تأثير الصدمة الكهربائية في تحفيز انقسامات خلايا المزارع الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس والمزروعة في قطرات الاكار المتعددة

جميلة هزاع رشيد وجدان سالم قاسم*

قسم علوم الحياة – كلية التربية

جامعة الموصل – العراق

تاريخ الاستلام 2005/11/16 تاريخ القبول 2006/1/23

ABSTRACT

Sunflower friable callus used in obtaining cell suspension culture in liquid MS medium containing 2.0 mg /L NAA and 1.0 mg/ L BA. The cell started their first division after 24hours and continued their division reaching to 7.33-8.50 x 10^3 cell / ml after 4 days of incubation.

Culturing of cell suspension using Multiple Drop Array (MDA) technique promote the divisions of cells and the formation of cell colonies which developed to form callus primordia.

Electro treatment of cell suspension enhanced division of cells, and the first division, occurs during 3-5 days the total number of cells colonies reach to 380. Callus formed cell suspension from sunflower did not overcome the regeneration problem in this plant.

الخلاصة

اعتمدت هذه الدراسة الكالس الهش في انشاء مزارع المعلقات الخلوية في وسط MS السائل المضاف اليه BA 2.0 ملغم/لتر وNAA 1.0 ملغم/لتر. وباشرت خلايا هذه المعلقات انقسامها الاول بعد 24 ساعة ، واستمرت في انقساماتها لتصل كثافتها ^{3}10x7.33 -^{3}10x8.50 بعد اربعة ايام من تحضينها.

لقد شجعت زراعة حلايا المعلقات الخلوية في تقانة قطرات الاكار المتعددة انقسام هذه الخلايا وتكوين المستعمرات الخلوية التي تطورت لتكوين بدايات الكالس. وادى تعريض المعلقات الخلوية للمعاملة الكهربائية الى تشجيع انقساماتها وزيادة اعداد المستعمرات الخلوية المتكونة الى 380 مستعمرة. ان الكالس المتكون من المعلقات الخلوية لنباتات زهرة الشمس لم تتمكن من التغلب على مشكلة التمايز في هذا النظام النباتي.

المقدمة

ان المزارع الخلوية المشتقة من الكالس تستخدم عموما بوصفها مصدراً لعزل البروتوبلاست في عدد من النباتات (1). وتستحدث مزارع المعلقات الخلوية بنقل قطعة من الكالس الى وسط غذائي سائل مناسب يمكن تحريكه باستعمال وسائل مختلفة (2). وعموماً يفضل الكالس الهش (Friable) غير المتماسك القوام في انشاء المزارع الخلوية (3).

ويعد نظام المعلقات الخلوية من الانظمة المهمة في هذا المضمار ولا سيما تقانة زراعة الخلايا المفردة (Single cell culture) اذ تسمح هذه التقانة بالتعرف الى تأثيرات المادة المختبرة في الخلية المفردة مقارنة بتلك النامية على الاوساط القياسية. فقد اعتمدت احدى الدراسات الحديثة تقانة طمر خلايا المعلقات الخلوية المشتقة من كالس الخس في قطرات الاكار لاختبار تاثير عدد من مشتقات مركبات الترايازولات في سلوك الخلايا وانقسامها (4).

نالت نباتات العائلة النجمية نصيبها من الاهتمام في مجال الزراعة النسيجية (5) وكذلك من خلال عدد من الدراسات التي اجريت في مجال عزل البروتوبلاست من الاجزاء النباتية المختلفة ودمجه باستخدام تقانات الدمج الكهربائي والكيميائي بين الانواع او الاجناس المختلفة في هذه العائلة ، فضلا عن استحداث المعلقات الخلوية من كالس عدد من هذه النباتات ، ولقد امكن استحداث الكالس من البروتوبلاست المعزول من اوراق نبات *Cichorium intybus* فضلاً عن تمايز الكالس المشتق من البرتوبلاست (6) .

فقد لاحظ Al-Mallah (7) ان تعريض كالس التبغ لمعاملات كهربائية مختلفة شجع على تمايزه مقارنة بالكالس غير المعامل. واشارت دراسة اخرى الى ان تعريض بروتوبلاست اوراق نبات*Lupinus mutabilis* للفولتيات 250, 500, 750, 1000 وللمدد الزمنية 20 ، 40 ملي ثانية ادى الى تشجيع انقسامه وتكوين الكالس (8).

ان الهدف الرئيس لهذه الدراسة يكمن في معرفة تأثير التحفيز الكهربائي المتبع في زراعة الانسجة لبعض الانواع النباتية على انقسامات خلايا المزارع الخلوية المشتقة من كالس زهرة الشمس.

مواد وطرائق العمل

المادة النباتية

عقمت بذور الصنف المحلي من زهرة الشمس Sunflower (*Helianthus annuus* L.) في المحلول القاصر التجاري Naocl. وقد اختبرت محاليل مختلفة منه بنسبة (1:1) و (4:2) ولمدد زمنية 15، 20 دقيقة / معاملة. زرعت البذور

المعقمة سطحيا بوضعها على سطح 50 سم^3 من وسط MS الصلب الخالي من منظمات النمو في دورق زجاجي حجم 250 سم^3 بمعدل 3 بذور /قنينة. حفظت العينات في غرفة الزرع في ظروف ظلام تام ودرجة حرارة 25 ± 2°م للايام الثلاثة الاولى بعدها نقلت العينات بعد ذلك الى النظام التعاقبي 16 ساعة ضوء/ 8 ساعات ظلام. استخدمت البادرات المعقمة السليمة بعمر 7 ايام مصدراً للحصول على قطع السيقان تحت الفلقية لاستحداث الكالس.

انشاء مزارع المعلقات الخلوية من كالس السيقان تحت الفلقية

استخدم وسط MS الصلب المدعم بمستويات متعددة (0.0 ، 0.5 ، 1.0 ملغم/لتر) من Naphthalene acetic acid NAA والمتداخلة مع مستويات مختلفة (0.0 ، 0.5 ، 1.0 ، 2.0 ملغم/لتر) من Benzyle adenine BA (9) لاستحداث الكالس اللازم لانشاء المعلقات الخلوية. اخذ 1 غم من الكالس الهش بعمر 21 يوما ووضع في دوارق زجاجية حجم 100سم^3 تحتوي كل منها على 25 سم^3 من وسط MS السائل المضاف اليه 1.0 ملغم/لتر NAA و2.0 ملغم/لتر BA. حفظت العينات في الحاضنة الهزازة shaking incubator (New Brunswick USA) في ظروف ظلام تام ودرجة حرارة 25±2°م وسرعة دوران 150 دورة/دقيقة (10). رفعت الدوارق من الحاضنة بعد 24 ساعة ورشحت من خلال منخل بلاستيكي معقم ذي فتحات بقطر 46 µm (Plant Genetic Manipulation Group.Nott.Univ.UK) لازالة الكتل الخلوية غير المفككة والسماح بمرور الخلايا المفككة. اعيدت المزارع الى الحاضنة الهزازة بالظروف السابقة نفسها (11).

ادامة مزارع المعلقات الخلوية

اديمت مزارع المعلقات الخلوية برفع الدوارق الزجاجية من الحاضنة ووضعها على نحو مائل مستندة الى جانب كابينة الزرع مدة 3 ساعات لاستقرار الخلايا وركودها اعقبها التخلص من الوسط السائل عن طريق سكبه بعناية دون فقد للخلايا المستقرة. واضيف الى الخلايا المترسبة 50 سم^3 من وسط MS السائل المضاف اليه NAA بتركيز 1.0 ملغم/ لتر و BA بتركيز 2.0 ملغم/لتر سدت فوهات الدوارق الزجاجية واعيدت الى الحاضنة الهزازة بالظروف السابقة نفسها (12).

تحديد حجوم وكثافة وحيوية خلايا المعلقات الخلوية

اخذ 0.1 مل من مزرعة المعلق الخلوي بعد مضي 24، 48، 72، 96 ساعة من التحضين باستخدام ماصة دقيقة micropipte بحجم 100 مايكروليتر ووضع على شريحة الهيموسايتوميتر (Labsco,W.Germany) وحسبت اعداد الخلايا مع تقدم عمر المزرعة.

(13) و قيست احجام خلايا مزارع المعلقات الخلوية بأخذ 0.1 سم^3 من المزرعة ووضعها على شريحة زجاجية وفحصها بالمجهر الضوئي المجهز بعدسة عينية تحتوي على تدريجات قياسية Ocular micrometer (8) وقدرت حيوية خلايا المعلقات الخلوية باتباع الطريقة القياسية (13) بمزج 0.1 سم^3 مع محلول صبغة الايفان الزرقاء (BDH Evan blue chemical Ltd. Poole, England). فحصت العينات بوساطة المجهر الضوئي اذ تظهر الخلايا الميتة بلون ازرق في حين تبقى الخلايا الحية من دون صبغة (15).

تعريض المزارع الخلوية للمعاملات الكهربائية

عرضت ست عينات حجم 1 سم^3 / عينة من مزرعة المعلق الخلوي بكثافة 7.33- 8.50 × 10^3 لمجموعة متباينة من المعاملات الكهربائية باستخدام جهاز التثقيب الكهربائي (16). انتخبت الفولتيات 1000، 1500 فولت وبمدد زمنية قدرها (0، 20، 50، 100) ملي ثانية/ معاملة. وضعت العينة المراد تعريضها في خلية الجهاز بعد ضبط الفولتية المطلوبة والمدة الزمنية المحددة تسلط الصعقة. اخذت العينات المعاملة وحفظت في انبوبة اختبار معقمة وعند الانتهاء من تعريض العينات جميعها يتم الاعداد لزراعتها.

زراعة المعلقات الخلوية بتقانة قطرات الاكار المتعددة

اخذ 1 سم^3 من مزرعة المعلق الخلوي المعاملة وغير المعاملة كهربائياً بكثافة اليوم الرابع 7.33- 8.50 × 10 ^{3} خلية / سم^3 واضيف اليها 1 مل من محلول 3% الاكار السائل المعقم مسبقاً والموجود في حمام مائي بدرجة 40°م. مزج الخليط جيدا وبسرعة لتجنب تصلبه ، زرع المزيج بشكل قطرات متماثلة الحجم بمعدل 8- 12 قطرة/طبق بتري بلاستيكي قطر 9 سم (Sterilin, UK). تركت الاطباق مفتوحة داخل كابينة الزرع لاتمام تصلب القطرات اعقبته اضافة 6 مل من وسط MS السائل المضاف اليه 1.0 ملغم/ لتر NAA و2.0 ملغم/ لتر BA لكل طبق مع مراعاة عدم غمر القطرات بالوسط المضاف (16) غلقت الاطباق وسدت بالبارافيلم وحفظت العينات في ظروف درجة الحرارة 25 ±2°م في نظام الاضاءة المتعاقب وجرت ادامة هذه المزارع مرة كل اربعة ايام بازالة الوسط القديم والتعويض عنه باضافة 6 مل من الوسط الجديد.

النتائج

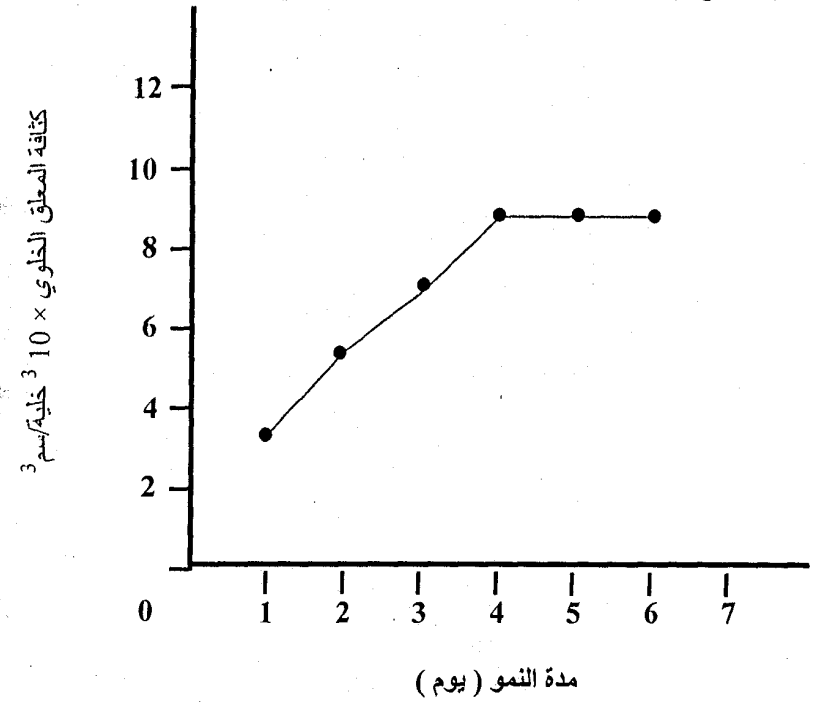
تكوين مزارع الكالس من السيقان تحت الفلقية

اظهر الوسط (MS+ 1.0 ملغم/ لتر NAA +2.0 ملغم/ لتر BA) الصلب ملاءمته وسطاً لاستحداث مزارع الكالس وتكوينها من قطع السيقان تحت الفلقية اشارت النتائج سهولة

استجابة قطع السيقان تحت الفلقية في الوسط الزرعي وتحولها بأكملها الى كالس ذي قوام هش ومناسب لانشاء المزارع الخلوية.

استحداث مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية

اظهرت النتائج ان الكالس الهش المستحدث من السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس على وسط الاستحداث MS المدعم بـ NAA 1.0ملغم/لتر و BA 2.0 ملغم/لتر كان مشجعاً لانشاء هذه المزارع في وسط MS السائل التي امتازت بكثرة الخلايا المفردة فيها مما شجع على الحصول على كثافات عالية من الخلايا (الشكل 1) ، فضلا عن ذلك اظهر وسط انشاء هذه المزارع تحفيزه لخلاياها بدلالة مباشرتها مبكراً بانقسامها. واظهرت البيانات تزايد اعداد الخلايا مع تقدم المزرعة في عمرها واشارت الفحوصات المجهرية الدورية الى ان كثافة المزرعة في اليوم الاول بلغت 3.05×10^3 خلية/سم^3 وازدادت الى 8.50×10^3 خلية/سم^3 عند اليوم الرابع (الشكل 1) واستخدمت هذه الكثافة في التجارب اللاحقة.



الشكل 1 . منحنى نمو المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس في وسط MS السائل المضاف اليه 1.0 ملغم/لتر NAA و 2.0 ملغم/لتر BA.

حساب احجام خلايا المزرعة وحيويتها

اظهرت نتائج قياس احجام الخلايا في عدد من عينات المعلقات الخلوية المختلفة المنتخبة عشوائياً ان احجام الخلايا تراوحت بين µm44.5-µm46.4 (الجدول 1) واظهرت

نتائج تقدير حيوية خلايا المعلقات الخلوية وفي مجموعة من العينات المفحوصة بعمر اليوم الرابع ان حيويتها تراوحت بين 90-97% (الجدول 1).

الجدول 1. احجام خلايا مزارع المعلقات الخلوية وحيويتها المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس.

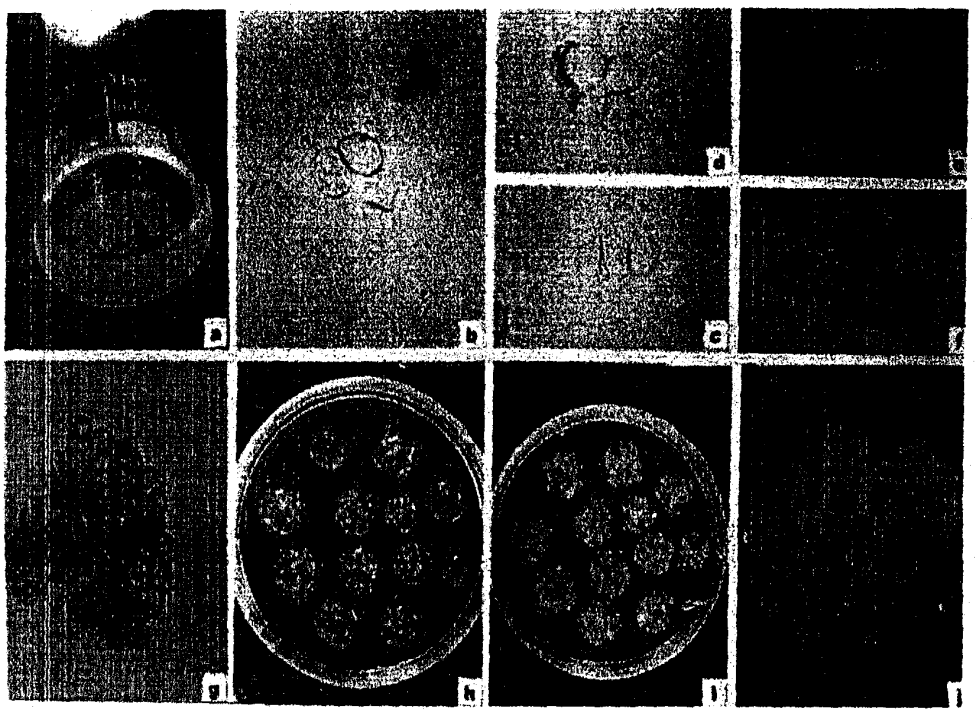
العينات	معدل حجم الخلايا (µm)	الحيوية %
العينة الاولى	*45.6	*90.0
العينة الثانية	44.5	92.2
العينة الثالثة	46.4	94.0
العينة الرابعة	44.4	97.0

*تمثل القيم الواردة في الجدول معدل 3 مكررات /عينة

واظهر الفحص المجهري تواجد اعداد من الخلايا في المراحل ثنائية وثلاثية ورباعية الخلية انتهاءً بتكوينها المستعمرات الخلوية التي تمثل تجمعات خلوية ناتجة من الانقسامات المتتالية للخلايا اعقبها عدم حصول اية زيادة في كثافة الخلايا في اليومين الخامس والسادس.

زراعة المعلقات الخلوية في قطرات الاكار المتعددة

اظهرت النتائج ملاءمة الكالس الهش المستحدث من السيقان تحت الفلقية (الشكل a.2) لانشاء المزارع الخلوية واظهرت زراعة كثافات اليوم الرابع التي تراوحت بين 7.33×10^3 خلية/سم^3 - 8.50×10^3 خلية/سم^3 استجابتها لهذه التقانة بدلالة مباشرة خلاياها بالانقسام الاول بعد 5 ايام من الزراعة (الشكل b.2) وتكون الخلايا البنوية المتساوية في الحجم وحصول الانقسام الثاني بعد مرور 24 ساعة على حدوث الانقسام الاول وتكوينها المرحلة ثلاثية الخلية (الشكلc.2) وتطورت بعد ذلك المرحلة رباعية الخلية (الشكل d.2). وقد استغرقت هذه المرحلة يومين واوضحت النتائج حيوية خلايا هذه المزرعة (الشكل e.2). وتوالت الانقسامات الاخرى مبتدئة بنشوء المستعمرات الخلوية (الشكل f.2) في اليوم العاشر من الزراعة وزيادتها في الحجم مع استمرار الانقسامات (الشكل g.2) لتتطور بعد 5 ايام من تكوين المستعمرات الخلوية اولى بادئات الكالس التي تمثل قطعا صغيرة من الكالس مطمورة في قطرة الاكار الصلب (الشكلh.2). وبلغت نسبة استحداث هذا الكالس 41.6% وازدادت احجام هذه القطع من الكالس الى قطع كبيرة بعد مرور 60 يوما من الزراعة (الشكل i.2) وتميز الكالس المطمور في القطرات بقوامه الهش وبلونه الاخضر الفاتح.



الشكل (2): زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة.

(a): انشاء مزرعة المعلق الخلوي المشتق من الكالس الهش بعمر 21 يوماً في وسط MS السائل المضاف اليه 1.0 ملغم/لتر NAA و 2.0 ملغم/لتر BA. (b): الانقسام الاول لخلايا مزارع المعلقات الخلوية المزروعة في قطرات الاكار وتكوين خليتين بنويتين بعد مرور 5 ايام على الزراعة. (c): مواصلة الانقسام الخلوي للخلية في (b) وتكوينها مرحلة ثلاثية الخلية بعد مرور 7 ايام على الزراعة. (d): تطور الخلية في (c) وتكوينها مرحلة رباعية الخلية بعمر 9 ايام من الزراعة. (e): عينة من خلايا المعلق الخلوي مصبوغة بصبغة الايفان الزرقاء (لاحظ تلون الخلايا باللون الازرق دلالة على موت هذه الخلايا). (f): بدء تكوين المستعمرات الخلوية الناتجة من المرحلة (e) من استمرار الانقسامات الخلوية بعد مرور 10 ايام على الزراعة. (g): تطور المستعمرات الخلوية. (h): تكوين بدايات الكالس في قطرات الاكار بعد 30 يوما من الزراعة. (i): زيادة حجم بدايات الكالس المتكونة في (h) مسببة تشقق قطرات الاكار وانفصالها عنه بعد مرور 60 يوما من الزراعة. (j): قطع الكالس بعد نقلها من قطرات الاكار الى وسط الادامة بعمر 75 يوما. ملاحظة: (قوة التكبير x40).

تأثير المعاملة الكهربائية في انقسامات خلايا المعلقات الخلوية المزروعة بطريقة الطمر في قطرات الاكار المتعددة

عموماً اظهرت نتائج هذه المعاملة انقسام خلايا المعلقات الخلوية في جميع المعاملات المستخدمة اذ باشرت خلايا المزرعة الخلوية التي عرضت للمعاملة 1000 فولت / 20 ملي ثانية انقسامها الأول بعد اليوم الخامس من الزراعة ودخلت هذه الخلايا الإنقسامين الثاني والثالث بعد يومين من الانقسام الاول وتوالت انقساماتها الاخرى حتى تكوين المستعمرات الخلوية بعد اليوم الحادي عشر من الزراعة وظهرت بدايات الكالس في اليوم السابع عشر من الزراعة قياسا على ظهورها في عينة المقارنة في اليوم الرابع عشر من الزراعة. وشجعت هذه المعاملة اعداد المستعمرات المتكونة (الجدول 3) وبادئات الكالس الناتجة عنها (الشكل a.3) واتصفت هذه القطع بلونها الاصفر (الشكل b.3).

وقد بدأت الخلايا المعرضة للفولتية 1000 فولت ولفترتي تعريض 50 و100 ملي ثانية انقسامها الأول بعد اليوم الثالث من زراعتها مقارنة بانقسام خلايا عينة المقارنة التي بدأت انقسامها الاول في اليوم الخامس من الزراعة. ودخلت الخلايا المنقسمة انقساميها الثاني والثالث بعد ثماني واربعين ساعة من حصول الانقسام الاول وتوالت هذه الانقسامات لتكوين المستعمرات الخلوية في اليوم العاشر من زراعتها لتتطور عنها بدايات الكالس بعد خمسة عشر يوماً من الزراعة.

وقد اظهرت النتائج زيادة العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة (الجدول 3) لكنها اقترنت بانخفاض عدد بدايات الكالس واتصفت بدايات الكالس بلونها الاصفر (الشكل c.3) وسجلت انخفاضاً في نسبة استحداث الكالس الى 38.3% قياساً على نسبة استحداثه في عينة المقارنة (الجدول 3).

بينما بدأت الخلايا المعرضة للمعاملات 1500 فولت / 20 ملي ثانية و 1500 فولت /50 ملي ثانية انقسامها الاول بعد اليوم الثالث من زراعتها قياسا على انقسام خلايا عينة المقارنة التي حدث انقسامها الاول في اليوم الخامس من الزراعة. ودخلت الخلايا المنقسمة انقساميها الثاني والثالث بعد ثماني واربعين ساعة من حصول الانقسام الاول وتوالت هذه الانقسامات لتكوين المستعمرات الخلوية في اليوم العاشر من زراعتها لتتطور عنها بدايات الكالس بعد خمسة عشر يوما من الزراعة. وحفزت المعاملة 1500 فولت / 20 ملي ثانية اعداد المستعمرات المتكونة (الجدول 3) ترتبت عليها زيادة واضحة في اعداد بدايات الكالس المتميزة بصغر حجمها في عينة المقارنة (الشكل a.4) واتصفت بلونها الاصفر (الشكل b.4) لتحقق نسبة 49.6% لاستحداث الكالس (الجدول 3) وقد تفوقت المعاملة 1500 فولت / 50ملي ثانية على بقية المعاملات في تحفيزها لاعداد المستعمرات المتكونة (الجدول 3)

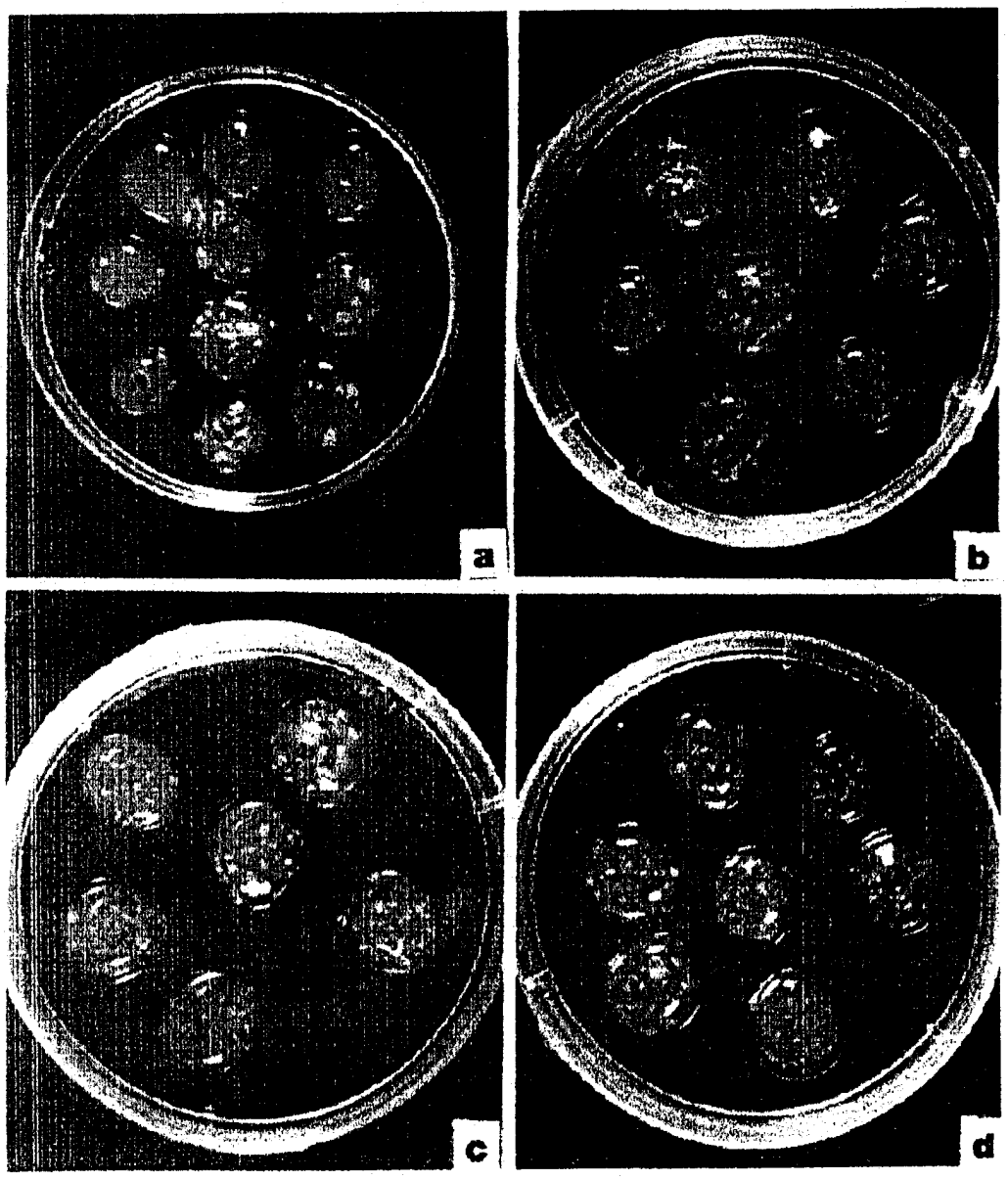
وتطورت عنها بدايات الكالس التي اتصفت بلونها الاصفر (الشكل c.4). اما المزارع الخلوية المعرضة للمعاملة 1500 فولت / 100 ملي ثانية فقد بدأت انقسامها الاول بعد اليوم الرابع من زراعتها ودخلت هذه الخلايا المنقسمة انقساميها الثاني والثالث بعد يومين من حدوث الانقسام الاول وتوالت انقساماتها الاخرى التي نتجت عنها المستعمرات الخلوية في اليوم الحادي عشر من الزراعة (الجدول 3) وظهرت بدايات الكالس في اليوم السابع عشر من الزراعة وتميزت قطع الكالس بلونها الاصفر (الشكل d.4) وعموماً امتازت بدايات الكالس الناتجة في معاملات الصدمة جميعاً ببطء نموها فضلا عن صغر حجمها.

الجدول 3. تاثير المعاملة بالصدمة الكهربائية في انقسامات خلايا مزارع المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس المطمورة في قطرات الاكار المتعددة.

المعاملة (فولت / ملي ثانية)	العدد الكلي ** للقطرات المزروعة	العدد الكلي للمستعمرات الخلوية المتكونة	العدد الكلي لبدايات الكالس المتكونة	العدد الكلي للقطرات المستحدثة للكالس	استحداث (%)
المقارنة *	125	149	45	55	44
20 / 1000	150	130	119	90	60.0
50 / 1000	140	186	106	81	57.8
100 / 1000	130	235	100	50	38.3
20 / 1500	125	260	160	62	49.6
50 / 1500	120	380	253	79	65.8
100 / 1500	145	178	115	59	40.6

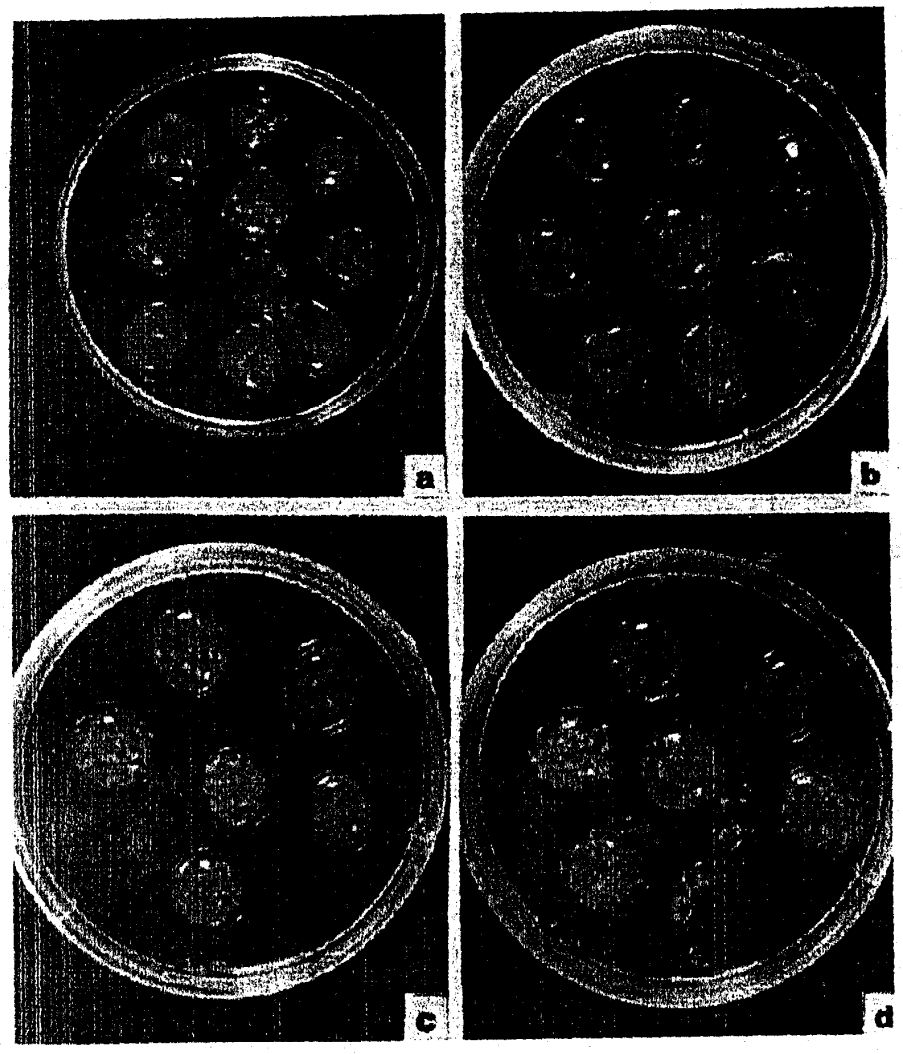
*المقارنة تمثل العينات التي لم تعامل كهربائيا.

** تمثل القيم الواردة في الجدول معدل 3 مكررات/ معاملة.



الشكل (3) : زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس المعرضة للصدمة الكهربائية 1000 فولت وللمدة 20, 50, 100 ملي ثانية في وسط MS الصلب المضاف اليها الوسط MS السائل المدعم باضافة 1.0 ملغم /لتر NAA و2 ملغم/ لتر BA والمزروعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة بعمر 30 يوما.

(a): تكوين بدايات الكالس من المعلقات الخلوية غير المعاملة كهربائيا بعد 30 يوما من الزراعة (المقارنة). (b): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1000 فولت/20 ملي ثانية (لاحظ صغر احجام بدايات الكالس المتكونة). (c): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1000 فولت /50 ملي ثانية. (d): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1000 فولت/100 ملي ثانية.



الشكل (4): زراعة المعلقات الخلوية المشتقة من كالس السيقان تحت الفلقية لنباتات زهرة الشمس المعرضة للصدمة الكهربائية 1500 فولت وللمدة 20, 50, 100 ملي ثانية في وسط MS الصلب المضاف اليها الوسط MS السائل المدعم باضافة 1.0 ملغم/لتر NAA و2.0 ملغم/لتر BA والمزروعة بتقانة قطرات الاكار المتعددة بعمر 30 يوما.

(a): تكوين بدايات الكالس من المعلقات الخلوية غير المعاملة كهربائيا بعد 30 يوما من الزراعة (المقارنة). (b): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1500 فولت/20 ملي ثانية. (c): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1500 فولت/50 ملي ثانية. (d): بدايات الكالس المتكونة من المعلقات الخلوية المعرضة للصدمة الكهربائية 1500 فولت/100 ملي ثانية.

المناقشة

ان نباتات زهرة الشمس التي تناولتها هذه الدراسة امتازت بسهولة استحداثها للكالس من قطع سيقانها تحت الفلقية باستخدام وسط MS معززاً بالاضافات المناسبة من منظمات النمو ، فقد اشارت مجموعة من الدراسات الى السهولة والقابلية الواضحة لاستحداث الكالس من الاجزاء المختلفة لنباتات زهرة الشمس ، اذ تمكن الباحثون من استحداث الكالس من القمم النامية (17) والاوراق الفلقية (18) والسيقان تحت الفلقية (19) والاجنة (20).

لقد اشارت مجموعة من الدراسات الى نجاح الوسط السائل المدعم بتداخلات من BA و NAA في تكوين مزارع الخلايا المعلقة من كالس الاوراق الفلقية لزهرة الشمس (20). وكذلك الوسط MS السائل المدعم بتداخلات من BA و 2,4-D في تكوين مزارع الخلايا المعلقة من كالس السيقان تحت الفلقية لزهرة الشمس (21) واشارت دراسات اخرى الى ان الكالس المشتق من زراعة المعلقات الخلوية والبروتوبلاست المعزول من قطع السيقان تحت الفلقية لزهرة الشمس اظهر صعوبة واضحة في تمايزه وقد يعزى السبب في ذلك الى فعل الوراثة ووجود تاثيرات سايتوبلازمية واخرى نووية (21).

ان التاثيرات المشجعة للصدمة الكهربائية في سلوك خلايا المعلقات الخلوية لنبات زهرة الشمس في هذه الدراسة كانت واضحة في جميع معاملاتها مما انعكس على بدء هذه الخلايا بانقسامها في وقت مبكر وزيادة الانقسامات التي تعاني منها هذه الخلايا (22). فقد اشارت احدى الدراسات الى ان السبب في زيادة الانقسامات الخلوية يعزى الى زيادة تضاعف الحامض النووي DNA (23) وهذا يفسر تأثيرات هذه المعاملة في تشجيع نمو كالس نباتات البلبة وزيادة حجمه (24) و زيادة انقسامات بروتوبلاست نبات *Stylosanthes guianesis* (8) ونبات البازلاء (25).

واشارت احدى الدراسات الى ان تأثير المعاملة الكهربائية يكمن في ازالة الحواجز الطبيعية الفيزيائية متمثلة بالغشاء البلازمي او الجدار الخلوي من خلال تكوين فتحات او ثقوب مؤقتة يضمن دخول البكتريا او المادة الوراثية او غيرها الى داخل الخلية وهذا من المحتمل ان يفسر الزيادة الحاصلة في اعداد العقد الجذرية المثبتة للنتروجين على بادرات الحث بسبب تزايد دخول البكتريا وزيادة اعداد الجذور الشعرية المحولة وراثياً على بادرات البنجر الملقحة بالبكتريا الاكروبكتريوم المعرضة لهذه المعاملة وهذا يفسر الزيادة الحاصلة في تكوين المستعمرات الخلوية الناتجة من انقسامات خلايا المعلقات الخلوية التي سبق تعريضها

للصدمة الكهربائية حيث ان الثقوب الناتجة من التعريض دقيقة من شـأنها تسـهيل دخـول الايونات والمواد الغذائية والاحماض الامينية من الوسط المحيط الى داخل الخلايا (29) فقـد ذكرت مجموعة من الدراسات ان تعريض كالس التبغ للمعاملة الكهربائية شجع تمايزه (30 و 7) كذلك تمايز الكالس الناتج من المعلقات الخلوية للنبات الطبـي *Solanum dulcamara* (31) ونبات الكرز الاحمر (32) ونبات عنيب الذيب *Solanum nigrum* (33).

المصادر

1.Cocking E.C., A method for the isolation of plant protoplast and vacuoles, Nature (London), 187: 927-929(1960).

2.Rashid A., J. Boca. Raton. 38:67-103(1988).

3.Butcher D.N. and ingram D.S., Plant Tissue Culture. London: Edward Arnold Publishers (1976).

4.البياتي ، جميلة هزاع ومحمد ، عبد المطلب. مجلة علوم الرافدين (2004) (مقبول للنشر).

5.Mohammad, A.M.S. and Hassan, H.A. Effect of some standard and prospective growth regulator on sunflower callus. Initiation and Growth. J. Univ. Kuwait (Sci). 15:69-77 (1988).

6.Varotto S. , Lucchin M. and Parrini P., J. Genet. Breed. 51: 11-22(1997).

7.Al-Mallah M.K., Electroporation enhanced plant regeneration from callus of *Nicotiania tabacum*. 2nd Arab Conf. Modern Biotechnol. Amman. Jordan (1993).

8.Mehmet B., Turk. J. Bot. 30: 177-185(2000).

9.احمد ، اميرة اسماعيل. تأثير المستخلصات المائية الجافة لثمار القـرع والطماطـة علـى استحداث ونمو كالس عباد الشمس. رسالة ماجستير ، كلية العلـوم ، جامعـة الموصـل (1990).

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

11.Gresshoff P.M., Bot. Gaz 157-164(1980).

12.Dixon R.A., Plant Cell Culture, A practical Approach. IRL Press, Oxford. Washington DC. (1985).

13.Hinton G.C.F. and Moulood B.K., A modified membrane filtration in marine and water ecosystem. Tropical Ecology. 192-194(1979).

14.Kanai R. and Edwards G.E., Plant Physiol. 52: 84-90(1973).

15.Paul J., Cell and Tissue Culture. London(1970)

16.الملاح ، مزاحم قاسم. ابتكار جهاز التثقيب الكهربائي (الجهاد 1) وتطبيقاته في زراعة الانسجة النباتية. براءة اختراع 3033. جهاز التقييس والسيطرة النوعية. جمهورية العراق.

17.Lupi M. C. , Bennici A. , Locci F. and Gennai D., Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 11: 47-55(1987).

18.Ceriabi M.F. , Hopp H.E. , Hahne G. , Escandon A.S., Plant Cell Physiol. 33:157-164 (1992).

19.Muller A. , Shuster C. , Iser M. , Fürst S. , Jach M. and Hess D., Regeneration from different explants of sunflower *Helianthus* and first transformation experiments. Proceeding of the fourth European Conference on Sunflower Biotechnology. 20: 66-78(1998).

20.Mohammad, A.M.S. and Raoof, I.Y., Raf. J. Sci., 4:54-67 (1981).

21.Gong- She L. and Fuxiong W., J. Plant. Bio. 49: 212-216(2000).

22.Micheal M.O. , Bapat V.A. and Schieder O., Z. flanzenphysiol. Bd., 106: 173-177(1982).

23.Rech E.L. , Ochatt S.J. , Chand P.K. , Davey M.R. , Mulligan B.J. and Power J.B., Bio/ Technol., 6: 1091-1093(1988).

24.ياسين جاسم محمد. رسالة ماجستير ، كلية التربية ، جامعة الموصل (2000).

25.Pouonti-Kaerlas J. , Ottosson A. and Eriksson T., Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 30: 141-148(1992).

26. Joersbo, M. and Brunstedt, J., J. Plant Physiol. 136: 464-467(1990).

27. Al-Mallah, M.K. and Al-Barhawi, N.I., Iraqi J. of Biol., 1: 17-22 (2001).

28.الملاح ، مزاحم قاسم والنعمة ، قتيبة شعيب. مجلة ابحاث التقانة الحيوية . 2:71-81 (2001).

29.Phansiri S. , Miyake H. , Maeda E. , Tanigucl T., J. Crop. Sci. 63: 706-713(1994).

30.Hibi T. , Tano H. , Sugiura M. , Kazami T. and Kimura S., J. Gen. Virol., 67: 2037-2042(1986).

31.Chand P.K. , Ochatt S.J. , Rech E.L. , Power J.B. and Davey M.R., J. Exp. Bot. 39:1267- 1274 (1988).

32.Ochatt S.J., Chand P.K., Rech E.L. , Davey M.R. and Power J.B., Plant Sci. 54: 165-169(1988).

33.Al-Mallah M.K. and Salih M., Raf. J. Sci., 14: 35-42(2003).