المحتوى العلمي لمقرر زراعة الانسجة والاجنة واستخدامها فى مجال الفاكهة

١-مقدمة تاريخية عن زراعة الأنسجة.

٢-تعريف زراعة الأنسجة وأهميتها.

٣-بعض المصطلحات الخاصة بزراعة الأنسجة والخلايا.

٤-مجالات زراعة الأنسجة.

٥-مراحل زراعة الأنسجة.

٦-معمل زراعة الأنسجة وتجهيزه وأدواته.

٧-بيئات زراعة الأنسجة وتجهيزها.

٨-إجراءات زراعة الأنسجة.

٩-استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للإكثار.

١٠-استخدام زراعة الأنسجة لإنتاج النباتات الخالية من الفيروس.

١١-استخدام زراعة الأنسجة فى إنتاج المواد العلاجية والطبيعية.

١٢-العوامل المؤثرة على إنتاج النواتج الثانوية لعملية التمثيل الغذائى.

١٣-استخدام زراعة الأنسجة فى خدمة مربى النبات.

١٤-زراعة معلقات الخلايا.

١٥-زراعة البروتوبلاست.

١٦-زراعة الأنسجة فى نخيل البلح- الموز- العنب.

١٧-المشاكل الناجمة عن استخدام زراعة الأنسجة فى الإكثار الخضرى.

والله ولى التوفيق

مقدمة:

- أول من تنبه إلى قدرة الخالق سبحانه وتعالى فى أن كل خلية نباتية منفردة لها القدرة على التكاثر وتكوين نبات كامل هو العالم هابرلاند Haberlandt وكانت أول محاولة له عام ١٩٠٢ .
- وقد عرفت هذه النظرية باسم القدرة الذاتية أو نظرية تعدد الجهود Totipotency وهذه النظرية اعتمد عليها علم زراعة الأنسجة النباتية.
- وقد بدأت الدراسة الجادة على زراعة الأنسجة والخلايا والأعضاء عام ١٩٣٤ عندما تمكن العالم White من تركيب بيئة غذائية وتمكن من إنماء جذور الطماطم عليها.
- ثم اكتشف نفس العالم White أول الهرمونات النباتية عام ١٩٣٤ وهو أندول حمض الخليك Indol acetic acid (IAA) .
- وقد قام Gualthert عام ١٩٣٩ باستخدام الاكسين لأول مرة فى بيئات زراعة الأنسجة وتمكن من إنتاج نسيج كلس Callus من زراعة أنسجة نخاع الجزر وفى نفس العام تمكن White من إنتاج الكالس من نبات الدخان.
- وفى عام ١٩٤١ اكتشف Van overbeek and Blackslee أهمية لبن جوز الهند Coconutmilk (الاندوسبرم السائل لثمار جوز الهند الغير ناضجة) فى تشجيع الزراعات على إنتاج الكالس وخاصة عند زراعة أجنة نبات الداتورة. وعندئذ تمكن من الجمع بين الأكسين ولبن جوز الهند فى بيئة واحدة لإنتاج الكالس فى عديد من النباتات.
- وفى عام ١٩٨٤ تم اكتشاف الكينتين بفضل الله ثم مجهودات معمل Skoog وقد تم استخدام الاكسين مع الكينتين لتكوين الأعضاء المختلفة وهو ما يسمى بالتكشف المورفولوجى.

الممسوحه ضوئيا بـ CamScanner

- وفى عام ١٩٤٩تمكن Nitsch من زراعة مبيض الطماطم لإنتاج نبات كامل.
- وفى عام ١٩٥٢ تمكن Morel and Morting من الحصول على أول نبات خالى من الفيروس من الداليا باستخدام تقنية زراعة الأنسجة.
- وفى عام ١٩٥٦ تمكن Nickell لأول مرة من زراعة معلقات الخلايا لنبات الفول.
- وفى عام ١٩٥٧ اكتشف Skoog and Miller أن التوازن الهرمونى بين الاكسين والسيتوكينين هو المسبب لاختلاف التخليق المورفولوجى لأنسجة الدخان والتى ينتج عنها الكالس أو النموات الخضرية أو الجذور العرضية.
- وفى عام ١٩٥٨ تمكن Reinert and Steward من تخليق الأجنة العرضية من زراعة خلايا الجزر.
- وفى عام ١٩٦٠ تمكن Murashige and Skoog من تطوير البيئة الغذائية اللازمة لتنمية كالس الدخان وثبت فيما بعد صلاحيتها للعديد من النباتات وهى البيئة الشهيرة المسماء بـ MS .
- وفى عام ١٩٦٧ تمكن Buargin and Nitsch من الحصول على أول نبات أحادى المجموعة الكروموسومية من زراعة متوك نبات الدخان.
- وفى عام ١٩٧٢ قام Murashige ومساعدوه من تطوير تقنية التطعيم الدقيق للقمم النامية Shoat apex micrografting للحصول على نباتات خالية من الفيروس فى الموالح (الحمضيات).
- وفى عام ١٩٧٧ تمكن Chilton ومساعدوه من عزل البلازميد من البكتريا لاستخدامها فى إدخال مادة الجين إلى نبات آخر وكان ذلك مدخلاً للهندسة الوراثية.
- وفى عام ١٩٧٨ تم عزل البروتوبلاست من البطاطس والطماطم وأحداث التهجين الخلوى بينهما عن طريق دمج البروتوبلاست.
- وفى عام ١٩٧٨ تم اكتشاف وعزل وتوصيف الإنزيمات الاندونيوكليز المقيدة Restriction enzymes وأطلق عليها هذا لأنها لا تقطع DNA عشوائياً ولكنها تقطعه فى أماكن محددة. وهذا الاكتشاف هو أهم كشف لإمكان عزل الجينات ونقلها وتحقيق أهداف الهندسة الوراثية وقد نال كل من Nathans and Smith عن هذا العمل جائزة نوبل فى العلوم. ثم توالت الدراسات واستمرت إلى يومنا هذا.

ما هى زراعة الأنسجة؟

زراعة الأنسجة Tissue culture هو العلم الذى يهتم بزراعة الأنسجة والخلايا والأعضاء على بيئة غذائية صناعية معقمة وتحضين هذه الزراعات فى ظروف بيئية مناسبة من الحرارة والإضاءة لتكوين نبات كامل جديد أو تحقيق الهدف الذى من أجله تمت الزراعة.

أهمية زراعة الأنسجة:

١- إنتاج أعداد كبيرة من النباتات فى فترة زمنية قصيرة Mass production .
٢- إنتاج نباتات خالية من الأمراض الفيروسية Free of virus .
٣- إنتاج بعض المواد الطبية والعطرية فى فترة قصيرة.
٤- تستخدم فى حل بعض المشاكل عند إجراء برامج التربية مثل زراعة الأجنة للهجن المتباعدة.
٥- إجراء التطعيم الدقيق لإنتاج نباتات ذات صفات معينة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٦- توفير الوقت والمجهود لأن مساحة العمل محدودة.

٧- صغر حجم الجزء المستعمل فى الزراعة.

٨- سهولة الاحتفاظ بتلك النباتات ونقلها وتخزينها لحين الحاجة إليها.

بعض المصطلحات الخاصة بزراعة الأنسجة
Plant tissue culture terminology

In vitro : هى كلمة لاتينية تعنى In glass وتعنى التجارب العلمية التى تجرى على الأعضاء النباتية فى الأوعية الزجاجية والتى تنمو تحت ظروف صناعية.

In vivo : هي كلمة لاتينية تعنى In life وهى التجارب العلمية التى تجرى على الأعضاء النباتية فى الظروف الطبيعية (فى الحقل) وهى مرتبطة بأجزاء النبات الأخرى.

Excise : هو عزل أو فصل أنسجة أو أعضاء أو قطاعات الأنسجة من النباتات كأجزاء نباتية للزراعة مثل عزل القمة النامية تحت الميكروسكوب وزراعتها فى المعمل.

Explant : هو لفظ يطلق على أى جزء نباتى يتم فصله من النبات ثم تعقيمه وزراعته على بيئة صناعية معقمة فقد يكون الـ Explant قمة نامية أو برعم ابطى أو جنين أو جزء من الجذر أو جزء من الورقة.

Aseptic : هو الخلو من الكائنات الممرضة والتلوث بالفطريات والبكتريا والفيروس. أى خلو البيئة الغذائية من الكائنات الدقيقة وهو متطلب هام لمزارع الأنسجة النباتية.

Callus : هى أنسجة الجروح التى تتكون عند الأسطح المجروحة فى النبات وهى أنسجة غير متميزة. وهى أنسجة برانشيمية تختلف فى درجة تلجننها وعادة لا يوجد بينها مادة لاحمة .

Bud : هو البرعم الخضرى أو الزهرى وهو ما زال فى حالة نشأة ولم ينمو بعد وعادة ما يكون مغلف بأوراق حرشفية تسمى Bud scale .

Axillary bud : هو برعم أو فرع خضرى ابطى يخرج من أباط الأوراق وهو عادة يتكون من الخلايا المريستمية الإبطية للقمم النامية وعادة تدفع لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات Mass production ويتم ذلك خلال استخدام الهرمونات التى تعمل على تثبيط السيادة القمية للقمة النامية وتشجيع إنتاج نموات جانبية Lateral shoot .

Adventitious : هى أعضاء نباتية (براعم – نموات خضرية– جذور.....) نتجت بطريقة عرضية فى موضع غير تقليدى مثل تكون النموات أو الأجنة على نسيج الكالس.

Disease- free, pathogen- free, pathogen tested
هى النباتات الصحيحة الخالية من أى أعراض مرضية والتى تستخدم كمصدر للحصول على نباتات كثيرة ذات مواصفات مثالية.

Somatic embryo or Embryoid : هى الأجنة العرضية الناشئة من أنسجة خضرية فى المعمل In vitro وهى تشبه الأجنة الزيجوتية مورفولوجيا.

Embryogenesis : هى عملية تكوين الأجنة بطريقة غير جنسية وعادة تنمو الأجنة اللاجنسية مباشرة من زراعة الأجزاء النباتية أو بطريقة غير مباشرة من الكالس وفى بعض الحالات تنمو الأجنة العرضية من الخلايا المنفردة.
Differentiation : هو التميز أو التخلق أوالتغيرات الفسيولوجية التى تحدث فى خلايا الأنسجة أو الأعضاء أثناء التطور والنمو لتصبح الخلايا أو الإنسجة متخصصة لها دور فسيولوجى أو عمل معين.

Organogenenesis : هى نشأة الأعضاء على سطح المنفصل النباتى أو من الكالس الناتج من زراعته وهى عادة تكون نموات خضرية أو جذور.

Induction : هو الحث أو التغيرات الفسيولوجية التى تعمل على حدوث ظاهرة فسيولوجية أثناء عملية التطور والتى ينتج عنه عملية Initiation .

Initiation : هو أول تغير ميكروسكوبى مرئى لتمييز الخلايا وتخليقها عند تطورها إلى أعضاء.

Cybrid : هى الخلية أو النبات الناتج من التهجين السيتولابلازمى مع نواة من إحدى الخلايا وعضوات الخلية السيتوبلازمية من أخرى.

Meristem : هى مناطق النمو والانقسام وتكوين وبناء البوتوبلاست ومنشأ الأنسجة الجديدة فى النباتات وعادة تكون الخلايا المريستمية خلايا غير متميزة Undifferentiated ومنها تتكون الأنسجة المتخصصة وظيفيا أو فسيولوجيا ويوجد المرستيم فى القمم النامية وقمم الجذور وفى أباط الأوراق وخلايا الكامبيوم الحزمى والأوراق الحديثة.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

Meristemaid : كتلة من خلايا مريستمية لها القدرة على النمو والتطور وتحتوى على سيتوبلازم كثيف مع عديد من الفجوات العصارية.

Shoot apex or shoot tip : هى القمة المريستمية الهرمية الشكل Meristimatic dome بالإضافة إلى مبادئ الأوراق Leaf premordia والأوراق المنبثقة وبعض خلايا الاستطالة الساقية.

ويجب عدم الخلط بين Shoot tip ، Meristem tip لأن الأول أكبر حجماً والثانى أصغر حجماً ويحتوى على القبة المريستمية فقط مع زوج واحد من مبادئ خروج الأوراق.

Somatic hybrid : هى الهجن الجسمية الناتجة من دمج الخلايا أو البروتوبلاست لتكوين نبات جديد (Genom جديد) .

Subculture : هى إعادة زراعة الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء المتكونة على بيئة جيدة لها تركيب مختلف فى واحد أو أثنين من مكوناتها للحصول على شكل مورفولوجى جديد أو تطور للأعضاء بعد مرور زمن فاصل يسمى Passage time .

Reculture : هى إعادة الزراعة على بيئة لها نفس مكونات البيئة السابقة ويكون الغرض هنا المحافظة على النسيج من التدهور نظراً لجفاف البيئة أو نفاذ محتوياتها أو تغير درجة حموضتها.

مجالات زراعة الأنسجة والخلايا

توجد أربعة مجالات رئيسية لزراعة الأنسجة والخلايا وهى:
١- إنتاج بعض المواد الكيماوية العلاجية والمواد الطبيعية والعطرية.
٢- التحسين الوراثى للمحاصيل الحقلية والبستانية.
٣- الحصول على سلالات خالية من الإمراض.
٤- الإكثار السريع وإنتاج عدد غزير من النباتات.

أولاً: إنتاج المواد الكيماوية الطبية والمواد الطبيعية:
هناك العديد من النباتات تنتج مواد طبيعية تعتبر إحدى نواتج عمليات التمثيل الغذائى يقوم الإنسان باستخراجها واستعمالها فى صناعات عديدة أهمها صناعة الدواء والزيوت العطرية ومكسبات الطعم مثل:

- الاتروبين من نبات الأتروبا.
- الكافيين من نبات البن.
- كوكايين من نبات الكوكا.
- الهيوسيامين من نبات السكران.
- الاميجدالين من نبات الخوخ- المشمش- البرقوق.
- السالسين من نبات الصفصاف.
- الزيوت العطرية من عدة نباتات (ريحان- نعناع – عطر).
- الفيتامينات من عدة نباتات (الحمضيات – الجوافة).

حيث تتم زراعة أنسجة أو أعضاء مختلفة من تلك النباتات للحصول على نسيج الكالوس ثم نستخلص المادة الفعالة منه دون الحاجة إلى زراعة النبات بالكامل وبذلك يمكن توفير مساحات من الأراضى وكذلك توفير المجهود اللازم للاستخراج هذه المواد من النبات الكامل.

ثانياً: التحسين الوراثى للمحاصيل:

تستخدم تقنية زراعة الأنسجة والأعضاء والخلايا فى برامج التحسين الوراثى للمحاصيل وذلك فى مجالات مختلفة مثل:

- **Embryo and Ovaryculture** → Embryo development
- **Cell and tissue culture** → Induction and isolation of maturation
- **Anther and microspore**:
- Source of variation
- Haploid plant development.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

- **Protoplasts**: – Mutation. – Hybridization. – Gene transfer.

كما لوحظ أن تقنية زراعة الأنسجة والأعضاء يمكن أن تذلل كثير من العقبات أمام مربى النبات حيث:

١- ثبت أن الأجنة الناتجة من الهجن المتباعدة الإباء لا يتم تكوينها ونضجها مثل الأجنة الناتجة عن الهجن الجنسية أو النوعية وتلك الأجنة تعانى من ظاهرة العقم الاندوسبرمى وينتج من عدم التوازن الكروموسومى لأنسجة الاندوسبرم والجنين فكما هو معروف أن الأجنة لا تتصل مباشرة بالأنسجة الوعائية لنبات الأم ولكن يتم الاتصال عن طريق الاندوسبرم والذى يستقبل المواد الغذائية ويوصلها للجنين عن طريق الحبل السرى وبالفحص السيتولوجى لهذه الأجنة ثبت أن هناك منطقة غير حية تمنع وصول الغذاء للاندوسبرم وعندئذ يموت الجنين. فإذا أمكن فصل هذه الأجنة فى وقت مناسب وتنميتها على بيئة مناسبة فإنه يمكن الحصول على نبات كامل هجين وهو هدف عظيم لمربى النبات.

٢- إذا أراد المربى الحصول على قوة الهجين فإنه يواجه عدة صعوبات أهمها طول المدة وكذلك صعوبة الحصول على نباتات متماثلة فى صفاتها الوراثية Homozygous لذلك يتطلب تأصيل العوامل الوراثية بالتهجين الذاتى لعدة أجيال فيواجه بأن نباتات الجيل الثالث أو الرابع تكون عديمة الخصوبة مما يوقف برامجه. ولذلك فإن حصوله على نبات أحادى المجموعة الكروموسومية Haploid يعتبر من الآمال العظيمة لمربى النبات حيث يمكن مضاعفته بالكولشيسين فيحصل على نبات ثنائى المجموعة الكروموسومية وفى نفس الوقت أصيل فى صفاته الوراثية Homozygous وذلك بزراعة المتك أو حبة اللقاح.

٣- يبحث مربى النبات كثيراً عن مصادر للاختلافات الوراثية واستخدام زراعة الأنسجة يمكن للمربى أن يتعامل مع عدد كبير من النباتات فى حيز محدود فيسهل عليه الانتخاب لصفات عديدة مثل المقاومة للإمراض- الجفاف- الملوحة- الحشرات. حيث نحصل على مزارع الخلايا ثم تعامل الخلايا بسموم الفطر المسبب للمرض أو بتركيزات عالية من الملوحة ثم يتم الانتخاب كما يمكن بنفس الطريقة السابقة إحداث الطفرات وعزلها.

٤- قد يصعب على مربى النباتات إجراء التهجينات الجنسية أو النوعية عند الرغبة فى نقل صفة ما من نبات إلى نبات آخر ولكن عن طريق الهندسة الوراثية وزراعة البروتوبلاست يمكن إجراء تلك التهجينات. كما يمكن عزل جين بمفرده ونقله ليدمج مع المادة الوراثية لنبات يراد إدخال صفة ما فيه بالإضافة إلى إمكانية نقل أى مادة وراثية معزولة من أى كائن حى إلى النبات.

ثالثاً: الحصول على سلالات خالية من الأمراض:

تصاب كثير من النباتات بالإمراض الفيروسية ويبذل الدراسون جهداً كبيراً للحصول على نباتات خالية من الإصابة وتستخدم تقنية زراعة الإنسجة فى الحصول على هذه النباتات بعدة طرق منها:

١- زراعة القمم النامية حيث وجد أن الفيروس ينتقل ببطء إلى القمم النامية وبالتالى فهى غالباً ما تكون خالية من الفيروس خاصة إذا عزلت بأحجام ميكروسكوبية تصل إلى ٠.٢ – ٠.٥ سم وزراعتها.

٢- زراعة نسيج النيوسيلة فى بعض النباتات وحيدة الجنين مثل الشادوك فى الحمضيات وبعض أصناف المانجو.

٣- إجراء عملية التطعيم الدقيق Shoot tip micrografting حيث يتم زراعة بذور الأصل على بيئة صناعية ثم عزل القمة النامية بطول ٠.١٤-٠.١٨ سم وتطعيمها على بادرة الأصل وبذلك نحصل على بادرة مكونة من أصل وطعم خالية من الفيروس بعد عدة أسابيع.

رابعاً: استخدام زراعة الأنسجة كوسيلة سريعة للتكاثر:

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner
الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

نظراً لأن طرق التكاثر الخضرى بالوسائل التقليدية ليست سريعة بالدرجة الكافية فإن الإكثار بزراعة الأنسجة يلبى الطلب المتزايد على الشتلات خاصة نباتات الفاكهة والزينة وبسعر مناسب فى حيز محدود. حيث نجح الباحثون فى إكثار بعض النباتات الصعبة الإكثار والغالية مثل الأوركيد. كما نجح بكرى عام ١٩٩٤ فى إكثار نخيل البلح بزراعة الأنسجة وفى عام ١٩٩٨ نجح بكرى فى إكثار المانجو البيكان بزراعة الأنسجة. كما نجحت كثير من المعامل فى إكثار العديد من النباتات الغالية الثمن وإنتاج عدد كبير منها.

مراحل زراعة الأنسجة

أولاً: مرحلة التأسيس (الحصول على مزرعة معقمة): Establishment of aseptic culture stage

وهذه المرحلة هامة جداً والغرض منها الحصول على مزرعة معقمة خالية من التلوث بأى كائن دقيق سواء للبيئة أو الجزء النباتى لأن التلوث بأى كائنات دقيقة سواء للبيئة أو الجزء النباتى لأن التلوث معناه تعفن الجزء النباتى وموته ويأتى ذلك بتعقيم الأدوات المستعملة- تعقيم البيئة الغذائية- تعقيم الأنسجة المستعملة ثم الزراعة فى جو وحيز معقمين.

ثانياً: مرحلة التضاعف (زيادة الأعضاء المتكاثرة): Multiplication of propagula stage

والهدف من هذه المرحلة هو زيادة الأعضاء والتراكيب الناتجة من المرحلة الأولى مثل زيادة حجم نسيج الكالس أو خروج النموات العرضية أو زيادة تكوين الأجنة الجسمية.

ثالثاً: مرحلة التجذير Rooting stage :

والهدف منها زراعة النموات الخضرية الناتجة من المرحلة الثانية على بيئة غذائية تحفزها على خروج الجذور.

رابعاً: مرحلة الأقلمة (الإعداد لنقل النبات للتربة): **Hardening stage (Adaptation)**

وهذه المرحلة تعتبر من أهم المراحل لأن التكاثر باستخدام زراعة الأنسجة لا يعتبر ناجحاً إلا إذا تم نقل النبات الناتج فى الأنبوبة المعقمة إلى التربة واستمراره فى النمو. وللوصول إلى هذه الغاية يجب العمل على تهيئة النبات للظروف الصعبة المحتمل أن يواجهها فى التربة وهذه التهيئة لابد أن تكون تدريجية حتى لا تحدث صدمة للنبات.

معمل زراعة الأنسجة

يحتوى معمل زراعة الأنسجة على الأدوات والأجهزة الآتية :

الأدوات:

١- الأنابيب Culture tubes :

وهذه تستخدم فى الزراعة وتصنع من زجاج البيركس لكى يتحمل حرارة التعقيم والتى تصل إلى ١٢١° م وهذه الأنابيب أحجامها مختلفة مثل:

الحجم ١٦ × ١٠٠ وهذه سعتها ١٥ سم. ١٦ × ١٢٥مم وهذه سعتها ١٩ سم. ١٦ × ١٥٠مم وهذه سعتها ٢٣ سم. ٢٠ × ١٥٠ مم وهذه سعتها ٣٠ سم ٢٥ × ١٥٠مم وهذه سعتها ٦٠ سم.

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٢- **أغطية الأنابيب Caps** : وهذه تصنع من مادة البولى بروبلين Polypropylene لتحمل الحرارة العالية وهى ذات أحجام مختلفة.

٣- **حوامل الأنابيب Raks** : وتصنع من الخشب أو الألومونيوم أو البلاستيك أو مادة البولى بروبلين المتحملة للحرارة وهذه ذات ثقوب مختلفة تبعاً لسمك الأنابيب وهذه تحمل من ١٢ إلى ٥٠ أنبوبة.

٤- **الدوارق المخروطية:** وهذه تصنع من زجاج البيركس وذات سعات مختلفة ١٠٠، ١٢٥، ٢٥٠، ٥٠٠ ملل.

٥- **أطباق بترى Petridishes** : وهى تصنع من الزجاج البيركس أو البلاستيك وتباع معقمة ولا تستعمل إلا مرة واحدة أما الزجاج فتستعمل أكثر من مرة وسعة الطبق ١٠٠ × ١٥ أو ٦٠ × ١٠ ملل.

٦- **القفازات Gloves** : وهذه تستخدم لمنع التلوث عن طريق اليدين أو لحماية بشرة اليدين من الكيماويات وتصنع من البلاستيك المقاوم للكيماويات.

٧- **أدوات تشريح:** مثل الملاقط والمشارط والأمواس.

٨- **زجاجيات لحفظ البيئة والكيماويات:** وهذه تكون ذات أحجام مختلفة ولونها غامق حتى لا تتأثر الكيماويات بالضوء.

الأجهزة:

١- **الأفران Ovens** : وتستخدم لتعقيم الأدوات والأطباق وعادة يتم التعقيم على درجة ١٨٠°م لمدة ٣ ساعات.

٢- **جهاز قياس الرقم الهيدروجينى PH meter** :

لقياس وضبط حموضة البيئة وهو يقرأ اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. ويقرأ فى مدى ١٤-٠ وذو حساسية PH 0.1±.

٣- **أوتوكلاف Autoclave** : لتعقيم البيئة الغذائية والزجاجيات على درجة حرارة ١٢١°م وضغط ١.٥.

٤- **جهاز طرد مركزى:** وهذا الجهاز يعمل حتى ٧٠٠ لفة/ دقيقة.

٥- **هزاز Shaker** : ويوجد منه نوعان: أفقى ودائرى والأفقى هو الأكثر استخداماً ومزود بضابط لسرعة الهز ويعمل فى مدى ٠-٢٠٠ لفة/ دقيقة.

٦- **ترمومترات لقياس درجة الحرارة داخل الحضانات.**

٧- **كابينة تعقيم (هود) (Hood) Laminer Flow** وهى تعمل على تخليص الهواء الداخل إلى حيز الكابينة من الكائنات الدقيقة عن طريق امراره على فلاتر ميكروبية وقد يزود بأشعة فوق بنفسجية Ultera vilot lamp ومصدر للإضاءة وأبعاده H29 X D17X W50 ومنه فردى وزوجى.

٨- **حضانة Incubator** : وتكون مزودة بضابط للحرارة وتعمل من ٤٠-٤°م ومزودة بإضاءة مع ميقاتى لضبط فترات الإضاءة والإظلام وتتراوح شدة الإضاءة بها من 1000 إلى 10000 LUX .

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner

٩- **موازين حساسة:** لوزن الكيماويات وتزن حتى أربع أرقام عشرية.

١٠ - **جهاز تقطير مياه :** ويفضل أن يكون من الأجهزة التى تقوم بتقطير الماء مرتين.

١١- حمام مائى Water bath . ١٢- مقلب مغناطيسى Magnetic steirrer .

١٣- مقياس لشدة الإضاءة LUX Meter . ١٤- ميكروسكوب ضوئى: لفحص الزراعات.

١٥- ثلاجة: لحفظ المحاليل والكيماويات.

الكيماويات: ولابد أن تكون نقية Pure ومصدر صناعتها معلوم ومنها الأملاح المعدنية والفيتامينات ومنظمات النمو والأجار والسكر والفحم النشط والمواد الطبيعية .... الخ.

بيئة زراعة الأنسجة

Tissue culture media

تختلف البيئة المناسبة لزراعة الأنسجة تبعاً لإختلاف النسيج المستعمل وطوره أو مرحلة النمو. ويوجد العديد من البيئات الغذائية التى تعطى للباحث فرصة الاختيار من بينها. وبصفة عامة تتركب البيئة الغذائية من:

١- الأملاح الغير عضوية: Inorganic salts

وتشمل العناصر الكبرى مثل النيتروجين، البوتاسيوم، الفسفور، الماغنسيوم، الكبريت، والعناصر الصغرى مثل الحديد، المنجنيز، النيكل، الكوبالت، الزنك، النحاس، البورون، المولبيدنم.

وهناك العديد من مخاليط الأملاح المعروفة مثل:

Murashing and skoog (MS), White, Nitseh and Nitsch وهذه المخاليط الثلاثة السابقة تناسب معظم النباتات وخاصة M.S ويمكن للباحث إضافة أى عناصر أخرى يراها ضرورية لنجاح الزراعات مثل زيادة تركيز الفوسفور بإضافة فوسفات الصوديوم الإحادية بتركيز 170 ملليجرام/ لتر.

٢- السكريات: Sugars : حيث يستخدم السكروز أو الجلوكوز والفركتوز والمانوز والمالتوز وهذه تستخدم بتركيزات تختلف باختلاف الجزء النباتى ومرحلة النمو فمثلا تركيز 2-4 % ملائمة لزراعة الأجنة، ٥% مناسبة لزراعة القمم النامية، ٧.٥% مناسبة لبيئة التطعيم الدقيق.

٣- الفيتامينات Vitamins :

وهى إحدى المكونات الهامة فى البيئة وعادة يستخدم فيتامين B1 (الثيامين) والبيروركسين وحمض النيكوتين والريبوفلافين، والبيوتين. كما يستعمل الاينوسيتول بتركيز ١٠٠ جزء فى المليون سواء كان فى صورة Myo أو Meso .

٤- الأحماض الأمينية Amino acid :

ومنها الارجنين وحمض الاسبارتيك وحمض الجلوتاميك والتبروزين وترجع أهميتها إلى زيادة نمو الكالس.

٥- المواد الطبيعية : Nutural compounds

وهذه المواد لا تستعمل إلا إذا فشلت البيئات فى إنماء النسيج أو عند الرغبة فى زيادة النمو لأن هذه المواد تحتوى على العديد من الفيتامينات والأحماض الأمينية ومن أهمها :

الممسوحة ضوئيا بـ CamScanner