Sohag University
Faculty of Agriculture
Department of Genetics

جامعة سوهـــــاج
كليــة الزراعــــــــــــة
قسم الوراثـــــــــــة

المحاضرة الثامنة

زراعة الانسجة والتكنولوجيا الحيوية

المستوي الثالث برنامج التكنولوجيا الحيوية

اعداد

د. احمد يوسف محمد
قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة سوهاج

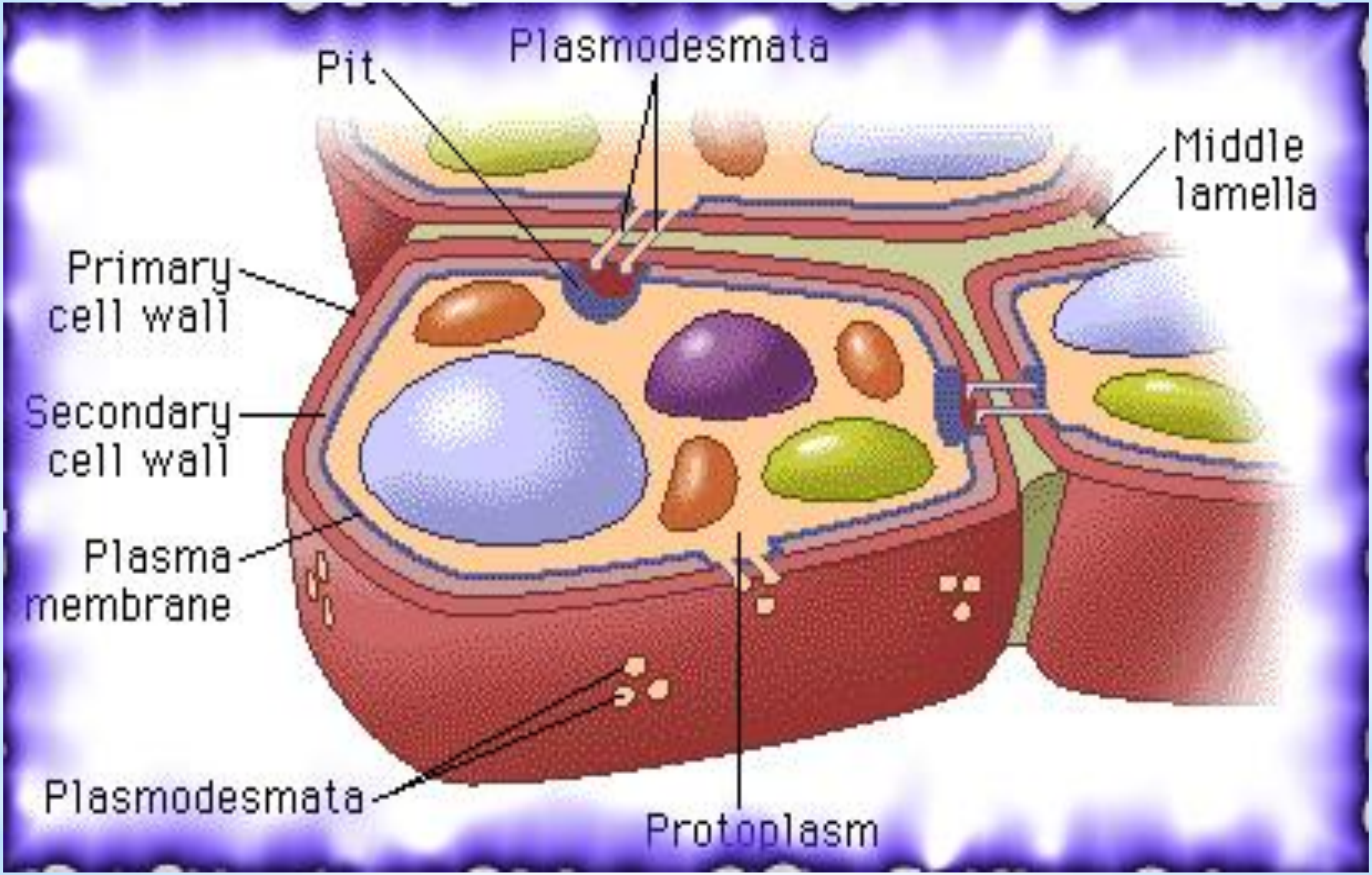
فصل وزراعة البروتوبلاست (Isolation and culture of protoplast):

يعرف البروتوبلاست أنه أي خلية (نباتية أو فطرية أو بكتيرية) تم نزع الجدار الخلوي بها بطريقة معينة. ولمعرفة كيفية إزالة الجدار الخلوي من الخلايا النباتية ، يجب في البداية أن نتعرف علي تركيب الجدار الخلوي للخلية النباتية، حيث يتكون الجدار الخلوي من ثلاث طبقات:

Middle lamella : وهي الطبقة التي تفصل الخلايا المجاورة ببعضها وتكون من الخارج بالنسبة للخلية. وتتكون هذه الطبقة من البكتين (عديد السكريات) والبروتينات. وتساعد هذه الطبقة في لصق وضبط محاذاة الخلايا ببعضها.

Primary cell wall: وهي طبقة أولية في الجدار الخلوي، وتعتبر أكبر مكون فيه حيث تتكون من ألياف دقيقة من السيليلوز والبكتين وأشباه السيليلوز والبروتينات السكرية. وهي تمنح الخلية المرونة والقابلية للنمو.

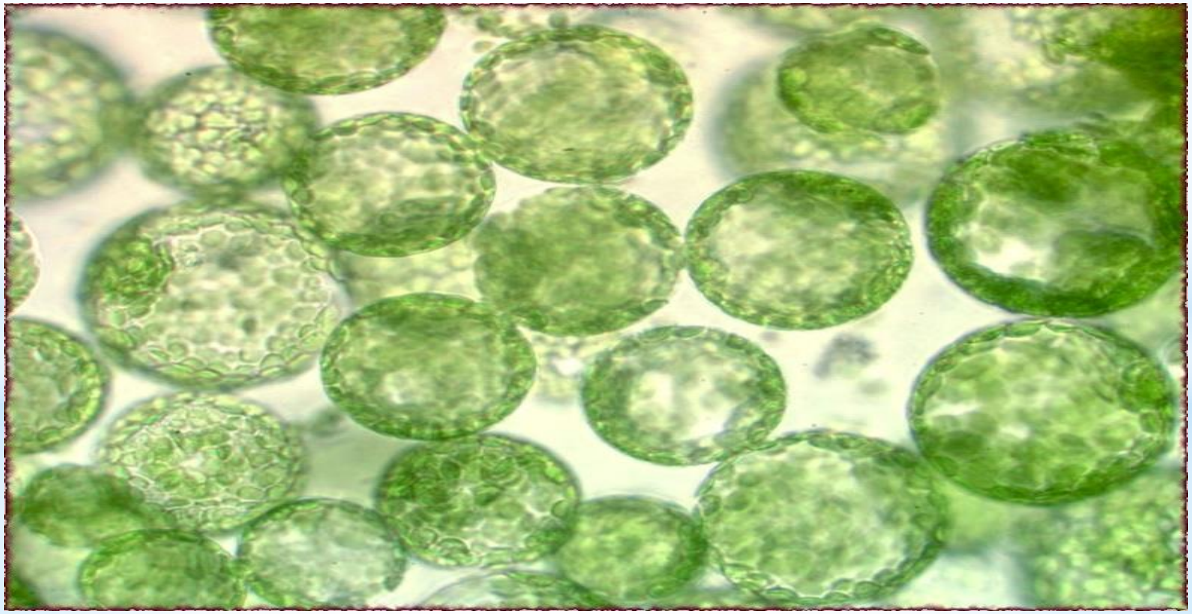
Secondary wall: وهي الطبقة الداخلية من الجدار الخلوي التي تجاور الغشاء البلازمي للخلية، وهي تتكون في بعض الخلايا النباتية التي أنهت نموها وإنقسامها حيث تساعدها في الصلابة والثبات. وتتكون من السيليلوز وأشباه السيليلوز واللجنين الذي يساعد الخلية في إظهار الصلابة ، كما يساعد في توصيل الماء في خلايا الأنسجة النباتية الوعائية.



التركيب الدقيق للجدار الخلوي للخلية النباتية

طرق فصل البروتوبلاست:

تعتمد كفاءة فصل البروتوبلاست على إمكانية إزالة الجدار الخلوي مع عدم إحداث أضرار للبروتوبلاست والإحتفاظ بحيويته وذلك بتوفير بيئة ذات ضغط إسموزي مناسب بإستخدام مادة للمحافظة على ثبات الضغط الإسموزي يختلف تركيزها تبعاً لنوع النسيج النباتي والظروف التي ينمى فيها النبات، وكان من المعتاد إستخدام الأملاح المعدنية للمحافظة على ثبات الضغط الإسموزي ولكن مع تطور طرق الفصل تم إستبدال الأملاح بالسكريات.



لماذا تفضل السكريات عن الأملاح في المحافظة على ثبات الضغط الإسموزي؟

للأسباب التالية:

١. الفصل بالإنزيمات يحتاج لفترة طويلة من التحضين في بيئة الفصل ، وخلال هذه الفترة فإن معدّل إختراق الأملاح للبروتوبلاست يكون أعلى من السكريات.

٢. في بعض الأحيان يقلل إستخدام الأملاح المعدنية من كفاءة الإنزيمات في التخلص من الجدار الخلوي.

وعموماً يعتبر المانيتول أفضل مادة تستخدم للمحافظة على الضغط الإسموزي للبروتوبلاست وهذا يرجع إلى بطئ إختراقها للخلية.

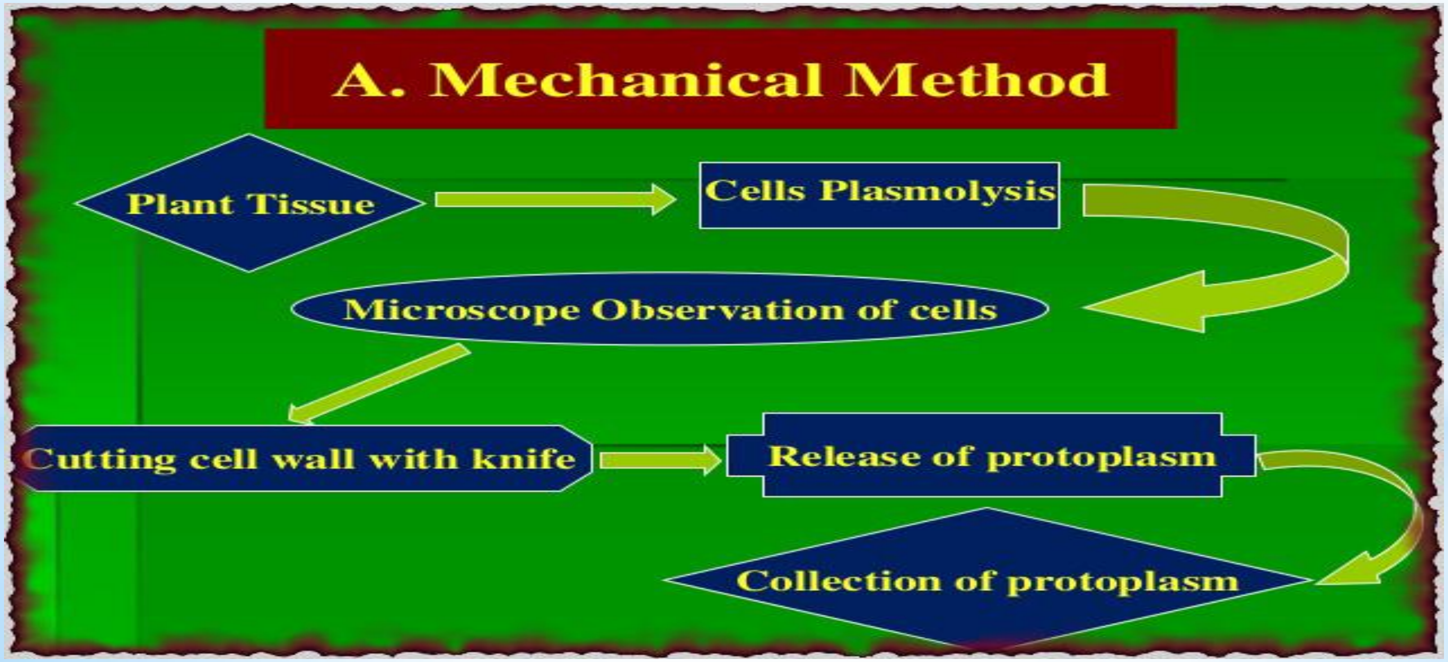
و هناك طريقتين أساسيتين لفصل البروتوبلاست من الجدار الخلوي وهما:

١. الفصل الميكانيكي (Mechanical Isolation)

٢. الفصل الخلوي (الإنزيمي) (Enzymatic Isolation)

أولاً: طريقة الفصل الميكانيكي (Mechanical Isolation):

تعتمد هذه الطريقة على مقدرة البروتوبلاست على الإنكماش في الحجم بحيث يصبح غير ملامس للجدار الخلوي، لإجراء الفصل الميكانيكي يعامل النسيج النباتي أولاً بمحلول ذو ضغط إسموزي يؤدي لإنكماش البروتوبلاست وبذلك ينفصل عن السطح الداخلي للجدار الخلوي، بعد ذلك يقطع النسيج النباتي إلى شرائح بواسطة مشرط ويوضع في محلول ذو ضغط إسموزي منخفض يعمل على زيادة حجم البروتوبلاست ونتيجة لذلك ينطلق من فتحة الجدار الخلوي إلى البيئة المحيطة.



مميزات طريقة الفصل الميكانيكي:

عدم تعرض البروتوبلاست للإنزيمات التي قد تؤثر على حيويتها وقدرتها على النمو والإنقسام

عيوب طريقة الفصل الميكانيكي:

١. حدوث اضرار لبعض البروتوبلاست أثناء عمليات الفصل وهذه تؤثر على مقدرتها على النمو والإنقسام النشط.

٢. يعتبر عدد البروتوبلاست المنفصل بهذه الطريقة قليل جداً مقارنة بمثيله الناتج من الفصل بواسطة الإنزيمات.

٣. لابد أن تحتوي الخلية النباتية المراد فصل البروتوبلاست منها على فجوة عصارية كبيرة وذلك لتسهيل قابليتها للإستجابة للتغيير في الضغط الإسموزي بإنكماش وتمدد البروتوبلاست.

ثانياً: طريقة الفصل بالإنزيمات (Enzymatic isolation):

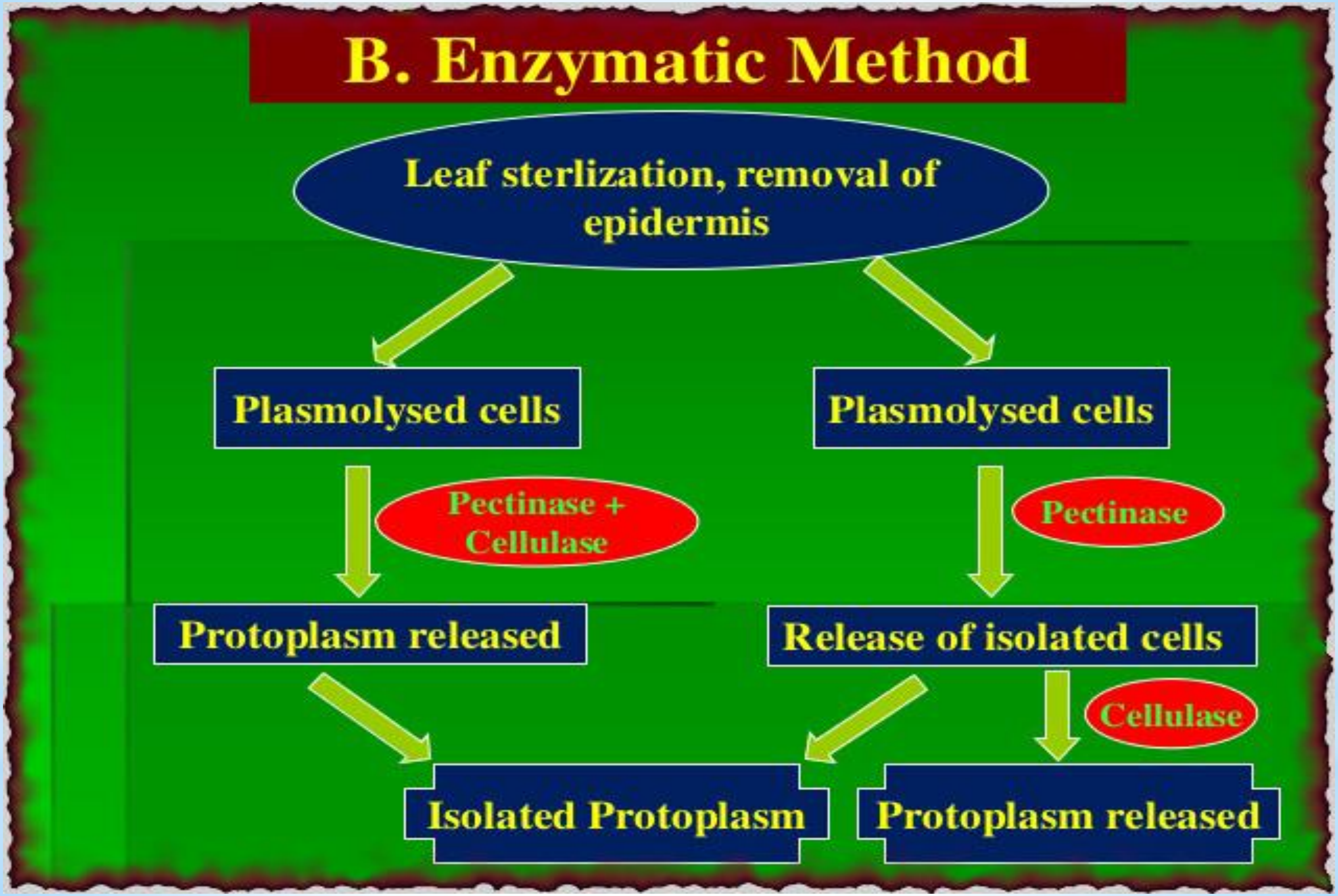
نحن نعرف أن الجدار الخلوي يتكون من خليط من ألياف السليولوز مغطاة بمادة الهيميسليولوز، كما يحتوي على بروتينات ودهون بنسب مختلفة، وبتقدم الخلية في العمر وتكشفها فإن نسبة السليولوز تزداد. كذلك فإن الطبقة الوسطى التي تقع بين الخلايا تتكون من البكتين وهي تعتبر مسؤولة جزئياً عن تلاحم الخلايا المجاورة، وبهذا يتضح لنا أن طبيعة تركيب الجدار الخلوي والطبقة الوسطى تُحتّم علينا إستعمال إنزيمات تحلل كلاً من السليولوز والهيميسليولوز والبكتين، ويعتمد تركيز الإنزيمات المستخدمة وطول فترة المعاملة على طبيعة النسيج النباتي المستخدم.

مميزات الفصل بالإنزيمات:

توفير عدد كبير من البروتوبلاست للعمل عليها بعد التخلص من بقايا النسيج النباتي.

عيوب الفصل بالإنزيمات:

يمكن أن تؤثر الإنزيمات على حيوية البروتوبلاست وقدرته على الإنقسام



Dr. Ahmed Youssef Mohamed-
a_yousef2005@yahoo.com

٧. ويمكن فصل البروتوبلاست من أنسجة مختلفة كما يلي:

فصل البروتوبلاست من الأوراق (Protoplast isolation from leaves)

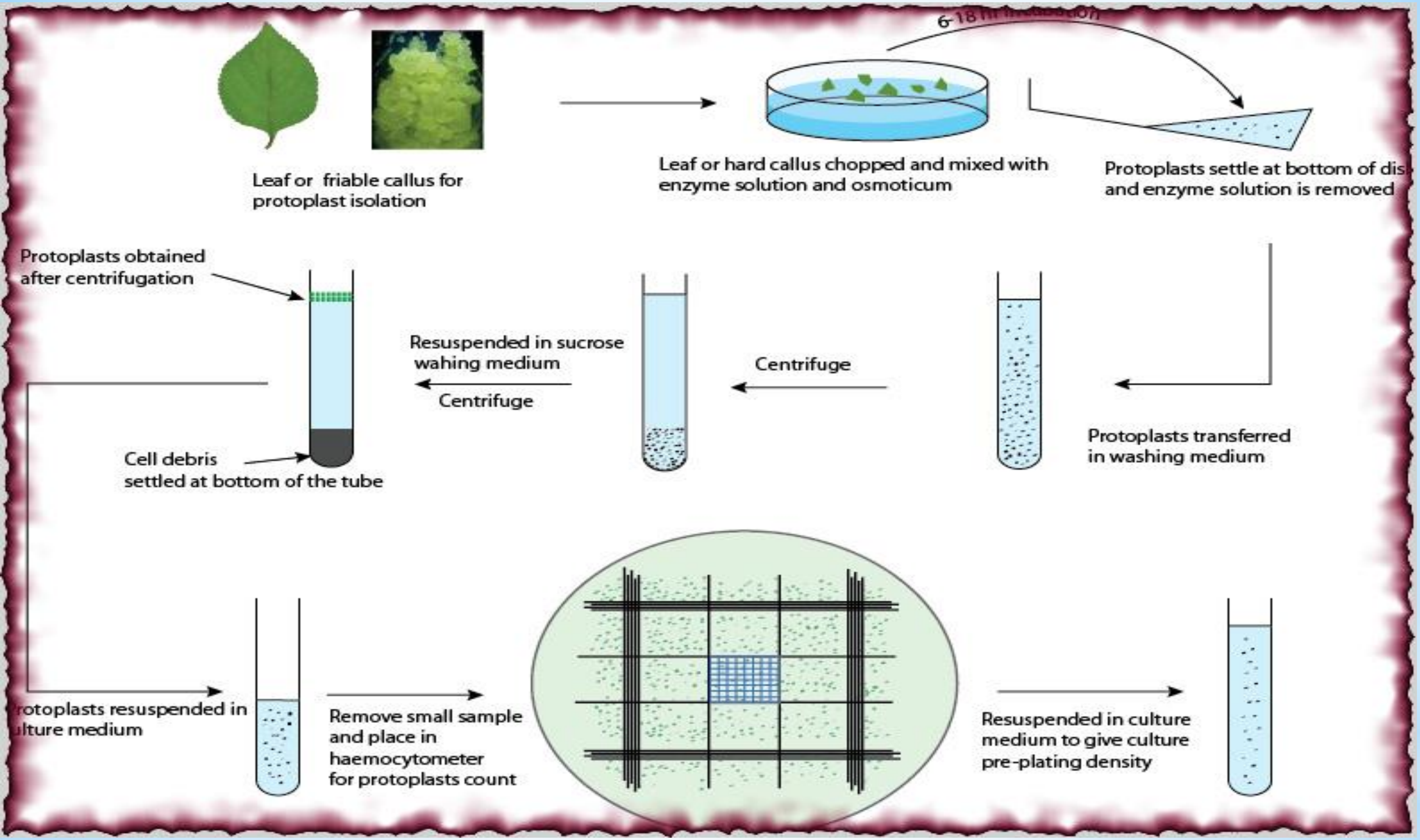
يتم فصل البروتوبلاست من الأوراق من خلال أربعة مراحل هامة:

١. تعقيم السطح الخارجي للأوراق.

٢. إزالة طبقة الأبيدرمس (Epidermis) من الأوراق بواسطة ملقط و مشرط تشريح.

٣. معاملة النسيج النباتي بالإنزيمات المحللة للجدر الخلوية مع توفير الضغط الإسموزي المناسب للبروتوبلاست.حيث يتم تقطيع الأوراق وغمرها في المحلول ويتم تحضينها علي درجة حرارة من ٢٥-٣٠ درجة مئوية وتترك لفترة من نصف ساعة إلي ٢٠ ساعة متوقفاً ذلك علي النوع النباتي والإنزيمات المستخدمة وتركيزها.

٤. فصل البروتوبلاست بواسطة التمرير من خلال فلتر أو إستخدام جهاز الطرد المركزي



صورة توضح طريقة فصل البروتوبلاست من الورقة

فصل البروتوبلاست من المعلق الخلوي (Protoplast isolation from cell suspension)

تعتبر خلايا المعلق الخلوي خاصة في مرحلة الإنقسام النشط مصدراً جيداً للحصول على البروتوبلاست (Uchimiya & murashige 1974) وفي هذه الطريقة:

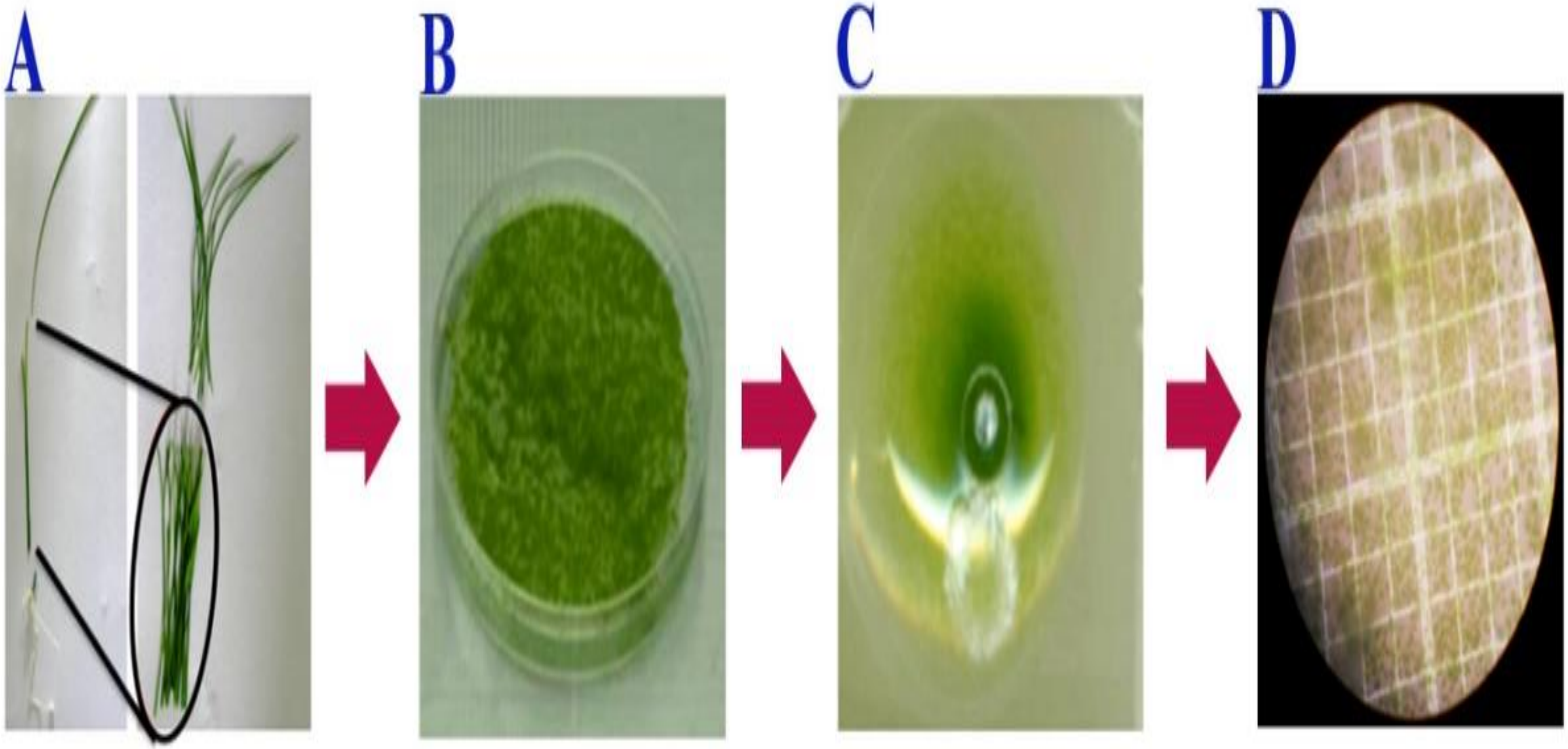
١. يُنقل حوالي ٥ مل من المعلق الخلوي إلى إنبوبة بغطاء.

٢. توضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي لفصل الخلايا عن البيئة المغذية وذلك على سرعة ١٠٠ لفة في الدقيقة لمدة ١-٢ دقيقة.

٣. تُزال البيئة المغذية ويوضع محلول الإنزيمات المحللة والذي يحتوي على إنزيمات السيلولاز بتركيز ١٤%، البكتيناز بتركيز ٢,٥% .

٤. ينقل محتويات الأنبوبة إلى طبق بتري الذي يوضع على جهاز هزاز على سرعة ٣٥-٧٥ لفة/ دقيقة لمدة تتراوح بين ٢-٦ ساعات.

٥. بعدها يفصل البروتوبلاست وينقل إلى بيئة مغذية.


A
B
C
D

فصل البروتوبلاست من الكالس (Protoplast isolation from callus)

١. يمكن الحصول على كمية كبيرة من البروتوبلاست بواسطة إستخدام الكالُس النشط.

٢. في حالة إستخدام الكالُس كمادة نباتية للحصول على البروتوبلاست فإنه يُستَخدم تركيز أقل من الإنزيم المُحلّل للسليولوز كما أن فترة التحضين تقل عن مثيلتها في فصل البروتوبلاست من الورقة.

٣. من أهم النقاط التي يجب أن تراعى في هذه الطريقة أن يكون الكالُس حديث العمر وذلك لأن الكالُس المتقدم في العمر يحتوى خلايا ذات جدر خلوية سميكة وهذه قد يصعب تحلّلها بواسطة الإنزيمات.

كذلك يمكن أستخلاص البروتوبلاست من خلايا النسيج الوسطي حيث تكون مفككة لحد ما عن بعضها وبالتالي يسهل علي الإنزيمات التخلل بين الخلايا وهدم جدرها.

ضبط الأسموزية:

عند زراعة البروتوبلاست علي البيئات العادية يؤدي ذلك إلي انفجار الخلايا ، وذلك بسبب إختلال الضغط الأسموزي في الخلايا لذا يجب ضبط الأسموزية ببعض المواد الكيميائية . ووجد أن خلايا البروتوبلاست تميل لأخذ الشكل الدائري (الكروي) عند تعادل الضغط الأسموزي ، ولكن يفضل أن يكون الضغط الأسموزي مرتفع نوعاً ما وذلك لضمان ثبات البروتوبلاست، مع العلم بأن الضغط الأسموزي المرتفع جداً غير محبذ لأنه قد يؤدي لتنشيط بعض العمليات الميتابولزمية. ويمكن ضبط الأسموزية باستخدام بعض السكريات مثل المانيتول Mannitol والسوربيتول Sorbitol والسكروز Sucrose والجلوكوزGlucose . ويعمل المثبت الأسموزي علي استبعاد التغيرات الفجائية التي تحدث عند نقل الخلايا من بيئة لأخري.

طرق تنقية البروتوبلاست:

بعد المعاملة الإنزيمية نحصل علي خليط من الخلايا الكاملة (غير منزوعة الجدار الخلوي) وخلايا متهتكة وخلايا بروتوبلاست. لذا يجب تنقية البروتوبلاست من هذه الشوائب وتستخدم لذلك عدة طرق هي:

١. طريقة الترشيح مع الطرد المركزي:

يتم فيها عمل ترشيح لنواتج الهضم الإنزيمي بفلاتر خاصة قطر الثقوب فيها حوالي 45 μm ، يليها إجراء طرد مركزي لنواتج الترشيح . يتم تجميع الطبقة العليا (الخفيفة ، المحتوية علي خلايا البروتوبلاست). وتمتاز هذه الطريقة في أن المحلول المستخدم في التنقية هو نفسه المستخدم في العزل. ويعاب عليها في أن خلايا البروتوبلاست تتعرض للتكسير أثناء الترشيح.

٢. طريقة التعويم Floatation:

وفي هذه الطريقة يتم إضافة محلول مركز من السكروز أو السوربيتول لمخلوط الإنزيمات المستخدم ، يلي ذلك عمل طرد مركزي، حيث يتجمع البروتوبلاست عند السطح العلوي لأنبوبة الطرد المركزي بينما تترسب الأجزاء الأخري في قاع الأنبوبة وينشأ عن هذه الطريقة تكسير للبروتوبلاست ولكن بصورة أقل من الطريقة الأولي. إلا أنه قد تحدث للبروتوبلاست أضرار أخري نتيجة الضغط الأسموزي العالي الناتج من إضافة السكريات.

٣. طريقة الفيكول Ficoll:

يتم تحضير بيئة غذائية (MS مثلاً) ، يتم إذابة الفيكول (نوع نقي من الأجار) بحيث يكون تركيزه 6% وتوضع نواتج الهضم الإنزيمي ويجري الطرد المركزي بسرعة 150 لفة في الدقيقة لمدة خمس دقائق. نجد أن خلايا البروتوبلاست تتجمع في الطبقة العليا. بينما تترسب الخلايا غير منزوعة الجدار الخلوي وتكسير الخلايا والأنسجة الوعائية في قاع الأنبوبة. ويتميز الفيكول بأنه لا يوجد له تأثير علي الضغط الأسموزي واستخدامه يفضل علي استخدام السكروز أو السوربيتول.

زراعة البروتوبلاست وتكشف النباتات:

تتم زراعة البروتوبلاست في بيئات تشبه لحد ما البيئات الغذائية العادية المستخدمة في زراعة الانسجة ولكنها تحتوي علي بعض الإضافات الخاصة وبعض التعديلات في تركيز الأملاح مثل إختزال كمية الأمونيوم وزيادة تركيز الكالسيوم وغيرها. وتتم الزراعة غالباً بكثافة تصل إلي ٢٥٠ خلية لكل مليلتر بيئة. ويمكن استخدام أحد الطرق التالية في الزراعة:-

١. طريقة القطرات السائلة:

يتم عمل معلق للبروتوبلاست في بيئة سائلة، ثم يؤخذ 0.1 - 0.2 مل من المعلق وتوضع في أطباق بتري معقمة، حيث يمكن زراعة من 5– 7 قطرات في الطبق الواحد. وتعتبر هذه الطريقة مناسبة للفحص الميكروسكوبي في حالة الرغبة في تتبع مراحل تطور البروتوبلاست ويمكن إضافة قطرات إضافية من البيئة الغذائية الطازجة كل 5– 7 أيام.

يعاب علي هذه الطريقة حدوث تجمع لخلايا البروتوبلاست داخل قطرة البيئة.

٢. طريقة مزرعة الأجار:

وفي هذه الطريقة يمكن زراعة البروتوبلاست بأحد اتجاهين:

اولاً: يمكن زراعته في البداية في بيئة سائلة حتي يتم بناء الجدار الخلوي للخلايا ثم يخلط قدر من البيئة السائلة مع الأجار.

ثانياً: تتم زراعة البروتوبلاست مباشرة علي بيئة الأجار وفي هذه الحالة نتجنب حدوث تجمع للخلايا. كما يمكن الحصول من هذه الطريقة علي مستعمرات خلايا بروتوبلاست منفصلة حيث أن كل مستعمرة ناتجة من خلية واحدة.

٣. طريقة الطبقات المغذية:

يتم في هذه الطريقة زراعة البروتوبلاست بإستخدام مزارع الأجار السابق توضيحها مع إضافة بعض خلايا البروتوبلاست الغير حية (مقتولة أو معاملة إشعاعياً) كمادة غذائية تعمل علي زيادة نجاح الزراعة خاصة في بعض حالات البروتوبلاست صعب الإنقسام والتكشف.

٤. الزراعة المشتركة :

تتم زراعة خليط من البروتوبلاست ، نوع سريع النمو مأخوذ من نبات معين مع نوع آخر ضعيف وبطئ النمو وفي هذه الحالة من المفترض أن يمد البروتوبلاست الفعال (سريع النمو) البروتوبلاست الآخر بعوامل معينة تعمل علي تنشيط بناء الجدار الخلوي وتنشيط النمو. ويجب أن تكون هناك طريقة ما تمكنا من تمييز نوعي البروتوبلاست بحيث يكون أحدهما خاص بنبات ألبينو مثلا.

٥. طريقة النقطة المعلقة:

تتم زراعة البروتوبلاست في قطرات سائلة في طبق بتري مقلوب حجمها يتراوح من 0.25– 0.50 ميكروليتر. وتسمح هذه الطريقة بزراعة عدد قليل من البروتوبلاست في القطرة الواحدة وعادة ما تستخدم في زراعة الخلايا المفردة من البروتوبلاست.

الأنقسام وتكوين الكالس:

العوامل التي تؤثر علي انقسام البروتوبلاست وتكوين الكالس:

١. تكوين الجدار الخلوي.

٢. الطراز الوراثي المستخدم.

٣. بيئة الزراعة.

٤. الظروف البيئية للمزرعة.

٥. حالة النسيج المستخدم في عزل البروتوبلاست.

ووجد أن البروتوبلاست المعزول من معلقات الخلايا يعطي نسبة عالية من الإنقسام الخلوي عن غيره من الأنسجة . ولوحظ في بعض الحالات حدوث إنقسام للنواة دون حدوث إنقسام خلوي مما يتسبب في وجود خلايا متعددة الأنوية قد تنمو وتكون نباتات متعددة المجموعة الكروموسومية

كما أنه قد يحدث اندماج ذاتي للبروتوبلاست ويؤدي ذلك أيضا إلي حدوث Polyploidy

التطبيقات المختلفة لزراعة البروتوبلاست:

١. أفضل وأدق الطرق لدراسة وراثة الخلية الجسمية.

٢. تحسين النبات.

٣. إكثار الخلايا والحصول علي طفرات.

٤. دراسة بناء الجدار الخلوي.

٥. دراسة خصائص الغشاء البلازمي.

٦. دراسة العدوي الفيروسية.

٧. دراسة إدخال المواد الحية وغير الحية إلي داخل الخلية.

٨. إندماج البروتوبلاست من خلايا مختلفة.

اتحاد البروتوبلاست وانتاج الهجن السيتوبلازمية:

قد يحدث اندماج تلقائي لخلايا البروتوبلاست في مراحل زراعته المختلفة. كما أنه قد يجري هذا الاندماج بطريقة صناعية (مستحدثة).

أولاً: الإتحاد التلقائي للبروتوبلاست Spontaneous fusion :

قد تلتحم بعض خلايا البروتوبلاست المتجاورة أثناء عملية الهضم الإنزيمي للجدر الخلوية. ينتج عن هذا الإلتحام خلايا تحتوي علي عدة أنوية متماثلة تعرف بالـ Homokaryons . ويتراوح عدد الأنوية في الغالب من نواتين إلي أربعة أنوية في الخلية الواحدة.

ثانيا: الاتحاد المستحدث للبروتوبلاست Induced fusion :

يتطلب التهجين الخضري بين خلايا البروتوبلاست Somatic hybridization المختلفة المنشأ عادة إتحاد مستحدث لها، لأن الإندماج التلقائي في الغالب لا يصلح في مثل هذه الحالات لأنه يكون بتكرارات منخفضة وغالباً لنفس النوع من الخلايا.

ومن الطرق المستخدمة في الإندماج المستحدث ما يلي:

١. المعاملة بنترات الصوديوم ($NaNO_3$):

وجد أن استخدام محلول من نترات الصوديوم منخفض الأسموزية Hypotonic solution يمكنه استحداث اندماج بين خلايا البروتوبلاست. إلا أن نسبة الخلايا المندمجة والمحتوية علي أنوية مختلفة (Heterokaryons) تكون منخفضة خاصة في حالة استعمال بروتوبلاست ناتج من خلايا تحتوي علي فجوات عصارية كثيرة.

٢. المعاملة بتركيز عالي من الكالسيوم تحت PH عالي:

تم استخدام هذا البروتوكول في الحصول علي هجن خضرية بين وداخل الأنواع في نبات الدخان. حيث يستخدم رفع الـPH لدرجة 10.5 مع إضافة تركيز عالي من الكالسيوم في صورة (كلوريد الكالسيوم المائي: $50\ mM\ CaCl_2.H_2O$) علي درجة حرارة $37\ C°$ لمدة نصف ساعة، إلا أن الوسط القاعدي يسبب موت البروتوبلاست في بعض الأنواع النباتية. ولقد أمكن بواسطة إستخدام هذه الطريقة الحصول على هجين جسدي من إندماج البروتوبلاست (**Melchers &labib 1974**).

١. المعاملة بالبولي إيثيلين جليكول Polyethylene glycol (PEG) :

تعتبر هذه الطريقة شائعة الاستخدام في اتحاد البروتوبلاست وإنتاج الهجن الخضرية. وهي تم عن طريق خلط نسب معينة من بروتوبلاست الأبوين المراد إحداث الاندماج بينهما ثم معاملتهما بمحلول من الـ PEG بتركيز من 50% – 28% لمدة 15-30 دقيقة . ثم تتم عملية غسيل تدريجي للبروتوبلاست بإستخدام محلول قلوي PH=9 من ايونات الكالسيوم (Ca^{++}).

أسباب نجاح طريقة الـ PEG :

١. ارتفاع نسبة الحصول علي خلايا بروتوبلاست مندمجة ومحتوية علي نواتين مختلفتين.

٢. لا تسبب موت الخلايا في معظم الأنواع النباتية.

٣. يمكن الحصول علي تجمعات خلوية (خليتين أو ثلاثة).

٤. الإندماج بين الخلايا غير متخصص، أي يمكن أن يحدث بين الأنواع النباتية المختلفة.

ميكانيكية التحام البروتوبلاست:

تتم عملية التحام البروتوبلاست خلال ثلاثة مراحل:

1. التجاور والالتصاق: حيث يحدث تجاور بين خليتين أو أكثر من البروتوبلاست ثم التصاق للإغشية الخلوية البلازمية الخاصة بها.
2. التحام الأغشية الخلوية البلازمية: حيث يحدث الإلتحام بين الخلايا المتلاصقة في عدة مواضع لتتكون قنوات سيتوبلازمية بين الخلايا.
3. الإندماج الكلي: تستمر عملية تكوين القنوات السيتوبلازمية ويحدث لها اتساع لتنتهي بإندماج تام بين الخلايا مكونة خلية واحدة كروية الشكل تحتوي نواتين أو أكثر مختلفة أو متماثلة علي حسب نوع الخلايا المندمجة.

ملاحظات عامة عن إندماج البروتوبلاست:

- يحدث خلط بين سيتوبلازم الخلايا المندمجة في الغالب بعد بضع ساعات.
- في حالة اندماج خلايا ذات أنوية مختلفة تموت الخلايا المندمجة إذا حدث الإندماج أثناء الطور البيني في دورة الخلية بينما تستطيع الخلايا الناتجة من الإندماج من الإستمرار في النمو ومواصلة الانقسام إذا حدث الإندماج في مراحل الإنقسام الميتوزي.
- ينجح اندماج البروتوبلاست بنسبة عالية إذا كانت الخلايا من نفس النوع النباتي وتتكون الهجن الخضرية بنسبة عالية.
- في حالة اندماج البروتوبلاست من خلايا أنواع نباتية مختلفة فغالباً ما يحدث استبعاد تدريجي لكروموسومات أحد الأبوين أو تحدث شذوذات كروموسومية في خلايا الهجن الناتجة مثل Bridges- Ring chromosomes – Fragments.
- يظهر إنعزال للمكونات السيتوبلازمية في خلايا الهجن الخضرية حيث تحتفظ الخلايا في الغالب علي بلاستيدات أحد الأبوين.
- يحدث أحياناً تكون اندماجات محتوية علي أكثر من نواتين وهي ناتجة من اندماج أثر من خليتين. ومعظم هذه الخلايا لا تستطيع الاستمرار والنمو القليل منها يبدأ في الإنقسام مكوناً افراد هجينة.

مميزات استخدام الهجن الخضرية:

١. انتاج هجن جديدة لا يمكن الحصول عليها بالتهجين الجسمي.

٢. الحصول علي أفراد رباعية المجموعة الكروموسومية Tetraploids .

٣. الحصول علي التراكيب الثنائية المتضاعفة خليطياً أو ما يعرف بشبيهات التراكيب الثنائية Amphidiploids وذلك عند استخدام بروتوبلاست احادي المجموعة الكروموسومية في التهجين يليه مضاعفة المجموعة الكروموسومية للخلايا الناتجة.

٤. إمكانية إجراء التهجين في أي عمر فسيولوجي غير مرتبط بوقت التزهير.

٥. يمكن عمل تهجين للنباتات منخفضة الحيوية أو في حالة عقم ذكري كامل.

٦. يمكن الحصول علي توافيق مختلفة ناتجة من التهجين وهذا مفيد جداً في حالة نقل الصفات الوراثية من الأنواع البرية إلي الأصناف المنزرعة بعكس برامج التربية التقليدية.