الفصل الرابع

مزارع البروتوبلاست

مقدمة

تُعد مزارع البروتوبلاست protoplast culture (وهى مزارع للخلايا بدون جدرها السيلولوزية) – وما يترتب عليها من تكوين لهجن جسمية – من أكثر التقنيات الحيوية حاجة لظروف واحتياجات خاصة لنجاحها. وقد أثارت تلك التقنيات اهتمام الكثيرين خلال سبعينيات وثمانينيات القرن الماضى، ولكنها أفَلَتْ بعد تطور تقنيات التحول الوراثى.

لقد عرفت مزارع البروتوبلاست كوسيلة لإنتاج نباتات كاملة منها بفضل دراسات Takebe وآخرين التى نشرت عام ١٩٧١ ومنذ ذلك الحين .. حدث تقدم هائل فى هذا المجال، وأمكن تجديد نمو عديد من المحاصيل الزراعية الهامة – مثل الموالح، والكمثرى، والبطاطس، والطماطم، والتبغ، والأرز، والبرسيم الحجازى، والذرة، والخيار، والباذنجان، والخس، والكرنبيات – أمكن تجديد نموها بصورة روتينية من مزارع البروتوبلاست، الأمر الذى مهد الطريق لدراسات دمج البروتوبلاست.

يمكن عن طريق تلك التقنية الحصول على ملايين البروتوبلاستات فى طبق بترى واحد بتحضين الأنسجة النباتية مع الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية. وتفصل البروتوبلاستات من مختلف الأجزاء النباتية كالجذور، والسويقة الجنينية السفلى، والفلقات، وعقد الرايزوبيم الجذرية، والأوراق، والثمار، وبتلات الأزهار، والإندوسبرم، والخلايا الأمية لحبوب اللقاح، والكالس، ومزارع معلقات الخلايا. ومن بين تلك الأجزاء النباتية، تُمثل الأوراق ومزارع معلقات الخلايا أهم المصادر للحصول على محصول عال من البروتوبلاستات فى أنواع عديدة من النباتات.

ولعزل البروتوبلاستات يحضن النسيج مع مخلوط من إنزيمات تقوم بتحليل الجدر

الخلوية ويتكون من السليولييز cellulase (بتركيز ٢٠ - ٥٠ ٪)، وبكتينيز pectinase (بتركيز ٥٠ - ١٠ ٪) لمدة ٥- ١٠ ساعات على ٢٥م يمرر ناتج عملية التحلل الإنزيمى خلال مناخل تتراوح سعة ثقوبها بين ٣٠، و ٤٠ ميكروميتر للتخلص من الأنسجة غير المهضومة، ثم تجمع البروتوبلاستات فى محلول ملحى ذات ضغط أسموزى مناسب

ويتطلب نجاح زراعة البروتوبلاست توفر بيئة نمو خاصة تسمح بتكـنره، ثم بتميز نباتات كاملة منه

ويتم دمج البروتوبلاستات protoplasts إما كهربائيًا (بإحداث صدمة كهربائية)، وإما كيميائيًا (باستعمال البوليثيلين جليكول PEG على سبيل المثال)، وإما بطرق أخرى عديدة

ولقد أمكن عن طريق تلك التقنية دمج بروتوبلاستات عديد من الأجناس النباتية، مثل *Citrus*، و *Lycopersicon*، و *Nicotiana*، و *Solanum*، كما دمجت بروتوبلاستات أنواع نباتية تنتمى لجنس واحد، وأحيانا دمجت بروتوبلاستات أنواع تنتمى لأجناس مختلفة، وفى أحيان ثالثة دمجت نواة أحد الأنواع فى سيتوبلازم نوع آخر لإنتاج ما يعرف باسم الهجين السيتوبلازمى cytoplasmic hybrid. أو cybrid

ومن أكبر المشاكل التى واجهت تهجين البروتوبلاستات وحدَّت من الاستفادة من تلك التقنية المتطلبات الكثيرة لتداول الخلايا، والتغير فى مستوى التضاعف، والحاجة إلى برامج تربية واسعة ومكثفة بعد الدمج (عن McCown ٢٠٠٣)

ويتوقف نجاح زراعة البروتوبلاست وتجديد نمو نباتات كاملة منه على عديد من العوامل، من أهمها ما يلى:

١ — التركيب الوراثى للنبات المستعمل.

٢ — النسيج المعزول منه البروتوبلاست

٣ — الظروف الفسيولوجية التى تتعرض لها مزارع البروتوبلاست.

٤ -- مدى نقاوة الإنزيمات المستخدمة.

٥ — الضغط الأسموزى للبيئة

٦ — فترة الحضانة.

٧ — بيئة الزراعة ومحتواها من منظمات النمو

٨ — كثافة الزراعة.

٩ — نوع البيئة (صلبة أم سائلة).

١٠ — ظروف الحضانة

تجهيز البروتوبلاستات وزراعتها

تعد الأوراق حديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلاست يُطَّهر النسيج النباتى المستعمل سطحيًا، ثم تسلخ بشرة الورقة، أو يقطع الجزء النباتى المستخدم إلى أجزاء صغيرة، قبل وضعه فى محلول الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. وتفضل أن تكون المعاملة بالإنزيمات الهاضمة تحت تفريغ، لإسراع عملية تخلل محلول الإنزيمات بين الخلايا كما يفيد — أيضًا — تحريك الأنسجة المعاملة بوضعها فى جهاز هزاز فى أثناء المعاملة. وتتراوح فترة المعاملة بالإنزيمات من نصف ساعة إلى ٢٠ ساعة.

مصادر البروتوبلاستات وإعدادها للاستعمال

تؤخذ الأوراق التى تستخدم فى تجهيز مزارع البروتوبلاست من نباتات قوية النمو وخالية من الأمراض تنمو فى ظروف رطوبة عالية وإضاءة منخفضة. ويفضل استعمال الأوراق المكتملة التكوين التى بدأت فى التصلب قليلاً، وذلك من البادرات، أو من النموات فى النباتات الأكبر سنًا، كما يجب ألاّ يكون بها أى متبقيات من المبيدات.

وعند سلخ الأوراق يجب استعمال مشرط حاد، مع تجنب إجراء القطع قريبًا من العروق الكبيرة فى الأوراق الكبيرة الأكثر تكوينًا.

يفيد تعريض النسيج الورقى المستخدم لتفريغ قدره ١٠٥ إلى ١٤٠ كيلوباسكال لمدة ١٥–٢٠ دقيقة أثناء تشريبها بالإنزيمات فى زيادة اختراق الإنزيمات للأنسجة، علمًا بأن الأوراق ذات النسيج البرانشيمى المندمج قد تتطلب التعريض للتفريغ لفترة أطول.

أما مزارع الكالس أو معلقات الخلايا التى تستعمل فى عزل البروتوبلاست فإنها