الكلية	القانون
القسم	القانون
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture
المادة باللغة العربية	زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	
اسم التدريسي	محمد رجب كامل علي العسافي
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Callus culture
عنوان المحاضرة باللغة العربية	زراعة الكالس
رقم المحاضرة	10
المصادر والمراجع	**المختار,** سراب عبد الهادي (2020). زراعة الانسجة النباتية . وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة – جامعة كربلاء . العراق
	حميد, محمد خزعل (2019). زراعة الانسجة النباتية. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي - كلية الزراعة – جامعة الانبار . العراق.
	فهمي, فكري جلال محمد (2003). زراعة الانسجة النباتية – دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع. مصر – القاهرة كلية الزراعة – جامعة أسيوط.

محتوى المحاضرة

زراعة الكالس Callus culture

الكالس : عبارة عن مجموعة من الخلايا البرنكيمية المفككة ذات الجدران الرقيقة, وتتكون هذه الخلايا من انقسام خلايا الام نتيجة لأحداث جروح فيه. حيث يتكون الكالس في مناطق الجرح في السيقان او الجذور وغيرها. وقد يتكون الكالس ايضا نتيجة لمهاجمة المسببات المرضية او الحشرية للنباتات واحداث جروح فيها.

وباستخدام تقانة زراعة الانسجة امكن تحفيز تكوين الكالس من اجزاء مختلفة من النبات ولأنواع نباتية متعددة على الرغم من ان هذه النباتات لا تكون كالس عند احداث جروح فيها في الطبيعة. وبشكل عام يمكن القول ان النباتات المتعددة الخلايا لها القدرة على انتاج الكالس عند زراعة اجزاء منها في اوساط غذائية مناسبة لهذا الغرض, الا ان نباتات ذوات الفلقتين هي المفضلة واستخدمت بشكل واسع في مجال البحوث العلمية والتطبيقية لزراعة الخلايا والانسجة النباتية. ويمكن تحفيز تكوين الكالس عند فصل اي

جزء من النبات سواء كان **جذر** ,**ساق** ,**ورقة وغيرها** ,الا ان الانسجة الفتية هي الاكثر احتمالا لإنتاج الكالس.

يمكن تحفيز خلايا الجزء النباتي المفصول والمزروع في الوسط الغذائي لانتاج الكالس تحت تأثير منظمات النمو التي تساعد على انقسام الخلايا .ومن جهة اخرى امكن الحصول على الكالس من اجزاء نباتية ذات خلايا عالية التخصص) **متمايزة** (ليس لها نشاط مرستيمي وذلك من خلال حثها على فقد التمايز والدخول في دورة انقسامات متكررة لانتاج خلايا الكالس .يزداد الكالس في الحجم نتيجة لانقسام خلاياه الواقعة في الطبقات الخارجية على الاغلب ,اما الخلايا الكائنة في الداخل عادة ما يكون انقسامها قليل وربما معدوم ,**وقد يعود السبب في ذلك** الى ان خلايا الطبقة الخارجية تكون في تماس مع الوسط الغذائي وبالتالي تتحفز للانقسام ويكون نشاطها في الانقسام معتمدا على مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو فضلا عن نوع الجزء النباتي المستخدم والظروف البيئية خلال فترة التحضين . ان خلايا الكالس الواقعة في مركز الكتلة والتي تكون غير قادرة على الانقسام وتكبر في العمر فتحصل لها تغيرات فسيولوجية وربما وراثية فتختلف عن الخلايا المرستيمية ولذلك ربما تحدث اختلافات وراثية لبعض الخلايا لا تشابه خلايا النبات الام من ما قد ينتج عنها نباتات تختلف في صفاتها عن النبات الام.

- **الاوساط الغذائية المستخدمة في نشوء وتنمية الكالس**

ان لمكونات الوسط الغذائي اثر كبير في نشوء الكالس من الاجزاء النباتية المفصولة والمزروعة فيه وقد تختلف الاجزاء النباتية المزروعة في احتياجاتها لمكونات الوسط الغذائي ,وبناء على ذلك فقد تم تحوير عدة اوساط غذائية لتصبح ملائمة لنمو نسيج او عضو نباتي معين .فبالإضافة الى المكونات الاساسية من العناصر المعدنية الرئيسية والثانوية والفيتامينات والسكروز فقد ثبت ضرورة اضافة بعض المركبات الاخرى مثل عصير الليمون ,حيث وجد ان اضافته الى الوسط الغذائي المزروع فيه الجزء النباتي الحاوي على خلايا الكامبيوم قد ادى الى نشوء الكالس دون الحاجة الى اضافة اي نوع من منظمات النمو النباتية.

كما يضاف احيانا حليب جوز الهند الى وسط زراعة الكالس فضلا عن اضافة بعض الحوامض الامينية مثل الكلايسين وال **Aspartic acid** و ال **Glutamic acid** كمصدر للنيتروجين المختزل .ان اهم الاوساط الغذائية التي تستخدم لغرض نشوء وتنمية الكالس هي . **White**, **B5**, **MS** ولغرض تصليب الوسط الغذائي يضاف اليه الاكار او يستخدم الوسط السائل في زراعة الكالس.

اما اضافة منظمات النمو فذلك يختلف باختلاف الجزء النباتي المزروع ومدى احتياجه الى نوع وتركيز معين من منظم النمو لتحفيز انقسام الخلايا وتكوين الكالس, حيث ان بعض الاجزاء النباتية تتطلب اضافة الاوكسينات الى الوسط الغذائي لتحفيز نشوء الكالس, والبعض الاخر يتطلب اضافة السايتوكاينين معا وبعضها الاخر لا تحتاج الى وجود اي من منظمات النمو في الوسط الغذائي لغرض نشوء الكالس.

مراحل تطور الكالس Callus development stage

1- مرحلة التحفيز Induction stage

يتم خلال هذه المرحلة تحفيز وتنشيط العمليات الايضية لخلايا الجزء النباتي وذلك لغرض تهيئتها للانقسام .ويتوقف طول الفترة اللازمة لتهيئة الخلايا للانقسام على عدة عوامل اهمها الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي المستأصل وظروف تحضين الزروعات .وعادة ما تستجيب الخلايا الواقعة في الطبقات السطحية من قطعة النسيج الى التحفيز اكثر من الخلايا الواقعة في العمق.

2- مرحلة انقسام الخلايا Cell division stage

يزداد نشاط الخلايا في هذه المرحلة بعد ان تتحول الخلايا المتخصصة للجزء النباتي المزروع الى خلايا مرستيمية, اي حدوث عملية فقدان التمايز (**Dedifferentiation**) ومن ثم اعادة تخصصها من جديد .(**Redifferentiation**) ومن الجدير بالذكر ان الخلايا في الطبقة السطحية والملامسة للوسط الغذائي تكون اكثر قدرة على الانقسام نتيجة عدة عوامل متداخلة مع بعضها **ومن هذه العوامل-:**

أ- تأثير المواد المتحررة من الانسجة نتيجة الجروح والتي يعتقد بان لها دور مهم في تحفيز الانقسام.

ب -وفرة الاوكسجين حول الخلايا مما يعزز قابليتها على الانقسام السريع.

ج -سرعة تحرر غاز ثاني اوكسيد الكاربون بعيدا عن الانسجة المزروعة.

د -وفرة المواد الغذائية وسرعة استفادة الخلايا منها نتيجة لتماس خلايا الطبقة السطحية مع الوسط الغذائي.

3- مرحلة التمايز والتخصص Differentiation & Specialization stage

وتتمثل هذه المرحلة في تخصص خلايا الكالس الناتجة من انقسام الخلايا وقيامها ببعض العمليات الايضية مثل انتاج المركبات الثانوية.(**Secondary substances**)

ومن الجدير بالذكر ان هذه المراحل متداخلة مع بعضها بمعنى اخر ان خلايا الجزء النباتي المزروع لا تتحفز كلها في وقت واحد وتدخل في المرحلة اللاحقة بل ان بعض الخلايا تتحفز وتمر بانقسامات متكررة ولا زالت خلايا اخرى قد جرى لها التحفيز وهكذا الحال لبقية المراحل.

اعادة زراعة الكالس Sub culturing of callus

وهي عملية نقل الكالس المتكون الى اوساط غذائية جديدة على فترات محددة ,وتعد هذه العملية من المتطلبات الاساسية لنجاح زراعة الكالس .ان استمرار زراعة الكالس في نفس الوسط الغذائي لمدة طويلة يؤدي الى تدهور النمو ويعود ذلك الى **عدة اسباب منها-:**

1- **استنزاف** المكونات الغذائية للوسط الغذائي وجفاف الوسط شبه الصلـــــــــــــــــــــــب.
2- **-زيادة** تركيز المكونات الغذائية في حالة الزراعة بالأوساط السائلة نتيجة تبخر المـــــــــاء.
3- **تجمع** وتراكم المخلفات الايضية للأجزاء النباتية في الوسط الغذائي مما تؤثر سلبا على نمو الاجزاء المزروعة.

عادة ما يتم نقل الكالس الناتج الى وسط غذائي جديد بنفس المكونات كل 4 اسابيع تقريبا وهذا يعتمد على نوع النبات ومعدل انقسام خلايا الجزء المزروع .فعندما يصل الكالس الى الحجم المناسب يقسم الى قطع يتراوح وزنها من **100 – 20** ملغم ويزرع في اوساط محضرة حديثا .ولابد من التقيد بالحجم المناسب للكالس عند اجراء عملية اعادة الزراعة ,حيث عند نقل الكالس وهو لايزال بكمية قليلة جدا يؤثر سلبا على نموه بحيث يكون بطيئا او قد يتوقف النمو .اما اذا ترك لفترة طويلة وازداد حجمه كثيرا فان ذلك قد يؤدي الى توقف الخلايا المتواجدة في المركز عن النمو وقد تفرز مواد ضارة تؤثر على بقية الخلايا.

ان الكالس المتكون تكون بعض خلاياه ملكننة (**Lignified**) والبعض الاخر تكون خلاياه هشة سهلة التمزق .كما تختلف خلايا الكالس في الوانها فمنها ماهي مصفرة ومنها البيضاء او الخضراء فضلا عن ان بعض الخلايا تحتوي على صبغة الانثوسيانين وهناك من الخلايا التي تتلون باللون البني والتي تستبعد عند اعادة الزراعة في وسط جديد.

يمكن تمييز عدة مجاميع من خلايا الكالس نتيجة حدوث بعض التغيرات التي تحصل له كما ان اعادة زراعة الكالس لفترات طويلة قد يتسبب في احداث بعض التغيرات الوراثية والتي تكون **على نوعين:**

1- **تغيرات في التركيب الوراثي Genetic Variation.**

وتحدث هذه التغيرات نتيجة لفقدان جزء من الكروموسوم او الجينات وبذلك فان هذه التغيرات تكون ثابتة وتتوارث بين الاجيال.

2- **تغيرات ابيجينية Epigenetic Variation**

وتكون هذه التغيرات في التعبير الجيني وهي تتوارث ايضا, الا انه من الممكن ان تختفي هذه الاختلافات عند الجيل الثالث او الرابع.

ظاهرة التكيف في الانسجة النباتية Habituation

يقصد بالتكيف هي جميع التغيرات الحاصلة في الانسجة النباتية المزروعة وامكانية نمو هذه الانسجة عند الغاء بعض مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو, حيث ينمو النسيج النباتي دون الحاجة الى اضافة الاوكسينات او السايتوكاينينات والتي كانت مضافة الى الوسط الغذائي في الاساس عند زراعة الاجزاء النباتية .فقد وجد ان الكالس المتكون على اجزاء بعض النباتات والذي يحتاج الى الاوكسينات في بداية نشوئه وتكونه يمكنه ان ينمو دون الحاجة الى اضافة هذه الاوكسينات الى الوسط الغذائي وتسمى انسجة الكالس هذه بالأنسجة المتكيفة للاوكسين, (**Auxin Aabituated**) كما ان انسجة الكالس التي يمكن ان تنمو على اوساط خالية من السايتوكاينين تسمى انسجة متكيفة للسايتوكاينين, (**Cytokinin Habituated**) وفي بعض الاحيان تتكون انسجة كالس متكيفة لأكثر من مركب.

ان الميكانيكية التي يحدث فيها التكيف للأنسجة غير مفهومة تماما, الا انه يعتقد ان الانسجة المتكيفة تصنع كميات كافية من عوامل النمو التي تتكيف لها نتيجة لحدوث تغيرات في مجموعة من الجينات المرتبطة والمسيطرة على مجموعة تنظيم بناء الهرمونات .ويعتقد بعض الباحثين ان التكيف يحدث نتيجة حصول تغيرات على مستوى التعبير الجيني (**Epigenetic**) حيث بينوا ان حالة التكيف هذه من الممكن ان تزول .وذكر باحثون اخرون ان هناك علاقة بين العوامل البيئية الخاصة بتحضين الزروعات وحالة التكيف لأنسجة الكالس, حيث لوحظ ان انسجة كالس التبغ المتكيفة للسايتوكاينين تفقد هذه الخاصية عند زراعتها على درجة حرارة16 م بدلا من**26 م** ,كما اضافوا ان تركيز الاملاح المعدنية في الوسط الغذائي قد تفقد نسيج الكالس المتكيف للاوكسين هذه الخاصية عند نقله الى وسط غذائي اخر مجهز بكميات اضافية من بعض الاملاح اللاعضوية.

ظاهرة التزجج Vetrification

ويقصد بها تكون نبيتات من انسجة الكالس ذات نمو غير طبيعي ,حيث تكون النبيتات الناتجة منه مشوهة وتكون اوراقها سميكة وشفافة وتنكسر بسهولة وقد لوحظ هذه الظاهرة في بعض الانواع النباتية .وربما يعود سبب حصولها الى تأثير بعض مكونات الوسط الغذائي وخاصة منظمات النمو , حيث وجد ان النبيتات الناتجة من الكالس المتكون من زراعة القمم النامية في وسط علي التركيز من ال **NAA**تحصل لها هذه الظاهرة كما وقد حصلت نفس هذه الصفات لنبيتات التفاح الناتجة من زراعة الكالس في وسط غذائي حاوي على السايتوكاينين.**BA**

جامعة الانبار
1987 1428
UNIVERSITY OF ANBAR