

المحاضرة الخامسة

زراعة الكالس:

الكالس كتلة من الخلايا غير المتخصصة وغير المنتظمة وتلك الكتلة أساسا عبارة عن نسيج ورمي (Tumor) يتكون على جروح الأنسجة والأعضاء المتميزة. خلايا الكالس بركيمية في طبيعتها وليست متجانسة تماما, اذ يلاحظ عند الفحص المجهرى وجود كمية قليلة من الانسجة المتميزة بجوار الحجم الكبير من الأنسجة غير المتميزة. يمكن ملاحظه أنسجة كالس وقد تكونت على أنسجة نباتات غير مزروعة نسيجية وخاصة 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 متميزة 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 اثمار النبات خضريا بالطريقة غير المباشرة أي باختلاف الكالس الى أفرع ونباتات.

تحفيز نشوء الكالس

من المعتاد في أغلب التجارب ان تكون الخطوة الاولى هي استحث الكالس للنشوء من الجزء النباتي الذي سبق وان تم اختياره او من بادرات بذور قد عقت وزرعت في الوسط الغذائي المناسب. ويجب الاخذ بنظر الاعتبار ليست كل خلايا النبات مؤهلة (Competent) لان تكون كالس 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) فتتشل في الاخلاف وتكوين نبات كامل. يمكن فحص وانتخاب الخلايا تحت المجهر الخاص بالقطع (Visual selection under dissecting microscope) مره كل اسبوع وتسجيل الملاحظات.

ينشأ 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 ستة 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**) وخاصة 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 والتغذية هي الاخرى لها دور مهما في نشوء الكالس في الزروع 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 الأسيية، 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 تطويرية محددة. بينت الدراسات المتعلقة بفحص الهيئة الكروموسومية (**Karyotyping**) لخلايا الكالس دخول اغلب الخلايا في طور الاستوائي خلال المرحلة الأسيية 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 بصحة 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 استنفاد مغذيات الوسط، تصلب الأكار، تراكم مركبات وسطية سامة واستنفاد 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 الكالس Principles of callus culture

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

تحضير جزء نباتي معقمه سطحية وجاهزة للزراعة, انتخاب الوسط المناسب والتوليفة من منظمات النمو , حضان الزروع 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 , الدرناات , 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**) . تتحفر 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 تبدأ مسالك حيوية معينة بالتعبير حيث بداية تراكم مواد الايض الثانوي. يظهر احيانا الكالس بالوان مختلفة (اصفر , اخضر , ابيض) في هذه المرحلة مع عدم استقراره وراثية (**Genetic instability**) ينتج عنها تغيرات 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.