الباب الرابع

البيئة الغذائية Nutritional Medium

صور البيئات الغذائية Forms of media

١- بيئة صلبة Soli medium

هـى بيئة تحتوى على آجـار أو جيلاتين أو Biogels لإكسـابها قواما هلاميا. ويفضل اسـتخدام آجار نقى مثل Difco- Nobel. ويضاف الآجار بتركيز ٠,٦ — ١٪ (وزن/ حجم) أو الجيلاتين بتركيز ١٪ (وزن/ حجم).

٢- بيئة سائلة Liquid medium

هـى بيئة لا تحتوى على آجار ويفضلها كثير مـن الباحثين فى الزراعة المعملية بدلا من البيئة الصلبة.

٣- بيئة ثنائية المظهر Double Phase medium

الاسـتعمال المنفرد للبيئة الصلبة أو السائلة فى الزراعة المعملية قد يظهر التزجج Vertification لذلك تسـتخدم بيئة مزدوجـة المظهر. وتجهز هذه البيئة بصب بيئة تحتـوى على آجار فى قاع وعاء الزراعة، ثم تـزرع عليها المادة النباتية، ثم يصب فوقها بيئة سـائلة تحتوى علـى نفس مكونات البيئة الصلبـة ولكنها بدون آجار. وبذلك تكون المادة النباتية متواجدة بين بيئة صلبة وبيئة سائلة يحتويان على نفس المكونات الغذائية. وبهذه الطريقة يسهل تغيير الجزء السائل من البيئة كلما تطلب ذلك ببيئة سائلة أخرى مماثلة ولكنها طازجة.

مقارنة بين البيئة الصلبة والسائلة

١- بعض الأنواع النباتية تنمو جيدا فى بيئة سائلة مثل نباتات العائلة Brome-liaceae، بينما ينمو البعض الآخر بصورة جيدة فى بيئة صلبة.

٢- تحتاج الأجزاء النباتية المزروعة فى بيئة سائلة إلى إمداد جيد من الهواء نظرا لانغماسها فى البيئة. لذلك تثبت الأوعية المزروعة على هزاز كهربائى لرجها بالسرعة المطلوبة حتى لا تصاب الأجزاء النباتية بالضرر.

٣- انخفاض معدل استفادة الجزء النباتى أو الكالس من مكونات البيئة الصلبة، حيث إن سطح الجزء النباتى الملامس للبيئة الصلبة هو المستفيد فقط. بينما تستطيع جميع أسطح الجزء النباتى المنغمس فى البيئة السائلة امتصاص العناصر الغذائية ومنظمات النمو لوجود تماس مباشر مع البيئة.

٤- تتركز الإفرازات Exudates الخارجة من الأجزاء النباتية فى مكان واحد على البيئة الصلبة مما يؤدى إلى إحداث الضرر أو الإطفار للنموات الجديدة. بينما تنتشر هذه الإفرازات فى البيئة السائلة بالرج، وبذلك يكون لها تأثير أقل ضررا على النموات.

٥- عدم استفادة الجزء النباتى المنغمس تحت سطح البيئة الصلبة من تبادل الغازات. بينما الرج المستمر للبيئة السائلة يساعد على تبادل الغازات واستفادة الجزء النباتى المنغمس فيها من مكونات البيئة الغذائية.

٦- صعوبة تخليص الجذور من البيئة الصلبة سالمة بدون أضرار، بينما يسهل تخليصها من البيئة السائلة.

٧- سهولة تسجيل مقاييس النمو وسرعة التنفس للنموات النامية على بيئة سائلة.

٨- ظاهرة الاستقطاب Polarization الناتجة عن تأثير الجاذبية الأرضية تكون واضحة على الكالس المنزرع على بيئة صلبة، بينما ليس لها تأثير واضح على الكالس المنزرع فى بيئة سائلة.

٩- عدم انتظام انتشار الضوء بين النباتات النامية على بيئة صلبة يؤثر على نموها، بينما يكون انتشار الضوء أفضل فى حالة البيئة السائلة.

١٠- يكون انقسام الخلايا وتكشفها ونموها أسرع على البيئة السائلة.

حركة البيئة السائلة

١- بيئة سائلة ساكنة Stationary liquid medium (Immobile media)

هى طريقة شائعة الاستعمال فى إنتاج المواد الأيضية الثانوية Secondary metab-olites وفى زراعة البروتوبلاست. وتكون البيئة السائلة ساكنة لتحسين انقسام ونمو الخلايا ومنع إحداث الضرر بها. وتساعد على انتخاب الطفرات والهجن الناتجة من اندماج البروتوبلاست بسهولة.

٢- بيئة سائلة متحركة Agitated liquid medium

يساعد استمرار حركة البيئة السائلة على وجود تماس مباشر بين سطح الجزء النباتى مع البيئة، وتعظيم استفادته من تجانس انتشار العناصر الغذائية والغازات فى البيئة، واختفاء أعراض نقص العناصر واختناق الجذور، وتساعد حركة البيئة على انتشار الإفرازات السامة فى البيئة وعدم تركيزها فى منطقة الجذور. ويستخدم هزاز كهربائى أو مقلب مغناطيسى لتحريك البيئة السائلة. ويثبت على الهزاز دوارق مخروطية كبيرة، يحتوى كل منها على ٢٠٪ من سعته بيئة سائلة، ويعمل الجهاز بسرعة ٥٠- ١٠٠ دورة/ الدقيقة. بينما يثبت على المقلب المغناطيسى دوارق مخروطية سعة ١٥٠ مللى، يحتوى الواحد منها على ١٥ مللى بيئة سائلة، ويعمل بسرعة ٢٥٠ دورة/ دقيقة. وللحصول على نتائج ممتازة يجب تجديد البيئة كل ١٠ أيام تقريبا.

٣- بيئة سائلة دوارة

تستخدم فى هذه الطريقة عجلة دوارة يثبت عليها دوارق مخروطية محتوية على أجزاء نباتية منزرعة فى بيئة سائلة. وتدور العجلة بسرعة دورة واحدة/ دقيقة مما

يـؤدى إلى انتقال البيئة الغذائية من طرف الـدورق إلى الطرف الآخر تاركة الجزء النباتى منغمسا فى البيئة الغذائية؛ ثم فى تماس معها، ثم معرضا للهواء مما يتيح فرصة لتبادل الغازات. وتستخدم هذه الطريقة فى زراعة الكالس وعديد من الأنواع النباتية.

ماكينات هزازة ودوارة

تستخدم ماكينات هزازة Shakers ودوارة Rotating machines لإسراع نمو الخلايا والأنسـجة النباتية والكورمات الأولية (الكريمات) Protocorms والمرستيمات المزروعة فى بيئة سائلة. ويستمر تشغيل هذه الماكينات لتنشيط تبادل الغازات ما بين الأكسيجين وثانى أكسـيد الكربون وتقليل تأثير الجاذبية الأرضية وتجانس توزيع العناصر الغذائية والهرمونات وانتشار الإفرازات السامة فى البيئة السائلة. ومن هذه الماكينات:

(أ) ماكينات بطيئة الحركة

منهـا ماكينات دوارة بطيئة الحركة مثل عجلة أوركيـد Orchid wheel وماكينة ستيوارد Steward machine، وتتحرك بسرعة ٢– ٤ دورة/ دقيقة، ومنها ماكينات دوارة أكثر سرعة مثل الجهاز الهزاز الدوار Rotary shakers، ومنها ماكينات تجمع بين النوعين السـابقين. وهذه النوعية من الماكينات تسـمح للأنسـجة المرسـتيمية أو الكورمـات الأوليـة للأوركيد باسـتمرار البقاء فى البيئة السـائلة. وتختلف هذه الماكينـات فى درجة انحدار المنضدة المثبت عليها أوانى الزراعة. فمثلا ميل منضدة عجلة الأوركيد ٤٥° بينما ميل منضدة ماكينة سـتيوارد ١٢– ١٥°. وتسـتخدم مع ماكينات سـتيوارد دوارق زجاجية كبيرة الحجم مسـتديرة القاع ذات زوائد أنبوبية فى المحيط القاعدى لها تسـاعد على تثبيتها. وتستخدم مع عجلة الأوركيد أنابيب اختبار توضع فى سلة أنابيب أو دوارق مخروطية ١٠٠ ملليلتر أو دوارق أصغر منها تثبت بمشدات خاصة Clamps.

(ب) دولاب دوار Rotator wheel

يثبت عليه دوارق مخروطية زجاجية ذات زوائد Nipples أنبوبية فى المحيط القاعدى لها. وتزرع الأجزاء النباتية فى الزوائد الأنبوبية. ويحتوى الدورق الواحد سعة لتر على عشرة زوائد أنبوبية. ويحتوى الدورق ٢٥٠ ملليلتر على ثمانية زوائد أنبوبية. وتساعد حركة دوران الدولاب بمعدل ١- ٢ دورة/ الدقيقة على انتقال البيئة السائلة من جهة إلى أخرى داخل الزوائد الأنبوبية وبذلك يتحسن تبادل الغازات فيها خصوصا إذا كان غطاء الأنبوبة من القطن. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح فى زراعة أنواع نباتية مختلفة.

(جـ) هزاز بسطح مستو Platform shaker

يستخدم هذا الجهاز لتفكيك الأجزاء النباتية إلى خلايا منفردة وتنشيط نموها وتكاثرها. ويستخدم لهذا الجهاز دوارق سعة ١٠٠- ١٠٠٠ ملى تثبت بكلبسات على السطح المستوى للجهاز. وتعتبر الدوارق سعة ١٠٠ ملىالمحتوية على ٢٠- ٢٥ ملى بيئة أو الدوارق سعة ٢٥٠ ملىالمحتوية على ٧٠ ملى بيئة هى الأمثل لمعظم التجارب، على أن تغلق فوهة الدورق بسدادة قطن أو ورق ألومنيوم. ويعمل الجهاز بسرعة ٣٠- ١٥٠ دورة/ دقيقة.. ويجب أن تكون الحركة تتابعية مدارية منتظمة تقدر من ٢- ٤ سم. ويجب تأمين استمرار عمل الجهاز بدون انقطاع نتيجة إخفاق فى ميكانيكية الجهاز أو قطع التيار الكهربائى. ويجب توفير الظروف المناسبة للنمو مثل الحرارة والعناصر الغذائية وغيرها ؛ وتتوفر الآن دوارق تتحمل الحرارة ومزودة بمدخل ومخرج لتسهيل إضافة بيئة طازجة وإخراج البيئة القديمة فى أى وقت أثناء التشغيل. وتوجد أنبوبة لتبادل الغازات يمرر فيها الهواء الداخل للدورق خلال مرشحات تعقيم لمنع التلوث ويساعد على انتشار الخلايا بانتظام فى البيئة الغذائية. كما يوجد مدخل لقياس حموضة البيئة لتجنب التغيرات المحتمل حدوثها أثناء فترة التجربة.

معلق الخلايا Cell suspension

تحضير معلق الخلايا

يحضر معلق الخلايا بزراعة خلية فردية أو مجموعة من الخلايا فى بيئة سائلة لا تحتوى على آجار بهدف تفكيك وإكثار الخلايا. ويمكن المساعدة فى تفكيك الخلايا بالضغط الخفيف على الجزء النباتى الغض أو أجنة أو كالس باستخدام قضيب زجاجى ثم زراعتها فى بيئة سائلة. وتستخدم دوارق مخروطية لها زوائد أنبوبية جانبية تحتوى على بيئة سائلة. وتزرع الخلايا النباتية أو أجزاء من الكالس داخل الزوائد الأنبوبية. وتثبت الدوارق على قرص دوار يتحرك بسرعة دورة واحدة/ الدقيقة. وبذلك تتكاثر الخلايا ويزداد عددها فى البيئة بعد فترة من الحركة المستمرة (Steward and Shantz, 1956). ويستخدم فى ذلك جهاز هزاز ذات مسطح مستو . وتنمو الخلايا وتتكاثر مع استمرار رج البيئة السائلة أثناء فترة الحضانة التى تستغرق ٢١– ٢٨ يوما مع المحافظة على تبادل الغازات وتجانس توزيع الخلايا فى الوسط الغذائى. لذلك فإن دراسة مكونات البيئة السائلة والمحافظة على حموضتها فى اتجاه نقطة التعادل لها أهمية كبيرة فى تسهيل تجزئة وتفكيك خلايا الكالس المتجمعة وتجانس انتشار الخلايا وتماسها المباشر مع البيئة السائلة.

تثبيت الخلايا فى البيئة السائلة

يمكن تنشيط النمو فى بيئة سائلة بدون استخدام أية وسيلة للتثبيت، حيث تغمس الخلايا والأنسجة فى بيئة غذائية مع استمرار الرج بهزاز كهربائى لتوفير التهوية الجيدة. وفى حالة عدم توفير جهاز الرج يمكن استخدام إحدى الطرق الآتية لتثبيت الخلايا:

١- استخدام ورق ترشيح خالٍ من الرماد Ashless filter paper

تعلق كبارٍ من ورق الترشيح فوق سطح بيئة سائلة غير متحركة. ثم تثبت الأجزاء النباتية أو التجمعات الخلوية المتعددة على السطح العلوى لورقة الترشيح. ويساعد ورق الترشيح على إمداد الخلايا أو الجزء النباتى بالبيئة الغذائية ويحافظ على إبقائها فى الهواء فيسهل لها تبادل الغازات.

٢- استخدام قطع اسفنج Viscose sponge تحت ورق ترشيح

تستخدم كبارٍ من ورق الترشيح كحامل للمادة النباتية. و يضاف قطعة اسفنج تحت ورقة الترشيح. وفى هذه الطريقة يمكن إعادة استخدام المواد المستعملة، وإجراء الزراعة الثانوية بعد تغيير البيئة الغذائية وبدون تغيير الإناء المستخدم فى الزراعة. وتسهل هذه الطريقة فحص النموات واستبعاد غير الصالح منها، ويمكن نقل البادرات الناتجة بسهولة إلى التربة كما تتميز بأنها تحتاج إلى كميات أقل من المواد الغذائية.

٣- الغمس Embedding

تغمس الخلايا أو البروتوبلاست فى مركبات مثل جيل بوليمر Polymeric gel أو جيل الجينات الكالسيوم Calcium alginate gel أو Agar أو Agarose. ويعتبر الجينات الكالسيوم من المركبات غير السامة بينما Polyacrylamide غالبا تكون سامة ولا يفضل استخدامها.

٤- الاصطياد الداخلى Entrapment

تستخدم فى هذه الطريقة مناخل أو أغشية ليفية مسامية Hollow– fiber membrane أو فومات مسامية Pre-formed plastic foams أو صوف زجاجى Glass wool أو صوف صخرى Rock wool. كذلك تستخدم ألياف أنبوبية مصنوعة

مـن خلات السـليلوز Cellulose acetate أو سـليكون متعـدد الكربونات Silicone polycarbonate. وترتب هذه الأغشـية على هيئـة حزم متوازية عند طرف الألياف الأنبوبية المحتوية على الخلايا، فيتم اصطياد الخلايا فى المسافات البينية للأغشية الليفية وتمر البيئة الغذائية السـائلة فى فراغات الألياف. وتستخدم شبكة من مادة Polyurethane foam لاصطيـاد الخلايـا حيث تنمو فى صورة تجمعات خلوية مع الاحتفاظ بحيويتها كاملة.

٥- التثبيت على كرات زجاجية

تعلق الخلايا على كرات زجاجية داخلها فجوة هوائية تساعدها على الطفو فوق البيئة السائلة.

الزراعة الثانوية لمعلق الخلايا

عندما يصل أحد العناصر المكونة للبيئة الغذائية إلى مرحلة الاستنزاف يصبح هو المتسـبب فى انخفاض سرعة نمو وانقسـام الخلايا، وتكون هذه الفترة هى المناسبة للبدء فى الزراعة الثانوية المتكررة للخلايا. وتتم الزراعة الثانوية باسـتخدام ماصات أو حقن لنقل أحجام محددة من معلق الخلايا إلى بيئة سـائلة طازجة تحتوى على نفس المكونات للبيئة السـابقة. ويفضل أخذ الكميات المطلوب زراعتها من السـطح العلوى لمعلق الخلايا.

مراحل انقسام الخلايا المعلقة

١- مرحلة تلكؤ الانقسام The lage phase

يحدث عقب الزراعة فى بيئة سـائلة دخول الخلايا فى مرحلة سكون حركى مع زيادة نشـاط فسـيولوجى. وتبدأ هذه المرحلة بسلسـلة مـن عمليات التمثيل الغذائـى تتهيأ بعدها الخلايا للانقسـام الميتوزى. ويحـدث أثناء مرحلة التمثيل

الغذائـــى زيادة القــدرة الاختزالية وإنتاج مركبـــات ATP والكربوهيدرات كمصدر للطاقة. لذلك يعتبر إضافة الســكروز للبيئة هامـــا جدا كمصدر للطاقة. حيث يتم أكسدة السكروز بواسطة دورة تحلل الجلوكوز Glycolysis ودورة البنتوز Pentose Phosphate pathway ودورة حمض تراى كربوكسيليك Tricarboxylic acid وتزداد ســرعة تمثيل البروتينات والأحماض النووية. كما تتأثر بشدة حالة ثبات مستوى إنزيم mRNAs بما تحتويه البيئة الغذائية من الأكســين ونشاط إنزيم Phenylala-nine ammonia lyase.

٢- مرحلة انقسام الخلايا Cell division phase

فى هذه المرحلة تبدأ الخلايا فى الانقسام وتستمر فى الانقسام حتى يصبح واحدا أو أكثر من عناصر البيئة هو السبب فى بطء أو توقف الانقسام. وفى تجربة زرعت خلايـــا القمة النامية لنبات الخرشــوف Jerusalem artichoke وحضنت عند ٢٥°م. وبعـــد ســبعة أيام زاد عدد الخلايا بمقدار ١٠ أضعاف العـــدد الذى بدأ به. وخلال هذه الفترة زادت كمية الأكسجين المستهلك فى التنفس، وزاد ثبات الحمض النووى RNA خلال ثلاثة الأيام الأولى من الزراعة المعملية، وزادت ســرعة تمثيل البروتين نســبيا وانخفاض المواد الثانوية الممثلة مع تغير بســيط فـــى حجم الخلايا وتميزت باحتوائها على فجوات صغيرة ولم يحدث لها تكشف.

٣- مرحلة الثبات العددى Stationary-phase

تنخفض بوضوح ســرعة انقســـام الخلايا عندما يصــل كثافتها مرحلة الثبات العددى فى البيئة الســـائلة، وينخفض تنفســـها وتمثيـــل الحمض النووى RNA وتمثيـــل البروتين مع زيادة عدد الخلايا المحتوية على فجوات عصارية. ويرتبط توقف الخلايا عن الانقســـام بزيادة تجمـــع بعض المركبات الأيضية الثانوية مثل بعض القلويدات والأنثوســـيانينات والفينـــولات والأنثراكوينون. وثبت أن ظهور

المركبات الأيضية الثانوية يكون مصحوبا بتكشف محدود لخلايا نباتات العائلة الباذنجانية Solanaceae خصوصا إذا لم تستبدل البيئة الغذائية ببيئة حديثة التجهيز. فمثلا إذا لم تجدد زراعة الكالس الخاص لنباتى *Atropa belladonna* و*Hyoscyamus niger* بعد نهاية أربعة الأسابيع الأولى من الزراعة قد يكون ذلك سببا فى تنشيط نمو الجذور والسوق وتكوين نموات تشبه الأجنة خلال الأسابيع الأربعة التالية. وفى المرحلة الأخيرة من طور الثبات العددى للخلايا Late stationary-phase قد تتكون الأجنة وتتكون مركبات Tropane alkaloids مثل Atropine وكثير من مركبات Hyoscyamine وScopolamine. وتتجمع هذه المركبات فى التكوينات الخلوية المتكشفة وقد تتجمع فى التجمعات الخلوية البسيطة. وقد تظهر بعض التكشفات الخلوية وبعض الأعضاء النباتية بعد أن تصبح العناصر الغذائية وقد قاربت على النفاذ من البيئة الغذائية. ويتأثر ظهور هذه التكشفات بتمثيل مواد ثانوية مشابهة لما تنتجه النباتات الكاملة. وتعد هذه ظاهرة طبيعية تبين أن سلامة تكوين المواد الأيضية الثانوية مرتبط بسلامة التركيب البنائى للخلايا.

الكثافة الحرجة للخلايا المعلقة

تعرف الكثافة الحرجة للخلايا بأنها أقل كثافة من الخلايا يجب حقنها فى البيئة السائلة لكى تبدأ فى النمو والانقسام بصورة جيدة. فقد يؤدى زراعة عدد قليل من خلايا الكالس فى بيئة سائلة إلى فشلها فى استعادة قدرتها على الانقسام، وقد تنمو هذه الخلايا وتنقسم بسرعة إذا زرعت بكثافة أكبر فى بيئة غذائية مماثلة. لذلك فإن تقدير الكثافة الحرجة للخلايا فى البيئة السائلة عند بدء التجربة له أهمية. وتتهيأ الخلايا سريعا للانقسام عقب زراعتها فى البيئة السائلة، ويزداد عددها بتعدد انقسامها حتى ترتفع كثافة الخلايا فى المعلق. عندئذ تبدأ سرعة انقسام الخلايا فى الانخفاض تدريجيا نتيجة تزاحمها. ويمكن أن يكون واحد

أو أكثـر مـن عناصر البيئة الغذائية هو المحدد لهذا الانقسـام والوصول إلى مرحلة الثبات العددى للخلايا Stationary phase. وعند هذه المرحلة يستلزم إجراء الزراعة الثانوية Sub-culturing بهدف زيادة عدد الخلايا بما يكفى واحتياج العمل. ويمكن رسم خط بيانى يوضح العلاقة بين معدل نمو الخلايا أثناء فترة التحضين ابتداء من فترة ما بعد الزراعة مباشـرة حتى الوصـول إلى مرحلة ثبات عدد الخلايا. ويفضل إجـراء الزراعـة الثانوية بأخذ عينـات من معلق الخلايا قبـل وصولها إلى مرحلة الثبات أو عقب وصولها إلى هذه المرحلة مباشرة بدون تأخير للمحافظة على حيوية الخلايا وقدرتها على النمو والتكاثر. وتحديد مرحلة الثبات العددى للخلايا يكون وفقا للعدد الأولى للخلايا عند بدء الزراعة وسـرعة نموها. ويفضل أن يكون التركيز الأولى للخلايا ما بين ٠,٥– ٢,٥ x ١٠^٥ خلية/ سم^٣. ويزداد هذا التركيز أثناء فترة الحضانة فيصبح ١– ٤ x ١٠^٦ خلية/ سم^٣. و يعنى ذلك أن جميع الخلايا انقسمت بمعدل ٤– ٦ مرات فى فترة ١٨– ٢٥ يوما. وإذا تم سحب عينة من الخلايا لإعادة زراعتها فإن الفترة اللازمة لبلوغها التركيز المذكور تصل إلى ٦– ٩ أيام فقط.

تقدير عدد الخلايا المعلقة

لقياس عدد الخلايا فى السـنتيمتر المكعب يسـتلزم إضافة حجم واحد من معلق الخلايا إلى حجمين من محلول ٨٪ ثالث أكسيد الكروميك Chromium trioxide. ثم ترفع درجة حرارة المحلول إلى ٧٠°م لمدة ٢– ١٥ دقيقة. وتحدد هذه الفترة الزمنية تبعـا لمرحلة نمو الخلايا فى البيئة الغذائية. بعدها يترك الخليط ليبرد ثم يهز بقوة لمـدة ١٠ دقائق فى جهاز هزاز. ويفضل إضافـة البكتين إلى معلق الخلايا للحصول على نتائج أفضل. ويخفف محلول الخلايا بمعدل مناسب لكى تصبح الخلايا سهلة العد والفحص تحت المجهر. ويتطلب الفحص المجهرى استخدام شرائح زجاجية تحتوى على ثلاث قنوات يصل عمقها إلى ١٢٠٠ ميكروميتر حيث يكون هذا العمق مناسـبا لمعظم خلايـا الأنواع النباتيـة المختلفة. وتنقل عينة مـن معلق الخلايا إلى

الشريحة وتترك فترة لكى تهدأ الخلايا وتثبت. ويمكن تحديد عددها تحت المجهر بقوة تكبير ١٠٠ مرة. ثم يتم حساب عدد الخلايا فى قناة واحدة تختار عشوائيا من القنوات الثلاث بالشريحة. ويكرر ذلك لخمس شرائح تحتوى على عينات من نفس معلق الخلايا تحت الاختبار. ويجب أن تحتوى القناة الواحدة على ٥ – ١٠ خلايا، فإذا كان حجم القناة الواحدة يساوى ٠,٩٩ ميكرولتر (µL) فإنه يمكن حساب عدد الخلايا على أساس واحد سنتيمتر مكعب.

توجيه الخلايا المعلقة نحو النمو والتطور

تنشط سلسلة من العمليات الحيوية والفسيولوجية أثناء نمو الخلايا. فتمتص الخلايا حاجتها من البيئة الغذائية وتقوم أيضا بإفراز مواد أيضية. وتتأثر البيئة بكل من ظاهرتى الامتصاص والإفراز. ويتأثر بالتالى سرعة انقسام الخلايا واتجاه نموها. ويمكن توجيه الخلايا إلى النمو والتطور بتغيير المحتوى الغذائى للبيئة. والعلاقة المتوازنة للأكسين والسيتوكاينين فى البيئة لها تأثير على تكشف الكالس. فزيادة تركيز السيتوكاينين (KIN) بالنسبة للأكسين (IAA) فى البيئة الغذائية يؤدى إلى تكشف ونمو الأفرع من الكالس. وزيادة تركيز الأكسين بالنسبة للسيتوكاينين يشجع تكوين الجذور. والتركيزات غير المتوازنة من السيتوكاينين والأكسين يؤدى إلى اضطراب النمو أى لا يتكشف منه نموات خضرية ولا جذور. وهذه هى القاعدة العامة لعدد كبير من الأنواع النباتية لتوجيه النمو نحو تكوين نموات خضرية أو جذرية، وتختلف الأنواع النباتية فى احتياجاتها المثلى للأكسينات والسيتوكاينينات، كذلك المكونات الأخرى للبيئة الغذائية لها أهمية فى تحديد مسار النمو. وفى الواقع أن ميكانيكية تأثير منظمات النمو لم تتضح بعد. ويعتمد نشاط الخلايا الناتج عن تواجد منظمات النمو والمكونات الأخرى بالبيئة الغذائية على العمر الفسيولوجى للخلايا المزروعة وأصل النسيج المأخوذ منه الجزء النباتى وطول مدة بقاء الخلايا فى المعمل (Skoog and Miller, 1957).

المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحديد المكونات الرئيسية للبيئة الغذائية

تحتوى البيئة الغذائية على حوالى ٢٠ مركبا. وتتكون أساسا من ماء وسكر وعناصر معدنية ومنظمات نمو (جدول ١). ويفضل الرجوع إلى الدراسات السابقة لتحديد البيئة المناسبة للنبات تحت الدراسة بدلا من إجراء سلسلة اختبارات لتحديد البيئة وتركيز كل مكون فيها، وقد يستغرق ذلك فترة زمنية طويلة. لذلك يجب أن تبدأ التجارب الأولية بثلاثة تركيزات (منخفض، متوسط، مرتفع) على عناصر البيئة للنبات تحت الاختبار كالآتى:

- السكروز: يحضر عادة بتركيزات ١٪ و٢٪ و٤٪.
- العناصر المعدنية: تستخدم بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962 كأساس تحضر منها تركيزات ٢٥٪ و٥٠٪ و١٠٠٪ من قوة العناصر المعدنية المذكورة بها.
- الأكسينات مثل: Indole- 3- Butyric Acid (IBA) ويحضر بتركيزات ٠,٠١ و٠,٥ و١ ملليجرام/ لتر.
- سيتوكاينينات مثل: 6-Benzyl Adenine (BA) وتحضر بتركيزات ٠,٠١ و٠,٥ و١ ملليجرام/ لتر.

فإذا كان المطلوب إجراء تجارب أولية على ٤ عوامل هى: السكروز والعناصر المعدنية و(IBA) و(BA) . ويحضر من كل مركب فى ثلاثة تركيزات. فيكون عدد التراكيب المطلوب تحضيرها هى $٣^٤ = ٨١$ تركيبة. لذلك تجرى تجارب زراعة الأنسجة على ٨١ تركيبة غذائية. واختيار أفضلها من حيث تأثيرها على سرعة النمو وجودته. وبهذا يتم الوصول إلى الهدف فى أقصر فترة ممكنة. وقد يستلزم إجراء مزيد من الاختبارات لتحديد التركيز الأمثل من الأكسين أو السيتوكاينين. فإذا ثبت من التجربة الأولى أن أفضل تركيز مثلا هو ٠,٥ ملليجرام/ لتر. فيفضل إجراء سلسلة اختبارات أخرى تحتوى على تركيزات أقل وأعلى من ٠,٥ مثل ٠,١، ٠,٣، ٠,٥، ٠,٨، ١ ملليجرام/ لتر. وقد يستلزم إجراء سلسلة اختبارات أخرى إذا تغير نوع المحصول.

جدول (١) المكونات الرئيسية للبيئات الغذائية المستخدمة فى الزراعة المعملية

الماء					
عناصر معدنية				مواد عضوية	
كبرى		صغرى			
نيتروجين	N	حديد	Fe	سكريات	
فوسفور	P	زنك	Zn	أحماض أمينية	
بوتاسيوم	K	منجنيز	Mn	فيتامينات	
كالسيوم	Ca	نحاس	Cu	منظمات نمو:	
ماغنسيوم	Mg	بورون	B	١- أكسينات	Auxins
كبريت	S	كوبالت	Co	٢- سيتوكاينين	Cytokinis
		نيكل	Ni	٣- جبرلين	Gibberellins
		ألومنيوم	Al	٤- حمض أبسيسيك	Abscisic acid
		موليبدنم	Mo	٥- إيثلين	Ethylene
معقدات طبيعية:		رقم الحموضة	PH	مستخلصات نباتية:	
- مستخلص خميرة				كازين	Casin hydrolysate
- لبن جوز الهند				ببتون	Pepton
				تريبتون	Trypton

أهمية مكونات البيئة الغذائية

١ - الماء Water

الماء من أهم المركبات فى البيئة الغذائية لأنه الوسط الذى تذوب فيه جميع المكونات، ويستلزم استخدامه فى صورة مقطرة ومعقمة بدرجة عالية. ويفضل استخدام

جهاز من الزجاج البيركس Pyrex لتقطير الماء مرتين. خصوصا لمزارع البروتوبلاست والخلايا الفردية والأنسجة المرستيمية. ويجب تنظيف جهاز التقطير من الداخل بصورة منتظمة للتخلص من الرواسب والشوائب العالقة بالجهاز والمحافظة على جودة الماء المقطر. ويلحق بجهاز التقطير جهاز مزيل للأيونات De- ionizer. ويفضل البعض استخدام أغشية أسموزية لترشيح وتنقية الماء المقطر بهدف مزيد من النقاوة والتعقيم. ويخزن الماء المقطر فى أوانٍ من البوليثين Polythene، حيث يمكن أن تنطلق من جدر الأوانى الزجاجية إلى الماء المقطر آثار من الرصاص والصوديوم والزنك التى يحتويها الزجاج كشوائب. وإذا كان لابد من استخدام الزجاج لتخزين الماء فيجب أن يكون من النوع البيركس.

٢ – السكر Sugar

السكروز من المركبات الهامة جدا الذى يتم تمثيله طبيعيا فى النبات. ولابد من تواجده فى البيئة الغذائية لأهميته كمصدر للطاقة فى تكوين النموات الجديدة. وترجع أهميته إلى عدم كفاءة النباتات المعملية فى بناء السكريات نتيجة ضعف الكلوروفيل وضعف الإضاءة. أو إطالة فترة الظلام التى تتعرض لها النباتات المعملية أحيانا مما يساعد على توقف البناء الضوئى تماما. كما أن تركيز ثانى أكسيد الكربون الناتج عن تنفس النباتات المعملية يكون محدودا وغير كاف لعملية التمثيل الضوئى (George, 1993; Pierik, 1997;). ومن الناحية العملية يصعب إمداد البيئة بغاز ثانى أكسيد الكربون، وزيادة تركيزه داخل الأوانى المزروعة يؤدى إلى تسمم النباتات. ويضاف السكروز للبيئة بنسبة ١ – ٥٪. وقد يستخدم الجلوكوز والفركتوز والمالتوز والجالاكتوز والسكريات الكحولية مثل الجلسرول والسوربيتول. ويعتمد تركيز السكروز المضاف للبيئة على نوع وعمر النبات النامى. فالأجنة الصغيرة جدا تحتاج إلى نسبة عالية من السكروز. وزيادة تركيز السكروز فى البيئة عن التركيز الأمثل يؤدى إلى تدهور النموات نتيجة تثبيط عملية التمثيل الكربونى وتثبيط تكوين الكلوروفيل والسكروز المتوفر فى السوبر ماركت مناسب لارتفاع نقاوته إذ يحتوى على ٩٩,٩٤٪ سكروز

و ٠,٠٢٪ مـاء و ٠,٠٤٪ سـكريات أخرى مثل الفركتوز والجلوكـوز. وتعقيم البيئة بالأوتوكلاف قد يحدث تغييرات للسكريات. كما أن زيادة رقم حموضة البيئة عامل هام فى إحداث هذه التغيرات. وتساعد زراعة أجزاء جذرية فى البيئة على إحداث تغيير فى السـكروز نتيجة نشـاط إنزيم الإنفرتيز Invertase المفرز من خلايا الجذر. واختلفت آراء الباحثين حول تأثير تعقيم السـكر بالأوتوكلاف. ويسـتخدم السكروز فى زراعة البروتوبلاسـت للمحافظة على الضغط الأسـموزى للبيئة الغذائية وحماية البروتوبلاسـت من الانفجار. ويضاف السوربيتول Sorbitol أو السكروز بتركيز ٠,٢٣ مولـر للمحافظة على البروتوبلاسـت فى البيئة الغذائية. ويعتبر السـوربيتول أفضل مصـدر للكربوهيدرات فى البيئات الخاصة بزراعة أنسـجة نباتـات العائلة الوردية Rosaceae. ويسـتخدم السكروز بدلا من السوربيتول مع بعض الأنواع التابعة للعائلة الوردية. ومن ناحية أخرى تنمو أنسجة بعض النباتات مثل الخوخ صنف Reliance فى وجود السوربيتول بصورة أفضل بالمقارنة بالسكروز.

٣ - الأملاح المعدنية Mineral salts

تشمل الأملاح المعدنية على العناصر الضرورية الكبرى وهى النيتروجين والفوسفور والبوتاسـيوم والكالسـيوم والماغنسـيوم والكبريت، ونقصها يسـبب موت النبات. والعناصـر الضرورية الصغرى وهـى الحديد والمنجنيز والنحـاس والزنك والبورون والموليبدنم والكلور والكوبالت. ويؤثر نقصها على انتظام سير العمليات الحيوية فى النبات، ولا تكون سببا مباشرا فى موت النبات.

وتعتبر بيئة Murashige and Skoog (MS) (1962) من أكثر البيئات استعمالا فى الزراعة المعملية. وتستجيب لها معظم النباتات بسهولة. وقد تكون بيئة (MS) غير مناسبة لنمو بعض النباتات ذات الحساسية الشديدة للتركيزات المرتفعة من العناصر مثل نباتات *Rhododendron; Gerbera; Kalmia* وبعض النباتات الخشـبية، لذلك قد تسـتخدم تركيزات مخففة من بيئة (MS) أو تستخدم بيئة أخرى منخفضة فى العناصـر المعدنية مثل بيئة Lloyd and Mc Cown, 1980; Woody Plant Media)

(WPM) Grattapaglia and Machado, 1998). ويفضل تحضير الأملاح باستخدام تركيز الأيونات بالملليمولر. وتتعدد البيئات وتختلف فى محتواها من العناصر بما يتناسب مع اختلاف حساسية النباتات تحت التجربة. وتعتبر بيئة (MS) غنية فى الأملاح، بينما بيئة Knop's فقيرة فيها. ويحتاج النبات ٢- ٢٦ ملليمول/ لتر بوتاسيوم، و١- ٥ ملليمول/ لتر من كل من الفوسفات ($H_2PO_4^-$) والكالسيوم (Ca^{++}) والماغنسيوم (Mg^{++}) والكبريتات (SuO_4^-). ويعتبر الحديد من العناصر الهامة فى البيئة لتأثيره المباشر على نمو وتكشف الأجزاء النباتية المزروعة. ويجب تواجد الحديد والعناصر المعدنية الأخرى فى صورة قابلة للامتصاص. مع العلم بأن أملاح الحديد فى صورة سترات Citrate وطرطرات Tartrate صعبة الذوبان فى الماء وترسب بعد تحضيرها فى البيئة الغذائية. بينما تميزت بيئة (MS) بوجود الحديد فى صورة مركب Fe-EDTA؛ وهو من المركبات المخلبية المفضلة بالمقارنة بأملاح الحديد الأخرى لأهميته فى تنشيط تكوين الأجنة والنموات، ويؤخذ عليه عدم الثبات فى البيئة بعد تعقيمها بالأوتوكلاف؛ حيث يتحد مع مركبات أخرى ويرسب بعد عدة أيام. لذلك يفضل عليه مركب FeNa- EDTA لاحتوائه على الحديد والصوديوم.

ويضاف النيتروجين إلى معظم البيئات فى صورة أمونيا (NH_4^+) أو نترات (NO_3). فإذا كانت كمية النيتروجين المطلوب إضافتها للبيئة ١٢- ٦٠ ملليمولر فيجب أن يكون تركيز الأمونيا ما بين ٦- ٤٠ ملليمولر. وتمتص معظم النباتات النترات بصورة أفضل من الأمونيا، بينما تمتص بعض النباتات الأمونيا بصورة أفضل من النترات. وامتصاص النبات لأيونات الأمونيا يؤدى إلى انخفاض رقم حموضة البيئة وإسالة الآجار ويؤدى بالتالى إلى امتصاص النيتروجين فى صورة نيتريت (NO_2) Nitrite. وفى أنواع نباتية عديدة وجد أن للنيتروجين المختزل تأثيره واضحا على نمو الأجزاء النباتية فى المعمل. وأن أيون الأمونيا (NH_4) فى صورة كلوريد أمونيا NH_4Cl أو نترات أمونيا NH_4NO_3 يحقق نموا جيدا لكالس نباتى الكمثرى والتفاح. وإضافة

الأحماض الأمينية وخاصة الأسبرجين Asparagine أو الجلوتامين Glutamine إلى البيئة فى وجود الأمونيا لم يُعْطِ أية زيادة ملحوظة فى النمو .(Nitsch, et al., 1970) ويدخل النيتروجين فى تركيب الأحماض الأمينية والبروتين والكلوروفيل والأحماض النووية (RNA ; DNA). ويدخل النيتروجين فى تركيب الإنزيمات التى تعتبر عاملا حيويا هاما تزيد من سرعة التفاعلات الحيوية بالخلية النباتية، ويدخل فى كثير من الهرمونات النباتية مثل الأكسينات التى تحتوى على حلقة الإندول مثل (IAA) والسيتوكاينينات مثل الكاينتين (KIN) والبنزايل أدينين (BA). ويساعد الأكسين على نمو النباتات وتكوين الجذور وكسر السكون وينشط السيتوكاينين تكوين الأفرع والتكاثر وزيادة عدد النباتات.

ويدخل الفوسفور فى تكوين الفوسفوليبيدات والأحماض النووية ومركبات جلوكوز-١-فوسفات وأدينوزين ثلاثى الفوسفات (ATP) وأدينوزين ثنائى الفوسفات (ADP) وأدينوزين أحادى (AMP) وجميعها مركبات تمد الخلية بالطاقة. بينما يدخل الماغنسيوم فى تركيب الكلوروفيل ويعمل على زيادة اللون الأخضر فى النبات. وغيابه يؤدى إلى اصفرار النباتات ولا تستكمل دورة حياتها. ويؤدى نقص الكالسيوم فى النبات إلى عدم تكوين الصفيحة الوسطى Middle lamella أثناء انقسام الخلية واصفرار النبات وإصابة القمة النامية بالقرح Necrosis وظهور ظاهرة التزجج Vertification فى النباتات المعملية. ولا يستطيع النبات استكمال دورة حياته فى غياب عنصر الكالسيوم. والبوتاسيوم من العناصر الضرورية للنبات لأنه يساعد على امتصاص الماء وانتقال السكريات. ولم يعرف حتى الآن المركبات التى يدخل البوتاسيوم فى تركيبها. ويؤدى غياب البوتاسيوم كلية إلى فقد النبات قدرته على تكملة دورة حياته. والكبريت من العناصر الضرورية ويدخل فى تركيب بعض الأحماض الأمينية مثل السيستين والسيستائين والميثيونين وجلوتاثيون. ويساعد الكبريت على إتمام تفاعلات الأكسدة والاختزال ولا يستطيع النبات تكملة دورة حياته فى حالة غيابه كليا.

٤ - الآجـار Agar

يستخلص الآجار من حشائش البحر Seaweeds فى صورة حبيبات Pellets. ثم ينظف وينقى للتخلص من المواد السـامة. ويوضح جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشـوائب العضوية وغير العضوية. ويسـتخدم الآجار كمادة غروية فى معظم البيئات الغذائية. والآجار من مشـتقات السكريات المتعددة Polysacchrides ذات الـوزن الجزيئـى الكبير. ولـه القدرة على ربط جزيئات المـاء فيحول البيئة السائلة إلى غروية. ويخفض ظاهرة التزجج نتيجة انخفاض نسبة الرطوبة الممتصة. ويضاف آجار Difco Bacto Agar إلى البيئة الغذائية بتركيز ٠,٦ ٠,٨٪. وللآجار القـدرة على الارتباط بجزيئات الماء وادمصاص المركبات الكيميائية بالبيئة. وزيادة تركيـز الآجار إلى ١٪ فى البيئة يؤدى إلى تصلب البيئة جدا ويصعب ثبات الجزء النباتى عليها نتيجة انخفاض الماء الميسر بالبيئة الغذائية مما يؤخر تكوين الجذور وانخفـاض التلامس بين المـادة النباتية والبيئة الغذائية ممـا يؤدى إلى انخفاض قدرتها على امتصاص الماء والعناصر الغذائية. وإذا استخدم الآجار بتركيز أقل من ٠,٤٪ تصبح البيئة غير متماسكة Sloppy خصوصا إذا كان رقم الحموضة منخفضا أيضا. بينما إذا اسـتخدم التركيز ٠,٦٪ وظلت البيئة غير متماسـكة لذلك يجب الرجـوع إلى تصحيـح حموضة البيئة، لأن رقم الحموضـة إذا كان أقل من ٤,٥- ٤,٨ يؤدى إلى عدم تماسـك البيئة. ومضمون ذلك أن نمو المادة النباتية يتأثر بنوع الآجار وتركيزه، لذلك يفضل اسـتخدام آجار نقـى وعالى الجودة. ويوضح جدول (٣) محتـوى أجار Difco من العناصر. وبالرغم من وجود أنواع أخرى معروفة من الآجار مثل Flow agar; Gibco phytagar إلا إنه يفضل زراعة البروتوبلاسـت أو الخلايـا الفردية فى آجـار نقية جدا مثل الأجاروس Agarose. ويمكن اسـتبدال الآجار بمركبات أخرى مثل:

– البوليمرات الصناعية Synthetic polymers مثل البيوجيل Biogel P٢٠٠. وهو عبارة عن حبيبات بولى أكريليميد Polyacrylamide pellets.

– الجينات الصوديوم Sodium alginate ويستخدم فى زراعة البروتوبلاست . ومواد من السليولوز المتبلور Cellulose crystallite aggregate (CCA) ولها أهمية خاصة فى تكوين جذور القنبيط.

– معقد الجيل رايت Gelrite وهى مادة غروية عالية النقاوة، تتكون من سكريات عديدة مثل الجلوكورونيك Glucuronic والجلوكوز والرامنوز Ramnose وأرثو أسيتيل ميوتيز O-Acetyl moieties. ومعقد Gelrite قادر على تكوين جيل لامع فى وجود ملح المائدة. وتعتمد قوة هذا الجيل على نوع الملح المضاف. فالكاتيونات الثنائية مثل الماغنسيوم (0.1% سلفات ماغنسيوم MgSO4 .7H2O) والكالسيوم تعطى جيلا أقوى من الجيل المضاف إليه أيونات أحادية التكافؤ مثل الصوديوم أو البوتاسيوم. ويحتاج Gelrite إلى حرارة وتوفير كاتيونات ليكون القوام غرويا. ويوصى باستخدام ٠,٢٪ جيل رايت. ويؤخذ عليه أنه يحتوى على آثار من مركبات فينولية قد تسبب سمية للنموات الناتجة فى المعمل.

– مادة نشوية تستخلص من نبات *Nephrolepis exaltata* تستخدم بتركيز ١٢جرام/ لتر بيئة، وتذوب فى الماء بدون استخدام حرارة.

جدول (٢) محتوى بعض أنواع الآجار من الشوائب العضوية وغير العضوية

الآجار المكونات	Bacto agar%	Noble agar%	Purified agar%
Ash	4.5	2.16	1.75
Calcium	0.13	0.23	0.27
Barium	0.01	0.01	0.01
Silica	0.19	0.26	0.09
Chloride	0.43	0.18	0.13
Sulphate	2.54	1.90	1.32
Nitrogen	0.17	0.10	0.14

جدول (٣) محتوى Difco Bacto Agar من العناصر

العناصر	التركيب (جزء فى المليون)
Cadmium	0.5 - 0.0
Chromium	0.1 - 0.0
Manganese	0.5 - 0.1
Zinc	10.0 - 0.0
Copper	1.5 -0.5
Iron	5.0 - 1.5
Lead	0.5 - 0.0
Magnesium	430.0 - 210.0

٥- معقدات طبيعية Natural complex

هى معقدات طبيعية مثل عصائر الطماطم والبرتقال والعنب والأناناس وماء جوز الهند والموز المهروس ومستخلص الخميرة ومستخلص المولت. وتحتوى هذه المعقدات ومستخلصاتها على تركيزات عالية من السكروز وعناصر غذائية ومركبات هامة أخرى يستلزم دراستها لمعرفة مكوناتها وعلاقتها بتنشيط النمو. فقد وجد أن زراعة أنسجة مفصولة من نباتات الموالح على بيئة مضافا إليها ١٠٪ عصير برتقال قد نمت بكفاءة تعادل ستة أضعاف مثيلتها التى لا تحتوى على عصير برتقال، وتعادل مثيلتها التى تحتوى على ١٠٪ سكروز (Einset, 1978). كذلك ثبت أن ماء جوز الهند يحتوى على مركبات عديدة مثل Myoinositol الذى يدخل فى تركيب البينات الغذائية كمنشط للنمو، ويدخل أيضا فى بناء الفوسفوليبيدات والمواد البكتينية فى الجهاز الخلوى وفى بناء الغشاء البلازمى. ويضاف Myoinositol إلى بيئة أنواع نباتية

عديد مثل البلارجونيوم Pelargonium hortorum بتركيز ٥٠– ١٠٠ ملليجرام/ لتر، ويعتبر هاما جدا لنمو كالس نبات Faxonus pennsylvanica وتكشف كالس نبات Hawoethia. ويساعد ماء جوز الهند على نمو وتكشف الأنسجة النباتية المزروعة فى المعمل لأنواع نباتية عديد مثل أجنة نبات الداتورا ونخاع نبات التبغ ومرستيم القمة النامية لنبات Pharbitic nil. ويحتوى ماء جوز الهند على مركبات عديدة لها أهميتها فى انقسام الخلايا مثل Diphenylurea والسيتوكاينين الطبيعى Zeatin ومركب مشابه للكينيتين (KIN) وهو أحد مركبات السيتوكاينينات. كما يحتوى على العديد من الأحماض الأمينية الحرة مثل فينيل ألآنين Phenyl alanine الذى له دور فعال فى انقسام خلايا نبات فول الصويا. ويضاف ماء جوز الهند للبيئة الغذائية بمعدل ٥٠– ١٥٠ ملليلتر/ لتر (٣– ١٥٪) . وتعتمد الكمية المضافة من ماء جوز الهند على عمر الثمرة حيث يتغير تركيبه بتقدم عمر الثمرة. وإضافة ماء جوز الهند مع الأكسينات للبيئة الغذائية يؤدى إلى انقسام سريع للخلايا. كذلك ثبت أن ماء ثمار جوز الهند الناضجة يحتوى على سيتوكاينين يسمى 9-β-D-Ribofura-nosylzeatin ولذلك يستخدم السيتوكاينين فى حالة عدم توفر ماء جوز الهند. كما يحتوى على نيتروجين مختزل له تأثير منشط قوى لنمو الأنسجة النباتية المختلفة. ويستخلص ماء جوز الهند بثقب الثمار بواسطة مثقاب كهربائى. ويجمع الماء من كل ثمرة على حدة فى كأس مستقل. ويختبر السائل للتأكد من صلاحيته. ثم يجمع الماء من الثمار السليمة ويرشح خلال شاشة جبن. ويعقم الراشح بالأوتوكلاف لمدة ١٥ دقيقة عند ١٢١°م ثم يترك ليبرد طول الليل. ثم يرشح فى صباح اليوم التالى، ويحفظ فى وعاء بلاستيك ذات غطاء قلاووظ عند ٢٠°م.

٦ - معقدات طبيعية أخرى

تستخدم بعض المعقدات الطبيعية الأخرى كمصادر للنيتروجين حيث تحتوى على أحماض أمينية وفيتامينات مثل كازين Casein–hydrolysate ويضاف بتركيز ٠,١– ١ جرام/ لتر. والببتون Peptone ويضاف بتركيز ٠,٢٥– ٣ جرام/ لتر. والتربتون Tryp-

tone ويضاف بتركيز ٠,٢٥ – ٢ جرام/ لتر. ومستخلص المولت Malt extract ويضاف بتركيز ٠,٥ – ١ جرام/ لتر. ومستخلص الخميرة Ycast extract، ويضاف بتركيز ٠,٢٥ – ٢ جرام/ لتر. وتستخدم الخميرة لاحتوائها على نسبة مرتفعة من فيتامين B .

٧- معقدات متنوعة Miscellaneous compounds

(أ) أمينات متعددة Polyamincs

تستخدم هذه المركبات لتشجيع خلايا الكالس على تكوين الأجنة. ومن هذه المركبات Spermidinc; Putrescine; Spermidine; Spermine. ولوحظ زيادة مركبات Putrescine طبيعيا فى أجنة نبات الجزر ونبات *Medicago sativa* أثناء نموها، وإضافة مثبط البولى أمينات Polyamines inhibitor يتوقف تكوين الأجنة، وبإضافة أى مركب من الأمينات المتعددة تستأنف الأجنة نشاطها. ويتواجد مركب Putrescine متزامنا مع بدء تكوين أجنة الجزر. وتساعد الأمينات المتعددة أيضا فى تكوين الجذور العرضية. ومضمون ذلك أن الأمينات المتعددة والإنزيمات المرتبطة بنشاطها لها أهمية فى انضباط النمو وتطوره، ولها أهمية كبيرة أيضا فى حفظ الأنسجة والأصول الوراثية النادرة لفترات طويلة للاستفادة بها مستقبلا. ويبدو أن مركب Putrescine مشتق من الحمض الأمينى L-Arginine. وأن الأمينات المتعددة لها القدرة على منع تحويل الميثيونين Methionine إلى إيثلين Ethylene. والتوازن الداخلى بين الإيثلين والأرجينين والأمينات المتعددة له دور هام فى انضباط تكوين الأجنة الجسمية (Rugini and Wang, 1986).

(ب) مركب فينايل يوريا ومشتقاته Phenylurea and its derivatives (DPU)

يعتبر مركب (DPU) مثبطا لإنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينينات، لذلك يعمل (DPU) على زيادة نشاط السيتوكاينينات (Horgan, 1986). ويعتبر إنزيمى

Thidiazol ureas (Thidiazuron); Pyridyl ureas ومشتقاتهما من أكثر المركبات نشاطا وفاعلية، ويعادل نشاطهما ١٠ آلاف مرة قدر نشاط (DPU)؛ كما أنهما أكثر نشاطا من الزايتين Zeatin (سيتوكاينين طبيعى). وينشط انزيم Thidiazuron نمو الأفرع لنباتات أشجار خشبية عديدة ، ويؤدى تركيز ٠,٠٥– ٠,١ ميكرومولر من انزيم Thidiazuron إلى زيادة ملحوظة فى عدد أفرع نبات *Celtis occidentalis* أكثر بالمقارنة بتركيز ٤– ١٠ ميكرومولر من مركب (Meyer and (BA) Kemsh, 1986). لذلك يجب أن تنال هذه المركبات اهتمام الباحثين.

(جـ) الأدنين Adenine

يضاف الأدنين فى صورة سلفات أدنين Adenine sulphate لسهولة ذوبانه فى الماء. ويضاف بمعدل ٢– ١٢٠ ملليجرام/ لتر للبيئة سابقة التجهيز الموجودة فى الأسواق (Nitsch, et al., 1967; Skoog and Tsui,1948). ويشجع الأدنين تكوين الأفرع على أجزاء نباتية متعددة.

٨ - الأكسينات والسيتوكاينينات

تعرف الهرمونات Hormons بأنها مركبات عضوية يتم تمثيلها فى النباتات الراقية بصورة طبيعية. وهى مركبات يظهر أثرها المنشط والمنظم فى النبات عندما يكون تركيزها منخفضا. وفى الأسواق الآن توجد منظمات نمو صناعية مماثلة للمركبات الطبيعية فى تأثيرها الفسيولوجى (Picrik, 1997). ويطلق على المركبات الطبيعية والصناعية اسم منظمات نمو Growth regulators لأهميتها الكبيرة فى تنظيم نمو النبات وتطوره وتوزيع المركبات المتلة فى النبات وانقسام الخلايا وزيادة عددها وحجمها. وللأكسينات Auxin والسيتوكاينينات Cytokinin أهمية كبيرة فى الزراعة المعملية. ومن المستحيل نجاح زراعة الأنسجة فى المعمل بدون منظمات نمو سواء كانت موجودة طبيعيا فى النسيج أم مضافة للبيئة الغذائية. والاتزان بين منظمات النمو المضافة للبيئة ومنظمات النمو الموجودة طبيعيا فى الجزء النباتى

لـه أهمية كبيرة فى تنظيم النمو وتكوين الشـكل الخارجـى للنموات. وعلى ذلك فالأجزاء النباتية التى تحتوى طبيعيا على قدر كاف من الأكسين أو السيتوكاينـين لا تحتـاج إلى إضافة مثـل هذه المركبات إلى البيئة. والأنسـجة الحديثة Juvenile لهـا القدرة على الانقسـام وإنتاج نموات جديدة بدون إضافـة منظمات نمو للبيئة لاحتوائها طبيعيا على منظمات نمو. بينما تحتاج الأنسجة البالغة Adult إلى إضافة منظمات نمو للبيئة لتنشـيط خلاياها على الانقسـام. وطبقا لاحتياج النبات تقسم البيئات إلى بيئة يضاف إليها أكسـينات فقط وبيئة يضاف إليها سـيتوكاينينات فقط وبيئة يضاف إليها (اكسـينات + سـيتوكاينينات) وبيئة لا تحتاج إلى إضافة منظمات نمو. ويعتبر Skoog and Miller, (1957) أول من أوضح العلاقة بين تركيز الأوكسـينات والسـيتوكاينات وأهمية التوازن بينهما فى البيئة الغذائية وأثر ذلك على طبيعة نمو وتكشف الأنسجة المزروعة. وتختلف النسبة بينهما باختلاف النوع النباتى. ويتم التعرف إلى النسـبة المثلى من خلال البحث والتجربة. وتحتاج كثير من الأنسـجة النباتية بشكل رئيسى إلى السيتوكاينينات فى حين لا يعتمد البعض الآخر على وجودها. وقد تبين أن احتياج الأنسجة النباتية إلى السيتوكاينينات هى صفة وراثية. ويعتبر المعدل الطبيعى فى جميع البيئات الأساسـية لمزارع الأنسـجة بالنسـبة هـو ٠,٥ ملليجرام/ لتر سـيتوكاينين + ٥ ملليجرام/ لـتر IAA فإذا زاد تركيز الأكسين IAA يتكشف الكالس إلى جذور، وإذا انخفض تركيز الأكسين وزاد السـيتوكاينين يتكشـف الكالس إلى أفرع وأوراق جديدة ونبيتات جديدة ذات سوق وأوراق وجذور.

وعند تحضير البيئة تذاب الأكسينات IAA; IBA; NAA فى الماء، وتكون أسـهل فـى الإذابة إذا كانت فى صورة ملح بوتاسـيوم. ويمكن إذابتهـا أيضا فى صورتها الحامضية فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم. ويمكن إذابة السـيتوكاينينات أيضا فى ٠,١ مولر هيدروكسيد بوتاسيوم أو هيدروكسيد صوديوم، بينمـا يذاب الجبرلين فى الماء. وتخزن محاليـل IAA والكينيتين فى الظلام لأنها غـير ثابتة فى الضـوء، بينما BA; 2,4–D ; NAA; IBA تكون أكثر ثباتا فى وجود

الضوء. ويفقد مركب IAA نشـاطه فى محلوله المائى تدريجيا بإطالة فترة التخزين، كما يفقد نشاطه أيضا بواسطة إنزيمات البيروكسيديز Peroxidase والإندول أسيتيك أسيد أوكسيديز IAA-Oxidase.

٨-١- الأكسينات Auxins

تضاف الأكسـينات غالبا للبيئة لتنشـيط نمو الكالس وتكوين الجذور العرضية. وتـؤدى التركيـزات المنخفضة من الأكسـينات إلى تكوين الجـذور العرضية، بينما التركيـزات المرتفعة منها تمنع تكوين الجذور وتؤدى إلى تكوين الكالس. وتثبط نمو السـوق العرضية والإبطية لعدم قدرتها على كسـر السـيادة القمية، كما أنها تثبط تكوين الأجنة فى معلق الخلايا. وتعمل الأكسينات على استطالة الخلايا وانتفاخها وانقسـامها وانتظـام التكوين الظاهـرى للنموات خصوصا إذا كانـت فى اتزان مع السيتوكاينن (Pierik, 1997). وتتأثر الأكسينات كثيرا برقم الحموضة وكمية العناصر بالبيئة الغذائية. وتشمل الأكسينات العديد من المركبات أهمها:

3-Indole Acetic Acid (IAA); 3-Indole Butaric Acid (IBA);
2,4,5-Trichlorophenoxy Acetic Acid (2,4,5-T); Naphthalene AceticAcid (NAA);
2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid (2,4-D); 4,4-Chlorophenoxy Acetic Acid (CPA);
4-Amino- 3,5,6- Trichloropicolinic Acid (Pichloram or TCP)

ويعتبر (IAA) من الأكسينات الضعيفة ويتكون طبيعيا فى النبات ويخلق صناعيا. ويضاف إلى البيئة بتركيز ٠,٠١ – ١٠ ملليجرام/ لتر. وتعتبر الأكسـينات الصناعية مثل (IBA ; NAA ; 2,4-D) من الأكسينات القوية وتضاف للبيئة بتركيز ٠,٠٠١ – ١٠ ملليجرام/ لتر. (Torres, et al., 2001) ويرشـح مركب (IAA) قبل إضافته للبيئة الغذائية باسـتخدام مرشـحات بكتيرية لأن تعقيمه بالأوتوكلاف يؤدى إلى تكسيره وتقليل فاعليته. ويحفظ فى زجاجات بنية لأنه يفسـد بالضوء. كذلك تحفظ البيئة المحتويـة على (IAA) فى ظلام تام حتى لا تفسـد فاعليتـه. وتعمل الإضاءة على

تكسير هذا الأكسين فى البيئة الغذائية بعد ١٤ ساعة من التحضين. كذلك يتأثر (IAA) بالحموضة والأملاح. ويلاحظ أن هذا الأكسين لا يذوب فى الماء ويجب إذابته أولا فى كحول إيثانول أو هيدروكسيد البوتاسيوم. ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام (IAA) فى هيدروكسيد بوتاسيوم تركيز واحد عيارى ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب بالماء المقطر.

ويستخدم (2,4- D) بتركيز عالٍ كمبيد حشائش وبتركيزات منخفضة فى مزارع الأنسجة للمساعدة على تكوين الكالس بالاتزان مع السيتوكينين. ويستخدم (2,4- D) فى مزارع الأنسجة فى نطاق محدود لأنه يساعد على إحداث الطفرات ويثبط أحيانا عملية التمثيل الضوئى، ولتجنب ذلك يوصى باستخدام مركب TCP بدلا من 2,4- D. بينما لا تسبب (IAA, NAA) هذه الآثار. وتختلف نباتات الفلقة الواحدة عن نباتات الفلقتين فى استجابتها لتأثير (2,4- D). ويرجع ذلك إلى قدرة نباتات الفلقة الواحدة على امتصاص (2,4- D) وقدرة هذه المادة على تغيير السلوك الفسيولوجى حيث تمنع تكوين الصفيحة الوسطى Middle lamella وتتلفها أثناء انقسام الخلايا. وثبت أن الأكسين (CPA) هو الأقل تأثيرا بالمقارنة بالأكسينات (2,4- D; 2, 4, 5- T). وبمقارنة بالأكسين (IAA) وجد أن (2,4-D) يحفز النمو بمقدار ٨– ١٢ مرة، وأن (2, 4, 5-T) يحفز النمو بمقدار ٤ مرات، بينما (CPA) يحفز النمو بمقدار مرتين فقط.

ويستخدم الأكسين (NAA) بكثرة فى مزارع الأنسجة النباتية لتكوين الكالس أو تكوين المجموع الجذرى فى المرحلة النهائية، ويعتبر أقل تأثيرا من IAA من حيث القدرة على إيقاف أو منع تكشف الأجزاء النباتية. والتركيزات المخففة من NAA تؤدى إلى تنشيط تكوين الجذور لبادرات العائلة (Pierik, et al., 1984 *Brme-liaceae*). ويلاحظ أن الاتزان الداخلى للأكسينات والسيتوكينينات هو المحدد فى جميع حالات نمو النبات.

ويذوب NAA فى الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم، ويحضر بإذابة ١٠٠ ملليجرام من الهرمون فى هيدروكسيد البوتاسيوم تركيز واحد عيارى، ثم يكمل إلى ١٠٠ سنتيمتر مكعب (فى هذه الحالة يكون سنتيمتر واحد مكعب يعادل

واحد ملليجرام). بينما يذاب 2,4- D فى كميات قليلة من هيدروكسيد البوتاسيوم (KOH). ويخفف المحلول بعد ذلك بإضافة الماء المقطر للوصول إلى الحجم المطلوب. وقد يستخدم مركب Dimethyl sulfoxide لإذابة الهرمونات فيه. وإندول حمض البيوتريك (IBA) من الأوكسينات الهامة المستخدمة على نطاق واسع فى مزارع الأنسجة النباتية بهدف تكوين المجموع الجذرى. وهذا الهرمون ثابت نسبيا بالمقارنة بمركب (IAA)، حيث إنه يتحمل التعقيم ولا يتأثر بالحرارة أو الضوء، ويذوب أيضا فى كحول الإيثانول وهيدروكسيد البوتاسيوم. ويتم تحضيره مثل تحضير مركب IAA.

٨- ٢- السيتوكينينات Cytokinins

السيتوكاينينات مركبات عضوية مشتقة من الأدنين Adenine (أمينوبيورين Aminopurine). ولها دور هام فى انقسام الخلايا ونمو أنسجة النبات وتؤثر على العديد من العمليات الفسيولوجية مثل تأخير الشيخوخة Senescence للخلايا وتنشيط حركة العناصر المعدنية ونضج الكلوروبلاست وضبط التكوين المورفولوجى للنبات (Torres, et al., 2001). كما أن للسيتوكاينين القدرة على تثبيط السيادة القمية وتنشيط نمو الأفرع الجانبية وكسر طور السكون، وتثبط نمو الجذور (George, 1993). ومن أكثر السيتوكاينينات استخداما 2iP , BA , KIN (Pierik, 1997). ويذاب الكاينيتين (KIN) فى الماء، ثم يعقم فى أوتوكلاف تحت ضغط بخارى واحد كيلوجرام/ سم٢ لمدة عشرة دقائق. ويذوب الكاينيتين و(BA) فى قليل من حمض الهيدروكلوريك ٠,١ عيارى. وتشمل السيتوكاينينات:

6-Benzyl Amino Purine (BAP); 6- Benzyl Adenine (BA); Isopentenyl adenine (IPA); 6- y- y- Dimethyl ally Amino Purine (2 ip); 6- Furfuryl- Amino Purine (Kinetin).;

5- (4- Hydroxy- 3- Methyl- trans- 2- Butenylamino) Purine (Zeatin).

أهمية التوازن بين الأكسينات والسيتوكينينات

الاتزان بين الأكسين والسيتوكاينين مطلوب غالبا لانتظام تكوين الساق والجذور العرضية. ففى مرحلة الزراعة الثانوية يجب أن يكون مستوى السيتوكاينين أعلى من الأكسين، بينما ينشط تكوين الجذور إذا كان الأكسين فى مستوى أعلى من السيتوكاينين، وقد يكون وجود السيتوكينين فى البيئة غير ضرورى أحيانا (Torres, et al., 2001) (شكل ١).

تركيز السيتوكاينين		تركيز الأكسين
منخفض +	تكوين الجذور على العقل	++++++++++ مرتفع
+	تكوين الكالس فى نباتات أحادية الفلقات	+++++++++
++	أول مرحلة فى تكوين الأجنة	+++++++++
++++	تكوين الجذور العرضية من الكالس	+++++++
++++++	تكوين الكالس فى نباتات ثنائية الفلقات	+++++
++++++++	تكوين أفرع عرضية	+++
مرتفع ++++++++++	نمو أفرع إبطية من ساق نبتة مزروعة	+ منخفض

شكل (١) تأثير توازن الأكسين: السيتوكاينين على النمو والتكشف

٨-٣- الجبرلين Gibberellins

يؤدى إضافة (الجبرلين + الأكسين) إلى استطالة الخلايا والسلاميات ونمو المرستيمات. ويضاف الجبرلين للبيئة لكسر سكون الأجنة والبراعم والبذور والدرنات وغيرها. ويثبط الجبرلين تكوين ونمو الجذور. وتضاف الجبريلينات (GA7 + GA3) لبعض مزارع الأنسجة، و(GA3) هو من أكثر المركبات استعمالا، والجبريلينات حساسة جدا للحرارة حيث يؤدى تعقيمها بالأوتوكلاف إلى تحطيم ٩٠٪ من نشاطها البيولوجى.

٩- منظمات نمو أخرى

٩-١- أوليجوسكارين Oligosaccharins

تدخل الأوليجوسكارين فى تركيب جدر الخلايا وتنظم سرعة النمو وتكشف الجذور والأزهار ونمو البراعم الخضرية، ولها أهمية فى حماية النبات ضد بعض الأمراض وتغييرات الظروف البيئية.

٩-٢- حمض الأبسيسيك Abscisic acid (ABA)

ثبت أن حمض الأبسيسيك له تأثير سلبى على مزارع الأنسجة وعلى نمو الكالس وتكوين الجنين.

٩-٣- الإيثلين Ethylene

الأجزاء النباتية هى المصدر الرئيسى للإيثلين المتجمع فى أوانى الزراعة، والأوعية البلاستيكية مصدر آخر للإيثلين. ويزداد تجمعه خلال الأيام الخمسة الأولى من الزراعة ثم ينخفض بعد ذلك. ويؤدى زيادة تجمعه إلى تثبيط نمو وتكوين الأعضاء النباتية. ووضع أنبوبة تحتوى على برمنجانات بوتاسيوم داخل وعاء الزراعة يؤدى إلى التخلص من حوالى ٧٠٪ من الإيثلين. وللإيثلين دور هام فى تكوين الأبصال (Van Aartrijk, et al. 1986).

٩-٤- فلوروجلوسينول Phloroglucinol

هـو مركـب فينولى لـه تأثير مثبـط لإنزيـم IAA-Oxidase المسـئول عن تحلل الأوكسين IAA. لذلك فإن له القدرة على تنشيط النمو وتكوين السوق. ويؤدى إضافة فلوروجلوسينول مع IAA إلى البيئة إلى تنشيط نمو الجذور.

٩-٥- مركبات فينايل يوريا Diphenyl urea compounds

تسـتخدم هـذه المركبـات بدلا مـن السـيتوكاينـينات بهدف تنشـيط النموات الجانبية. حيث تقوم هذه المركبات بوقف نشـاط إنزيم Cytokinin oxidase المؤكسد للسيتوكاينيـن. وبالتالى تحتفظ الخلايا بمستواها الداخلى من السيتوكاينـين التى لها أهمية فى عمليات التضاعف الكروموسومى.

١٠ - فيتامينات Vitamins

معظـم النباتات قادرة علـى تمثيل الفيتامينات إلا إنه لم يدرس الاحتياج الفعلى للأجـزاء النباتية مـن الفيتامينات. ويضاف واحد أو أكثر مـن الفيتامينات لتحفيز النمـو. حيث ثبت أن حامض الفوليك وحمض (PABA) يحفزان النمو ولكنهما غير أساسيين فى البيئة. وأن الثيامين Thiamine- HCl أساسى لنمو كالس نبات التبغ. وحمض الأسـكوربيك لايحتاجه النبات ولكنه يشـجع علـى النمو فقط فى غياب أو انخفاض تركيز الثيامـين. ويضاف حمض الأسـكوربيك كمركب مضاد للأكسـدة وحماية الأجزاء النباتية من الاسوداد (جدول ٤).

جدول (٤) التركيز المناسب من الفيتامينات

الفيتامين	التركيز/ لتر
Thiamin (Vitamin B1)	5 - 0.1
Riboflavin (Vitamin B2)	10 - 0.1

تابع جدول (٤)

الفيتامين	التركيز/ لتر
Pyridoxin (Vitamin B6)	1 - 0.1
Panthothenic acid	2.5 - 0.5
Folic acid	0.5 - 0.1
Nicotinic acid	5 - 0.1
Para-Aminobenzoic acid (PABA)	1 - 0.5
Myo-inositol	200 - 100
Ascorbic acid (Vitamin C)	100 - 1
Biotin (Vitamin H)	1 - 0.1
Tocopherol (Vitamin E)	50 - 1

١١ - أحماض أمينية Amino acids

الأحماض الأمينية لها أهميتها إذا كان النبات غير قادر على بناء البروتين بالقدر الكافى لاحتياجه. ويضاف الكازين Casein hydrolysis للبيئة كمصدر للأحماض الأمينية بنسبة ٠,٠٥ – ٠,١٪. ويضاف غالبا Tyrosine; Glycine; L-Asparagine; L-Glutamine كمصادر إضافية للأمونيا بمعدل ١٠٠ ملليجرام/ لتر. وقد يضاف سلفات الأدنين Adenine sulfate إلى البيئة لتحسين النمو وتكوين الأفرع. ويضاف Biotin; Glycine كمصادر للنيتروجين العضوى.

١٢– الفحم النباتى النشط Activated charcoal

ينتج الفحم النباتى بتفحيم الخشب عند حرارة مرتفعة فى وجود بخار الماء.

ويحتوى الفحم على فراغات بينية دقيقة جدا تجعل مساحة المسطح الفعال به كبيرة وقادرة على ادمصاص جميع المواد السامة والغازات. ويحتوى الفحم النباتى على ٩٥– ٩٩٪ فحم نشـط، لذلك يفضل الفحم النباتى عن الفحم الحيوانى. ويفضل استخدام الفحم نباتى النوع Merck No. 2186، ويضاف للبيئة بتركيز ٠,٢– ٣٪ (وزن/ حجم) ومن أهم مميزاته: إكساب البيئة لونا غامقا فتصبح مناسبة لنمو الجذور وامتصاص:

– الصبغات السامة الملونة الناتجة من المركبات الفينولية مثل الميلانين وغير الملونة الأخرى.

– المواد السامة التى تفرزها الأجزاء النباتية المفصولة من الموز والأشجار الخشبية.

– المركبـات العضوية مثل منظمات النمو والإيثلين والفيتامينات والحديد والزنك وغيرها.

– مركـب Hydroxy methyl furfural (HMF) الناتج من انحلال السـكروز أثناء التعقيم.

– مركب فينيل حمض الخليك Phenyl acetic acid وحمض البنزويك Benzoic acid التى تنتجها النباتات النامية فى المعمل.

– يساعد على انتظام وثبات رقم حموضة البيئة الغذائية.

ويضـاف الفحـم النباتى للبيئة كحافـز لنمو وتكوين الأعضـاء Organogenesis والأجنـة Embryogenesis لأنـواع عديدة مثـل تكوين الأجنة مـن متوك الأنيمون Anemone والتبـغ Nicotiana والفيونـاريـا Funaria والأوركيـدات Orchids وأجنة نخيـل البلح والقمم النامية لنبـات الزنجبيل Ginger والبصل والجزر البرى، بينما يعتبر مثبطا لنمو فول الصويا وكالس نبات التبغ (Ammirato, 1983).

البيئات الغذائية شائعة الاستعمال

تتكـون البيئات أساسـا من أمـلاح العناصر الأساسـية الكـبرى والصغرى مضافا إليها سـكروز كمصدر كربونى ومواد أخرى مثـل الفيتامينات والأحماض الأمينية

والأوكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين والمركب المخلبى EDTA وبعض المستخلصات الطبيعية مثل ماء جوز الهند وخلاصة الخميرة وعصير الطماطم وغيرها. وقد تكون مكونات البيئة المناسبة لتحفيز جزء نباتى معين ليكون كالس ليست من الضرورة أن تكون مناسبة لتكشف النموات الخضرية والجذرية من هذا الكالس. كما أن مكونات البيئة السائلة المناسبة لنمو جزء نباتى معين لا يعنى أن تكون مناسبة لإحداث نفس الأثر إذا كانت بيئة صلبة. وتستخدم عديد من البيئات فى معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتختلف هذه البيئات فى مكوناتها ومن أشهر هذه البيئات:

١- بيئة Murashige and Skoog (MS), 1962

وهى من أشهر البيئات الغذائية، وتستخدم بكثرة فى معامل زراعة الأنسجة والخلايا النباتية. وتستخدم لتحفيز الأجزاء النباتية على النمو وتكوين نباتات كاملة لاحتوائها على نسب عالية من النيتروجين والبوتاسيوم. كذلك تستخدم بيئة (MS) لإجراء التجارب عليها عندما يكون الاحتياج الفعلى للنبات غير معروف وأن النبات غير حساس للتركيزات المرتفعة من العناصر. فإذا كان النبات حساسا للأملاح فيستخدم خليط العناصر الغذائية الكبرى والصغرى لبيئة Heller, 1953، وإذا كان النبات حساسا جدا للأملاح فتستخدم بيئة Knop, 1884.

٢- بيئة White (WH), 1963

وتتميز باحتوائها على تركيزات منخفضة جدا من النيتروجين والبوتاسيوم بحيث لا يتناسب مع إحداث نمو جيد للكالس والخلايا النباتية. وعلى الباحث أن يدخل بعض التغييرات المناسبة على تركيز هذين العنصرين بما يناسب نوع النبات تحت التجربة (جدول ٥).

٣ – بيئة Gamborg, et al. (B5), 1976

استخدمت لأول مرة فى زراعة خلايا نبات فول الصويا، وتتميز بارتفاع نسبة النيتروجين والبوتاسيوم. وتستخدم بعد إضافة (2, 4- D) للبيئة بهدف تحفيز الخلايا على الانقسام والتكاثر السريع.

جدول (٥) مكونات بيئة White (WH) من العناصر الصغرى والكبرى

Conc. mg/ l	Micro-elements	Macro-elements	Conc. mg/ l
$FeSO_4.7H_2O$	-	KNO_3	80
$Fe_2(SO_4)_3$	2.5	$Ca(NO_3)_2.4H_2O$	288
$MnSO_4.4H_2O$	4.55	NH_4NO_3	-
$MnSO_4.H_2O$	-	$(NH_4)_2SO4$	-
$ZnSO_4.7H_2O$	2.67	$NaH_2PO_4.H2O$	19
H_3BO_3	1.5	KH_2PO_4	-
KI	0.75	KCl	70
$CuSO_4.5H_2O$	0.001	$CaCl_2.2H_2O$	-
Na_2EDTA	-	$MgSO_4.7H_2O$	737
$Na_2MoO_4.2H_2O$	-	Na_2SO_4	200
MoO_3	0.0001		
$CoSO_4.6H_2O$	-		

ارشادات عامة عند تحضير البيئة

١- تحضر محاليل مركزة من جميع الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والهرمونات التى تدخل فى تركيب البيئة الغذائية (جداول ٦- ١٠). ويفضل ترشيح هذه المحاليل باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) قبل حفظها.
وتحضر العناصر الكبرى والصغرى كل على حدة بكميات تكفى مستقبلا لعدة تحضيرات من البيئة. وتخزن هذه المحاليل فى ظلام فى غرفة عادية. ويوجد فى الأسواق مخلوط من العناصر الكبرى والصغرى سابقة التجهيز وتسمى تجاريا MS-salts، على أن تتبع الإرشادات المسجلة على العبوة لتجنب بعض المشاكل مثل سرعة الترسيب.

٢- تحفظ المحاليل المركزة بعيدا عن الأتربة ومصادر التلوث عند ٢- ٤°م، مع مرعاة عدم تكوين رواسب أو تغيير لونها. ويجب استخدام هذه المحاليل فى فترة لا تزيد عن ٣٠ يوما.

٣- تجزأ محاليل الفيتامينات ومنظمات النمو المركزة فى أنابيب اختبار، تحتوى كل أنبوبة على القدر المطلوب إضافته للبيئة عند تحضيرها ثم تخزن الأنابيب عند (-٢٠°م) لحين وقت استعمالها لضمان سلامة محتوى الأنابيب من التلوث. وتحفظ المحاليل المركزة لإندول حمض الخليك (IAA) فى مكان مظلم عند ٢- ٤°م.

٤- تضاف خلاصة الخميرة والسكر والإنزيمات إلى البيئة عند تحضيرها. ويضاف ٠,٦- ١٪ آجار عند تحضير البيئة الصلبة، ويفضل أن يكون الآجار على هيئة مسحوق.

٥- يرشح لبن جوز الهند عقب استخراجه من الثمار ثم يعقم بالأوتوكلاف ويحفظ عند (-٢٠°م) لسرعة فساده

٦- قبل تعقيم المركبات سريعة التلف بالأوتوكلاف يفضل ترشيحها أولا باستخدام ورق ترشيح رقم (٣) ثم تعقم باستخدام مرشحات التعقيم Millipore MF filters

مسامية (0.22 µm). وعند ترشيح المحاليل المخففة جدا من منظمات النمو خلال مرشحات التعقيم يفضل التخلص من الكمية الأولى من الراشح لاحتمال إدمصاص جزء من الهرمون على سطح المرشحات مما يسبب انخفاض تركيزه.

٧- تكتب جميع البيانات على الأوانى المحتوية على المحاليل مثل اسم المادة وتركيزها وتاريخ التحضير وأى بيانات تضمن سلامة المحاليل واستخدامها قبل فسادها وفقد جودتها.

٨- إذا كان المطلوب استخدام بيئات صلبة أو سائلة مثل البيئات المستخدمة فى زراعة الأجنة فتوضع أنابيب الاختبار على مسطح مائل عقب تعقيمها واستخراجها من الأوتوكلاف عند ٤٥- ٥٠°م .

٩- يستخدم ماء خالٍ من الأيونات De-ionized water بدلا من استخدام مياه الصنبور لارتفاع محتواه من أيونات الكالسيوم الذى يترسب فى قاع الأوتوكلاف.

١٠- يجب تحديد زمن التعقيم ودرجة الحرارة اللازمة للتعقيم. وقد تستخدم بكتيريا *Bacillus stearothermo-phillis* كدليل بيولوجى للتعرف على سلامة التعقيم حيث تموت بعد ١٢- ١٥ دقيقة من التعقيم عند ١٢١°م.

خطوات تحضير البيئة الغذائية

١- تحضر العناصر الكبرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock solution 1).

٢- تحضر العناصر الصغرى كل بمفرده فى محلول حجمه لتر واحد ويسمى (Stock .solution 2).

٣- يحضر محلول يحتوى على حديد مخلبى Fe-Chelate بمفرده فى لتر واحد.

٤- يوضع دورق زجاجى يحتوى على ٥٠٠ ملليلتر ماء مقطر على مسطح ساخن لتسخين الماء، ثم تضاف إليه الكمية المطلوبة من السكر، ويرفع المحلول مباشرة عن السخان بمجرد وضع السكر.

٥- يضـاف إلى محلول السـكر الكميات المطلوبة من العناصـر الكبرى والعناصر الصغـرى والحديـد المخلبى مـع التقليب الجيد، ثم يوضع بعد ذلك على المسـطح الساخن حتى الغليان.

٦- تضـاف الأحمـاض الأمينية المطلوبة بالتركيز المحـدد لها. وتختلف نوعها وكميتها باختلاف نوع النبات.

٧- تضـاف الفيتامينـات للبيئة خصوصـا فيتامين (B_1) لأهميتـه حيث لا يتم تخليقه فى النبات، وذلك بالتركيز المحدد للنبات تحت التجربة. وقد لا يسـتلزم إضافـة فيتامينـات إذا كانت أجزاء ورقية أو خلايا أو كلوروبلاسـت لأنها تحتوى على فيتامينات مخلقة ذاتيا.

٨- يضـاف أحيانا بعض المعقدات الطبيعية مثل لبن جوز الهند وعصير الطماطم وعصير البرتقال ومستخلص الخميرة ومستخلص النشا والكازين لقدرتها العالية على تنشيط النمو.

٩- تضـاف منظمات النمو (الأكسـينات والسـيتوكاينينـات) عـادة بتركيزات منخفضة جدا مع مراعاة الاتزان بينهما ونسـبة الإضافة حسب الهدف من الزراعة. وقد يضاف الجبرلين لبعض البيئات إذا كان له أهمية.

١٠- تضبط حموضة البيئة عند ٥.٧- ٥,٨ باستخدام جهاز pH- meter ويستخدم فى ذلك محاليل مخففة من هيدروكسـيد صوديـوم وحامض هيدروكلوريك. ثم يضاف الآجار عند تحضير البيئة الصلبة فقط. ويخلط الآجار مع ماء بارد مع التقليب الجيد ثم يضاف إلى البيئة. ويجب عدم إضافة الآجار أثناء غليان الماء حتى لا يحدث طبخ زائد له ويسبب تأثيرات ضارة. ويفضل إضافة الآجار باستخدام قمع مع الحرص بعدم تكوين تكتلات فى المحلول أو حدوث فوران أو رغاوى. ثم يستكمل الحجم إلى واحد لتر بالماء المقطر.

١١- توزع البيئة المحضرة على أوانى الزراعة (أنابيب، دوارق مخروطية، برطمانات). ويراعى انتظام توزيع البيئة الغذائية ومنع التصاقها بالجدار الداخلى أو الخارجى.

□□□

جدول (٦) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من الأيونات

Medium Component	1 mM	2 mM	3 mM	4 mM	5 mM	6 mM	7 mM
N-Total	10.942	16.036	7.058	27.385	76.756	27.336	60.017
NH_4^+	-	7.567	-	8.994	2.028	2.608	20.612
NO_3^-	10.942	8.469	7.058	18.391	24.728	24.728	39.405
$H_2PO_4^-$	1.837	1.837	0.906	0.500	1.087	2.608	1.249
K^+	4.310	1.837	10.060	9.897	25.815	24.728	20.042
Ca^{2+}	4.234	4.234	0.510	1.496	1.163	1.360	2.993
Mg^{2+}	1.014	1.014	1.014	0.751	1.014	1.623	1.501
SO_4^{2-}	1.014	4.789	1.014	0.751	2.028	1.623	1.501
Na^+	-	-	7.964	-	-	-	-
Cl^-	-	-	11.080	2.991	2.325	2.721	5.986

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Helder, 1953. 4. Nitsch, 1972.
5. Gamborg, et al , B5, 1976. 6. Schenk & Hildebrandt, SH, 1972.
7. Murashige & Skoog , MS, (1962)

جدول (٧) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الكبرى (ملليجرام/لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
KNO3	250	-	-	950	2500	2500	1900
NaNO3	-	-	600	-	-	-	-

تابع جدول (٧)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
Ca(NO3)2. 4H2O	1000	1000	-	-	-	-	-
NH4NO3	-	-	-	720	-	-	1650
(NH4)2 SO4	-	500	-	-	134	-	-
H2PO4 NH4	-	-	-	-	-	300	-
H2O NaH2PO4	-	-	125	-	150	-	-
KH2PO4	250	250	-	68	-	-	170
KCl	-	-	750	-	-	-	-
CaCl2.2H2O	-	-	75	220	150	200	440
MgSO4.7H2O	250	250	250	185	250	400	370

جدول (٨) محتوى بعض البيئات الغذائية الهامة من العناصر الصغرى (ملليجرام/ لتر)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$FeCl_3 . 6H_2O$	-	-	1.0	-	-	-	
$FeSO_4 . 7H_2O$	-	-	-	27.8	27.8	15.0	27.8
$MnSO_4 . 4H_2O$	-	25.0	0.1	13.2	13.2	13.2	22.3

تابع جدول (٨)

Medium Compound	1	2	3	4	5	6	7
$ZnSO_4 . 7H_2O$	-	7.5	1.0	2.0	2.0	1.0	8.6
H_3BO_3	-	-	1.0	3.0	3.0	5.0	6.2
KI	-	-	0.01	0.75	0.75	1.0	0.83
$CuSO_4 . 5H_2O$	-	-	0.03	0.025	0.025	0.2	0.025
$NaMoO_4 . 2H2O$	-	-	-	0.25	0.25	0.1	0.25
$CoCl_2 . 6H_2O$	-	-	-	0.025	0.025	0.1	0.025
$NiCl_2 . 6H_2O$	-	-	0.03	-	-	-	-
$AlCl_3$	-	-	0.03	-	-	-	-
Na_2EDTA	-	-	-	37.3	37.3	20.0	37.3

1. Knop, 1884. 2. Knudson, 1946. 3. Heller, 1953. 4. Nitsch, 1972.
5. Gamborg, et al. (B5), 1976. 6. Schenk and Hildebrandt (SH), 1972.
7. Murashige and Skoog, (MS), 1962

جدول (٩) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الكبرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	MS mg/l	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
KNO_3	18.8	1900.0	25.0	2500.0	0.8	80.0
$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$	-	-	-	-	1.2	288.0

تابع جدول (٩)

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
NH_4NO_3	20.0	1650.0	-	-	-	-
$(NH_4)2SO_4$	-	-	1.0	134.0	-	-
$NaH_2PO_4 . H_2O$	-	-	1.1	150.0	0.12	19.0
KH_2PO_4	1.25	170.0	-	-	-	-
KCl	-	-	-	-	0.9	65.0
$CaCl_2 . 2H_2O$	3.0	440.0	1.0	150.0	-	-
$MgSO_4 . 7H_2O$	1.5	370.0	1.0	250.0	3.0	737.0
Na_2SO_4	-	-	-	-	1.4	200.0

جدول (١٠) محتوى بعض البيئات الغذائية من العناصر الصغرى

Medium Component	MS mM	MS mg/l	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
$FeSO_4 . 7H_2O$	100.0	27.8	100.0	27.8	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	0.1	-	-	-	6.3	2.5
$MnSO_4 . H_2O$	-	-	60.0	10.0	-	-
$MnSO_4 . 4H_2O$	100.0	22.3	-	-	29.8	6.55

تابع جدول (١٠)

Medium Component	MS mM	MS mM	B5 mM	B5 mg/l	WH mM	WH mg/ l
$MnSO_4 . H_2O$	-	-	60.0	10.0	-	-
$ZnSO_4 . 7H_2O$	30.0	8.6	7.0	2.0	9.3	2.67
H_3BO_3	100.0	6.3	50.0	3.0	25.0	1.5
KI	5.0	0.83	4.5	0.75	4.5	0.75
$CuSO_4 . 5H_2O$	0.1	0.025	0.1	0.025	0.004	0.001
Na_2EDTA	100.0	37.3	100.0	37.3	-	-
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	1.0	0.25	1.0	0.25	-	-
MoO_3	-	-	-	-	0.007	0.0001

الاحتياطات الواجبة عند تحضير البيئة

١- يجب أن تكون جميع المواد الداخلة فى تركيب البيئة الغذائية نقية، وتستخدم ملعقة نظيفة معقمة لكل مادة. ثم تعاد عبوات المركبات الكيميائية إلى أماكن حفظها بعد غلقها جيدا.

٢- توجد فى الأسواق بيئات غذائية جاهزة التحضير تحتوى على العناصر الكبرى والصغرى وحديد مخلبى. ويفضل استخدامها لأسباب اقتصادية وتوفيرا للوقت والمجهود.

٣- تحضر البيئة باستخدام المحاليل المركزة للعناصر الكبرى والعناصر الصغرى التى سبق تحضيرها. ويوزن الآجار والسكر عند الحاجة إليهما. وتحضر محاليل منظمات النمو والفيتامينات قبل الاستخدام مباشرة.

٤- قد تتكون رواسب بمحاليل العناصر الكبرى والصغرى أثناء التخزين حتى ولو كان التخزين باردا. وتسبب الرواسب مشاكل كثيرة. ومحاولة إعادة إذابتها بالحرارة أو الغليان قد يؤدى إلى تغيير تركيزها فى المحلول نتيجة فقد الماء بالبخر، وفى هذه الحالة يفضل التخلص منها وإعادة تحضيرها.

٥- يفضل معاملة البيئة الغذائية بالبخار بدلا من الغليان لإذابة الآجار، حيث إن المعاملة بالبخار تكون أكثر أمانا وتقلل من حدوث تحلل كيميائى غير مرغوب فيه.

٦- المواد التى تتأثر بالحرارة مثل الفيتامينات ومنظمات النمو تضاف بعد تعقيم البيئة بالأوتوكلاف وتبريدها لدرجة حرارة ٤٥- ٥٠°م.، وتستخدم المرشحات المعقمة Filter-sterilization لتعقيمها.

٧- قد يضاف للبيئة الغذائية فحم نباتى نشط للاستفادة من قدرته على امتصاص الغازات السامة التى تتجمع حول جذور النباتات، على أن يضاف للبيئة قبل التسخين أو بعد التسخين مع التقليب الجيد حتى يتجانس تماما مع البيئة الغذائية. ثم تعقم البيئة فى الأوتوكلاف عند ١٢١°م و١,٥ ضغط جوى ولمدة ١٥- ٢٠ دقيقة.

٨- فى حالة الضرورة تخزن البيئة الغذائية بعد تحضيرها، مع مراعاة تجنب تخزينها لمدة طويلة للمحافظة على ثبات المركبات الكيميائية الداخلة فى تكوينها ومنع التبخير الشديد للماء منها.

٩- توزع البيئة فى الأوانى وهى دافئة ثم تترك للتجمد، مع مراعاة وضع أنابيب الاختبار فى وضع مائل حتى تتجمد البيئة. وتحفظ الأوانى المحتوية على بيئة غذائية عند ٥°م لحين زراعتها.

١٠- تغطى الأنابيب والدوارق بورق ألومنيوم بعد صب البيئة الغذائية فيها.

غلق الأوانى بعد زراعتها

تغلق الأوعية بعد زراعتها لمنع تلوثها وجفافها، مع المحافظة على سهولة تبادل الغازات داخل الوعاء مع الجو الخارجى، وتجنب نقص الأكسيجين ومنع تراكم

غازات ثانى أكسـيد الكربون والإيثلين داخلها. ويجب أن تتوفر هذه المواصفات فى جميع أغطية الأنابيب والدوارق. ويستخدم فى غلق أوانى الزراعة المعملية ما يلى:

١- سـدادات قطن صوفى Cotton wool وهى تسـتخدم بكثرة ويتم تشكيلها يدويـا، ولهـا أهميتها فـى المعامل التجاريـة. وتوجد ماكينات لتشـكيل هذه السـدادات بالحجم والمواصفات المطلوبة. ويجب ألا تتعرض هذه السدادات إلى اللهـب بعد الحقن لأن الصوف الزجاجى الصناعى يعطى عند حرقه مواد ضارة وخطيرة.

٢- سدادات Steristop مسامية يمكن دفعها داخل الأنبوبة.

٣- غطاء ألومنيوم Aluminum cap يثبت على فوهة الإناء بكلبس.

٤- ورق الومنيوم Aluminum foil يستخدم خاصة للدوارق المخروطية الكبيرة.

٥- غطاء من الزجاج الشفاف Transparent glass تمتاز بإعادة تعقيمها.

٦- غطـاء حلزونى Screw cap يسـتخدم لتغطية الأنابيب والدوارق ذات الفوهة الحلزونيـة. وعند اسـتخدامها يجب ألا تكون محكمة الغلـق حتى لا تمنع تبادل الغازات بين داخل الأنبوبة وخارجها.

٧- سدادات فـوم Foam plugs.

٨- شـرائح فيـتا فيلم Vita film رقيقة وأنواع أخرى مثل Para film; Polypro-pylcne film; PVC plastic film، ويجب أن تسـمح هذه المواد بتبادل الغازات ولا تسمح بخروج بخار الماء.

احتياطات غلق الأوانى بعد زراعتها

١- يـؤدى الغلق المحكم إلى تجمع ثانى أكسـيد الكربون والإيثلين داخل أوانى الزراعة ويمنع تبادل هذه الغازات بالهواء الجوى. وزيادة تركيز هذه الغازات داخل الأوانى له تأثير سام على النموات بداخلها. والأغطية المصنوعة من ورق (الألومنيوم+ البولىبروبلـين Polypropylene) لها مضارها حيـث إنها غير منفذة للغازات، بينما الأغطية المصنوعة من البولى بروبولين نفاذة للغازات ولا تنفذ بخار الماء.

٢- تعتبر الأنابيب والصناديق والأغطية البلاستيكية مصدرا لغاز الإيثلين خصوصا إذا كانت محكمة الغلق.

٣- تؤدى زيادة الرطوبة داخل الأوانى المزروعة إلى ظهور ظاهرة التزجج Vertification.

٤- الأغطية الزجاجية وغيرها من الأغطية الصناعية الشفافة تسمح بنفاذ الضوء من أعلى، بينما الأغطية القطنية وأوراق الألومنيوم غير منفذة للضوء.

تقدير تركيز مكونات البيئة الغذائية

يقدر تركيز المواد الداخلة فى مكونات البيئة الغذائية بطرق عديدة منها:

١- النسبة بالحجم Volume percentage وتستخدم عادة عند استخدام محاليل طبيعية مثل ماء جوز الهند وعصير الطماطم، ويحضر ماء جوز الهند بمعدل ٥٠ ملليلتر + ٩٥٠ ملليلتر ماء مقطر.

٢- النسبة بالوزن Weight percentage وتستخدم عادة عند تحضير الآجار والسكريات والأملاح المعدنية. ويتم تحضيرها بإذابة الوزن المطلوب بالجرام من المادة فى حجم معلوم من البيئة الغذائية.

٣- المولر Molar ويستخدم التركيز بالمولر عادة عند تحضير منظمات النمو. والمول الواحد يساوى الوزن الجزيئى للمركب مقدرا بالجرام. والمولر يساوى واحد مول من المادة مذابة فى لتر. فمثلا:

(أ) طريقة حساب المولر للأكسين IAA.

واحد مولر لمركب IAA = الوزن الجزيئى بالجرام/ لتر = ١٧٥,١٨ جرام/ لتر.

واحد ملليمولر (mM) IAA = ٠,١٧٥١٨ جرام/ لتر.

واحد ميكرومولر (µM) IAA = ٠,٠٠٠١٧٥١٨ جرام/ لتر = ٠,١٧٥١٨ ملليجرام/ لتر.

(ب) طريقة حساب المولر لمركب كلوريد الكالسيوم $CaCl_2.2H_2O$

يحسب الوزن الجزيئ لمركب $CaCl_2.2H_2O$، وذلك بجمع الأوزان الذرية للعناصر الداخلة فى المركب:

$O + 2H_2 + Cl_2 + Ca$

الوزن الجزيئ= ٤٠,٠٨ + ٢ × ٣٥,٤٥٣ + ٤ × ١,٠٠٨ + ٢×١٦,٠٠ = ١٤٧,٠١٨

واحد مولر $CaCl_2.2H_2O$= الوزن الجزيئ بالجرام/ لتر= ١٤٧,٠١٨ جرام/ لتر.

واحد ملليمولر $CaCl_2.2H_2O$ (mM) = ٠,١٤٧٠١٨ جرام/ لتر.

واحد ميكرومولر IAA (µM) = ٠,٠٠٠١٤٧٠١٨ جرام/ لتر = ٠,١٤٧٠١٨ ملليجرام/لتر.

٤- ملليجرام/ لتر Milligram/ L (mg l^{-1}) ويستخدم هذا المعيار عند تحضير منظمات النمو فمثلا:

$١٠^{-٦}$ = واحد ملليجرام/ لتر و$١٠^{-٧}$ = ٠,١ ملليجرام/ لتر.

٥- ميكروجرام/ لتر microgram/ L (1 μg^{-1})

واحد ميكروجرام/ لتر يساوى ٠,٠٠١ ملليجرام/ لتر.

٦- جزء فى المليون(PPM) Part per million.

جزء واحد فى المليون يساوى واحد ملليجرام/ لتر.

$١٠^{-٦}$= ملليجرام / لتر(mg l^{-1}) و$١٠^{-٣}$= ٠,١ جرام/ لتر (g l^{-1})

ويفضل استخدام المولر فى مجال فسيولوجيا النبات، فمثلا يصعب مقارنة النشاط الفسيولوجى لتركيز واحد ملليجرام IAA/ لتر مع ملليجرام واحد IBA/ لتر لاختلافهما فى عدد الجزيئات فى اللتر. بينما مقارنة ميكرومولر واحد IAA مع ميكرومولر واحد IBA يكون مقبولا لاحتواء المحلولين على نفس العدد من جزيئات المادتين. ومسجل فى الجداول التالية الوزن الذرى للعناصر الداخلة فى البيئة (جدول ١١)، والأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى (جدول ١٢) والسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى (جدول ١٣) والأكسينات والسيتوكينينات والجبرلين (جدول ١٤).

جدول (١١) الأوزان الذرية للعناصر الداخلة فى البيئات الغذائية

Element	Atomic Weight	Element	Atomic Weight
Aluminium (Al)	26.98	Manganese Mn	54.94
Boron (B)	10.82	Molybdenum (Mo)	95.95
Calcium (Ca)	40.08	Nickel (Ni)	58.71
Carbon (C)	12.011	Nitrogen (N)	14.008
Chloride (Cl)	35.457	Oxygen (O)	16.00
Cobalt (Co)	58.94	Phosphorus (P)	30.975
Copper (Cu)	63.54	Potassium (K)	39.10
Hydrogen (H)	1.008	Sodium (Na)	22.991
Iodine (I)	126.91	Sulphur (S)	32.066
Iron (Fe)	55.85	Zinc (Zn)	65.38
Magnesium (Mg)	24.32	-	-

جدول (١٢) الأوزان الجزيئية لمركبات العناصر الكبرى والصغرى للبيئة الغذائية

Compound		Atomic Weight
1- Macro-elements		
Ammonium nitrate	NH_4NO_3	80.04
Ammonium sulphate	$(NH_4)_4SO_4$	132.15

تابع جدول (١٢)

Compound		Atomic Weight
Calcium chloride	$CaCl_3,2H_2O$	147.02
Calcium nitrate	$Ca(NH_3)_2.4H_2O$	236.1
Magnesium sulphate	$MgSO_4.7H_2O$	246.47
Potassium chloride	KCL	74.55
Potassium nitrate	KNO3	101.11
Ptassium dihydrogen Orthophosphate	KH_3PO_4	136.09
Sodium dihydrogen Orthophosphate	$NaH_2PO_4.2H_2O$	156.01
2- Microelements		
Boric acid	H_3BO_3	61.83
Cobalt chloride	$CoCl_3.6H_2O$	237.93
Cupric sulphate	$CuSO_4.5H_2O$	249.68
Manganous sulphate	$MnSO_4.4H_2O$	223.01
Potassium iodide	KI	166.01
Sodium molybdate	$Na_2MoO_4.2H_2O$	241.95
Zinc sulphate	$ZnSO_4.7H_2O$	287.54

تابع جدول (١٢)

Compound		Atomic Weight
Sodium EDTA	Na_2-EDTA	372.25
Ferrous sulphate	$FeSO_4.7H_2O$	278.03
Ferric-sodium EDTA	FeNaEDTA	367.07

جدول (١٣) الأوزان الجزيئية للسكريات والفيتامينات ومركبات أخرى

Compound	Molecular Weight
1 - Sugers and Alcoholic sugars	
Fructose ($C_6H_{12}O_6$)	180.15
Glucose ($C_6H_{12}O_6$)	180,15
Manitol ($C_6H_{14}O_6$)	182.17
Sorbitol ($C_6H_{14}O_6$)	182,17
Sucrose ($C_{12}H_{11}O_{12}$)	342,31
2- Vitamins	
Ascorbic acid (Vit. C)	176,12
Biotin (Vit. H)	244,31
Calcium pantothenate (Ca salt of Vit. B1)	476,63
Cyanocobalamine (Vit. B1)	1357,64

تابع جدول (١٣)

Compound	Molecular Weight
L-Cystein HCL	157,63
Folic acid	441,40
Inositol	180,16
Nicotinic acid Or Niacin (Vit.B3)	123,11
Pyridoxine HCL (Vit. B4)	205,64
Thiamine HCL (Vit. B1)	337,29
Glycine	75,07
L - Glutamine	146,15
3- Other compounds	
Abscissic acid	264,31
Colchicine	399,43
Phloroglucinol	126,11

جدول (١٤) الوزن الجزيئى للأكسينات والسيتوكاينينات والجبرلين

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
1- Auxins	
p-Chlorophenoxy Acetic Acid (p-CAA)	186.59

تابع جدول (١٤)

Phloroglucinol Compound	Molecular weight
2,4-Dichloro Acetic Acid (2,4-D)	221.04
Indole 3-Acetic Acid (IAA)	175.18
3-Indole Butyric Acid (IBA)	203.23
-Naphthalene Acetic Acid (NAA)	186.20
ß-Naphoxy Acetic Acid (NOA)	202.20
2- Cytokinins / Purins	
Adenine (AD)	189.13
Adenine sulphate (ADSO4)	404.37
G-Bezyl Adenine (BA) or 6- Benzyl Amino Purin (BAP)	225.20
N-Isopentenyl Amino Purine (2-ip)	203.3
6- Furfurylamine purine (Kinetin)	215.21
6-Benzylamino –9-Tetra-hydropyranyl-H-purine	309.40
6-(4 Hydroxy-3-Methylbut-2-enylamino) purine	219.20
3- Gibberellin	
Gibberellic Acid (GA3)	346.37