زراعة الأنسجة النباتية
Plant Tissue Culture
المحاضرة العاشرة
أنواع البيئيات وكيفية إعدادها

أنواع البيئات (حسب درجة تصلبها) Media types

يوجد ثلاثة أنواع من البيئات وهم البيئة الصلبة والبيئة السائلة والبيئة الشبيهة بالصلبة.

1 - البيئة الصلبة **Solid media**

وهي البيئة المضاف اليها آجار وهو إما فيتاجيل أو جيلريت أو بكتو دفكو آجار فيصلبها وكمية الآجار حوالي من 2 – 7 جم/ لتر وهناك أنواع من الآجار تصلب البيئة عند 2جم/ لتر وأفضل رقم حموضة لهذه البيئة **pH** هو 5.7 واذا كانت البيئة الصلبة في أنبوبة إختبار يجب وضعها بميل بزاوية 45 درجة قبل التصلب بعد الخروج من الأوتوكلاف مباشرة وذلك لزيادة سطح البيئة داخل أنابيب الإختبار.

2 - البيئة السائلة **Liquid media**

وهي البيئة التي لايضاف اليها آجار وأفضل رقم حموضة **pH** هو 5.5 وعند زراعة مثل هذه البيئة إما أن يوضع الجزء النباتى مباشرة في البيئة أو إذا كان مرستيم فيحتاج إلي ركاب أو قنطرة من قطعة ورق ترشيح ويوضع المرستيم أعلى القنطرة ويصل إلية الغذاء عن طريق التشرب أو النشع وفي حالة زراعة الكالوس على البيئة السائلة يحتاج إلي هزاز **Shaker** لتجديد الهواء (التهوية) وجعل البيئة السائلة تصل إلي كل جزء من أجزاء النسيج.

3 - البيئة شبة الصلبة **Semi-solid media**

وهي البيئة التي يكون بها كمية آجار أقل فهي لاتكون صلبة ولا سائلة.

المواد المصلبة للوسط الغذائى Solidifying Agents

تضاف المواد المصلبة إلى الوسط الغذائى للحصول على بيئات صلبة حتى يمكن الزراعة عليها. وتموت الخلايا إذا زرعت فى بيئة سائلة ثابتة حيث إنها تسقط داخل البيئة السائلة وتفقد الأوكسجين اللازم لتنفسها. وتعمل المواد المصلبة للوسط الغذائى على إتاحة فرصة للنمو على أسطح الوسط الغذائى ويعتبر الآجار من أفضل المواد المصلبة للوسط الغذائى وهو مستخلص من بعض الأعشاب البحرية. والآجار عبارة عن معقد من السكريات وللأهمية نذكر هنا أن الآجار أو الجلاتين لا يتفاعل مع مركبات الوسط الغذائى. وكذلك لا تستطع الإنزيمات النباتية هدم هذه المركبات وتحليلها وتظل صلبة طول مدة النمو على مختلف درجات الحرارة. عادة يستخدم الآجار بنسبة 2-7 جم/لتر على حسب نوع الآجار وهى كمية كافية لتصليب أو تدعيم الوسط الغذائى عند نفس الأس الأيدروجينى المستخدم فى البيئة.

عند القيام بإجراء تجارب تغذية يستبعد إستخدام الآجار حيث إنه يحتوى على مجموعة من العناصر المعدنية التى تؤثر فى الوسط الغذائى مثل عناصر الكالوسيوم والمغنسيوم والبوتاسيوم والصوديوم وبعض العناصر الصغرى وعليه فإن التغير فى نسبة الأجار بالوسط الغذائى سوف تؤثر على كمية العناصر المعدنية

الموجودة فى الوسط الغذائى. ويمكن التغلب على هذه النقطة فى تجارب التغذية عن طريق غسله فى ماء مقطر لمدة 24 ساعة ثم شطفه باستخدام كحول الإيثانول ثم التجفيف على درجة حرارة 60ºم لمدة 24 ساعة.

أما بالنسبة لمادة الجيلاتين فإنها تستخدم بتركيزات أعلى 10% لتصلب الوسط الغذائى ولكن لا تستخدم بكثرة لأنه يتحول إلى مادة سائلة عند درجة حرارة أعلى من 25ºم بالإضافة إلى ذلك هناك العديد من المواد التى يمكن إستخدامها فى عملية تصلب الوسط الغذائى نذكر منها على سبيل المثال لا الحصر Gelrite, Phytagel, alginate, methacel يوجد فى الأسواق الآن نوع من الأجاروز النقى والذى يستخدم فى مزراع البروتوبلاست ومزراع الخلية الواحدة. أيضاً هناك طرق بديلة لحمل الخلايا فى الوسط الغذائى السائل مثل إستخدام ورق سلوفان أو ورق ترشيح أو استخدام رغاوى البولى إثيلين. وعموماً فإن درجة النمو بالنسبة للأنسجة لا تعتمد أساساً على نوع النسيج والنوع النباتى المستخدم. ويعتبر الفيتاجيل من أفضل المواد المصلبة للبيئة حيث أنة يستخدم بتركيز منخفض 2جم/لتر وهو شفاف أى خالى من الشوائب (El-Shobaky 1991).

إعداد البيئات Media Preparation

إعداد البيئات الغذائية فى مجال زراعة الأنسجة قد يكون من أكثر العناصر إستهلاكاً للوقت. ولذلك توجد فى الأسواق الآن بيئات غذائية جاهزة على صورة مخلوط جاف من العناصر الكبرى والصغرى أو بقية المكونات الأخرى. وأبسط هذه الطرق أن تذاب هذه الكمية فى كمية من الماء. يذاب السكر والآجار فى كمية أخرى من الماء مع إجراء عملية إذابة ساخنة للآجار ثم تضاف بعض المكونات العضوية الأخرى مثل الفيتامينات ومنظمات النمو ثم تضاف الكميات معاً وتكمل إلى 1 لتر ويقدر الأس الأيدروجينى قبل ذلك ثم يجرى لها عملية التعقيم. على العموم تستخدم البيئات السابقة التجهيز فى عملية الإكثار الخضرى عن طريق زراعة الأنسجة ولكن فى حالة التجارب العلمية يفضل تحضير البيئات فى المعمل من مخاليط الأملاح على أن يوزن كل ملح على حدة ثم يذاب فى كمية من الماء ثم تجرى إذابة جميع العناصر المطلوب إضافتها فى التجربة حسب نوع الوسط الغذائى المستخدم وهذه عملية صعبة جداً. ولقد وجد بديل لهذه العملية على أن تحضر محاليل مُركزة (Stocks) بكميات كبيرة من هذه المحاليل والعناصر بكميات مضاعفة ثم عند إعداد البيئة نأخذ من هذه المحاليل الكميات اللازمة لإعداد الوسط الغذائى.

فعلى سبيل المثال تحضر محاليل الـStocks المُركزة للعناصر الصغرى بحيث يحتوى المحلول على 100 ضعف كمية العناصر التى يجب أن توجد فى الوسط الغذائى (حجم لتر) وتحضر المحاليل كالآتى:

Micro nutrients	1X mg/L	100 X mg/100L
KI	0.83	83
H_3BO_3	6.2	620
$ZnSO_4.7H_2O$	8.6	860

$MnSO_4.4H_2O$	22.3	2230
$NaMoO_4.2H_2O$	0.25	25
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	2.5
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	2.5
$Na_2.EDTA$	37.3	3730
$FeSO_4.7H_2O$	27.8	2780

وعند تحضير محاليل الحديد المخلبية تذاب كل من كبريتات الحديدوز المائية $FeSO_4.\ 7H_2O$ وكذلك محلول الصوديوم Na EDTA. $2H_2O$ كل على حدة فى 45 مل ماء بالتسخين والتقليب حتى تمام الذوبان ثم نخلط المحلولان ثم يكمل المقدار إلى 100مل.

وكذلك تذاب كمية يوديد البوتاسيوم فى 85مل ماء ثم يكمل إلى 100 مل.

أما باقى العناصرالصغرى تذاب مع بعضها فى 70 مل ماء ثم تكمل إلى 100مل..

ومن ذلك يتضح أن العناصر الصغرى قسمت إلى ثلاث محاليل وعند تحضير لتر بيئة يتم أخذ 1مل من كل محلول..

كل المحاليل المركزة السابقة يجب أن تخزن فى أوعية زجاجية فى درجات حرارة منخفضة ويفضل الثلاجة. ومحلول الحديد يجب أن يحفظ فى زجاجة ملونة غير منفذة للضوء. عند إستخدام المحاليل المركزة هذه لابد من إجراء عملية الرج جيداً وإستبعاد أى محاليل تحتوى على ترسيبات أو أى ملوثات فطرية نهائياً. تبذل عناية خاصة عند إستخدام لبن جوز الهند. محلول الأندوسبرم يرشح ويخزن فى زجاجة ملونة بألوان معتمة وتحفظ فى الديب فريزر على درجة – 20°م والمحاليل الرئيسة لمكونات الوسط الغذائى

تحضير البيئة **Stocks and Media Preparation (MS)**

تشتمل تلك الخطوة إعداد Stocks من مكونات البيئة المختلفة (ذكرت سابقا) وتخزن على درجة حرارة 4 - 5° م لحين إستخدامها في تحضير البيئات المطلوبة. وتحضير البيئة يتم بالوضع الآتى (لتر بيئة):

1 - يوزن من 20 - 30 جم من السكروز أو حسب المطلوب.

2 - يـوزن 100 مجم من الإينوزيتول.

3- توزن العناصر الكبرى كما موضح بجدول البيئات.

3 - يؤخذ 1مل من كل من الثلاث محاليل السابقة الخاصة بالعناصر الصغرى وكذلك يتم إضافة الفيتامينات كما هو موضح بجدول البيئات.

4 - توضع الهرمونات على حسب نوع الهرمون والتركيز المطلوب.

5 - يكمل الحجم إلي لتر (1000 سم3) بالماء المقطر.

6 - يضبط ال pH ويكون من 5.8 to 5.6 الصلبة ومن 5.2 to 5.5 السائلة.

7 - يوضع الآجار لتصلب البيئة وهو حوالي 7جم/ لتر ويتوقف هذا على نوع الآجار وفي بعض الأحيان تكون سائلة بدون آجار وتطبخ البيئة على سخان بمقلب مغناطيسى حتى تمتزج جميع هذه المكونات.

8 - تصب البيئة في برطمانات أو أنابيب إختبار حوالي 20سم للأنبوبة ثم تغطى بأغطية خاصة بذلك مصنوعة من مادة البولى بروبيولين التي تتحمل الضغط ودرجة الحرارة عند التعقيم.

9 - تعقم الأنابيب أو البرطمانات في الأوتوكلاف على درجة حرارة 121°م وضغط جوى 1كجم / سم2 لمدة 20 دقيقة.

10 - تبرد البرطمانات والأنابيب المحتوية على البيئة وتوضع الأنابيب مائلة في راكات خاصة بذلك بزاوية 45 درجة لحين الزراعة.