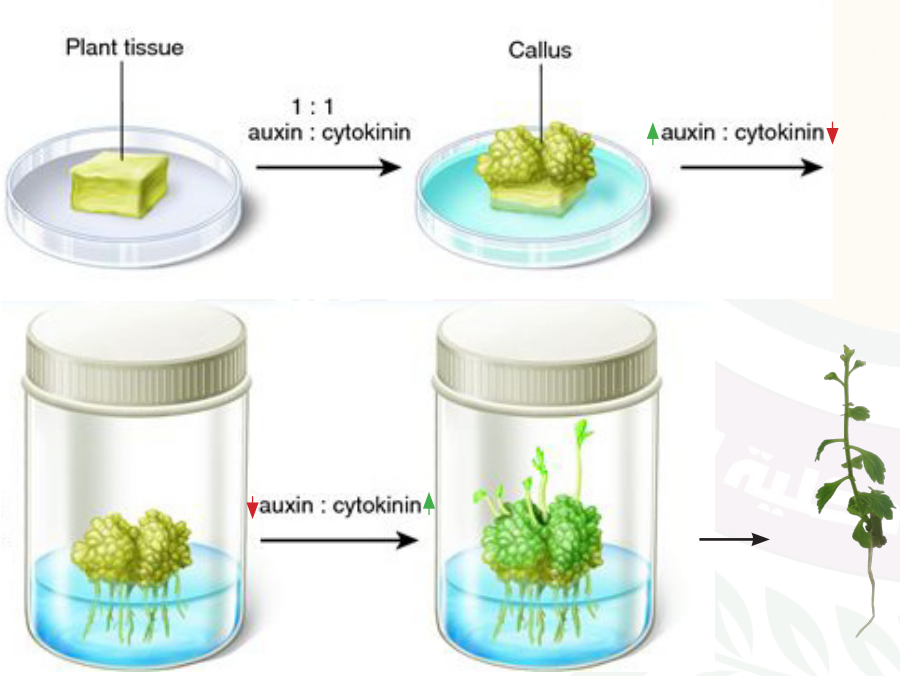
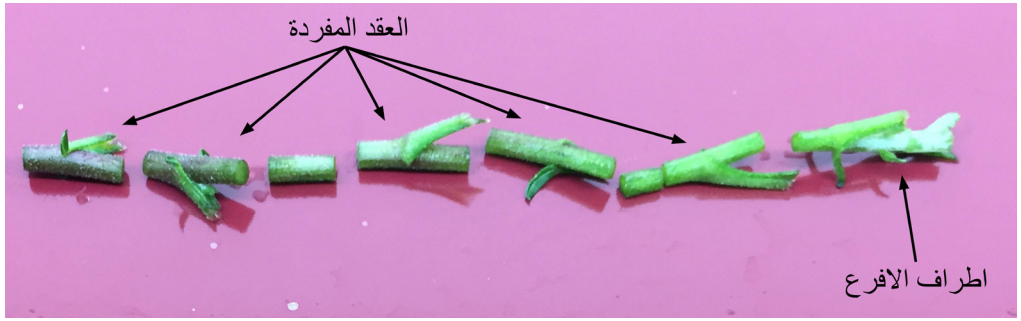
Plant tissue culture
Laboratory-organization

زراعة نسيج النبات
المختبر وتنظيمه

تستخدم عبارة زراعة نسيج النبات لوصف عملية نمو اي جزء نباتي خارج الجسم الحي، على وسط غذائي وتحت ظروف التعقيم.
استندت هذه التقانة على ثلاثة اهداف اساسية :-

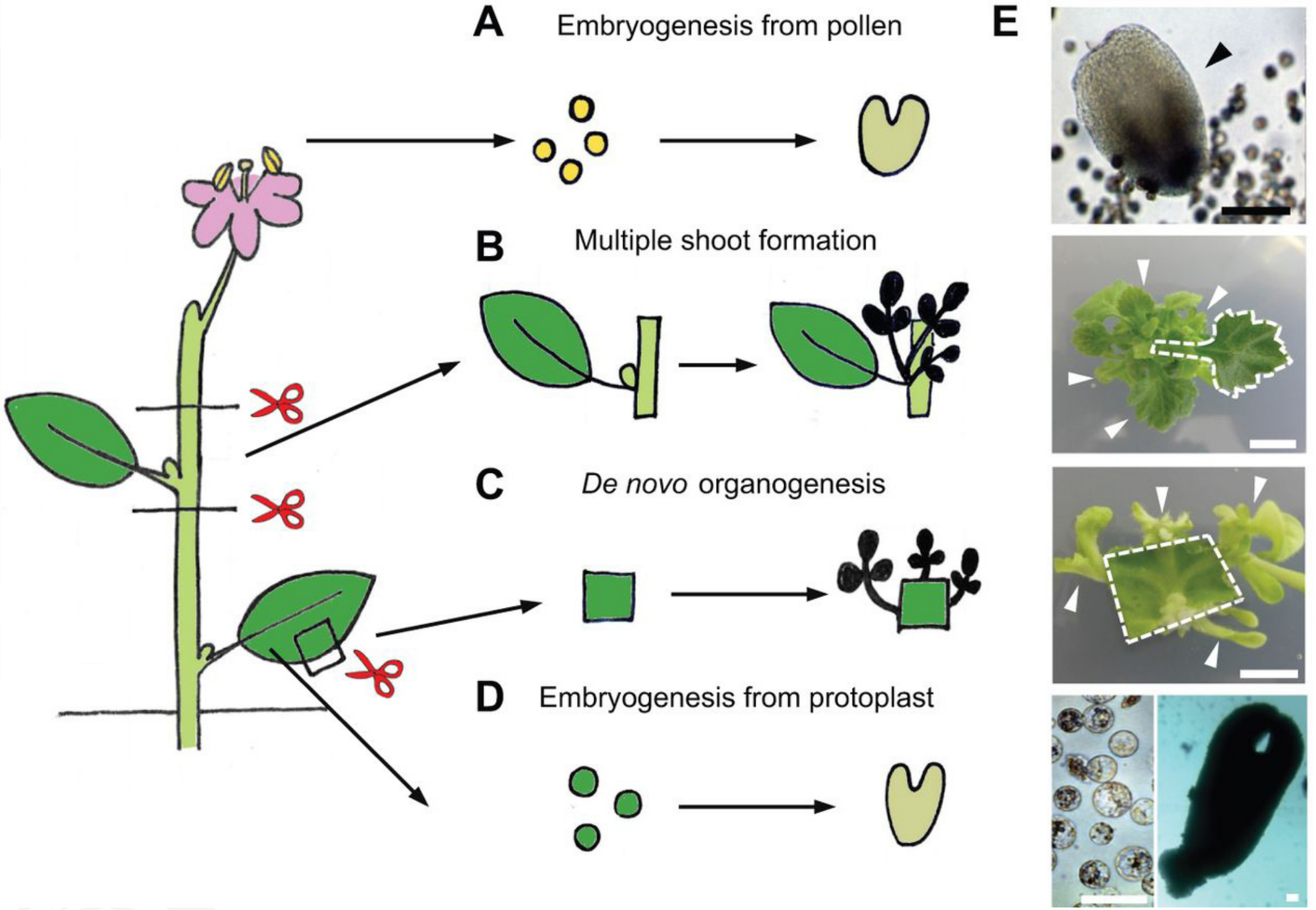
1. عزل الجزء النباتي من بقية جسم النبات.
2. حفظ الجزء النباتي تحت ظروف فيزيائية (بيئية) وكيميائية معروفة ومسيطر عليها.
3. يجري العمل تحت ظروف التعقيم.



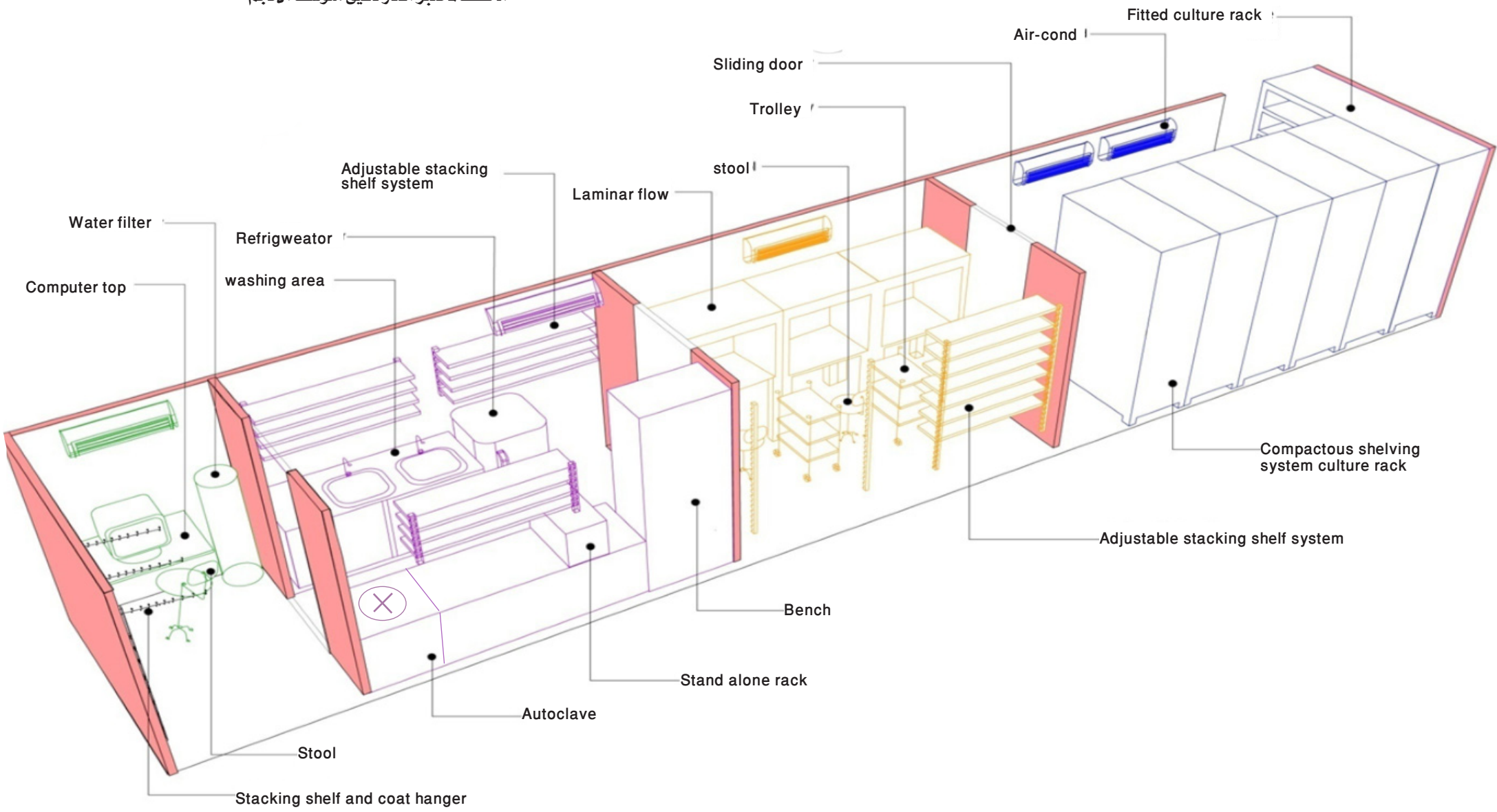


تتطلب عملية التعقيم درجة عالية من النظافة داخل المختبر سواء وظفت هذه التقانة في عملية الاكثار اليومية او كطريقة لدراسة التغيرات الوراثية او الايضية او التطورية في النبات، او لاحداث اختلافات جديدة في النبات باستخدام الهندسة الوراثية، وهناك متطلبات اساسية كحد ادنى للتنظيم يجب توفرها في العاملين في مختبرات زراعة الانسجة، تتضمن الآتي:-

1. منطقة للغسل.
2. منطقة لتحضير وتعقيم وخزن الاوساط.
3. منطقة للزراعة (منضدة انسياب الهواء الطبقي) لانجاز العمل تحت ظروف معقمة.
4. غرف النمو او الزراعة.
5. منطقة لأجراء التجارب وتسجيل الملاحظات.


A
Embryogenesis from pollen
B
Multiple shoot formation
C
De novo organogenesis
D
Embryogenesis from protoplast
E

مخطط لمختبر اكثار دقيق متوسط الحجم



Changing Area

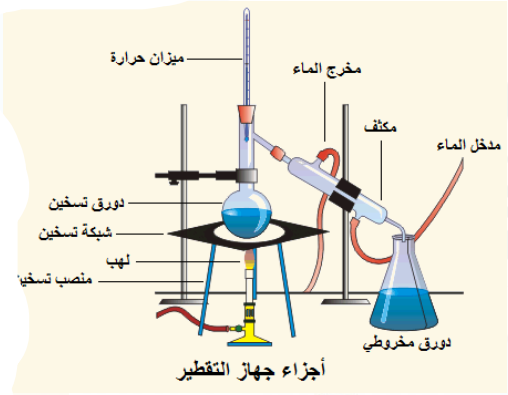
Media Preparation Area

Transfer Room

Growth Room

متطلبات الزراعة Culture facility

أ- متطلبات عامة تتضمن وحدة تقطير الماء وزجاجيات (دوارق باحجام مختلفة، انابيب الزراعة، قناني، بيكرات، اسطوانات قياس مدرجة، ماصات، اقماع، قناني لخزن الماء المقطر، محاليل الاصل وكواشف) كذلك ثلاجات ومجمدات لخزن محاليل الاصل، كيميائيات، ميازين ،صفائح حارة Hot plates، فرن، جهاز معقام حراري، مجهر مجهز بكاميرا، خزانات لحفظ الكيميائيات، اجهزة خلط، جهاز قياس الاس الهيدروجيني، قوارير كبيرة لتحضير الوسط، كيميائيات عالية النقاوة (Chemicals of pure grades)، قطن، لفات من رقائق الالمنيوم وقضبان زجاجية... الخ.



أجزاء جهاز التقطير

DKŽkł ĘÓ ă Æơ Ny f p

Rotary shaker

ب- متطلبات في غرفة الزراعة In culture room

تشتمل على غرفة نمو الزروعات النباتية تجهز بمكيفات هواء ووحدة سيطرة على درجات الحرارة مع وجود مؤقتات زمنية. كذلك تشتمل على منظم للسيطرة على طول الفترة الضوئية، مرطبات (Humidifiers)، رفوف، خلاط دوار (Rotary shaker)، كابينة انسياب الهواء الطبقي، اغطية للشعر، قفازات، مصابيح اشعة فوق بنفسجية، مجهر، اضافة الى اماكن لخزن الاوساط.

2 - ظروف الزراعة Culture conditions

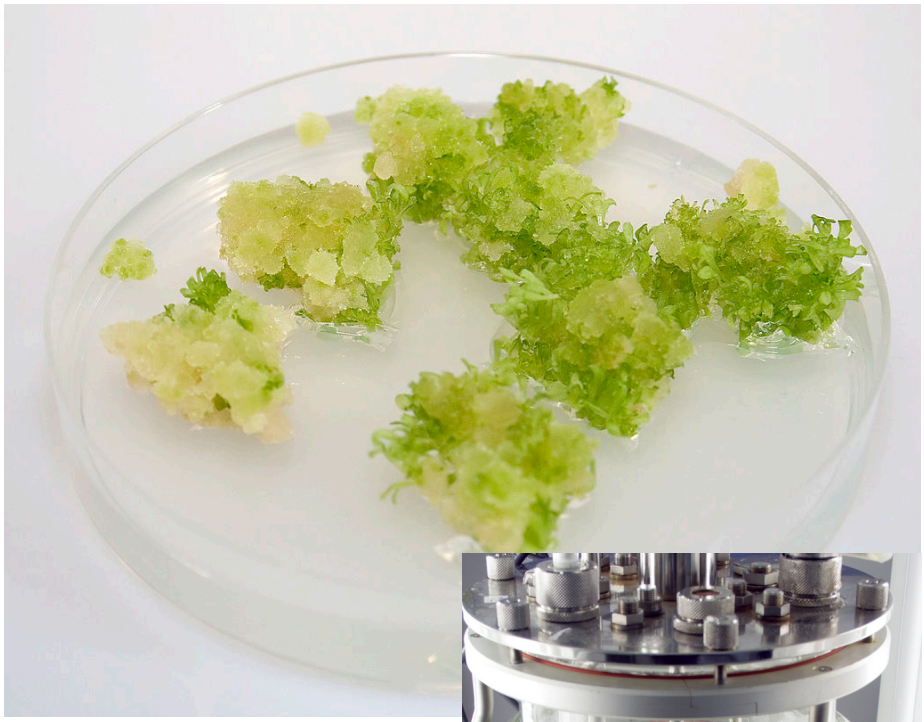
تشتمل بيئة الزراعة على المحلول المغذي (الوسط) وظروف الزراعة المناسبة لنمو الاجزاء النباتية المختلفة.

أ- وسط الزراعة: يمكن زراعة خلايا النبات على وسط مغذي بسيط مقارنة بخلايا الحيوان التي تحتاج الى مواد معقدة. تعد اوساط Murashige و1962، Skoog وB5 لـGamborg وآخرون، 1968، اكثر الاوساط استخداما في هذا المجال. تشترك جميع الاوساط بصيغ متشابهة ولكن بمركبات مختلفة. علما ان اسماء الاوساط اشتقت من اسماء العلماء الذين اكتشفوها.

ب- الظروف الفيزيائية: لظروف الزراعة تأثير مباشر في نمو النسيج وبشكل عام يتطلب العمل بالزراعة النسيجية توفر الظروف التالية:-

- درجة حرارة حضن (22-28°م).
- اضاءة من صفر- 5000 لوكس بفترة اضاءة (16 - 18) ساعة.
- رطوبة نسبية حوالي 60 %.
- اعادة زراعة النسيج Subculture :

تتطلب (2 - 8) اسابيع للزراعة على الاوساط الصلبة و(1-2) اسبوع لمعلقات الخلايـــا .



المكونات الكيميائية للوسط الغذائي MS من شركة Hi-media.

Ingredients	mg. l^{-1}
Macro elements	
Ammonium nitrate	1650.0
Calcium chloride	332.20
Magnesium sulphate	180.69
Potassium nitrate	1900.0
Potassium phosphate monobasic	170.00
Micro elements	
Boric acid	6.2000
Cobalt chloride hexahydrate	0.0250
Copper sulphate pentahydrate (EDTA)	0.0250
Disodium salt dihydrate	37.300
Ferrous sulphate heptahydrate	27.800
Manganese sulphate monohydrate	16.900
Molybdic acid (sodium salt)	0.2130
Potassium Iodide	0.8300
Zinc sulphate heptahydrate	8.6000
Vitamins	
Myo-Inositol	100.00
Nicotinic acid (free acid)	0.5000
Pyridoxine HCl	0.5000
Thiamine hydrochloride	0.1000
Amino acid	
Glycine	2.0000
Others	500.00
Total ($g.l^{-1}$)	4.9000

العناصر الكبرى

النيتروجين (N): يؤثر على معدل نمو النبات وضرورى لتكوين الكلوروفيل والقلويدات والأحماض النووية وهرمونات النمو والأحماض الأمينية مصادر النيتروجين لبيئة زراعة الأنسجة بصوره: الامونيوم NH4 والنترات NO3.

الفسفور (P): ويتركز فى الأجزاء المرستيمية إلا أن دوره غير معروف بالضبط ويرجح أن له دور فى تنشيط الإنزيمات. بصوره: فوسفات البوتاسيوم ، فوسفات الصوديوم.

البوتاسيوم (K): ضرورى للإنقسام الطبيعى للخلية وتكوين الكربوهيدرات والبروتينات، بصوره: نترات بوتاسيوم أو فوسفات بوتاسيوم.

الكبريت (S): يوجد فى بعض جزيئات البروتين. يشجع النمو الجذرى والخضرى، بصوره: سلفات SO4.

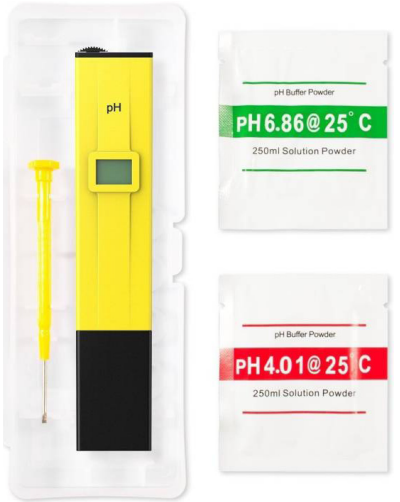
الكالسيوم (Ca): يلعب دور فى نفاذية الجدار الخلوى ويسهل حركة الكربوهيدرات والأحماضالامينية خلال النبات كما أنه يشجع نمو الجذور، بصوره: كلوريد الكالسيوم أو نترات الكالسيوم.

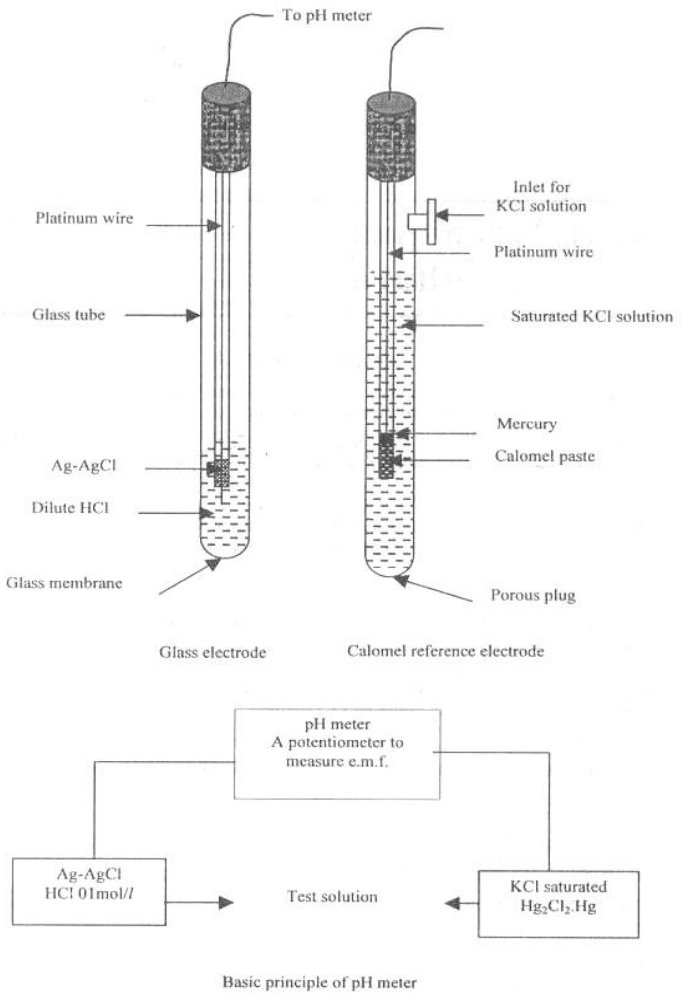
الماغنسيوم (Mg): يعتبر العنصر المركزى فى جزئ الكلوروفيل. هام جدا كمنشط إنزيمى. نقصه يسبب شحوب الأوراق، بصوره: كبريتات الماغنسيوم.

أدوات زراعة نسيج النبات
Tools for Plant Tissue Culture

اولاً: pH meter (جهاز قياس الأس الهيدروجيني)

يستخدم لياس الاس الهيدروجيني للوسط وضبطه (5.8-6).

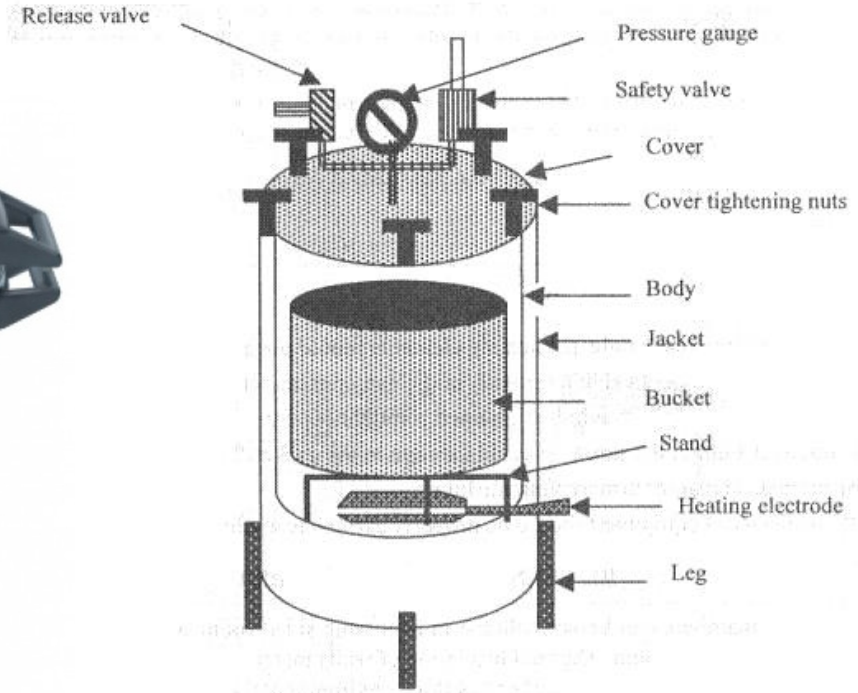




تركيب PH مع الاقطاب ومبدا العمل

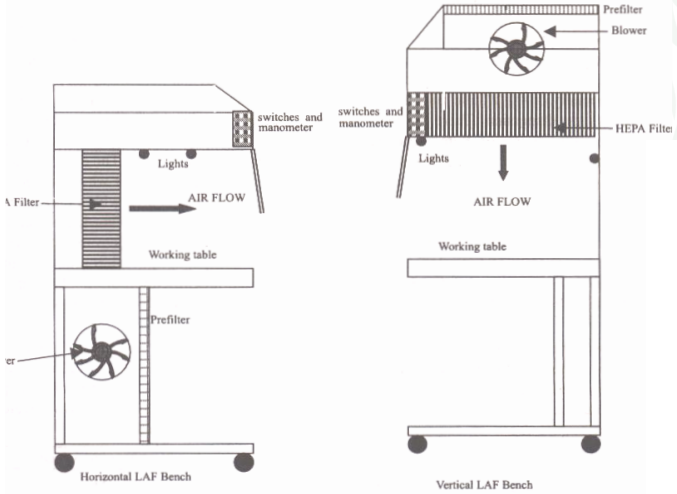
ثانياً: المعقام الحراري Autoclave

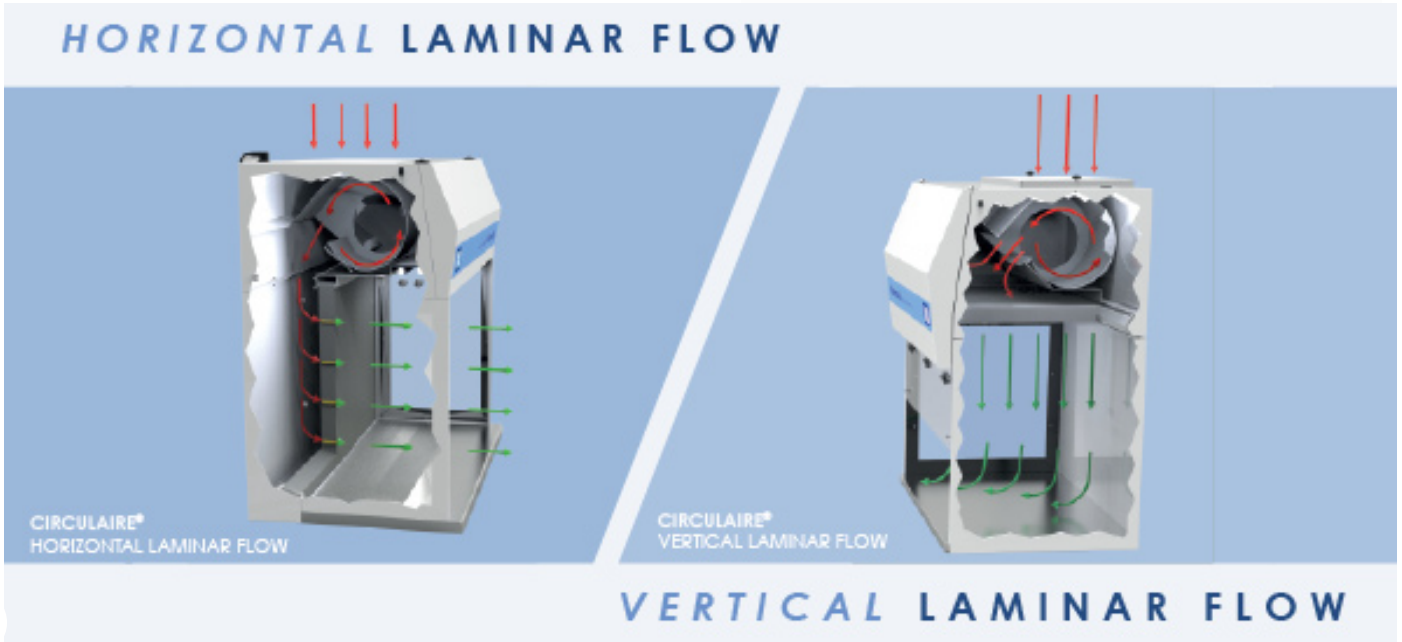
يستخدم المعقام الحراري في تعقيم الوسط والزجاجيات والادوات المستعملة في زراعة انسجة النبات، وهو نفس الجهاز المستخدم في المستشفيات لتعقيم ادوات القياس والقطن والادوات والبياضات والملابس الكتانية ... الخ، تجرى عملية تعقيم المواد برفع الحرارة الرطبة (121°م) نتيجة ارتفاع الضغط داخل القناني (15 - 22) psi، رطلا لكل انج مربع او (1.02-1.5) كغم/ سم^2 لمدة 15 دقيقة في عملية التعقيم الروتينية لقتل الاحياء الدقيقة وجعل المواد خالية من الميكروبات.

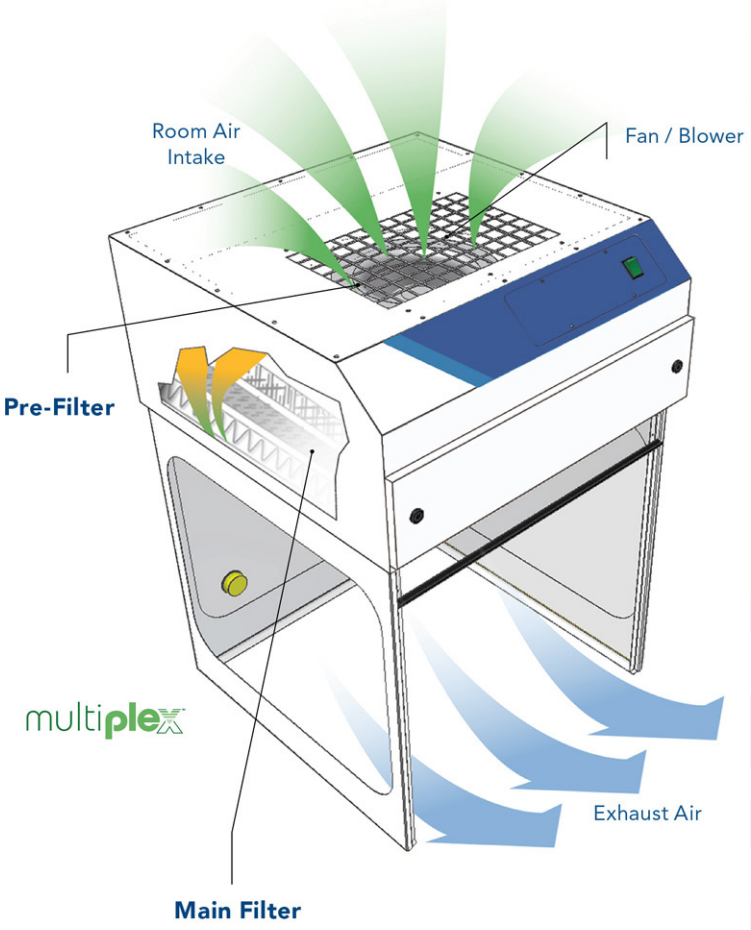


رابعاً : منضدة انسياب الهواء الطبقي Laminar air flow bench (LAF)

هي منضدة العمل الرئيسية لمشاريع زراعة انسجة النبات تحت ظروف التعقيم، وهي مزودة بمصفاة دقائقية عالية الكفاءة (HEPA) تسمح بمرور الهواء وتحجز مرور الجزيئات والأحياء الدقيقة، كما وتحوي على مصدر اشعة فووق بنفسجية لتعقيم الكابينة.







خامسا : جهاز الصفيح الساخن الدوار
stirrer magnetic hot pleat

يستخدم لتسخين ومزج مكونات الوسط الغذائي لوجود هيتر كهربائي واستخدام تقنية الطرد المغناطيسي في تدوير الوسط الغذائي .

سادسا : الميزان الحساس
Electronic Weighing Scale

يستخدم لقياس اوزان المواد بدقة عالية وباجزاء من الغرام.

التعقيم Sterilization

يتطلب العمل في مجال زراعة الانسجة درجات عالية من التعقيم (الخلو من الجراثيم) في جميع خطوات العمل، خاصة في وحدات الانتاج التجاري حيث ان تلوث دفعة من الزروعات ربما يسبب خسارة مادية كبيرة او حتى خسارة سلالة نباتية كاملة. عليه تفرض اجراءات وقائية صارمة لدخول الاشخاص والمواد الحية، وتتبع النظم الاساسية والتطبيقات العملية للتعقيم في جميع مختبرات زراعة الانسجة:

اولاً: نظافة المختبر Laboratory- cleanliness

ظرورة الاهتمام بتعقيم المختبر والمحافظة على نظافته باستمرار.

ثانياً: الادوات والاوساط Tools and media

تجرى جميع خطوات الزراعة النسيجية تحت ظروف التعقيم، لذا فأن جميع المواد المستعملة في العمل تكون خالية من الجراثيم ومعقمة. وتتبع طرق مختلفة لهذا الغرض اعتمادا على نوع المادة وطريقة التعقيم. واساسا تختلف طرق تعقيم المواد النباتية الحية عن طرق تعقيم الادوات والزجاجيات. تتوفر حاليا العديد من المواد الجاهزة للاستعمال معقمة باشعة كاما وتستخدم لمرة واحدة. ان توفر هذه المواد سهل وبشكل ملحوظ العمل في مجال الزراعة النسيجية.

تستخدم ثلاث طرق للتعقيم في المختبرات:-

1. التسخين الجاف Dry heat

توضع الزجاجيات والادوات المعدنية وبقية المواد التي لا تحترق بالحرارة العالية في حاويات أو تلف بالورق أورقائق الالمنيوم السميكة وتوضع في الفرن الجاف وتعقم لمدة لا تقل عن ثلاث ساعات على درجة حرارة (140-160م°). ولايمكن تعقيم الاوساط والادوات البلاستيكية بهذه الطريقة.

جهاز الفرن الكهربائي

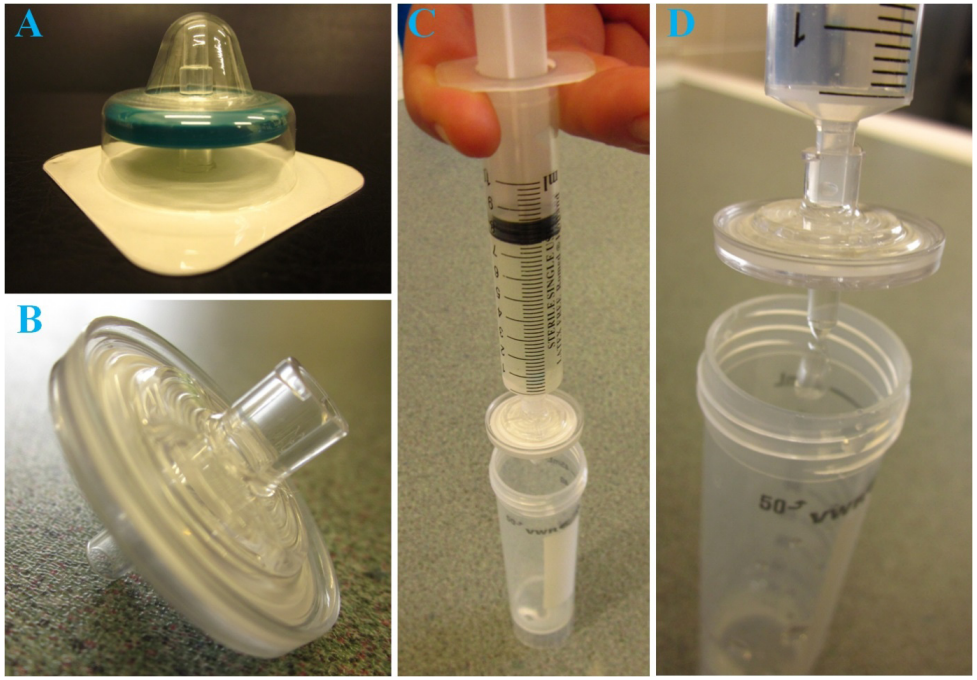
2. التسخين الرطب Wet heat

من اكثر الطرق شيوعا في تعقيم الادوات والاوساط هي استخدام المعقام الحراري (صفحة 10) على درجة 121°م، بضغط 15psi (رطل لكل أنج مربع) ولمدة 15دقيقة (1.02 كغم/سم2)، لأجهزة المعقام الحديثة القدرة على توليد معالجات

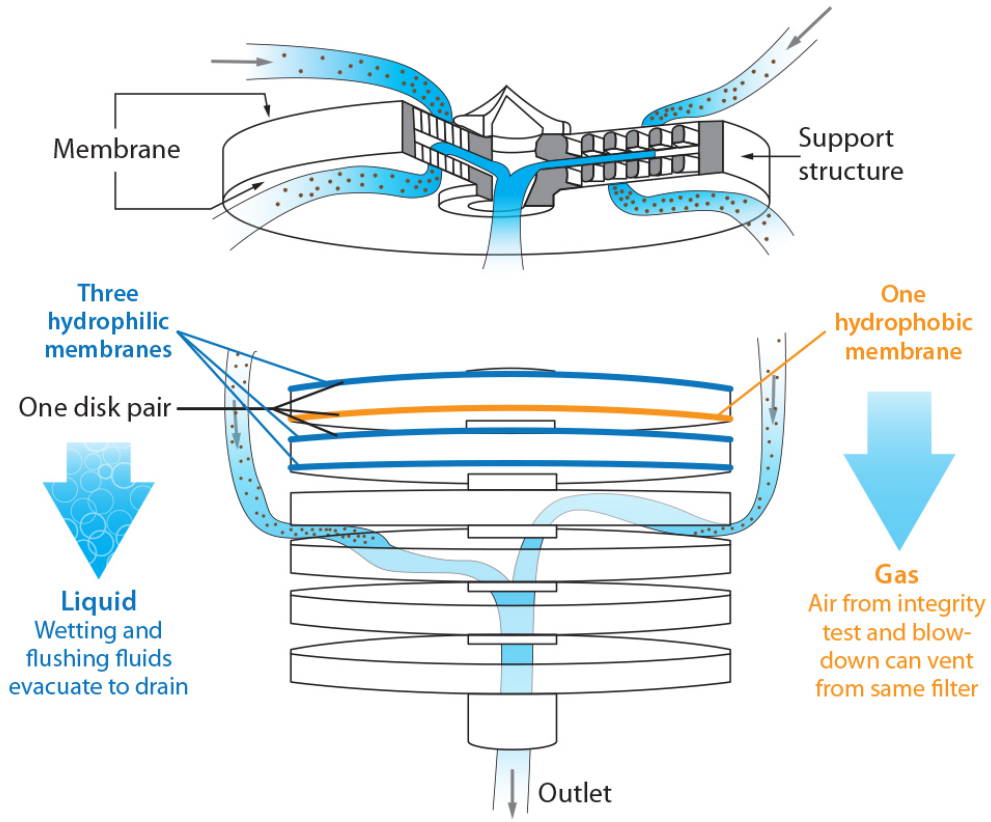
بالبخار المشبع لرفع درجة الحرارة الى (70-132°م) ليرتفع الضغط الى 25 رطل لكل أنج مربع. ويجب وضع القناني الحاوية على الوسط بشكل عامودي ولا يملأ اكثر من 40% من سعتها الاجمالية بالوسط. وهناك علاقة بين كمية الوسط المراد تعقيمه وطول مدة التعقيم جدول(4-1). تتطلب الاحجام الكبيرة مدة تعقيم اطول على درجة حرارة 121°م.

3. التعقيم بالترشيح Filter sterilization

يستخدم التعقيم بالترشيح او التعقيم البارد في حالة عدم امكانية التعقيم الحراري للمحلول او الوسط، تعمل مسامية المرشح (0.22 –0.45mμ) على حجز الاحياء الدقيقة فتجعل المحلول خالي منها .



طريقة استعمال المرشح



كيفية التعقيم بالمرشح

ثالثاً: تعقيم الادوات Sterilization of tools

تغمر مثل هذه المواد بضمنها الملاقط عادة في الكحول الاثيلي 80% (حجم / حجم) داخل اللمنر لحين استعمالها.

رابعاً- تعقيم الجزء النباتي Explant sterilization

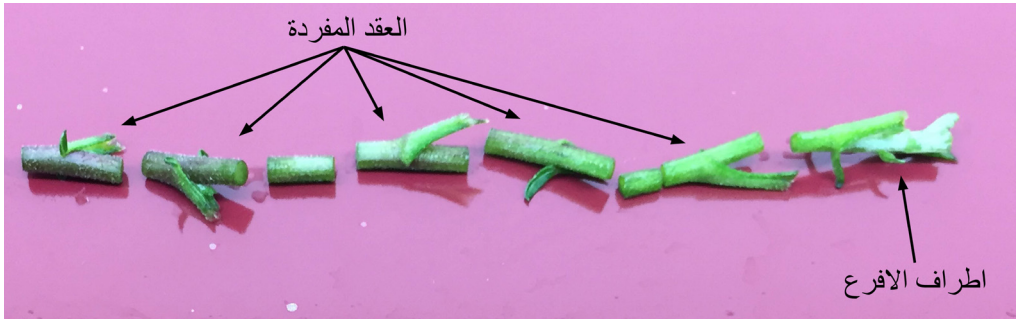
يجب تعقيم جميع الاجزاء النباتية قبل نقلها الى الوسط، ويمكن تعقيم الاجزاء النباتية المحضرة باحجام مناسبة باحد المحاليل التالية :-

1. محلول هايبوكلورات الصوديوم بتركيز 1-4 % (القاصر التجاري).
2. المحلول المشبع لهيبوكلورايت الكالسيوم بتركيز 7 %.
3. محلول البروم المائي بتركيز 1 %.
4. الكحول الاثيلي بتركيز 70 %.
5. كلوريد الزئبق بتركيز 0.1 - 0.2 %.
6. محلول بيروكسيد الهيدروجين بتركيز 10 %.
7. محلول نترات الفضة بتركيز 1 %.

لايشجع حاليا على استخدام المعادن الثقيلة كالزئبق كونها تحتاج الى طرق خاصة للتخلص منها بعد الاستعمال.

تهيئة الاجزاء النباتية وتعقيمها

تستعمل العقل الحاوية 2-3 عقدة من افرع حديثة للنبات وتغسل بالماء الجاري لعدة مرات، ثم تعقم سطحيا بعد اختيار مادة التعقيم ولنفرض هنا هايبوكلورات الصوديوم (القاصر التجاري)، تتم جميع العمليات داخل كابينة انسياب الهواء الطبقي، وباستعمال التركيز الموصى به لكل نبات (من البحوث العلمية) ولنفرض هنا 20 حجم لحجم (v/v) من هايبوكلورات الصوديوم ولمدة محددة (من البحوث العلمية) على افتراض 6 دقيقة، وهنا يستخدم سلندر حجم 100 مل اذ يضاف 20 مل من القاصر وهنا يمثل 20 (v/v) ويكمل الحجم الى 100 مل بالماء المقطر المعقم مسبقا والمخزون، مع اضافة قطرة من المادة الناشرة الصابون السائل (الزاهي التجاري) او Tween-20 لمحاليل التعقيم، تغمر الاجزاء النباتية بمحاليل التعقيم للمدة المحددة مع الرج المستمر طول مدة التعقيم وبعد سكب محلول التعقيم من اناء الغسل في اناء كبير معقم داخل اللمنر ثم يضاف لها الماء المقطر المعقم لتغسل لمدة 5 دقائق مع الرج المستمر بواقع ثلاث مرات، ثم تقطع الى عقد مفردة باستعمال شفرات معمة وتزرع في القناني الحاوية على وسط MS وبواقع عقدة واحدة لكل قنينة.



الوسط وتحضيره Medium and its preparation

طورت الاوساط الغذائية المعروفة اليوم والتي تلبي متطلبات زراعة خلايا وانسجة النبات خلال الاعوام (1930–1950). تحتوي جميع الاوساط الغذائية على نفس العناصر المغذية التي يحتاجها النبات الكامل، ان اكتشاف منظمات النمو خلال تلك الفترة وتطور المعرفة حول تغذية النبات وخصوصا العناصر الصغرى والفيتامينات اسهم كثيرا في تطور الاوساط المغذية. والجدير بالذكر ان اكتشاف اندول حامض الخليك (IAA) عام 6192 من قبل F. W. Went والكاينتين من قبل Skoog ومساعديه عام 1955، قد تبعه تحديد مفهوم الTotipotency وتنظيم عملية التكوين التشكيلي (Morphogenesis) تبعا لاختلاف نسبة الاوكسين الى السايتوكاينين في نبات التبغ من قبلSkoog وMiller عام 1957.

استندت الاوساط التى استخدمها اوائل العاملين في تركيبها على محلول Knop المغذي، ولاحقا طورت اوساط من قبل White عام 1943 وMiller عام 1953، ويعتبر وسط Murashige و1962 Skoog علامة بارزة في ابحاث الزراعة النسيجيه وهو الوسط الاكثر استعمالاً في هذا المجال، وقد طورت اوساطاً اخرى استنادا الى تركيبة هذا الوسط لتلبية الاحتياجات التجريبية المختلفة وتأمين احتياجات نوع معين من النبات، من هذه الاوساط :-

1. وسط Linsmaier and Skoog ، 1965.
2. وسط B5 Gamborg et al.، 1968.
3. وسط Schenk and Hilderbrandt، 1972.
4. وسط Nitsch and Nitsch، 1969.
5. وسط Llyod and Mc Cown، 1980 للنباتات الخشبية.

وقد تقدمت طرق زراعة الانسجة النباتية الى مستوى امكن معه زراعة نسيج اي نبات بنجاح، ان نجاح زراعة نسيج النبات يعتمد على اختيار الوسط المغذي، حيث يمكن تنمية انسجة اغلب انواع النبات على اوساط معروفة، والتى تحتوي على الاملاح المعدنية ومصدر للكربون (عادة يكون السكروز) والفيتامينات ومنظمات النمو، يستعمل وسطMS الذي صمم لنبات التبغ، حاليا على نطاق واسع لزراعة الخلية والكالس لانواع مختلفة من النباتات.

Gamborg B5

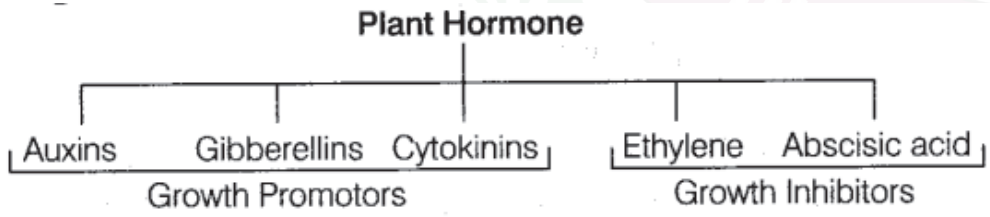
MS

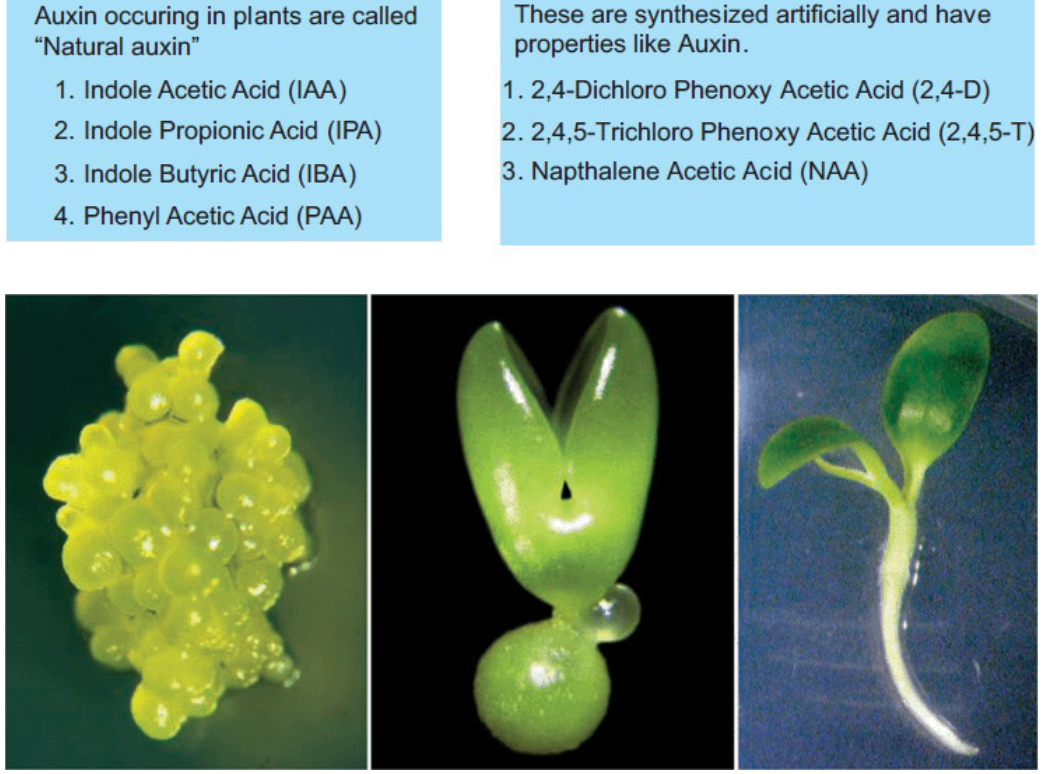
Medium Composition تركيب الوسط

تحتوي الاوسط المغذية لاغلب مزارع انسجة النبات على خمسة مكونات هي المغذيات العضوية ومصدر الكربون والفيتامينات ومنظمات النمو والمتممات العضوية .

Plant growth regulators منظمات النمو النباتية

يتطلب تنشيط نمو الاجزاء النباتية خليط متوازن من منظمات النمو، وتستخدم نوعين من التوليفات احدهما لتضاعف الخلية وتكوين الكالس ويفضل ان يحتوي على اوكسين 2،4-D او NAA مع السايتوكاينين بتراكيز اقل (الكاينتين) او BA او 2ip او الزياتين او Thidiazuron وآخر للاخلاف يحتوي على اوكسين بتركيز واطئ (NAA اوIAA او IBA) وسايتوكاينين بتركيز عالي، ولايستخدم 2،4-D لهذا الغرض، حيث انه يحفز تضاعف الخلية ويعوق عملية التمايز في النباتات ثنائية الفلقة. عليه فأن الاوكسينين 2،4-D و 2،4،5–TP فعالين في تحفيز تكون الاجنة الجسمية (Somatic embryogenesis) في مزارع محاصيل الحبوب احادية الفلقة والاعشاب ثنائية الفلقة.





تتوفر حاليا في الاسواق انواع عديدة من الاوساط الجاهزة بشكل مسحوق تنتجها شركات Himedia وSigma وبتراكيب مختلفة يمكن ان يضاف لها المادة الكيميائية المرغوبة عند تحضيرها، علما بأن الاوساط التي تحضر في المختبر اقل كلفة من الجاهزة والتي تشترى من الاسواق.

تحضير لتر واحد من الوسط Medium preparation

أ. الاوساط الغذائية من محاليل لاصل:

1.نقوم وزن واذابة كميات المواد الاتية بالغرام واذابة كل كروب منها في لتر ماء مقطر لتكوين محلول الاصل Stock soulution منفصل وخزنها بالثلاجة، وهي اربعة محاليل اصل:

A محلول اصل العناصر الرئيسة	
نترات الامونيوم	16.5
نترات البوتاسيوم	19
كلوريد الكالسيوم المائي	44
كبريتات المنسيوم المائية	37
فوسفات البوتاسيوم الثنائية	17
يؤخذ 100 مل	

B محلول اصل العناصر الثانوية	
كبريتات المنغنيز المائية	2.23
كبريتات الزنك المائية	0.86
حامض البوريك	0.62
يوديد البوتاسيوم	0.083
مولبيدات الصوديوم المائية	0.025
كبريتات النحاس المائية	0.0025
كلوريد الكوبلت المائي	0.0025
يؤخذ 1 مل	

C محلول اصل الحديد	
كبريتات الحديدوز المائية	2.785
المادة المخلبية	3.725
يؤخذ 10 مل	

D محلول اصل المكونات العضوية ماعدا السكروز	
Myo-inoitole	1
thiamine	0.01
Glycine	0.2
Pyridoxine	0.05
Nicotinic acid	0.05
يؤخذ 1 مل	

2.ووزن 2-7 غرام اكار ووزن 30 غرام سكر كل على حدة.

3.يستخن 400 مل ماء في بيكر على جهاز الصفيح الساخن الدوار ويضاف له محاليل الاصل A، B، C، D ويترك ليمتزج جيدا ويضاف بعدها السكر، ويوضع ايضا 400 مل اخر من الماء في فلاسك سعة واحد لتر ويضاف له الاكار وتسد فوهته بالالمنيوم فويل وصولا للغليان وتكوين فقاعات من الستر ومن قاع الفلاسك.

4. يمزج المحلولان في سلندر سعة واحد لتر ويكمل الحجم بالماء المقطر المعقم.

5. تضاف الهرمونات اللازمة حسب التجربة المطلوبة من محاليل الاصل المجهزة مسبقا والمخزونة بالثلاجة.

6. يتم تعديل pH المحلول ليكون 5.8 - 6 باستعمال محلول 0.1 عيارية من هيدروكسيد الصوديوم و0.1 عيارية من حامض الهيدروكلوريك.

7. يصب الوسط الزراعي مباشرة في انابيب الزراعة (150مل - 1لتر) حسب الانابيب المتوفرة (10-200 مل) وتغلق فوهة الانابيب اما بسداداته الاصلية او باستعمال ور الالمنيوم فويل.

7. تنقل اوعية الزراعة الى جهاز المعقام الحراري Autoclave على درجة 121°م لمدة 15 دقيقة.

8. تستخرج اوعية الزراعة من المعام وتترك لتبرد في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

ب. الاوساط الغذائية الجاهزة:

1. نقوم بوزن الوسط الغذائي الجاهز باستعمال بوزن 4.9 غرام مذكورة مكوناته صفحة 8.

وبذات الخطوات السابقة (2-8).

Stock soulution

A 100 ML

B 1 ML

C 10 ML

D 1 ML

1

اكار 2-7 غرام

سكر 30 غم

2

1

اكار 2-7 غرام

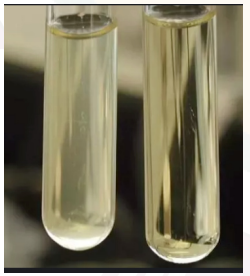
MS 4.9 غم

سكر 30 غم

2

7

6



5

ماء مقطر معقم

+

الهرمونات

3

4