# الباب الثامن

## زراعة البروتوبلاست Protoplast fusion

حتى عام ١٩٧٠ كانت الممارسات الوراثية فى النباتات مركزة على نقل عوامل وراثية من نبات إلى آخر باستخدام التلقيح والإخصاب وإنتاج بيضة مخصبة Zygote. ويحتوى الزيجوت على كروموسومات نصفها من الأب والنصف الآخر من الأم. والكروموسومات هى الحاملة للجينات المعبرة عن الصفات الوراثية للنبات وتسمى جينات كروموسومية Chromosomal genes ومقرها النواة. ويحمل الكلوروبلاست والميتاكوندريا جينات خاصة بصفات السيتوبلازم وتسمى جينات سيتوبلازمية Cyto-plasmic genes موروثة من الأم. ويمكن نقل المادة الوراثية بدمج بروتوبلاست خليتين مهضوم جدارهما بواسطة الإنزيمات. وبعد هضم الجدار الخلوى يكون البروتوبلاست مغلفا بالبلازماليما Plasmalemma. ثم يخرج البروتوبلاست تاركا البلازماليما. وقد يكون البروتوبلاست المندمج خاصا بخليتين من الخلايا الجسمية ( ثنائية Diploid) أو خاصًا بخليتين من الخلايا الجنسية (أحادية Haploid) مثل بروتوبلاست حبوب اللقاح. ويعتبر دمج البروتوبلاست من طرق الوراثة الجزيئية Molecular genetic التى تهدف إلى نقل مادة وراثية بعيدا عن استخدام التكاثر الجنسى.

### النباتات التى يمكن إكثارها بالبروتوبلاست

يمكن فصل البروتوبلاست من جميع الأنواع النباتية تقريبا، ولكن لايمكن إكثارها جميعا بالبروتوبلاست. فيمكن إكثار أنواع نباتية كثيرة مثل التبغ والطماطم والبطاطس والفلفل والباذنجان التابعة للعائلة الباذنجانية *Solanaceae* وبعض الأنواع التابعة للجنس Brassica التابع للعائلة الصليبية Cruciferae وبعض محاصيل العلف For-age التابعة للعائلة البقولية Leguminasae وبعض الأنواع التابعة للعائلة الخيمية Umbelliferae. أما عن العائلة النجيلية Gramincae فيصعب تكاثرها بالبروتوبلاست

باستثناء الأرز الذى يمكن اكثاره بالبروتوبلاست. وأثبتت بعض التجارب الفردية عدم نجاح تكاثر القمح وقصب السكر والذرة والشعير والراى Rye والتريتيكال Triti-cal والسورجم Sorghum بالبروتوبلاست. بينما توجد بشائر ناجحة فى إكثار بعض نباتات الأعلاف البقولية مثل البرسيم الحجازى Alfalfa والبرسيم المصرى Clovers والتريفوال Trefoils والنباتات البقولية المنتجة للحبوب مثل فول الصويا والبسلة والفاصوليا والترمس. وبالرغم من ذلك فإنها تحتاج إلى مزيد من الأبحاث المؤكدة مع الاهتمام بخصوبة النباتات الناتجة.

## مراحل إنتاج البروتوبلاست المندمج (الهجين)

١- مرحلة اختيار الجزء النباتى.
٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية.
٣- مرحلة زراعة الخلايا النباتية.
٤- مرحلة فصل البروتوبلاست.
٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست.
٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست.
٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج.
٨- مرحلة الانتخاب المعملى للطفرات.
٩- مرحلة تكوين جدر جديدة لخلايا البروتوبلاست.
١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست.

## ١- مرحلة اختيار الجزء النباتى

تختلف الأنواع النباتية فى استجابتها للتكاثر بالبروتوبلاست، لذلك فإن اختيار النوع النباتى المناسب له أهمية كبيرة فى انجاح التجربة. وأن يكون البروتوبلاست المندمج ثابتا وراثيا. وأن تفصل الأجزاء النباتية من نباتات جيدة النمو وخالية من

الأمراض ونامية فى المعمل أو صوبة محمية. فإذا فصلت الأجزاء النباتية من نباتات نامية خارج المعمل فيستلزم تعقيمها جيدا حتى لا يؤثر رداءة التعقيم على جودة البروتوبلاست.

ويفصل البروتوبلاست من أنسجة نباتية عديدة بصرف النظر عن مرحلة نموها مثل القمم النامية للأفرع والبادرات والفلقات والسويقة الجنينية Hypocotyl والأنسجة الخازنة للدرنات والكورمات والفلقات وغيرها.

وتفضل الأوراق الخضراء حديثة العمر المغطاة بطبقة رقيقة من الكيوتيكل لسهولة هضم الجدر الخلوية بالإنزيمات وتحقيق أعلى عائد من البروتوبلاست. بينما أنسجة الأوراق البالغة تكون ملجننة ويصعب هضمها بالإنزيمات وتعطى عائدا أقل من البروتوبلاست. وتعتبر خلايا الميزوفيل Mesophyll فى الورقة من المصادر الهامة للبروتوبلاست لقدرتها على التمثيل الضوئى. وتعتبر مزارع الخلايا المعلقة مصدرا هاما للحصول على البروتوبلاست لأنها خلايا نشطة فى الانقسام، ولها قدرة عالية للتطور وتكوين جدر خلوية جديدة. وعند فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة يجب اختيار الخلايا التى تكون فى مرحلة نمو واضحة وتكون ذات جدر رقيقة غير مغلظة. ولا يفضل أحيانا استخدام الكالس أو الخلايا المعلقة لعدم ثباتها وراثيا، مع أن التغييرات الوراثية لها أهمية كبيرة عند مربى النباتات واستحداث الطفرات.

## ٢- مرحلة اختيار الإنزيمات الهاضمة لجدر الخلية

يفصل البروتوبلاست باستخدام مجموعة من الإنزيمات الهاضمة للجدر الخلوية. ويمكن التعرف من الدراسات السابقة على الإنزيمات المناسبة لهضم جدر الخلايا لكل نوع من النباتات وتحديد التركيز المناسب لكل إنزيم ومدة المعاملة، وقد يستلزم إجراء تجارب للحصول على هذه المعلومات. ويجب التعرف إلى مكونات الجدار الأولى للخلية، حيث تختلف مكوناته باختلاف نوع الخلية ومصدرها إن كانت من نباتات ذات فلقتين أو ذات فلقة واحدة. ويتركب الجدار الأولى

فى جميع النباتات أساسا من مواد غروية محبة للماء شاملة البروتين والسليلوز والهيميسلسولوز. وفى خلايا نباتات الفلقتين يكون السليولوز والألياف مغطى بطبقة واحدة من الهيميسليلوز Hemicellulose مرتبطا بالزيلوجلوكان Xyloglu-can. ويرتبط الهيميسليلوز والألياف بمواد بكتينية مرتبطة بالزايلوجلوكان. بينما فى خلايا نباتات الفلقة الواحدة يكون الهيميسليلوز مرتبطا بأرابينوزيلان Arabi-noxylan. وعلى ذلك يتطلب استخدام خليط من الإنزيمات يتكون من محلول مركز من Cellulase لتفكيك وتحليل الجدار الأولى للخلية وPectinase لفصل الخلايا من الطبقة الوسطى للأوراق النباتية. وتأثير هذين الإنزيمين فى صورتهما الطبيعية أقوى من الإنزيمات الصناعية. وهذا يدل على احتواء الإنزيم الطبيعى الخام على مركبات وإنزيمات أخرى لها أهميتها فى تحلل الجدار الأولى. ويستخلص السليوليز من فطر *Myrothecium verrucaria* وحشرة *Trichoderma viride*. ويستخلص البكتينيز *Pectinase* من فطر *Rhizopus*. ويستخلص معقد إنزيمى من فطر *Basidiomycete* له القدرة على إذابة الجدار الخلوى لبعض الأنواع النباتية بفاعلية كبيرة. ويقوم إنزيم الهيميسليوليز بإذابة الجدار الخلوى بنجاح. ويستخلص خليط من الإنزيمات المحللة للجدر الخلوية من الطحالب. ويستخدم عادة خليط من السليوليز لإذابة السليولوز Cellulose والبكتينيز لإذابة البكتين Pectine والهيميسليوليز لإذابة الهيميسليولوز. وتحقق بعض الإنزيمات الصناعية نجاحا فى ذلك. وبالرغم من ذلك يتميز العديد من الخلايا بأن لها جدرا ثانوية مقاومة لفعل هذه الإنزيمات ويصعب تحليلها إنزيميا ويصعب فصل البروتوبلاست منها. وقد يكون لمعقد الإنزيمات الخام تأثيرات غير مرغوبة على البروتوبلاست المستخلص بفعل الآثار الجانبية للمواد الأخرى الداخلة فى تركيبه. فقد تسبب هذه الإنزيمات انفجار الخلايا المنتفخة Turgid وخروج البروتوبلاست بسرعة كبيرة مما يؤدى إلى موتها ؛ خصوصا إذا تعرضت الخلايا المنتفخة للإصابة بمرض العفن الطرى Soft rot. أما إذا كانت الخلايا متبلزمة فإن البروتوبلاست يبدى مقاومة أكبر لهذه الإنزيمات وتكون سرعة خروجه أقل. لذلك يفضل تعريض الأنسجة النباتية المصابة بالأمراض إلى حالة

البلزمة قبل تعريضها للإنزيمات لتقليل الضرر المتوقع على البروتوبلاست. ويجب التخلص من الأملاح الموجودة طبيعيا فى مستخلص الإنزيمات، وذلك بوضعه فى عمود Biogel P6 Column مقاسه ٤٠ × ٢,٥ سم ثم يغسل العمود بإضافة ٥ ملليلتر من الماء حتى تفصل الأملاح تدريجيا من المستخلص. ثم تجمع الجزيئات المتبقية مع بعضها وتجفف بالتجميد Freeze dry، وتضاعف هذه الطريقة فاعلية الإنزيم فى فصل البروتوبلاست بسرعة. وقد ثبت نجاح هذه الإنزيمات فى فصل البروتوبلاست من الخلايا المعلقة.

## ٣- مرحلة زراعة الخلايا النباتية

يفضل زراعة الخلايا فى بيئة سائلة لاستخلاص البروتوبلاست منها وإمكان التحكم فى مكونات البيئة الغذائية والبيئة المحيطة أثناء التحضين. كما تساعد البيئة السائلة على ترشيد استهلاك الإنزيمات الهاضمة وتوفير قدر كبير منها وتساعد على تفكك الأنسجة وزيادة عدد الخلايا المنفردة فى البيئة بسبب انتشار الإنزيمات بين الخلايا وإذابة الجدر الخلوية وتحرير البروتوبلاست منها بسهولة. والبروتوبلاست الناتج من البيئة السائلة يتأقلم بسرعة للزراعة المعملية ولا يحتاج إلى تعقيم. وقد تتعرض الخلايا للبلزمة أثناء فصل البروتوبلاست وتحدث لها أضرار شديدة. لذلك توضع الخلايا المفككة فى محلول منظم للضغط الأسموزى، ثم يضاف المحلول المنظم المحتوى على الخلايا إلى محلول الإنزيمات لضمان استقرار البروتوبلاست وعدم انفجاره. ويجب تحديد التركيز المناسب من المحلول المنظم ومتابعة أثره على سلامة البروتوبلاست أثناء خروجه من الخلية والحصول على أكبر كمية منه. ويستخدم الجلوكوز والسكروز والمانيتول والسوربيتول كمركبات لضبط الأسموزية عند ٧٠٠– ٨٠٠ ملليموز. وتسبب المعاملة الخطأ انخفاض حيوية البروتوبلاست.

## ٤- مرحلة فصل البروتوبلاست

### خطوات فصل البروتوبلاست

١- تزرع الأجزاء النباتية المعقمة فى دوارق سعة ٢٥٠ ملليلتر تحتوى كل منها على ٩٠ ملليلتر بيئة سائلة للحصول على كالس. وتجدد زراعة الكالس فى بيئة سائلة طازجة ثلاثة مرات، بين كل فترة وأخرى ٤ أيام، للحصول على كمية كبيرة من البروتوبلاست. والتأخير فى استخلاص البروتوبلاست يقلل كميته.

٢- تثبت الدوارق على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٢٤ دورة/ دقيقة لمدة ١٠- ١٤ يوما، بعدها تقسم البيئة بكل دورق على ثلاثة دوارق جديدة بمعدل ٣٠ ملل/ دورق. ويضاف بيئة سائلة طازجة ليصل حجمها ٩٠ ملل/ دورق. ثم ترفع الدوارق من الهزاز وتترك لترسب الخلايا إلى القاع. ويتم التخلص من الجزء العلوى من البيئة السائلة. ثم ينقل الجزء السفلى المحتوى على الخلايا المترسبة إلى دورق آخر سعة ١٠٠ ملليلتر.

٣- يضاف إلىمعلق الخلايا خليط من إنزيمات معقمة بواسطة مرشحات تعقيم. ويحتوى الخليط على ٣٪ Driselase + ٠,٠٥٪ Pectic Acid Transe Lim- (PATL) inase + ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW. وتضبط الحموضة عند pH 5.6. ويضاف خليط الإنزيمات بمعدل ٢٠ ملليلتر/ دورق. ويفضل أن تتم المعاملة الإنزيمية بسرعة. ثم تحضن عادة فى ظلام عند ٢٧°م بعد تثبيت الدوارق على هزاز يعمل بسرعة ٧٢ دورة/ دقيقة لمدة ٢- ٢,٥ ساعة.

٤- يضاف إلى خليط الإنزيمات ٢٥ ملليلتر من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول وأملاح CPW.

٥- ينقل المحلول المحتوى على خلايا وبروتوبلاست إلى أنابيب اختبار تحتوى على غطاء محكم الغلق وتثبت على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة ولمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء العلوى من البيئة الغذائية ويضاف بدلا منه حجم صغير من محلول يحتوى على ١٣٪ مانيتول + أملاح CPW.

٦- يمرر المحلول بأكمله خلال منخل من النايلون الخشن للتخلص من البقايا الكبيرة من حطام الخلايا، ثم يمرر مرة ثانية خلال منخل نايلون ناعم (٠,٦٤ ميكروميتر) للتخلص من البقايا الأصغر حجما. ثم يحمل الراشح المحتوى على خلايا وبروتوبلاست على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ دقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم يستبعد الجزء الطافى.

٧- يضاف إلى الخلايا والبروتوبلاست محلول يتكون من ٢١٪ سكروز + أملاح. CPW ويعاد تحميل الدوارق على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة ١٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٥ دقائق لتجميع البروتوبلاست فى الجزء العلوى من السائل بينما تهبط الخلايا وحطامها إلىالقاع. ويسحب البروتوبلاست بماصة باستير وينقل إلى بيئة غذائية. ويؤخذ جزء بسيط من المخلوط للفحص وتحديد كمية البروتوبلاست المفصول.

وبهذه الطريقة يمكن فصل ٢,٥ x ١٠^٦ خلية بروتوبلاست بكل دورق سعة ٢٥٠ ملليلتر. وبزراعة البروتوبلاست بتركيز ٢,٥ x ١٠^٤/ ملليلتر فى بيئة سائلة تحتوى على أملاح العناصر الغذائية + ٢ ملليجرام/ لتر NAA تركيز + ٠,٥ ملليجرام/ لتر BAP + ٩٪ مانيتول يبدأ البروتوبلاست فى النمو بكفاءة عالية .

## مكونات أملاح (CPW):

- فوسفات بوتاسيوم ثنائى الإيدروجين $KH_2PO_3$ بتركيز ٢٧,٢ ملليجرام/ لتر.
- نترات بوتاسيوم $KNO_3$ بتركيز ١٠١ ملليجرام/ لتر.
- كلوريد كالسيوم $CaCl_2.2H_2O$ بتركيز ١٤٨٠ ملليجرام/ لتر.
- يوديد بوتاسيوم KI بتركيز ٠,١٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات ماغنسيوم $MgSO_4.7H_2O$ بتركيز ٢٤٦ ملليجرام/ لتر.
- سلفات نحاس $CuSO_4.5H_2O$ بتركيز ٠,٠٢٥ ملليجرام/ لتر.

## ( أ ) استخدام خليط الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

١- تزرع بذور التبغ فى ظلام تام وحرارة ٢١°م لإنتاج بادرات. ثم تنقل البادرات إلى صوبة زجاجية تحت ظروف إضاءة شدتها ٩٠٠٠ لكس لمدة ١٦ ساعة يوميا

وحـرارة ٢٥– ٢٨°م. تنقـل النباتات إلى إصص قطر ١٢ سـم تحت إضاءة ١١ ألف لكس. وتروى النباتات بالنشع من أسفل الأصيص.

٢– تجمـع الأوراق كاملـة التمدد بعـد ٦٠ يوما من الإنبات. ثم تعقم الأسـطح الخارجية للأوراق بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم التجارى، ثم تغسـل عدة مرات بماء معقم لإزالة الآثار المتبقية من مادة التعقيم. ثم تترك الأوراق حتى تذبل ويترهل قوامها، ثم تزال وتستبعد بشرتها السفلى، ثم تقطع الأوراق إلى أجزاء صغيرة وتفرد فى أطباق بترى ١٤سـم، ويضاف إلى الأجزاء الورقية محلول مانيتول بتركيز ١٣٪ يحتـوى علـى أملاح (CPW) بعد ضبـط حموضته عند pH 5.8 باسـتخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٥ عيارى.

٣– يسحب محلول المانيتول وأملاح (CPW) من أسفل الأوراق المجزأة بعد ١– ٢ سـاعة، ويوضع بدلا منها ٢٠ ملليلتر من خليط إنزيمات معقمة بمرشـحات التعقيم يشـمل ٤٪ Maccrozyme + ١٣٪ Mannitol + ٤٪ Meicelase + أمـلاح CPW وتضبط الحموضة عند pH 5.8. ثم يحضن الخليط والأوراق المجزأة لمدة ٨ سـاعات عند ٢٧°م وظلام تام مع تحريك الأوراق بملقط لتسـهيل خروج البروتوبلاسـت. ثم يترك البروتوبلاست فى نفس الظروف لمدة ٣٠ دقيقة، ثم تستبعد الإنزيمات بماصة باستير Pasteur pipette.

٤– ينقل البروتوبلاسـت إلى أنبوبة اختبار لها غطاء محكم ويضاف إليه محلول المانيتـول وأمـلاح CPW. ثم تثبت الأنابيب على جهاز طرد مركزى يعمل بسـرعة ٣٥ دورة فى الدقيقة لمدة ٥ دقائق، ثم تستبدل البيئة بمحلول ٢٠٪ مانيتول وأملاح CPW. ثـم تثبـت الأنابيب مرة ثانية على جهاز الطرد المركزى يعمل بسـرعة ٥٠ دورة/ الدقيقـة ولمـدة ١٠ دقائق، يطفو بعدها البروتوبلاسـت على السـطح حيث يسـحب بماصة باسـتير. ثم يضاف إليه ١٠ ملليلتر بعد فصله من محلول المانيتول وأملاح CPW وتؤخذ منها عينات للفحص. ويلاحظ أن حطام الخلايا تستقر فى قاع الأنابيب حيث تستبعد بعد رفعها من جهاز الطرد المركزى.

## (ب) استخدام تعاقب الإنزيمات لفصل بروتوبلاست من أوراق نبات التبغ

تستخدم هذه الطريقة فى دراسة الفيروسات التى تصيب أوراق نبات التبغ. وتتلخص فى اختيار نباتات عمر ٦٠- ٧٠ يوما نامية فى أصص عند ٢٢- ٢٥°م وشدة إضاءة ١٠- ١١ ألف لكس، وفترة إضاءة ١٦ ساعة يوميا من مصابيح فلوروسنت بيضاء. ويفصل البروتوبلاست من أوراق غير مكتملة الانبساط بطول ٢٠- ٢٥ سم، تقع بين الورقة السادسة والتاسعة من قمة النبات. وتتلخص هذه الطريقة فيما يلى:

تعقم الأوراق ثم تغسل بالماء المقطر المعقم للتخلص من بقايا مواد التعقيم، ثم تستبعد البشرة السفلية.

تقطع الأوراق منزوعة البشرة السفلية إلى قطع، وتوضع فى٢٠ ملليلتر من محلول معقم بفلتر تعقيم يحتوى على ١٣٪ Mannitol + ٩٪ Macerozyme + ١٪ Potas-sium dextransuphate، وتضبط حموضته عند pH 5.8 باستخدام حمض هيدركلوريك تركيز ٢ عيارى، ويساعد هذا المحلول على ذبول الأجزاء الورقية. ثم يحمل المحلول المحتوى على الأوراق المجزأة على جهاز هزاز يعمل بسرعة ١٠٠- ١٢٠ دورة/ الدقيقة عند حرارة ٢٥°م.

تجمع الخلايا المفصولة من الأجزاء الورقية منزوعة البشرة على مراحل بعد ٣٠، ٧٥، ١٢٠، ١٨٠ دقيقة من بدء عمل الهزاز، على أن تستبدل البيئة الغذائية بعد كل فترة زمنية ببيئة مماثلة طازجة. مع ملاحظة أن المرحلتين الأخيرتين من تجميع الخلايا محتوية على خلايا برانشيمية.

توضع الخلايا فى جهاز طرد مركزى سرعته ١٠٠- ٢٠٠ دورة/ الدقيقة لمدة ٢- ٣ دقيقة، ثم تغسل مرتين بمحلول مانيتول حديث التحضير بتركيز ١٣٪ ويعاد وضعها فى جهاز الطرد المركزى.

بعد الخطوات السابقة توضع الخلايا المفصولة فى ٤٠ ملليلتر من إنزيم Cel-lulase الخام بتركيز ٤٪ مضاف إليه ١٣٪ مانيتول، وتضبط الحموضة عند pH 5.8 باستخدام حمض هيدروكلوريك تركيز ٢ عيارى قبل التعقيم بمرشحات التعقيم. ثم

تحضن الخلايا المعلقة عند ٣٦°م لمدة ٣- ٣,٥ ساعة مع مراعاة وجود قضيب يتحرك بصورة محورية لمنع تكتل وتجمع الخلايا خلال فترة إزالة الجدار الخلوى.

بعد انتهاء الفترة الزمنية المحددة تنقل الخلايا مع البيئة الغذائية إلى جهاز طرد مركزى مرة ثانية يعمل بسرعة ١٠٠ دورة/ الدقيقة ولمدة دقيقة واحدة. تغسل بعدها مرتين بمحلول المانيتول تركيز ١٣٪ مضاف إليه كلوريد الكالسيوم تركيز ٠,١ ملليمولر. ويعاد تثبيتها مرة ثانية على جهاز طرد مركزى كما فى المرة السابقة، بعد ذلك يتم فصل البروتوبلاست باستخدام ٥ ملليلتر من المانيتول.

### (جـ) فصل بروتوبلاست من أنسجة غير ورقية

يفضل فصل البروتوبلاست من أنسجة ورقية ولا يفضل استخلاصه من أنسجة أخرى. وقد يرجع ذلك إلى صعوبة تحديد التركيب الإنزيمى المناسب لفصل البروتوبلاست من هذه الأنسجة. وصعوبة تغلغل الإنزيمات بين الخلايا. ويمكن فصل البروتوبلاست من الخلايا البرانشيمية وغيرها باستخدام نفس الإنزيمات المذكورة سابقا إذا كان لها جدار خلوى رقيق. ويستلزم استخدام كميات كبيرة من إنزيم Pectinase عند فصل البروتوبلاست من الثمار المحتوية على نسبة عالية من البكتين. ويمكن الحصول على البروتوبلاست من حبوب اللقاح باستخدام إنزيم Helicase المحضر بطريقة التجفيف بالتجميد حيث يتميز باحتوائه على إنزيم B 1-3 Gglucanase ذى القدرة العالية على هضم مادة الكالوس Callose الموجودة فى الجدار الخلوى، ووجود ترسيبات كبيرة من مادة Sporopollinin على جدر حبوب اللقاح يكون سببا لإعاقة استخلاص البروتوبلاست منها بواسطة الإنزيمات.

## ٥- مرحلة تنقية البروتوبلاست

بعد الحصول على البروتوبلاست، يرشح خلال مناخل ٣٣- ١٠٠ ميكروميتر من الصلب أو النيلون للتخلص من بقايا جدر الخلايا وغيرها. ثم يحمل الراشح

على جهاز طرد مركزى يعمل بسرعة منخفضة مع التكرار بعد إضافة محلول ٢١٪ سكروز، حيث إن الطرد المركزى السريع يحدث أضرارا شديدة للبروتوبلاست لرقته. ثم يجمع البروتوبلاست المتكتل على السطح. ويراعى أن وجود منظمات نمو مختلفة فى البيئة تسبب تغييرا فى عملية البناء الضوئى للبروتوبلاست، ومنع تكوين جدر خلوية جديدة ونمو الخلايا. وقد يتغير شكل البروتوبلاست ويصبح غير كروى ويستمر ذلك لمدة طويلة. فإذا توفرت الظروف المناسبة تنقسم خلايا البروتوبلاست، وقد يكون الانقسام فى المرحلة الأولى مضطربا غير متناظر أو شاذ، وربما يرجع ذلك إلى فقد مواقع المعلومات بالخلية Information positions نتيجة تدهور شبكة البلازمودزماتا Plasmodesmata. وبذلك يتدهور الاتصال بين الخلايا ويتغير النظام الهيكلى للخلية Cytoskeleton pattern، ويحدث تغيير فى نظام الإمداد بالعناصر وفى حجم ومساحة أسطح الخلايا، ويتوقف التيار السيتوبلازمى Cytoplasmic stream لمدة تصل إلى ٢٤ ساعة بعد فصل النسيج.

## أسباب انخفاض محصول البروتوبلاست من الخلايا

بالرغم من توفر الظروف المثلى فإن أكبر كمية مستخلصة من البروتوبلاست حوالى ٣٠٪. وأسباب ذلك:

١- مقاومة جدر الخلايا إلى فعل إنزيم Cellulase. ولذلك يمكن استخدام أنواع مختلفة من الإنزيمات مثل Macerozyme R10; Onosuka R10; Driselase. ويعتبر أفضل تركيز لإنزيم Cellulase R10 هو ١٪، وأفضل تركيز لإنزيم Macerozyme R10 هو ٠,٢٪.

٢- سرعة موت خلايا عديدة بعد نقلها من بيئة غذائية إلى بيئة أخرى عند رفع الضغط الأسموزى للخلايا من أجل تحرير البروتوبلاست من الجدر الخارجية للخلايا. وقد يستخدم السكروز بدلا من المانيتول بهدف زيادة الضغط الأسموزى، بالرغم من أن السكروز يؤدى إلى خفض كمية البروتوبلاست المستخلصة بصورة واضحة جدا.

٣- تتأثر كمية البروتوبلاست المستخلصة من الخلايا المعلقة والأنسجة النباتية بمرحلة النمو. وتعتبر مرحلة الانقسام السريع للخلايا المعلقة فى البيئة الغذائية هى أفضل المراحل بالمقارنة بمرحلة الثبات العددى للخلايا، وثبت أن هذه الفترة كانت بعد ٤- ٥ أيام من الزراعة المعملية لنبات التبغ.

## ٦- مرحلة اندماج البروتوبلاست Protoplast fusion

### خاصية اندماج البروتوبلاست

يتميز البروتوبلاست بقدرته على الاندماج الذاتى والتكتل، ويمكن الاستفادة من هذه الخاصية فى دمج بروتوبلاست خلايا جسمية نباتية وإنتاج خلايا هجينية منها. وتختلف سرعة الاندماج والتكتل باختلاف النوع النباتى. فقد يندمج البروتوبلاست بعد فصله مباشرة إذا تعرض لبعض العوامل الطبيعية. وقد يحتاج بعض الوقت حتى يندمج. وقد تنخفض قدرته على الاندماج والتكتل تدريجيا بمرور الفترة الزمنية عقب فصله. لذلك يفضل تحديد الفترة الحرجة لكل نوع نباتى، وهى الفترة الزمنية التى يقضيها البروتوبلاست المفصول قبل اندماجه. ويؤدى الفصل البطىء للبروتوبلاست إلى حدوث اندماج بين خلايا النسيج الواحد، وهو ما يسمى بالاندماج الذاتى للخلايا Spontaneous fusion، ويحدث الاندماج الذاتى أثناء هضم الجدار الخلوى باستخدام الإنزيمات. حيث تبدأ الخيوط البلازميدية Plasmodesmata التى تربط الخلايا ببعضها بالتعدد والزيادة فى الحجم والانتشار فى مساحة أكبر مما يسمح بانتقال محتويات خلية إلى خلية أخرى مجاورة لها. وعلى هذا الأساس فإن ظاهرة الاندماج الذاتى تعتمد على صفات الأنسجة النباتية ودرجة تعقيدها. ولا يكفى وجود التقارب بين البروتوبلاست لحدوث الاندماج بل يتطلب أيضا أن تكون الشبكة البلازميدية متقاربة وعلى بعد أقل من واحد ملليمتر. والبروتوبلاست المفصول من خلايا معلقة يكون غنيا بالسيتوبلازم ويكون أكثر قابلية على الاندماج بالمقارنة بالبروتوبلاست المفصول من الطبقة الوسطى للورقة، وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاست الطبقة الوسطى

للورقة يحتوى على طبقة رقيقة من السيتوبلازم حول الفجوة العصارية كبيرة الحجم بجانب وجود جسيمات أخرى مثل الكلوروبلاست. وبالفحص المجهرى تظهر بعض التغييرات فى البروتوبلاست عقب فصله مباشرة مثل وجود بروتوبلاست يحتوى على نواتين Nucleus، وقد يرجع ذلك إلى أن الخلية أثناء فصل البروتوبلاست كانت فى مرحلة انقسام أو فىأطوارها النهائية من الانقسام.

### أهداف اندماج البروتوبلاست

بإزالة جدر الخلايا يصبح البروتوبلاست عاريا وقابلا للتداول لعديد من الممارسات المعملية والوراثية مثل:

١- اندماج مجموعتين كاملتين من المجموعات الكروموسومية Genomes وإنتاج هجين منهما.

٢- نقل جزء من المجموعة الجينية من بروتوبلاست واهب إلى بروتوبلاست مستقبل لإنتاج هجن غير متناظرة جزئيا Partial asymmetric.

٣- نقل جسيمات Organells (يسمى هجين سيتوبلازمى Cybrid) مثل الكلوروبلاست والميتوكوندريا بهدف نقل صفة معينة مثل مقاومة المبيدات أو مقاومة الحشائش أونقل صفة العقم الذكرى السيتوبلازمى.

## طرق دمج البروتوبلاست (تهجين البروتوبلاست)

### ١- الاندماج باستخدام مركبات كيميائية Chemically- induced fusion

لتشجيع اندماج البروتوبلاست، يجب أن تكون الأغشية البلازمية Plasma membranes فى تلامس تام. ونظرا لوجود شحنة سالبة على سطح البروتوبلاست تعمل على حدوث تنافر بين البروتوبلاست المتجاور، لذلك يجب التخلص من الشحنات السالبة لمنع التنافر بين البروتوبلاست المتجاور ويتم الاندماج بسهولة. وتستخدم وسائل عديدة تعمل على تغيير الشحنات السالبة، منها تغيير الحموضة (pH) أو

إضافة كاتيونات متعددة Polycations أو نزع الماء Dehydration من البروتوبلاست. وقد وجد أن تعريض بروتوبلاست الطبقة الوسطى للورقة إلى بيئة تميل إلى القلوية- تحتوى على أيونات كالسيوم- يؤدى إلى تكوين أعداد كبيرة من البروتوبلاست المندمج، وكانت أفضل النتائج عندما تعرض البروتوبلاست إلى محلول منظم Buffer solution (pH 10.5) والتحضين عند ٣٧°م ولمدة ١٠- ١٥ دقيقة. ويجب ألا تطول مدة التعريض عن ٤٥ دقيقة حتى لا يؤدى إلى تكوين بروتوبلاست غير ثابت وغير متماسك. واستخدمت هذه الطريقة بنجاح فى إحداث الاندماج والتهجين فى خلايا جسمية لنبات البيتونيا.

ويعتبر مركب Polyethylene glycol (PEG) (الوزن الجزيئى ١٥٠٠- ٦٠٠٠ دالتون) من أكثر المركبات استخداما فى الاندماج الكيميائى للبروتوبلاست. وإضافة هذا المركب بجرعات متتالية إلى معلق البروتوبلاست يؤدى إلى تجمعه Agglutination بنسبة ١- ١٠٪، ثم يتبع ذلك التخلص من هذا المركب بإضافة محلول منظم حموضته (pH 9-11) يحتوى على نسبة مرتفعة نسبيا من أيونات الكالسيوم (١٠- ١٥ ملليمول). وميكانيكية هذا الاندماج قد تكون ناتجة عن حدوث انتشار جانبى للبروتينات الملاصقة للأغشية وخلق مناطق غنية فى الليبيدات غير مستقرة تؤدى إلى الاندماج. وقد لا تؤدى طرق الاندماج الكيميائى إلى النتيجة المتوقعة وقد يرجع ذلك إلى أن بروتوبلاست بعض الأنواع النباتية لا يتحمل التعرض للمركب (PEG). كذلك يختلف تأثير هذه المادة فى التخلص من الشحنات السالبة الموجودة على سطح البروتوبلاست باختلاف وزنها الجزيئى وتركيزها وكثافة البروتوبلاست فى البيئة الغذائية ودرجة حرارة التحضين وكثافة الشحنات الموجبة المضافة للبيئة. وقد ثبت أن مادة (PEG) ذات الوزن الجزيئى ١٥٤٠ هى الأفضل من استخدام أوزان جزيئية أقل أو أعلى من ذلك، وتستخدم بتركيز لايقل عن ٣١٪ وتحضن عند ٣٥°م ثم ١٥°م. كذلك ثبت نجاح طريقة تكتل بروتوبلاست الجزر وثلاثة أنواع من التبغ وهم *N. stocktonii; N. tabacum N. nesophila;* باستخدام الفصل الإنزيمى ثم تعريض البروتوبلاست المفصول لجهاز مميز الخلايا "Cell Storter - Flow Cytometer" عند

طول موجة ٥١٤ نانوميتر وإشعاع ضوئى مرئى مقداره «400 mW» باستخدام فلاتر LP 590; FT 560; BG 38; LP 510 مما يؤدى إلى تحفيز الاندماج بنسبة كبيرة. ويستخدم الدكسترات Dextran بنجاح مع بروتوبلاست نباتات *Petunia hybrida ; Brassica pekinensis; Nicotiana tabacum* لدمجها مع بروتوبلاست الجزر، ويتم ذلك فى الخطوات الآتية:

– يستخلص بروتوبلاست النباتات الثلاثة المذكورة وكذلك بروتوبلاست نبات الجزر كل على حدة.

– يخلط ١٠ ملليلتر من بروتوبلاست الجزر مع مقدار مساو له من أى من البروتوبلاست الثلاثة، ثم يكرر ذلك مع بروتوبلاست الأثنين الآخرين، ثم يوضع كل خليط منهم فى محلول ٠,٥٥ مولر مانيتول.

– ينقل ٠,٤ ملليلتر من بيئة الاندماج (متكونة من ١٥٪ دكسترات Dextran+ واحد مولر كلوريد صوديوم لكل طبق بترى بلاستيك يحتوى على ٠,٢ ملليلتر بروتوبلاست. ثم يضاف لكل طبق بترى ٠,٤ ملليلتر من بيئة الإندماج مرة ثانية. ثم تحضن الأطباق عند ٣٠°م لمدة ١٥ دقيقة، بعدها يضاف ٠,٢ ملليلتر كلوريد صوديوم تركيز ١,٣٦ مولر. وبعد مرور ١٥ دقيقة أخرى يتم تخفيف المحلول بإضافة ٥ ملليلتر بيئة غذائية مضافا إليها مانيتول تركيز ٠,٢٧ مولر ومواد أخرى غير عضوية بتركيز ٠,١٣ مولر. ثم يحضن الخليط عند ٥°م لمدة ساعة واحدة فقط، بعدها تنقل إلى الغرفة العادية. وبعد ٢٤ ساعة يجمع البروتوبلاست ويفحص.

## ٢- الاندماج الكهربائى Electrofusion

### (أ) المرحلة الأولى

يوضع البروتوبلاست فى بيئة غذائية منخفضة التوصيل الكهربائى بين قطبين كهربائيين Two electrodes وتردد مرتفع بين القطبين (0.5-1.5 Mhz). وبواسطة «فصل كهربائى ثنائية» Dielectrophoresis على جهاز الكتروفوريسيس تصبح

الشحنة على سطح البروتوبلاست مستقطبة وكأنها ثنائية القطبين Dipoles. وأثناء هجرة البروتوبلاست على طول خطوط المجال الكهربائى تتلامس مع بعضها وتكوين ما يسمى سلاسل اللؤلؤ Pearl chains موازية لخطوط المجالات الكهربائية المستخدمة. ويتوقف طول السلاسل على كثافة البروتوبلاست وقوة المجال الكهربائى وطول مدة تطبيق المجال الكهربائى. ويفضل استخدام مجالات كهربائية متجانسة Uniform fields بين الإلكترودات Electrodes بينهما مسافات حوالى ٥ ملليمتر، حيث تهاجر خلايا البروتوبلاست نحو هذه الإلكترودات، وتتكون عليها سلاسل مركزة من البروتوبلاست غير مشتته إلى إلكترودات أخرى وبكميات كبيرة بحيث يسهل ملاحظتها والتعامل معها. وتستخدم عادة خمسة إلكترودات متوازية مصنوعة من الصلب غير قابل للصدأ مثبتة فى وعاء من البرسبكس Perspex حجمة ٠,٥ ملليلتر. ومن الممكن أن تندمج ٠,٥ – ١ x ١٠$^{٦}$ بروتوبلاست فى الدورة الواحدة التى تستغرق ٦٠ – ٩٠ ثانية. ومن الممكن أيضا استخدام بدائل للإلكترودات وخلايا كهربائية مغايرة للتصميم المذكور. وقد وجد أن النسبة الكلية المندمجة تصل إلى ٦٠٪ فى خليط مكون من عشيرتين من البروتوبلاست بنسبة ١ : ١. ولوحظ أن ٥٠٪ من هذه النسبة يحدث بها اندماج بنسبة ١ : ١ داخلى بين خلايا عشيرة واحدة متماثلة و٥٠٪ يحدث اندماج بين خلايا العشيرتين مكونة خلايا هجينية خليطة النواة Heterokaryons.

## (ب) المرحلة الثانية

تعريض سلاسل البروتوبلاست إلى نبضات كهربائية مباشرة بجهد 3-1) (kVcm-1 وقصيرة ما بين ١٠ – ٢٠٠ ميكروثانية كافية لإحداث ثقوب Electro-poration فى الغشاء المحيط بالبروتوبلاست والأغشية التى فى تماس مع بعضها وبذلك يسهل دمج البروتوبلاست. ومن الممكن إدخال DNA وجسيمات أخرى إلى البروتوبلاست مباشرة. ويستخدم جهاز إطلاق النبضات الكهربائية Capacitor discharge "spike" pulses لدمج البروتوبلاست. وتتميز طريقة الاندماج الكهربائى

للبروتوبلاست بتفوقها على الطريقة الكيميائية. وأن البروتوبلاست المتلاصق فى سلاسل هو المستهدف. كما يمكن توليد ومضات ذات جهد كهربائى مختلف، ويمكن عد البروتوبلاست المندمج.

## العوامل المؤثرة فى اندماج البروتوبلاست

– مصدر البروتوبلاست، إن اندماج البروتوبلاست المفصول من أوراق النوع البرى للبطاطس Solanum brevidens أسرع من اندماج البروتوبلاست المفصول من معلق خلايا نفس النوع المؤقلم للزراعة التقليدية.

– الومضات الطويلة للجهد الكهربائى (الفولت) الأعلى تحقق اندماجا أكثر.

– البروتوبلاست كبير الحجم أسرع فى الاندماج من صغير الحجم. وسلاسل البروتوبلاست الأطول تعطى اندماجا متكررا أكثر من السلاسل القصيرة. لذلك يعامل البروتوبلاست الأصغر حجما مسبقا بمادة Spermine لكى يعمل على زيادة مساحة أغشية البروتوبلاست المتماسة وتجمعة فى سلاسل.

– يعمل كلوريد الكالسيوم على زيادة نسبة الاندماج بإزالة الشحنات السالبة على أسطح البروتوبلاست، بينما مادة نترات الصوديوم المستخدمة أحيانا فى إزالة الشحنات السالبة تحقق نتائج أقل كثيرا. لذلك يفضل احتواء بيئة الاندماج Fusion medium على مانيتول Manitol + واحد مليمولر كلوريد كالسيوم $CaCl_2$. وبهذه المعاملة يرتفع نسبة اندماج البروتوبلاست من ٣٠٪ إلى ٦٠٪.

– يحدث الدمج عادة بالتحضين فى تركيز مرتفع من مركب (PEG) وتركيز مرتفع من أيونات الكالسيوم (Ca++) ورقم حموضة مرتفع نسبيا (يميل إلى القلوية). وهذه المعاملة ضرورية لإزالة الشحنات السالبة الموجودة على البروتوبلاست. على أن يتم التخلص من آثار المخلوط (PEG) و(Ca++) بالغسيل بعد إتمام الاندماج. والمتوقع نجاحا عظيما لطريقة الدمج الكهربائى، حيث تؤدى إلى الحصول على كثير من البروتوبلاست الحى أكثر من استخدام مركب (PEG). كما حقق دمجا للبروتوبلاست باستخدام مركب Dextran ومنشط كهربائى.

## ٧- مرحلة عزل البروتوبلاست المندمج

## Selection of somatic hybrid cells

- **عـزل مباشر تحت ميكروسكوب** Direct isolation

تشـفط الخلية الهجينيـة المندمجة بماصة ميكرومتريـة Micropipett أو بأنبوبة شعرية Micro capillary متصلة بسرنجة Syringe لها قلاووظ محكم. وتشفط الخلايا ذات الأنوية المندمجة Heterokaryons واحدة بعد الأخرى تحت ميكوسكوب ضوئى. وبالرؤية المباشـرة يمكن بسهولة تمييز البروتوبلاست الهجين من بين بروتوبلاست الأوراق وبروتوبلاست الخلايا المعلقة.

- **الرؤى بالعين** Visual method

أحيانـا يمكن تمييز الخلايـا الهجينية ذات الأنوية المندمجـة بالعين المجردة إذا كانـت متميزة بصفـة معينة عن غيرها فى اللون وحجم البروتوبلاسـت. فمثلا يمكـن تمييز الخلايا الهجينيـة الخالية من الكلوروفيل بسـهولة إذا كانت ناتجة مـن اندماج خلايا لا تحتوى على كلوروفيل أو تمييزها بوجود خيوط سـيتوبلازمية وكلوربلاست إذا اندمج سيتوبلازم خلية تحتوى على كلوروفيل وسيتوبلازم لايحتوى على كلوروفيل.

- **اسـتخدام جهـاز مميـز الخلايـا** Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)

ويسـمى أيضـا Continuous flow cytometer. وتعتمد هـذه الطريقة على تلوين بروتوبلاسـت خلايا النوعين المطلوب دمجهما كلٌ بلون خاص مختلف عن الآخر. وتستخدم صبغات وميضية Fluorescent dyes مختلفة (تسمى دلائل وميضية Fluoes-cence markers) مثل Fluorescein أو Rhodamine. وباستخدام جهاز مميز الخلايا

Cell Sorter يمكن تمييز وانتخاب وفصل الخلايا ذات النواة الهجينية ذات الألوان المختلفة وذلك بتمرير خلايا البروتوبلاست المندمجة وغير المندمجة فى جهاز مميز الخلايا حيث تمتص الخلايا الهجينية الطاقة الضوئية ثم تنبعث منها فى صورة وميض ضوئى مختلف.

- **الطرق الطبيعية للفصل** Separation on physical characteristics

حققت الطرق الطبيعية تقدما كبيرا فى تمييز الخلايا الهجينية. حيث تستخدم طريقة التمييز بين الشحنة الكهربائية المنتشرة على سطح الخلايا الهجينية ومقارنتها بالشحنة المنتشرة على بروتوبلاست الآباء. واختلاف تأثير الطرد المركزى على الخلايا الهجينية بالمقارنة بالآباء. وهى طرق يمكن أن تؤدى إلى نتائج جيدة فى حالة الكثافة العالية من الخلايا الهجينية فى البيئة الغذائية ولكن يجب عدم الاعتماد عليها بصورة مطلقة.

## ٨- مرحلة الانتخاب المعملى للطفرات من الهجن الجسمية

قد تحدث طفرات ذاتية فى الهجن الجسمية الناتجة من اندماج بروتوبلاست خليتين من خلايا الصنف النباتى النامى فى البيئة الغذائية أو تحدث فى هجن جسمية ناتجة من اندماج بروتوبلاست مستخلص من خليتين مختلفتين فى الصنف أو النوع أو الجنس أو العائلة. ويمكن استحداث طفرات فى الخلايا الجسمية المندمجة بتعريضها لبعض المطفرات مثل Ethylmethane sulphonate; N-ethyl N-nitro-ureum أو أشعة جاما أو أشعة إكس أو بنقل جينات أو إحداث تغيير فى تركيب الحمض النووى DNA. وعند انتخاب طفرات من الهجن الجسمية للبروتوبلاست يتم التركيز على الخلايا الهجينية ذات الصفات غير العادية. ويفضل الإبقاء على الخلايا غير المعاملة بالمطفرات للمقارنة مع الخلايا المعاملة مع الاهتمام بمتابعة كل خلية منتخبة بمفردها من حيث التكاثر والتكشف والنمو للحصول على سلالة خلوية Cell line.

# طرق الانتخاب المعملى للطفرات

## (أ) الانتخاب المباشر للطفرات

تنتخب الطفرات من المزارع المعملية للبروتوبلاست أو من معلق الخلايا التى تتميز بالقدرة على النمو تحت ظروف غير عادية من الإجهاد البيئى مثل الملوحة والجفاف والمضادات الحيوية والسموم النباتية Phytotoxins والعناصر الثقيلة وغيرها.

## (ب) طرق تحليلية لصفات الهجن الجسمية Characterization of somatic hybrids

### ١- تحليل مشابه الإنزيم Isoenzyme analysis

يتم تحليل الآباء الداخلة فى التهجين وتحليل الهجين الناتج نفسه باستخدام جهاز الإلكتروفريزيس حيث تظهر حزم مختلفة من البروتين على الجيل *Gel*. ويظهر للهجين تعبير جينى عن بعض الحزم مشابها فى ذلك أحد الأبوين. وربما تظهر حزم إضافية مشتقة من تركيبات جديدة ناتجة من وحدات إنزيمية فرعية. ومن مشابهات الإنزيم المستعملة كدلائل Glucose-6-phosphate dehydrogenase; Phosphoglucose isomerase; Glutamine oxaloacetate transaminase; Esterase and shikimate dehydrogenase

### ٢- تحليل جزىء "دنا" بالنواة Nuclear DNA analysis

يستخلص الحمض النووى DNA من الكروموسومات أو من الكلوروبلاست أو الميتوكوندريا ثم يجزأ إلى شظايا Fragments باستخدام إنزيمات قطع Restriction enzymes. ثم ترقم إحدى الشظايا بالفوسفور المشع ($^{32}P$) وتلصق بجزىء DNA آخر، فسوف يظهر فى الهجن الناتجة طرز مختلفة لحزم هجينية Hybridization bands من DNA يمكن متابعتها باستخدام الأوتوراديوجرام Autoradiograms.

### ٣- النشاط الإنزيمى Enzyme activity

إذا استخدمت طفرتان تتميزان بخاصية نقص إنزيم Nitrate reductase deficient (NR-) خاص باختزال النترات، أى إنهما لا يستطيعان الاستفادة من النترات كمصدر للنيتروجين. فإن الهجن الناتجة منهما قد تختلفان عن الآباء وتكون لها القدرة على الاستفادة من النترات كمصدر للنيتروجين لاحتوائها على إنزيم Nitrate reductase وفى هذه الحالة يمكن تقدير نشاط الإنزيم.

### ٤- المظهر الخارجى Morphology

قد يظهر على الهجن الجسمية صفات ظاهرية محددة أو ظهور بعض الصبغات مثل الأنثوسيانين Anthocyanin أو وجود شعيرات على سطح الورقة. وقد تكون بعض هذه الصفات موروثة من الأب أو الأم. وقد تظهر صفات جديدة فى الهجن غير موجودة أصلا فى الآباء مثل ظهور صبغة قرمزية اللون على السطح الخارجى من درنات البطاطس الهجن وظهور لون أصفر أو أحمر فى لحم الدرنة.

### ٥- تحليل سيتولوجى Cytological analysis

يمكن تقدير تكامل الكروموسومات للهجن الجسمية بطريقة روتينية بواسطة الضغط بشدة على قمة الجذر واستخلاص الكروموسومات من كلا الأبوين. وتبين التحاليل الهجن التى تملك التكامل المتوقع للكروموسومات القادمة من كلا الأبوين، كما يمكن تمييز الانقسامات الشاذة Aneuploidy.

### ٦- تحليل الصفات المرغوبة Analysis of desired characters

تقدر الصفات الزراعية المرغوبة مثل مقاومة الأمراض والصفات القياسية المعروفة لدى مربى النباتات.

## ٩- مرحلة تكوين جدر جديدة للبروتوبلاست المندمج

تكويـن الجـدار الخلـوى للبروتوبلاسـت المندمج مـن المراحل الهامة فـى زراعة البروتوبلاست. حيث يرتبط انقسام الخلية ونموها بتكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاست. وتبدأ مرحلة نشـوء الجدار الخلوى الجديد بعد نقل البروتوبلاسـت إلى بيئة خالية من الإنزيمات المحللة للسليلوز. فبعد ١٦ ساعة من نقل بروتوبلاست التبغ فى بيئة غذائية يزداد تكوين لويفات سـليولوزية على السطح الخارجى من البروتوبلاست. وبعد يومين تتكـون جـدر خلوية جديدة لحوالى٦٠- ٨٠٪ من البروتوبلاسـت. وبعد ثلاثة أيام من الزراعة تتكون جدر خلوية لجميع البروتوبلاست. وأثناء هذه المرحلة يستلزم المحافظة على الضغط الأسموزى للبروتوبلاسـت فى البيئة الغذائية عند الحد الأمثل- يتناسـب مـع زراعة ونمو البروتوبلاسـت- حتـى لا تحدث أى تغييرات غـير مرغوبة فى بناء خليـة البروتوبلاسـت. لذلك يجب أن يكون تركيز أيونات الكالسـيوم ($Ca^{++}$) مرتفعة والجهـد الأسموزى السـالب للبيئة منخفضا خلال إعادة تكويـن الجدار الجديد حول البروتوبلاسـت، ثم يرفع الجهد الأسموزى للبيئة تدريجيا خلال الأيام القليلة من بدء تكوين الجدار الخلوى. ويحدث أول انقسـام للخلية الجديدة بعد ٢- ٧ أيام من زراعة البروتوبلاست. وتتحول الزراعة فى هذه المرحلة من زراعة بروتوبلاست إلى زراعة خلايا نباتية عادية. لذلك تحفز الخلايا الجديدة على الانقسـام والنمو والتكشـف إلى أعضاء نباتية مختلفة حتى يتم تكوين النبات الكامل. وتسـتخدم مادة Calcaflour White ST بتركيز ٠,١٪ للكشـف عن تكوين الجدار الخلوى الجديد. ويتميز هذا المركب بقدرته على انعكاس الضوء السـاقط عليه من مصدر للضوء الأزرق. ويعامل البروتوبلاست بهذا المركب سـواء كان فى بيئة سـائلة أو صلبة. حيث توضع الخلايا المتكونة حديثا لمدة ٥دقائق مع مراعاة الحفاظ على الضغط الأسموزى وغسل الخلايا بعد ذلك لإزالة المتبقى مـن هذه المادة. وتفحـص تحت الضوء الأزرق. فالخلايا التـى كونت جدارا يكون لها القـدرة على انعكاس الضوء الأزرق. ويفى بهذا الغرض مصباح زئبقى يحتوى على فلتر إنارة BG 12 وفلتر مكثف K 510. ولوحظ أن البروتوبلاسـت المسـتخلص من الطبقة

الوسطى لأوراق التبغ استعادت نشاطها وكونت جدارا خلوية بسرعة، وأن حوالى ٦٠-٨٠٪ من هذه الخلايا بدأت فى الانقسام بعد ٤ أيام من زراعتها فى البيئة الغذائية. ويؤدى انقسام هذه الخلايا إلى تكوين كتل من الكالس. ويضاف لبن جوز الهند إلى البيئة الغذائية للحصول على انقسام خلوى جيد والحصول على كتل من الكالس، ويمكن تحفيز خلايا الكالس على النمو وتكوين أفرع والحصول على نباتات كاملة.

## ١٠- مرحلة انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست المندمج

### العوامل المؤثرة فى انقسام ونمو خلايا البروتوبلاست

#### ١- العوامل الوراثية

تنمو بعض أنواع البروتوبلاست بصورة جيدة على بيئة غذائية معينة دون غيرها من البيئات بالرغم من ثبات الظروف البيئية المحيطة، وقد يرجع ذلك إلى أسباب وراثية، حيث تختلف كفاءة انقسام البروتوبلاست باختلاف الأنواع التابعة للجنس بيتونيا Petunia، ويصعب انقسام البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. paradii* بصرف النظر عن نوع البيئة المستخدمة، بينما البروتوبلاست المستخلص من النوع *P. hybrida* أو من نباتات الجيل الأول للهجين «*P. paradii x P. hybrida*» كان سهل الانقسام. كذلك يتأثر نمو البروتوبلاست بمستوى تضاعف العدد الكروموسومى بالخلية. فمثلا قابلية انقسام البروتوبلاست المستخلص من نباتات ثنائية كان مرتفعا بالمقارنة مع بروتوبلاست النباتات الأحادية. ويحتاج البروتوبلاست المستخلص من خلايا الطبقة الوسطى لأوراق نباتات أحادية إلى إضافة معقدات طبيعية إلىالبيئة لتشجيعه على الانقسام.

#### ٢- نوع النبات

تختلف كفاءة نمو خلايا البروتوبلاست فى البيئة الغذائية باختلاف الأنواع والأجناس النباتية. فقد نجح ٣٨ جنسا نباتيا من بين ٦٦ جنسا فى إنتاج نباتات

من خلايا البروتوبلاست. وأن بروتوبلاست نبات الأرز هو الأسهل من بين الأجناس التابعة للعائلة النجيلية *Gramineae*. كذلك ينجح إكثار أجناس تابعة للعائلة *Solanacea* مثل *Capsicum; Datura; Browallia; Lycopersicon; Solanum; Nicotiana;* وأنواع نباتية تابعة لعائلات نباتية مختلفة مثل *Atropa; Petunia; Hyocyamus Daucus carrota; Medicago sativa; Brassica napus; Asparagus officinalis; Manihot esculenta; Trifolium repens; sinesis Citrus*. ولم تصل الأنواع التابعة للجنس *Nicotiana* إلى مستوى كفاءة النوع *Nicotiana tabacum* من حيث قابليته للانقسام والنمو. وكان النوع *N. sylvestrris* أقل كفاءة فى الانقسام ونمو البروتوبلاست بالرغم من محاولات تحسين الظروف البيئية المحيطة وتغيير مكونات البيئة. ويعتبر القمح والشعير وغيرهما من محاصيل الحبوب بأنها ضعيفة فى إعطاء بروتوبلاست قادر على الانقسام والنمو حتى ولو كان مستخلصا من الطبقة الوسطى للورقة لصعوبة تكوين الجدار الخلوى للبروتوبلاست وعدم القدرة على الانقسام وصعوبة الحصول على كالس من أوراق هذه المحاصيل.

### ٣- البيئة الغذائية

أثناء فصل البروتوبلاست قد يحدث ضرر للشبكة البلازميدية مما يؤدى إلى تسرب بعض مكوناته من السوائل إلى البيئة الغذائية، لذلك تضاف بعض منظمات النمو ومواد أخرى إلى البيئة لتعويض ما تفقده. كما أن هز الدوارق المحتويه على بروتوبلاست بجهاز الرج قد يؤدى إلى تمزق الشبكة البلازميدية وتحطيم البروتوبلاست. لذلك يفضل أن يكون البروتوبلاست فى بيئة سائلة ساكنة أو متحركة ببطء للمحافظة على البلازميدات ومساعدة البروتوبلاست على الهبوط بسلام إلى قاع الدورق. وثبت أن إضافة ٦ مللى بيئة سائلة حاملة للبروتوبلاست فوق بيئة مماثلة مضاف إليها آجار (بيئة ثنائية المظهر Two- phases medium) فى طبق بترى قطر ٩سم أعطت نتائج جيدة. واستخدام الأطباق الزجاجية أفضل من البلاستيكية لتجنب التصاق البروتوبلاست على جدر الأطباق البلاستيكية.

ويفضل إضافة ٠,٠٤ – ٠,٠٢٪ مادة ناشرة مثل Tween-80 لمنع الالتصاق. وتستخدم هذه الطريقة بنجاح كبير فى زراعة البروتوبلاست. ومن فوائد هذه الطريقة إمكان استبدال البيئة السائلة (الطبقة العلوية فى الطبق البترى) ببيئة أخرى مماثلة لنفس البيئة السائلة ولكنها طازجة، ويمكن أيضا إحلال أجزاء من البيئة الصلبة (الطبقة السفلية فى الطبق البترى) بأجزاء من بيئة مماثلة صلبة طازجة وبنفس الحجم. ويتم هذا الاستبدال فى البيئة السائلة والصلبة باستمرار للمحافظة على الضغط الأسموزى وتحفيز الخلايا على النمو والانقسام بصورة منتظمة. وبهذه الطريقة تنشأ تجمعات من خلايا البروتوبلاست وتهبط على طبقة البيئة الصلبة فى قاع الطبق وتنمو بنجاح، ويمكن متابعتها ونقلها فيما بعد للإكثار. وتستخدم بنجاح البيئات الجاهزة التى لها نفس مواصفات بيئة (MS) لزراعة البروتوبلاست. وثبت أن إضافة كلوريد الكالسيوم بتركيز ٥ ملليمولر وكبريتات الماغنسيوم بتركيز ٤ ملليمولر للبيئة كان لها القدرة على الحفاظ على الأغشية البلازمية والحصول على نتائج جيدة فى زراعة البروتوبلاست المفصول من خلايا الطبقة الوسطى للأوراق.

ويمكن زراعة البروتوبلاست فى بيئة سائلة أو صلبة، بالرغم من أن لكل منهما بعض المشاكل. ويفضل أن تحتوى البيئة الصلبة على ٠,٢٪ آجار بدلا من ٠,٦٪، ويفضل النوع Baker Agar بدلا من Difco Agar وإضافة الكازين Casein hydro-lysate أو بعض الأحماض الأمينية مثل الجلوتامين إلى البيئة تعطى نتائج جيدة. ويعتبر السكروز هو المفضل دائما كمصدر للطاقة والكربون، وإضافة الجلوكوز أو الزايلوز Xylose والرايبوز Ribose مجتمعة أو منفردة إلى البيئة تعطى نتائج مفيدة. وإضافة الأكسينات (2,4- D; NAA) والسيتوكاينينات(BAP ; KIN) منفردة أو مجتمعة بتركيز ٠,١ – ٥ ملليجرام/ لتر إلى البيئة لها أهمية كبيرة جدا لاستمرار نمو خلايا البروتوبلاست وتحقيق إنتظام وجودة النمو. ويختلف تركيز منظمات النمو فى البيئة باختلاف البروتوبلاست ومصدره. أما بالنسبة للمواد الحافظة على

الضغط الأسموزى فتستخدم نفس المواد المستخدمة فى مرحلة فصل البروتوبلاست. ويعتبر المانيتول بتركيز ٠,٥– ٠,٦ مولر أكثرها استخداما. ويستخدم كذلك خليط المانيتول + السوربيتول بنجاح أيضا. كما يستخدم سكر الجلوكوز مع بروتوبلاست خلايا نبات الفول البلدى وفول الصويا. بينما كان السكروز مفضلا لنمو بروتوبلاست نبات Brome grass.

## ٤- الظروف البيئية المحيطة

تختلف أنواع البروتوبلاست فى احتياجها للحرارة أثناء التحضين، لذلك يجب تحديد درجة الحرارة المناسبة حتى لا تكون سببا رئيسيا فى تثبيط نمو البروتوبلاست. فمثلا يحضن بروتوبلاست نبات التبغ عند ١٦ – ٣٧°م وبروتوبلاست نبات الطماطم عند ٢٩°م لكى يحقق كفاءة عالية فى النمو والانقسام. وللضوء تأثير كبير فى إنجاح البروتوبلاست خاصة إذا كان مصدره الطبقة الوسطى للأوراق. وتعتبر أفضل شدة إضاءة لبروتوبلاست نبات التبغ هى ٣٣٠٠ لكس، وانخفاض شدة الضوء يؤدى إلى انخفاض قدرة البروتوبلاست على النمو.

## ٥- كثافة البروتوبلاست فى البيئة الغذائية

كثافة خلايا البروتوبلاست فى البيئة السائلة لها أهمية كبيرة فى طبيعة نموها وتشير الدلائل إلى إمكانية نمو بعض أنواع البروتوبلاست عند كثافة منخفضة جدا تصل إلى ١٠٠٠ بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة. ويفشل بروتوبلاست نبات التبغ فى الانقسام والنمو إذا كانت كثافته أعلى من ٥ × ١٠$^{٥}$ بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة. وأن الكثافة المثلى التى أعطت أفضل معدل للانقسام والنمو هى ٥ × ١٠$^{٤}$ بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة، ولم يلاحظ أى انقسام عندما كانت كثافة البروتوبلاست ٦ × ١٠$^{٣}$ بروتوبلاست/ ملليلتر بيئة أو أقل من ذلك. ومن ناحية أخرى وجد أن أفضل كثافة لبروتوبلاست خلايا نبات البيتونيا Petunia هى ٣,٥ × ١٠$^{٤}$/ ملليلتر.

## أهم الممارسات الوراثية للبروتوبلاست المندمج

### ١- التهجين الجسمى بين أنواع مختلفة Somatic hybridization

يعرف التهجين الجسمى أيضا باسم Para-sexual hybridization. فى الواقع أن دمج البروتوبلاست ليس له ميزة خاصة لإنتاج هجن جسمية فى حالة إذا كان من السهل إنجاز التهجين بالطرق التقليدية. ودمج البروتوبلاست له أهمية كبيرة فى إنتاج خلايا هجينية لبعض المحاصيل التى يصعب تهجينها بالطرق التقليدية لأسباب عدة مثل عدم وجود قرابة أو عدم توافق أو وجود عقم ذكرى أو مسببات أخرى. فإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست من نفس النوع النباتى تتكون نواة متجانسة Homokaryon. وإذا اندمج اثنان من البروتوبلاست واندمجت نواتاهما وهما مختلفان فى الجنس أو النوع تتكون نواة غير متجانسة Heterokaryon. وفى كلتا الحالتين تندمج النواتان بعد اندماج البروتوبلاست ثم يتكون جدار خلوى حول البروتوبلاست لتتكون خلية جديدة، وبزراعة خلية البروتوبلاست على بيئة غذائية وظروف بيئية مناسبة تنقسم ويتكون منها نبات كامل. وبالرغم من صعوبة التهجين فى الحقل بالطرق التقليدية بين نوعين من البطاطس أحدهما *S. tuberosum* (يكون درنات وغير مقاوم أو قليل المقاومة للأمراض) والثانى *S. brevidens* (لا يكون درنات ومقاوم للأمراض)، فقد نجح التهجين بينهما بدمج البروتوبلاست والحصول على نباتات كاملة من الخلية الهجينية. كذلك تم إنتاج هجينين أحدهما تابع للجنس *Brassica* وهو «*Brassica oleracea x B. compestris*» والآخر تابع للجنس *Medicago* وهو «*Medicago sativa x M. falcate*» بدمج البروتوبلاست وكان هناك صعوبة فى إنتاج الهجينين بالطرقة التقليدية. وتم الحصول أيضا على الهجين «*Nicotiana langsdorffii x N. glauca*» بدمج البروتوبلاست. وثبت أن الحالات التى ينجح فيها التهجين بين جنسين وإنتاج بذور منهما بالطرق التقليدية هما أيضا قادران على إنتاج هجن بطريقة الدمج بين البروتوبلاست. لذلك يجب اختيار مستعمرات

من البروتوبلاست نجح فيها الاندماج وتكوين هجن على أن يتوفر التوافق بينهما وتندمج جميع محتويات النواتين فى نواة هجينية. لأن كثيرا ما يؤدى الإندماج بين البروتوبلاست إلى فشل الأنوية فى الإندماج أو فقد بعض الكروموسومات نتيجة لعدم قدرتها على الحركة السريعة واللحاق بمرحلة التناسخ Replication، وبناء على ذلك يمكن أن تفقد أعدادا كبيرة من الخلايا نتيجة بطئها الشديد فى النمو وعدم قدرتها على الانقسام. وبعد إتمام اندماج البروتوبلاست تظهر صعوبة فى انتخاب الهجن الجسمية Somatic hybrids من مجموعة الخلايا الموجودة. فمثلا إذا حدث تهجين بين بروتوبلاست خليتين مختلفتى المصدر (A) و(B) فإن عشيرة الخلايا الهجينية الناتجة قد تحتوى بعضها على بروتوبلاست غير مندمج من (A) ومن (B) بجانب بروتوبلاست مندمج مكونا هجينا ذات نواة متجانسة Homokaryons (AA) و(BB). وقد تندمج النواتان مكونة نواة هجينية غير متجانسة Heterokaryons (AB) بجانب أنواع مختلفة متعددة الأنوية ومندمجة. وقد حدث تطور فى طرق انتخاب الهجين المرغوب (AB). ونجح التهجين الجسمى بين أنواع نباتية كثيرة مثل:

*Brassica campestris; B. oleraceae; B. napus; Medicago sativa; Petunia spp.; Lycopersicon lycopersicum; Solanum tuberosum; Daucus carota; Nicotiana species; Pennisetum americanum; Trifolium repens.*

كذلك نجح التهجين الجسمى بين أجناس نباتية مختلفة مثل:

*"Solanum tuberosum x Lycopersicon lycopersicum"*
*"Brassica x Arabidopsis"*
*"Daucus carota x Acgopodium podagraria"*

## ٢- إنتاج هجن سيتوبلازمية Cytoplasmic hybrids (Cybrids)

هى طريقة مازالت فى مراحلها الأولى لانخفاض نسبة نجاحها. حيث يتم التهجين بدمج بروتوبلاست (نواة + سيتوبلازم) لنبات (A) مع سيتوبلازم فقط من نبات (B). وقد نجحت هذه الطريقة فى إنتاج هجين سيتوبلازمى *"N. plumbagini-folia x Nicotiana tabacum"* وهذا النوع من التهجين هام فى حالة وجود ظاهرة

عقم ذكرى سيتوبلازمى Cytoplasmic male sterility تتحكم فيه جينات محمولة على الميتوكوندريا أو مقاومة بعض الأمراض أو مقاومة لبعض مبيدات الحشائش.

### ٣- زراعة الأنوية Transplantation of nuclei

تنحصر فى امتصاص نواة خلية ثم زراعتها فى خلية أخرى. أو فصل قطعة من الحمض النووى DNA عليها جين خاص بصفة محددة مثل مقاومة مرض معين، ثم إدخالها على جينوم نبات آخر. وتسمى هذه الطريقة بتهجين الحمض النووى. كذلك تشمل هذه الفكرة على فصل جسيمات مثل البلاستيدات والميتوكوندريا من سيتوبلازم خلية ما ونقلها إلى سيتوبلازم خلية أخرى. وهذه طريقة واعدة من طرق الهندسة الوراثية.

## ٤- إنتاج نباتات ثنائية ورباعية

يتم ذلك بدمج بروتوبلاست خليتين ثنائية العدد الكروموسومى لإنتاج خلية رباعية Tetraploid. أو دمج بروتوبلاست خليتين أحاديتين Haploids للحصول على نباتات ثنائية Diploids، ثم معاملة النباتات الثنائية بالكولشسين لإنتاج نباتات رباعية.

### ٥- التحور الوراثى Transformation

قد يؤدى دمج البروتوبلاست إلى تكامل جينى وظهور صفة فى الهجين الناتج غير موجودة فى الآباء مثل طفرتين من نبات التبغ *Nicotiana tabacum*- الأولى حساسة للضوء (SS vv) والثانية أقل حساسية (ss VV)- والتهجين بينهما أنتج هجينا (SSss VVvv) غير حساس للضوء وهى صفة غير متوفرة فى الآباء. كذلك وجد أن كلا من نباتى *Nicotiana glauca* و*B. langsdorffi* يحتاج إلى إضافة أكسين النمو إلى البيئة الغذائية، وبدمج البروتوبلاست بينهما أنتج هجينا يتميز بالاكتفاء الذاتى من الأكسين المنتج طبيعيا فى خلاياه.

### سلبيات التهجين الجسمى Disadvantages of somatic hybridization

لاحظ (Sneep, et al., 1982; Harms, 1983) وجود بعض السلبيات للتهجين الجسمى منها:

١- لا توجد طريقة ذات كفاءة عالية للانتخاب. والمنتج النهائى للتهجين الجسمى غالبا يكون عقيما أو متغيرا فى صفاته الخارجية أو غير ثابت وراثيا أو ميتا خصوصا فى حالة اندماج سيتوبلازم لأبوين غير متقاربين.

٢- نمو كايميرا بالكالس Chimeric calluses فى موقع الخلية الهجين نتيجة لعدم اندماج نواتى الخليتين بالرغم من اندماج البروتوبلاست.

٣- يؤدى التهجين الجسمى بين خليتين ثنائية العدد الكروموسومى إلى تكوين خلايا ملتصقة Amphidiploid وليست مندمجة، وهى ظاهرة غير مستحبة.

٤- يظهر فى الأجيال التالية للتهجين الجسمى بين أنواع متباعدة فى المملكة النباتية بعض الشذوذ مثل غياب كروموسوم أو حدوث انقسامات شاذة Aneuploids أو غياب نواة من السيتوبلازم Cybrids.

## إنتاج بروتوبلاست أحادى Haploid Protoplast

يتشابه بروتوبلاست خلايا طبقة الميزوفيل المفصول من نباتات أحادية مع برتوبلاست النباتات الثنائية من حيث الانقسام فى البيئة الغذائية وإعطاء نباتات قادرة على التكاثر. كذلك يمكن فصل البروتوبلاست من جميع أجزاء النبات تقريبا، وأصبح الآن من الأعمال الروتينية بصرف النظر عن إن كان مصدره نباتات أحادية أو متضاعفة العدد الكروموسومى. وقد تميل خلايا البروتوبلاست الأحادى إلى التضاعف الكروموسومى بعد زراعتها فى المعمل، ولكن النباتات الناتجة من بروتوبلاست التبغ والبيتونيا والبطاطس والأتروبا والداتورا تحتفظ بثباتها الوراثى وتظل أحادية العدد الكروموسومى. وقد ثبت أن زراعة بروتوبلاست خلايا الميزوفيل هى طريقة واعدة لإكثار النباتات الأحادية.

## ١- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح ناضجة

فى النباتات المزهرة Angiosperms ، القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة مغطاة بمادة Sporopollenin ، معقد من بوليميرات كاروتينية وإستر كاروتينات فى سلسلة مستقيمة غير متفرعة من مركب β-1,3 Glucan. وهى من أكثر المركبات العضوية صلابة ومقاومة لفعل المذيبات. ويمكن إذابتها فقط فى ايدروكسيد بوتاسيوم KOH ومحاليل مؤكسدة قوية وبعض القواعد العضوية الخاصة وبعض الكائنات الدقيقة ، ولكن لم يثبت إمكان هضمها بالإنزيمات. ويتم فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح ناضجة بإضعاف ثقب حبة اللقاح Germpore وإحداث تحلل جزئى للقشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح وإزالة القشرة بعد ذلك ميكانيكيا. ويستخلص البروتوبلاست الأولى Subpro- toplasts من أنبوبة حبة لقاح نابتة. ويتميز البروتوبلاست المفصول حديثا بشكله الكروى Spherical واحتوائه على فجوة Vacuole. فإذا عرضت عشيرة من البروتوبلاست للطرد المركزى يندمج بطريقة ذاتية ويكون بروتوبلاست عملاقا متعدد الأنوية Multinucleate giant protoplasts. وبزراعة البروتوبلاست معمليا يحدث له استطالة ثم انقسام وتكوين براعم قادرة على النمو (Bajaj, 1975).

## ٢- فصل البروتوبلاست من حبوب لقاح غير ناضجة

نظرا لصعوبة فصل البروتوبلاست من حبوب اللقاح الناضجة فإنه يفضل استخلاصه من خلايا أمية لحبوب اللقاح Pollen mother cells وهى فى مرحلة ميكرة من النمو ويفضل أن تكون فى مرحلة الانقسام الرباعى Pollen tetrads ، حيث تكون مغلفة بجدار بسيط غير معقد مثل القشرة الخارجية Exine لحبة اللقاح الناضجة. وخطوات فصل وزراعة البروتوبلاست من خلايا أمية لحبوب اللقاح وهى فى الطور الرباعى Tetrad قد حددها كالآتى:

١- يفصل متك واحد تحت ظروف معقمة من برعم زهرى حديث ثم يصبغ بصبغة Aceto-carmine للتأكد من مرحلة نمو حبوب اللقاح.

٢- تقطع نهاية قاعدة المتك بواسطة مشرط مدبب الطرف. ثم يضغط على المتك ضغطا خفيفا لإفراز محتواه إلى الخارج باستخدام ملعقة زجاجية Spatula. مع مراعاة أن الضغط الشديد نسبيا يؤدى إلى إخراج الخلايا ثنائية العدد الكروموسومى Diploid من المتك فى صورة شريطية Tapetal cells. وتظهر محتوى الخلايا الأمية لحبوب اللقاح والخلايا الرباعية Tetrads فى صورة محلول لبنى.

٣- يعامل البروتوبلاست المستخلص بخليط من إنزيم هليكيز Helicase تركيز ٠,٧٥- ١٪ مضافا إليه ٨- ١٠٪ سكروز (إنزيم هليكيز مستخلص من أمعاء قواقع (Snail intestines، وتحضن لمدة ٣٠- ٤٥ دقيقة. ويستخدم خليط الإنزيم بمعدل واحد ملليلتر لكل متك واحد فقط.

٤- بعد التحضين يتم إحلال خليط الأنزيم بمحلول ١٠٪ سكروز ويترك حتى يستقر البروتوبلاست.

٥- يشطف البروتوبلاست عدة مرات ببيئة سائلة طازجة، ثم يضاف البروتوبلاست إلى بيئة سائلة، ثم يزرع فى المعمل، فتتكون جدر لبعض البروتوبلاست وتظهر عليه براعم. وقد يحدث انقسام أحيانا. وعادة تكون كمية البروتوبلاست المستخلص قليلة. لذلك لا يفضل إجراء الطرد المركزى حتى لا تنخفض كميته. وتلقى زراعة بروتوبلاست حبوب اللقاح قبولا فاترا لقلة ما ينتجه من نباتات أحادية.

□□□