فصل وزراعة البروتوبلاست (Isolation and culture of protoplast):

الخلية النباتية بخلاف النواة على سيتوبلازم يحتوى على بلاستيدات، ميتوكندريا، شبكة إندوبلازمية ، أجسام جولجي، فجوات عصارية ، ريبوسومات وغيرها من المكونات يحيط بها غشاء رقيق يسمى الغشاء البلازمي وهذا يحاط بجدار قوي لا يسمح بتمدد البروتوبلاست إلا في نطاق محدود يسمى الجدار الخلوي. وعند إزالة الجدار الخلوي ينطلق البروتوبلاست إلى البيئة المحيطة ويصبح الغشاء البلازمي هو الفاصل الوحيد بين البيئة والمكونات الداخلية. وتشير الأبحاث العلمية إلى نجاح فصل وزراعة البروتوبلاست من أعضاء نباتية مختلفة مثل الجذور والسوق والأوراق والأزهار والثمار وحبوب اللقاح كما يمكن فصل البروتوبلاست من الكالُس ومن معلقات الخلايا.

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:

1. الفصل بالإنزيمات يحتاج لفترة طويلة من التحضين في بيئة الفصل ، وخلال هذه الفترة فإن معدّل إختراق الأملاح للبروتوبلاست يكون أعلى من السكريات.
2. 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.

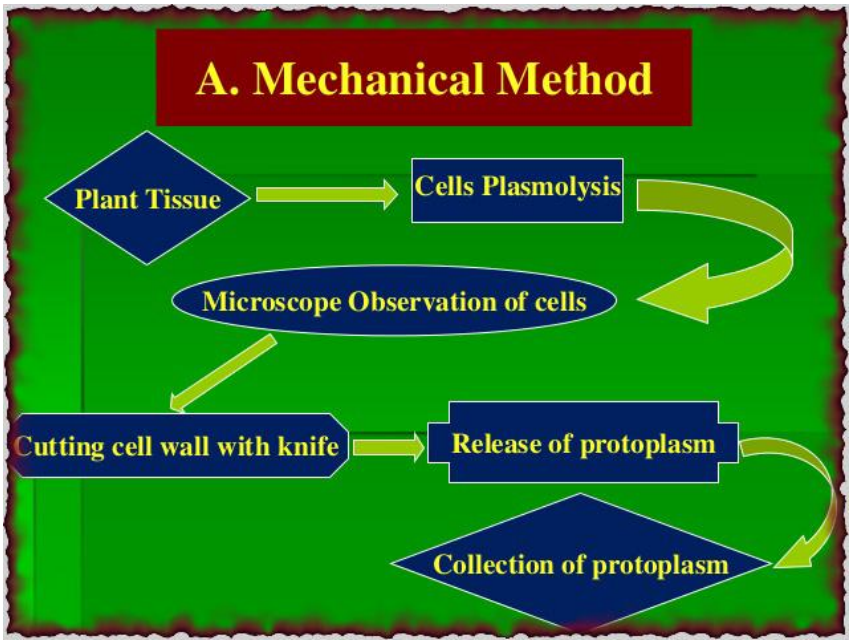
و هناك طريقتين أساسيتين لفصل البروتوبلاست من الجدار الخلوي وهما:

1. الفصل الميكانيكي (Mechanical Isolation)
2. 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:

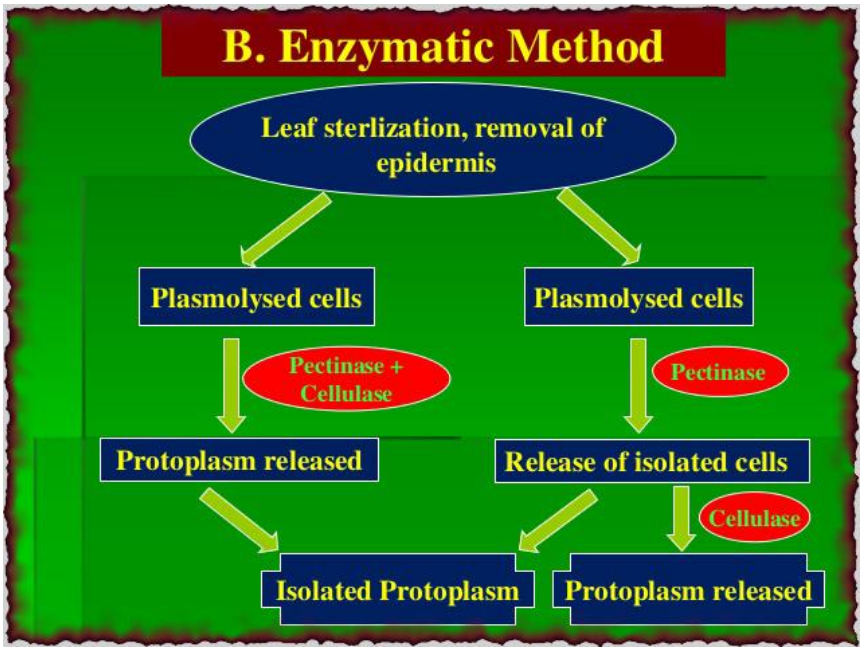
عدم تعرض البروتوبلاست للإنزيمات التي قد تؤثر على حيويتها وقدرتها على النمو والإنقسام

عيوب طريقة الفصل الميكانيكي:

1. حدوث اضرار لبعض البروتوبلاست أثناء عمليات الفصل وهذه تؤثر على مقدرتها على النمو والإنقسام النشط.
2. يعتبر عدد البروتوبلاست المنفصل بهذه الطريقة قليل جداً مقارنة بمثيله الناتج من الفصل بواسطة الإنزيمات.
3. 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:

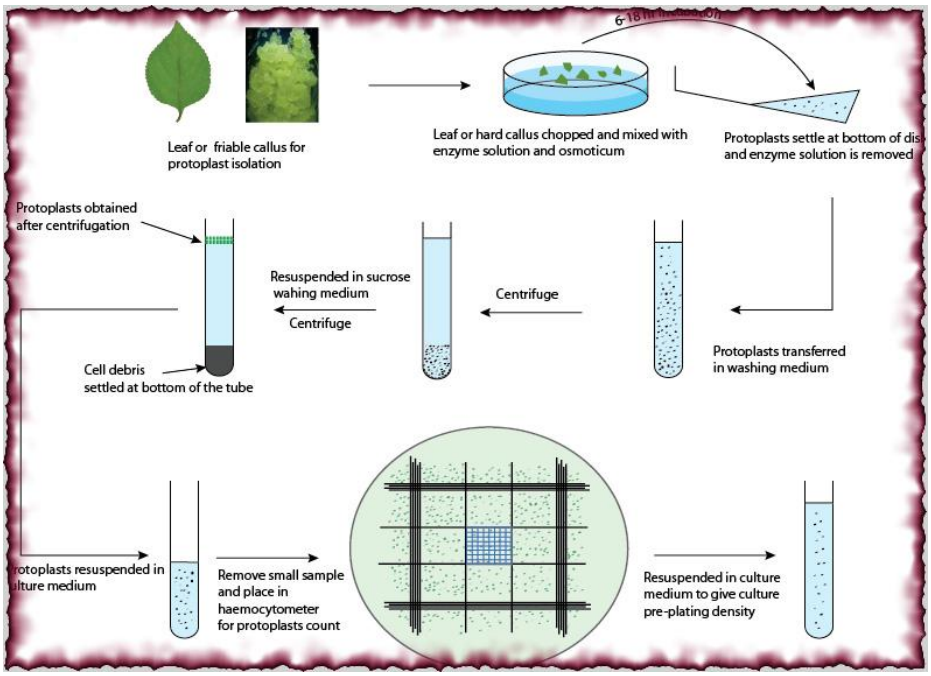
يمكن أن تؤثر الإنزيمات على حيوية البروتوبلاست وقدرته على الإنقسام

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:

1. تعقيم السطح الخارجي للأوراق.
2. إزالة طبقة الأبيدرمس (Epidermis) من الأوراق بواسطة ملقط و مشرط تشريح.
3. معاملة النسيج النباتي بالإنزيمات المحللة للجدر الخلوية مع توفير الضغط الإسموزي المناسب للبروتوبلاست.
4. 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:

1. يُنقل حوالي 5 مل من المعلق الخلوي إلى إنبوبة بغطاء.
2. توضع الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي لفصل الخلايا عن البيئة المغذية وذلك على سرعة 100 لفة في الدقيقة لمدة 1-2 دقيقة.
3. تُزال البيئة المغذية ويوضع محلول الإنزيمات المحللة والذي يحتوي على إنزيمات السيلولاز بتركيز 14%، البكتيناز بتركيز 2,5% .
4. ينقل محتويات الأنبوبة إلى طبق بتري الذي يوضع على جهاز هزاز على سرعة 35-75 لفة/ دقيقة لمدة تتراوح بين 2-6 ساعات.
5. بعدها يفصل البروتوبلاست وينقل إلى بيئة مغذية.

فصل البروتوبلاست من الكالس (Protoplast isolation from callus)

1. يمكن الحصول على كمية كبيرة من البروتوبلاست بواسطة إستخدام الكالُس النشط.
2. 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.
3. 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.

زراعة البروتوبلاست (Protoplast culture)

الهدف الأساسي من زراعة البروتوبلاست هو تشجيع الإنقسام بعد تكوّن الجدار الخلوي لتكوين مستعمرة خلوية ومنها يتكون الكالُس، ونتيجة لتغيير محتويات البيئة المغذية وبالأخص منظّمات النمو فإنه يمكن تشجيع تكون الأفرع والجذور وبالتالي الحصول على نبات كامل (Nagata & Takebe 1970).