ذلك قبل التسخين مباشرة أى قبل إضافة الآجار إلى الوسط الغذائى وبعد معايرة البيئة.

B. أوراق pH

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

تابع تجربة توضح تشكل البادرات النباتية فى الانابيب

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

تجربة توضح تشكل النبات والاحتياجات الغذائية للأعضاء النباتية المختلفة مأخوذة اجنة البذور لبادرات حيث ان الجزء النباتى المستأصل (explant) من الجزء الخضرى ومن الجزء الجذرى سوف تنقل الى ثلاث بيئات مختلفة. اثناء نمو البذور فى الاطباق، فأنا يمكننا تجنب الجنين النامى الامراض الوراثية والصفات الغير مرغوب فيها الموروثة من الاباء وكذلك بسبب التعقيم الفائق لسطح البذور بواسطة هيبوكلورات الصوديوم سوف يجنبنا التلوث الخارجى فى اطباق النمو الموجودة فيها البيئات المعقمة ايضا ويتم ذلك من خلال خطوتين على مدى اسبوعين.

الخطوة الاولى: هي تنمية البذور فى اطباق بترى حتى تظهر الرويشة والجذر.

الخطوة الثانية: نقل جزء من الرويشة او الجذر الى انابيب تحتوى بيئة مناسبة لنمو.

طريقة العمل: Methods

الخطوة الاولى: Week 1

1. خارج الهود (Outside the laminar flow hood): توضع البذور المراد زراعتها فى طبق

بترى يحتوى على 7% من محلول هيبوكلورات الصوديوم وتترك لمدة 10-15 دقيقة للتعقيم.

2. الأعداد لعملية النقل:

• يتم غسل اليدين والساعدين بالصابون ثم يليها مسحهما ب 70% الكحول الإيثيلي

(ETOH) وممكن استبدال هذى الخطوة بلبس قفازات معقمة مسبقا.

- يعقم الهود المراد استخدامه لزراعة عن طريق مسح جوانب وأعلى الهود باستخدام 70% كحول إيثيلي.
 - يشغل الهود قبل البدء بعملية الزراعة لمدة 10-15 دقيقة لتوفير بيئة أكثر تعقيماً وعند ادخال اطباق البتري التي تحتوي على البذور المعقمة الى الهود يجب مسح اسطحها بالكحول.
 - يجب أن يوجد داخل الهود قبل البدا كلا من جار زجاجي ممكن يستخدم كحماية مهملات وكأس زجاجي (بيكر) يحتوي على إيثانول وموجود فيه الملاقط معقمة، ماء معقم ، اوراق ترشيح معقمة ذات حجم مناسب لحجم اطباق البتري المستخدمة سابقا و اطباق بتري معقمة.
3. داخل الهود (Inside the laminar flow hood): يتم مسح اسطح الهود بالماء المعقم مرتين لضمان التعقيم وباستخدام الملاقط المعقمة بالكحول يتم نقل أوراق الترشيح الى اطباق النمو ومن ثم نقل البذور الى تلك الاطباق وتغطى بالماء المعقم بمقدار 5-10 مل وتترك في الحضان عند درجة حرارة 25 مئوية وتنمى الاطباق تحت الضوء المستمر لمدة أسبوع.

OUTSIDE OF TRANSFER CHAMBER:**CHAMBER PREPARATION:**

Be certain that chamber has been aseptically cleaned prior to use. First, swab the floor and walls of chamber with 70% ethanol. Turn on + run Laminar hood for 10-15 minutes. Prior to the next aseptic transfers:

1. roll up sleeves
2. wash hands with soap
3. wipe external aspects of petri dish with 70% ethanol
4. wipe hands with 70% ethanol

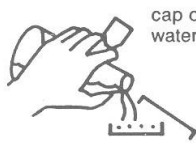
INSIDE TRANSFER CHAMBER:

Decant chlorox from seeds



(1)

Add sterile H₂O



(2)

cap of sterile water flask

Replace lid

Replace cap-H₂O. Swirl seeds 10 min.

H₂O

(3)

Decant H₂O off seeds



(4)

Add 2nd wash of sterile H₂O. Same as (2).

(5)



H₂O Swirl 10 min.

(6)

(Meanwhile, prepare a sterile seed germination chamber.)

Remove forceps from EtOH beaker; using forceps, remove 3-5 sheets of sterile paper from glass petri dish.

(7)



Replace lid

(8)

Place paper in sterile plastic petri dish



Replace lid

(9)

Decant H₂O off seeds as in (4)

(10)

Add 5-10ml sterile water to seeds as in (2).

(11)

Decant H₂O & seeds into germination chamber.



(12)

Label germination dish with name, date & seed type. Tape edges of dish to insure lid stays on.

(13)

مخطط يوضح الخطوات الاولى من زراعة الانسجة النباتية في انابيب الاختبار مأخوذ من بذور.

المعمل الرابع

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 أو بكتيري. تنقل الجزء النباتي المستأصل المراد استزراعها الى اطباق تحتوي على بيئات مختلفة.

طريقة العمل:

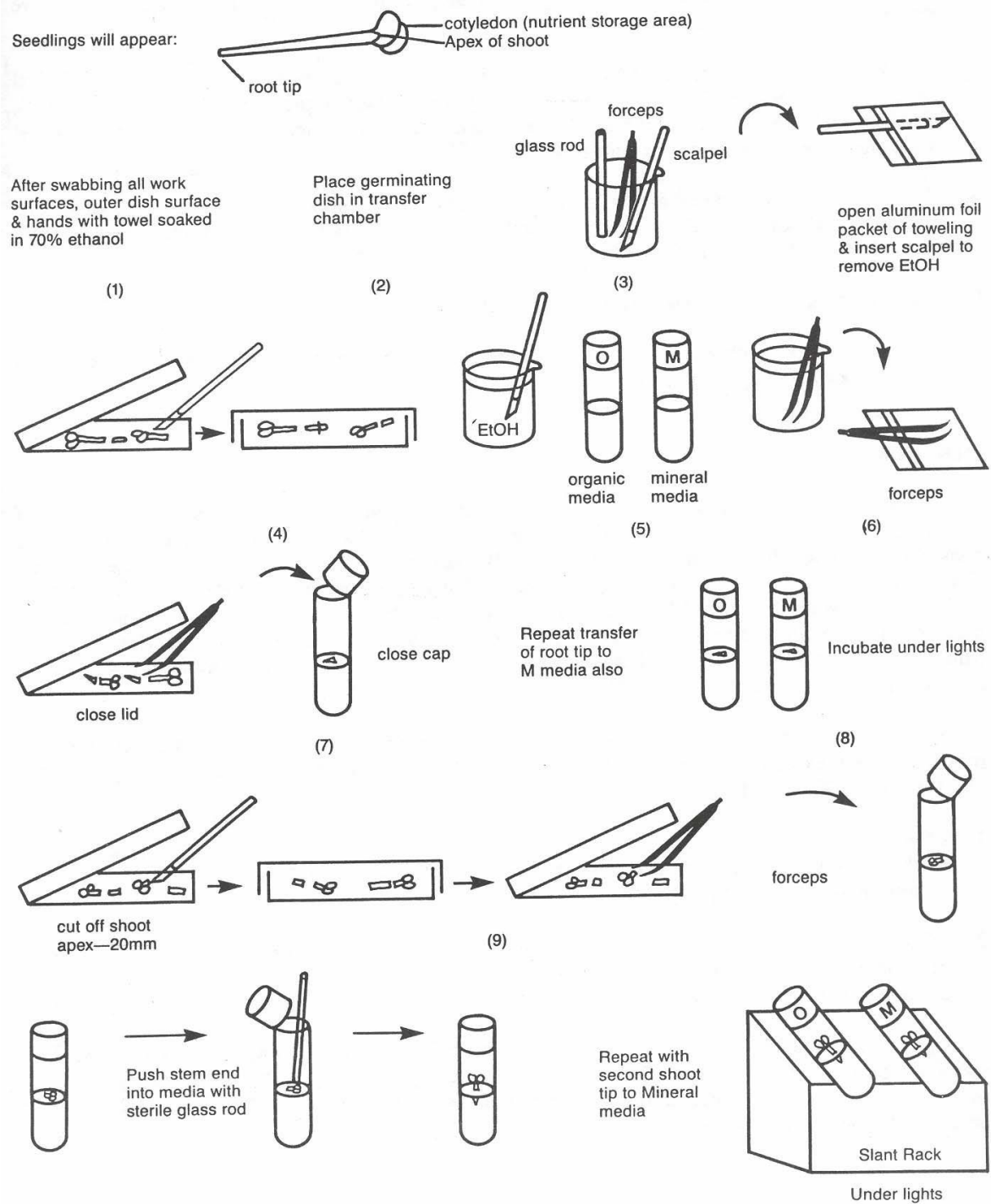
1. يتم صب البيئات المختارة في الانابيب بحيث تصب بكمية تسمح لنمو البادرة داخلها تقريبا يتم صب البيئة الى نص انبوبة الاختبار.
2. تدخل الى جهاز الاوتوكليف ليتم تعقيمها.
3. تعقم الاطباق والاسطح داخل الهود مرة أخرى بالايثانول 70%. مع ملاحظة لبس القفازات المعقمة أو تعقيم الايدي كما في التجربة السابقة.
4. تنقل الاطباق والأدوات (الملاقط والمشارط) بعد التعقيم الى الهود (غرفة النقل)
5. يتم ازالة ما تبقى من الايثانول من على الاسطح بواسطة اسفنجة جافة أو 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 التفريعات.

11. وملاحظة الاطباق يجب ان يشمل درجة الحرارة وجودة الإضاءة، مدة التجربة وكثافة النمو.

جدول ملاحظة انابيب الزراعة:

المجموع الجذري		المجموع الخضري		
2	1	2	1	البيئة المستخدمة
				تغير في الطول
				عدد التفريعات
				القدرة على التشكل
				اللون



المعمل الخامس والسادس

تأثير الهرمونات على نمو الانسجة النباتية في بيئة زراعة الانسجة

Effects of Hormone Balance on Explant Growth and Morphogenesis

مقدمة:

الهرمونات في كلا من الانسجة النباتية او الحيوانية ذات تأثير فعال بكميات ضئيلة في النسيج. ومن الهرمونات النباتية التي تستخدم في زراعة الانسجة هي السيتوكينينات والاكسينات (cytokinins and auxins).

السيتوكينينات مشتقة من الادنين وتؤثر في الخلايا النباتية الغير متميزة من خلال امرين هما تحفيز تخليق ال DNA وزيادة الانقسام. ومن ناحية أخرى فهو يسبب أيضا تأخير الاستجابة للانقسام في الخلايا الغير متميزة وذلك لغرض انتاج البراعم ومنها الاثمار والازهار (وذلك على حسب الموقع وكمية السيتوكينينات المضافة). ويوجد مركبين من السيتوكينينات المستخدمة في زراعة الانسجة الاكسينات الطبيعية مثل Zeatin والاكسينات الصناعية مثل Kintine وكلاهما له نفس التأثير والفعالية.

أوكسينات هي مركبات الإندول أو اشباه الإندول التي تحفز استطالة الخلايا وتحفز نمو الجذور العرضية. ويمكن استخدام المركبات الصناعية او الطبيعية من الاوكسينات مثل : الاكسينات الطبيعية Indoleacetic acid (IAA) ، والاكسينات الصناعية naphthaleneacetic acid (NAA) . تتميز الاكسينات الصناعية بأنها ليست حساس للإضاءة بخلاف نظيرتها الطبيعية التي تعتبر حساسة للضوء حيث يثبط عملها تحت الإضاءة العالية وأيضاً تتميز الاكسينات الصناعية بأن الانزيمات المضادة لها الموجودة في الانسجة النباتية لا تستطيع التعرف عليها فلا تثبط عملها.

الهرمونات النباتية لا تعمل في عزلة داخل جسم النبات ، ولكنها تعمل بتعاون مع بعضها البعض. لذلك يعتبر التوازن بين تراكيز هرمونات أكثر أهمية من التركيز المطلق من أي هرمون واحد . كلا من انقسام الخلايا و استطالتها يحدث نتيجة هذا التوازن. و بالتالي فإن التوازن بين تركيزات السيتوكينينات والاكسينات يلعب دورا في النمو الإجمالي للأنسجة النباتية .

فمن خلال التغير في تراكيز تلك الهرمونات في التجربة من شأنه ان يحدث تغيير ملحوظ في نمو الانسجة وتشكلها في البيئة الزراعية محل الدراسة.

تجربة تأثير الهرمونات على نمو الانسجة النباتية في بيئة زراعة الانسجة

Effects of Hormone Balance on Explant Growth and Morphogenesis

تتم التجربة على مرحلتين الأول مرحلة الانبات ومدتها أسبوع والمرحلة الثانية هي مرحلة نقل الاكسبلانت الى الاطباق المحتوية على التراكيز المختلفة للهرمونات ومدتها ايضا اسبوع.

الاسبوع الاول:

(مرحلة التعقيم والانبات)

الادوات:

اطباق بتري معقمة ، كحول ايثيلي 95% في بخاخ ، ملاقط، أوراق ترشيح ، ماء مقطر ومعقم 1 لتر، لهب ، قطن، بذور، ليبل، كلوركس 20% (200 مل).

طريقة العمل:

1. تعقيم البذور (بذور الخيار او الطاطم) لمدة 1 دقيقة مع 95 % ETOH .
2. عملية شطف في الماء المعقم
3. تعقيم في 25 % كلوركس لمدة 5 دقائق و يشطف ثلاث مرات مع الماء المعقم .
4. نقل 10 بذور بملقط المعقم الى طباق بتري تحتوي على اوراق ترشيح معقمة.
5. تحضن الاطباق المدة اسبوع (20-23 درجة مئوية) .

الاسبوع الثاني:

(مرحلة نقل الاكسبلانت الى الاطباق المحتوية على التراكيز المختلفة للهرمونات)

الادوات:

اطباق بتري تحتوي على بيئات ذات تراكيز هرمونية مختلفة معقمة(معدة مسبقا) ، كحول ايثيلي 95% في بخاخ ، ملاقط ، ماء مقطر ومعقم 1 لتر، لهب ، قطن، بذور، ليبل، كلوركس 20% (200 مل). اطباق المحتوية على البادرات التي نميت سابقا.

طريقة العمل:

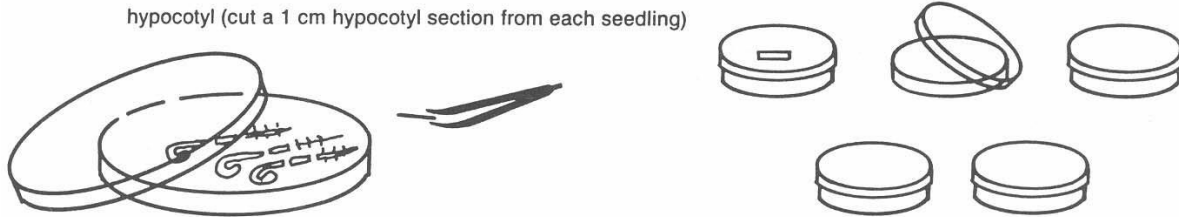
1. يجب ان تتم التجربة تحت ظروف التعقيم داخل الهود باستخدام الملاقط والمشارط المعقمة.

2. يتم اختيار الجزء النباتي المراد نقلة الى بيئتي النمو المحتوية على تراكيز مختلفة من الهرمونات (البيئة A ، البيئة B).

3. تغلق الاطباق وتحضن لمدة اسبوع ومن ثم ملاحظة اي البيئات كانت مناسبة لنمو الجزء النباتي المختار.



1. Remove lid of germination dish and cut explants from 5 seedlings as shown below. Cover the dish and replace the instrument in EtOH.



2. Remove the forceps from EtOH. Slip between sterile toweling to remove EtOH. Remove each excised hypocotyl from the germination dish to one of the 5 media plates. Slightly depress the hypocotyl into the media for adequate transfer of nutrients into the explant (piece of hypocotyl).

المعمل السابع:

زراعة الأنسجة النباتية (تجربة تشكل الكالوس من النسيج النباتي)

زراعة الأنسجة النباتية

زراعة البذور

زراعة حبوب اللقاح

زراعة نسيج الورقة

قبل البدء في تجربة انبات الكالوس من النسيج النباتي يجب توفير جميع احتياطات التعقيم ومن أهمها تعقيم العينة النباتية المراد اخذ النسيج منها.

بالنسبة للأوراق : أول ما يطلع الكالوس ننقلها إلى بيئة MS
أما بالنسبة للبذور : أول ما يطلع الجذير والرويشة ننقلها إلى بيئة MS

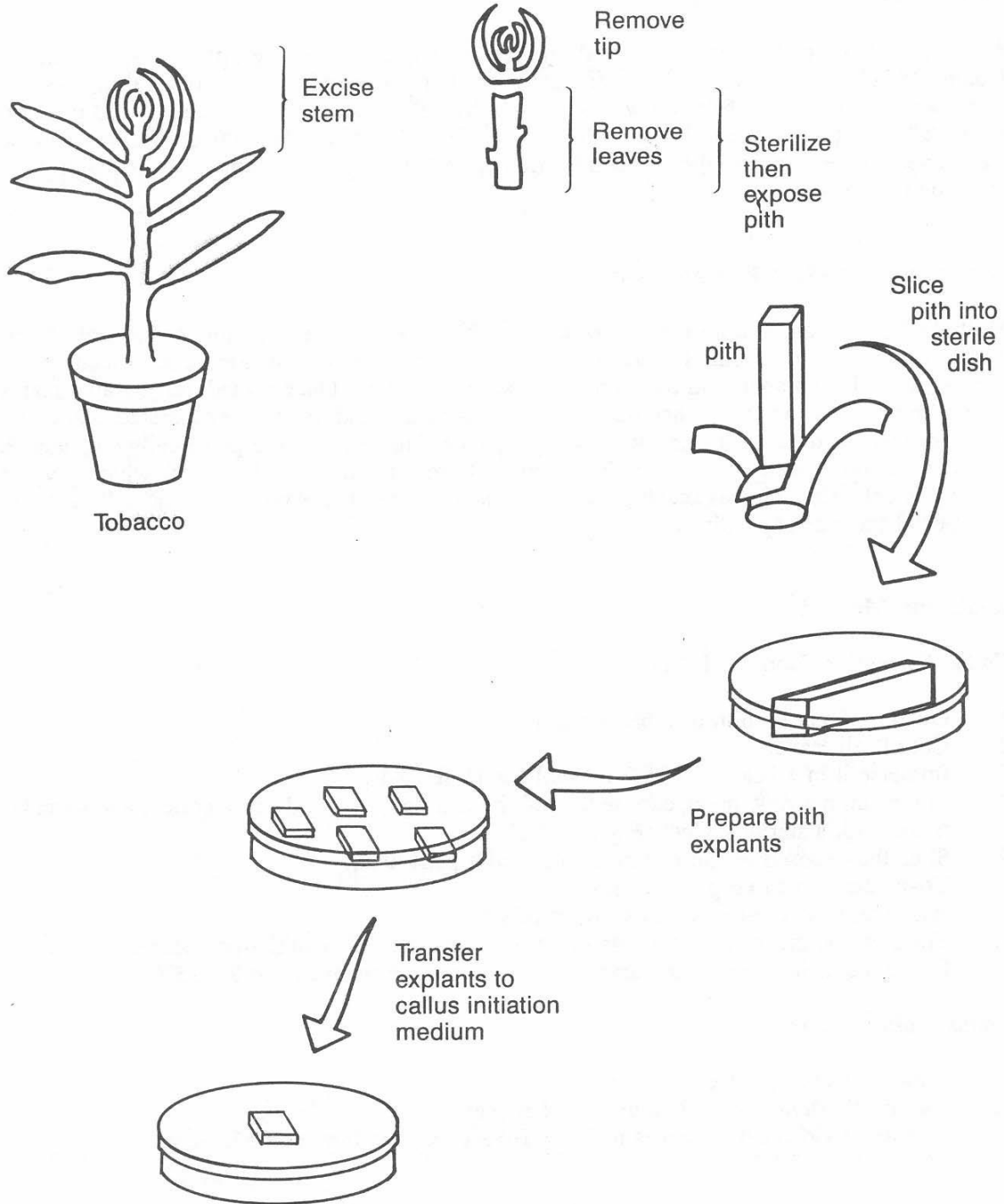
خطوات العمل:

(يجب مراعاة ظروف التعقيم أثناء عملية الزراعة)

1. غسل العينة النباتية المستخدمة بالزراعة بالماء الجاري.
2. تلف العينة النباتية بشاش معقم.
3. نضعها في كحول 70% لمدة دقيقة .
4. نضعها في هيبوكلوريد الصوديوم (كلوركس) 20% لمدة 10 - 30 دقيقة.
5. نغسلها بماء مقطر ومعقم 3 مرات .

6. نقطع الساق بواسطة مشرط معقم وذلك بأزالة الأوراق والانسجة الوعائية والغلاف الخارجي واخذ النخاع وننقله في طبق بتري المحتوي على البيئة بواسطة ملقط معقم (في 4 أركان من الطبق). ثم نحضن الأطباق في مكان معقم ونظيف.

كما هو موضح في الرسم التوضيحي التالي:



زراعة حبوب اللقاح

نبات الارز

- غسل العينة النباتية المستخدمة للزراعة بالماء الجاري.
- تلف العينة النباتية بشاش معقم.
- نضعها في كحول 70% لمدة دقيقة .
- نضعها في هيبوكلوريد الصوديوم (كلوركس) 20% لمدة 10 - 30 دقيقة.
- نغسلها بماء مقطر ومعقم 3 مرات .
- نقطع المتك عند الطرف بواسطة مقص معقم وننقلها في طبق بتري المحتوي على البيئة بواسطة ملقط معقم ويتم الطرق على حافة الطبق حتى تسقط حبوب اللقاح ثم توزع في 4 أركان الطبق.
- نحضن الأطباق في مكان معقم ونظيف.

المعمل الثامن

فوائد زراعة الأنسجة

فوائد زراعة الأنسجة

- إكثار النباتات التي يصعب إكثارها بالطرق المعتادة في وقت قصير.
 - تربية النباتات المرغوبة والحصول على طفرات أو هجن جديدة جيدة الصفات.
 - الحصول على سلالات خالية من الفيروس.
 - استخدام الهندسة الوراثية بصورة أكثر سهولة بإدخال أو نقل صفات جيدة مرغوبة كمادة الى نواة الخلية الأم.
 - إنتاج المواد العطرية والطبية النادرة بطريقة اقتصادية في المعمل.
- ولا تقتصر أهمية علم زراعة الأنسجة النباتية على هذا فقط بل تمتد إلى أنها تعتبر الوسيلة الفريدة التي لم تكن في متناول العلماء من قبل لدراسة فسيولوجيا النباتات والتطوير البيولوجي للكائن النباتي الحي من صور بسيطة إلى صور مركبة معقدة البناء ولكنها متوافقة الوظائف.
- وفي السنوات الأخيرة أنتشر استخدام زراعة الأنسجة تجاريا على نطاق واسع وأهم النباتات المستخدمة: الفراولة و الموز و التفاح من الفاكهة ، والبطاطس والبطاطا والباذنجان من الخضروات و اللافندر والنعناع من النباتات العطرية .**

شروط نجاح زراعة الأنسجة :

لكي تتم عملية زراعة الأنسجة بنجاح يجب أن تتوفر في المعمل عناصر ضرورية وأهم شرطين يجب توافرها : النظام والنظافة حتى يتم فصل الجزء المراد زراعته من النباتات الأم الى بقية الزراعة بطريقة سليمة وسريعة تحقق أقصى المراد زراعته من النباتات الميكروبي. وإلى جانب النظام والنظافة فمن الأهمية بمكان التأكد من نظافة الكيماويات المستعملة كذلك الماء المقطر المستخدم في تحضير البيئات.

مميزات استخدام طريقة زراعة الأنسجة :

تعتبر طريقة التكاثر بالوسائل والطرق التقليدية بطيئة لدرجة أنها لا تفي بالدرجة الكافية بالطلب المتزايد على التقاوي والشتلات مما يدفع الكثير من الدول الى استيراد هذه التقاوي والشتلات من الخارج.

هذا بالإضافة إلى أن بعض أنواع هذه الشتلات صعبة وبطيئة الإكثار وعلى هذا فقد أدى استخدام طريقة زراعة الأنسجة إلى إنتاج أعداد كبيرة جداً من تقاوي النباتات وفي مساحة محدودة بالمقارنة بالطرق التقليدية لإنتاج هذه النباتات مع الحفاظ على صفاتها الوراثية ومطابقتها لنباتات الأم.

إنتاج شتلات خالية من مسببات المرضية أهمها الفيروس: فمن المعروف أن بعض النباتات التي تتكاثر خضرياً مثل البطاطس والفراولة والموز والثوم وغيرها تصاب بالفيروسات العديدة التي تؤدي إلى ضعف النباتات و نقص الإنتاجية و رداءة التقاوي والشتلات وحيث أن هذه الإصابة تنتشر في جميع أجزاء النباتات فإن هذه الأمراض يمكن أن تنتقل عن طريق التكاثر بالطرق التقليدية باستخدام الدرنات أو الريزومات أو المدادات الأمر الذي يؤدي إلى تدهور التقاوي عاماً بعد عام و لكن باستخدام أسلوب زراعة الأنسجة يمكن إنتاج نباتات خالية من هذه المسببات المرضية سواء كانت مسببة لأمراض فطرية أو بكتيرية أو نيماتودية أو حتى فيروسية و بالتالي ينعكس ذلك على جودة و كفاءة التقاوي والشتلات الناتجة من زراعة الأنسجة .

فائدة استخدام الشتلات المنتجة عن طريق زراعة الأنسجة مقارنة بالإنتاج التقليدي

- 1- خلو الشتلات من الأمراض المختلفة وبذلك يمكن توفير الكيماويات التي يتم استخدامها في الرش لمقاومة الأمراض والآفات.
- 2- قوة الشتلة الناتجة من زراعة الأنسجة و تماثل النباتات.
- 3- زيادة الإنتاجية من الشتلات الناتجة عن زراعة الأنسجة من 10 - 20%.
- 4- يمكن الحصول عليها في الوقت الملائم للزراعة و بالكمية الكافية و بالسعر المناسب.

5- حيث إن الإكثار يتم فى المعامل فيمكن استغلال مساحة المشاتل فى زراعات أخرى فى تلك الفترة .

6- التخلص من الفيروسات

7- تسهيل نقل وتبادل النباتات عالمياً

8- الإكثار الخضري الواسع النطاق

9- إنتاج البذور الاصطناعية

10- الدراسات الفسيولوجية

11- انتاج منتجات صناعية ثانوية من عمليات الأيض

12- إنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية

13- الاختلافات الجسدية والانتخاب الخلوي للتحسين الوراثي

14- دمج البروتوبلاست (التهجين الجسدي Hybridization somatic)

15- الهندسة الوراثية (التحوير الوراثي)

16- الحفظ بالتجميد Cryopreservation