كيمياء الزراعة النسيجية

أ.د. ناصر بن صالح الخليفة

تُعد الزراعة النسيجية من بوادر وأساسيات التقنية الحيوية الزراعية، والنقل، والتحسين الوراثي، كما أنها وسيلة لحفظ الأصول الوراثية، وقد نشأت فكرتها من قدرة واستعداد أي خلية نباتية لتتشكل وتُكَون عضوًا من أعضاء الكائن الحي. وقد طورت هذه التقنية أساسيات علم النبات خاصة في مجالات الزراعة، والبستنة، والغابات، والمحاصيل، وتربية النبات؛ وذلك من خلال التشكل الجنيني والعضوي. تهدف تقنية الزراعة النسيجية إلى الإكثار الدقيق للنبات (Micropropagation) ومضاعفة خلاياه، وذلك لإنتاج المواد الحية (Bioproducts)، مثل: المواد الصيدلانية أو الغذائية أو العطرية وغيرها.

تتميز تقنية الزراعة النسيجية - مقارنة بالتقنيات التقليدية الأخرى - بالعديد من المميزات التي جعلت منها أداة مهمة بيد الكثير من الباحثين، ومختبرات التصنيع الدوائي والغذائي والصناعي. وتتمثل هذه المميزات في: ضمان نوعية المنتج، وتوفير إنتاج مكثف ومحسن، وسهولة تداولها في النقل والتصدير والاستيراد، وخلوها من الأمراض والميكروبات، ومشابهة الأمهات أو المصادر النباتية. وعلى الرغم من تلك المميزات إلا أن لها بعض العيوب التي تتمثل في: ارتفاع تكلفتها، واحتياجها إلى فنيين ذوي كفاءة عالية من الدقة والتدريب، واحتياجها لتراكيز كيميائية دقيقة، وعمل مكثف لتغيير الأوساط الغذائية، ومتابعة مستمرة شبه يومية.

تعتمد تقنية الزراعة النسيجية بصورة أساس على البيئات (الأوساط) الغذائية المستخدمة في تنشئة، ومضاعفة النباتات، وبصورة أدق على المواد الكيميائية الداخلة في تركيب الوسط الغذائي.

سُجل علم الزراعة النسيجية - نظرياً - عام ١٨٣٩م من خلال نظريات **شلايدن وشوانز (Schlieden & Schwanns)**، وفي عام ١٩٠٢م بحث **هابيلاندت (Habelandt)** زراعة أول خلية نباتية مفصولة في بيئة غذائية تقليدية مركبة كيميائياً، ثم توالت الأبحاث العلمية مع تركيب أوساط كيميائية غذائية، إلى أن أضاف إليها **موراشيجي وسكوج (Murashige & Skoog)** عام ١٩٦٢م بحثهما المتعلق بتطوير بيئة غذائية للنمو المتسارع لأنسجة التبغ.

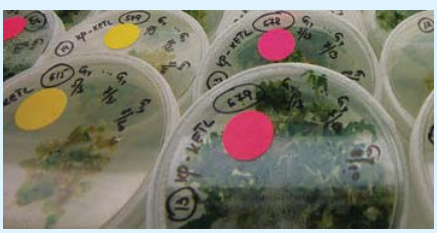
تتكون البيئة المستخدمة في أي زراعة نسيجية من مكونات غير عضوية، وأخرى عضوية يمكن توضيحها على النحو التالي:

مكونات غير عضوية

تشمل المكونات غير العضوية كل من العناصر الكبرى، والعناصر الصغرى، وتضاف - غالباً - للنبات على هيئة مركبات كيميائية قابلة للذوبان والتحول إلى صور يستفيد منها النبات بصورته المزروعة بالأنابيب سواء خلايا أو أجنة أو أنسجة أو أعضاء أو نبات كامل، وطبقاً للمرحلة أو الغرض سواء أكانت مرحلة تشكل جنيني أو تضاعف أو استطالة أو تجذير. وتشمل المكونات غير العضوية ما يلي:

- **العناصر الكبرى**

تشمل العناصر الكبرى معظم العناصر التي يحتاجها النبات لتنشيط خلاياه وأنسجته، ويحتاج إليها بكميات كبيرة - مقارنة بالعناصر الصغرى -



■ تنمية أنسجة نباتية في وسط غذائي.

و تقاس بالملليمول / لتر (ملليمولر)، مثل:

■ **النيتروجين (N)**: ويدخل في تركيب مكونات النبات من البروتينات، والأحماض، واليخضور (Chlorophyll)، وغيرها. ويضاف في صورة مركبات مختلفة مثل نترات البوتاسيوم (KNO_3)، أو نترات الأمونيوم (NH_4NO_3)، وهي مركبات مهمة للتوازن الأيوني والكاتيوني، ولنقل العناصر من خلال الأوعية.

■ **البوتاسيوم (K)**: ويعد أحد الكاتيونات الأحادية المتحركة في خلايا الخشب واللحاء في جذور وسيقان النبات، ويتركز بكميات كبيرة. تصل إلى ٢٠٠ ملليمولر في تلك الخلايا، كما أنه يمثل عنصراً مهماً لانقسام الخلايا، ونمو القمة النامية، فضلاً عن قيامه - في الأوساط الغذائية - بتوفير الكربوهيدرات كمصدر للطاقة، واستحثاث التفاعلات الإنزيمية بالنبات.

■ **الفوسفور (P)**: يعد الفوسفور من العناصر الأساسية التي لا غنى عنها لتغذية النبات، حيث يقوم بتقوية الجذور، وهو مكوِّن رئيسي للأحماض النووية والأغشية البلازمية في الخلية. وله دور أساسي في تكوين مادة اليخضور مما يساعد على عملية البناء الضوئي، كما له دور فعَّال منشط لبعض الإنزيمات وأهمية في امتصاص النيتروجين والتقليل من التأثير السام للجرعات الزائدة من البورون (B).

■ محلول كلوريد الكالسيوم أحد العناصر الكبرى المهمة لتنشيط خلايا النبات.

■ **الكبريت (S)**: ويضاف إلى البيئة - كأيونات الكبريتات - بمقدار ١ - ٣ ملليمولر مع الماغنسيوم على هيئة كبريتات الماغنسيوم، الذي يتفاعل مع الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP) في الجذور، حيث يتحول إلى تركيبات مهمة تساعد في تكوين الجذور واليخضور، لذا فإنه من الضروري إضافته خلال مراحل الاستطالة وتكوين الجذور.

■ **الكالسيوم (Ca)**: ويضاف إلى البيئة في صورة نترات أو كلوريد الكالسيوم، بمعدل ١-٣ ملليمولر، حيث يساهم في بناء جدر الخلايا، كما يعمل على تثبيط الإنزيم المسؤول عن تكسير البكتين، فضلاً عن تحكمه في نفاذية الأغشية، وبالتالي نفاذ الكربوهيدرات والبروتين من وإلى محتوى الخلية. بينما يؤدي نقصه إلى موت القمم في الجذور مما يحد من عملية الامتصاص.

■ **المغنسيوم (Mg)**: ويضاف في صورة كبريتات المغنسيوم - بمعدل ١-٣ملليمولر. ويستخدم لبناء كل من اليخضور، والبروتين، كما يساعد في توازن الكاتيونات والأنيونات، وفي تفاعلات الأدينوسين ثلاثي الفوسفات (ATP).

● العناصر الصغرى

العناصر الصغرى عبارة عن مركبات كيميائية تستخدم بكميات قليلة (ميكرومولر- µM) في الأوساط الغذائية للنبات، و تسمى - أحياناً - بالعناصر النادرة، ومن أهمها ما يلي:

■ **المنجنيز (Mn)**: ويضاف في صورة كبريتات المنجنيز بتركيزات تتراوح بين ٥- ٣٠ ميكرومولر، ويستخدم لتخفيف حالات التأكسد في عمليات البناء الضوئي للنبات، وفي تركيب أغشية البلاستيدات الخضراء، وفي استحثاث العديد من الإنزيمات. أما نقصه فيؤدي إلى ابيضاض الأوراق وتساقطها في الأنابيب، بينما تؤدي زيادته إلى تبرقشها.

المركب	الصيغة الكيميائية	الكمية (ملجم/لتر)	التركيز
نترات الأمونيوم	NH_4NO_3	١٦٥٠	٢٠,٦١ *
كلوريد الكالسيوم اللامائية	$CaCl_2$	٣٣٢,٢	٢,٩٩ *
كبريتات المغنيسيوم	$MgSO_4$	١٨٠,٧	١,٥٠ *
نترات البوتاسيوم	KNO_3	١٩٠٠	١٨,٧٩ *
أحادي فوسفات البوتاسيوم	KH_2PO_4	١٧٠	١,٢٥ *
حامض البوريك	H_3BO_3	٦.٢	١٠٠ **
كلوريد الكوبالت المائي	$CoCl_2.6H_2O$	٠,٠٢٥	٠,١١ **
كبريتات النحاس المائية	$CuSO_4.5H_2O$	٠,٠٢٥	٠,١ **
صوديوم إيثيلين ثنائي الأمين	Na_2-EDTA	٣٧,٢٦	١٠٠ **
كبريتات الحديد المائية	$FeSO_4.7H_2O$	٢٧,٨	١٠٠ **
كبريتات المنجنيز المائية	$MnSO_4.H_2O$	١٦,٩	١٠٠ **
مولبيدات الصوديوم المائية	$Na_2Mo_4O.2H_2O$	٠,٢٥	١,٠٣ **
أيوديد البوتاسيوم	KI	٠,٨٣	٥ **
كبريتات الزنك المائية	$ZnSO_4.7H_2O$	٨,٦	٢٩,٩١ **
مايو أنوسيتول	$C6H_{12}O_6$	١٠٠	٠,٥٦ **
جلايسين	NH_2CH_2OOH	٢	٢٦,٦٤ **
حامض النيكوتين	$C6H_5NO_2$	٠,٥	٤,٠٦ **
بايرودكسين	$C8H_{11}N_3OHCl$	٠,٥	٢,٤٣ **
ثيامين	$C_{12}H_{17}N4O_5$	٠,١	٠,٣٠ **

* ملليمول/ لتر ** ميكرومول/ لتر .

■ مثال لبعض عناصر بيئة الزراعة النسيجية موضحًا فيه اسم المركب والصيغة الكيميائية والكمية والتركيز.

■ **البورون (B)**: ويضاف إلى البيئة كحامض بوريك، حيث يساعد الخلايا على امتصاص الكالسيوم، وبناء البكتين، ومن ثم بناء جدر الخلايا. ويعد البورون عنصرًا مهماً لمعظم العمليات الحيوية بالخلايا مثل الانقسام، والتميز، والبلوغ. ويؤدي نقصه إلى تشكل قمم ورقية بيضاء، وموت قمم الجذور.

■ **الخارصين (Zn)**: وهو عنصر مهم لإنتاج الأكسين، وزيادة فاعلية الإنزيمات، وبالتالي تكوين اليخضور. وتحتاج معظم النباتات النسيجية من ٥ إلى ٣٠ ميكرومولر من كبريتات الخارصين.

■ **النحاس (Cu)**: ويضاف في صورة مركب كبريتات النحاس بتركيز ٠,١ ميكرومولر، ويعمل كحامل إلكتروني في النبات، حيث أنه يساعد في بناء الكربوهيدرات، وتثبيت النيتروجين، وتقليل الأكسجين.

■ **الموليبدنم (Mo)** : ويضاف كموليبدات صوديوم بتركيز لا يتعدى ٠,١ ميكرومولر، حيث أن وجوده مهم لبعض الإنزيمات التي تحول النترات إلى نشادر (Ammonium)، كما يؤدي نقصه إلى الموت القمي للأوراق، والتفاف حوافها.

■ نقص عنصر الموليبدنم يؤدي إلى الموت القمي للأوراق.

■ **الكوبالت (Co)**: ويوجد في معظم الأوساط الغذائية للنباتات النسيجية رغم عدم ضرورته، إلا أن الأبحاث تشير إلى دوره غير المباشر في منع فاعلية الأكسينات والسيتوكينينات، وتثبيط دور الإيثيلين في مراحل معينة .

مكونات عضوية

تتمثل المكونات العضوية (Organic Supplements) المستخدمة في بيئات الزراعة النسيجية فيما يلي:

• الفيتامينات

يعتمد تشكل الخلايا النسيجية ومرحلة نموها على ما يضاف للبيئة المغذية من الفيتامينات التي يلعب تركيزها في طبيعة التشكل والتميز في النبات النسيجي سواء كان خلية أو عضو، وتنتج الفيتامينات بكميات مختلفة في خلايا معظم أنسجة النباتات، إلا أنه يتم إضافتها بكميات قليلة جداً إلى الخلايا أو الأنسجة أو الأعضاء النباتية المزروعة في الأنابيب التي لا تستطيع توفير الكميات المناسبة والكافية منها، وتلعب الفيتامينات دوراً مهماً في عمليات البناء، والهدم، والنقل، داخل الخلايا، ومن أهمها ما يلي:

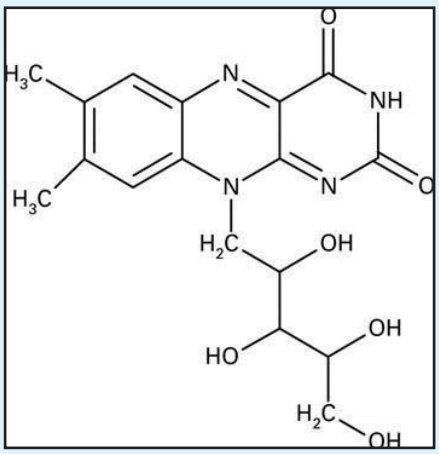
■ **الثيامين (فيتامين B_1)**: ويقوم بالعمليات الحيوية للكربوهيدرات، وبناء الأحماض الأمينية.

■ **البيرودكسين (فيتامين B_6)**: ويدخل في تنظيم البروتين.

■ **النياسين**: ويستخدم في عمليات نقل الهيدروجين والالكترونات.

■ **النوسيتول**: ويدخل في بناء الدهون الفوسفاتية، وفي بناء البكتين في جدار الخلية.

■ **الميوانوسيتول**: ويُصنَّف كفيتامين، وهو سكر كحولي يضاف بكميات تصل إلى ١٠٠ مليجرام / لتر إلى كثير من الأوساط المغذية لاستحثاث النمو خاصة في النباتات وحيدة الفلقة، وذلك لاستحثاث الكالس، بينما لا تحتاجه النباتات الأخرى.



■ الصيغة الكيميائية لفيتامين ب١.

■ **فيتامينات أخرى**: مثل الريبوفلافين (B_2)، والبيوتين (B_7)، وحمض الستريك (C)، وغيرها، وقد لا تكون ضرورية في أغلب الأحيان.

• الأحماض الأمينية

تعد الأحماض الأمينية مصدراً للنيتروجين العضوي، مثل الجلوتامين، والسايرين، والبرولين، كما أن بعضها ـ مثل الجلايسين ـ يدخل في تركيب اليخضور الذي يعد أكثر الأحماض بساطة وشيوعاً في الاستخدام. أما السايستين فيستخدم كمضاد للأكسدة خاصة مع الأنسجة التي تنتج فينولات، حيث يعمل على تقليل الاسوداد.

• السكر

يعد السكر من المواد العضوية الأساس التي تُضاف للوسط الغذائي كمصدر للطاقة والكربون، ومن أكثر السكريات استخداماً هو السكروز الذي يتحول أثناء التعقيم الحراري أو العمليات الحيوية للنبات إلى جلوكوز وفركتوز، كما يدخل السكر بنسبة عالية في التنظيم الأسموزي؛ وبالتالي في عملية الامتصاص. يستخدم السكر في تركيبة البيئة المستخدمة في الزراعة النسيجية بمعدل ٢٠-٤٠

جرام / لتر، ويعد التركيز مابين ٣٥ إلى ٤٠ جرام/ لتر مناسباً لكثير من النباتات، شكل (١).

• منظمات النمو

تسمى منظمات النمو - غالباً - هرمونات، وهي مواد ذات دور أساس في تنسيق النمو، والتميز في خلايا وأنسجة النبات النسيجي، وتضم خمسة أنواع - بناءً على دورها في العمليات الحيوية للنبات - هي:

■ **الأكسينات** : وتعمل على استطالة وانقسام الخلايا ، والتشكل الجنيني ، وتنشئة الجذور، وتضم مجموعة من التركيبات بعضها طبيعي والآخر صناعي، وتضاف بتركيزات محدودة تتراوح بين ٠,٠٠١ إلى ١٠ ملليجرام / لتر، ومن أشهرها - في الأوساط الغذائية النباتية - حامض الأندول أسيتيك الثلاثي (IAA)، إلا أنه من أضعفها إذ يتأثر بالاستخدام لفترة قصيرة وتقل فاعليته، بينما تطول فاعلية أكسينات أخرى، مثل: (IBA)، و(NAA)، و(2,4-D)، و(CPA).

■ **السيتوكينينات** : وتساعد في انقسام الخلايا في زراعة الكالس، حيث أنها تستحث تكوين البراعم العرضية في مراحل التضاعف، وتضاف بتركيزات تتراوح بين ٠,١ إلى ١٠ ملليجرام /لتر. ومنها ما هو طبيعي، مثل: الزياتين (Zeatin)، والأدينين (2iP)، إلا أن تواجدهما قليل ومكلف ولا يستمر تأثيرهما بالبيئة النباتية، لذا يستعان بمنظمات صناعية مشابهة في التأثير مثل الكاياتين (Kinetin)، والأمينوبيورين (BAP)، والبنزايل أدينين (BA) والذي يعد أكثر تأثيرًا. وتوجد كل من الأكسينات والسيتوكينينات بصورة متوازنة وذلك للتحكم في توجه نمو النبات من تكوين الجذور إلى نمو السيقان والأوراق.

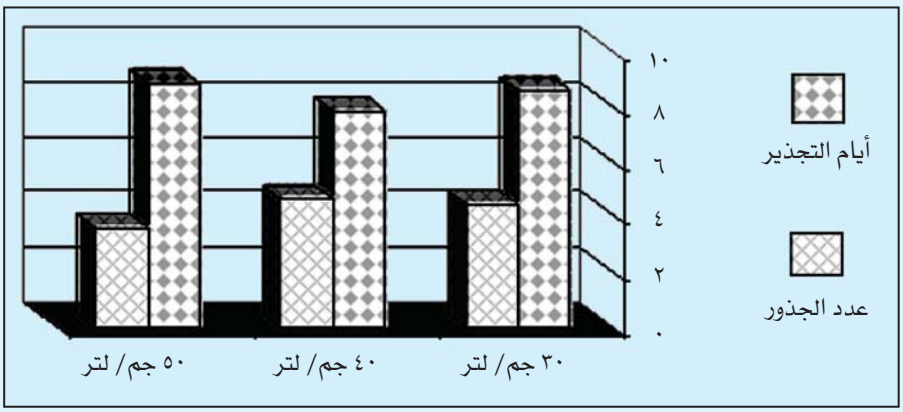
■ **الجبرالينات** : وتدخل في عمليات بناء خلايا النبات في الأنابيب - من أهمها استطالة السيقان - وهي أقل استخداماً من الأكسينات والسيتوكينينات، ومن أهمها (GA3)، و(GA4)، و(GA7). ويعد (GA3) الأكثر شيوعاً، إلا أنه يتأثر بحرارة التعقيم ويفقد فاعليته، ولذا فإنه يضاف بعد التعقيم - عن طريق الفلترة الدقيقة - لمنع الملوثات الميكروبية .

■ **حامض الأبسيسك (ABA)**: ويستخدم في مراحل التشكل الجنيني من الكالس، وفي الأوساط المستخدمة للنباتات الخشبية .

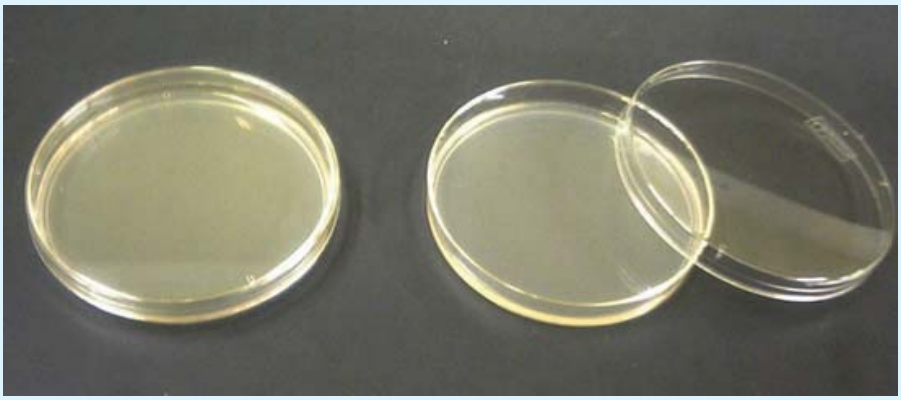
■ **الفحم** : ويستخدم في صورته النشطة لتهيئة الوسط المظلم لتكوين الجذور في البيئة الغذائية، كما أنه يستخدم لامتصاص المواد السامة والضارة من خلايا النبات مثل الفينولات المؤكسدة، والأصباغ الخارجة من الخلايا، كما يمتص زوائد بعض المواد العضوية مثل الفيتامينات، والهرمونات، والحديد، والخارصين. ويضاف الفحم المنشط بكميات تتراوح بين ٠,٢ إلى ٣ جرام / لتر.

• المواد الداعمة

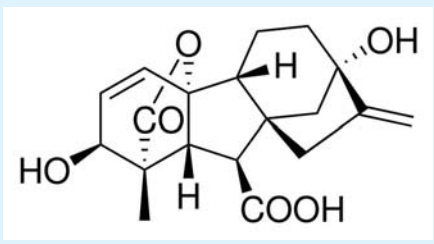
ومن أهمها الآجار، ويضاف بكميات تتراوح بين ٠,٥ إلى ١ ٪ ، وغالباً يفضل استخدام ٧ جرام / لتر، ويوفر الآجار بيئة صلبة أو شبه صلبة ترتكز عليها أنسجة النبات أو أعضاءه داخل الأنابيب، ويتميز الآجار بعدم تفاعله مع أي من المواد الداخلة في تركيب بيئة الوسط الغذائي، ولا يتحلل بالإنزيمات



■ شكل (١) تأثير تركيز السكر في بيئة زراعة الورد على التجذير (الخليفة وآخرون ٢٠٠٥م).



■ بيئة الآجار، تمثل البيئة الصلبة داخل أطباق بتري .



■ الصيغة الكيميائية لهرمون الجبريلين (GA3).

■ جهاز التعقيم الحراري (Autoclave).

الناتجة من خلايا وأنسجة النبات. يدخل في تركيب الآجار بعض المواد غير المرغوبة، مثل: بعض الأملاح، والفينولات، والأحماض الدهنية، إلا أن هذه المواد ليست ضارة ويمكن غسله لإزالتها. وفضلاً عن ذلك يمكن استخدام قطع إسفنجية كمادة داعمة خاصة في مراحل التضاعف للسيقان الورقية.

• المضادات الحيوية

وهي مواد طبيعية تُنتج من بعض الكائنات الميكروبية الدقيقة، كما أنها تُنتج صناعياً، وتستخدم لتثبيط أو القضاء على بعض الميكروبات (الفطريات، والبكتيريا) التي تنمو في الأوساط الغذائية بالأنابيب .

التعقيم

يعد التعقيم الحراري بأجهزة الأوتوكليف. تعقم به الأوساط الغذائية قبل استخدامها، والأدوات المستخدمة في الزراعة النسيجية. أساس عمليات التعقيم، إلا أن المواد الحية وبعض المواد العضوية تتطلب تعقيماً سطحياً بمواد كيميائية ضرورية؛ وذلك للقضاء على الملوثات الميكروبية التي تنمو على خلايا النبات، وتحين لها الفرصة للتضاعف والتكاثر عند زراعة الخلايا أو الأنسجة في بيئة مغذية. يستخدم مبيض الملابس. غالباً. كمصدر للكلورين المعقم، أو هيبوكلورايت الصوديوم مع نقط من (Tween 20) لتساعد على اختراق الكلورين لخلايا النبات وتثبيط الملوثات، ومن ثم يتم شطف الأنسجة بماء مقطر ومعقم. تحت جهاز الكابينة الحيوية. لغسل المادة المعقمة.

خاتمة

تعتمد مستويات نجاح الزراعة النسيجية بالمقام الأول على تركيب البيئة من العناصر والتي يعتمد عليها النمو والتشكل في النبات حسب الصنف وطبيعة النبات، فمثلاً يمكن أن تنمو بعض النباتات في بيئة تتكون من عناصر غير عضوية مع السكر فقط، بينما تتطلب النباتات الأخرى جميع مكونات البيئة. وفضلاً عن ذلك فإن النباتات الغضة لا تتطلب تراكيز عالية من الهرمونات، بينما تحتاج النباتات الصحراوية مثل النخيل. في بداية تفعيل التشكل الجنيني. إلى تركيز عالي من هرمون الأكسين 2.4-D ، إلا أن هذا التركيز يُعد عالياً في تشكل بعض النباتات الأخرى، بل وقد يؤدي إلى التطفير.

المراجع

- ناصر بن صالح الخليفة (٢٠٠٣) . الإكثار النسيجي للنخيل . سجل وقائع المؤتمر العلمي الأول لنخيل التمر المنعقد في القصيم من ١٩-٢١/رجب ١٤٢٤هـ ، صفحات : ٥٣٣- ٥٥٤ ، جامعة الملك سعود . القصيم

- **ناصر بن صالح الخليفة** (٢٠٠٢): دور الزراعة النسيجية في إكثار نباتات الحدائق والمتنزهات، سجل وقائع ندوة « المتنزهات العامة والحدائق ودورها في الترويح وحماية البيئة » في عمان- الأردن، ٢٢الى ٢٥ ابريل / ٢٠٠٢ الموافق ١٠ – ١٢ صفر ١٤٢٣هـ ص: ٢٥٥-٢٦٩ .

- **ناصر بن صالح الخليفة ، أحمد العبد القادر و تاج الدين نصرون** (١٤٢٧)دراسة إمكانية إكثار بعض أشجار وشجيرات الحطب وتحديد أهميتها الاقتصادية والبيئية في المنطقة الوسطى من المملكة العربية السعودية – التقرير الفني النهائي لمشروع أت / ٢٠/ ٠٨١ – برامج المنح – مدينة الملك عبد العزيز للعلوم والتقنية .

- Al-Khalifah, N.S. In vitro culture of Ficus benjamina for propagation and study of stress. Ph.D. Thesis. The University of Nottingham. UK, (1996).

-Al-Khalifah N. and P. **Alderson** (1998). The effect of Auxins and Ethylene on leaf abscission of Ficus benjamina. In: Kanellis et al (eds.) Proceedings of the Biology & Biotechnology of the plant Hormone Ethylene II Conference . Santorini- Greece on September 51998 ,8-. Kluwer Academic Publisher. PP: 255 - 260.

Nasser S. Al-Khalifah, Hadi S. & Khan F. A. , (2005).Influence of sucrose concentration on in vitro Growth of five Rose(Rosa hybrida L.) cultivars . Plant Tissue Culture , 15(1)4349-.

- Debergh, P.C. Micropropagetion of Herbaceous plants. in Horticulture, practice and Commercial problems, Proceedings of the institute of Horticulture sympesion. University of Nohinghom . UK (1986)..PP.2736-.

-Flick, C. E., Evans, D. A. and Sharp, W. R. In hand book of Plant Cell, Culture. Vol. 1, Evans, D. A. and Sharp, W. R., Ammirato, P. V. and Yamada, Y. (eds.) Macmillan Publishing Co.,) New York. (1983 p. 18

-George, E. F. (1996) Plant propagation by tissue culture Part 2 in practice . Exegetics Ltd. Edington, UK.