أمثلة لبعض البيئات القياسية الشائعة الاستعمال

البيئات القياسية

توصل الباحثون إلى عدد من البيئات القياسية لاستخدامها فى مزارع الأنسجة (جدول ٢-٩)، وهى التى يمكن إما استخدامها مباشرة، وإما بعد إدخال التعديلات المناسبة عليها، لتصبح أكثر ملاءمة للنوع النباتى المستهدف. ويبين جدول (٢-١٠) تركيز مختلف العناصر فى كل من البيئات التى جاء ذكرها فى جدول (٢-٩).

جدول (٢-٩): البيئات القياسية المستخدمة فى مزارع الأنسجة[أ].

المكونات	البيئات (الكميات بالجزء فى المليون)[ب]						
	White's (جـ)	Heller's (د)	MS (هـ)	ER (و)	B (ز)	Nitsch's (ح)	NT (ط)
غير العضوية							
NH_4NO_3	--	--	1650	1200	--	720	825
KNO_3	80	--	1900	1900	2527.5	950	950
$CaCl_2.2H_2O$	--	75	440	440	150	--	220
$CaCl_2$	--	--	--	--	--	166	--
$MgSO_4.7H_2O$	750	250	370	370	246.5	185	1233
KH_2PO_4	--	--	170	340	--	68	680
$(NH_4)_2SO_4$	--	--	--	--	134	--	--
$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	300	--	--	--	--	--	--
$NaNO_3$	--	600	--	--	--	--	--
$NaSO_4$	200	--	--	--	--	--	--
$NaH_2PO_2.H_2O$	19	125	--	--	150	--	--
KCl	65	750	--	--	--	--	--
KI	0.75	0.01	0.83	--	0.75	--	0.83
H_3BO_3	1.5	1	6.2	0.63	3	10	6.2
$MnSO_4.4H_2O$	5	0.1	22.3	2.23	--	25	22.3
$MnSO_4.H_2O$	--	--	--	--	10	--	--
$ZnSO_4.7H_2O$	3	1	8.6	--	2	10	--
$ZnSO_4.4H_2O$	--	--	--	--	--	--	8.6
$Zn.Na_2.EDTA$	--	--	--	15	--	--	--
$Na_2MoO_4.2H_2O$	--	--	0.25	0.025	0.25	0.25	0.25
MoO_3	0.001	--	--	--	--	--	--
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.03	0.025	0.0025	0.025	0.025	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	--	--	0.025	0.0025	0.025	--	--
$CoSO_4.7H_2O$	--	--	--	--	--	--	0.03
$AlCl_3$	--	0.03	--	--	--	--	--
$NiCl_2.6H_2O$	--	0.03	--	--	--	--	--
$FeCl_3.6H_2O$	--	1	--	--	--	--	--
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	--	--	--	--	--	--
$FeSO_4.7H_2O$	--	--	27.80	27.8	--	27.8	27.8
$Na_2.EDTA.2H_2O$	--	--	37.3	37.3	--	37.3	37.3
Sequestrene 330Fe	--	--	--	--	28	--	--

تابع جدول (٢-٩):

المكونات	البيئات (الكميات بالجزء فى المليون)(ب)						
	White's(جـ)	Heller's(د)	MS(هـ)	FR(و)	B(ز)	Nitsch's(ح)	NT (ط)
العضوية							
Inositol	--	--	100	--	100	100	100
Nicotinic acid	0.05	--	0.5	0.5	1	5	--
Pyridoxine HCl	0.01	--	0.5	0.5	1	0.5	--
Thiamine HCl	0.01	--	0.1	0.5	10	0.5	1
Glycine	3	--	2	2	--	2	--
Folic acid	--	--	--	--	--	0.5	--
Biotin	--	--	--	--	--	0.05	--
Sucrose	2%	--	3%	4%	2%	2%	1%
D-Mannitol	--	--	--	--	--	--	12.7%

(أ) لم تعط بيانات منظمات النمو وبيئات الزراعة الخاصة لحالات معينة.

(ب) أعطيت تركيزات المانيتول والسكروز كنسب مئوية.

(جـ) بيئة هوايت White.

(د) بيئة هلر Heller

(هـ) بيئة مراشيج وسكوج Murashige & Skoog

(و) بيئة إيركسون Eriksson

(ز) بيئة جامبورج Gamborg وآخرون

(ح) بيئة نتشه Nitsch

(ط) بيئة ناجاتا وتاكيبا Nagata & Takeba

جدول (٢-١٠). تركيز الأيونات فى البيئات المبينة فى جدول (٢-٩)

الأيونات	الوحدات	البيئات						
		White's	Heller's	MS	ER	B5	Nitsch's	NT
NO_3	mmol l^{-1}	3.33	7.05	39.41	33.79	25.00	18.40	19.69
NH_4		--	--	20.62	15.00	2.00	9.00	10.30
Total N		3.33	7.05	60.03	48.79	27.03	27.40	29.99
P		0.138	0.90	1.25	2.50	1.08	0.50	5.00
K		1.66	10.05	20.05	21.29	25.00	9.90	14.39
Ca		1.27	0.51	2.99	2.99	1.02	1.49	1.50
Mg		3.04	1.01	1.50	1.50	1.00	0.75	5.00
Cl		0.87	11.08	5.98	5.98	2.04	2.99	3.00

تابع جدول (٢-١٠).

البيئات								
NT	Nitsch's	B5	ER	MS	Heller's	White's	الوحدات	الأيونات
100.00	100.00	50.10	100.00	100.00	3.70	12.50		Fe
5236.50	996.80	2079.90	1610.00	1730.00	1013.50	4502.00		S
202.00	202.00	1089.00	237.20	202.00	7966.00	2958.00		Na
100.00	161.80	48.50	10.00	100.00	16.00	24.20		B
100.00	112.00	59.20	10.00	100.00	0.40	22.40		Mn
36.83	34.70	7.00	37.30	30.00	3.40	10.40	$\mu mol\ l^{-1}$	Zn
0.10	0.10	0.10	0.01	0.10	0.10	0.04		Cu
1.00	1.00	1.00	0.1	1.00	--	0.007		Mo
0.10	--	0.10	0.01	0.10	--	--		Co
5.00	--	4.50	--	5.00	0.06	4.50		I
--	--	--	--	--	0.20	--		Al
--	--	--	--	--	0.10	--		Ni

كذلك نقدم فى جدول (٢-١١) مزيداً من البيئات القياسية وتركيز مختلف المكونات فيها بالجزء فى المليون.

جدول (٢-١١): البيئات القياسية المستخدمة فى مزارع الأنسجة ومكوناتها[b] (عن Chawla ٢٠٠٠).

Chu ١٩٧٨ (N_6)	Gamborg ١٩٦٨ (B_5)	Gautheret ١٩٤٢	Murashige & Skoog ١٩٦٢	White ١٩٦٣	Nitch & Nitch ١٩٥٦	المكون
—	—	—	—	٦٥	١٥٠٠	KCl
١٨٥	٢٥٠	١٢٥	٣٧٠	٧٢٠	٢٥٠	$MgSO_4.7H_2O$
—	١٥٠	—	—	١٦,٥	٢٥٠	$NaH_2PO_4.H_2O$
١٦٦	١٥٠	—	٤٤٠	—	—	$CaCl_2.2H_2O$
٢٨٣٠	٢٥٠٠	١٢٥	١٩٠٠	٨٠	٢٠٠٠	KNO_3
—	—	—	—	—	٢٥	$CaCl_2$
—	—	—	—	٢٠٠	—	Na_2SO_4
—	—	—	١٦٥٠	—	—	NH_4NO_3
٤٠٠	—	١٢٥	١٧٠	—	—	KH_2PO_4
—	—	٥٠٠	—	٣٠٠	—	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$
٤٦٣	١٣٤	—	—	—	—	$(NH_4)_2SO_4$

تابع جدول (٢-١١)

Chu ١٩٧٨(N,)	Gamborg ١٩٦٨ (B٥)	Gautheret ١٩٤٢	Murashige & Skoog ١٩٦٢	White ١٩٦٣	Nitch & Nitch ١٩٥٦	المكون
—	—	٠٫٠٥	—	—	—	$NiSO_4$
٢٧٨	—	٠,٠٥	٢٧,٨	—	—	$FeSO_4.7H_2O$
-	-	٣	٢٢,٣	٧	٣	$MnSO_4.4H_2O$
٣,٣	١٠	—	—	—	—	$MnSO_4.H_2O$
٠٨	٠٧٥	٠,٥	٠,٨٣	٠,٧٥	-	KI
—	٠,٠٢٥	—	٠,٠٢٥	—	—	$CoCl_2.6H_2O$
--	—	٠٢	—	—	--	$TiSO_4$
١٥	٢	٠١٨	٨,٦	٣	٠,٥	$ZnSO_4.7H_2O$
—	٠,٠٢٥	٠,٥	٠٠٢٥	—	٠,٠٢٥	$CuSO_4.5H_2O$
-		٠,١		-		$BeSO_4$
١٫٦	٣	٠,٠٥	٦,٢	١,٥	٠,٥	H_3BO_3
--		١	-	--	-	N_2SO_4
—	٠,٢٥	—	٠,٢٥	—	٠,٠٢٥	$Na_2MoO_4.2H_2O$
		--		٢,٥	—	$Fe(SO_4)_3$
٣٧٣	—	—	٣٧,٣	—	—	EDTA disodium salt
—	٤٣	--	--	—	—	EDTA-Na ferric salt
—	١٠٠	—	١٠٠	—	—	m-inositol
١,٠	١,٠	٠,١	٠,١	٠,١	—	Thiamine
٠٥	١,٠	٠,١	٠,٥	٠١	-	Pyridoxine
٠٥	١,٠	٠,٥	٠,٥	٠,٥	—	Nicotinic acid
-	-	٣	٢	٣	—	Glycine
—	١٠	--	—	١٠	—	Cysteine
٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٣٠٠٠٠	٢٠٠٠٠	٣٤٠٠٠	Sucrose

(أ) جميع القيم بالملليجرام فى اللتر (جزء فى المليون).

تحضير المحاليل القياسية

يستعمل الماء المقطر فى تحضير المحاليل القياسية لكل من العناصر الكبرى والصغرى والفيتامينات ومنظمات النمو، ويجب أن تكون المركبات الكيميائية المستخدمة من أعلى درجات النقاوة

١ — المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى:

تحضر المحاليل القياسية للعناصر الكبرى والصغرى — عادة — بنحو ١٠ أضعاف إلى

١٠٠ ضعف التركيز المطلوب من أى منها فى البيئات (جدول ٢-١٢). وعند إذابة العناصر فى الماء .. تجب إضافة كل مركب على انفراد لتجنب حدوث أى ترسيب وبالنسبة لمحلول العناصر الكبرى تتم إذابة كلوريد الكالسيوم منفردًا فى الماء، ثم يضاف إلى بقية المحلول لتجنب حدوث ترسيب.

جدول (٢-١٢): تحضير المحاليل القياسية لبيئة موراشيج وسكوج.

المكون	التركيز فى بيئة موراشيج وسكوج (مجم/لتر)	التركيز فى المحلول القياسى (مجم/لتر)	الحجم الذى يستعمل لكل لتر من البيئة (مل)
العناصر الكبرى (١٠ ×)			١٠٠
NH_4NO_3	١٦٥٠	١٦٥٠٠	
KNO_3	١٩٠٠	١٩٠٠٠	
$MgSO_4.7H_2O$	٣٧٠	٣٧٠٠	
$CaCl_2.2H_2O$	٤٤٠	٤٤٠٠	
KH_2PO_4	١٧٠	١٧٠٠	
العناصر الصغرى (١٠٠ ×)			١٠
H_3BO_3	٦,٢	٦٢٠	
$MnSO_4.4H_2O$	٢٢,٣	٢٢٣٠	
$ZnSO_4.7H_2O$	٨,٦	٨٦٠	
KI	٠,٨٣	٨٣	
$Na_2MoO_4.2H_2O$	٠,٢٥	٢٥	
$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٢,٥	
$CoCl.6H_2O$	٠,٠٢٥	٢,٥	
الحديد			
Fe.EDTA-Na salt	٤٠	—	
الفيتامينات		٥٠ مجم/١٠٠ لتر	١
Nicotinic acid	٠,٥	٥٠ مجم/١٠٠ لتر	٠,٢
Thiamine HCl	٠,١	٥٠ مجم/١٠٠ لتر	١
Pyridoxine	٠,٥		
مركبات أخرى			
Myo-inositol	١٠٠	—	
Sucrose	٣٠٠٠٠	—	
Agar	٨٠٠٠	—	

- لا تحضر محاليل قياسية منها.

٢ — المحاليل القياسية لمنظمات النمو:

لا يذوب أى من منظمات النمو فى الماء، وإنما تُذاب إما فى الكحول (كما فى الـ

*p*CPA، والـ 2,4-D، والـ GA،). وإما فى محلول عيارى واحد من أيدروكسيد الصوديوم (كما فى الـ IAA، و IBA، والـ NAAα، و الـ NOA، والـ BA، والـ 2iP، والكينتين، والزياتين، وحامض الأبسيسك). يجب أن يُذاب المركب فى ملليلترات قليلة من المذيب، ثم يضاف الماء ببطء للوصول إلى الحجم المطلوب.

وعندما يُرغب فى تحضير تركيزات بالملليجرام فى اللتر تفضل إذابة ٥٠ مجم فى لتر للحصول على تركيز ٥٠ مجم/لتر

وعندما يُرغب فى تحضير تركيز باللى مولار تفضل إذابة الكميات الموضحة فى جدول (٢-١٣) فى ١٠٠ مل للحصول على تركيز ١ ملى مولار. وإذا احتوت بيئة الزراعة على تركيز ١٠ ميكرو مولار من منظم نمو ما (ولنكن 2,4-D) فإن

١ ملى مولار = ٢٢١ مجم/لتر أو ٢٢١ ٠ مجم/مل

الكمية فى ١٠٠ مل من المحلول القياسى = ٢٢١ ٠ × ١٠٠ – ١ ٢٢ مجم

وبما أن ١٠ ميكرومولار = ٢٢١٠ ميكروجرام، أى ٢ ٢١٠ مجم

إذا فإن الحجم الذى يلزم من المحلول القياسى هو ١٠ مل (لأن ١ ٢٢ × ١٠ – ١ ٢٢ مجم) (عن Chawla ٢٠٠٠)

جدول (٢-١٣) تحضير المخاليل القياسية لمظمات النمو

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
الاوكسينات		
2,4 Dichlorophenoxy acetic acid	2,4-D	٢٢ ١
Indole-3 acetic acid	IAA	١٧٥
Indole-3 butyric acid	IBA	٢٠,٣٢
α-Napthalene acetic acid	NAA	١٨,٦٢
β-Naphthoxy acetic acid	NOA	٢٠,٢٣
2 4,5-Trichlorophenoxy acetic acid	2,4,5-T	٢٥,٥٦
p-Chlorophenoxy acetic acid	*p*CPA	١٨,٦٦
Picloram	PIC	٢٤,١٢
السيتوكينينات		
Adenine	Ade	١٨,٩١
Benzyl adenine or benzyl amino purine	BAP أو BA	٢٢ ٥٢

تابع جدول (٢-١٣)

المكون	الاختصار	مجم/١٠٠ مل (1mM)
N-isopentenylamino purine	2iP	٢٠٣٣
Kinetin	KIN	٢١,٥٢
Zeatin	ZEA	٢١.٩٢
مركبات أخرى		
Gibberellic acid	GA_3	٣٤,٦٤
Abscisic acid	ABA	٢٦,٤٣
Colchicine	Col	٣٩,٩٤

خلط مكونات بيئة الزراعة وضبط الرقم الأيدروجينى (الـ pH)

تجب إضافة مكونات بيئة الزراعة بنفس الترتيب الذى وردت به فى جدولى (٢-١٢، و ٢-١٣)، بما فى ذلك منظمات النمو، ويضاف الماء إلى أقل من الحجم النهائى مباشرة، ثم يُضْبط الـ pH إلى القيمة المطلوبة (مثلاً ٥٨ فى بيئة MS) بإضافة نقطة بنقطة من أى من محلول ١ عيارى من أيدروكسيد البوتاسيوم، أو ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك، مع التقليب المستمر

وتحضر المحاليل العيارية لضبط الـ pH بحساب عدد جرامات المادة (أيدروكسيد البوتاسيوم أو حامض الأيدروكلوريك) فى ١٠٠ مل من المحلول، وهى تعادل الـ minimum assay للمادة (٪) × كثافتها النوعية

ويلى ذلك حساب العيارية، وهى عدد جرامات المادة فى اللتر/الوزن المكافئ

أما الوزن المكافئ فهو يساوى الوزن الجزيئى/الحموضة أو القاعدية

وفى حالة حامض الأيدروكلوريك فإن الـ minimum assay = ٣٥٤٪، والكثافة النوعية = ١٨ ١، وبالتالى فإن عدد جرامات حامض الأيدروكلوريك فى ١٠٠ مل = ٣٥٤ × ١,١٨ = ٤١ ٧٧ جم.

أما الوزن المكافئ لحامض الأيدروكلوريك فهو: ٤٦ ١/٣٦ = ٤٦ ٣٦

وبذا يحضر محلول ١ عيارى من حامض الأيدروكلوريك بأخذ حجم قدرة = ٤١٧ ٧ :٤٦ ٣٦، أى ١١,٥ مل وإكماله بالماء إلى لتر واحد

ويلى ضبط الـ pH إكمال المحلول إلى حجمه النهائى

يتراوح الـ pH المناسب للنمو الخلوى فى البيئات بين ٥٠، و ٦٠، علمًا بأن النمو والتطور الطبيعيين يتوقفان عندما يكون الـ pH أعلى عن ٧٠ أو أقل من ٤٥ وتجدر الإشارة إلى أن عملية تعقيم البيئات فى الأوتوكليف تؤدى إلى خفض الـ pH بمقدار ٣٠-٠,٥ وحدة. وإذا حدث انخفاض شديد فى pH البيئة أثناء الزراعة (تصبح البيئة سائلة) فإنه يتعين تجديدها، علمًا بأن ذلك الانخفاض قد يصل إلى ٠,٥ وحدة pH هذا وتؤدى زيادة الـ pH عن ٦٠ إلى جعل البيئة صلبة أكثر مما ينبغى، بينما يؤدى انخفاضها إلى عدم تصلبها بشكل جيد (عن Chawla ٢٠٠٠).

إضافة الآجار والتعقيم

يلى ضبط الـ pH إضافة الكمية المطلوبة من الآجار (مثلا ٦-٨ جم/لتر) أو أى مادة مماثلة يسخن المحلول مع التقليب إلى حين ذوبان الآجار، ويعرف تمام الذوبان بأن يصبح المحلول تام الشفافية

يلى ذلك توزيع البيئة فى أوعية من الزجاج أو البولى بروبلين، ثم يحكم إغلاقها بالقطن أو برقائق الألومنيوم

تعقم بيئة الزراعة فى الأوتوكليف لمدة ٢٠ دقيقة على ١٢١°م تحت ضغط ١٥ رطل على البوصة المربعة (١٠٥ كيلو بسكال).

وإذا ما رغب فى إضافة هرمونات أو مركبات أخرى معقمة بالترشيح، فإنها تضاف مباشرة إلى البيئة المعقمة فى الأوتوكليف

تُبرد البيئة فى حجرة عزل laminar airflow على ٥٠-٦٠°م، وتضاف الهرمونات من خلال مرشح millipore، أو أى مرشح آخر ذات ثقوب بقطر ٠,٢٢ ميكروميتر.

وبعد التبريد يفضل حفظ البيئة على حرارة ٤-١٠°م، مع تفضيل استعمالها بعد نحو ٣-٤ أيام من تحضيرها حتى يمكن تحديد ما إن كانت قد عقمت بصورة جيدة أم لا، حيث تظهر نموات الكائنات الملوثة للبيئات المعقمة جيدًا — خلال تلك الفترة، ويتعين حينئذٍ التخلص من تلك البيئات (عن Chawla ٢٠٠٠)