الفصل الثامن

زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture

8-1- مقدمة :

تعد زراعة البروتوبلاست إحدى الطرائق الأساسية من تقنيات زراعة الأنسجة النباتية. والبروتوبلاست بالتعريف هي خلية نباتية خالية من الغشاء البكتوسللوزي، وتحوي كافة مكونات الخلية النباتية من السيتوبلاسم والنواة والصانعات والميتوكوندري والفجوة وتكون محاطة بالغشاء السيتوبلاسمي كما هو موضح بالشكل (8-1). تعد البروتوبلاست أصغر جزء نباتي يتم زرعه في أوساط مغذية صلبة او سائلة. تحتفظ البروتوبلاست بقدرتها في تكوين نباتات كاملة مثل الخلايا النباتية ، ويمكن القيام بتطبيق بعض التقنيات التي لايمكن تطبيقها في الخلايا النباتية بسبب وجود الجدار الخلوي. لذلك لها أهمية علمية وتطبيقية في مجال تربية النبات والتحسين الوراثي وفي مجالات الهندسة الوراثية.

قبل البدء بدراسة البروتوبلاست وكيفية الحصول عليها وزرعها، لابد لنا من تذكر الخلية النباتية ومكوناتها المختلفة. يوضح الشكل (8-1)المرفق بنية الخلية النباتية بمكوناتها المختلفة الأساسية.

يتألف الجدار الخلوي من طبقتين :

- طبقة بكتينية تعمل على ربط الخلايا النباتية مع بعضها البعض في النسيج البارانشيمي ، وعند تفكيك هذه الطبقة يتم تحرير الخلايا النباتية عن بعضها البعض.
- طبقة من السللوز والهيميسللوز تحيط بالخلايا النباتية وعند هضم هذه الطبقة يتم تحرير البروتوبلاست.

يلعب الجدار البكتوسللوزي دورا هاما في حياة الخلية النباتية، فهو يقوم بالوظائف التالية:

1- حماية الخلية من المؤثرات الخارجية.
2- المحافظة على شكل الخلية النباتية، نتيجة اختلاف في الضغط بين داخل وخارج الخلايا.
3-تحتوي على انزيمات ضرورية لاستقلاب الخلوي ومهمة للنمو والانقسام الخلوي.
4- يحوي الجدار على فتحات دقيقة تسمح بنقل ومبادلة المواد الغذائية والمركبات الأساسية بين الخلايا.

لذلك من الضروري عند نزع الجدار الخلوي لتحرير البروتوبلاست إضافة بعض المواد الحافظة لوسط الاستخلاص للمحافظة على حياة البروتوبلاست حتى لاتتعرض للتخريب بفعل اختلاف الضغط الحلولي بين وسط الاستخلاص وداخل البروتوبلاست. يضاف عادة بعض المواد الحافظة للضغط الحلولي مثل المانيتول والسوربيتول والغلوكوز.

8-2- مزايا زراعة البروتوبلاست:

تعد تقنية زرع البروتوبلاست من التقنيات الهامة التي لها تطبيقات كثيرة في مجال تربية النبات والهندسة الوراثية وبحوث الإجهادات الحيوية واللاحيوية في النبات. لهذه التقنية مزايا وفوائد كثيرة منها:

1- تعد تقنية البروتوبلاست إحدى تقنيات الإكثار الخضري عندما تتطور وتعطي أجنة خضرية مباشرة أو تعضي مباشر دون المرور بمرحلة الكالوس.

2- يمكن الحصول على زيادة في الخلط الوراثي عند تطور البروتوبلاست وتكوين كالوس ومن ثم نباتات كاملة، كما يمكن الحصول على سلالات أو أصناف جديدة أو طفرات لها أهمية تطبيقية في مجال التحسين الوراثي للنباتات الاقتصادية.

3- يتم الحصول على أنواع نباتية جديدة عن طريق دمج البروتوبلاست.

4- يمكن الحصول على هجن خضرية متجانسة Somatic Hybrid أو غير متجانس أو هجن خضرية غير متكاملة مثل السيبريد Cybrid . عن طريق دمج البروتوبلاست.

5- تعد طريقة زرع البروتوبلاست إحدى طرائق الهندسة الوراثية إذ يمكن ادخال أجزاء من الDNA أو بلازميد ، أو بكتريا ، أو فيروسات أو كلوروبلاست. تعد تقنية زرع البروتوبلاست مهمة في عملية النقل المورثي والتعديل الوراثي.

6- يمكن نقل صفة العقم السيتوبلاسمي عن طريق دمج البروتوبلاست.

3-8- عزل البروتوبلاست :

يتم عزل البروتوبلاست من مصادر نباتية مختلفة، من القمم النامية الخضرية والجذرية، ومن الأوراق النباتية ، من حبوب اللقاح والخلايا النباتية ، كما يمكن عزل البروتوبلاست من الكالوس.

يتوجب إضافة مواد حافظة للضغط الحلولي إلى وسط الاستخلاص مثل السكروز أو الغلوكوز، أو المانيتول والسوربيتول، للمحافظة على حياة وحيوية البروتوبلاست من التأثر بتركيز الوسط المغذي.

يتألف الوسط المغذي الخاص بالاستخلاص من العناصر المعدنية الكبرى والصغرى ، فيتامينات، أحماض آمينية، الهرمونات النباتية، مصدر للطاقة بالإضافة إلى مواد حافظة للضغط الكحولي، ويضاف أيضا المزيج الأنزيمي.

يتم عزل البروتوبلاست إما :

1- بطريقة ميكانيكية حيث يتم تجزئة الأوراق ثم تطحن للحصول على مزيج من البروتوبلاست والشوائب التي تنتج من تهشيم الأنسجة النباتية. يتم الحصول على نسبة قليلة من البروتوبلاست التي تتصف بضعف حيويتها، كما يلاحظ وجود نسبة من البروتوبلاست المجرحة والمهشمة بفعل الهرس.

2- بطريقة أنزيمية حيث يضاف إلى وسط الاستخلاص مزيج أنزيمي من البكينيز Pectinase ، الذي يعمل على هضم الروابط البكتينية في الجدار البكتوسللوزي، والسيللوليزCellulase والهيمي سللوليزhemicellulase الذين يعملون على هضم الروابط السللوزية وتحرير البروتوبلاست.

والأنزيمات المستخدمة هي مركبات بروتينية بسيطة ، تعزل من الفطور مثل فطر Trichoderma أو فطر ال Aspergillus . ولابد من تحديد المزيج المناسب الذي يختلف باختلاف نوع النبات ونوع الأنسجة المستخدمة في عزل البروتوبلاست. توجد في الأسواق خلطات جاهزة يمكن استخدامها مباشرة. يتم الحصول بهذه الطريقة على بروتوبلاست بكمية كبيرة وذات حيوية عالية وغير مهشمة.

عزل البروتوبلاست من أوراق التبغ:

يؤثر مكان وعمر نبات في نسبة البروتوبلاست التي يمكن الحصول عليها من بارانشيم أوراق التبغ. يفضل استخدام نباتات نامية في بيت زجاجي ، ويفضل أخذ أوراق من الثلث العلوي للنبات بين 15 ورقة (الفضل بين 4- 6 أوراق من القمة).

تعقم الأوراق بالكحول 70% لمدة نصف دقيقة ثم تعقم بمحلول من هيبوكلوريت الكالسيوم 5% لمدة 5 دقائق ثم تغسل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم.

تجفف الأوراق بورق فيلتر معقم ثم تقسم إلى قطع صغيرة حوالي 0.5-1سم ثم تنزع البشرة السفلية. يضاف وسط الأستخلاص الحاوي على المحلول الأنزيمي ، كما هو موضح بالجدول ( )، والمعقم بالفلترة إلى الأوراق لعزل البروتوبلاست.

يمكن الحصول على عدة ملايين من البروتوبلاست ، ذات الحيوية العالية، من غرام واحد من أوراق التبغ (Chaussat et Bigot, 1982).

يهدف عزل البروتوبلاست الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية . لايضاف عادة إلى وسط الاستخلاص في التبغ السكروز حتى لا تبدأ البروتوبلاست بتكوين الجدر الخلوية بمرحلة مبكرة . وإنما يضاف إلى وسط زرع البروتوبلاست كما هو موضح بالجدول (8-1).

جدول (8-1): وسط عزل وزراعة بروتوبلاست التبغ

عناصر الوسط	وسط الاستخلاص مغ/ل	وسط الزرع
البكتينيز (ماسيروزيم)	200	0
السللوليز	1500	0
NH4NO3	825	825
KNO3	950	950
CaCL2,2H2O	220	220
MgSO4,7H2O	185	185
KH2PO4	85	85
FeSO4,7H2O	27.85	27.85
Na2EDTA	37.25	25,37
ZnSO4	1	1
H3BO3	1	1
MnSO4,4H2O	0.1	0.1
CuSO4,5H2O	0.03	0.03
ALCL3	0.03	0.03

NiCL2,6H2O	0.03	0.03
KI	0.01	0.01
اينوزيتول	100	100
بانتوتينات الكالسيوم	1	1
بيوتين	0.01	0.01
نياسين	1	1
بيريدوكسين	1	1
تيامين	1	1
NAA	3	3
BAP	1	1
سكروز	0	20000
مانيتول	80000	80000
بكتوآغار	0	6000
5.5=pH		

8-4-العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست:

تؤثر بعض العوامل الأساسية في عزل البروتوبلاست في الأنواع النباتية . تختلف شروط العزل ونسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها بحسب الأنواع النباتية.

8-4-1- تأثير عمر النبات الأم :

لوحظ تأثير واضح لعمر النبات الأم في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها وفي نسبة حيويتها. ففي التبغ فقد أوضحت التجارب بأن أفضل عمر لنباتات التبغ هو بين 40 -60 يوما تعطي أفضل النتائج (Watt et al., 1974).

8-4-2- تأثير حجم الأوراق المستخدمة :

يوثر حجم الأوراق المستخدمة أيضا في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها وفي نسبة حيويتها. ففي العنب تبين بان استخدام الأوراق ذات الحجم الوسط أفضل من الصغيرة والكبيرة (Wright, 1985) كما هو موضح بالجدول (8-2). وقد تم الحصول على نتائج مماثلة في التبغ.

جدول (8-2): تاثير حجم أوراق العنب في عزل البروتوبلاست

حجم الأوراق	عدد البروتوبلاست في سم² من أوراق العنب
صغيرة	0.6±0.1 مليون
وسط	5.3± 0.5 مليون
كبيرة	2.7 ± 0.5 مليون

8-4-3- تأثير تركيب الوسط المغذي ونسبة الهرمونات النباتية:

يلعب التركيب المعدني ونسبة ونوع الهرمونات النباتية المستخدمة في وسط الاستخلاص دورا هاما في عزل البروتوبلاست. ففي العنب لوحظ تمديد المحلول المعدني لموراشيج وسكوغ عشر مرات زاد بشكل كبير في نسبة البروتوبلاست حوالي أربع أضعاف (Wright, 1985). كما يمكن الحصول على البروتوبلاست من خلايا الكالوس. فقد تم الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست الحية من كالوس نبات Fritillaria imperialis وذلك باستخدام وسط استخلاص يحوي 9% مانيتول + 2% سيللولاز+0ز1% بكتيناز، وقد تم معاملة الكالوس بهذا المزيج لمدة 8 ساعات (Chamani and Tahami, 2016).

تلعب الهرمونات دورا مهما في وسط الاستخلاص وقد دلت التجارب بأن للأكسينات دورا مهما في زيادة نسبة البروتوبلاست المعزولة. تختلف نوع ونسبة الأكسينات المستخدمة بحسب الأنواع النباتية ففي التبغ يتم استخدام الاوكسين NAA بتركيز 3 مغ/ل والBAP بتركيز 1 مغ/ل (Chaussat and Bigot,1982). أما في حال أوراق العنب يتم استخدام ال2-4,D بتركيز 5مغ/ل والBAP بتركيز 0.1 مغ/ل حيث تم الحصول على أفضل نسبة من البروتوبلاست الحية (Wright,1985). يلعب الأوكسين دورا مهما في زيادة مطاطية الجدر الخلوية مما يزيد من فاعلية الأنزيمات في هضم الجدر بين الخلايا وتحرير البروتوبلاست. كما تلعب الهرمونات النباتية دورا مهما فيما بعد في تكوين الجدر الخلوية الجديدة عند زرع البروتوبلاست.

8-4-4- تاثير الإضاءة والحرارة:

تؤثر الإضاءة في عزل البروتوبلاست، فقد لوحظ بان تعريض الأوراق لفترة ظلام أو تنفيذ عملية الاستخلاص بالظلام أو بشروط النهار القصير تزيد في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها من الأوراق في التبغ وفي العنب وفي البطاطا والباذنجان (Bhatt & Fassuliotis,1981; Wright,1985).

تؤثر الحرارة أيضا في عزل البروتوبلاست وفي نسبة حيويتها. وقد وجد بالتجربة في حال العنب بأن أفضل درجة حرارة كانت 22°م حيث أعطت أفضل عدد من البروتوبلاست بالمقارنة مع درجات الحرارة العالية والمنخفضة كما هو موضح بالجدول (8-3) (Wright,1985).

جدول (8-3) : تأثير درجة الحرارة في عزل البروتوبلاست بالعنب

درجة الحرارة المستعملة درجة مئوية	عدد البروتوبلاست بالسم المربع في الأوراق
15	11.0±1.0 مليون
22	24.8±2.3 مليون

26	12.8 ±0.8 مليون
30	7.6 ± 1.2 مليون

من الملاحظ بشكل واضح بأن درجة الحرارة تؤثر بشكل كبير في نشاط أنزيمات الاستخلاص الذي ينعكس في عدد البروتوبلاست المحررة من نسيج الأوراق.
ولابد من الذكر أخيرا بأن نوع وتركيز الأنزيمات ، نوع المواد الحافظة المستخدمة وتركيزها يؤثر بشكل كبير في عزل البروتوبلاست ويختلف هذا التاثير بحسب الأنواع النباتية.

8-5-حيوية البروتوبلاست:

تنشط الأنزيمات في عملية هضم الجدر البكتوسللوزية ضمن شروط خاصة حيث تؤثر بعض العوامل مثل درجة الحوضة ، نسبة الأملاح، درجة الحرارة والإضاءة في نشاط الأنزيمات. كما تلعب مدة الهضم وتركيز الأنزيمات ، تركيز المواد الحافظة للثبات الضغط الحلولي للخلايا، الحالة الفيزيولوجية للأجزاء المستخدمة ومكونات الوسط المغذي، دورا في المحافظة على حيوية البروتوبلاست وفي نسبة البروتوبلاست المحررة. يتوجب المحافظة على سلامة الغشاء السيتوبلاسمي وذلك عن طريق اختيار الأمثل للأنزيمات الهاضمة وتحديد بدقة الفترة المناسبة للهضم (حوالي ساعة إلى ساعتين بالنسبة للأنزيمات المعاملة بالحرارة) كما يجب اختيار المواد الحافظة التي تعمل على تثبيت الضغط الحلولي لمنع انفجار أو انكماش بشكل قوي للبروتوبلاست. إن ارتفاع الشديد أو الانخفاض الشديد لمثبت الضغط ربما ينتج عنه ضرر غير عكسي، قد يؤثر على حيوية البروتوبلاست.

يمكن التحقق من حيوية البروتوبلاست بعد العزل مباشرة بالطرق التالية:
- بوساطة كاشف إيفان (Evan's Blue). ويتم ذلك بوضع 100 ميكروليتر من معلق البروتوبلاست في طبق بتري ويضاف له 10 ميكروليتر من صبغة إيفان يتركيز 0.4 مول يحضن المزيج لمدة 5 دقائق . يتم حساب النسبة المئوية للبروتوبلاست الغير مصبوغة بأزرق إيفان وهي تعبر عن نسبة البروتوبلاست الحية (Bohmer & Meyer,1996).

- بوساطة فينول سفرانين Phenol Safranin . تعمل هذه الصبغة على تلوين البروتوبلاست الميتة باللون الأحمر ، بينما الخلايا الحية تبقى بدون تلون. ويتم حساب نسبة البروتوبلاست الحية بعد نقع المعلق البروتوبلاست في محلول 0.1 % من فينول سفرانين لمدة ساعتين.
- بوساطة فلورسين دي آسيتات Fluorescein diacetate (FAD) يعمل على تشعيع الغشاء السيتوبلاسمي الذي يصبح لونه أخضر وأبيض بينما لا يطرا أي تلون على الخلايا الميتة. يتم حساب نسبة حيوية البروتوبلاست بعد 5-15 دقيقة من المعاملة بال FAD (Sankararao & Prakash,1995) .

8-6- تنقية البروتوبلاست:

يتم غسل معلق البروتوبلاست في نهاية التحضين بالمحلول الأنزيمي بوسط الاستخلاص الخالي من الأنزيمات. يحوي المعلق الخاص بالبروتوبلاست على البروتوبلاست مع بقايا الأنسجة النباتية والخلايا المهشمة ، لذلك يتم تنقية البروتوبلاست من الشوائب بوساطة فلترة المعلق بفلاتر دقيقة ميكرونية(منخل ب50-60 ميكرون) تسمح بمرور الخلايا عبرها مع وسط المغذي السائل دون الشوائب الكبيرة. بعد الفلترة يتم غسل المعلق بإضافة وسط مغذي خاص بالغسل ، ثم تثفل المعلق البروتوبلاست بسرعة 600 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق بعدها يتم إزالة

المادة الطافية مع شوائب وناخذ الراسب الحاوي على البروتوبلاست . تكرر العملية مرتين إلى ثلاث مرات بهدف تنقية البروتوبلاست. يؤخذ راسب البروتوبلاست ويضاف له وسط مغذي حاوي على جميع العناصر المغذية اللازمة لزرع البروتوبلاست .
تعد عدد خلايا البروتوبلاست الموجودة في المعلق باستخدام جهاز الهيماسيتوميتر Hemacytometer (Bohmer &Meyer,1996).

8-7- زرع البروتوبلاست :

يشبه الوسط المغذي الخاص بزرع البروتوبلاست الأوساط المغذية الخاصة بزرع الخلايا النباتية. يضاف إلى وسط زرع البروتوبلاست بعض المواد الحافظة للضغط الحلولي مثل المانيتول ، كما تضاف تراكيز عالية من الهرمونات النباتية من الأوكسين والسيتوكينين. لتسمح بتكوين الجدر الخلوية بأقرب فرصة ممكنة. يختلف تركيب الوسط المغذي الخاص بزرع البروتوبلاست وتركيز ونوع الهرمونات المستخدمة بحسب الأنواع النباتية. تزرع البروتوبلاست في بيئة مغذية سائلة أو نصف صلبة أو صلبة، بحسب الأنواع النباتية.
يحدث في بادئ الأمر إعادة تكوين الجدر الخلوية خلال عدة أيام بعد زرع البروتوبلاست في الظروف المناسبة. يمكن التحقق من إعادة تجديد الجدر الخلوية باستخدام اختبار صبغة أبيض فلور الكالسيوم حيث يصبغ السيللوز المصنع الجديد وتضيء عندما تشعع بالأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 366 نانوميتر.
يبدأ أول انقسام خلوي للبروتوبلاست بعد تجديد الجدر الخلوية ويحدث عادة بعد 2-7 أيام بحسب الأنواع النباتية كما هو موضح بالشكل (8-2).
فقد دلت التجارب بأن الوسط السائل يتم تبديل الوسط المغذي في هذه الفترة ويستخدم وسط مغذي بدون مواد حافظة. يتم متابعة تطور الخلايا بشكل معلق خلوي الذي يمكن أن تتطور الخلايا لتعطي كتلة خلوية صغيرة كما هو موضح بالشكل (8-3). التي تتطور لتشكل أجنة خضرية

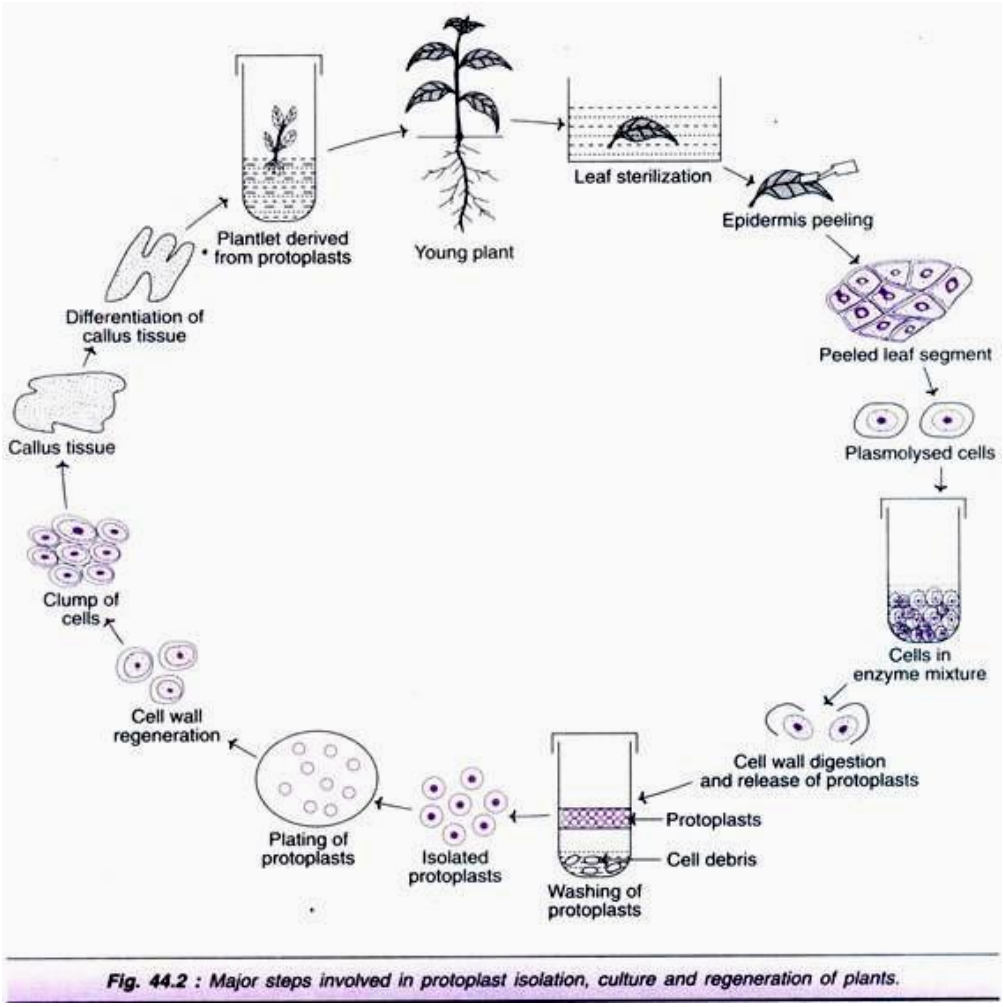
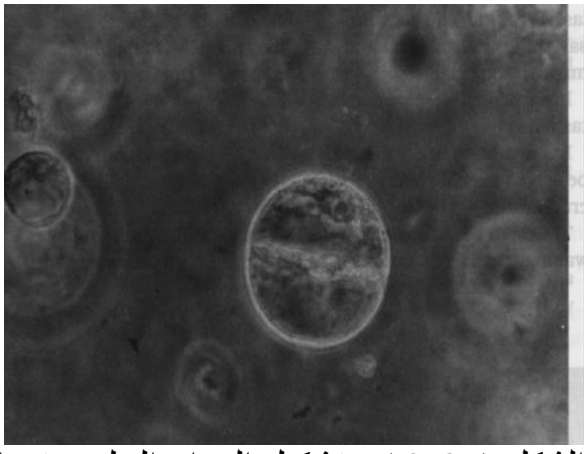


Fig. 44.2 : Major steps involved in protoplast isolation, culture and regeneration of plants.

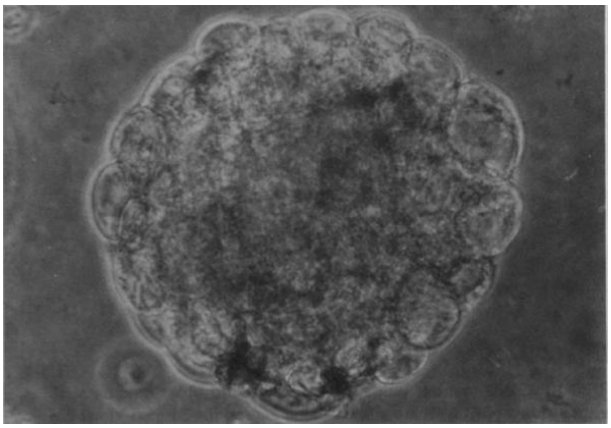
الشكل (8-2): عزل وزرع وتطور البروتوبلاست

وتتابع نموها لتشكيل نبات كامل وفي هذه الحالة تعطي نباتات اكثر ثباتا من الناحية الوراثية. أو تتابع الخلايا انقسامها وتشكل كتلة صغيرة من الخلايا ميكروكالوس الذي يمكن ان يتطور ويكون كالوس جنيني او كالوس تكويني ويعطي نباتات كاملة وفي هذه الحالة يتم الحصول على نباتات قد تكون مشابهة للنبات الأم وقد تكون مغايرة للنبات الأم ويوضح الشكل (8-2) عزل وزرع وتنطور البروتوبلاست في النبات.

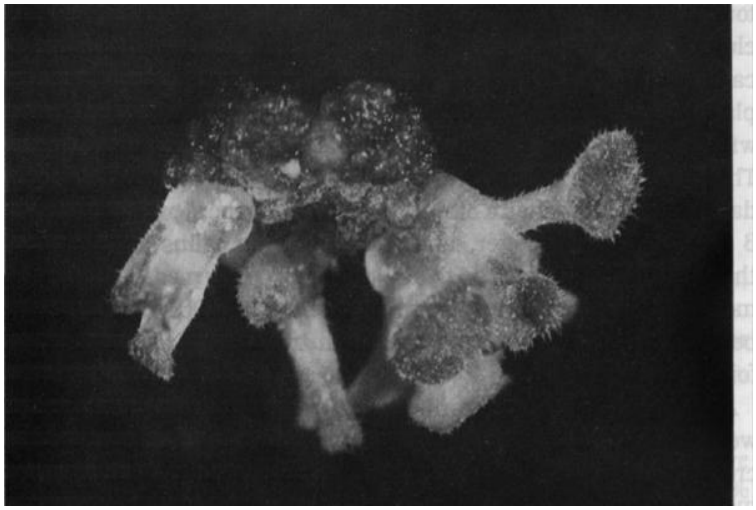
يمكننا الحصول من الميكروكالوس على تكوين الأجنة التي تنمو وتنبت وتعطي نبات كامل. او الميكروكالوس يمكن ان يتطور ويتكون براعم ويجذر ويعطي نباتات كاملة كما هو موضح بالأشكال (8-3، 8-4،-8-5). وعندما تصبح النباتات كاملة يتم تقسيتها ونقلها إلى البيت الزجاجي كما هو موضح بالشكل (8-6).



الشكل (8-3) : تشكيل الجدار الخلوي في البروتوبلاست



الشكل (8-4): تشكيل الكتلة الخلوية صغيرة



الشكل (8-5) تشكيل البراعم في البنفسج الفريقي

الشكل (8-6): نباتات ناتجة من زرع البروتوبلاست في البنفسج الأفريقي.

تؤثر عوامل كثيرة في زرع البروتوبلاست ومدى استجابتها للتطور والنمو. فقد لوحظ تاثير واضح للنوع النباتي في نسبة البروتوبلاست الممكن الحصول عليها وفي مقدرتها على النمو وتكوين نباتات كاملة. فقد دلت التجارب بالحصول على نباتات كاملة في العديد من النباتات العشبية محاصيل وخضار ونباتات زينة مثل التبغ، الداتورا، الجزر ، الفاصولياء، النجيليات والبنفسج ،
(Chaussat & Bigot, 1982; Winkelmann and Grunewaldt, 1992).
وقد استخدمت عزل وزرع البروتوبلاست في تحسين الوراثي للعديد من الأشجار الخشبية أشجار الفاكهة كالتفاحيات والحمضيات والكيوي والموز والأشجار الحراجية مثل الحور والصفصاف والأوكاليبتوس والصنوبريات (Deng, 2003).
لمصدر البروتوبلاست دورا مهما في قدرتها على النمو والتجديد. فقد دلت التجارب بأن البروتوبلاست الماخوذة من الأوراق أكثر استجابة للنمو من البروتوبلاست المأخوذة من أجزاء نباتية أخرى في التبغ والنجيليات. كما أن البروتوبلاست الناتجة من أوراق تكونت داخل الأنابيب تعطي استجابة للنمو بشكل أكبر من الماخوذة من أوراق جمعت من الطبيعة أو من البيوت المحمية.
لوحظ أيضا لشروط زراعة الأمهات دورا كبيرا في قدرة البروتوبلاست في النمو والتجديد. تبين أن النباتات الموجودة في الطبيعة تعطي بروتوبلاست بكميات أقل وتكون قدرتها في النمو والتطور أقل بكثير من البروتوبلاست الماخوذة من امهات مرباة داخل بيوت محمية.
يلعب تركيب الوسط المغذي دورا مهما في توجيه النمو والحصول على نباتات كاملة. تختلف تركيب الأوساط المغذية باختلاف الأنواع النباتية. فإن إعادة تجديد الجدر الخلوية والانقسام الخلوي وتشكيل الكالوس و تكوين الأعضاء النباتية براعم وجذور أو تكوين الأجنة كل هذه المراحل تحتاج إلى تركيب خاص للوسط المغذي يختلف باختلاف مرحلة الزرع وحسب النوع النباتي وحسب طبيعة النمو المراد الحصول عليه ويوضح الجدول (8-1) تركيب الوسط المغذي اللازم لزرع البروتوبلاست في خلايا التبغ.
يلعب تركيز البروتوبلاست في الوسط المغذي له دورا مهما في قدرة البروتوبلاست في النمو وتكوين الميكروكالوس. ففي حال التبغ توضح بأن أفضل كثافة حوالي 50000 بروتوبلاست بالمم^2 أعطت أفضل نتيجة من البروتوبلاست النامية حيث لوحظ أكثر من 50% من البروتوبلاست بدأت بالانقسام والنمو أما الكثافة الأعلى والتراكيز الأقل من البروتوبلاست تؤثر في مقدرة البروتوبلاست في التجديد والنمو (Chaussat & Bigot,1982).

تختلف الفترة الزمنية اللازمة لتجديد الجدر الخلوية وبداية الأنقسام الخلوي ومن ثم تطور الميكروكالوس والحصول على أجنة او أعضاء نباتية براعم وبالتالي تكوين نباتات كاملة بحسب الأنواع النباتية. ويوضح الجدول (8-4) كافة المراحل المتعاقبة مع الفترة الزمنية اللازمة منذ استخلاص البروتوبلاست وحتى الحصول على نباتات كاملة في نبات البنفسج، كما يعطي فكرة عن طبيعة النمو ومراحله المختلفة بالإضافة إلى متطلبات الوسط المغذي في كل مرحلة (Winkelmann and Grunewaldt (1992.

في هذا المثال تم الحصول على 2000 نبات خلال فترة حوالي 28 أسبوع وقد فحصت النباتات الناتجة فبلغت نسبة التشابه الوراثي مع النبات الأم حوالي 95%.

جدول (8-4): زرع وتطور البروتوبلاست في البنفسج

مراحل الزرع	طبيعة النمو	متطلبات الوسط المغذي	الفترة الزمنية بالأسبوع
أوراق متكونة بالنسج بروتوبلاست	عزل البروتوبلاست بالأنزيمات	وسط مغذي+مواد حافظة + محلول انزيمي	0
زرع البروتوبلاست	استبعاد المحلول الأنزيمي+ تنقية	نفس الوسط السابق بدون أنزيمات	0
تبدبل وسط الزرع	تجديد الجدر الخلوية + بداية الأنقسام	وسط مغذي + مواد حافظة + تراكيز الهرمونات	2
زرع على وسط صلب	انقسام خلوي لتكوين كتل خلوية صغيرة	تخفيض المواد الحافظة + تخفيض الهرمونات	4
زرع الميكروكالوس	تكوين ميكروكالوس 3-4مم	نفس الوسط صلب	12
إكثار واستطالة النموات	تكوين براعم خضرية زيادة عدد النموات واستطالتها	زيادة تركيز السيتوكينين تخفيض السيتوكينين	20
تجذير النموات	تكوين الجذور	إضافة الأوكسين	24
نقل النباتات إلى البيت المحمي	تقسية النباتات	تحتاج ظروف خاصة	28

8-8- استخدامات زراعة البروتوبلاست:

تستخدم زراعة البروتوبلاست لأغراض متعددة ،كما لاحظنا من تعرفنا على مزايا زرع البروتوبلاست. ويمكن إيجاز هذه الاستخدامات بمايلي:

1- تعد طريقة زرع البروتوبلاست طريقة من طرائق التكاثر الخضري الدقيق إذا تطورت مباشرة وأعطت نباتات كاملة دون المرور بمرحلة الكالوس عن طريق تكوين المباشر للاجنة أو البراعم. يتم الحصول على نباتات مشابهة في تركيبها الوراثي للنبات الأم. لاستخدم في الإكثار الخضري لاته من الصعب التأكد أي من النباتات تكونت بشكل مباشر وأي نباتات تكونت بعد المرور بمرحلة الكالوس في مرحلة مبكرة. وهذا يعطي شك بمدى الثبات الوراثي للنباتات الناتجة ولو بنسبة قليلة ، كما لاحظنا في مثال البنفسج الأفريقي بالفقرة السابقة حيث كانت نسبة التغير قليلة لم تتجاوز 5%. لذلك لاتستخدم هذه التقنية في التكاثر الخضري الدقيق في أنواع النباتات ذات الأهمية الاقتصادية. يمكن أن تتطور البروتوبلاست بشكل مباشر لتكوين الأجنة الخضرية. ففي الموز تم الحصول على أجنة خضرية بعد ثلاث أسابيع من زراعة البروتوبلاست، كما تم تطور الأجنة وأعطت نباتات كاملة بعد 12 أسبوع(Haicour et al., 2009).

2- تكوين طفرات جديدة لها أهمية في تربية النبات: تعد طريقة زرع البروتوبلاست مصدر لزيادة الخلط الوراثي عند تكوين الميكروكالوس واكثاره للحصول على كالوس وثم تكوين نباتات كاملة بالتكوين غير المباشر للأجنة أو البراعم هنا يلاحظ الحصول على نباتات قد تشابه أو تغاير في تركيبها الوراثي للنبات الأم. وقد تم تكوين عدة طفرات هامة في بعض الأنواع النباتية. نذكر منها طفرة قديمة تم الحصول عليها من قبل فريق امريكي عام 1973 بدءا من زرع بروتوبلاست حيث حصلو على طفرة في التبغ مقاومة لمادة سامة وهي الميثيونين سلفوكيسمين مادة سامة للخلايا النباتية. وهذه المادة تشبه مادة سامة تفرز من بكتريا *Pseudomonas tabaci* التي تسبب اللفحة البكتيرية للتبغ . ونتيجة الانتخاب عن طريق زرع البروتوبلاست تم الحصول على طفرة مقاومة لهذا المرض.

وتختلف نسبة الخلط الوراثي في النباتات الناتجة عن زرع البروتوبلاست بحسب الأنواع النباتية. ويمكن أن يعزى سبب الخلط الوراثي إلى اختلاف في بنية الكروزومات أو في عددها (Fiuk and Rybczynski, 2007; Tomiczak et al.,2016). ففي دراسة نفذت على زراعة البروتوبلاست لخمس أنواع من النباتات الطبية التي تتبع جنس Gentiana . لوحظ تفاوت في نسبة الخلط الوراثي للأنواع المدروسة. ويوجد اختلاف واضح في عدد الكروموزومات في النباتات المتجددة كما هو موضح بالجدول (8-5).

جدول (8-5) : نسبة عدد الصبغيات في النباتات المتجددة من البروتوبلاست

النوع النباتي	النباتات المتجددة	عدد النباتات	عدد الكرموزومات
Gentiana kurroo	نباتات الشاهد	24= 100%	2n=26
	نباتات متجددة 1	2= 10%	2n=26
	نباتات متجددة 2	17= 85%	4n=52
	نباتات متجددة 3	1= 5%	غير محدد العدد
Gentiana tibetica	نبات الشاهد	35=100%	4n=52
	نباتات متجددة 1	60=85%	4n=52

	نباتات متجددة 2	10= 14.3%	تقريبا 100 كروموزوم

يلاحظ اختلاف في نسبة عدد الكرموزومات بين النوعين وفي نسبة النباتات الغير محددة عدد الصبغيات (Tomiczak et al.,2016).

3- إدخال ال DNA والأحياء الدقيقة وجسيمات غريبة إلى البروتويلاست: تعد تقنية زرع البروتوبلاست إحدى تقنيات الهندسة الوراثية بحيث تسمح ،كونها خالية من الجدار الخلوي بإدخال المورثات أو البلاسميدات أو أجزاء من ال DNA أو ال RNA أو بعض الأحياء الدقيقة والفيروسات. يمكن الحصول على بروتوبلاست معدلة وراثيا وبالتالي نباتات كاملة بعد نمو البروتوبلاست وتطورها.
يتم التعديل الوراثي بشكل غير مباشر (عن طريق البكتريا الأكروبكتريوم) أو مباشرحيث يتم بإحدى التقنيات التالية (Darbany et al.,2008) :

1- القذف المورثات المباشر داخل الخلايا النباتية بالمدفع الجيني Biolistic Gun .
2- الحقن الدقيق ويتم حقن المورثات داخل الخلايا بوساطة أبر دقيقة جدا ميكروماصة بحجم 0.5-0.1 ميكرون.
3- الصدمة الكهربائية Electroporation يتم عمل صدمة كهربائية تسمح بعمل مسامات مؤقتة بالغشاء السيتوبلاسمي مما يسهل دخول المورثات او الDNA إلى داخل الخلايا او البروتوبلاست.
4- التعديل الكيميائي بوساطة البولي إيتلين غليكول PEG الذي يعمل على دخول الDNA إلى داخل الخلايا أو البروتوبلاست. كما يمكن استخدام مواد كيميائية اخرى مثل ديكستران سلفات او كالسيوم سلفات.
5- التعديل باستخدام جسيمات ليبيدية الحاملة للبلاسميد Lipofection : يتم دمج جسيمات الليبيزوم الحاملة للبلاسميد مع الخلايا النباتية أو البروتوبلاست مما تسمح بدخول هذه الجسيمات إلى داخل الخلية.
6- التعديل باستخدام الأمواج فوق الصوتية Ultrasound Treatment التي تعمل على زيادة مطاطية الجدر الخلوية مما تزيد من فرص دخول البلازميدات إلى داخل الخلايا.
7- التعديل بوجود وسيط فيبر كربيد السيليكونٍ Silicon carbide fibers

يمكن استخدام كافة الطرق المباشرة في التعديل الوراثي في البروتوبلاست ولكنها لا تزال أقل فاعلية بشكل عام من التعديل بوساطة الأكروبكتريوم. ولكنها مفيدة في بعض الأنواع النباتية على سبيل المثال في المحاصيل النجيلية تعطي نتائج إيجابية كون التعديل بفعل البكتريا يكون قليل الفعالية.

8-9- فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست:
تتوقف فعالية التعديل الوراثي في البروتوبلاست على مجموعة من العوامل الأساسية وهي:

1- تقنية التعديل الوراثي المستخدمة : لتقنية التعديل المستخدمة وتركيز البروتوبلاست وتركيز البلاسميدات أو الDNA الحاملة للمورثات المراد ادخالها ، مصدر البروتوبلاست ، المعاملات الأولية المختلفة ، الوزن الجزيئي لل PEG والتركيز والpH. كل هذه العوامل تؤثر في فعالية طريقة التعديل الوراثي المستخدمة وتؤثر في

نسبة البروتوبلاست المعدلة وراثيا. يوثر النوع النباتي بشكل مباشر في نجاح التعديل الوراثي في البروتوبلاست.

2- تقنية الكشف عن البروتوبلاست المعدلة وراثيا: يتوجب الكشف عن الخلايا المعدلة وراثيا بعد حوالي 14 يوما من التعديل الوراثي. ويتم ذلك عادة من خلال إضافة للبلازميد المدخل إلى البروتوبلاست بعض الجينات مثل جين مقاومة لبعض المضادات الحيوية أو مضاد لمبيد عشبي أو مولدة للاشعاع وبعض الجينات التي لاتكون في المجموعة الوراثية الأساسية للنبات مثل جين Gus الذي يعمل على تشفير أنزيم ß-glucuronidase وهذا الأنزيم يسمح بكشفه بواسطة اختبار Gus-assay أو بوساطة طرائق البيولوجيا الجزيئية. يوجد بعض الطرائق الإشعاعية مثل مركب EGFP مركب يدمج مع البلازميد وبعد نقل البلازميد إلى الخلايا يكشف عنه حيث بواسطة جهاز fluorescence spectrofluorimetry يعطي اخضر اللون ويتم الكشف على مستوى الخلايا او الكالوس. ويمكن عزل ظاهريا الميكروكالوس المعدل عن الميكروكالوس غير محور، ويسمى اختبار البروتين الأخضر المشع
(Neidz et al.,2001).

ولابد من حساب نسبة البروتوبلاست المحورة وتحسب بالمقارنة بين الكتل الخلوية التي بقيت على قيد الحياة بعد اختبار الجين المضاد الحيوي ففي هذه الحالة العينات المحورة تبقى على قيد الحياة عند زرعها على وسط يحوي المضاد الحيوي كونها تحمل الجين المقاوم بينما العينات غير المحورة تموت تحت تاثير المضاد الحيوي.

3- قدرة الخلايا المحورة على التجديد وتكوين نباتات كاملة:
ليس كافة النباتات المحورة وراثية بوساطة البروتوبلاست لها قدرة على التجديد وتكوين نباتات محورة كاملة. ولذلك لا بد من دراسة كثير من العوامل التي تؤثر في تجديد وتعضي المباشر والغير مباشر للأنواع المراد تحويرها وهذا مهم جدا لنجاح التحوير الوراثي بوساطة البروتوبلاست. وتختلف قدرة التعضي بحسب الأنواع النباتية وكل نوع يحتاج إلى شروط خاصة تختلف بين الأنواع لا بل بين الأصناف ضمن النوع الواحد.

4- التحقق من الثبات الوراثي في النباتات الناتجة من زرع البروتوبلاست المحورة:
يختلف مدى الثبات الوراثي في النباتات الناتجة عن البروتوبلاست بحسب طريقة التجديد المتبعة. في حال التجديد والتعضي المباشر دون المرور بمرحلة الكالوس تكون النباتات الناتجة مشابهة تماما للنبات الأم اما إذا كان التجديد أو التعضي غير مباشر ينتج نباتات قد تكون مشابهة أو مغايرة في تركيبها الوراثي للنبات الأم الذي اخذت من البروتوبلاست. لذلك هذا الأمر في غاية الأهمية بالنسبة للتحوير الوراثي باستخدام البروتوبلاست.
السؤال الذي يطرح نفسه مالفائدة من التحوير الوراثي إذا لم أحافظ على الثبات الوراثي للنبات الأم. لذلك يجب دراسة وإيجاد الإجابة على هذا السؤال حتى تكون تقنية التحوير بوساطة البروتوبلاست ناجحة. يجب الحصول على بروتوبلاست محورة ولها المقدرة على التجديد أو التعضي المباشر وتحافظ على صفات النبات الأم.
يرتبط موضوع الثبات الوراثي بعوامل كثيرة مثل النوع النباتي ، طريقة التجديد أو التعضي، فترة إكثار الكالوس، نوع ونسبة الهرمونات النباتية المستخدمة في الوسط المغذي الخاص بالتجديد.
ويتم الكشف عن الثبات الوراثي للنباتات الناتجة عن البروتوبلاست بوساطة تقنيات البيولوجيا الجزيئية.

مثال على التحوير الوراثي بوساطة البروتوبلاست: تم الحصول على نباتات من البرتقال الحلو المحورة بوساطة البروتوبلاست التي تحمل بلاسميد يحوي (EGFP Neidz *et al*.,2001). . الذي يميز البروتوبلاست المحورة ويعطيها اللون الأخضر. عزلت البروتوبلاست من كالوس جنيني من البرتقال الذي يعطي أجنة خضرية بسهولة كما هو موضح بالشكل (8-7). عزلت البروتوبلاست ومزجت مع بلازميد يحوي الEGFP . وتم التحوير بتقنية الصدمة الكهربائية Electroporation وتم الكشف عن البروتوبلاست والميكروكالوس والكالوس الجنيني المحور بواسطة جهاز fluorescence spectrofluorimetry الذي يعطي اخضر اللون. ويمكن عزل ظاهريا العينات غير المحورة التي يبقى لونها أبيض عن المحورة التي تتلون باللون الأخضر الشكل (8-7) . وقد تم الحصول على ميكروكالوس وكالوس جنيني الذي تطور فيما بعد وأعطى نباتات كاملة كما هو موضح بالشكل (8-7).

8-10-- دمج البروتوبلاست:

تعد تقنية دمج البروتوبلاست إحدى التطبيقات الأساسية لزرع البروتوبلاست. تسمح هذه التقنية بدمج نوعين من البروتوبلاست من أنواع نباتية متباعدة والحصول على هجن لايمكن الحصول عليها بالتهجين الجنسي لعدم وجود توافق بالتلقيح فيما بينها.

تسمح أيضا بدمج نوعين والحصول على هجن خضرية متجانسة يمكن عند نموها ان تعطي نباتات جديدة، كما حصل عند دمج بروتوبلاست من البطاطا مع بروتوبلاست من البندورة تم الحصول على هجين خضري متجانس عند نموه أعطى نبات وسط بين البندورة والبطاطا سمي بالبومات (Chaussat & Bigot,1982)، ولكن مع الأسف كان نبات عقيم .

كما تفيد عملية دمج البروتوبلاست الحصول على هجن متجانس Hو غير متجانسة تسمح بنقل الصفات الوراثية من نبات لآخر وبالتالي الحصول على هجن ذات أهمية اقتصادية أو تحمل بعض الصفات الجديدة الهامة في برنامج التحسين الوراثي للنبات المستخدم. ويوضح الشكل (8-8) عملية دمج وتطور هجن البروتوبلاست وتكوين نبات كامل.

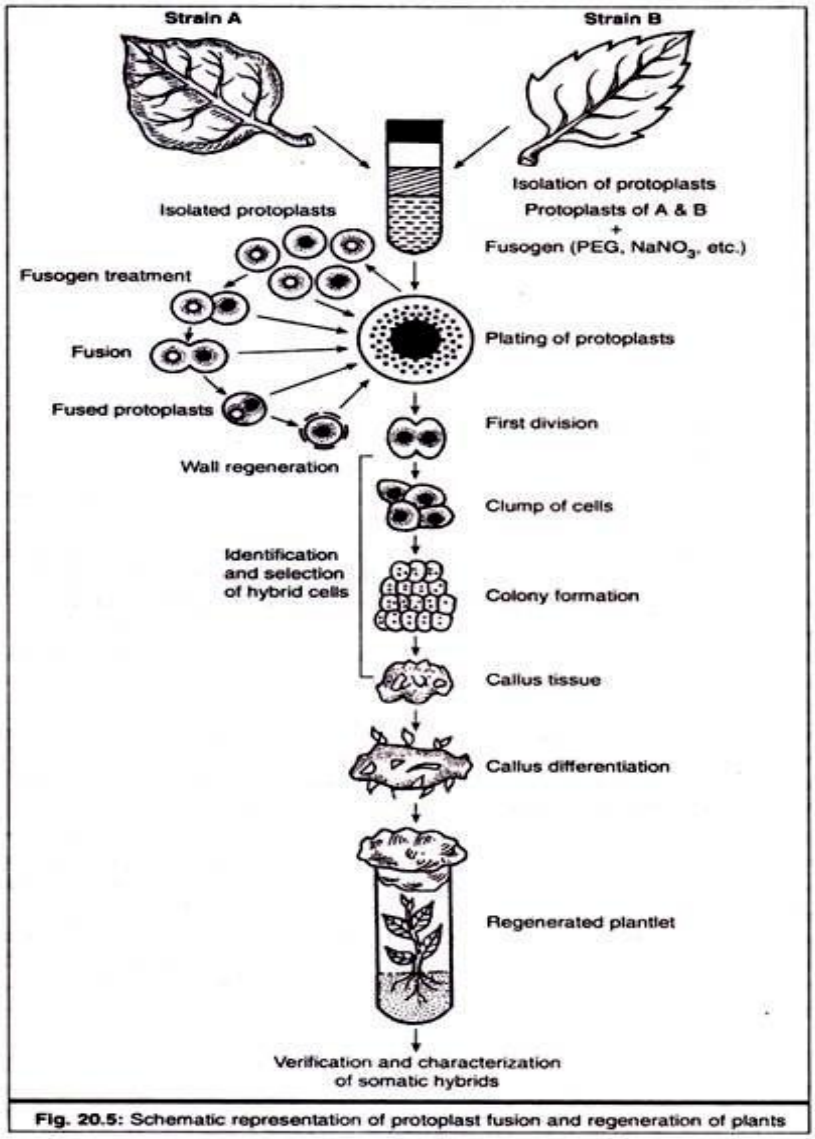


Fig. 20.5: Schematic representation of protoplast fusion and regeneration of plants

الشكل (8-8): دمج البروتوبلاست وتجديدها لتكوين نبات كامل

تفيد عملية دمج البروتوبلاست في نقل صفة العقم السيتوبلاسمي في بعض الأنواع النباتية عن طريق تشكيل السيبريد Cybrid. ولهذه الخاصية تطبيقات هامة في برامج انتاج البذارلبعض الأنواع النباتية.

8-10-1- - طرائق دمج البروتوبلاست:

يستخدم نوعين من طرائق الدمج:

1- بالطريقة الكهربائية : ويتم تعريض البروتوبلاست النوعين المراد دمجهم لحقل كهربائي يعمل على تقريب البروتوبلاست من بعضها البعض واندماجهم.

2- بالطريقة الكيميائية : ويتم ذلك عن طريق وضع نوعين البروتوبلاست مع بعض بتراكيز متساوية تقريبا مليون بروتوبلاست بالميلليتر من كل نوع ثم يضاف لهم محلول الPEG البولي ايتلين غليكول بتركيز معين وتترك لفترة من الزمن 10-30 دقيقة ثم يغسل محلول الPEG ثلاث مرات وتزرع الخلايا المندمجة في وسط مغذ سائل يحوي كافة المتطلبات اللازمة للانقسام والتطور. يعمل البولي ايتلين غليكول على تقريب بين خلايا البروتوبلاست ويساعد في عملية الدمج (Zhang and Huajun,2004). .

8-10-2- نتائج دمج البروتوبلاست:

لايمكن الحكم على نتائج دمج البروتوبلاست مباشرة بعد عملية الاندماج ، قد يكون اندماج حقيقي كامل أو منقوص ، أو اندماج سيتوبلاسمي فقط. يتم الحكم على نتائج المج بعد بدء انقسام البروتوبلاست المندمجة حيث تظهر الحالات التالية:

1- هجين خضري متجانس ومتكامل Somatic Hybrid : في هذه الحالة يتم اندماج كلي بين نواة وسيتوبلاسما الأب الأول مع نواة وسيتوبلاسما الأب الثاني ويتم المحافظة على الاندماج الكامل حتى بعد انقسام الخلايا وتكوين الميكروكالوس الذي عند تطوره يعطي نبات هجين وسط بين النوعين (Chaussat and Bigot,1982).

2- هجين غير كامل وغير متجانس : في هذه الحالة يتم اندماج كلي بين نواة وسيتوبلاسما الأب الأول مع نواة وسيتوبلاسما الأب الثاني. ولكن تفقد بعض المخزون النووي لأحد الأبوين ويتشكل بعد الانقسام هجين غير محدد عدد الكروموزومات Anaploid . وهذا النوع من الهجن لا يتطور في أغلب الأحيان.

3- هجين غير مستقر : أي يحدث اندماج سيتوبلاسمي ونووي بين الأبوين ولكن لا تلبث النواتان أن تعود للانفصال من جديد عند أول انقسام وبالتالي يلاحظ تشكل كتلة من الخلايا تشبه الأب الأول وكتلة من الخلايا تشبه الأب الثاني وهذا مايسمى بالكيميريا Chimera.

4- هجين سيتوبلاسمي ال Cybrid : أي يحدث اندماج كامل بين سيتوبلاسما الأب الأول مع سيتوبلاسما الأب الثاني دون حدوث اندماج نووي وعند الانقسام تكون كتلة خلوية تحوي سيتوبلاسما الأبوين مع نواة احد الأبوين ويمكن أن تتطور وتعطي نباتات كاملة. ولهذا النوع له فوائد تطبيقية هامة في بعض الأنواع النباتية التي تتصف بصفة العقم الذكري السيتوبلاسمي.
لايوجد اختبارات نستطيع بها التمييز بين أنواع الهجن المتكونة في مرحلة مبكرة. ولابد من القيام بعملية التجديد والتعضي للحكم على الهجن الناتجة. وخاصة الهجن الخضرية المتجانسة التي تهم ونسعى دائما لتكوينها.

8-10-3- تقييم الهجن الخضرية الناتجة من دمج البروتوبلاست:

تقيم الهجن الخضرية المتجانسة وذلك من خلال مقارنة هذه الهجن مع هجن جنسية ناتجة عن عماية التهجين الجنسي بين الأنواع في حال وجود توافق بالتلقيح فيما بينها. كما يتم مقارنة الهجن الخضرية مع الآباء. ويتم مقارنة الصفات الخضرية والزهرية والثمرية والصفات الانتاجية والزراعية ومدى قدرتها على التلقيح
(Si *et al*.,1998 ; 2000 and 2001) ، كما يمكن مقارنة الهجن مع الآباء باستخدام بعض المعايير السيتولوجية (عدد الكروموزومات) والأنزيمية والجزيئية (Matthews et al., 1999; Trabelsi et al., 2005; Guo et al., 2007). كما يمكن مقارنة درجة الخصوبة وحيوية حبوب اللقاح الناتجة للهجن الناتجة ومقارنتها مع الآباء.

8-10-4- مثال على دمج البروتوبلاست في البطاطا:

عزلت بروتوبلاست من صنف بطاطا *Solanum tuberosum* رباعي الصيغة الصبغية صنف Dezire من أوراق بعمر 4-6 أسابيع. كما عزلت بروتوبلاست من نوع بطاطا برية *Solanum circaeifolium* تحمل صفة المقاومة لمرض الفيتوفتورا *Phytophtora infestans* . أخذت بروتوبلاست بحجم 1:1 من النوعين وأخذ منها 100 ميكروليتر وأضيف لها عدة قطرات من محلول PEG 25% وضع المزيج لمدة 20-30 دقيقة مع التحريك الخفيف . ثم تم استبعاد محلول ال PEG ووضع المزيج في وسط للزراعة

ولابد من الذكر بأنه لايمكن تمييز بين البروتوبلاست المندمجة مع البروتوبلاست غير المندمجة في مرحلة مبكرة لذلك زرعت كافة البروتوبلاست مع بعض . وبدأت بالانقسام بعد 4-5 أيام حيث شكلت بعد فترة ميكروكالوس التي أعطت بدورها نباتات كاملة . فقد كانت نسبة العينات التي تطورت إلى نباتات كاملة حوالي 26%

(Espejo *et al*., 2008). وقد تم الحصول على 19 هجين خضري متجانس وقد تم تقييمها ولوحظ بأنها تحمل صفات وسط بين الأبوين.

8-11- عزل البروتوبلاست في الفطر المحاري:

تم عزل البروتوبلاست أيضا من بعض أنواع الفطر الزراعي مثل النوع المحاري Pleurotus pulmonarius; Pleurotus florid . تم الحصول على البروتوبلاست من هيفات الفطر الزراعي بعمر 3 ايام ، وقد استخدم 3 أنواع من الأنزيمات وهي بكتيناز 1مل+1مل سيللولاز +1مل شيتيناز وأضيف إلى وسط الاستخلاص السوربيتول كمادة حافظة للضغط الحلولي (Eyini et al., 2006).

8-11-1- العوامل المؤثرة في عزل بروتوبلاست الفطر المحاري:

- نوع وتركيز المزيج الأنزيمي:
  استخدم ثلاث أنواع من الأنزيمات كل واحد لوحده أو مزيج فيما بينها وقد تم الحصول على اعلى نسبة من البروتوبلاست الحية باستخدام مزيج من الأنزيمات الثلاثة وهي بكتيناز(Pectinase)1مل+1مل سيللولاز(Cellulase) +1مل شيتيناز(Chitinase).

- عمر الهيفات :
  جربت هيفات من الفطر المحاري بأعمار مختلفة وهي : 3-5-7-9 أيام وقد تم الحصول على أعلى نسبة من البروتوبلاست الحي من هيفات بعمر 3 أيام.

- تأثير فترة التحضين:
  اخضعت الهيفات بعمر 3 ايام للتحضين مع المزيج النويمي لفترات مختلفة وهي : 0.5- 1 – 2 – 2.5- 3 و 4 ساعات. وقد تبين بان أفضل فترة تحضين هي ثلاث ساعات أعطت أفضل نسبة من البروتوبلاست.

- تأثير درجة الحموضة:

استخدم وسط استخلاص بدرجات من الpH 4- 6-8- وكان الوسط الحاوي على درجة حموضة 6 أفضل مايمكن.

- تاثير نوع المادة الحافظة :

استخدم ثلاث أنواع من المواد الحافظة بمعدل 0.6 مول ، وهي السوربيتول وسلفات المغنزيوم وكلوريد البوتاسيوم. وقد كانت أفضل النتائج في السوربيتول.

8-11-2- زرع بروتوبلاست الفطر المحاري:

زرعت البروتوبلاست مباشرة بعد عزلها في وسط مغذ في غرف النمو على درجة حرارة 30 م ولوحظ تطور سريع للبروتوبلاست إذ تطورت وأعطت هيفات جديدة بعد أربع أيام فقط من زراعتها ونسبة التجديد كانت منخفضة بحدود 3-4 %. كما قسم من البروتوبلاست كون ميكروكالوس(Eyini et a.,2006).

8-11-3- دمج بروتوبلاست في الفطور الزراعية:

تمكن فريق ياباني من دمج نوعين من البروتوبلاست التي تم عزلها من نوعين من الفطور. النوع الأول وهو Laetiporus sulphureus ، هذا الفطر ينتج مواد مضادة ومانعة للجلطات القلبية التي تعد أول سبب رئيس للموت في اليابان. هذا الفطر يصعب إكثاره وإنتاجه وشكله غير مرغوب للاستهلاك. فقد تم دمج البروتوبلاست مع بروتوبلاست تم الحصول عليها من فطر مرغوب ومواصفاته الإنتاجية جيدة وهو Hypsizigus marmoreaus. تمت عملية الدمج بين النوعين بوساطة الPEG . وبعد الدمج تم الحصول على هجن متجانسة بين النوعين ، واستطاعت الهجن إنتاج المادة الفعالة وهي مرغوبة من الناحية التسويقية والإنتاجية (Okamura et al., 2000).