

المحاضرة الرابعة

الوسط الغذائي

Media ingredients مكونات الاوساط الغذائية

أن التركيب الأساسي للأوساط الغذائية الخاصة بالزراعة النسيجية قد تم اكتشافها عن طريق الأبحاث العلمية وذلك لمعرفة دور المغذيات المثالية المختلفة ومنظمات النمو في نمو وتطور النباتات المختلفة خارج الجسم الحي. وتعد التركيبة الغذائية المطوره من قبل العالمين مراشيكي وسكوك Murashige and Skoog في العام 1962 ويختصر بوسط (MS) من اهم وافضل التركيبات الغذائية القياسية والتي لازالت تستخدم الى يومنا الحاضر من قبل العاملين في المختبرات التجارية والبحثية. وتستعمل هذه الوصفه الغذائية لمعظم النباتات العشبية والخشبية على حد سواء. من الوصفات الاخرى الذي يسمى Gamborg mdium والذي يختصر بـ (B5) والذي وصف من قبل العالم Gamborg في سنة 1968 وان من الوصفات الاخرى المستخدمه للنباتات الخشبية المسمى بالـ Woody Plant Medium ويختصر بـ وسط (WPM) وهذا الوسط يستخدم لنمو النباتات الخشبية وقد اكتشف من قبل العالمين Greg Lloyd و Brent McCown سنة 1980.

على العموم ان عملية خلط المواد الكيماويه مع بعضها البعض لغرض تركيب وسط غذائي لزراعة النباتات خارج الجسم الحي هي بحد ذاتها مشابهه للوصفات الغذائية وكيفية طبخها. فالبرغم من اختلاف لغة المكونات الغذائية او الأجهزة المستخدمه في عمل الوسط، الا ان الوصفات يجب ان تتبع بدقه وذلك لان عدم اتباع هذا الوصفات بالدقه المطلوبه قد تؤثر على نشاط ونمو الخلايا المزروعه خارج الحي وربما لا تتميز هذه الخلايا بل وقد يسبب موت هذه الخلايا او الانسجة النباتيه.

تتكون الاوساط الغذائية المستخدمه في الزراعة النسيجية بصورة عامه من بعض المكونات الاساسيه يمكن اجمالها بما يلي:

1. المغذيات الاعضوية Inorganic nutrients
2. المغذيات العضوية Organic nutrients
3. الهرمونات النباتيه او منظمات النمو Phytohormones or Growth regulators

1. المغذيات الاعضويه

والتي يطلق عليها ايضا بالاملاح وتنقسم الى مجموعتين وهي:

المغذيات الكبرى Macroelements ويقصد بها تلك العناصر التي يحتاجها النبات بكميات اكثر من 0,05 ملي مول /لتر. وهذه العناصر هي : النيتروجين والكالسيوم والبوتاسيوم والفسفور والحديد والمغنسيوم والكبريت. اما المغذيات الصغرى Microelements وهي المغذيات التي يحتاجها النبات بكميات صغيرة اقل من 0,05 ملي مول/لتر. وتشمل الكلور والكوبلت والنحاس واليود والمولبدنيوم والمنغنيز والزنك.

تعتبر الأملاح الموجوده او المتوفره في الوسط الغذائي مهمه جدا اذ انها تعتبر كلبنه اساسية لتصنيع المركبات العضوية او انها تستخدم كمحفزات لأنزيمات التفاعل. كما وانها تلعب

دورا مهما في عملية نقل الجزيئات المتأينه ولها دور في عملية التنظيم الأزموزي كما ولها اهمية في الحفاظ على القوة الألكترونيه للنبات Electrochemical Potential .

هناك انواع مخلقة من الأوساط الغذائية المتوفرة لمختلف النباتات ولمختلف الأهداف ويمكننا ان نشترها جاهزة من السوق وبذا توفر المال والأيدي العاملة) وتكون هذه العملية مشابهة لعملية صنع الحلوى عن طريق شراء العلب الجاهزه). ولهذا لانحتاج لشراء كميات كبيرة من المكونات الغذائية كما وانها لاتخضع للاختلافات في تحضير المحاليل القياسية نتيجة اختلاف الطبيعة البشريه. لكن عملية تكوين او تجهيز وصفة جديده للأكثر نبات معين قد تحتاج هذه العملية الى شراء المكونات الغذائية المختلفة وذلك لبناء وصفة الأكثر.

التاثيرات البايولوجية للأملاح المعدنية Biological effects of mineral salts

1. المغذيات الكبرى:

الكالسيوم Ca

هو عنصر مهم ومتم لجدار الخلية Cell wall اذ تكون على شكل بكتات الكالسيوم ويلعب هذا العنصر دورا مهما في تكوين مادة البكتين (الصفحة الوسطى Middle) Lamella وهذه المادة تربط الخلايا مع بعضها البعض. كما وانها تلعب دورا هاما في عملية السيطرة على نفاذية غشاء الخلية. وتسهل حركة الكربوهيدرات والأحماض الأمينية في النبات وتحفيز نشوء الجذور كذلك وتساعد في عملية النمو والتطور وفي تمثيل النيتروجين . يستخدم الكالسيوم على شكل $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ أو على شكل $Ca_{10}[PO_4]_6[OH]$ او $Ca[NO_3] \cdot 4H_2O$.

الحديد (Fe)

يستخدم الحديد في عملية تصنيع الكلورفيل كما ويساهم في عملية تحويل الطاقة في عملية التركيب الضوئي وعملية التنفس. نقصان الحديد يسبب أصفرار الأوراق الحديثة التكوين. يضاف الحديد على شكل $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ مع المادة المخلبية Na_2EDTA .

المغنيسيوم (Mg)

هذا العنصر مهم كونه يتوسط جزيئة الكلورفيل وكونه محفز للانزيم. نقصانه يسبب أصفرار الأوراق القديمه. يستخدم على شكل $MgSO_4 \cdot 7H_2O$.

النيتروجين (N)

يؤثر النيتروجين على نمو النبات كونه مهم جدا لبناء جزيئة الـDNA والبروتينات والكلورفيل والأحماض الأمينية وبعض الهرمونات النباتية. نقصانه يسبب ضعف او توقف نمو النبات وهناك نوعين من مصادر النيتروجين التي تضاف الى الوسط الغذائي هما الأمونيوم NH_4^+ و NO_3^- .

الفسفور (P)

يتوفر هذا العنصر بشكل كبير في الأنسجة المرستيمية أو الأنسجة السريعة النمو وايضا جزيئة الـDNA و ATP كما انه من العناصر الأساسية في عملية التركيب الضوئي وعملية التنفس كما وانه يؤثر على نضوج النبات وعلى نمو الجذور لذا يكون توقف النمو مع ظهور اللون الاحمر القرمزي هي من اعراض نقص الفسفور في الوسط الغذائي. يضاف الفسفور الى الوسط الغذائي على شكل $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ أو على شكل KH_2PO_4 .

(K) البوتاسيوم

يعد البوتاسيوم ضروري جدا في عملية الانقسام وتحفيز نشوء أو نمو المرستيمات ويلعب دورا هاما في الكثير من التفاعلات في النبات كما وانه يساعد في بناء الكاربوهيدرات والكلورفيل وفي اختزال النترات الى أمونيوم. لذا قلة البوتاسيوم يؤدي الى ضعف وتوقف نمو النبات، تبقع الأوراق وتجعد الورقة مع موت حافات الأوراق. يستخدم البوتاسيوم في الوسط الغذائي على شكل KH_2PO_4 .

(S) الكبريت

موجود في بعض البروتينات وهو مهم لنمو الجذور والأوراق الخضر الداكنه في الأشجار. يتم اضافته الى الوسط الغذائي على شكل مركبات السلفات SO_4^{2-} .

المغذيات الصغرى

.2

(B) البورون

هو من المغذيات الأثرية الصغرى ويلعب دورا مهما في عملية نقل السكر والماء والهormونات، كما وانه يدخل بعملية أيض النيتروجين وتكوين الثمار وانقسام الخلايا. أما نقص هذا العنصر فيؤدي الى ظهور أعراض مميزة كثيرا ماتكون على شكل تدهور الأنسجة الداخلية مثل تعفن بنجر السكر *Beta vulgaris* وانشقاق ساق الكرفس *Celery* (*Apium graveolens*) او مرض وجه القرد في الزيتون *Olea europaea* بالاضافة الى بعض الأعراض الأخرى مثل موت أطراف الأشجار *Tip die-back*. ظهور الأوراق الهشه والمتجعه والسميكة. أما زيادة هذا العنصر فيؤدي الى ظهور جروح في النبات او الموت لذا فهو كثيرا ما يستخدم كمبيد للاعشاب. يضاف البورون في الزراعة النسيجية على شكل حامض البوريك H_3BO_3 .



مرض وجهه القرد في الزيتون

الكلور (Cl)

يبدو ان لهذا العنصر دور مهم في النمو اذ انه يحفز عملية التركيب الضوئي . اما أعراض نقص هذا العنصر فتتمثل بذبول الأوراق والتي تصبح ذات لون اصفر او برونزي ثم تموت. يحتاج النبات الى الكلور بكمية قليلة جدا. ولكنها تضاف بكميات كبيرة كبيرة في الوسط الغذائي مع الكالسيوم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$. ويبدو ان معظم النباتات تتحمل هذه الكمية من الكلور في الوسط الغذائي ولكن بعض الباحثين يحذرون من اضافة هذه الكميات الى الوسط الغذائي ويفضلون تجنب اضافتها بأستخدام الكالسيوم من مصدر آخر.

الكوبلت (Co)

يدخل هذا العنصر في تركيب فيتامين B12 وهو مهم لتثبيت النيتروجين وتحويل النيتروجين الجوي الى نترات بواسطة البكتريا المثبتة للنيتروجين. يضاف الكوبلت على شكل كلوريد الكوبلت $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ وبكمية مقدارها 0,025 ملغم/لتر.

النحاس (Cu)

أن نقص النحاس يسبب تثبيط النمو وتشوه الاوراق والتفافها وكذلك تبقعها او موت الافرع. يعتقد ان للنحاس اهمية في تحويل الطاقه عندما تتحول من النحاسوز Cuprous احادية التكافوء الى النحاسيك (Cupric) Cu^{++} ثنائية التكافوء. كما ويدخل النحاس في تصنيع وتركيب بعض الأنزيمات. يضاف النحاس الى الوسط الغذائي بتركيز 0,025 ملغم/لتر على شكل كبريتات النحاس المائية $CuSo_4 \cdot 5H_2O$. وهو مهم لجميع النباتات المزروعه خارج الجسم الحي.

اليود (I)

يضاف اليود الى الوسط الغذائي على شكل يوديد البوتاسيوم (KI). وبصورة عامة لايعتبر اليود من العناصر الأساسية. ومع ذلك فأنها احد مكونات بعض الأحماض الأمينية. كما وقد وجد لليود تأثير سلبي على مزارع Rododendron ولذلك تم حذفها من الوسط الغذائي.

المولبدنيوم (Mo)

يعتقد ان للمولبدنيوم اهمية في تحويل النيتروجين الى امونيا وتساعد على عملية تثبيت النيتروجين. يحتاج النبات المولبدنيوم في عملية النمو الطبيعي وصناعة البروتين ويشك ان نقصانه يؤدي الى اصفرار ما بين العروق في الأوراق او ظهور مرض مقبض السوط .Whiptail



مرض مقبض السوط

المنغنيز (Mn)

هذا العنصر مهم جدا لاغشية البلاستيدة الخضراء وأعراض نقصه تتمثل بظهور الأصفرار المبرقش. يضاف الى الوسط الغذائي على شكل كبريتات المنغنيز $MnSO_4 \cdot H_2O$ وهذا العنصر مهم اضافته الى الوسط الزراعي في الزراعة النسيجية.

الزنك (Zn)

يعتبر الزنك ضروري كمحفز للانزيمات المهمة في عملية تكوين الكلورفيل وكذلك في تكوين الهرمون الاوكسين (IAA) Indole-3-acetic acid. انعدام وجود الزنك ربما يؤدي الى حدوث تشوه في الجذور او تبرقش الاوراق او تشوهها. يضاف هذا العنصر الى الوسط الغذائي بشكل $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. أما الكميات الكبيرة فتكون سامه للنبات.

3. المكونات العضوية أو المغذيات العضوية Organic Nutrients

يمكن ان ينمو النبات المزرع خارج الجسم الحي فقط اذا تم تجهيز الوسط الغذائي بالمغذيات العضوية والتي تشمل الفيتامينات والاحماض الامينية والسكريوز والهرمونات النباتي هـاو كما يطلق عليها بـ (منظمات النمو).

1. الفيتامينات Vitamines

الفيتامينات هي عباره عن مواد تحتاجها الحيوانات بكميات كعوامل مساعده او اضافيه للغذاء. لكن غيابها من الغذاء يؤدي الى تعوق النمو والتطور وحدوث ظرف غير صحي. كذلك النبات او خلايا النبات تحتاج الكثير من هذه المواد كمواد اساسيه او كمحفزات ايضية. لكن النبات ليس كما الحيوان لها القابلية على تصنيع احتياجها من هذه المواد. لكن الخلايا والأنسجة المزروعه خارج الجسم الحي لها القابلية على ذك كونها تحولت من ذاتية التغذية الى رمية التغذية لذا نموها وبقاءها على قيد الحياة يعتمد على اضافة هذه المواد الى الوسط الغذائي.

تستخدم الفيتامينات بصوره متكرره في الزراعة النسيجية ومن اهمها:

هو الثيامين (Vit. B1) Thiamine وحمض النيكوتينك Nicotinc acid او يسمى بالنياسين Niacin والبايرودوكسين Pyridoxine (Vit. B6) بالاضافة الى المايوانوسيتول Myo-inositol وتعتبر هذه الفيتامينات اساسية في الزراعة النسيجية بينما الفيتامينات الأخرى غير متفق عليها كونها ضرورية او اساسية.

ان الفائدة من اضافة الثيامين قد تم اكتشافها من قبل العلماء Robbins و Bonner و Bartley والعالم White بنفس الوقت في العام 1937 اما حمض النيكوتينك ففج تم اضافته في عام 1940 من قبل العالم Bonner و Gautheret في العام 1942 والعالم White سنة 1943.

اما الـ Pyridoxine فقد وجد Robbins and Schmidt سنة 1939 ان اضافته ضروري لنمو جذور نبات الطماطه.

وعلى العموم تعتبر الفيتامينات الثلاثة B1 و B6 و Pyridoxine بالاضافة الى Myo-inositol هي احد اهم المكونات المهمه في الوسط الغذائي MS. وتستخدم لأغراض متعددة للزراعة النسيجية للعديد من النباتات بالأعتماد على طبيعة النبات ونوع الزراعة . فقد وجد Welander بان الفيتامينات لها تاثير تثبيطي لتكوين السيقان المباشر على السويقه الفلقية لنبات الـ Begonia بينما حصل كل من Roset و Bokelmann سنة 1976 في نبات Chrysanthemum فقط عندما كانت هذه الفيتامينات موجودة في الوسط الغذائي. اما باقي الباحثين فيعتقدون ان اضافة الفيتامينات الى الوسط الغذائي هي مشابهه لنظرية الحزام والحماله Belt and Barces. اي اضافتها الى الوسط الغذائي هي كشي احتياطي لمنع فشل تجربة الزراعة النسيجية.

التاثيرات البايولوجية لبعض المركبات العضوية Biological Effects of Some

Organic Compounds

1. الأدينين(Adenine (6-amino-purine): مهم للخلية كونه يدخل في تركيب المادة النووية DNA و RNA ولها تأثير ضعيف مثل تأثير السايٹوكاينين وتستخدم في الأوساط الغذائية على شكل كبريتات الأدينين أو سلفات الأدينين Adenine Sulfate وهي مهمة لتكوين السيقان.
2. البايوتين(Biotine (Vita. B8): يستخدم بصورة شائعة في الأوساط الغذائية وهو مهم في ايض البروتينات والدهون والكربوهيدرات.
3. (Vita. B9) Folic Acid: وجد هذا الفيتامين في الأوراق وبعض الأنسجة وهو مساعد للأنزيم.
4. الانبوسيتول Inositol او(Myo-Inositol): وهو سكر كحولي يضاف الى معظم الأوساط الغذائية على شكل فوسفات لذا يسمى Phosphate-Inositol يدخل هذا المركب في تركيب الأغشية الخلوية خصوصا تلك التابع لها و الخاصة بالعضيات المختلفه مثل البلاستيدات الخضراء. يعتبر الأنبوسيتول أساسي للنمو وهو مفيد جدا لذا يضاف بتركيز 100 ملغم/لتر.
5. Nicotnic Acid او يسمى الـ(Niacin) او (Vita. B3): هو احد مرافقات الانزيمات الفعالة في تفاعلات الضوء. لذا معظم الأوساط الغذائي تحتوي هذا الفيتامين بتركيز من 10-0,1 ملغم/لتر.
6. (Vita. B5) D-Pantothenic Acid: هو احد مرافقات الأنزيمات الخاصه بأيض الدهون ويضاف على شكل املاح الكالسيوم ومن الأفضل تعقيمه بالنعقيم البارد.
7. (Vita. B6) Pyridoxine: وهو احد مرافقات الأنزيمات الأيضية وعادة يضاف الى الوسط الغذائي على شكل Pyridoxine-HCl.
8. (Vita. B1)Thiamine: هذا الفيامين اساسي في معظم الأوساط الغذائية في الزراعة النسيجية كونه احد مرافقات الأنزيمات الخاصه بدورة كريبس ويضاف بمقدار 0,4 ملغم/لتر.
9. السكروز Sugar

جميع الأوساط الغذائية تحتوي على السكروز كمصدر للكربون وذلك لدعم نمو الأنسجة الغذائية خارج الجسم الحي، وذلك لكونها غير ذاتية التغذية وليس لها القابلية على القيام بعملية التركيب الضوئي بشكل كفوء نتيجة عدم حصول عملية التبادل الغازي بصورة جيدة كما وان تركيز ثاني اوكسيد داخل الأوعية الزرعية قد يكون عالي التركيز او بالعكس واطيء التركيز.بالإضافة الى ذلك قد تضاف الى الوسط الغذائي انواع اخرى من السكريات مثل الكلوكوز او الفركتوز او غيرها: أما كمية السكروز المستخدمة في الوسط الغذائي فانها تعتمد على نوع القطعة النباتية وكذلك عمرها. لقد وجد Koch سنة 1996 بان للكربوهيدرات اهمية كبيرة في التعبير الجيني

في النبات اذ يستجيب النبات للتغيرات الطارئه في حالة الكربوهيدرات فبعضها تتحفز وبعضها تنشط.

TABLE 3.1 Composition of the Five Inorganic Salt Stocks of the Murashige and Skoog Inorganic Formulation

Chemical	Concentration (g/liter stock)
Nitrate stock	
Ammonium nitrate (NH_4NO_3)	165.0
Potassium nitrate (KNO_3)	190.0
Sulfate stock	
Magnesium sulfate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	37.0
Manganous sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	1.69
Zinc sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.86
Cupric sulfate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
Halide stock	
Calcium chloride ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	44.0
Potassium iodide (KI)	0.083
Cobalt chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.0025
PBMo stock	
Potassium phosphate (KH_2PO_4)	17.0
Boric acid (H_3BO_3)	0.620
Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0.025
NaFeEDTA stock	
Ferrous sulfate ($\text{FeSO}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2.784
Ethylenediamineteraacetic acid, disodium salt (Na_2EDTA)	3.724

TABLE 3.2 Inorganic Salt Formulation of Several Commonly Used Basal Salts for Plant Tissue Culture in Milligrams per Liter of Medium^a

Chemical	White (1963)	B5 ^b	N6 ^c	WP ^d
NH ₄ NO ₃				400
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	463	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	720	246	185	370
KCl	65			
KNO ₃	80	2528	2830	
KH ₂ PO ₄			400	170
K ₂ SO ₄				990
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	19	150		
Na ₂ SO ₄	200			
CaCl ₂ ·2H ₂ O		150	166	96
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	300			556
Na ₂ EDTA·2H ₂ O		37.2	37.2	37.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O		27.8	27.8	27.8
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5			
H ₃ BO ₃	1.5	3	1.6	6.2
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.001	0.025		0.25
MnSO ₄ ·H ₂ O		10		
MnSO ₄ ·4H ₂ O	7		4.4	22.3
MoO ₃	0.0001			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		0.25		0.25
KI	0.75	0.75	0.8	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	3	2	1.5	8.6