الفصل الثالث

الأوساط المغذية المستخدمة بزراعة النسج

3-1- مقدمة :

تعد الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب غير ذاتية التغذية، فهي تعتمد على الأوساط المغذية لتامين احتياجاتها الغذائية. يتطلب الوسط المغذي احتواءه على كافة المتطلبات المغذية التي تحتاجها الأجزاء النباتية المزروعة من مغذيات معدنية وعضوية حتى تستطيع النمو والإكثار. يختلف تركيب الوسط المغذي بحسب النوع النباتي وحسب طريقة زراعة النسج وحسب مرحلة الزرع والهدف من زرع الخزعات النباتية. يزداد تركيب الأوساط المغذية تعقيدا كلما صغر حجم الجزء النباتي. فعند زرع بذور مثلا يكون الوسط المغذي بسيط ، بينما عند زرع البروتوبلاست تحتاج إلى وسط مغذي معقد حتى تستطيع الخلايا النباتية النمو والإنقسام والإكثار.

3-2- تركيب الأوساط المغذية:

يتألف الوسط المغذي من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى ، وعلى مصدر للطاقة، ومركبات عضوية مثل الفيتامينات والأحماض الآمينية والهرمونات النباتية بكميات متفاوتة وتراكيز مختلفة بحسب النوع النباتي وحسب طبيعة وحجم الجزء المزروع والهدف من زراعة الأجزاء داخل الأنابيب. ويتالف الوسط المغذي من العناصر التالية:

3-2-1: العناصر المعدنية:

وهي مجموعة من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى التي يحتاجها النبات بتراكيز مختلفة للنمو والإكثار. وتقسم هذه العناصرإلى قسمين:

أولاً: العناصر الكبرى:

وتشمل ستة عناصر رئيسة كبرى يحتاجها النبات وهي: النيتروجين (N) - الفوسفور (P)- البوتاسيوم (K)- الكالسيوم (Ca)- المغنزيوم(Mg) - الكبريت (S) .

يحتاج النبات والخزعات النباتية هذه العناصر بكميات كبيرة، فهي عناصر بنائية تدخل في تركيب الخلايا والأنسجة النباتية. تضاف العناصر الكبرى إلى الأوساط المغذية على شكل أملاح مثل نترات أو سلفات أو كلوريد. تعد كافة العناصر الكبرى سريعة الانحلال بالماء.

ويمثل الجدول (3-1) مكونات بعض المحاليل المعدنية من العناصر المعدنية الكبرى المستخدمة بزراعة النسج.

أهمية ودور العناصر المعدنية الكبرى:

أ- الآزوت : يدخل النتروجين في تكوين البروتينات والأحماض النووية، والبروتوبلازم. ويعد عنصر الآزوت من العناصر الضروية للإنقسام الخلوي وبناء الأنسجة النباتية المختلفة . ويدخل في تركيب المركبات العضوية الأولية والثانوية . تظهر أعراض نقصه على صورة اصفرار النبات وتقزم النمو . وله دور في التخلص من الجذور الحرة التي تنشأ من عمليات الاستقلاب .

ب- الفوسفور: يزيد تركيزه في القمم الميرستيمية ويتشابه دوره مع النتروجين من حيث أهميته بالرغم من احتواء الأنسجة على كميه قليلة منه .ويدخل في عمليات البناء الضوئي وتكوين وانقسام الخلايا وتطور الجذور. وله دوراً أساسياً في تكوين المركبات الناقلة للطاقة . زيادة الصورة الميسرة من الفوسفات ربما تؤدي إلى تثبيط النمو في مزارع الأنسجة نظراً لترسيب الكالسيوم وبعض العناصر الأخرى.

ج-البوتاسيوم : يعد عنصر البوتاسيوم من العناصر المعدنية التي تتواجد بالأنسجة النباتية بتراكيز مرتفعة. يدخل في تركيب البروتينات واليخضور وبعض الأنزيمات والكربوهيدرات ويلعب دورا مهما في الإنقسام الخلوي وفي تنظيم درجة الحموضة والضغط الخلوي الداخلي.

د- المغنيزيوم :

يدخل في تكوين الكلوروفيل وتنشيط عديد من الإنزيمات خاصة تلك التي تنظم انتقال الفوسفات وحركة السكريات داخل النبات وتمثيل الأحماض النووية. له دور في الاتزان الأيوني في النبات.

هـ- الكبريت :الكبريت أحد مكونات بعض الأحماض كالسستين والسستئين والتي تدخل في تكوين البروتين وبعض الفيتامينات كالثيامين .يؤدي نقصه إلى رخاوة الأنسجة وزيادة هشاشتها وانخفاض قطر سوق النباتات.

و- الكالسيوم : تكوين السيليلوز في خلايا مزارع الأنسجة لا يتم إلا في وجود الكالسيوم في الوسط. للكالسيوم دور هام في تكشف الأعضاء من خلال تأثيره على الفعل الحيوي لمنظمات النمو . كما يدخل الكالسيوم كأحد مكونات جدار الخلية وبالنسبة للنيتروجين فترجع أهمية إلى أنه يدخل في تركيب الأحماض الأمينية والبروتينات وهو أساس بناء الخلية ويدخل أيضا في تركيب الفيتامينات والأحماض النووية والأنزيمات التي تساعد على إتمام عملية البناء الضوئي.

جدول (3-1): تركيب العناصر المعدنية الكبرى في بعض المحاليل المستخدمة بزراعة النسج (ميليمولmM).

التركيب المعدني	محلول موراشيج وسكوغ	كامبورغ	هيللر	وايت
NH4NO3	20.6	-	-	-
(NH4)2SO4	-	1	-	-
CaCl2 2H2O	3	1	0.5	-
Ca(NO3)2 4H2O	-	-	-	1.3
MgSO4.7H2O	1.5	1	1	3
KCl	-	-	10.1	0.09
KNO3	18.8	24.7	-	-
KH2PO4	1.25	-	-	-
NaNO3	-	-	7.1	0.8
NaH2PO4.H2o	-	1.1	0.9	0.14
Na2SO4	-	-	-	1.4

ثانيا- العناصر الصغرى:

وتشمل مجموعة العناصر الصغرى جميع العناصر المعدنية التي يحتاج إليها النبات في النمو والتمثيل الغذائي ولكن بكميات صغيرة جداً ولكنها ضرورية لحياة النبات ونموه وتشمل هذه المجموعة العناصر التالية: الحديد (Fe) - المنغنيز (Mn)- الزنك(Zn)- البورون (B) - النحاس (Cu)- الموليبدنيوم(Mo) - الكلور (Cl)- الكوبالت (Co)وقد ثبت أن هذه العناصر تعمل كمنشطات للأنزيمات.

وقد أظهرت معظم البيئات المستخدمة في مجال زراعة الأنسجة وخاصة بيئة موراشيج وسكوج بأنها أدخلت لتحسين كفاءة نمو النبيتات في زراعة الأنسجة. ويوضح الجدول (3-2) مكونات بعض المحاليل من العناصر الصغرى ، والمستخدمة في زراعة النسج.

يجب التساؤل عن كيفية اختيار تلك العناصر في البيئة المغذية سواء أكانت كبرى أو صغرى وكيفية تحديد النسبة المفترض أن يحتاجها النبات دون حدوث أي ضرر في العمليات الحيوية، فنجد أن لكل عنصر له دور معين في مراحل نمو النبات، كما نجد أن عنصر الحديد والزنك والموليبدنيوم جزء من تركيب الأنزيمات.

وطبقا للتوصيات الجمعية الدولية لفيزيولوجيا النبات فإن العناصر التي يحتاجها النبات بكميات تزيد عن 0.5 مليغرام/لتر تصنف على أنها عناصر كبرى أما الأقل من ذلك فهي عناصر صغرى. أما بالنسبة للعناصر الصغرى فأننا نجد أن هذه العناصر لا توجد منفردة أبداً في الطبيعة لذا فهي توجد أما في الصورة المركبة مثل كبريتات النحاس وكبريتات والزنك وكبريتات المنغنيز. أو على الصورة المخلبية EDTA حيث يوصي بأن يكون الحديد على الصورة المخلبية كمصدر للحديد في الوسط وذلك لمنع ترسيبه بالوسط ويتم إذابته في صوديوم أدتا.(Na2 EDTA)

الجدول (3-2): تركيب بعض المحاليل المعدنية من العناصر الصغرى(ميكرومول).

التركيب المعدني	موراشيج وسكوغ	كامبورج	هيللر	وايت
ZnSO4.7H2O	30	7	16	10
MnSO4.4H2O	100	59	0.45	22
H3BO3	100	49	-	24
KI	5	4.8	0.06	4.5
AlCl3	-	-	0.23	-
CoCl2.6H2O	0.1	0.1	-	-
CuSO4.5H2O	0.1	0.1	0.12	-
FeCl3.6H2O	-	-	3.7	-
FeSO4.7H2O	100	100	-	-
Fe2(SO4)3	-	-	-	6.3
NiCl2.6H2O	-	-	0.13	-
Na2MoO4.2H2O	1	1	3.5	-

أهمية العناصر الصغرى: وترجع فاعليتها لقدرتها على تغيير تكافؤها داخل النبات مما يزيد من نشاط الإنزيمات الضرورية للكثير من العمليات الحيوية . تزداد حاجة الخلايا لها خلال التكشف فقد يتكون الكالوس دون تكشف إلا في وجود تلك العناصر. ويؤدي نقص النحاس من مزارع الأنسجة إلى تقزم وتشوه النمو. نقص المولبيدنيوم يسبب أعراض التسمم NO3 لعدم اختزالها لـ.NH4

يثبط الكوبالت والحديد بعض عمليات الأكسدة وكذلك إنتاج الإيثلين. للحديد قدرة عالية على التأكسد والاختزال، وبذلك له تأثيرات فيزيولوجية مهمة في نشاط عدد من الإنزيمات خصوصاً النشطة في عمليات التنفس .إنتاج هرمون أندول حامض الخليك IAA بتوفير الزنك.

3-2-2- : المواد الكربوهيدراتية Carbohydrates :

لا تستطيع الأجزاء النباتية المزروعة بالأنابيب القيام بعملية الإصطناع الضوئي بسبب صغرها وعدم وجود عناصر الضرورية للاصطناع الضوئي وخاصة اليخضور وغاز CO2 داخل الأنابيب، لذلك يضاف مصدر للطاقة إلى الوسط المغذي. تحتاج الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب إلى مصدر للطاقة لكي تقوم بعملية النمو والإكثار. ولذلك يضاف عادة السكريات إلى الأوساط المغذية لتامين مصدر للكربون. يستعمل السكروز كمصدر مناسب وهو أكثر السكريات استعمالاً، وهو سكر ثنائي غير مختزل كيتوني يتكون من (جلوكوز + فركتوز). وتأثيره فعال جداً على النمو بعكس بعض السكريات الأخرى مثل المالتوز واللاكتوز. والسكروز يستخدم عادة بتركيز من 2-8% في الوسط الغذائي لكي يساعد على تطور ونمو الأجزاء النباتية في زراعة الأنسجة. تختلف قدرة العينات النباتية على النمو والتطور بحسب نوع الكربوهيدرات المضافة إلى الوسط المغذي. وقد لوحظ بالتجربة بان السكروز بتركيز 3% يعطي افضل النتائج في تكوين البراعم ونموها بعكس أنواع أخرى مثل المانيتول الذي لايعطي نتيجة مشابهة مثل السكروز(Margara, 1982).

كما لوحظ تأثير السكروز في اصطناع الأوكسينات بالأنسجة النباتية ، أما الغالاكتوز الذي يعمل كمثبط لتكوين الأوكسينات مما يؤثر سلبا في قدرة الخزعات النباتية على النمو وتكوين البراعم العرضية بعكس السكروز.

3-2-3- الفيتامينات Vitamins:

تعمل إضافة الفيتامينات إلى الوسط المغذي في تحفيز تعضي الأجزاء النباتية المزروعة ونموها. وهذه الفيتامينات تستخدم كعوامل مساعدة في إتمام العمليات الحيوية بالنبات. ومن هنا ظهر الاحتياج إلى إضافة الفيتامينات الأساسية إلى الوسط الغذائي للحصول على أحسن نمو وأسرع تكشف لتلك الأنسجة والقدرة على إنتاج نباتات.

تعمل الفيتامينات كعامل مساعد في النظم الأنزيمية، وهي مطلوبة بكميات قليلة جداً ومن أكثرها شيوعا الثيامين وهو أكثر الفيتامينات استخداماً في مزارع الأنسجة النباتية. ومنها أيضا حمض النيكوتين والبيرودكسين والكالسيوم بنتوثيانيت والميوإينوزيتول. ويعد الميو إينوزيتول والثيامين من أكثر الفيتامينات تاثيرا في تحفيز نمو العينات النباتية وإكثارها.

يضاف احيانا فيتامين C (اسكوربيك أسيد) مع حمض الستريك إلى الوسط المغذي كعامل مساعد في تخفيف ظاهرة الاسمرار في الأنسجة النباتية إذ يعملان كمواد مضادة للاكسدة مما يخفف من هذه الظاهرة في بعض الأنواع النباتية. ويوضح الجدول (3-3) مكونات بعض المحاليل المغذية من الفيتامينات والمستخدمة بزراعة النسج.

الجدول (3-3): تركيب بعض المحاليل المغذية من الفيتامينات (مغ/ل)

الفيتامينات	موراشيج وسكوغ	كامبورج	نيتش	وايت
التيامين	0.5	10	0.5	0.01
البريدوكسين	0.5	1	0.5	0.01
حمض النيكوتين	0.5	1	5	0.05
الميواينوزيتول	100	100	100	-
غلايسين	2	-	2	3
بيوتين	-	-	0.05	-
فوليك أسيد	-	-	0.5	-

3-2-4- الأحماض الأمينية Amino Acid :

تعد الخزعات النباتية المزروعة بالنسج ذاتية التغذية بالنسبة لعنصر الآزوت . تستطيع القيام باصطناع المواد الآزوتية اللازمة لنموها داخل الأنابيب. تقوم بامتصاص النترات والأمونيوم من الوسط المغذي وتؤمن حاجتها من المركبات العضوية الآزونية ومنها الأحماض الامينية. عادة لا تضاف الأحماض الأمينية للوسط الغذائي في مزارع الأنسجة إلا في بعض الحالات الخاصة. وهناك العديد من المصادر التي تحتوي على الأحماض الأمينية والتي يمكن إضافتها إلى الوسط الغذائي مثل الكازئين وقد نحتاج أحيانا لإضافة حمض آميني معين لإحداث تأثير فيزيولوجي مطلوب مثل حمض الميثونين والذي له دور مؤثر في تخليق الإثيلين وله تأثير منبه أيضاً .ومن الأحماض الأمينية التي تستخدم في مزارع الأنسجة منها على سبيل المثال الأرجنين والغلوتامين والأسبارجين.

ولابد من الذكر اخيرا بانه لايمكن تكوين قاعدة عامة حول إضافة الأحماض الآمينية ونوعها وبسبب التناقض في النتائج المتحصل عليها، ففي بعض التجارب أعطت نتائج إيجابية وفي بعض النتائج الأخرى أعطت نتائج سلبية وفي البعض الاخر لم تبد الخزعات لأي استجابة إضافية للنمو عند إضافة الأحماض الآمينية وذلك حسب النوع النباتي وحسب الهدف من زراعة النسج.

3-2-5- منظمات النمو النباتية Plant Growth Regulators :

تلعب الهرمونات النباتية دورا هاما في توجيه النمو في كافة طرائق زراعة النسج. وتختلف الهرمونات المستخدمة بحسب الأنواع وحسب الهدف من زراعة النسج وحسب مرحلة النمو للأجزاء النباتية. ويتوجب أخذ بعين الاعتبار ثلاث عوامل وهم نوع الهرمون المستخدم وتركيزه والتوازن الهرموني بين الهرمونات المضافة.

يتم انتاج الهرمونات النباتية في أماكن محددة من النبات . وهذه المواد العضوية تتكون بكميات صغيرة جداً ،ثم تنتقل إلى أماكن أخرى لأحداث تأثيرها الفيزيولوجي.

وتوجد خمسة مجاميع رئيسة للهرمونات النباتية وهي: الأوكسينات، والسيتوكينينات، والجبريلينات، والإيتلين ومركباته ومثبطات النمو مثل حمض الأبسيسيك . ونظرا لأهمية هذه المركبات فقد تم تخصيص فصل كامل لها للتعرف عليها وعلى دورها الفيزيولوجي في زراعة الأنسجة النباتية.

3-2-6- أحماض عضوية:

لا تستخدم الأحماض العضوية بزراعة الأنسجة إلا لأغراض خاصة ومحددة. تضاف عادة كمضادات أكسدة مثل حمض الأسكوربيك مع حمض الستريك، في حال وجود مشكلة اسمرار في الخزعات النباتية. كما يضاف أحيانا بعض الأحماض مثل المالات- الفومارات- والسوكسينات التي تعمل على زيادة مصادرالنتروجين في الأوساط المغذية الخاصة بزراعة الخلايا النباتية، عند استخدام الآمونيوم كمصدر للآزوت.

3-2-7- مواد عضوية طبيعية:

يضاف إلى الأوساط المغذية أحيانا بعض المصادر العضوية الطبيعية مثل عصير البرتقال ، مستخلص الخميرة، عصير البندورة ، مستنبت الشعير، وسائل جوز الهند.

فقد لوحظ بالتجربة ،إن إضافة سائل جوز الهند إلى الوسط المغذي زاد بشكل واضح نمو الخلايا النباتية وزيادة انقسامها وزيادة نمو الكالوس في بعض الأنواع النباتية. ويعود السبب بأن سائل جوز الهند يحوي بعض الفيتامينات وبعض الأحماض الأمينية وبعض السكريات مع هرمونات نباتية، أوكسين وسيتوكينين، بتراكيز خقيقة جدا (Margara,1982). كانت تستخدم قديما قبل اكتشاف الهرمونات الصناعية بمختلف مركباتها بهدف تحفيز النمو والانقسام الخلوي.

3-2-8- الآجار

يستعمل نوعين من الأوساط المغذية في زراعة النسج. وسط سائل وفي هذه الحالة يضاف كافة مكونات الوسط من دون الآجار. ويضاف عادة مادة الاجار آجار للوسط الصلب. هي مادة كربوهيدراتية عديدة تضاف للبيئة لإعطائها الصلابة بتركيز 0.6-1% ونحصل عليها من الطحالب البحرية. ويوجد سببين أساسيين لاستخدام الآجار في الوسط هما: خموله من الناحية الحيوية،

والثانية : سهولة إذابته عند التسخين وتصلبه عند درجة حرارة 45-50 م. و الآجار هو سكر عديد غير متجانس يتكون من الأجروز والأجروبكتين، والأجروز هو المسؤول عن صفة الجيل للآجار. تختلف نوعية الآجار المستخدمة حسب درجة نقاوتها فيوجد الاجار التجاري وتستخدم بتركيز 8-12 غ /ل. اما الاجار النقي يستخدم بالمتوسط 6 غ/ل. يتأثر تصلب الاجار بعاملين:

الأول درجة الحموضة ويفضل أن يكون الpH بين 5-6 ، في حال زيادة الحموضة يقل تصلب الاجار.

الثاني درجة تركيز الآجار في حال التراكيز الخفيفة تحت ال6 غ/ل تقل صلابة الآجار لكن تزيد قابلية أمتصاص العناصر المغذية من قبل الأجزاء النباتية. وفي حال التراكيز العالية 10غ/ل تزداد صلابة الوسط وتقل قابلية امتصاص العناصر المغذية من قبل الخزعات النباتية، وتزيد من صلابة الأنسجة النباتية وتصبح أكثر قدرة لعملية التقسية (Hartmann &Kester, 1986).

ويمكن استعمال مواد اخرى مثل البيوجل Biogel وهو جل بولي أكراميد Poly acramide .

3-2-9- الفحم النشط Activated charchol :

يستخدم الفحم النشط في مزارع الأنسجة النباتية لمعالجة بعض الظواهر أو المعوقات الفيزيولوجية أو لتشجيع النمو في بعض الأنواع النباتية:

- مثل ظاهرة الاسمرار التي تظهر بفعل المركبات الفينولية التي تفرزها الخزعات النباتية. يضاف الفحم النشط الذي يعمل على امتصاص المواد المثبطة للنمو والتي تنتج بواسطة النسيج المزروع في البيئة المغذية.

- أو لمعالجة ظاهرة الشفافية التي تصاب بها الخزعات النباتية أثناء طور الإكثار حيث يعمل الفحم النشط المضاف على امتصاص منظمات النمو، التي لها قابلية عالية في الارتباط بالفحم النشط.

- تحسن نمو الكالوس الجنينيى وإكثاره وتجذير داخل الأنابيب في بعض الأنواع النباتية مثل النخيل (المعري، 1995) .

3-2-9- درجة الحموضة pH:

يعرف الـ pH بأنه اللوغاريتم السالب لتركيز أيون الهيدروجين. وهو الدليل السهل والسريع لمعرفة حموضة أو قلوية المحاليل المستعملة ويتدرج الـ pH من 1 حتى 14 درجة وتكون نقطة التعادل عن pH = 7 أما الأقل من ذلك فيدل على أن الوسط حامضي (من 1-7) ، و الأعلى من ذلك يكون الوسط قلوي (7-14).

والـ pH ضروري جدا لتسهيل أيونات المعادن في البيئة وجعلها في صورة ميسرة للنباتات النامية عليه وهي غالبا ما تكون حامضية إلى متعادلة حتى يكون جميع العناصر الغذائية في الصورة الميسرة لها تمكن النبات من الاستفادة مه دون حدوث أي ضرر عليه .

وتؤثر درجة الحموضة في درجة ذوبان الآجار وتصلبها وتفضل أن تكون بين 5-6 للحصول على أفضل بيئة مغذية تسمح بنمو الخزعات النباتية المزروعة داخل الأنابيب بشكل جيد.

3-3- تحضير المحاليل الأم:

تحوي الأوساط المغذية مركبات كثيرة وبتراكيز مختلفة. فالعناصر الكبرى يكون تركيزها كبير نسبيا، اما العناصر الصغرى والهرمونات النباتية والفيتامينات فتضاف بتراكيز صغيرة وحتى أجزاء من الملغرام. من الصعب وزنها بدقة لذلك يتم تحضير محاليل أم مركزة وتؤخذ منها مقادير معينة حسب نسبة التركيز. يفضل تحضير المحاليل الأم كل عنصر على حدى، ويمكن دمج بعض المركبات مع بعضها البعض كما في العناصر الصغرى عدا مركبات الحديد.

تعد عملية تحضير المحاليل الأم بشكل مركز مهمة وأساسية في زراعة النسج للأسباب التالية:

- يسهل عمل الوسط المغذي وذلك بأخذ الكميات المطلوبة مباشرة من المحاليل الأم.

- يوفر وقت وجهد في تحضير المحاليل المغذية.

- يؤمن دقة في العمل لأنه ليس بالأمر السهل وزن أجزاء من الملغرام مهما كان الميزان حساس.

يتم تحضير المحاليل الأم بتركيزها 10 إلى 100 مرة وذلك حسب درجة الاستهلاك في المخبر. يوجد مركبات سهل الانحلال بالماء مثل العناصر المعدنية الكبرى والصغرى فيتم وزن المقادير المطلوبة وإذابتها بشكل مباشر بالماء المقطر المعقم. ويوجد بعض المركبات التي يصعب انحلالها بالماء فهي تذاب إما بالمذيبات العضوية أو الكحول أو قلويدات الخفيفة أو الحموض الخفيفة كما هو الحال بالهرمونات النباتية.

تحفظ المحاليل الأم بالبراد على درجة حرارة 2 م، وتحفظ محاليل الأم الخاصة بالهرمونات في زجاجات قاتمة اللون للتخفيف من تخريبها بفعل الضوء.

4-3- تحضير الأوساط المغذية :

يتطلب تحضير الأوساط الزراعية دقة وتنظيم العمل بشكل جيد وعناية خاصة، بسبب المكونات الكثيرة التي تدخل في تحضيره. يكفي نسيان إضافة مركب من مكونات الوسط الأساسية مثل عنصر من العناصر الكبرى إلى خلل في نمو الأجزاء النباتية المزروعة وينتهي بتوقف النمو

كليا. يتوجب أخذ الحيطة والحذر أثناء التحضير ولابد من تنظيم العمل بشكل مرتب والقيام بتسجيل كافة الخطوات عند التحضير. يتطلب تحضير الأوساط استخدام ماء مقطر عالي النقاوة ومنزوع الإيونات. يجب استخدام زجاجيات بأنواعها المختلفة تتحمل درجات الحرارة العالية من نوع البيركس. ويجب استخدام ماصة خاصة لكل مركب وعدم مزج وخلط المحاليل الأم الأساسية.

4-4-1- شروط تحضير الوسط المغذي :

يتطلب تحضير الأوساط المغذية الشروط التالية:

- تامين الأدوات اللازمة للتحضير (ميزان حساس- جهاز تسخين وتحريك مغناطيسي أو ميكروايف- براد - مقياس pH ميتر- أوتوغلاف- موزع بيئة آلي).

- تامين الزجاجيات اللازمة للتحضير (دوارق- ماصات- مخبار زجاجي- أنابيب زجاجية للزرع- حوامل أنابيب....). يجب ان تكون كافة الزجاجيات المستخدمة من النوع البيركس متحملة للحرارة العالية.

- توفر المحاليل الأم لكافة مكونات الوسط المغذي.

- العمل في مكان نظيف في المخبر مع توفير المساحة الكافية للعمل الخاص بتحضير المحاليل المغذية.

- يتم إضافة كافة مكونات الوساط المغذية بالترتيب مع مراعاة تسجيل كل مركب يضاف إلى دورق تحضير الوسط المغذي، على استمارة تحضير الوسط. على أن يستخدم لكل مكون ماصة خاصة ولمرة واحدة.

- يتوجب قياس درجة حموضة الوسط المغذي قبل إذابة الآغار ويتم ذلك باستخدام حمض أو أساس مخفف (N1)منNacl أو NaoH لتعديل الحموضة للوسط المغذي.

- يتم تحضير الوسط المغذي على درجات حرارة عالية مع التحريك المستمر للوسط حتى إذابة كاملة للآغار المضاف . وعندما يصبح الوسط شفاف يكمل حجم المحلول المحضر بالماء المقطرحتى نحصل على الحجم الكلي الواجب تحضيره. يتوجب إضافة السكروز في نهاية فترة التحضير حتى لايتكرمل بفعل درجات الحرارة العالية.

- يوزع الوسط على دوارق وأنابيب الزرع بحسب الكمية المطلوبة للعمل(للأنابيب بين 10-25 مل/بالأنبوب). وتسد الأنابيب بسدات معدنية أو بلاستيكية أو بالقطن .

-3-4-2- تعقيم الوسط المغذي:

نظرا لاحتواء الوسط المغذي على معظم العناصر الغذائية اللازمة لنمو الكائنات الدقيقة كالبكتريا والفطريات والخمائر وغيرها، فإن عملية التعقيم للوسط المغذي قبل زراعة الجزء النباتي

عليه ضرورية جداً للحفاظ عليه من هذه الملوثات التي تنافسه على الغذاء وتفرز مواد سامة تؤدي إلى موت الخزعات النباتية. يتم تعقيم الأوساط المغذية بالأوتوغلاف على درجات حرارة 115 م لمدة 30 دقيقة أو على درجة حرارة 121 م لمدة 20 دقيقة مع ضغط 1 بار.

ولابد من الذكر أخيربأنه يوجد بعض المواد العضوية والهرمونات التي لاتتحمل التعقيم بالدرجات الحرارة العالية ، فيتم تعقيمها بالفلترة عن طريق استخدام جهاز الميلبورن للتعقيم باستخدام فلاتر دقيقة وتضاف إلى الوسط بعد تعقيمه وقبل تعبئة الدوارق وأنابيب الزرع. توزع في هذه الحالة باستخدام أدوات معقمة ، وتحت جهاز العزل الجرثومي. مع أخذ جميع الاحتياطات الضرورية لتجنب تلوث الوسط المغذي.

3-5- تخزين الأوساط المغذية:

تخزن الأوساط المغذية لمدة أسبوعين في جو المخبر. وذلك حسب المواد الموجودة في الوسط المغذي. مثلا إذا احتوى الوسط الأوكسين أندول أستيك أسيد فهو سريع التدهور والتخريب ، ففي هذه الحالة لايفضل تخزين الوسط المغذي أكثر من أسبوع في جو المخبر. وإذا أريد تخزينها لفترة أطول يفضل وضعها في البراد إذ يمكن حفظها لمدة 4-6 أسابيع.

يتوجب وضع أو تخزين الوسط المغذي في المخبر في خزن نظيفة ، داخل غرف العزل لتجنب التلوث. تخزن الأنابيب أو دوارق الزرع بالظلام للتخفيف من تخريب الهرمونات وخاصة الأوكسينات بفعل الضوء.

.