

- 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 يُطهر النسيج النباتي المستعمل سطحياً، ثم تُلخ بشرة الورقة، أو يقطع الجزء النباتي المستخدم إلى أجزاء صغيرة، قبل وضعه في محلول الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. وتفضل أن تكون المعاملة بالإنزيمات الهاضمة تحت تفريغ، لإسراع عملية تخلل محلول الإنزيمات بين الخلايا كما يفيد - أيضاً - تحريك الأنسجة المعاملة بوضعها في جهاز هزاز في أثناء المعاملة. وتتراوح فترة المعاملة بالإنزيمات من نصف ساعة إلى ٢٠ ساعة.

### مصادر البروتوبلاستات وإعدادها للاستعمال

تؤخذ الأوراق التي تستخدم في تجهيز مزارع البروتوبلاست من نباتات قوية النمو وخالية من الأمراض تنمو في ظروف رطوبة عالية وإضاءة منخفضة. ويفضل استعمال الأوراق المكتملة التكوين التي بدأت في التصلب قليلاً، وذلك من البادرات، أو من النموات في النباتات الأكبر سناً، كما يجب ألا يكون بها أي متبقيات من المبيدات. وعند سلخ الأوراق يجب استعمال مشرط حاد، مع تجنب إجراء القطع قريباً من العروق الكبيرة في الأوراق الكبيرة الأكثر تكويماً.

يفيد تعريض النسيج الورقي المستخدم لتفريغ قدره ١٠٥ إلى ١٤٠ كيلوباسكال لمدة ١٥-٢٠ دقيقة أثناء تشريبها بالإنزيمات في زيادة اختراق الإنزيمات للأنسجة، علماً بأن الأوراق ذات النسيج البرانشيمي المندمج قد تتطلب التعريض للتفريغ لفترة أطول.

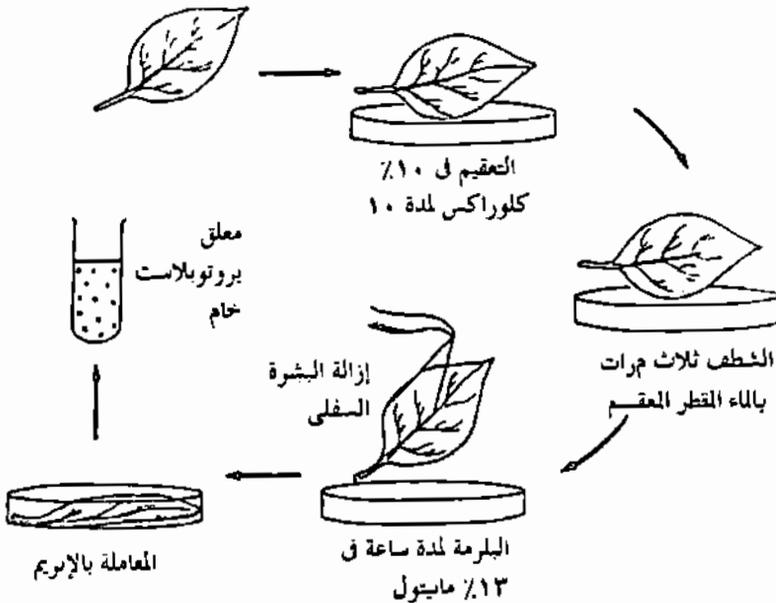
أما مزارع الكالس أو معلقات الخلايا التي تستعمل في عزل البروتوبلاست فإنها

يجب أن تكون في مرحلة النمو اللوغاريتمى وقت عزلها، علماً بأن النسيج الذى يسهل سحقه وتقنيته (الذى يكون friable)، والأقل محتوى من النشا . يعطى أفضل النتائج (عن Grosser ١٩٩٤)

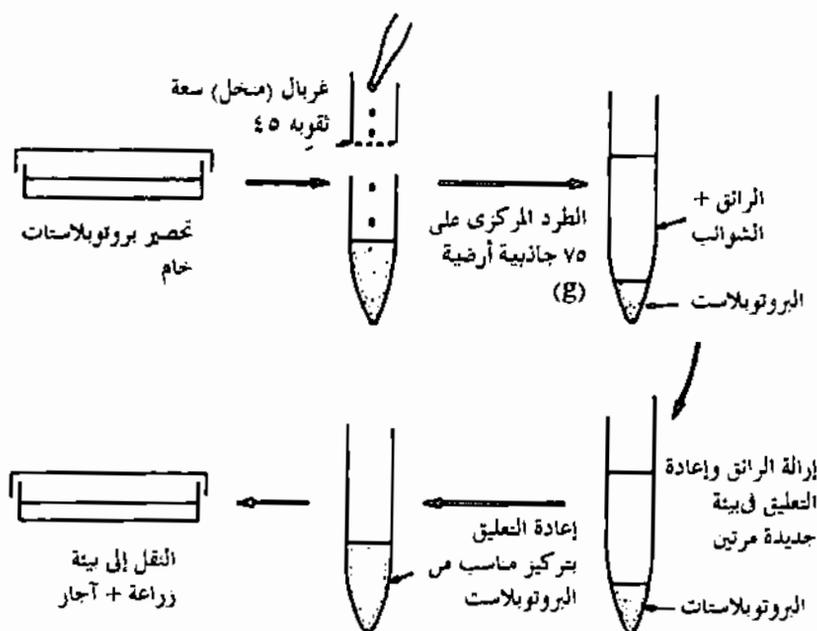
### تحضير البروتوبلاست الخام وتنقيته

يفصل الجدار الخلوى السيليلوزى عن البروتوبلاست بسهولة، بواسطة إنزيم السليوليز cellulase الذى يحضر من مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria* وقد ظهرت منذ عام ١٩٦٨ تحضيرات تجارية من إنزيمى ماسيروزيم macerozyme، وسليوليز، واستخدمت بتعريض قطع من النسيج النباتى للإنزيم الأول - ماسيروزيم - لفصل الخلايا عن بعضها، ثم إضافة الإنزيم الثانى - سليوليز - لهضم الجدر الخلوية، ولكن تفضل إضافتهما معا فى آن واحد.

ويبين شكل (١-٤) طريقة عزل البروتوبلاست الخام. بينما يبين شكل (٤-٢) طريقة تنقية هذا البروتوبلاست الخام (عن Dodds ١٩٨٥).



شكل (١-٤): تخطيط يوضح طريقة عزل البروتوبلاست الخام



شكل (٤-٢): تخطيط يوضح طريقة تقيية البروتوبلاست الخام.

يُنقى البروتوبلاست بالترشيح على فلاتر من الصلب غير القابل للصدأ أو من النيلون، تكون ذات ثقوب بقطر ٤٥ ميكروميتر، هذا .. علماً بأن المتبقيات الصلبة particulate debris التي تفصل عن البروتوبلاست بالترشيح تخفض من كل من pH البيئة، وحيوية البروتوبلاست، ومعدلات الدمج. ولأجل تقليل تلك المشكلة، يستعمل مُدرج gradient، مثل ٢٥٪ سكروز . ١٣٪ مانيتول (عن Grosser ١٩٩٤).

ونوضح في جدول (٤-١) الظروف المثلى التي تلزم لعزل بروتوبلاست نوعين

نباتيين

### الإنزيمات المستعملة في هضم الجدر الخلوية

يتضمن عزل البروتوبلاست بطريقة هضم الجدر الخلوية استعمال إنزيمات السيلوليز cellulase والهيميسيلوليز hemicellulase، والبكتينيز pectinase، وهي التي يُتَّحصل عليها من مصادر مختلفة، مثل: الفطريات، والقواقع (الحلزونات)، ومعى النمل

## التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات

الأبيض تتوفر هذه الإنزيمات تجاريًا بتحضيرات مختلفة على درجات متباينة من النقاوة. يجرى الهضم بتوافيق مختلفة من تلك الإنزيمات في pH يتراوح بين ٥.٥ و ٨ لمدة ٣-١٨ ساعة. وبعد ذلك تُجمع البروتوبلاستات وتنقى بالطرد المركزي لفصلها عن بقايا الخلايا (عن Veilleux وآخرين ٢٠٠٥).

جدول (٤-١) الظروف المثلى لعزل بروتوبلاستات نوعين نباتيين (عس Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

المادة أو الظروف أو العملية	مزرعة خلايا تبغ	خلايا النسيج الوسطى للتجليات
المادة النباتية	مزرعة مجددة بعمر ٤-٥ أيام	بادرات بعمر ٥-٦ أيام
Cellulase	Onozuka R-10 %١	Cellulysin %٢
Macerozyme	Onozuka R10 %٠,٢-٠,١	%٥
Hemi-cellulase	—	%١
pH المحلول الإنزيمي	٤,٧ أو ٥,٧	٥,٤-٤,٦
حجم المحلول الإنزيمي/الوزن الطازج للنسيج	١٠ مل/جم	١٠ مل/جم
فترة الحضانة	٣-٢ ساعة	٢ ساعة
حرارة التحضين	٢٢-٣٧ م	٢٠-٢٥ م
معدل الرج الدوراني	٥٠ دورة/دقيقة	٨٠ دورة/دقيقة
النظم الإسموزي	٨٠٠-٣٠٠ مللي مانيتول/لتر	٦٠٠ مللي مول سوربيتول/لتر

هذا ويجب استخدام أفضل التحضيرات الإنزيمية من بين تلك المستخدمة في تحرير البروتوبلاستات من الجدر الخلوية، مثل الـ cellulases، والـ macerases، والـ pectolyases، حيث إنها تسرع من تحرير البروتوبلاست وتقلل من تعرضه للملوثات الضارة وربما يقلل خلط محاليل الإنزيمات مع بيئة البروتوبلاست من الشد الذي يتعرض له البروتوبلاست أثناء عزله، وبذا . تزداد حيويته

ويعطى جدول (٤-٢) أمثلة لبعض محاليل الإنزيمات، والـ pH، والمحاليل الأسموزية التي استخدمت في عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية.

جدول (٤-٣): أمثلة لبعض مخاليط الإنزيمات، والـ pH، والمخاليط الإنزيمية التي استخدمت في عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية (عسـن Mantell وآخـرين ١٩٨٥).

المحلول الإنزيمى	pH الـ	مخلوط الإنزيمات (وزن/حجم)	الجزء النباتى المستعمل	النوع النباتى
13% Mannitol (0.71 M)	5.8	4% Meicelase 0.4% Macerozyme 2% Driselase 2% Cellulase	Leaf (mesophyll) Cell suspensions	<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi
Seawater		0.5% Macerozyme 2% Cellulase	Leaf (mesophyll)	
Seawater		0.5% Macerozyme 0.1% Cellulase	Leaf (mesophyll)	<i>N. sylvestris</i>
8% Mannitol (0.44 M)	5.8	0.02% Macerozyme		
0.6 M Mannitol	5.5	1.5% Cellulase 0.3% Macerozyme 0.2% PATE	Axenic shoots Leaf (mesophyll)	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Bintje <i>Macleaya</i> spp.
0.5 M. Mannitol	5.6	0.5% Cellulase 2% Rhozyme 4% Meicelase	Leaf (mesophyll)	<i>Medicago</i> spp.
13% Mannitol (0.71 M)	5.6	0.3% Macerozyme 2% Rhozyme 4% Meicelase	Roots	<i>Phaseolus aureus</i>
13% Mannitol (0.71 M)	5.6	0.3% Macerozyme 2% Rhozyme 4% Meicelase	Cell suspensions	<i>Trigonella</i> spp.
13% Mannitol (0.71 M)	5.6	0.3% Macerozyme		

ويبين جدول (٤-٣) عدداً من التحضيرات التجارية للإنزيمات المستعملة في هضم الجدر الخلوية وأمكن بواسطة هذه الإنزيمات فصل البروتوبلاست عن الجدار الخلوي في أية خلية نباتية ثم تتلجنن جدرها، أيًا كان النسيج الذي أخذت منه، ويعد إنزيم pectinase ضرورياً لتحليل الصفيحة الوسطى وفصل الخلايا عن بعضها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

جدول (٤-٣) بعض الإنزيمات المتوفرة تجارياً، والتي تستخدم في عزل البروتوبلاست (عن Bohjwani & Razdan ١٩٨٣)

الكائن المنتج للإنزيم	الإنزيم
<i>Trichoderma viride</i>	Cellulase R-10
<i>Trichoderma viride</i>	Meicclase-P
<i>Rhizopus</i> sp.	Hemicellulase H-2125
<i>Rhizopus</i> sp.	Maccrozyme R-10
<i>Aspergillus niger</i>	Pectinase (purified)
<i>Aspergillus japonicus</i>	Pectolyase Y23
<i>Aspergillus</i> sp.	Pectinol
<i>Arthrobacter luteus</i>	Zymolyase
<i>Irpex lactes</i>	Drisclease

ومن بين النحصرات الإنزيمية التجارية الأخرى الـ helicase، والـ cellulysin، والـ rhozyme

هذا ويجب تحديد جودة التحضيرات الإنزيمية، والكميات التي ستعين استخدامها منها، والمدة التي تلزم تعريض البروتوبلاست لها، والتركيز المناسب من المركبات التي تستخدم في التحكم الأسموزي (osmoticum) تحديد كل ذلك تجريبياً هذا مع العلم بأن زيادة التعرض للإنزيمات قد يضعف الأغشية البروتوبلازمية ويقلل حيوية البروتوبلاست ويمكن أحياناً تقليل الإضرار بالبروتوبلاست بزيادة تركيز الـ osmoticum ويفيد الرج الهادئ باستعمال رجّاج دوار على سرعة بطيئة (٢٥-٥٠ دورة في الدقيقة) في تحرير البروتوبلاستات ويفضل إجراء عملية عزل البروتوبلاست في الظلام على حرارة ٢٥-٢٨م، وهي الظروف التي تسمح بزيادة نشاط الإنزيمات، مع

الاحتفاظ بحيوية البروتوبلاستات. علما بأن البروتوبلاستات تعد حساسة للضوء (عن Grosser 1994)

### بيئات مزارع البروتوبلاست

تشابه بيئات مزارع البروتوبلاست مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير، وتفضل البيئات السائلة. مع مراعاة الدقة في ضبط الضغط الإسموزي للبيئة ويبين جدول (٤) -٤ تركيب إحدى البيئات لزراعة البروتوبلاست

هذا ويستخدم في مزارع البروتوبلاست الأجاروز agarose بدلاً من الآجار الذى يستخدم فى النوعيات الأخرى من مزارع الأنسجة. ويعتبر الأجاروز بمثابة آجار منقى أزيلت منه إسترات الكبريتات sulphate esters، ومن ثم تقل فيه الشحنات السالبة كثيراً عما فى الآجار

### ومن أهم مميزات الأجاروز - مقارنة بالآجار - ما يلى،

- ١ - تنخفض درجة ذوبان الأجاروز مقارنة بالآجار، وبالتالي تقل فرصة الإضرار بالبروتوبلاست
- ٢ - تكون كفاءة عملية الزراعة أعلى.
- ٣ - يبقى البروتوبلاست فى وضع ثابت، وبالتالي يكون من الأسهل ملاحظته
- ٤ - لا يحدث تجمع وتكتلات للبروتوبلاست بدرجة حدوث ذلك على الآجار، وبالتالي يكون من الأسهل إجراء عملية انتخاب وإكثار البروتوبلاستات المفردة

### تحضين المزارع وتجديد النمو

تجب زراعة البروتوبلاست بطريقة تسمح بأكبر قدر من التبادل الغازى. وذلك جعلها إما فى طبقة رقيقة، وإما فى بيئة شبه صلبة، وإما فى طبقة رقيقة من بيئة سائلة. ويتعين إحكام إغلاق المزارع التى تم فيها دمج البروتوبلاست لتجنب جفافها. وخاصة بالنسبة للبيئات التى تحتوى على المانيتول، والتى تكون أكثر تعرضاً للجفاف.

جدول (٤-٤) بيئة لزراعة البروتوبلاست (عس Bhojani & Razdan ١٩٨٣).

المكونات	الكمية (مجم/لتر)	المكونات	الكمية (مجم/لتر)
			Mineral salt
0.75	KI	600	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
3.00	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1900	KNO <sub>3</sub>
10.00	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	600	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
2.00	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	300	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O
0.25	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	170	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.025	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	300	KCl
0.025	CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	25	Sequestrene 330 Fe
			Sugars
125	Mannose	68400	Glucose
125	Rhamnose	125	Sucrose
125	Cellobiose	125	Fructose
125	Sorbitol	125	Ribose
125	Mannitol	125	Xylose
			Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH <sub>4</sub> OH)
10	Malic acid	5	Sodium pyruvate
10	Fumaric acid	10	Citric acid
			Vitamins
0.005	Biotin	100	Inositol
0.5	Choline chloride	1	Nicotinamide
0.1	Riboflavin	1	Pyridoxine-HCl
1	Ascorbic acid	10	Thiamine-HCl
0.005	Vitamin A	0.5	D-Calcium pantothenate
0.005	Vitamin D <sub>3</sub>	0.2	Folic acid
0.1	Vitamin B <sub>12</sub>	0.01	p-Aminobenzoic acid
Soybean × pea or <i>N. glauca</i>		Soybean × barley	Hormones
0.2		1	2,4-D
0.5		0.1	Zeatin
1		--	NAA
		125 mg l <sup>-1</sup>	Vitamin-free casamno acid
		10 ml l <sup>-1</sup>	Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)

يبدأ تمثيل الجدر الخلوية حول البروتوبلاست بمجرد فصل الإنزيمات عنه ويظهر أول الدلائل على تكوين الجدر السيليلوزية بعد نحو ٢-٤ أيام من زراعة البروتوبلاست. بينما تبدأ معظم الانقسامات الخلوية بعد ٧-١٤ يوماً من الزراعة، ويؤدى ذلك إلى تكوين نسيج كالس.

وغنى عن البيان أن تطوير بروتوكول فعال لتجديد النمو لواحد - على الأقل - من كل أبوين مستخدمين فى التهجين الجسمى للبروتوبلاستات يعد أمراً حتمياً لتحقيق الهدف المرتجى من عملية الدمج (عن Grosser ١٩٩٤)

وعلى الرغم من كثرة وتنوع الأنواع النباتية التى أعطت نمو كالس فى مزارع البروتوبلاست إلا أن معظم الأنواع التى حدث فيها تميز (أى نمت فيها النباتات من مزارع البروتوبلاست) كانت من العائلة الباذنجانية، وتشمل القائمة التى تميزت فيها نباتات من مزارع البروتوبلاست: القنفل، والبطاطس، والباذنجان، والتبغ، والبيتونيا، وأنواع أخرى قليلة من العائلات المركبة، والصليبية، والنجيلية، والزنبقية، والبقولية وغيرها.

ونقدمه فى القائمة التالية بياناً ببعض الأنواع النباتية (مقسمة حسب العائلات التى تنتمى إليها) التى أمكن تجديد النمو فيها من مزارع البروتوبلاست (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣):

Compositae

*Senecio vulgaris*

Cruciferae

*Arabidopsis thaliana*

*Brassica napus*

Euphorbiaceae

*Manihot esculenta*

Gramineae

*Bromus inermis*

*Pennisetum americanum*

Liliaceae

*Asparagus officinalis*

*Heimerocallis sp.*

Leguminosae

*Medicago sativa*

*Trifolium repens*

Ranunculaceae

*Ranunculus sceleratus*

Rutaceae

*Citrus sinensis*

Solanaceae

*Atropa belladonna*

*Capsicum annuum*

*Datura metel*

*D. meteloides*

*D. innoxia*

*Hyoxyamus muticus*

*Nicotiana acuminata*

*N. alata*

*N. debneyi*

*N. glauca*

*N. langsdorffii*

*N. longiflora*

*N. otophora*

*N. paniculata*

*N. plumbaginifolia*

*N. suaveolens*

*N. sylvestris*

*N. sylvestris* × *N. otophora*

*N. tabacum*

*N. tabacum* × *N. otophora*

*Petunia axillaris*

*P. hybrida*

*P. inflata*

*P. parodu*

*P. parviflora*

*P. violacea*

*Salpiglossis sinuata*

*Solanum chacoense*

*S. dulcamara*

*S. melongena*

*S. tuberosum*

Umbelliferae

*Daucus carota*

ومن أهم الأنواع الخشبية التي نجح فيها تجديد النمو من مزارع البروتوبلاست ما يلي (عن Bajaz ١٩٨٩):

*Citrus spp.*  
*Santalum album*  
*Pyrus communis*  
*Ulmus spp.*  
*Populus tremula*  
*Liriodendron tulipifera*

### أهمية مزارع البروتوبلاست

يستفاد من مزارع البروتوبلاست في النواحي التالية:

- ١ - تعد مزارع البروتوبلاست أفضل من مزارع الخلايا الكاملة، ويجب استعمالها كبداية في عمليات الإكثار وعزل السلالات الطفرية.
- ٢ - دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها معاً، وهو ما يعد وسيلة فعالة لإجراء التهجينات البعيدة.
- ٣ - إدخال تراكيب مجهرية حية أو غير حية في الخلايا النباتية، ويستفاد من ذلك في دراسات الهندسة الوراثية.
- ٤ - إجراء الدراسات الفسيولوجية الخاصة بتمثيل الجدار الخلوي وخصائص الغشاء البلازمي.
- ٥ - إحداث الإصابة بالفيروسات بإدخالها في البروتوبلاست مباشرة.
- ٦ - زراعة كلوروبلاستيدات نباتات عالية الكفاءة في عملية البناء الضوئي في بروتوبلاست نباتات منخفضة الكفاءة، ونقل الصفات المرتبطة بالكلوروبلاستيدات (مثل المقاومة لمبيد الحشائش اترازين atrazine في اللفت) من نوع إلى آخر.
- ٧ - إدخال صفة العقم الذكري السيتوبلازمي في النباتات (Vasil ١٩٧٦). (أمكن - على سبيل المثال - إدخال صفة العقم الذكري السيتوبلازمي بواسطة مزارع البروتوبلاست من النوع *Nicotiana tabacum* إلى *N. Sylvestris*، ومن *Petunia hybrida* إلى *P. Axillaris*، عن Sink ١٩٨٤).