مقارنة ثلاث طرق في زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء بتقانة الطمر في الاكار◆

مزاحم قاسم الملاح   سهلة محمد زيدان

قسم علوم الحياة / كلية التربية / جامعة الموصل

ABSTRACT

The present study established cell suspensions from the friable callus derived from the stem explant of broad bean (*Vicia faba*) axenic seedlings. These suspensions of certain densities were cultured by embedding in agar, using three methods of culture including, multiple drop arrays (MDA), thin layers and sectors. In the presence of MS and SH liquid medium forming solid – liquid medium.

The results indicated that all methods succeeded at culturing cell suspension using MS medium. Moreover, these methods sustained callus formation. Multiple Drop Array (MDA) induced callus at ratio of 68% in MS medium, and 48% in SH medium. All pieces of callus primordia continued their growth and increased in size.

الخلاصة

تناولت هذه الدراسة زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء *Vicia faba* L. (broad bean) باعتماد ثلاث طرق من طمرها في الاكار . فقد زرعت كثافات مختلفة منها اولا بطريقة قطرات الاكار المتعددة Multiple Drop Array ، وثانيا في قطاعات الاكار Sectors فضلا عن زراعتها في الطبقات الرقيقة Thin layers ، مضافا اليها احد اوساط MS او SH السائلة المدعم بتداخلات مشتركة من منظمات النمو لتكون المزارع الصلبة – السائلة . واظهرت النتائج نجاح الطرق الثلاثة لزراعة المعلقات فضلا عن تباينها في تشجيع انقسامات الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية وتطورها الى بادئات الكالس . وقد تفوقت طريقة الزراعة في القطرات في اوساط MS ، SH في تكوينها بادئات الكالس اذ بلغت نسبته 68% ، 48% على التوالي، بينما سجلت نسبة استحداثه في طريقة القطاعات 50% ، 40% في ذات الوسطين على التوالي ، وفي طريقة الطبقات الرقيقة 60% ، 44% في الوسطين MS ، SH اعتماداً على الكثافة المزروعة . استمرت جميع بادئات الكالس المتكونة بالنمو والزيادة بالحجم مسببة تشقق

◆ البحث ملقى في المؤتمر الأول لعلوم الحياة في كلية التربية جامعة الموصل للفترة 4-5 أيلول 2007

الاكار المطمورة فيه وعند بلوغها حجم معين نقلت هذه القطع الى اوساط MS الصلبة لادامتها .

المقدمة

تعد تقانة زراعة المعلقات الخلوية للبروتوبلاست او تلك المشتقة من الكالس احد اساليب الزراعة النسيجية الحديثة لمتابعة سلوك الخلايا وانقسامها وصولا الى استحداث الكالس . وتعتمد هذه التقانة على استخدام الكالس الهش في انشاء المعلقات الخلوية لسهولة تفكك خلاياه بواسطة تحريك الوسط الغذائي السائل الى خلايا مفردة او تجمعات خلوية (1) . وذكرت مجموعة من الدراسات ان عددا من البقوليات وعددا غير محدود من محاصيل الحبوب كانت تعاني من صعوبات واضحة في استجابتها للزراعة النسيجية وامكن التغلب عليها باعتماد زراعة البروتوبلاست او الخلايا المعلقة المشتقة من الكالس ومنها نبات الباقلاء *Vicia faba* (3,2) والفاصوليا *Phaseolus actifolins* (4) وفول الصويا *Glycine max* (5) . واعتمدت هذه المزارع مع البقوليات العلفية ، اذ ابدى بروتوبلاست البرسيم *Trifolium repenes* قدرته على الانقسام وتكوين الكالس في قطرت الاكار الذي اظهر قابليته على التمايز ، اذ بدأت الخلايا بانقسامها خلال 72 ساعة من الزراعة وباشرت انقسامها الثاني بعد 48 ساعة من حدوث الانقسام الاول وتكونت المستعمرات الخلوية خلال 7 ايام من الزراعة حيث شوهدت بالمجهر الضوئي بعد 14-21 يوما من الزراعة وظهرت بادئات الكالس في القطرات خلال اربعة اسابيع من طمرها في الاكار (6).

تهدف الدراسة الحالية الى التعرف على استجابة المعلقات الخلوية عند زراعتها في ثلاث طرق من الطمر في الاكار ومدى قدرة الكالس الناتج منها على التمايز وتكوين النباتات .

المواد وطرق العمل

انتاج البادرات المعقمة وتكوين مزارع الكالس

زرعت بذور الباقلاء *Vicia faba* (الصنف المحلي) المعقمة سطحيا (2) على وسط MS (7) الصلب الخالي من منظمات النمو لتكوين البادرات المعقمة للحصول على قطع سيقانها. زرعت قطع السيقان بمعدل ثلاث قطع على سطح 30 مل من وسط الاستحداث في دوارق زجاجية حجم 100 مل . وقد اختبرت اوساط الاستحداث (MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA) و (MS + 0.5 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم /لتر BA) و (MS + 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D) لتكوين مزارع الكالس (2).اعيدت زراعة الكالس الهش المستحدث من قطع السيقان مرة كل 3 اسابيع على نفس الاوساط لادامته والافادة منه في انشاء مزارع المعلقات الخلوية .

انشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان

اتبعت الطريقة القياسية (8) في انشاء مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس . حضنت المزارع في الحاضنة الهزازة (Shaking incubater New Brunswick USA) في ظروف ظلام تام بدرجة حرارة 28+2 م وسرعة 150 دورة/دقيقة (9) رشحت المزارع باستخدام منخل دقيق معقم 46m لازالة الكتل والتجمعات الخلوية الكبيرة والحصول على الخلايا المفردة . واعيدت هذه الخلايا الى الحاضنة الهزازة بنفس الظروف المذكورة سابقا .

تحديد كثافة المعلق الخلوي

قدرت كثافات مزارع المعلقات الخلوية وباعمار مختلفة باستخدام شريحة الهيموسايتوميتر ابتداءاً من اليوم الاول للزراعة ولمدة اسبوع من التحضين (10) .

تقدير حيوية خلايا المعلق الخلوي

اخذت قطرات من محلول 0.5% من صبغة الايفان الزرقاء (BDH chem. Ltd pool U.K) ومزجت مع 1 سم^3 من خلايا المعلق الخلوي . حسبت الخلايا الحية غير المصبوغة والخلايا الميتة المصبوغة وقدرت حيويتها (11) .

زراعة المعلقات الخلوية بتقانة الطمر بالاكار

مزج 6 مل من مزرعة المعلق الخلوي النامية في وسط MS لكل من الكثافات (3.0، 4.8 ، 5.6 ، 3.7 ، 2.9 ، 4.2 ، 3.4 ، 3.3 × 10^3 خلية/مل) مع 6 مل من محلول 3% من الاكار المعقم السائل بدرجة حرارة 40°م وكذلك(2.3 ، 2.1 ، 3.4 ، 2.5 ، 1.8 ، 2.7 ، 3.2 ، 3.4 ، 3.7 × 10^3 خلية/مل) من مزرعة المعلق الخلوي النامية في وسط SH (12) . اخذ 2 مل من المزيج ووزع بهيأة قطرات متماثلة الحجم في قاعدة طبق بتري قطر 9 سم (Sterilin U.K) ، بينما سكب 2 مل اخرى بهيأة طبقة رقيقة بسمك 2 ملم في قاعدة طبق بتري قطر 9 سم وبعد تصلبها قطعت الى اربعة قطاعات متماثلة الحجم ونقل كل قطاع الى طبق بتري مستقل ، بينما سكبت كمية مماثلة من المزيج بهيئة طبقة رقيقة كاملة في قاعدة طبق بتري قطر 9 سم ايضا . اضيف الى كل من الاطباق 4 مل من الاوساط الغذائية السائلة MS و SH الحاوية نفس تراكيز منظمات النمو المستخدمة في استحداث الكالس . غطيت الاطباق باغطيتها وسدت بالبارافيلم وحفظت بدرجة حرارة 25°م وشدة اضاءة 700-800 لوكس/16 ساعة ضوء (1) .

فحصت خلايا المعلقات الخلوية المزروعة في الاكار تحت المجهر الضوئي لمتابعة انقساماتها ، أديمت المزارع كل اربعة ايام بازالة الوسط بهدوء واضافة كمية جديدة من الوسط ذاته حتى ظهور القطع الصغيرة من الكالس .

نقل بادئات الكالس وإدامتها

نقلت مجموعة من بادئات الكالس المتكونة في الاكار الى الوسط الصلب (MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA) ومجموعة اخرى الى الوسط (SH + 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA) لاكثاره وحفظت العينات بدرجة حرارة 25 ^{o}م وشدة اضاءة 700-800 لوكس/16 ساعة ضوء .

النتائج

زراعة المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة

أظهرت نتائج زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة تفوق الوسط MS + 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA عن الوسطين الاخرين حيث شجع الخلايا على مباشرتها انقسامها الاول بعد 7 ايام من الزراعة ومواصلة انقسامها التي انتهت بتكوين المستعمرات الخلوية (الجدول 1) .

بينت النتائج ايضا تشجيع كل من الوسطين (MS + 0.5 ملغم/لتر + 0.5 ملغم/لتر BA) و (MS + 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لترD-2,4) انقسام الخلايا عند زراعة كثافتها الاولى وتكوين المستعمرات الخلوية، وحصول انخفاض في تكوينها عند زراعة الكثافات الاخرى (الجدول 1) .

الجدول (1) : تكوين الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط MS بتقانة قطرات الاكار المتعددة.

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	عدد القطرات المستحدثة للكالس	تكوين منشأت الكالس (%)
MS الخالي من منظمات النمو (المقارنة)	$10^3 \times 3.0$	38	0	0	0	0
	$10^3 \times 4.8$	226	161	145	140	62
BA 0.5+NAA 1.0 + MS	$10^3 \times 5.6$	241	180	170	165	68
	$10^3 \times 3.7$	203	141	130	127	63
	$10^3 \times 2.9$	104	48	44	42	40
BA 0.5+ NAA 0.5+MS	$10^3 \times 4.2$	129	90	78	66	51
	$10^3 \times 3.4$	115	58	53	52	45
	$10^3 \times 3.2$	128	72	65	45	35
2,4-D 2.0+kin 2.0+NAA 2.0+MS	$10^3 \times 3.7$	140	87	77	64	46
	$10^3 \times 3.3$	120	64	54	50	42

تمثل القيم الواردة في الجدول معدلات ثلاثة مكررات لكل معاملة

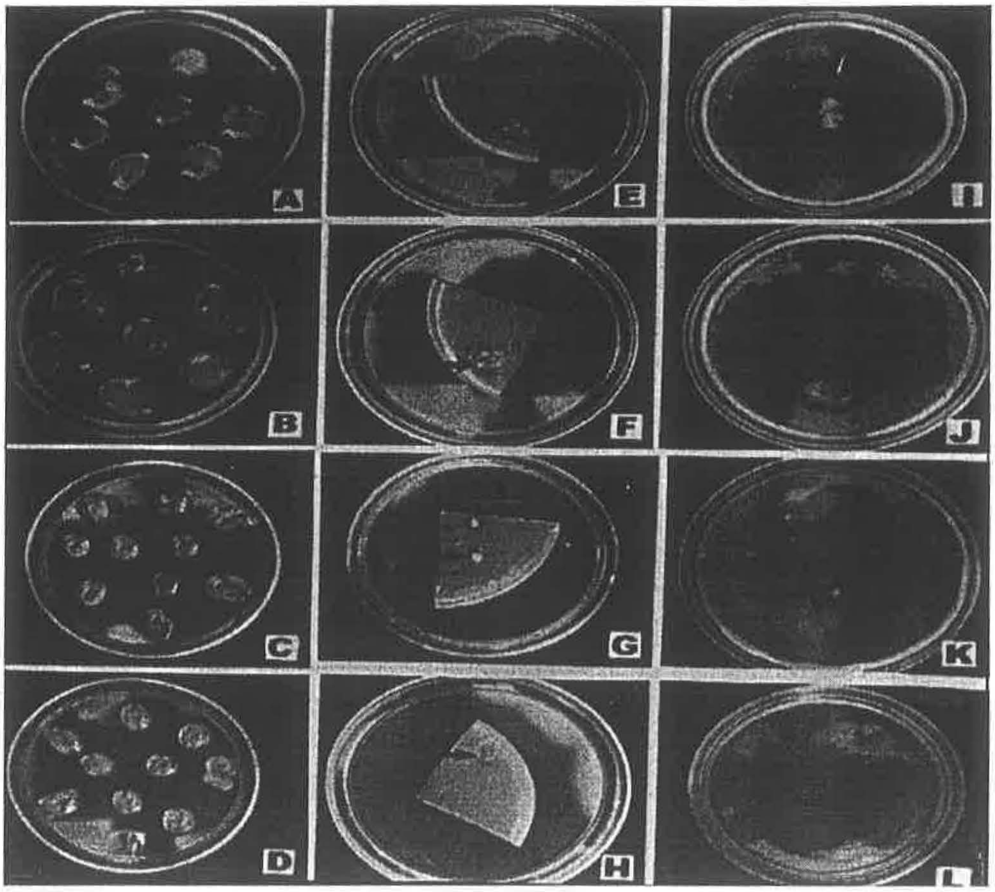
وتطورت هذه المستعمرات مكونة بادئات الكالس التي تمثل قطع صغيرة من الكـــالس الاخضر المطمورة في القطرات (الشكل A.1) وبلغت نسبة استحداث هذا الكالس 68% عند زراعة اعلى كثافة من المعلق الخلوي (الجدول 1). وازداد حجم هذه البادئات وتحولت الـــى قطع اكبر من الكالس مسببة تشقق الاكار بعد مرور 90 يوما من الزراعة (الشكل B.1) .

واكدت نتائج زراعة المعلقات الخلوية في الوسط SH في قطرات الاكار تفوق الوسط (SH + 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D) في استحداث الكالس (الجدول 2) واستغرق ظهور بادئات الكالس 50 يوما من الزراعـــة (الـــشكل C.1) . اعقبها زيادة حجمها وبدء انفصالها عن القطرات بعد 90 يوما من الزراعة (الشكل D.1) .

الجدول (2) : تكوين الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط SH بتقانـــة قطـــرات الاكـــار المتعددة.

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشات الكالس المتكونة	عدد القطرات المستحدثة للكالس	تكوين منشأت الكالس (%)
SH الخالي من منظمات النمو (المقارنة)	$10^3 \times 2.3$	142	0	0	0	0
	$10^3 \times 2.10$	88	44	40	25	28
BA 0.5+NAA 1.0 – SH	$10^3 \times 3.04$	186	102	89	75	40
	$10^3 \times 2.5$	111	51	47	39	35
	$10^3 \times 1.8$	84	32	28	25	28
BA 0.5+ NAA 0.5+ SH	$10^3 \times 2.7$	198	98	85	74	37
	$10^3 \times 2.1$	98	45	40	35	35
	$10^3 \times 3.2$	104	50	42	38	36
2,4-D 2.0+kin 2.0 + NAA 2.0 + SH	$10^3 \times 3.7$	332	215	190	161	48
	$10^3 \times 3.4$	126	57	44	52	41

تمثل القيم الواردة في الجدول معدلات ثلاثة مكررات لكل معاملة



الشكل (1) : زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان الباقلاء في وسط MS ، SH الصلب المدعم بمنظمات النمو والمزروعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة ، القطاعات ، الطبقات الرقيقة .

A : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA والمزروعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة بعد 90 يوما من الزراعة .

B : زيادة عدد بادئات الكالس المتكونة في (A) .

C : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط SH الصلب المدعم 2.0 ملغم/لتر NAA +2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D والمزروعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة بعد 60 يوما من الزراعة.

D : زيادة بادئات الكالس في الحجم مسببة تشقق قطرات الاكار وانفصالها عنه بعد 90 يوما من الزراعة .

E : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5ملغم/لتر BA والمزروعة بتقانة قطاعات الاكار بعد 90 يوما من الزراعة .

F : زيادة بادئات الكالس في الحجم (الجزء المؤشر) المتكونة في (E) بعد 120 يوما من الزراعة .

G : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط SH الصلب المدعم 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D والمزروعة بتقانة قطاعات الاكار بعد 60 يوما من الزراعة.

H : نمو بادئات الكالس وزيادة حجمها (الجزء المؤشر) المتكومة في (G) بعد 90 يوما .

I : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط MS الصلب المدعم 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA والمزروعة بتقانة الطبقات الرقيقة بعد 90 يوما من الزراعة .

J : زيادة حجم بادئات الكالس المتكونة في (I) مسببة تشقق الاكار وانفصالها عنه (الجزء المؤشر) بعد 120 يوما من الزراعة .

K : تكوين بادئات الكالس (الجزء المؤشر) في وسط SH الصلب المدعم 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D والمزروعة بتقانة الطبقات الرقيقة بعد 60 يوما من الزراعة.

L : نمو بادئات الكالس وزيادة حجمها (الجزء المؤشر) المتكونة في (K) مسببة تشقق الاكار وانفصالها عنه بعد 90 يوما من الزراعة .

زراعة المعلقات الخلوية في قطاعات الاكار

اظهرت زراعة المعلقات الخلوية في قطاعات الاكار انها مشجعة لانقسام الخلايا بدرجة مماثلة لطريقة قطرات الاكار بدلالة نسب الانقسام وتكوين المستعمرات الخلوية في اوساط MS المستخدمة . اذ بدأ الانقسام الاول بعد اسبوع من الزراعة وتكونت المستعمرات الخلوية بنسبة 67% (الجدول 3) وظهرت اولى بادئات الكالس بعد 65 يوما من الزراعة (الشكل E.1) وبلغت نسبتها 50% (الجدول 3) . وتحولت الى قطع من الكالس بعد مرور 3 اشهر من الزراعة (الشكل F.1) . في حين انخفضت نسبة تكوين بادئات الكالس في

الجدول (3) : تكوين الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط MS بتقانة قطاعات الاكار.

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للقطاعات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	عدد القطاعات المستحدثة للكالس	تكوين منشأت الكالس (%)
MS الخالي من منظمات النمو (المقارنة)	$10^3 \times 3.0$	5	0	0	0	0
BA 0.5 + NAA 1.0 - MS	$10^3 \times 4.8$	12	6	4	4	33
	$10^3 \times 5.6$	18	12	9	9	50
	$10^3 \times 3.7$	12	5	4	4	33
BA 0.5 + NAA 0.5 + MS	$10^3 \times 2.9$	11	5	4	4	36
	$10^3 \times 4.2$	15	9	7	6	40
	$10^3 \times 3.4$	14	8	6	5	36
2,4-D 2.0 +kin 2.0 - NAA 2.0 + MS	$10^3 \times 3.2$	20	7	6	5	25
	$10^3 \times 3.7$	20	10	7	6	30
	$10^3 \times 3.3$	12	5	4	4	33

تمثل القيم الواردة في الجدول معدلات ثلاثة مكررات لكل معاملة .

ادى استخدام الوسط SH في زراعة المعلقات الخلوية في قطاعات الاكار الى حصول استجابة ضعيفة مقارنة بزراعتها في قطرات الاكار المتعددة للوسط نفسه وارتقى الوسط (SH + 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D) في تكوينه المستعمرات الخلوية (الجدول 4).

الجدول (4) : تكوين الكالس في زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط SH بتقانة قطاعات الاكار

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للقطاعات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	عدد القطاعات المستحدثة للكالس	تكوين منشأت الكالس (%)
SH الخالي من منظمات النمو(المقارنة)	$10^3 \times 2.3$	8	0	0	0	0
BA 0.5 + NAA 1.0 + SH	$10^3 \times 2.1$	7	4	3	2	28
	$10^3 \times 3.04$	14	5	4	4	29
	$10^3 \times 2.5$	14	6	5	4	28
BA 0.5 + NAA 0.5 + SH	$10^3 \times 1.8$	9	4	4	3	33
	$10^3 \times 2.7$	16	7	6	5	31
	$10^3 \times 2.1$	6	3	2	2	33
2,4-D 2.0 + kin 2.0 + NAA 2.0 – SH	$10^3 \times 3.2$	10	5	4	4	40
	$10^3 \times 3.7$	16	8	7	6	37
	$10^3 \times 3.4$	12	5	4	4	33

تمثل القيم الواردة في الجدول معدلات ثلاثة مكررات لكل معاملة

اذ تكونت بادئات الكالس بعد مرور 60 يوما من الزراعة (الشكل G.1) وتطورت الى قطع صغيرة من الكالس بعد 3 اشهر من الزراعة (الشكل H.1).

زراعة المعلقات الخلوية في طبقات الاكار الرقيقة

اشارت بيانات زراعة المعلقات الخلوية في طبقات الاكار الرقيقة تحفيزها الانقسامات الخلوية مع تفوق الوسطين (MS + 1.0 ملغم/لتر + 0.5 ملغم/لتر BA) و (MS + 2.0 ملغم/لتر NAA + 2.0 ملغم/لتر Kin + 2.0 ملغم/لتر 2,4-D) . وتعد هذه الطريقة اكثر ملائمة لزراعة المعلق الخلوي بعد قطرات الاكار المتعددة بدلالة زيادة اعداد المستعمرات الخلوية وظهور بادئات الكالس خلال 55 يوما من الزراعة (الجدول 5) .

الجدول (5) : تكوين الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط MS بتقانة الطبقات الرقيقة من الاكار.

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للمكررات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشأت الكالس المتكونة	عدد المكررات المستحدثة للكالس	تكوين منشأت الكالس (%)
MS الخالي من منظمات النمو(المقارنة)	$10^3 \times 3.0$	8	0	0	0	0
BA 0.5 + NAA 1.0 + MS	$10^3 \times 4.8$	15	8	9	8	53
	$10^3 \times 5.6$	20	13	12	12	60
	$10^3 \times 3.7$	12	7	6	6	50
BA 0.5 + NAA 0.5 + MS	$10^3 \times 2.9$	20	12	10	8	40
	$10^3 \times 4.2$	19	11	10	9	47
	$10^3 \times 3.4$	18	10	9	8	44
2,4-D 2.0 + kin 2.0 + NAA 2.0 + MS	$10^3 \times 3.2$	15	9	7	6	40
	$10^3 \times 3.7$	16	8	7	7	44
	$10^3 \times 3.3$	12	6	5	5	42

وتميزت بادئات الكالس بلونها الاخضر الفاتح (الشكل I .1) اعقبها تحولها الى قطع من الكالس بعد 65 يوما من النمو لتصل نسبة تكوين الكالس 60% (الجدول 5) . واستمرت بالزيادة بالحجم مسببة تشقق الاكار وانفصالها عنه (الشكل J.1) وابدت جميع الكثافات المزروعة استجابة لتكوين الكالس.

اشارت نتائج زراعة المعلقات الخلوية في طبقات الاكار الرقيقة مع الوسط SH السائل انها اكثر ملائمة من الزراعة في القطاعات بدلالة نسب انقسام الخلايا وتزايد اعدادها منذ الاسبوع الاول للزراعة وتطورها الى مستعمرات خلوية وبلغت اعلى نسبة 50% (الجدول 6) في الوسط SH + 1.0 ملغم/لتر NAA + 0.5 ملغم/لتر BA ، وظهور بادئات الكالس خلال 50 يوما من الزراعة (الشكل K.1) لتسجل نسبة استحداث الكالس 44% (الجدول 6) . ولم يشجع هذا الوسط كثيرا زيادة حجم قطع الكالس المتكونة فيه (الشكل L.1). وابدت جميع الكثافات المزروعة استجابة لتكوين مزارع الكالس في اوساط SH .

الجدول (6) : تكوين الكالس من زراعة كثافات متباينة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في وسط SH بتقانة الطبقات الرقيقة من الاكار

الوسط المستخدم (ملغرام/لتر)	الكثافات المزروعة (خلية/سم^3)	العدد الكلي للمكررات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لمنشآت الكالس المتكونة	عدد المكررات المستحدثة للكالس	تكوين منشآت الكالس (%)
SH الخالي من منظمات النمو (المقارنة)	$10^3 \times 2.3$	8	0	0	0	0
	$10^3 \times 2.1$	10	5	4	4	40
BA 0.5+ NAA 1.0 + SH	$10^3 \times 30.4$	16	8	7	7	44
	$10^3 \times 2.5$	8	4	3	3	37
	$10^3 \times 1.8$	9	4	4	3	33
BA 0.5 +NAA 0.5+ SH	$10^3 \times 2.7$	15	4	5	5	33
	$10^3 \times 2.1$	14	4	4	6	43
	$10^3 \times 3.2$	12	6	5	5	41
2,4-D 2.0 + kin 2.0 + NAA 2.0 + SH	$10^3 \times 3.7$	16	9	8	7	44
	$10^3 \times 3.4$	10	5	4	4	40

تمثل القيم الواردة في الجدول معدلات ثلاثة مكررات لكل معاملة .

المناقشة

ان النتائج المتحققة في هذه الدراسة اشارت الى امكانية التغلب على بعض الصعوبات التي تصاحب استحداث الكالس مثل ظاهرة تلون الكالس المشتق من سيقان نباتات الباقلاء مما يعيق نموه . حيث ذكرت بعض المصادر ان قسما من نباتات العائلة البقولية تعاني من هذه المشاكل في الوسط الزرعي فضلا عن مشكلة تمايز كالسها (9 ,13 ,14) . فقد اشارت احدى الدراسات الى استحداث كالس الباقلاء في وسط MS المدعم باضافة 0.01 ملغم/لتر Kin و 0.5 ملغم/لتر 2,4-D او استخدام وسط MS الحاوي على الكلوتامين glutamine والحامض الاميني Pyridoxine-HCl في الحصول على كالس هش ذات لون ابيض مائل للاصفرار (15) . واشارت دراسة اخرى ان الكالس الناتج من نباتات الباقلاء يعتمد على نوع ونسب الاضافات من منظمات النمو المستخدمة (16) .

ان نجاح زراعة المعلقات الخلوية بالطرق الثلاثة من طمرها في الاكار من المحتمل ان يعزى الى الطبيعة الهشة للكالس المشتق من سيقان الباقلاء ، وقد تمثلت استجابتها للزراعة في طرق الطمر الثلاثة مباشرة انقساماتها واحتفاظها بحيوتها (2) وقد يكمن نجاح هذه المعلقات الى احتوائها على نسب عالية من الخلايا المفردة مما ترتب عنها تماثل انماط انقسام هذه الخلايا من حيث انقسامها وتناظرها مع نسب تكون الكالس منها.وان تفوق تكون الكالس المشتق من هذه المعلقات بهذه التقانة قد يكسبه القدرة على التمايز. حيث اشارت احدى الدراسات التي استخدمت قطرات الاكار في زراعة نواتج اندماج بروتوبلاست فول الصويا والبرسيم الى تشجيع حدوث انقسام الخلايا المزروعة وتطور المستعمرات الخلوية الى الكالس الذي ابدى قابلية على التمايز (17) .

ويستنتج من هذه الدراسة ان تفوق تقانة طمر المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الباقلاء في قطرات الاكار المتعددة قد يعزى الى ظروف هذه التقانة مقترناً بحجم القطرة الواحدة مما ادى الى تفوقها في اعداد المستعمرات الخلوية وبادئات الكالس المتكونة مقارنة بطرق الطمر الاخرى . فضلا عن ان التباين في استحداث الكالس يعتمد على حيوية الخلايا المزروعة بالرغم من استخدام نفس الكثافة المزروعة مقترنة بنسبة الاوكسينات والسايتوكاينينات المضافة في هذه الحالة يبدو انها كانت مشجعة لنمو الكالس وتمايزه كما حصل في صنف الباقلاء *Equina* (14) . وقد أثبتت بعض الدراسات الاخرى التي أجريت على نباتات اخرى نجاح طريقة زراعة المعلقات الخلوية بطريقة قطرات الاكار المتعددة كما في زراعة المعلقات الخلوية لنبات الخس والتي هدفت الى معرفة تأثير مركبات الترايازولات كمنظمات نمو بديلة عن المنظمات القياسية في انشاء هذه المزارع (18).ويتوقع ان توفر

هذه التقانة فرصا للتغلب على بعض مشاكل تمايز الكالس في النباتات التي تبدي صعوبات في الوسط الزرعي كالباقلاء أو غيرها من الانظمة النباتية .

المصادر

1. Dixon, R.A. Plant Cell Culture, A Practical Approach, IRL Press, Oxford, U.K. (1985).
2. AL–Mallah, M.K. and Zeadan, S.M. J. Edu. And Sci., 2: 35–46. (2004).
3. Binding, H. and Nehls, R. Z Pflanzenphysiol Bd., 88.S. 327-332. (1978).
4. Kumar, A.S., Gamborg, O.L. and Nabors, M.W. Plant Cell Repts., 7: 322 – 325. (1988).
5. Kao, K.N.; Gamborg, O.L; Miller, R.A. and Keller W.A. Nature New Biol, 232: 124 – 128.(1971).
6. Cocking, E.C. and Davey, M.R. Plant Physiol., 133: 547 – 459. (1988).
7. Murashige, T. and Skoog, F. Physiol. Plant, 15: 473 – 497. (1962).
8. Morris, P. and Fowler, M.W. Plant Cell, Tiss and Org. Cult. 1: 15 – 24. (1981).
9. Roper, W. Z. Pflanzenphysiol. 93: 245–257. (1979).
10. Santos, A.V.; Qutka, D.E.; Cocking, E.C. and Davey, M.R. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 99: 261 – 270. (1980).
11. Brikenhead, K. and Willmer, C.M. J. Exp. Bot. 37: 119 – 128. (1986).
12. Schenk, R.V. and Hildebrandt, A. C. Plant Cell Culture. Can, J. Bot. 50: 199-204. (1972).
13. Grant, M.E. and Fuller, K.W. J. Exp. Bot. 19: 667 – 680. (1968).
14. Fakhrai, H.E. and Evans, P.K. J. Exp. Botany, 40: 813 – 817. (1989).
15. Cornelia, A. and Kohlenbach, H.W. Plant Cell Repts., 8: 267 – 269. (1989).
16. Zeadan, S.M. Ph.D. Thesis, University of Mosul, Iraq (in Arabic). (2004).
17. Fowke, L.C. and Rennie, P.J. Planta (Berl.). 9: 39 – 45. (1976).
18. Al – Bayaty, J.H. and Mohammad, A.S. J. Al-Raf. And Sci., 16: 210-227.(2005)