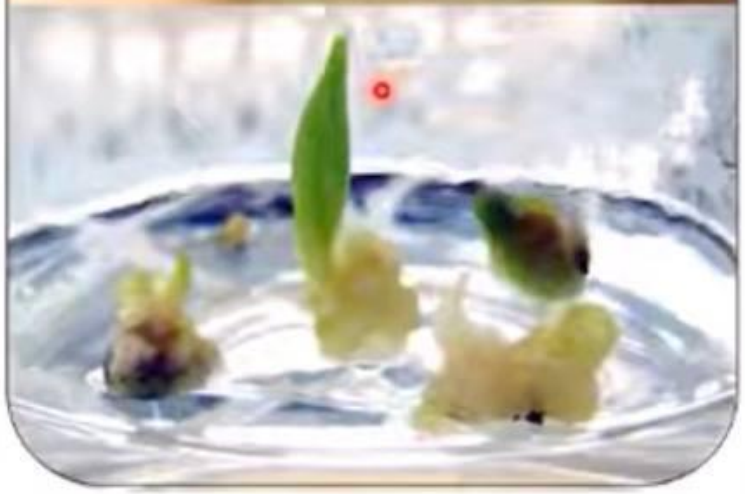
المحاضرة التاسعة

مقدمة
عن زراعة الأنسجة

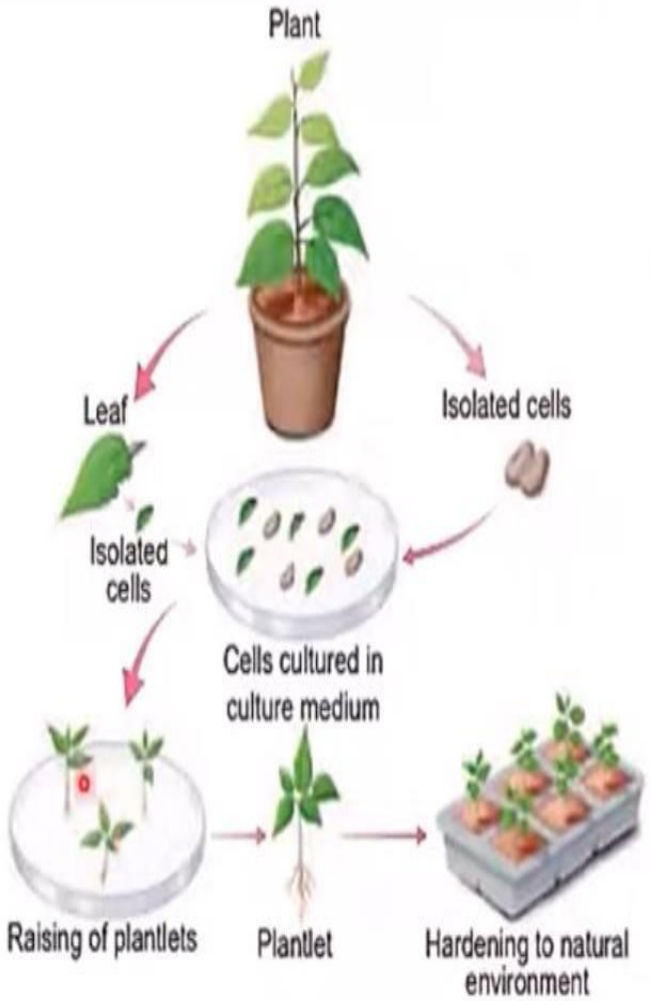
مقدمة عن زراعة الأنسجة



زراعة أي خلية أو نسيج أو حتى عضو نباتي 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 في كثير من المعامل التجارية في الخارج والداخل.

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة



1- مزارع الأعضاء Organ culture:

وهي تعني زراعة الأعضاء بالكامل وذلك يشمل زراعة:

الأوراق

الجذور

السوق

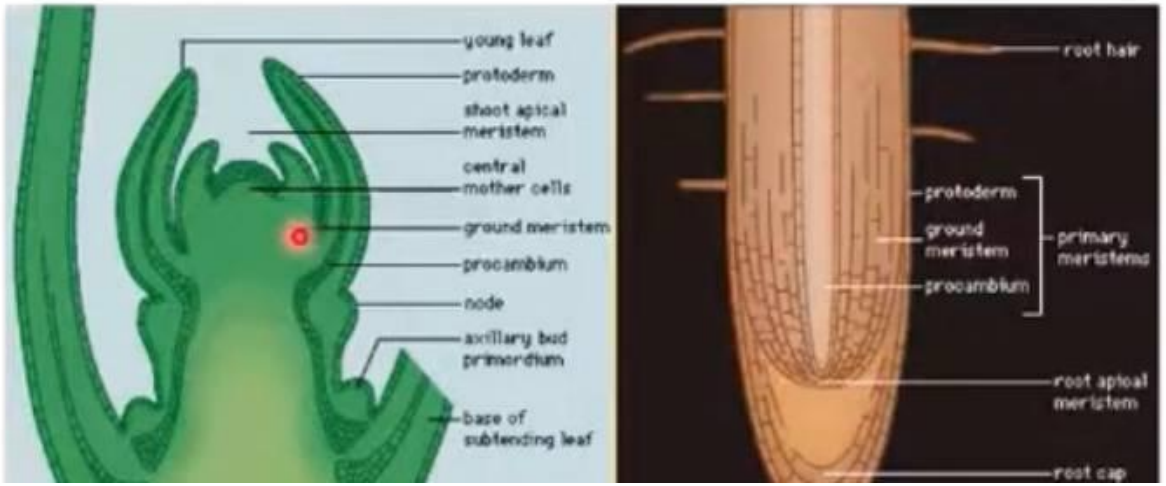
الأزهار

غيرها من الأعضاء النباتية.

الأنـواع المختلفة لمزارع الأنـسجة

2- مزارع الميرستيم Meristem culture:

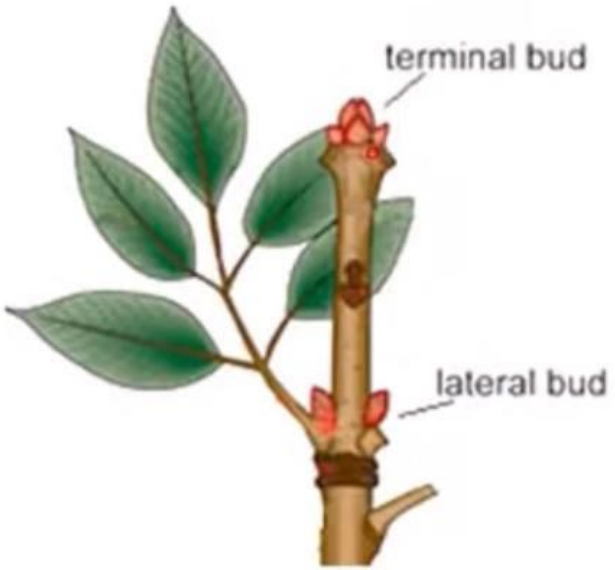
تتكون مناطق الميرستيم من خلايا نشطة في الانقسام الخلوي مما ينتج خلايا تتكشف لتعطي أنسجة نباتية جديدة. وتستخدم مزارع الميرستيم للحصول والمحافظة على وإكثار النباتات خالية من الأمراض.

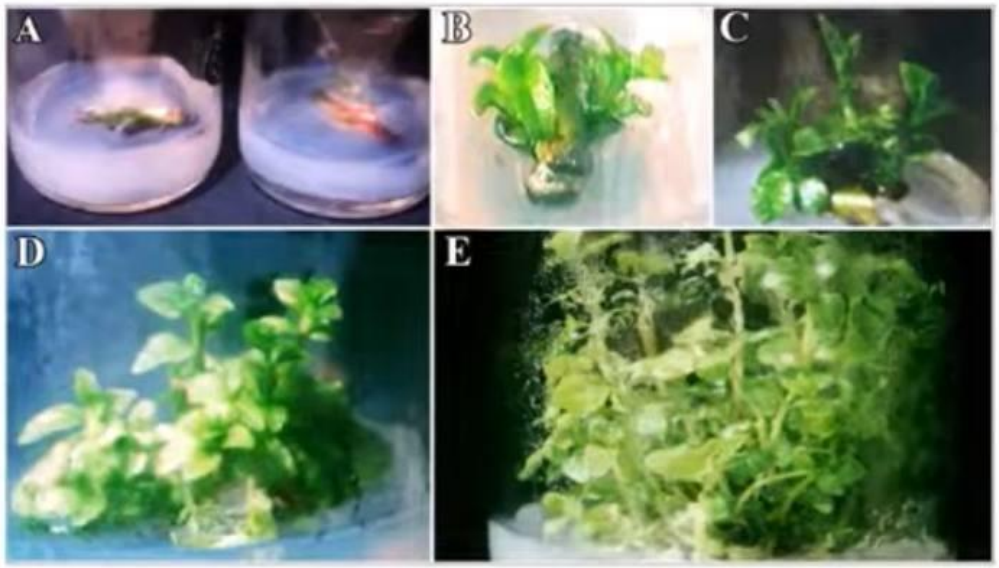


الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

3- مزارع البراعم Bud culture:

تستخدم البراعم الطرفية والجانبية للحصول على نباتات كاملة مماثلة للنبات الأصلي (النبات الأم) فيما يعرف بالتكاثر الخضري الدقيق Micropropagation، ويمكن استخدام هذه الطريقة لإكثار نبات معين بأعداد كبيرة وفي وقت قصير.



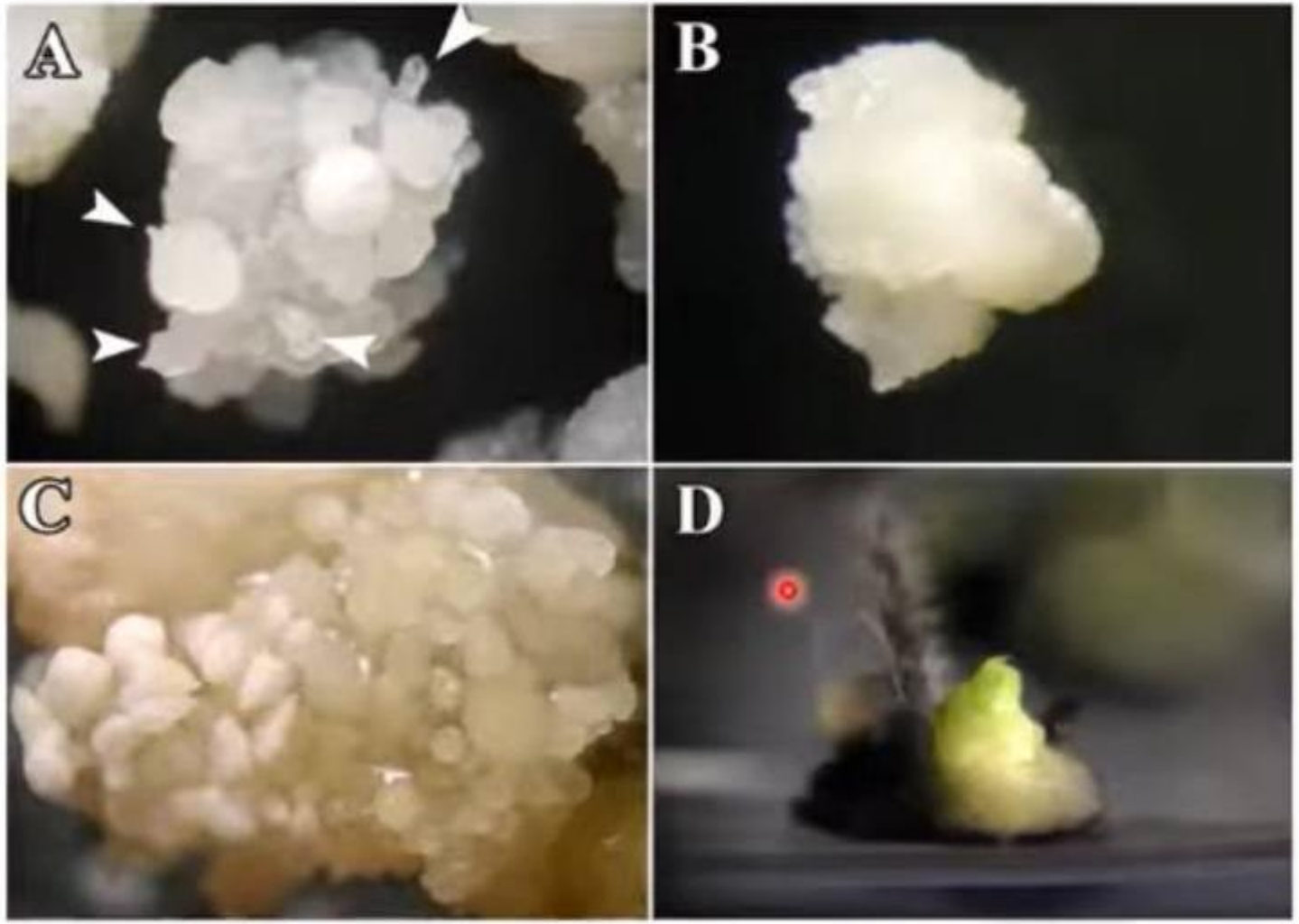


Youssef et al., 2010

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

4- مزارع الكالوس Callus culture:

ينتج أحياناً عند حدوث جرح فى أجزاء النبات تكوّن نمو من خلايا غير متكشفة، هذا النمو يعرف بالكالوس. يتكون ما يشبه هذا النسيج فى مزارع الأنسجة عند استخدام أنواع معينة من منظمات النمو. وتستخدم مزارع الكالوس في العديد من تقنيات زراعة الأنسجة، فعلى سبيل المثال يمكن انتاج الكالوس لاستخدامه في الحصول على أعضاء نباتية أو أجنة خضرية.

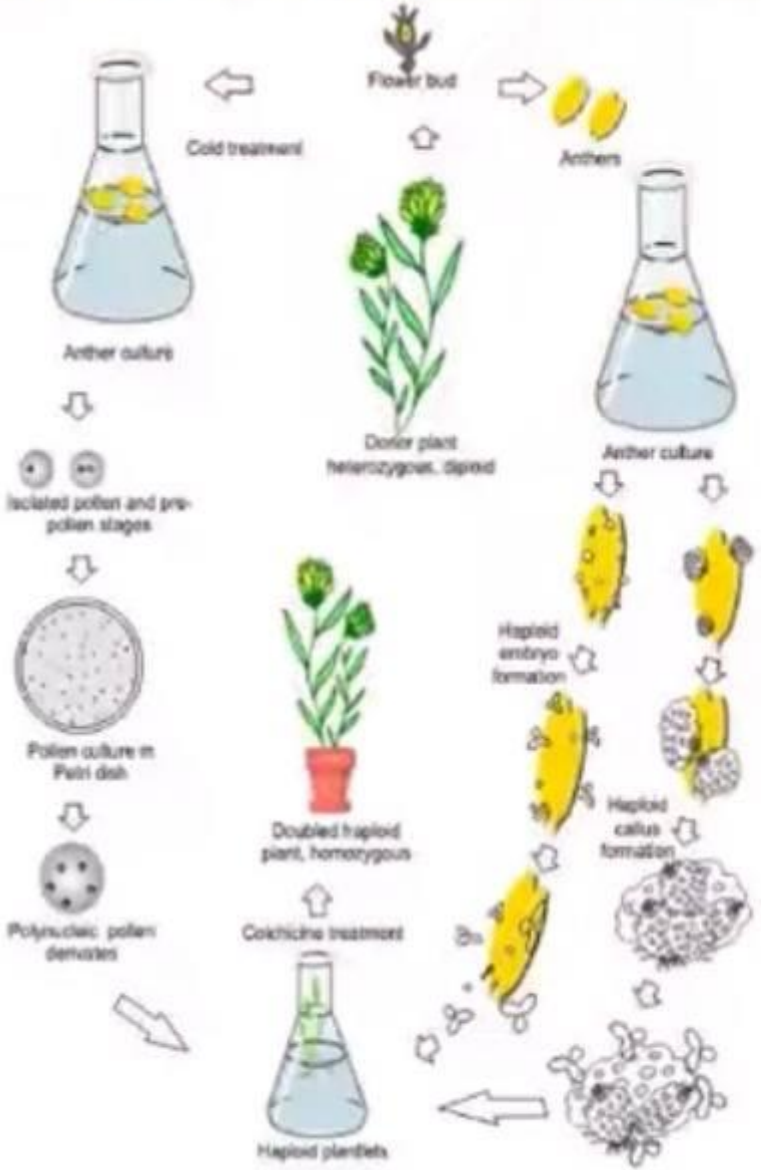


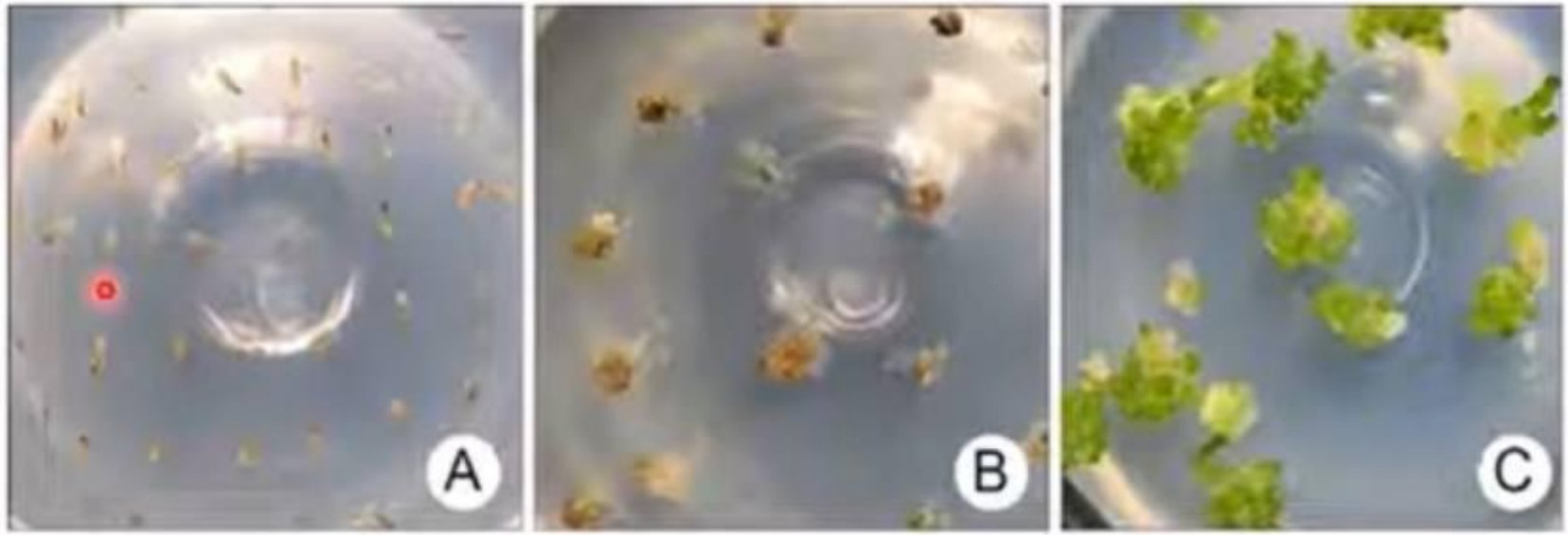
Youssef et al., 2011

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

5- مزارع المتوك وحبوب اللقاح Anther and pollen culture:

عادة ما يستخدم هذا النوع من المزارع لإنتاج النباتات الأحادية Haploid plants وهي التي تحتوي على نصف العدد الكروموسومي للنبات المنزرع. حيث يمكن فيما بعد مضاعفة هذا العدد والحصول على نباتات أحادية متضاعفة Dihaploid تستخدم في برامج تربية النبات وذلك لتحسين العديد من النباتات الهامة واختصار الوقت اللازم للحصول على سلالات نقية بالطرق التقليدية.

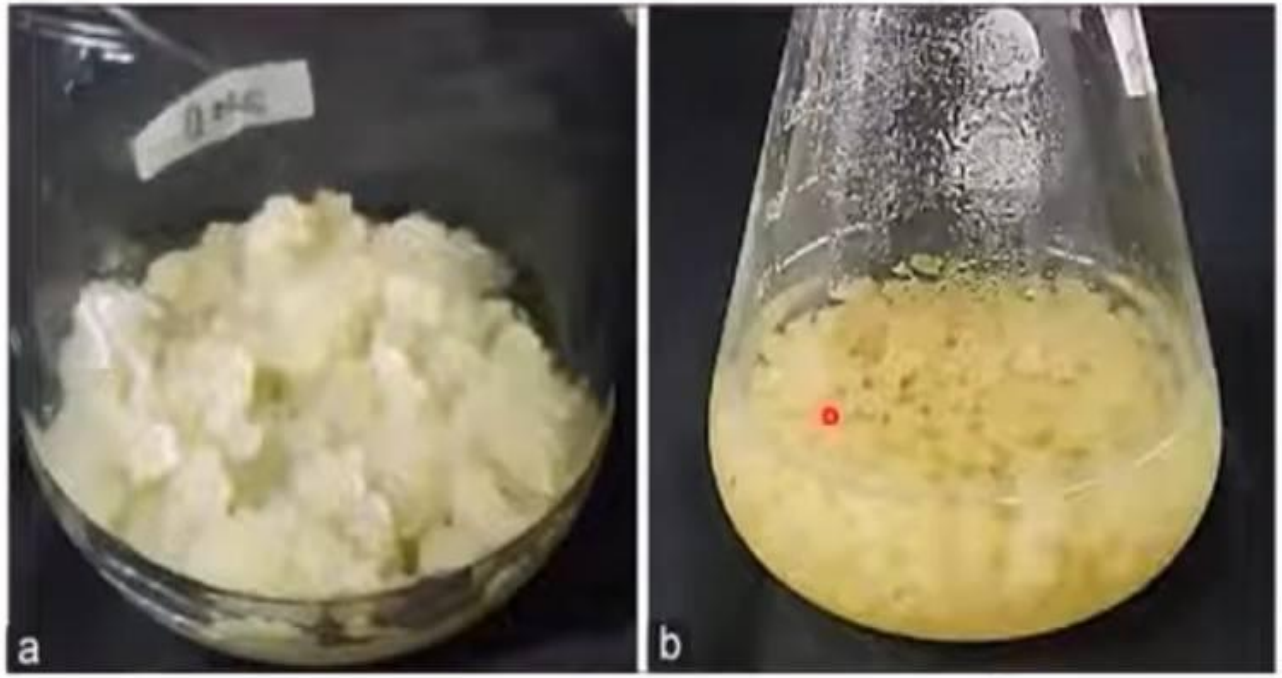




الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

6- مزارع معلقات الخلايا Cell suspension culture:

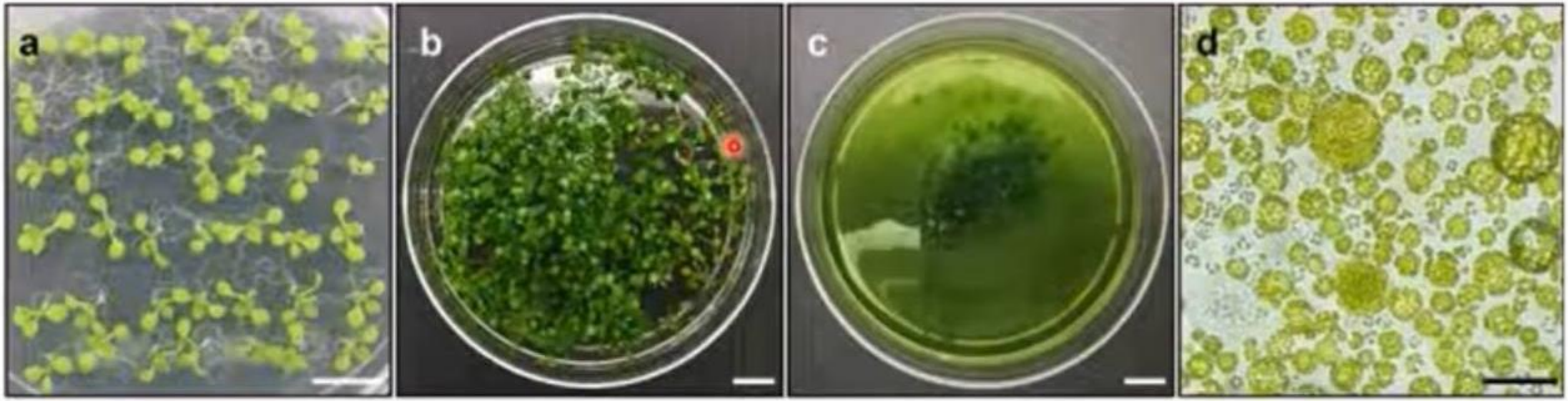
يستخدم الكالوس ذو الخلايا غير المتكشفة في عمل معلق للخلايا في بيئات سائلة، مما يسهل عملية تفكك الخلايا وتفردها عن بعضها ويجعلها تستفيد بأكبر قدر ممكن من المواد الغذائية الموجودة في الوسط. وتستخدم مزارع معلقات الخلايا للحصول على أجنة خضرية بكميات كبيرة جداً، حيث يتحول كل جنين فيما بعد إلى نبات كامل.



الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة

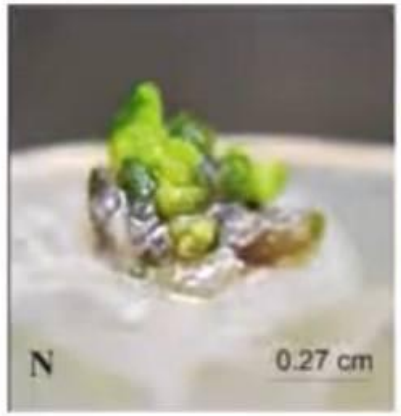
7- مزارع البروتوبلاست Protoplast culture:

يتكون البروتوبلاست من نزع الجدار الخلوي من الخلية النباتية والابقاء على مكونات الخلية محاطة بالغشاء البلازمي. هذا يجعل البروتوبلاست أكثر استجابة، بالمقارنة بالخلايا الكاملة، لتقنيات زراعة الأنسجة المختلفة، مثل التهجين الجسمي Somatic hybridization (التهجين بين الخلايا الجسمية) وتقنيات الهندسة الوراثية. ويمكن الحصول على البروتوبلاست من العديد من الأنسجة النباتية مثل الكالوس ومعلقات الخلايا عن طريق هضم الانزيمي للجدار الخلوي.



التعقيم

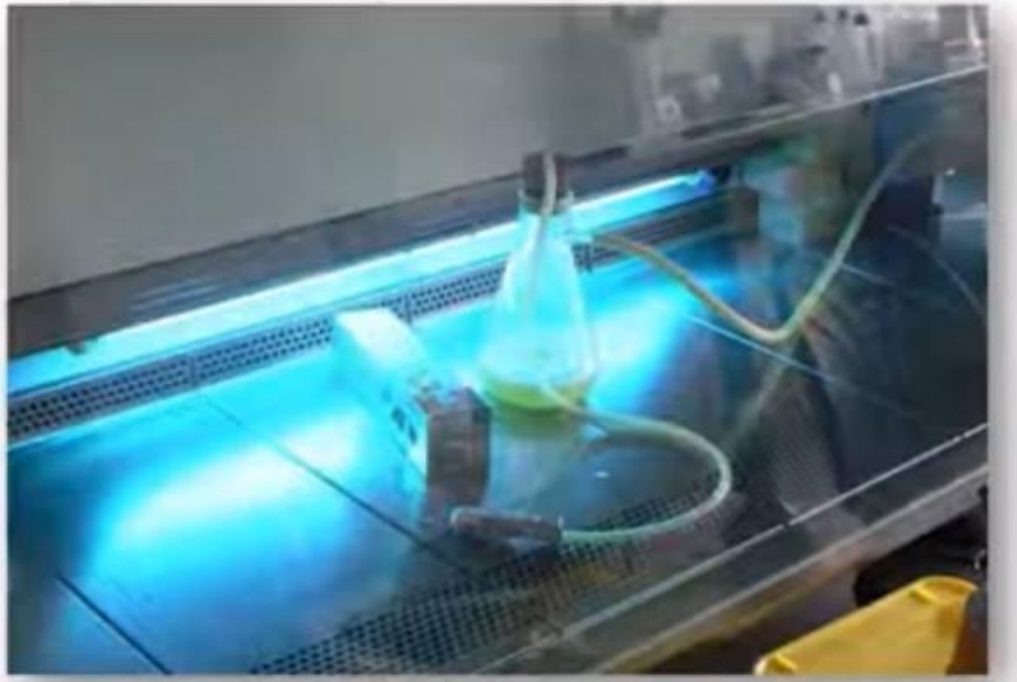
تعتمد تقنية زراعة الأنسجة على استمرارية وجود الظروف المعقمة بداية من تعقيم البيئة الغذائية والأجزاء النباتية المنزرعة وصولاً إلى التحضين في مكان نظيف ومعقم. وتتباين طرق التعقيم على حسب الشيء المراد تعقيمه والطريقة المناسبة لذلك.



ويعرف التعقيم على أنه **إزالة أو إبادة لجميع الكائنات الحية الدقيقة في الشيء المراد تعقيمه**

الإبادة الطبيعية Physical destruction

وهي تتم إما بهواء جاف ساخن Dry hot air أو بالبخار Steam أو بالإشعاع Irradiation.



121°C / 20min

160°C / 4h

Physical removal الازالة الطبيعية

وهي تتم بالغسيل أو بالترشيح Filtration.

الخطوات العامة لتعقيم الجزء النباتي المنزرع:

1- غسيل الجزء النباتي في محلول رغوي (صابون سائل)، خاصة للأجزاء النباتية الخاصة بالنباتات الشجرية.

2- يترك الجزء النباتي تحت ماء الصنبور الجاري لمدة 10-30 دقيقة.

3- يغمس الجزء النباتي في كحول 70% لمدة بعض الثواني (بحد أقصى دقيقة).

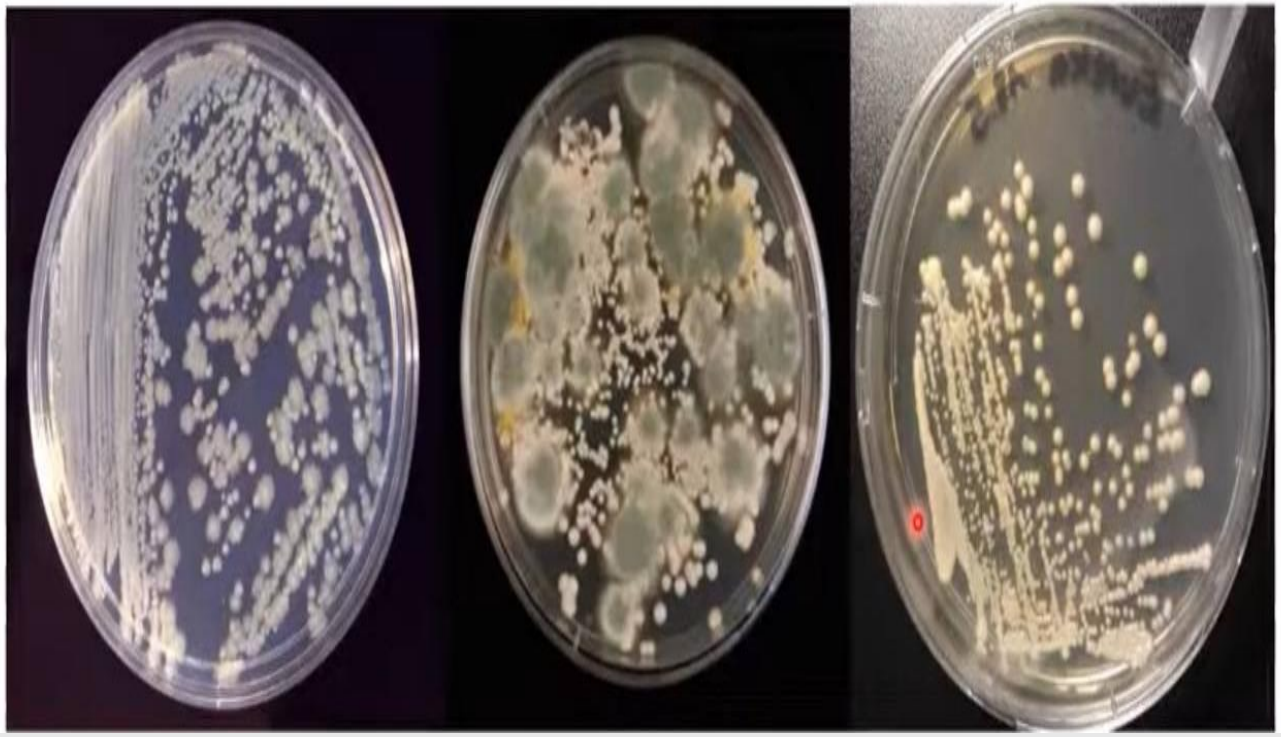
4- تحت ظروف معقمة (كابينة الزراعة) يغمس الجزء النباتي في أحد المعقمات لمدة 5-10 دقيقة ويمكن إضافة عامل مساعد مثل الـ Tween 20 ليساعد المعقم للوصول الى سطح النسيج.

5- في بعض الأنسجة صعبة التعقيم نحتاج إلى جهاز تفريغ هواء لمساعدة المعقم.

6- في نهاية التعقيم يجب غسيل الجزء النباتي ثلاث مرات بماء مقطر معقم.

Contamination التلوث

يعتبر التلوث بالكائنات الحية الدقيقة من أهم المشكلات التي تواجه المشتغلين بزراعة الأنسجة. وغالباً ما يكون التلوث ناتج من نمو خلايا بكتيرية أو فطريات أو خمائر.



Contamination التلوث

ويختلف مصدر التلوث، فيمكن أن يكون:

1- الجزء النباتي المنزرع.

2- البيئة الغذائية.

3- التداول أثناء عملية الزراعة.

4- غسيل الجزء المنزرع بعد تعقيمه بماء غير معقم.

5- أوعية الزراعة غير محكمة الغلق.

6- معمل التحضين.

التلوث Contamination

للتخلص من هذه المشكلة يجب الأخذ في الاعتبار النقاط التالية:

1. تعقيم الجزء النباتي باستخدام الطريقة المناسبة والتركيزات الصحيحة.
2. يمكن رج الأجزاء النباتية قبل التعقيم في محلول من الصابون السائل والكلور أو مادة الـ SDS لمنع التوتر السطحي وضمان وصول المعقم لسطح الجزء النباتي.
3. استخدام وقت كافي للتعقيم، حيث يمكن تجربة أكثر من وقت حتى الوصول للوقت المناسب.
4. التأكد من تعقيم الماء المقطر المستخدم في غسيل الجزء النباتي بعد التعقيم.
5. ضرورة تعقيم حجرة الزراعة وكابينة الزراعة والأدوات المستخدمة وأيدي القائم بالزراعة، كما يفضل استخدام غطاء للرأس والفم أثناء الزراعة.
6. التأكد من إحكام غلق أغطية الزجاجيات المستعملة في الزراعة.
7. ترك البيئة الغذائية فترة كافية 2-4 أيام بعد خروجها من الأوتوكليف في المعمل قبل استخدامها في الزراعة لضمان التعقيم.
8. التأكد من نظافة وفعالية فلتر الهواء الخاص بكابينة الزراعة.
9. التأكد من نظافة معمل التحضين وخلوه من الحشرات، حيث وجد أن النمل الصغير وبعض أنواع القراد يمكنه دخول أوعية الزراعة والتنقل بينها مما يساعد في نقل الكائنات الدقيقة وتلوث الزراعات.
10. يمكن استخدام بعض المبيدات الفطرية الجهازية والمضادات الحيوية إذا كان مصدر التلوث بالفطريات أو البكتريا ناتج من أنسجة النبات الداخلية.