

والحماية من الحرارة الشديده الانخفاض بالاختيار المناسب لكل من الـ osmoticum ،
والـ cryoprotectant

إندماج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسمية

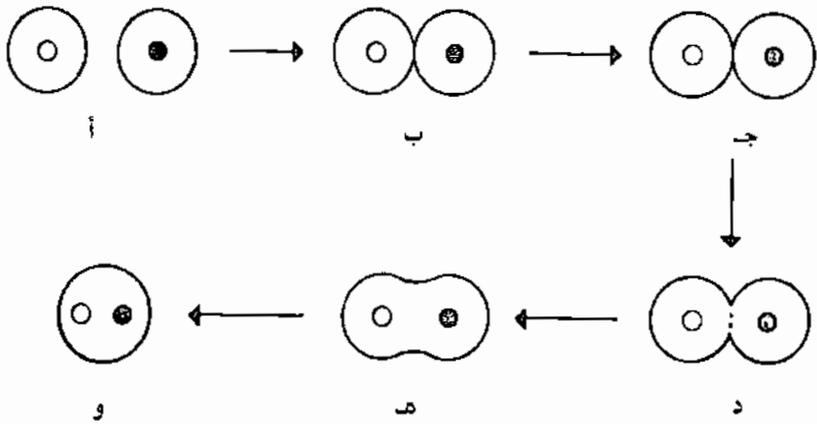
مقدمة

يحدث إندماج للبروتوبلاست Protoplasm Fusion بصورة تلقائية وطبيعيه فى مزارع البروتوبلاست المجهزة من خلايا نشطة فى الانقسام ويحدث الإندماج باتساع الأغشية البروتوبلازمية المتجاورة والنحام الروابط البلازمية بينها، لتتكون بذلك وحدات بروتوبلازمية جديدة بكل منها من ٢-٤ نواة ويمكن تقليل حالات 'إندماج البروتوبلاست بوضع الخلايا المستخدمة فى إعداد مزارع البروتوبلاست فى سائل ذى ضغط إسموزى مرتفع، ليلزمتها بفرض قطع الروابط البروتوبلازمية

أما إنتاج الهجن الجسميه somatic hybrids فيتطلب اندماج بروتوبلاست الأنواع التى يراد تهجينها. ويسنلزم ذلك توفر عامل، أو وسيلة مناسبة لتحقيق الإندماج (fusogen) وقد جربت لذلك معاملات كثيرة أثبت بعضها نجاحا كبيرا فى تحفير اندماج بروتوبلازم الأنواع البعيدة، مثل معاملات نترات الصوديوم، والـ pH المرتفع، والتركيز المرتفع لأيون الكالسيوم. والبولىثيلين جليكول. والمعاملة بتيار كهربائى ذى فولت مرتفع لفترة قصيرة .. إلخ

ويحدث اندماج البروتوبلاست بالطريقة المبينة فى شكل (٤-٣)، وينتج عنه إنتاج بروتوبلاست ذى نواتين مختلفتين Binucleate Heterokaryon يعقب الاندماج اختلاط بروتوبلاست الأنواع المندمجة خلال ساعات قليلة، وتكون جداراً خلويًا حول البروتوبلاست المندمج، ثم تدخل الخلية الهجين فى انقسامات ينشأ عنها تكون هجين جسدى Somatic Hybrid، وقد تنقسم كل نواة فى البروتوبلاست ذى النوايين منفصلة عن الأخرى، دون أن تشترك كروموسوماتها معا فى خيوط مغزل واحد، وتنشأ عن ذلك حالات من الكيميرا. وقد تستمر الخلايا ذات النواتين المختلفتين فى إنتاج خلايا مماثلة لعدة أجيال، دون أن تندمج النواتان معا وقد يحدث اندماج للنواتين فى الطور البينى

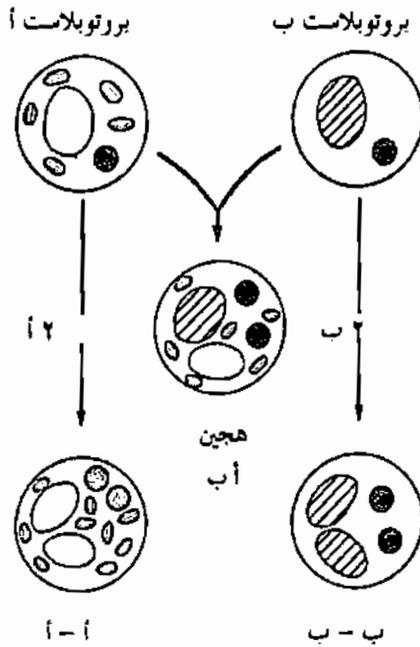
Interphase بين الانقسامات، ولكن هذا الاندماج لا يترتب عليه إنتاج خلية هجين قادرة على الاستمرار في الانقسام (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



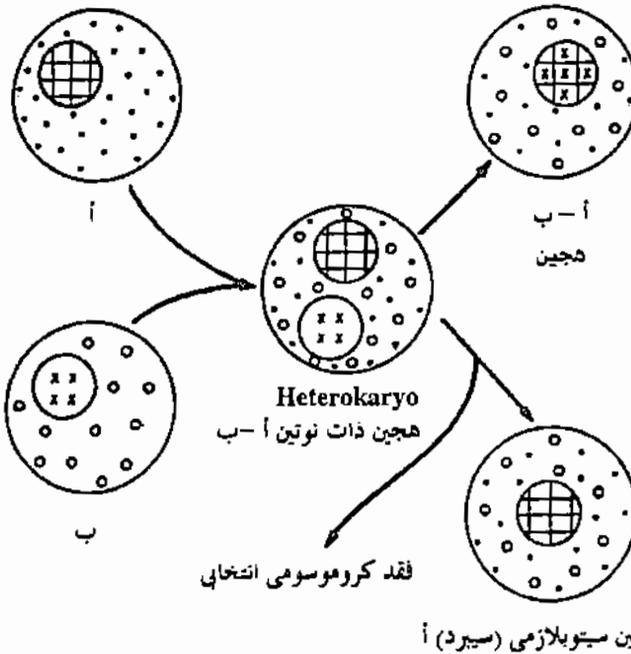
شكل (٤-٣) خطوات عملية اندماج البروتوبلاست لوعين مختلفين. يبدأ الاندماج بتقارب البروتوبلاست كما في الشكل (ب)، ثم اندماج الأغشية البروتوبلازمية في مناطق محددة (كما في الشكل ج)، وينتهي بتكوين الخلية ذات النواتين المختلفتين binucleate heterokaryon.

ويوضح شكل (٤-٤) بعض الحالات التي يمكن أن تنتج عن اندماج البروتوبلاستات الكاملة (عن Dodds ١٩٨٥).

هذا .. ولا يكون اندماج النواتين مفيداً في إنتاج خلايا هجين hybrids إلا إذا حدث أثناء الانقسام الميتوزي وحتى إذا تكونت الخلايا الهجين في أثناء الانقسام الميتوزي فإن اندماج النواتين لا يكون تاماً في أغلب الحالات، وكثيراً ما تستبعد الكروموسومات الخاصة بأحد النوعين المندمجين من الخلايا الهجين بعد عدة أشهر من الانقسام كما يحدث الشيء ذاته - غالباً - بالنسبة لبعض الخلايا، مثل البلاستيدات الخضراء. وقد تستبعد كروموسومات أحد النوعين، بينما تستبعد بلاستيدات النوع الآخر، ويعطى ذلك الفرصة لإنتاج خلايا لأحد النوعين المهجنين، وهي تحتوى على بلاستيدات النوع الآخر، ولنقل عوامل سيتوبلازمية (مثل العقم الذكري) من نوع أو جنس إلى آخر وتعرف الهجن التي تحتوى على نواة من أحد الأنواع وسيتوبلازم من النوع الآخر، أو منهما معا باسم سيبرد Cybrids (شكل ٤-٥، عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٤-٤): الاحتمالات الممكنة لنواتج الاندماج.



هجين سيتوبلازمي (سيرد) أ

شكل (٥-٤): إنتاج هجين سيتوبلازمي (سيرد cybrid؛ عن Dodds ١٩٨٥).

ويطلب تصجين الخلايا الجسمية somatic cells، ما يلي:

- ١ - تخليص البروتوبلاست من الجدر الخلوية.
- ٢ - حث تلامس الأغشية البروتوبلازمية على المستوى الجزيئي، وكذلك حث التحلل والانهار الجزئي المؤقت لتلك الأغشية؛ حتى تسمح باندماج البروتوبلاستات المستقلة.
- ٣ - التعرف على الهجن الجسيمة وانتخابها.
- ٤ - زراعة الهجن البروتوبلازمية في بيئة صناعية
- ٥ - تجديد النمو النباتي من تلك الهجن (Kao & Michayluk، ١٩٨٩).

أهمية التهجين الجسمي

يحقق التهجين الجسمي (دمج البروتوبلاست) المزايا التالية

- ١ - إمكان إنتاج هجن نوعية وجنسية جديدة بين نباتات يصعب أو يستحيل تهجينها جنسياً؛ فهي تتغلب على جميع مشاكل عدم التوافق الجنسي، فمثلاً أمكن دمج برتوبلاست البطاطس مع برتوبلاست الطماطم في هجين لا جنسى كذلك تتكون هجن لا تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات كلا الأبوين (asymmetric hybrids) عندما يحدث تهجين جزئى وهى هجن تحتوى على أعداد غير عادية من الكروموسومات، أو على تباينات كبيرة منها (جدول ٤-٥)
- ويمكن عن طريق هذه التهجينات البعيدة إنتاج أجناس نباتية جديدة تماماً لم يكن لها وجود من قبل (جدول ٤-٦)

- ٢ - تفيد الهجن الجسمية - كثيراً في نقل جينات مرغوب فيها من نوع نباتي لآخر، مثل جينات المقاومة للأمراض والآفات، وتحمل الظروف البيئية القاسية. وصفات الجودة، والمقاومة لبييدات الحشائش، والعقم الذكري السيتوبلازمي . والأمثلة الناجحة على ذلك كثيرة جداً ومتنوعة (جدول ٤-٨، و ٤-٩).

- ٣ - يمكن أن يستفاد من دمج البروتوبلاست كوسيلة بديلة للحصول على نباتات متضاعفة هجيناً

- ٤ - يمكن دمج برتوبلاستات النباتات العقيمة جنسياً (مثل الأحادية والثلاثية وذات التعدد الكروموسومى غير التام .. إلخ) .. يمكن دمجها معاً لإنتاج نباتات خصبة ثنائية ومتضاعفة

٥ - يكون دمج البروتوبلاست وإنتاج الهجن ممكنًا والنباتات مازالت فى طور الحداثة.

٦ - يتيح دمج الخلايا جسميًا فرصة كبيرة لدراسة الجينات السيتوبلازمية ونشاطها؛ الأمر الذى يمكن توظيفه لخدمة أهداف تربية النبات.

جدول (٤-٥): التباينات فى أعداد الكروموسومات التى ظهرت فى الهجن الجسمية التى نتجت من دمج بروتوبلاستات بعض الأنواع النباتية.

عدد الكروموسومات	الأنواع المتدمجة وأعداد كروموسوماتها	
فى الهجن الجسمي		
تباينات كثيرة	<i>B. oleracea</i> (2n=18)	+ <i>B. campestris</i> (2n=18)
تباينات كثيرة	<i>B. napus</i> (2n=38)	+ <i>B. juncea</i> (2n=36)
٤٦ ، ٤٨ ، ٧٢	<i>Datura innoxia</i> (2n=24)	+ <i>D. stramonium</i> (2n=24)
٥٨-٥٠	<i>N. tabacum</i> (2n=48)	+ <i>N. glutinosa</i> (2n=24)
٩٦	<i>N. tabacum</i> (2n=48)	+ <i>N. nesophila</i> (2n=48)
٧٢	<i>N. tabacum</i> (2n=48)	+ <i>N. sylvestris</i> (2n=24)
٧٢	<i>Lycopersicon esculentum</i> (2n=24)	+ <i>L. peruvianum</i> (2n=24)
٤٨-٤٤	<i>Petunia parodii</i> (2n=48)	+ <i>P. hrybrida</i> (2n=14)
٦٠	<i>Solanum tuberosum</i> (2n=24, 48)	+ <i>S. chacoense</i> (2n = 14)

جدول (٤-٦): هجن جسمية جنسية intergeneric أنتجت بطريقة دمج البروتوبلاست (عن Chawla ٢٠٠٠).

الجنس الجديد	الأنواع النباتية المهجنة جسميًا وأعداد كروموسوماتها	
<i>Raphanobrassica</i>	<i>Raphanus sativus</i> (2n=18)	+ <i>B. Oleracea</i> (2n = 18)
<i>Moricandiobrassica</i>	<i>B. oleracea</i> 2n = 18)	+ <i>Moricandia arvensis</i> (2n = 27, 28)
<i>Erucabrassica</i>	<i>Eruca sativo</i> (2n = 22)	+ <i>B. napus</i> (2n = 38)
<i>Diplotaxobrassica</i>	<i>Diplataxis muralis</i> (2n = 42)	+ <i>B. napus</i> (2n = 38)
<i>Nicotipersicon</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> (2n = 24)	+ <i>Lycopersicon esulentum</i> (2n = 24)
<i>Solanopersicon</i>	<i>Solanum tuberosum</i> (2n = 24)	+ <i>L. esculentum</i> (2n = 24)
<i>Daturotrapa</i>	<i>Datura innoxia</i> (2n=48)	+ <i>Atropa belladano</i> (2n = 24)
<i>Oryzochloa</i>	<i>Oryza sativa</i> (2n=24)	+ <i>Echinochloa oryzicola</i> (2n = 24)
<i>Arabidobrassica</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (2n = 10)	+ <i>B. campestris</i> (2n = 20)

٧ - يُتيح دمج البروتوبلاست فرصة فريدة للحصول على توافق خاصة من الأنوية والسيتوبلازم في التهجينات الجسمية بين مختلف الأنواع ويستدل من عدد من الهجن الجسمية أنه على الرغم من أن نوعين مختلفين من السيتوبلازم قد يختلطا مبدئياً عند دمج البروتوبلاست؛ لينتجا ما يعرف بال heteroplasmon . فإنه في نهاية الأمر يسود سيتوبلازم أحد النوعين، مما يترتب عليه حدوث انعزال سيتوبلازمي؛ الأمر الذي شوهد كثيراً في انعزالات الميتوكوندريات والبلاستيدات الخضراء. ويفيد ذلك كله في إمكان الحصول على جيرمبلازم جديد وفريد لا يمكن الحصول عليه بالطرق الأخرى التقليدية (عن Chawla ٢٠٠٠).

٨ - النقل الجزئي للمادة النووية من نوع نباتي لآخر.

٩ - نقل المادة الوراثية السيتوبلازمية (دنا الميتوكوندريات والبلاستيدات الخضراء)، لإنتاج نباتات عقيمة الذكر، أو لنقل صفات سيتوبلازمية أخرى هامة (مثل المقاومة لبعض مبيدات الحشائش) في cybrids.

١٠ - إنتاج تباينات المزارع somaclonal variations.

١١ - إنتاج نباتات ذات محتوى مرتفع من الألكالويدات وغيرها من نواتج الأيض الثانوية ذات الأهمية

١٢ - إنتاج هجن جسمية للاستعمال كأصول جذرية لأشجار الفاكهة (عن Bajaj ١٩٩٤)

وعلى الرغم من أن الهدف الأصلي الذي كان يسعى إليه الباحثون من وراء دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية المختلفة (وهو الحصول على أنواع جديدة تجمع بين صفات الآباء التي دمجت معاً) . على الرغم من أن هذا الهدف الأصلي لم يتحقق، إلا أن تلك الدراسات أثبتت أهمية دمج البروتوبلاست في توفير تراكيب وراثية جديدة ليس لها نظير في الطبيعة.

لقد جرت عمليات دمج بروتوبلاست محاصيل مختلفة كلية، كما في حالتى البطاطس مع الطماطم، وال Arabidobrassica، وعلى الرغم من أنها لم تأت بأى نتيجة

عملية، إلا أنها فتحت الطريق أمام احتمالات أخرى كثيرة، مثل دمج البروتوبلاستات الأحادية معاً، والبروتوبلاستات الأحادية مع الثنائية. كذلك أمكن دمج سلالات بطاطس ثنائية التضاعف وخليطة وراثياً معاً، وحُصِل على نباتات رباعية وخليطة وراثياً، حيث أكثرت بسهولة خضرياً مع المحافظة على تركيبها الوراثي الخليط. ولقد فتحت الهجن السيتوبلازمية (أو cybrids) مجالاً واسعاً لنقل المادة الوراثية السيتوبلازمية من نوع لآخر مع احتفاظ الأخير بهيئته الكروموسومية النووية ومن بين الصفات الهامة التي يتحكم فيها جينات سيتوبلازمية - توجد في البلاستيدات أو في الميتوكوندريا - تلك الخاصة بالعمق الذكري السيتوبلازمي، وبجهاز البناء الضوئي، ونقص الكلوروفيل، وإنزيمات تمثيل الكربون، ومقاومة الاستربتومييسين (عن Bajaj ١٩٨٩).

يتلخص الأمر بالنسبة لاستخدام مزارع البروتوبلاست في إنتاج الهجن البعيدة في أن غالبية المحاولات في هذا الاتجاه كانت على الأجناس التي يسهل الحصول فيها على نباتات من مزارع البروتوبلاست، وهي: *Nicotiana*، و *Petunia*، و *Daucus*، و *Solanum*، و *Datura*. ويلزم تطوير تقنية إنتاج النباتات من مزارع البروتوبلاست في أجناس أخرى مهمة لكي يمكن أن تشملها محاولات الهجن البعيدة.

وقد أمكن - عن طريق دمج بروتوبلاست الأنواع البعيدة - معاً - في مزارع البروتوبلاست - إنتاج أربعة أنواع من الهجن هي:

١ - هجن تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات الأيوين (أى متعددة المجموعات الكروموسومية شبيهة بالثنائية Amphidiploids مثل الهجن (*Datura innoxia* + *D. stramonium*)، و (*D. innoxia* + *D. discolor*).

٢ - هجن خليطة وعقيمة أنتجت بإضافة هيئات كروموسومية من أنواع يرية إلى النوع المزروع، وتكثر خضرياً كما في جنس البطاطس *Solanum*.

٣ - هجن تحتوى على جزء فقط من الهيئة الكروموسومية لأنواع أخرى، مثل غالبية الهجن التي أنتجت حتى الآن.

٤ - هجن تحتوى على نواة أحد الأنواع، وسيتوبلازم النوع الآخر، أو كلا النوعين الهجينين سيبرد Cybrids، عن Schieder ١٩٨٢.

وسائل تحفيز دمج البروتوبلاست

يمكن في وضع الأمر دمج بروتوبلاستات أي نوعين نباتيين، بل إن بروتوبلاستات
لأنواع سببية يمكن دمجها مع بروتوبلاستات الأنواع الحيوانية

ومن بين أهم الطرق التي اتبعتها لأجل تحفيز اندماج البروتوبلاستات، ما يلي:

١ الاندماج التلقائي

من المعروف أن اندماج البروتوبلاستات يحدث تلقائياً أثناء التحلل الإنزيمي لجدار
الخلوية. وقد أُرِجِع ذلك إلى تمدد الروابط البروتوبلازمية بين البروتوبلاستات الخاصة
بالحلاب المجاورة وقد لوحظ على سبيل أمثال - أن ٢٥% من البروتوبلاستات
المعزولة من حلال ثوب الصويا المزروعة كانت عديدة الأنوية. وفي النوع *Vicia*
haurastana كان متوسط عدد الأنوية بكل بروتوبلاست ٤٥؛ ٢ بينما تراوح المدى بين نوات
وحده، و ٤٥ نواة كذلك وجد في إندوسبرم الذرة أن ٥٠% من البروتوبلاستات المعزولة
تتميزاً كانت متعددة الأنوية وبحسب كل منها على نواتين إلى ٢٨ نواة

٢ طريقة ميكانيكية

عندما يمر البروتوبلاستات من خلال حاصه دقيقة ذات فتحة صغيرة جداً يحدث
اندماج بعضها، ولكن نسبة اندماج تكون منخفضة. ولذا فإن تلك الطريقة لم
تعد صالحة

٣ رفع - pH في وجود كاسيوم

يؤدي بوضع بروتوبلاستات عند pH مرتفع (١٠.٥) إلى تحفيز دمج البروتوبلاستات
وفي هذه الطريقة يحصل بروتوبلاستات التي يُراد دمجها مع تلك المحلولة بحمض على
صوديوم كاسيوم $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (٠.٠٥ مولان)، وجليسين الصوديوم $Na \text{ glycine}$ (٠.٠٥
مولان). وصوديوم (٠.٤ مولان) عند pH ١٠.٥ يحفظ قرص البروتوبلاست لتتكون بعد
إجراء - بصرى مركزي على ٥٠ مثل الجاذبية لمدة ٣ دقائق يحفظ في حمام مائي على
٣١ م مدة ٤٠-٥٠ دقيقة حيث تحدث الاندماجات

٤ المعاملة ببترات صوديوم

يوضع بروتوبلاستات في مخلوط يتكون من نترات صوديوم (بنسبة ٥٥) وسكروز

(بنسبة ١٠٪) على ٣٥م لمدة ٥ دقائق. يؤدي الطرد المركزي بعد ذلك (على ٢٠٠ مثل الجاذبية) لمدة ٥ دقائق إلى ترسب البروتوبلاستات على صورة قرص يحفظ على ٣٠م لمدة ٣٠ دقيقة في حمام مائي، حيث تحدث الاندماجات.

وقد تبين أن البروتوبلاستات المعزولة من القمم النامية لجذور الشوفان وبعض الحبوب النجيلية الأخرى في ٠,٥٦ مولار سكروز مع ١٠٪ سيليلوليز cellulase، و ٥٪ macerozyme .. كان لها القدرة على الاندماج في محلول من نترات الصوديوم بتركيز ٠,٢٥ مولار. وقد تكرر ذلك في حالات أخرى، مثل التهجين الجسمي للنوع *Nicotiana glauca* مع *N. langsdorffii*.

٥ - استخدام البروتينات:

يؤدي البروتين جيلاتين gelatin والنواتج الأولية لتحلله عندما يكون بتركيز ٢-٥٪ إلى إحداث تجمع يتسبب في حدوث اندماجات بين البروتوبلاستات (عن Kao & Michayluk ١٩٨٩، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

٦ - اندماج البروتوبلاستات بالأحماض الدهنية والإسترات.

٧ - اندماج البروتوبلاستات بالصدمة الأسموزية:

أمكن تحقيق نجاح محدود في دمج بروتوبلاستات الأنواع المختلفة بتعرضها لصدمة إسموزية معتدلة، وكان معدل الاندماج النوعي أقل من ١٪، وبمعدل حوالى ٠,١٪.

٨ - اندماج البروتوبلاستات بالدكستران وكبريتات الدكستران dextran sulfate:

أدت الدكسترانات ذات الوزن الجزيئي المرتفع (بتركيز ١٥٪) في وجود الأملاح غير العضوية إلى حث تكاثر البروتوبلاستات وإلى اندماجها بنسبة ١٠٪.

٩ - اندماج البروتوبلاستات بمساعدة الـ polyviny alcohol (اختصاراً: PVA):

يمكن حث التصاق البروتوبلاستات واندماجها بالـ PVA، وتتكون أكثر المحاليل فاعلية في دمج الخلايا من: ١٥٪ (وزن/وزن) PVA، و ٠,٠٥ مولار كلوريد كالسيوم، و ٠,٣ مولار مانيتول. هذا .. وليس للـ PVA أية تأثيرات ضارة على حيوية البروتوبلاستات.

١٠ - اندماج البروتوبلاستات بمساعدة البوليثلين جليكول polyethylene glycol (اختصاراً PEG):

تعتمد أكثر الطرق نجاحاً في دمج البروتوبلاستات المهجين على البوليثلين جليكول PEG الذى يحفز التصاق البروتوبلاستات واندماجها يتميز الـ PEG بفاعليته، وقلة تكلفته، وعدم سميته للبروتوبلاست إذا ما زادت فترة التعرض له وتاريخياً استعمل بدايه الـ PEG ذات الوزن الجزيئى المرتفع (٦٠٠٠-٨٠٠٠)، ولكن تحول الاتجاه بعد ذلك إلى استعمال الـ PEG ذات الوزن الجزيئى المنخفض (١٥٠٠)، والذي وجد أنه أكثر كفاءة وقد تبين أن فعل الـ PEG ليس متخصصاً على أنواع نباتية بعينها، حيث كان فعالاً في دمج بروتوبلاستات عديد من الأنواع النباتية التى تنتمى إلى أجناس وعائلات مختلفة.

ويفضل لأجل الحصول على هجن جسمية حرة وظيفية - عند المعاملة بالبولىثلين جليكول - دمج البروتوبلاست عند السطح البيني interface لمحلولين، فقد أدى دمج البروتوبلاست عند السطح البيني لكل من الـ PEG-sucrose (البولىثلين جليكول مع السكروز)، ومحلول الجلوكوز، مع pH عالٍ وصدمة أسموزية. أدى ذلك إلى إنتاج ٣٠٪ من الهجن الجسمية (ال heterokaryocytes) الحرة والظيفية والعالية الحيوية

وتتلخص طريقة الـ PEG لدمج البروتوبلاستة فيما يلى:

أ - يوضع حوالى ١٥٠ ميكروليتر من ٤-٥٪ (حجم/حجم) من معلق البروتوبلاست على غطاء شريحة زجاجية فى طبق بترى وتترك حتى ترسب البروتوبلاستات فى طبقة رقيقة.

ب - يضاف ببطء حوالى ٣٠٠-٤٥٠ مل من محلول الـ PEG (جدول ٤-٧) إلى تحضير البروتوبلاست

ج - يحضن البروتوبلاست فى محلول الـ PEG على حرارة الغرفة لمدة ١٠-٢٠ دقيقة

د - يتم التخلص من الـ PEG ببطء باستعمال بيئة مزارع البروتوبلاست

جدول (٤-٧): محاليل تستخدم في دمج البروتوبلاستات.

المحلول		المركب
pH مرتفع + أيون الكالسيوم	PEG	
٥,٤	—	الجلوكوز (جم)
—	٥٠	PEG ١٥٤٠ (جم)
٧٣٥	١٥٠	كلوريد كالسيوم به جزيئين من الماء (مجم)
—	١٠	فوسفات أحادي البوتاسيوم (مجم)
٧٣٥	—	الجليسين (مجم)
١٠٠	١٠٠	الماء (مل)

الـ pH ٥,٥-٦,٥ (أيدروكسيد البوتاسيوم) ١٠,٥ (أيدوكسيد الصوديوم)

وقد حُصل على نسبة اندماج عالية للبروتوبلاستات - بلغت ٥٠٪ - حينما تم التخلص من الـ PEG في pH مرتفع (١٠,٥) مع تركيز عالٍ من الكالسيوم، ثم غسيل البروتوبلاستات المعاملة ببيئة زراعة البروتوبلاست.

كما وجد أن إضافة الـ dimethylsulfoxide إلى الـ PEG يمكن أن يزيد من معدل اندماج البروتوبلاستات.

ويعيب دمج البروتوبلاستات على غطاء شريحة زجاجية أنها تميل إلى الالتصاق بقوة بالغطاء لعدة أيام تختفي أثناءها الاختلافات المورفولوجية بين الخلايا الأبوية والهجينة الجسمية؛ مما يجعل من الصعب عزل الهجن بالوسائل الميكانيكية (عن Kao & Michayluk ١٩٨٩).

وتؤثر كثير من العوامل في مدى كفاءة الـ PEG على مثل التصاق البروتوبلاستات واندماجها، وفي حيوية البروتوبلاستات خليطة النوايا الناتجة عن الاندماج (الـ heterokaryocytes)، كما يلي:

أ - لا يحدث الالتصاق القوي للبروتوبلاستات، واندماجها بنسبة عالية إلا في التركيزات العالية من الـ PEG.

ب - تزداد فاعلية الـ PEG فى التصاق البروتوبلاستات واندماجها بتزويد محلول الـ PEG بأيونات الكالسيوم، بينما تقبض تلك الفاعلية فى وجود تركيزات عالية من البوتاسيوم أو الصوديوم فى الـ pH المرتفع هذا إلا أن توفر الكالسيوم بالقدر العالى الكافى يمكن أن يحدث معه الالتصاق والاندماج حتى فى وجود تركيزات عالية من الصوديوم فى pH عال.

ج - للضغط الإسموزى لمختلف المحاليل تأثيرات كبيرة على اندماج البروتوبلاستات وحيويتها

د - تعد البروتوبلاستات المتحصل عليها من الأوراق الصغيرة، أو من المزارع السريعة النمو هى الأفضل لأجل الاندماج، بينما لا تعد البروتوبلاستات المتحصل عليها من خلايا الميزوفيل الكبيرة السن، أو خلايا المزارع المسنة مناسبة للاندماج، هذا مع العلم بأن الخلايا المسنة تحتوى على جدار خلوى ثانوى لا يهضم إنزيمياً كذلك فإن التجديد السريع للجدر الخلوية قبل تعريض البروتوبلاستات لعامل الدمج fusogenic agent يمكن أن يقلل -- كذلك -- من عملية الاندماج

هـ - تعرف تأثيرات ضارة لـ PEG على البروتوبلاستات، ولكن ربما ترجع تلك الأضرار - حقيقة - إلى الشوائب التى قد توجد مع الـ PEG، وليس إلى الـ PEG ذاته وقد وجد أن الـ PEG المزال منه الأملاح (desalted) أقل ضرراً بكثير على البروتوبلاستات عن الدرجة التجارية الصيدلانية من الـ PEG

و - لكل من تركيز الإنزيمات المستعملة وأنواعها تأثيرات جمة على اندماج البروتوبلاستات وحيوية الـ heterokaryocytes المنتجة

ز - تلعب كثافة البروتوبلاستات التى يتم التعامل معها دوراً هاماً فى اندماجها، فالكثافة يجب تنظيمها بحيث تحدث معظم الاندماجات بين بروتوبلاستين اثنين، مع خفض الاندماجات المتعددة للبروتوبلاستات إلى أدنى مستوى ممكن. ومن بين تركيزات معلقات البروتوبلاستات التى استخدمت بنجاح ٥-١٠٪ (حجم/حجم) عند اتباع طريقة السطح البينى لـ PEG-sucrose والجلوكوز، و ٤-٥٪ (حجم/حجم) عند ترسيب

البروتوبلاستات على سطح صلب بطرق ال PEG، و ٢-٨ × ١٠^٦ /مل عند اتباع طريقة الدمج الكهربائي electrofusion

ح - توجد تباينات كثيرة بين البروتوبلاستات المتحصل عليها من مختلف الأنواع النباتية في مدى تحملها للمعاملة بالإنزيمات ومستحضات الدمج.

١١ - الاندماج الكهربائي.

أصبح دمج البروتوبلاستات يجرى - حالياً - بصورة روتينية وبكفاءة عالية بالمعاملة بالتيار الكهربائي. تبدأ عملية الدمج الكهربائي بإعادة تعليق البروتوبلاستات في بيئة ذات درجة توصيل كهربائي منخفضة، ووضعها في تجويف يحيط به قطبين كهربائيين، ثم إمرار تيار متردد (AC). يؤدي ذلك إلى تحرك البروتوبلاستات في الحقل الكهربائي بخاصية الـ dielectrophoresis، والتصاقها بعضها ببعض كما لو كانت حبات في مسبحة. يلي ذلك إعطاء نبضة قصيرة من تيار مستمر (DC) بقوة ١٠-١٢ كيلو فولت/سم، بهدف حث البروتوبلاستات المتجاورة على الاندماج معاً.

وباتباع هذه الطريقة أمكن إحداث اندماجات بنسبة ٨٠-١٠٠٪ في عديد من الأنواع. بينما لم تتعد النسبة ١٠٪ إلا نادراً عند اتباع الطرق الكيميائية وفي كثير من الحالات أظهرت البروتوبلاستات المدمجة كهربائياً تجديداً أفضل للنمو بعد زراعتها.

وإلى جانب إعطاء هذه الطريقة لنسبة عالية من الاندماجات، فإنها غير سامة، وتعطى نتائج يمكن تكرارها.

وتتوفر - حالياً - أجهزة دمج البروتوبلاست على نطاق تجارى (عن Kao & Michayluk ١٩٨٩، و Bajaj ١٩٩٤، و Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

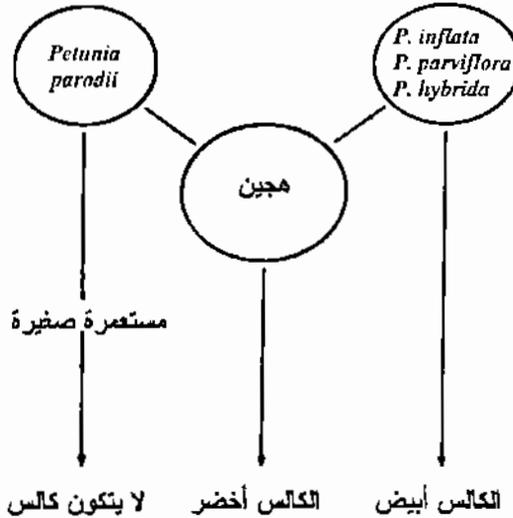
هذا .. وتندمج البروتوبلاستات الصغيرة الحجم بمعدلات أقل من معدلات اندماج البروتوبلاستات الكبيرة الحجم. كما تؤثر كثافة البروتوبلاست في معدل اندماجها وعلى قابليتها للزراعة في البيئات، حيث تخفض الكثافة العالية من معدل الاندماج (عن Grosser ١٩٩٤).

انتخاب الاندماجات البروتوبلاستية المرغوب فيها

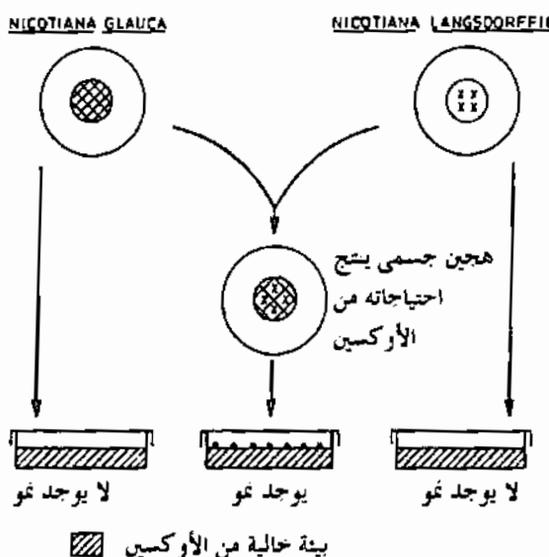
تمثل البروتوبلاستات المندمجة من الهجن الجسمية المرغوب فيها - عادة - أقل من ١٠٪ من الاندماجات الكلية، ويتعين بذل كثير من الوقت والجهد لأجل انتخاب الهجن الخلوية المرغوب فيها.

ومن بين الطرق الهائجة الأستعمال لتعقب ذلك المصدف، ما يلي:

- ١ - التعرف على الهجن الخلوية مورفولوجياً بعد اندماج خلايا تختلف مظهرياً أو تختلف في ألوان الصبغات التي تُعامل بها
- ٢ - ظهور قوة الهجين بالهجن الخلوية في مرحلة النمو الكالوسى
- ٣ - الاختلاف المورفولوجى شكل (٤-٦) أو الفسيولوجى (شكل ٤-٧) بين أنسجة نويات الأبوين والهجين بينهما فى المراحل التالية للمزارع (عن Waara & Glimelius، ١٩٩٥).
- ٤ - الطرد المركزى مع فصل الهجن على أساس الكثافة النوعية (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



شكل (٤-٦): طريقة انتخاب الخلايا الهجين بين النوع *Petunia parodii* وأى من الأنواع *P. inflata*، أو *P. parviflora*، أو *P. hybrida* باستعمال مزارع البروتوبلاست.



شكل (٤-٧): الانتخاب على أساس قدرة الهجين على إنتاج الأوكسين الذي يلزم لنموه، بينما يفتقر الأبوين لتلك الخاصية.

زراعة الهجن البروتوبلاستية المنتجة وتجديد نموها

يلى دمج البروتوبلاستات واختيار المرغوب منها زراعتها فى بيئة جديدة للسماح بتمثيل الجدر الخلوية وانقسام الخلايا المتكونة.

تقوم البروتوبلاستات المزروعة بتمثيل الجدر الخلوية فى خلال ١٠-٢٠ دقيقة من زراعتها، وتستكمل العملية فى نحو ٧٢ ساعة. وتمر الخلايا الجديدة المتكونة (الـ plastocytes) بأول انقسام لها بعد نحو ٢-٥ أيام وبعد نحو ٣-٤ أسابيع من التحضين تظهر مستعمرات بحجم رأس الدبوس تستمر فى الزيادة فى الحجم لتكون كالس، وهو الذى يتجدد منه النمو النباتى بعد نقله إلى بيئة جديدة (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

أمثلة متنوعة للهجن البعيدة الجسمية التى أمكن الحصول عليها بدمج البروتوبلاست

كان الهجين *Nicotiana tabacum* x *N. langsdorffii* هو أول هجين جسمي ينتج.

وذلك فى عام ١٩٧٢، وأعقب ذلك إنتاج عشرات من الهجن الجسمية الأخرى (عن Bajaj ١٩٨٩).

ولقد تم - فيما يلى - محدثًا من القوائم لعائلات تم فيها دمج البروتوبلاستات لأجل الحصول على هجن جسمية.

© قائمة Bhojwani & Razdan (١٩٨٣):

أولاً: أنواع متوافقة جنسيًا

عدد الكروموسومات فى الهجن

36, 34-54	<i>Daucus carota</i> (2n=18) + <i>D. capillifolius</i> (2n=18)
42	<i>Nicotiana glauca</i> (2n=24) + <i>N. langsdorffii</i> (2n=18)
56-64	
42, 28-183	
66, 71	<i>N. tabacum</i> (2n=48) + <i>N. alata</i> (2n=18)
72	<i>N. tabacum</i> (2n=48) + <i>N. glauca</i> (2n=24)
56-64	<i>N. tabacum</i> (2n=48) + <i>N. glutinosa</i> (2n=24)
66, 68, 72, 120, 104-115	<i>N. tabacum</i> (2n=48) + <i>N. knightiana</i> (2n=24)
48	<i>N. tabacum</i> (2n=24) + <i>N. otophora</i> (2n=24)
48, 46-96	<i>N. tabacum</i> (2n=24) + <i>N. sylvestris</i> (2n=24)
24, 48, 48-80	
48	
24-28	<i>Petunia parodii</i> (2n=14) + <i>P. hybrida</i> (2n=14)
28, ?	<i>P. parodii</i> (2n=14) + <i>P. inflata</i> (2n=14)
?	<i>Solanum tuberosum</i> (2n=24-84) + <i>S. chacoense</i> (2n=24)

ثانياً: أنواع غير متوافقة جنسيًا:

عدد الكروموسومات فى الهجن

72	<i>Datura innoxia</i> (2n = 24) + <i>D. candida</i> (2n = 24)
48, 72	<i>D. innoxia</i> (2n = 24) + <i>D. discolor</i> (2n = 24)
48, 72, 96, ?	<i>D. innoxia</i> (2n=24) + <i>D. sanguinea</i> (2n=24)
46, 48, 72	<i>D. innoxia</i> (2n=24) + <i>D. stramonium</i> (2n=24)
?	<i>Nicotiana sylvestris</i> + <i>N. knightiana</i>
72	<i>N. tabacum</i> (2n=24) + <i>N. nesophila</i> (2n=48)
96	<i>N. tabacum</i> (2n=48) + <i>N. nesophila</i> (2n=48)
72	<i>N. tabacum</i> (2n=24) + <i>N. stocktonii</i> (2n=48)
31, 36, 40	<i>Petunia parodii</i> (2n=14) + <i>P. parviflora</i> (2n=18)

نالتا هجين جسمية (بين أجناس مخلطة) intergeneric

55,60	<i>Arabidopsis thaliana</i> (2n=40) + <i>Brassica campestris</i> (2n=20)
?	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Lycopersicon</i> sp.
?	<i>Daucus carota</i> + <i>Aegopodium podagaria</i>
50-70	<i>Solanum tuberosum</i> (2n=24) + <i>Lycopersicon esculentum</i> (2n=24)
84-175	<i>Datura innoxia</i> (2n=48) + <i>Atropa belladonna</i> (2n=24)
19	<i>Daucus carota</i> (2n=18) + <i>Petroselinum hortense</i> (2n=22)

● قائمة Hanson وآخرون (1989)

L. esculentum cv San Marzano + *Solanum rickii* LA 1974

L. esculentum cv UC82B + *L. pennellii* LA 716

● قائمة Baja (1994)

حالات الدمج

المجموعة النباتية

البطاطس والبطاطم

Solanum tuberosum + *Lycopersicon esculentum*

S. tuberosum + *S. brevidens*

S. tuberosum + *S. chacoense*

S. tuberosum + *S. nigrum*

S. tuberosum + *S. phureja*

S. tuberosum + *S. torvum*

S. tuberosum + *Nicotiana tabacum*

S. tuberosum + *N. plumbaginifolia*

Solanum cybrids

Lycopersicon esculentum + *S. nigrum*

L. esculentum + *S. lycopersicoides*

L. esculentum + *S. rickii*

L. esculentum + *S. acaule*

L. esculentum + *S. peruvianum*

L. esculentum + *S. muricatum*

L. esculentum + *S. tuberosum*

L. esculentum + *S. peruvianum*

L. esculentum + *L. pennellii*

البقوليات والبذور الزيتية

Brassica napus + *B. campestris*
B. napus + *B. oleracea*
B. napus + *B. napus*
B. napus microfusion
B. napus resynthesis
B. oleracea + *B. campestris*
Moricandia arvensis + *B. oleracea*
B. oleracea + *B. napus*
B. napus + *B. nigra*
B. hirta + *B. napus*
Eruca sativa + *B. juncea*
Arabidopsis thaliana + *B. campestris*
A. thaliana + *B. napus*
Eruca sativa + *B. napus*
Sinapis turgida + *B. species*
S. alba + *B. napus*
Barbarea vulgaris + *B. napus*
Thlaspi perfoliatum + *B. napus*
Diplotaxis harra + *B. napus*
Brassica cybrids
Arachis hypogaea + *A. villosa*
Medicago sativa + *M. falconata*
M. sativa + *M. arborea*
M. sativa + *Lotus corniculatus*
Lotus corniculatus + *Glycine max*
Pisum sativum + *Oryza sativa*
P. sativum + *Triticum aestivum*
Trifolium rubens + *T. pratense*
T. pratense + *T. hybridum*
Vicia faba + *Petunia hybrida*

الحبوب الصغيرة والنجيليات

Oryza sativa + *Pisum sativum*
O. sativa + *Daucus carota*
O. sativa + *Echinochloa oryzicola*

O. sativa + *Glycine max*

O. sativa + wild species

O. sativa intraspecific somatic hybrids/cybrids

O. sativa male sterile hybrids

Zea mays + *Triticum* sect. *tritirigia*

Triticum aestivum + *Pisum sativum*

Triticum monococcum + *Pennisetum americanum*

Pennisetum americanum + *Panicum maximum*

Saccharum officinarum + *Pennisetum americanum*

Festuca arundinacea + *Lolium multiflorum*

Oryza sativa + *Porteresia coarctata*

الخضار

Daucus carota + *Petroselinum hortense*

D. carota + *D. capillifolious*

D. carota + *Oryza sativa*

D. carota + *Nicotiana tabacum*

Lactuca sativa + *L. serriola*

L. sativa + *L. virosa*

Solanum melongena + *S. sisymbriifolium*

S. melongena + *S. torvum*

S. melongena + *S. khasianum*

S. melongena + *Nicotiana tabacum*

S. melongena + *S. aethiopicum*

S. melongenu + *S. nigrum*

Cabbage + Chinese cabbage

Japanese radish + Cauliflower

Raphanus sativus + *B. oleracea*

الأشجار

Citrus sinensis + *Severinia disticha*

C. sinensis + *C. unshiu*

C. sinensis + *C. paradisi*

C. sinensis + *C. limon*

C. reticulata + *C. aurantium*

C. reticulata + *Citropis gilletiana*

C. unshiu + *C. jambhiri*

C. sudachi + *C. aurantifolia*
C. aurantifolia + *Feroniella lucida*
C. aurantifolia + *Swinglca glutinosa*
Citrus + *Microcitrus*
Carica candamarcensis + *C. papaya*
Datura tree species + *Datura herbaceous*
Populus + *Hibiscus sabariffa*
Populus Korcana + *Populus nigra*
Pyrus communis(*Prunus avium* × *pseudocerasvs*)

النباتات الطبية والعطرية ونباتات الزينة

Atropa belladonna + *Nicotiana plumbaginifolia*
A. belladonna + *Scopolia carniolica*
Datura innoxia + *D. stramonium*
D. innoxia + *A. belladonna*
Datura mutants
Dianthus species
Duboisia hopwoodi + *N. tabacum*
D. leichhardtii + *N. tabacum*
Hyoseyamus muticus + *N. tabacum*
N. tabacum + *N. knightiana*
N. tabacum + *N. sylvestris*
N. tabacum + *N. glutinosa*
N. tabacum + *N. debncyi*
N. tabacum + *N. repanda*
N. glauca + *N. langsdorfii*
N. glauca + *N. tabacum*
N. rustica + *N. tabacum*
N. sylvestris + *N. tabacum*
N. sylvestris + *N. rustica*
N. tabacum + *Petunia hybrida*
N. tabacum + *Daucus carota*
N. tabacum + *Glycine max*
N. glauca + *G. max*
N. tabacum + *Solanum melongena*
N. tabacum + *Hordeum vulgare*
N. tabacum + *Salpiglossis sinuata*

Tobacco cybrids
Petunia hybrida + *P. parodii*
P. hybrida + *N. tabacum*
P. hybrida + *Vicia faba*
P. inflata + *P. parodii*
Rauwolfia serpentina + *Vinca minor*
R. serpentina + *Rhazya stricta*
Solanum khasianum + *S. melongena*

النباتات الدنيئة

Algae
Zygnema + *Spriogyra*
Ulva pertusa + *U. conglobata*
Porphyra yezoensis + *P. pseudolinearis*
Enteromorpha + *Ulvaria*
Gracilaria chilensis + *G. tikvahiae*
Ulva + *Enteromorpha*
Porphyra yezoensis + *P. haitansis*
Bryophytes
Physcomitrella patens mutants
Funaria hygrometria wild-type mutants
Liverworts
Ferns
Pteridium aquilinum
Streptomycin-resistant + streptomycin-sensitive

ومن الأمثلة الأخرى ما يلي:

• أمكن الحصول على هجن جسمية رباعية التضاعف بدمج بروتوبلاستات الطماطم مع النوع *Solanum lycopersicoides* بطريقة الدمج الكيربائي. وقد أعطت النباتات الرباعية (2س = 4ن = 48) حبوب لقاح خصبة، أو أنتجت - بالتلقيح الذاتي - ثمارا احتوت على بذور كاملة الحيوية. كما تحملت غالبية النباتات الهجين المختبرة معاملة تعريض للبرودة تراوحت بين -3 إلى 3 ثم (Hossain وآخرون 1994)

• تعد السلالات العقيمة الذكر ذات أهمية بالغة في إنتاج هجن الأرز، وقد جرت محاولات لتحقيق ذلك الهدف عن طريق دمج البروتوبلاستات

• كذلك أمكن دمج بروتوبلاستات الجنسين *Microcitrus*، و *Citrus* معاً، علماً بأن الجنس الأول قد يعطى صفة العقم الذكري التي قد تقود إلى إنتاج ثمار بكرية العقد (عن Bajaz ١٩٩٤).

• أجرى Tang & Punja (١٩٨٩) دراسات مزارع البروتوبلاست اللازمة لزراعة، ودمج بروتوبلاست الخيار مع بروتوبلاست السلالة P.I. 292190 من النوع البري *Cucumis metuliferus* المقاومة لكل من نيماتودا تعقد الجذور، وفيرس موزايك الزوكيني الأصفر، وفيرس موزايك البطيخ رقم (١).

• كما أمكن نقل صفة المقاومة لمبيد الحشائش أترازين atrazine من محصول نفت الزيت إلى القنبيط، عن طريق دمج بروتوبلاست المحصولين معاً، ثم تعريض البروتوبلاست المندمج للأترازين وقد أنتجت الخلايا التي أمكنها البقاء نباتات قنبيط مقاومة للمبيد (HortScience - المجلد ٢٣ - العدد ٣).

• أجرى الأمر ذاته بالنسبة للطماطم، حيث هجنت مع النوع *Solanum nigrum* المقاوم للأترازين، مع التخلص من نواة النوع الأخير وسيتوبلازم الطماطم، وأمکن بذلك إنتاج سيبرد Cybrid يحتوى على الطماطم وسيتوبلازم *S. nigrum* الذى توجد به المقاومة للأترازين (عن Fobes ١٩٨٧).

• ومن بين الأنواع الجديدة من الصليبيات التي أمكن الحصول عليها بدمج بروتوبلاستات أجناس مختلفة، ما يلي:

<i>Arabidobrassica</i>	<i>Raphanobrassica</i>
<i>Erucobrassica</i>	<i>Thlasporassica</i>
<i>Barbareobrassica</i>	<i>Brassica naponigra</i>
<i>Brassica napooleracea</i>	

• كذلك أمكن دمج بروتوبلاست الباذنجان *Solanum melongena* مع بروتوبلاستات عديد من الأنواع الأخرى من الجنس *Solanum*، مثل النوع *S. sisymbriifolium* لنقل صفتى المقاومة لكل من نيماتودا تعقد الجذور والعنكبوت الأحمر، والنوع *S. torvum* لنقل صفة المقاومة لذبول فيرتسيليم، والنوع *S. nigrum* لنقل صفة المقاومة للأترازين.

• وفي البطاطس *S. tuberosum* أمكن الحصول على cybrids عديدة استخدمت فيها الأنواع المعطية (معطية للسيتوبلازم فقط) التالية. *S. etuberosum*، و *S. brevidens*، و *S. berthaultu*، علمًا بأن صفة العقم الذكري السيتوبلازمي قد أصبحت هدفًا هامًا في برامج التربية لأجل إنتاج هجن بذرية التكاثر (عن Bajaj 1994)

• أمكن باستخدام تقنية دمج البروتوبلاست (طريقة الدمج الكهربى electrofusion) إنتاج هجن جسمية جمعت بين الطماطم *Lycopersicon esculentum*، والبيبينو *pepino* (*Solanum muricatum*)، وقد تم بهذه الطريقة نقل عديد من صفات البينيو إلى الطماطم، ولكن النباتات المتحصل عليها كانت على درجة عالية من العقم، ولم تنتج أية ثمار بالتلقيح الذاتى، ولكن بتلقيحها رجعيًا إلى الطماطم أمكن إنتاج ثمارًا احتوت على بعض البذور، ولكنها كانت فاقدة القدرة على الإنبات (عن Sakamoto & Taguchi 1994)

• كذلك أمكن باستخدام تقنية دمج البروتوبلاست الجمع - في هجن جسمية - بين بروتوبلاست الباذنجان *Solanum melongena* وكلا من *S. khasianum*، و *S. torvum*، و *S. nigrum*، و *S. aethopicum*، و *Nicotiana tabacum*، و *Lycopersicon pennellii* (عن Sihachakr وآخريين 1994)

• أمكن كذلك - إعادة تركيب النوع *Brassica napus* باستخدام تقنية دمج بروتوبلاست *B. rapa* مع *B. oleracea* (عن Jourdan 1994).

• أمكن إنتاج هجين جسمى بين صنفين غير متوافقين جنسيًا من البطاطا، هما: *Koganesengan*، و *Bitambi*، وذلك لأول مرة، حيث كان الهجين وسطًا بين الأبوين في صفات لون وشكل الورقة، كما احتوت على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين [2n=12س (2n + 2n) = 180] (Wang وآخرون 1997)

الهجن السيتوبلازمية (السيبردز)

نجد في الهجن الجنسية أن الأم تكون هي المصدر الوحيد للسيتوبلازم في النبات الهجين، هذا بينما يسهم الأبوان بقدر متساو من السيتوبلازم في حالة الهجن الجسمية

ومع ذلك فإنه يمكن إنتاج هجنا جسميه يُحصل نهب على النواة من أحد الأبوين، بينما يحصل على نسيوبلازم من كليهما، وبهذا يسمح ما تعرف بالهجس نسيوبلازميه (cybrids) ومن خلال التحكم فى توزيع المادة الوراثيه لمُحصس عليها من أبوس فى مرحل المنكرة القالبية لاندماج البروتوبلاستات، فإنه يمكن توجيه توزيع حيث يتحصس على نسيوبلازم من أحد الأبوين بينما يُسهم النوع الآخر بالنواة فقط أو بكل من النواة والنسيوبلازم

وبد فقد تحول لاهتمام فى عملية دمج البروتوبلاست من محاولة إنتاج نباتات جديدته تمام من نس صفت معينة - يصعب نقلها بطرق تربيته العادية - من نوع آخر وتعصى هجس السبيرد (cybrids) - التى تحتوى على نواة من احد النوعين لمُحصس، ونسيوبلازم من كليهما - تعصى الفرصه للحصول على حاله من الخُلط الوراسى فى المادة الوراثيه غير النوويه هذا مع العلم بأن العضيات النسيوبلازمية مثل ميبوكوندرىب والكلوروبلاستيدات - تحتوى على mt-DNA و cp-DNA على التوالي، لدى يتحكم فى العمم الذكرى النسيوبلازمى، وجهاز البناء النسونى وكفاءته، وانزيمات ميميل الكريون. والمعومه بلاسرينوميسين

ومن اهم الطرق التى استخدمته فى إنتاج الـ cybrids، ما يلى:

١ - وقف نساط نواه أحد النوعين أو المخلص منهب بالتعريض لأسعة جاما، أو لأسعة إكس (٩-٥٠ كيلوراد)، أو بالترد المركزى خلال Percoll gradient، مع اتباع دت بلاندماج مع برويوبلاست كامل من النوع الآخر

٢ - دمج برويوبلاست طبيعى مع ما يعرف باسم subprotoplast أو microprotoplast

٣ - التخلص من كروموسومات أحد النوعين أثناء تكاثر الخلية الهجين بالمعاملة بملركب indoacetate الذى يؤدى إلى تثبط الهيئة الكروموسومية النووية

٤ - استعمال الطفرات ومضادات الأيض (عن Bajaj ١٩٩٤، و Chahal & Gosal

(٢٠٠٢)

عند اللجوء الى الدمج مع التعريض لأسعة جاما (gamma fusion) يوقف نشاط

أحد النوعين (المعطى) بالتعريض لجرعة مميتة أو شبه مميتة من أشعة جاما قبل دمجها مع النوع الآخر (المستقبل). تؤدي تلك المعاملة إلى توجيه عملية التخلص من كروموسومات النوع المعطى - فقط - عند دمج بروتوبلاستات النوعين معاً.

وقد أمكن باتتباع هذه الطريقة الحصول على عدد من الهجن غير المتساوقة (asymmetric hybrids) - أى التى لا تحتوى على جرعات متماثلة من المادة الوراثية للنوعين المدمجين معاً - مثل:

Daucus + Petroselinum

Physalis + Datura

Hyoscyamus + Nicotiana

Daucus + Nicotiana

Atropa + Nicotiana

Citrus cybrids

Potato cybrids

Nicotiana cybrids

Brassicac cybrids

وفى التبغ .. أمكن الحصول على سلالات عقيمة الذكر سيتوبلازمياً فى خطوة واحدة، بينما يتطلب إنتاجها بطرق التربية التقليدية بين ثلاث إلى أربع سنوات (عن Bajaj ١٩٩٤).

ويعنى ذلك أنه يمكن عن طريق إنتاج الهجن السيتوبلازمية التى تحتوى على نواة أحد الأبوين وسيتوبلازم الأب الآخر الاستغناء عن نحو ٨-١٢ جيلاً من التلقيحات الرجعية التى يتحتم عملها عند الرغبة فى نقل صفة سيتوبلازمية من أحد التراكيب الوراثية إلى تركيب وراثى آخر (جدول ٤-٨). ومن أمثلة ذلك صفتى: العقم الذكري السيتوبلازمى (فى الأرز، والطماطم، والكرنبيات، والتبغ)، والمقاومة لبعض مبيدات الحشائش مثل الأترازين (فى *Brassica napus* الذى نقلت إليه من *B. campestris*).

الصفة المنقولة		المجين الجسدي	
		صفات المقاومة للأمراض والآفات وتحمل الظروف القياسية	
Tobacco mosaic virus	فيروس موزايك التبغ	<i>Nicotiana tabacum</i>	+ <i>N. nesophila</i>
Potato virus X	فيروس إكس البطاطس	<i>Solanum tuberosum</i>	+ <i>S. chacoense</i>
Tobacco horn worm	دودة التبغ القرنية	<i>N. tabacum</i>	+ <i>N. nesophila</i>
Potato leaf roll virus	الندوة المتأخرة وفيروس التفاف أوراق البطاطس وفيروس واي البطاطس	<i>S. tuberosum</i>	+ <i>S. brevicens</i>
Late blight, PLRV and Potato virus Y			
<i>Phytophthora</i>	الفيثوفتورا	<i>S. circalifolium</i>	+ <i>S. tuberosum</i>
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	الذبول البكتيري	<i>S. melongena</i>	+ <i>S. sanitwongsei</i>
Frost tolerance	تحمل الصقيع	<i>S. tuberosum</i>	+ <i>S. commersonii</i>
<i>Phoma lingam</i>	قاعدة الساق السوداء	<i>B. napus</i>	+ <i>B. nigra</i>
<i>Alternaria brassicaceae</i>	القرناريا	<i>B. oleracea</i>	+ <i>Sinapis alba</i>
<i>Alternaria brassicaceae</i>	القرناريا	<i>B. napus</i>	+ <i>Sinapis alba</i>
<i>Phytophthora</i>	فيثوفتورا	<i>Citrus sinensis</i>	+ <i>Poncirus trifoliata</i>
TMV, spotted wilt virus, cold tolerance	فيروس موزايك التبغ . وفيروس الذبول والتبقع . وتحمل البرودة	<i>Lycopersicon esculentum</i>	+ <i>L. peruvianum</i>
Cold tolerance	تحمل البرودة	<i>S. lycopersicoide</i>	+ <i>L. esculentum</i>
Tomato diseases and insect pests	بعض أمراض وآفات الطماطم	<i>Solanum ochroleanthum</i>	+ <i>L. esculentum</i>
Black rot (<i>Xanthomonas campestris</i>)	العفن الأسود	<i>Brassica oleracea</i>	+ <i>B. napus</i>
Cold tolerance	تحمل البرودة	<i>B. oleracea</i> spp. <i>capitata</i>	+ <i>B. oleracea</i> (Ogura CMS line)
Frost tolerance	تحمل الصقيع	<i>S. tuberosum</i>	+ <i>S. commersonii</i>
Club root disease	الجزر الصولجاني	<i>R. sativa</i> (Japanese radish)	+ <i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>
<i>Alternaria brassicicola</i> and <i>Phoma lingam</i>	القرناريا وقاعدة الساق السوداء	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i>	+ <i>S. alba</i> + <i>B. carinata</i>
Club root resistance	الجزر الصولجاني	<i>Citullus lanatus</i>	+ <i>Cucumis melo</i>

الصفة المتوفرة	المصدر الجيني
Frost and salt tolerance	+ <i>Daucus carota</i>
Nematode	+ <i>S. sisymbirifolium</i>
Nematode	+ <i>S. bulbocastanum</i>
Root knot nematode	+ <i>S. bulbocastanum</i>
Beet cyst nematode	+ <i>Brassica napus</i>
Beet cyst nematode	+ <i>R. sativus</i> + <i>B. napus</i>
High nicotine content	صفات الجودة
Low erucic acid	+ <i>N. tabacum</i>
	+ <i>Eruca sativa</i>
	الصفات الزراعية:
Streptomycin resistance	+ <i>N. sylvestris</i>
Triazine resistance	+ <i>S. tuberosum</i>
Triazine resistance	+ <i>B. napus</i>
Hygromycin resistance	+ <i>N. sylvestris</i>
Triazine resistance	+ <i>B. napus</i>
CMS	+ <i>N. sylvestris</i>
CMS	+ <i>B. napus</i>
CMS	+ <i>N. sylvestris</i>
CMS and Triazine resistance	+ <i>Raphanus sativa</i>
	الترايازين
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي ومقاومة الترايازين
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي
CMS	المقم الذكري السيئوبلازمي

ومن بين الأمثلة الأخرى على هجين السوبردز، ما يلي:

• أمكن دمج بروتوبلاست خلايا الميزوفيل في كل من نوع الطماطم البري *Lycopersicon pennellii* مع بطاطس أحادية مضاعفة *dihaploid* من صنف نيكولا، بهدف نعل صفة تحمل الملوحة من *L. pennellii* إلى البطاطس وقد أنتجت النباتات الهجين أزهاراً وسيقاناً أرضية قصيرة ودرنات مشوهة، ولكنها كانت على درجة عالية من العمق، حيث تراوحت حيوية حبوب اللقاح التي أنتجتها بين ٣٪، و ٧٪ وقد تبين من اختبارات تحمل الملوحة أن الهجين أظهر ٥٠٪ من قدرة *L. pennellii* على تحمل الملوحة، بينما لم تنمو نباتات البطاطس مطلقاً تحت ظروف الملوحة (Sherraf وآخرون ١٩٩٤)

• أما هجين الطماطم مع البطاطس فقد ظهرت به بعض صفات الأبوين، رغم أنه كان أقرب دائماً إلى أحدهما ولذا فقد أطلق على الهجين اسم *topato*، أو *pomato* حسبما تكون صفاته، أقرب إلى الطماطم. أو إلى البطاطس، على التوالي وقد تكونت لبعض النباتات الهجين درنات صغيرة بيضاء اللون، وأزهار، وثمار، صفراء اللون، لها نكهة الطماطم، إلا أن جميع الأزهار كانت عقيمة، وكانت الثمار خالية من البذور (عن Gaynor & Kaur-Shawney ١٩٨٥).

• استخدمت تقنية دمج البروتوبلاست في الحصول على هجين سيتوبلازم (سيبرد) *cybrids* بعيدة جداً — مثل الهجين بين الجزر (وهو من ذوات الفلقتين)، والأرز (وهو من ذوات الفلقة الواحدة) — وذلك بعد تعريض بروتوبلاستات الجزر — قبل استعمالها في عملية الدمج — لأشعة إكس وقد احتوى الهجين الناتج على الهيئة الكروموسومية للأرز مع سيتوبلازم من كل من الأرز والجزر (Kisaka وآخرون ١٩٩٤)

هذا وتجدر الإشارة إلى أن نجاح عملية نقل الكلوروبلاستيدات من أحد الأنواع إلى سيبردز *cybrids* يرتبط سلبياً مع الـ *phylogenetic distance* (وهي المسافة التي تفصل النوعين المعنيين عن بعضهما وراثياً، والتي تقدر بالتحليل الوراثي). ولذا فإنه بينما لا يمكن نقل كلوروبلاستيدات بعض أنواع الجنس *Solanum* البعيدة جداً عن البطاطس إلى *cybrids* البطاطس، فإن كلوروبلاستيدات الأنواع الأقل بعداً عن البطاطس يمكن نقلها، وتكون فعالة في *cybrids* البطاطس (عن Galun وآخرين ١٩٩٤).