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.

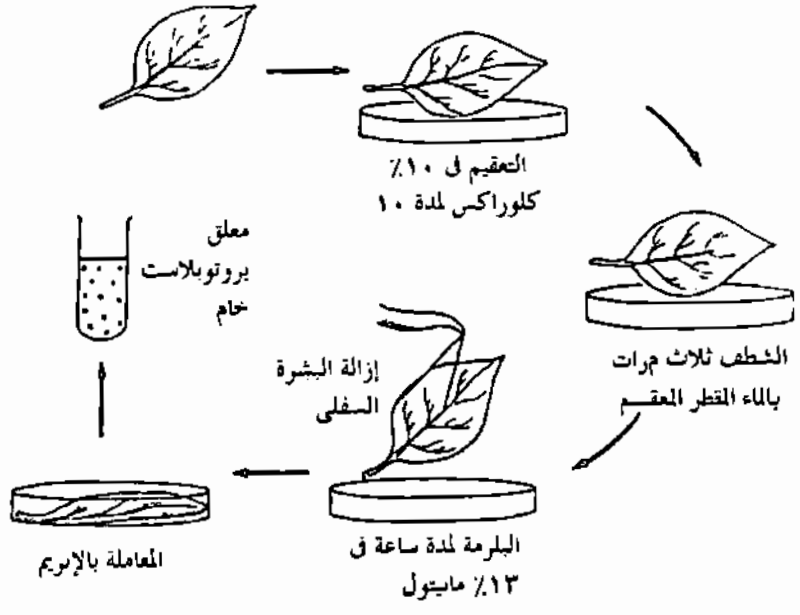
أما مزارع الكالس أو معلقات الخلايا التى تستعمل فى عزل البروتوبلاست فإنها

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

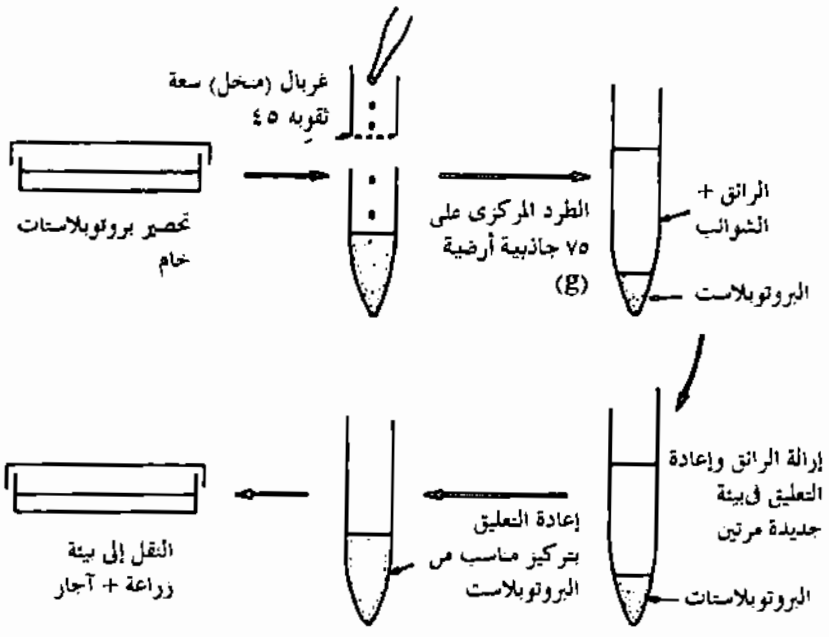
تحضير البروتوبلاست الخام وتنقيته

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



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



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

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

ونوضح فى جدول (٤-١) الظروف المثلى التى تلزم لعزل بروتوبلاست نوعين نباتيين

الإنزيمات المستعملة فى هضم الجدر الخلوية

يتضمن عزل البروتوبلاست بطريقة هضم الجدر الخلوية استعمال إنزيمات السيليوليز cellulase والهيميسيليوليز hemicellulase، والبكتينيز pectinase، وهى التى يُتحصل عليها من مصادر مختلفة، مثل: الفطريات، والقواقع (الحلزونات)، ومعى النمل

الأبيض تتوفر هذه الإنزيمات تجاريًا بتحضيرات مختلفة على درجات متباينة من النقاوة. يجرى الهضم بتوافيق مختلفة من تلك الإنزيمات فى pH يتراوح بين ٥٠، و ٨٠ لمدة ٣-١٨ ساعة. وبعد ذلك تُجمع البروتوبلاستات وتنقى بالطرد المركزى لفصلها عن بقايا الخلايا (عن Verlleux وآخرين ٢٠٠٥).

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

المادة أو الظروف أو العملية	مزرعة خلايا تبغ	خلايا النسيج الوسطى للنجيليات
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	٪٠٥
Hemi-cellulase	—	٪١
pH المحلول الإنزيمى	٤,٧ أو ٥,٧	٥,٤-٤,٦
حجم المحلول الإنزيمى/الوزن الطازج للنسيج	١٠ مل/جم	١٠ مل/جم
فترة الحضانة	٢-٣ ساعة	٢ ساعة
حرارة التحضين	٢٢-٣٧م	٢٠-٢٥م
معدل الرج الدورانى	٥٠ دورة/دقيقة	٨٠ دورة/دقيقة
المنظم الإسموزى	٣٠٠-٨٠٠ ملى مانيتول/لتر	٦٠٠ ملى مول سوربيتول/لتر

هذا ويجب استخدام أفضل التحضيرات الإنزيمية من بين تلك المستخدمة فى 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 الشدّ الذى يتعرض له البروتوبلاست أثناء عزله، وبذا تزداد حيويته

ويعطى جدول (٤-٢) أمثلة لبعض مخاليط الإنزيمات، والـ pH، والمحاليل الأسموزية التى استخدمت فى عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية.

جدول (٤-٢): أمثلة لبعض مخاليط الإنزيمات، والـ pH، والمحاليل الإسموزية التى استخدمت فى عزل بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية (عـن Mantell وآخرين ١٩٨٥).

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

ويبين جدول (٤-٣) عددًا من التحضيرات التجارية للإنزيمات المستعملة فى هضم الجدر الخلوية وأمكن بواسطة هذه الإنزيمات فصل البروتوبلاست عن الجدار الخلوى فى أية خليه نباتية لم تتلجنن جدرها، أيًا كان النسيج الذى أخذت منه، ويعد إنزيم بكتنيز pectinase ضروريًا لتحليل الصفيحة الوسطى وفصل الخلايا عن بعضها (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)

جدول (٤-٣) بعض الإنزيمات المتوفرة تجاريًا، والتى تستخدم فى عزل البروتوبلاست (عن Bohjwani & Razdan ١٩٨٣)

الإنزيم	الكائن المنتج للإنزيم
Cellulase R-10	*Trichoderma viride*
Meicclase-P	*Trichoderma viride*
Hemicellulase H-2125	*Rhizopus* sp.
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.
Pectinase (purified)	*Aspergillus niger*
Pectolyase Y23	*Aspergillus japonicus*
Pectinol	*Aspergillus* sp.
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*
Driselase	*Irpex lactes*

ومن بين التحضيرات الإنزيمية التجارية الأخرى الـ helicase، والـ cellulysm، والـ rhozyme

هذا ويجب تحديد جودة التحضيرات الإنزيمية، والكميات التى تتعين استخدامها منها، والمدة التى تلزم تعريض البروتوبلاست لها. والتركيز المناسب من المركبات التى تستخدم فى التحكم الأسموزى (osmoticum) تحديد كل ذلك تجريبيًا

هذا مع العلم بأن زيادة التعرض للإنزيمات قد يضعف الأغشية البروتوبلازمية ويقلل حيوية البروتوبلاست ويمكن أحيانًا تقليل الإضرار بالبروتوبلاست بزيادة تركيز الـ osmoticum ويفيد الرج الهادئ باستعمال رجّاج دوار على سرعة بطيئة (٢٥-٥٠ دورة فى الدقيقة) فى تحرير البروتوبلاستات ويفضل إجراء عملية عزل البروتوبلاست فى الظلام على حرارة ٢٥-٢٨م، وهى الظروف التى تسمح بزيادة نشاط الإنزيمات، مع

الاحتفاظ بحيوية البروتوبلاستات، علما بأن البروتوبلاستات تعد حساسة للضوء (عن Grosser ١٩٩٤)

بيئات مزارع البروتوبلاست

تتشابه بيئات مزارع البروتوبلاست مع بيئات مزارع الخلايا إلى حد كبير، وتفضل البيئات السائلة، مع مراعاة الدقة فى ضبط الضغط الإسموزى للبيئة ويبين جدول (٤-٤) تركيب إحدى البيئات لزراعة البروتوبلاست

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

ومن أهم مميزات الآجاروز - مقارنة بالآجار - ما يلى:

١ - تنخفض درجة ذوبان الأجاروز مقارنة بالآجار، وبالتالى تقل فرصة الإضرار بالبروتوبلاست

٢ - تكون كفاءة عملية الزراعة أعلى.

٣ يبقى البروتوبلاست فى وضع ثابت، وبالتالى يكون من الأسهل ملاحظته

٤ - لا يحدث تجمع وتكتلات للبروتوبلاست بدرجة حدوث ذلك على الآجار، وبالتالى يكون من الأسهل إجراء عملية انتخاب وإكثار البروتوبلاستات المفردة

تحضين المزارع وتجديد النمو

تجب زراعة البروتوبلاست بطريقة تسمح بأكبر قدر من التبادل الغازى، وذلك بجعلها 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 تعرضًا للجفاف.

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

الكمية (مجم/لتر)	المكونات	الكمية (مجم/لتر)	المكونات
			Mineral salt
0.75	KI	600	NH_4NO_3
3.00	H_3BO_3	1900	KNO_3
10.00	$MnSO_4.H_2O$	600	$CaCl_2.2H_2O$
2.00	$ZnSO_4.7H_2O$	300	$MgSO_4.7H_2O$
0.25	$Na_2MoO_4.2H_2O$	170	KH_2PO_4
0.025	$CuSO_4.5H_2O$	300	KCl
0.025	$CoCl_2.6H_2O$	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_4OH)
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_3	0.2	Folic acid
0.1	Vitamin B_{12}	0.01	*p*-Aminobenzoic acid
Soybean × pea or *N. glauca*		Soybean × barley	Hormones
0.2		1	2,4-D
0.5		0.1	Zeatin
1		--	NAA
		125 mg l^{-1}	Vitamin-free casamino acid
		10 ml l^{-1}	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 يومًا 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 أمرًا حتميًا 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: الفلفل، والبطاطس، والباذنجان، والتبغ، والبيتونيا، وأنواع أخرى قليلة من العائلات المركبة، والصليبية، والنجيلية، والزنبقية، والبقولية وغيرها.

ونقدم فى القائمة التالية بيانًا 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
Hemerocallis sp.
Leguminosae
Medicago sativa
Trifolium repens

Ranunculaceae
Ranunculus sceleratus
Rutaceae
Citrus sinensis
Solanaceae
Atropa belladonna
Capsicum annuum
Datura metel
D. meteloides
D. innoxia
Hyoscyamus 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. parodii
P. parviflora
P. violacea
Salpiglossis sinuata
Solanum chacoense
S. dulcamara
S. melongena
S. tuberosum
Umbelliferae
Daucus carota

ومن أهم الأنواع الخشبية التى نجح فيها تجديد النمو من مزارع البروتوبلاست ما يلى (عن Bajaj ١٩٨٩):

Citrus spp.
Santalum album
Pyrus communis
Ulmus spp.
Populus tremula
Liriodendendron tulipifera

أهمية مزارع البروتوبلاست

يستفاد من مزارع البروتوبلاست فى النواحى التالية:

١ — تعد مزارع البروتوبلاست أفضل من مزارع الخلايا الكاملة، ويجب استعمالها كبداية فى عمليات الإكثار وعزل السلالات الطفرية.

٢ — دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها معًا، وهو ما يعد وسيلة فعّالة لإجراء التهجينات البعيدة.

٣ — إدخال تراكيب مجهرية حية أو غير حية فى الخلايا النباتية، ويستفاد من ذلك فى دراسات الهندسة الوراثية.

٤ — إجراء الدراسات الفسيولوجية الخاصة بتمثيل الجدار الخلوى وخصائص الغشاء البلازمى.

٥ — إحداث الإصابة بالفيروسات بإدخالها فى البروتوبلاست مباشرة.

٦ — زراعة كلوروبلاستيدات نباتات عالية الكفاءة فى عملية البناء الضوئى فى بروتوبلاست نباتات منخفضة الكفاءة، ونقل الصفات المرتبطة بالكلوروبلاستيدات (مثل المقاومة لمبيد الحشائش اترازين atrazine فى اللفت) من نوع إلى آخر.

٧ — إدخال صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى فى النباتات (Vasil ١٩٧٦). (أمكن — على سبيل المثال — إدخال صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى بواسطة مزارع البروتوبلاست من النوع *Nicotiana tabacum* إلى *N. Sylvestris*، ومن *Petunia hybrida* إلى *P. Axillaris*؛ عن Sink ١٩٨٤).

٨ – الحصول على تباينات وراثية يمكن الاستفادة منها فى تحسين النباتات، خاصة الأنواع العقيمة منها التى لا تنتج بذورا. (أمكن فى البطاطس – على سبيل المثال – تجديد نمو أكثر من ١٠٠٠ سلالة clone من بروتوبلاست الميزوفيل للصنف رصت بيربانك Russet Burbank أظهرت مدى واسعًا من التباين فى شكل الدرنة، ولون الجلد، والمحصول، وغيرها من الصفات. ومن بين ٨٠٠ سلاله تم اختبارها انتخبت ٢٠ سلالة أظهرت مقاومة للفطر *Phytophthora infestans*. وقد تك مل هذه التباينات الوراثية المتحصل عليها من مزارع البروتوبلاست فى دراسات اجريت على أصناف أخرى من البطاطس، مثل: Fortyfold، و Bintje، و Majestic، عن Bajaj (١٩٨٩

وتعد مزارع البروتوبلاست المتحصل عليها من نباتات أحادية أكثر فائدة من م ارع الكالس الأحادى نظرا لثباتها الوراثى مقارنة بمزارع الكالس، ولأن كل بروتوب ت مُطفر يمكن أن يعطى نباتًا أحاديًا.

كذلك يمكن التعامل مع مزارع البروتوبلاست الأحادية كما لو كانت مزارع ميكروبية، حيث يمكن زراعتها فى أطباق بترى وتعريضها بأعداد كبيرة لمختلف العوامل المطفرة.

ولقد أمكن الحصول على طفرات متعددة فى مزارع البروتوبلاست الأحادى لعديد من الأنواع النباتية سواء أكانت لبروتوبلاستات الميزوفيل (كما فى النفت، والبيتونيا، والتبغ، والبطاطس)، أم لبروتوبلاست الكالس (كما فى الأرز القمح)، أم لبروتوبلاستات وحدات اللقاح الرباعية pollen tetrad protoplasts (كما فى الزمير، والتبغ، و لبيتونيه، والقمح)، أم فى بروتوبلاست حبوب اللقاح (كما فى التبغ، والبيتونيا، والقمح) (عن Bajaj ١٩٩٠)

هذا .. ويمكن حفظ مزارع البروتوبلاست فى النيتروجين السائل على -١٩٦م، ثم تجديد نموها بصورة عادية، ولا يختلف ذلك عما يحدث بالنسبة لمزارع معلقات الخلايا، إلاّ أن غياب الجدار الخلوى والروابط البروتوبلازمية plasmodesmata يجعل البروتوبلاست أكثر حساسية للتفجر bursting، الأمر الذى يتطلب إعطاء الأمر عناية أكبر – مقارنة بمزارع معلقات الخلايا – فيما يتعلق بكل من الضغط الإسموزى،

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

إندماج البروتوبلاست وإنتاج الهجن الجسمية

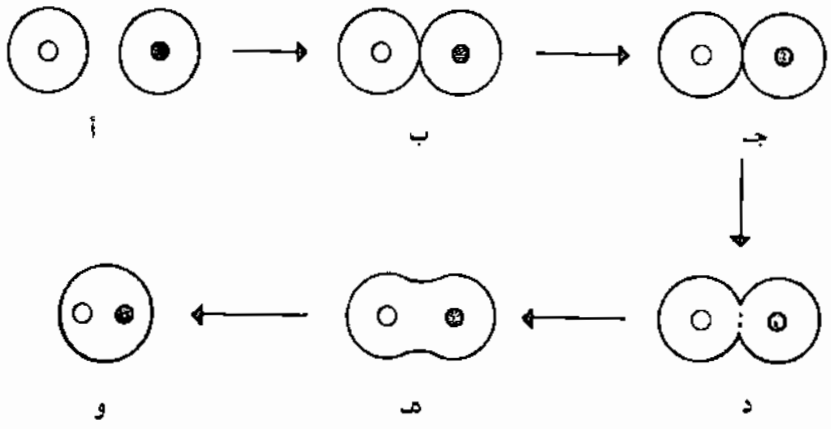
مقدمة

يحدث إندماج للبروتوبلاست Protoplasm Fusion بصورة تلقائية وطبيعيه فى مزارع البروتوبلاست المجهزة من خلايا نشطة فى الأنقسام ويحدث الإندماج باتساع الأغشية البروتوبلازمية المتجاورة والتحام الروابط البلازمية بينها، لتتكون بذلك وحدات بروتوبلازمية جديدة بكل منها من ٢-٤٠ نواة ويمكن تقليل حالات إندماج البروتوبلاست بوضع الخلايا المستخدمة فى إعداد مزارع البروتوبلاست فى سائل ذى ضغط إسموزى مرتفع، لبلزمتها بغرض قطع الروابط البروتوبلازمية

أما انتاج الهجن الجسميه somatic hybrids فيتطلب اندماج بروتوبلاست الأنواع التى يراد تهجينها. ويستلزم ذلك توفر عامل، أو وسيلة مناسبة لتحقيق الاندماج (fusogen) وقد جربت لذلك معاملات كثيرة أثبت بعضها نجاحا كبيرا فى تحفيز اندماج بروتوبلازم الأنواع البعيدة، مثل معاملات نترات الصوديوم، والـ pH المرتفع، والتركيز المرتفع لأيون الكالسيوم، والبوليثيلين 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 قليله، وتكون جدارًا خلويًا حول البروتوبلاست المندمج، ثم تدخل الخلية الهجين فى انقسامات ينشأ عنها تكون هجين جسمى Somatic Hybrid، وقد تنقسم كل نواة فى البروتوبلاست ذى النواتين منفصلة عن الأخرى، دون أن تشترك كروموسوماتها معا فى خيوط مغزل واحد، وتنشا عن ذلك حالات من الكيميرا. وقد تستمر الخلايا ذات النواتين المختلفتين فى إنتاج خلايا مماثله لعدة أجيال، دون أن تندمج النواتان معا وقد يحدث اندماج للنواتين فى الطور البينى

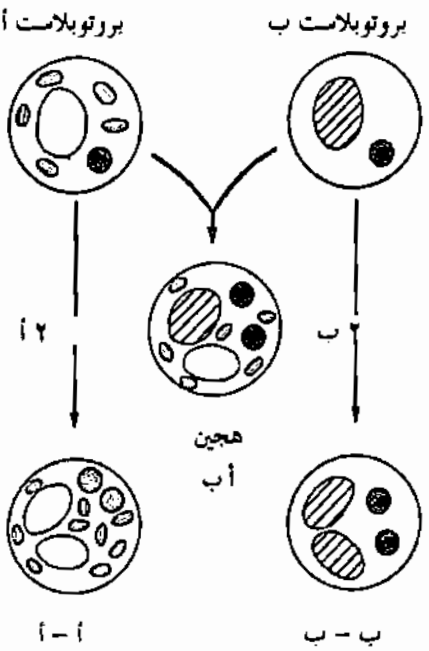
Interphase بين الانقسامات، ولكن هذا الاندماج لا يترتب عليه إنتاج خلية هجين قادرة على الاستمرار فى الانقسام (عن Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



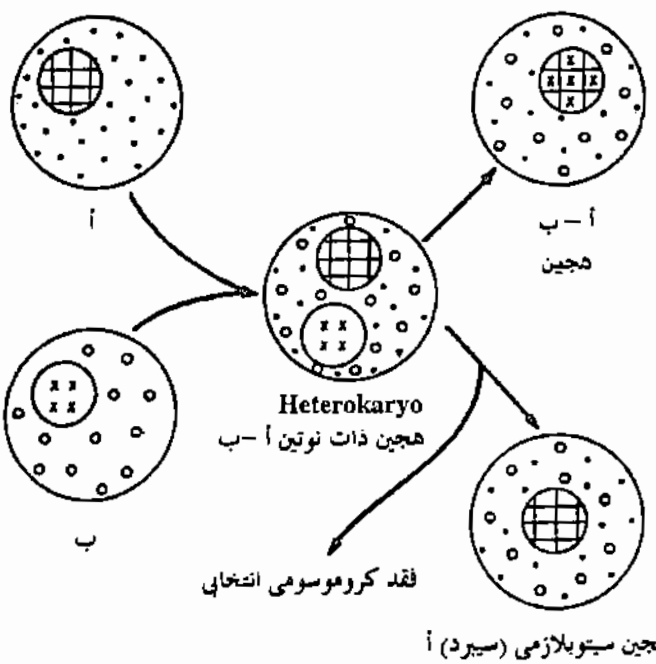
شكل (٤-٣) خطوات عملية اندماج البروتوبلاست لنوعين مختلفين. يبدأ الاندماج بتقارب البروتوبلاست كما فى الشكل (ب)، ثم اندماج الأغشية البروتوبلازمية فى مناطق محددة (كما فى الشكل جـ)، ويتهى بتكوين الخلية ذات النواتين المختلفتين **binucleate heterokaryon**.

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

هذا .. ولا يكون اندماج النواتين مفيدا فى إنتاج خلايا هجين hybrids إلا إذا حدث أثناء الانقسام الميتوزى وحتى إذا تكونت الخلايا الهجين فى أثناء الانقسام الميتوزى فإن إندماج النواتين لا يكون تامًا فى أغلب الحالات، وكثيرًا ما تستبعد الكروموسومات الخاصة بأحد النوعين المندمجين من الخلايا الهجين بعد عدة أشهر من الانقسام كما يحدث الشئ ذاته — غالبًا — بالنسبة لعضيّات الخلية. مثل البلاستيدات الخضراء. وقد تستبعد كروموسومات أحد النوعين، بينما تستبعد بلاستيدات النوع الآخر، ويعطى ذلك الفرصة لإنتاج خلايا لأحد النوعين المهجنين، وهى تحتوى على بلاستيدات النوع الآخر، ولنقل عوامل سيتوبلازمية (مثل العقم الذكرى) من نوع أو جنس إلى آخر وتعرف الهجن التى تحتوى على نواة من أحد الأنواع وسيتوبلازم من النوع الآخر، أو منهما معا باسم سيبرد Cybrds (شكل ٤-٥، Bhojwani & Razdan ١٩٨٣)



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



شكل (٤-٥): إنتاج هجين سيتوبلازمى (سيبرد cybrid؛ عن Dodds ١٩٨٥).

ويتطلب تهجين الخلايا الجسمية somatic cells، ما يلي:

١ – تخليص البروتوبلاست من الجدر الخلوية.

٢ – حث تلامس الأغشية البروتوبلازمية على المستوى الجزيئى، وكذلك حث التحلل والانهيار الجزئى المؤقت لتلك الأغشية؛ حتى تسمح باندماج البروتوبلاستات المستقلة.

٣ – التعرف على الهجن الجسيحة وانتخابها.

٤ – زراعة الهجن البروتوبلازمية فى بيئة صناعية

٥ – تجديد النمو النباتى من تلك الهجن (Kao & Michayluk ١٩٨٩).

أهمية التهجين الجسمى

يحقق التهجين الجسمى (دمج البروتوبلاست) المزايا التالية

١ – إمكان إنتاج هجن نوعية وجنسية جديدة بين نباتات يصعب أو يستحيل تهجينها جنسيًّا، فهى تتغلب على جميع مشاكل عدم التوافق الجنسى، فمثلاً أمكن دمج بروتوبلاست البطاطس مع بروتوبلاست الطماطم فى 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 تمامًا لم يكن لها وجود من قبل (جدول (٤–٦)

٢ – تفيد الهجن الجسمية – كثيرًا فى نقل جينات مرغوب فيها من نوع نباتى لآخر، مثل جينات المقاومة للأمراض والآفات، وتحمل الظروف البيئية القاسية. وصفات الجودة، والمقاومة لمبيدات الحشائش، والعقم الذكرى السيتوبلازمى . والأمثلة الناجحة على ذلك كثيرة جدًّا ومتنوعة (جدولا ٤–٨، و ٤–٩).

٣ – يمكن أن يستفاد من دمج البروتوبلاست كوسيلة بديلة للحصول على نباتات متضاعفة هجينيًّا

٤ – يمكن دمج بروتوبلاستات النباتات العقيمة جنسيًا (مثل الأحادية والثلاثية وذات التعدد الكروموسومى غير التام .. إلخ) .. يمكن دمجها معًا لإنتاج نباتات خصبة ثنائية ومتضاعفة

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

٦ — يتيح دمج الخلايا جسميًّا 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 برتوبلاستات بعض الأنواع النباتية.

الأنواع المندمجة وأعداد كروموسوماتها				عدد الكروموسومات فى الهجين الجسمى
B. campestris (2*n*=18)	+	*B. oleracea* (2*n*=18)		تباينات كثيرة
B. juncea (2*n*=36)	+	*B. napus* (2*n*=38)		تباينات كثيرة
D. stramonium (2*n*=24)	+	*Datura innoxia* (2*n*=24)		٤٦، ٤٨، ٧٢
N. glutinosa (2*n*=24)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)		٥٠–٥٨
N. nesophila (2*n*=48)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)		٩٦
N. sylvestris (2*n*=24)	+	*N. tabacum* (2*n*=48)		٧٢
L. peruvianum (2*n*=24)	+	*Lycopersicon esculentum* (2*n*=24)		٧٢
P. hybrida (2*n*=14)	+	*Petunia parodii* (2*n*=48)		٤٤–٤٨
S. chacoense (2*n* = 14)	+	*Solanum tuberosum* (2*n*=24, 48)		٦٠

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

الأنواع النباتية المهجنة جسميًّا وأعداد كروموسوماتها			الجنس الجديد
B. Oleracea (2*n* = 18)	+	*Raphanus sativus* (2*n*=18)	*Raphanobrassica*
Moricandia arvensis (2*n* = 27, 28)	+	*B. oleracea* 2*n* = 18)	*Moricandiobrassica*
B. napus (2*n* = 38)	+	*Eruca sativa* (2*n* = 22)	*Erucabrassica*
B. napus (2*n* = 38)	+	*Diplotaxis muralis* (2*n* = 42)	*Diplotaxobrassica*
Lycopersicon esulentum (2*n* = 24)	+	*Nicotiana tabacum* (2*n* = 24)	*Nicotiopersicon*
L. esculentum (2*n* = 24)	+	*Solanum tubersoum* (2*n* = 24)	*Solanopersicon*
Atropa belladana (2*n* = 24)	+	*Datura innoxia* (2*n*=48)	*Daturotrapa*
Echinochloa oryzicola (2*n* = 24)	+	*Oryza sativa* (2*n*=24)	*Oryzachloa*
B. campestris (2*n* = 20)	+	*Arabidopsis thaliana* (2*n* = 10)	*Arabidobrassica*

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

٨ – النقل الجزئى للمادة النووية من نوع نباتى 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) فى 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 الأصلى الذى كان يسعى إليه الباحثون من وراء دمج بروتوبلاست الأنواع النباتية المختلفة (وهو الحصول على أنواع جديدة تجمع بين صفات الآباء التى دمجت معًا) . على الرغم من أن هذا الهدف الأصلى لم يتحقق، إلا أن تلك الدراسات أثبتت أهمية دمج البروتوبلاست فى توفير تراكيب وراثية جديدة ليس لها نظير فى الطبيعة.

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

عملية، إلاّ أنها فتحت الطريق أمام احتمالات أخرى كثيرة، مثل دمج البروتوبلاستات الأحادية معًا، والبروتوبلاستات الأحادية مع الثنائية. كذلك أمكن دمج سلالات بطاطس ثنائية التضاعف وخليطة وراثيًا معا، وحُصِل على نباتات رباعية وخليطة وراثيًا، حيث أكثرت بسهولة خضريًا مع المحافظة على تركيبها الوراثى الخليط. ولقد فتحت الهجن السيتوبلازيمة (أو cybrids) مجالا واسعًا لنقل المادة الوراثية السيتوبلازمية من نوع لآخر مع احتفاظ الأخير بهيئته الكروموسومية النووية ومن بين الصفات الهامة التى يتحكم فيها جينات سيتوبلازمية — توجد فى البلاستيدات أو فى الميتوكوندريا — تلك الخاصة بالعقم الذكرى السيتوبلازمى، وبجهاز البناء الضوئى، ونقص الكلوروفيل، وإنزيمات تمثيل الكربون، ومقاومة الاستربتومايسين (عن Bajaj ١٩٨٩).

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

وقد أمكن — عن طريق دمج بروتوبلاست الأنواع البعيدة — معًا — فى مزارع البروتوبلاست — إنتاج أربعة أنواع من الهجن هى:

١ — هجن تحتوى على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين (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 برية إلى النوع المزروع، وتكثر خضريًا كما فى جنس البطاطس *Solanum*.

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

٤ — هجن تحتوى على نواة أحد الأنواع، وسيتوبلازم النوع الآخر، أو كلا النوعين المهجنين سبيرد Cybrids، عن Schieder ١٩٨٢.

وسائل تحفيز دمج البروتوبلاست

يمكن في واقع الأمر دمج بروتوبلاستات أي نوعين نباتيين، بل ان بروتوبلاستات لأنواع نباتيه يمكن دمجها مع بروتوبلاستات الأنواع الحيوانيه

ومن بين أهم الطرق التي اتبعت لأجل تحفيز اندماج البروتوبلاست، ما يلي:

١ الاندماج التلقائي

من المعروف ان اندماج البروتوبلاستات يحدث تلقائيًا أثناء التحلل الانزيمي لجدر الخلويه. وقد أرجع ذلك الى تمدد الروابط البروتوبلازميه بين البروتوبلاستات الخاصه بالخلايا مجاورة وقد لوحظ على سبيل المثال — أن ٢٥ من البروتوبلاستات المعزوله من خلال قرون الصويا المزروعة كانت عديدة الأنوية، وفي النوع *Vicia hajastana* كان متوسط عدد الأنوية بكل بروتوبلاست ٢٤٥ بينما تراوح المدى بين نواه واحده، و ٤٥ نواه كذلك وجد في إندوسبرم الذرة أن ٥٠ من البروتوبلاستات المعزولة طبيعيًا كانت متعدده الأنويه ويحتوى كل منها على نواتين إلى ٢٨ نواه

٢ طريقه ميكانيكية

عندما تمر البروتوبلاستات من خلال ماصه دقيقة ذات فتحة ضيقه جدا يحدث اندماج بمعدل، ولكن نسبه حدث الاندماج تكون منخفضه. ولذا فإن تلك الطريقه لم تعد شائعه

٣ رفع pH في وجود كالسيوم

يؤدى تواجد أيون كالسيوم عند pH مرتفع (١٠٥) الى تحفيز دمج البروتوبلاستات وفي هذه الطريقه يخلط البروتوبلاستات التي يُراد دمجها معا في محلول يحتوى على كلوريد كالسيوم $CaCl_2.2H_2O$ (٠٠٥ مولار)، وجليسين الصوديوم Na glycine (٠٠٥ مولار)، ومانيتول (٠٤ مولار) عند pH ١٠٥ يحفظ قرص البروتوبلاست لتتكون بعد إجراء الطرد المركزى على ٥٠ مثل الجاذبية لمدة ٣ دقائق يحفظ في حمام مائي على ٣١م لمدة ٤٠-٥٠ دقيقه حيث تحدث الاندماجات

٤ المعامله بنترات صوديوم

توضع البروتوبلاستات في مخلوط يتكون من نترات صوديوم (بنسبة ٥٥) وسكروز

(بنسبة ١٠٪) على ٣٥م لمدة ٥ دقائق. يؤدى الطرد المركزى بعد ذلك (على ٢٠٠ مثل الجاذبية) لمدة ٥ دقائق إلى ترسب البروتوبلاستات على صورة قرص يحفظ على ٣٠م لمدة ٣٠ دقيقة فى حمام مائى، حيث تحدث الاندماجات.

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

٥ — استخدام البروتينات:

يؤدى البروتين جيلاتين gelatin والنواتج الأولية لتحلله عندما يكون بتركيز ٢–٥٪ إلى إحداث تجمع يتسبب فى 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 فى دمج بروتوبلاستات الأنواع المختلفة بتعريضها لصدمة إسموزية معتدلة، وكان معدل الاندماج النوعى أقل من ١٪، وبمعدل حوالى ٠,١٪.

٨ — اندماج البروتوبلاستات بالدكستران وكبريتات الدكستران dextran sulfate:

أدت الدكسترانات ذات الوزن الجزيئى المرتفع (بتركيز ١٥٪) فى وجود الأملاح غير العضوية إلى حث تكتل البروتوبلاستات وإلى اندماجها بنسبة ١٠٪.

٩ — اندماج البروتوبلاستات بمساعدة الـ polyviny alchol (اختصارًا: PVA):

يمكن حث التصاق البروتوبلاستات واندماجها بالـ PVA، وتتكون أكثر المحاليل فاعلية فى 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 البوليثيلين جليكول polyethylene glycol (اختصارا PEG):

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

ويفضل لأجل الحصول على هجن جسمية حرة وطليقة — عند المعاملة بالبوليثيلين جليكول — دمج البروتوبلاست عند السطح البينى interface لمحلولين، فقد أدى دمج البروتوبلاست عند السطح البينى لكل من الـ PEG-sucrose (البوالثيلين جليكول مع السكروز)، ومحلول الجلوكوز، مع pH عال وصدمة أسموزية . أدى ذلك إلى إنتاج ٣٠٪ من الهجن الجسمية (الـ heterokaryocytes) الحرة والطليقة والعالية الحيوية

وتتلخص طريقة الـ PEG لدمج البروتوبلاست 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

جـ – 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 فى دمج البروتوبلاستات.

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

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

وتؤثر كثير من العوامل فى مدى كفاءة الـ PEG على حث التصاق البروتوبلاستات واندماجها، وفى حيوية البروتوبلاستات خليطة النوايا الناتجة عن الاندماج (الـ heterokaryocytes)، كما يلى:

أ — لا يحدث الالتصاق القوى للبروتوبلاستات، واندماجها بنسبة عالية إلاّ فى التركيزات العالية من الـ PEG.

ب – تزداد فاعلية الـ PEG فى التصاق البروتوبلاستات واندماجها بتزويد محلول الـ PEG بأيونات الكالسيوم. بينما تثبط تلك الفعلية فى وجود تركيزات عالية من البوتاسيوم أو الصوديوم فى الـ pH المرتفع هذا إلاّ أن توفر الكالسيوم بالقدر العالى الكافى يمكن أن يحدث معه الالتصق والاندماج حتى فى وجود تركيزات عالية من الصوديوم فى pH عال.

جـ - 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 إنزيميًا كذلك فإن التجديد السريع للجدر الخلوية قبل تعريض البروتوبلاستات لعامل الدمج fusogenic agent يمكن أن يقلل -- كذلك — من عملية الاندماج

هـ - تعرف تأثيرات ضارة للـ 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 ضررًا بكثير على البروتوبلاسات 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 دورًا هامًا فى اندماجها، فالكثافة يجب تنظيمها بحيث تحدث معظم الاندماجات بين بروتوبلاستين اثنين، مع خفض الاندماجات المتعددة للبروتوبلاسنات إلى أدنى مستوى ممكن. ومن بين تركيزات معلقات البروتوبلاستات التى استخدمت بنجاح ٥–١٠٪ (حجم/حجم) عند اتباع طريقة السطح البينى للـ PEG-sucrose والجلوكوز، و ٤–٥٪ (حجم/حجم) عند ترسيب

البروتوبلاستات على سطح صلب بطرق الـ PEG، و ٢-٨ × ١٠^٤/مل عند اتباع طريقة الدمج الكهربائى electrofusion

ح – توجد تباينات كثيرة بين البروتوبلاستات المتحصل عليها من مختلف الأنواع النباتية فى مدى تحملها للمعاملة بالإنزيمات ومستحثات الدمج.

١١ – الاندماج الكهربائى.

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

وباتباع هذه الطريقة أمكن إحداث اندماجات بنسبة ٨٠-١٠٠٪ فى عديد من الأنواع. بينما لم تتعد النسبة ١٠٪ إلاّ نادرًا عند اتباع الطرق الكيميائية وفى كثير من الحالات أظهرت البروتوبلاستات المندمجة كهربائيًا تجديدًا أفضل للنمو بعد زراعتها.

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

وتتوفر – حاليًا – 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 فى معدل اندماجها وعلى قابليتها للزراعة فى 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.

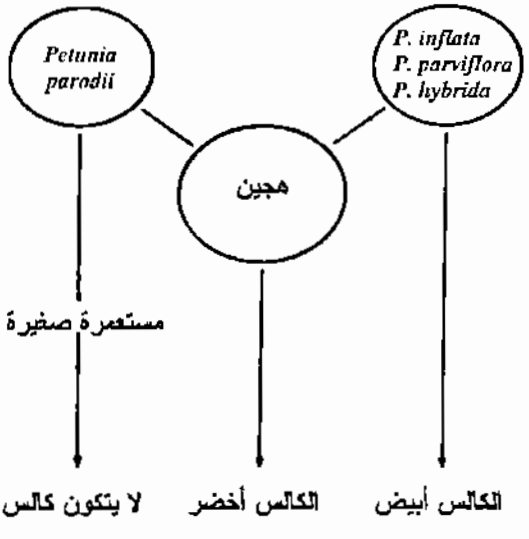
ومن بين الطرق الشائعة الاستعمال لتحقيق ذلك الهدف، ما يلي:

١ — التعرف على الهجن الخلوية مورفولوجيًا بعد اندماج خلايا تختلف مظهريًا أو تختلف فى ألوان الصبغات التى تُعامل بها

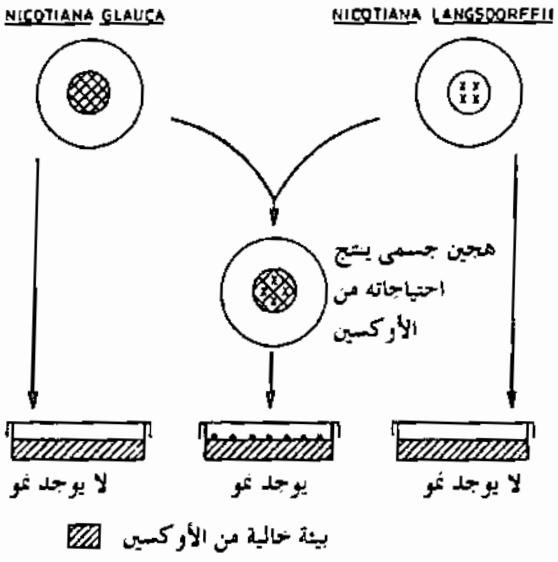
٢ — ظهور قوة الهجين بالهجن الخلوية فى مرحلة النمو الكالوسى

٣ — الاختلاف المورفولوجى شكل (٤–٦) أو الفسيولوجى (شكل ٤–٧) بين أنسجة نموات 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 الذى 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 المزورعة 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. langsdorfii* هو أول هجين جسمى ينتج.

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

ونقدم – فيما يلى – عددًا من القوائم لحالات تم فيها دمج البروتوبلاستات لأجل الحصول على هجن جسمية.

● قائمة Bhojwani & Razdan (١٩٨٣):

أولا: أنواع متوافقة جنسيًا

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

ثانيا: أنواع غير متوافقة جنسيًا:

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

ثالثا هجن جنسية (بين أجناس مختلفة) intergeneric

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

● قائمة Hanson وآخرون (١٩٨٩)

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

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

● قائمة Bajaj (١٩٩٤)

المجموعة النباتية	حالات الدمج
البطاطس والطماطم	
Solanum tuberosum + *Lycopersicon seculentum*	
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
Arabodopsis 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 + Tritieum 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 + Echinocloa 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*

الخضر

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 + *Nicatiana 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*
Hyoscyamus muticus + *N. tabacum*
N. tabacum + *N. knightiana*
N. tabacum + *N. sylvestris*
N. tabacum + *N. glutinosa*
N. tabacum + *N. debneyi*
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 يلى:

● أمكن الحصول على هجن جسمية رباعية التضاعف بدمج بروتوبلاستات الطماطم مع النوع *Solanum lycopersicoides* بطريقة الدمج الكهربائى. وقد أعطت النباتات الرباعية (٢س = ٤ن = ٤٨) حبوب لقاح خصبة، أو أنتجت — بالتلقيح الذاتى — ثمارا احتوت على بذور كاملة الحيوية. كما تحملت غالبية النباتات الهجين المختبرة معاملة تعريض للبرودة تراوحت بين −١٣ إلى ٣ ْم (Hossain وآخرون ١٩٩٤)

● تعد السلالات العقيمة الذكر ذات أهمية بالغة فى إنتاج هجن الأرز. وقد جرت محاولات لتحقيق ذلك الهدف عن طريق دمج البروتوبلاست

● كذلك أمكن دمج بروتوبلاستات الجنسين *Microcitrus*، و *Citrus* معًا، علمًا بأن الجنس الأول قد يعطى صفة العقم الذكرى التى قد تقود إلى إنتاج ثمار بكرية العقد (عن Bajaj ١٩٩٤).

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

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

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

● ومن بين الأنواع الجديدة من الصليبيات التى أمكن الحصول عليها بدمج بروتوبلاستات أجناس مختلفة، ما يلى:

Arabidobrassica	*Raphanobrassica*
Erucobrassica	*Thlaspobrassica*
Barbareobrassica	*Brassica napontgra*
Brassica napooleracea	

● 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 فيرتسيلليم، والنوع *S. nigrum* لنقل صفة المقاومة للأترازين.

● وفى 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 الذكرى السيتوبلازمى قد أصبحت هدفًا هامًا فى برامج التربية لأجل إنتاج هجن بذرية التكاثر (عن Bajaj ١٩٩٤)

● 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 ١٩٩٤)

● كذلك أمكن باستخدام تقنية دمج البروتوبلاست الجمع — فى هجن جسمية — بين بروتوبلاست الباذنجان *Solanum melongena* وكلا من *S. khasianum*، و *S torvum*، و *S. nigrum*، و *S. aethiopicum*، و *Nicotiana tabacum*، و *Lycopersicon pennellii* (عن Sihachakr وآخرين ١٩٩٤)

● أمكن كذلك — إعادة تركيب النوع *Brassica napus* باستخدام تقنية دمج بروتوبلاست *B. rapa* مع *B oleracea* (عن *Jourdan* ١٩٩٤).

● أمكن إنتاج هجين جسمى بين صنفين غير متوافقين جنسيًا من البطاطا، هما: *Koganesengan*، و *Bitambi*، وذلك لأول مرة، حيث كان الهجين وسطًا بين الأبوين فى صفات لون وشكل الورقة، كما احتوت على العدد الكامل لكروموسومات الأبوين [٢ن=١٢س (٢ن + ٢ن) = ١٨٠] (Wang وآخرون ١٩٩٧)

الهجن السيتوبلازمية (السيبردز)

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

ومع ذلك فانه يمكن انتاج هجنا جسميه يُحصل فيه على النواه من أحد الأبوين، بينما يحصل على السيتوبلازم من كليهما، وبذا يسمح ما تعرف بالهجن السيتوبلازميه cybrids، ومن خلال التحكم فى توريث المادة الوراثيه المحصل عليها من الأبوين فى المراحل المتأخرة لاندماج البروتوبلاستات، فإنه يمكن توجيه التوزيع بحيث يتحصل على السيتوبلازم من أحد الأبوين بينما يُسهم النوع الآخر بالنواة فقط أو بكل من النواه والسيتوبلازم

وبذا فقد تحول الاهتمام فى عملية دمج البروتوبلاست من محاولة إنتاج نباتات جديده تحمل فى نفس صفات معينة - يصعب نقلها بطرق التربيه العادية من نوع لآخر وتعنى هجن السيبرد cybrids -- التى تحتوى على نواة من احد النوعين المهجنين، والسيتوبلازم من كليهما — تعطى الفرصه للحصول على حالة من الخلط الوراثى فى المادة الوراثيه غير النوويه هذا مع العلم بأن العضيات السيتوبلازمية مثل الميتوكوندريات والكلوروبلاستيدات - تحتوى على mt-DNA، و cp-DNA على التوالى، لذى يتحكم فى العقم الذكرى السيتوبلازمى، وجهاز البناء الحوئى وكفاءته، وانزيمات تمثيل الكربون، والمقاومه للاستربتومايسين

ومن أهم الطرق التى استخدمت فى إنتاج الـ cybrids، ما يلى:

١ وقف نشاط نواه أحد النوعين أو المخلص منها بالتعريض لأشعة جاما، أو لأشعة إكس (٩-٥٠ كيلورد)، أو بالطرد المركزى خلال Percoll gradient، مع اتباع دمج بالاندماج مع بروتوبلاست كامل من النوع الآخر

٢ — دمج بروتوبلاست طبيعى مع ما يعرف باسم subprotoplast أو microprotoplast

٣ التخلص من كروموسومات أحد النوعين أثناء تكاثر الخلية الهجين بالمعاملة بالمركب iodoacetate 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 لأشعة جاما (gamma fusion) يوقف نشاط

أحد النوعين (المعطى) بالتعريض لجرعة مميتة أو شبه مميتة من أشعة جاما قبل دمجه مع النوع الآخر (المستقبل). تؤدى تلك المعاملة إلى توجيه عملية التخلص من كروموسومات النوع المعطى – فقط – عند دمج بروتوبلاستات النوعين معًا.

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

Daucus + *Petroselinum*

Physialis + *Datura*

Hyoscyamus + *Nicotiana*

Daucus + *Nicotiana*

Atropa + *Nicotiana*

Citrus cybrids

Potato cybrids

Nicotiana cybrids

Brassiac cybrids

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

ويعنى ذلك أنه يمكن عن طريق إنتج 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 الذكرى السيتوبلازمى (فى الأرز، والطماطم، والكرنبيات، والتبغ)، والمقاومة لبعض مبيدات الحشائش مثل الأترازين (فى *Brassica napus* الذى نقلت إليه من *B. campestris*).

جدول (٤–٨) بعض الصفات الوراثية التى أمكن نقلها عن طريق دمج البروتوبلاست (عن Chawla ٢٠٠٠).

الصفة المنقولة		الهجين الجسمى	
صفات المقاومة للأمراض والآفات وتحمل الظروف القياسية			
Tobacco mosaic virus	فيرس موزايك التبغ	*Nicotiana tabacum*	+ *N. nesophila*
Potato virus X	فيرس إكس البطاطس	*Solanum tuberosum*	+ *S. chacoense*
Tobacco horn worm	دودة التبغ الترنية	*N. tabacum*	+ *N. nesophila*
Potato leaf roll virus	الندوة المتأخرة وفيرس التفاف أوراق البطاطس وفيرس واى البطاطس	*S. tuberosum*	+ *S. brevidens*
Late blight, PLRV and Potato virus Y			
Phytophthora	الفيتوفثورا	*S. circalifolium*	+ *S. tuberosum*
Pseudomonas solanaccarum	الذبول البكتيرى	*S. melongena*	+ *S. sanitwongsei*
Frost tolerance	تحمل الصقيع	*S. tuberosum*	+ *S. commersonii*
Phoma lingam	قاعدة الساق السوداء	*B. napus*	+ *B. nigra*
Alternaria brassiceae	ألترناريا	*B. oleracea*	+ *Sinapis alba*
Alternaria brassiceae	ألترناريا	*B. napus*	+ *Sinapis alba*
Phytophthora	فيتوفثورا	*Citrus sinensis*	+ *Poncirus trifoliata*
TMV, spotted wilt virus, cold tolerance	فيرس موزايك التبغ. وفيرس الذبول المتبقع. وتحمل البرودة	*Lycopersicon esculentum*	+ *L. peruvianum*
Cold tolerance	تحمل البرودة	*S. lycopersicoides*	+ *L. esculentum*
Tomato diseases and insect pests	بعض أمراض وآفات الطماطم	*Solanum ochranthum*	+ *L. esculentum*
Black rot (*Xanthomonas campestris*)	العفن الأسود	*Brassica oleracea*	+ *B. napus*
Cold tolerance	تحمل البرودة	*B. oleracea* spp. *capitata*	+ *B. oleracea* (Ogura CMS line)
Frost tolerance	تحمل الصقيع	*S. tuberasum*	+ *S. commersonii*
Club root disease	الجذر الصولجانى	*R. sativa* (Japanese radish)	+ *B. oleracea* var. *botrytis*
Alternaria brassicala and Phoma lingam	ألترناريا وقاعدة الساق السوداء	*B. oleracea var botrytis*	+ *S. alba* + *B. carinata*
Club root resistance	الجذر الصولجانى	*Citrullus lanatus*	+ *Cucumis melo*

تابع جدول (٤-٨).

الصفة المنقولة		الهجين الجسمي	
Frost and salt tolerance	تحمل الصقيع والملوحة	*Hardeum vulgare*	+ *Daucus carota*
Nematode	النيماتودا	*Solanum melongena*	+ *S. sisymbrifolium*
Nematode	النيماتودا	*S. tuberosum*	+ *S. bulbocastanum*
Root knot nematode	نيماتودا تعقد الجذور	*S. tuberosum*	+ *S. bulbocastanum*
Beet cyst nematode	نيماتودا البنجر المتحوصلة	*Raphanus sativus*	+ *Brassica napus*
Beet cyst nematode	نيماتودا البنجر المتحوصلة	*Sinapis alba*	+ *R. sativus* + *B. napus*
صفات الجودة:			
High nicotine content	المحتوى العالى من النيكوتين	*N. rustica*	+ *N. tabacum*
Low erucic acid	المحتوى المنخفض من حامض الإيروسك	*B. napus*	+ *Eruca sativa*
الصفات الزراعية:			
Streptomycin resistance	مقاومة الاستربتومايسين	*N. tabacum*	+ *N. sylvestris*
Triazine resistance	مقاومة الترايازين	*N. tabacum*	
Triazine resistance	مقاومة الترايازين	*S. nigrum*	+ *S. tuberosum*
Hygromycin resistance	مقاومة الهيجروميسين	*B. nigra*	+ *B. napus*
Triazine resistance	مقاومة الترايازين	*B. napus*	
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*N. tabacum*	+ *N. sylvestris*
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*B. campestris*	+ *B. napus*
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*N. tabacum*	+ *N. sylvestris*
CMS and Triazine resistance	العقم الذكرى السيتوبلازمى ومقاومة الترايازين	*B. napus* + *B. campestris*	+ *Raphanus sativa*
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*Oryza spp.*	
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*L. esculentum*	+ *Solanum acaule*
CMS	العقم الذكرى السيتوبلازمى	*B. napus*	+ *B. tournefortii*

ومن بين الأمثلة الأخرى على ضمن السيبردز، ما يلى:

● أمكن دمج بروتوبلاست خلايا الميزوفيل فى كل من نوع الطماطم البرى *Lycopersicon pennellu* مع بطاطس أحادية مضاعفة dihaploid من صنف نيكولا، بهدف نقل صفة تحمل الملوحة من *L. pennellu* إلى البطاطس وقد أنتجت النباتات الهجين أزهارا وسيقانا أرضية قصيرة ودرنات مشوهة، ولكنها كانت على درجة عالية من العقم؛ حيث تراوحت حيوية حبوب اللقاح التى أنتجتها بين ٣٪، و ٧٪ وقد تبين من اختبارات تحمل الملوحة أن الهجين أظهر ٥٠٪ من قدرة *L. pennellu* على تحمل الملوحة، بينما لم تنمو نباتات البطاطس مطلقا تحت ظروف الملوحة (Sherraf وآخرون ١٩٩٤)

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

● استخدمت تقنية دمج البروتوبلاست فى الحصول على هجن سيتوبلازم (سيبرد) cybrids بعيدة جدًا — مثل الهجين بين الجزر (وهو من ذوات الفلقتين)، والأرز (وهو من ذوات الفلقه الواحدة) — وذلك بعد تعريض بروتوبلاستات الجزر — قبل استعمالها فى 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 سلبيًا مع الـ phylogenetic distance (وهى المسافة التى تفصل النوعين المعنيين عن بعضهما وراثيًا، والتى تقدر بالتحليل الوراثى). ولذا فإنه بينما لا يمكن نقل كلوروبلاستيدات بعض أنواع الجنس *Solanum* البعيدة جدًا عن البطاطس إلى cybrids البطاطس، فإن كلوروبلاستيدات الأنواع الأقل بعدًا عن البطاطس يمكن نقلها، وتكون فعالة فى cybrids البطاطس (عن Galun وآخرين ١٩٩٤).

استخدامات تقنية دمج البروتوبلاست فى مجال تربية النبات .. إنجازات ومحددات

مجالات استخدام التقنية

استخدمت تقنية دمج البروتوبلاست فى خدمة أهداف تربية النبات فى كل من المجالات التالية:

أولاً: التغلب على حالات عدم التوافق الجنسى

أثبتت تقنية دمج البروتوبلاستات أنها أداة فعالة فى التغلب على مشاكل عدم التوافق الخلطى فى برامج التربية، وقد أمكن الاستفادة من تلك التقنية فى حالات كثيرة نذكر منها ما يلى:

Daucus carota + Petroselinum hortense
Petunia parodii + P. Parviflora
Nicotiana tabacum + Salpiglossis sinuata
Physalis minima + Datura innoxia
Hyoscyamus muticus + Nicotiana tabacum
Solanum tuberosum + S. chacoense
S melongena + S. nigrum
Lycopersicon + Petunia
Citrus sinensis + Severinia disticha
C. reticulata + Citropis gilletina
Pyrus communis + Prunus avium
Nicotiana tabacum + N. repanda
Lycopersicon esculentum + Solanum muricatum
Brassica napus + B. nigra
B. Napus + Barbarea vulgaris
B. napus + Thlaspi perfoliatum

ثانيًا: إنتاج الـ cybrids (الهجن غير المتساوية asymetric)

من بين الأنواع النباتية التى أمكن إنتاج cybrids منها تحتوى على هيئتها الكروموسومية الكاملة بالإضافة إلى سيتوبلازمها وسيتوبلازم نوع آخر (بهدف نقل صفات سيتوبلازمية هامة) كلاً من البطاطس، والصليبيات، والأرز، والطماطم، والجزر، والتبغ، والموالح.

ثالثا: المقاومة للأمراض والآفات ومبيدات الحشائش

ترتب على التباين الوراثى الذى تحدثه عملية دمج البروتوبلاستات ظهور حالات من المقاومة أو التحمل لعدد من مسببات الأمراض، والآفات، وظروف الجفاف والبرودة، ومبيدات الحشائش إلخ، كتلك المبينة فى جدول (٤-٩)

رابعا: زيادة المحتوى النباتى من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية

إن من أهم التطورات التى حدثت مؤخرًا فى الصناعات الدوائية الزيادة فى محتوى النباتات الطبية من الألكالويدات ومنتجات الأيض الثانوية من خلال عملية دمج البروتوبلاست، والتى كان من أهمها ما يلى:

Atropa + Datura

Atropa + Scopolia

Hyoscyamus + Nicotiana

Rauwolfia + Vinca

ولقد أظهرت هجن الداتورة النوعية الجسمية زيادة قدرت بنحو ٢٠-٢٥٪ فى محتواها من الألكالويدات الكلية مقارنة بالآباء كذلك ظهر تحسن واضح فى الألكالويدات فى الهجين *Duboisia leichhardtii + Nicotiana tabacum*

خامسا: التهجين الجسمى وتحسين الأشجار

إن تربية الأشجار بطرق التربية التقليدية تتطلب سنوات عديدة، وهى مشكلة تزداد تعقيدا بحالات عدم التوافق وقد حدث تقدم كبير فى تربية الأشجار مع التقدم فى التقنيات الحيوية، حيث أمكن إجراء الإكثار الدقيق لها بأعداد هائلة فى زمن قياسى، وإنتاج نباتات أحادية، وحفظ الجيرمبلازم فى الحرارة الشديدة الانخفاض، وتجديد نمو النباتات من البروتوبلاست، والتحول الوراثى إلخ وأفادت تقنية دمج البروتوبلاست فى إنتاج الـ cybrids والهجن الجسمية — ومن ثم التغلب على مشكلة عدم التوافق فى أنواع مختلفة من الـ *Citrus*، و *Pyrus communis + Prunus avium*، و *Populus koreana + P. nigra* كذلك فإن الهجن الجسمية فى الـ *Citrus* قد تصبح من أهم

الأصول الجذرية للموالح بما قد توفره من مقاومة للبرودة، والملوحة، ولفحة الوالح، والنيماتودا.

جدول (٤-٩): أنواع نباتية أظهرت مقاومة بعد دمج البروتوبلاست.

المحصول	الأنواع المندمجة معًا	المقاومة أو التحمل
البطاطس والطماطم	*S. chacoense + S. tuberosum*	فيروسات البطاطس
	Solanum nigrum + S. tuberosum	الأترازين Atrazine
	S. brevidens + S. tuberosum	فيرس التفاف الأوراق
	S. torvum + S. tuberosum	الفيرتسيلليم
	S. brevidens + S. tuberosum	الندوة المتأخرة
	Lycopersicon piminellifolium + S. tuberosum	الـ *Erwinia*
	Nicotiana sylvestris + S. tuberosum	أوليجوميسين Oligomycin
	L. esculentum + S. acaule	تحمل البرودة
الصليبيات	*Brassica napus + B. nigra*	*Phoma lingam*
	B. oleracea + B. napus	أترازين
	Eruca + Brassica	الجفاف والحشرات
	Raphanus sativus + B. napus	نيماتودا البنجر المتحولة
	Sinapis alba + B. napus	نيماتودا البنجر المتحولة
الباذنجان	*Solanum sisymbriifolium + S. melongena*	نيماتودا تعقد الجذور
	S. torvum + S. melongena	الفيرتسيلليم – النيماتودا
	S. nigrum + S. melongena	الأترازين
التبغ	*Nicotiana glauca + N. tabacum*	فيرس موزايك التبغ
	N. tabacum + N. nesophila	دودة التبغ
	N. repanda + N. tabacum	فيرس موزايك التبغ
	Meloidogyne arenaria	

سادسًا: التهجين الجسمي بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية

يمكن أن يؤدى الاندماج بين البروتوبلاستات الأحادية والثنائية العدد الكروموسومى إلى إنتاج هجن ثلاثية تكون عقيمة، وقد تكون قادرة على إنتاج ثمار بكرية العقد.

سابعًا: التهجينات الجسمية فى النباتات الدنيئة

لا يختلف نظام دمج البروتوبلاست فى النباتات الدنيئة (الطحالب، وال

bryophytes، والسراخس ferns) عما في مغطاة البذور. تستعمل حشائش البحر seaweeds على نطاق واسع كغذاء للإنسان، وخاصة في اليابان والصين، كما تستخدم في إنتاج الآجار، والأسمدة، ومكسبات الطعم، وبعض المركبات ذات الأهمية الدوائية. ولذا .. فإن دمج البروتوبلاست قد يكون ذا فائدة كبيرة، وخاصة في التغلب على مشكلة عدم التوافق الجنسي (عن Bajaj ١٩٩٤).

الإنجازات الهامة

من بين إنجازات الهجن الجسمية، ما يلي:

١ — إعادة تركيب لقت الزيت *Brassica napus*، بدمج *B. campestris* مع *B. oleracea*.

٢ — دمج أنواع من الأجناس الصليبية *Eruca*، و *Sinapis*، و *Raphanus*، و *Moricandia*، و *Diplotaxis* مع أنواع مختلفة من الصليبيات، وأساسًا مع *B napus* وقد أعطت الهجن الجنسية مدى واسعًا من عدد الكروموسومات، وعديدا من الهجن ذات التعدد الكروموسومي غير التام، بالإضافة إلى بعض الهجن ذات التعدد الكروموسومي التام.

وقد أجريت التهجينات الجسمية في محاولة لنقل صفتي المقاومة للفطر *Alternaria brassicae*، ونيماتودا البنجر المتحوصلة *Heterodera schactii* من *Sinapsis alba*، وصفتي تحمل الجفاف والمنّ من *Eurca sativa*، وصفة المقاومة لنيماتودا البنجر المتحوصلة من الفجل، وصفة الـ low (O_2-compensation point) من *Moricandia arvensis*، وصفة العقم الذكري السيتوبلازمي من كل من *Diplotaxis harra*، و *Brassica tournefortii* .. نقلها جميعًا إلى لفت الزيت.

٣ — تم دمج بورتوبلاست *Arabidopsis thaliana* مع كل من *B. campestris*، و *B. napus*، علمًا بأن النوع الأول ينتمي إلى قبيلة مختلفة عن تلك التي ينتمي إليها النوعين الآخرين، وكانت الهجن الجسمية الناتجة أكثر لاسيمتيرية (أكثر طردًا لكروموسومات أحد النوعين المندمجين) عما في الهجن الجسمية النوعية أو الجنسية.

٤ — أمكن الحصول على هجن جسمية مزهرة وخصبة بين الأنواع المتوافقة جنسيًا *Medicago sativa* و *M. falcata*، وكذلك بين البرسيم الحجازى و *M. intertexta*.

٥ — حُصِل على هجن جنسية جسمية لكل من التوافيق التالية:

Panicum maximum (+) *Pennisetum americanum*

Sacchurum officinarum (+) *P. americanum*

Oryza sativa (+) *Eichinochloa oryzicola*

Triticum monococcum (+) *P. americanum*

Festuca arundinacea (+) *Lolium multiflorum*

هذا إلاّ أن الحصول على نباتات مكتملة النمو لم يكن ممكنًا إلاّ فى التهجين الجسمى الأخير، علمًا بأن هذا الهجين يمكن الحصول عليه جنسيًا كذلك.

٦ — نجحت محاولات التغلب على مشاكل الهجن الجنسية بين الأرز، وبعض الأنواع الأخرى القريبة منه، وهى: *Oryza brachyantha*، و *O. eichingeri*، و *O. officinalis*، و *O. perrieri* وذلك باللجوء إلى الهجن الجسمية، حيث أمكن الحصول على نباتات كاملة مزهرة قادرة على إنتاج حبوب لقاح خصبة فى كل الحالات، فيما عدا فى حالة التهجين مع النوع الأول

٧ — أمكن الحصول على هجن جسمية بين الباذنجان وكلاً من: *Solanum aethiopicum*، و *S. integrifolium*، و *S. khasianum*، و *S. nigrum*، و *S. sisymbrifolium*، و *S. torvum*، إلاّ أنها كانت على درجة عالية من العقم باستثناء التهجين بين الباذنجان وكلا من النوعين الأول والثانى الذى كان خصبًا فى كل منهما، علمًا بأن الهجين الجنسى فى كلتا الحالتين كان خصبًا كذلك

٨ — حُصِل على أول نبات هجين جسمى من التهجين بين *Nicotiana glutinosa*، و *N. langsdorffii*، كما حُصِل على هجن جسمية ذات مزايا هامة اقتصاديًا من الاندماج بين *N. tabacum*، و *N. rustica*، حيث أظهرت الهجن محتوى عال من النيكوتين، ومقاومة لكل من عفن الجذر الأسود الذى يسببه الفطر *Thielaviopsis basicola*، والعفن الأزرق الذى يسببه الفطر *Peronospora tabacina*

والغريب فى الأمر أن المقاومة للفطر الأخير لا تتوفر فى أى من الأبوين المهجنين جسميًا، ويبدو أنها ظهرت نتيجة للتفاعل بين التركيبين الوراثيين للأبوين. وقد أمكن كذلك نقل صفة المقاومة للـ TMV إلى هجن تبغ جسمية خصبة من كل من *N. nesophila*، و *N. stocktonii*

٩ — أمكن الحصول على هجن جسمية بين الطماطم والأنواع البرية القريبة التى يصعب تهجينها معها، وهى *L. chilense*، و *L. pennellii*، و *L. peruvianum* كذلك أمكن تهجين الطماطم جسميًا مع نباتات من أجناس أخرى، مثل *N. tabacum*، و *Solanum etuberosum*، و *S. etuberosum* x *S. brevidens*، و *S. lycopersicoides*، و *S. muricatum*، و *S. nigrum*، و *S. rickii*، و *S. tuberosum* ويتميز الهجين الجسمى بين الطماطم و *L. peruvianum* بخصوبته على خلاف الهجين الجنسى بينهما كذلك . فإنه بينما يستحيل إجراء التهجين الجنسى بين الطماطم، و *S. etuberosum*، فإن الهجين الجسمى بينهما كان ممكنًا وخصبًا.

١٠ — اقتُرح فى البطاطس إجراء التربية على سلالات ثنائية التضاعف، ثم إجراء تهجينات جسمية بينها (لاستعادة مستوى التضاعف الرباعى) . اقتُرحت هذه الطريقة كوسيلة بديلة لطرق التربية العادية للبطاطس وقد تم بالفعل فى السنوات الأخيرة إجراء عدد كبير من الاندماجات داخل النوع لهذا الغرض.

١١ — وفى اتجاه مماثل لما سبق بيانه تم — كذلك — دمج بروتوبلاست سلالات بطاطس أحادية متضاعفة مع بروتوبلاستات ثنائية التضاعف لكل من النوع الثنائى *S. phureja*، وأخرى من الهجين: *S. tuberosum* x *S. phureja*.

١٢ — أمكن بهذه الطريقة للتربية التنبؤ بمسلك عديد من الصفات فى الهجين، وذلك من واقع تواجدها فى الآباء الأحادية المتضاعفة dihaploid. وقد نقلت الصفات لمقاومة الأمراض أو الآفات، مثل جين المقاومة Ro1 المسئول عن مقاومة النيماتودا *Globodera rostochuensis* الذى نقل من أحد الآباء الأحادية المتضاعفة إلى الهجين، وكذلك نقل الجينات الرئيسية المسئولة عن المقاومة لكل من PVX، و PVY.

وقد أعطت عديد من الهجن محصولاً أعلى من محصول الأصناف القياسية التى قورنت معها.

١٣ – أمكن الحصول على هجن جسمية بين البطاطس وعديد من الأنواع البرية غير المتوافقة مع البطاطس – جزئيًا أو كليًا – فى التلقيحات الجنسية، وكان من بين هذه الأنواع، ما يلى:

S. brevidens	*S. bulbocastanum*
S. chacoense	*S. sircaeifolium*
S. commersonii	*S. nigrum*
S. pinnatisectum	*S. torvum*

كذلك أمكن الحصول على هجين جسمى مع النوع المتوافق جنسيًا مع البطاطس *S. berthaultii*

ويعد أكثر الأنواع البرية استعمالاً فى دراسات الدمج مع البطاطس النوع الثنائى الذى لا يكوّن درنات: *S. brevidens*، الذى يحمل جينات لمقاومة عديد من الأمراض، مثل PLRV، و PVX، و PVY، والعفن الطرى البكتيرى (Erwinia soft rot)، وهى التى أمكن نقلها بالفعل منه إلى البطاطس.

ولقد كانت بعض هذه الهجن الجسمية النوعية خصبة وأمكن تهجينها رجعيًا إلى البطاطس.

كذلك نقلت صفات تحمل البرودة من أنواع مثل *S. brevidens*، و *S. commersonii*، إلا أن الهجن كانت وسطا بين الأبوين فى شدة تحملها للبرودة.

وأظهر الهجين النوعى الجسمى بين البطاطس والنوع *S. circaeifolium* مقاومة لكل من *Phytophthora infestans*، و *Globodera pallida*.

١٤ – أمن كذلك الحصول على هجن جسمية بين البطاطس وكلا من *Lycopersicon esculentum*، و *L. pimpinellifolium* (عن Waara & Glimelius ١٩٩٥).

إن أكثر محاولات دمج بروتوبلاست البطاطس مع بروتوبلاست أنواع الجنس *Solanum* البرية الثنائية التضاعف أجريت بهدف نقل صفات المقاومة للأمراض، ومن أمثلة ذلك صفات المقاومة لكل من *Phytophthora infestans*، و *Globodera pallida* من النوع *S. circaeifolium*، وفيرس التفاف أوراق البطاطس من *S. brevidens*. كذلك نقلت صفات تحمل البرودة والصقيع من *S. commersonii* (عن Millam وآخرين ١٩٩٥)

المحددات والتحديات

تكون الهجن الجسمية إما متساوقة symmetric (وهى التى تحتوى على الهيئتين الكروموسوميتن الكاملتين لكلا الأبوين)، وإما غير متساوقة asymmetric (وهى التى تحتوى على هيئة كروموسومية كاملة من أحد الأبوين، بينما يكون الأب الآخر ممثلاً ببعض كروموسوماته فقط، وقد تفقد بعض الكروموسومات من كلا الأبوين فى الهجين) وجدير بالذكر أن عدم التساوق الكروموسومى أمر عشوائى يحدث تلقائيًا ولا يمكن التنبؤ به، وهو لا يقتصر على الجينات النووية فقط، حيث قد يحدث — كذلك — فى الجينات السيتوبلازمية. ويزداد الاهتمام حاليًا بالهجن غير المتساوقة كروموسوميًا، بهدف إنتاج هجن جسمية سيتوبلازمية (cybrids)، لأجل نقل صفات سيتوبلازمية هامة (مثل العقم الذكرى السيتوبلازمى، والمقاومة للأمراض، وتحمل مبيدات الحشائش) فى خطوة واحدة.

هذا ولا يمكن استعمال الهجن الجسمية المتساوقة symmetric بصورة مباشرة كأصناف جديدة من المحصول المراد تحسينه نظرًا لاحتواء تلك الهجين على الهيئة الكروموسومية الكاملة للنوع الآخر المستخدم فى التهجين، الأمر الذى يستدعى إجراء التهجين الرجعى لعدة أجيال مع التقييم المستمر قبل التوصل إلى صنف جديد مقبول زراعيًا. وفى المقابل .. فإن الهجن الجسمية غير المتساوقة asymmetric — وهى التى يحصل عليها بمعاملة بروتوبلاستات النوع المعطى بأشعة إكس — تحتوى فقط على كروموسوم واحد أو كروموسومين من النوع المعطى، الأمر الذى يقود إلى إنتاج صنف تجارى يحتوى على صفة أو صفات جديدة مرغوب فيها دونما حاجة إلى مزيد من

الجهد فى تربيته. أما إذا أمكن استبعاد جميع كروموسومات النوع المعطى مع نقل سيتوبلازمه فقط، فإن الهجين السيتوبلازمى cybrid الناتج قد يحتوى على صفات سيتوبلازمية مرغوب فيها مثل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى (عن Millam وآخرين ١٩٩٥).

إن عدم التطابق incongruity بين مكونات الاندماج الجسمى لخلايا الطماطم مع خلايا البطاطس أو خلايا التبغ لم يسمح بإنتاج cybrids حقيقية أو هجن جسمية خصبة؛ مما يدل على أهمية كل من تفاعل السيتوبلازم مع النواة، وتفاعل النواة مع النواة فى تلك الحالات. ومن أهم مشاكل محاولات دمج بروتوبلاستات الأنواع البعيدة عن بعضها تقسيميًّا ضعف خصوبة الهجن وعدم حدوث اقتران يذكر بين كروموسومات الأبوين. وفى حالة التهجين الجسمى بين الطماطم والبطاطس أمكن الحصول على نسل خصب بمعدل منخفض حينما تمت زراعة أعداد كبيرة من الأجنة بعد التهجين الرجعى للهجين السداسى التضاعف (طماطم ٢ن + بطاطس ٤ن) مع البطاطس الرباعية (عن Wolters وآخرين ١٩٩٤).

وغالبًا ما تكون الهجن الجسمية الناتجة عن دمج بروتوبلاستات أنواع نباتية بعيدة عن بعضها البعض تقسيميًّا .. غالبًا ما تكون عقيمة، ونادرًا ما تستعمل الهجن الجسمية بصورة مباشرة؛ مثلما حدث عند إعادة تركيب النوع الهجينى المتضاعف *Brassica napus*، وكذلك عندما أنتجت أصناف بطاطس رباعية التضاعف خليطة وراثيًّا بدمج سلالات أحادية متضاعفة، واستعمال الهجن الجسمية لأشجار الفاكهة كأصول جذرية.

ويهتم المربى بالطرق التى تتبع لأجل الحد من المادة الوراثية التى تنقل من الأنواع البرية إلى الهجن الجسمية التى تنتج من اندماجها مع الأنواع المزروعة؛ وهو أمر قد يتحقق بالتخلص من كروموسومات كاملة من بين التى حُصل عليها من النوع البرى، إلاّ أن هذه العملية تكون عشوائية؛ حيث لا يمكن التنبؤ بالكروموسومات التى يتم فقدها (عن Waara & Glimelius ١٩٩٥).

ويمكن تلخيص أهم المحددات والتحديات التى تواجه إنتاج الهجن الجسمية والاستفادة منها، فيما يلى:

١ -- تتطلب الاستفادة من عملية دمج البروتوبلاست توفر نظام كفء لتجديد النمو من لبروتوبلاستات وعلى الرغم من أن دمج بروتوبلاستات أى نوعين أمر ممكن، فإن إنتاج نباتات هجين لم يكن ممكنا إلا فى حالات خاصة

٢ -- إن عدم توفر وسيلة فعالة للانتخاب بين البروتوبلاستات المندمجة يعد أحيانا مشكلة كبيرة

٣ غالبًا ما تكون نواتج دمج البروتوبلاستات غير متوازنة (عقيمة، أو مسوهة، أو غير ثابتة)؛ ومن ثم تكون غير خصبة ولا يمكن إكثارها جنسيًا

٤ كثيرًا ما يتكون نمو كالوسى كيميرى فى مكان الهجن، ويرجع ذلك — عادة — إلى عدم اندماج الأنوية بعد اندماج الخلايا وانقسامها كل على انفراد

٥ — يؤدى دمج نوعين ثنائيين إلى الحصول على تراكيب متضاعفة هجينيًا amphidiploid، وهو أمر لا يكون — عادة — مرغوبا فيه؛ ولذا يفضل فى كثير من الأحيان دمج بروتوبلاستات النباتات الأحادية.

٦ - كثيرا ما تكون النباتات الناتجة من عملية التهجين الجسمى شديدة التباين

٧ لا يمكن أبدا الجزم بأن صفة معينة مطلوبة سوف يتم التعبير عنها بعد التهجين الجسمى

٨ — يكون الثبات الوراثى أثناء زراعة البروتوبلاست ضعيفا

٩ — لكى يمكن الاستفادة من ناتج عملية دمج البروتوبلاست فى برامج التربية فإن الهجن الجسمية التى تحتوى على خليط من الجينات من نوعين مختلفين يجب أن تكون قادرة على التكاثر الجسمى، لأنه يلزم فى الغالبية العظمى من الحالات تهجينها رجعيًا إلى النوع المزروع؛ وعلى الرغم من ذلك فإن عددًا كبيرًا من الهجن الجسمية النوعية والغالبية العظمى من الهجن الجسمية الجنسية تكون عقيمة تمامًا (عن Chawla ٢٠٠٠)

مصادر إضافية

من بين المصادر الإضافية التى يمكن الرجوع إليها بخصوص مزارع البروتوبلاست والهجن الجسمية، ما يلى:

المرجع	الموضوع
Vasil (١٩٨٠)	التحديات والتقدمات فى مجال أبحاث البروتوبلاست
Vasil & Vasil (١٩٨٠)	عزل البروتوبلاست وزراعته
Cooking (١٩٧٥، و ١٩٨٣)	استخدام مزارع البروتوبلاست فى إنتاج الهجن البعيدة
Sink (١٩٨٤)	دمج البروتوبلاست لتحسين النباتات
Lorz (١٩٨٥)	دمج مختلف عضيات الخلية فى خلايا نباتات أخرى
Power & Chapman (١٩٨٥)	عزل البروتوبلاست وزراعته
Gaynor & Kaur-Shawhney (١٩٨٥)	إنتاج محاصيل جديدة عن طريق دمج البروتوبلاست
Veilleux وآخرون (٢٠٠٥)	استخدام مزارع البروتوبلاست فى تحسين النباتات