الباب الخامس

إنتاج الكالس Callus induction

يؤدى إحداث جرح فى أى عضو نباتى إلى تنشيط الخلايا عند السطح المجروح والخلايا المجاورة لها وتنقسم وتكون كتلة خلوية تسمى بالكالس تعمل على التئام الجرح. ويعتبر الكالس بأنه كتلة من خلايا غير محددة أو مميزة المعالم له القدرة على الانقسام السريع. وينتج الكالس بسهولة فى المعمل من أى نسيج نباتى يزرع على بيئة مناسبة. ويمكن اكثاره بتجزئته وزراعة الأجزاء على بيئة مناسبة تحتوى على أملاح معدنية وفيتامينات ومنظمات نمو ومصدر كربونى (سكروز).

سرعة نمو الكالس فى البيئة السائلة

بعد زراعة خلايا الكالس فى بيئة سائلة تبدأ مرحلة يتوقف فيها النمو لفترة محدودة. بعدها تبدأ الخلايا فى الانقسام السريع، ويزداد عددها وحجمها حتى تصل إلى مرحلة الثبات العددى، وهى مرحلة تصل فيها كثافة الخلايا حدها الأقصى ثم تنخفض سرعة الانقسام حتى تتوقف تماما نتيجة زيادة عدد الخلايا واستنزاف واحد أو أكثر من العناصر المكونة لمعلق الخلايا. وفى هذه المرحلة تكون الخلايا سابحة فى البيئة مفردة أو متجمعة أو خليط منهما. فمثلا كالس نبات *Anthurium andreanum* ينمو فى صورة خلايا متكتلة Clumps. بينما كالس الجزر يتفكك بسهولة إلى خلايا فردية أو متجمعة. فإذا كان النمو الناتج ضعيفا فقد يكون سببه ضعف الجزء النباتى، لذلك يفضل زراعة جزء نباتىآخر تحت نفس ظروف التحضين مع تخفيض تركيز منظمات النمو فى البيئة. فإذا كان نمو الكالس مازال

ضعيفا، فهذا دليل على أن البيئة المستخدمة غير مناسبة، لذلك يفضل إضافة بعض المعقدات الأخرى للبيئة مثل لبن جوز الهند وكازين ومستخلص الشعير النابت ومستخلص الخميرة وغيرها. ويختلف لون وتركيب وطريقة نمو الكالس باختلاف الأنواع النباتية. فقد يكون لونه أبيض أو ملونا، وقد يكون هشا أو متماسكا، وقد يكون طريا (مائيا) أو صلبا، وقد يكون سهل أو صعب التفكك إلى خلايا. وقد تحدث طفرات فى الخلايا الداخلية للكالس. وقد يفقد الكالس احتياجه من الأكسين و/ أو السيتوكاينين بعد تكرار الزراعة المعملية ويكون قادرا على الاكتفاء الذاتى بما يحتويه من منظمات النمو.

إنتاج كالس نبات التبغ Tobacco

١- إنتاج كالس من ساق التبغ

١- تفصل قطع بطول ٣سم تقريبا من ساق حديثة لنبات جيد النمو خالى من الآفات. وتغمس نهايات القطع فى شمع بارافين سائل لتغطيتها وحمايتها أثناء عمليات التعقيم المتتالية.

٢- ينظف السطح الخارجى للقطع الساقية ويزال شمع البارافين من عليها مع الاحتفاظ بوجوده على الأسطح المجروحة فقط. ثم تعقم بغمسها فى ٧٠٪ كحول إيثانول لمدة ٢٠- ٣٠ ثانية، يتبعه تعقيما كاملا فى محلول هيبوكلوريت الصوديوم (تركيز الكلور ٢٪ تقريبا). ويمكن استخدام بعض المعقمات الأخرى مثل Calcium hypochlorite; Mercuric chloride; Bromine water. ويوصى بإضافة ١- ٢ نقطة من أحد مركبات التخلص من التوتر السطحى Surfactants مثل Tween- 80 إلى محلول التعقيم لتحسين انتشاره.

٣- تشطف القطع الساقية ٥- ٦ مرات فى ماء مقطر معقم، ثم تقطع إلى أقراص بسمك ٢- ٣ ملليمتر، مع استبعاد النهايات المجروحة المغطاة بالبرافين. ويوضع كل قرص أفقيا على بيئة (MS) صلبة تحتوى على ٣٠ جرام سكروز/ لتر + ملليجرام واحد 2,4-

D/ لتر + ٠,٢ ملليجرام/ لتر كاينيتين. ثم تحضن عند ٢٤- ٢٨°م وضوء فلوروسنت. وبعد ١- ٣ أسابيع يبدأ تكوين الكالس بصورته البللورية. وبعد ٤- ٨ أسابيع يصبح حجم الكالس صالحا للتجزئة وإعادة زراعته فى بيئة مماثلة ولكنها طازجة لإكثاره.

٢- إنتاج كالس من ورق التبغ

تفصل ورقة حديثة العمر من نبات التبغ، ثم تعقم سطحيا وتقطع إلى أجزاء ويزرع كل جزء فى بيئة صلبة فى أنبوبة اختبار. فيتكون كالس فى مواقع الجروح على الأجزاء الورقية. وتجرى الزراعة الثانوية Sub-culturing إذا كانت هناك حاجة لزيادة كمية الكالس. فيجزأ الكالس بعد وصوله للحجم المناسب، ثم تزرع الأجزاء فى بيئة طازجة صلبة أو سائلة لتشجيعه على النمو. وتكرر هذه الخطوة عدة مرات باستخدام بيئة طازجة. وبالفحص الميكروسكوبى يمكن ملاحظ وجود تجمعات خلوية أكبر حجما عن باقى خلايا الكالس. وظهور هذه التجمعات الخلوية بعد فترة قصيرة من زراعة الكالس يعنى ميله لتكوين أجنة ونموات جديدة مبكرا وهى ظاهرة غير مرغوبة لأنها تؤثر فى كمية الكالس الناتج. ويجب التخلص من هذه التجمعات الخلوية حتى يعود الكالس لنشاطه فى النمو والانقسام مع توفير البيئة الغذائية ومنظمات النمو المناسبة. وتظهر التجمعات الخلوية كبيرة الحجم إذا احتوى الجزء النباتى على خلايا برانشيمية، وتختفى إذا احتوى على خلايا مرستيمية.

العوامل المؤثرة فى تكوين الكالس

١- عمر الجزء النباتى

ينتج الكالس من زراعة أى جزء نباتى فى بيئة غذائية مناسبة. وتعتبر الخلايا أو الأنسجة المفصولة من نباتات حديثة العمر Juvenile أو من نباتات عشبية هى الأفضل فى إنتاج ونمو الكالس بالمقارنة بالأنسجة البالغة Adult. وأن الأجزاء الطرفية تحتوى على مستوى هرمونى أعلى من الأجزاء القاعدية والبالغة.

٢ - نوع النبات

يمكن إنتاج الكالس بزراعة أى جزء نباتى مفصول من نباتات ذات فلقتين أو فلقة واحدة فى بيئة مناسبة. ويختلف الكالس فى تكوين نباتات باختلاف النوع النباتى ومحتوى البيئة الغذائية والبيئة المحيطة. فمثلا الأجزاء النباتية المفصولة من النوع *Anthurium andraeanum* لها القدرة على تكوين كالس وإنتاج نموات جديدة، بينما قدرة النوع Anthurium scherzerianum منخفضة (٧٥٪)، وهما نوعان يتبعان للجنس أنثوريوم Anthurium. كذلك يتكون الكالس من متوك الجارونيا Geranium بنسبة ١٠- ٦٢ ٪. وتعتبر النباتات أحادية الفلقات Monocotyledons أقل إنتاجا للكالس بالمقارنة بالنباتات ثنائية الفلقات Dicotyledons. وفى حالة صعوبة إنتاج الكالس من نباتات أحادية الفلقات يفضل زراعة أجنة أو أوراق حديثة العمر أو بادرات أو أزهار حديثة جدا مع إضافة الأكسين للبيئة كمنشط لتكوين الكالس. وإنتاج الأجنة من الكالس قد يكون صعبا أو مستحيلا لبعض الأنواع النباتية، وقد تتكون على الكالس أجنة عرضية تدخل فى سكون عميق يصعب انكساره. وتوجد ظواهر كثيرة يصعب تعليلها مثل انخفاض أو فقد كامل لقدرة خلايا الكالس على النمو والتكاثر بعد عدة مرات من الزراعة الثانوية، أو تكوين نبتات مباشرة بدون تكوين أجنة عرضية. وقد يكون لمنظمات النمو دور رئيسى فى نمو وتكاثر بعض الأنواع النباتية بينما البعض الآخر قد يبدأ فى التكاثر الخضرى تلقائيا فى غياب منظمات النمو.

٣ - صورة البيئة الغذائية

تنجح زراعة الكالس فى بيئة صلبة أو سائلة، إلا إن نموه أسرع فى البيئة السائلة لوجود تلامس مباشر بين الخلايا والبيئة مما يزيد استفادة الخلايا من مكونات البيئة. وهز الدوارق المحتوية على بيئة سائلة باستخدام جهاز رج يساعد على سرعة نمو الكالس وتفكك خلاياه وزيادة مساحة الأسطح الملامسة للبيئة وإمداد الكالس بالأكسجين. وتساعد البيئة الصلبة على إنتاج نموات من الكالس مبكرا قبل

اكتمال نموه. ويفضل رج البيئة على هزاز دوار Rotary shaker بسرعة ٨٠– ١٠٠ دورة/ الدقيقة، وقد تخفض سرعته أحيانا إلى ٤٠ دورة/ الدقيقة وقد تزاد إلى ١٢٠ دورة/ الدقيقة. ويجب أن تحتوى الدوارق المخروطية ٢٠– ٣٠٪ من سعتها. ويفضل تخفيض كمية البيئة الغذائية فيها إذا كانت كمية الخلايا أو التجمعات الخلوية المزروعة فيها قليلة.

٤ - البيئة الغذائية والبيئة المحيطة

تستخدم بيئة (MS) قبل أو بعد تطويرها لإنتاج الكالس على أن تحتوى على سكروز أو جلوكوز بنسبة ٢– ٤٪ وقد يضاف إلى البيئة الكازين Casein hydrolysate ومستخلص الشعير النابت Malt extract والخميرة وماء جوز الهند. وتختلف الأكسينات والسيتوكينينات المضافة للبيئة من حيث نوعها وتركيزها والنسبة بينهما باختلاف نوع النبات والنمط الوراثى ومحتوى الجزء النباتى من الهرمونات. ونسبة الأكسين و/ أو السيتوكاينين لها أهمية فى إنتاج الكالس. فقد تحتاج بعض النباتات إلى أكسين فقط مثل النباتات أحادية الفلقة وقد تحتاج البعض الآخر إلى سيتوكاينين فقط، وقد يستلزم وجود الأكسين + السيتوكاينين (Steward, et al., 1964).

ويستلزم لتكوين كالس بعض الأنواع النباتية توفير الضوء أو الظلام بما يتناسب ونوع النبات على أن تحضن عند ٢٢– ٢٨°م.

٥ – الزراعة الثانوية

الكالس هو عبارة عن نسيج سريع النمو. وقد يفقد الكالس قدرته الذاتية على الانقسام والنمو أثناء الزراعة الثانوية إذا اتجه إلى تكوين نبتات أو أجنة. ويجب ألا يضعف الكالس أو يفقد كفاءته فى التكاثر بتكرار الزراعة الثانوية لذلك تزال النموات الخضرية التى تتكون عليه مبكرا قبل أن يصل إلى الحجم المناسب للزراعة الثانوية.

٦ – ظهور طفرات وتغييرات وراثية ذاتيا

تتميز خلايا الكالس بسرعة انقسامها وسرعة تأثرها للتغييرات التى تحدث فى مكونات البيئة الغذائية والظروف البيئية المحيطة. وينتج عن ذلك عدم انتظام انقسام خلايا الكالس وحدوث اضطرابات فى توزيع الكروموسومات والجينات أثناء انقسام الخلايا. ويؤثر ذلك بوضوح على شكل ولون الكالس وتكوين الأجنة منه. لذلك تستبعد خلايا الكالس التى حدثت بها تغييرات وراثية شاذة. وقد يهتم بها مستحدثو الطفرات. وجدول (١) يبين بعض التغييرات فى عدد الكروموسومات بخلايا كالس نباتات الذرة الأحادية Haploid النامية فى بيئة مضافا إليها أكسين وسيتوكاينين (Kochhar, et al., 1971).

جدول (١) تباين عدد الكروموسومات فى كالس ونباتات الذرة *

Ploidy level	Callus No. of cells	%	Plants* No. of cells	%
Hypohaploid (> 10)	34.0	7.9	25.0	3.9
Haploid (= 10)	383.0	89.7	564.0	87.4
Hypodiploid (> 20)	2.0	0.2	10.0	1.6
Diploid (= 20)	8.0	1.9	46.0	7.1
Total	427.0	99.7	645.0	100.0

* عدد النباتات المختبرة ٣٥ نبات

ظاهرة التزجج Vertification

هى ظاهرة فسيولوجية تصيب الكالس حيث يتحول مظهره إلى ما يشبه الزجاج. ويطلق على هذه الظاهرة أسماء عدة مثل Glassiness; Glauciness; Translucency;

Waterlogging; Hyperhydration Hyperhydric transformation. ويحـدث التزجـج أضـرارا كثيرة للكالس مثل عدم اسـتكمال نموه وميلـه إلى تكوين نبتات مبكرة عليها جـذور. وقد تحقق ذلك فى كالـس أنواع وأصناف عديدة تابعـة للأجناس *Prunus* *Malus* والقرنفل والخرشـوف. ومن العوامل المساعدة على ظهور التزجج ارتفاع نسبة الرطوبة فى البيئة الغذائية مثل البيئة السائلة. وزيادة نسبة الرطوبة الذاتية فى خلايا الجزء النباتى مثل تلك المفصولة من نباتات غضة حديثة العمر. واستخدام بيئات غنية فـى الأملاح المعدنية مثل بيئـة (MS). وانخفاض أو عدم وجود الآجار. وبعض أنواع الآجار قد تكون سببا فى ظهور التزجج. وانخفاض الضوء، وارتفاع الحرارة، والتعقيم الشـديد. ويمكن منع أو تقليل التزجج باسـتبدال بيئـة (MS) الغنية بالأملاح ببيئة Lepoivre عند زراعة أجزاء مفصولة من نباتات *Prunus Malus;* أو تسـتخدم بيئات ثنائية المظهر (2-Phase media) أو تحسين تبادل الغازات فى الأوعية المنزرعة.

تكشف الأجنة الجسمية من الكالس

تنتج الأجنة الجسـمية بزراعة خلايا أو أجزاء نباتية زراعة معملية ويطلق على هذه الأجنة بأنها أجنة خضرية أو عرضية أو لا جنسـية. بينما الأجنة الجنسـية هى أجنة ناتجـة من التلقيح والإخصاب وتفصل من البذور. وعلى ذلك فإن النباتات الناتجة من أجنة جسـمية نـوع من أنواع التكاثر الخضرى وهى امتـداد لصفات نبات الأم . وعند التكشف تتحول بعض خلايا الكالس إلى أجنة جسمية Somatic embryogenesis ممتلئة بسيتوبلازم كثيف. ثم تتحول إلى براعم جسمية تحتوى خلاياها على فجوات عصيرية صغيرة الحجم. وتنمو البراعم لتكون نبتات. وينشـأ الجنين الجسمى من خلية فردية، ثم تنقسـم هذه الخلية وتكون ما يشبه الجنين الأولى Pro-embryo-like فى صورة عقدة Nodular أو نسيج متكتل يشبه البرعم Bud-like. وقد ينشأ الجنين الجسمى من خلايا داخليـة فى كتلة خلايا الكالسEndogenously أو من خلايا سـطحية Exogenously وتسمى أجنة عرضية. وتتكشف الأجنة بإحدى الطريقتين (Ammirato, 1983):

١- تكشف مباشر Direct differentiation

يتكون الجنين فى هذه الحالة من خلية أو عدة خلايا من الجزء النباتى مباشرة بدون الدخول فى مرحلة تكوين الكالس. وتسمى الخلايا التى ينشأ منها الجنين باسم Pro-embryonic determined cells (PEDCs). وفصل جزء من هذا الجنين وزراعته يؤدى إلى تحديث كامل له. ومن أمثلة ذلك زراعة أجزاء مفصولة من نسيج النيوسيلة Nucellus tissue الموجود فى بعض أنواع الموالح والمانجو التى تتميز بظاهرة تعدد الأجنة Polyembryony وخلايا الإبيدرم Epidermal cells للسويقة الجنينية لنباتات الجزر البرى *Ranunculus scelratus* و*Linum usitatissimum* و*Brassica napus*.

٢- تكشف غير مباشر Indirect differentiation

يعنى ذلك إنتاج الأجنة من الكالس. وفى هذه الحالة يزرع الجزء النباتى فى بيئة سائلة لتكوين معلق خلايا. وتلقى هذه الطريقة اهتماما كبيرا فى المجال التجارى لكثرة عدد الأجنة الجسمية الناتجة . ويزرع أعداد كبيرة من الخلايا الجسمية فى أحجام صغيرة من البيئة السائلة. ويمكن إنتاج حوالى ١٠° أجنة جسمية من كل جرام واحد من النسيج. ويستلزم التخلص من الخلايا والأجنة المتكشفة مبكرا بهدف تشجيع الكالس على الاستمرار فى النمو والانقسام لإكثار كميته. وقد أمكن بهذه الطريقة إنتاج أجنة جسمية من نسيج اللحاء الثانوى Sccondary phloem للجزر وأجزاء مفصولة من ورقة نبات البن العربى *Coffea arabica* والبيتونيا *Petunia hyb-rida* والأسبرجس *Asparagus officinalis*.

البيئة الغذائية المناسبة لإنتاج أجنة جسمية

١- من الواضح الآن أن الكالس قادر على تكوين أجنة جسمية تتكشف إلى سوق وجذور عرضية. ويرتبط تطور الجنين الجسمى بوجود الأكسين والسيتوكينين

فى البيئة الغذائية، حيث تتكون نموات خضرية من نسيج الكالس إذا توفر تركيز منخفض من الأكسين وتركيز مرتفع من السيتوكاينين. ويعتبر مركب (BA) هو أكثر السيتوكاينينات المنشطة لتكوين أفرع عرضية. كذلك التركيز المرتفع من العناصر الغذائية فى البيئة يساعد على إنتاج أفرع عرضية. وقد تتكون الجذور العرضية فى بعض الحالات عند قاعدة الأفرع العرضية. وتتكون منشئات الجذور Root primordial عادة فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيا من الأكسين وتركيز منخفض من السيتوكاينين. بينما تحتاج لنموها إلى تركيز أكثر ارتفاعا من الأكسين. وقد تنمو الجذور والسوق من الكالس فى وقت واحد دون الارتباط ببعضهما.

٢- إمداد البيئة الغذائية بالأكسين له أهمية لمعظم النباتات للبدء فى تكوين الأجنة. وغالبا التركيز المرتفع من الأكسين يكون مطلوبا لتكوين الأجنة، والتركيز المنخفض من الأكسين لازما لتنشيط نمو الأجنة بعد تكوينها، وغياب الأكسين يؤدى إلى إنضاج مبكر للجنين. وقد لا يستلزم إضافة الأكسين إلى بيئة بعض الأنواع النباتية. وللأكسين 2,4- D أهمية كبيرة فى تكوين أجنة النباتات العشبية مثل النجيليات. بينما ليس للسيتوكاينينات دور هام فى هذا الشأن. ويمنع الجبريلين والإيثلين تكوين الأجنة.

٣- يساعد ارتفاع تركيز الأمونيوم على نمو السوق والجذور، وإمداد البيئة الغذائية بالنيتروجين المختزل فى صورة أيونات أمونيوم له أهمية للزراعات المعملية. فالنيتروجين المختزل (مثل أملاح الأمونيا) أو لبن جوز الهند أو الكازين Casein hydrolysate أو الأحماض الأمينية مثل L- Glutamine وL- Alanine قد يكون لها أهمية فى تنشيط وتكوين الأجنة. وأوضح Pierik and Steegmans, 1976 أن تخفيض تركيز الأمونيوم فى حالة نبات *Anthurium andrcanum* ينشط تكوين الأفرع العرضية على نسيج الكالس.

٤- البوتاسيوم ينشط تكوين الأجنة، والتركيز المرتفع من الكالسيوم يثبط تكوين الأجنة.

٥- ينشط الضوء عموما تكوين الأجنة، بالرغم من أنه يمكن تكوين الأجنة لبعض الأنواع النباتية فى ظروف شدة ضوء منخفضة أو فى ظلام. والحرارة المرتفعة عادة

مرغوبة لتكوين الأجنة. وتحتاج زراعة المتوك لبعض النباتات إلى صدمة باردة Cold shock لتنشيط تكوين الأجنة ونموها.

٦- التركيز الأمثل للسكروز هو ٢- ٣٪ تقريبا.

٧- حمض الأبسيسـيك Abscisic acid يتكون طبيعيا فى النبات وله تأثير مثبط للنمو، إلا إن له بعض التأثيرات الواضحة على نمو الأجنة فى المزارع المعلقة. فمثلا بعد زراعة الخلايا فى بيئة سائلة لوحظ وجود اختلافات فى نمو وتطور التجمعات الخلوية الناتجة ما بين تجمعات صغيرة وكبيرة من الخلايا المرستيمية وخلايا مهيأة لتكوين أجنة مبكرة بجانب خلايا عادية. ويعنى ذلك عدم تجانس الخلايا فى معلق الخلايا. وإضافة حمض الأبسيسك كان له تأثير واضح على خفض هذه الاختلافات فى نمو الخلايا وجعل الأجنة تتطور طبيعيا.

□□□