زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا صنف إباء *Glycine max* في قطرات الأكار المتعددة

قتيبة شعيب النعمة

قسم علوم الحياة - كلية التربية

جامعة الموصل

تاريخ الاستلام 2004/9/25 تاريخ القبول 2004/12/15

ABSTRACT

The present study aimed to establish cell suspension from stem callus of *Glycine max*. These suspensions were cultured by embedding them in agar, This technique was favorable for cell division, colonies formation and microcalli production.

The results indicate that the best growth of cells was 174×10^6 cell / ml in the sixth day with viability between 47- 81 %.

الخلاصة

تمكنت الدراسة من إنشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس سيقان نباتات فول الصويا *Glycine max* . زرعت الكثافات (60 ، 73 ، 85 ، 101 ، 122 ، 174 ، 134) × 10^6 خلية / مل من هذه المعلقات بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة والتي أبدت نجاحها وكفاءتها في تشجيع انقسام الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية حيث بلغت 2159 مستعمرة خلوية وتطورها الى بدايات الكالس التي تفاوتت نسبة تكوينها ما بين 10-285 % اعتمادا على الكثافة المستخدمة.

وأظهرت النتائج أن معدل نمو الخلايا اتخذ نمطا واضحا بالزيادة خلال فترة نمو المعلق الخلوي حيث بلغ أعلى معدل نمو للخلايا 174 × 10^6 خلية / مل في اليوم السادس. وتراوحت نسبة حيوية خلايا المعلقات الخلوية خلال فترة نموها بين 47 - 81 %.

المقدمة

يعد النبات البقولي فول الصويا *Glycine max* L. Merrill (soybean) من النباتات المهمة اقتصادياً لاحتواء بذوره على نسبة عالية من البروتينات والزيوت (1) حيث تستعمل في غذاء الإنسان فضلا عن الاستخدامات الصناعية والغذائية الأخرى (2).

اتبعت تقنية زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من الكالس مع العديد من الأنواع النباتية البقولية مثل فول الصويا *Glycine max* (3) والفاصوليا *Phaseolus acutifolius* (4) والباقلاء *Vicia faba* (5) وغير البقولية مثل الجزر (6) والكرفس (7) من خلال طمرها في الاكار. لقد اعتمدت إحدى الدراسات الحديثة هذه التقنية (8) لدراسة تأثير عدد من مشتقات مركبات الترايازولات في انقسام الخلايا واستحداث الكالس وتمايزه. حيث يمنح نظام المعلقات الخلوية الفرصة للتعرف على تأثير المادة المختبرة على مستوى الخلية الواحدة (9). وعموماً يعتمد نجاح هذه التقنية على كثافة الخلايا المزروعة ونوع الوسط المستخدم (10) وعوامل أخرى فسلجية وبيئية (11).

وتهدف الدراسة الحالية إلى استحداث الكالس من مزارع المعلقات الخلوية لنبات فول الصويا بطمرها في قطرات الاكار المتعددة والتعرف على الكثافات الملائمة لهذا الغرض وتقدير حيوية خلايا المعلقات الخلوية.

مواد وطرائق العمل

(1) مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان:

استحدثت مزارع كالس سيقان فول الصويا (الصنف إباء) على وسط MS الحاوي على 1 ملغم/لتر Naphthalene Acetic Acid و2 ملغم/لتر Benzyl Adenine (12). أعيدت زراعة الكالس بهدف إدامته مرة واحدة كل ثلاثة أسابيع على نفس الوسط لإكثاره والإفادة منه في إنشاء مزارع المعلقات الخلوية.

اتبعت طريقة Morris و Fowler (13) لتحضير المعلقات الخلوية من الكالس المشتق من سيقان نبات فول الصويا ، أخذ 1 غم من الكالس الهش الفتي بعمر 21 يوم ونقله إلى دورق حجم 250 مل معقم حاو على 50 مل من وسط MS السائل الحاوي على نفس منظمات النمو وبنفس التراكيز المستخدمة في استحداث الكالس. حضنت الدوارق في الحاضنة الهزازة (New Brunswisck Scientific, Co. Inc. Edision, N. I., USA) بظروف ظلام تام ودرجة حرارة 28 ± 2 °م وبسرعة 150 دورة/ دقيقة لمدة 48 ساعة. رشحت

المزارع المتكونة باستخدام منخل دقيق معقم 46 µm (Plant Genetic Manipulation Group Nott. Univ. U.K.) للحصول على الخلايا المفككة المفردة وإزالة الكتل والتجمعات الخلوية الكبيرة. أديمت مزارع المعلقات الخلوية بإزالتها من الحاضنة وتركها بوضع جانبي لمدة 4 ساعات لاستقرارها (14). سكب الوسط القديم وأستبدل بإضافة 50 مل من الوسط الجديد إلى الخلايا وإعادة الدوارق إلى الحاضنة الهزازة. حددت كثافة المزرعة بأخذ 0.1 مل من المعلق الخلوي بأعمار 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 يوم ووضعه في حجرة الهيموسايتوميتر لتحديد كثافة المعلق الخلوي (5).

(2) تقدير حيوية خلايا المعلق الخلوي:

استخدم محلول 0.5 % من صبغة ايفان الزرقاء (BDH Chemical Ltd. Pool, U.K) في تقدير حيوية المعلق الخلوي وذلك بمزج 1 مل من مزرعة المعلق الخلوي مع 1 مل من محلول الصبغة وتركها لمدة 10 دقائق. حسبت أعداد الخلايا الحية غير المصبوغة (15). قدرت حيوية الخلايا لكل كثافات المعلق الخلوي.

(3) زراعة المعلق الخلوي في قطرات الاكار:

مزج 1 مل من مزرعة المعلق الخلوي لكل من الكثافات (60 ، 73 ، 85 ، 101 ، 122، 174 ، 134) × 10^6 خلية / مل مع 1 مل من محلول 3 % من الاكار السائل المعقم المحفوظ بدرجة 40 °م بصورة سريعة لمنع تصلب الاكار. سحب المزيج ووزع في قعر أطباق بتري البلاستيكية بقطر 9 سم (Sterilin, UK) بشكل قطرات عددها 10 قطرات لكل طبق. تركت القطرات لكي تتصلب داخل الطبق ثم أضيف لكل طبق 5 مل من وسط MS السائل الحاوي 1 ملغم / لتر NAA + 2 ملغم / لتر BA مع ملاحظة عدم غمر القطرات بالوسط السائل (16). سدت الأطباق بالبارافلم وحفظت في غرفة الزرع في درجة حرارة 25 ± 2 °م وشدة إضاءة 700-800 لوكس (16 ساعة ضوء). فحصت خلايا المعلقات الخلوية المزروعة في قطرات الاكار بعد 24 ساعة تحت المجهر الضوئي لتحديد بدء الانقسام الأول ومتابعة الانقسامات لتكوين المستعمرات وتطورها إلى بدايات الكالس.

النتائج

تكوين مزارع المعلقات الخلوية:

أظهرت النتائج أن الكالس الهش المستحدث من سيقان بادرات فول الصويا كان ملائما لإنشاء المعلقات الخلوية باعتماد وسط MS السائل المدعم بإضافة 1 ملغم / لتر NAA و 2 ملغم / لتر BA. حيث شجع هذا الوسط انقسام الخلايا وأدى إلى زيادة كثافة المعلق الخلوي. فقد باشرت الخلايا انقسامها الأول بعد 24 ساعة من زراعتها وتعاقبت الانقسامات الخلوية حتى اليوم السادس من الزراعة وتوقفت عن الانقسام في اليوم السابع وقد تراوحت حيوية خلايا المزارع المعلقة بين 47 – 81% (الجدول 1).

الجدول (1): إنقسامات وحيوية خلايا مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان بادرات فول الصويا طيلة عمر المزرعة

عمر المزرعة(يوم)	الكثافة المزروعة($\times 10^6$خلية/مل)	الحيوية(%)
0	0	0
1	60	47
2	73	66
3	85	69
4	101	70
5	122	76
6	174	79
7	134	81

زراعة المعلقات الخلوية بالطمر في الاكار:

أظهرت نتائج زراعة الكثافات المختلفة من مزارع المعلقات الخلوية بطمرها في قطرات الاكار المتعددة استجابة الخلايا المزروعة لهذه التقانة بدلالة انقسامها ومواصلتها لهذه الانقسامات وتكوينها المستعمرات الخلوية المكونة من عدد كبير من الخلايا. استمرت هذه المستعمرات في نموها مؤدية إلى تكوين بدايات الكالس التي ظهرت بهيئة قطع صغيرة بيضاء اللون، ازدادت هذه القطع في حجمها مسببة تشقق الاكار وتكوينها قطع الكالس (الجدول 2).

الجدول (2): تكوين الكالس من زراعة كثافات مختلفة من المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا بتقانة قطرات الاكار المتعددة

الكثافات المزروعة (×10^{6}خلية/ مل)	العدد الكلي للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	تكوين بدايات الكالس (%)	عدد البدايات المتطورة إلى كالس
60	17	989	47	0
73	20	559	0	0
85	29	171	10	0
101	24	2159	291	10
122	24	1790	245	11
174	21	472	285	7
134	30	762	206	5

وأظهرت النتائج أن الوسط MS المدعم بإضافة 1 ملغم / لتر NAA و 2 ملغم / لتر BA كان مشجعاً لمباشرة الخلايا بالانقسام مع ملاحظة اختلافات في بدء الانقسام واستمراره حتى تكوين الكالس.

وأوضحت النتائج حدوث الانقسام الأول للكثافة الأولى (60 × 10^6 خلية/ مل) في اليوم العاشر من الزراعة تلاها نشوء الخلايا الثنائية والثلاثية والرباعية خلال سبعة أيام وظهرت بدايات الكالس بعد 25 يوماً. بينما بدأ الانقسام الأول للكثافة الثانية (73 × 10^6 خلية/ مل) في اليوم الثامن من الزراعة وتكونت الخلايا الثنائية والثلاثية والرباعية بعد 15 يوماً أعقبها تكوين المستعمرات الخلوية بعد سبعة أيام وانتهت بتكوين بدايات الكالس. بدأ الانقسام الأول في الكثافة الثالثة (85 × 10^6 خلية/ مل) خلال سبعة أيام وتكونت الخلايا الثنائية خلال أيام ثلاثة ثم تكونت خلايا ثلاثية ورباعية وبعد مضي 12 يوم من الزراعة تكونت المستعمرات الخلوية وظهرت أولى بدايات الكالس بعد 19 يوم من الزراعة. وباشرت الخلايا في المزرعة ذات الكثافة الرابعة (101 × 10^6 خلية/ مل) بالانقسام منذ اليوم الأول للزراعة أعقبها تكوين خلايا ثنائية وثلاثية في اليوم الثاني والثالث وظهور المستعمرات الخلوية بعد 5 أيام ونشأت أولى بدايات الكالس خلال سبعة أيام فقط من الزراعة وبعد مرور سبعة أيام أخرى تكونت قطع كبيرة من الكالس. وكان سلوك الخلايا في المزرعة ذات الكثافة الخامسة (122 × 10^6 خلية/ مل) مماثلا لسلوك الخلايا في الكثافة السابقة.

وحدث الانقسام الأول في خلايا المزرعة الخلوية ذي الكثافة السادسة (174 × 10^6 خلية/ مل) في اليوم الأول (الشكل 1 – a) أعقبها تكوين مراحل الخلايا

الثنائية (الشكل 1 – b) والثلاثية (الشكل 1 – c) والرباعية (الشكل 1 – d) في اليوم الثاني والثالث والرابع على التوالي وبعد مرور سبعة أيام تكونت المستعمرات الخلوية (الشكل 1 – e) والتي تطورت لتكون أولى بدايات الكالس تحولت بعدئذ إلى قطع كالس واضحة الحجم بعد مرور 25 يوم من الزراعة (الشكل 1 – f). وفي المزرعة ذات الكثافة السابعة (134×10^6 خلية/ مل) باشرت الخلايا انقسامها في اليوم الأول من الزراعة وتكوينها للمراحل الثنائية والثلاثية والرباعية الخلية في الأيام اللاحقة وبعد سبعة أيام تكونت المستعمرات الخلوية أعقبها ظهور أولى بدايات الكالس بعد 15 يوم من الزراعة تطورت بعد 25 يوم الى قطع صغيرة من الكالس.

تكوين مزارع الكالس وإدامته:

نقلت قطع الكالس المتكونة من زراعة المعلقات الخلوية بعد أزالتها من قطرات الاكار إلى سطح وسط MS الصلب الحاوي على 1 ملغم / لتر NAA و 2 ملغم / لتر BA. وأظهرت نتائج إدامة هذا الكالس نجاح نموه على الوسط المستخدم. واتصف الكالس بكونه من النوع الهش وذو لون اخضر براق (الشكل 1 – g).

المناقشة

إن إمكانية الحصول على مزارع المعلقات الخلوية من كالس نباتات فول الصويا يعد خطوة مهمة للتغلب على بعض الصعوبات في تمايز هذا الكالس. خصوصاً أن نبات فول الصويا يعد من الأنواع النباتية صعبة الاستجابة لتكوين الكالس وتمايزه بالرغم من إمكانية استحداثه من الأجزاء المختلفة (12).

إن نجاح تقانة مزارع المعلقات الخلوية في هذه الدراسة يعزى إلى نوع الكالس الهش المتكون من السيقان الذي أبدى دوراً كبيراً في سرعة الاستجابة لهذه التقنية وبدا هذا واضحاً من نسب انقسام الخلايا وحيويتها. فقد أشارت إحدى الدراسات إلى أن الانقسام الأول بدأ بعد 72 ساعة من زراعة خلايا بروتوبلاست نبات الجت بطريقة الطمر بالاكار وباشرت الخلايا انقسامها الثاني بعد48 ساعة من حدوث الانقسام الأول وتكوينها المستعمرات الخلوية (17). وأوضحت دراسة أخرى أجريت على النبات البقولي *Cyamopsis tetragonoloba* ان الغرام الواحد من الكالس المستحدث من الأوراق أعطى 2.5×10^6 خلية من البروتوبلاست وبلغت نسبة تكوين المستعمرات الخلوية 1- 5 % خلال أسبوعين من الزراعة (18).

كما أشارت إحدى الدراسات (19) أن للوسط الغذائي دور كبير في انقسام الخلايا واستحداث الكالس فقد أكدت هذه الدراسة أن زراعة الخلايا المفردة لعدد من نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين باعتماد المزارع الصلبة – السائلة لاختبار عدد من الأوساط أن خلايا هذه النباتات أبدت استجابة واضحة ومتفاوتة فيما بينها بدلالة الزيادة الحاصلة في معدل نمو الخلايا في الأوساط المختلفة. إن التقنية المتبعة في هذه الدراسة من المحتمل أن تكون ملائمة لأنواع نباتية أخرى وبالذات التي تتصف بصعوبة استجابتها في الوسط الزرعي مثل النوع النباتي المستخدم في هذه الدراسة. وقد يكون هذا المسار بديلا مناسبا للتغلب على مشاكل تمايز الكالس.

المصادر

1.Rech E.L. , Golds T.J. , Husnian T. , Vainstein M.H. , Jones B., Hammatt N. , Mulligan B.J. and Davey M.R., Plant Cell Repts. 8: 33-36 (1989).

2. الجنابي، محسن علي احمد وعلي، يونس عبد القادر. "المدخل إلى إنتاج المحاصيل الحقلية". دار الكتب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل (1996).

3.Kao K.N. , Gamborg O.L. , Miller R.A. and Keller W.A., Nature New Biol., 232: 124-128 (1971).

4.Kumar A.S. , Gamborg O.L. , and Nabors M.W., Plant Cell Repts. 7: 322-325 (1988).

5. الملاح ، مزاحم قاسم و زيدان ، سهلة محمد. مجلة التربية والعلم. 16(2): 35-47 (2004).

6.Murashige T., Ann. Rev. Plant Physio;. 25: 135-166 (1974).

7.Williams L. and Collin H.A., Ann. Bot. 40: 333-338 (1976).

8. البياتي ، جميلة هزاع رشيد و محمد ، عبد المطلب. مجلة علوم الرافدين (مقبول للنشر) (2004).

9.Salisburg E.B. and Ross C.W., Plant Physiology. 4th ed., Wadsworth Publishing Company Belmont, California, Division of Wads Worth, Inc. (1992).

10.Purohit S.S., Agricultural Biotechnology .P.G. Department of Botany Dungar College, Bikaner, India (1999).

11.Michael M.O. , Bapat V.A. and Schieder O., .Z. Pflanzenphysiol. Bd., 106: 173-177 (1982).

12.Al-Bayaty F.A., M. Sc. Thesis, Univ. of Mosul. (2002). (in Arabic).

13.Morris P. , and Fowler M.W., Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1: 15-24 (1981).

14.Gresshoff P.M., Bot. Gaz. 141: 157-164 (1980).

15.Birkenhead K. and Willmer C.M., J. Exp. Bot. 37: 119-128 (1986).

16.Dixon R.A., Plant Cell Culture, A Practical Approach. IRL. Press. Oxford. UK (1985).

17.Cocking E.C. and Davey M.R., Z. Pflanzenphysiol. Bd., 99: 261-270 (1980)..

18.Saxena K.P. , Gill R. , Rashid A. and Maheshwari S.C.Z. Pflanzenphysiol. 106: 277-280 (1982).

19.Fowke L.C. and Wang H., Physiol. Plnt. 85: 391-395 (1992).

الشكل (1): تكوين الكالس من زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس سيقان فول الصويا بتقانة قطرات الاكار المتعددة

(a) خلية مفردة قبل مباشرتها الانقسام مطمورة في قطرة الاكار بوجود وسط MS السائل الحاوي 1 ملغم NAA + 2 ملغم BA.

(b) الانقسام الخلوي الأول لخلايا المعلق الخلوي بعد مرور يومين من الزراعة (مرحلة الخليتين).

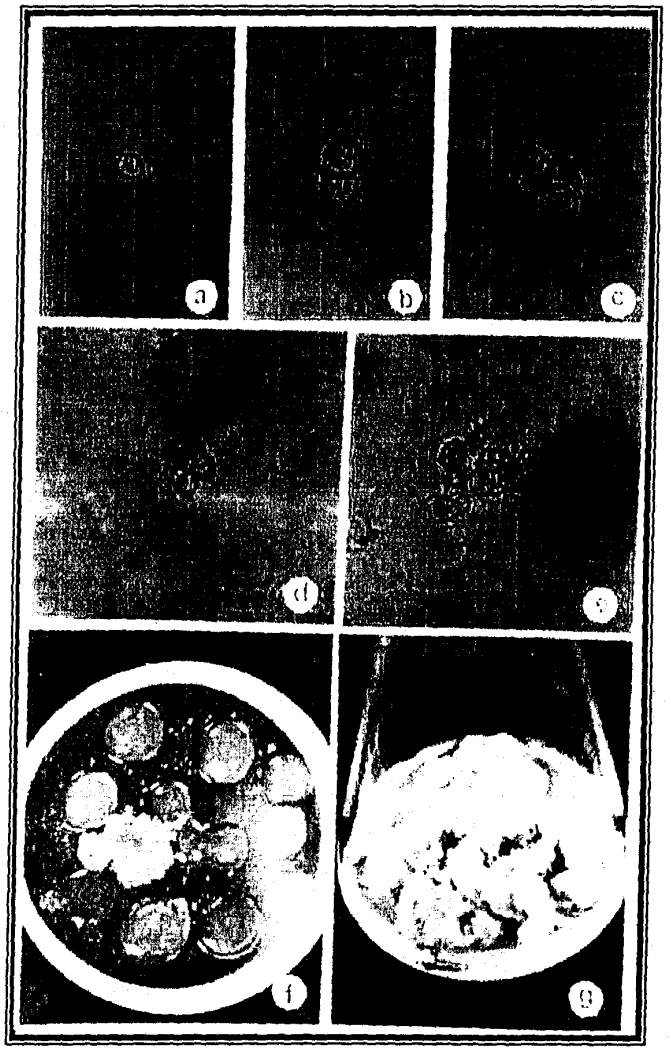
(c) الانقسام الخلوي الثاني لخلايا المعلق الخلوي بعد مرور ثلاثة أيام من الزراعة (مرحلة ثلاثية الخلايا).

(d) الانقسام الخلوي الثالث لخلايا المعلق الخلوي بعد مرور أربعة أيام من الزراعة (مرحلة رباعية الخلايا).

(e) تكوين المستعمرات الخلوية الناتجة من استمرار الانقسامات الخلوية بعد مرور سبعة أيام من الزراعة.

(f) تطور بدايات الكالس إلى قطع كالس كبيرة الحجم بعد مرور 25 يوم من الزراعة.

(g) الكالس الناتج من المعلق الخلوي المنقول إلى وسط الاستحداث والإدامة بعمر 15 يوم .


a
b
c
d
e
f
g