الاستعانة بالمجهر . ويكتمل نمو الأجنة بعد زراعتها ، ثم تنمو معطية نباتات صغيرة ، يتم نقلها بعناية إلى أصص معقمة . وجدير بالذكر أن الأجنة الصغيرة لاتكمل تكوينها ، وإنما تنمو إلى كالس فى بعض الحالات ، ثم تتميز فيه بعد ذلك نباتات صغيرة . يحدث ذلك – على سبيل المثال – فى الذرة إذا زرعت الأجنة بعد حوالى ١٨ يوما من التلقيح .

وقد تمكن Harberd (١٩٦٩) من زراعة أجنة بعض الهجن النوعية فى الجنس *Brassica* بطريقة سهلة ، إذ قام بحصاد مبايض الأزهار الملقحة فى الوقت المناسب ، وعقّمها سطحيًا ، وقطعها طوليًا ، ثم نقلها إلى بيئة مغذية على جهاز هزاز . أدت الحركة الدائمة للبيئة المغذية إلى خروج عدد من الأجنة من المبايض ؛ حيث نمت فى البيئة المغذية بدرجة مماثلة لما يحدث عند اتباع الطرق الأخرى الأكثر صعوبة .

وأمكن كذلك زراعة أجنة الهجين النوعى *Lycopersicon esculentum* x *L. peruvianum* قبل اكتمال تكوينها بزراعة البنور غير المكتملة التكوين المحتوية على هذه الأجنة فى بيئة خاصة . أنتجت البنور نسيج كالس ، تميزت فيه نباتات كانت ثنائية أو رباعية المجموعة الكروموسومية ؛ مما يدل على أنها لم تنشأ من نسيج الإندوسبرم الثلاثى . كما استدل على أن هذه النباتات كانت هجنا نوعية من صفات النوع *L. peruvianum* الذى استخدم كمصدر لحبوب اللقاح ، التى ظهرت فى الهجن ؛ مثل : وجود صبغة الأنثوسيانين (حيث استخدمت سلالة من الطماطم خالية من الأنثوسيانين كأم فى التهجين) ، وشكل الأوراق ، والأزهار ، والثمار ، بالإضافة إلى عقم النباتات الهجين (Thomas & Pratt ١٩٨٢) . ولمزيد من التفاصيل عن مزارع الأجنة .. يراجع Raghavan (١٩٨٠) .

مزارع البروتوبلازم

تعد مزارع البروتوبلازم Protoplast Culture (مزارع الخلايا بدون جدرها السيلولوزية) ضرورية لكل من عملية دمج البروتوبلازم Protoplasm fusion – عند الرغبة فى إجراء تهجينات نوعية بعيدة – وعملية إدخال أجزاء غريبة من الحامض النووى دى إن أى DNA ، أو عضيّات خلوية Cell Organells أو بكتيريا ، أو فيروسات معينة فى حالات

الهندسة الوراثية . ومن الضرورى – لتحقيق ذلك – عزل البروتوبلازم عن الجدار الخلوى ، وزراعته فى بيئة تسمح بتكاثره ، ثم بتميز نباتات كاملة منه .

يفصل الجدار الخلوى السيليلوزى عن البروتوبلازم بسهولة ؛ بواسطة إنزيم السليولين Cellulase الذى يحضر من مزارع الفطر *Myrothecium verrucaria* . وقد ظهرت منذ عام ١٩٦٨ تحضيرات تجارية من إنزيمى ماسيروزيم macerozyme ، وسليولين ، واستخدمت بتعريض قطع من النسيج النباتى للإنزيم الأول – ماسيروزيم – لفصل الخلايا عن بعضها ، ثم إضافة الإنزيم الثانى – سليولين – لهضم الجدر الخلوية ، ولكن تفضل إضافتهما معًا فى آن واحد .

وقد ظهرت بعد ذلك عدة تحضيرات تجارية أخرى من الإنزيمات التى تستخدم فى مزارع البروتوبلازم (جدول ١٧-١٢) . وأمكن بواسطة هذه الإنزيمات فصل البروتوبلازم عن الجدار الخلوى فى أية خلية نباتية لم تتلجنن جدرها ، أيًا كان النسيج الذى أخذت منه . ويعد إنزيم بكتنيز Pectinase ضروريًا لتحليل الصفيحة الوسطى وفصل الخلايا عن بعضها .

تعد الأوراق حديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلازم . يُطَهر 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 .

تتشابه بيئات مزارع البروتوبلازم مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير ، وتفضل البيئات السائلة ، مع مراعاة الدقة فى ضبط الضغط الآسموزى للبيئة . بيدأ تمثيل الجدر الخلوية حول البروتوبلازم بمجرد فصل الإنزيمات عنه . ويظهر أول الدلائل على تكوين الجدر السيليلوزية بعد نحو ٢ – ٤ أيام من زراعة البروتوبلازم ، بينما تبدأ معظم الانقسامات الخلوية بعد ٧ – ١٤ يوماً من الزراعة ، ويؤدى ذلك إلى تكوين نسيج كالس . ويبين جدول (١٧-١٣) تركيب إحدى البيئات المستخدمة فى مزارع البروتوبلازم .

جدول (١٧ – ١٢) : بعض الإنزيمات المتوفرة تجارياً ، والتي تستخدم في عزل البروتوبلازم .

الإنزيم	الكائن المنتج للإنزيم	الشركة المنتجة
Cellulase R-10	*Trichoderma viride*	Kinki Yokult Mfg. Co. Ltd., 8-12, Shingikancho, Nishinomiya, Japan
Meicelase-P	*Trichoderma viride*	Meiji Seiki Kaisha Ltd., No. 8, 2-Chome, Kyobashi, Chuo-Ku, Japan
Hemicellulase H-2125	*Rhizopus* sp.	Sigma, München
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.	Kinki Yokult Mfg. Co. Ltd.
Pectinase (purified)	*Aspergillus niger*	Sigma Chem. Co., P.O. Box 14508, St. Louis, MO 63178, U.S.A.
Pectolyase Y23	*Aspergillus japonicus*	Seishin Pharm. Co. Ltd. 9-500-1, Nagareyama, Nagareyama-shi, Chiba-ken, Japan
Pectinol	*Aspergillus* sp.	Rohm and Haas Co. Independence Hall West, Philadelphia, PA 19105, U.S.A.
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*	Sigma Chem. Co.
Driselase	*Irpex lactes*	Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd., Tokyo, Japan

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

ولمزيد من التفاصيل عن مزارع البروتوبلازم .. يراجع Vasil (١٩٧٦) ، و Hanke (١٩٨٠) ، و Vasil & Vasil (١٩٨٠) و Power & Chapman (١٩٨٥) .

جدول (١٧ – ١٣) : بيئة لزراعة البروتوبلازم .

المكونات	الكمية (مجم / لتر)	المكونات	الكمية (مجم / لتر)
Mineral salt			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2 \cdot 2\,H_2O$	600	$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.00
$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$	300	$ZnSO_4 \cdot 7\,H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4 \cdot 2\,H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4 \cdot 5\,H_2O$	0.025
Sequestrene 330 Fe[c]	28	$CoCl_2 \cdot 6\,H_2O$	0.025
Sugars			
Glucose	68 400	Mannose	125
Sucrose	125	Rhamnose	125
Fructose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Mannitol	125
Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH_4OH)			
Sodium pyruvate	5	Malic acid	10
Citric acid	10	Fumaric acid	10
Vitamins			
Inositol	100	Biotin	0.005
Nicotinamide	1	Choline chloride	0.5
Pyridoxine-HCl	1	Riboflavin	0.1
Thiamine-HCl	10	Ascorbic acid	1
D-Calcium pantothenate	0.5	Vitamin A	0.005
Folic acid	0.2	Vitamin D_3	0.005
p-Aminobenzoic acid	0.01	Vitamin B_{12}	0.01
Hormones	Soybean x barley	Soybean x pea or *N. glauca*	
2,4-D	1	0.2	
Zeatin	0.1	0.5	
NAA	—	1	
Vitamin-free casamino acid[d]	125 mg l^{-1}		
Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)	10 ml l^{-1}		