مزارع الكالس (Callus cultures)

الكالس كتلة من الخلايا غير المتخصصة وغير المنتظمة وتلك الكتلة أساسا عبارة عن نسيج ورمي (**Tumor**) يتكون على جروح الأنسجة والأعضاء المتمايزة. خلايا الكالس برنكيمية في طبيعتها وليست متجانسة تماما, اذ يلاحظ عند الفحص المجهري وجود كمية قليله من الانسجة المتمايزة بجوار الحجم الكبير من الأنسجة غير المتمايزة. يمكن ملاحظه أنسجة كالس وقد تكونت على أنسجة نباتات غير مزروعة نسيجية وخاصه عند قطع وزراعة عقل النباتات في التربة حيث ينشأ الكالس أولا من مناطق قطع العقلة أو الجذر.

الأجزاء المستعملة في نشوء مزارع الكالس

تكون مادة الشروع في الأجزاء النباتية في نشوء مزارع الكالس من أنسجة متمايزة مفصولة من أي جزء من النبات (جذر, ساق, ورقة, ورقة حرشفية, متك , زهرة وغيرها). يحتوي الجزء النباتي في الغالب على أنسجة بمراحل مختلفة من الانقسام الخلوي والتهيئة للتخصص لأعضاء ذات وظائف متنوعه فاذا ما احتوى الجزء النباتي على خلايا مرستيمية عندئذ تكون معدلات انقسام الخلايا وتضاعفها سريعة. لذلك يمكن اختيار القمة النامية كمصدر لنشوء الكالس والاستفادة منه لأغراض مختلفة أو اكثار النبات خضريا بالطريقة غير المباشرة أي باختلاف الكالس الى أفرع ونبيتات.

تحفيز نشوء الكالس

من المعتاد في أغلب التجارب ان تكون الخطوة الاولى هي استحاث الكالس للنشوء من الجزء النباتي الذي سبق وان تم اختياره او من بادرات بذور قد عقمت وزرعت في الوسط الغذائي المناسب. ويجب الاخذ بنظر الاعتبار ليست كل خلايا النبات مؤهلة (**Competent**) لان تكون كالسة بل غالبا ما تكون الخلايا المرستيمية باستطاعتها تكوين تراكيب منتظمة ومن ثم نبات كامل. بينما الخلايا الاخرى غير المؤهلة ولا تعبر عن وجود طاقتها الكامنة (**Totipotency**) فتفشل في الاخلاف وتكوين نبات كامل. يمكن فحص وانتخاب الخلايا تحت المجهر الخاص بالقطع (**Visual selection under dissecting microscope**) مره كل اسبوع وتسجيل الملاحظات.

ينشا الكالس من مناطق مختلفة على الجزء النباتي مثل أنسجة كامبيوم الجذور وقد تظهر العديد من الاجنة الجسمية مباشرة محيطة بالبذرة عند زراعتها كجزء نباتي. تحصل العديد من النشاطات غير المرئية بالعين المجردة اثناء نشوء الكالس ولا تظهر الا بعد سته أسابيع ككتلة من نسيج الكالس ويمكن تحديد انواع تحفز مزارع في النشوء من خلايا المعلق الخلوي خاصة في الدراسات المتعلقة بالأجنة الجسمية , منحنيات نمو الكالس, تجارب الانتخاب مثل تحمل

الاجهادات, عزل الخطوط الخلوية النقية ذات الصبغات وغيرها. تحتوي مزارع الكالس خليط من الخلايا غير المتجانسة في الحجم, الشكل, اللون, العمليات الايضية, العدد الكروموسومي وغير ذلك. يظهر قسم من الخلايا حاملا صبغات بالوان مختلفة مما يسهل من عزلها وانتقاء خطوط خلايا ذات لون واحد.

تحتوي أحيانا تلك الخطوط على مواد أيض ثانوية مفيدة. تؤثر مستويات الهرمونات الداخلية **(Endogenous hormones)** وخاصية النقل القطبي للهرمون داخل الجزء النباتي في تحفيز نشوء الكالس على ذلك الجزء. لعل من أهم العوامل المؤثرة في نشوء الكالس والتي درست بشكل مستفيض, تراكيز منظمات النمو المجهزة الى الوسط والتي تختلف باختلاف النوع النباتي ونوع الجزء النباتي الظروف البيئية والتغذوية هي الاخرى لها دور مهما في نشوء الكالس في الزروعات النسيجية للخلايا تحت المجهر الضوئي.

منحنى نمو الكالس

تشابه أنسجة الكالس في نموها الكائنات المجهرية أحادية الخلية يتخذ منحنى نمو الكالس شكل حرف او ما يسمى المنحنى السيني **Signoid** ويمر نمو الكالس بخمس مراحل. تختلف سلوكية تركيب وبايوكيميائية خلايا الكالس عند مرورها في مراحل النمو الخمسة (المرحلة الأسية, المرحلة اللوغاريتمية , المرحلة الخطية, مرحلة التباطؤ, مرحلة التوقف), اذ هناك خلايا متباينة في ملامحها المظهرية والفسلجية في كل مرحلة. تؤثر مكونات الوسط في مده الكالس في مرحلة ما لذلك من الضروري التعامل مع مزارع كالس بمرحلة تطورية محددة.

بينت الدراسات المتعلقة بفحص الهيئة الكروموسومية **(Karyotyping)** لخلايا الكالس دخول اغلب الخلايا في الطور الاستوائي خلال المرحلة الأسية من نمو الخلايا حيث سرعه الانقسام وزيادة كمية الكالس. تنقل خلايا الكالس الى وسط جديد في نهاية المرحلة الخطية وقبل دخولها مرحلة التناقص **(Decelerating)** مع ملاحظة نقل الكالس الذي يبدو بصحه جيدة واستبعاد الكتل التي يظهر عليها الاسمرار. تفضل مزارع الكالس بطيئة النمو ذات اللون الابيض غير الشفاف لأغراض الاخلاف واستبعاد كتل الكالس الخضراء السريعة النمو لكونها لا تتمايز الى أعضاء.

يجب تحديد مرحلة نمو الكالس التي تعطي أكبر كمية من مركبات الأيض الثانوي أو المركب المطلوب والتي غالبا ما تكون مرحلة توقف النمو نتيجة استنفاذ مغذيات الوسط, تصلب الأكار , تراكم مركبات وسطية سامة واستنفاذ Co من داخل الكالس. يستوجب تحديد منحنى نمو الكالس التضحية بمكررات من المزارع وعلى فترات زمنية منتظمة وتسجيل اوزان الكالس الرطب والجاف بعد ازالة بقية الأكار.

أساسيات زراعة الكالسPrinciples of callus culture

من أجل نجاح تحفيز الكالس على النشوء وبنجاح من الضروري مراعاة ما يلي :

تحضير جزء نباتي معقمه سطحية وجاهزة للزراعة, انتخاب الوسط المناسب والتوليفة من منظمات النمو , حضن الزروعات تحت ظروف مسيطر عليها من ضوء وحرارة و رطوبة وغيرها. تفضل الأجزاء النباتية وهي في طور الحداثة وتلك المفصولة من البادرات و النموات الخضرية الحديثة والبراعم. تستجيب أنواع اخرى مختلفة من الاجزاء النباتية لنشوء الكالس مثل أطراف الجذور, نسيج اللحاء, الأجنة المتطورة, أجزاء الزهرة والورقة , الثمار , الدرنات , الأبصال وغيرها مع مراعاة استبعاد الخلايا الملكننة **(Lignified)** . تدخل خلايا الكالس في ثلاث مراحل تطورية (أ) الاستحثاث **(Induction)** (ب) انقسام الخلايا **(Cell division)** (ج) بدء التمايز **(Differentiation)** . تتحفز وتزداد عمليات الايض داخل الخلايا في المرحلة التطورية الأولى والتي يعتمد على طولها على الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي, المتطلبات التغذوية , المحتوى الهرموني الداخلي, النقل القطبي لمنظمات النمو, اضافة الى العوامل البيئية. ونتيجة لزيادة معدلات أيض الخلية, يزداد تراكم الخلية من العوامل المشجعة على الانقسام لتكون كتلة خلوية بأعداد كبيرة من الخلايا. تكون الخلايا السفلية في تماس مع الوسط والاعلى منها تتغذى من انتشار المغذيات من الخلايا الواقعة اسفلها. يبدأ تمايز الخلايا في المرحلة الثالثة عندما تبدا مسالك حيوية معينة بالتعبير حيث بداية تراكم مواد الايض الثانوي. يظهر احيانا الكالس بالوان مختلفة (اصفر, اخضر, ابيض) في هذه المرحلة مع عدم استقراريه وراثية **(Genetic instability)** ينتج عنها تغايرات مظهرية قد تعزي الى عوامل تطورية فوق وراثية **(Epidgenetic)** او وراثية. قسم الكالس **(Subculture)** بعد وصوله لحجم مناسب لفتره قد تصل الى 21–28 يوم واذا كانت الكتلة صغيرة, يعاد نقلها الى وسط جديد **(Reculture)** لإتاحة الفرصة لها بالوصول الى حجم مناسب. يعاد زراعة الكالس عموما على وسط جديد بفترة تتراوح من 3 الى 4 اسابيع بتقسيم قطع الكالس الى اوزان 250–500 ملغم تحصل حاله من التطبع **(Habituation)** كنتيجة لاستمرار نمو الكالس في وسط الادامة بوجود منظمات النمو حيث تتمكن قطع الكالس وبمرور الزمن من النمو في وسط خال من المنظمات وهذا ما يطلق عليه بالتطبع الهرموني **(Hormone habituation)** ومن الصعب التمييز بين نوعي الكالس العادي والمتطبع للنمو دون هرمونات عدا قابلية الأخير للنمو من دونها . يفيد ذلك بتقليل أو حذف كلف منظمات النمو وتقليل خطوات العمل والتخلص من احتمالية الخطأ في تحضير تراكيز المنظمات وغيرها من الفوائد.

منظمات النمو

تؤثر ولحد كبير اضافة منظمات النمو الى الوسط الغذائي في استحثاث الكالس على النشوء . واعتمادا على طبيعة الجزء النباتي وهيئته الوراثية ومحتواه الداخلي من الهرمونات, يتطلب احتياجه من منظمات النمو الى ثلاثة مجاميع , اما أوكسينات فقط, أو سايتوكاينينات فقط أو توليفة من الاثنان.

تطبيقات مزارع أنسجة الكالس

تكون مزارع الكالس بطيئة النمو في وسط مستقر **(Static)** مما يسمح بإجراء العديد من الدراسات المتعلقة بالنمو, التمايز والايض وغيرهما وكما مبين أدناه:

1. دراسة الاحتياجات الغذائية للنبات من خلال دراستها على المستوى الخلوي اولا.
2. دراسة تمايز الخلايا والأعضاء والعمليات الفسيولوجية والجزيئية المرافقة لها.
3. نشوء مزارع المعلقات الخلوية والبروتوبلاست والحصول على خلايا مفردة.
4. التحري والاستفادة من التغايرات الجسمية الناتجة من الاخلاف غير المباشر من الكالس.
5. سهلت خلايا الكالس كثيرة في اجراء التحولات الوراثية **(Genetic transformation)** لسهولة عزل الخلايا المفردة منها وهندستها وراثية.
6. وظفت مزارع الكالس في دراسة وانتاج مركبات الايض الاولي والثانوي وتنظيمهما.

المصادر:

1- اساسيات زراعة الخلايا والانسجة النباتية. 1988. جامعة بغداد . الدكتور محمد عباس سلمان.

2- زراعة الانسجة والخلايا النباتية . الدكتور فيصل رشيد الكنافي .1987. جامعة الموصل.

3- توفيق الرفاعي وسمير عبد. 2007. زراعة الأنسجة والاكثار الدقيق للنبات. المكتبة المصرية للطباعة والنشر . الإسكندرية.

4- زراعة الانسجة النباتية . جامعة الملك سعود . قسم النبات, الاستاذ الدكتور فكري فهمي.