الفصل العاشر

التربية باستحداث الطفرات

إن الطفرات المستحدثة Induced Mutations هى التى يتم إنتاجها صناعيًا عن طريق المعاملة بواسطة العوامل المطفرة Mutagenic Agents. وكانت أولى محاولات استحداث الطفرات فى عام ١٩٢٧ حينما نشر Muller أن معدل الطفرات يمكن زيادته فى حشرة الدروسفيلا لدى معاملتها بأشعة إكس X-rays، ثم حصل Stadler على نتائج مماثلة على نبات الشعير فى العام التالى، وقد أعقب ذلك محاولات كثيرة جادة لاستحداث الطفرات فى المحاصيل الزراعية بغرض تحسينها، ويستخدم لذلك نوعان رئيسيان من العوامل المطفرة Mutagenic Agents هما: الأشعة، والمركبات الكيميائية.

أهداف التربية باستحداث الطفرات وحدود استخداماتها

إن الفائدة الرئيسية التى ترجى من محاولات استحداث الطفرات صناعيًا هى الحصول على اختلافات وراثية جديدة، يمكن استخدامها فى برامج التربية لإنتاج أصناف جديدة محسنة، إلا أن فريقًا من العلماء يرون أن الطفرات الطبيعية تحدث بصفة دائمة، وأنها حدثت مرات عديدة خلال آلاف السنين التى زرعت فيها محاصيلنا الزراعية، وأن الطبيعة والإنسان قد قاما - دائمًا - بانتخاب أفضلها وأكثرها تأقلمًا مع الظروف البيئية؛ أى إن كل الطفرات التى نحاول استحداثها لابد أن تكون موجودة بالفعل فى الجيرمبلازم المتوفر لدينا، ولا يتطلب الأمر أكثر من تقييم هذا الجيرمبلازم للبحث عن الصفات المرغوبة. ومما يؤيد هذا الاعتقاد .. أن الغالبية العظمى من الطفرات المستحدثة تكون لصفات غير مرغوبة؛ حيث تزيد كثيرًا نسبة الطفرات غير المرغوبة (الضارة) إلى الطفرات المرغوبة (المفيدة) - لدى استعمال أشعة أكس - عن ١:٨٠٠.

ولكن نظرًا لأن معدل حدوث الطفرات الطبيعية منخفض للغاية؛ حيث يبلغ حوالى واحد فى المليون للجين الواحد؛ فإننا نلجأ إلى المعاملة بالعوامل المطفرة لأجل زيادة

معدل حدوث الطفرات فى الصفات المرغوب فيها. وتحـدث الزيـادة فـى معـدل حـدوث الطفرات الطبيعية بفعل عوامل كثيرة، منها: التعريض للحرارة العاليـة وتخزيـن البـذور لفترات طويلة، ومن خـلال مـزارع الأنسـجة، والمعاملـة بالإشـعاع، والمعاملـة بالمركبـات الكيميائية المطفرة.

هـذا .. إلا أن إجراء أى برنامج للتربيـة يعتمـد علـى استحداث الطفـرات المرغـوب فيها لا يـكون مبررًا إلا فى حالـة غيـاب تلـك الطفـرات تمامًـا مـن الجـيرمبلازم المتـاح لبرنامج التهجين والانتخـاب، وبعـد أن يعجـز المربـى عـن تحسـين المحصـول بـالطرق الأخرى.

وتجدر الإشـارة إلى أنه لا يمكن توجيه العوامل المطفرة نحو جين معين لتغييره وإنتاج آليل جديد منـه، وإنمـا تحـدث الطفـرات بصـورة عشـوائية، ويكـون للظـروف السـابقة للمعاملة تأثير بالغ فى مدى الاستجابة لها. ومن أهـم العوامـل المؤثـرة التغذيـة المعدنيـة للنبات، والتضاعف polyploidy.

كذلك فإنه نادرًا ما تظهر الطفرة المرغوب فيها – منفـردة – عقـب المعاملـة بـالعوامل المطفرة، حيث غالبًا ما تظهر عدة طفرات فى آن واحد، وغالبًـا مـا تكـون أكثريـة تلـك الطفرات ضارة؛ ولذا .. فإن الطفرات المستحدثة نادرًا ما تستخدم بصـورة مباشـرة وإنمـا تستعمل فى برامج التربية بالتهجين للاستفادة منها فى إنتاج أصناف جديدة.

ونظرًا للانخفاض الشديد فى نسـبة الطفـرات المرغـوب فيـها التـى تسـتحدث بفعـل التعريض للعوامل المطفرة .. فإن نجاح أى برنـامج للتربيـة باسـتحداث الطفـرات يعتمـد على تقييم أعداد كبيرة من النباتات فى تلك الصفات.

ويكون من المناسب إجراء برنامج التربية باستحداث الطفرات فى أى مـن الحالات التالية:

١ – عندما لا تتوفر الصفة أو الصفات المرغوب فيها فى جيرمبلازم المحصول.

٢ – عندما تكون الجينات المرغوب فيها متوفـرة فى جيرمبلازم المحصـول، ولكنـها تكون مرتبطة بشدة بجينات أخرى مرغوب فيها.

٣ – عندما تتوفر أصناف جيـدة جـدًا مـن الناحيـة الزراعيـة، ولكـن تنقصـها صفـة

واحدة؛ حيث يكون استحداث الطفرات فى تلك الأصناف أفضل وسيلة لتحسينها دون إحداث تغيرات غير مرغوب فيها فى خلفيتها الوراثية.

٤ – حينما تكون التغيرات المرغوب فيها مطلوبة فى محصول خضرى التكاثر (عن Chopra ٢٠٠٠).

مدى ملاءمة التربية بالطفرات لمختلف المجاميع المحصولية

تعد النباتات الذاتية التلقيح أكثر المجاميع المحصولية ملاءمة للتربية بالطفرات؛ لأن الطفرات المتنحية تنعزل فيها بحالة أصيلة فى الجيل التالى، دونما حاجة إلى إجراء التلقيح الذاتى يدويًا، بالإضافة إلى أنها متجانسة ولا يجدى معها الانتخاب إلاّ بعد استحداث الاختلافات الوراثية فيها، كما يمكن التعرف على الطفرات التى تظهر فيها بسهولة؛ لأنها صادقة التربية.

كما تناسب التربية بالطفرات النباتات الخضرية التكاثر؛ لأن النباتات التى تظهر بها طفرات مرغوبة يمكن إكثارها خضريًا؛ لتصبح صنفًا جديدًا. وتجدر الإشارة إلى أن التربية بالطفرات فى المحاصيل الخضرية التكاثر تعادل فى تأثيرها التربية بطريقة التهجين الرجعى فى المحاصيل الجنسية التكاثر؛ ذلك لأن الإكثار الخضرى للطفرة يجعل منها صنفًا جديدًا مشابهًا تمامًا للصنف الأصلى (الذى عومل بالعوامل المطفرة). فيما عدا الصفة المرغوبة وهى الطفرة.

كذلك .. تتبع التربية بالطفرات فى تحسين نباتات الزينة؛ إذ إن التشوهات التى قد تحدثها المعاملة بالعوامل المطفرة قد تكون – فى حد ذاتها – صفات مرغوبة فى هذه النباتات.

أما المحاصيل الخلطية التلقيح .. فلا تناسبها التربية بطريقة الطفرات، لما تتطلبه من جهد كبير لتلقيح أعداد كبيرة منها ذاتيًا؛ لعزل الطفرات المتنحية بحالة أصيلة، كما تكثر بها الاختلافات الوراثية بطبيعتها. وبالرغم من ذلك .. فقد أمكن الوصول إلى نتائج مرضية مع هذه النباتات عند زراعتها متجمعة in bulk.

وتجدر الإشارة إلى أنه يكون من الأسهل اكتشاف الطفرات فى الصفات النوعية البسيطة عما فى الصفات الكمية التى يتحكم فيها عدد كبير من العوامل الوراثية.

هذا .. وتختلف الحساسية للعوامل المطفرة باختلاف الأنواع النباتية. وقد بيّن كثيرون أن النباتات ذات الكروموسومات الكبيرة أكثر حساسية من النباتات ذات الكروموسومات الصغيرة، بينما تقل الحساسية فى النباتات المتضاعفة عما فى أصولها الثنائية. وفى الهجن عما فى آبائها، وتزيد معدلات استحداث الطفرات فى العشائر القليلة التجانس عما فى السلالات النقية.

نوعية التأثيرات التى تحدثها العوامل المطفرة

يكون للعوامل المحدثة للطفرات تأثيرات فسيولوجية، وأخرى وراثية على النباتات المعاملة، كما يلى:

١ – التأثير الفسيولوجى:

تُحدث معظم العوامل المطفرة تأثيرات فسيولوجية فى النباتات المعاملة، تظهر على شكل زيادة فى قوة النمو النباتى فى الجيل المعامل؛ فتؤدى معاملة البذور إلى زيادة فى قوة نمو البادرات التى تنمو منها، وتؤدى معاملة الأجزاء الخضرية المستخدمة فى التكاثر إلى زيادة فى قوة نمو النباتات التى تنتج منها، مع زيادة فى سمك الأوراق أو ظهور تعريق غير عادى بها. ويختفى هذا التأثير الفسيولوجى فى مرحلة متأخرة من حياة النبات، ولا يظهر فى الجيل التالى، سواء أكان التكاثر جنسيًّا، أم خضريًّا. ولا يمكن التمييز بين التأثير الفسيولوجى للعوامل المطفرة، والطفرات الحقيقية إلاّ فى الجيل الثانى بعد المعاملة.

٢ – التأثير الوراثى:

تحدث المعاملة بالعوامل المطفرة تأثيرات وراثية تكون على شكل طفرات عاملية، أو تحورات كروموسومية أو كليهما معًا. وتكون معظم الطفرات ضارة، وغالبيتها متنحية، خاصة فى النباتات الثنائية المجموعة الكروموسومية، بينما تكثر الطفرات السائدة سيادة تامة أو جزئية فى النباتات المتضاعفة.

ويدل عديد من الدراسات على أن كثيرًا من الطفرات التى يحدثها الإشعاع تكون على صورة نقص فى جزء صغير من الكروموسوم، إلا أنه حدث ارتداد للحالة الأصلية فى بعض الطفرات؛ مما يدل على عدم صحة الرأى القائل بالنقص الكروموسومى، وإذا

حدثت الطفرات نتيجة للنقص الكروموسومى .. فإنها تكون غير ذات قيمة فى تحسين المحصول.

ويكون لبعض الطفرات تأثير متعدد Pleiotropic، ويكون بعضها مرتبطًا بطفرات أخرى، كما يمكن أن تحدث الطفرات فى الصفات الكمية؛ ومن أمثلة ذلك أنه أمكن الحصول على سلالات من الفول السودانى – بعد معاملته بالإشعاع – كانت أعلى محصولا من الصنف الأصلى.

أما التحورات الكروموسومية .. فإنها تكون ذات تأثير سلبى غالبًا، إلا أنها تسمح للمربى بتغيير تركيب الكروموسومات بالطريقة التى يراها مفيدة لتحقيق أهداف برنامج التربية.

كيفية حدوث الطفرات

يحدث التأثير المطفر للمعاملة بالعوامل المطفرة بإحدى طريقتين أو بكلتيهما، كما يلى:

١ – التأين Ionization:

يحدث التأين حينما تتصادم الأشعة ذات الموجات الضوئية القصيرة جدًا مع الذرات التى يتكون منها النسيج النباتى المعامل؛ حيث يؤدى هذا التصادم إلى إطلاق إليكترونات من هذه الذرات مخلفة وراءها أيونات. وتتصادم الإليكترونات المنطلقة بدورها، مع ذرات وجزيئات أخرى؛ لتخلف وراءها مزيدًا من الأيونات، وينطلق منها مزيد من الإليكترونات؛ وبذا .. تتجمع الإليكترونات فى مسار الأشعة، وتكون الذرات المتأينة أكثر قابلية للتفاعلات الكيميائية، وإذا حدث ذلك فى الذرات التى يتكون منها جزئ الحامض النووى DNA .. فإنه يؤدى إلى ظهور الطفرات.

وتختلف الطريقة التى يحدث بها التأين باختلاف الأشعة المؤينة كما يلى:

تُحدث الأشعة الجزيئية Particulate Radiation تأثيرها عندما يمر جزئ سريع ذو شحنة موجبة فى المادة؛ حيث يقوم بجذب إليكترون من مدار إحدى الذرات؛ فتصبح تلك الذرة أيونًا موجبًا. أما الأيون المنطلق منها .. فإنه يتصل بذرة أخرى، فتصبح بذلك أيونًا سالبًا.

أما النيترونات السريعة الحركة .. فإنها تتصادم مع نواة الذرة؛ مما يؤدى إلى إثارتها، وانطلاق الجزيئات الموجبة الشحنة منها، وهو ما يؤدى إلى مزيد من التأين بإزالة الإليكترونات من المدار الخارجى لذرات أخرى .. وهكذا.

أما الأشعة الكهرومغناطيسية .. فإنها تحدث التأين بطريقة ثانوية؛ حيث تؤدى الطاقة التى يكتسبها الوسط من هذه الموجات إلى إحداث حالة من عدم الثبات، يتبعها فقدان إليكترونات من المدارات الخارجية للذرات، تحدث بدورها مزيدًا من التأين.

٢ – الإثارة Exitation:

تحدث الإثارة عند المعاملة بالأشعة فوق البنفسجية؛ حيث تمتصها البيورينات purines والبيرميدينات pyrimidines التى توجد فى الحامض النووى DNA، وتؤدى الأشعة إلى رفع إليكترونات الذرات التى تكون فى طريقها إلى مدارات أعلى يكون مستوى الطاقة فيها أكبر وتكون هذه الذرات المثارة أكثر قابلية للتفاعلات الكيميائية، وهو ما يزيد من فرصة حدوث الطفرات (Gardner & Sunstad ١٩٨٤).

الأشعة المحدثة للطفرات

يعد الإشعاع Radiation من أهم العوامل المطفرة؛ حيث تُحدث الأشعة فوق البنفسجية وجميع أنواع الأشعة ذات الموجات الضوئية الأقصر منها طفرات فى الكائنات الحية التى تتعرض لها.

تقسيم الأشعة حسب طريقة تأثيرها

تقسم الأشعة حسب طريقة تأثيرها إلى مجموعتين هما:

١ – الأشعة غير المؤينة Non-ionizing Radiations؛ ومن أمثلتها الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Rays.

٢ – الأشعة المؤينة Ionizing Radiations؛ ومن أمثلتها: أشعة ألفا alpha rays وأشعة بيتا beta rays، وأشعة إكس X-rays، وأشعة جاما gamma rays، والنيترونات neutrones.

تعتبر النظائر المشعة Iostopes من أهم مصادر الأشعة المؤينة؛ إذا إنها تنتج طاقة فى

صورة جزيئات particles، أو موجات waves، وكلاهما يعد إشعاعًا radiation. تكون الجزيئات المنطلقة من العناصر المشعة ذات طاقة عالية، ويمكنها أن تنقل طاقتها الكامنة هذه إلى أى وسط تمر فيه، وتعرف هذه الأشعة باسم الأشعة الجزيئية particulate or corpuscular radiations. أما الموجات التى تنطلق من العناصر المشعة .. فإنها تكون قصيرة جدًا، وذات طاقة عالية أيضًا، وتحدث اضطرابات كهربائية ومغناطيسية فى تركيب الوسط الذى تمر فيه، وتعرف هذه الأشعة باسم الأشعة الكهرومغناطيسية electromagnetic raditions.

وتشتمل الأشعة الجزيئية Corpuscular Radiations على كل من النيترونات البطيئة slow neutrons، وجزيئات ألفا، وبيتا. أما الأشعة الكهرومغناطيسية .. فإنها تتضمن كلا من أشعة x وأشعة جاما.

وحدات قياس الأشعة المؤينة

تستخدم الوحدات التالية فى قياس جرعات الأشعة المؤينة:

١ – الرونتجن Rontgen (r): تقاس به جرعات أشعة إكس، وأشعة جاما خاصة فى الهواء.

٢ – مكافئ الرونتجن الفيزيائى Rontgen Equivalent Physical (rep): تقاس به الأشعة الجزيئية particulate irradiation، خاصة فى الأنسجة الطرية soft tissues فى الدراسات البيولوجية.

٣ – جرعة الإشعاع الممتصة Radiation Absorbed Dose (راد rad): تقاس به كل أنواع الأشعة فى الدراسات البيولوجية والفيزيائية، وتعتبر (الراد) وحدة امتصاص، وهى أكثر الوحدات استعمالاً.

٤ – الجراى Gray (ورمزها Gy)، وهو يعادل جِوُّل joule (J) واحد من الطاقة الممتصة لكل كيلو جرام من المادة المعرضة للإشعاع ($J\ kg^{-1}$)، وهى الوحدة الدولية لقياس الجرعة الممتصة، علمًا بأن الراد (rad) الواحد = ١٠٠ erg/جم = ٠,٠١ J/كجم؛ أى إن كل Gy (واحد J/كجم) = ١٠٠ راد = ١٠ erg/كجم.

أنواع الأشعة

فيما يلي بيان بأهم أنواع الأشعة المستخدمة فى استحداث الطفرات:

أولاً: الأشعة فوق البنفسجية

تولَّد الأشعة فوق البنفسجية Ultraviolet Radiation بواسطة لمبات بخار الزئبق، وتتراوح أطوال موجاتها من ١٠٠ إلى ٤٠٠ ملى ميكرون (نانوميتر)، ولكن أكثر موجاتها تأثيرًا هى التى تكون بطول ٢٥٤ ملى ميكرونًا؛ لأنها أكثرها امتصاصًا بواسطة البيورينات والبيرميدينات التى يتكون منها الحامض النووى DNA. وتُحدث الأشعة فوق البنفسجية تأثيرها بواسطة الإثارة التى تنرع من التفاعلات الكيميائية فى الأنسجة التى تتعرض لها. وهى لا تعتبر من الأشعة المؤينة باستثناء ما يكون منها فى مدى الموجات القصيرة جدًّا. وتكون أغلب الطفرات التى تحدثها الأشعة فوق البنفسجية من النوع العاملى، وإذا أحدثت الأشعة كسورًا كروموسومية .. فإنها تكون طرفية عادة، وغالبًا ما يلتحم الجزء المكسور فى مكانه الأصلى، أو يفقد بما يحمله من جينات.

ويُعاب على الأشعة فوق البنفسجية أنها لا تتعمق كثيرًا فى الأنسجة المعاملة، وهو ما يحد من استعمالها، ويقتصر استعمالها – غالبًا – على معاملة حبوب اللقاح.

ثانيًا: أشعة ألفا

يحصل على أشعة ألفا Alpha Rays من النظائر المشعة مثل الفوسفور (^{32}P)؛ والكربون (^{14}C) وهى أشعة جزيئية Particulate، عبارة عن أنوية الهليوم؛ إذ تتكون من جزيئات، يحتوى كل منها على عدد ٢ بروتون، و ٢ نيترون، وتكون – بالتالى – ذات شحنة موجبة. وهى خطرة جدًّا إذا وصلت إلى جسم الإنسان، ولكن يمكن الحماية منها بورقة رقيقة، ولا يتعدى اختراق هذه الأشعة للأنسجة النباتية أكثر من جزء صغير من المليمتر؛ ذلك لأنها تحمل شحنة موجبة؛ فتقل سرعتها تحت تأثير الشحنات السالبة التى توجد فى المادة. تحدث أشعة ألفا تأينًا شديدًا، وتتسبب فى حدوث تحورات كروموسومية غالبًا.

ثالثًا: أشعة بيتا

يحصل على أشعة بيتا Beta Rays (أو أشعة الكاثود) من النظائر المشعة مثل

الفوسفور المشع (^{32}P)، والكبريت المشع (^{35}S)، وهى أشعة جزيئية، عبارة عن إليكترونات سريعة الحركة تقذفها أنوية الذرات غير الثابتة للعناصر المشعة. وقد تكون هذه الأشعة خطرة على الإنسان، ويمكن الحماية من أخطارها بلوح سميك من الكارتون. وتخترق أشعة بيتا الأنسجة النباتية لمسافة عدة ملليمترات فقط، لأنها تحمل شحنات سالبة؛ فتقل سرعتها تحت تأثير الشحنات الموجبة التى توجد فى المادة. وتحدث أشعة بيتا تأثيرها بطريق التأين، ولكن بدرجة أقل من أشعة ألفا، وتتسبب فى حدوث طفرات عاملية وتحورات كروموسومية. وتعامل بأشعة بيتا كل من البذور والبادرات، ولكن يغلب استعمالها فى معاملة البذور. وتغمر الأجزاء النباتية التى يُراد معاملتها مدة مناسبة فى تركيز مناسب من محلول مائى لأحد المركبات التى يدخل العنصر المشع فى تكوينها، وقد يضاف المحلول للتربة التى تنمو فيها النباتات فى بعض الحالات.

رابعًا: أشعة جاما

يُحصل على أشعة جاما Gamma Rays من النظائر المشعة فى المفاعلات النووية، حيث تنطلق من العنصر المشع كوبالت ٦٠ ^{60}Co، أو سيزيوم ١٣٧ ^{137}Cs وهى أشعة كهرومغناطيسية، تشبه الضوء العادى، إلاّ أن طاقتها عالية، وموجاتها أقصر بكثير، وتعتبر بمثابة أشعة إكس طبيعية، إلاّ أن موجاتها أقصر منها كثيرًا أيضًا، ولها قدرة أكبر على اختراق الأنسجة. وبينما تتراوح أطوال موجات الضوء العادى من ٤٠٠–٧٠٠ ملى ميكرون، ويصل طول موجة أشعة إكس إلى ٠,٠٥ ملى ميكرونًا. فإن معظم أشعة جاما تقل أطوال موجاتها عن ٠,٠٠١ ملى ميكرونًا، وتعد أشعة جاما خطرة على الإنسان؛ إذ إنها تخترق الجسم بقوة، ولا يمكن الحماية منها إلا بعازل من الرصاص، يبلغ سمكه عدة سنتيمترات، أو بعازل من الأسمنت، يبلغ سمكه عدة أقدام.

تخترق أشعة جاما الأنسجة النباتية لعدة سنتيمترات. وتجرى معاملة النباتات وهى فى حقول المفاعلات النووية؛ حيث تعرض للأشعة المنطلقة من مفاعل ذرى به الكوبالت المشع ^{60}Co. يوجد المفاعل تحت الأرض؛ حيث يوجد العنصر المشع فى صندوق سميك من الرصاص، ويرفع آليًا من بعد إلى أن تتم المعاملة، ثم يعاد إلى مكانه تحت الأرض.

تحدث الأشعة تأثيراتها بطريق التأين، وينتج عنها طفرات عاملية وتحورات كروموسومية كثيرة.

تستعمل أشعة جاما فى معاملة البذور والبادرات والنباتات النامية فى الأصص فى دوائر حول المفاعل، وتكون جرعة الإشعاع أعلى ما يمكن بالقرب من المفاعل، وتقل شدتها كلما ابتعدنا عنه، وقد تعطى معاملة اشعة جاما على صورة جرعة واحدة كبيرة فى أماكن خاصة مجهزة لذلك.

خامسًا: أشعة إكس

تُولَّد أشعة إكس X-Rays بواسطة أجهزة خاصة، وهى أشعة كهرومغناطيسية، ذات طاقة عالية، وتنتج على مستويات مختلفة من الطاقة بحسب طول الموجة المطلوبة، وتتراوح أطوال الموجات من ٠,٠٠٥-٠,٠١ مللى ميكرونًا فى اشعة إكس ذات الموجات القصيرة hard x-rays إلى ٠,١-١,٠ مللى ميكرونًا فى أشعة إكس ذات الموجات الطويلة soft x-rays. وتزيد طاقة الأشعة وقدرتها على اختراق الأنسجة وإحداث التأين كلما قصرت موجاتها. وتعتبر أشعة إكس خطرة على الإنسان؛ إذ إنها تخترق الجسم. ويكفى للحماية منها عازل من الرصاص يبلغ سمكه عدة ملليمترات.

يبلغ مدى اختراق أشعة إكس الأنسجة النباتية من بضعة ملليمترات إلى عدة سنتيمترات، وهى تحدث تأثيرها بطريق التأين، وينتج عنها طفرات عاملية، وتحورات كروموسومية. وبينما تتناسب أعداد التحورات الكروموسومية التى تحدثها أشعة إكس - لوغاريتميًا - مع الجرعة .. فإن أعداد الطفرات العاملية تتناسب - خطيًا - معها؛ لذا نجد أن العدد الأكبر من التحورات الكروموسومية التى تحدثها المعاملة يضع حدًا أعلى للجرعة التى يمكن استعمالها، وهو ما يحد من عدد الطفرات العاملية التى يمكن إحداثها.

هذا .. وتختلف الجرعة التى يتعين استعمالها من أشعة إكس باختلاف النوع النباتى والجزء المعامل من النبات والعوامل البيئية؛ فيمكن - مثلاً - تعريض البذور الجافة لجرعات أعلى من الأشعة عن البذور المستنبتة أو الأجزاء الخضرية؛ لأن البذور الجافة أقل حساسية للأشعة. والقاعدة العامة هى أن يعرض أى نسيج أو عضو نباتى إلى

أكبر جرعة يمكن أن يتحملها، دون أن تلحق به أضرار من جراء المعاملة؛ ذلك لأن عدد الطفرات المستحدثة يتناسب - خطيًا - مع الجرعة كما سبق بيانه، وتتحدد الجرعة المناسبة بواسطة تجارب أولية لكل محصول على حدة. وعلى سبيل المثال .. فإن الجرعة المناسبة قدرت بنحو ٧٥٠٠ رونتجن فى البسلة، و ١٠٠٠٠ رونتجن فى الفاصوليا.

وتفضل أشعة إكس عن غيرها من الأشعة المحدثة للطفرات؛ الأسباب التالية:

١ - تعتبر الأجهزة المولدة لأشعة إكس فى متناول اليد، ويسهل تشغيلها.

٢ - تسهل معاملة البذور والأجزاء النباتية الأخرى بالأشعة.

٣ - من السهل تقدير الجرعة المناسبة من الأشعة وقياسها.

٤ - يمكن وقف تشغيل الأجهزة المولدة لأشعة إكس عند انتهاء المعاملة، بخلاف العناصر المشعة التى تشع بصورة مستمرة.

٥ - لا توجد مشاكل تتعلق باستعمال أشعة إكس كتلك الخاصة بمشاكل التداول أو التلوث بالعناصر المشعة، ويلزم - مع ذلك - الحرص عند تشغيل الأجهزة المولدة لأشعة إكس.

وتستعمل أشعة إكس فى معاملة البذور والبادرات، ويغلب استعمالها فى معاملة البذور.

ساوسًا: البروتونات أو الديوترونات

تولد البروتونات أو الديوترونات بواسطة المفاعلات النووية، وهى أشعة جزيئية، عبارة عن أنوية ذرات الأيدروجين العادى بالنسبة للبروتونات، وأنوية ذرات الأيدروجين الثقيل بالنسبة للديوترونات، وهى خطرة جدًا على الإنسان، ويمكن الحماية من أخطارها؛ بعازل من الماء، أو البارافين يبلغ سمكه عدة سنتيمترات، وهى تخترق الأنسجة النباتية لعدة سنتيمترات، وتعد من الأشعة المؤينة، وينتج عنها طفرات عاملية، وتحورات كروموسومية.

سابعًا: النيترونات البطيئة والسريعة

تولد النيترونات بالانشطار النووى لعنصر اليورانيوم ٢٣٥ فى مفاعل نووى، وتتفاعل

بعض النيترونات مع ذرات أخرى من اليورانيوم لتستمر عملية الانشطار، وبينما يمتص المفاعل بعض النيترونات، فإن بعضها الآخر يمر نحو خارج المفاعل من مخارج خاصة، وتلك هى التى يمكن استعمالها لغرض إحداث الطفرات. وتعد النيترونات السريعة هى تلك التى تكون طاقتها عالية لدى خروجها من المفاعل. أما النيترونات البطيئة فتكون طاقتها أقل ويتم إنتاجها بخفض طاقة النيترونات السريعة.

والنيترونات عبارة عن أشعة جزيئية تتكون من جسيمات عديمة الشحنة، أثقل قليلاً من البروتونات، ولا يستدل عليها إلاّ من أثار تفاعلها مع أنوية ذرات المادة التى تكون فى مسارها؛ حيث تطلق البروتونات من الأنوية التى تصيبها. وهى خطرة جدًّا على الإنسان، ويمكن الحماية منها بحاجز سميك من عناصر خفيفة؛ مثل الملح. وهى تخترق الأنسجة النباتية لعدة سنتيمترات، وتعد من الأشعة المؤينة، وينتج عنها طفرات عاملية وتحورات كروموسومية. وتستعمل هذه الأشعة فى معاملة البذور والبادرات، خاصة البذور (Elliott ١٩٥٨، و Herskowitz ١٩٦٥، و Grosch ١٩٦٥، و Briggs & Knowles ١٩٦٧، و Chaudhari ١٩٧١، و Lapins ١٩٨٣).

ولمزيد من التفاصيل عن الإشعاع وتأثيره البيولوجى .. يراجع Grosch (١٩٦٥)، و Drake (١٩٦٩)، و Lapins (١٩٨٣).

جرعة الإشعاع ومعدل الجرعة

تعرف الجرعة dose التى تتم بها المعاملة بالعامل المطفر، ومدة المعاملة باسم معدل الجرعة dose rate. وتعرف المعاملة الحادة acute بأنها تلك التى تجرى خلال فترة قصيرة تستمر لمدة دقائق قليلة أو ساعات معدودة. أما المعاملة المزمنة أو المتواصلة، فهى تلك التى يستمر فيها التعرض للعامل المطفر لمدة طويلة تكون بالأسابيع، أو الشهور، أو السنوات. ويعد معدل الجرعة من أوائل المتغيرات التى يتوجب اتخاذ قرار بشأنها فى أى برنامج للتربية باستحداث الطفرات.

هذا وتقسم جرعات الإشعاع إلى عالية (> ١٠ كيلو جراى)، ومتوسطة (١-١٠ كيلو جراى)، ومنخفضة (< ١ كيلو جراى). تستعمل الجرعات العالية فى تعقيم المنتجات الغذائية، والمنخفضة فى استحداث الطفرات فى البذور، حيث تتراوح الجرعات بين

٦٠، و ٧٠ جراى فى كثير من النباتات التى تتكاثر بذريًا، مثل الأرز، والقمح، والذرة، والفاصوليا، ولفت الزيت.

ويتم تحديد معدل الجرعة تجريبيًا؛ فمثلاً .. عند معاملة البذور فإن معدل الجرعة المناسب يكون هو ذلك الذى يؤدى إلى موت ٥٠٪ من البذور، وهى التى تعرف باسم LD_{50} (جدول ١٠-١). هذا .. مع العلم بأن أى بذرة تنبت، ولا يستطيع النبات إكمال نموه لحين إنتاج محصول جديد من البذور الكاملة الحيوية، أو أن لا يمكن للنبات الناتج منها أى ينتج ولو بذرة واحدة حية .. تعتبر ضمن الـ ٥٠٪ الميتة، أى ضمن الـ LD_{50} (عن Fehr ١٩٨٧).

جدول (١٠-١): جرعة أشعة جاما التى تلزم للقضاء على ٥٠٪ من البذور (LD_{50}) فى بعض العائلات النباتية (عن Gupta ٢٠٠٠).

العائلة	LD_{50}(Krad)
النجيلية	٢٠-٤٠
الباذنجانية	٣٠-٦٠
الكرنبية	١٢٠-١٤٠
الثومية	٢٠-٣٠
القرعية	٣٥-٦٠
البقولية	
الفول	٤-٦
البسلة	١٠-٢٧
الحمص	١٨-٢٦
الفاصوليا	١٥-٣٠
الفول السودانى	٣٥-٤٥

أما فى مزارع الأنسجة - حيث تجرى معاملة الإشعاع على ملليجرامات فقط من الأنسجة النباتية وميكروجرامات من معلقات الخلايا - فإن جرعة الإشعاع تكون شديدة الانخفاض، وتتراوح بين ٢، و ٥ جراى لمزارع الكالوس، و ١٥-٢٠ جراى للنباتات الصغيرة الناتجة من الإكثار الدقيق، علمًا بأن جرعات تزيد عن ١٠ جراى تؤثر سلبيًا - بدرجة كبيرة على حيوية مزارع الكالوس.

وعندما يرغب فى إحداث تغيرات وراثية فى وحدة واحدة، كأن تكون فى إحدى النيوكليوتيدات (من أجل الحصول على طفرة جينية point mutation) أو على صورة فقد فى جزء من أحد الكروموسومات (من أجل الحصول على فقد كروموسومى deletion) .. فإنه يكفى – عادة – التعرض للعامل المطفر مرة واحدة ولفترة قصيرة. أما إذا رغب فى إحداث تغيرات وراثية فى وحدتين أو أكثر، مثلما يكون عليه الحال عند الرغبة فى إحداث كسر فى كروموسومين مختلفين بغية الحصول على انتقال كروموسومى .. فإنه يفضل فى تلك الحالات التعريض للعامل المطفر عدة مرات وعلى فترة زمنية طويلة (عن Ahloowalia & Maluszynski ٢٠٠١).

المركبات الكيميائية المحدثة للطفرات

أنواع المركبات الكيميائية المحدثة للطفرات

تقسم المركبات الكيميائية المحدثة للطفرات – حسب فاعليتها – إلى الأقسام التالية:

١ – مركبات شديدة الفاعلية فى إحداث الطفرات، ولكنها خطرة الاستعمال، وسامة، وقد تسبب الإصابة بالسرطان لو تعرض لها الإنسان، ومن أمثلتها ما يلى:

ethylenimine (EI)

N-nitroso-N-ethylurea (NEU)

N-nitroso-N-methylurea (NMU)

1,4-bisdiazoacetylbutane

٢ – مركبات فعّالة فى إحداث الطفرات، وشائعة الاستعمال، ومن أمثلتها ما يلى:

diethyl sulphate (DES)

ethyl methane sulphonate (EMS) إيثيل ميثان سلفونيت

methy methane sulphonate (MMS)

isopropyl methane sulphonate (iPMS)

azide

colchicine الكولشيسين

٣ – مركبات أقل فاعلية فى إحداث الطفرات وأقل استعمالاً، ومن أمثلتها ما يلى:

caffeine الكافين

paraxanthine
adenine
formalin الفورمالين
phenols الفينولات
maleic hydrazide الماليك هيدرازيد
Potassium thiocyanate ثيوسيانات البوتاسيوم
dichloroacetone
chloroacetone

كما تقسم المركبات المحدثة للطفرات - حسب المجموعة الكيميائية التي تنتمي إليها - إلى المجاميع التالية:

١ - مجموعة شبيهات القواعد Base Analogues: تحل محل القواعد النيتروجينية في الأحماض النووية، ومن أمثلتها ما يلي:

5-bromo-uracil
5-bromodexoyuridine
2-amino-purine

ومن المركبات القريبة من شبيهات القواعد ما يلي:

8-ethoxy caffeine
maleic hydrazide
Theophyline
Paraxanthine
Theobromine
Tetramethyluric acid
Nebularine

٢ - مجموعة مضادات الحيوية Antibiotics، ومن أمثلتها ما يلي:

Azaserine
mitomycin C
streptonigrin
actinomycin D

٣ – مجموعة المركبات القلوية Alkylating Agents:

تنتمي المركبات القلوية المحدثة للطفرات إلى مجاميع كيميائية مختلفة، منها مركبات المسترد الكبريتية Sulfur Mustards، ومركبات المسترد النيتروجينية Nitrogen Mustards، والإبوكسيدات Epoxides، والإيثيلين إمينات Ethyleneimines، والكبريتات Sulfates والسلفوناتات Sulfonates، والسلفونات Sulfones، واللاكتونات Lactones، والديازو ألكينات Diazoalkanes، ومركبات النيتروزو Nitrozo compounds.

ومن أهم المركبات الكيميائية القلوية المحدثة للطفرات ما يلى:

Ethyl-2-chloroethyl sulfide

2-chloroethyl-dimethyl amine

Ethylene oxide

Ethyleneimine

Ethyl methanesulfonate

Diazomethane

N-ethyl-N-nitroso urea

n-Butylmethanesulphonate

cis-1: 4-Dimethanesulphonoxybut-2-ene

p-N-di-(Choloroethy) - phenyl propionic acid

1: 4-Dimethanesulphonoxybutane

p-N-di (Chloroethyl)-phenylamino butyric acid

trans-1: 4-Dimethanesulphonxy but-2-enc

p-N-di-(Choloroethyl)-phenyl valeric acid

p-N-di-(Chloroethy)-phenyl acetic acid

1:2, 3:4-Diepoxybutane

D: P-N-di-(Chloroethyl)-phenylalanine

L:p-N-di-(Chloroethyl)-phemylalanine

1:4-Dimethanesulphonoxybut-2-ene

p-N-di-(Choroethyl)-phenyl butyric acid

2:4:6-tri-(Ethyleneimino)-1:3:5-Triazine

٤ – مجموعة الأزايد Azide: ومن أمثلتها ما يلى:

Sodium azide

٥ – مجموعة الهيدروكسيل أمين Hydroxylamine: من أمثلتها ما يلى:

Hydroxlamine

٦ – مجموعة حامض النيتروز: Nitrous Acid .. من أمثلتها ما يلى:

Nitrous Acid

٧ – مجموعة الأكريدينات Acridines .. ومن أمثلتها ما يلى:

Acridine orange

٨ – مركبات أخرى مثل:

Chloroacetone

Dichloroacetone

Potassium Thiocyanate

Ethyl Carbamate

Formalin

Phenols (عدة فينولات)

Manganous chloride

ويبين شكل (١٠–١) التركيب الكيميائى البنائى لبعض من تلك المركبات المطفرة (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

ويُجمع الباحثون على أن أهم المركبات التى تستخدم فى استحداث الطفرات، هى ما يلى (عن Fehr ١٩٨٧، و Chopra ٢٠٠٠):

١ – إثيل ميثان سلفونيت Ethyl methansulfonate:

الرمز: EMS.

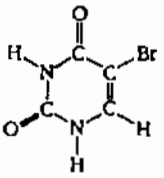
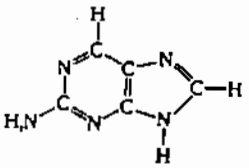
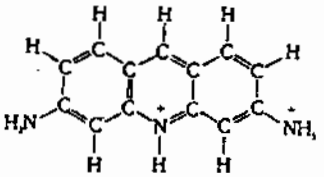
التركيب الكيميائى: $CH_3SO_2OC_2H_5$.

الطبيعة: عديم اللون.

التركيز المستعمل عادة: ٠,١–٠,٣٪.

يعد الإثيل ميثان سلفونيت أهم المركبات المحدثة للطفرات، وأكثرها استعمالاً، وهو

غير سام نسبيًا. يستخدم المركب على صورة محلول مائى تنقع فيه البذور أو الجذور الصغيرة للنباتات التى يراد معاملتها، وأكثر الطفرات التى يحدثها هى من النوع العاملى.

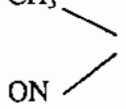
الاسم الكيميائى للمركب	الاسم العادى أو المختصر للمركب	التركيب الكيميائى
I. Alkylating agents المركبات القلوية		
Di-(2-chloroethyl) sulfide	Mustard gas or sulfur mustard	$Cl—CH_2—CH_2—S—CH_2—CH_2—Cl$
Di-(2-chloroethyl) methylamine	Nitrogen mustard	$Cl—CH_2—CH_2—N(CH_3)—CH_2—CH_2—Cl$
Ethylmethane sulfonate	EMS	$CH_3—CH_2—O—SO_2—CH_3$
Ethylethane sulfonate	EES	$CH_3—CH_2—O—SO_2—CH_2—CH_3$
N-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine	NTG	$HN=C(NH—NO_2)—N(O)—CH_3$
II. Base analogs شبيهات القواعد		
5-Bromouracil	5-BU	
2-Aminopurine	2-AP	
III. Acridines الأكريدينات		
2,8-Diamino acridine	Proflavin	
IV. Deaminating agents المزيلة لمجموعة الأمين		
Nitrous acid		HNO_2
V. Miscellaneous مركبات أخرى		
Hydroxylamine	HA	NH_2OH

شكل (١٠-١): التركيب الكيميائى البنائى لبعض من أهم المركبات المطفرة.

٢ – إن مثيل إن نيتروزويوريا N-methyl-N-nitrosourea:

الرمز: (MNH).

التركيب الكيميائى:



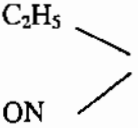
الطبيعة: مادة صلبة صفراء اللون

التركيز المستعمل عادة: ٠,٠١–٠,٠٣٪.

٣ – إن إثيل إن نيتروزويوريا N-ethyl-N-nitrosourea:

الرمز: (ENH).

التركيب الكيميائى:



الطبيعة: مادة صلبة صفراء اللون.

التركيز المستعمل عادة: ٠,٠١–٠,٠٣٪.

٤ – آزايد الصوديوم Sodium azide:

التركيب الكيميائى: NaO_3.

الطبيعة: مادة صلبة بيضاء اللون.

التركيز المستعمل عادة: ٠,٠٠١–٠,٠٠٤ مولار M.

٥ – إثيل نيتروزويوريثين Ethyl nitroso urethane:

الرمز: (ENU).

٦ – إثيلين إمين Ethyleneimine:

الرمز: (EI).

٧ – داى إثيل سيلفيت Diethyl sulfate:

الرمز: (DES).

كيفية إحداث المركبات المطفرة لتأثيرها

نجد – بصورة عامة – أن المركبات الكيميائية المطفرة تحدث تأثيرها بطريقتى التأين والإثارة، وينتج عنها طفرات عاملية أكثر من التحورات الكروموسومية، إلاّ أن النسبة بين نوعى الطفرات تختلف باختلاف المركب المستعمل (Williams ١٩٦٤، و Lapins ١٩٨٣).

تنتمى المركبات المطفرة المفضلـة إلى مـا يعـرف باسـم الـ alkylating agents، وهـى تتضمن المركبات: EMS، و MNH، و ENH، ويعنى بالـ alkylation إحـلال مجموعـة alkyl (مثل C_2H_5 من EMS) محل ذرة أيدروجين فى قاعدة آزوتية بالدنا.

ويُحدث الـ akylation للدنا التأثيرات التالية:

١ – إذا حدث فى مجموعة الفوسفات فإنه تتكون phosphate triesters تكـون غـير ثابتـة، وتطلق مجموعة الـ alkyl، ولكـن إذا مـا تبقـى عدد كـاف مـن مجموعـات الـ alkyl، فإنها تتعارض مع انقسام الدنا. وأحيانًا .. يتحلل الـ phosphate triesters بـين مجموعتى السكر والفوسفات؛ مؤديًا إلى تقطع شريط الدنا.

٢ – إذا حدث فى القواعد الآزوتية فإن الموقع السـابع للجوانـين يكـون هـو المفضـل لعملية الـ alkylation، إلا أن معظم التأثيرات المطفرة تنشأ فـى حـالات الـ alkylation عند الموقع السادس للجوانين، حيث يمكنه الاقتران مع الثيامين؛ مما ينشأ عنه ترحيـل transition لمواقع اقتران القواعد.

٣ – يمكن للـ alkylated guanine أن ينفصل عـن الديوكسـى ريبـوز deoxyribose؛ مما يجعله depurinated. ويمكـن أن تُمـلأ تلـك الفجـوة – حينئـذٍ – بـأى قـاعدة أثنـاء ازدواج الدنا؛ مما يؤدى إلى حدوث الطفرات (عن Chopra ٢٠٠٠).

ولدراسة فعل المركبات الكيميائية المحدثة للطفرات على المستوى الجزيئى .. يراجع Drake (١٩٦٩).

الأمور التى تجب مراعاتها بشأن استخدام المركبات المطفرة

تعتبر المركبات المطفرة شديدة التفاعل؛ فهى تتفاعل حتى مع الماء الذى تُذاب فيـه؛ فمثلاً يتفاعل الـ EMS مع الماء معطيًا methane sulphonic acid وإيثانول، كما يلى:

$$CH_3SO_2OC_2H_5 + H_2O \longrightarrow CH_3SO_2OH + C_2H_5OH$$

ولذا .. فإنه – عمليًـا – يجـب تحضـير محـاليل المركبـات المطفـرة قبـل اسـتعمالها مباشرة، وألاّ تخزن. وتقاس سرعة تحلل تلك المركبات بفترة نصـف الحيـاة half life، وهى الوقت الذى يستغرقه تحلل نصف الكمية الأصلية. وعلى سبيل المثال .. تقدر فـترة نصف الحياة فى الـ EMS فـى المـاء (عنـد pH=٧,٠) بـ ٩٣ سـاعة علـى ٢٠°م، و ٢٦ سـاعة على ٣٠°م، و ١٠,٤ سـاعة على ٣٧°م.

وتوّصف الجرعة بكل من تركيز المركب المستخدم ومدة المعاملة الكلية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

هذا .. ويجب تداول جميع المركبات المحدثة للطفرات بحذر شديد؛ فتؤخذ كافة الاحتياطات كي لا تصل منها أية كمية إلى جوف الإنسان، أو تلامس جلده، كما ترتدى القفازات عند زراعة البذور المعاملة.

الأهداف التى تجرى لأجلها برامج التربية باستحداث الطفرات

لا يلجأ المربى إلى التربية باستحداث الطفرات إلاّ بعد استنفاذ كل الوسائل الأخرى الممكنة لتحسين المحصول. ويجرى برنامج التربية بالطفرات – عادة – لتحقيق واحد أو أكثر من الأهداف التالية:

١ – إحداث طفرات فى جين واحد، أو فى عدد محدود من الجينات:

يكون ذلك هو الهدف الأمثل، عندما يرغب المربى فى تحسين أحد الأصناف الجيدة فى إحدى الصفات المهمة التى تنقصه؛ خشية أن تؤدى التربية بالطرق الأخرى إلى فقدان الصنف بعض خصائصه التى تميزه عن غيره، وكثيرًا ما يفاضل المربى بين طريقتى التربية بالتلقيح الرجعى وبالطفرات، آخذًا فى الحسبان مدى سهولة إحداث الطفرة المرغوبة، ومدى ارتباطها بالطفرات الأخرى غير المرغوبة.

وتجدر الإشارة إلى أن التربية بالطفرات لاستحداث طفرة فى جين واحد .. هى الطريقة الوحيدة الممكنة لتحسين الأصناف الممتازة من المحاصيل الخضرية التكاثر، نظرًا لأن اللجوء إلى التكاثر الجنسى عند تربيتها يعنى الابتعاد كثيرًا عن التركيب الوراثى للصنف. وعمليًا .. تعتبر التربية بالطفرات فى المحاصيل الخضرية التكاثر بديلة للتربية بطريقة التهجين الرجعى فى المحاصيل الجنسية التكاثر.

هذا .. وقد تستحدث الطفرات العاملية بغرض الاستفادة منها فى تحسين المحصول فى برامج التربية الأخرى.

٢ – تحسين الصفات الكمية:

على الرغم من أن الصفات الكمية يتحكم فيها عدة جينات .. إلاّ أنه أمكن إحراز تقدم كبير فيها بالتربية بالطفرات؛ فمثلاً .. تمكن Gregory فى عام ١٩٥٦ من إنتاج

طفرات من الفول السودانى بالمعاملة بأشعة إكس، وكانت هذه الطفـرات أعلـى محصـولاً من الصنف الأصلى (عن Briggs & Knowles ١٩٦٧).

٣ – إحداث زيادة فى نسبة العبور:

قد يكون الغـرض مـن تعريـض النباتـات للعوامـل المطفرة – خاصـة الإشـعاع – هـو إحداث زيادة فى نسبة العبور؛ لإعطاء الفرصـة لحـدوث عبـور بـين الجينـات المرتبطـة بشدة وبين الجينات التى توجد فى المناطق القريبة من السنترومير، وهى التى تقل فيـها نسبة العبور الطبيعى. ويساعد العبور – فى هذه الحالات – على انعزال تراكيب وراثيـة جديدة، قد يرغب المربى فى الحصول عليها.

٤ – إحداث تحورات كروموسومية:

تحدث المعاملة بالعوامل المطفرة تحورات كروموسومية كثيرة يمكن الاستفادة بها فـى برامج التربية؛ فمثلاً .. أمكن – عن طريق إحداث كسـور كروموسومية فى أمـاكن معينـة من الـكروموسومات – نقل صفة المقاومة لصدأ الأوراق فى القمح من أحـد الأنـواع البريـة إلى القمح المزروع.

٥ – إحداث طفرات فى الجينـات السيتوبلازميـة التـى تتحكـم فـى الصفـات التـى تورث عن طريق الأم. ويذكر أنه حتى عام ١٩٧٢ أمكن إنتاج ٩٨ صنفًا محصوليًا، و ٤٧ صنفًا من نباتات الزينة من طفرات مسـتحدثة. ومـن الأصنـاف المحصوليـة .. أنتـج ٨٥ صنفًا منها بالانتخاب المباشر للطفـرات المسـتحدثة، بينمـا أنتجـت الثلاثـة عشـر صنفًـا الأخرى من برامج تربية تضمنـت تـهجينات بـين الطفـرات وأصنـاف – أو سـلالات – أخرى (Welsh ١٩٨١).

ويمكن القول إنه فى حالات عدم وجود الصفات المرغوبة فـى جـيرمبلازم المحصـول (المحلى والعالمى)، أو عندما لا يُرغب فى إحداث أى تغيير وراثـى فـى صنـف تجـارى هام (ولو بطريقة التهجين الرجعى) .. فإن التربيـة بـالطفرات تعـد هـى الطريقـة المثلـى لتحسين المحصول وإكسابه الصفات المطلوبة. ولا يعتد – فـى هـذا الشـأن – بانخفـاض معدل حدوث الطفرات، أو بزيادة نسبة الطفرات الضارة، فإن طفرة واحد مفيدة من كـل ألف طفرة يمكن أن تسهم فى تحسين المحصـول بشـكل جوهـرى، خـلال فـترة زمنيـة وجيزة، وبجهـد أقل مما فى طرق التربية الأخرى.

طرق المعاملة بالعوامل المطفرة

توجد أربع طرق رئيسية لمعاملة النباتات بالعوامل المطفرة هى:

أولا: معاملة حبوب اللقاح

تتميز طريقة معاملة حبوب اللقاح بسهولتها وإمكان التحكم فى العوامل البيئية المحيطة من رطوبة، وحرارة، وضغط جوى ... إلخ، كما تعامل كميات كبيرة من حبوب اللقاح فى حيز صغير. وتنفرد طريقة معاملة حبوب اللقاح بميزة أخرى، وهى أن الطفرات المحدثة فى حبة اللقاح تنتقل إلى كل خلايا الجنين الذى ينشأ منها (بعد إخصابها إحدى البويضات)، ثم إلى كل خلايا النبات الذى ينمو منه.

ثانياً: معاملة البذور

تتميز طريقة معاملة البذور – مثل الطريقة السابقة – بسهولتها وإمكان التحكم فى العوامل البيئية المحيطة، مع معاملة كميات كبيرة من البذور فى حيز صغير، إلا أن الطفرة إن حدثت فى إحدى خلايا الجنين فى البذرة .. فإنها لا تظهر إلا فى جزء من النبات الذى ينمو منها؛ فلا يكون النبات كله ذا تركيب وراثى واحد كما يحدث عند معاملة حبوب اللقاح.

وتختلف الجرعة المناسبة من الإشعاع لمعاملة البذور باختلاف النوع المحصولى، وأفضلها هى التى تؤدى إلى فقدان حيوية ٥٠٪ من البذور، وهى التى تعرف باسم Lethal Dose 50 (LD_{50}). وقد تحددت بالفعل الجرعة المناسبة من أشعة إكس بالنسبة لمعظم الأنواع المحصولية. ويراعى أن تكون البذور التى يراد معاملتها عالية الحيوية، وتحتوى على قدر مناسب من الرطوبة، ولا تكون رطوبتها شديدة الانخفاض أو عالية بدرجة كبيرة.

ثالثاً: معاملة الأجزاء الخضرية

تختلف الجرعة المناسبة لمعاملة الأجزاء الخضرية باختلاف النوع والصنف، وتزيد فى الأنسجة المتخشبة عما فى الأنسجة العشبية، وتتراوح الجرعة المناسبة غالبًا بين ٢٠٠٠، و ٤٠٠٠ رونتجن.

ويحسن أن تجرى المعاملة فى أولى مراحل تكويـن البرعم، وأفضـل وقت لذلك هـو عندما يكون برعم المستقبل عبارة عن خليـة واحـدة. أمـا إن كـان ذلك صعب التحقيـق فتجب محاولة تطوير طرق جديدة لتشجيع تكويـن براعـم عرضيـة مـن الأجـزاء المعاملة (IAEA ١٩٦٨).

ويفضل إجراء المعاملة على البادرات الصغيرة؛ لسهولة تداولها وإحضارها للمفـاعلات فى أصص.

كما يعامل خشب الطعوم لأشجار الفاكهة أثناء الشتاء والربيع، ثم يطعم على الأصـل المناسب، تبدو النموات الأولى التى تظهر من البراعم المعاملة طبيعية عادة، وتجب إزالـة هذه النموات؛ لأن ذلك يزيد من فرصة ظهور الطفرات فى النموات الجديدة. ومع تكـرار التقليم .. فإن خشب الطعم قد يستمر فـى إنتـاج نمـوات تظـهر فيـها طفـرات جديـدة، وغالبًا ما تكون معظم الطفرات المتكونة على شكل كيميرا محيطية.

هذا .. ولا يكون من اليسير معاملة الشجيرات والأشجار بالإشعاع؛ لصعوبة تداولها.

ولا تستخدم النظائر المشعة بكثرة فى إحداث الطفرات؛ نظرًا لصعوبة التخلص منها، وهى تفضل عند الرغبـة فى إحـداث الطفـرات فـى الأنسـجة الداخليـة للنبـات، وذلـك بتغذية النبات بأحد العناصر المشعة مثـل الفوسـفور المشـع ^{32}P أو الكـبريت المشـع ^{35}S؛ حيث يمتصها النبات كما لو كانت عناصرها ثابتة، ويتحرك العنصر مع الماء المتـص إلى الأنسـجة الميرستيمية. وتنتقـل هـذه النظـائر مـع تيـار المـاء فـى النبـات كأيونـات لهـذه العناصر، ولكنها تتغير أثناء وجـودها فـى النبـات – بسـبب عـدم ثباتـها – إلى عنـاصر أخرى؛ فيتغير ^{32}P إلى كبريت، ويتغير ^{35}S إلى كلورين عندما تشع منها جزيئات بيتا.

وتجدر الإشارة إلى أفضلية معاملة النباتات المزهرة؛ لأن الانقسام الميـوزى (الاختزالى) يكون أكثر حساسية للإشعاع من الانقسام الميتوزى.

هذا .. ولا تجب معاملـة الأجـزاء الخضريـة المصابـة بالفيروسـات إلا عنـد الضـرورة القصوى. ويلزم – فى هذه الحالة – التمييز بين أعـراض الإصابـة الفيروسـية والطفـرات التى يمكن أن تظهر نتيجة للمعاملة.

ولمزيد من التفاصيل عن برامج التربية بالطفرات فى الفاكهة والمحاصيل الحقلية التى تتكاثر خضريًّا .. يراجع IAEA (١٩٧٣).

رابعًا: معاملة مزارع الخلايا والأنسجة

تعامل مزارع الخلايا أو الأنسجة بالعامل المطفر، ثم تقيم المزرعة بعد المعاملة فى بيئات تسمح بالتعرف على الصفات المرغوبة، وتنمى الخلايا أو الأنسجة الحاملة للطفرة المرغوبة، إلى أن تصبح نباتات كاملة.

ويتميز استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة بما يلى:

١ – إمكان التحكم فى عديد من العوامل الضرورية لإجراء الانتخاب بدرجة أكبر مما فى النباتات العادية.

٢ – نظرًا لأن المزارع تكون فى صورة خلايا أو بروتوبلاست، فإن مشاكل الـ diplontinc selection تقل كثيرًا.

٣ – إذا ما تكونت نباتات المزارع من خلايا مفردة فإنه تقل كثيرًا حالات الطفرات الكيميرية.

٤ – يزداد معدل ظهور الطفرات لأن كل خلية بالمزرعة تكون على اتصال مباشر بالعامل المطفر.

٥ – يمكن إجراء الانتخاب بسهولة شديدة – سواء لما يتعلق بالعوامل الحيوية أو غير الحيوية – بإضافة عامل الشدّ المناسب إلى بيئة الزراعة التى تتعرض للعامل المطفر.

٦ – يمكن تقييم ملايين الخلايا (يمكن أن تعطى أى منها نباتًا جديدًا) فى طبق بترى واحد.

٧ – يُسهِّل استعمال عشائر الخلايا الأحادية العدد الكروموسومى التى يتحصل عليها من مزارع المتوك وحبوب اللقاح .. يُسهِّل ذلك عملية التعرف على الطفرات وتثبيتها، حتى ولو كانت متنحية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٠).

هذا .. ويتأثر إنتاج الطفرات فى مزارع الأنسجة والخلايا بعديد من العوامل، نذكر منها ما يلى:

١ – مصدر النباتات المستخدمة فى الزراعة (الـ explants).

٢ – التركيب الوراثى للنبات المستخدم.

٣ – بيئة الزراعة.

٤ – عمر المزرعة.

وللتفاصيل المتعلقة بهذا الموضوع .. يراجع Brar & Jain (١٩٩٨).

وأيًا كانت طريقة المعاملة بالعوامل المطفرة .. فإنه تجب اتخاذ الاحتياطات اللازمة لمنع حدوث أى ضرر للقائمين بها.

العوامل المؤثرة فى فاعلية العوامل المطفرة

تتأثر مدى فاعلية العوامل المطفرة فى إحداث الطفرات بالعوامل التالية:

١ – مستوى الأكسجين:

يؤثر مستوى الأكسجين فى الجزء النباتى المعامل على مدى الضرر الذى يمكن أن يحدثه العامل المطفر له. فكلما ارتفع مستوى الأكسجين .. زادت الأضرار، وزادت معدلات التحورات الكروموسومية نسبة إلى الطفرات العاملية. ويمكن تقيل – أو تجنب – أضرار الأكسجين بمعاملة البذور، وهى مشبعة بالرطوبة، أو وهى فى حيز خال من الأكسجين. أما إذا رغب فى زيادة فاعلية وجود الأكسجين .. فإن المعاملة إما أن تجرى على البذور الجافة، وإما أن توضع البذور فى محاليل المركبات الكيميائية المطفرة، مع دفع فقاقيع الهواء بها.

٢ – المحتوى الرطوبى:

يرتبط تأثير المحتوى الرطوبى مباشرة بمستوى الأكسجين فى النسيج النباتى المعامل؛ إذ إن المحتوى الرطوبى المرتفع يصاحبه انخفاض فى مستوى الأكسجين، ويختلف مدى تأثير المحتوى الرطوبى باختلاف الأنواع النباتية، والعوامل المطفرة المستخدمة؛ فهو أكثر أهمية بالنسبة لأشعة إكس، وأشعة جاما منه بالنسبة للنيترونات السريعة.

٣ – درجة الحرارة:

ليس لدرجة الحرارة أهمية تذكر عند المعاملة بالإشعاع، ولكنها على درجة كبيرة من الأهمية بالنسبة للمعاملة بالمركبات الكيميائية المطفرة؛ حيث تؤثر فى الفترة الزمنية

اللازمة لحدوث التفاعل بين المركب والنسيج النباتى. ويطلق على الفترة الزمنية اللازمة لتفاعل نصف كمية المركب مع النسيج النباتى اسم نصف الحياة half-life. وتتراوح هذه المدة بالنسبة لمركب الـ EMS من ٧,٩ ساعة فى حرارة ٤٠°م إلى ٧٩٦ ساعة فى حرارة ٥°م، وتبلغ مدة نصف الحياة للمسترد الكبريتى sulfur mustard ثلاث دقائق فقط على حرارة ٣٧°م.

٥ – الظروف السابقة للمعاملة

يؤدى نقع البذور فى الماء لفترة – قبل تعريضها للعوامل المطفرة – إلى زيادة نسبة رطوبتها، وفقدان بعض المركبات القابلة للذوبان فى الماء، وبدء نشاط الإنبات وتمثيل الحامض النووى DNA. وكل هذه التغيرات تؤثر فى معدل حدوث الطفرات. ويمكن زيادة رطوبة البذور دون أن تباشر فى الإنبات بنقعها فى الماء على درجة الصفر المئوى. ويراعى – فى هذه الحالة – أن يكون الماء متحركًا حول البذور مع تغييره كل ١٥–٣٠ دقيقة.

٦ – الظروف التالية للمعاملة:

يجب ألا تخزن البذور المعاملة بالإشعاع لأكثر من أسابيع قليلة قبل زراعتها، ويفضل أن يكون تخزينها فى وسط خال من الأكسجين. وإذا كان من الضرورى تخزينها لفترات أطول من ذلك .. فيجب أن يكون التخزين على درجة الصفر المئوى.

أما فى حالات المعاملة بالمركبات الكيميائية .. فإنه يراعى غسيل البذور بماء جار لمدة ثمانى ساعات، إذا رغب فى تجفيف البذور وتخزينها قبل الزراعة، ولكن الأفضل هو غسيل البذور بالماء لفترة قصيرة، ثم زراعتها مباشرة.

٧ – الـ pH:

للـ pH أهمية كبيرة بالنسبة للمركبات الكيميائية المطفرة لأنه يؤثر فى مدى الضرر الفسيولوجى، ومعدلات الطفرات العاملية والتحورات الكروموسومية التى يمكن أن يحدثها المركب. وتختلف المركبات فى هذا الشأن؛ فبينما يستعمل مركب الـ EMS عند pH ٧ .. فإن أزايد الصوديوم sodium azide يكون أكثر فاعلية عند pH ٣. ويفضل – إذا استعملت المحاليل المنظمة – أن يستعمل منظم الفوسفات بتركيز لا يزيد على ٠,١ مولار.

الأمور التى تجب مراعاتها فى برامج التربية بالطفرات

تجب أن تتوفر لدى المربى رؤية واضحة بالنسبة للأمور التالية فى برامج التربية بالطفرات.

١ – اختيار الجيرمبلازم المناسب لمعاملته:

إذا كان المطلوب هو تحسين صنف جيد فى صفة مرغوبة تنقصه .. فإن أفضل جيرمبلازم للمعاملة هو ذلك الصنف. وإذا كانت الصفة التى يُراد تحسينها كمية .. فإن على المربى أن يقارن بين مستوى الصفة فى الصنف التجارى، ومستواها فى السلالات والأصناف الأخرى، حتى إن لم تكن تصلح للزراعة التجارية؛ فإذا كان مستوى الصفة المرغوبة أعلى فى سلالة غير مزروعة مما فى الصنف التجارى .. فإن فرصة تحسين مستوى الصفة إلى الدرجة المطلوبة بالطفرات تكون أكبر فى السلالة عما فى الصنف التجارى، ويقابل ذلك أن السلالة لن يمكن استخدامها فى الزراعة بعد اكتسابها الصفة، وإنما تستخدم كمصدر للصفة فى برنامج للتربية، بينما يستعمل الصنف التجارى فى الزراعة مباشرة بعد اكتسابه الصفة بالطفرات.

٢ – اختيار مصدر البذور المناسب:

تجب العناية باختيار البذور من أفضل المصادر الموثوق بها، لكى تمثل الصنف تمثيلاً صادقًا. وأفضل البذور لهذا الغرض هى بذور الأساس Foundation Seed، أو حتى بذور المربى Breeder Seed إن أمكن؛ لتجنب وجود أية نباتات مخالفة للصنف يمكن أن تعتبر – خطأ – طفرات مستحدثة.

٣ – اختيار العامل المطفر والجرعة المناسبة:

يلزم – إن لم تتوفر معلومات كافية عن أنسب العوامل المطفرة والجرعة المناسبة منها – أن تتم المعاملة بأكثر من عامل مطفر، وبعدة جرعات من كل منها. كما تجب زراعة نباتات المقارنة بعد معاملة بذورها بالطريقة ذاتها، ولكن دون التعرض للعامل المطفر.

٤ – اختيار عدد البذور المناسب للمعاملة:

يتوقف عدد البذور المناسب التى تجب معاملتها على حيوية البذور بعد المعاملة، وعدد النباتات والأنسال التى يمكن تقييمها فى الجيل الطفرى الثانى، ومعدل حدوث

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).

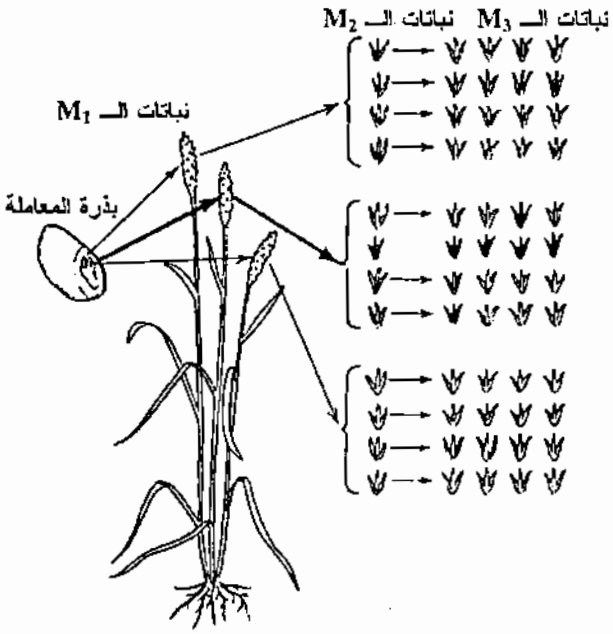
نادرًا ما تظهر أية طفرات على نباتات الجيل الطفرى الأول (M1)؛ لأن معظم الطفرات تكون متنحية، بينما تظهر على نباتات هذا الجيل التغيرات الفسولوجية التى لا تورث (ويراعى – مع ذلك – انتخاب نباتات الجيل الطفرى الأول التى يشتبه فى أن بها طفرات). تلقح جميع نباتات الـ M_1 ذاتيًا، أو يجرى التلقيح فيما بينها فى حالات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

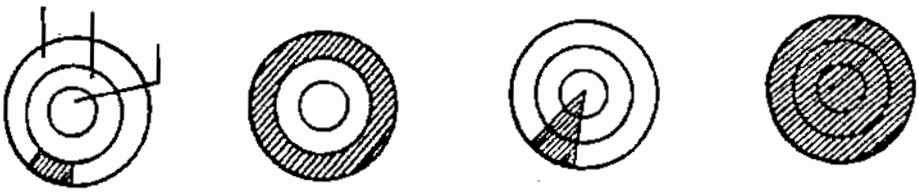
وأنسب الجرعات هى التى تكون قريبة من الـ LD_{50} أو الـ GR_{50}.

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)

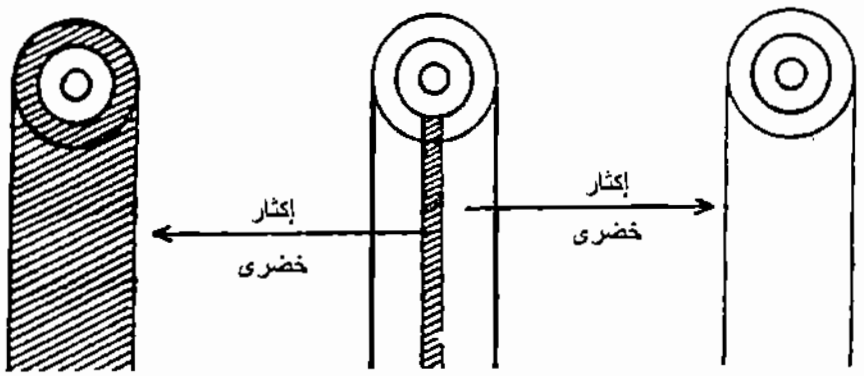
شكل (١٠-٣): أنواع الطفرات التى قد تظهر فى قطاع عرضى بالقمة النامية لنبات خضرى التكاثر.

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.

ويمكن عن طريق معاملة البراعم العرضية تجنب قوى الـ diplontic selection، وهى تقنية تأخذ فى الاعتبار أن البراعم العرضية التى تتكون عند قاعدة أعناق الأوراق المفصولة تنشأ من خلية واحدة أو مجموعة قليلة من خلايا البشرة، علمًا بأن عدد الأنواع النباتية التى يمكن إكثارها بواسطة النبتات الصغيرة العرضية التى تنشأ على الأوراق المفصولة يزيد عن ٣٥٠ نوعًا. هذا إلا أن نجاح تلك الطريقة يتأثر بعمر الورقة والجزء المستخدم فيها وبيئة الزراعة والظروف البيئية (عن Chopra ٢٠٠٠).

أمثلة لبعض إنجازات التربية باستحداث الطفرات

كان إنتاج أول الأصناف الجديدة باستحداث الطفرات بعد أربع سنوات فقط من نشر Stadler لأبحاثه فى هذا الموضوع. ولقد أمكن حتى عام ٢٠٠٠ إنتاج أكثر من ١٨٠٠ صنف جديد بطريقة استحداث الطفرات شملت ١٥٤ نوعًا نباتيًا، وتضمنت عديد من المحاصيل الاقتصادية الهامة، مثل: القمح، والشعير، والقطن.

وقد كان توزيع الأصناف المطورة - حسب المحصول - كما يلى (عن Chopra ٢٠٠٠):

المحصول	العدد
الأرز	٣٢٢
الشعير	٢٤٨
القمح (bread)	١٤٠
القمح (durum)	٢٥
الذرة	٤٧
نجيليات أخرى	٥٤
البقوليات	٢٠٦
المحاصيل الصناعية	٦٠
المحاصيل الزيتية	٥٤
الخضر	٥١
محاصيل أخرى	٧٩

وبينما خضعت بعض الطفرات لبرامج تربية بالتهجين والانتخاب قبل استعمالها كأصناف جديدة، فإن كثيرًا منها استعملت مباشرة كأصناف جديدة (Ahloowalia & Maluszynski ٢٠٠١).

ويمكن إيجاز أبرز إنجازات التربية باستحداث الطفرات، فيما يلي:

● شهدت زراعة الأرز تطورًا كبيرًا بعد إدخال الأصناف الطفرية شبه المتقزمة في الزراعة، وهي التي تسمح بزيادة معدلات التسميد الآزوتي دون التعرض لمشكلة الرقاد. ومن أهم تلك الأصناف: Calrose 76 في كاليفورنيا، و Basmati 370 في باكستان، وسلسلة أصناف PNR في الهند، و Zhefu 802 في الصين، و RD6، و RD15 في تايلاند. كما سمحت طفرات الأرز المتنحية غير الحساسة للفترة الضوئية بإنتاج هجن الأرز بالاعتماد على سلالتين فقط بدلاً من ثلاث.

ويبين جدول (١٠-٥) بعضًا من أهم الصفات النباتية الأخرى التي أمكن استحداثها بالطفرات في أصناف الأرز المزروعة.

جدول (١٠-٥): الصفات النباتية التي أمكن تحسينها باستحداث الطفرات في أصناف الأرز المزروعة (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٥).

الصفة	عدد الأصناف الطفرية
شبه التقزم semidwarfness	١٢٦
التبكير	١١٠
تكوين الخلفات tellering	٢٤
زيادة الطول tallness	٢٣
نوعية الحبوب	١٦
تحمل العصفة blast tolerance	١٤
التأقلم	١٢
الإندوسبرم الجلوتيني glutinous endospem	١٢
تحمل الملوحة	٩
تحمل البرودة	٦
عدم الحساسية للفترة الضوئية	٥
التأخير	٢

● حُصل فى النباتات الخضرية التكاثر على كثير من الطفرات بمعاملة العقل الساقية، والأوراق، والنباتات الساكنة. وتبعًا لإحصائيات منظمة الأغذية والزراعة التابعة للأمم المتحدة فإنه من بين ٤٦٥ طفرة حُصل عليها فى نباتات خضرية التكاثر، فإن غالبيتها كانت من الزهور ونباتات الزينة؛ بينما كان القليل منها من الفاكهة.

● أصبح استحداث الطفرات أحد أهم وسائل التربية فى بعض نباتات الزينة، مثل الألسترومريا ulstromeria، والبيجونيا begonia، والأقحوان chrysanthemum، والبوجاينفيللا bougainvillea، والورد rose، والأزاليا azalea، والقرنفل carnation، والداليا dahlia، والاستربتوكاربس streptocarpus.

● أنتجت طفرات من بسلة الزهور *Lathyrus sativus* تنخفض نسبة الـ neurotoxins فى بذورها إلى ٠,٠٣٪، مقارنة بنسبة ٠,٣٪ فى الأصناف العادية، الأمر الذى يجعلها صالحة للاستهلاك الآدمى، علمًا بأن هذا النبات ينمو جيدًا فى ظروف الجفاف والظروف الجوية القاسية، كما أن الطفرة أبكر وأكثر محصولاً من الصنف الأصلى.

● إن من بين أهم إنجازات التربية بالطفرات تطوير محصول جديد تمامًا، مثلما حدث بالطفرتين اللتان حولتا الكتان *Linum usitatissimum* من محصول لا يصلح الزيت المستخرج من بذوره للاستهلاك الآدمى إلى أحد محاصيل الزيوت الهامة (اللينولا linola) الذى تقوم عليه صناعات كبيرة. أثرت الطفرتان فى مسارات تمثيل الأحماض الدهنية، وأحدثتا نقصًا كبيرًا فى محتوى الزيت من حامض اللينوليك linoleic acid، وبذا تحول الزيت الذى كان سريع التزنخ ولا يصلح إلا للأغراض الصناعية إلى زيت يقارن بزيوت دوار الشمس والكانولا (عن Larkin ١٩٩٨).

● أمكن عن طريق إشعاع مزارع الأنسجة فى نخيل البلح، والتفاح، والبطاطس، والبطاطا والأناناس الحصول على طفرات من تلك المحاصيل لم يكن من الممكن الحصول عليها من قبل.

ومن بين الطفرات التى نتجت من مزارع الأنسجة طماطم ذات مواصفات مختلفة فى اللون والطعم والقوام والقدرة على التخزين، وذرة مقاوم لمبيد الحشائش imidazole،

وطفرة حشيشة برمودا *cyanodon dactylon* ذات مقاومة عالية للـ fall armyworm (عن Larkin ١٩٩٨).

ولقد أمكن عن طريق استحداث الطفرات فى مزارع الأنسجة الحصول على عديد من التغيرات الوراثية الهامة كما يلى (عن Maluszynski وآخرين ١٩٩٥):

المحصول	الطفرات المستحدثة
بسلة الزهور	تحمل البرودة
التبغ	تحمل اللوحة، ومقاومة البكتيريا *Pseudomonas syringae* وتحمل مبيدا الحشائش بكلورام picloram، وباراكوات paraquat
الفلفل	تحمل اللوحة
البرسيم الحجازى	تحمل اللوحة
القمح	تحمل الصقيع
الذرة	مقاومة فطر الـ *Helminthosporium*
لفت الزيت	مقاومة الفطر *Phoma lingam*
البطاطس	مقاومة الفطر *Phytophthora infestans*
بنجر السكر	مقاومة الفطر *Helminthosporium sacchari*
الأرز	زيادة الحامض الأمينى ليسين

● إن الطفرات التى أمكن الحصول عليها من نبات الـ *Arabidopsis* تستعمل حاليًا فى دراسة الجينات التى تتحكم فى الاستجابة للأوكسينات، والسيتوكينينات، وحامض الجبريلليك، وحامض الأبسيسك، والإثيلين، فيما يتعلق بالنمو النباتى، والإزهار، والشيخوخة، وتكوين الثمار ونضجها. كما تسمح تلك الطفرات بعزل الجينات ودراستها ونقلها؛ الأمر الذى يساعد فى إمراع تربية النباتات لمختلف الأغراض (عن Ahloowalia & Maluszynski ٢٠٠١).