الكلية	العلوم
القسم	التقنيات الاحيائية
المادة باللغة الانجليزية	Plant tissue culture technique
المادة باللغة العربية	تقنية زراعة الانسجة النباتية
المرحلة الدراسية	الرابعة
اسم التدريسي	أنمار كامل مبارك
عنوان المحاضرة باللغة الانجليزية	Protoplast isolation and culture
عنوان المحاضرة باللغة العربية	فصل وزراعة البروتوبلاست
رقم المحاضرة	الخامسة
المصادر والمراجع	George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G.-J. (2008).** *Plant Propagation by Tissue Culture*. Springer https://uodiyala.edu.iq/uploads/PDF%20ELIBRARY%20UODIYALA/EL34/Plant%20Propagation%20by%20Tissue%20Culture%203rd%20Edition.pdf
	Pierik, R. L. M. (1997).** *In Vitro Culture of Higher Plants*. Springer
	Reed, B. M. (2008).** *Plant Tissue Culture: Techniques *and Experiments
	https://biot202.wordpress.com/wp-content/uploads/2015/09/plant-tissue-culture-third-edition-techniques-and-experiments-by-roberta-h-smith.pdf

فصل وزراعة البروتوبلاست Protoplast Isolation and Culture :

مقدمة عن فصل البروتوبلاست:

أن أول من فصل البروتوبلاست من أنسجة النباتات الراقية هو العالم Klercker عام 1892. أستعمل الطريقة الميكانيكية Mechanical Method في فصل البروتوبلاست من خلال استعمال سكين حاد لقطع الجدار الخلوي وتحرير البروتوبلاست والحصول على البروتوبلاست السليم وغير المتضرر من عملية القطع بالسكين الحاد. أن عزل البروتوبلاست بالطريقة الميكانيكية يمكن تطبيقه فقط على الأنسجة التي تحتوي على فجوات عصارية. وتعد هذه الطريقة غير مفضلة بالرغم من بساطتها لكون يتم من خلالها الحصول على عدد قليل من البروتوبلاست بسبب تضرر الكثير منه بعملية القطع بالسكين الحاد.
في عام 1960 تمكن بعض من العلماء عزل عدد كبير من البروتوبلاست من أنسجة النباتات الراقية باستعمال الطريقة الأنزيمية Enzymatic Method. كان يستعمل محلول من انزيم السيليليز Cellulase Enzyme الذي تم استخلاصه من زروعات الفطر *Myrothecium verrucaria* لغرض هضم وتحطيم جدران الخلايا وتحرير البروتوبلاست. وفي عام 1968 أحرز العالم Cocking تقدما كبيرا في هذا المجال وأصبحت انزيمات Cellulase and Macerozyme متاحة ومتيسرة على نطاق تجاري. أن أول من أستعمل الانزيمات في عزل البروتوبلاست على نطاق تجاري هو Takebe *et al.* (1968). بعد ذلك تم عزل البروتوبلاست من خلايا نسيج الورقة الوسطي Mesophyll Tissue من قبل العديد من الباحثين من خلال اضافة انزيمين بصورة متوالية على نسيج الميزوفيل. اذ تم اضافة انزيم Macerozyme أولا لقطع الأوراق لتحرير الخلايا بعضها عن البعض بصورة مفردة ثم يتم بعد ذلك اضافة انزيم Cellulase ليتم معالجة هضم وتحطيم جدران الخلايا وتحرير البروتوبلاست من الخلايا المفردة. أن Power and Cocking عام 1968 بينا أمكانية اضافة كلا الانزيمين معا في وقت واحد لغرض عزل البروتوبلاست من نسيج الميزوفيل وذلك على اعتبار هذه الطريقة أسرع من اضافتهما بصورة متتالية كما في طريقة الهضم بالانزيمات وكذلك لغرض تقليل فرص التلوث الميكروبي عن طريق تقليل خطوات طريقة العمل بالمقارنة مع الطريقة الميكانيكية. معظم العاملين بمجال عزل البروتوبلاست يستعملون الطريقة الانزيمية لوقتنا هذا وهي الطريقة المبسطة المتألفة من خطوة واحدة والتي تم بها الحصول على عدد كبير من البروتوبلاست من نسيج الميزوفيل لنبات التبغ والعديد من

الأنسجة لنباتات اخرى. لقد ساهمت الطريقة الانزيمية المستعملة في عزل البروتوبلاست مساهمة فعالة في العديد من الانسجة النباتية المختلفة مثل البروتوبلاست الذي تم عزله من نسيج ميزوفيل النبيتات النامية خارج وداخل الجسم الحي *In vitro* and *In vivo* cultures ومن الشتلات المعقمة الخالية من التلوث الميكروبي وخلايا الام المولدة Microspore mother cells وكالس حبوب اللقاح والزروعات المعلقة الجنينية وغير الجنينية التي تم الحصول عليها من الكميتات الذكرية والأنثوية.

TABLE 12.1

Some commonly used commercially available enzymes for protoplast isolation

Enzyme	Source	Supplier
Cellulases		
Onozuka RS	*Trichoderma viride*	Yakult Honsha, Japan
Cellulase R-10	*T. viride*	Yakult Honsha, Japan
Cellulysine	*T. viride*	Calbiochem, USA
Driselase	*Irpex lactes*	Kyowa Hakko Kogyo, Japan
Meicelase-P	*T. viride*	Meiji Seik Kaisha, Japan
Hemicellulase		
Hemicellulase	*Aspergillus niger*	Sigma, USA
Rhozyme HP-150	*Aspergillus niger*	Rohm and Hass, USA
Zymolyase	*Arthrobacter luteus*	Sigma, USA
Pectinase		
Macerozyme R-10	*Rhizopus* sp.	Yakult Honsha, Japan
Macerase	*Rhizopus* sp.	Calbiochem., USA
Pectinase (purified)	*A. niger*	Sigma, USA
Pectolyase Y23	*A. japonicus*	Seishin Pharmaceutical, Japan
Pectinol	*A. niger*	Rohm and Hass, USA

العوامل التي تؤثر على انتاج وحيوية البروتوبلاست:

1. مصدر النسيج النباتي: تعد الورقة افضل نسيج نباتي للحصول على عدد كبير من البروتوبلاست دون الحاجة الى قتل النبات وكذلك طبيعة ترتيب الخلايا في نسيج الميزوفيل تسهل من عملية عزل البروتوبلاست فضلا عن سهولة وصول الانزيمات الهاضمة الى جدران الخلايا ليتم عزل البروتوبلاست. كما أن لعمر الورقة والظروف الخارجية الي نمت فيها تأثير بعملية عزل البروتوبلاست من الاوراق. ولغرض السيطرة على تلك الظروف تم اخذ نسيج الميزوفيل من أفرع خضرية تم تنميتها خارج الجسم الحي *In vitro* shoots كما ان هذه الاوراق لا تحتاج الى اجراء تعقيم سطحي لها Surface sterilants. كما تعتمد عملية الحصول على عدد كبير من

البروتوبلاست على معدل ومرحلة نمو الخلايا ويتم ذلك عندما تجرى الزراعة الثانوية Subculture كل 3–7 ايام بطريقة الزراعة المعلقة Suspension culture. وتعد طريقة زراعة البروتوبلاست الافضل في تكوين الاجنة الجسمية Somatic embryos بطريقة الزراعة المعلقة.

TABLE 12.2

Optimal conditions for the isolation of protoplasts from cultured cells of tobacco[a]

Parameter	Optimum condition
Plant material	4–5-day-old subculture
Cellulase	1% Onozuka R-10
Macerozyme	0.1–0.2% Onozuka R-10
pH of enzyme solution	4.7–5.7
Volume of enzyme solution/fresh weight of tissue	10 ml g^{-1}
Incubation period	2–3 h
Incubation temperature	22–37°C
Rate of agitation	50 rev. min^{-1}
Osmoticum	300–800 mmol l^{-1} mannitol

[a]After Uchimiya and Murashige (1974).

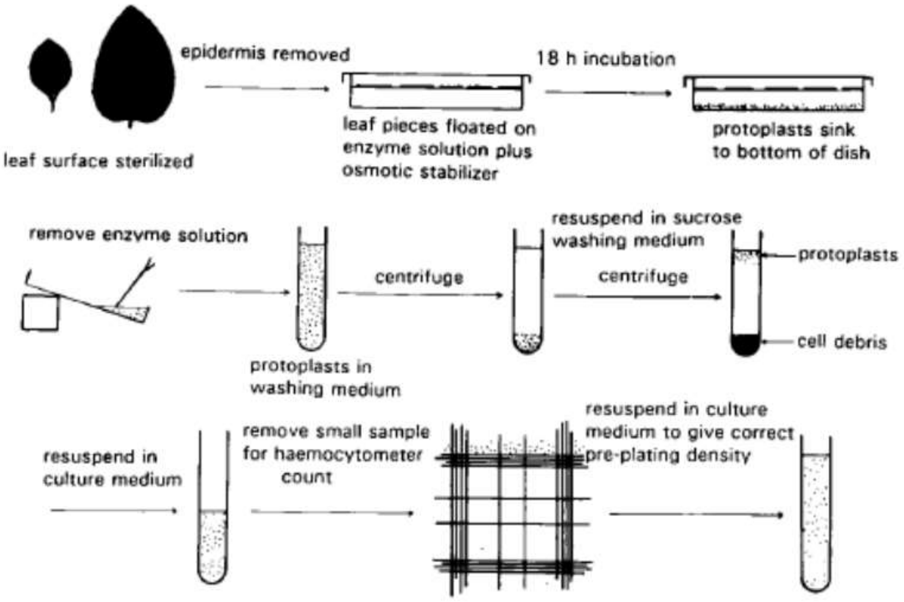

Fig. 12.1. Flow diagram for the isolation of mesophyll protoplasts (courtesy of E.C. Cocking, UK).

2. المعاملة ما قبل اضافة الانزيم Pre-enzyme treatment : وهي عملية ازالة طبقة البشرة السفلى من نصل الورقة ليلامس المحلول الانزيمي خلايا الميزوفيل لتسهيل تغلغل المحلول الانزيمي عبر المسافات البينية بين الخلايا Intercellular spaces of leaf اما اذا كان ذلك غير ممكن فيمكن تقطيع الورقة الى شرائح صغيرة بعرض 1-2 ملم. ويتم ازالة طبقة البشرة من خلال فرشاة ناعمة مع نصل حاد للمشرط لكي تسهل عملية تغلغل الانزيمات الهاضمة أو من خلال استعمال انزيم Cutinase لازالة طبقة البشرة.
3. المعاملة بالانزيمات Enzyme treatment: يعتمد عزل وتحرير البروتوبلاست من أنسجة ميزوفيل الورقة على طبيعة وتركيز الانزيمات المستعملة. يعد انزيمي Cellulase and Pectinase ضروريان لعزل البروتوبلاست من الخلايا النباتية. اذ ان انزيم Cellulase يعمل على تحطيم جدران الخلايا وانزيم Pectinase يعمل على تحلل طبقة الصفيحة الوسطى التي تربط الخلايا مع بعضها البعض. وهناك انزيمات عديدة باسماء تجارية تستعمل لهذا الغرض منها التي هي من أصل فطري مثل Onozuka cellulose SS وانزيم Onozuka macerozyme SS ولها اسماء تجارية مختلفة مثل Driselase ويضم Cellulase و Pectinase و Laminarinase و Xylanase والتي أثبتت كفاءتها في تحسين عزل البروتوبلاست من أنسجة النبات (Kao *et al*., 1974). كما استعملت الانزيمات النقية في هذا الخصوص مثل Cellulase R-10 والبكتينيز Pectinase (Okono and Furusawa, 1977; Slabas *et al*., 1979). وانزيم Pectolyase Y-23 الذي يعمل بكفاءة عالية مع انزيم Cellulase على عزل البروتوبلاست من نسيج ميزوفيل ورقة البازلاء خلال مدة 30 دقيقة (Nagata and Ishii, 1979) . بعض الأنسجة النباتية قد تتطلب اضافة انزيم اخر مثل Hemicellulase مع انزيمي Cellulase و Macerozyme. أذ أن عند اضافة انزيم Cellulase الى خلايا الاليرون Aleurone cells في الشعير لا يتم هضم الجدار الخلوي بشكل كامل اذ يبقى منه طبقة رقيقة وتسمى الخلية التي هضم جدارها بهذه الطريقة بـ Spheroplast لذلك يجب ان تعامل بانزيم Glusulase الذي يعمل على هضم ما تبقى من الجدار الخلوي (Taiz and Jones, 1971). أن الانزيمات التجارية الخام (غير النقية) The crude commercial enzymes مثل Nucleases و Proteases قد تسبب احيانا ضرر في البروتوبلاست الذي يؤدي الى ضعف حيويته لذلك يفضل استعمال الانزيمات النقية التي يتم

تنقيتها بواسطة Biogel او Sephadex G-25 (Constabel, 1982). في حين لاحظ الباحثان Arnold and Eriksson (1976) أن الانزيمات النقية قللت من حيوية البروتوبلاست بالمقارنة مع الانزيمات الخام التي اعطت عدد كبير من البروتوبلاست الاكثر حيوية.

يعتمد نشاط الانزيمات في عزل البروتوبلاست على درجة الحموضة. اذ ان درجة الحموضة المثلى الملائمة لنشاط انزيمي Onozuka cellulose R-10 و Macerozye R-10 كما موضح من قبل الشركة المصنعة هي 5-6 و 4-5 بالتتابع. من الجانب العملي يجب ان يكون pH المحلول الانزيمي يتراوح بين 4.7-6.0. أن درجة الحرارة المثلى لنشاط الانزيمات هي 40-50 مئوي والتي تعد درجة حرارة مرتفعة بالنسبة لخلايا النبات. عموما وجد ان درجة الحرارة 25-30 مئوي هي كافية لعزل البروتوبلاست بالطريقة الانزيمية. أن مدة المعاملة الانزيمية تتطلب 30 دقيقة وهي لكافية لعزل البروتوبلاست (Nagata and Ishii, 1979). كما ان نسبة حجم المحلول الانزيمي الى وزن النسيج النباتي الموضوع فيه يؤثر انتاجية البروتوبلاست وعزله. اذ ان 10 مل من المحلول الانزيمي لكل ا غرام من وزن النسيج النباتي يعطي نتائج مرضية. أن البروتوبلاست المتضرر من التحلل الانزيمي يسبب تحرير انزيمات Hydrolytic enzymes الذي يؤثر على حيوية البروتوبلاست السليم. وللتغلب على هذه المشكلة تم اضافة Potassium dextran sulphate (5% w/v) الى المحلول الانزيمي (Ochatt and Power, 1992). كما تم اضافة مضادات الاكسدة Antioxidant الى المحلول الانزيمي مثل مادة PVP 10 بمعدل 10000 وزن جزيئي الذي حسن من عزل عدد كبير من البروتوبلاست ذات الحيوية العالية في بعض انواع أشجار الفاكهة المتساقطة الاوراق (Revilla *et al.*, 1987).

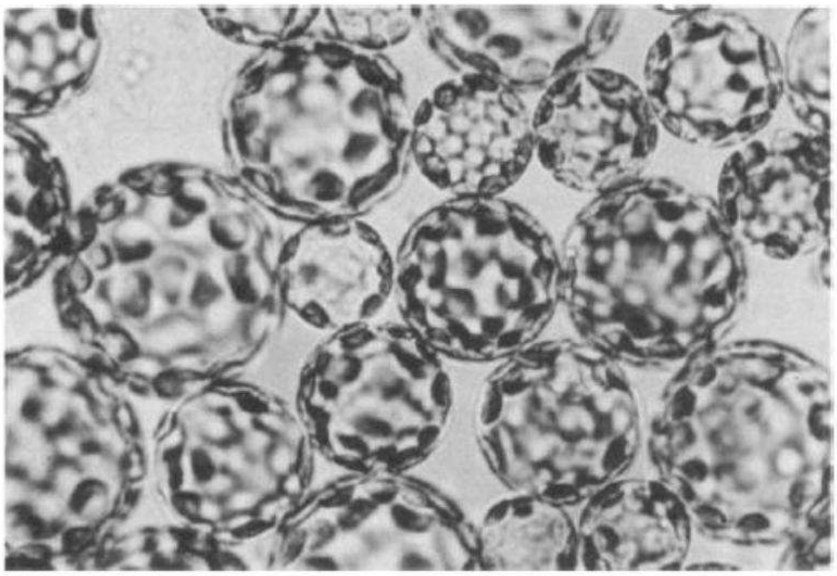

Fig. 12.2. Freshly isolated mesophyll protoplasts (courtesy of J.B. Power, UK).

4. الازموزية Osmoticum: أن الاستقرار الازموزي في المحلول الانزيمي هو يؤدي الى انتاج بروتوبلاست سليم ومعافى يأخذ شكلا كرويا طبيعيا. الازموزية العالية قد تمنع من انقسام البروتوبلاست المنتج عند زراعته لاحقا. وعند عدم الاستقرار الازموزي يجب اضافة مواد تستعمل لضبط الضغط الازموزي في المحلول الانزيمي المستعمل لعزل البروتوبلاست ومن المواد الاكثر تنظيما للازموزية هي Sorbitol و Mannitol والذي يضاف بمعدل 450–800 ميليمول. لاحظ كل من Uchimiya and Murashige عام 1974 أن بعض الذائبات مثل الكاربوهيدرات القابلة للذوبان التي تتمثل بالكلوكوز والفركتوز والجالكتوز والسوربيتول والمانيتول كانت اكثر تأثيرا في التنظيم الازموزي للبروتوبلاست. كما يمكن استعمال بعض الاملاح في التنظيم الازموزي مثل كلوريد الكالسيوم $CaCl_2$ 50–100 ميليمول/لتر والذي حسن من استقرار الغشاء البلازمي Plasma membrane. كما وجد Meyer (1974) و Bohnke and Kohlenbach (1978) ان المنظم ازموزي مثل KCl بتركيز 335 ميليمول و $MgSO_4.7H_2O$ بتركيز 40 ميليمول قد حسن من حيوية وانتاجية البروتوبلاست المعزول.

تنقية البروتوبلاست Protoplast purification:

بعد حضن القطع الورقية في المحلول الانزيمي لمدة كافية من الزمن تم اخراج البروتوبلاست بعناية من القطع الورقية وتحريرها. بعد عزل البروتوبلاست الصحي والسليم يبقى الخليط الانزيمي مع بقايا الجدار الخلوي وخلايا النسيج الوعائي والكلوروبلاست والخلايا غير المتضررة والبروتوبلاست المتضرر وذلك من خلال ترشيحها عن الملوثات والانسجة التالفة بواسطة غربال معدني او بلاستيكي قطر فتحاته تتراوح قطر فتحاته 30−100 مايكروميتر. ولزيادة تنقية البروتوبلاست تكرر مرتين على التوالي. بعد ذلك يتم ترسيب البروتوبلاست بواسطة جهاز الطرد المركزي بواقع 100 xg لمدة 5 دقائق. بعد ذلك يتم عمل معلق من البروتوبلاست ومحلول الغسل لغرض غسلها 3 مرات بعد ذلك توضع في جهاز الطرد المركزي على 50xg ولمدة 3 دقائق. ويتم ذلك من خلال وضع معلق البروتوبلاست والمحلول الانزيمي مع اضافة السكروز بتركيز 21% في جهاز المركزي على 100xg لمدة 10 دقائق. تظهر حزمة من البروتوبلاست النقي بين المحلول المعلق ومحلول السكروز 21% بينما يترسب البروتوبلاست المحطم في قاعدة الانبوب الزجاجي ويتم عزل البروتوبلاست النقي بواسطة ماصة بحذر شديد وتوضع في انبوبة طرد مركزي اخرى. تكرر العملية السابقة مرة اخرى لغرض تنقية البروتوبلاست. بعد ذلك يتم غسل البروتوبلاست المعزول لمدة 3 مرات. بعد ذلك تزرع البروتوبلاست بوسط زراعة معلق وبكثافة مناسبة.

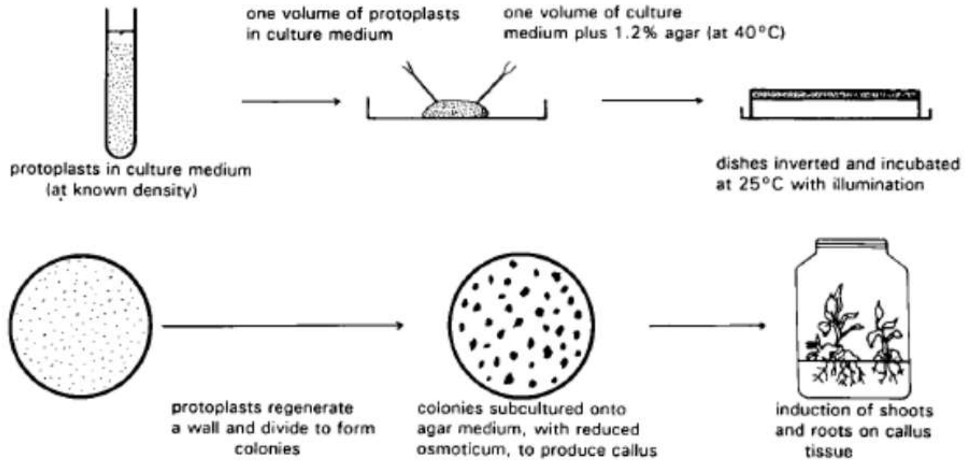

Fig. 12.3. Flow diagram for the culture of protoplasts (courtesy of E.C. Cocking, UK).

حيوية البروتوبلاست Protoplast Viability:

طرق قياس واختبار حيوية البروتوبلاست:

1. طريقة اختبار الدوران السايتوبلازمي Cytoplasmic Streaming وتعتمد على نشاط الميتابولزم Active metabolism. وهذه الطريقة غير ملائمة لانسجة الميزوفيل وذلك لاحتوائها على عدد كبير من البلاستيدات الخضر.
2. قياس الاوكسجين المستهلك Oxygen uptake ويعد مقياس للايض التنفسي Respiratory metabolism .
3. فعالية البناء الضوئي Photosynthetic activity.
4. صبغة Evan الزرقاء للاغشية السليمة Evan's blue dye by intact membranes.
5. صبغة Fluroescein di acetate وتعد هذه الطريقة هي الاكثر استعمالا في اختبار حيوية البروتوبلاست.

زراعة البروتوبلاست Protoplast Culture:

طرق زراعة البروتوبلاست المعزول هي تشبه طرق زراعة الخلايا المفردة. اذ يزرع البروتوبلاست على اوساط شبه صلبه. لكي يستقر البروتوبلاست في الوسط لكي ينتج منه نبيتات. لكن يفضل الزراعة في اوساط غذائية سائلة للاسباب التالية:

1. ان بعض بروتوبلاست بعض انواع من النباتات لا ينقسم الى خلايا جديدة اذا كان الوسط شبه صلب.
2. يمكن تخفيض الضغط الازموزي للوسط الغذائي السائل بعد ايام قليلة من الزراعة.
3. امكانية وسهولة تغيير الوسط الغذائي السائل نتيجة لافرازات البروتوبلاست السامة التي قد تؤدي الى قتل الخلايا السليمة.
4. يمكن تقليل كثافة الزراعة في الوسط الغذائي السائل بعد مدة زمنية وذلك بعزل خلايا الزروعات الكثيفة.

في الاوساط السائلة يتم زراعة البروتوبلاست بطرق مختلفة منها:

1. الزراعة المعلقة على شكل طبقة رقيقة في أطباق بتري.
2. الزراعة في فلاسك حجم 50–100 مل يوضع فيه معلق من البروتوبلاست بحجم 5 مل.
3. الزراعة في أطباق بتري توضع في كل طبق 50–100 قطرة من المعلق وتوضع في حاضنة مجهزة برطوبة عالية Humidified Chamber.

تكوين الجدار الخلوي Cell Wall Formation:

بعد 2–4 ايام من الزراعة يفقد البروتوبلاست شكله الكروي نتيجة لتكوين جدار الخلية. سرعة تكون الجدار الخلوي تختلف باختلاف نوع النبات ودرجة تمايز الخلايا التي عزل منها البروتوبلاست. اغلب نباتات العائلة الباذنجانية والصليبية تكون بروتوبلاست خلاياها والكالس والميزوفيل سريعة في تكوين جدار الخلية (24–40 ساعة). وبروتوبلاست محاصيل الحبوب وبروتوبلاست ميزوفيل العائلة البقولية يتكون جدارها الخلوي بعد اربعة ايام من الزراعة. بينما يتأخر تكوين جدار الخلايا في بروتوبلاست النباتات الخشبية الى 7 أيام من الزراعة.

انقسام الخلايا وتكوين الكالس Cell division and callus formation:

عندما يتكون الجدار الخلوي على البروتوبلاست تكون الخلايا مستعدة للانقسام. فقد يكون نسبة البروتوبلاست الذي يكون جدران خلوية من 0.1 – 80 %. يبدأ الانقسام الخلوي بعد 2–7 ايام في أغلب الزروعات ونادرا ما يتأخر الى 7–25 يوما. يستمر عادة الانقسام الخلوي السريع للزروعات حوالي 2–3 اسابيع. بعد ذلك يمكن نقل المستعمرات الخلوية المتكونة الى وسط غذائي أخر وتعد كانسجة نباتية جاهزة للاكثار الدقيق.

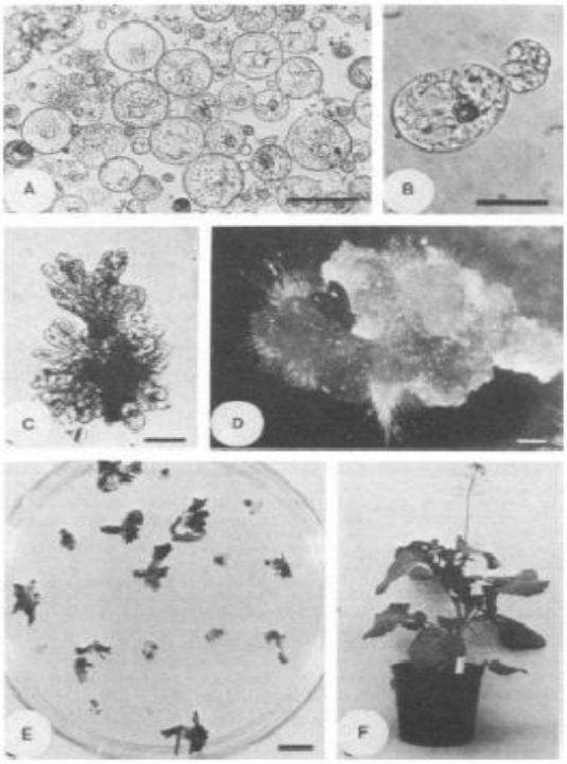

Fig. 12.4. Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of *Brassica napus*. (A) Freshly isolated protoplasts of different sizes. (B) One-day-old protoplasts; both the protoplasts have regenerated wall but only the small one has divided. (C) Callus obtained from the protoplasts after 14 days of

هناك عوامل تؤثر على الانقسام الخلوي هي:

1. مكونات الوسط الغذائي Medium components: يعد الوسط الغذائي الاكثر استعمالا هو وسط MS والوسط B5 . والوسط المحور من قبل Kao et al.(1973) والمكون من اضافة واحد مليمول/لتر من $ClCa_2$ الى الوسط B5 والذي حسن من النسبة المئوية للانقسام الخلوي. بينما عندما اضيف 20 مليمول/لتر من NH_4NO_3 الى ذلك الوسط ادى الى تقليل الانقسام الخلوي لزروعات البروتوبلاست. اذ اثبتت الزراعة ان ايونات الامونيوم تعد ضارة لعملية الانقسام الخلوي. لذلك ينصح بتقليل تركيز نترات الامونيوم الى تراكيز قليلة بحيث لاتؤثر على عملية الانقسام الخلوي لزروعات البروتوبلاست. كذلك الفيتامينات والاحماض الامينية لها اهمية في تحفيز وتشجيع الانقسام الخلوي كذلك يمكن اضافة حليب جوز الهند والكازين هيدرولايسيت الى الوسط الغذائي. فضلا عن ذلك ان اضافة منظمات النمو النباتية وخاصة الاوكسينات والسايتوكاينينات لها اهمية كبيرة في حدوث الانقسام الخلوي وتشجيعه عند اضافتها الى الوسط

الغذائي. كما يمكن اضافة مضادات الاكسدة او الكلايسين او PVP-10 لتحسين الانقسام الخلوي ومنع حدوث التلون البني Browning نتيجة لتأكسد المواد الفينولية. وهناك مضادات اكسدة اخرى مثل n-Propyl-gallate (n-PG) ضروري اضافته لتشجيع الانقسام وتوالد الافرع Shoot regeneration. اما عند اضافة خليط من مضادات الاكسدة (Glutathione, Glutathione peroxidase and Phospholipase) ادى ذلك الى زيادة نمو وانقسام الكالس النامي من زروعات البروتوبلاست.

كما ان اضاف 2% من مادة Ficoll الى الوسط الغذائي ادت الى تضاعف سرعة الانقسام الخلوي للبروتوبلاست عند المقارنة للوسط الغذائي بدون اضافة تلك المادة.

2. الازموزية Osmoticum : يتطلب تنظيم ازموزي لوسط الزراعة لحماية البروتوبلاست من الضرر والتلف لذلك يضاف منظم ازموزي مثل المانيتول Mannitol او السوربيتول Sorbitol بتركيز 500-600 مليمول/لتر. كما استعمل السكروز كمنظم ازموزي لبروتوبلاست البطاطا والبطاطا الحلوة والكسافا. كما اثبتت الدراسات ان منظمات الازموزية الايونية ادت الى فشل حدوث الانقسام الطبيعي للبروتوبلاست لذلك يجب تجنبها. بعد 7-10 ايام من الانقسام الخلوي يجب نقل الزروعات الى اوساط غذائية جديدة خالية من المنظم الازموزي لان بقاءها لفترة طويلة يؤثر على استمرارية الانقسام الخلوي للزروعات النسيجية ويسبب توقفها.
3. كثافة الزراعة Density of culture: لها تأثير على الانقسام الخلوي. لذا تزرع البروتوبلاست بكثافة $1x\ 10^4$ الى $1x\ 10^5$ بروتوبلاست/مل من الوسط الغذائي. لان الكثافة العالية من الزراعة تسبب الاندماج بين البروتوبلاست وبالتالي تتغير الصفات الوراثية أوحدوث التباينات الوراثية. يفضل زراعة البروتوبلاست بكثافة منخفضة 100-500 بروتوبلاست/مل وذلك لتجنب حدوث تغايرات وراثية بسبب الاندماج البروتوبلاستي.
4. المعاملة الفيزيائية Physical treatment: المعاملة بالتيار الكهربائي 250-2000 فولت لمدة 10 ثواني له دور في تشجيع الانقسام الخلوي للبروتوبلاست. كذلك الصعقة الحرارية لها دور في تشجيع الانقسام الخلوي للبروتوبلاست كما في نبات الرز اذ يتم صعقها حراريا على درجة 45 مئوي ولمدة 5 دقائق.

5. ظروف حضن البروتوبلاست: يجب حضن البروتوبلاست في الظلام او بعيدا عن الضوء لمدة 5-7 ايام في بداية الحضن لتشجيع البروتوبلاست على الانقسام الخلوي. كما تحضن على درجة حرارة 25-30 مئوي على اعتبارها درجة حرارة مثلى لحدوث الانقسام الخلوي.

6. مصدر النسيج النباتي Plant material: ان الحالة الفسيولوجية للنسيج النباتي ونوع الجزء النباتي ونوع النبات له دور مهم في الانقسام الخلوي.

TABLE 12.3

A medium for culturing protoplasts at low density[a,b]

Constituents	Amount (mg l^{-1})	Constituents	Amount (mg l^{-1})
Mineral salts			
NH_4NO_3	600	KI	0.75
KNO_3	1900	H_3BO_3	3.00
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	600	$MnSO_4 \cdot H_2O$	10.00
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	300	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	2.00
KH_2PO_4	170	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.25
KCl	300	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.025
Sequestrene 330 Fe[c]	28	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.025
Sugars			
Glucose	68400	Mannose	125
Sucrose	125	Rhamnose	125
Fructose	125	Cellobiose	125
Ribose	125	Sorbitol	125
Xylose	125	Mannitol	125
Organic acids (adjusted to pH 5.5 with NH_4OH)			
Sodium pyruvate	5	Malic acid	10
Citric acid	10	Fumaric acid	10
Vitamins			
Inositol	100	Biotin	0.005
Nicotinamide	1	Choline chloride	0.5
Pyridoxine·HCl	1	Riboflavin	0.1
Thiamine·HCl	10	Ascorbic acid	1
D-Calcium pantothenate	0.5	Vitamin A	0.005
Folic acid	0.2	Vitamin D_3	0.005
p-Aminobenzoic acid	0.01	Vitamin B_{12}	0.01
Hormones	Soybean × barley	Soybean × pea or *N. glauca*	
2,4-D	1	0.2	
Zeatin	0.1	0.5	
NAA	–	1	
Vitamin-free casamino acid[d]	125 mg l^{-1}		
Coconut water (from mature fruits; heated to 60°C for 30 min and filtered)	10 ml l^{-1}		