العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست الورقية في صنف البطاطا بينيلا

نور القباني[1] و فهد البيسكي[1] خليل المعري[2]

الملخّص

عُزل البروتوبلاست من أوراق صنف البطاطا بينيلا في مخابر كلية الزراعة- جامعة دمشق بهدف تحديد العوامل المؤثرة في مردود وحيوية البروتوبلاست. أظهرت النتائج إمكانية الحصول على أكبر مردود من البروتوبلاست المعزول ($1.7 \pm 0.06 \times 10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق، وبلغت نسبة الحيوية ($82.91 \pm 2.38\%$) عند استخدام البيئة المضاف إليها ثيوسلفات الفضة (STS) بتركيز 50 ميكرومولاً، وقد أدت المعاملة بتراكيز مختلفة من STS إلى زيادة مساحة المسطح الورقي كمصدر لعزل البروتوبلاست وتقصير طول المسافات العقدية مقارنة بالشاهد. كما بيّنت النتائج أن استخدام المانيتول بتركيز 0.75 مولاً أعطى أعلى مردود من البروتوبلاست المعزول ($1.68 \pm 0.04 \times 10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق وأعلى حيوية ($87.82 \pm 2.64\%$)، في حين تم الحصول على أعلى مردود ($1.07 \pm 0.04 \times 10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق، وأعلى حيوية ($76.93 \pm 5.13\%$) عند استخدام السكروز بتركيز 0.5 مولاً، كما بيّنت النتائج أن استخدام أوراق نباتات مزروعة مخبرياً بعمر 4 أسابيع يؤدي إلى الحصول على أكبر مردود من البروتوبلاست المعزول ($1.94 \pm 0.04 \times 10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق، وأعلى حيوية ($84.88 \pm 1.40\%$) وذلك بعد التحضين مدة (14-16) ساعة ضمن المحلول الإنزيمي المؤلف من: 1.75% R10 سيلوليز+0.4% Cellulase ماسيروزيم+0.005 Macerozyme مول كلوريد الكالسيوم+0.75 مول مانيتول +0.01 مول MES، وكانت درجة حموضة الوسط (pH) 5.6.

الكلمات المفتاحية: بطاطا، بروتوبلاست، سيلوليز، ماسيروزيم، ثيوسلفات الفضة، سورية.

[1] كلية الزراعة، جامعة دمشق، [2] الهيئة العامة للتقانة الحيوية، سورية.

Factors affecting leaf protoplast isolation from Binella -potato cultivar

Al-Qabbani, N.[(1)], F. Al-Biski,[(1)] and K. Al-Maarri[(2)]

Abstract

In this research, protoplast isolations were obtained from the leaves of Potato Binella cultivar at the laboratories of Agriculture College- Damascus University in order to determine factors affecting the yield and viability of protoplast isolation. Results indicated that the best yield percentage of isolated protoplast ($1.7\pm0.06\times10^6$ protoplast/g of leaves) with high percentage of viability (82.91±2.38%) were obtained when silver thiosulfate (STS) at 50µM was added to the isolation medium. The treatment in different concentrations of STS increased the leaf area as a source to isolate the protoplast and shorten the length of nodal distance, compared to control. Adding manitol to the isolation medium gave better results than sucrose. The best yield of isolated protoplast ($1.68 \pm 0.04 \times 10^6$ protoplast/g of leaves) with high viability percentage (87.82 ± 2.64%) was obtained by adding 0.75 M of manitol to the isolation medium, while high density ($1.07 \pm 0.04 \times 10^6$ protoplast / g of leaves) and high viability (76.93 ± 5.13%) were obtained when adding sucrose at 0.5 M. *In vitro* leaf age affected the yield and the viability of isolated protoplast, the highest density ($1.94 \pm 0.04 \times 10^6$ protoplast / g of leaves) and the highest viability (84.88±1.40%) were obtained when using 4 week *in vitro* leaf age, after an incubation period (14-16 hours) in a medium containing: 1.75% cellulase R 10 + 0.4% Macerozyme R 10 + 0.005M $CaCl_2.2H_2O$+ 0.75M mannitol + 0.01M MES, and pH of 5.6.

Keywords: Potato, Protoplast, Cellulase, Macerozyme, Silver Thiosulfate.

[(1)] Faculty of Agriculture, Damascus University, [(2)] National Commission for Biotechnology, Syria.

المقدمة

تعدُّ البطاطا من أهم محاصيل الخضر في الوطن العربي، وفي عدد كبير من دول العالم. وتتبع العائلة الباذنجانية *Solanaceae* التي تضم نحو 90 جنساً، ونحو 2000 نوع. وتنتمي البطاطا إلى الجنس *Solanum*، الذي يعدُّ من أهم أجناس العائلة الباذنجانية وأكبرها، إذْ يحتوي على أكثر من 1000 نوع.

وتحتوي أنواع البطاطا سلسلة متصلة من التراكيب الصبغية المتضاعفة، فهناك الأنواع الثنائية 2n=2x=24 والثلاثية 2n=3x=36 والرباعية 2n=4x=48 والخماسية 2n=5x=60 والسداسية 2n=6x=72 (مسعود، 1981). تستخدم البطاطا بعد حصادها إلى مجموعة كبيرة من الأغراض فهي فضلاً عن أنّها غذاء للإنسان فإنها تقدم أيضاً علفاً للحيوانات، ولها استعمالات عديدة في مجال الصناعة حيث يستخرج منها النشاء وتستعمل في صناعة الورق والمنسوجات وصناعة المواد اللاصقة، فضلاً عن استخدامها في صناعة التخمير واستخراج الكحول مثل الإيتانول والبيوتانول وبعض الأحماض مثل الستريك واللاكتيك (البيسكي وزملاؤه، 2004).

تستخدم تقنية عزل البروتوبلاست وزراعتها على نطاق واسع في تحسين النباتات، وفي نقل المعلومات الوراثية الجديدة من نوع إلى آخر عن طريق دمج البروتوبلاست (التهجين الجسمي) الذي استعمل بنجاح في نقل صفة المقاومة للفيروسات (Valkonen و Rokka، 1998) والمقاومة للصقيع (Preiszner وزملاؤه، 1991) من الأصناف البرية إلى الأصناف المزروعة كذلك استخدمت في عزل الطفرات (Razdan و Cocking، 1981)، وقد نجحت زراعة البروتوبلاست في العديد من أصناف البطاطا الثنائية 2n=24 والرباعية 2n=48 وفي أكثر من 30 نوعاً عالمياً (Ferreira و Zelcer، 1989).

يعدُّ السيلولاز والبكتيناز من الإنزيمات التي تستخدم استخداماً واسعاً في عزل البروتوبلاست، إذْ يقوم البكتيناز بتحفيز تفريق التجمعات الخلوية (Grezes وزملاؤه، 1994) ويستخدم السيلولاز في فك الروابط السللوزية في الجدار الخلوي التي تنتهي بتحرير البروتوبلاست (Sondahl وزملاؤه، 1980). عُزل البروتوبلاست في صنف البطاطا Desiree باستخدام وسط استخلاص يحوي مزيجاً من الإنزيمات 1% Cellulase R-10 و0.25% Macerozyme R-10 (Sidorov وزملاؤه، 1987). وقد وجد Tavazza و Ancora (1986) أنه في المحلول الأنزيمي المحتوي على مزيجٍ من الإنزيمات 0.1% Cellulase R-10 و0.25% Macerozyme R-10 فإن المردود من البروتوبلاست لصنف البطاطا Desiree كان 1.56×10^6 بروتوبلاست/غرام أوراق ومردود الصنف Kenebe 1.21×10^6 بروتوبلاست/غرام أوراق.

تحتاج المراحل المختلفة من عزل البروتوبلاست وصولاً إلى مرحلة الزراعة إلى ضغط أسموزي مناسب لمنع انفجارها نتيجة الضغط المطبق من محتويات الخلية على

الغشاء السيتوبلازمي، ومن أكثر المركبات استخداماً السوربيتول والمانيتول والسكروز (الرفاعي والشوبكي، 2002). وبَيّنَ Grun و Chu (1978) أنَ الضغط الأسموزي الأمثل لمحلول عزل البروتوبلاست وزراعته يختلف بحسب النوع والطراز الوراثي في البطاطا، وهو 0.4 مولاً من المانيتول بالنسبة إلى النوع المزروع *Solanum tuberosum* وتؤدي الزراعة في ضغط أسموزي مرتفع إلى حدوث الإسمرار وتثبيط نمو الكالوس (Kao و Michayluk، 1980؛ Klimaszewske، 1989). وإن استخدام النباتات النامية مخبرياً بعمر 3-4 أسابيع في عزل البروتوبلاست أمر مرغوب نظراً إلى نوعية البروتوبلاست الناتجة عنها وثباتها (Chang و Chan، 1991؛ Chi و Pua، 1989). عُزل البروتوبلاست من أنسجة نباتية مختلفة، من الأوراق، والفلقات، والجذور والأزهار (Zhu وزملاؤه، 2005؛ Chabane وزملاؤه، 2007) واختلف مردود البروتوبلاست بحسب مصدر الأنسجة النباتية المستخدمة في العزل، لذلك يجب تحديد المادة الأم إلى كونها عامل مهم في الحصول على أعلى مردودية وحيوية للبروتوبلاست (Assani وزملاؤه، 2001).

تعدُّ الأوراق من أهم المصادر الأساسية للحصول على البروتوبلاست ، وذلك لأنها تتيح فرصة الحصول على خلايا جيدة ومتماثلة في الوقت نفسه من أنسجتها (Liu و Chen، 1978). وبَيّنَ Perl وزملاؤه (1988) أن وجود مضادات الإيثلين في وسط الزراعة مثل ثيوسلفات الفضة كان فعالاً في تحسين إنتاج البروتوبلاست وفعاليته في البطاطا، وإن استخدام ثيوسلفات الفضة بتركيز 50-100 ميكرومول/ل أدى إلى إنتاج مساحة ورقية كبيرة كمصدر للمادة النباتية لعزل البروتوبلاست إذ أدى إلى إنقاص طول المسافات العقدية وزيادة الوزن الجاف والكلوروفيل 11 (Songstad وزملاؤه، 1988؛ Shillito وزملاؤه، 1983). تستخدم تقنية عزل البروتوبلاست ودمجها دمجاً واسعاً في التحسين الوراثي للنباتات، وفي نقل المورثات النوعية بهدف الحصول على نباتات متحملة للإجهادات الفيزيولوجية والبيئية.

لذلك لابدَّ من وضع تقنية وتحديد الشروط الأنسب لعزل البروتوبلاست من أجزاء نباتية مختلفة كمرحلة أولى، والتمكن من عملية تجديد البروتوبلاست للحصول على نباتات كاملة كمرحلة ثانية، ليصار إلى استخدام التقنية الأوسع انتشاراً وهي دمج البروتوبلاست بهدف التحسين الوراثي واستنباط أصناف جديدة متحملة للشروط البيئية المحلية. وقد اختير صنف البطاطا بينيلا نظراً إلى كونه من الأصناف المحلية المهمة، لما يتميّز به من صفات كمية ونوعية عالية.

مواد البحث وطرائقه

نُفّذ البحث في مخبر التقانات النباتية في الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية، وفي كلية الزراعة بجامعة دمشق، خلال العام 2010- 2011. واستخدمت درنات بطاطا (الصنف بينيلا) من مرتبة إيليت بمعدل 100 درنة، وأُنبتت باتباع الخطوات الآتية:

- غُسلتْ الدرنات بالماء الجاري، لإزالة الأوساخ ،ثم عُوملت الدرنات بحمض الجبرلين تركيز (4ppm) مدة ربع ساعة لكسر طور السكون.
- استئصال النهايات الزهرية من قمة الدرنة وهي الجهة المقابلة لمكان اتصال الدرنة بالستولون (رئد) وتتركز فيها عدة عيون، وزراعتها في أصص مملوءة بمادة البيتموس (التورب الزراعي) المخصب والمعقم وبدرجة حموضة (pH) 6-7 ،ثم جرت عملية التطهير السطحي للنموات البرعمية الناتجة من الطرف الزهري؛ وذلك تحت جهاز العزل الجرثومي، حيث قُصّتْ النموات إلى عقل مفردة بطول 2-3 سم، وغسلت بالماء الجاري تلاها الغمر بالكحول الإيتيلي تركيز 70% مدة 1 دقيقة، مع التحريك ثم المعاملة بهيبوكلوريت الصوديوم تركيز (0.5-1-2)% مدة 5 و10 دقائق لكل تركيز، ثم غسلت النموات البرعمية 3 مرات متتالية بالماء المقطر المعقم؛ وذلك بمعدل 5 دقائق في كل مرة بهدف إزالة آثار المادة المستخدمة بالتعقيم كلّها.

زُرعت العينات النباتية في وسط MS وفق Murashige وSkooge (1962) المضاف إليه 30 غ/ل سكروز و7 غ/ل آجار وبدرجة حموضة باهاء (pH) 5.8، وذلك ضمن أنابيب اختبار بحجم 2.5× 20 سم تحوي 12 مل من الوسط المغذي، ثم عُقّمت الأنابيب في جهاز التعقيم الرطب Autoclave في حرارة 121مْ وضغط 1.04كغ/سم^2 مدة 20 دقيقة.

حضنت الأنابيب المزروعة بغرفة النمو في درجة حرارة حرارة 22مْ وإضاءة 16 ساعة/8 ظلاماً وشدة ضوئية 3000 لوكس، علماً أن عدد الأنابيب المزروعة في هذه المرحلة بلغ 24 أنبوباً لكل معاملة تعقيم، كررت التجربة مرتين لتأكيد النتيجة، وسجلت في هذه المرحلة النسب المئوية للعينات السليمة والنسب المئوية للعينات النامية من العينات السليمة.

عزل البروتوبلاست: زُرعت الأجزاء النباتية (عقل بطول 1.5 سم تحوي برعماً جانبياً واحداً) المستخدمة في عزل البروتوبلاست في بيئة SH وفق Schenk وHildebrand (1972) الخالية من الهرمونات والمزودة بثيو سلفات الفضة بتركيز 50 ميكرومولاً، وبعد شهر أخذ من (10-20) نباتاً أي ما يعادل 1غ مادة نباتية وعرضت لدرجة حرارة 10مْ + ظلام مدة 24 ساعة (ظروف إجهاد) ما ينعكس إيجابياً على حيوية البروتوبلاست وقدرتها على النمو.

عزلت البروتوبلاست في ظروف معقمة تحت جهاز العزل الجرثومي ،حيث أخذت الأوراق الكبيرة و المتوسعة بشكل كامل من دون أعناقها وقطعت إلى أجزاء صغيرة (1-2) مم بواسطة شفرة معقمة وذلك ضمن أطباق بتري قطر 9 سم، وأضيف إليها 10 مل من محلول البلزمة (الجدول1) وبعد 30 دقيقة استبعد محلول البلزمة وأضيف بدلاً منه 10 مل من المحلول الأنزيمي المعقم بالفلترة (0.22 µm) الذي يتألف من: 1.75% Cellulase R10+0.4% Macerozyme R10+0.005 مول كلوريد الكالسيوم المائي+ 0.75 مول مانيتول+0.01 مول MES (2(N-morpholino ethan sulfonic acid) ودرجة حموضة الوسط (pH) 5.6.

حضنت الأطباق مدة (14-16) ساعة في الظلام وبحرارة 25 مْ، وتلا ذلك فلترة ناتج التحلل الأنزيمي من خلال 8 قطع من الشاش المعقم الموضوعة على أنابيب فالكون 15مل وغسلت هذه الأنسجة بمحلول الغسيل W5 (الجدول 1)، ثم عُرّضت لطرد مركزي 700 دورة/د ولمدة 5 دقائق، واستبعد السائل الطافي وأضيف إلى الراسب 10 مل من محلول الغسيل W5 ثم عرضت لطرد مركزي 500 دورة/د مدة 6 دقائق، واستبعد السائل الطافي وكررت عملية الغسيل مرة ثانية، ثم أضيف إلى الراسب الذي يمثل البروتوبلاست المعزول 1 مل من وسط الزراعة (Kikuta وزملاؤه، 1984) من أجل القيام بتحديد المردود وتقييم الحيوية، وقد حُدّد المردود عن طريق شريحة عد الخلايا (NEUBAUER IMPROVED) باستخدام مجهر ضوئي مقلوب، وحُدّدت الحيوية باستخدام صبغة إيفان (w/v)0.4% باستخدام المجهر الضوئي المقلوب من دون أشعة فوق بنفسجية حيث تلونت الخلايا الميتة باللون الأزرق، في حين لم تتلون الخلايا الحية، وحُسبت نسبة الخلايا الحية كالآتي:

%للبروتوبلاست الحي =عدد البروتوبلاست الحي / العدد الكلي للبروتوبلاست ×100

الجدول (1) محاليل بلزمة وغسيل البروتوبلاست

العناصر	محلول البلزمة	محلول W5
NaCl		0.15(M/L)
KCl		0.01(M/L)
$CaCl_2.2H_2O$	0.001(M/L)	0.125(M/L)
غلايسين		0.01(µM/L)
مانيتول	0.5(M/L)	-
غلوكوز		0.005(µM/L)
MES	3(M/L)	-
PH	5.6	5.8

العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاس: دُرس عدد من العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست وفي مردودها وحيويتها.

تأثير المعاملة بثيوسلفات الفضة: يعدُّ مركب ثيوسلفات الفضة من مثبطات الإيتلين، وقد زرعت النباتات التي ستستخدم في عزل البروتوبلاست في بيئة SH الخالية من الهرمونات المزودة بتراكيز مختلفة من ثيو سلفات الفضة (0 – 25 – 50 – 75 -100) ميكرومول وبمعدل 16 أنبوباً من كل معاملة؛ وبذلك كان عدد الأنابيب المزروعة في هذه المرحلة: 5 معاملات ×16 أنبوب = 80 أنبوباً.

كررت كل معاملة مرتين، وقيست مساحة المسطح الورقي باستخدام جهاز الماسح الضوئي (Area Meter AM300) ومتوسط طول ثلاث مسافات عقدية من وسط النبات؛ وذلك بعد شهر من الزراعة، فضلاً عن حساب مردود وحيوية البروتوبلاست المعزول.

تأثير نوع منظم الضغط الأسموزي وتركيزه: دُرس تأثير نوعين من منظمات الضغط الأسموزي: المانيتول والسكروز؛ وذلك بتراكيز مختلفة: (0 – 0.25 – 0.5– 0.75 –1) مولاً لكل منهما. حيث حُدّد التركيز الأمثل من حيث مردود وحيوية البروتوبلاست المعزول، نُفّذت التجربة بثلاثة مكررات وبمعدل 3 غ ورق للمكرر الواحد وكررت كل تجربة مرتين.

تأثير عمر العينات النباتية داخل الأنابيب: دُرس تأثير أعمار النبات (4-5-6-7) أسابيع في مردود البروتوبلاست الناتج وحيويته وذلك بثلاثة مكررات للتجربة الواحدة وبمعدل 3 غ ورق للمكرر الواحد مع تكرار التجربة مرتين.

صُمّمت التجربة وفق القطاعات العشوائية الكاملة وحُلّلت النتائج إحصائياً باستخدام برنامج SPSS، وجرت مقارنة المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 1%.

النتائج و المناقشة

التطهير السطحي وتأسيس الزراعات المعقمة: تحققت أفضل نتائج التعقيم عند استخدام هيبوكلوريت الصوديوم (NaOCl) بتركيز 0.5% مدة 10 دقائق وقد بلغت نسبة العينات السليمة 83%، ونسبة العينات التي أبدت استجابة للنمو من العينات السليمة 83%، في حين أدى استخدام التركيز 2% من هيبوكلوريت الصوديوم مدة 5 و10 دقائق إلى خفض نسبة العينات النامية إلى 30% و20% على التوالي، وقد استُخدمت مادة هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl نظراً إلى فعاليتها في عمليات التطهير السطحي في العديد من النباتات المزروعة مخبرياً (المعري، 1995؛Pevalek و Jelaska، 1987)، وتتميّز هذه المادة بفعالية عالية في تطهير الخزعات النباتية قليلة التلوث السطحي، خاصة إذا استخدمت بالتراكيز المناسبة.

العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاست:

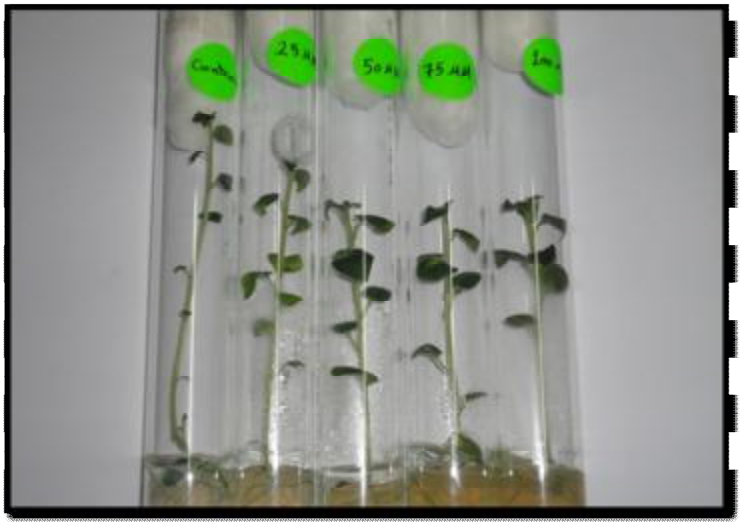
تأثير المعاملة بثيوسلفات الفضة: يبيّن الجدول (2) أن وجود ثيوسلفات الفضة بتراكيز مختلفة (25-50-75-100) ميكرومول في وسط الزراعة يزيد وبشكل معنوي من مساحة المسطح الورقي؛ وذلك مقارنة بالشاهد الخالي من ثيوسلفات الفضة، مع وجود فروق غير معنوية بين التراكيز المختلفة وهذا يوافق ما حصل عليه Ehsanpour و Jones (2001) إذْ وجدا أن التركيز الأمثل من ثيوسلفات الفضة لنمو عقل البطاطا بشكل طبيعي يقع ضمن المدى 50 -100 ميكرومول؛ وذلك في صنف البطاطا Delaware.

في حين يظهر الجدول (2) وجود انخفاض في طول المسافات العقدية مع زيادة تركيز ثيوسلفات الفضة في الوسط من (0 إلى 50) ميكرومولاً في حين لم تؤدِ زيادة التركيز من (50 إلى 100) ميكرومول إلى انخفاض معنوي في طول المسافات العقدية (الشكل 1)؛ وهذا يوافق ماحصل عليه Ehsanpour و Jones (2001) إذْ ذكرا عدم وجود فروق معنوية في طول المسافات العقدية عند استخدام ثيوسلفات الفضة بتركيز (50 و100) ميكرومول مع وجود فروق معنوية بين هذين التركيزين وبين الشاهد غير المعامل، وقد ذكر Mollers وزملاؤه (1992) أن التراكيز العالية من ثيو سلفات الفضة تؤدي إلى ظهور أعراض السمية.

الجدول (2) تأثير تراكيز ثيوسلفات الفضة في متوسط طول المسافات العقدية ومساحة المسطح الورقي.

تركيز ثيوسلفات الفضة (µM)	متوسط طول المسافات العقدية (سم)	متوسط مساحة المسطح الورقي لكامل الأوراق (مم^2)
0	2.27±0.22^a	298.9±42.06^b
25	1.63±0.11^b	462.8±36.06^a
50	**1.21±0.08^a**	**550.4±136.65^a**
75	1.25±0.12^a	569.1±119.04^a
100	1.18±0.17^a	564.4±124.37^a
LSD 1%	0.17645	121.931

- أخذت النتائج بعد 30 يوماً من الزراعة، والنتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين.
- الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي ($p < 0.05$) بين المعاملات.



الشكل (1) تأثير تراكيز مختلفة من ثيوسلفات الفضة في طول المسافات العقدية ومساحة المسطح الورقي لصنف البطاطا بينيلا.

تعطي عقل البطاطا المزروعة ضمن أوعية مغلقة نموات ذات أوراق صغيرة وجذوراً هوائيةً، ويعود هذا إلى تراكم الإيتلين ونقص الأوكسجين داخل هذه الأوعية ممَّا يؤدي إلى إعاقة نمو عقل البطاطا، ومن ثم فإن تثبيط تأثير الإيتلين باستخدام بعض المركبات مثل ثيوسلفات الفضة يؤدي إلى إعادة عقل البطاطا إلى نموها الطبيعي الذي بدوره يؤدي إلى الحصول على أوراق أكبر ومن ثمَّ زيادة مردود البروتوبلاست المعزول وحيويته، ويؤدي كذلك إلى منع استطالة السلاميات(Perl وزملاؤه، 1988؛ Hussey و Stacy، 1981).

يبيّن الجدول (3) والشكل (2) أن استخدام ثيوسلفات الفضة بتركيز 50 ميكرومولاً يؤدي إلى الحصول على أكبر مردود من البروتوبلاست ($1.7\pm0.06\times10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق وحيث كانت الحيوية ($82.91\pm2.38\%$) (الشكل 6)، في حين أدى استخدام ثيوسلفات الفضة بتركيز 75 ميكرو مولاً إلى الحصول على حيوية أعلى (84.38 ± 1.75)، وهذا يوافق ماذكره Avihai وزملاؤه (1988) الذين وجدوا أن مردود البروتوبلاست المعزول من أنسجة نباتية مزروعة في بيئة مضاف إليها ثيوسلفات الفضة (STS) أعلى من ذلك المعزول من أنسجة مزروعة في بيئة خالية من STS ،كما تؤكد ما ذكره Veen (1987) أن معاملة عقل البطاطا بثيوسلفات الفضة يوفر مادة نباتية مناسبة لعزل البروتوبلاست.

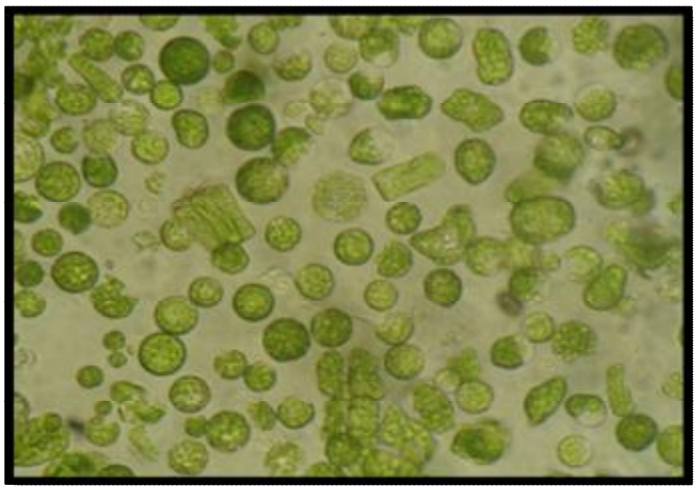
ويعود السبب في ذلك إلى أن إضافة STS إلى وسط الزرع يثبط من اصطناع الإيتلين، وهذا يؤدي إلى إعادة عقل البطاطا إلى نموها الطبيعي؛ وبذلك تزداد كتلة المادة

النباتية المستخدمة في عزل البروتوبلاست، فضلاً عن أن الأنسجة النباتية النامية بوجـــود STS تصبح أكثر مقاومة للإجهاد (Perl وزملاؤه، 1988).

الجدول (3) تأثير تراكيز ثيوسلفات الفضة في مردود البروتوبلاست المعزول وحيويتها.

تركيز ثيوسلفات الفضة (µM)	متوسط مردود البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/غ أوراق)	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)
0	0.79 ± 0.04^{c}	71.10 ± 3.49^{c}
25	0.81 ± 0.03^{c}	75.78 ± 2.48^{b}
50	$\mathbf{1.7\pm0.06^{a}}$	$\mathbf{82.91\pm2.38^{a}}$
75	1.44 ± 0.08^{b}	84.38 ± 1.75^{a}
100	0.68 ± 0.03^{d}	67.33 ± 2.73^{c}
LSD 1%	0.095	4.2357

- النتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين. -الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي ($p>0.05$) بين المعاملات.



الشكل (2) تأثير التركيز 50 ميكرومولاً من ثيوسلفات الفضة في مردود بروتوبلاســت صــنف البطاطا بينيلا ضمن محلول العزل.

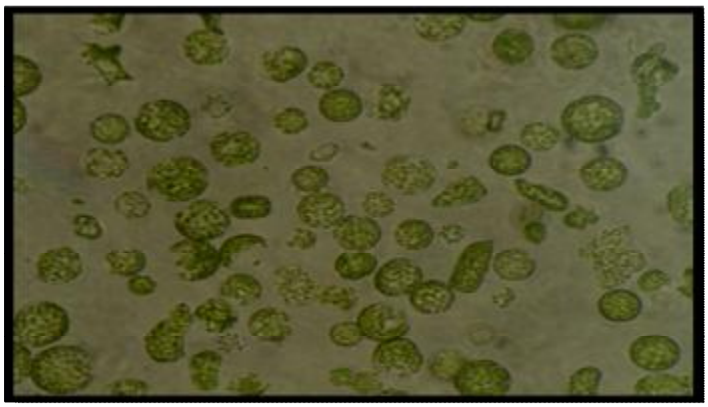
تأثير نوع منظم الضغط الاسموزي وتركيزه: يؤثر الضغط الأسموزي لمحلول عــزل البروتوبلاست تأثيراً كبيراً في كمية البروتوبلاست المعزول وفي نوعيته، إذْ يبيّن الجدول (4) والشكل (3) أن استخدام المانيتول بتركيز 0.75 مولاً ضمن محلول العزل أدى إلـــى الحصول على مردودية أعلى من البروتوبلاســت ($1.68\pm0.04\times10^6$) بروتوبلاســت/غ أوراق المترافق بحيوية أكثر (87.82±2.64%) (الشكل 7).

الجدول (4) تأثير تراكيز مختلفة من المانيتول في كثافة البروتوبلاست المعزول وحيويته.

تركيز المانيتول (M)	متوسط مردود البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/غ أوراق)	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)
0	0^{d}	0^{d}
0.25	0.30 ± 0.09^{d}	2.87 ± 1.23^{d}
0.5	1.08 ± 0.08^{b}	81.82 ± 2.60^{b}
0.75	**1.68 ± 0.04^{a}**	**87.82 ± 2.64^{a}**
1	0.87 ± 0.08^{c}	69.60 ± 3.39^{c}
LSD 1%	0.1151	3.7221

- النتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين. -الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي($p < 0.05$) بين المعاملات.

وهذا يتوافق مع نتائج بعض البحوث التي أشارت إلى أن الضغط الأسموزي الأمثل لمحلول عزل البروتوبلاست يختلف بحسب النوع النباتي والصنف، فمثلاً في النوع *Solanum chacoence* هو 0.3 مول مانيتول و0.4 مول مانيتول في النوع المزروع *Solanum tuberosum* (Grun و chu، 1978). لذلك جاءت نتائج هذا البحث مخالفة لنتائج Ehsanpour و Jones (2001) التي أشارت إلى أن التركيز المثالي من المانيتول هو 7.5% في صنف البطاطا Delware ومتقاربة مع Kikuta وزملائه (1994) الذين وجدوا أن التركيز المثالي من المانيتول بالنسبة إلى صنف البطاطا May Queen هو 0.6 مولاً، ويمكن أن يعزى الاختلاف في النتائج إلى اختلاف التركيب الوراثي للأصناف.



الشكل (3) تأثير التركيز0.75 مولاً من المانيتول في مردود بروتوبلاست صنف البطاطا بينيلا ضمن محلول العزل.

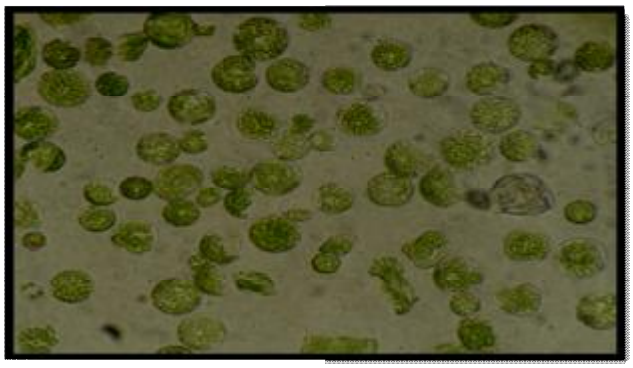
كما تبين النتائج (الجدول 5) والشكل (4) أن أعلى مردود من البروتوبلاست ($1.07\pm0.04\times10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق وأعلى حيوية (76.93±5.13%) تنتج عن استخدام السكروز بتركيز 0.50 مول (الشكل8).

الجدول (5) تأثير تراكيز مختلفة من السكروز في مردود البروتوبلاست المعزول وحيويته.

تركيز السكروز (M)	متوسط مردود البروتوبلاست $\times10^6$ (بروتوبلاست/غ أوراق)	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)
0	0^d	0^d
0.25	0.027 ± 0.04^c	15.65 ± 1.83^c
0.5	**1.07 ± 0.04^a**	**76.93 ± 5.13^a**
0.75	0.36 ± 0.08^b	28.8 ± 4.25^b
1	0^d	0^d
LSD 1%	0.07475	4.9758

- النتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين. -الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي ($p< 0.05$) بين المعاملات.

تأثير عمر العينات النباتية داخل الأنابيب: يبيّن الجدول (6) والشكل (5) أن عمر الأوراق يؤثر في مردود البروتوبلاست المعزول وحيويته إذْ أدى استخدام أوراق بعمر 4 أسابيع إلى الحصول على مردود أعلى ($1.94\pm0.04\times10^6$) بروتوبلاست/غ أوراق وحيوية أعلى (84.88±1.40%) من البروتوبلاست المعزول (الشكل 9).



الشكل (4) تأثير التركيز 0.5 مولاً من السكروز في مردود بروتوبلاست صنف البطاطا بينيلا ضمن محلول العزل.

في حين أدى عزل البروتوبلاست من الأوراق الأكبر عمراً (6 و7) أسابيع إلى الحصول على بروتوبلاستاً ذي مردود وحيوية أقل، وهذا يوافق ماحصل عليه Qin chen وزملاؤه

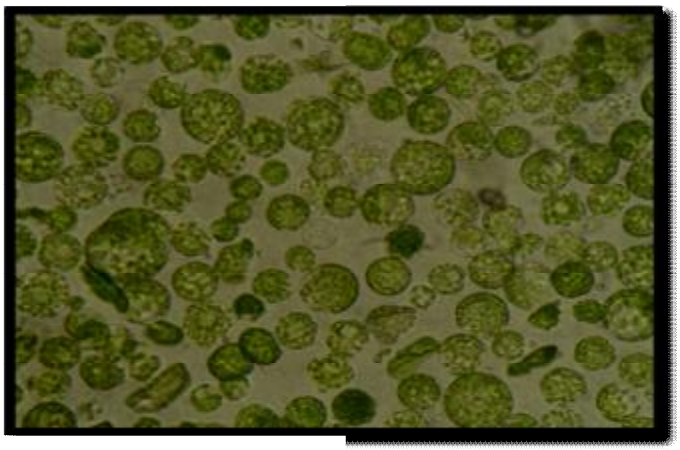
(2007) إذ وجدوا أن أعلى مردود من البروتوبلاست المعزول كان عند استخدام أوراق بعمر 30 يوماً وذلك في صنف البطاطا *S.pinnatisectum*.

الجدول (6) تأثير عمر الأوراق في مردود البروتوبلاست المعزولة وفي حيويته.

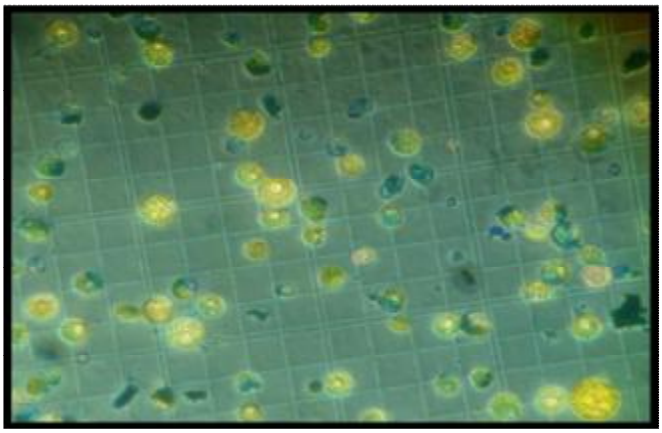
عمر الأوراق (أسبوع)	متوسط مردود البروتوبلاست $\times 10^6$ (بروتوبلاست/غ أوراق)	متوسط حيوية البروتوبلاست (%)
4	**1.94 ± 0.04^{a}**	**84.88 ± 1.40^{a}**
5	1.32 ± 0.08^{b}	80.32 ± 1.00^{ab}
6	0.79 ± 0.02^{c}	75.72 ± 2.64^{b}
7	0.70 ± 0.04^{d}	67.33 ± 6.34^{c}
LSD 1%	0.0845	5.8215

- النتائج المعروضة هي متوسط لتجربتين. -الأحرف المتشابهة تشير إلى عدم وجود فرق معنوي($p< 0.05$) بين المعاملات.

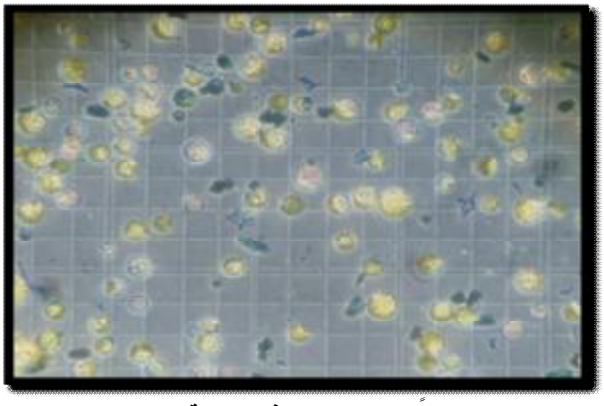
وقد أظهرت تجارب مماثلة أن عمر الأوراق يؤثر في مردود البروتوبلاست مثل البصل (Buiteveld و Creem-Molenoar، 1994) والفصة (Levee وزملاؤه، 2005)، كما أن الأوراق الحديثة تعطي بروتوبلاستاً ذات مردود وحيوية أعلى لأنها تحوي كميات كبيرة من خلايا الميزوفيل ذات الجدار الخلوي منخفض الثخانة بسبب ارتفاع معدل الانقسام الخلوي فيها، فضلاً عن انخفاض نسبة تراكم المواد الليغنينية فيها (Babaoglu، 2000).



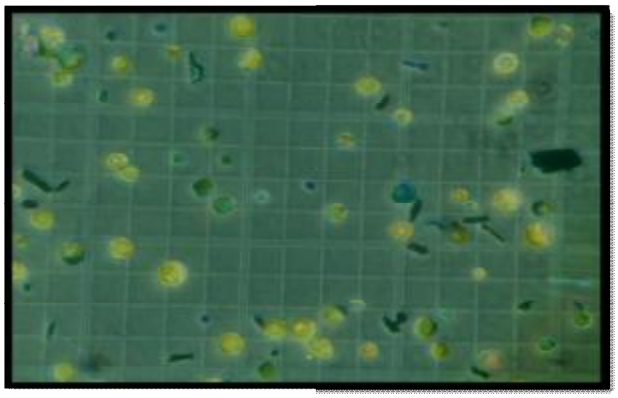
الشكل (5) مردود بروتوبلاست صنف البطاطا بينيلا ضمن محلول العزل لنبات بعمر 4 أسابيع.



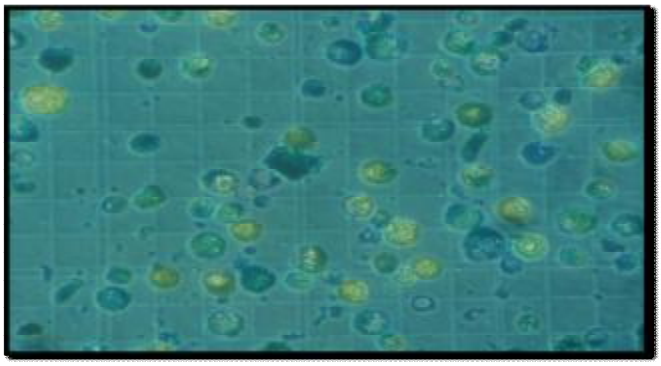
الشكل (6) تأثير التركيز 50 ميكرومولاً من ثيوسلفات الفضة في حيوية بروتوبلاســت صــنف البطاطا بينيلا على شريحة العد.



الشكل (7) تأثير التركيز 0.75 مولاً من المانيتول في حيوية بروتوبلاست صنف البطاطا بينــيلا على شريحة العد.



الشكل (8) تأثير التركيز 0.5 مولاً من السكروز في حيوية بروتوبلاست صنف البطاطا بينيلا على شريحة العد.



الشكل (9) حيوية بروتوبلاست صنف البطاطا بينيلا على شريحة العد لنباتات بعمر 4 أسابيع.

واقترح القيام بتجارب عزل البروتوبلاست في الأصناف الأخرى المهمة اقتصادياً ومحلياً.

وتطبيق هذه النتائج عن طريق دمج البروتوبلاست بهدف التحسين الوراثي للبطاطا.

المراجع References

البيسكي، فهد، وحياة طوشان، وعماد اسماعيل، وفراس شيحاوي. 2004. تأثير كل من العمر الفيزيولوجي لبذار البطاطا وموعد الحصاد في معدل انتاج الدرنات، مجلة بحوث جامعة حلب، 49: 201-231.

المعري، خليل. 1995. إكثار النخيل بزراعة الأنسجة النباتية، جامعة الملك فيصل، السعودية. الصفحات: 77-96.

الرفاعي، توفيق سمير الشويكي. 2002. تقنيات القرن 21 لتحسين النبات باستخدام زراعة الأنسجة، الطبعة الأولى، دار الفكر العربي، لقاهرة، مصر، الصفحات: 271- 290.

مسعود، كاسر. 1981. أساسيات تربية النبات، منشورات جامعة حلب، 350 صفحة.

Assani, A., R. Haicour, G. Wenzel, W. B. Foroughi, F. Bakry, F.X. Cote, G. Ducreux, A. Ambroise and A. Grapin. 2001. Influence of donor material and genotype on protoplast regeneration in banana and plantain cultivars *(Musa* spp.). Plant Sci., 162: 355-362.

Avihai P., D. Aviv and E. Galun. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield, plating efficiency and transient expression of an alien gene.Plant Cell Rep., 7:403-406.

Babaoglu, M. 2000. Protoplast isolation in Lupin *(Lupinus mutabilis*: sweet) and determination of optimum expplant sources and isolation conditions. Turk. J. Botanical, 24: 177-185.

Buiteveld, J. and J. Greemers-Molenaar. 1994. Plant regeneration from protoplast isolated from suspension culture of Leek (*Allium ampeloprasum* L.), Plant Sci., 100:203-210.

Chabane, D., A. Assani, N. Bouguedoura, R. Haicour and G. Ducreux. 2007. Induction of callus formation from difficile date palm protoplasts by means of nurse culture. Comptes Rendus Biol., 330: 392-401.

Chang, H. H. and M. T. Chan. 1991. Improvment of potato (*Solanum tuberosum* L.) transforma tion by Agrobacterium in presence of silver thiosulfate. Bot. Bull Acaemia sonica., 32:63-70.

Chi, G. C. and E. C. E Pua. 1989. Ethylene in hibitors enhanced denova shoot regeneration from cotyledons of *Brassica campestris Spp. chinensis* (*Chinese cabbage*) *In vitro* plant Sci. Lett., 64:243-50.

Ehsanpour, A. A. and M. G. K. Jones. 2001. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Delaware using silver thiosulfate (sts). J. Sci. I. R. Iran., 12:103-110.

Ferreira, D. I. and A. Zelcer. 1989. Advances in protoplast research on Solanum, Int. Rev. Cytol., 115:1-65.

Grun, P. and L. J. Chu.1978. Development of plants from protoplasts of *Solanum* (*Solanaceae*). Am. J. Bot., 65: 538-43.

Grezes, J., D. Thomas and B. Thomasset. 1994. Factors influencing protoplast isolation from Cofea Arabica cells. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 36: 9 1-97.

Hussey, G. and N. I. Stacey. 1981. *In vitro* propagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). Ann. of Bot., 48: 787-96.

Kao, K. N.and M. R. Michayluk. 1980. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of alfa. Z. pflanzenphysiol. 96:135-141.

Kikuto, Y., W. Saito and Y. Okazawa.1984. Protoplast culture of potato:changes in viability and initiation of cell division. pla.1:18-21.

Klimaszewska, K. 1989. Recovery of somatic embryos and plantlets from protoplasts cultures of larix ×*eurolepis*. Plant Cell Rep.8:440-444.

Levee, V., M. Bartand, M. Duval, P. Bilodeau, S. Aquin and L.P. Vezina. 2005. An efficient system for protoplast culture alfafa *(Medicago sativa)* suitable for plant transformation and regeneration http://www.medicago.com, July 16.

Liu, M. C. and W. Chen. 1978. Tissue and cell culture as aids to sugarcane breeding II. performance and yield of callus derived lines. Euphytica. 27:273-282.

Mollers C., S. Zhang and G. Wenzel. 1992. The Influence of silver tiosulfate on potato protoplast cultures. Plant Breeding, 108: 12-18.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physi., 15(1): 473-479.

Perl, A. D. Aviv and E. Galun. 1988. Ethylene and *in vitro* culture of potato: suppression of ethylene generation vastly improves protoplast yield. plating efficiency and transient expression of an alien gene. Plant Cell Rep.,7:403-406.

Pevalek, K. B. and S. Jelaska. 1987. Microclonal propagation of *Prunus avium*. Acta Hort. 212:599-601.

Preiszner, J., A. Feher, O. Veisz, J. Sutka and D. Dudits.1991. Characterization of morphological variation and cold resistance in interspecific somatic hybrids between potato (*Solanum tuberosum* L.) and S. brevidens Phil. Euphytica, 57:37–49.

Qin Chen, H. Y. Li, Y. Z. Shi, D. Beasley, B. Bizimungu, and M. S. Goettel. 2007. Development of an effective protoplast fusion system for production of new potatoes with disease and insect resistance using Mexican wild potato species as gene pools. Agr., 611-619.

Razdan, M. K. and E. C. Cocking. 1981. Improvement of legumes by exploring extra-specific genetic variation. Euphytica, 30:819-833.

Shillito, R. D., J. Paszkowski and I. Potrykus.1983. Agarose plating and bead type culture technique enable and stimulate development of protoplast – derived colonies in a number of species .plant cell Rep., 2:222-47.

Schenk, R. U., and A. C. Hildebrandt. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot., 50: 199-204.

Sidorov,V. A., M. K. Zubko, A. Kuchko, L. K. Komarnitsky and Yu. Gleba, 1987. Somatic hybridization in potato: use of gamma irradiated protoplast of *Solanum* pinnatisectym in genetic reconstruction. Theor Appl. Genet., 74:364-368.

Sondhal, M. R., M. S. Chapman and W. R. Sharp. 1980. Protoplast liberation, cell wall reconstitution and callus proliferation in *Cofea Arabica* L. callus tissue. Turrialba, 30:161-165.

Songstad, D. D., D. R. Duncan and J. M. Widholm. 1988. Effict of 1-aminocyclopropane–1- carboxylic acid, silver nitrate and norbornadiene on plant regeneration from maize callus cultures .plant cell Rep.,7:262-65.

Tavazza, R. and G. Ancora. 1986. Plant regeneration from mesophyll protoplast in commericale potato cultivars (*Primura, Kennebec, Spunta, Desiree*). plant cell Rep., 5:243-146.

Valkonen, J. P. T. and V. M. Rokka. 1998. Combination and expression of two virus resistance mechanisms in interspecific somatic hybrids of potato. Plant Sci., 131: 85–94.

Veen, H. 1987. Use of inhibitors of ethylene action. Acta Hort., 201: 213-22.

Zhu, L., B. C. Wang, J. Zhou, L. X. Chen, C. Y. Dai and C. R. Duan. 2005. Protoplast isolation of callus in Echinacea augustifolia. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 44: 1-5.

Received	**2012/04/03**	**إيداع البحث**
Accepted for Publ.	**2012/07/18**	**قبول البحث للنشر**