الفصل الثالث

مزارع الخلايا

عزل الخلايا المفردة وزراعتها

يُعد عزل خلايا مفردة (شكل ٣-١) أولى الخطوات فى عمل مزارع الخلايا Cell Cultures. وتجرى هذه الخطوة إما بالوسائل الميكانيكية، وإما إنزيميًّا من الأعضاء النباتية الكاملة، وإما تؤخذ الخلايا من نسيج كالس callus tissue نامٍ من أسطح معقمة لأجزاء نباتية مزروعة. ويلى ذلك .. زراعة الخلايا من المعلق.

وتعد طريقة برجمان Bergmann (شكل ٣-٢) أكثر الطرق شيوعًا لزراعة الخلايا المفردة، ويراعى فيها أن يكون تركيز الخلايا المفردة فى البيئة السائلة ضعف التركيز النهائى المطلوب عند الزراعة.

كما يوضح شكل (٣-٣) تقنية النسيج المغذى nurse-tissue technique لتنمية مستعمرات من الخلايا المفردة، ويوضح شكل (٣-٤) خطوات تقنية غرف النمو الدقيقة microchamber technique لزراعة الخلايا المفردة.

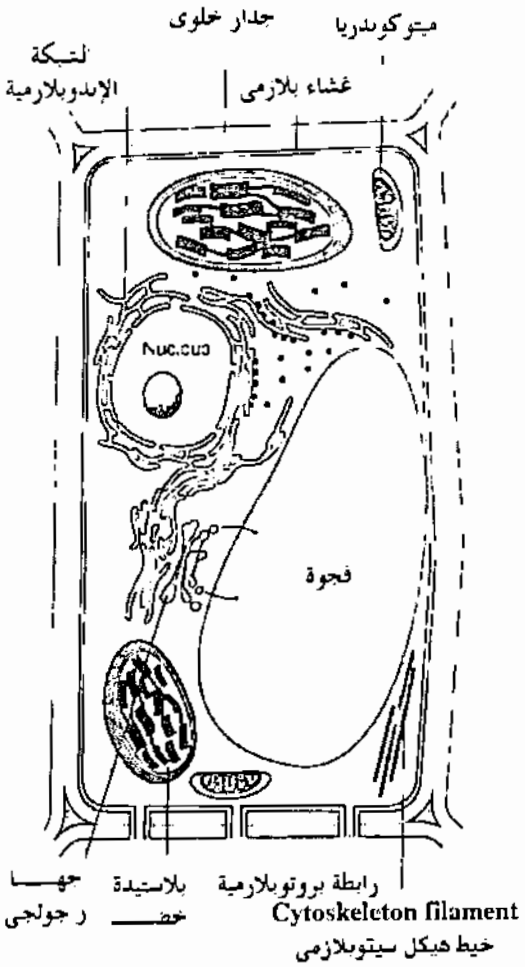
ويبين شكل (٣-٥) إنتاج نبات تبغ من خلية مفردة

بيئات مزارع الخلايا

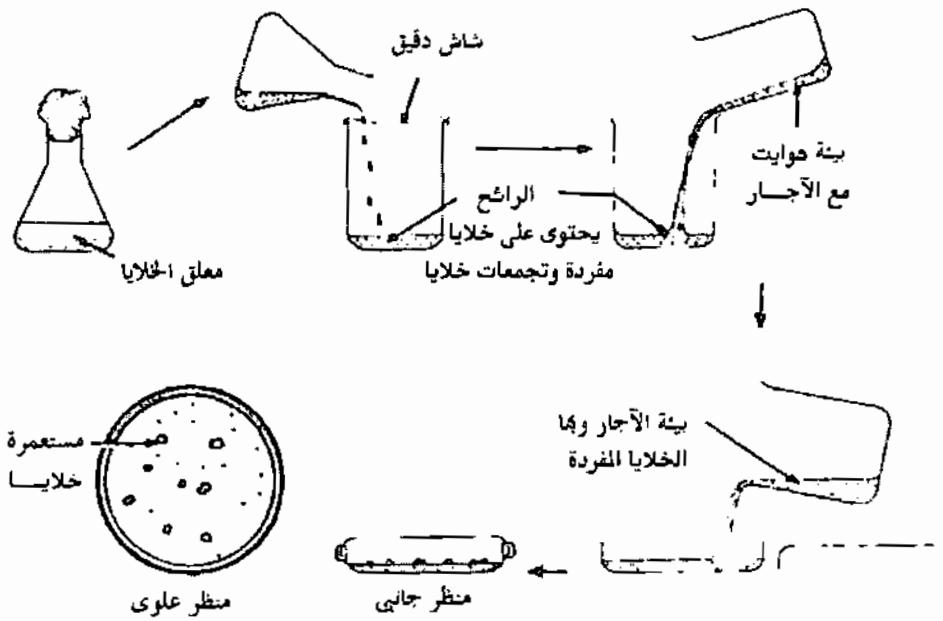
تتوقف طبيعة النمو فى مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات فى بيئة النمو، حيث قد يكون النمو متميزًا Differentiated، أو غير متميز Undifferentiated. ويُعنى بالنمو المتميز تكوينه لنموات خضرية، أو جذور، أو كليهما، بينما يُعنى بالنمو غير المتميز تكوينه لكتلة من الخلايا تسمى كالس Callus.

ينتج الكالس — عادة — من أى نسيج نباتى متميز (مثل الأوراق، والسيقان والجذور)؛ بوضع الجزء النباتى الذى تؤخذ منه الخلايا (explant) فى بيئة تحتوى على تركيز مرتفع نسبيًّا من الأوكسين، وتركيز منخفض نسبيًّا من السيتوكينين، حيث

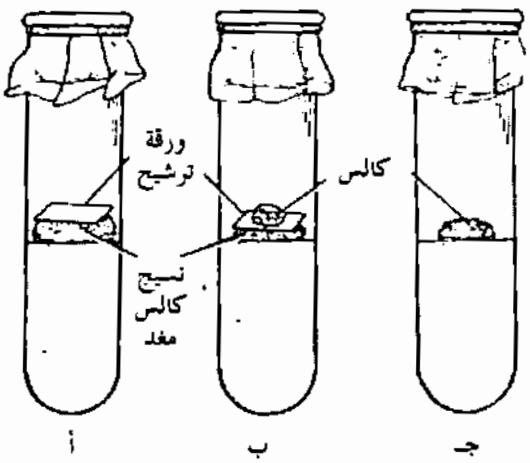
يتكون الكالس حينئذ، ويمكن أن يستمر فى النمو بعد ذلك، إما على صوره كتل متعددة الخلايا multicellular masses فى البيئات الصلبة، وإما على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا small cell aggregates فى البيئات السائلة الدوارة (أى التى توضع على أجهزة تتحرك بأوعيه امزارع حركة دورانية) ومع استعمال تركيزات مرتفعة من السيتوكينينات وتركيزت منخفضة من الأوكسينات فى بيئة النمو فإنه يمكن – حيانا – تحفيز تكوين نموت متميزة إلى سيقان وأوراق وجذور، أو تكوين أجنه عرضية تنمو بدورها إلى نباتات كاملة بعد ذلك



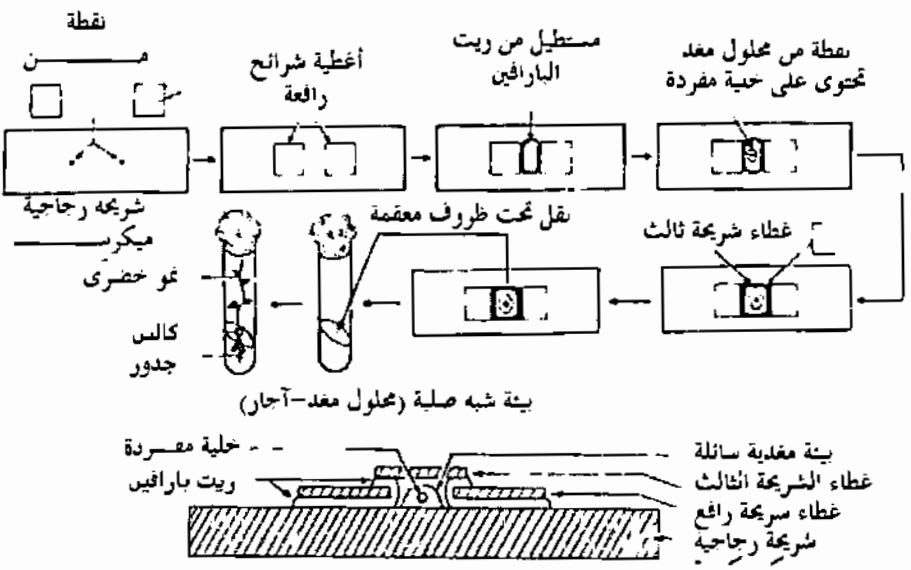
شكل (٣–١): خلية نباتية.

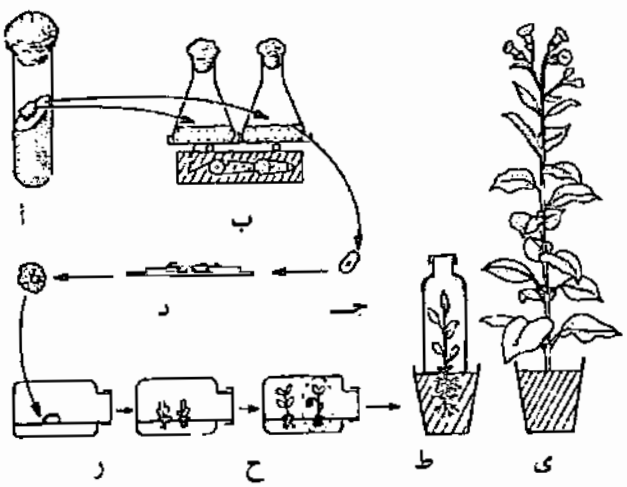


شكل (٣-٢): طريقة Bergmann لزراعة الخلايا المفردة.



شكل (٣-٣): تقنية النسيج المغذى nurse-tissue technique لتنمية مستعمرات من الخلايا المفردة. (أ) وضعت خلية مفردة من كالس على ورقة ترشيح تستند على كتلة من الكالس (النسيج المغذى). (ب) حدث انقسام بالخلية وكونت نسيجًا صغيرًا. (جـ) نمت كتلة من الكالس بعد نقل ناتج الانقسام الأولى للخلية المفردة من على ورقة الترشيح إلى بيئة الزراعة مباشرة.





شكل (٣-٤) خطوات تقنية غرفة النمو الدقيقة microchamher technique لزراعة الخلايا المفردة

شكل (٣-٥): تكوين نبات تبغ من خلية مفردة. (أ) كالس نامٍ من قطعة صغيرة من النبات أخذت من النخاع، (ب) عملية نقل قطعة صغيرة من الكالس إلى بيئة سائلة فى دوارق زجاجية ووضعها على هزاز، (جـ) تفكك الكالس إلى خلايا مفردة، (د) نقل الخلية المفردة جـ من الدورق ووضعها فى نقطة من بيئة الزراعة فى حيز صغير خاص microchamber، (هـ) نسيج صغير تكون من الخلية المفردة من خلال عدة انقسامات متتالية، (و) عملية نقل النسيج هـ إلى بيئة شبه صلبة حيث ينمو إلى كالس كبير، (ر،حـ) تميز النباتات، (ط، ى) نمو النباتات إلى مرحلة النضج عند نقلها إلى أصص

ونقدم – فيما يلى تركيب بيئتين مناسبتين لزراعة خلايا مفردة من النسيج الوسطى (الميزوفيل) للورقة

البيئة والكميات (مجم/لتر)		المكونات
Joshi and Ball	Rossini	
—	٩٥٠	KNO_3
٧٥٠	—	KCl
—	٧٢٥	NH_4NO_3
٦٠٠	—	$NaNO_3$
٢٥٠	١٨٧	$MgSO_4.7H_2O$
—	١٦٩	$CaCl_2$
١١٢	—	$CaCl_2.6H_2O$
—	٦٩	KH_2PO_4
١٤١	—	$NaH_2PO_4.2H_2O$
٥,٣٥	—	NH_4Cl
—	١٢,٥	$MnSO_4.4H_2O$
٠,٠٣٦	—	$MnCl_2.4H_2O$
٠,٠٥٦	٥	H_3BO_3
—	٥	$ZnSO_4.4H_2O$
٠,١٥	—	$ZnCl_3$
٠,٠٢٥	٠,١٢٥	$NaMoO_4.2H_2O$
—	٠,٠١٢٥	$CuSO_4.5H_2O$
٠,٠٥٤	—	$CuCl_2.2H_2O$
٠,٠٢	—	$CoCl_2$
—	١٣,٩	$FeSO_4.7H_2O$
٠,٥	—	$FeCl_3.6H_2O$
—	١٨,٦	Na.EDTA
٠,٨	—	Disodium salt of ethylene dinitrilotetraacetic acid
—	٢	Glycine
—	٥	Nicotinic acid
—	٠,٥	Pyridoxine HCl
—	٠,٥	Thiamine HCl
—	٠,٠٥	Biotin
—	٠,٥	Folic acid
٤٠٠	—	Casein hydrolysate (acid hydrolysate, acid and vitamin free)
—	١٠٠	m-Inositol
—	٠,١	BAP
٠,١	—	Kinetin
١	١	2,4-D
٢٠٠٠٠	١٠٠٠٠	Sucrose
؟	٥,٠	pH

ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الخلايا والتميز منها . يراجع Helgeson (١٩٨٠)، و Evans وآخرون (١٩٨١)