الطفرات فى الصفات المرغوب فيها، ومدى سهولة تقييم هذه الصفات. ومن الطبيعى أن عدد البذور التى تجب معاملتها يزيد عند نقص حيوية البذور المعاملة بدرجة كبيرة، وعندما يقل معدل حدوث الطفرات فى الصفات المرغوبة.

٥ – تحديد طريقة التلقيح المناسبة لإنتاج بذور الجيل الطفرى الثانى:

بينما تترك نباتات الجيل الأول من النباتات الذاتية التلقيح على طبيعتها لإنتاج بذور الجيل الطفرى الثانى، فإن النباتات الخلطية التلقيح إما أن تلقح ذاتيًا يدويًا، وإما أن تترك للتلقيح الخلطى فيما بينها، ولكن يلزم فى هذه الحالة تأمين مسافة عزل كافية بين حقل نباتات الجيل الطفرى الأول، وأية حقول أخرى من النوع نفسه؛ لمنع التلقيح الخلطى الخارجى.

برنامج التربية بالطفرات

الحجم المناسب للعشيرة فى كل من الجيلين الطفريين الأول والثانى

يلزم لأجل تأمين الحصول على النوع المرغوب فيه من الطفرات ألاّ تقل عشيرة الـ M_1 عن حجم معين، علمًا بأن زيادة عدد النباتات فى الـ M_2 لا يعوض النقص الحادث فى الـ M_1. ويتوقف الحجم الأمثل لعشيرة الـ M_1 على طبيعة وراثة الجين أو الجينات المسئولة عن الصفات المرغوب فيها، ومعدل حدوث الطفرات. فمثلاً .. يلزم لتأمين ظهور الطفرات المرغوب فيها عددًا أكبر من نباتات الـ M_1، عندما يتحكم فى الصفة المطلوبة زوجان أو ثلاثة أزواج من الجينات، عما يكون عليه الحال عندما تكون الصفة بسيطة ويتحكم فيها زوج واحد من الجينات. وبالمقارنة .. عندما تكون الصفة كمية ويتحكم فيها عديد من الجينات – حيث يكون المطلوب هو زيادة الاختلافات الوراثية – فإن عشيرة الـ M_1 يمكن أن تكون أصغر حجمًا لأن عدد المواقع التى يمكن أن يحدث عند أى منها تغير وراثى فعال يكون كبيرًا.

وقد اقترحت معادلة لتقدير عدد عائلات الـ M_2 التى يلزم تقييمها لتأمين عزل الطفرات المرغوب فيها، التى تظهر بمعدلات مختلفة، وهى كما يلى:

$$n = \log (1-P_t)/\log (1-\mu)$$

حيث إن:

n = عدد عائـلات الـ M_2.

μ = معدل حدوث الطفرة.

P_1 = احتمال ظهور طفرة واحدة على الأقل.

ويبين جدول (١٠-٢) أعداد عائلات الـ M_2 التى يتعين فحصها فى حالات مختلفة لكل من μ، و P_1.

جدول (١٠-٢): عدد عائلات الـ M_2 التى يتعين فحصها عند اختلاف كل من معدل حـــدوث الطفرة واحتمالات حدوثها.

معدل حدوث الطفرة (μ)	عدد عائلات الـ M_2 (n)		أنواع الطفرات
	P_1 = ٠,٩٠	P_1 = ٠,٩٩	
١×١٠^{-٢}	٢٣٣	٤٦٥	التغيرات الكروموسومية والاختلافـات الكمية
١×١٠^{-٣}	٢٣٢٦	٤٦٥٢	عديد من الجينات المتنحية
١×١٠^{-٤}	٢٣٢٦٠	٤٦٥٢٠	جين واحد متنح
١×١٠^{-٥}	٢٣٢٦٠٠	٤٦٥٢٠٠	جين واحد سائد

ويحسب عدد نباتات الـ M_2 لكل عائلة M_2 بالمعادلة التالية:

$$m = \log (1-P_2)/\log (1-a)$$

حيث إن:

m = عدد نباتات الـ M_2/عائلة.

a = نسبة انعزال الطفرة.

P_2 = احتمال ظهور طفرة واحدة أصيلة على الأقل.

هذا .. علمًا بأن نسبة انعزال طفرة بسيطة متنحية فى الـــ M_2 هى $^1/_4$ عنـد معاملـة جاميطة أحادية (حبة لقاح) بالعامل المطفر. أما عنـد معاملـة البـذور فـإن نسـبة انعـزال الطفرة تختلف عن ذلك نظرًا لأن أكثر من خلية بالجنين المعامل تسهم فى إنتاج الجيـل التالى.

ويبين جدول (١٠-٣) أحجام عائلات الـ M_2 التى يتعين تقييمها فى حالات الانعزال المختلفة.

جدول (١٠-٣): أحجام عائلات الـ M2 لحالات الانعزال المختلفة ومستويات احتمال ظهور الطفرات الأصيلة.

نسبة الانعزال (a)	حجم عائلة الـ M_2 (m)	
	$P_2 = ٠,٩$	$P_2 = ٠,٩٩$
$^{١}/_{٤}$	٨,٠	١٦,٠
$^{١}/_{٨}$	١٧,٢	٣٤,٥
$^{١}/_{١٢}$	٢٦,٣	٥٢,٦
$^{١}/_{١٦}$	٣٥,٧	٧١,٤
$^{١}/_{٢٠}$	٤٥,٥	٩١,٠

ويمكن بالاستعانة بالمعادلتين السابقتين لكل من n، و m حساب حجم عشيرة الـ M_2 التى تلزم لعزل طفرة من نوع معين بدرجة معينة من الاحتمال. فمثلاً .. عندما تكون الطفرة بسيطة متنحية ومعدل حدوثها ١×١٠^{-٣} فإن عشيرة الـ M_2 التى يلزم فحصها تكون حوالى ٥٠٠٠٠ نبات، وإذا كان معدل حدوث تلك الطفرة ١×١٠^{-٥} فإن عشيرة الـ M_2 تصبح ٥ مليون نبات. وعلى الرغم من أن متطلبات زراعة وفحص تلك الأعداد الكبيرة من النباتات تؤدى إلى اكتفاء المربى بعدد أقل بكثير من ذلك، فإنه لا بديل من زراعة العدد المقدر بالمعادلات لتأمين ظهور الطفرات المرغوب فيها بدرجات الاحتمال المقبولة (عن Chopra ٢٠٠٠).

تداول أجيال التربية

يعطى الجيل الأول الذى ينتج من زراعة بذور سبقت معاملتها أو معاملة حبوب اللقاح التى استخدمت فى إنتاجها الرمز M_1 (نسبة إلى كلمة mutation أى طفرة)، وتعطى الأجيال التالية الرموز M_2، و M_3 ... إلخ، كما يفضل البعض استعمال الرموز: R_1، و R_2، و R_3 ... إلخ (نسبة إلى كلمة radiation أى إشعاع). وقد تستعمل الرموز X_1، و X_2، و X_3 ... إلخ عند استعمال أشعة إكس فى إحداث الطفرات، كما تستخدم

الرموز نفسها كذلك فى حالات معاملة الأجزاء الخضرية، مع الإكثار الخضرى للنباتات الناتجة، رغم أن نباتات الـ M_2 أو الـ M_3 لا تختلف وراثيًا – فى حالات الإكثار الخضرى – عن نباتات الـ M_1.

تزرع البذور أو الأجزاء النباتية المعاملة بالعامل المطفر فى الحقل مباشرة.

وبالنسبة للبذور التى تكون محتوية بالفعل على عديد من مبادئ القمم النامية primordia وقت المعاملة – كما فى القمح والشعير – فإنه يوصى بزراعتها بكثافة عالية للحد من تكوين الخلفات؛ لأن معدل حدوث الطفرات يكون أعلى فى النمو الرئيسى عما فى النموات التى تكوّن الخلفات.

وفى الدراسات التى يكون الهدف منها التعرف على معدل حدوث الطفرات، فإن الجيرمبلازم المستعمل يجب أن يكون على درجة عالية من النقاوة الوراثية.

ومن الأهمية بمكان التحكم فى التلقيح فى نباتات الـ M_1 لمنع حدوث التلقيحات الخلطية. وتشكل النباتات وحيدة الجنس وحيدة المسكن – مثل الذرة والخيار – حالات خاصة نظرًا لأن النورات أو الأزهار المذكرة والمؤنثة تظهر بالتتابع وتتكون من أنسجة مختلفة؛ ولذا .. فإنها قد لا تشترك فى نفس الطفرات، وحتى إذا ما لقحت ذاتيًا فإنها سوف تعطى تراكيب وراثية خليطة. وقد اقترح لمثل تلك الحالات ترك نباتات الـ M_1 للتلقيح فيما بينها وإجراء التلقيح الذاتى على نباتات الـ M_2، ثم رصد الطفرات فى الـ M_3.

تحصد نباتات الـ M_1 منفردة، وعند وجود خلفات – كما فى القمح والشعير – تحصد كل خلفة مستقلة ويسجل تتابع ظهورها؛ لأجل مقارنة معدل حدوث الطفرات فى مختلف الخلفات حسب تدرج ظهورها. أما فى حالة النباتات وحيدة الجنس وحيدة المسكن فإن نباتات الـ M_1 تحصد جميعها معًا (عن Chopra ٢٠٠٠).

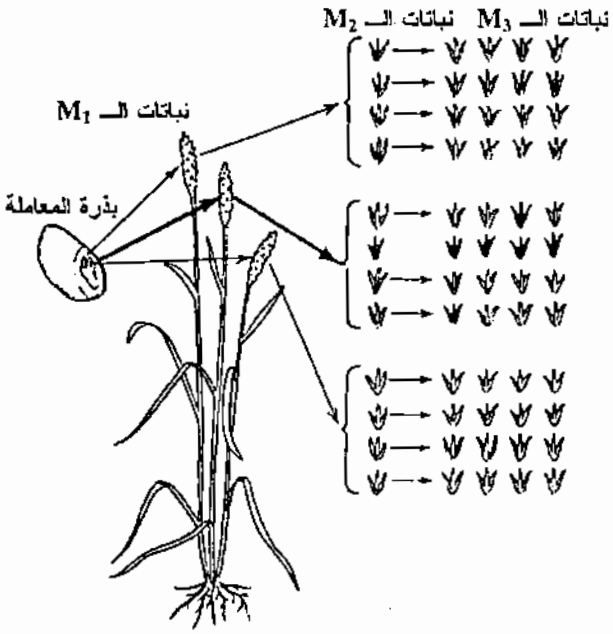
نادرًا ما تظهر أية طفرات على نباتات الجيل الطفرى الأول (M1)؛ لأن معظم الطفرات تكون متنحية، بينما تظهر على نباتات هذا الجيل التغيرات الفسولوجية التى لا تورث (ويراعى – مع ذلك – انتخاب نباتات الجيل الطفرى الأول التى يشتبه فى أن بها طفرات). تلقح جميع نباتات الـ M_1 ذاتيًا، أو يجرى التلقيح فيما بينها فى حالات العقم أو عدم التوافق الذاتى.

وأيًّا كانت الطريقة التى اتبعت فى المعاملة بالعامل المطفر .. فإنه لا بد من زراعة نباتات غير معاملة من نفس الصنف للمقارنة؛ لأن تلك هى الوسيلة الوحيدة الممكنة للتمييز بين الطفرات الحقيقية والاختلافات الوراثية الطبيعية، التى قد توجد فى الصنف، وتستمر زراعة نباتات المقارنة فى الأجيال الطفرية التالية كذلك.

يبدأ الانتخاب فى الجيل الثانى M_2؛ لأن ذلك هو الجيل الذى تنعزل فيه الطفرات المتنحية بحالة أصيلة فى حالة التكاثر الجنسى، ولأنه يكون الجيل الذى يختفى فيه التأثير الفسيولوجى للمعاملة بالعوامل المطفرة أيًّا كانت طريقة تكاثر المحصول. وتزرع نباتات الجيل الطفرى الثانى على مسافات واسعة، حتى يمكن دراسة كل منها على انفراد، مع زراعة نحو ١٠-١٢ نباتًا من كل نسل فى خط مستقل. ويكفى هذا العدد للعثور على نبات واحد - على الأقل - أصيل متنح فى الطفرة. لكن نظرًا لأن نسبة بسيطة للغاية من نباتات الجيل الطفرى الأول هى التى تحدث بها الطفرات؛ لذا .. تجب زراعة عدة آلاف من الأنسال فى الجيل الطفرى الثانى؛ لإعطاء الفرصة لظهور الطفرات إن وجدت. وإذا تعارض ذلك مع الإمكانات المتاحة .. فإنه تفضل زراعة ٣ بذور M_2 من كل ١٠٠٠ نبات M_1 عن زراعة أعداد كبيرة من بذور الـ M_2 من كل من عدد محدود من نباتات الـ M_1، وتنتخب النباتات المرغوبة فقط، وتلقح ذاتيًّا لإنتاج بذور الجيل الطفرى الثالث M_3، وتستبعد جميع النباتات التى يكون نموها طبيعيًّا. وإذا كان المطلوب هو العثور على طفرة فى جين واحد فقط بأحد الأصناف المرغوبة .. فإنه تلزم زراعة ١٠٠٠٠ نسل M_2 على الأقل؛ لأن معدل ظهور الطفرة المرغوبة فى غياب الطفرات الأخرى غير المرغوبة يكون منخفضًا للغاية.

ويبين شكل (١٠-٢) الكيفية التى تظهر بها الطفرات المتنحية بحالة أصيلة فى الجيلين الطفريين الثانى والثالث، وذلك عند محاولة استحداث الطفرات فى حبوب القمح. ففى هذا المثال أدت معاملة حبوب القمح بأحد العوامل إلى استحداث طفرة متنحية فى إحدى الخلايا الميرستيمية بجنين البذرة، وقد نمت خلفة من تلك الخلية، كانت خليطة فى جين الطفرة. وفى النسل الناتج من التلقيح الذاتى لهذه الخلفة (M_2) .. ظهر نبات واحد من بين أربعة نباتات حاملاً للطفرة بحالة أصيلة، وقد أعطت جميع البذور الناتجة من التلقيح الذاتى لهذا النبات نباتات طفرية متنحية أصيلة فى الجيل التالى (الجيل الطفرى الثالث M_3). يلاحظ أن نباتين آخرين من نفس النسل

الذى ظهرت فيه الطفرة بحالة أصيلة فى الـ M_2 كانا خليطين فى جين الطفرة، الأمر الذى ظهر جليًا فى نسلهما فى الـ M_3. هذا .. وقد مُيزت النباتات الطفرية فى الشكل باللون الأسود.



شكل (١٠-٢): طريقة التعرف على الطفرات المتنحية فى الجيلين الطفريين الثانى والثالث. يراجع المتن للتفاصيل (عن Poehlman & Sleper ١٩٩٥).

يقتصر برنامج التربية بعد ذلك على تقييم الطفرات التى أمكن استحداثها، فتزرع عدة خطوط من كل طفرة فى الجيل الطفرى الثالث M_3، وتقارن الطفرات المرغوبة منها مع الأصناف التجارية المهمة فى تجارب صغيرة بمكررات فى الجيل الطفرى الرابع M_4، والخامس M_5. وتقارن الطفرات المتميزة منها فى تجارب موسعة فى الجيلين الطفريين السادس M_6 والسابع M_7.

وعمومًا .. فإن تعامل النباتات ابتداء من الجيل الطفرى الثانى يكون بإحدى أربع طرق هى:

١ - انتخاب النسب.

٢ - انتخاب التجميع.

٣ – التحدر من بذرة واحدة.

٤ – اختبار الأجيال المبكرة.

هذا .. وقد تكثر الطفرة المتنحية، وتستعمل كصنف جديد مباشرة، أو تستخدم كسلالات تربية فى برامج أخرى لتربية المحصول، إن لم تكن صالحة للاستعمال كصنف جديد. ولمزيد من التفاصيل عن هذا الموضوع .. يراجع Fehr (١٩٨٧).

خطوات برنامج للتربية بالطفرات فى النباتات الذاتية التلقيح

تكون خطوات برنامج التربية بالطفرات فى النباتات الذاتية التلقيح كما هو موضح فى جدول (١٠–٤) (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

استحداث الطفرات فى النباتات الخضرية التكاثر

نظرًا لصعوبة اختراق المركبات الكيميائية للأجزاء النباتية الخضرية، فإن معاملتها بالإشعاع تكون أفضل من معاملتها بالمركبات المطفرة. وإذا ما رُغب فى إجراء المعاملة بالمركبات الكيميائية فإنه يفضل إذابتها فى مركب يسمح بسرعة اختراقها للأنسجة النباتية، مثل الـ dimethyl sulphoxide.

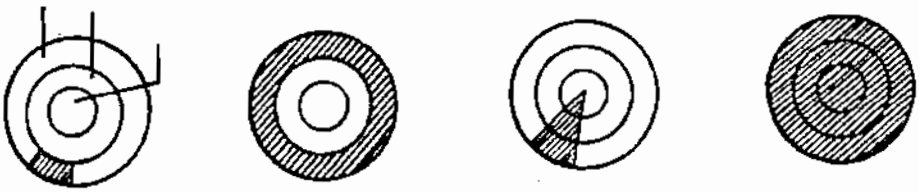
وأنسب الجرعات هى التى تكون قريبة من الـ LD_{50} أو الـ GR_{50}.

ونظرًا لأن البراعم التى تتعرض لمعاملة الإشعاع تتكون من عديد من الخلايا .. فإن الطفرات التى تستحدث تكون دائمًا على صورة قطاعات sectors. وتحت تلك الظروف تلعب قوى الـ diplontic selection دورًا كبيرًا فى احتمالات اكتشاف تلك الطفرات وملاحظتها من عدمه.

وإنه لمن المعروف والمتفق عليه حاليًا أن القمة النامية الخضرية، والبراعم العادية والعرضية يتكون كل منها من ثلاث طبقات مستقلة تأخذ الرموز L-I، و L-II، و L-III (شكل ١٠–٣)، وهى التى يشار إليها – كذلك – باسم الـ histogenic layers. وتلك الطبقات هى التى تعطى فى نهاية المطاف النمو الخضرى المتميز بما يحمله من أوراق وبراعم إبطية.

جدول (١٠-٤): خطوات برنامج التربية باستحداث الطفرات فى النباتات الذاتية التلقيح.

السنة	الجيل	العملية
الأولى	-	● تعامل البذور (< ٥٠٠ بذرة) بالعامل المطفر المناسب.
الثانية	M_1	● تزرع البذور العاملة على مسافات واسعة فى معزل، علمًا بأن بعض النباتات قد تكون كيميرية، حيث تظهر فيها الطفرات على أحد الخلفات أو بعضها فقط. ● يمكن ملاحظة الطفرات السائدة. ● نظرًا لتوقع اختلافات نباتات الـ M_1 فيما قد تحمله من طفرات؛ لذا .. يتعين حصاد بذور كل نبات مستقلة عن بذور النباتات الأخرى، وبمعدل حوالى ٢٠ بذرة/نبات.
الثالثة	M_2	● يزرع نسل كل نبات فى خط مستقل. ● تحدد الخطوط التى تظهر بها الطفرات، وتنتخب الطفرات المرغوب فيها. ● قد لا يمكن ملاحظة الطفرات الخاصة بالصفات الكمية؛ ولذا .. يتعين انتخاب النباتات الطبيعية الخصبة القوية النمو الحاملة لكل صفة. ● تحصد بذور النباتات المنتخبة مستقلة.
الرابعة	M_3	● يزرع نسل كل نبات منتخب فى خط مستقل. ● تنتخب الطفرات والسلالات المتجانسة، والتى قد يمكن حصاد بذورها معًا إن كانت السلالات متجانسة. ● يجرى انتخاب للنباتات الفردية التى تحمل طفرات مرغوب فيها والتى قد تظهر فى السلالات غير المتجانسة، مع حصاد بذور تلك النباتات مستقلة.
الخامسة	M_4	● تقيم السلالات المتشابهة المجمعة معًا، وكذلك السلالات الفردية تقييمًا أوليًا لأجل انتخاب أفضل السلالات لمزيد من التقييم. ● تستبعد – عادة – السلالات التى تظهر فيها انعزالات.
السادسة إلى التاسعة	M_5-M_8	● يستمر تقييم السلالات الثابتة فى عدة مواقع
العاشرة	M_9	● تكثر البذور وتنشر زراعتها كصنف جديد.



طفرة فى كل النسيج | طفرة قطاعية (sectorial) | طفرة محيطية periclinal (ظهرت فى الـ L_1) | طفرة ناقصة mericlinal (ظهرت جزئيًا فى الـ L_1)

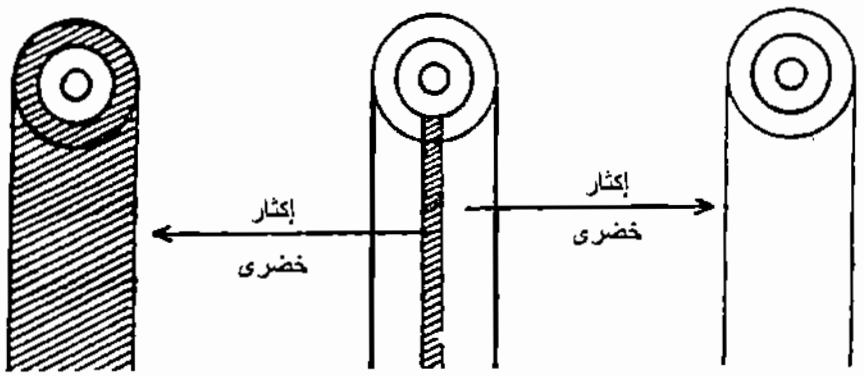
شكل (١٠-٣): أنواع الطفرات التى قد تظهر فى قطاع عرضى بالقمة النامية لنبات خضرى التكاثر.

وبعد التعرض للمعاملة بالعامل المطفر فإن أى خلية أو مجموعة من الخلايا فى أى من الطبقات الـ histogenic الثلاث يمكن أن تحدث بها طفرات. هذا إلاّ أن لموقع الخلايا الطافرة أهمية كبيرة بالنسبة لما تنتهى إليه تلك الطفرة. فإذا ما انتهت الخلايا الطافرة وتلك التى تنتج عن انقسامها إلى تكوين ورقة، فإنه يكون غالبًا من الصعب اكتشاف تلك الطفرة. أما إذا ما أسهمت تلك الخلية الطافرة والخلايا التى تنتج عن انقسامها إلى تكوين أحد الفروع (شكل ١٠-٤) ونتج عنها تكوين كيميرا ناقصة mericlinal chimera (شكل ١٠-٤)، فإنه يمكن زيادة فرصة تكوين فرع طافر يحمل براعم إبطية طافرة إما بتكرار التقصير القمى فى حالة النباتات الخشبية، وإما بزراعة أجيال متتالية كما فى حالة الدرنات (عن Chopra ٢٠٠٠).

استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة والخلايا

يمكن بالاستعانة بتقنيات بعض مزارع الأنسجة والخلايا، مثل: مزارع المتوك، والأجنة الجنسية، ودمج البروتوبلاست التغلب على بعض محددات التربية بالطفرات فى كل من النباتات الجنسية التكاثر والخضرية التكاثر. كما يمكن عن طريق مزارع الأنسجة مع التربية بالطفرات إسراع برامج التربية بداية من إحداث التغيرات الوراثية، ومرورًا بالانتخاب، وانتهاء بإكثار التراكيب الوراثية المرغوب فيها.

كذلك يمكن بالحصول على الطفرات المتنحية فى حالة أصيلة – من خلال مزارع المتوك أو مزارع المبايض – إسراع عملية التعرف على الصفات المرغوب فيها (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٥، و Ahlowalia & Maluszynski ٢٠٠١).



شكل (١٠-٤): كيفية ظهور الطفرات - من عدمه - عند الإكثار الخضرى بكيميرا ناقصة mericlinal chimera.

العوامل المتحكمة فى عدم ظهور بعض حالات الطفرات المستحدثة

قد لا تظهر الطفرات التى حدثت بالفعل لأى سبب من الأسباب التالية:

١ - قد يحدث ترميم أو تصليح repair إنزيمى لجزء الدنا الذى حدثت فيه الطفرة، بحيث يعود إلى حالته الطبيعية قبل أن يمكن اكتشافها.

٢ - قد يكون الجزء النباتى الذى حدثت فيه الطفرة ضعيفًا وغير قادر على منافسة الأجزاء العادية من النبات إلى درجة أنه لا يُسهم فى إنتاج الجاميطات للجيل التالى، وتعرف تلك الظاهرة باسم diplontic selection.

٣ - إذا حدث ذلك التنافس على المستوى الجاميطى (بسبب ضعف إنبات الجاميطات المطفرة أو لأى ضعف فسيولوجى فى أدائها)، فإن ذلك يعرف باسم haplontic selection.

٤ - قد لا تظهر الطفرة المنتظرة ولا يمكن التعرف عليها إن لم تتوفر لها الظروف البيئية التى تلزم لاكتشافها، مثل الظروف البيئية القاسية أو ظروف الإصابات المرضية أو الحشرية ... إلخ عندما يكون الهدف هو استحداث طفرات متحملة لتلك الظروف أو مقاومة لتلك الأمراض أو الآفات.