



جامعة الملك سعود

كلية العلوم

قسم النبات

علم زراعة الانسجة

٤٧٢ Bot

الجزء العملي

اعداد : هلاء الربيعه

المرجع : زراعة الانسجة النباتية - أ.د. فكري فهمي

## المعمل الاول

### زراعة الانسجة

يطلق مصطلح *Tissue culture* عندما يتم زراعة أى خلية أو نسيج أو حتى عضو نباتى داخل أوعية زجاجية محتوية على بيئة غذائية وتحت ظروف بيئية معقمة ومتحكم فيها. وتعتبر طرق زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء النباتية وسيلة جديدة وهامة لإكثار كثير من النباتات والتي أصبحت تطبق الآن فى كثير من المعامل التجارية فى الخارج والداخل.

وعندما تستخدم هذه الطرق لإكثار النباتات يعرف فى هذه الحالة بالإكثار الدقيق *Micropropagation*

### ما هو المقصود بزراعة الأنسجة النباتية ؟

يمكن تعريف زراعة الأنسجة بأنه علم يتألف من عدد من الطرق المختلفة لإنماء الأعضاء النباتية أو الأنسجة أو الخلايا على بيئات صناعية أمكن تركيب محتوياتها فى المعمل و يتم النمو فى ظروف متحكم فيها .

و قد شغل هذا العلم الجديد العديد من العلماء و الباحثين فى العالم خلال الثلاثين سنة الأخيرة و أجريت العديد من الأبحاث الأكاديمية كانت من نتيجتها زيادة الفهم عن كيفية تمييز و كشف و تكوين الأعضاء أو الأجزاء النباتية المفصولة والمنماة فى البيئات الصناعية و أدت أيضاً إلى ابتكار العديد من الطرق الحديثة فى هذا المجال و أمكن توجيه تلك الأبحاث الأكاديمية لخدمة النواحي التطبيقية فى سبيل تطوير الإنتاج الزراعي والتغلب على العديد من المشاكل التي تواجه إنتاج تقاوي المحاصيل الزراعية الاقتصادية الهامة.

### خطوات إنشاء معمل زراعة الأنسجة *Establishment of tissue culture lab*

#### تجهيز معمل زراعة الأنسجة: *Laboratory Organization*

#### 1- غرفة الاستقبال : *Reception room*

وهي غرفة بعد مدخل المعمل مباشرة، وتستخدم كإستراحة للعاملين بالمعمل ولإستقبال الضيوف وكذلك لإتمام الأعمال الإدارية الخاصة بالمعمل . ويحذر على غير العاملين المرور من تلك الغرفة والدخول للمعمل إلا

لغير العاملين به، أما بالنسبة للعاملين فيتم إستبدال الملابس وارتداء البلطو وواقي القدم ثم الدخول للمعمل، وتشمل هذه الغرفة على مكتب للإدارة ودولاب لحفظ الأوراق ومكان لاستقبال الضيوف وكذلك مكان مخصص لاستبدال الملابس به.

## **٢- غرفة البداية: Introduction room**

وهي حجرة يتم فيها إعداد الأجزاء النباتية المراد زراعتها من النباتات المراد إكثارها معمليا. حيث يتم إجراء عملية التعقيم الأولية عليها ويكون بها كبينة زراعة (هود) ودواليب زراعة بدون إضاءة لتحضين تلك الأجزاء بعد زراعتها على البيئة المخصصة لذلك في مدة لا تتجاوز الشهر،

## **٣- مكان الغسيل :- Washing area**

يجب احتواء المعمل على أحواض غسيل كبيرة لسهولة الغسيل ويفضل أن يكون مغطي بطبقة من الرصاص (لمقاومته للأحماض والقلويات) وبه مصدر دائم للماء العذب، ويستخدم الصابون السائل دائما في التخلص من الشوائب وقد يستخدم حمض الكبريتيك للتخلص من الشوائب الصعبة.

## **٤- غرفة تحضير البيئة المغذية :- Medium preparation room**

وهي غرفة يتم فيها تجهيز وإعداد البيئة المغذية المراد زراعة الجزء النباتي عليه. وتتكون حجرة البيئة من بنشات لتسهيل عملية إعداد البيئة وعلى أرفف ودواليب لتخزين الكيماويات والزجاجيات المستخدمة دائما.

## **٥- غرفة التحضين :- Incubation room**

وهي عبارة عن غرفة صغيرة الحجم بها دواليب بدون إضاءة، يتم تحضين البيئة بها بعد تجهيزها على درجة حرارة الغرفة لمدة من ٤-٧ أيام وذلك لتأكد من خلوها من الفطريات والبكتريا قبل الزراعة عليها مباشرة.

## **٦- غرفة الزراعة :- Culture room**

تعتبر هذه الغرفة أهم غرف معمل زراعة الأنسجة وأشدها تعقيما. وتتكون من :-

- ١- كبينة زراعة (هود) منها الفردي والزوجي، على حسب عدد العاملين عليه. ويكون الهواء الخارج من الهود أفقيا وليس رأسيا.
- ٢- ستائر هوائية عند الباب ذات ضغط أعلى من الضغط الخارجي بـ ½ أو ¼ بار لعدم السماح بمرور أي حشرة طائرة داخل الغرفة.
- ٣- (UV) لزيادة التعقيم وتستخدم فقط قبل الزراعة بأكثر من ساعة ولمدة ١٠ - ١٥ ق.
- ٤- فلتر لتغير الهواء الداخلي للغرفة مما يساعد على تقليل الميكروبات.
- ٥- دولا ب من الخشب لحفظ الأدوات المستخدمة في عملية الزراعة .
- ٦- Bacti-ceneretor لتعقيم أدوات الزراعة على الهود.
- ٧- المشارط والملاقيط ( أدوات التشريح ) مصنعه من الأستانلي استيل لمنع الصدا .
- ٨- علبة استانلي استيل لتعقيم أوراق التشريح بها.
- ٩- عربة متحركة لسهولة النقل والحركة بين غرفة الزراعة وغرفة النمو مصنعة من الاستانلي استيل يتم استخدامها في نقل البيئات والنباتات المنزرعة.
- ١٠- كراس متحركة للهود .
- ١١- تكييف بالغرفة لتسهيل عملية التنفس على العاملين بالزراعة.

## ٧- غرفة النمو Growth room :-

وهي عبارة عن دواليب للزراعة بها إضاءة (غالبا ما تكون ١٦ إضاءة/٨ أظلام) ويكون لها لوحة مفاتيح من الخارج، للتحكم في عدد ساعات الإضاءة وتشغيل التكييف والأجهزة التي بالداخل من الخارج دون الدخول وخصوصا عند تشغيل (UV).

وتحتوي على فلتر لتغيير الهواء الداخلي وستائر هوائية فقط ولا يفضل استخدام UV في غرفة النمو حيث يؤثر ذلك على النباتات المنزرعة به.

وغرفة النمو والزراعة لها ملابس خاصة بها غير التي تستخدم في حجرة تحضير البيئة. وهذه الملابس لا يتم الخروج بها من تلك الغرفة. وهذا بالإضافة إلى مكان مخصص لتخزين الكيماويات والزجاجيات والأدوات في مخزن خاص بالمعمل .

## المعمل الثاني

### مكونات بيئات زراعة الأنسجة

#### بيئة الزراعة Culture Medium

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- ليبيدات) وأيضا يكون الهرمونات والفيتامينات والأحماض النووية والإنزيمات، كما ينتج عن عمليات التمثيل الغذائي داخل النبات مجموعة من المركبات الثانوية الهامة جداً. 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 التكشف 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:-

١- العناصر الكبرى . Macro elements

٢- العناصر الصغرى . Micro elements

٣- الفيتامينات . Vitamins

٤- الأحماض الأمينية . Amino acid

٥- مصدر الطاقة أو الكربون . Carbohydrates

## ٦- 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 مصدراً دائماً 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 .

- النيتروجين (N) : يؤثر على معدل نمو النبات وضروري لتكوين الكلوروفيل والقلويدات والأحماض النووية nucleic acids وهرمونات النمو والأحماض الأمينية amino acids . مصادر النيتروجين لبيئة زراعة الأنسجة

الأمونيم (  $\text{NH}_4 +$  ) ، النترات  $\text{NO}_3^-$

٢- الفسفور (P) : ويتركز في الأجزاء المرستيمية إلا أن دوره غير معروف بالضبط ويرجح أن له دور في تنشيط الإنزيمات. يستخدم في بيئات زراعة الأنسجة في صورة فوسفات البوتاسيوم (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) أو فوسفاتالصوديوم (  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  )

٣- البوتاسيوم (K): ضرورى للإنقسام الطبيعى للخلية وتكوين الكربوهيدرات والبروتينات. يضاف فى البيئة على هيئة نترات بوتاسيوم  $KNO_3$  أو فوسفات بوتاسيوم  $KH_2PO_4$ . ونادرا مايستعمل كلوريد البوتاسيوم KCl

٤- الكبريت (S): يوجد فى بعض جزيئات البروتين. يشجع النمو الجذرى والخضرى. يضاف فى بيئة الزراعة فى صورة سلفات ( $SO_4=$ ).

٥- الكالسيوم (Ca): يلعب دور فى نفاذية الجدار الخولى ويسهل حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية خلال النبات كما أنه يشجع نمو الجذور. يضاف فى البيئة فى صورة كلوريد الكالسيوم  $CaCl_2$  أو فى صورة نترات الكالسيوم  $Ca(NO_3)_2$

٦- الماغنسيوم (Mg): يعتبر العنصر المركزى فى جزئ الكلوروفيل. هام جدا كمنشط إنزيمى. نقصه يسبب شحوب الأوراق. يضاف إلى البيئة فى صورة كبريتات الماغنسيوم  $Mg SO_4$

٧- الحديد (Fe): يدخل فى تخليق الكلوروفيل ويشارك فى عملية التمثيل الضوئى والتنفس. نقصه يسبب إصفرار وشحوب الأوراق. يستخدم فى بيئات زراعة الأنسجة النباتية على هيئة كبريتات حديدوز  $FeSO_4$  بعد أن يتم خلطها بأملاح الصوديوم لل  $ethylene-diamine tetraacetic acid$  (EDTA) والذى يجعل الحديد أكثر صلاحية للنبات.

#### العناصر الصغرى:-

وهي العناصر التي يحتاج النبات إليها بكميات صغيرة جداً، بحيث لا تزيد عن بضع ملليجرامات ويطلق

عليها أيضاً العناصر الأثرية وهي: الحديد- المنجنيز- الزنك- البورون- النحاس- الموليبدنيوم- اليود-

الأمنيوم- الكلور- وقد ثبت أن هذه العناصر تعمل كمنشطات للأنزيمات.

- البورون Boron يضاف البورون (B) لبيئة زراعة الأنسجة بكميات صغيرة من  $Boric acid$  حمض البوريك  $H_3BO_3$

٢- موليبدم Molybdenum ضرورى للنمو الطبيعى للنبات ويضاف (Mo) لبيئة الزراعة فى صورة Sodium molybdate موليبدات صوديوم  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

٣- المنجنيز Manganese يضاف فى صورة سلفات المنجنيز  $Mn SO_4$ ؛

٤- الكوبالت Co يضاف لمعظم أنواع البيئات بكمية لاتتجاوز ٢٥ من الألف مليجرام للتر فى صورة كلوريد الكوبالت  $CoCl_2$

٥- زنك Zn يضاف فى صورة كبريتات الزنك  $Zn SO_4$ ؛

٦- نحاس Cu يعتبر إضافة ٢٥ من الألف ملليجرام لكل لتر بيئة في صورة كبريتات النحاس  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  كافيا لإمداد الجزء النباتي المزروع من عنصر النحاس

٧- كلور Cl يضاف في صورة كلوريد الكالسيوم  $\text{CaCl}_2$  لمعظم أنواع البيئات

٨- يود Iodine يضاف للبيئة في صورة أيوديد البوتاسيوم (KI)

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة وخاصة بيئة موراشيج وسكوج سنة

١٩٦٢م بأنها أدخلت لتحسين كفاءة نمو النباتات معملياً.

أما بالنسبة للعناصر الصغرى فأنا نجد أن هذه العناصر لا توجد منفردة أبداً في الطبيعة لذا فهي توجد

أما في الصورة المركبة مثل كبريتات النحاس وكبريتات الزنك وكبريتات المنجنيز (تمثل المجموعة الخامسة

في بيئة موراشيج وسكوج-١٩٦٢). أو على الصورة المخلبية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على

الصورة المخلبية كمصدر للحديد في البيئة وذلك لمنع ترسيبه بالبيئة ويتم إذابته في صوديوم أدا (  $\text{Na}_2$

EDTA).

### ثانياً : الفيتامينات :- Vitamins

تعمل الفيتامينات كعامل مساعد في النظم الأنزيمية، وهي مطلوبة بكميات قليلة جداً ومن أكثرها شيوعاً

الثيامين وهو أكثر الفيتامينات استخداماً في مزارع الأنسجة النباتية، ومنها أيضاً حمض النيكوتين

والبيروكسين والكالسيوم بنتوثانين ومايوانستول والذي يستخدم عادة بتركيز ١٠٠ ملليجرام/لتر وهي مادة

منظمة حيوية والفيتامينات تتأثر بالحرارة لذا ينصح بتعقيم الفيتامينات من خلال المرشحات ثم إضافتها

بالماصة بعد تعقيم البيئة وهي دافئة.

### ثالثاً : 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 بإستثناء الجليسين. وكما يفضل استخدام مخلوط من النيتروجين العضوي كازين هيدروليزات وهو مخلوط من الأحماض الامينية مرتبطة بروابط ببتيدية 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 الارجنين واليورينا وجلوتامين والاسبارجين والامونيا. واستخدام خليط منهم قد يسبب حدوث تداخل بينهما مما يؤدي إلى تثبيط نمو النباتات 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.

## Carbohydrates

### رابعاً : المواد الكربوهيدراتية :-

كل كائن حي يحتاج إلى مصدر للطاقة وذلك لإتمام جميع العمليات الحيوية بداخل الكائن الحي، وعليه فإن كل وسط غذائي يحتاج إلى السكريات كمصدر للكربون والطاقة، 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 ٢-٥% 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 كافي للتمثيل الضوئي. وعلى ذلك فإضافة السكر يكون بديل لمصدر الكربون والقيام بعملية البناء الضوئي داخل أوعية الزراعة على الوجه الأكمل.

ويمكن استخدام السكر الموجود فى الأسواق المحلية داخل معامل زراعة الأنسجة النباتية. مع الأخذ فى الاعتبار ترشيح السكر بعد إذابته للتخلص من الشوائب العالقة به.

### **سأ : منظمات النمو النباتية :- Plant Growth Regulators**

نمو النبات هو محصلة لنمو جميع خلاياه وأنسجته وأعضائه وبالتالي فأنا 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 والمنشطة والموقفة للنمو وسوف نتكلم عن هذه المجموعات باختصار.

#### **١- موقوفات النمو :- Growth Position**

وتستخدم عادة فى حالة الغرض الحفظ على صنف معين أو سلالة معينة لفترة من الزمن من ٦:١٢ شهر، ولا تزيد عن ذلك حتى لا يحدث تدهور فى النبات ومن أشهر هذه المجموعة هرمون السيكونيل (CCC).

#### **٢- 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 فى الطبيعة عند تعرض النباتات لبعض الإجهاد أو الجفاف حيث ينتقل حمض الابسيسك (ABA) إلى الأوراق ويقوم بغلق الثغور لتقليل من عملية النتج بداخل النبات وبعد مرور هذه الظروف الغير الملائمة يرجع مرة أخرى إلى مكانه وبالتالي تعمل الثغور كما كانت فى الظروف العادية المناسبة لنموه.

أما فى زراعة الأنسجة فقد يستخدم فى حالة تأخير خروج النبات لمرحلة الأقامة لمدة لا تزيد عن ثلاثة أشهر بهدف بيعه فى الأسواق بسعر مناسب وهذا له علاقة بالعرض والطلب ومستلزمات السوق.

### **Growth Activated**

### **٣- منشطات النمو :-**

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 الزراعة. وتنقسم إلى ثلاثة أقسام رئيسية هي:

#### **أ) الاوكسينات : Auxins**

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

وهى مركبات تماثل فى عملها تأثير الطبيعي فى النبات، حيث تعمل على استطالة النبات وتكوين البراعم وانفصال الأوراق عن النبات وانقسام الخلايا وانتحاء النبات والسيادة القمية وتساعد على تجذير النبيتات معملياً.

ويعتبر NAA, IBA هما الأكثر استخداماً فى عملية التجذير عن IAA لأنهم أكثر ثباتاً منه وأقل تأثيراً بالحرارة والضوء. كما يعتبر 2,4-D & 2,4,5-T الأكثر استعمالاً فى نمو الكالس وتكون الأجنة العرضية. وفى بعض الأحيان قد يقوم 2,4-D بوظيفة كلا من الاوكسينات والسيتوكينينات معاً كمصدر بديل لهم بالنبات.

#### **ب) 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 وإخراج البراعم. وقد يستخدم جوز الهند كبديل للسيتوكينينات في البيئة وبصفة عامة فقد وجد أن النسبة العالية للسيتوكينين/الاوكسين تشجع من انقسام الخلايا وتكوين النموات الخضرية ، أما النسبة المنخفضة منها تشجع على تكوين الجذور. مع العلم بأن والسيتوكينينات لا تقوم بتكوين الجذور على النبات منفردة بدون الاوكسينات.

تذوب السيتوكينينات عند تحضيرها بالمعمل في حمص الهيدروكلوريك HCL (١ عيارى) حيث يتم ذلك بوزن ٠,١ جم من السيتوكينين المراد تحضيره ثم إذابته في HCL ثم استكماله إلى ١٠٠ مللى ماء مقطر، وبالتالي يكون قد تمت تحضيره بنسبة (١ هرمون : ١ ماء).

أما بالنسبة الاوكسينات والجبريلينات فيتم تحضيرها بالمعمل بوزن ٠,١ جم من الاوكسين المراد تحضيره ثم إذابته في هيدروكسيد الصوديوم أو هيدروكسيد البوتاسيوم KOH & NaOH (١ عيارى) ثم استكماله إلى ١٠٠ مللى ماء مقطر، وبالتالي يكون قد تمت تحضيره بنسبة (١ هرمون : ١ ماء مقطر).

### ج- الجبريلينات : Gibberelins (GA<sub>3</sub>)

وهو أكثر الجبريلينات شيوعاً حيث أن منه أكثر من ٥٢ 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 في التشكيل للنباتات الناتجة بزراعة الأنسجة . ومن العوامل

المهمة أيضاً هي القواعد النيتروجينية مثل كبريتات الادنين.

وترجع أهمية كبريتات الادنين (Adenine sulfate- AdSO<sub>4</sub>) في النقاط التالية:

- ١- يساعد على النمو .
  - ٢- يرفع معدل إكثار البراعم الابطية .
  - ٣- له تأثير مشابه لتأثير السيتوكينين .
  - ٤- له تأثير إيجابي على زيادة المساحة الورقية .
  - ٥- يشجع على تكوين الأفرع العرضية فى وجود السيتوكينينات .
- ونلاحظ من الدراسات السابقة أهمية لبعض النباتات وعادة ما يستخدم بتركيز من ٤٠-٨٠ ملجم/لتر . وعلى الرغم من أن هناك نباتات أخرى لا تحتاج إلى إضافة بصفة مستمرة.

#### سادساً: الإضافات الأخرى:

##### **Agar**

##### **١- الآجار :**

مادة كربوهيدراتية عديدة تضاف للبيئة لإعطائها الصلابة بتركيز ٠,٦-١% ونحصل عليها من الطحالب البحرية. وله سببين أساسيين لاستخدام فى البيئة هما الأول: خمولة 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، والاجروز هو المسئول عن صفة الجيل للآجار.

##### **٢- الفحم النشط : Activated charcoal**

- يستخدم الفحم النشط فى 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 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.

يعرف الـ pH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهي الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج الـ pH من صفر حتى ١٤ درجة وتكون نقطة التعادل عن pH = 7 أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي، أما الأعلى من ذلك فيكون الوسط قلوي (٧-١٤). والـ 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 :-**

#### **أ) جهاز pH-meter :-**

الذي يقيس تركيز أيون الهيدروجين عن طريق الألكترود، حيث أن هذا الألكترود 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 الـ 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.

وعموماً فإن الوسط الغذائي الصلب المضاف إليه الآجار يتم تسخينه يكون الـ pH له حوالي  $5.7 \pm 1$ ،

أما في الوسط المغذي السائل يكون الـ pH له حوالي  $5.1 \pm 1$ .

#### **ب) 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 .

### المعمل الثالث

#### اعداد بيئة زراعة الأنسجة النباتية

اسم البيئة المستخدمه في الزراعة :

بيئة MS : تستخدم لنمو المجموع الخذري والجذري .

#### خطوات اعداد البيئة :

- وزن ٤,٤٣ جرام من بيئة MS.
- نذوبها في ١ لتر من الماء المقطر بواسطة جهاز التقليب.
- نضيف الهرمونات التالية :
- $\text{mL } 0.5 = 2.4\text{-D}$
- $\text{mL } 2.5 = \text{N.A.A}$
- $\text{mL } 0.5 = \text{Kientine}$
- 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 ٥٠٠ 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 الرابع

#### تعقيم البيئة المغذية

نظرا لاحتواء الوسط المغذي على معظم العناصر الغذائية اللازمة لنمو الكائنات الدقيقة كالبكتيريا 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 :-**

### **(١) التعقيم بالبخار :- Autoclaving**

وهو أكثر الطرق استعمالا في معامل زراعة الأنسجة وأسهل في الاستعمال حيث يتم ذلك عن طريق جهاز يسمى بالأتوكلاف (حلقة التعقيم) حيث يتم وضع الوسط المغذي في أوعية ثم وضعه في الجهاز على درجة حرارة ١٢١ م وضغط جوي ١,٥ كجم/سم<sup>٢</sup> = ١,٥ رطل/بوصة المربعة ولمدة ٢٠ 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 بالبخار:-**

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 .
- السكر 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 ٩٠ % منه يحدث له فقد في قدرته على التفاعل .

### **(٢) التعقيم البارد : Cold sterilization**



هناك بعض المركبات التي تتأثر بالحرارة العالية مثل الجبريلين والزياتين وحمض الابسيسك وبعض منظمات النمو الأخرى التي لا يمكن تعقيمها في الأتوكلاف. لذا يتم تعقيمها أولاً في المرشحات الغشائية ذات قطر ٠,٢٢ - ٠,٤٥ ميكرون، ثم أضافتها على البيئة الصلبة بعد تسخينها وتعقيمها عندما تكون على درجة حرارة من ٣٧ - ٤٠ 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.

## **Radio sterilization**

## **(٣) التعقيم الإشعاعي :-**

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 مسامة في الوسط الغذائي نتيجة لتكسير السكر والأحماض الأمينية. وهذا بالإضافة إلى تكلفتها العالية مثل أشعة جاما تستخدم في تعقيم البينات والأوعية البلاستيكية والأنابيب ..... الخ، أما على كابينات 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 ١٠ ق.

### الشروط الواجب إتباعها في تحضير وحفظ البينات :-

- ١- تحضير البيئة المغذية من أنقى أنواع الكيماويات.
- ٢- تعقيم الأدوات المستخدمة لتجنب التلوث.
- ٣- حفظ بعض المحاليل كالحديد في زجاجيات بنية اللون منعا لتحليلها .
- ٤- تحضير الهرمونات النباتية والفيتامينات وأملاح المعادن الصغرى وحفظها في الثلاجة ويعمل بها عند وضعها على البيئة المغذية.

- ٥- التأكد من درجة حموضة البيئة لأهميته في نجاح نمو البيئات على البيئة المغذية.
- ٦- استخدام ميزان حساس ٤ أرقام عشرية لتمكن من وزن المعادن ذات الأوزان الصغيرة جدا.
- ٧- يراعي استخدام بلاستيك ناعم أو كأس زجاجي للوزن فيه وعدم استخدام أوراق حتى تكون ملساء ويتم نقل الوزن بالكامل.
- ٨- يضع الباحث أمامه سجل مدون فيه مكونات البيئة المطلوب تحضيرها بالكميات المطلوبة كل مركب على حدا.
- ٩- يتم تحضير الهرمونات والفيتامينات بكميات قليلة لا تتعدى ٢٠٠ ملي حتى لا يحدث لها فقد أو تكسير أو قد تتعرض لأحد الملوثات فتفقد الكمية كلها.
- ١٠- يستخدم الماء المقطر في البيئة المغذية من الماء العذب.
- ١١- حفظ المحاليل في الثلاجة على درجة حرارة ٤ م.
- ١٢- كمية الأجار في البيئة الصلبة تتراوح ما بين ٠,٦ - ١ % ، أما الجيل رايت لا يتعدى ٠,٢ % في الوسط المغذي.
- ١٣- لا توجد بيئة واحدة صالحة لكل أنواع الاستعمال في مزارع الأنسجة .
- ١٤- أي مادة جديدة مستخدمة لابد من اختبارها حتى تثبتتها واستعمالها .
- ١٥- جميع البيئات لابد أن تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى بنسب ثابتة .
- ١٦- الاوكسينات تشجع على النمو والتحذير أما السيتوكينينات تعمل على النمو وتكوين البراعم.
- ١٧- البيئات الزراعية التجارية تعتبر المناسبة في أغلب الأحيان لتفادي الخطأ التجريبي .

### **الخطوات المتبعة لزراعة الخلايا و الأنسجة النباتية**

#### **أولاً: إختيار الجزء النباتي:**

#### **١-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 الفيروسية ويجب أن يكون قد خرج من طور الراحة إذا كان له طور راحة مثل الدرنات والأبصال.

## ٢- إختيار الجزء الذى 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 النيويسيلة 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 اعتبارات من الواجب النظر إليها قبل إختيار الجزء الذى سيزرع وهي:

### أ - الجزء النباتى المستخدم Explant

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

### ب - عمر المنفصل النباتى Age of Explant

عادة يفضل إستخدام المنفصل النباتى صغير السن وفي بعض الأحيان يفضل إجراء عملية التطوئش 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.

### ج - حجم المنفصل النباتى Size of Explant

لقد وجد أنه كلما زاد حجم المنفصل النباتى 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 النباتى صغير حتى يكون خالي من الأمراض وخاصة الأمراض الفيروسية وقليل التلوث. وقد وجد El-Shobaky (١٩٩١) - أن طول المرستيم (٠,١-٠,٢٥ مم) أدت إلى إنتاج نباتات خالية من الفيروس من نباتات مصابة من البطاطس.

### د - موسم الحصول على المنفصل النباتى Season of Explant

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 النباتى:

### تعقيم الجزء المستعمل Sterilization of the Explant

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

- (١) يغسل الجزء النباتي 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.
- (٢) يوضع في كحول إيثانول ٧٠% لمدة نصف إلي واحد دقيقة ثم يغسل بالماء المقطر.
- (٣) يوضع في هيبوكلوريت الصوديوم (الكلوروكس) ٢٠% لمدة ١٠-٣٠ دقيقة مع الرج والتقليب المستمر.
- (٤) يغسل بالماء المقطر المعقم ٤-٥ مرات للتخلص من آثار المادة المعقمة وبعدها يصبح الجزء النباتى قابل للزراعة. الخطوات من ٢ حتى ٤ تجرى داخل الهود.

### زراعة الجزء المستعمل على سطح البيئة Culture of the explant

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 منعكس 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.

### - تحضين المزارع Incubation of the cultures

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:

#### ١ - الكثافة الضوئية Light intensity

تحتاج الأنسجة النباتية التي تم زراعتها في أوعية تحتوى على بيئة مغذية إلي 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 إلي عدم تعرضها لشدة الإضاءة المناسبة وقد لوحظ أن زراعة الأنسجة يلزمها التدرج في شدة الإضاءة من ١٠٠٠ إلي ٣٠٠٠ لوكس وهناك بعض المزارع تحتاج إلي ١٠٠٠٠ لوكس. الكثافة الضوئية كانت مفيدة لإستطالة النباتات وزيادة عدد الأوراق وطول وعدد الجذور فى البطاطس (El-Shobaky ١٩٩١).

#### ٢ - الفترة الضوئية Photoperiod

تحتاج معظم المزارع إلى ١٦ ساعة إضاءة و ٨ ساعات إظلام وهناك البعض يحتاج إلى ١٢ ساعة إضاءة ومثلها إظلام وفي حالة الحصول على الميكروتيوبرز من البطاطس فإنها قد تحتاج إلى ضوء خافت أو إلى إظلام تام.

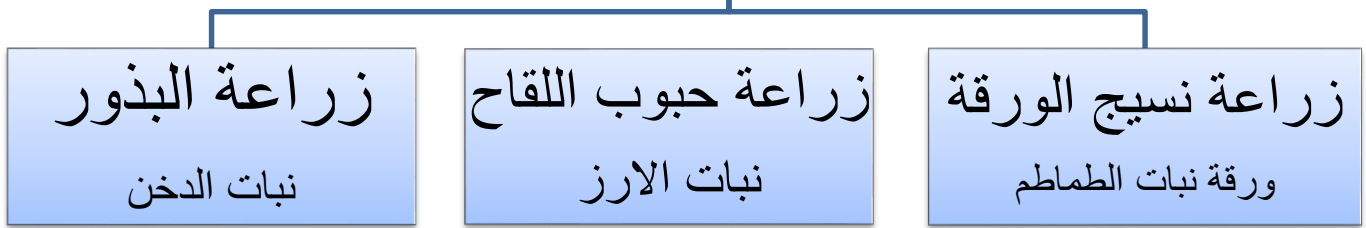
### Heat requirement

### ب - الإحتياجات الحرارية

في معظم الأحيان تكون درجة الحرارة ٢٢ - ٢٧°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 ٢٧ - ٣٥°م وقد وجد أن أفضل درجة حرارة للبراعم الخضرية على نبات الدخان كانت ١٨°م. درجة الحرارة ٢٠-٢٥°م كانت مناسبة لزيادة عدد الأفرع والأوراق وطول وعدد الجذور لنباتات البطاطس النامية في أوعية الزراعة El-Shobaky (١٩٩١).

### المعمل الخامس + السادس

## زراعة الأنسجة النباتية



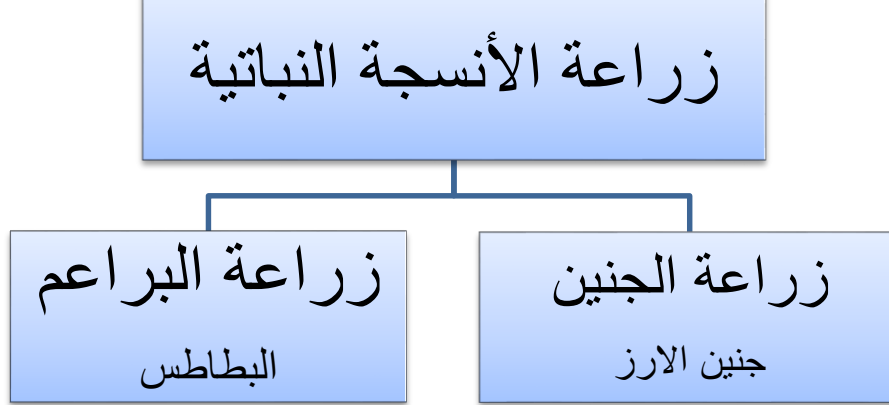
### خطوات العمل:

( يجب مراعاة ظروف التعقيم أثناء عملية الزراعة )

- 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 ١٠ - 30 دقيقة.
- نغسلها بماء مقطر ومعقم 3 مرات .
- نقطع الجزء النباتي إلى أجزاء صغيرة بواسطة مشرط معقم وننقلها في طبق بتري المحتوي على البيئة بواسطة ملقط معقم ( في ٤ أركان من الطبق ).

- نحضن الأطباق في مكان معقم ونظيف.

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 )

- غسل العينة النباتية المستخدمة بالزراعة 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 البرعم بواسطة مشرط معقم وننقلها في طبق بتري المحتوي على البيئة بواسطة ملقط معقم ( في ٤ أركان من الطبق ) .
- اما الجنين يتم قطع الجزء المحتوي على الجنين بواسطة مشرط معقم وننقلها في طبق بتري المحتوي على البيئة بواسطة ملقط معقم ( في ٤ أركان من الطبق ) .
- نحضن الأطباق في مكان معقم ونظيف.

### 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 ٤ أركان الطبق.
- نحضن الأطباق في مكان معقم ونظيف.

### المعمل السابع

#### فوائد زراعة الانسجة

- 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.

وفى 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 :

لكى تتم عملية زراعة الأنسجة بنجاح يجب أن تتوفر فى 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 فى 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 وفى مساحة محدودة بالمقارنة بالطرق التقليدية لإنتاج هذه النباتات مع

الحفاظ على صفاتها الوراثية ومطابقتها لنباتات الأم.

إنتاج شتلات خالية من المسببات المرضية أهمها الفيروس: فمن المعروف أن بعض النباتات التي تتكاثر خضريا مثل

البطاطس والفراولة والموز والثوم وغيرها تصاب بالفيروسات العديدة التي تؤدي إلى ضعف النباتات و نقص الإنتاجية و

ردائة التقاوي والشتلات وحيث أن هذه الإصابة تنتشر فى جميع أجزاء النباتات فإن هذه الأمراض يمكن أن تنتقل عن طريق

التكاثر بالطرق التقليدية باستخدام الدرنات أو الريزومات أو المدادات الأمر الذى 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 بالتالى ينعكس ذلك على جودة و كفاءة التقاوي والشتلات الناتجة من زراعة الأنسجة .

### فائدة استخدام الشتلات المنتجة عن طريق زراعة الأنسجة مقارنة بالإنتاج التقليدى

- ١ - خلو الشتلات من الأمراض المختلفة وبذلك يمكن توفير الكيماويات التى يتم استخدامها فى الرش لمقاومة الأمراض والآفات.
- ٢ - قوة الشتلة الناتجة من زراعة الأنسجة و تماثل النباتات.
- ٣ - زيادة الإنتاجية من الشتلات الناتجة عن زراعة الأنسجة من ١٠ - ٢٠ %.
- ٤ - يمكن الحصول عليها فى الوقت الملائم للزراعة و بالكمية الكافية و بالسعر المناسب.
- ٥ - حيث إن الإكثار يتم فى المعامل فيمكن استغلال مساحة المشاتل فى زراعات أخرى فى تلك الفترة .
- ٦ - التخلص من الفيروسات
- ٧ - تسهيل نقل وتبادل النباتات عالمياً
- ٨ - الإكثار الخضري الواسع النطاق
- ٩ - إنتاج البذور الاصطناعية
- ١٠ - الدراسات الفسيولوجية
- ١١ - إنتاج منتجات صناعية ثانوية من عمليات الأيض
- ١٢ - إنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية

١٣- الاختلافات الجسدية والانتخاب الخلوي للتحسين الوراثي

١٤- دمج البروتوبلاست (التهجين الجسدي Hybridization somatic)

١٥- الهندسة الوراثية (التحوير الوراثي)

١٦- الحفظ بالتجميد Cryopreservation

## المعمل الثامن

### طرق الإكثار الدقيق

#### لعل أهم وأبسط طرق الإكثار الدقيق :

١- زراعة المرستيم Meristem-tip culture

٢- زراعة البرعم الطرفي Shoot-tip culture

٣- زراعة البرعم الجانبي Axillary (lateral) bud culture

٤- زراعة العقدة Single node culture

### مراحل إكثار النباتات بطريقة زراعة الأنسجة:

المرحلة الأولى: إعداد الجزء المستخدم في التكاثر وزراعته في بيئة معقمة

**المرحلة الثانية:** مرحلة التضاعف

**المرحلة الثالثة:** مرحلة التجذير

**المرحلة الرابعة:** مرحلة الأقلمة والنقل للبيئة الخارجية

**المرحلة الأولى:**

تعتبر هذه المرحلة من أهم مراحل زراعة الأنسجة حيث يتم فيها فصل النسيج النباتي تحت ظروف التعقيم وزراعته في بيئة صناعية ثم حفظه في حضانات تحت درجة حرارة ورطوبة وإضاءة معينة في المعمل .

**المرحلة الثانية:**

الهدف منها زيادة إعداد النباتات في المعمل حيث تنقل النباتات النامية إلى بيئة أخرى ذات تركيب كيميائي معين لتشجيع تكوين فروع جديدة للنباتات ويتم تكرار هذه العملية حتى نحصل على الأعداد المطلوبة من النباتات.

**المرحلة الثالث:**

إعادة زراعة النباتات و نقلها من المعمل إلى الصوب لإعادة أقليمتها في التربة حيث تستخرج النباتات من الأنابيب ثم تزرع في إصيصات صغيرة تحتوى على رمل وتربة زراعية مع تغطيتها بالبلاستيك الشفاف للحفاظ على الرطوبة ثم يزال هذا الغطاء تدريجيا .

**المرحلة الرابعة :**

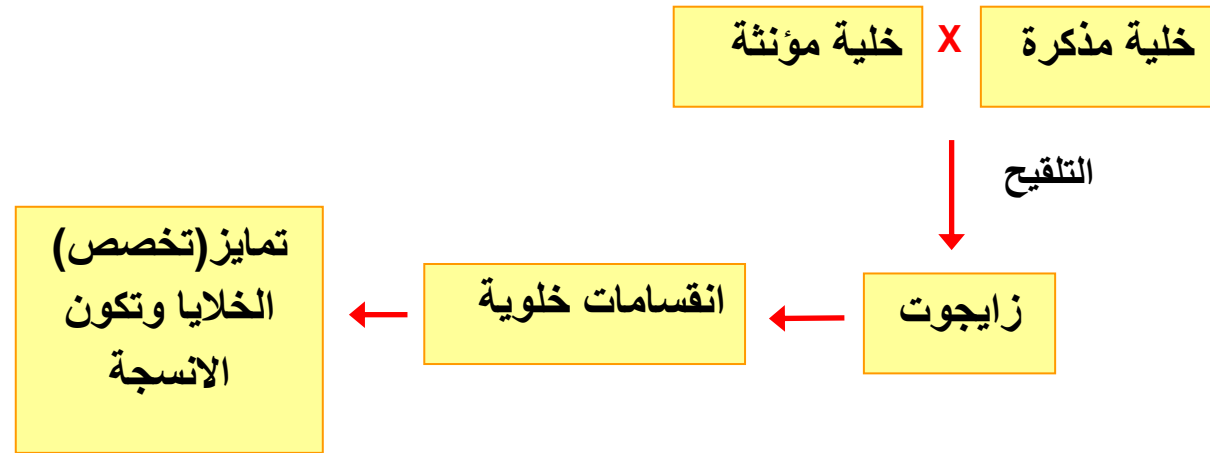
مرحلة الأقلمة والنقل للبيئة الخارجية ، وفيها يكون جاهزا للتوزيع على المزارعين لإعادة زراعة الشتلات في الحقول.

**أمثلة لإكثار بعض نباتات الزينة والنباتات الطبية**

البيئة المستعملة	الجزء المستخدم	النبات
MS	القمة النامية	الورد
MS	المرستيم	القرنفل
MS	القمة النامية	الجريبيرا
Anderson Formula	البراعم الخضرية	الأنثوريوم
MS	القمة النامية	حصى لبنان

MS	البراعم الأبوية	المريمية
----	-----------------	----------

يبدأ تخلق الكائنات الحية من خليتين (الإكثار الجنسي)

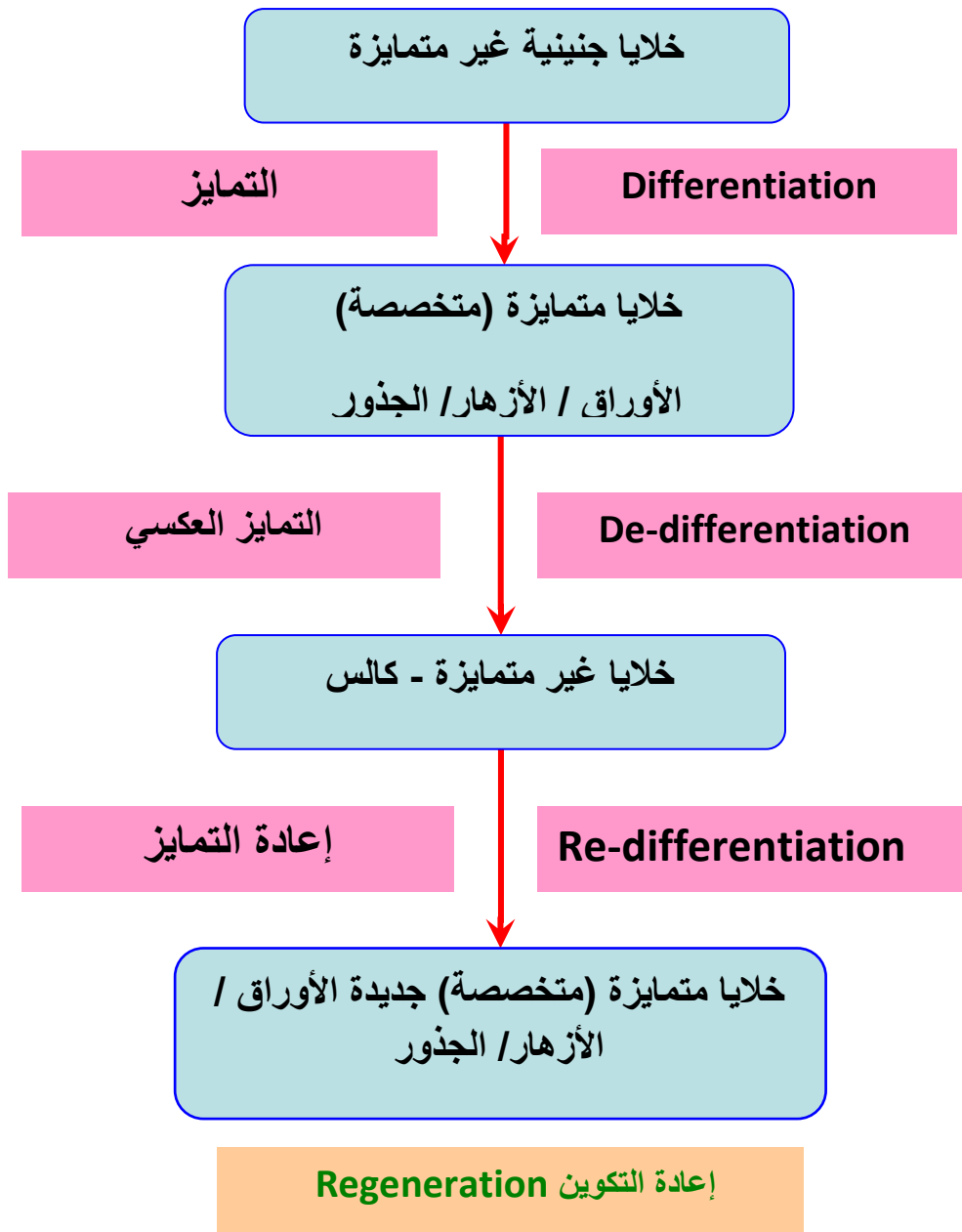


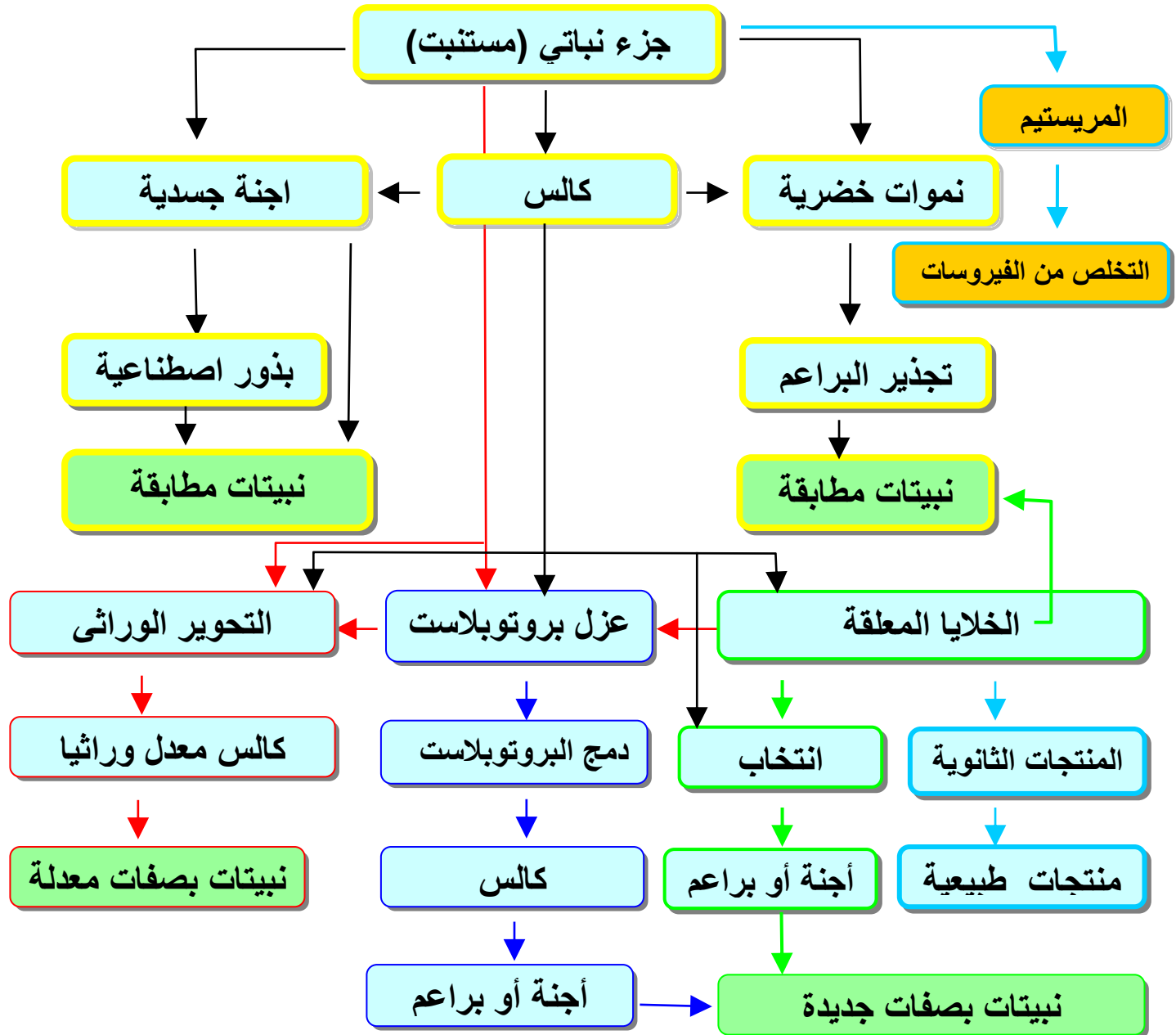
نظرية القدرة الكامنة **Totipotency** (Schleiden and Schwann, 1883)

تنص النظرية على أن الخلية عبارة عن وحدة مستقلة قادرة على إعادة تكوين كائن م. تحتوي الخلية على جميع المعلومات الوراثية (المجين genome) الضرورية لتكوين

التمايز الخلوي:

تطور الى جنين  
ثم كائن كامل





## المعمل ٩

### طرق تعقيم العينات النباتية

#### مصادر حدوث التلوث

(١) مسببات الامراض النباتية والتي تصيب الاجزاء الداخلية.

(٢) التعقيم الغير كافي للبيئة الغذائية .

(٣) الهواء الغير معقم

(٤) عمال الابعاث

#### طريقة اعداد العينة النباتية للزراعة:

(١) الغسيل بالماء الجاري والتخلص من البقايا النباتية والتربة .

(٢) نضعها في كحول ايثيلي 70% لمدة دقيقة ، مع الاخذ بالاعتبار ان تركيز ٩٦% من الكحول يسبب جفاف للنسيج بدرجة كبيرة .

(٣) نضعها في هيبوكلوريد الصوديوم (كلوركس) ٢٠% لمدة ١٠ - ٣٠ دقائق للتعقيم ولمنع تكون الفقاعات .

(٤) نغسلها بماء مقطر ومعقم ٣ مرات لازالة بقايا هيبوكلوريد الصوديوم .

(٥) نقطع الجزء النباتي إلى أجزاء صغيرة بواسطة مشرط معقم باللهب بعد وضع كحول ٩٦%

#### اسباب حدوث الاصابة للنسيج بعد التعقيم السطحي :

(١) الاصابة الداخلية

(٢) تلوث منصدة العمل و الادوات المعملية .

(٣) الكحول الذي تجرى به عملية التعقيم

(٤) الانابيب التي بها البينات قد تتلوث من الخارج لذلك ينصح بعد التعقيم ان تحفظ الانابيب في مكان معقم .

٥) ارضية حجرة المعمل تمثل مصدرا للتلوث

## المعمل ١٠

### العزل والزراعة واعادة الاستزراع subculturing

#### اهم اسباب اعادة الاستزراع :

- ١) استنفاد مكونات البيئة الغذائية نتيجة لنمو القطع النباتية عليها
- ٢) جفاف البيئة الغذائية ويكون هذا راجعا إلى ارتفاع تركيز الاملاح والسكريات .
- ٣) النمو النباتي قد يكون ملاء الانابيب والدورق تماما .
- ٤) احتياج الجزء النباتي إلى حالة من اعادة تكاثره خضرًا.
- ٥) ظهور تلون بني او اسود في البيئة الغذائية خلال الاسابيع الاولى .
- ٦) قد يكون النقل إلى بيئة طازجة نتيجة احتياجات معينه
- ٧) قد يكون النقل نتيجة تحول البيئة الصلبة إلى سائلة بسبب تغير درجة الحموضة