زراعه الخلايا المعلقه Cell Suspension Culture

هي عباره عن خلايا مفرده او كتل صغيره من الخلايا منتشره وناميه في وسط غذائي سائل في ظروف معقمه تماما

يتم تنشئه المزارع المعلقه للخلايا بنقل قطع من الكالس غير المتمايز الى وسط غذائي سائل وكذلك يمكن تنشئه المزارع المعلقه باستعمال اجزاء نباتيه متمايزه (مثل اجزاء من السيقان الجنينيه او الفلق او النسيج المتوسط في الاوراق) وعاده لاتوجد مزرعه معلقه تتكون كليا من خلايا مفرده , وبصوره عامه تتكون خلايا المزارع المعلقه من خلايا مفرده , وكتل من الخلايا باحجام مختلفه , القطع المتبقيه من الاجزاء النباتيه التي استعملت لتنشئه المزرعه .

اهميه نظام الزراعه المعلقه

1. توفر نظاما جيدا لدراسه نمو الخلايا النباتيه وتخصصها لان الخلايا المعلقه تتكون من خلايا او كتل خلويه متشابهه لحدما فسلجيا وحيويا مما يسهل دراستها.
2. توفر هذه التقنيه مجالا كبيرا لتتبع انقسام الخلايا المفرده وتوسعها والتي لايمكن تتبعها في تقنيه زراعه الانسجه النباتيه والكالس .
3. توفر نظاما جيدا لانتاج المواد الثانويه secondary metabolits واستخلاصها خارج الجسم الحي .
4. الخلايا الناميه في هذا النوع من المزارع تعاني من تحول في عملياتها البنائيه والايضيه ومعدل نموها وتكون مايسمى بالخطوط الخلويه cell lines .

واهم مميزات الخطوط الخلويه هي :-

1. درجه عاليه من تفكك الخلايا وانفصال تجمعاتها .
2. متجانسه ومتشابهه مظهريا .
3. انويه مميزه وسايتوبلازم كثيف .
4. تجمع حبيبات النشا فيها .
5. مقدرتها على النمو والتكاثر بغياب الهرمونات النباتيه Habituation .
6. زياده المتضاعفات الكروموسوميه polyploidy فيها .

تنشئه مزارع الخلايا المعلقه

تستعمل عاده انسجه مختلفه من اجل استحداث المزارع الخلويه وهي :

1. نسيج الكالس callus tissue

يعد نسيج الكالس من افضل المصادر لاستحداث المزارع الخلويه وذلك للاسباب التاليه :-

أ. كون الكالس ينمو تحت ظروف معقمه فلايحتاج الى تعقيم .
ب. لاتحتاج هذه العمليه الى اضافه مواد خاصه لفصل الخلايا التي ربما تؤثر على حيويه ونشاط الخلايا في مزارع المعلقات الخلويه المستحدثه .

يستعمل عاده الكالس الهش في استحداث المزارع الخلويه في اوساط غذائيه سائله للحصول على خلايا مفرده او تجمعات خلويه صغيره . وتعتمد صلابه الكالس على مكونات الوسط الغذائي خاصه نسبه الاوكسينات الى السايتوكاينات لذلك يعد اختيار الوسط المناسب اساسا للحصول على كالس هش لاستعماله في استحداث المزارع الخلويه ويستعمل عاده من 2-4 غم من الكالس الهش لكل 100سم^3 من الوسط الغذائي . ويتم نقل الكالس الى وسط غذائي سائل مشابهه في مكوناته لذلك المستخدم لاستحداث الكالس في اوعيه خاصه ويتم تحريك الوسط الغذائي مع انسجه الكالس باستمرار باستعمال وسيله مناسبه ويؤدي تحريك الوسط الى :-

1. توفير ضغط معتدل على خلايا انسجه الكالس ممايساعد على تفككها الى كتل خلويه صغيره او خلايا مفرده .
2. توزيع المكونات بصوره منتظمه في الوسط .
3. توفير تبادل غازي مناسب بين الخلايا المغموره في الوسط الغذائي والهواء الموجود داخل اوعيه الزراعه .

2. من خلايا النسيج المتوسط لاوراق النباتات Mesophyll tissue of leaves

توجد طريقتان تستعملان في الحصول على خلايا مفرده او تجمعات خلويه صغيره من النسيج المتوسط للاوراق لاستحداث المزارع الخلويه وهي :-

أ. الطريقه الانزيميه Enzyme method

تستعمل مستحضرات انزيميه خاصه تعمل على اضعاف الجدارن الخلويه وتحطيم الصفيحه الوسطى بين الخلايا النباتيه . يقتصر استعمال هذه الطريقه على انواع نباتيه قليله ولاتستعمل في معظم نباتات ذوات الفلقه الواحده مثل الشعير والحنطه والذره .

ومن سلبيات هذه الطريقه هي احتياج الخلايا المفصوله الى حمايه ازموزيه دقيقه وكذلك فان تعريض الخلايا الى محاليل انزيميه يؤدي الى تضرر قسم من الخلايا ممايؤثر سلبا على نشاط ونمو الخلايا في المزارع الخلويه .

ب. الطريقه الميكانيكيه Mechanical method

تعتمد هذه الطريقه على تحرير الخلايا او التجمعات الخلويه الصغيره دون استعمال المواد الكيمياويه وذلك بازاله انسجه معينه من الاوراق ميكانيكيا بادوات خاصه ويتم فيها عزل خلايا من النسيج المتوسط للورقه وذلك بواسطه عمل شق عبر الورقه لتعريض خلايا النسيج المتوسط Mesophyll ثم تقشط طبقه النسيج المتوسط باستعمال مشرط دقيق حاد وتنقل الى وسط سائل مباشره . واتبعت طرق اخرى في عزل الخلايا ميكانيكيا ومن مميزات الطريقه الميكانيكيه هي :-

1. تجنب تعريض الخلايا النباتيه الى التأثير او التأثيرات الضاره للانزيمات .
2. لاتحتاج الخلايا المفصوله بهذه الطريقه الى حمايه ازموزيه .

طرق زراعه الخلايا المعلقه

هناك طريقتين رئيسيتين لزراعه الخلايا المعلقه وهي :-

1. الزراعه الكميه Batch culture

عباره عن نظام مغلق لتنميه الخلايا المعلقه , حيث تنمى الخلايا في حجم ثابت من الوسط الغذائي السائل المتحرك وذلك لضمان التوزيع المنتظم للخلايا الحره وكتل الخلايا في الوسط ولتحفيز تبادل غازي جيد بين وسط الزراعه والهواء .

يحدث نمو الكتله الحيه Biomass في المزارع الكميه وفق نمو ثابت في البدايه تمر المزارع بفتره تباطؤ في النمو يتبعها فتره نمو اسيه تنقسم فيها الخلايا بسرعه وبعد ثلاثه او اربعه اجيال خلويه يتدهور النمو وتدخل المزارع في النهايه في مرحله التوقف عن الانقسام .

وقد يؤدي ترك المزارع لفتره طويله في مرحله التوقف الى موت اعداد كبيره من الخلايا وتحللها لذلك من الضروري اعاده الزراعه عندما تصل المزارع الى اكبر وزن جاف لها . ويختلف الوقت اللازم لمضاعفه الخلايا في المزارع المعلقه للخلايا بأختلاف نوع النبات حيث عند اعاده زراعه المعلقات الخلويه تستعمل ماصات او حقن ذات فوهات صغيره جدا تسمح للخلايا المفرده والكتل الصغيره للخلايا (تحتوي على 2-4 خلايا) بالمرور خلالها وتمنع مرور الكتل الكبيره للخلايا. عند نقل كميه من المعلق الخلوي لأعاده الزراعه توقف حركه الدوارق لعده ثواني لكي تترسب كتل الخلايا الكبيره ويؤخذ المعلق من الجزء العلوي للمزرعه .

وتتصف المزارع الكميه المعلقه بثبات نمط التغيرات التي تحصل في نمو الخلايا والعمليات النباتيه فيها وبثبات مكونات الوسط الغذائي , لذلك تعتبر هذه المزارع غير مثاليه لدراسات نمو الخلايا والعمليات البنائيه فيها .

هناك اربعه انظمه رئيسيه تستعمل حاليا في الزراعه الكميه لمعلقات الخلايا يمكن تمييز هذه الانظمه بالطريقه المستعمله لتحريك الوسط السائل في الوعاء .

أ. المزارع ذات الدوران البطيئ Slowly rotating cultures
ب. المزارع الاهتزازيه Shake cultures
ج. المزارع ذات الحركه المغزليه Spinning cultures
د. المزارع المتحركه الوسط الغذائي Stirred cultures

2. الزراعه المستمره Continuous cultures

تختلف الزراعه المستمره عن الزراعه الكميه وذلك بتنميه المزارع المعلقه باعداد كبيره في حاله ثابته ولفتره طويله باضافه اوساط غذائيه جديده وسحب كميات متساويه من الوسط الغذائي المستعمل ويوجد نوعان من الزراعه المستمره

أ. نوع مغلق Closed type
ب. نوع مفتوح Open type

في النوع المغلق يوازن تدفق الوسط الغذائي القديم مع الوسط الغذائي المضاف فضلا عن ذلك فان الخلايا الموجوده في الوسط الغذائي القديم تعزل وتضاف الى وسط الزراعه اليآ ولذلك فان الكتله الحيويه Bio mass تستمر في الزياده لاستمرار نمو الخلايا وانقسامها . اما في النوع المفتوح فيصاحب انسياب الوسط الجديد الى الداخل بخروج حجم مساوي له من الوسط القديم مع الخلايا (دون اعاده الخلايا ثانيه الى الوسط) ويمكن تنظيم معدل انسياب الوسط وغله المزرعه بطريقه تسمح بابقاء المعلقات الخلويه في حاله نمو في الطور الاسي (التضاعف الخلوي) الى مالانهايه .

مراحل نمو المزارع الخلويه المعلقه Cell suspension culture growth stage

تمر الخلايا في المزارع الخلويه باطوار مختلفه من النمو , فعند وضع الخلايا المنشئه للمزارع الخلويه في الوسط الغذائي يتوقف نموها لمده زمنيه تدعى هذه المده بفتره الفتور وذلك لتأقلمها على الظروف الجديده يتبع ذلك زياده اسيه في عدد الخلايا وزياده خطيه في مجاميع الخلايا يعقب ذلك انخفاض ملحوظ في معدل انقسام وبعدها تتوقف الخلايا عن الانقسام وتدخل في مرحله التوقف . ومن اجل المحافظه على حيويه الخلايا والمزارع الخلويه فيجب اعاده زراعه الخلايا بمرحله قبل توقف الانقسام .

وتؤثر كثافه الخلايا في المزارع الخلويه بشكل عام على مده اعاده الزراعه وكذلك حيويه الخلايا المكونه للمزارع الخلويه تختلف باختلاف الخلايا المكونه للمزارع . تختلف المده الزمنيه للوصول الى اعلى كثافه معتمده على نشاط وحيويه الخلايا واحيانا تحتاج 18-25 يوم لاعاده الزراعه في حين تحتاج مزارع اخرى الى 6-9 يوم فقط , ويجب الاخذ بنظر الاعتبار الكثافه الحرجه critical density وهي كثافه الخلايا في الوسط عند زراعه او اعاده زراعته والتي لاتنمو المزارع اذا قلت عنها .

الوسط الغذائي لزراعه الخلايا المعلقه Cell suspension culture medium

يمكن استعمال الوسط الغذائي الملائم لنمو الكالس الهش لنبات معين لاستحداث ونمو المعلقات الخلويه لذلك النوع من النبات . ويفضل اختيار الوسط المناسب لنمو الخلايا المعلقه بتغير بعض المكونات الاساسيه في الوسط الغذائي كالاوكسينات والسايتوكاينات وتختلف احتياجات المزارع الخلويه بالنسبه للفيتامينات ضمن الصنف النباتي الواحد لذلك فمن الضروري اختيار الوسط الغذائي المناسب بعد دراسه مكوناته بصوره دقيقه وخاصه نسبه الاوكسينات الى السايتوكاينات ويعد اختيار الوسط المناسب فان PH الوسط يؤثر على امتصاص المواد مثل الحديد في المزارع الخلويه ويستعمل وسط B5 ووسط Eriksson لزراعه الخلايا المعلقه للنباتات الراقيه .

المزارع الخلويه والحد الادنى لكثافة الخلايا Cell suspension culture and critical cell density

تحتاج عمليه استحداث المزارع الخلويه الى عدد معين من خلايا النسيج او الكالس لأضافتها في وسط غذائي وبظروف بيئيه مثلى . لذلك يجب ان تكون كثافه الخلايا (عدد الخلايا او التجمعات او الكتل الخلويه) ضمن المستوى الحرج Critical level او الحد الادنى لنمو وانقسام الخلايا في الوسط الغذائي لاستحداث المزارع الخلويه Cell Suspension والكثافه الحرجه تعد مؤشراً لقدرة الخلايا على الانقسام والنمو وصولا الى مستوى معين من النمو في ظروف مثاليه . ان حجم الجزء النباتي يؤثر بدرجه كبيره على عمليه استحداث الكالس لذلك فان كثافه الخلايا المستخدمه في الزراعه تؤثر ايضاً في عمليه وطبيعه نموها وزراعه الخلايا النباتيه بالمستوى الامثل من الكثافه تؤدي الى نمو جيد في فتره زمنيه قليله مقارنه بزراعه الخليه المفرده بغض النظر عن الظروف البيئيه المثلى المتوفره لنموها . وتحتاج عمليه زراعه المعلقات الخلويه بكثافات منخفضه الى وجود عناصر غذائيه ومواد معقده التركيب لتحفيز الخلايا على الانقسام والنمو وهذه المواد قد لا يتطلب وجودها في الوسط الغذائي عند زراعه كثافه عاليه (فوق المستوى الحرج) من الخلايا المعلقه لان الخلايا بهذه الاعداد الكبيره لها المقدره على بناء مواد خاصه داخلياً تفرز خارجاً الى الوسط الغذائي تؤثر بشكل فعال على نمو الخلايا المفرده او الكتل الخلويه الصغيره . لذلك فان اضافه هذه المواد الى مزارع الخلايا المستخدمه من كثافات خلويه دون المستوى الحرج يؤدي الى نمو جيد لها .