زراعة الأنسجة النباتية
Plant Tissue Culture
المحاضرة التاسعة
أهم منظمات النمو المستخدمة في الزراعة النسيجية

وتوجد أربعة مجاميع رئيسية لمنظمات النموالهامة لمزارع الأنسجة وهى الأوكسينات، السيتوكينينات – الجبرلينات وحامض الأبسيسيك. إن نمو الخلايا والأنسجة وتكشفها إلى البراعم الخضرية أو إلى الجذور يكون واضحاً جلياً عند إضافة واحد أو أكثر من هذه المنظمات إلى الوسط الغذائى وتتباين الإحتياجات المختلفة من منظمات النمو لتكوين الجذور أو تكوين البراعم الخضرية. والتى تتشابه مع نسب الهرمونات الموجودة أساساً فى النبات الأصلى والتى تخلق به هذه الهرمونات ذاتياً وتضاف وتعقم أغلب هذه المنظمات بواسطة المرشحات البكتيرية نظرا لتكسرها بالحرارة العالية والضغط العالى (ظروف التعقيم). وهذة المجموعات هى:

1- الأوكسينات Auxins

يوجد العديد من الأوكسينات التى تضاف إلى الوسط الغذائى نذكر منها على سبيل المثال إندول حامض الخليك indole-3 – acetic acid ويرمز له (IAA) ، أندول حامض البيوتريك indole 3 butyric acid ويرمز له (IBA) وكذلك 2 ، 4 دى كلورفينوكسأسيتيك أسد ويرمز له (2, 4 – D) 2,4 – dichlorophenoxy acetic acid . نفثـــالين حامض الخليـــك naphthoxyacetic acid ويرمز له (NAA) ويوجد IAA طبيعياً فى الخلايا النباتية وهناك العديد من الأوكسينات التى تؤثر فى مزارع الخلايا والأنسجة ومن أهمها:

أ- الإندول أسيتيك أسد I AA

يشجع تكوين الجذور على النباتات وهذا المركب يجب إضافتة بواسطة المرشحات البكتيرية لأن تعقيمة بواسطة الأوتوكلاف مع البيئة يؤدى إلي تكسيرة وتقليل الإستفادة منة وكذلك يجب حفظة في زجاجة بنية أو قاتمة اللون لأنة يتأثر بالضوء ويضاف للبيئة في حدود 0.1 to 10 mg /L ويجب أن تحفظ البيئة المحتوية على هذا الهرمون في الإظلام التام حتى لايتكسر وتقل الإستفادة منة ويلاحظ أن الأوكسين لايذوب في الماء ويجب إذابتة أولا في كحول الإيثانول أو هيدروكسيد البوتاسيوم أو هيدروكسيد الصوديوم.

<u>التحضير:</u> يوزن100 مجم من حمض الإندول أسيتيك وتذاب في 2 مل هيدروكسيد الصوديوم 1 عيارى ثم يكمل الحجم إلي100 مل بالماء المقطر وفي هذه الحالة يكون 1مل = 1 مجم.

ولقد أستخدم هذا الأكسين بنجاح لتكوين كالوسى نخيل البلح والفيكس كما أستخدم لإحداث الجذور (للتجذير) فى نباتات الجربيرا والكوردالين ونباتات الموز.

ب -الإندول بيوتريك أسد IBA

من الأوكسينات الهامة التي تستخدم على نطاق واسع في مزارع الأنسجة النباتية بهدف تشجيع وتكوين الجذور وهذا الهرمون ثابت نسبيا بالمقارنة بحمض الإندول أسيتيك (IAA) حيث أنة يتحمل التعقيم ولا يتكسر بالحرارة أو الضوء ويذوب أيضا في كحول الإيثانول وهيدروكسيد الصوديوم ويحضر كالسابق.

ج- نفثالين أسيتيك أسد NAA

من المركبات الأوكسينية التي تستخدم بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لتكوين الكالوس وتشجع تكوين الجذور في المرحلة النهائية ويلاحظ أن الإتزان الداخلى للأوكسين والسيتوكاينين هو المحدد في جميع حالات نمو النبات وهذا الهرمون يذوب في كحول الإيثانول وكذلك هيدروكسيد الصوديوم ويحضر بإذابة 100 مجم منة في 2مل هيدروكسيد الصوديوم 1ع ثم يكمل الحجم إلي 100 مل بالماء المقطر وفي هذه الحالة يكون 1 مل = 1 مجم. ويجب ملاحظة أن هذه الأوكسينات تتأثر تأثيرا كبيرا بال **pH** وكمية الأملاح بالبيئة. وكثيرا ماتذكر التركيزات بالملى مول والميكرو مول وفي هذه الحالة يجب تحويلها إلي مليجرام وميكروجرام طبقا للآتى:

التركيز بالميكروجرام = التركيز بالميكرومول × الوزن الجزيئى

التركيز بالمليجـرام = التركيز بالملي مـول × الوزن الجزيئى

د- 2 ،4 داي كلورو فينوكسى أسيتك أسد "2, 4 - D " 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid

وهو يتميز بأن تأثيره قوى في تخليق الأجنة العرضية وتكوين الكالوس ولكنة يعتبر مطفر. وقد درست أهمية الأوكسينات فوجد مثلا **أن** IAA هام جدا وضرورى لتصنيع DNA وإنقسام الخلية وقد وجد أنة بدون الأوكسين يحدث أن تنقسم الخلايا مرات قليلة ثم تموت وقد وجد أنة في مزارع نخاع الدخان أن إنقسام الخلايا يبدأ فورا بعد إضافة الأوكسين بالإضافة الى هذة الأنواع الرئيسية يوجد أوكسينات أخرى من أهمها:-

1-رابع كلورو فينوكسى حامض الخليك

4 – chlorophenoxy acetic acid (4- CPA)

أو بارا كلورفونكسى حامض الخليك

P – chlorophenoxy acetic acid (PCPA)

2 - 2، 4، 5 ثلاثى كلوروفينوكسى حامض الخليك

2,4,5 – Trichlorophenoxy acetic acid (2, 4,5 –T)

3- 2 مثيل – 4 كلوروفينوكسى حامض الخليك

2 – methy – 4 – chlorophenoxy acetic acid (MCPA).

4- 4 أمينو، 3، 5، 6 ثلاثى كلور حمض البيكنولينيك

4 amino - 3, 5, 6- trichloropicolinic acid (picloram.)

5- 3، 6 داى كلورو – 2 ميثوأوكسى حامض البنزويك

3,6 – dichloro – 2 – methoxy benzoic acid. (dicamba).

والأثـر الرئيسـى للأوكسـينات هـو التـأثير الواضـح علـى إنقسـام الخلايـا فـى الطبيعـة والـدور الرئيسـى لهـذه الهرمونات أنها تشارك بنشاط هام فى عملية إستطالة السلاميات والسيقان وتكوين الجذور. وتتباين الأوكسينات فى تأثيرها

الفسيولوجى عن طريق قدرتها على التحرك خلال الأنسجة النباتية والإرتباط ببعض الخلايا. وحسب درجة إنحدار وتقوس الساق النباتية فإنة وجد أن 2,4–D يؤثر بحوالى من 8 – 12 مرة ضعف تأثير IAA مقارنة بتأثير Picloram, PCPA الذى يؤثر من (2-4 مرات) من تأثير IAA , 2, 4 – D , 2, 4, 5 – T وجد أنهم مؤثرين فى عملية إنتاج الكالوسات.

2- السيتوكينينات Cytokinins

إن مجموعة السيتوكينينات التى هى فى الأصل مشتقات من الأدينين تقوم بدور فعال ونشط فى إنقسام الخلايا وكذلك تحوير السيادة القمية وتكوين البراعم الجانبية. وهي من الهرمونات الهامة في مزارع الأنسجة النباتية والتى تساعد على إنقسام الخلايا وتكوين النموات الجانبية والمساعدة على الزيادة العددية أثناء إكثار النباتات وهذه الهرمونات تنشط تكوين الأفرخ والبراعم العرضية وتمنع تكوين الجذور خاصة عند إستعمالها بجرعات كبيرة ومنع تكوين الجذور يأتى من التأثير على الخلايا التي لاتنقسم والسيتوكينينات هي:

أ **- سيتوكينين طبيعي** مثل:

1 - الزياتين ، وهو مرتفع الثمن جدا يحدث تضاعف في مزارع الأنسجة النباتية.

Zeatin) 6–(4hydroxy–3methyl–trans-2 butanylamino) purine

2 - زياتين رايبوزايد. Zeatin Riboside

3 - أيزوبنتنايل أدينين 2-ip يستخدم لإحداث التضاعف. 6– (y – y – dimethylamino) purine

ب - **سيتوكاينين صناعي** وهذه المركبات عامة تذوب في حمض الهيدروكلوريك وتحضر بإذابة 100 مجم من المادة في 2مل 1 ع من الحمض السابق (5 -10 نقطة) ثم يكمل الحجم إلي 100 سم^3 بالماء المقطر. وعامة تستخدم هذه المركبات بتركيز من 0.01 to 10 mg/L وهذه المواد ثابتة وتحفظ في الثلاجة وتعمل على إنقسام الخلايا وزيادة النموات الجانبية ويستخدم كذلك مع الأوكسين لتكوين الكالوس وذلك عند الإتزان بين الأوكسين والسيتوكينين وهذه المركبات مثل:

1 الكينيتين Kinetin (6 فورفورايل أمينو بيورين)N – (2 furfurylamino)1– H – purine 6 amine

ويستخدم بكثرة في مزارع الأنسجة النباتية لإحداث التضاعف وتكوين الكالوس عند إتزانها مع الأوكسينات.

2 - بنزايل أمينو بيورينBAP 6- benzylaminopurine يذوب في هيدروكسيد الصوديوم.

3 - البنزايل أدينين 6 benzyladinine BA يذوب في هيدروكسيد الصوديوم.

وعموما فإن هناك أهمية كبرى لنسبة الأوكسينات إلي السيتوكينينات وهذه النسبة تختلف من نبات إلي نبات آخر ومن نسيج إلي نسيج آخر ولكل حالة نسبة معينة تساعد على تكوين الكالوس أو تسمح بتكوين المجموع الجذرى فزيادة نسبة السيتوكاينين إلي الأوكسين يشجع تكوين البراعم العرضية والخضرية وزيادة الأوكسين تسمح بتكوين الجذور وتعادل النسبة يسمح بتكوين البراعم الخضرية والجذرية معا.

لقد وجد حديثاً أن هناك بعض مشتقات اليوريا مثل (DPU) والـ (CPPU) وبعض المشتقات الأخرى من diphenylurea تظهر نشاط مثل السيتوكينينات وتحتاج هذه المركبات إلى مزيد من الدراسات على إستخدامها فى مزارع الأنسجة لدراسة تأثيرها على نمو المزارع والخلايا وتعتبر نسبة وجود كل من الأوكسينات والسيتوكينينات فى الوسط الغذائى من العوامل المؤثرة فى عملية التكشف بالنسبة للخلايا والأنسجة المنزرعة. وينصح باستخدام بنسبة عالية

من الأوكسينات إلى السيتوكينينات فى حالة الرغبة فى تكوين الكالوس وكذلك تكوين الأجنة وتكوين الجذور والعكس يقود إلى تكوين البراعم الخضرية ولقد لوحظ أنه عند إضافة الـ BA والـ 2,4 – D إلى الوسط الغذائى بنسبة $15\ mg/\ l^{-1}$ أدت إلى ظهور وتكون الكالوس فى مزارع Agrostis وعند إستخدامهم وإضافتهم بنسبة $0.5\ mg/\ l^{-1}$ ساعدت على تكون البراعم وفى كلتا الحالتين نسبة الأوكسين إلى السيتوكينين واحدة والطريقة التى تعمل بها السيتوكينينات ليست مفهومة بعد. ولكن وجد هناك إرتباط بين بعض المركبات والحمض النووى الريبوزى الناقل (tRNA) ولقد لوحظ أن السيتوكينينات أدت إلى زيادة فى تخليق الـ RNA ومن ثم زيادة فى تخليق البروتينات والإنزيمات داخل الخلية.

3- الجبرلينات وحامض الأبسيسيك Gibberellins and Abscisic Acid

تستخدم هذه المجموعة من منظمات النمو فى زراعة الأنسجة ولكن فى أحوال قليلة. هذه المجموعة تستخدم أحياناً لتنشيط النمو وأحياناً تستخدم لتثبيط النمو. إن حمض الجبريليك GA_3 هو أكثر المجموعة إنتشاراً فى الإستخدام فى مزارع الأنسجة دون باقى العشرين نوعا المعروفة من الجبريلينات. وهذه المركبات فى الحقيقة تؤدى إلى زيادة فى النمو ولكن بكثافة أقل وتشجع النباتات المتقزمة على النمو والإستطالة. أما بالنسبة لحامض الأبسيسيك فإنه قد يشجع النمو أو يثبطة حسب نوع النبات والتركيز المستخدم. وهو من العناصر المهمة في منظمات النمو والوظيفة الأساسية لحمض الجبرالين هو تشجيع إستطالة الخلايا وتميزها. ولقد وجد El-Shobaky (1991) أن إضافة 1/2- 2مجم من الجبرلين الى الوسط الغذائى أدت الى زيادة طول وعدد الأفرخ والجذور لعديد من أصناف البطاطس. ولكن وجد أن لة تأثير مانع في بعض الحالات فقد وجد أن الجبرالين الطبيعى الموجود في الفاصوليا كان مانعا لتكوين الجذور وهو أثر غير مباشر في منع أنقسام الخلايا ومن المؤكد حاليا أن الجبرالين قد يمنع تجذير العقل في كثيرمن النباتات وكذلك يمنع تكوين الجذور العرضية عندما أضيف إلي أعناق أوراق البيجونيا. مما سبق نجد أن هذه الهرمونات تستخدم بتركيزات قليلة جدا (مجم/ لتر) ومنها ما يتكسر بالحرارة أثناء عملية التعقيم للبيئة ولذلك يفضل إضافة مثل هذه الهرمونات عن طريق المرشحات المعقمة. وقد وجد كذلك أنة في حالة التوازن بين نسبة الأوكسينات والسيتوكينينات فإنة ينتج براعم خضرية وجذور.