

أستعمال التكنولوجيا الحيوية فى أمراض النبات

Applications Of Biotechnology In Plant Pathology

يعتبر التعريف الحديث للتكنولوجيا الحيوية biotechnology هو عبارته عن التعامل بكفاءة وبسهولة manipulation فى التحوير الوراثى للجينات والمادة الوراثية وبالإضافة إلى ذلك تكاثر الكائنات الحية وأن يكون ذلك بطرق تكنولوجية حديثة novel technologies . يعتبر هذا هو الأساس الحديث فى التعريف ولكن أصبح هذا التعريف أعم وأشمل . ومثال لذلك مزارع الأنسجة tissue culture والهندسة الوراثية genetic engineering والتي ينتج عنها كائنات حية محسنة ويمكن أيضا أن ينتج عنها مركبات مرغوبة . ويمكن إستعمال هذه الكائنات الحية والمركبات الناتجة إستعمالات متعددة مفيدة وإقتصادية ولرفاهية الإنسان . يوجد أمثله كثيرة لذلك فى فروع العلوم المختلفة ومنها على سبيل المثال وليس الحصر ما يأتى . إزالة البيض الزائد من رحم أنثى الأبقار ذات السلالات المتميزة بأنتاج عال من اللبن ثم يتم تلقيح البيض فى المعمل فى أنابيب الأختبار فى عدم وجود الأنثى أو الذكر أى *in vitro* بواسطة حيوانات منوية من ذكر الأبقار ويكون ذو تركيب وراثى متميز وأن تحمل حيواناته المنوية صفات متميزه وقد يكون لها علاقه بإدرار اللبن . يأخذ البيض الملقح ويوضع أى *Implanted* فى الجزء المخصص له من الجهاز التناسلى لأنثى أبقار من سلالات تتميز بأنها ذات إدرار لبن منخفض . تكون النتيجة أن هذه الأناث الأخيره تلد أبقار يمكن أن تكون ذات أدرار عال من اللبن . وننتقل إلى مثال آخر خاص بالإنسان والبكتريا وحيث أمكن نقل جين من الإنسان خاص بأنتاج الأنسولين إلى خلايا البكتيريا الغير مرضيه ونتيجة لتكاثر البكتيريا فإنها تنتج بلايين من الخلايا والتي يمكنها إنتاج الأنسولين بكميات كبيره وبسهولة كبيرة وفى وقت بسيط . والأهم من ذلك أنه قبل ذلك كان الأنسولين يأخذ من الحيوانات وقد كان يسبب

حساسيه لكثير من مرضى السكر ويسبب لهم مضاعفات مرضيه لأنه أنسولين حيوانى . وفى بعض الحالات ولأنه غريب عن جسم الإنسان فإنه يتكون فى جسم الإنسان المريض بالسكر أجسام مضاده لهذا الأنسولين وينتج عن ذلك مضاعفات وأضرار لمرضى السكر. ولكن الآن وحيث أن الجين المنتج للأنسولين بواسطة البكتيريا أصله من الإنسان فإن الأنسولين الناتج لا يسبب أى أضرار لمرضى السكر وذلك بالإضافة إلى رخص الأنسولين المنتج بهذه الطريقة. وبعد الحديث عن الحيوان والإنسان ننقل إلى النبات فإنه يمكن الآن زراعه متك النبات أو بدائى تكوين. حبوب اللقاح على بيئه مغذيه فى المعمل فينتج عن ذلك أعدادا كبيره من نباتات أحاديه haploid . وهذه يمكن أن تعامل معاملات خاصة مثل إضافة مركب الكولتسين حيث ينتج نباتات متماثلة ثنائيه homozygous diploid وعن طريق مزارع الأنسجه فإن ينتج ملايين من النباتات المتماثلة وراثيا فى غضون بضع أشهر وحيث يكون لهذه النباتات تركيب وراثى وصفات وراثيه مرغوبه مثل إنتاجيتها العاليه أو مقاومتها للأمراض .

تفيد التكنولوجيا الحيويه فى النبات plant biotechnology على فهم البيولوجيه الجزيديه للنبات plant molecular biology ويستعمل فى ذلك طرق مزارع الأنسجه المختلفه وأيضا الهندسه الوراثيه . حيث يتم تعريف وعزل ونقل الجين أو الجينات المرغوبه من نبات إلى آخر أو إلى كائن حى آخر. تسبب التكنولوجيا الحيويه فى النبات سهوله وسرعه التكاثر الخضرى للنبات وتسرع من برامج تربيته النبات كما أنها تزيد من إنتاجيه نواتج صناعيه للنبات عن طريق مزارع الأنسجه .

يمكن تلخيص أهميه استعمال التكنولوجيا الحيويه فى أمراض النبات فيما يأتى:

١ - إنتاج سريع للنباتات الخاليه من الطفيليات الممرضه أى الخاليه من الأمراض وذلك عن طريق التكاثر الخضرى السريع وبالتالي بالنسل الناتج من هذه النباتات يكون خال من الأمراض. ولكن يجب حمايه هذا النسل من الأصابة بالطفيليات لفترات حيث أن إنتاج هذه النباتات عن طريق مزارع الأنسجه وحيث أنها تكون متزاحمه أثناء إنتاجها كما أنها شديده وعاليه النجاس الوراثى وأيضا تعريضها لفترات طويله لظروف بيديه وظروف تغذيه معينه أثناء إنتاجها بواسطة مزارع الأنسجه يمكن أن يجعل هذه النباتات فجأة قابله للأصابه بموجه

مفاجأة outbreak من طفيل ممرض شديد قدره على الإصابة وينتج عن ذلك كارثة مرضيه.

٢ - أحيانا تكون الأصناف الجديدة الناتجة عن الهندسة الوراثية نتيجة نقل جين أو أكثر إليها غير قابله للتأقلم مع التغييرات المفاجئة في الظروف البيئية أو حتى مع الكائنات الحية الدقيقة وخاصة النباتية منها الموجودة في البيئة. وتصبح هذه الأصناف متأثره بذلك وقد يقل إنتاجها أو تفقد بعض أو كل مواصفاتها المتميزه.

٣ - يمكن أن يكون في المستقبل الحامل والناقل الرئيسي للجين vector من نبات معطى donor إلى نبات مستقبل recipient هي مسببات أمراض النبات مثل البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببه لمرض التدرن التاجي في كثير من العوائل النباتية وفيرس موزايك (تبرقش) القنبيط cauliflower mosaic virus وأيضا فيروسات أخرى.

٤ - دراسه الجينات المسببة لمقاومه النبات للمرض أو الأمراض وأيضا دراسة الجينات الموجوده في الطفيل والتي تسبب قدره الطفيل على أصابه طفيليات أخرى مسببه أمراض للنبات وذلك عن طريق الهندسه الوراثيه سيكون له دور كبير في المستقبل في مقاومه أمراض النبات ومنها المقاومه الحيويه. ويكون ذلك بإضافة جين أو جينات مقاومه للأمراض لأصناف النبات القابل للإصابة وذلك بواسطه الهندسه الوراثيه فتصبح هذه الأصناف مقاومه للأمراض وفي هذه الحالة يكون التعامل مع النبات. والعكس صحيح فيمكن أن يكون التعامل مع الطفيل حيث يمكن أن ينقل إليه جين أو جينات بواسطه الهندسه الوراثيه وبذلك يحدث تغيير في التركيب الوراثي للطفيل ويمكن لهذا الطفيل أن يصاد طفيل آخر ممرض للنبات وشديد قدره في إصابته للنبات وبذلك يقى النبات من الإصابة ويسمى هذا النوع من المقاومه بالمقاومه الحيويه biological control .

مزارع الأنسجة وأمراض النبات

تعرف مزارع الأنسجه tissue cultures بأنها زراعه أى جزء من النبات في ظروف بيئيه معقمه على بيئات صناعيه وهذه الأجزاء هي الجذر والساق والأوراق والمبيض والبويضات والمنتك والأنسجة وحبوب اللقاح والخلايا المفرده والبروتوبلاست.

أستعملت مزارع الأنسجة كثيرا في المحاصيل البستانية لإنتاج نباتات ذات صفات مرغوبه وقد أستعملت أيضا في أمراض النبات لإنتاج نباتات خالية من الأمراض أو مقاومه لها.

يعتبر العالم الفرنسي Morel موريل أول من تنبه إلى أهميه أستعمال القمم النامية للساق في إنتاج سيقان ونباتات خالية من الفيروس وقد طبق فكرته هذه على نباتات الداليا المصابه بأحد الأمراض الفيروسيه. زرع القمم الناميه للنبات المصاب على بيئه معقمه في المعمل وعاده تحتوى القمم الناميه على جزء قصير جدا يحمل ورقه أو ورقتين صغيرتين جدا. تتكون البيئه من بعض الأملاح مثل فوسفات بوتاسيوم ونترات الأمونيوم وكبريتات المغنسيوم وأحد السكريات مثل السكروز وبعض الفيتامينات مثل فيتامين الثيامين وبعض منظمات النمو مثل الجبريللين والكينتين kinetin وبعض الأحماض الأمينيه مثل الجليسين والآجار. تنمو القمم الناميه على البيئه وتكون ساق عاديه خاليه من الفيروس تأخذ هذه الساق وتزرع في بيئه خاليه من الحشرات والفيروسات فينتج منها نباتات داليا خاليه من الأمراض الفيروسيه. تباع درنات الداليا الناتجه من هذه الطريقه ويكون الأقبال عليها شديدا لخلوها من الفيروس.

أمكن بعد ذلك تطبيق هذه الطريقه على كثير من النباتات بطريقه إقتصاديه لإنتاج نباتات خاليه من الفيروس مثل القرنفل والبطاطس وقصب السكر والشليك والموز. فى حالة نباتات القرنفل توضع النباتات فى بيئه يمكن التحكم فى درجه حرارتها وترفع درجه الحرارة تدريجيا لمده أسبوعين حتى تصل إلى ٢٨ مع وجود رطوبه نسبيه ٩٠%. وتترك النباتات تحت هذه الظروف لمده شهرين ثم تؤخذ القمم الناميه وتزرع على بيئات معقمه صناعيه وتعطى هذه القمم سيقان ونباتات خاليه من الفيروس. تطبق هذه الطريقه أيضا فى نبات قصب السكر.

إنتاج نباتات خاليه من الفيروسات أو الفطريات

تطبق طريقه القمم الناميه بنجاح كبير فى نبات البطاطس لإنتاج تقاوى أى درنات خاليه من الفيروس على نطاق تجارى وتوجد شركات متخصصه الآن فى كثير من الدول لهذا الغرض. ترجع أهميه ذلك إلى أن نبات البطاطس نبات إقتصادي عالمى يزرع عاده فى كثير من دول العالم إن لم يكن جميعها مع بعض الاستثناءات وتعتبر الأمراض الفيروسيه

التي تصيب البطاطس مثل مرض إنتفاف الأوراق ومرض بترقش البطاطس عامل محدد في زراعته وإنتاج البطاطس. زراعته درنات مصابه بالفيروس ينتج عنها نباتات ضعيفه غير قادره على تكوين درنات البطاطس وبذلك تقل إنتاجيه النباتات أو تصبح معدومه. ولذلك يادئ ذى بدأ أن تكون الدرنات المستعمله للزراعة خاليه من الفيروس ولذلك فإنه توجد شركات متخصصه لذلك وتحقق ربح كبير عن طريق إنتاجها لدرنات خاليه من الفيروس من مزارع الأنسجه.

تتلخص فكره إنتاج البطاطس بهذه الطريقة في أن القمم النامية للبراعم الموجوده في عيون درنات البطاطس تعتبر خاليه من الفيروس. حيث وجد أن الفيروس يعيش في داخل خلايا النبات ولكنه لا يعيش في الجزء الطرفى من القمم الناميه والذي يشمل منطقة تسمى الغلاف أو الغطاء tunica والبدن corpus وهى عباره عن أنسجه مرستيمية وجزء من المرستيم المحيطى peripheral meristem والمرستيم العمودى rib meristem. أى أن الفيروس لا يعيش عادة في الأنسجه المرستيميه الموجوده في الجزء القمى من القمم الناميه وهذه هى الحقيقة التي إستفاد منها موريل Morel لإنتاج نباتات داليا خاليه من الفيروس. عند قطع هذا الجزء من القمم الناميه الخالى من الفيروس وتنميته على البيئه الصناعيه ينتج ساق خال من الفيروس. يستعمل ذلك في إنتاج درنات البطاطس حيث يتم فصل الجزء القمى من القمم النامية والذي يحتوى عادة على بدائيات ورفقتين خضريتين. يتم زراعة هذا الجزء على بيئه معقمه صناعيه تحتوى على أملاح وسكروز وبعض الفيتامينات ومنظمات النمو والأحماض الأمينية والآجار. تنمو القمم النامية وتنتج ساق عاديه ومنها نباتات عاديه. تزرع هذه النباتات في الصوب الخاليه من الحشرات وتكون تحت مراقبه مستمره للتأكد من خلوها من الفيروسات تقاوم الحشرات بكفاءه عاليه لأنها يمكن أن تكون عامل في نقل الأمراض الفيروسيه. تزرع هذه الدرنات في مساحات كبيرة بعد ذلك لإنتاج كميات كبيره من درنات البطاطس ويجب أن تكون مقاومة الحشرات بكفاءه عاليه.

يمكن أن تتبع نفس الطريقة للحصول على نباتات خاليه من فطريات الذبول

وهى *Fusarium oxysporum* و *Verticillium albo - atrum*.

إنتاج نباتات مقاومه للأمراض

يمكن باستعمال مزارع حبوب اللقاح إنتاج نباتات مقاومه للأمراض. تجرى فى هذه الطريقة زراعة المتك أو أجزاء منه أو حبوب اللقاح على بيئه صناعية فى المعمل تتكون هذه البيئه من بعض الأملاح المعدنية وبعض الفيتامينات وبعض منظمات النمو والأحماض الأمينية والسكرورز والآجار. يحدث نمو فى داخل حبه اللقاح وتتكون عده خلايا داخل حبه اللقاح ثم تنقسم هذه الخلايا لتكون كميه كبيره من الخلايا تضغط على الجدار وتمزقه. يتكون من هذا النمو بعد تحرره من جدار حبه اللقاح شكل كروي ثم قلبى ثم طوربيدى torpedo ومن الأخير يتكون النبات الصغير على البيئه. يلاحظ أن النباتات المتكونه بهذه الطريقة تكون أحاديه (1ن) لأنها ناتجه من حبوب اللقاح. تعتبر النباتات العاديه ثنائية (2ن) ولذلك فإنه أثناء تكوين هذه النباتات الأحاديه من حبوب اللقاح تعامل البيئه أو النوات بمركب الكولشيسين الذى يسبب تضاعف فى عدد الكروموسومات فتصبح النباتات الناتجه (2ن) بدلا من (1ن). أهميه هذه الطريقة فى أمراض النبات أنه يمكن عن طريقها إنتاج نباتات مقاومه للأمراض. أمكن فى اليابان إنتاج نباتات تبغ مقاومه لمرض الذبول بهذه الطريقه. وجد فى التبغ صنف مقاوم لسلاله معينه من الطفيل المسبب للمرض وتركيب النبات فى هذه الحالة AA ووجد صنف آخر مقاوم لسلاله أو سلالات أخرى من الطفيل وتركيب النبات فى هذه الحالة BB. وجد أن الصنف الأول قابل للأصابة بالسلاله الثانيه من الطفيل ولذلك فتركيبه الوراثى AAbb ووجد أن الصنف الثانى من نبات التبغ عكس الصنف الأول ولذلك فتركيبه الوراثى BBBb. عند تهجين هذين الصنفين ينتج فى الجيل الأول نبات تركيبه الوراثى Aa Bb. عند أخذ حبوب اللقاح من هذا النبات وزراعتها على البيئه المحتويه على الكولشيسين ينتج نباتات ثنائية بتركيبها الوراثى AAbb، AABB، aaBB، aabb، ناتجه من حبوب اللقاح تركيبها Ab و AB و aB و ab. عند زراعة هذه النباتات فى بيئه ملوثة بسلالات الطفيل فإن جميع هذه النباتات تموت عدا النباتات ذات التركيب الوراثى AABB حيث تكون مقاومه للمرض وأيضا أصيله فى هذه الصنفه. يلاحظ أيضا أن نسبة النباتات المقاومه الأصيله فى هذه الصنفه تكون نسبتها 25%. تفضل هذه الطريقة حيث أن نسبة

النباتات المقاومة مرتفعه وهى ٢٥% كما أن النباتات تكون أصليه فى مقاومتها. أما فى الطريقة العاديه وهى الحصول على الجيل الثانى F2 من النبات السابق فإن نسبة النباتات المقاومه الأصيله ١٦/١ وأن بعض النباتات الأخرى الغير أصيله فى مقاومتها تكون نسبتها ١٦/٨ (شكل ٨١) ويفضل عنها بالطبع النباتات الأصيله. يسهل أيضا فى طريقة زراعة

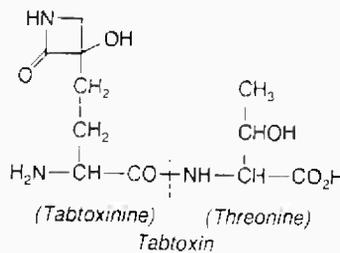
تركيب حبوب اللقاح	A.Abb × aaBB				تركيب الأبوين
	AB	aB	Ab	ab	تركيب خلية البيضة
AB	AABB	AaBB	AABb	AaBb	
aB	AaBB	aaBB	AaBb	aaBb	
Ab	AABb	AaBb	AAbb	Aabb	
ab	AaBb	aaBb	Aabb	aabb	

(شكل ٨١): التركيب الوراثى لسل الجيل الثانى وبه تركيب واحد فقط مرغوب نسبتة ١ إلى ١٦ .

الأنسجة فصل النباتات المقاومه الأصليه حيث أنها تستمر فى النمو فى الحقل الملوث بسلاطات الطفيل وتموت النباتات القابله للأصابه أما فى الطريقه العاديه فلا يمكن التمييز بين النباتات الأصليه فى مقاومتها وغير الأصليه حيث أنه يستمر فى النمو فى الحقل الملوث بسلاطات الطفيل هذه التراكيب الوراثيه المختلفه. وقد أمكن بذلك الحصول على نباتات تبغ من مزارع الأنسجه تجمع بين صفات المقاومه للذبول ووفره المحصول والصفات المرغوبه للأوراق لأستعماله فى السجائر والسيجار. ويحتاج هذا البرنامج إلى سنتين فقط بطريقه مزارع الأنسجه بينما يحتاج إلى سنه سنوات بالطرق العاديه.

تمكن كارلسون Carlson من إنتاج طفرات فى حبوب لقاح نبات التبغ وذلك بخلط البيئه التى تنمو عليها حبوب اللقاح بمركب يسبب حاله التطفر وهو إيثيل ميثان سلفونات ethyl methane - sulphonate ينتج عن ذلك حبوب لقاح لها طفرات ينقصها تخليق بعض الفيتامينات مثل البيوتين والأحماض الأمينيه مثل الأرجنين والبرولين والليسين. نتيجة لذلك ينتج طفرات لبعض حبوب اللقاح وتكون مختلطه مع حبوب اللقاح العاديه. يوضع مخلوط حبوب اللقاح

المتطفرة والعادية على بيئات صناعية ينقصها وجود مركبات البيوتين والأرجنتين والبرولين والليسين وذلك في وجود مركب برمو أوكس 5-bromodeoxyuridine . يسبب المركب الأخير موت للخلايا المنقسمة ولا يؤثر على الخلايا الغير منقسمة وذلك عند تعريضها للضوء . حيث يتداخل المركب الأخير في تركيب الحمض النووي للخلايا المنقسمة ويسبب موتها لوجود البروم . يتم التخلص من جميع حبوب اللقاح العادية حيث تموت جميعها لنموها على البيئة أما حبوب اللقاح المتطفرة فإنها لا تنقسم لأحتياجها لبعض الفيتامينات أو الأحماض الأمينية الغير موجوده في البيئة وبذلك تظل حيه . تنقل حبوب اللقاح إلى البيئة السابقة الخاليه من المركب السام مع إحتوائها على فيتامين البيوتين فتتنقسم حبوب اللقاح المتطفرة والتي ينقصها فيتامين البيوتين . وهكذا تستعمل هذه البيئة مع إضافة الحامض الأميني اليسين فتتنقسم حبوب اللقاح المتطفرة والتي ينقصها الحامض الأميني اليسين وهكذا بالنسبة للأحماض الأمينية الأخرى . أمكن كارلسون إستقلال ذلك إقتصاديا وذلك بوضع سم بكتيرى tabotoxin في البيئة فإن حبوب اللقاح الناميه تكون مقاومه للسم . وبذلك أنتج نباتات تبغ مقاومه للسم البكتيرى وهو المسلول عن حدوث كثير من أعراض مرض ويلدفير wildfire في التبغ المتسبب عن البكتريا *Pseudomonas tabaci* والتي تفرز هذا السم tabotoxin (شكل ٨٢) . ولذلك تكون هذه النباتات مقاومه للمرض .



(شكل ٨٢) : تركيب السم البكتيرى الذى يفرز بالبكتيريا *Pseudomonas tabaci* .

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجة وأهميتها في أمراض النبات:

توجد أنواع عديدة من مزارع الأنسجة وهى كما يلي. ومع ذكر أهمية كل نوع من هذه المزارع فى أمراض النبات.

١ - مزارع قمة الجذور أو السيقان Root or shoot tips cultures : بإستعمال هذه القمم وزراعتها على بيئه مناسبه يتم تكوين نباتات منها ويمكن أن تكون هذه النباتات خاليه من الأمراض الفيروسيه كما سبق ذكره فى إنتاج تقاوى البطاطس.

٢ - مزارع الكالس والخليه المفرده Callus and single - cell cultures : يعتبر الكالس عباره عن كتله من الخلايارقيقه الجدر غير مرتبه فى نظام معين disorganized undifferentiated وتكون الخلايا عاده غير كامل التشكل أو التمييز ويكون بها نسبة كبيره من الخلايا المرستيميه. يمكن تكوين الكالس والخلايا المنفرده للأنسجه وللأجزاء النباتيه على بيئات خاصه وبمعاملات خاصه. يستعمل الكالس فى تنميه ودراسه الفطريات الأجباريه التطفل مثل البياض الدقيقى والبياض الزغبي والأصداء وأيضا الفطريات غير إجباريه التطفل كما يستعمل أيضا فى إكثار وتنميه الفيروسات والنيماتود والبكتريا. كما تستعمل هذه المزارع فى دراسه فسيولوجى التطفل للطفيليات المختلفه ودراسة تأثير السموم فى ذلك كما تستعمل أيضا فى دراسة الدور الذى تقوم به phytoalexins فى مقاومه النبات. تستخدم هذه المزارع فى إختبار أهميه ودور المبيدات الفطرية والبكتيرييه والفيروسيه والميكوبلازميه فى مقاومه هذه الطفيليات. أحيانا تكون العلاقه بين هذه المزارع والخلايا مع الطفيل مماثله لعلاقه النبات العادى مع الطفيل ولكن فى أحيان كثيره تكون العلاقه بين هذه المزارع والطفيل غير مماثله لعلاقه النبات العادى مع الطفيل ولذلك يجب أن تؤخذ هذه النتائج بحذر.

٣ - مزارع بروتوبلاست النبات Plant protoplasts cultures : يمكن الحصول على هذه المزارع بواسطه معامله أنسجه النبات وخاصه الأوراق بإنزيمات محله لجدر خلايا النبات وهى عبارة عن خليط من أنزيم السيلوليز وأنزيمات محله للمركبات البكتينية. ينتج عن ذلك تحليل جدر الخلايا ويصبح البروتوبلاست حر. تستخدم هذه المزارع أستعمالات عديده فى أمراض النبات كما يأتى:

أ - عمل التلقيح بالفيرس ودراسه فسيولوجيا وتكاثر الفيرس: يتم تلقيح البروتويلاست بفيرس أو أكثر. يحدث ذلك بخلط البروتويلاست مع تحضير نقي من الفيرس وأيضا مركب fusagen والأخير تركيبه poly-L- ornithine أو polyethylene glycol . يتم رج المخلوط لمدة ١٠ إلى عشرون دقيقة في درجة حرارة الغرفة ثم يتم غسل مخلوط البروتويلاست بالمانيتول أو محلول مغذى أو بمخلوط منهما وذلك لإزالة الزيادة من الفيرس والفيوساجين. تختلف نسبة إصابه البروتويلاست بالفيرس تبعا لنوع الفيرس والبروتويلاست لكنها قد تصل أحيانا من ٧٠ إلى ٩٥٪ يتم دوره تكاثر الفيرس في البروتويلاست كل ٢٤ إلى ٣٦ ساعة بعد التلقيح. يمكن التعرف على سرعه تكاثر الفيرس في البروتويلاست بإستعمال المجهر الإلكتروني أو الأختبار على عائل مناسب يصاب بالفيرس ويظهر عليه أعراض عباره عن بقع موضعيه local lesion on host أو بالإختبارات السيرولوجيه ومنها الآن إختبار ELISA وتكون هذه الإختبارات على فترات مختلفه بعد عمليه التلقيح.

يمكن التعرف على البروتويلاست المصاب وعدها بمعامله البروتويلاست بأجسام مضاده مشعه للفيرس ويكون ذلك بمعامله الأجسام المضاده بمركب يسبب فلوره ومثال ذلك مركب FITC ثم فحص البروتويلاست بواسطة مجهر أشعه فوق بنفسجيه .

ب - تلقيح البروتويلاست بحامل لماده نوويه مهندسه وراثيا: يسمى الحامل في هذه الحاله vector . يوجد نوعين من vectors يستعملان بكفاءه عاليه لسهولة إختراقها خلايا النبات العادى وحيث يحملان ماده نوويه مهندسه وراثيا. وهذين النوعين هما البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* أو Ti - Plasmid الخاص به والنوع الثانى هو فيروس DNA ثنائى الخيط أو الشريط double - stranded DNA لفيروس موزايك القنبيط. توجد أنواع أخرى من الفيرس مثل فيروسات DNA وحيد الخيط أو الشريط single - stranded من النوع geminivirus والفيروسات والكروموسومات وبروتويلاست البكتريا *E. coli* المهندسه وراثيا تحت الدراسه والتجارب لتستعمل vectors ويمكن إدخالها خلايا النبات بسهولة.

يمكن إدخال ماده الوراثيه مثل ماده النوويه والبلازميد و DNA أو RNA الفيرس إلى البروتويلاست بأستعمال fusagen أو بوضع هذه ماده الوراثيه فى حوصلات دهنيه صناعيه

صغيره تسمى liposomes . بوضع هذه الليبوسومات مع البروتوبلاست وحفظ هذا المخلوط لفترة في حضان في درجة حراره مناسبه فإن البروتوبلاست يمكن أن يحتوى هذه الليبوسومات في داخله وتصبح ماده الوراثيه الموجوده داخل الليبوسومات موجوده داخل بروتوبلاست النبات.

يعتبر إدخال جين أو جينات المقاومه لمرض نباتى معين إلى داخل البروتوبلاست بالطرق السابقه حيث يصبح البروتوبلاست مصدر لمقاومه المرض النباتى ويمكن أن ينتج نبات مقاوم من أهم الطرق وأكثرها تفضيلا لاستعمال الهندسه الوراثيه ومزارع الأنسجه في إنتاج نباتات مقاومه للأمراض.

ج - إنتاج بروتوبلاست مقاومه للطفيليات أو مقاومه لسموم الطفيليات أو غيرها من السموم: في حاله أستعمال مزارع الأنسجه من نوع مزارع الكالس أو مزارع الخلايا المنفرده أو مزارع البروتوبلاست فإن بعض الخلايا أو البروتوبلاست الناتج من هذه المزارع يكون مختلف وراثيا في صفة أو أكثر عن خلايا النبات الأم. أى أنه يحدث تغيير وإختلاف في التركيب الوراثي ويسمى ذلك somaclonal variation . وأحد هذه الصفات التى يحدث فيها إختلاف قد يكون المقاومه للأمراض أو السموم وتستخدم هذه الحاله في إنتاج النباتات المقاومه للأمراض. فقد يكون النبات الأم قابل للأصابه بمرض معين ولكن الخلايا الناتجه من مزارع الأنسجه لهذا النبات يكون فيها إختلاف في الصفات الوراثيه عن النبات الأم ويكون بعض هذه الخلايا مقاوم لمرض معين. يمكن الأستدلال على هذه الخلايا وعزلها وتميئها حيث ينتج عنها نباتات مقاومه للأمراض بالرغم من أن النبات الأم قابل للأصابة. أنظر شرح تفصيلي لذلك في الجزء السابق الخاص بإنتاج نباتات تبغ مقاومه لمرض wildfire .

د - تقييم المركبات المضاده (المثبطه) للفيرس antiviral عن طريق إستعمال بروتوبلاست مصاب بالفيرس: يجرى حاليا تجارب كثيره للحصول على مركبات مقاومه للفيرس ولا تسبب ضرر لخلايا النبات حيث يمكن عن طريق هذه المركبات مقاومه الأمراض الفيروسيه. تستخدم الآن مزارع البروتوبلاست المصابة بالفيرس في إختبار هذه المركبات حيث أن المركب الذى يمنع أو يحد من تكاثر الفيرس داخل البروتوبلاست يكون فعال في مقاومه

الفيرس. يمكن التعرف على ذلك باستخدام إختبار ELISA للتعرف على سرعه ودرجه تكاثر الفيرس. والأهم من ذلك أن يكون هذا المركب غير ضار على البروتويلاست وبالتالي غير ضار على النبات. تجرى التجارب بعمل مزارع البروتويلاست وإضافه تركيزات مختلفه من المركب المراد إختباره إلى هذه المزارع المصابه بالفيرس المراد إختباره ويجرى تقدير سرعه تكاثر الفيرس من كل تركيز.

هـ - تزاوج البروتويلاست لنقل جينات المقاومه إلى عوائل غير متوافقه أى أن التهجين بينها فاشل: يصعب أو يتعذر فى كثير من الأحيان عمل تهجين بين أنواع متقاربه أو أجناس متقاربه. ولذلك يمكن إستعمال تزاوج بين البروتويلاست لأدخال صفة أو أكثر مرغوبه فى بروتويلاست معين إلى بروتويلاست نبات آخر من نوع مقارب أو جنس مقارب عن طريق تزاوج البروتويلاست ويتعذر التهجين العادى بينهما. حيث يصبح البروتويلاست الناتج عن التزاوج يحمل الصفة المرغوبه. يمكن تشجيع عمليه التزاوج بين البروتويلاست وذلك بوضع ماده fusagen مع مخلوط البروتويلاست، أو أستعمال صدمات كهربائيه لفترة قصيره ناتجه عن تيار كهربائى مباشر فإن ذلك يشجع عمليه التزاوج أيضاً.

من أمثله ذلك أن التهجين بين نوعين من جنس الفول صعب وهما *Vicia narobensis* ونوع الفول العادى *Vicia faba* وحيث أن النوع *fabae* قابل للأصابة بمرض التبقع البنى أو الشيكولاتى فى الفول والذى يتسبب عن الفطر *Botrytis cinerea* ، وأيضاً *Botrytis fabae* . وحيث أن النوع *narobensis* يكون مقاوم لهذا المرض ويحتوى على جينات المقاومه فإنه يمكن عمل تهجين بين بروتويلاست النوعين للحصول على بروتويلاست به صفة المقاومه للمرض. يحدث التهجين بين البروتويلاست بسهولة فى المعمل. يسبب هذا المرض خسائر فادحه فى محصول الفول فى مصر فى بعض السنوات. وأيضاً مثال آخر حيث أمكن نقل صفة مقاومه مرض التفاف أوراق البطاطس المتسبب عن فيروس إلتفاف أوراق البطاطس وذلك بتزاوج نوعين من البروتويلاست أحدهما خاص بأنوع بطاطس بريه لا تنتج درنات وتحمل جين أو جينات المقاومه والنوع الآخر من البروتويلاست خاص بأصناف البطاطس العاديه القابله للأصابة.

و- إستخدام بروتويلاست أحادى haploid للدراسات الوراثيه ومقاومه الأمراض والسموم:

يمكن الحصول على بروتوبلاست أحادي haploid وذلك من مزارع المتك حيث ينتج خلايا أحادية يمكن أن يتكون منها كالس أحادي ويمكن معاملة هذه الخلايا أو خلايا الكالس للحصول على بروتوبلاست أحادي. من مميزات البروتوبلاست الأحادي أن الجينات توجد بصورة منفردة وليست في أزواج وبذلك يمكن التعرف على الصفات المختلفة للجينات ومنها المتنحية وأيضا minor genes. وفي حالة وجود صفة مرغوبة أو مقاومه لمرض معين فإنه يمكن مضاعفه البروتوبلاست بإستخدام مركبات كيماويه منها الكولشيسين. تصبح صفة المقاومه موجوده بحاله أصيله. سبق شرح ذلك بالتفصيل في حالة إستعمال مزارع المتك لإنتاج حبوب لقاح يمكن منها إنتاج نباتات مقاومه للأمراض مثل مقاومه نبات التبغ لمرض الذبول.

يمكن إستعمال مزارع البروتوبلاست الأحادي لتحديد موقع جينات المقاومه وعددها حتى لو كانت minor genes يمكن عن طريق هذه المزارع دراسته علاقه جينات المقاومه بالسلاطات المختلفه للفطريات أو البكتيريا أو الفيروسات المسببه لأمراض النبات.

أساسيات الهندسة الوراثية

بعض الأجزاء الهامة في الخلية النباتية:

الأغشية البلازمية أغشية حية إختيارية النفاذية selective permeable أى لها القدرة على التحكم في دخول الذائبات والمذيبات، كما أنها تحتوى على أنزيمات وحاملات أيونات وجزيئات تساعد على مرور أيونات وجزيئات خاصة في اتجاه عكسى بالنسبة للاتجاه الطبيعى لمنحدر التركيز. وذلك تبعاً لاحتياجات الخلية. وهذا يعرف بالنقل النشط active transport عادة يوجد اختلاف في النفاذية الإختيارية لكل من الغشاء البلازمى الخارجى والغشاء البلازمى الفجوى فمثلا نجد في الطحلب الأخضر *Valonia* أن الغشاء البلازمى الخارجى ينفذ المغنسيوم، بينما لا ينفذه الغشاء البلازمى الفجوى، لهذا نجد المغنسيوم موجود فى البلازم الاساسى ولا يوجد فى الفجوة العصارية لهذا الطحلب.

الشبكة الاندوبلازمية endoplasmic reticulum عبارة عن أنابيب وحويصلات دقيقة متشابكة منغمسة فى البلازم الاساسى وجدرها تماثل فى تركيبها الغشاء البلازمى. الشبكة

الإندوبلازمية قد تكون ملساء أو خشنة ويرجع خشونة النوع الأخير إلى أنها تحمل على سطوحها أجسام دقيقة تعرف بالريبوسومات. تتصل الشبكة الإندوبلازمية بالغشاء البلازمي الخارجى وبالغلاف النووي، كذلك قد تتصل بجهاز جولجى. يعتقد أن وظيفة الشبكة الإندوبلازمية هي سهولة تمرير المواد داخل الخلية أو تخزينها وخاصة المركبات البروتينية. فالبروتين الذى يتكون على الريبوسومات يمر إلى تجاويف الشبكة الإندوبلازمية ويتجمع فيها وقد ينتقل بعد ذلك إلى جهاز جولجى أو يرشح إلى السيتوبلازم. ومن المعروف أن الشبكة الإندوبلازمية يحدث لها تبرعم وتنفصل منها حويصلات تحوى على البروتين وتتحرك عبر السيتوبلازم لتلتحم بالغشاء البلازمي وتفرغ محتوياتها خارجه أو تلتحم بأغشية جهاز جولجى لتفرغ محتوياتها بداخله وبذلك تنتقل محتويات الشبكة الإندوبلازمية إلى جهاز جولجى.

النواة nucleus جسم كروي أو بيضاوى. تختلف أحجامها كثيراً حسب نوع الخلية ونوع النبات فهي كبيرة نسبياً وتتوسط عادة الخلية المرستيمية، وصغيرة نسبياً وتوجد عادة جانبياً فى الخلايا البالغة. تحوى الخلية للنباتات والحيوانات الراقية على نواة واحدة عادة إلا أنه فى بعض الحالات كما فى الأنابيب اللبنية latex tubes فى النبات نجد أن الخلية الواحدة تحوى على عديد من الأنوية. ومن المعروف أن الخلية تموت إذا فصلت منها النواة، إلا أن الأنابيب الغربالية الناصجة تستمر حية برغم خلوها من النواة. ويقال أن نواه الأنوية الغربالية الناصجة توجد فى حالة إنتشار فى سيتوبلازم الخلية. ويرى البعض أن الأنوية الغربالية تكون دائماً على صلة وثيقة بخلية مرافقة أو أكثر، كل خلية مرافقة لها نواتها التى تخدمها وتخدم الأنوية الغربالية المجاورة.

تختلف النواة عن السيتوبلازم فى زيادة لزوجة السائل النووى عن السيتوبلازم وفى زيادة نسبة الأحماض النووية فى النواة عن السيتوبلازم.

يوجد بالنواة نوعان رئيسيان من الأحماض النووية هما حمض اللى أوكسى ريبوز النووى deoxyribonucleic acid الذى يرمز له بالرمز DNA وحمض الريبوز النووى ribonucleic acid الذى يرمز له بالرمز RNA. يتركب كل من الحمضين النوويين من وحدات تسمى نيوكليوتيدات nucleotides، وتتكون كل وحدة من هذه الوحدات من جزيء من السكر

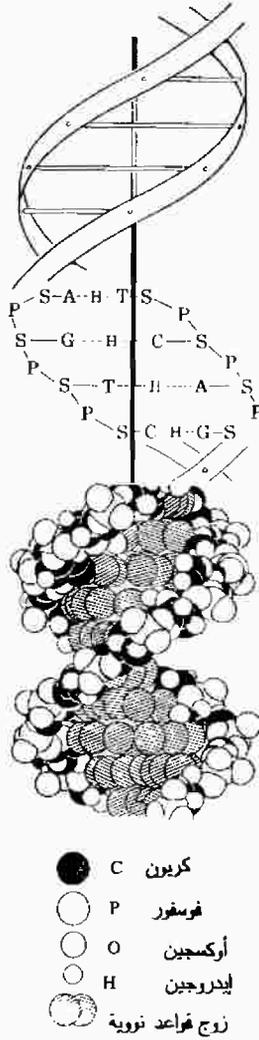
الخماسى دى اكسى ريبوز فى حالة الحمض RNA أو سكر ريبوز فى حالة الحمض RNA يرتبط مع السكر جزئى فوسفات من ناحية وقاعدة نيتروجينية من ناحية أخرى. تتكون القاعدة اللبتروجينية من أدنين adenine، وجوانين guanine وسيتوسين cytosine، يضاف إليهم ثيمين thymine فى حالة الحمض DNA ويوراسيل uracil فى حالة الحمض RNA. القواعد النيتروجينية جزئياتها حلقية فهى تتكون من حلقة واحدة سداسية كما فى سيتوسين وثمانين ويوراسيل وتعرف بالبيريميديئات pyrimidines أو تتكون من حلقتين خماسية وسداسية كما فى أدنين وجوانين وتعرف بالبيورينات purines.

الحامض النووى DNA عبارة عن سلسلتين حلزونيتين من النيوكليوتيدات تلتقان حول بعضهما ويربط بين بعض القواعد فى السلسلتين روابط إيدروجينية. وهذه الروابط تربط بين أدنين فى سلسلة وثمانين فى السلسلة الأخرى وأيضاً نفس الشيء بالنسبة لجوانين وسيتوسين (شكل ٨٣-٨٦).

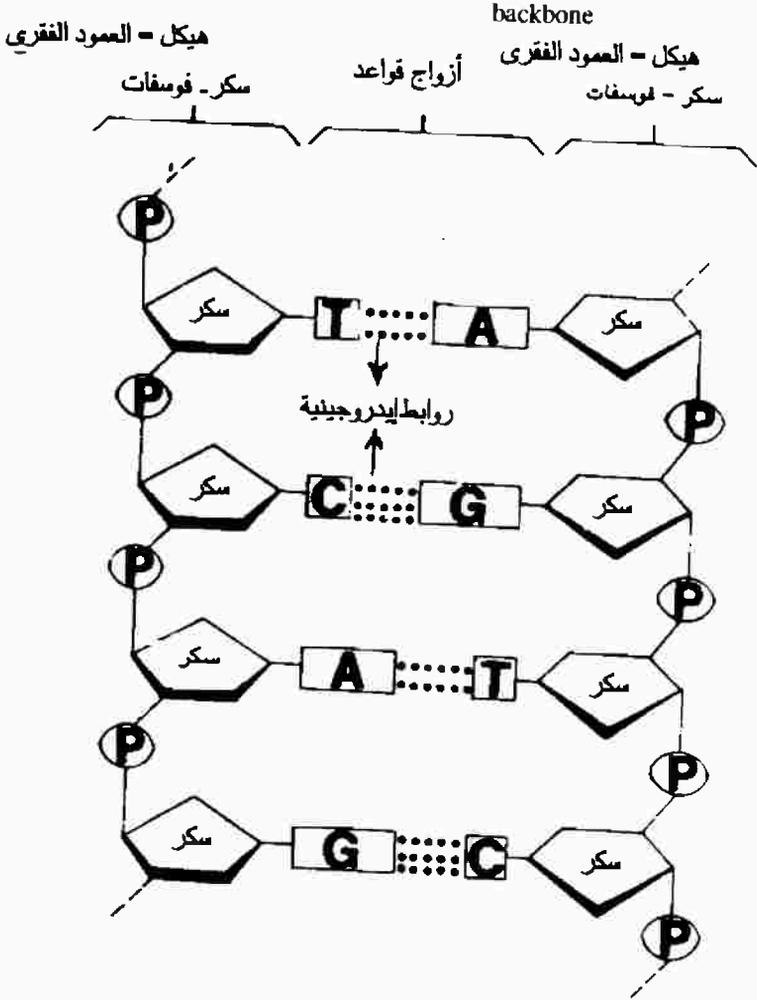
يوجد بين الثيمين والأدنين رابطتين إيدروجينية ولكن يربط بين جزئى السيتوسين والجوانين ثلاث روابط إيدروجينية.

تحتوى الخلية الجسدية للإنسان على ٤٦ كروموسوم. فإذا تصورنا أنه أمكن فك اللولب المزدوج لجزئى DNA فى كل صبغى ووضعت هذه الجزئيات على امتداد بعضها البعض لوصل طولها إلى ٢ متر، والهستونات وغيرها من البروتينات هى المسئولة عن ضم هذه الجزئيات الطويلة لتقع فى حيز نواة الخلية التى يتراوح قطرها من ٢ - ٣ ميكرون، ولقد أوضح التحليل البيوكيميائى وصور المجهر الإلكتروني أن جزئى DNA فى الصبغى يلتف حول مجموعات من الهستون مكونا حلقات من النيوكليوسومات nucleosomes (شكل ٨٧) مما يؤدى إلى تقصير طول جزئى DNA عشر مرات، إلا أنه يتعين أن يضم الجزئى ويقصر حوالى ١٠٠٠٠٠ مرة حتى تستوعبه النواة، ولهذا فإن حلقات النيوكليوسومات تلتف مرة أخرى لتتضم مع بعضها ومع ذلك فإن كل ما سبق ليس بكاف لتقصير جزئى DNA إلى الطول الملاحظ، وأشرطة النيوكليوسومات الملففة بشدة ترتب على شكل حلقة كبيرة بواسطة البروتينات التركيبية غير الهستونية للكروماتين. والكروماتين الملفف والمكثف بشكل كبير يشار إليه على أنه مكثف، وعندما يكون جزئى DNA على هذه الحالة لا تستطيع الإنزيمات

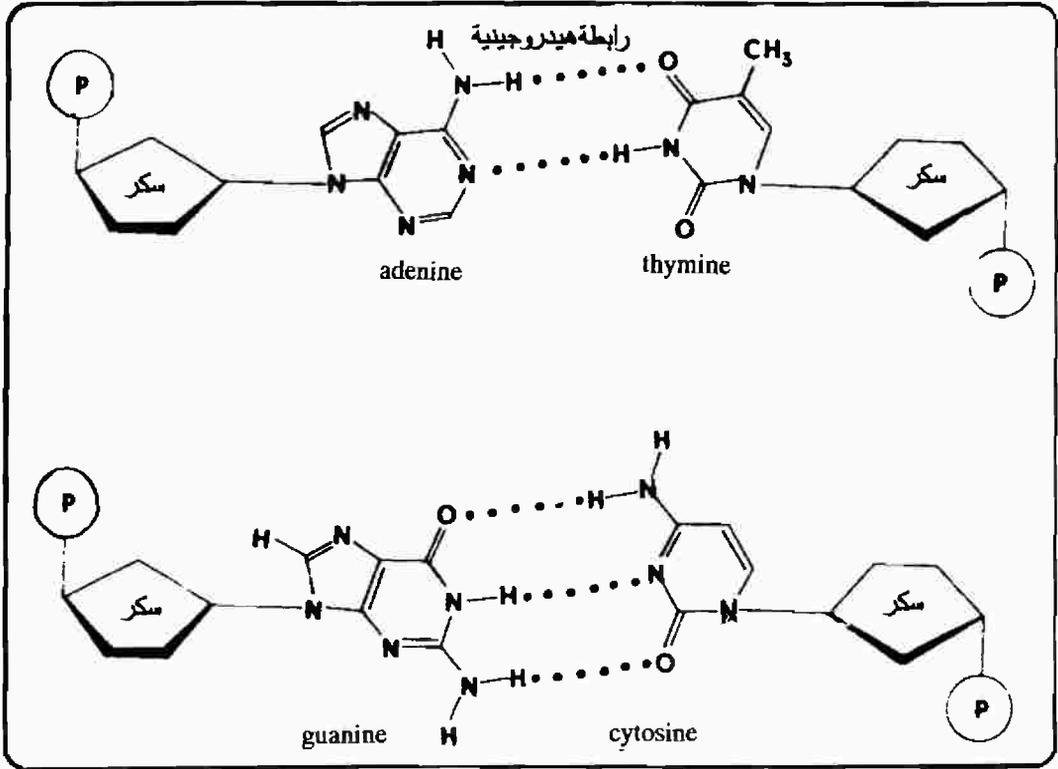
أن تصل إليه، ويتعين فك هذا الالتفاف والتكديس على الأقل إلى مستوى شريط من النيوكليوسومات قبل أن يعمل DNA كقالب لبناء DNA أو RNA .



(شكل ٨٢) : تركيب جزيء DNA



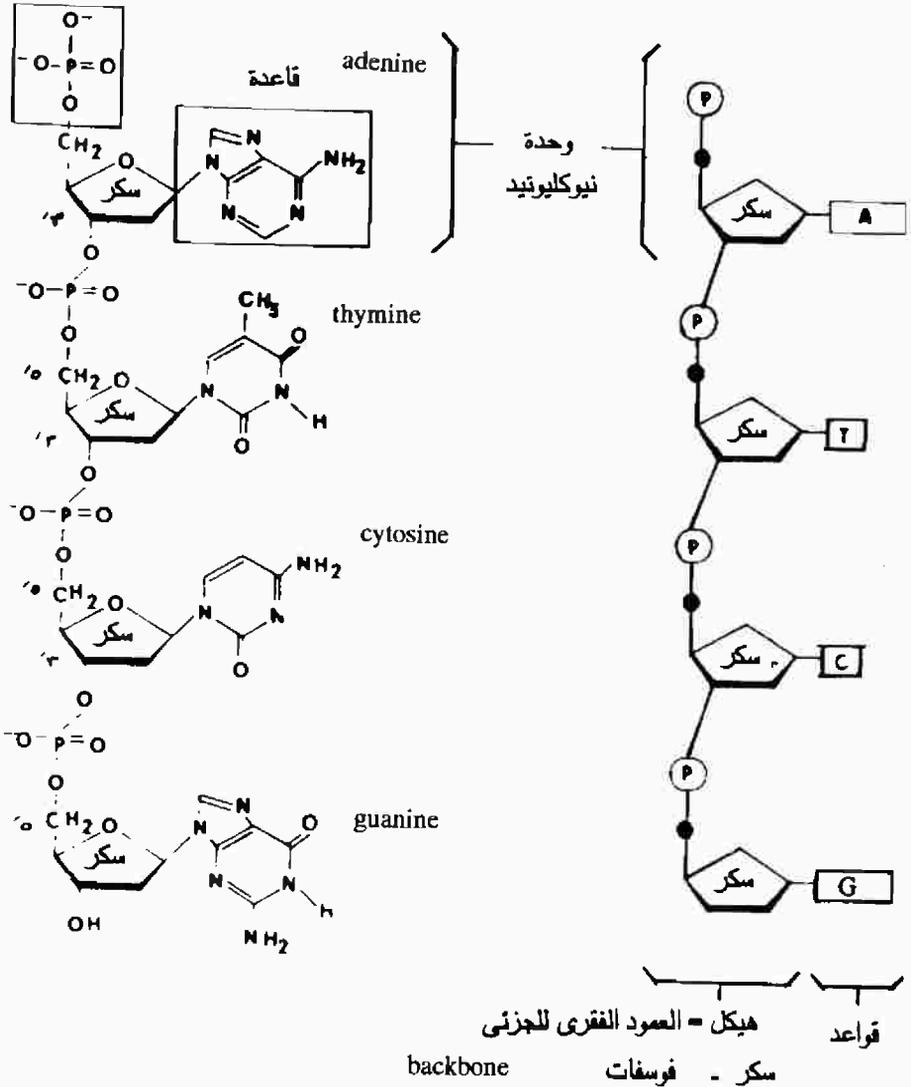
(شكل ٨٤) : شريطان من DNA يربط بينهما روابط إندروجينية.



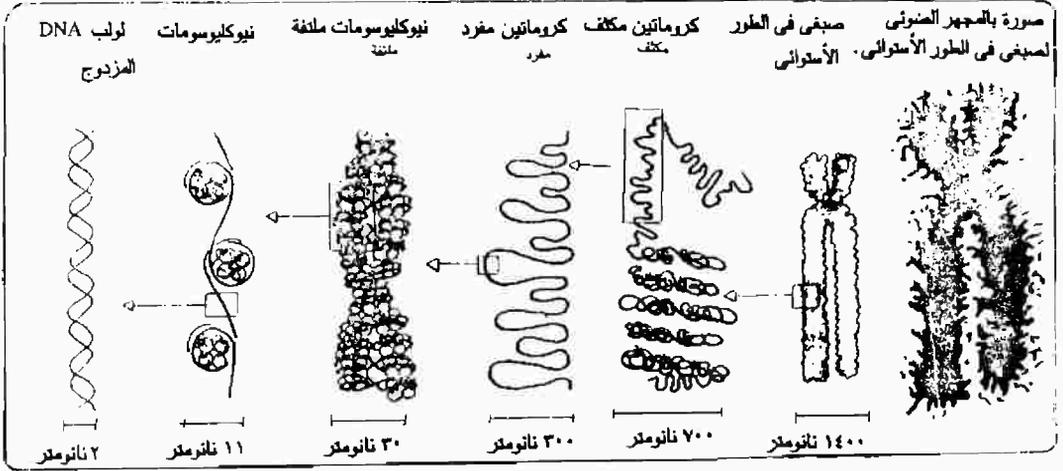
(شكل ٨٥) : أزواج القواعد في DNA وتكوين الروابط الإيدروجينية.

تركيب جزئى

تركيب مبسط



(شكل ٨٦): قطعة من DNA تركيب مبسط وتركيب جزئى.



(شكل ٨٧) : الطريقة التي يخلف بها DNA في الكروماتين.

تضاعف DNA

DNA Replication

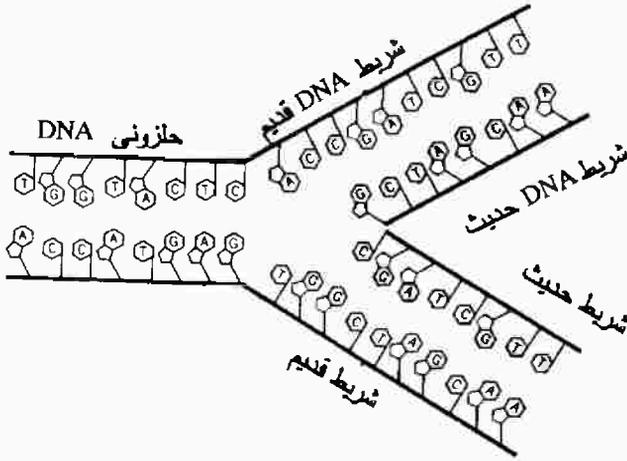
قبل أن تبدأ الخلية في الانقسام تتضاعف كمية DNA بها حتى تستقبل كل خلية جديدة نسخة طبق الأصل من المعلومات الوراثية الخاصة بالخلية الأم، ويحدث ذلك أثناء الطور البيئي interphase في أثناء خطوات إنقسام الخلية، ولقد أشار كل من واطسن وكريك إلى أن تركيب الشريط المزدوج ذى القواعد المتزاوجة لجزئى DNA يحتوى على وسيلة يمكن بها مضاعفة المعلومات الوراثية بدقة. فحيث إن الشريطين يحتويان على قواعد متكاملة، فإن تتابع النيوكليوتيدات في كل شريط يوفر المعلومات اللازمة لإنتاج الشريط المقابل فمثلا إذا كان تتابع القواعد النيتروجينية في جزء من الشريط هو (5'A-A-T-C-C3') فإن قطعة الشريط

التي تتكامل معها يكون ترتيب قواعدها النيروجينية (3'T-T-A-G-C5') فاذا ما تم فصل شريطى DNA عن بعضهما البعض فإن أيا منهما يمكن أن يعمل كقالب لانتاج شريط يتكامل معه. ولقد قام العلماء بإجراء العديد من التجارب للتأكد من ذلك.

وباستخدام سلسلة من التجارب تمكن كل من ميسلسون Meselson وستال Stahl من إثبات طريقة تضاعف DNA وملخصها أن شريطى DNA ينفصلان عن بعضهما بكسر الروابط الإيدروجينية التي تربط القواعد المتزاوجة ويعمل كل شريط من الشريطين كقالب لبناء شريط جديد ثم يتم تكوين روابط إيدروجينية بين القواعد المتزاوجة للربط بين شريطين أحدهما جديد والآخر قديم. وعند إنقسام الخلية ترث كل خلية جديدة جزيئى DNA هجين أى يتكون من شريط قديم وآخر جديد. ولقد أجرى ميسلسون وستال تجاربهما على البكتريا إلا أنه من الواضح الآن أن DNA فى كل الكائنات الحية يتضاعف بنفس الطريقة. ومما هو جدير بالذكر فإن العلماء قد تمكنوا عمل عملية تضاعف DNA فى أنويه الأختبار من المعمل وذلك فى وجود بعض المركبات النقيه ومنها البروتينات والأنزيمات. ولذلك أمكن فهم ميكانيكيه وكيفيه حدوث تضاعف DNA بالتفصيل كما سيلي شرحه (شكل ٨٨ ، ٨٩)

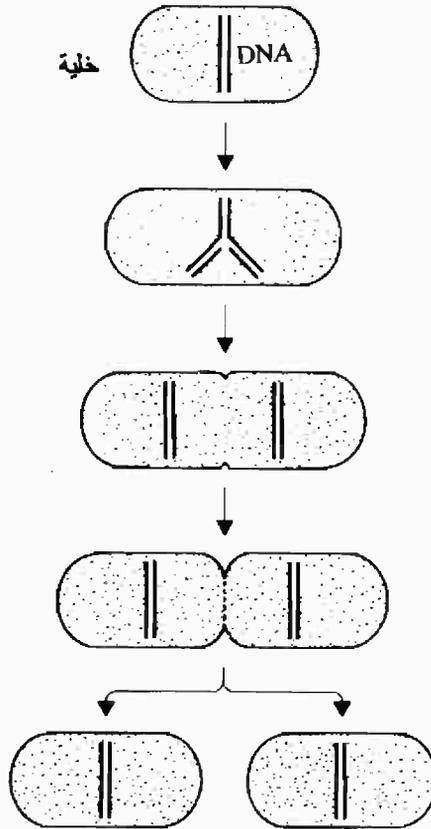
تبدأ العملية بأن يرتبط بروتين معين بحلزونى DNA وهذا البروتين هو عبارته عن أنزيمات فك حلزونى DNA وتسمى DNA - helicases. تتحرك هذه الأنزيمات على جزيئى DNA من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر مسببه فك وفصل حلزونى DNA وينفصل الشريطان عن بعضهما ويبتعد كل منهما عن الآخر. يمكن تشبيه ذلك بأن الأنزيم هو أبزيم السوسته وعند شد الأبزيم تنفتح السوسته وينفصل شريطى السوسته عن بعضهما the unzipping zipper .

أما البناء الفعلى لحلزونى DNA الجديدان فتقوم بها أحد أنزيمات البلمره وهى DNA Polymerases والتي تساعد على إضافه النيوكليوتيدات واحده بعد الأخرى وتتميز هذه الأنزيمات بأنها تعمل فى إتجاه واحد فقط unidirectional والتي تساعد على إضافه



(شكل ٨٨) : تضاعف الـ DNA - أى تضاعف شريطين أى حلزوني الـ DNA .

النيوكليوتيدات واحده بعد الأخرى إلى النهاية ٣ لشريط DNA الجديد ولكي يتم إضافة النيوكليوتيده إلى الشريط الجديد لابد أن تتزوج القاعده النيتروجينية في النيوكليوتيده مع القاعده النيتروجينية الموجوده على شريط القالب (شكل ٩٠) وهكذا يتكرر ذلك في جميع الحالات وعامه ومن المعروف أن أنزيم البلمرة يعمل في اتجاه واحد فقط من الطرف ٥ في اتجاه ٣ للشريط الجديد الذي يجرى بناؤه. ولقد سبق أن ذكرنا أن شريطي نولب DNA المزدوج متوازيان عكسياً، أى أن أحدهما يكون في اتجاه ٥ إلى ٣ بينما الشريط المتزوج معه يتوجه في الاتجاه المعاكس أى في اتجاه ٣ إلى ٥ . وعلى ذلك فعندما يعمل أنزيم فك الحلزون على فصل شريطي جزئ DNA يتم ذلك في اتجاه النهاية ٣ لأحد الشريطين والنهاية ٥ للشريط الآخر. وبالنسبة للشريط القالب ٥ - ٣ ليست هناك مشكلة حيث أن أنزيم البلمرة يتبع أنزيم فك الحلزون مباشرة مضيفاً نيوكليوتيدات جديدة إلى النهاية ٣. إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس، وذلك لأن أنزيم البلمرة لا يعمل في اتجاه ٥ - ٣. ولذا فإن هذا الشريط يتم بناؤه

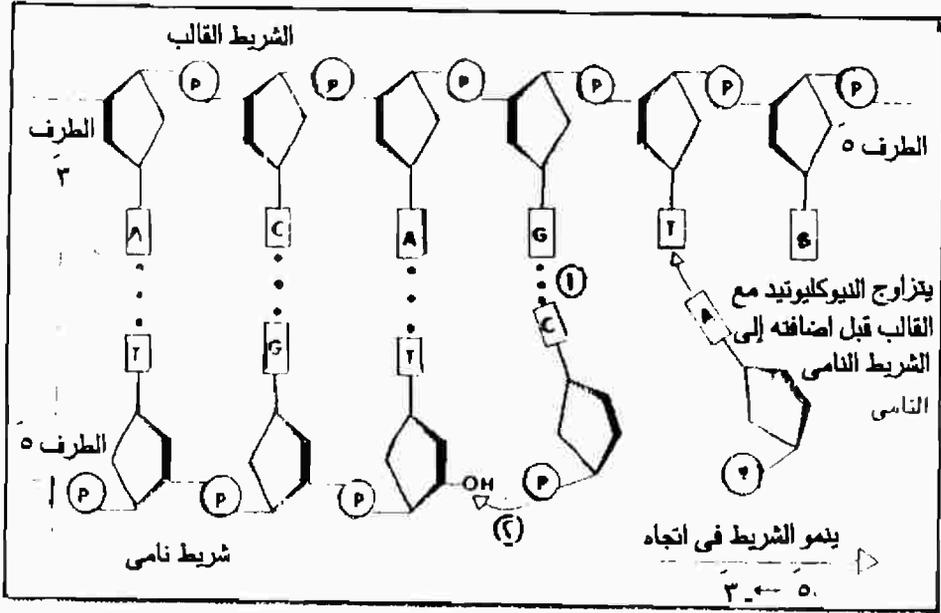


(شكل ٨٩) : خطوات إنقسام خلية إلى خليتين وتضاعف جزيئ DNA .

على شكل قطع صغيرة في اتجاه ٥ - ٣ بواسطة إنزيم بلمرة آخر Polymerase B (شكل

٩١) ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها البعض بواسطة أنزيم الربط DNA-ligase .

أما في أوليات النواة فإن جزيئ DNA يوجد على شكل حلزوني مزدوج إلا أن نهاياته تلتحم بعضها مع بعض مكونه شكل حلقي وهذا الجزيئ يتصل بالغشاء البلازمي للخلية عند نقطة واحدة يبدأ عندها نسخ جزيئ DNA .



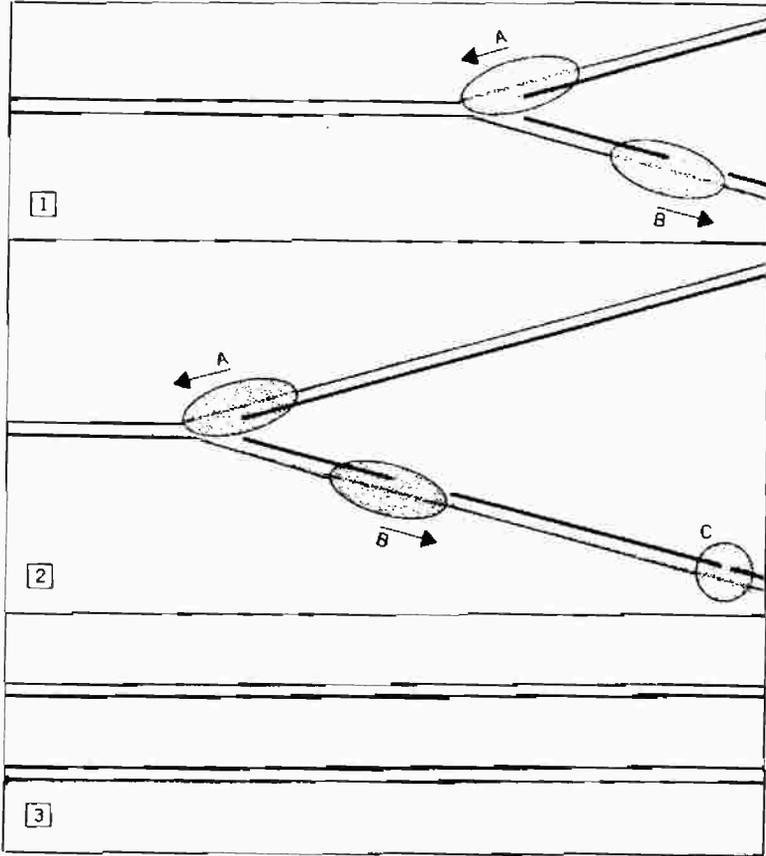
(شكل ٩٠) : الطريقة التي يعمل بها إنزيم DNA-Polymerase في مضاعفة أحد أشرطة DNA.

- ١- تتزاوج القواعد النيتروجينية مع المتكامل معها على الشريط القالب.
- ٢- يقوم DNA - polymerase بربط النيوكليوتيدات المتزاوجة في الشريط النامي.

الشفرة الوراثية The Genetic Code

من المعروف أنه توجد أحماض أمينية كثيرة ولكن يوجد منها أحماض أمينية أساسية essential amino acids وهي الأحماض التي تدخل في تركيب البروتينات وأما الأحماض الأمينية الأخرى الغير أساسية فإنها لا تدخل في تركيب البروتينات. ومن المعروف أنه يوجد عشرون حامض أميني أساسي وسيتناول شرح الشفرة الوراثية هذه الأحماض الأمينية الأساسية دون غيرها.

من المعروف أن هناك عشرين حمضا أمينيا مختلفا تدخل في بناء البروتينات وأن هناك أربع قواعد نيتروجينية - نيوكليوتيدات - فقط تدخل في بناء كل من DNA و RNA وعلى ذلك



(شكل ٩١): إنزيم DNA Polymerase منه النوع A الذي يخلق شريط متكامل من DNA في اتجاه فرع الشوكة ولكن النوع B من هذا الأنزيم لا يخلق شريط متكامل من DNA بل يخلق أجزاء متقطعة من شريط DNA في الاتجاه العكسي على الشريط الآخر من DNA ثم تربط هذه الأجزاء بواسطة إنزيم الربط DNA ligase ويرمز له بالرمز C وفي النهاية يتكون شريطين جديدين متكاملين من DNA (3) .

فاللغة، الوراثية تحتوي على أربعة «حروف أبجدية»، وهذه الحروف الأربعة من القواعد النيتروجينية يجب أن تشكل عشرين «كلمة»، تدل كل منها على حمض أميني معين، ولا يمكن أن تتكون كل كلمة من حرف واحد لأن ذلك يعني وجود أربع كلمات فقط على صورة شفرة

هي A,G,C,U والبروتينات بذلك تحتوي على أربعة أحماض أمينية فقط وبالمثل فإن الكلمات لا يمكن أن تتكون من حرفين (نيوكليوتيدتين) وذلك لأن القواعد النيروجينية الأربعة اذا رتب في كل الاحتمالات الممكنة لاثنين معا تعطى ٢٤-١٦ كلمة شفرة codon مختلفة وهذا مازال غير كاف للعشرين حمضا أمينيا التي تدخل في بناء البروتين، أما اذا رتب الأربعة حروف (قواعد نيروجينية - نيوكليوتيدات) على شكل ثلاثيات فإنها ستنتج ٢٤-٦٤ كلمة شفرة وهذا أكثر من الحاجة لتكوين كلمة شفرة لكل حمض أميني، وعلى ذلك فأصغر حجم نظري لكلمة شفرة DNA هو ثلاث نيوكليوتيدات أي ثلاثة قواعد نيروجينية. الاختلاف الوحيد بين النيوكليوتيدات في القواعد النيروجينية. تم في عام ١٩٦٥ الوصول إلى الشفرات الخاصة بكل حمض أميني والتي يطلق عليها اسم كودونات. وهذه الكودونات موجودة في جدول (رقم ٢) مع ملاحظة أن الكودونات في هذا الجدول هي الكودونات التي توجد في mRNA، أما ثلاثيات شفرة DNA فهي النيوكليوتيدات التي تتكامل قواعدها مع تلك الموجودة في الجدول. كما يتضح من الجدول أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أميني، كما أن هناك كودونا لبدء البروتين وهو AUG وثلاثة كودونات (UGA, UAA, UAG) توقف بناء البروتين أي أنها تعطى إشارة عن النقطة التي يجب أن تقف عندها آلية بناء البروتين وتنتهي سلسلة عديد الببتيد.

والشفرة الوراثية عامة universal - بمعنى أن نفس الكودونات تمثل شفرات لنفس الأحماض الأمينية في كل الكائنات الحية مثل الفيروسات والميكوبلازما والبكتيريا والنباتات والحيوانات والأنسان والفطريات التي تمت دراستها حتى الآن وهذا دليل قوی على أن كل الكائنات الحية الموجودة الآن على وجه الأرض تعتبر continuum قد نشأت عن أسلاف مشتركة، ولقد كان للمجموعات الرئيسية من الكائنات الحية تاريخ تطوري منفصل لمئات الملايين من السنين، وعلى ذلك يظهر أن الشفرة قد تكونت بعد فترة قصيرة من بدء الحياة واستمرت بدون تغير تقريبا لبلايين السنين منذ ذلك الوقت ونتيجة لذلك حدث التطور في المملكة الحيوانية حتى الأكثر رقيا وهو الإنسان وحدث التطور في المملكة النباتية حتى الأكثر رقيا وهي النباتات الزهرية وأكثر النباتات الزهرية تطورا هي نباتات العائلة (الفصيلة) المركبه.

القاعدة الأولى	القاعدة الثانية				القاعدة الثالثة
	U	C	A	G	
U	UUU Phenylalanine	UCU Serine	UAU Tyrosine	UGU Cysteine	U
	UUC Phenylalanine	UCC Serine	UAC Tyrosine	UGC Cysteine	C
	UUA Leucine	UCA Serine	UAA STOP	UGA STOP	A
	UUG Leucine	UCG Serine	UAG STOP	UGG Tryptophan	G
C	CUU Leucine	CCU Proline	CAU Histidine	CGU Arginine	U
	CUC Leucine	CCC Proline	CAC Histidine	CGC Arginine	C
	CUA Leucine	CCA Proline	CAA Glutamine	CGA Arginine	A
	CUG Leucine	CCG Proline	CAG Glutamine	CGG Arginine	G
A	AUU Isoleucine	ACU Threonine	AAU Asparagine	AGU Serine	U
	AUC Isoleucine	ACC Threonine	AAC Asparagine	AGC Serine	C
	AUA Isoleucine	ACA Threonine	AAA Lysine	AGA Arginine	A
	AUG (START) Methionine	ACG Threonine	AAG Lysine	AGG Arginine	G
G	GUU Valine	GCU Alanine	GAU Asparagine	GGU Glycine	U
	GUC Valine	GCC Alanine	GAC Asparagine	GGC Glycine	C
	GUA Valine	GCA Alanine	GAA Glutamic acid	GGA Glycine	A
	GUG Valine	GCG Alanine	GAG Glutamic acid	GGG Glycine	G

(جدول ٢) : الكودونات كما توجد في mRNA

تخليق البروتينات Protein Synthesis

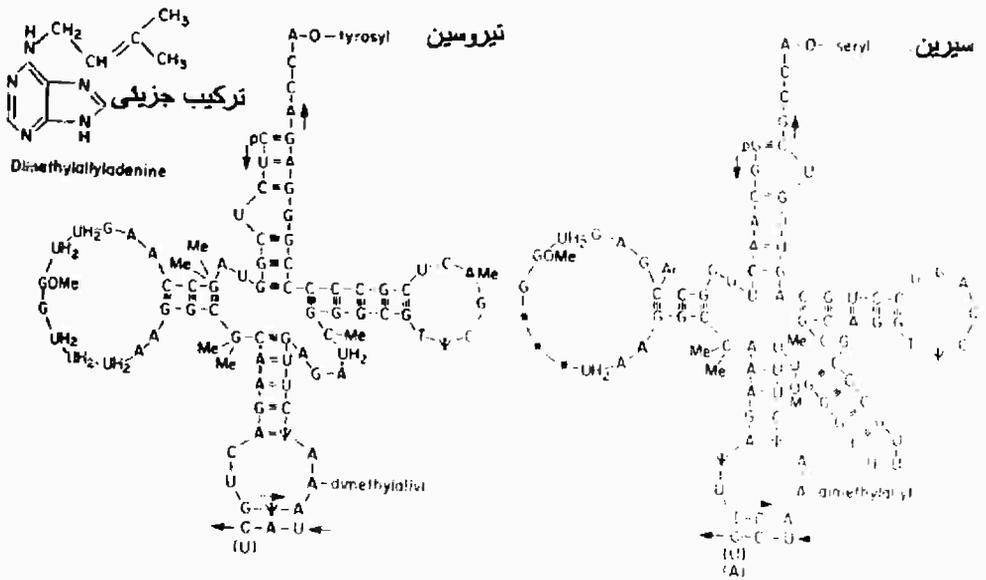
تخليق البروتين يحتاج تواجد أحماض أمينية حرة بالخليه ويحتاج أيضا بعض من الأنزيمات ولا بد أيضا من تواجد الريبوسومات بالخليه. كما يقوم RNA بدور رئيسي في هذه العملية. يوجد ثلاثة أنواع من RNA تسهم في بناء البروتين وهي

١ - حمض RNA الرسول (mRNA) Messenger RNA وهو عبارة عن خيط رفيع ويمكن رؤيته بالمجهر الإلكتروني وهو غير ثابت ويتغير وزنه الجزيئي تبعاً لنوع الخلية وتبعاً لنوع البروتين الذي يقوم ببناء فقد نجده قصير كما في نوع يسمى leader RNA أي RNA القائد وقد يكون طوله عادي في كثير من الأحوال. يتراوح وزنه الجزيئي من خمسون ألف إلى ٥ مليون دالتون. وهو الذي يحمل الشفرة التي تحدد تتابع الأحماض الأمينية الداخلة في تركيب البروتين.

٢ - حمض RNA الريبوسومي (rRNA) Ribosomal RNA - يدخل في بناء الريبوسومات (أماكن بناء البروتين) عدة أنواع من RNA الريبوسومي وحوالي ٧٠ نوعاً من عديد الببتيد، ويتم بناء الريبوسومات في حقيقيات النواة في منطقة من النواة تسمى النوية، يتم بها بناء الآلاف من الريبوسومات في الساعة، ومما يجعل هذا المعدل السريع ممكناً هو أن DNA في خلايا حقيقيات النواة يحتوي على ما يزيد على ٦٠٠ نسخة من جينات RNA الريبوسومي التي ينسخ منها rRNA، وهناك أربعة أنواع مختلفة من rRNA تدخل مع البروتين في بناء الريبوسومات. وهو مكون رئيسي للريبوسومات وإن كان الدور الذي يلعبه في بناء البروتين مازال غير معروف حتى الآن.

٣ - حمض RNA الناقل (tRNA) Transfer RNA - تلتف أجزاء من الجزيئ لتكون حلقات وبذلك يصبح الجزيئ عبارة عن قدم وساق وفروع تنتهي بحلقات. يختلف عدد الفروع والحلقات باختلاف الجزيئ وعاده تكون الفروع إثنان أو ثلاثة وكذلك الحلقات. وهو يتكون من نيوكليوتيدات عديدة وعاده عددها حوالي ثمانون. توجد روابط إيدروجينية تصل أدنين ويوراسيل وبين سيتوسين وجوانين في كل من الساق والفروع أما القاعدة والحلقات فلا يوجد بها قواعد إيدروجينية.

وقد وجد في النباتات الزهرية أن بعض الأحماض الأمينية يحتاج إلى مركب سيتوكينين والبعض الآخر لا يحتاج. فمثلا في حالة للحامض الاميني سيرين والحامض الاميني تيروسين والحامض الاميني ايزولوسين تحتاج إلى مركب سيتوكينين وهو مركب (شكل ٩٢)



(شكل ٩٢) : جزئى tRNA ناقل للحامض الأميني سيرين وآخر ناقل للحامض الأميني تيروسين مع وجود مركب (DMAA) dimethylallyl adenine بالقرب من anticodon

الداى ميثيل الايل أدينين DMAA. وفي حالة tRNA للحامض الأميني أرجينين وقالين وجليسين وفينيل ألانين لا يتكون ولا يحتاج إلى مركب سيتوكينيني. أما أهمية المركب السيتوكينيني لـ tRNA فإنه لا بد من وجوده لكي يحدث ارتباط بين مقابل الكودون anticodon في tRNA والجزء المخصص له على كودون mRNA.

وهناك موقعان هاما على جزيء RNA لهما دخل ببناء البروتين، الموقع الأول يوجد في قمة الجزيء هو الذى يتحد فيه الجزيء بالحامض الأميني الخاص به، ويتكون هذا الموقع من الثلاث قواعد CCA أما الموقع الآخر هو السطح السفلى للقاعده مقابل الكودون anticodon

الذى تتزاوج قواعده مع كودونات mRNA المناسبة عند مركب mRNA والريبوسوم حيث يحدث ارتباط مؤقت بين mRNA و tRNA يسمح للحمض الأميني المحمول على tRNA أن يدخل فى سلسلة عديد الببتيد فى المكان المحدد. ولهذا النوع دور هام ورئيسى فى بناء البروتين حيث أنه يقوم بحمله الأحماض الأمينية إلى الريبوسومات، ولكل حمض أميني نوع خاص من RNA يعرف على الحمض الأميني وينقله (الأحماض الأمينية التى لها أكثر من شفرة يكون لها أكثر من tRNA)، وينسخ tRNA من جينات tRNA التى توجد عادة على شكل تجمعات من ٧-٨ جينات على نفس الجزء من جزيء DNA.

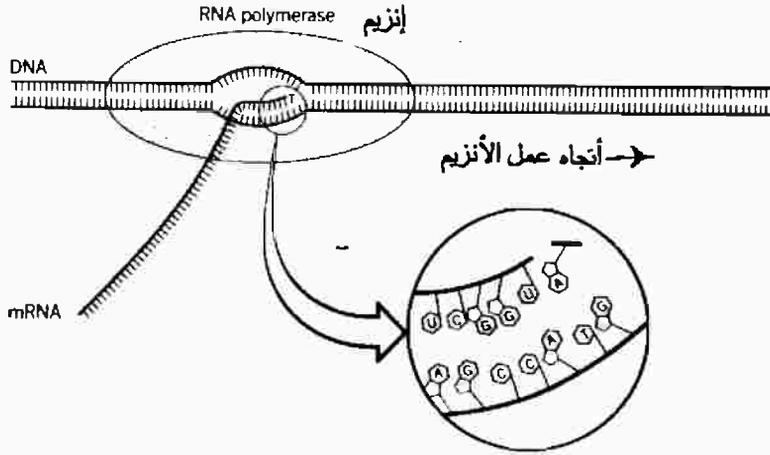
خطوات تخليق البروتين

تحدث خطوات عديده متعاقبه فى بناء البروتين وهى ما يأتى:

١ - النسخ Transcription

وهى عبارة عن عملية نسخ DNA إلى RNA أى أن يصبح RNA متوازن ومتكامل فى تركيبه مع شريط DNA الناتج منه. ويحدث ذلك بواسطة أنزيم آخر من أنزيمات البلمره وهو RNA - Polymerase . يبدأ هذا الأنزيم فى العمل على جزيء DNA ويسبب فك وإتعاد شريطى DNA عن بعضهما فى مسافه قصيره وهى تتراوح بين عشره إلى عشرون نيكلوتيد ثم يقوم بوضع النيكلوتيدات المكمله لشريط DNA فى هذه المنطقه ويتم ربطها وهكذا يتحرك الأنزيم عبر جزئى DNA ليكون سلسله من النيوكليوتيدات والتى يتكون منها mRNA يلاحظ أن النيوكليوتيدات التى يتكون منها تكون حره فى الخليه وأن الأنزيم يضعها فى مكانها المناسب على شريط DNA ويقوم بربطها (شكل ٩٣).

وبذلك يتكون mRNA مكمل فى تركيبه لشريط DNA ومشابه له ويختلف عن DNA فى إحتوائه على قاعده يوراسيل بدلا من الثيمين وأيضا فى وجود سكر الريبوز بدلا من سكر دى أكسى ريبوز. يتوقف عمل الأنزيم عندما يصل إلى شفرة stop ولذلك تتحرر سلسله mRNA ولا ترتبط بشريط DNA وتصبح حره فى الخليه.



(شكل ٩٣) : فك شريطى DNA عن بعضهما فى مكان عمل الأنزيم RNA polymerase وتكوين شريط جديد من mRNA أى عمليه النسخ .

٢ - الترجمة Translation

يتكون الريبوسوم من تحت وحدتين احدهما كبيرة والأخرى أصغر، وعندما لا يكون الريبوسوم قائما بعمله فى إنتاج البروتين فإن تحت الوحدتين تنفصلان عن بعضهما وتحرك كل منهما بحرية، وقد يرتبط كل منهما بتحت وحدة أخرى من النوع المقابل عندما تبدأ عمليه بناء البروتين مرة أخرى. توجد الريبوسومات حرة فى سيتوبلازم الخلية أو توجد ملتصقة بسطح الشبكة الأندوبلازميه ويتكون نتيجة لذلك الشبكة الأندوبلازميه الخشنة. تبدأ عمليه الترجمة بإرتباط mRNA بالريبوسوم وغير معروف التفاصيل الدقيقة لعمليه الربط. ولكن من المعروف أنه لكل mRNA موقع إرتباط بالريبوسوم وهو عبارته عن تتابع للنوكليوتيدات يرتبط بالريبوسوم وأول ثلاثة نوكليوتيدات ترتبط بالريبوسوم تسمى كودون البداية start codon ويمكن شرح ذلك فى حاله أوليات النواه حيث يرتبط mRNA بالريبوسوم ويحيث يصبح أول كودون أى كودون البدايه متجها إلى أعلى أى أن العمود الفقري back bone للجزيئ يكون لأسفل والقواعد النيتروجيه لأعلى وهو الوضع الصحيح للترجمه. يكون هذا الكودون (شكل

(٩٤) هو AUG كما في الجدول إما في الطرف الآخر من mRNA فيوجد ذيل مكون من حوالي مائتين أدينين A يعتقد أن هذا الذيل يحمي mRNA من التحليل بواسطة الأنزيمات الموجودة في السيتوبلازم.

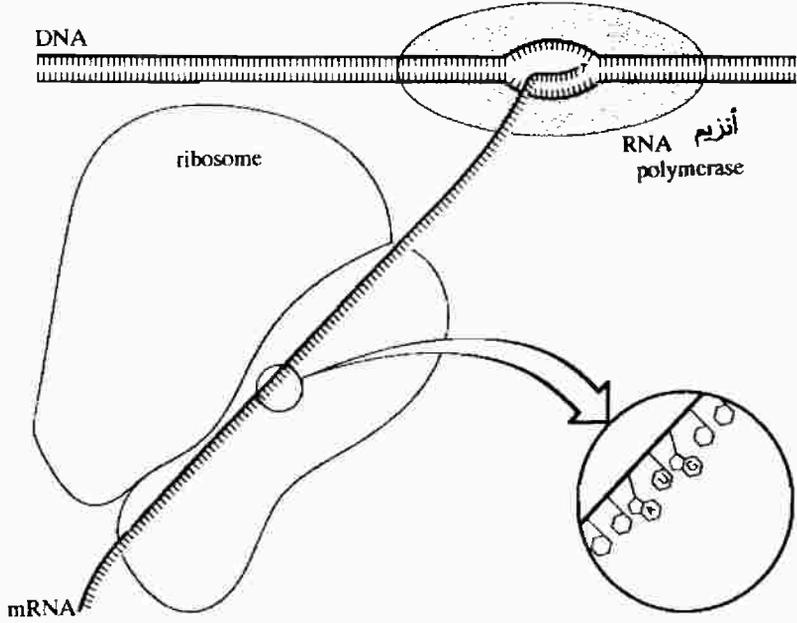


(شكل ٩٤) : شكل تخطيطي لجزء mRNA يظهر به موقع الارتباط بالريبوسوم *

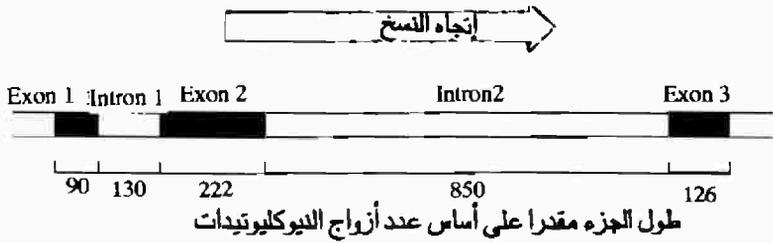
وذيل عديد الأدينين وينتهي أول كودون به إلى أعلى

تختلف أوليات النواه عن حقيقيات النواه في هذه الحالة فقد وجد في البكتريا أن الريبوسومات ترتبط ببداية mRNA وتبدأ حدوث الترجمة وتخليق البروتين بينما يكون الطرف الآخر للجزء mRNA مازال في مرحلة البناء على شريط DNA (شكل ٩٥) أما في حقيقيات النواه فإن mRNA ينفصل تماما عن شريط DNA ويصبح حر قبل إرتباطه بالريبوسوم ويحدث ذلك في الإنسان. يتداخل mRNA في جميع الحالات مع تحت الوحدة الصغيره من الريبوسوم وليست مع تحت الوحدة الكبيره.

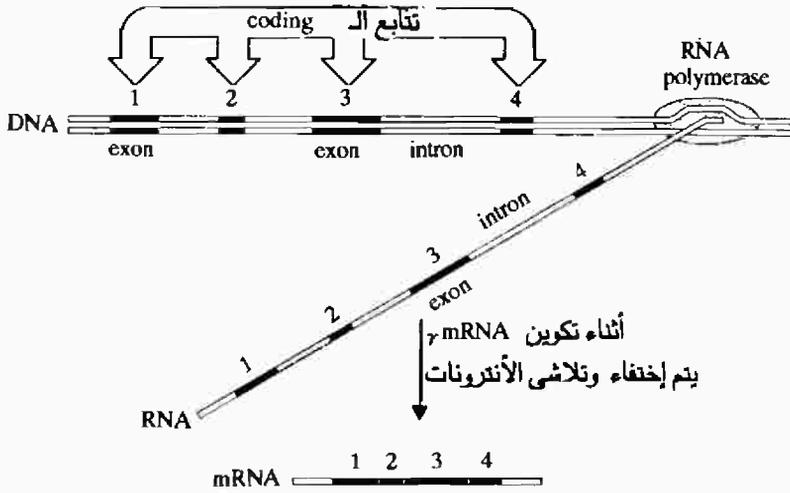
تختلف أوليات النواه عن حقيقيات النواه في فرق آخر جوهرى وهو أن الجين في حقيقيات النواه يتكون من أجزاء فعالة من النيوكليوتيدات أى أجزاء لها شفره coding regions وتدخل في بناء البروتين وتسمى أكسونات exons ويفصل بين هذه الأجزاء الفعالة أجزاء غير فعالة من النيوكليوتيدات أى أجزاء ليس لها شفره moncoding regions ولا تدخل في بناء البروتين وتسمى إنترونات introns ومثال لذلك الجين الموجود في الإنسان والخاص بتكوين بروتين B - globin فإن يتكون من ثلاث exons وإثنين introns . يعتبر B - globin أحد مكونات هيموجلوبين الدم (شكل ٩٦، ٩٧).



(شكل ٩٥) : تكوين mRNA من جزيئ DNA وإرتباطه بالريبوسوم في كائنات أوليات النواه



(شكل ٩٦) : تركيب جين B - globin في الإنسان يتكون من Exons و Introns وعدد أزواج النيوكليوتيدات في كل جزء.



(شكل ٩٧): إختفاء الأنترونات أثناء تكوين mRNA. جزءه من جين يوجد به ٤ أكسونات وأيضا أنترونات. وأثناء تخليق RNA يوجد به أيضا أكسونات وأنترونات ولكن عدد تمام تكوين mRNA تختفى الأنترونات ولا توجد إلا الأكسونات.

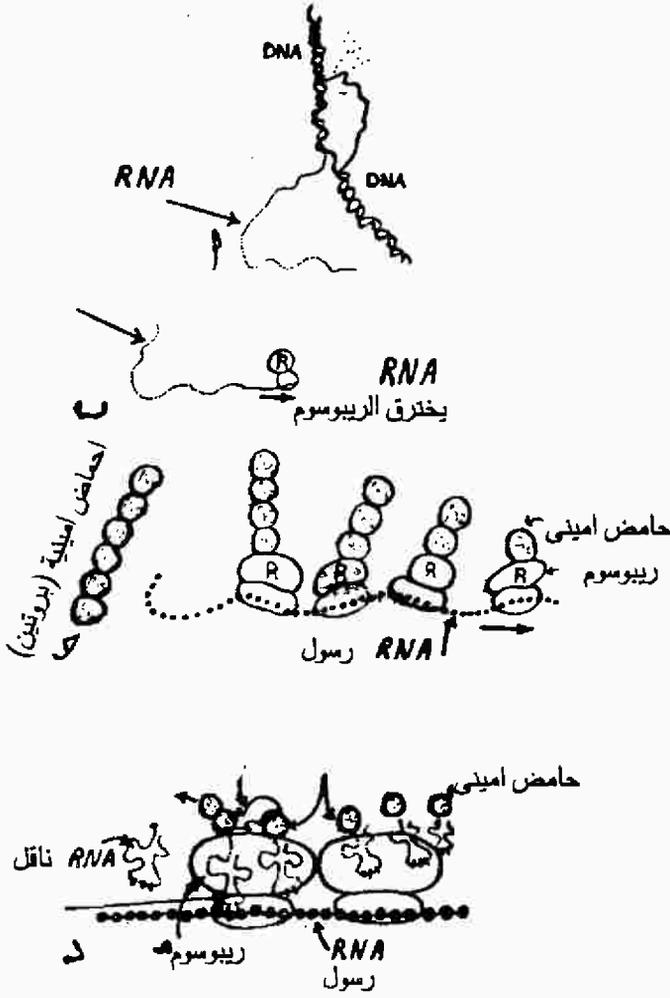
تختلف هذه الأجزاء في عدد النيكليوتيدات ففي أكسون رقم ١ يتكون من تسعون زوج وفي أكسون رقم ٢ يتكون من ٢٢٢ زوج وفي أكسون رقم ٣ يتكون من ١٢٦ زوج وفي أنترون رقم ١ يتكون من ١٣٠ زوج وفي أنترون رقم ٢ يتكون من ٨٥٠ زوج. وفي أنواع أخرى من الجينات قد يكون في الجين الواحد أكثر من خمسون أنترون. ولكن في أوليات النواه الأمر يختلف حيث أن الجين في خلايا البكتريا لا يحتوى إطلاقا على إنترونات. ولذلك فإن mRNA في حقيقيات النواه يتكون من مناطق تقابل الأكسونات ومناطق تقابل الأنترونات وذلك في أثناء تكوينه ولكن عندما يكون قابل للالتحام بالريبوسوم فإن يصبح خال من الأنترونات ويصبح قصير. ويتضح أن الخلية لها نظام معين يمكن عن طريقه قطع الأنترونات وفصلها من mRNA ولذلك يصبح mRNA في النهاية خال منها وعباره عن أكسونات ملتصقه ببعضها ولذلك يصبح قصير الطول. أما عن كيفية حدوث ذلك في الخلية

فهو غير معروف. أما في بدائيات اللواه مثل البكتيريا فإن mRNA لا يحتوى على مناطق أنتروونات في أثناء تكوينه ولذلك فإن طوله لا يقصر عند إرتباطه بالريبوسوم يعتقد أن البكتيريا كانت تكون mRNA به أنتروونات ولكن أثناء التطور عبر ملايين السنين فقدت البكتيريا هذه الصفة وأصبح الآن mRNA البكتيرى خال من الأنترونات.

يوجد على الريبوسوم موقعان يمكن أن ترتبط بهما جزيئات tRNA . الموقع p على الريبوسوم يسمى موقع البيبتيديل peptidyl والموقع A الذى يليه يسمى موقع أمينوأسيل aminoacyl . ولذلك فإن فى البدايه يكون كودون البدء AUG عند موقع البيبتيديل. لكل حامض أمينى tRNA خاص به ويرتبط الحامض الأمينى فى قمم tRNA الخاص به بواسطة أنزيم aminoacyl tRNA synthetase . وحيث أنه يوجد عشرون حامض أمينى فإنه يوجد عشرون tRNA وعلى الأقل عشرون نوع من إنزيم tRNA synthetase حيث أنه على الأقل يوجد إنزيم خاص لكل حامض أمينى. وكل إنزيم قادر على التعرف على نوع tRNA الخاص به ويلتصق به ويقوم بربط الحامض الأمينى الخاص به بـ tRNA . الأحماض الأمينية المختلفة توجد حره فى الخليه وذلك قبل إرتباطها بـ tRNA . وبعد ربط الحامض الأمينى بـ tRNA الخاص به فإن الأنزيم يتحرر ويصبح حر ويكرر عمليه الربط مره أخرى. يتداخل tRNA بما يحمله من حامض أمينى مع الريبوسوم وغير معروف حتى الآن كيفية حدوث وطبيعته التداخل. ولكن يوجد عدده تفسيرات لكيفية حدوث العمليه ومنها أن tRNA المرتبط بالحامض الأمينى يتحرك ويستقر على المنطقه المخصصه له على mRNA المتداخل مع تحت الوحده الصغرى من الريبوسوم وهى موقع أمينوأسيل فى الريبوسوم وبعد ذلك ترتبط تحت الوحده الكبرى الحره بتحت الوحده الصغرى السابقه لتتكون وحده الريبوسوم الكامله. ولكى تحدث الخطوات ويتكامل الريبوسوم يحتاج إلى أنواع خاصه من البروتين وتسمى بعوامل البدايه (البدء) initiation factors (IF) وهى IF₁, IF₂, IF₃ . أول كودون فى mRNA هو AUG وتكون القواعد النيروجينية متجهه لأعلى ثم تتزاوج بواسطة الروابط الإيدروجينية قواعد مقابل الكودون UAC لجزيئ tRNA الخاص بالميثيونين مع كودون AUG وذلك فى موقع البيبتيديل وبذلك يصبح الحامض الأمينى ميثونين methionine أول حامض أمينى فى سلسله عديد البيبتيد التى ستبنى. وأما عن عمليه ربط ثان الأحماض الأمينية فى سلسله عديد البيبتيد فإن tRNA الثانى الذى يرتبط بحامض أمينى معين يرتبط مقابل الكودون الخاص به بالكودون التالى على جزيئ mRNA وبالتالي يصبح الحامض الأمينى

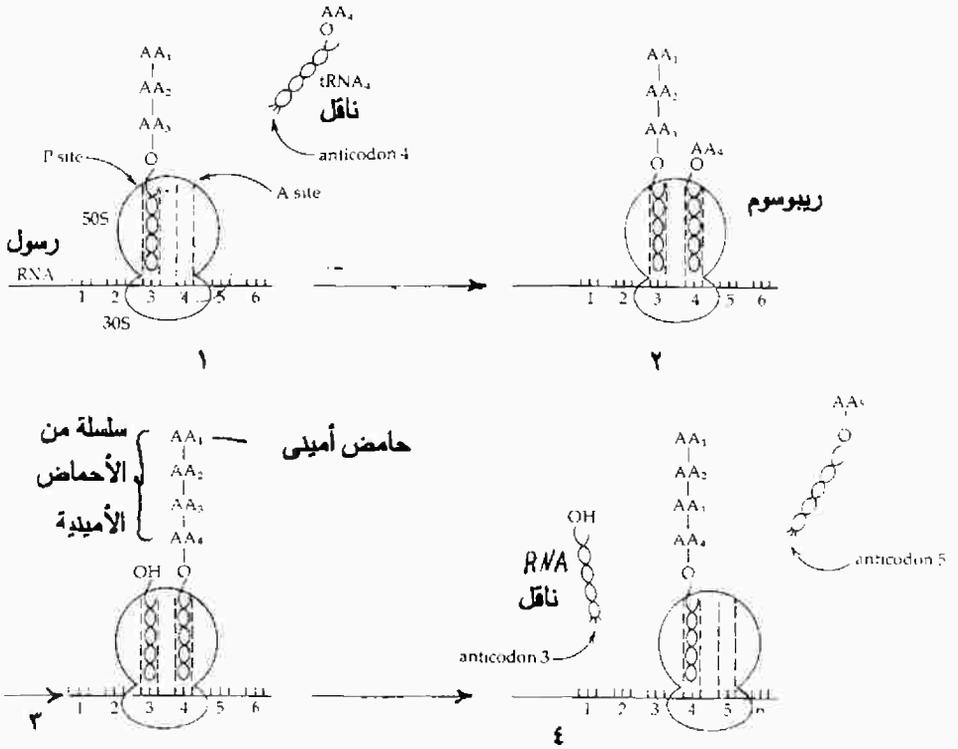
الذي يحمله جزئى tRNA الحامض الأمينى الثانى فى السلسلة. يحدث بعد ذلك تفاعل خاص لربطه الحامضين الأمينين ببعضهما بواسطة رابطته ببتيديه ويسمى تفاعل نقل الببتيدىل peptidyl transferase reaction والأنزيم الخاص بهذا التفاعل عبارته عن جزء من تحت وحده الريبوسوم الكبيره. بذلك يرتبط الحامض الأمينى الأول فى السلسلة وهو الميثيونين بالحامض الأمينى الثانى فى السلسلة على tRNA الثانى ولذلك يصبح tRNA الأول والذي كان يحمل الحامض الأمينى ميثونين فارغ. وفى هذه الأثناء يتحرك tRNA الثانى إلى موقع الببتيدىل ويطلق عليه أيضا موقع p.p site . وفى نفس هذه اللحظة يتحرك mRNA نفس المسافة. يوجد رأى آخر أن الريبوسوم يتحرك فى عكس إتجاه mRNA وفى كلا الحالتين يصبح الموقع أمينوأسيل ويطلق عليه أيضا موقع A ، Site A فارغ ومستعد لأستقبال tRNA ثالث يحمل حامض أمينى ثالث ونتيجة لذلك يصبح tRNA الأول والذي كان يحمل الحامض الأمينى ميثيونين فارغ وحر ويترك الريبوسوم وهكذا تتكرر العمليه وتزداد سلسلة الأحماض الأمينية فى الطول (الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها على هيئة سلسلة بروابط ببتيديه تسمى عديد الببتيد polypeptide) وهكذا تستمر العمليه حتى نصل إلى أحد كودونات التوقف Stop وهى UGA و UAA و UAG وفى هذه الحالة تتوقف العمليه ويتحرر عديد الببتيد من الريبوسوم. وتحتاج عمليه تحرر عديد الببتيد إلى نوع من البروتين يسمى عامل التحرير حيث يرتبط بروتين عامل التحرير (RF) release factor بكودون التوقف فى المكان aminoacyl (A) على الريبوسوم.

وبعد ذلك ينفصل تحت وحدتين الريبوسوم الصغيره والكبيره عن بعضهما وعن mRNA وذلك فى وجود نوع خاص من البروتين يسمى عامل البداية (IF₃) . توجد أعداد كبيره من الريبوسومات متصله بجزئى واحد من mRNA وتعمل فى آن واحد ويسمى ذلك التركيب بعديد الريبوسومات polysomes أو polyribosomes حيث أنه عند بروز طرف mRNA من الريبوسوم ترتبط بتحت وحده ريبوسوم أخرى صغيره تبدأ بدورها بناء عديد الببتيد وهكذا تتكرر العمليه والأرتباط بالريبوسوم حتى يلتصق عدد كبير من الريبوسومات قد يصل مائه (شكل ٩٨ - ١٠١). كان يعتقد أن mRNA يخترق تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم ولكن الآن يفضل الرأى أن mRNA يوجد بين تحت الوحدتين الملتصقتين ببعضهما.



شكل ٩٩ : خطوات تكوين بروتين الخلية

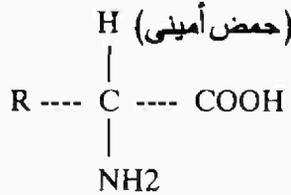
- (أ) تكوين RNA رسول من DNA .
- (ب) اختراق RNA رسول للريبوسوم .
- (ج) عديد الريبوسومات يكون البروتين .
- (د) منظر تفصيلي لعديد الريبوسومات وتكوين البروتين .



(شكل ١٠٠) : خطوات تخليق البروتين. يرسم tRNA حلزوني للسهولة .

خطوات تكوين البروتين

هناك خطة مشتركة لتكوين آلاف الأنواع من البروتينات التي توجد في الأنظمة الحية، فهناك عشرون نوعا من الوحدات البنائية للبروتين هي الأحماض الأمينية، وللأحماض الأمينية العشرين تركيب أساسى واحد حيث يحتوى كل حمض أمينى على مجموعة كربوكسيلية COOH ومجموعة أمينية NH₂ يرتبطان بأول ذرة كربون، كما توجد ذرة هيدروجين تعتبر المجموعة الثالثة التي ترتبط بنفس ذرة الكربون، وفيما عدا الحمض الأمينى جلايسين glycine الذى يحتوى على ذرة هيدروجين أخرى مرتبطة بذرة الكربون الأولى فإن الأحماض الأمينية التسعة عشر الباقية تحتوى على مجموعة رابعة (R) تختلف باختلاف الحمض الأمينى، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها فى وجود الإنزيمات الخاصة فى تفاعل نازع للماء بروابط ببتيدية peptide bonds لتكوين حامضين أمينيين مرتبطين ببعضهما ويسمى ثنائى الببتيد dipeptide ثم يرتبط حامض أمينى ثالث فيسمى ثلاثى الببتيد tripeptide ثم يرتبط حامض أمينى رابع فيسمى رباعى الببتيد وهكذا حتى تصبح السلسلة مكونة من أحماض أمينية عديدة فتسمى عديد الببتيدات polypeptide ويعتبر عديد الببتيدات بوليمر polymer .

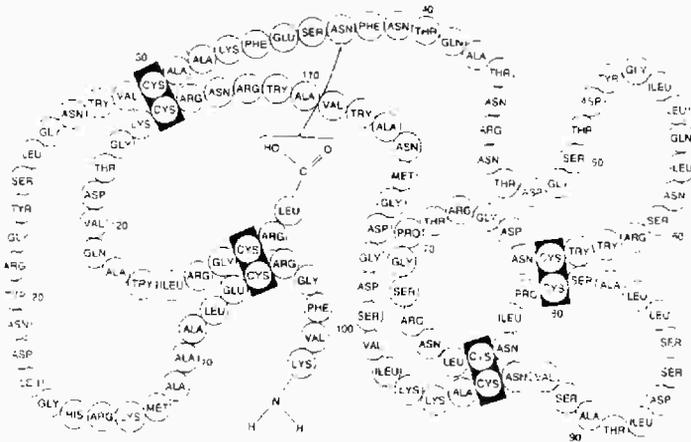


يوجد عديد الببتيد على هيئة شريط ويسمى التركيب الأولى primary structure ويكون فى هذه الحالة وهو لا يزال متصل بالريبوسوم ثم يحدث بعد ذلك أن بعض أجزاء الشريط تلتف حلزونيا ويسمى هذا التركيب helix - & ويعتبر فى هذه الحالة أنه التركيب الثانوى secondary structure للبروتين. يمكن أن يحدث ذلك ولازال عديد الببتيد متصل بالريبوسوم. ثم يحدث بعد ذلك التركيب الثالثى للبروتين tertiary structure حيث نجد أن جميع أجزاء الجزيء بما فيها helix - & تلتف على بعضها لتكون بروتين له شكل ذو ثلاث أبعاد three dimensional

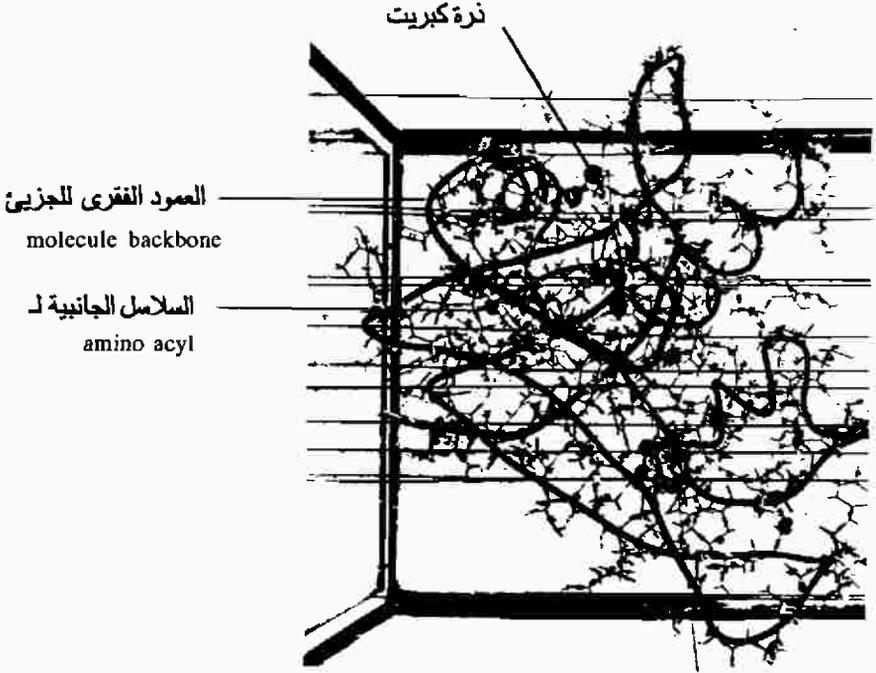
shape وقد أمكن معرفة هذا التركيب بواسطة أشعة x . في التركيب الثالثي وبعد حدوث الألتفاف تتكون أنواع كثيرة من الروابط وأهمها disulfide bridges والروابط الكارهه للماء hydrophobic bonds والروابط الإيدروجينية hydrogen bonds . وتعمل هذه الروابط على الحفاظ على الألتفاف وشكل البروتين حيث أنه في عدم وجود هذه الروابط يمكن أن ينفك الألتفاف في جزئي البروتين المميز للتركيب الثالثي. ومما هو جدير بالذكر أن التركيب الثانوي والثالثي للبروتين يتحكم فيه التركيب الأولي both the secondary and tertiary configuration of a protein are determined solely by its primary structure.

يمكن أن يتكون التركيب الرابعي للبروتين the quaternary structure of a protein وذلك بأتحاد أكثر من عديد الببتيد أى يكون اثنين أو ثلاثة أو أكثر ويكون لكل عديد الببتيد على حده التركيب الإبتدائي والثانوي والثالثي الخاص به ومثال ذلك بروتين أنزيم جلوتاميك ديهيدروجينيز.

تختلف البروتينات في ترتيب ونوع وعدد الأحماض الأمينية الداخلة في التركيب الأولي وأن التركيب الأولي هو الذى يحدد مواصفات التركيب الثانوي والثالثي وأيضاً الرابعي إن وجد. يتضح أن الجينات تتحكم في التركيب الأولي ولذلك فإن الجينات تتحكم في تركيب البروتين (شكل ١٠٢، ١٠٣).



(شكل ١٠٢): التركيب الإبتدائي لبروتين ليزوزيم lysozyme بياض بيض الدجاج يوضح أربعة روابط disulfide bridges بين المستكين cysteine . أسماء الأحماض الأمينية مختصرة بالحروف الأولى من كل حامض .



(شكل ١٠٣): جزيئ بروتين نو ثلاث أبعاد وهو عبارة عن أنزيم ribonuclease . العمود الفقري للجزيئ وهو سلسلة عديد الببتيدات polypeptide عبارة للخط الأسود الثقيل وأما عن السلال الجانبيّة لـ amino acyl عبارة عن الخطوط الرقيقة وذرات الكبريت عبارة عن شكل كروي تكون أربعة disulfide bridges .

توجد أنواع كثيرة من البروتين في الكائنات الحية ويمكن تصنيفها إلى مجموعتين كما يأتي :

١ - البروتينات التركيبية Structural Proteins :

أى التى تدخل في تراكيب محددة في الكائن الحى مثل الأكتين والميوسين اللذين يدخلان في تركيب العضلات وغيرها من أعضاء الحركة، والكولاجين الذى يدخل في تركيب الأنسجة الضامة، والكيراتين الذى يكون الأغطية الواقية كالجلد والشعر والحوافر والقرون والريش وغيرها .

أما البروتينات الهستونية فهي مجموعة محددة من البروتينات التركيبية توجد في النواه، والهستونات بروتينات صغيرة تحتوي على قدر كبير من الحمضين الأمينيين القاعديين أرجنين Arginine وليسين Lysine ، وتحمل المجموعة الجانبية (R) لهذين الحمضين الأمينيين عدد الأس الهيدروجيني (pH) للخلية شحنات موجبة. وعلى ذلك فهي ترتبط بقوة بمجموعات الفوسفات الموجودة في جزيء DNA والتي تحتوي على شحنات سالبة، وتوجد الهستونات بكميات ضخمة في كروماتين أى خلية.

٢ - البروتينات التنظيمية Regulatory Proteins :

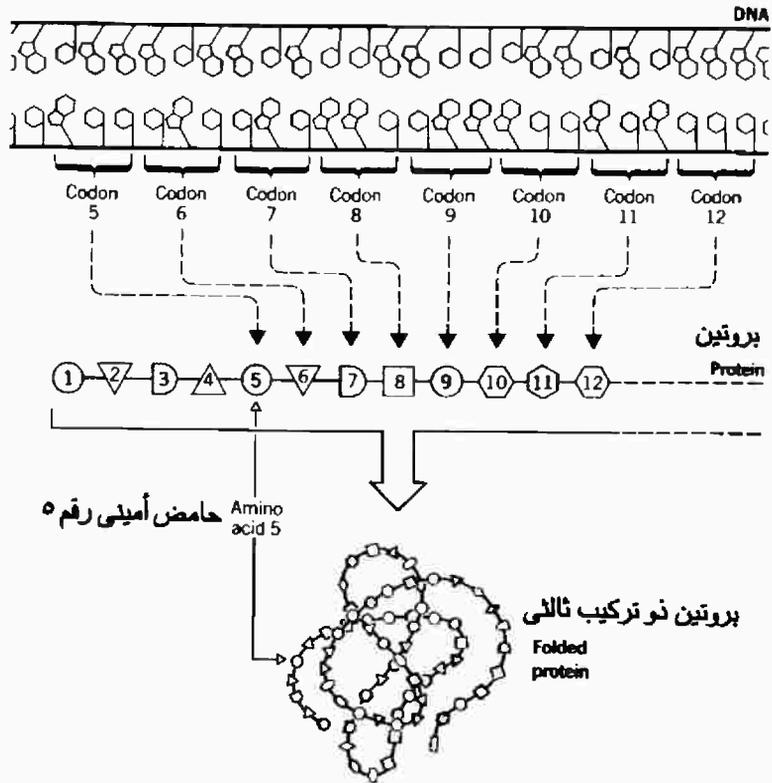
أى التى تنظم العديد من عمليات وأنشطة الكائن الحى، وهى تشمل الإنزيمات التى تعدل التفاعلات الكيميائية بالكائنات الحية والأجسام المضادة التى تعطى الجسم مناعة ضد الأجسام الغريبة والهرمونات وغير ذلك من المواد التى تمكن الكائنات الحية من الاستجابة للتغير المستمر فى البيئة الداخلية والخارجية.

وتعزى الفروق بين البروتينات المختلفة إلى الفروق فى أعداد وأنواع وترتيب الأحماض الأمينية فى عدد الببتيدات، كما تعزى إلى عدد عديد الببتيدات التى تدخل فى بناء البروتين بالإضافة إلى الروابط الايدروجينية الضعيفة التى قد تعطى للجزئ شكله المميز، وعملية تخليق البروتين عملية معقدة تتضمن تداخل العديد من الأنواع المختلفة من الجزيئات وخاصة الأنزيمات.

ملخص لعملية تخليق البروتين

لتخليق أى بروتين يتم نسخ الشفرة الوراثية له والموجودة على جزيء DNA إلى جزيء RNA الرسول (mRNA) messenger RNA الذى يحمل تلك الشفرة إلى الريبوسومات حيث يتم بناء هذا البروتين. وتحدد الشفرة الوراثية الموجودة على جزيء DNA وبالتالي على جزيء mRNA ترتيب الأحماض الأمينية التى ستكون عديد الببتيد، إلا أن كلمات الشفرة، فى mRNA لا تتعرف بشكل مباشر على الحمض الأميني المقابل ولكنها تحتاج إلى جزيء موصل adaptor هو (tRNA) transfer RNA . وهناك جزيء RNA خاص بكل حمض أميني، ويرتبط

أحد طرفي هذا الجزيئ بالحمض الأميني الخاص به، كما يوجد على جزء من tRNA تتابع للنوكليوتيدات أى مقابل الكودون يعرف على ويتزاوج مع تتابع للنوكليوتيدات (كودون) على mRNA وعند قراءة شفرة mRNA من على الريبوسوم فإن جزيئات tRNA تصل بالتتابع وتعطى أحماضها الأمينية إلى سلسلة عديد الببتيد النامية. وتستخدم جزيئات tRNA المرة بعد الأخرى في نقل الأحماض الأمينية، كما أن جزيئات mRNA يمكن أن تترجم أكثر من مرة لتعطى العديد من نسخ عديد الببتيد الذى تحمل شفرته. ثم يتكون من عديد الببتيد جزيئ البروتين. ولذلك يصنع أن الجين أو الجينات تتحكم في تخليق البروتين (شكل ١٠٤).



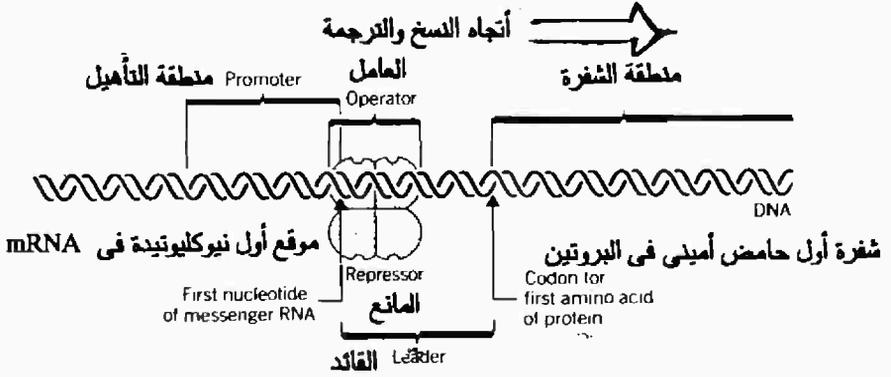
(شكل ١٠٤) : خطوات تخليق البروتين من DNA .

التثبيط والتوهين

لكي يتمكن مهندس الوراثة genetic engineer من تنظيم عملية إنتاج RNA يجب أن يتحكم في كيفية البدء والإنتهاء في عملية الإنتاج حيث أنه إذا لم يمكنه كيف ومن أين يبدأ فستكون عملية إنتاج RNA مختلفة وأيضاً إذا لم يمكنه كيف ومتى ينتهي من العملية فسيحدث إختلال في إنتاج RNA . يمكن التحكم في ذلك بواسطة طريقتين وهما المنع أو التثبيط repression والتوهين attenuation وقد تم دراسة هاتين الطريقتين بالتفصيل في البكتيريا .

دراسة تحكم الجين في الصفة عن طريق إستخدام الموانع أو المثبطات repressors أجريت على بعض الحالات ولكنها درست بكثرة في حالة الأنزيمات المحللة للمركبات الغذائية التي تتكون داخل الخلية البكتيرية. تتميز هذه الأنزيمات المدروسة بأنها لا تنتج داخل الخلية البكتيرية إلا في حالة وجود المركب الغذائي الذي تحلله substrate في داخل الخلية البكتيرية. بمعنى أنه في حالة عدم وجود المركب داخل الخلية البكتيرية لا يتكون الأنزيم. ومثال ذلك إنزيم لاكتيز داخل البكتيريا *E. coli* . وقد وجد أن الجين أو الجينات التي تتحكم في الأنزيم تتوقف عن عملها وبالتالي لا ينتج الإنزيم في حالة وجود نوع معين متخصص من البروتين يسمى المانع repressor والذي يرتبط بحلزوني DNA في منطقة ملاصقة لبداية المنطقة الخاصة بالجين وبالتالي يمنع الجين من إظهار تأثيره. حيث أن وجود المانع يمنع إنزيم RNA polymerase من إداء عمله وبالتالي لا تتكون رسالة من الجين أى لا يتكون mRNA خاص بهذا الجين والعكس صحيح عند توفر سكر اللاكتوز داخل الخلية البكتيرية فإن المانع يترك مكانه على الجين ويلتصق بالسكر ولذلك يصبح الجين قادر على عمل رسالة message ويصبح إنزيم RNA polymerase قادر على العمل في منطقة الجين ودائماً يرتبط الأنزيم بالـ DNA في منطقة قريبة من الجين تسمى منطقة التأهيل promoter . يحرك الأنزيم من منطقة التأهيل إلى منطقة الجين ويتكون في هذه المنطقة mRNA قصير يسمى القائد leader أى leader mRNA ثم يلي ذلك تكوين mRNA الخاص بمنطقة الجين والمكون لشفرات الجين ثم يلتصق mRNA بالريبوسومات لتكوين البروتين المكون لأنزيم اللاكتيز نتيجة لتكوين الأنزيم يتم تحليل سكر اللاكتوز. بعد تمام تحليل سكر اللاكتوز لا يجد المانع السكر ليلتصق به فينتقل ويرتبط مرة أخرى بالجين في منطقة تسمى العامل operator وذلك يمنع الجين من إظهار

تأثيره (شكل ١٠٥) أي أنه يمنع تكون الرسالة الخاصة بتكوين أنزيم اللاكتيز ويعمل آخر

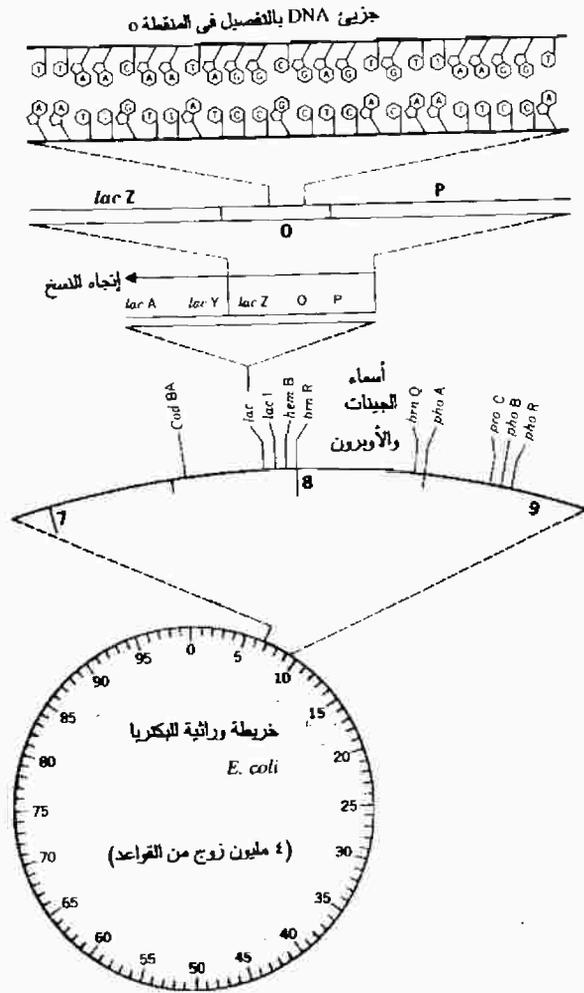


(شكل ١٠٥) : التحكم في إيراد صفة الجين بواسطة gene expression repressor

يمنع تكوين mRNA الخاص بأنزيم اللاكتيز. ومما هو جدير بالذكر أن لكل جين مانع خاص به وأيضا منطقة تأهيل خاصة به. ولهذا النظام فائدة عظيمة للخلية حيث أنه يوفر الطاقة اللازمة لإنتاج الأنزيمات في عدم وجود مادة التفاعل substrate وحيث يكون إنتاج الأنزيمات غير مفيد للخلية. هذه الأنزيمات التي تتميز بأنها تتكون فقط في وجود مادة التفاعل تسمى بالأنزيمات التأقلمية adaptive enzymes ويوجد منها الكثير في الكائنات الحية الدقيقة مثل البكتيريا والفطريات والميكوبلازما. أحيانا تمنع مجموعة من الجينات قريبة من بعضها من أظهر تأثيرها بواسطة مانع واحد فقط فتسمى هذه المجموعة من الجينات أو بيرون operon . ومن أحسن الأمثلة لذلك حالة سكر اللاكتوز في خلية البكتيريا حيث أنه يوجد ٣ جينات متقاربة هي التي تتحكم في التحول الغذائي لسكر اللاكتوز وتخليق إنزيم اللاكتيز ويسمى operon في هذه الحالة باسم lac . والجينات الثلاثة هي lac A ، lac Y ، lac Z مترابطة بجانب بعضها على الكروموسوم البكتيري بالقرب من الموقع ٨ للخريطة الكروموسومية near map position 8 . يبدأ عمل إنزيم RNA Polymerase من المكان P وينتج ويستمر في عمله

حتى نهاية الجين *lacA* . أى أن الأنزيم يتوقف عمله تماماً بعد إتمام مروره على الجين *lacA* . وعندما يرتبط مانع أوبيرون *lac* فى منطقة الجين *lac 1* مع *lac operator* وهو المنطقة *O* فإن عملية نسخ mRNA تتوقف تماماً بالنسبة لهذه الثلاث جينات. ومما هو جدير بالذكر أن تتابع الـ nucleotides فى هذه المنطقة من الكروموسوم البكتيرى معروف تماماً كما أن تتابع nucleotides فى هذا المانع معروف كما هو فى الشكل (شكل ١٠٦).

أما فى حالة التوهين *attenuation* فإنه يتكون شريط قصير من mRNA . درست هذه الحالة دراسة مستفيضة على الجينات التى تقوم بتخليق الأحماض الأمينية. حيث أنه من المعروف أنه لا بد من وجود توازن فى كمية الأحماض الأمينية فى الخلية وعددها عشرون وعند وجود حامض أمينى بتركيز عال فى الخلية فإن الخلية توقف إنتاج هذا الحامض لفترة وبذلك فإنها تدخر وتحفظ الطاقة اللازمة لإنتاج هذا الحامض الأمينى الزائد عن حاجة الخلية. أى أنه يوجد حفظ وتنظيم لطاقة الخلية المستعملة فى إنتاج الأحماض الأمينية. يحدث ذلك فى الخلية عن طريق عملية التوهين. ومثال ذلك حالة التوهين فى جينات الحامض الأمينى تريتوفان. حيث أن أنزيم RNA polymerase يبدأ فى عمل mRNA على بعد مسافة محدودة من بداية أول جين فى الرسالة. ينتج عن ذلك ما يسمى RNA القائد *leader RNA* وهذا الأخير يتكون منه بروتين قصير قائد *a short leader protein* . ويوجد على RNA القائد كودونات تحتم وجود التريتوفان فى البروتين القائد. وفى منطقة القائد *leader region* (وهى الجزء من DNA الذى يبدأ بمنطقة نشاط RNA polymerase وينتهى عند بداية أول جين فى الرسالة) يوجد إشارة وقوف فعالة *active stop signal* تسمى الموهن *attenuator* . عند وجود تركيز عال من التريتوفان فإن الريبوسومات تكون قادرة على تخليق البروتين القائد ونتيجة لذلك فإن منطقة موهن الـ RNA - RNA *attenuator region of RNA* تنطوى وتلتوى بطريقة معينة وتمنع وتوقف نشاط إنزيم RNA polymerase . وبذلك يتوقف تكوين البروتين الخاص بتكوين وتخليق التريتوفان. ولكن فى وجود ندره فى تركيز التريتوفان. فإن حركة الريبوسوم تتأخر أو تتوقف عندما يصل إلى منطقة كودونات التريتوفان فى RNA القائد اللازم لتكوين البروتين القائد. تأخير أو توقف الريبوسوم يمنع الموهن من تأثيره على وقف نشاط إنزيم RNA polymerase ولذلك ينشط هذا الأنزيم ويستمر فى عمله على جزيئ DNA ليكون رسالة



(شكل ١٠٦) : operons على الكروموسوم البكتيرى للبكتيريا *E. coli*. الكروموسوم البكتيرى أى DNA يكون حلقي ويقسم إلى ١٠٠ وحدة. تكبير جزء من DNA عند الوحدة رقم ٨ يوضح مكان lac operon. يوجد جينات lac A و lac Y و lac Z تتحكم فى تخليق سكر اللاكتوز. يتم نسخ هذه الثلاث جينات فى mRNA واحد.

P أى promoter وهى المنطقة التى فيها إنزيم RNA polymerase يرتبط بجزئى DNA أما عن O أى operator وهى المنطقة التى فيها يرتبط بالجزئى Lac Z. هى عبارة عن الجين المسئول عن تكوين الأنزيم الذى يحلل اللاكتوز. ترتيب النيوكليوتيدات فى DNA فى الجين الخاص بسكر اللاكتوز معروف تماما. أعلى الرسم جزئى تفصيلى لمنطقة O على الكروموسوم البكتيرى.

كاملة entire message . ويتكون mRNA كامل يحمل كل مواصفات الجينات الداخلة فى تخليق البروتين اللازم لتكوين الأنزيمات اللازمة لتخليق التريبتوفان. كل واحد من هذه الجينات له موقعه الخاص على mRNA وله مكان للبداية start site للربط بالريبوسومات خاص به. وهكذا فإن تركيز التريبتوفان فى الخلية يتحكم وينظم تخليق التريبتوفان.

مما سبق ينضح أن المنع والتوهين هما طريقتان هامتان لكى تتحكم الخلية فى إنتاج مركبات لازمة لها وتمنع تكوين مركبات غير لازمة. ومثال لذلك فى الإنسان أو الحيوان أو النبات فإن الخلية تحتوى على جينات كثيرة بعض هذه الجينات يحتاجها الكائن الحى فى فترة من فترات حياته فقط لأنها تتحكم فى إنتاج مركبات معينة مطلوبة فى فترة معينة بينما تكون هذه المركبات غير مطلوبة فى فترة أخرى من الحياة. ولذلك يجب منع الجينات عن إنتاج هذه المركبات ويكون ذلك بالمنع أو التوهين أو كليهما. ومن أمثلة ذلك الإنسان يمكن أن تنطبق عليه هذه القاعدة فى مرحلة البلوغ تتكون مركبات أو وحدات لا يكونها فى مرحلة الطفولة قد تكون هذه هورمونات معينة أو أنزيمات أو مركبات معينة أو مركبات معينة فى مرحلة البلوغ فى الذكور تتكون الحيوانات المنوية التى لا تتكون بالطبع فى مرحلة الطفولة أو الصبى.

يعتبر نقل جينات وصفة تخليق الأنسولين من الإنسان إلى البكتيريا من الأنجازات العظيمة للهندسة الوراثية. ولكن بعد نقل هذه الجينات إلى البكتيريا كيف تتحكم فى تنشيط أو منع هذه الجينات من أداء وظيفتها. حيث أنه بعد نقل هذه الجينات إلى البكتيريا فإننا نحتاج أولاً أن نمنع البكتيريا من إنتاج الأنسولين لكى تتكاثر بكفاءة عالية وتنتج أعداد هائلة من الخلايا البكتيرية وبعد ذلك نشط هذه الأعداد الهائلة من الخلايا البكتيرية لإنتاج بروتين الأنسولين وبذلك يمكن الحصول على كميات كبيرة من الأنسولين وتصبح الطريقة إقتصادية. يمكن التحكم فى ذلك بواسطة المنع. حيث يوضع الجين أو الجينات الخاصة بإنتاج الأنسولين فى DNA البكتيرى مباشرة بعد منطقة المنع. وعن طريق إزالة المنع أو وضعه فى مكانه يمكن التحكم فى إنتاج الأنسولين أو وقفه وهكذا يمكن التحكم فى إنتاج الأنسولين أو وقفه فى الخلية البكتيرية تبعاً للحاجة وتشابه هذه الحالة تحليل المركبات الغذائية المتوفرة أو الغير متوفرة داخل الخلية البكتيرية والتى تتحكم فى إزالة أو ربط المنع.

الأنزيمات والهندسة الوراثية

تستعمل الأنزيمات كأداة هامة في تجارب الهندسة الوراثية وتحتاج الأنزيمات إلى عزلها وفصلها من خلايا أو أنسجة العائل ثم يتم تنقيتها قبل إستعمالها في التجارب، ومثال لذلك أنزيم DNA polymerase . يمكن خلط الخلايا البكتيرية المحتوية على هذا الأنزيم بكرات زجاجية صغيرة الحجم ثم سحق هذا المخلوط المتكون من الكرات والخلايا في خلاط . يجب أستعمال كمية كبيرة من الخلايا البكتيرية حوالى نصف كيلو وأن تخلط الخلايا البكتيرية بالمحلول المنظم قبل العمل . وفي أثناء أستعمال الخلاط تسبب كرات الزجاج تجريح وكسر جدار الخلايا البكتيرية وبذلك تختلط محتويات الخلايا البكتيرية ببعضها وتسمى مستخلص الخلايا cell extract . ثم يتم عزل وفصل هذا الأنزيم من مستخلص الخلايا في خطوات عديدة كما يلي . تختلف المحتويات المختلفة للخلية والعصيات organelles والأنزيمات في خواصها الكيماوية والطبيعية وأحجامها ووزنها الجزيئى ولذلك يمكن فصلها عن بعضها بواسطة القوة الطاردة المركزية . يمكن أستعمال قوة طاردة مركزية بسرعات مختلفة . توجد محتويات الخلايا الكبيرة وذات الوزن الجزيئى الكبير منسبة في قاع أنبوية جهاز الطرد المركزى وتوجد الأنزيمات في السائل supernatant الموجود في الأنبوية .

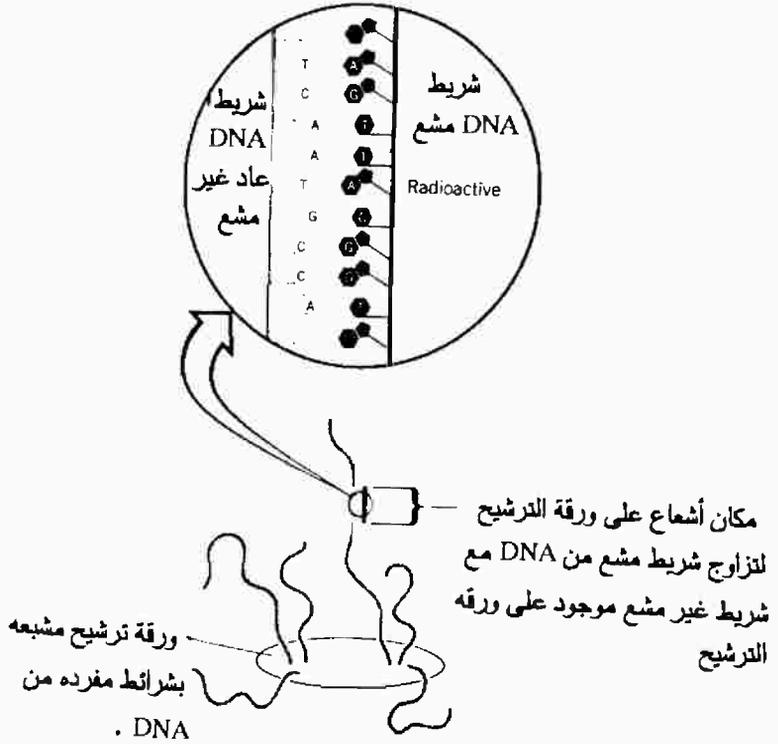
بعد عملية الإستخلاص يجب تنقية الأنزيم ويكون ذلك عادة بواسطة طريقة العمود للتحليل الكروماتوجرافى column chromatography . حيث توجد أنبوية زجاجية رأسية مفتوحة من أسفل ممتلئة بمواد صلبة معينة فقد تكون نوع معين من سليكا جل silica gel أو مسحوق الورق ground - up paper المعامل كيماويا ألخ . ثم يصب السائل الناتج من الطرد المركزى من أعلى الأنبوية ويمر السائل خلال مادة العمود وبعض مكونات السائل ستلتصق بماده العمود والأخرى ستمر خلال العمود وتمر خلال فتحة العمود السفلية وتجمع في أنبوية إختبار . يصب من أعلى محلول ملحي مخفف أو أى محلول مناسب فإن بعض المكونات الملتصقة بمادة العمود تنتقل إلى المحلول الملحي ويجمع المحلول الملحي من أسفل في أنبوية إختبار . ثم يصب محلول ملحي أكثر تركيز وهكذا تكرر العملية مرات عديدة . نحصل في النهاية على أنابيب إختبار بها محاليل عديده . وبذلك يتم فصل وتنقية الأنزيمات من مستخلص الخلايا .

يجب الكشف عن وجود الأنزيم في أنابيب الاختبار المختلفة ويكون ذلك بخلط الأنزيم مع مادة التفاعل. وفي حالة حدوث التفاعل يكون ذلك دليل على وجود الأنزيم. ولذلك يخلط السائل الموجود في أنبوبة الاختبار مع شريط مفرد من DNA single - stranded DNA مع نيكليوتيدات حره مختلفة ويكون فيها أحد القواعد معلم أى مشع وليكن ثيمين T . يتم وضع المخلوط في حضان درجة حرارته ٣٧م وذلك لتوفير درجة حرارة ملائمة لنشاط الأنزيم وذلك لمدة ساعة. ثم يضاف حامض مبرد cold acid إلى المخلوط فيحدث تجمع لجزئيات DNA مع بعضها لتكون راسب أبيض في أنبوبة الإختبار. ثم يرشح المخلوط السابق خلال ورقة ترشيح ويمر الراشح عبر ورقة الترشيح ويبقى على ورقة الترشيح راسب عبارة عن DNA . تعتبر النيوكليوتيدات الحرة قصيرة وصغيرة وتكون معلقة في وجود الحامض ولا ترسب في قاع أنبوبة الاختبار وعند إجراء عملية الترشيح فإنها تنفذ مع الراشح ولا تترسب على ورقة الترشيح. ولذلك يترسب فقط على ورقة الترشيح DNA الذى تكون من النيوكليوتيدات الحرة نتيجة لنشاط الأنزيم. ولذلك فقياس درجة الأشعاع على ورقة الترشيح هو دليل على وجود الأنزيم ودرجة نشاطه. وكلما زادت درجة الأشعاع على ورقة الترشيح كان ذلك دليل على كفاءة ونشاط الأنزيم. معنى ذلك أن درجة الأشعاع هي مقياس لعدد النيوكليوتيدات المشعة الموجودة في DNA وهي مقياس لدرجة نشاط الأنزيم (شكل ١٠٧).

يمكن عمل الترشيح كل دقيقة من مخلوط التفاعل وقياس درجة الأشعاع على ورقة الترشيح كل دقيقة وبذلك يمكن الحكم على سرعة التفاعل ودرجة نشاط الأنزيم في مستخلص الخلايا. وبذلك يمكن التأكد من وجود أو عدم وجود الأنزيم في مستخلص الخلايا. لكل أنزيم طريقة خاصة لعزله وفصله وتنقيته والتعرف عليه.

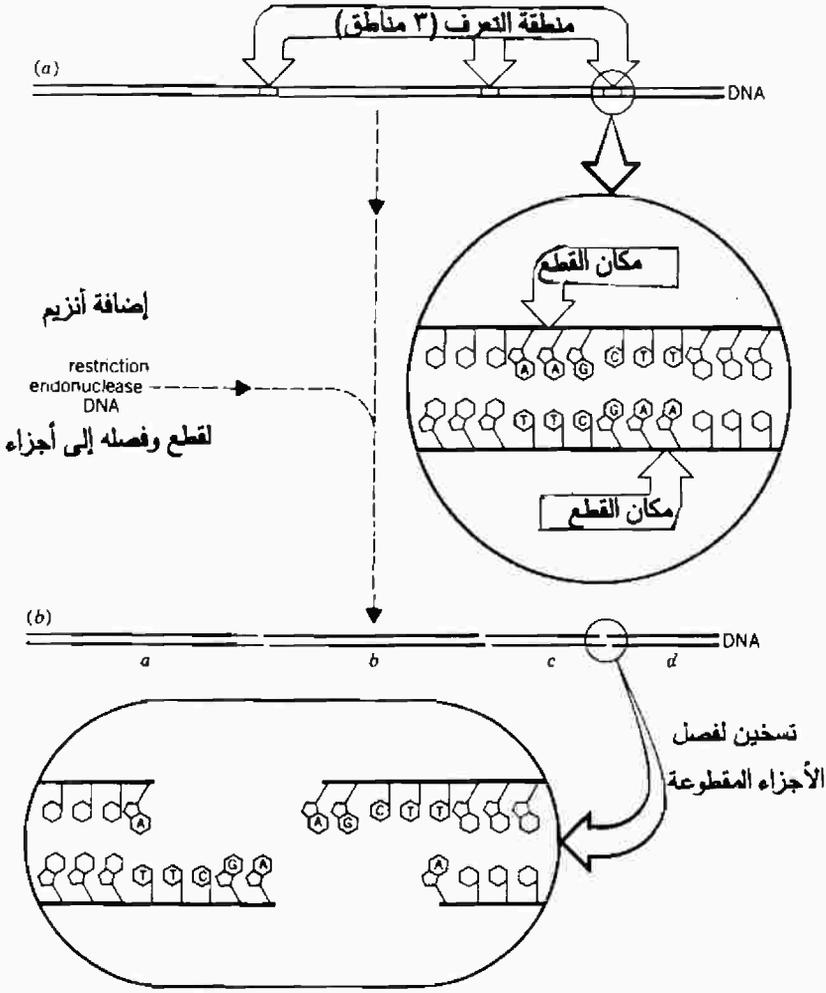
أنزيمات القطع (التجزئي) Restriction Endonucleases

عبارة عن مجموعة من الأنزيمات تقوم بقطع DNA في مناطق معينة. وهذه الأنزيمات يمكنها أن تتعرف على تتابع النيوكليوتيدات في DNA ويعد كل أربعة أزواج أو ستة أزواج عادة من القواعد (النيوكليوتيدات) فإنها تقوم بقطع شريطى DNA وتسمى منطقة عمل الأنزيم على DNA في هذه الحالة بمنطقة التعرف recognition site . والتي تشمل تتابع معين



(شكل ١٠٧) : التهجين بين DNA . وتزواج بين شريط مشع من DNA مع شريط (حلزون) آخر غير مشع . يصبح مكان التزاوج على ورقة الترشيح مشع . يستدل بالأشعاع على حدوث التزاوج .

من النيوكليوتيدات معروف لدى الأنزيم recognition sequences وتسمى النقطة التي يقطع عندها الأنزيم جزيئ DNA بمكان القطع cut site . يمكن أن يكون مكان القطع على شريطي DNA متقابلين ويمكن أن يكون غير متقابل ولذلك يكون القطع مائل ونقطتي القطع غير متقابلين staggered (شكل ١٠٨) وفي كلتا الحالتين في القطع المتقابل والغير متقابل يكون مكان القطع هو العمود الفقري backbone لجزيئ DNA أي في السلسلة المكونة من سكر دى أوكسى ريبوز وفوسفات ويظل شريطي DNA المقطوعين مرتبطين ببعضهما بواسطة الروابط الإيدروجينية للقواعد النيتروجينية ولذلك يجرى عملية تسخين هين لجزيئ DNA ينتج عنه فك الروابط الإيدروجينية ويصبح كل جزء مقطوع من شريطي DNA حر وغير



(شكل ١٠٨) : كيفية عمل إنزيمات القطع restriction endonuclease وحدث قطع في DNA غير متقابل staggered .

مرتبط مع ما يقابله من الشريط الآخر. أي أن الأنزيم يقطع السلسلة ولكن يلزم التسخين الهين لفك الروابط الإيدروجينية بين القواعد الإيدروجينية المتقابلة. إذا حدث القطع بواسطة الأنزيم في ثلاثة مناطق في جزيء الـ DNA فينتج عن ذلك أربعة أجزاء من DNA أي أربعة قطع في حالة التسخين الهين لهذه الأربعة قطع من DNA تصبح ثمانية خيوط منفردة من DNA .

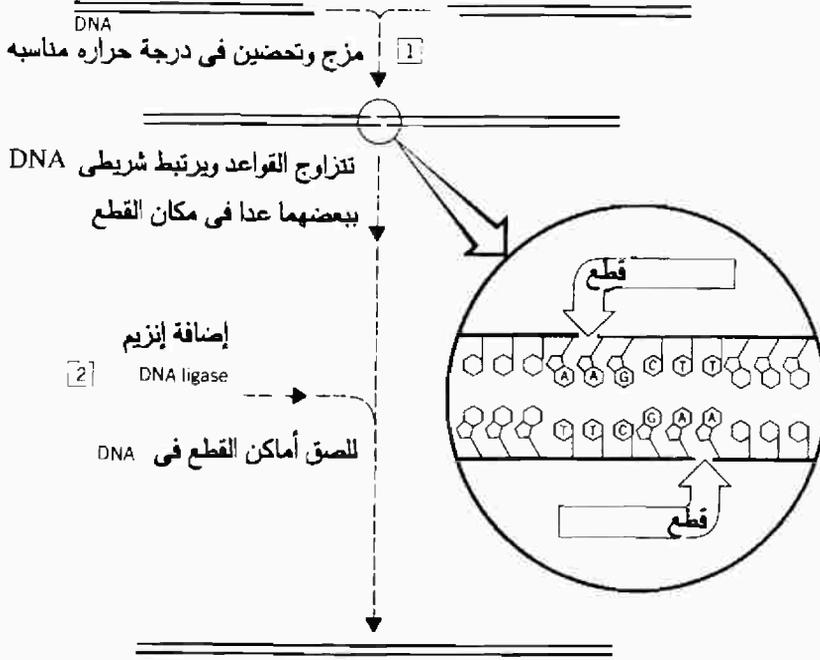
توجد أنواع عديدة من هذه الأنزيمات - أى أنزيمات قطع الـ DNA - والتي تختلف فيما بينها فى نوع تتابع النيوكليوتيدات الذى تعمل عليه recognition sequences . حيث أن كل أنزيم يعمل على نوع من التتابع معين ويساعد ذلك فى قطع جزيئى DNA إلى أجزاء عديدة وفى مناطق كثيرة تبعا لنوع الأنزيمات المستعملة وبذلك يمكن التحكم فى مكان القطع . تباع هذه الأنزيمات على نطاق تجارى .

إنزيمات الربط (الألتحام) Ligases

عندما يكون قطع جزيئى DNA بواسطة إنزيم القطع (التجزئى) فى نقطتين غير متقابلتين فإنه ينتج أحد شريطى (خيطين) DNA به نيوكليوتيدات زائدة فى طرف من مكان القطع ونيوكليوتيدات أقل فى الطرف الآخر. أما عن الشريط الآخر فيكون العكس صحيح حيث أن الطرف الأول به نيوكليوتيدات أقل من الطرف الآخر. ولذلك تسمى الأطراف المقطوعة بالأطراف اللزجة sticky ends . تكون النيوكليوتيدات الموجودة فى أحد الشريطين ولتكن أربعة مكملة للنيوكليوتيدات فى الشريط الآخر فى مكان القطع. ولذلك عند وضع هذه الأشرطة مع بعضها فى درجة حرارة مناسبة فإن الأطراف اللزجة تلتحم نتيجة لتوافق وإرتباط القواعد النيتروجينية على كلا الشريطين ويرتبط الشريطين ببعضهما ولا يوجد أى أثر لمكان القطع. يمكن أيضا (شكل ١٠٩) عمل الألتحام بين الأطراف اللزجة بواسطة إنزيم الربط (الألتحام) DNA ligase . ومما هو جدير بالذكر فإنه يوجد أيضا أنزيمات الربط DNA ligases يمكنها عمل إلتحام الأطراف المستوية blunt ends وهذه الأطراف لا تعتبر أطراف لزجة ولا يمكنها أن تلتحم إلا فى وجود أنزيم الربط وذلك على العكس فى حالة وجود الأطراف اللزجة التى يمكن أيضا أن تلتحم فى عدم وجود الأنزيم. تنتج الأطراف المستوية نتيجة لعمل إنزيم القطع فى نقطتين متقابلتين تماما على شريطى (خيطين) جزيئى DNA .

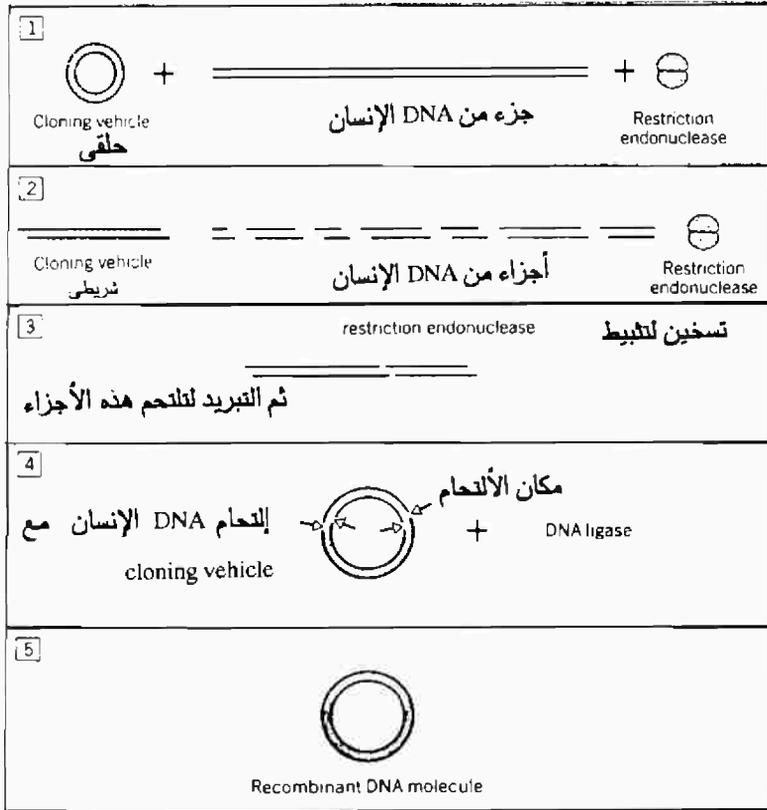
القطع والإلتحام Cutting and Splicing

بمعنى آخر قص ولزق. حيث يستعمل ذلك عند نقل صفة من كائن معين إلى حاملات وناقلات الجينات أى عربات إحتواء الجينات cloning vehicle مثل البلازميدات. فعند نقل صفة من الإنسان فإنه يتم خلط عربات إحتواء الجينات (البلازميدات) مع DNA الإنسان مع إنزيم



(شكل ١٠٩) : إلتحام جزيئات شريطي DNA مع بعضهما . يلاحظ أن جزيئات الشريطين لهما أطراف لزجة . sticky ends

القطع (r. e.) . ينتج عن ذلك قطع عرية إحتواء الجينات (البلازميدات) الدائرية وتصبح مستقيمة كما يتم تقطيع DNA الإنسان إلى أجزاء مستقلة عديدة ولتكن سبعة أجزاء نتيجة لعمل أنزيم القطع (r. e.) . يمكن أن تكون الأطراف لزجة . يمكن لجزء من DNA الإنسان أن يلتحم مع عريه إحتواء الجينات المستقيمة وخاصة بعد تسخين معتدل لوقف نشاط الأنزيم (r. e.) ثم التبريد حيث يساعد التبريد على إلتصاق الأطراف للزجة . ثم يضاف إنزيم الربط (الالتحام) ligase ليتم إلتصاق وألتحام جزء من DNA الإنسان إلتحام كامل بعريه إحتواء الجينات والتي تصبح دائرية مرة أخرى ولكنها تحتوى على جزء من DNA الإنسان . يتم بذلك نقل الصفة من الإنسان إلى عريات إحتواء الجينات (شكل ١١٠) .



(شكل ١١٠) : تكوين recombinant جزيئ DNA .

- ١ - جزء من DNA الإنسان و cloning vehicle وأنزيم R. E. .
- ٢ - قطع في cloning vehicle ليصبح شريطي وتجزئى DNA الإنسان إلى أجزاء كثيرة فى وجود إنزيم R. E. وجميع هذه الأجزاء لها أطراف لزجة .
- ٣ - التسخين الهين والتبريد يمكن أن تلتقى وتلتصق أجزاء من DNA الإنسان مع cloning vehicle .
- ٤ - إلتحام DNA و cloning vehicle تماما فى وجود DNA ligase فى أماكن الأطراف اللزجة .
- ٥ - تكوين جزيئ حلقى من cloning vehicle و DNA الإنسان أى recombinant .

المجسات The Probes

يتم قطع DNA فى مناطق معينة بواسطة إنزيم القلع restriction endonuclease نقى وينتج عن ذلك قطع أو أجزاء عديدة من DNA . يتم وضع هذه الأجزاء فى عربات أحتواء الجينات cloning vehicles بواسطة إنزيم الربط DNA ligase نقى . توجد هذه الأنزيمات متوفرة وتباع تجاريا نقيه . تنقل هذه العربات c. v. إلى داخل العائل host أو vector ويكون فى هذه الحالة البكتيريا إيشيريشيا كولاي E.coli . ثم يتم تنمية هذه البكتيريا على بيئة الآجار المغذى أو أى بيئة آجار أخرى مناسبة . بعد تماما نمو البكتيريا على بيئة الآجار وتكوينها مستعمرات colonies بكتيرية تؤخذ هذه الخلايا البكتيرية ويتم كسر جدارها ويتم التعامل مع DNA البكتيرى وتحويله من DNA ثنائى الشريط double stranded DNA إلى أحادى الشريط single stranded DNA وهكذا يصبح DNA أحادى الشريط قابل للتزاوج أى أن القواعد النيروجينية على هذا الشريط قابلة للتزاوج مع قواعد نيروجينية أخرى متوافقة - pair - the bases available for base ing لينكون شريط آخر مشابه من RNA أو DNA تبعاً للطلب . ثم يعامل DNA أحادى الشريط بواسطة مجس probe مشع radioactive . المجس the probe عبارة عن DNA أو RNA مكمل complementary للجين تحت الدراسة ويتحسس المجس هذا الجين المطلوب ويتكامل معه ليكون جزء متكامل من DNA أو RNA لهذا الجين . يتحسس المجس الجين المطلوب ولا يتكامل إلا مع الجين المطلوب . ومن ذلك يتضح أن لا بد أن يكون الجين تحت الدراسة معروف تركيبه بالتفصيل لكى يمكن عمل المجس الخاص به . يمكن بعد ذلك التعرف على المستعمرات البكتيرية المشعة وهى التى تحتوى الجين المطلوب وأما المستعمرات البكتيرية الغير مشعة فإنها لا تحتوى الجين المطلوب وتستبعد .

كيفية الحصول على المجس the probe يكون بعدد من الطرق . أولاً يمكن عزل mRNA من الجين المطلوب . حيث يتم ذلك بتنمية الخلايا البكتيرية فى وجود قواعد نيروجينية مشعة وهذه الطريقة غير عملية حيث أنه للحصول على mRNA مشع طبيعى وبه درجة مناسبة من الأشعاع لا بد من تعريض الخلايا لكميات كبيرة وتركيزات كبيرة من هذه القواعد النيروجينية المشعة والتى تسبب عادة موت الخلايا البكتيرية . وعند الحصول على mRNA مشع يمكن إستعمال إنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase لتخليق DNA . يمكن الحصول

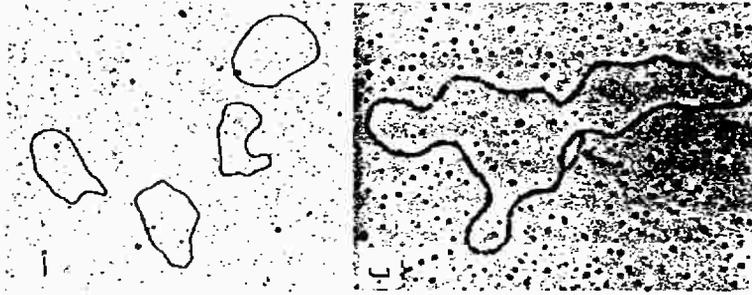
على هذا الأنزيم بتنقية فيروسات RNA مسببة الأورام RNA tumor viruses . ينتج عن ذلك الأنزيم خيط واحد من DNA ثم يعامل الأخير بأنزيم البلمرة DNA polymerase فينتج الخيط الآخر لجزيئ DNA . وحيث أن DNA الناتج بهذه الطريقة يمكن الحصول عليه عمليا من تجارب في أنبوبة الاختبار والذي يسمى DNA تكميلي complementary DNA (c DNA) فإنه يمكن الحصول عليه مشع باستخدام قواعد نيتروجينية مشعة .

والطريقة الثانية للحصول على المجس probe وهي الأكثر تفضيلا فهي تشمل تنقية البروتين الناتج من الجين المطلوب تحت الدراسة . يمكن معرفة تتابع الأحماض الأمينية في هذا البروتين بطرق تحليل كيمائى خاصة . وحيث أن كل حامض أمينى له كودون على DNA الجين المطلوب . وبذلك يمكن التكهّن بترتيب وتتابع النيوكليوتيدات فى الجين المطلوب من دراسة تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين تحت الدراسة . يقال هنا التكهّن prediction وليست بالتأكيد لأنه من المعروف أن كثير من الأحماض الأمينية لها أكثر من كودون . بعد ذلك يتم تخليق DNA تركيبى كيمائيا ويكون قصير الطول وأن يتم تركيبه بإضافة قاعدة نيتروجينية واحدة (نيوكليوتيد واحد) واحدة تلو الأخرى one base at a time وذلك ليتكون DNA المتكهن بتركيبية أو المطلوب تركيبه حسب الطلب . ومما هو جدير بالذكر أنه توجد أجهزة الآن قادرة على اكتشاف تتابع الأحماض الأمينية فى البروتين وأن تخلق أيضا DNA قصير تركيبى synthesized . يوجد إنزيم kinase كينيز نقى يستعمل لإضافة فوسفور مشع إلى جزيئ DNA التركيبى . وبذلك يصبح هذا الجزيئ من DNA مجس ذو درجة عالية من الأشعاع highly radioactive probe .

البلازميدات Plasmids

تعتبر البلازميدات جزيئات صغيرة حلقيه وذات زوج من خيطى (شريطى) double DNA stranded DNA . يوجد عليها جزء خاص من DNA يسمى منشأ مكان التضاعف origin of replication . تتكون البلازميدات طبيعيا فى الخلايا البكتيرية . منشأ مكان التضاعف يعتبر إشارة بدء start signal لبدء نشاط إنزيم البلمرة DNA polymerase (DNA polymerase) ولتضاعف DNA فى داخل الخلية البكتيرية . توجد أنواع عديدة من البلازميدات وهى تختلف فى طولها أى

أنتساع وقطر الحلقة وعدد الجينات التي تحتويها. بعض البلازميدات الصغيرة تتكون من ٥٠٠٠ نيوكليوتيد (زوج) - خمسة آلاف - وهي كافية لتكوين خمسة أنواع من البروتين متوسطة الحجم. يستعمل ويفضل هذا البلازميد بالمقارنة بالكروموسوم البكتيري في *E. coli* حيث أن DNA هذه البكتيريا يتكون من أربعة مليون زوج من النيوكليوتيدات وقد يزيد قليلا وأما في جسم الإنسان فإنه توجد أربعة بلايين زوج من النيوكليوتيدات في نواه الخلية. توجد بلازميدات كبيرة الحجم وهي قابلة للإنتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى ولكنها غير مفضلة للعمل بها في الهندسة الوراثية ونقل الجينات لصعوبة التعامل معها وذلك طبعا لكبر حجمها (شكل ١١١).



(شكل ١١١): البلازميدات

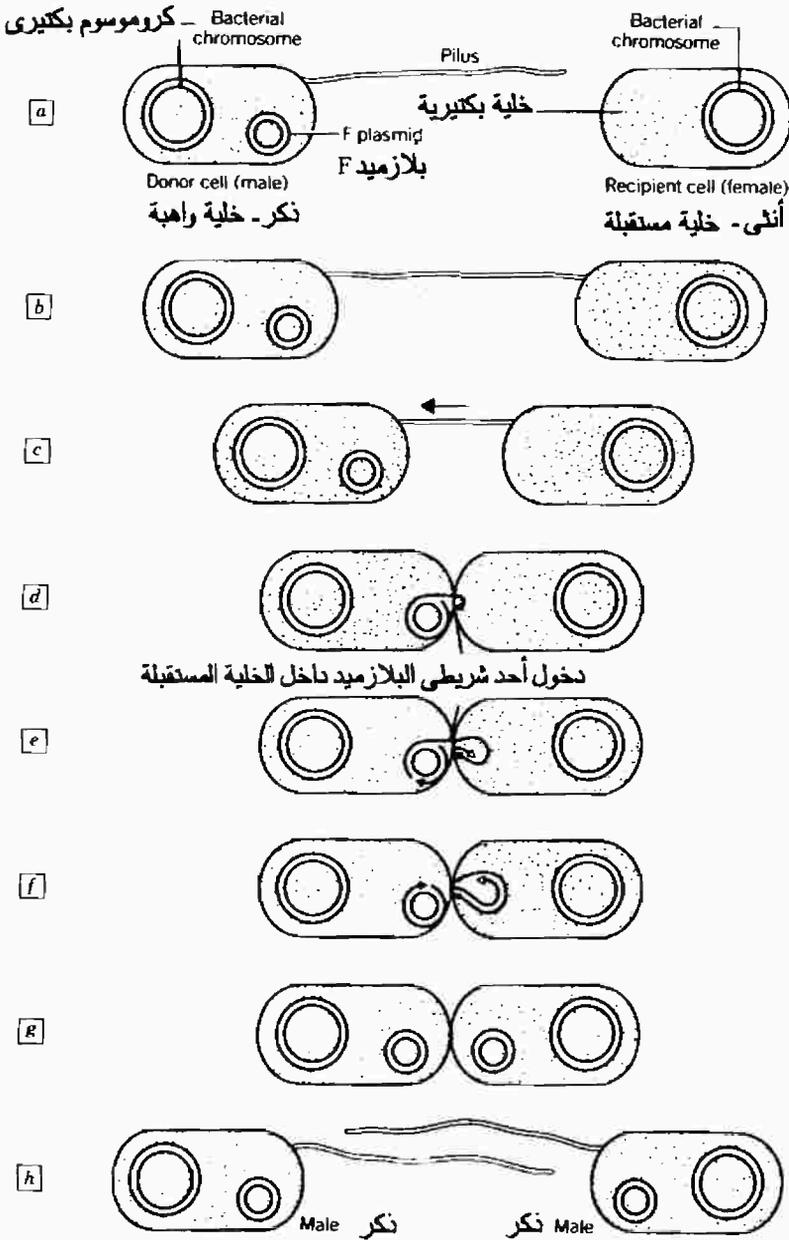
أ- أربعة بلازميدات.

ب - بلازميد كبير ويشير السهم إلى منطقة قصيرة يكون فيها الـ DNA وحيد الشريط single - stranded .

أنتضح أن العامل F يوجد في خلية الذكر في السيتوبلازم وقد سمي F particle ويتبع في وراثته الوراثة السيتوبلازمية وينقسم مستقلا عن الكروموسوم. وفي بعض الأحيان القليلة قد يوجد بالكروموسوم ويسمى F factor العامل F ويعتبر كجزء مكمل للكروموسوم وتبعاً لذلك ينقسم تبعاً لانقسام الكروموسوم. وقد وجد أن ألتحام العامل F بالكروموسوم وإنفصاله ليصبح موجود بالسيتوبلازم وغير مرتبط بالكروموسوم يحدث عكسياً في مناطق عديدة من الكروموسوم. أحياناً نجد أن المستعمرات الناتجة من خلية واحدة فيها F particle موجود في

الستيويلازم في بعض الخلايا وأنه قد يلتحم بالكروموسوم ويصبح F factor وذلك في بعض الخلايا الأخرى. توجد صفات أخرى في البكتيريا غير الصفة F توجد على هيئة حالتين متبادلتين كروموسومية وستيوبلازمية وهذه العوامل المتحركة في هذه الصفات تسمى episomes . أتضح بعد ذلك وهو الصحيح والثابت الآن أن F particle هي عبارة عن بلازميد F في خلية *E. coli* . ولذلك يسمى الآن بلازميد F *F plasmid* وهو عبارة عن عامل خصوبة Fertility factor . يسمى بعامل الخصوبة لأنه يتحكم في تكوين زوائد مجوفة أنبوبية طويلة تتكون من البروتين تكون موزعة على سطح الخلية البكتيرية الذكورية وتسمى هذه الزوائد البيلي *pili* والمفرد بيلس *pilus* يمكن أن تسمى باللغة العربية الهديبات حيث أنها زوائد دقيقة. وكل هديب يكون خيطى الشكل. يعتقد أن هذه الهديبات لها دور حيوى في الالتصاق بسطح الخلايا المؤنثة أو قد يكون لها دور في جذب الخلايا المذكورة في إتجاه الخلايا المؤنثة. أما الخلايا المؤنثة فإنها لا تحتوى بلازميد F ولذلك فإن سطحها يكون خال من الهديبات. وعندما تقارب الخلايا المذكورة والمؤنثة ويعتقد أنه قد يكون نتيجة لجذب أحد الهديبات حيث أن هذا الهديب يلامس الخلية المؤنثة وينقبض ويقصر في الطول ويسبب جذب كلا من الخلية المذكورة والخلية المؤنثة في إتجاه بعضهما أى في إتجاه كلا منهما الآخر حتى يتلامسا. ثم يحدث قطع في البلازميد F في أحد خيطى DNA . وينفك من حلزون DNA ويخترق خلية الأنثى. عند تواجد خيط DNA في داخل الخلية المؤنثة فإنه في الحال ينشط إنزيم البلمرة DNA ويكون خيط أو شريط آخر مكمل وهكذا يصبح بالخلية المؤنثة بلازميد F . وفي هذه الأثناء أيضا ينشط أنزيم البلمرة DNA في الخلية الذكورية ليكون خيط أو شريط آخر من DNA بدلا من الشريط أو الخيط المنتقل إلى الخلية المؤنثة. وهكذا يصبح بالخلية المؤنثة بلازميد F وكذلك فإنها تكون هديبات وتصبح خلية مذكرة. يلاحظ في البداية وجود تزواج بين خلية مذكرة وخلية مؤنثة وفي النهاية تصبح الخليتين ذكريتين. تسمى الخلية الذكورية دائما بالخلية الواهبة *donor cell* والخلية الأنثوية *recipient cell* بالخلية المستقبلة تنفصل بعد ذلك الخلايا عن بعضها وتصبح كل خلية مستقلة بذاتها (شكل ١١٢) .

وفي بعض الحالات النادرة يمكن أن يلتحم البلازميد مع الكروموسوم البكتيرى لينتكون كروموسوم أى حلقة كبيرة *giant circle* وفي هذه الحالة يمكن أن ينتقل الكروموسوم البكتيرى من خلية إلى أخرى عن طريق البلازميد. يعتبر هذا التزاوج البكتيرى بين الذكر والأنثى نوع بدائى من أنواع الجنس *primitive form of sex* .



(شكل 112) : خطوات تزاوج خليتين بكتيريتين أحدهما منكره والأخرى مؤنثة.

تعتبر البلازميدات القابلة للانتقال *transmissible plasmids* غير مفضلة كحاملات وناقلات للجينات *cloning vehicles* لأنها يمكن أن تؤدي إلى حوادث أو أضرار للإنسان. حيث أن سلالات البكتيريا *E. coli* المستعملة في المعاملة تكون أداءه جيدة للدراسة الوراثية لأنها تحتوي على طفرات تجعلها ينقصها حامض أميني أو أكثر أو فيتامين أو أكثر ولذلك فإن هذه السلالات تكون ضعيفة. ونتيجة لذلك فإن هذه السلالات لا يمكنها المعيشة طبيعياً خارج المعمل. وعامة سلالات المعمل من هذه البكتيريا تكون غير قادرة على عمل إصابة للإنسان حيث أنه توجد سلالات عادية من هذه البكتيريا يمكن أن تسبب ضرر للإنسان في الجهاز الهضمي. تسمى السلالات العادية دائماً بالسلالات البرية *wild strains*. ليست كل السلالات العادية ممرضة للإنسان بل بعض منها فقط.

وعند استخدام بلازميدات قابلة للانتقال لنقل بعض الصفات للخلايا البكتيرية. وتصبح هذه الخلايا البكتيرية حاملة لصفات جديدة لم تكن بها أصلاً ويكون النقل عن طريق البلازميدات فإن هذه الخلايا تسمى بكتيريا مهندسة وراثياً *engineered bacteria*. وعلى سبيل الخطأ أو عدم الحرص يمكن لهذه السلالات البكتيرية المهندسة وراثياً أن تتواجد خارج المعمل. ولذلك يمكن لهذه السلالات الأخيرة أن تتزاوج مع بكتيريا عادية (برية). تكون البكتيريا العادية دائماً قوية وذلك بالإضافة إلى الصفات التي قد تنتقل إليها عن طريق التزاوج مع بكتيريا مهندسة وراثياً. يمكن أن تكون هذه الصفات المنقولة ضارة كما أن هذه البكتيريا العادية لها قدرة كبيرة وفرصة كبيرة للدخول إلى القناة الهضمية للإنسان بما تحمله من صفات ضارة وعادة تكون سلالات المعمل من هذه البكتيريا ضعيفة وغير قادرة وليست لها الفرصة أن تدخل إلى القناة الهضمية للإنسان. وعند دخول هذه البكتيريا العادية والتي تحمل صفات ضارة وجينات ضارة يسبب ذلك ضرر للإنسان. ولحسن الحظ فإنه يوجد عدد كبير من البلازميدات غير قابلة للانتقال *nontransmissible plasmids* ذات أحجام مختلفة ودرجات مختلفة من التعقيد في التركيب ولذلك يفضل ويجب استعمال بلازميدات غير قابلة للانتقال في الهندسة الوراثية ونقل الجينات. ولذلك فإنه ليس من الضروري استعمال بلازميدات قابلة للانتقال لهذا الغرض.

استخدام البلازميدات فى الهندسة الوراثية ونقل الصفات الوراثية :

تتميز البلازميدات بأنها تحتوى على جينات مقاومة للمضادات الحيوية ولذلك تجعل الخلايا البكتيرية الحاملة لها مقاومة لتأثير المضادات الحيوية القاتل على الخلايا البكتيرية. وهذه الخلايا المقاومة تستعمل بكثرة كأداة جيدة فى الهندسة الوراثية. عندما يحتاج مهندس الوراثة نقل صفة معينة من الإنسان إلى سلالة بكتيرية لا يوجد بها هذه الصفة فإنه يستعمل خلايا بكتيرية بها بلازميد به جين أو أكثر مقاوم لمضاد حيوى معين مثل البنسلين. حيث يقوم بلسق جزء من DNA المحتوى على الجين المطلوب الخاص بالإنسان. فى البلازميد المقاوم للبنسلين. ثم يستخلص DNA البلازميد من الخلايا البكتيرية ويضاف إلى مزرعة خلايا بكتيرية حساسة للبنسلين. يمكن أن ينتقل DNA البلازميد إلى بعض الخلايا البكتيرية الحساسة للبنسلين والنامية على البيئة وتسمى هذه الخطوة بالتحويل الوراثى transformation. عند دخول DNA إلى الخلايا البكتيرية يتكاثر بها ويحدث له تكاثر أيضا فى أثناء تكاثر الخلية البكتيرية. ثم تأخذ البكتيريا الموجودة على البيئة وتخطط على بيئة آجار مغذى أو أى بيئة مشابهه وأن تحتوى هذه البيئة على البنسلين أيضا. ثم توضع الأطباق فى الحضان لمدة يومين فى درجة حرارة مناسبة. تموت الغالبية العظمى من الخلايا البكتيرية لأنها حساسة للبنسلين. ولكن النادر فى هذه الخلايا والمحتوى على البلازميد ينمو على البيئة لأنه مقاوم للبنسلين. ولذلك فإن المستعمرات البكتيرية النامية على البيئة فى أطباق بتري تحتوى على أجزاء من DNA البلازميد والذى قد يحمل الصفة المطلوبة. ولذلك نستخدم صفة المقاومة للمضاد الحيوى لتسهيل فحص عدد قليل نسبيا من الخلايا البكتيرية بدلا من فحص ملايين الخلايا البكتيرية والتي لا تحتوى على أى جزء من DNA البلازميد المطلوب نقله وبالتالي لا تحتوى على الصفة المطلوب نقلها. أما الخلايا المقاومة للبنسلين فقد تحتوى على الصفة المطلوب نقلها. حيث أنه ليس من الضرورى أن تكون جميع الخلايا المقاومة للبنسلين تحتوى على هذا الجين ولكن عادة بعض منها. أى أنه مما سبق يتضح أنه توجد أربعة حالات للبكتيريا *E. coli* كماياتى:

١ - خلايا بكتيرية لا تحتوى على أى بلازميد.

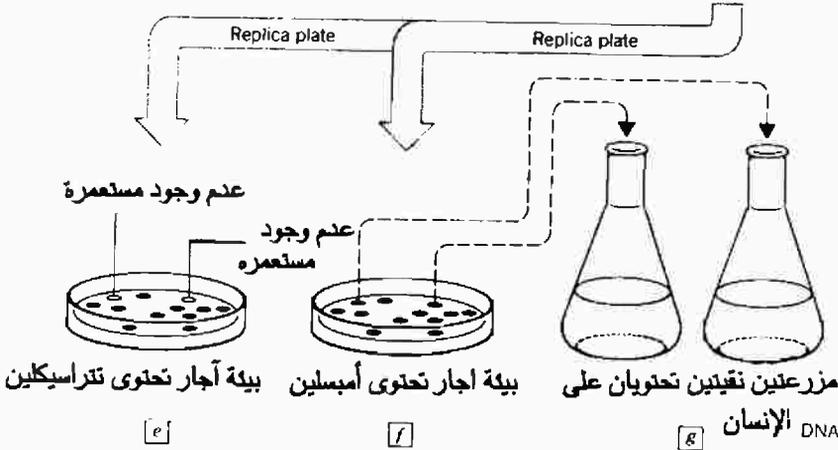
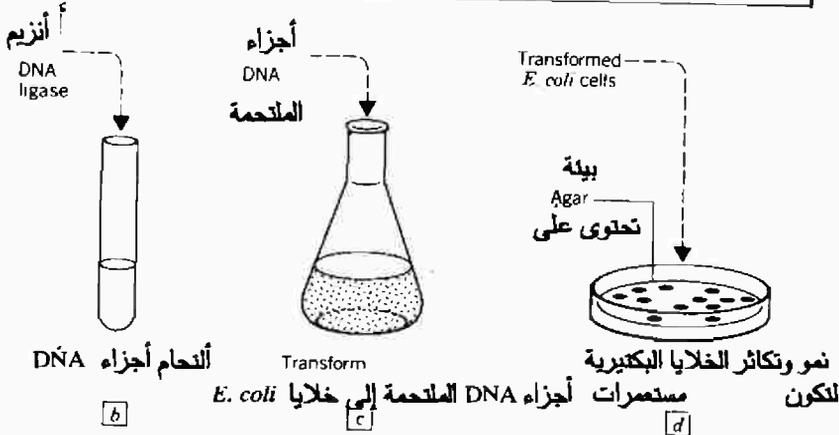
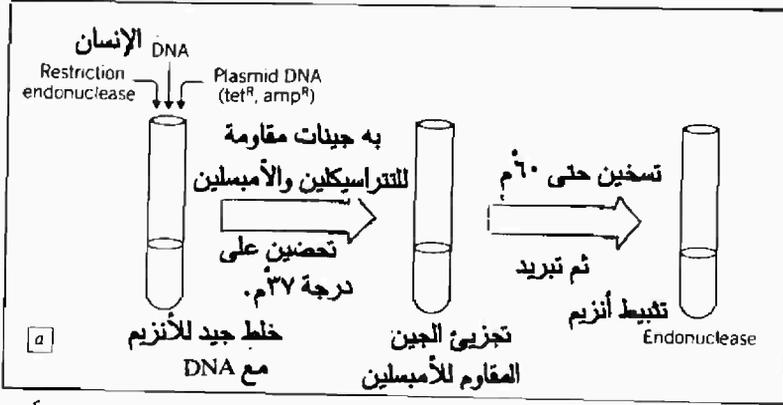
٢ - خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير لا يحتوى على DNA من الإنسان.

٣ - خلايا بكتيرية تحتوي على DNA بلازميد وهذا الأخير يحتوى على جزء من DNA الإنسان ولكنه لا يحتوى على الجين المطلوب.

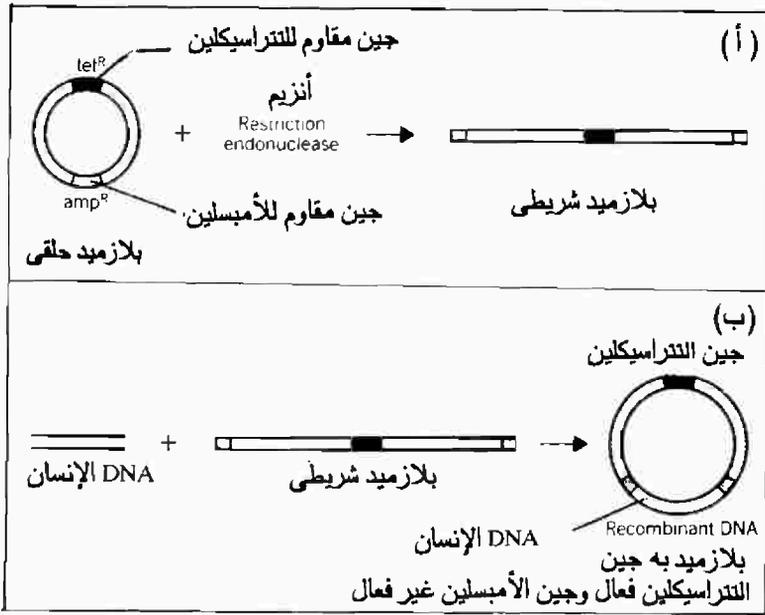
٤ - خلايا بكتيرية تحتوي على DNA بلازميد وهذا الأخير يحتوى على DNA الإنسان كما يحتوى الجين المطلوب.

تعتبر المجموعة الرابعة من الخلايا البكتيرية هي المطلوبة. تعتبر هذه الخلايا نادرة وقد تكون بنسبة خلية واحدة في البليون خلية. استعمال خلايا بلازميد به صفة المقاومة للمضاد الحيوى مثل البنسلين أو تتراسيكلين أو ستريptomisin وكما سبق ذكره سيستبعد المجموعة الأولى من الخلايا ويتبقى لدينا الثلاث مجاميع الأخرى من الخلايا (شكل ١١٣).

ولذلك فإنه يجب استعمال بلازميد به جينين وليس جين واحد خاصين بمقاومة المضادات الحيوية وليكن أحدهما خاص بمضاد حيوى من مجموعة البنسيلينات وهو أمبسيلين (amp^R) ampicillin والآخر خاص بمقاومة التتراسيكلين (tet^R) tetracyclin. يستعمل إنزيم القطع restriction endonuclease متخصص فى قطع البلازميد فى منتصف جين المقاومة للأمبسيلين ولذلك يصبح البلازميد شريطى وليست حلقى. توجد أنواع عديدة من إنزيمات القطع فيختار الأنزيم الذى يمكنه قطع البلازميد فى منتصف جين مقاومة أمبسيلين. عند إضافة جزء من DNA الإنسان إلى البلازميد فإنه يلتصق بأحد طرفى البلازميد الشريطى. ثم التسخين لدرجة حرارة ٦٠م لتثبيت الأنزيم ثم يضاف أنزيم DNA ligase بواسطته يتم الالتحام أجزاء DNA ولصق طرفى البلازميد مرة أخرى ليصبح مستدير. يصبح جين المقاومة للأمبسيلين غير فعال حيث أنه ينفصل إلى جزئين نتيجة لوجود جزء من DNA الإنسان (شكل ١١٤). يصبح البلازميد فعال فقط فى مقاومة التتراسيكلين. يتم إدخال أجزاء DNA المتحمة والبلازميد داخل خلايا بكتيرية لنوع البكتيريا *E. coli* وذلك عن طريق عملية transformation. حيث توضع البلازميدات فى بيئة سائلة تحتوى على البكتيريا *E. coli*. وفى هذه الحالة فإن البكتيريا التى تحتوى على بلازميد غير محتوى على أى جزء من DNA الإنسان تكون مقاومة لكل من أمبسيلين والتتراسيكلين. تفحص جميع المستعمرات البكتيرية النامية على بيئة بها تتراسيكلين لإختبار المستعمرات الحساسة للأمبسيلين أى المستعمرات الغير قادرة على



(شكل 113) : طريقة للحصول على مزارع نقية من البكتريا تحتوي على DNA الإنسان cloned human DNA

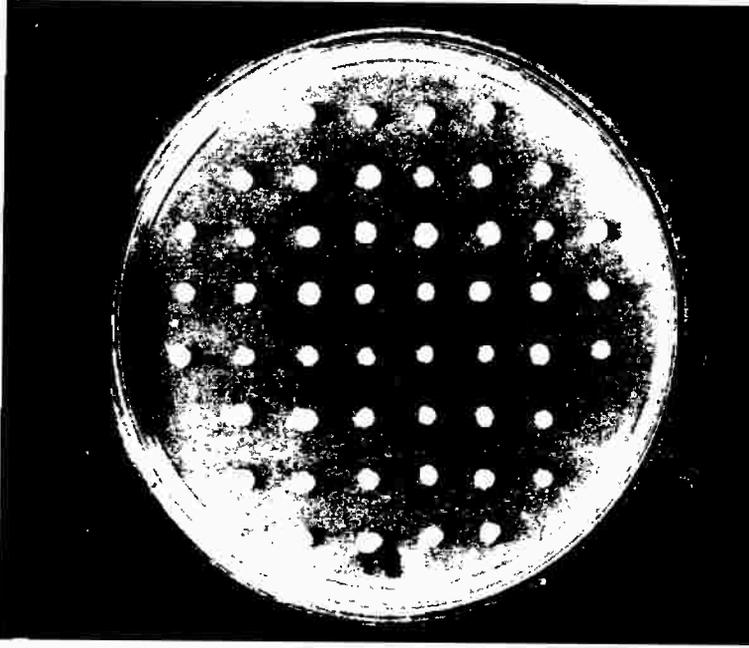


(شكل ١١٤) : تلييط الجين

أ. بلازميد حلقي به جين مقاوم للنتراسيكلين وجين مقاومة للأمبسلين. وفي وجود أنزيم R. E. يصبح البلازميد شريطي.

ب. جزء من DNA الإنسان إلتم بالبلازميد في منتصف منطقة الجين المقاومة للأمبسلين وبسبب ذلك فصل منطقة الجين إلى جزئين وبذلك يصبح الجين مثبط وغير فعال في أظهار الصفة.

النمو والتكاثر على بيئة بها أمبسيلين. ثم توضع قطعة من الحرير أو القطيفة معقمة لتلامس سطح المستعمرات البكتيرية النامية على بيئة الآجار (شكل ١١٥) المحتوية على النتراسيكلين. بعض الخلايا البكتيرية من كل مستعمرة سوف تلتصق إلى قطعة الحرير. تزال قطعة الحرير ثم توضع في طبق بترى به بيئة آجار مغذى nutrient agar مخلوط بالأمبسيلين توضع قطعة الحرير بحيث أنها تلامس سطح البيئة وبالطبع يكون هذا الطبق نظيف خال من أى مستعمرات بكتيرية. تلتصق الخلايا البكتيرية من كل مستعمرة بكتيرية بسطح البيئة. تنمو فقط الخلايا إلى مستعمرات على البيئة في حالة مقاومتها للأمبسيلين. يسمى هذا الإختبار بإسم صورة طبق الأصل لتنمية المستعمرات البكتيرية على البيئة replica plating. سيتم توزيع الخلايا وبالتالي



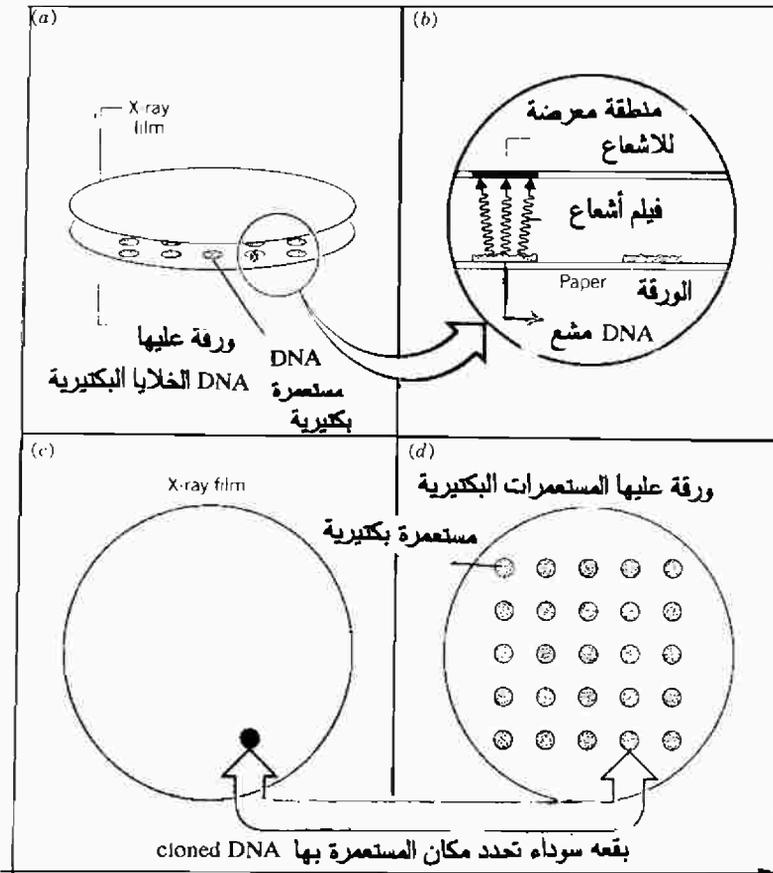
(شكل ١١٥) : طبق بترى يحتوى على بيئة آجار عليها مستعمرات بكتيرية مرتبة فى صفوف .grid pattern

المستعمرات فى الأطباق بنفس التوزيع السابق فى الطبق الأول الأصل. سيتم مقارنة توزيع المستعمرات البكتيرية فى الطبق الثانى بالطبق الأول وفى حالة مكان المستعمرات الخالية فى الطبق الثانى تعتبر هى المستعمرات المطلوبة وهى الحساسة للأمبسيلين. وفى الشكل يتضح أنه توجد مستعمرتين فقط حساسة للأمبسيلين. يتم نقل لقاح من كل مستعمرة على حده بواسطة إبره التلقيح البكتيرية إلى دوارق مخروطية تحتوى على بيئة المرق المغذى nutrient broth . تنمو هذه الخلايا فى البيئة وتنتج أعداد هائلة من الخلايا البكتيرية التى تحتوى على جزء من DNA الإنسان. وبهذا الأختبار يتم تضيق الخناق وتستبعد الخلايا البكتيرية الموجودة فى رقم ٢ وتصبح لدينا خلايا بكتيرية تشمل المجموعة رقم ٣ والمجموعة رقم ٤. ولكن حتى هذه الخطوه لا يمكن التكهّن بتركيب DNA الإنسان الداخلى فى تركيب البلازميد وهل يحتوى هذا الجزء من DNA على الجين المطلوب أو يحتوى أجزاء أخرى لا تحتوى الجين المطلوب.

والحقيقة أن فرصة الحصول على بلازميد به الجين المطلوب تكون نادرة. ولذلك يجب تكرار طريقة replica plating لمرات كثيرة للحصول على عدد من الخلايا البكتيرية يحتمل أن يوجد به الجين المطلوب. وإختبار replica plating سهل ويمكن إستعمال خلايا بكتيرية مقاومة لأنواع كثيرة من العقاقير والمضادات الحيوية ويمكن الكشف عنها بمقارنة شكل توزيع المستعمرات على البيئة فى الطبقة الأولى والطبق الثانى ويمكن بذلك الحصول على آلاف من المستعمرات البكتيرية المطلوبة. وعندما يتم الحصول على عدة آلاف من المستعمرات البكتيرية المطلوبة نبدأ فى عمل الخطوات التالية وذلك للحصول على الخلايا البكتيرية المحتوية على جين الإنسان المطلوب.

يؤخذ من كل مزرعة بكتيرية (مستعمرة) عينة وذلك بواسطة إبره التلقيح وتوضع على سطح بيئة آجار مغذى أو أى بيئة آجار أخرى مناسبة فى طبق بتري. يتم تخطيط قاع طبق بتري بقلم شمع إلى مربعات يكون عددها عادة خمسون أو يتم عمل خمسون مربع على ورقة وتوضع هذه الورقة تحت طبق بتري. توضع عينة واحدة بكتيرية فى منتصف كل مربع وبذلك يحتوى طبق بتري الواحد على خمسون عينة تنمو لتكوين خمسون مستعمرة. وبعد تمام نمو الخلايا البكتيرية وتكوين المستعمرات توضع ورقة معقمة على سطح المستعمرات سيلتصق جزء من المستعمرات بسطح الورقة ويصبح توزيع المستعمرات على الورقة يماثل تماما توزيعها فى الطبق. توضع الورقة فى محلول صودا كاوية مخفف. تسبب الصودا الكاوية تكسير خلايا البكتيريا ويتبقى ملتصق بالورقة بشدة بعض أجزاء من بقايا الخلايا وأيضا DNA. تسبب الصودا الكاوية أيضا فصل حلزونى DNA ويصبح خيطين منفصلين. ولذلك فإن DNA يوجد فى بقع على الورقة. يمكن أن تكون الورقة المستعملة مقسمة إلى مربعات لها نفس عدد ومساحة مربعات الورقة. وبذلك يمكن لمهندس الوراثة أن يحدد DNA الموجود على الورقة والمستعمرة الخاصة به الموجودة فى الطبق. ثم تعادل الصودا الكاوية على الورقة بواسطة حامض ثم توضع الورقة فى طبق بتري به مجس معلم أى مشع radioactive probe. يعتبر المجس عبارة DNA مكمل للجين المطلوب وقد تم تخليقه وتركيبه من RNA رسول خاص بالجين المطلوب. يعتبر المجس خيط فردى من DNA وأيضا DNA الموجود على الورقة خيط فردى كذلك. ولذلك فى هذا الحالة سيلتصق بشدة المجس مع DNA الورقة المتوافق معه أى الخاص بالجين المطلوب.

ولن يلتصق المجس مع أى DNA غير متكامل معه. ولذلك فإن DNA الجين المطلوب على الورقة سيصبح مشع. وبإختبار الأماكن المشعة على الورقة تكون هي الخاصة بالجين المطلوب. ولتقدير أماكن الأشعاع على الورقة تزال الورقة من الطبق المحتوى على المجس المشع وتغسل بشدة بالماء لأزالة أى بقايا للمجس المشع الغير ملتصقة بـDNA وبالطبع المجس المشع الملتصق بالـ DNA للجين المطلوب لا يغسل بالماء ويظل ملتصق بالورقة. تعرض الورقة لفيلم أشعة x وفى الأماكن التى يوجد بها أشعاع أى يوجد بها DNA الجين المطلوب تظهر على هيئة بقعة سوداء. ولذلك فإن البقع السوداء تحدد مكان الجين المطلوب (شكل ١١٦).



(شكل ١١٦): تحديد مكان والدعرف على المستعمرة البكتيرية التى تحتوى خلاياها عى DNA جين الإنسان.

ومكان وجود هذه البقع على الورقة يحدد مكان DNA المطلوب وعن طريق DNA يحدد مكان المستعمرة في الطبق والتي تحتوى على خلايا بكتيرية تحتوى بلازميد حامل لجين الإنسان المطلوب. ومن هذه المستعمرة يمكن الحصول على أعداد لا نهائية من الخلايا البكتيرية الحاملة لجين الإنسان. وقد يكون هذا الجين هو الجين اللازم لتخليق الأنسولين وبذلك يمكن إنتاج الأنسولين بواسطة خلايا البكتيريا.

تخليق الأنسولين بواسطة البكتريا:

يعتبر الأنسولين نوع من البروتين الوظيفى أى بروتين له دور معين فى الخلية. يوجد فى الإنسان العادى جين خاص بإنتاج الأنسولين ولكن مرضى السكر ينقصهم تكوين الأنسولين بتركيزات عالية نسبيا ولذلك يحتاج مريض السكر إلى أنسولين إضافى ويؤخذ هذا الأنسولين عن طريق الحقن، يؤثر الأنسولين على إحتراق السكر فى الجسم. يحتاج الجسم إلى كميات من الأنسولين لإتمام عملية أحتراق أى تحليل السكر. ومريض السكر يكون غير قادر على إتمام هذه العملية على الوجه الأكمل ولذلك بالرغم من وجود السكر فى جسمه إلا أنه يطلب المزيد من السكر وذلك لنقص إحتراق أى تحليل السكر فى الجسم نتيجة لنقص الأنسولين ولذلك يتم حقنه بالأنسولين. ينتج الأنسولين قبل إكتشاف طرق الهندسة الوراثية عن طريق إستخلاصه من بنكرياس الخنازير أو ما يشابهها وكانت عملية إنتاجه مكلفة. ولكن الإنسان عن طريق الهندسة الوراثية أمكنه نقل جين إنتاج الأنسولين من الإنسان إلى البكتريا. طريقة عمل ذلك هى الطريقة المذكورة فى الجزء السابق مباشرة. يتضح أن هذه الطريقة أسهل وأرخص فى إنتاج الأنسولين وذلك بالمقارنة من إنتاج الأنسولين من بنكرياس الحيوان. فى بعض الحالات يمكن أن يسبب أنسولين بنكرياس الحيوان حساسية للإنسان وبذلك تصبح الأمور أكثر تعقيدا ولكن لحسن الحظ فإن الأنسولين المنتج بواسطة البكتريا لا يسبب هذه الحالة من الحساسية.

كيفية فصل DNA البلازميد والجين المنقول :

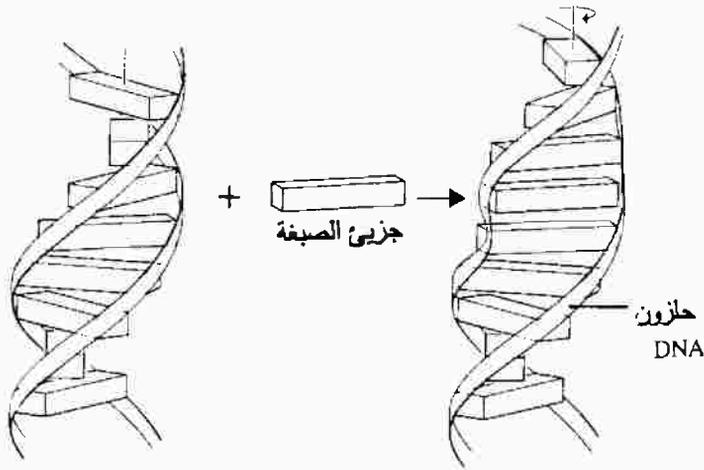
فى التجربة السابقة وبعد الحصول على بلايين من الخلايا البكتيرية التى تحتوى جين الإنسان والنامية على بيئة سائلة broth فإنه يمكن فصل DNA البلازميد عن DNA الجين

المنقول من الإنسان والحصول على كل منهما منفردا وذلك فى خطوات عديدة كما يلى :

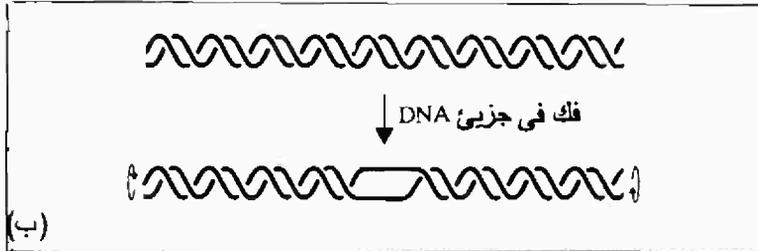
يأخذ معلق البكتريا السابقة ويعرض لقوة طارده مركزية بواسطة جهاز الطرد المركزى centrifuge فترسب الخلايا البكتيرية فى قاع أنابيب الجهاز ويبقى محلول البيئة أعلى الراسب فى الأنبوية. يسكب محلول البيئة من الأنبوية ثم يضاف قليل من الماء وبهز الأنبوية تكون الخلايا البكتيرية معلق فى وجود الماء. يضاف للمعلق أنزيمات ومركبات تشبه الصابون detergent تسبب تحليل جدر الخلايا البكتيرية وينحدر DNA الخلايا البكتيرية و DNA البلازميدات من الخلايا ويسمى ذلك الخليط الموجود فى الأنبوية باسم ناتج تحلل الخلايا cell lysate. يتم فصل DNA الخلية البكتيرية عن DNA البلازميد وحيث أن الأول أطول بدرجة كبيرة جدا عن الثانى فقد يكون طوله ألف مرة أو أكثر. ولذلك فإن إحدى الطرق هى تعريض DNA لقوة طاردة مركزية فسيرسب DNA البكتيرى فى القاع ويبقى البلازميد فى أعلى. ولكن فى كثير من الحالات لا تصلح هذه الطريقة لأن كمية DNA البكتيرى تكون كبيرة جدا بالمقارنة بالبلازميدات ولذلك لا يكون الفصل كامل بينهما.

وفى الطريقة الثانية يتم تكسير DNA الخلية البكتيرية بسهولة نتيجة لطوله. وذلك عن طريق إمتصاص محلول منه بواسطة ماصة لمرات عديدة. يسبب ذلك تكسير DNA الخلية البكتيرية إلى أجزاء خيطية الشكل ولا تسبب هذه المعاملة تكسير البلازميد ويبقى مستدير كما هو. يمكن فصل أجزاء DNA الخلية عن البلازميد بسهولة نتيجة لإختلافهما فى الكثافة النسبية relative density والقدرة على الطفو buoyancy. قدرة الإنسان على الطفو أو العوم يمكن التحكم فيها بطريقتين فعند إسترخاء الإنسان مع عدم الحركة يمكن أن يطفو على سطح الماء وعند ربط حله النجاء life jacket بالإنسان فإنها تسبب تقليل الكثافة النسبية وبذلك تساعد الإنسان على الطفو إلى أعلى وسهولة الطفو وأيضا العوم والعكس صحيح فإذا ربط الإنسان بقطع صخرية كبيرة الحجم فإنها تزيد من الكثافة النسبية وتسبب جذبها إلى أسفل وصعوبة الطفو والعوم وإذا كانت زائدة الحجم فإنها تسبب غرقه. ولذلك فإن الكثافة النسبية لها تأثير واضح على درجة الطفو. وبالإضافة إلى ذلك فإن الكثافة النسبية للماء تؤثر على الطفو أيضا فكلما زاد تركيز الملح فى الماء كلما زادت الكثافة النسبية وكلما زادت سهولة الطفو والعوم للإنسان. ولذلك فإن الطفو والعوم فى البحر الميت ذو التركيز العالى من الملح يكون أسهل

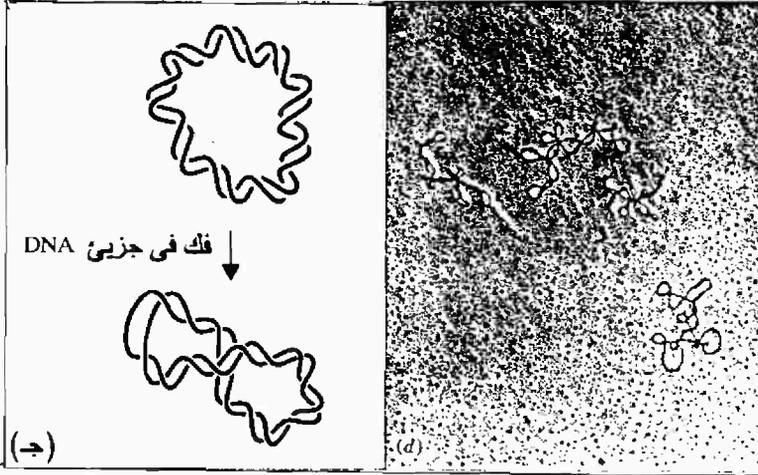
بدرجة كبيرة من العموم في البحار العادية لإرتفاع تركيز الملح في الأول بالنسبة لتركيزه في البحار العادية. وهذه القاعدة الخاصة بطفو الإنسان هي ذاتها الخاصة بطفو الجزئيات وغيرها من أنابيب الاختبار في المعمل ويعتبر ذلك مثال لتوضيح كيف أن الجزئيات تطفو في المحاليل. يمكن ملئ أنابيب الاختبار بمحلول ملحي ولذلك فإن تركيز الملح يزيد في الإتجاه من أعلى إلى أسفل ويسمى التغيير التدريجي في التركيز concentration gradient وينتج عن ذلك تغير تدريجي في الكثافة density gradient. نتيجة لذلك يمكن أن نتحكم في تركيز الملح في أنبوبة الإختبار بحيث يكون DNA معلق في محلول الملح حيث أنه عند وضع جزئى DNA فإنه يسقط إلى أسفل في المحلول ويتوقف عن السقوط ويصبح معلق عندما تتساوى كثافة DNA مع كثافة محلول الملح. درجة سقوط DNA في المحلول يتحدد بكثافة جزئى DNA وكثافة المحلول. يمكن التحكم في طفو DNA البكتيرى حيث يضاف له حله الحياة life jacket وهى عبارة عن جزئيات صبغه ethidium أو مايشابهها فتقلل من كثافة الجزئى وتساعد على الحركة إلى أعلى المحلول. يحدث ذلك بشراة لجزئى DNA الخيطى ولا يحدث لـ DNA البلازميد أى الحلقي والسبب في ذلك أنه عند دخول جزئى الصبغة بين حلزونى DNA الشريطى فإن الحلزونى ينفك ويأخذ جزئيات صبغة أكثر ويزداد الفك وذلك لأن طرفى DNA الشريطى سائبين وتحدث هذه العملية بسهولة في DNA الشريطى أما DNA المستدير فأطرافه ملتحمة ولا توجد أطراف حرة ولذلك لا ينفك الحلزون بسهولة ويكون إتحاده بجزئيات الصبغة محدود (شكل ١١٧). ولذلك يمكن فصل DNA الشريطى للكروموسوم عن DNA الحلقي للبلازميد بعد معاملتهما بالصبغة وتركهما في أنبوبة إختبار بها محلول ملحي مركز نسبيا ونتيجة للجاذبية الأرضية سيحدث الفصل بينهما ولكن يحتاج ذلك إلى وقت طويل. ولذلك يمكن إختصار الوقت بخلط نوعى DNA مع الصبغة مع المحلول الملحي وتعريضهم لقوة طرد مركزي في جهاز الطرد المركزي والذي يلف بسرعة كبيرة نسبيا ونتيجة لذلك يحدث الفصل بسرعة تزيد عن مائة ألف مرة قدر الجاذبية الأرضية. قد يحتاج الأمر إلى عمل الطرد المركزي لمدة يوم أو أكثر. وفي هذه التجارب تكون الصبغة عادة بروميد الأثيديم ethidium bromide والمحلول الملحي يكون من الأملاح الثقيلة مثل كلوريد السيزيوم cesium chloride وتخلط في أنبوبة بلاستيك وتعرض لقوة طرد مركزية سرعتها خمسة وثلاثون ألف في الدقيقة (r p m) لمدة يومين. وقبل تشغيل الجهاز يوضع في الأنبوبة زيت معدنى



(أ)



(ب)



(ج)

(د)

(شكل 117) : تداخل الصبغة فى داخل حلزونين DNA .

- أ- دخول الصبغة بين الحلزونين .
- ب- فك حلزونى DNA الشريطى نتيجة لدخول الصبغة .
- ج- فك حلزونين DNA الحلقى نتيجة لدخول الصبغة .

ليملأ فراغ الأنبوية ويمنع إنبعاثها أثناء سرعة عملية الطرد المركزي. يتم فحص الأنبوية بعد عملية الطرد المركزي بواسطة الأشعة فوق بنفسجية أو جزء قريب من فوق الأشعة البنفسجية يسمى الضوء الأسود black light . نتيجة لوجود الصبغة في جزيئات DNA فإنها تمتص الأشعة فوق البنفسجية ويحدث للضوء عملية فلوره ويحدث تكون أى أشعاع ضوء يرتقالي لامع فى أجزاء الأنبوية المحتوية على DNA . يدل هذا الأشعاع البرتقالي على مكان DNA فى الأنبوية ونتيجة لذلك يوجد حزمتين ضوئيتين الحزمة الضوئية العليا تدل على مكان DNA الكروموسوم والحزمة الضوئية السفلية تدل على مكان وجود DNA البلازميد . يمكن سحب DNA البلازميد من الأنبوية بواسطة ماصة مناسبة وبذلك يوجد لدينا DNA بلازميد نقي . يمكن بعد ذلك فصل جين أو جينات الإنسان من البلازميد ويكون أولاً بقطع DNA البلازميد إلى أجزاء بواسطة إنزيمات القطع (r. e) . ينتج عن ذلك تكون أجزاء خيطية (شريطية) صغيرة من البلازميد (راجع عمل إنزيمات القطع) . يمكن فصل هذه الأجزاء عن بعضها بواسطة الفصل نتيجة للهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى gel electrophoresis . ولا بد من التعرف على مكان عمل إنزيمات القطع المستعملة أى أماكن القطع المختلفة على البلازميد ويحتاج ذلك إلى عمل ما يسمى بالخرائط mapping أى عمل خرائط لجزئ DNA البلازميد لتحديد أماكن القطع بواسطة أنزيمات القطع (r. e) .

الفاج البكتيرى Bacteriophages

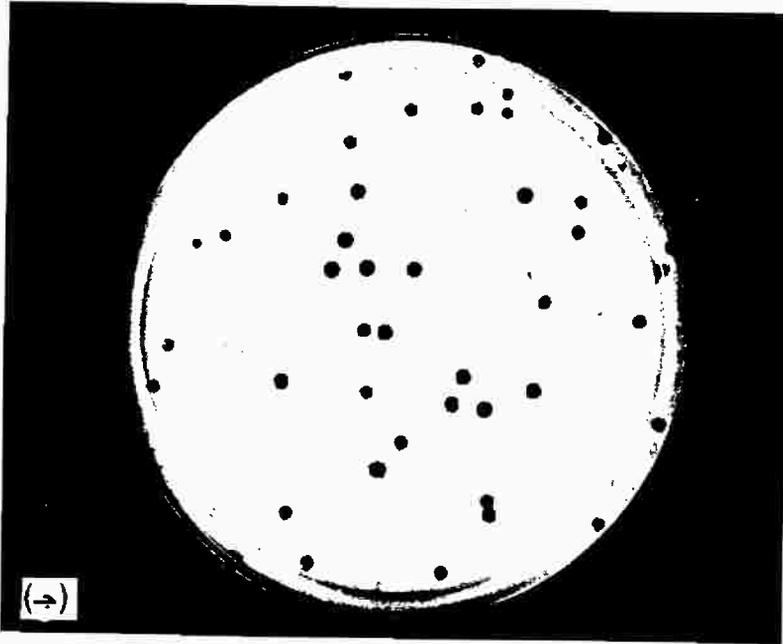
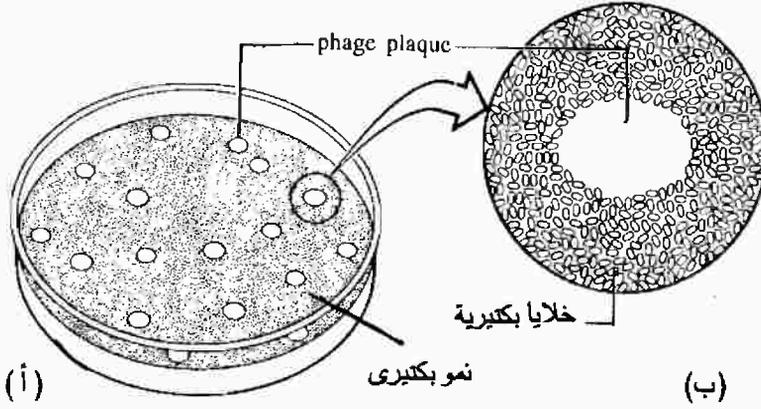
تعتبر البكتيريوفاجات فيروسات تصيب البكتيريا وتسمى أيضا بالفاج phages . يحترق DNA الفاج على جينات تتحكم فى بناء البروتين والذى يكون غلاف يحيط بـ DNA . وبالرغم من إحتواء الفاج على بروتين إلا أنه غير قادر على تخليقه ذاتيا حيث لا يوجد بالفاج الأجزاء اللازمة لبناء البروتين ومثال ذلك الريبوسومات ولذلك فإنه يحتاج إلى خلية البكتيريا لكى يؤثر على التحول الغذائى فيها لصالحه وذلك بأن تكون الخلية البكتيرية البروتين الخاص بالفاج . الفاج حقة صغيرة تحت الجلد miniature hypodermic syringe حيث أنه يقوم بحقن DNA داخل الخلية البكتيرية ويشبه بذلك الحقنة . عند دخول DNA الفاج إلى الخلية البكتيرية فإنه يتحكم فى تفاعلات الخلية البكتيرية . حيث أن بعض جينات الفاج تنسخ بواسطة إنزيم البلمرة RNA الخاص بالخلية البكتيرية وأن يتكون m RNA يتكون منه بروتين الفاج

وذلك باستعمال ريبوسومات الخلية البكتيرية. بعض أنواع الفاج وفي المراحل الأولى بعد إصابة الخلية البكتيرية فإنها تكون أنواع من البروتينات تسبب تحطيم DNA الخلية البكتيرية وتجزئته إلى أجزاء صغيرة. ولذلك تموت الخلايا البكتيرية. بعض أنواع الفاج بها جينات خاصة بها ويمكنها أن تكون إنزيم بلمرة RNA (RNA polymerase) خاص بها ولذلك فإنها لا تحتاج إلى هذا الإنزيم الخاص بالخلية البكتيرية. أيضا بعض أنواع الفاج لها جينات خاصة بها تتحكم في تخليق الـ DNA الخاص بها ولذلك فإنه في حالة وجود DNA الفاج داخل الخلية البكتيرية وفي حالة تحرر بعض النيوكليوتيدات من DNA البكتيري فإنه يمكن أن يتكون من هذه النيوكليوتيدات DNA الفاج ويتم هذه العملية من مكونات الفاج ما عدا النيوكليوتيدات حيث يأخذها الفاج من البكتيريا. أى أن الفاج له في هذه الحالة ميكانيكية لمضاعفة DNA replication machinery خاصة به. تنتج كميات كبيرة من DNA الفاج وفي دقائق قليلة فإن جينات أخرى تبدأ في العمل لإنتاج كميات كبيرة من البروتين اللازمة لعمل الرأس والذيل. تتجمع جزئيات البروتين لتكون الرأس ثم يعبأ بداخله DNA ثم يلتصق الذيل بعد ذلك بالرأس ليتكون الفاج الكامل. تكوين الفاج داخل الخلية البكتيرية يتكون تلقائيا. وأن الوقت من حقن DNA إلى إنتاج جزئيات فاج جديدة قد يستغرق أقل من عشرون دقيقة. وتصبح الخلية البكتيرية مجرد غلاف يحتوى على مئات من جزئيات الفاج. ثم تنتج جزئيات الفاج إنزيم يسبب تحطيم جدار الخلية البكتيرية لتحرر جزئيات الفاج وتصيب خلايا بكتيرية جديدة.

ينتج جزئى فاج واحد داخل الخلية البكتيرية الواحدة مئات من الفاج. وكل فاج من المائة يصيب خلية بكتيرية ويكون مئات وعند تكرار هذه الحالة أربعة مرات فقط فإن فاج واحد يؤدي إلى موت ما يزيد عن بليون خلية بكتيرية. أما عند إضافه عدد قليل من الفاج إلى مزرعة بكتيرية كثيفة وقبيل إنفجار أى خلية بكتيرية نتيجة للأصابة بالفاج فإن يتم توزيع ونشر خلايا هذه المزرعة على سطح بيئة آجار مغذى. وفي خلال عشرون إلى ثلاثون دقيقة فإن الخلية البكتيرية الأولى المصابة تنفجر وتحرر جزئيات الفاج وهذه تصيب خلايا أخرى وهكذا تكرر العملية ولذلك فإنه تتكون تدريجيا حلقات من الخلايا الميتة حول أول خلية بكتيرية وهكذا تتسع الحلقات وفي هذه الأثناء أيضا تتكاثر الخلايا البكتيرية غير المصابة وحيث أن عدد هذه الخلايا كبير بالنسبة لعدد الخلايا المصابة فإن الخلايا السليمة تكون طبقة

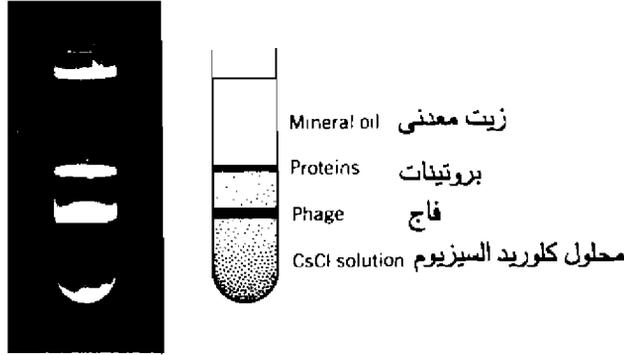
وتغطي سطح الآجار. وبعد أن يغطي سطح البيئة تماما بالخلايا البكتيرية تتوقف الخلايا عن التكاثر وأيضاً يتوقف الفاج عن التكاثر لأنه معتمد على الخلايا البكتيرية. وفي النهاية توجد بعض الحفر holes المستديرة في سطح النمو البكتيري وهذه تحتوى على خلايا ميتة نتيجة لتأثير الفاج وتسمى plaques. يعتبر كل plaque ناتج من فاج واحد عادة. يكون قطر plaque حوالي ٣ - ٤ مم. يمكن تعريب كلمة plaque أى مكان وجود الفاج وموت الخلايا البكتيرية (شكل ١١٨).

عند أذخال جزء من DNA إلى DNA الفاج ثم يلتحم هذا DNA مع DNA الفاج دون أى تأثير ضار على DNA الفاج فإن هذا الـ DNA سيتكاثر مع DNA الفاج عادى. يمكن لمهندس الوراثة أن يحدد الـ plaque المحتوى على DNA المنقول وذلك باستخدام مجس معلم وذلك باستخدام توافق القواعد النيروجينية المكملة لبعضها فى المجس والـ DNA المنقول أو الجين تحت الدراسة. وبعد التعرف على plaque المطلوب يتم غمس أبره التلقيح البكتيرية ذات العقدة فى plaque وينتج عن ذلك إلتصاق بعض الفاج بالأبره ثم يتم غمس عقده الأبره فى المزرعة البكتيرية وينتج إنتقال جزئيات الفاج إلى خلايا المزرعة البكتيرية. يصيب الفاج خلايا البكتيريا وهكذا تتكون أعداد هائلة من الفاج نتيجة لتكاثر الخلايا البكتيرية وتكوين ملايين من الخلايا. ولذلك فإن الجين تحت الدراسة يتواجد بداخل الفاج وبكميات هائلة حيث أن الفاج يتكون بكميات هائلة. يمكن بعد ذلك فصل وتنقية DNA الفاج عن بروتين الفاج وعن بقايا الخلايا البكتيرية وذلك بطريقة الكثافة النسبية مع قوة الطرد المركزي - density gradient centrifugation كما سبق ذكره تماماً فى فصل البلازميدات. ولا نحتاج فى هذه الحالة إلى أى نوع من الصبغات حيث أن الكثافة النسبية للبروتين، DNA للفاج مختلفة تماماً. يتم وضع الفاج فى أنبوبة بها ملح ثقيل heavy salt مثل كلوريد السيزيوم وتوضع فى جهاز الطرد المركزي حيث يتم عمل عملية الطرد المركزي لمدة يوم على سرعة ٢٥٠٠٠ لفة فى الدقيقة وبعد إنتهاء عملية الطرد المركزي يمكن فصل الفاج عن DNA البكتيريا وعن مكونات الخلايا البكتيرية الأخرى حيث يظهر الفاج (شكل ١١٩) عند تعريض الأنبوبة للأشعة فوق البنفسجية على هيئة حزمة أى خط فى الأنبوبة بلون متعدد opalescent نتيجة لعملية قلوره الضوء. يمكن سحب هذه الحزمة band بواسطة ماصة. ثم يجرى إعادة عملية الطرد المركزي بسرعات مختلفة لفصل بروتين، DNA عن بعضها. وفى أثناء عملية الطرد المركزي تجرى ملئ الجزء العلوى من الأنبوبة بواسطة زيت معدنى وذلك لعدم تحطيم أو أنبعاغ الأنبوبة البلاستيك أثناء عملية الطرد المركزي.



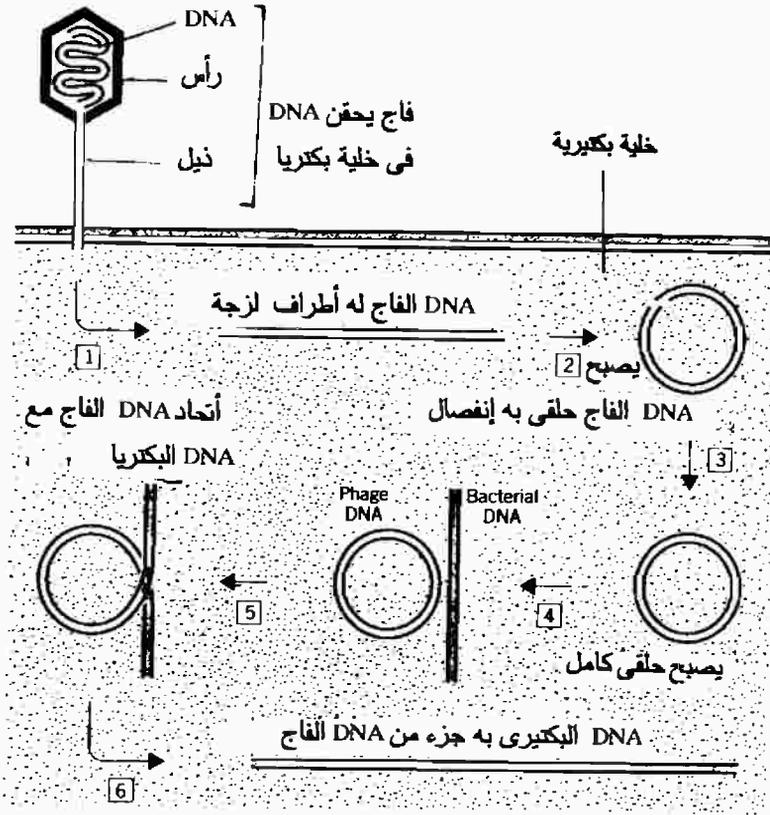
Phage plaques : (شكل ١١٨)

- أ- طبق بتري به نمو بكتيري على بيئة وبه plaques .
- ب- plaque مكبر.
- ج- طبق بتري به نمو بكتيري على بيئة و plaques غامقة.



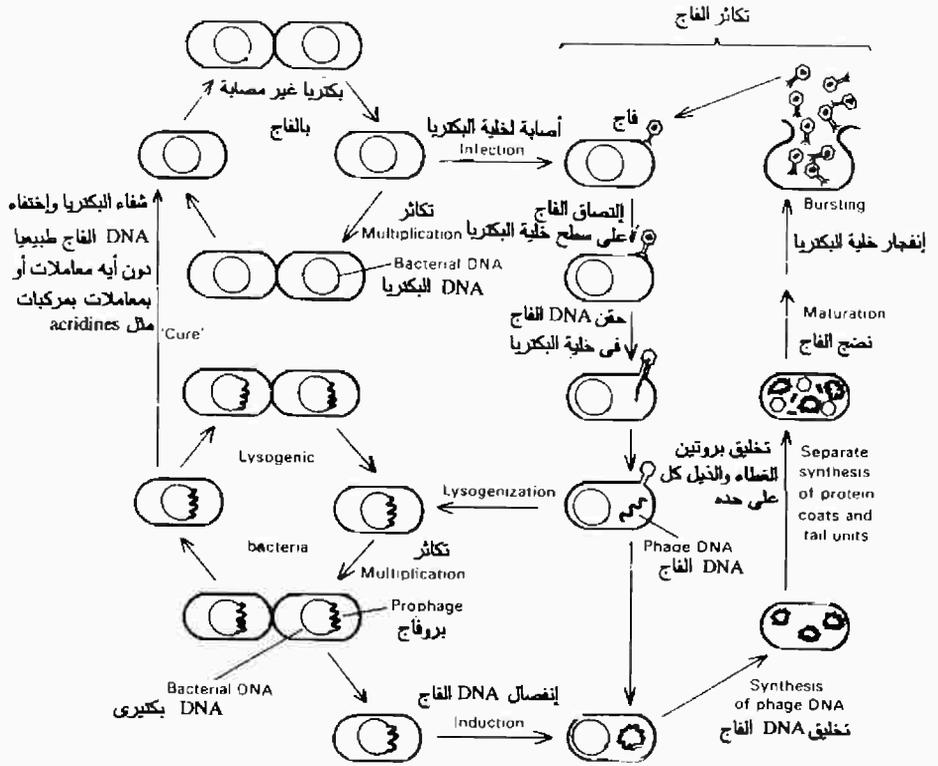
(شكل ١١٩) : المحتويات المختلفة بعد عملية الطرد المركزي في أنبوية طرد مركزي لمخلوط من الفاج والبروتينات ومحلول كلوريد السيزيوم وزيت معدني .

توجد حالة أخرى من الفيرس ويسمى الفيرس المعتدل temperate ويسمى أيضا لامبدا λ . حيث أنه عند حقن DNA الفاج داخل الخلية البكتيرية فإنه له الخيار فيما أن يسبب تحطيم الخلية البكتيرية lysis وتسمى أيضا إصابة lytic infection وأما أن يصبح جزء من DNA الخلية البكتيرية ولا يسبب لها تحطيم أو تحلل وتسمى هذه الخلايا البكتيرية في هذه الحالة الحاملة دون تحطيم للخلية lysogen . ولذلك يصبح DNA الفاج في هذه الحالة جزء من DNA الخلية ويتكاثر معها طبيعيا كأنه جزء عادي من DNA البكتيريا أو الكروموسوم البكتيري (شكل ١٢٠) . ولذلك في حالة lysogen فإن جين أو جينات الفاج تنتج بروتين مانع repressor يمنع جينات الفاج من تكوين بروتين يسبب تحطيم أو قتل الخلية البكتيرية . حيث أنه في حالة التحلل lysis فإن جينات الفاج تنتج بروتين يسبب تحطيم وقتل الخلية البكتيرية . أي أنه في حالة lysogen فإن جينات الفاج التي تنتج بروتين يسبب قتل الخلية البكتيرية توقفت نتيجة لوجود المانع turned off by a repressor protein . تتميز الخلايا lysogen بأنه عند إصابتها بـ DNA فاج جديد فإن البروتين المانع يحيط بـ DNA الفاج الجديد ويمنع تأثيره . ولذلك فإن الخلايا lysogen تكون مقاومة لأي إصابة بـ DNA فاجات جديدة ولا تتأثر بها . ولذلك توجد الخلايا البكتيرية lysogen على هيئة نمو بكتيري في مركز plaque . ولذلك عندما يحمل lysogen جين جديد منقول إليه بواسطة الفاج يصبح الحال مماثل لحالة البلازميد ويمكن



(شكل ١٢٠): تكوين lysogen بين DNA الفاج والخلية البكتيرية.

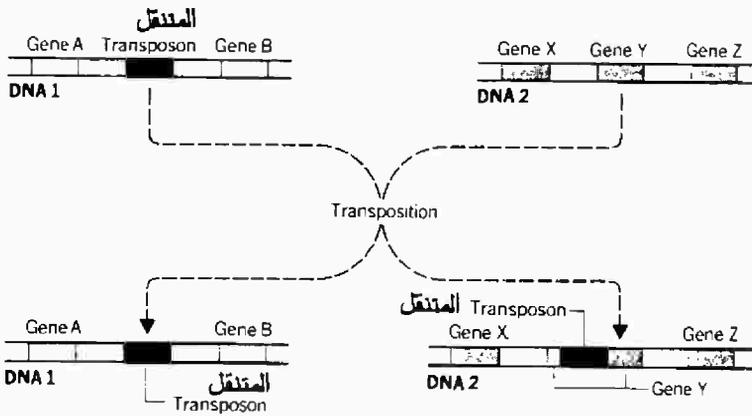
أكثر خلية lysogen للحصول على أعداد هائلة فلكية من خلايا البكتيريا lysogen الحاملة للجين الجديد. وعند عمل مناطق منظمة regulatory regions على الجين الجديد أى أنها مناطق من DNA يمكن بها التحكم فى بدء نشاط الجين وإظهار تأثيره turn on وأيضا يمكن بها التحكم فى توقف نشاطه turn off. يمكن عمل ذلك بكفاءة عالية بواسطة الهندسة الوراثية. ويمكن الحصول على DNA الفاج وأيضا الجين المطلوب من داخل الخلية البكتيرية له بواسطة طرق تنقية DNA المذكوره سابقا. بلعب بروتين الخلية البكتيرية وبروتين الفاج دور هام فى لصق واللتحام DNA الفاج بالكروموسوم البكتيري أى DNA البكتيري (شكل ١٢١).



(شكل ١٢١) : خطوات تكاثر الفاج و Lysogenization

المتنقلات Transposons

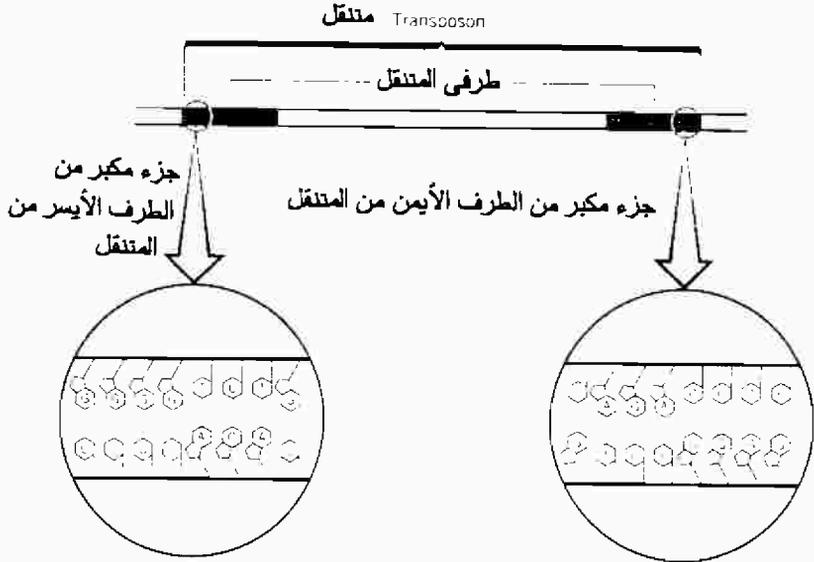
يمكن لمهندس الوراثة نقل جين أو جينات أو DNA من مكان إلى مكان آخر على جزيئ DNA آخر. يمكن أن يحدث ذلك طبيعيا في جينات خلايا الكائنات الحية. حيث توجد أجزاء متصلة من DNA يمكن أن تضاعف نفسها وأن هذه الأجزاء الجديدة المكررة من DNA يمكن أن تنتقل وتلتصق بجزيئ DNA آخر. يسمى هذا الجزء المنتقل من DNA والذي يتكون من تتابع عديد من النيوكليوتيدات باسم المتنقل transposon وتسمى عملية نقل المكان transposition . يمكن أن تتكون أجزاء عديدة غير متصلة من DNA على الكروموسوم تسمى بالمتنقلات transposons . تختلف نتيجة عملية نقل المكان تبعا للموقع المنتقل إليه المتنقلات فإذا أنتقل بين تتابع نيوكليوتيدات الجين فإنه يسبب توقف عمل الجين (شكل ١٢٢) . ويكون الجين غير قادر على إظهار وظيفته أى على إنتاج البروتين الخاص به. يمكن أن يكون العكس عندما تدخل المتنقلات على الجزيئ الجديد بالقرب من الجين فإنها تسبب تنشيطه . activates a gene .



(شكل ١٢٢) : عملية إنتقال المتنقلات . إنتقال متنقل .

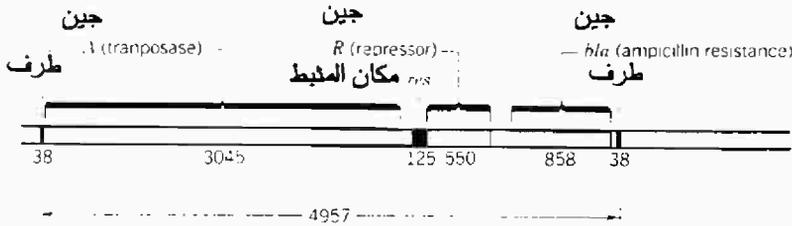
توجد المتنقلات في مجموعات كبيرة من الكائنات الحية ويمكن القول أن جميع الكائنات الحية تحتوي المتنقلات. تتميز هذه المتنقلات في جميع الكائنات الحية المختلفة بثلاث

خصائص. أولاً تعتبر المتنقلات أجزاء متقطعة أى غير متصلة من DNA وكل جزء يتكون من العديد من النيوكليوتيدات كما أن كل متنقل له مكان محدد ثابت على جزيئ DNA المتنقل إليه. ثانياً تحتوى المتنقلات على نيوكليوتيدات يتكون منها مركب أو أكثر وهذه الأخيرة تكون المسؤولة عن نقل المتنقلات من مكان إلى آخر. وجد أن هذه المركبات عبارة عن بروتين فى غالبية الحالات. ولذلك فإن المتنقلات تحتوى على جينات مسؤولة عن إنتقالها من مكان إلى آخر. ثالثاً يتكون كلا من طرفى المتنقل من العديد من النيوكليوتيدات المتتابعة. يعتبر هذا التتابع للنيوكليوتيدات عبارة عن موقع أو مكان التعرف recognition site. أى مكان للتعرف هو عبارة عن منطقة أو جزء من المتنقل تستخدم مع عوامل أخرى أو أجزاء أخرى من المكونات factors فى حركة ونقل المتنقل. يكون تتابع النيوكليوتيدات فى مكان التعرف مقلوب أو معكوس inverted (شكل ١٢٣) حيث يوجد فى طرف تتابع معين وفى الطرف الآخر تتابع مقلوب أى عكسى.



(شكل ١٢٣): المتنقل وتركيب طرفيه

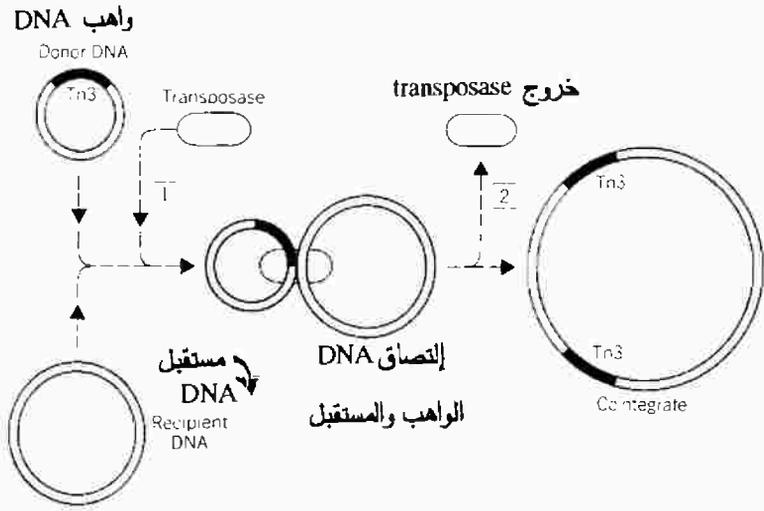
تختلف عملية نقل المكان transposition للمنتقلات فهي تختلف فى التفاصيل الجزيئية من منتقل إلى آخر. سيتم وصف هذه العملية فى أحد المنتقلات وهو Tn_3 . يوجد هذا المنتقل فى خلايا البكتيريا ويحتوى على ثلاث جينات وهى A و R و bla (شكل ١٢٤) وبالإضافة إلى ذلك يوجد ثمانية وثلاثون زوج من القواعد النووية فى أحد الطرفين ويوجد نفس العدد فى الطرف الآخر ولكن مرتبة بطريقة عكسية أى مقلوبة بالنسبة للطرف الآخر. يكون الجين bla بروتين يفسد الأمبسليلين ولذلك فإن أى خلية بكتيرية تحتوى Tn_3 تكون مقاومة للأمبسليلين. يكون الجين A بروتين يسمى transposase وهو مسئول عن إنتقال وحركة Tn_3 . عند إزالة الجين A فإن Tn_3 تكون غير قادرة على الحركة. يكون الجين R مثبط والذي يرتبط بالجين A ويمنعه من تكوين transposase ويسمى المثبط repressor. ولذلك فإن المثبط والذي يتكون من البروتين يؤثر على حركة المنتقلات ويقال إلى حد ما من درجة حدوثها. عند منع نشاط جين R وذلك نتيجة لحدوث طفرة فى هذا الجين فإن الخطوة الأولى فى حدوث عملية نقل المكان للمنتقل Tn_3 تزداد كثيرا.



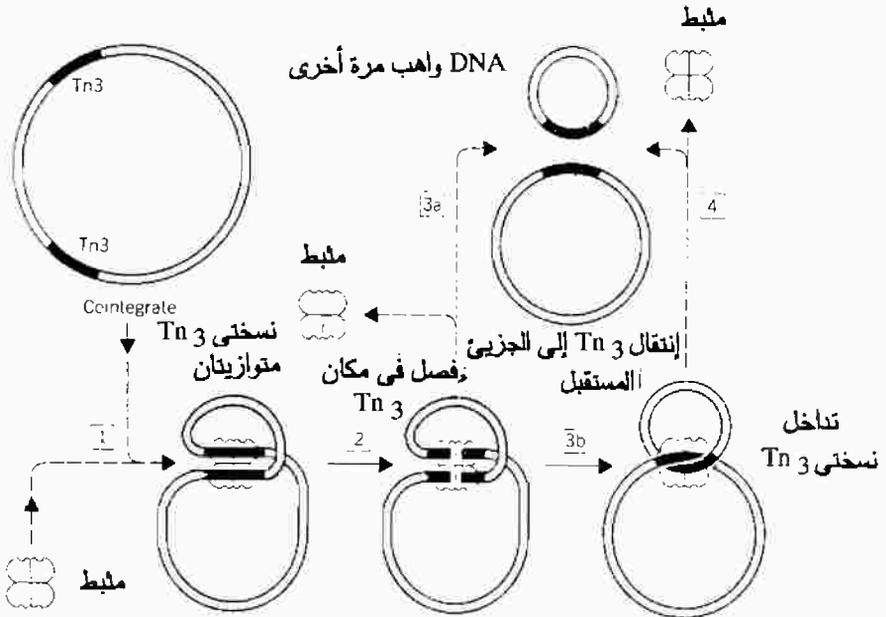
(شكل ١٢٤): تركيب المنتقل

يحتوى Tn_3 على ثلاث جينات ومكان res هو مكان إلتصاق المثبط بالمنتقل. توضح الأرقام عدد النيوكليوتيدات فى كل جزء.

تحدث عملية نقل المكان فى المنتقل فى خطوتين (شكل ١٢٥، ١٢٦). وفى الخطوة الأولى تحدث عملية إلتصاق أو ألتهام بين جزيئ DNA المحتوى على المنتقل Tn_3 وبين جزيئ DNA آخر لا يحتوى على Tn_3 . يسمى الجزيئ المعطى للمنتقل بالـ DNA الواهب donor ويسمى الجزيئ المستقبل للمنتقل باسم DNA المستقبل recipient. يتوسط هذه الخطوة وجود بروتين transposase. ثم يتضاعف أى يتكرر جزيئ Tn_3 بواسطة أنزيم DNA polyme- rase ويتم إلتحام طرفى الجزيئ الواهب بطرفى الجزيئ المستقبل لتتكون حلقة كبيرة تسمى



(شكل ١٢٥) : خطوات تكوين cointegrate



(شكل ١٢٦) : خطوات حدوث recombination من الـ cointegrate

cointegrate وبعد تمام أكتمال تكوين cointegrate فإن البروتين الداخل في العملية والذي يسمى transposase ينفصل عن جزيء الـ DNA . وفي الخطوة الثانية ينفصل الـ cointegrate إلى حلقتين . يلعب المثبط repressor المنتج بواسطة الجين R دور كبير في هذه الخطوة حيث أنه يرتبط بالـ cointegrate ويسبب إلتواء DNA ليصبحا الـ Tn 3 في مواجهة بعضهما وموازيا لبعضهما . ثم يحدث كسر في نسختي Tn 3 في المكان res . ثم يحدث توزيع بين DNA جزئيين Tn 3 recombination بطريقتين وفي الطريقة الأولى يحدث إلتحام بين طرفي DNA في المستقبل وفي الواهب دون تداخل كما في الشكل 3 a وحيث ينفصل المثبط . وفي الطريقة الثانية يحدث تداخل بين حلقتي interlocked DNA وحيث يوجد إنزيم يقوم بفصل الحلقتين وهو topiomerase ويصبحا حلقتين منفصلتين مع إنفصال المثبط كما في الشكل 4 . وفي كلا الحالتين يتكون جزيء DNA واهب وجزيء مستقبل به المنتقل Tn 3 . وبذلك يكون قد تم إنتقال المنتقل . يقوم المثبط بوظيفتين حيث أنه يقلل معدل حدوث الأنتقال للمنتقل والوظيفة الثانية أنه يجعل جزئيين Tn 3 متقابلين ويقوم بعملية الكسر أي الفصل في منتصفيهما كما يقوم بأعادة إلتحام مكان الفصل بعد حدوث عملية recombination . ولذلك فإن المثبط يتحكم في مدى تكرارية حدوث عملية إنتقال المنتقلات ولذلك فإن عملية النقل متحكم فيها ومنظمة تماما .

تعتبر المنتقلات من أهم أدوات أو وسائل الدراسات الوراثية لما يأتي . أولا يمكن إستعمال المنتقلات كـ cloning vehicles . حيث يمكن إدخال الجين المطلوب بين تتابع النيوكليوتيدات في المنتقل . يمكن الحصول على أعداد كبيرة جدا من هذا المنتقل المحتوي على الجين المطلوب وذلك بإدخال هذا المنتقل إلى الخلية البكتيرية . يمكن الحصول على هذا المنتقل المحتوي على الجين المطلوب كما يمكن أيضا الحصول على البلازميد من خلايا البكتريا الحاملة لها وذلك بفصلها وعزلها وتلقيتها من خلايا البكتريا كما تم شرحه في جزء البلازميد . يمكن حقن المنتقل بما يحمله أي الجين المطلوب في الحيوانات وبذلك ينتقل المنتقل المطلوب إلى كروموسوم الكائن ويتحد معه . وقد تم عمل ذلك تماما لتغيير لون العين في حشرة ذبابة الفاكهة . ثانيا تحدث بعض الأمراض الوراثية نتيجة لتثبيط بعض الجينات بواسطة المنتقلات . ولذلك فإن إزالة المنتقلات تسبب الشفاء من المرض . يمكن أن يكون العكس صحيح حيث أن النشاط الزائد لبعض الجينات overactive genes يسبب بعض الأمراض الوراثية ولذلك فإن

إضافة المتقلبات تقلل إلى حد ما من هذا النشاط الزائد للجينات ويتم الشفاء من المرض الوراثي.

يكون تركيب بعض الفيروسات المسببة لحدوث الأورام مشابهة لتركيب المتقلبات أى أن تنابع النيوكليوتيدات فى كل منهما متماثل إلى حد كبير. ولذلك فإن دراسة إنتقال المتقلبات والتعرف على ميكانيكية حدوثها يمكن أن يؤدي إلى علاج بعض أنواع مرض السرطان.

الأستدلال على نقل الجينات (DNA) بالعين : Visualization of cloned DNA

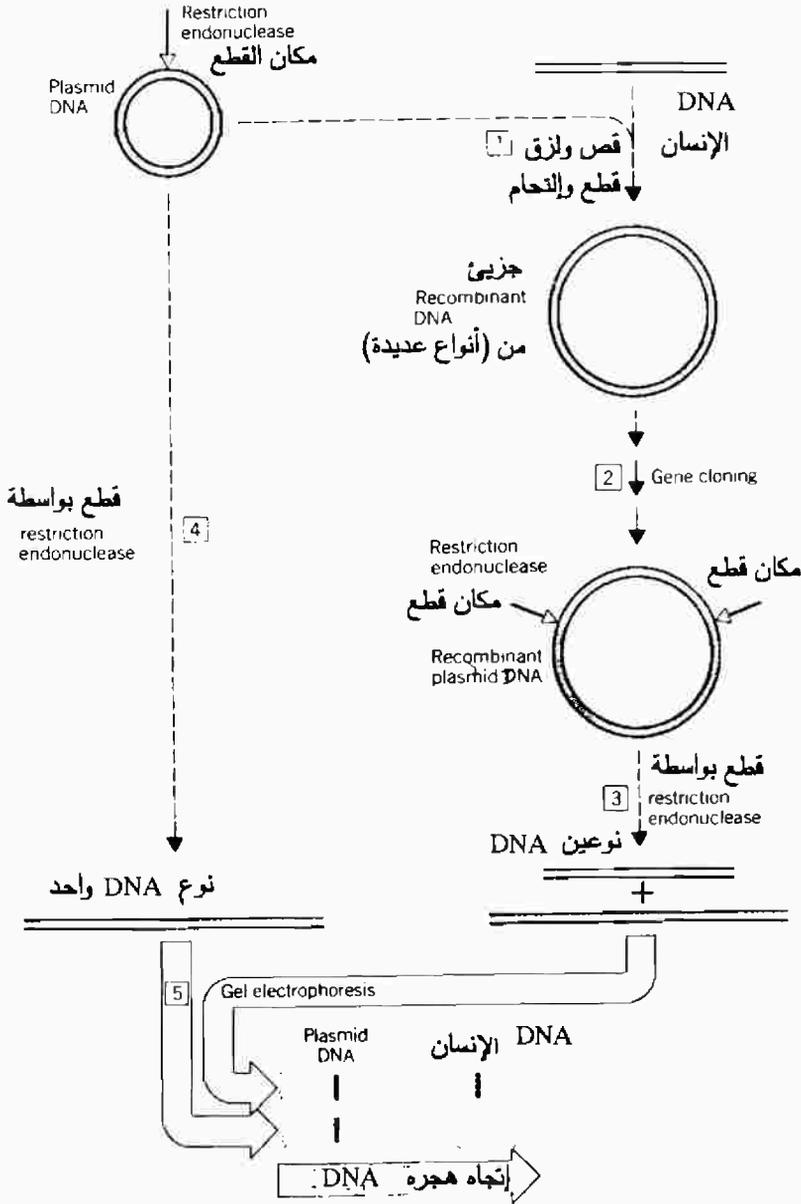
بعد نقل الجين المطلوب إلى البلازميد أو الفاج فإنه من الصعب على مهندس الوراثة معرفة ذلك وقد أمكن معرفة ذلك بالطرق الكيموحيوية وبالأختبارات الوراثةية ولكن من الأفضل هو التأكد من ذلك بروية ذلك بواسطة العين المجردة وسيكون ذلك خير دليل. يكون ذلك بإحدى طريقتين.

فى الطريقة الأولى : يتم قطع البلازميد فى مكان معين بواسطة إنزيم القطع (r. e.) وهذا نوع معين من الإنزيم متخصص لقطع البلازميد فى هذا المكان ويتم أيضا قطع جزء من DNA الإنسان عبارة جين أو عدة جينات ويكون ذلك بواسطة نفس أنزيم القطع restriction endonuclease . يتم خلط البلازميد مع الجزء الشريطى المقطوع لـ DNA الإنسان ويحدث إلتحام للجزء المقطوع من DNA الإنسان مع البلازميد فى مكان القطع. يحدث تكون بلازميد عادى به DNA الإنسان ولكن يوجد حالات عديدة حيث أن DNA الإنسان المقطوع يمكن أن يحتوى الجين المطلوب وقد لا يحتويه حيث أنه لا يمكن معرفة ذلك بدقة كافية. وكذلك قطع البلازميد يكون فى مكان واحد ويمكن أن يكون ليست بالتحديد نفس المكان بالضبط فى جميع البلازميدات. ولذلك ينتج بلازميدات عادية بها DNA الإنسان ولكنها أنواع أو طرز عديدة لأنها متشابهة وليست متماثلة تماما فى تركيبها. يمكن إدخال هذه البلازميدات إلى داخل خلايا بكتيرية ثم يتم تنمية هذه الخلايا البكتيرية على البيئة لتتكون أعداد هائلة من هذه الخلايا. ثم يتم عزل الخلايا البكتيرية التى تحتوى الجين المطلوب وأيضا عزل البلازميد المحتوى على هذا الجين المطلوب من هذه الخلايا البكتيرية وذلك كما سبق شرحه (أنظر

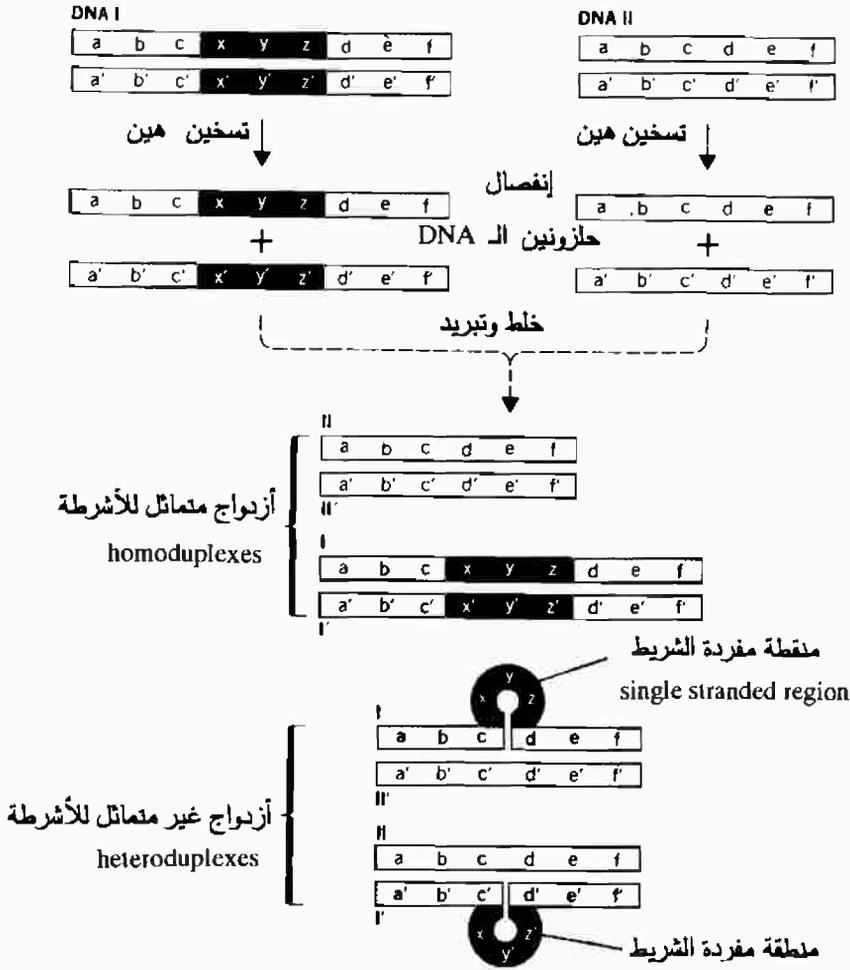
جزء البلازميدات). تحتوي البلازميدات المعزولة على DNA الجين المطلوب ويستخدم مرة أخرى أنزيمات القطع (r. e.) متخصصة حيث يتم قطع البلازميد في نقطتين أي مكانين وينتج عن ذلك جزء خيطي (شريطي) للبلازميد وأيضاً جزء خيطي (شريطي) لـ DNA الإنسان. أما في حالة البلازميد العادي فإن له نقطة أو مكان قطع واحد بواسطة إنزيم قطع متخصص ويصبح شريطي كما سبق ذكره في أول التجربة. ولذلك باستخدام طريقة الهجرة في وسط غروي في مجال كهربائي electrophoresis فإنه يمكن فصل البلازميد العادي في حزمة واحدة أما البلازميد المحتوي على DNA الإنسان فإنه سيكون حزمتين. تكون الحزمة البعيدة عن بداية مكان الفصل هي حزمة DNA الإنسان والحزمة القريبة من بداية مكان الفصل هي حزمة البلازميد. وبذلك يمكن الحصول على DNA في صورة نقية (شكل ١٢٧).

وفي الطريقة الثانية يستخدم المجهر الإلكتروني وعمل تهجين بين DNA وتسمى هذه الطريقة عمل خرائط التزاوج غير المتماثل heteroduplex mapping. والفكرة في عمل هذه الخرائط بسيطة حيث أنه عند تزاوج خيطين مختلفين نسبياً من DNA حيث أنه توجد أجزاء متشابهة ومتماثلة في ترتيب النيوكليوتيدات وأجزاء أخرى غير متماثلة ولذلك عند عمل التهجين بين هذين الخيطين (الشريطين) فإنه سيحدث تماثل وتوافق في الأجزاء المتوافقة ويحدث تقارب وتزاوج وبذلك تتكون أجزاء عبارة عن خيطين من DNA double stranded بينما توجد أجزاء أخرى من الخيطين غير متماثلة وغير متوافقة فلا تتقارب أو تتزاوج مع بعضها ولذلك ينتج في بعض المناطق خيط مفرد single stranded DNA. وهذه المناطق ذات الخيط المفرد تكون حلقة loop يمكن رؤيتها بسهولة في صور المجهر الإلكتروني. وفيما شرح تفصيلي لهذه الطريقة :

يوجد نوعين من جزيئات DNA أحدهما أطول من الآخر لأنه يحتوي على جينات زائدة وهي X ، Y ، Z ثم بالتسخين الهين يتم فصل شريطي DNA ثم يتم خلطهما والتبريد فيحدث تزاوج مرة أخرى وقد يكون بين شريطين متماثلين كما في الأصل homoduplexes وقد يحدث بين شريطين مختلفين ونتيجة لإختلاف الطول يحدث تكون حلقة loop في مكان X ، Y ، Z وهذه يمكن رؤيتها بالمجهر الإلكتروني. مكان الحلقة عبارة عن single strand وتعتبر هذه الحالة heteroduplexes (شكل ١٢٨).



(شكل ١٢٧): الأستدلال على مكونات recombinant DNA بواسطة gel electrophoresis . قطع البلازميد ينتج عنه نوع واحد من DNA ولكن قطع وإلتحام البلازميد مع DNA الإنسان ينتج عنه بلازميد recombinant حلقى . ثم تجزئ هذا البلازميد الأخير ينتج عنه نوعين من DNA يمكن الأستدلال على ذلك بواسطة الهجرة في مجال كهربائي في وسط غروي gel electrophoresis .



(شكل ١٢٨): تزاوج شريطين الـ DNA وتكوين منطقة مفردة الشريط single - stranded . تسخين هين لفصل حلزونين الـ DNA ثم خلط نوعي الـ DNA ثم التبريد فيحدث أزواج متماثل للشريطين homoduplexes أو أزواج غير متماثل للشريطين فتوجد منطقة بها الجينات X و Y و Z ولا يقابلها منطقة متماثلة فيحدث تكوين منطقة مفردة الشريط بها الجينات X و Y و Z حلقية الشكل .

عزل ونقل الجين Gene Cloning

يعتبر ذلك أحد الأمثلة لتطبيق الدراسات السابقة بطريقة عملية وهو نقل الجينات المتحكمه فى بناء الهيموجلوبين. يعتبر الهيموجلوبين بروتين مسئول عن نقل الأوكسجين من الرئة إلى أنسجة الجسم. وأحد الأمراض الناتجة عن إختلال فى وظيفة الهيموجلوبين هو نوع من الأنيميا sickle - cell anemia . يتحكم فى بناء وتكوين هيموجلوبين الدم جينات عديدة. ومما هو جدير بالذكر أنه تتكون أنواع مختلفة من الهيموجلوبين فى جسم الإنسان أثناء مراحل نموه ومثال ذلك أن نوع الهيموجلوبين المتكون فى المولود بعد الولادة مباشرة يختلف عن نوع الهيموجلوبين الموجود فى الإنسان البالغ. ويعتبر ذلك أحد الأمثلة الرائعة للتعرف على ميكانيكية عمل الجين حيث أن الجين ممكن أن يعمل فى فترة معينة switch on ثم يتوقف عن العمل بعد ذلك switch off . أى أن الجين يأخذ إشارة بدء العمل لإنتاج نوع معين من بروتين الهيموجلوبين فى المولود وبعد ستة أشهر من الولادة يتوقف هذا الجين عن العمل ويبدأ جين أو جينات أخرى فى العمل لتكون بروتين الهيموجلوبين الخاص بالإنسان البالغ. ولذلك فإن وجود هذه الجينات الخاصة بتخليق بروتين الهيموجلوبين معزولة ومعدة للاختبار والدراسة cloned تكون ذات فائدة كبيرة لمهندس الوراثة حيث أنها ستفيد فى عمل تجارب لإكتشاف كيفية بدأ الإشارة لعمل الجين وميكانيكية الإشارة التى يتوقف بها عمل الجين.

وتتلخص طريقة عزل ونقل والإحتفاظ بالجين gene cloning فيما يأتى :-

- ١ - تحديد مصدر مناسب أى كائن حى مناسب للحصول على الجين DNA .
- ٢ - فصل DNA المطلوب عن DNA الكائن الحى .
- ٣ - مزج الـ DNA المفصول مع DNA الفاج .
- ٤ - الحصول على مجس معلم .

١ - قول الآية الكريمة (ويخلق الحس من الميت) :

١ - تحديد مصدر مناسب للحصول على الجين المطلوب :

تستعمل جينات مأخوذة من الأرناب وحيث تتحكم هذه الجينات فى تخليق بروتين هيموجلوبين الأرناب. جميع خلايا الأرناب بها هذه الجينات. وحيث أن الفاج يحتوى على

DNA يحمل معلومات وراثية ودون أن يكون هذا DNA جزء من كائن حي. ولذلك فإن جينات الهموجلوبين يمكن الحصول عليها من كائن حي أو ميت ويمكن تخزينها في ظروف مناسبة أى في درجة حرارة منخفضة مناسبة لعملية التجمد ويمكن حفظها بذلك إلى زمن لانهاى. ولذلك يمكن أن يكون الميت مصدر للحياه. ويمكن أن يكون ذلك تفسير للآية القرآنية ويخلق الحى من الميت والتي إحتار فيها مفسروالقرآن كثيرا.

٢ - فصل DNA المطلوب عن DNA الكائن الحى :

تجمد كبد الأرنب ثم يأخذ ويوضع فى خلاط وهكذا حتى يتم تحطيم الخلايا. ثم يوضع محلول مركب شبيه بالصابون detergent وأيضا محلول أنزيم يعمل لتحليل البروتين. يفيد مخلوط محلول detergent مع الأنزيم فى فصل وإزالة البروتينات المرتبطة بالـ DNA وأيضا تفيد فى تثبيط الإنزيمات التى تحلل الأحماض النووية nucleases . يحفظ ذلك المخلوط cell lysate لعدة ساعات فى حضان فى درجة حرارة مناسبة ويخلط أيضا فى هذه الفترة بمحلول الفينول الذى يسبب إزالة البروتين المتبقى والذى لم يهضم بالأنزيمات المحللة للبروتين. ثم يأخذ المخلوط ويجرى له عملية طرد مركزى وذلك فى وجود محلول معين لعمل تدرج فى الكثافة كما سبق ذكره centrifuged in a density gradient وذلك لفصل وتنقية الـ DNA . تتكون حزمة band واحدة فى أنبوبة جهاز الطرد المركزى ويمكن سحب هذه الحزمة بواسطة حقنة حيث أن هذه الحزمة تحتوى على DNA . يتم وضع هذه الحزمة فى أنبوبة إختبار. تحتوى أنبوبة الأختبار على ملايين من الجينات وبعض منها خاص بالهموجلوبين.

٣ - مزج الـ DNA المفصول مع DNA الفاج :

يتم تنقية فاج من النوع لامدا lambda كما سبق ذكره. ثم يتم إستخلاص DNA الفاج وحيث أنه زائد الطول فإنه يعامل بأنزيم قطع مناسب restriction endonuclease . يتم تجزئى DNA الأرنب بواسطة أنزيم قطع مناسب إلى أجزاء طويلة نسبيا. يتم خلط DNA الفاج مع DNA الأرنب ثم يضاف إنزيم الربط (الإلتحام) ligase وذلك لكى يحدث إلتحام بين DNA الفاج وDNA الأرنب. ثم يكون DNA الناتج من الألتحام البروتين الخاص بالفاج. وبذلك يعبأ DNA

ناتج الألتحام recombinant DNA داخل بروتين الفاج. وبذلك يمكن حقن هذا DNA فى داخل الخلية البكتيرية بواسطة الفاج. ومن ذلك يتضح أن يتم تخليق الفاج فى أنبوبة الإختبار فى المعمل وينقل إلى مزرعة بكتيرية *E. coli* حيث يتم إصابة خلايا البكتيريا. ثم يتم فرد خلايا المستعمرة البكتيرية على بيئة آجار مناسبة وينتج عن ذلك ظهور plaques . يحتوى كل plaque على ملايين من جزيئات الفاج. وقليل من جزيئات الفاج تحتوى على جينات الهيموجلوبين .

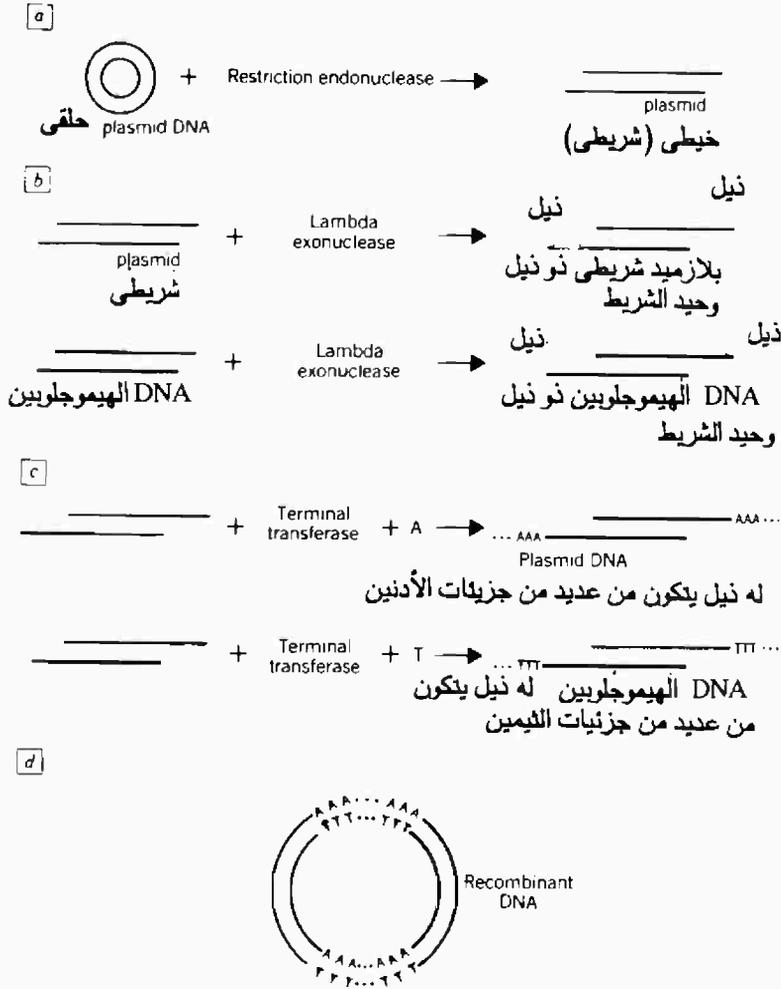
٤ . الحصول على مجس معلم:

لكى نتعرف على الجين أو الجينات الخاصة بالهيموجلوبين فى كل plaque نستعمل مجس معلم يتوافق فى تركيبه مع تركيب الجينات تحت الدراسة. ولذلك لا بد من الحصول على ترتيب وتتابع النيوكليوتيدات فى RNA أو DNA جين الهيموجلوبين. تكون الخطوة الأولى هى عزل وتنقية m RNA الخاص بالهيموجلوبين. من الصعب عزل m RNA خاص بجين معين خاصة وأن الخلية الواحدة تخلق كثير من أنواع m RNA وأنها متماثلة إلى حد كبير كيميائياً وطبيعياً physically . تختلف حالة m RNA فى الهيموجلوبين حيث أن خلايا كرات الدم الحمراء تنتج هيموجلوبين ولذلك فإن الغالبية العظمى من m RNA فى هذه الخلايا هو الخاص بالهيموجلوبين .

يتم فصل كرات الدم الحمراء من الدم وذلك بتعريضه لقوة طاردة مركزية حيث تترسب كرات الدم الحمراء فى قاع أنبوبة جهاز الطرد. يتم سكب السائل الناتج من الأنبوبة ويضاف قليل من محلول ملحي للأنبوية ويعاد تعليق كرات الدم فى الماء resuspended يضاف مركب شبيه بالصابون وهو detergent يسبب تكسير الخلايا. يضاف بعد ذلك محلول الفينول وذلك لإزالة البروتين ثم يضاف كحول. يسبب الكحول تكوين راسب أبيض من RNA والذى يمكن فصله بسهولة بواسطة قوة طاردة مركزية. حتى هذه الخطوة يصبح RNA نقى ولكنه خليط من m RNA ، t RNA ، r RNA . تتميز كثير من أنواع m RNA بأن نهاية الجزيئ تحتوى على مئات النيوكليوتيدات من نوع أدينين مرتبطة ببعضها. تستغل هذه الظاهره فى فصل

m RNA بطريقة العمود للفصل الكروماتوجرافي. حيث يتم ملأ العمود بواسطة سيليلوز مرتبط بشدة بـ DNA ذو خيط واحد single - stranded DNA يتكون من نيوكليوتيدات بها قاعدة واحدة فقط هي الثيمين. ويكون إلتصاق الثيمين بالسيليلوز شديد. يمرر خليط RNA المعزول على هذا العمود فيلتصق بشدة m RNA لوجود كميات كبيرة من الأدينين في طرفه بالثيمين الملتصق بشدة بالسيليلوز. يبقى m RNA مرتبط بالثيمين والسيليلوز ولا ينساب إلى أسفل العمود. والعكس صحيح في أنواع RNA الأخرى حيث أنها لا ترتبط بالثيمين وتنساب إلى أسفل العمود ويتم سحبها من أسفل العمود. وهكذا تم فصل m RNA عن الأنواع الأخرى من RNA. يتم بعد ذلك فصل m RNA من العمود بسهولة وذلك بواسطة تدفئه مناسبة أى تسخين خفيف حيث يسبب ذلك فصل الإرتباط بين الثيمين والأدينين ويصبح m RNA حر ويسهل فصله. ثم يتم عمل مجس معلم وذلك بخلط m RNA مع قواعد نيتروجينية معلمة مع أنزيم النسخ العكس reverse transcriptase حيث أن هذا الأنزيم يقوم بعمل DNA معلم من نيوكليوتيدات حرة معلمة من جزيئ m RNA. يسمى DNA المتكون في هذه الحالة بالـ DNA المكمل complementary DNA (c DNA). يستخرج الأنزيم السابق من أورام متصبية عن فيروس يمكن بإستعمال المجس المعلم تحديد plaque المحتوية على الجين المطلوب. ولكن نحتاج في هذه الحالة إلى فحص أعداد هائلة من plaques وعادة يصل عددها إلى مئات الآلاف. ولذلك لا بد من توفر كميات كبيرة من c DNA. ولذلك فإن c DNA يتم تحويله إلى DNA ثنائى الخيط double - stranded باستعمال إنزيم البلمرة DNA polymerase - DNA. ثم يتم وضع ذلك DNA فى بلازميد ثم يتم نقل البلازميد إلى الخلية البكتيرية *E. coli*. تتكاثر هذه الخلية وبذلك نحصل على كميات كبيرة من الخلايا البكتيرية التى تحتوى على DNA المطلوب وبالتالي نحصل على أعداد كبيرة من المستعمرات البكتيرية التى تحتوى على DNA المطلوب. يمكن التعرف على هذه المستعمرات بإستعمال m RNA مشع خاص بتخليق الهيموجلوبين. وفيما يلى شرح لذلك. يتم قطع البلازميد بواسطة أنزيم القطع restriction endonuclease فى مكان واحد ولذلك يصبح خيطى شريطى بدلا من أن يكون دائرى. يمكن تحويل البلازميد الشريطى إلى بلازميد شريطى له ذبول طويلة حيث أن كل خيط له ذيل طويل وذلك فى وجود إنزيم لامدا exonuclease. يمكن أيضا تحويل DNA الخاص بالهيموجلوبين بحيث أن

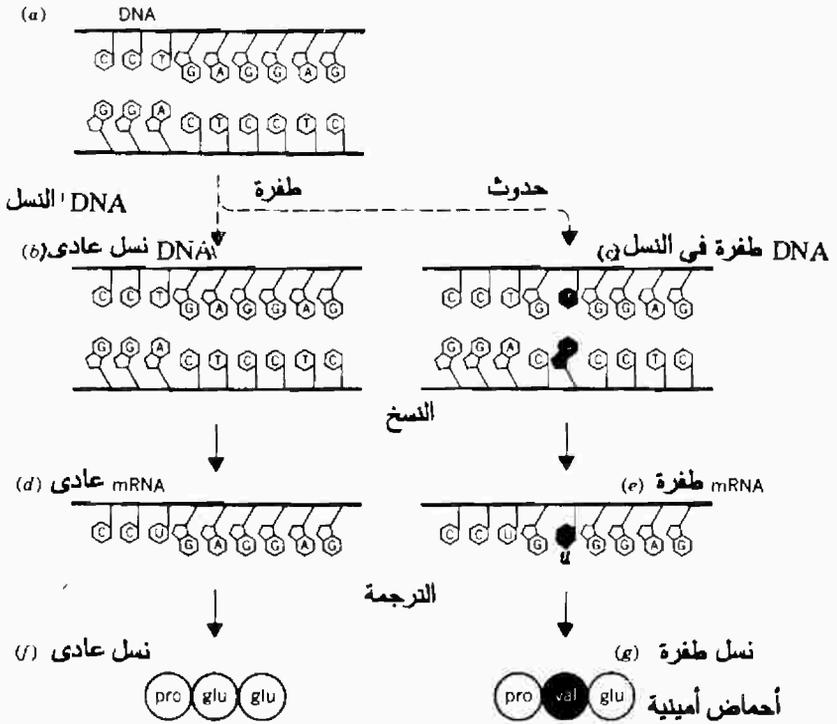
يكون كل خيط له ذيل طويل وذلك بنفس الأنزيم السابق. يستخدم إنزيم لربط مائة نيوكليوتيد بها قاعدة نيتروجينية واحدة هي الثيمين في نهاية أى في ذيل DNA الهيموجلوبين وأيضا يستخدم نفس الأنزيم لربط مائة نيوكليوتيد بها قاعدة نيتروجينية واحدة هي الأدينين وذلك في نهاية خيوط البلازميد. يسمى هذا الأنزيم باسم إنزيم النقل الطرفي terminal transferase . يتم خلط DNA الهيموجلوبين مع DNA البلازميد فيحدث تقابل وتوافق بين الأدينين والثيمين ويكمل كل منهما الآخر وذلك بالارتباط بروابط إيدروجينية وينتج عن ذلك تكوين بلازميد حلقي به جزء من DNA خاص بالهيموجلوبين ويسمى هذا البلازميد recombinant DNA (شكل ١٢٩). توضع هذه البلازميدات في مزارع بكتيرية *E. coli*. بعض هذه البلازميدات يمكن أن تخترق الخلايا البكتيرية وتسكن بداخلها. يوجد في البلازميد المستعمل جين خاص بمقاومة مضاد حيوى معين ولذلك فإن وضع الخلايا البكتيرية على بيئة آجار مناسبة بها مضاد حيوى معين فإن الخلايا البكتيرية الغير محتوية على البلازميد لن تتكاثر أما البكتريا التى تحتوى على البلازميد فإنها تتكاثر وتكون مستعمرات بكتيرية. وبذلك نحصل على كميات كبيرة من الخلايا البكتيرية بها البلازميد الناقل لـ DNA الهيموجلوبين. تختبر هذه المستعمرات البكتيرية لوجود DNA الهيموجلوبين بواسطة طريقة أنتهجين بين DNA والتي سبق شرحها في الجزء الخاص بالبلازميد يمكن أن نجد أن ٨٠% من المستعمرات البكتيرية تحتوى على DNA الهيموجلوبين. تصبح هذه المستعمرات أيضا مصدر رئيسى للحصول على فاجات بها DNA الهيموجلوبين. يستعمل البلازميد الحامل لـ DNA الهيموجلوبين والذي يسمى DNA recombinant وأيضا يسمى c DNA plasmids وبه درجة من الأشعاع وذلك بإستعمال إنزيم خاص قادر على إضافة فوسفور مشع في نهاية DNA . يستعمل ذلك في إختبار سبعمائة وخمسون ألف ٧٥٠,٠٠٠ plaques لإكتشاف plaques محتوية على DNA الهيموجلوبين. في أثناء الأختبار يجرى عملية تهجين بين DNA وتستعمل طريقة سبق شرحها في البلازميد. يمكن أن نتعرف على وجود plaques بها DNA الهيموجلوبين. يمكن التعرف على نتابع وترتيب النيوكليوتيدات في DNA أى في جينات الهيموجلوبين .



(شكل ١٢٩) : لصق أو الالتحام DNA الهيموجلوبين في بلازميد حلقى. تحويل البلازميد الحلقى إلى شريطي بواسطة إنزيم R. E. تكون ذيل وحيد الشريط single stranded tail في حالة البلازميد وحالة الهيموجلوبين بأستعمال أنزيم lambda exonuclease . إضافة نيكليوتيدات إضافية في حالة البلازميد تتكون من عديد من الأدينين وفي حالة الهيموجلوبين تتكون من عديد من الثيمين مكونة في كلتا الحالتين ذيل طويل. يتم الالتحام A مع T ويتكون recombinant DNA .

الطفرات Mutations

تعتبر الطفرات عبارة عن أخطاء تحدث في تركيب DNA أثناء التضاعف وتنتقل إلى الأجيال التالية أي أنها تورث عند وجود تغيير في زوج واحد من النيوكليوتيدات الداخلة في تركيب الجين ومثال ذلك أن يتغير AT إلى TA. ولذلك فإن RNA polymerase إنزيم البلمرة يقوم بعمل عمليه النسخ دون أي اكتشاف للخطأ ولذلك فإن يتكون mRNA به يوراسيل بدلا من أدنين. أي أن mRNA العادى يوجد به فى مكان الطفرة الأدينين ولكن mRNA الطفرة يوجد فى نفس المكان يوراسيل بدلا من الأدينين. ونتيجة لذلك يتغير الكودون على mRNA الطفرة ويصبح GUG بدلا من GAG. نتيجة لذلك يتكون الحامض الأمينى فالين بدلا من الحامض الأمينى جلوتاميك وبذلك يتغير تركيب البروتين نتيجة لحدوث الطفرة. وقد وجدت هذه الحالة فى الأشخاص التى تعاني من الأنيميا Sickle - cell anemia حيث أن الشخص العادى يكون الجلوتاميك بينما الذى يعاني من الأنيميا فإن يكون فالين بدلا من الجلوتاميك. وفى بعض الحالات يتغير T إلى C فى DNA وينتج عن ذلك الحامض الأمينى بروتين بدلا من سيرين وحيث أن ذلك لا يؤثر على ترتيب الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها فتسمى طفره مفتقدة الحاسه missense mutation. وفى بعض الحالات قد يكون التغيير فى تركيب البروتين جوهري. نتج لحدوث الطفرة ويتحول البروتين الذى يؤدي وظيفة هامة إلى بروتين خامل وفى بعض الحالات ينتج عن ذلك موت الكائن الحى وتسمى هذه بالطفرة المميتة lethal mutation يمكن أن تحدث الطفرة فيتغير تركيب الكودون ويتحول إلى كودون التوقف stop (وتسمى كودونات التوقف أيضا بـ nonsense codon) ولذلك ميكانيكيه تخليق البروتين تتوقف مبكرا ولا يصبح البروتين كامل. وإذا حدثت الطفرة فى بدايه الجين فإن جزء بسيط جدا من البروتين سيتكون ويكون له تأثير ضار بالكائن الحى (شكل ١٣٠ - ١٣٣). يمكن أن تحدث أنواع أخرى من الطفرات وذلك بأن يفقد أو يضاف حرف أى قاعده نيروجينية أى نيوكليوتيد. ولذلك فإن mRNA يفقد أو يزيد هذا الحرف وينتج عن ذلك تغيير فى شفرة الكودونات وتنتج أحماض أمينية فى ترتيب مختلف فى البروتين ويختلف عن البروتين الأصيل. تسمى هذه الحالة بطفرة تغيير الإطار frameshift mutation أحيانا يحدث هذا النوع من الطفرات ولكن يزيد أو يفقد أكثر من حرف وقد يكون إثنين أو أربعة أو خمسة



(شكل ١٣١): حدوث طفرة في DNA ويصبح T بدلا من A . ولذلك يتكون في mRNA يوراسيل بدلا من الأدينين في حالة الطفرة. ولكن في النسل العادي يتكون الأدينين. ولذلك يختلف نوع البروتين في النسل العادي عنه في الطفرة إذ يتكون في الطفرة الحامض الأميني فالين بدلا من جلوتاميك. في النسل العادي الكودون G - A - G يعطى حامض الجلوتاميك وفي الطفرة يكون الكودون G - U - G يعطى الحامض الأميني فالين.

جزئى عادى

AUGULLAACGGGGLAACCAUGAGGAG

(a)

إضافة insertion

إضافة

AUGULLAACGGGGLAACCAUGAGGAG

(b)

نقص deletion

نقص

AUGULLAACGGGGLAACALGAGGAG

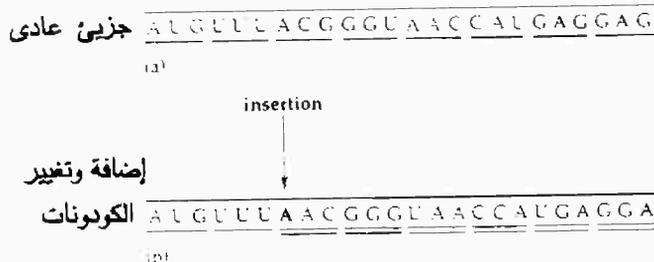
(c)

(شكل ١٣٢) : طفره تغيير الأطار نتيجة إضافة جزئى أدلين ثم نقص جزئى سيتوسين. يكون نتيجة

ذلك حدوث تغيير فى تركيب ثلاث كودونات أسفلهم خطين. ثم يصبح تتابع الكودونات عادى.

الكودونات الموجود أسفلها خط واحد عادى الكودونات الموجود أسفلها خطين تكون مختلفة نتيجة لحدوث

طفره تغيير الأطار frameshift .



(شكل 132) : طفره تغيير الأطار نتيجه إضافة insertion جزئى أدنين. a جزئى عادى، b جزئى به

إضافة أدنين ونتيجه لذلك تغيرت الكودونات. إبتداء من الكودونات التى أسفلها خطين.

أو جزء كبير نسبيا من DNA. وفى حالة إزاله أو إضافه ثلاثه أو سته أو مضاعفتها فإن الطفره تسبب إزاله أو أضافه حامض أميلى أو أكثر ولا تعتبر طفره تغيير الإطار لأنها لا تسبب تغيير شفره الكودونات. لحسن الحظ لا تحدث الطفرات تلقائيا إلا نادرا ولا بد من وجود عامل خارجى مؤثر قد يكون الأشعاع أو المركبات الكيماويه. ويسمى هذا المؤثر الذى يسبب حدوث الطفرات بإسم المطفّر mutagen والجمع المطفّرات mutagens. فى حالة نقص قاعده نيروجينييه أو أكثر تسمى طفره نقص فى القواعد deletion mutation وفى هذه الحالة قد تكون بين نوع طفره تغيير الأطار إذا كان النقص واحد أو أثنين أو أربعة أو خمسة ولكن قد يكون النقص فى ثلاثة أو ستة أو تسعة قواعد ولكن لا يسبب تغيير الأطار frame unchanged .

أهمية الهندسة الوراثيه فى أمراض النبات

تستخدم الهندسة الوراثيه الآن فى كثير من مجالات الزراعة وخاصة أمراض النبات ومما هو جدير بالذكر أن بعض مسببات أمراض النبات يكون لها دور أساسى وحيوى لدى خبير وممارس الهندسة الوراثيه حيث تعتبر بعض مسببات أمراض النبات هى أداه رئيسيه للهندسه الوراثيه فى النبات ومن هذه المسببات البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببه لمرض التدرن التاجى فى كثير من النباتات مثل العنب والتفاح وعباد الشمس وأيضنا فيروس تبرقش

القنبيط cauliflower mosaic virus وأيضا بعض الكائنات الحيه الدقيقة الأخرى والتي لا تسبب أمراض للنبات مثل البكتريا *E. coli* أى *Escherichia coli* والخميره .

البيولوجية الجزيئية للنبات : Plant molecular biology

تحتوى الخلايا النباتيه على DNA ثنائى الشريط أو الخيط double - stranded DNA (ds DNA) فى ثلاثه أماكن رئيسيه بالخليه وهى النواه والميتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء. كل مجموعه من هذه ds DNA تكون جينوم genome. يتكون الجينوم النووى من عديد من الكروموسومات وهو أكبر جينوم موجود فى الخليه أى أنه أكبر من جينوم الميتوكوندريا وأيضا جينوم البلاستيدات الخضراء حيث يتراوح فى حجمه من $110 \times 0,2$ إلى أكثر من 110×40 زوج من القواعد النوويه أى النيروجينية. يكون الاختلاف فى الحجم تبعاً لنوع النبات. وفى حالة جينوم الميتوكوندريا فإنه يتكون من DNA حلقى عاده ولكن أحيانا يكون شريطى أى خيطى linear ويحتوى الجينوم على أكثر من جزيئ وقد يحتوى بالإضافة إلى ذلك على جزيئات DNA صغيره الحجم تشبه جزيئات البلازميد plasmidlike وعامه يتراوح حجم الجينوم فى الميتوكوندريا من $110 \times 0,2$ إلى $110 \times 2,5$ زوج من القواعد النوويه. وفى حاله جينوم البلاستيدات الخضراء يتكون من جزئى DNA حلقى وعامه يتراوح حجمه بين $110 \times 0,12$ إلى $110 \times 0,19$ زوج من القواعد النوويه. تحتوى كل بلاستيده خضراء على عدد يتراوح بين 30 إلى مائتين نسخه من الجينوم copies of its genome . يحدث تكرار لك DNA الخاص بالجينوم وقد يكون التكرار فى جزء من DNA أو جميع DNA الجينوم. وينتقل الجزء المتكرر إلى الخليه الناتجه من الأنقسام أو يبقى فى نفس الخليه. يتم نسخ DNA الجينوم إلى RNA ومنه الريبوسومى والرسول والناقل. كل جزء من الـ DNA يمكن نسخه ليقوم بوظيفه معينه يسمى جين. يعتبر mRNA هو الوحيد الذى يترجم لبناء البروتين. تتابع الشفرات الوراثيه لكثير من mRNA يتأثر نتيجته لتداخل الأنترونات introns أثناء تخليقه ولكن تزال الأنترونات قبل أن يصبح mRNA صالح للنسخ لتخليق البروتين. ولذلك فإن RNA فى الخليه يصنع ويعدل processed تركيبه بواسطه الخليه قبل أن يصبح ناضج mature أى قابل لنسخ البروتين.

يجب معرفه أن DNA و mRNA والريبوسومات الخاصه بالنواه أى النوويه تعتبر لها

صفات ومميزات الكائنات حقيقية النواه تماما. وأما هذه الأجزاء في الميتوكوندريا تكون لها جزئيا صفات ومميزات الكائنات حقيقية النواه وجزئيا صفات ومميزات الكائنات بدائيه النواه أى أنها وسطية في صفاتها ومميزاتا بين الكائنات حقيقيه النواه والكائنات بدائيه النواه . تكون هذه الأجزاء في البلاستيدات الخضراء لها صفات ومميزات الكائنات بدائيه النواه أساسيا حيث أن لها mRNA يماثل mRNA البكتيرى حيث أنه ينقصه تتابع جزئيات الأدينين العديده الطرفيه terminal polyadenylated وينقصه وجود الأنترونات وأيضا فإن عمله النسخ أو التعبير expression يمكن تثبيطها بواسطة المضادات الحيويه التى تسبب تثبيط mRNA البكتيرى. ومما هو جدير بالذكر أن الريبوسومات في البلاستيدات الخضراء تكون أصغر في حجمها من ريبوسومات السيتوبلازم وتماثل في حجمها ريبوسومات البكتريا بينما حجم ريبوسومات الميتوكوندريا يكون وسطى بين النوعين السابقين ولكن أقرب في حجمه من ريبوسومات السيتوبلازم. علاوه على ذلك فإن الميتوكوندريا تستعمل شفره وراثيه مختلفه قليلا عن الشفره الوراثيه العامه universal genetic code حيث أن شفرتين أى اثنين من ثلاثيات النيوكليوتيدات two nucleotide triplets تختلفان في تكوين حامضين أمينيين مختلفين في الميتوكوندريا عنه في أجزاء الخليه الأخرى وحيث يوجد فيها النظام العام للشفره الوراثيه .

يعرف الجين بأنه أنجز تعبيره expressed عندما يتم نسخه transcribed لتكوين mRNA .
 يترجم mRNA translated ليكون البروتين والأخير ينتقل إلى المكان المناسب في الخليه وحيث يقوم بالوظيفه المخصصه له بالخليه . توقيت وفترة وسرعه تعبير expression الجين يتحكم فيها عوامل داخلية وخارجيه . ومن هذه العوامل وجود الجينات المنظمه regulatory genes الأخرى وأيضا مناطق المحفز promoter regions الموجوده في مقدمه الجين وأيضا علامات أو أشارات البدايه والنهائيه initiation and termination signals على DNA و mRNA ومنظمات النمو الموجوده في مراحل معينه من تكوين الخلايا والنبات والعوامل البيئيه المختلفه مثل الضوء والتغذيه الخ.

البيولوجيه الجزيئيه لمسببات أمراض النبات:

يتشابه التركيب أو النظام الوراثى في مسببات أمراض النبات سواء حقيقيه النواه مثل

الفطريات والنباتات والحيوانات الأولية السوطيه أو بدائيه النواه مثل البكتريا والميكوبلازما والسبيروبلازما والطحالب الخضراء المزرقه وأيضا المجموعه الثالثه وهى الفيروسات ولكنها تختلف أيضا فى بعض من النظام الوراثى genetic system أى أنها تتشابه فى بعض صفات النظام الوراثى كما أنها تختلف فى بعض الصفات الأخرى . حيث أن الأنظمه الوراثيه للطفيليات حقيقيه النواه مثل الفطريات والنباتات الزهرية المتطفله تماثل الأنظمه الوراثيه فى النبات وأيضا الأنظمه الوراثيه فى النيماتود والحيوانات الأوليه السوطيه تماثل الأنظمه الوراثيه فى الحيوان وأيضا الأنظمه الوراثيه فى البكتريا المسببه لأمراض النبات والميكوبلازما تماثل الأنظمه الوراثيه فى البكتريا ولكن الأنظمه الوراثيه فى الفيروس تختلف عن الأنظمه الوراثيه فى الكائنات حقيقيه النواه والكائنات بدائيه النواه حيث أنها تعتمد تماما على العلاقه بين ماده النويه للفيروس RNA أو DNA مع جينومات خليه النبات العائل .

وقد حازت الوراثة الجزيئيه لكثير من مسببات أمراض النبات إهتمام كبير حديثا حيث بدأ الأهتمام بها فى أواخر السبعينيات ويزداد الأهتمام بها عاما بعد عام لأنه وجد أن بعض هذه الطفيليات النباتيه مثل بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وفيروس موازيك القنبيط تستعمل vehicles لماده وراثيه غريبه يمكن إدخالها فى جينوم النبات العائل حيث يمكن أن تكون هذه ماده الوراثيه لكائن آخر ولذلك سميت غريبه foreign . وبذلك يمكن لهذه ماده الوراثيه أن تغير وتحور فى تركيب النبات العائل . ومن الأهمية بمكان أيضا أنه أمكن إثبات إمكانية تغيير وتعديل التركيب الوراثى فى الطفيليات المسببه لأمراض للنبات وأيضا تحوير التركيب الوراثى للكائنات الحيه الدقيقه والمضاده لها حيويا وحيث يكون لذلك أهميه كبيره فى المقاومه الحيويه للطفيل ولأمراض النبات .

عزل الجين وإدخاله فى كائن حى آخر دقيق لعمل أعداد كبيره منه Gene Cloning . يعرف gene cloning بأنه عزل جين أو عدد من الجينات المتقاربه التى لها دور معين gene sequence ثم إدخاله فى خليه بكتريا أو خميره حيث يمكن إكثارها بسرعه وبذلك يمكن عمل أعداد هائله من هذا الجين . يمكن أيضا إنتاج أعداد كبيره من mRNA الخاص بهذا الجين وبذلك يمكن دراسته تركيب الجين والتعرف عليه وأيضا يمكن معرفه التتابع فى الجين والذى ينظم تعبير الجين expression حيث يمكن بذلك إعادة تركيب أو تخليق الجين resynthesize أو تحويره modify . وأيضا يمكن إضافه الجين إلى كائن حى آخر لأظهار تأثير هذا الجين فى

الكائن الحى الجديد. تعتبر الطرق المستعملة فى gene cloning غير بسيطه وأنها الأساس فى الهندسه الوراثيه. وفيما يلى ذكر ذلك بإختصار:-

أ - تكوين DNA تكمبلى من RNA رسول Cloning Complimentary DNA from mRNA

يتم إستخلاص mRNA من الخلايا حيث تكون الخليه فى مرحله يكون فيها الجين فعال ومثال ذلك أن الجين ينتج إنزيم أوسم أو أن جين النبات العائل ينتج فيتوألوكسين. يعرض mRNA لأنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase حيث يقوم بتخليق DNA وحيد الخيط أو الشريط single stranded DNA ويكون مكمل complementary mRNA ويرمز له بالرمز cDNA. ثم يتم تعريض cDNA إلى أنزيم آخر وهو DNA polymerase حيث يكون cDNA ثنائى الخيط double stranded cDNA. وهذا الأخير يتم إدخاله فى بلازميد خليه بكتيريه. يحمل البلازميد المستعمل جينات لمقاومه إثنين من المضادات الحيويه وهى أمبسللين ampicillin وتتراسيكلين tetracycline. ثم يتم إدخال cDNA داخل الجين المقاوم للأمبسللين أى ينخلل أو يتوسط النيوكليوتيدات المكونه للجين وبذلك يفشل الجين المقاوم للأمبسللين فى أظهار تأثيره وتصبح الخليه المحتويه على هذا البلازميد غير مقاومه للأمبسللين وتموت من تأثيره. ولذلك فإنه يتم إدخال هذا البلازميد فى خلايا بكتريا *E. coli* وتصبح الخليه محتويه على هذا البلازميد أى transformed ليست من الضرورى أن تكون كل الخلايا البكتيريه محتويه على البلازميد فبعضها يحتوى هذا البلازميد والبعض الآخر لا يحتوى على هذا البلازميد الذى يحتوى المقاومه للتتراسيكلين. وعند وضع البكتريا *E. coli* على بيئه آجار مغذى تحتوى على التتراسيكلين فإن البكتريا المحتويه على البلازميد المحتوى على جين المقاومه للتتراسيكلين هى التى تعيش فقط. تأخذ هذه البكتريا وتكاثر على بيئه آجار مغذى أو بيئه سائله مثل بيئه المرق المغذى وينتج عن ذلك ملايين من الخلايا البكتريه التى تحتوى على البلازميد المحتوى على cDNA وأيضا جين المقاومه للتتراسيكلين. وللتعرف على المستعمره المحتويه على الجين المختبر المطلوب يحتاج ذلك إلى أختبارات أخرى سيرولوجيه أو أنزيمييه serological or immunological techniques لبروتين خاص coded بالجين ويمكن إستخدام طريقه أخرى وهى طريقه المجس المشع radioactive probe. وعند

الحصول على المستعمره البكتيرية المحتويه على الجين فإنه يتم إكثار هذه البكتريا للحصول على كميته كافيته من DNA الجين أو حتى البروتين الذي ينتجه هذا الجين. تستعمل هذه المستعمرات البكتيرية لدراسات تاليه منها عزل الجين وكيفية التعامل معه ونقله.

ب - عزل ونقل وأدخال جينات من الجينوم إلى كائن حي دقيق: Cloning genes from genome DNA

يخلو mRNA المكتمل أو الناضج من الأنترونات وأيضا يخلو من تتابع النيكليوتيدات المحيط بـ DNA الجين في الجينوم ولذلك من الضروري عمل genomic clones أي عمل clones للأجزاء المختلفه من الجينوم. تنفيذ genomic clones في دراسته تركيب وتوزيع وترتيب الجينات في الجينوم وأيضا تتابع النيكليوتيدات الملاصقه للجين أي المحيط به. يتم عمل genomic clones وذلك بعزل جينومات النواه والبلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا كل على حده وتنقيتها . يهضم DNA جزئيا أي يتم تجزيته بواسطه أنزيمات التجزئة أو القمع restriction enzyme لتعطى أجزاء صغيره من DNA كل جزء يتكون من حوالي عشرون ألف زوج من القواعد النوويه. تخلط الأجزاء الصغيره من DNA مع بلازميدات البكتريا وعاده تخلط مع جينوم محور modified genome للفاج لا مدا lambda phage . تؤخذ أجزاء DNA وتدخل في تركيب DNA البلازميد أو الفاج. ثم يتم إستعمال هذه البلازميدات أو الفاج في إدخال DNA في خلايا البكتريا *E.coli* ثم يتم إكثار هذه البكتريا على بيئات مناسبة وبذلك نحصل على كميات هائله من الماده الوراثيه DNA المطلوبه والموجوده في داخل بلايين من خلايا البكتريا *E.coli* . يتم تحديد الجينات المطلوبه بالطرق السابق شرحها في الجزء السابق. يتم عمل cDNA cloning قبل عمل genome cloning عاده حيث أنه يتم عمل مجسات متخصصه specific probes لعديد من الجينات المطلوب دراستها. وتستعمل هذه المجسات في التعرف على الجينات المطلوبه ويتم عزلها أثناء خطوات genomic cloning .

ج - تعبير الجينات المعزوله المنقوله: Expression of cloned genes

يكون لعمليات التعرف detection وعزل isolation ونقل cloning الجينات دور كبير في إمداد مهندس الوراثه بالمعلومات المفيده وتنفيذ أيضا في إنجاز الهدف المنشود من الهندسه

الوراثية وهو إمكانية التعبير السليم والمنشود للجين المنقول gene cloning في كائن حي جديد وفي بيئة مختلفة. حيث أنه دائما يكون الجين المنقول ذو فائدة كبيرة بل وعظيمة للكائن الحي المنقول إليه. ومما هو جدير بالذكر في هذا الصدد أنه لا يكفى نقل الجين المطلوب إلى كائن حي جديد بل وأن يكون هذا الجين فعال active أى نشط والفاعليه والنشاط في هذه الحالة معناها أن يكون الجين قادر على إظهار تأثيره أى التعبير عن وجوده expression وذلك بإظهار وإنجاز التفاعل أو التفاعلات الكيموحيوية في الكائن الحي الجديد والتي عادة يكون لها فائدة عظيمة للكائن الحي المنقول إليه. تعبير الجينات المنقولة من النبات (كائن حي حقيقى النواه) إلى البكتريا (كائن بدائى النواه) يكون غير ممكن في بعض الأحوال وذلك لأختلاف محفزات الجينات different promoter genes وأيضا لعدم قدره جينومات البكتريا على إزالة الإنترونات من mRNA أثناء تكويته أو نضجه وأيضا قد يكون لعدم قدرة البكتريا على تحويل البروتين الإبتدائى إلى بروتين ناضج قادر على أداء وظيفته functional proteins. ولكن بالرغم من ذلك فإن كثير من جينات النواه والبلاستيدات الخضراء والميتوكوندريا قد عزلت ونقلت cloned إلى البكتريا وقد كانت قادره على التعبير عن وجودها expression وذلك بإستعمال DNA تكميلي cDNA تم تركيبه والحصول عليه من هذه الجينات. تم حديثا أكتشاف طرق وفيها يستخدم vectors لبلازميدات أو فيروسات والتي يمكن عن طريقها أن تعبر جينات النبات عن وظائفها وهى فى داخل الخلايا البكتيرية. يمكن أيضا عزل ونقل cloning بعض جينات من النباتات الزهرية والفطريات (كائنات حقيقيه النواه) إلى كائنات حيه دقيقة حقيقيه النواه مثل الخميره وقد تم ذلك حديثا نسبيا ويمكن أن يكون لذلك أهميه عظمى فى المستقبل حيث أن خلايا الخميره بعكس خلايا البكتريا قادره على تحويل البروتين الإبتدائى إلى بروتين كامل ناضج وظيفى أى قادر على أداء وظيفته بكفاءه عاليه functional mature protein. وحديثا جدا أمكن نقل جينات نبات cloned genes إلى نباتات أخرى تختلف فى النوع أو الجنس وبذلك يمكن أن يفتح ذلك مجال عظيم فى الهندسه الوراثيه وذلك بإستعمال جينات مدروسه وقادره على تخليق أنواع مختلفه من البروتينات وذات وظائف مختلفه وحيث أن أحد هذه الوظائف هى قدرتها على مقاومه أمراض النبات فإنه بذلك يكون للهندسة الوراثيه دور هام فى أمراض النبات. حيث أن الهدف المنشود لعلماء أمراض النبات هو

الحصول على أصناف مقاومة من النباتات المختلفة. حيث أن الأصناف المقاومة لا تحتاج إلى مقاومه كيميائية أو خلافة من طرق المقاومة الأخرى. ومما هو جدير بالذكر أن المقاومة الكيميائية الآن أصبحت مرفوضة حيث أن المبيدات المستعملة تلوث البيئة وضررها بليغ على الإنسان والحيوان وذلك بالإضافة إلى ارتفاع أسعارها وأنها تحتاج إلى مجهود كبير لعمل رش دورى لضمان فاعلية عملية المقاومة.

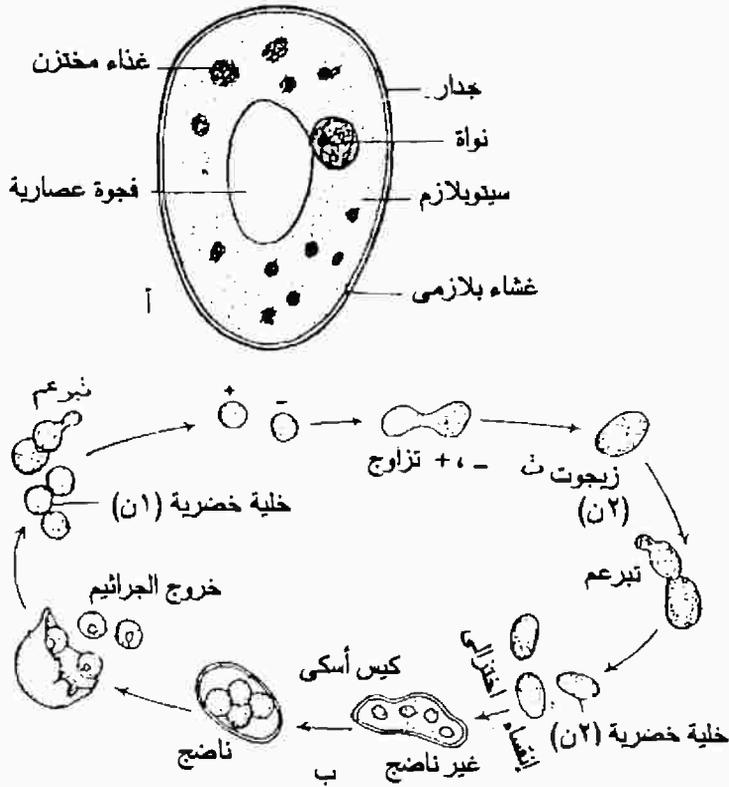
نبذة عن فطر الخميرة:

هي فطريات أسكية تتكون من خلية واحدة كروية أو بيضاوية أو مستطيلة أو مضلعة، شفافة أو ملونة، ولها جدار خلوي واضح به نسبة من الكيتين ويبطنه غشاء بلازمي، وبها فجوة عصارية واضحة. النواة واضحة مميزة، ويحتوى السيتوبلازم على ميتوكوندريات وبه غذاء مخزن فى صورة جليكوجين وحببيبات زيت (شكل ١٣٤).

التكاثر اللاجنسى يحدث بطريقتين، الانقسام المباشر والتبرعم. فى الانقسام المباشر، تستطيل الخلية الام وتنقسم نواتها إلى قسمين ثم يتكون جدار فاصل يفصل النواتين وتتكون خليتان. فى التبرعم يظهر نتوء بالخلية الأم، وتنقسم نواة الخلية الام إلى نواتين، تنتقل نواة منهما إلى النتوء الذى يفصل من الام بالانقباض أو بتكوين جدار. تكبر الخلية الجديدة فى الحجم قبل أن تنفصل من الخلية الام، وقد تبقى متصلة وتبرعم هى بالتالى قبل تمام نموها. ويكون نتيجة ذلك ظهور خلايا الخميرة متصلة بشكل سلاسل وذلك كما فى خميرة البيرة *Saccharomyces cerevisiae*.

التكاثر الجنسى يختلف باختلاف الاجناس فى خميرة البيرة، حيث تتضح فى دورة الحياة ظاهرة تبادل الاجيال. فيحدث بتزاوج خليتين خضرتين متوافقتين (+ و -) أحاديئا الأساس الكروموسومى. وذلك بأن تتقارب الخليتان ويمتد من كل منهما فى اتجاه الآخر نتوء صغير يعرف بأنبوبية التزاوج copulation tube، يتلاصقان من طرفيهما ويذوب الجدار الفاصل بينهما ثم يحدث اتحاد البروتوبلاستين وتنتج عن ذلك خلية ثنائية الأساس الكروموسومى هى الزيغوت، وهذه تتكاثر بالتبرعم مكونة خلايا خضرية ثنائية الأساس الكروموسومى. بعد فترة من التكاثر الخضرى تدخل الخلايا دور سكون ثم تنقسم نواة كل منها انقسامًا اختزاليا

متحولة بذلك إلى اكياس أسكية تحتوى كل منها على أربعة جراثيم أسكية. يتمزق الكيس الاسكى وتتحرر الجراثيم الأسكية، وتتكاثر بالتبرعم مكونة خلايا خضرية أحادية الاساس الكروموسومى تعيد دورة الحياة (شكل ١٣٤).



(شكل ١٣٤) : فطر الخميره

أ. تركيب الخليه

ب. دوره الحياه

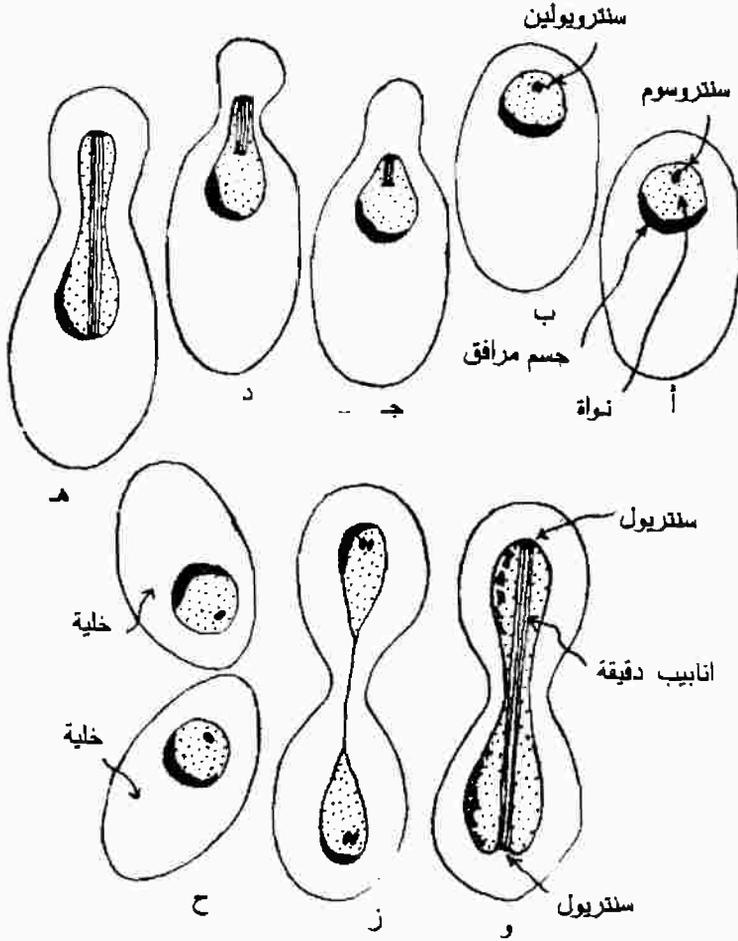
الإنقسام المباشر amitosis يعرف أيضاً، بالإنقسام البسيط، ويحدث عادة في بعض النباتات الدنيئة وحيدة الخلية كالبكتريا والخمائر. وفي فطر الخميرة تتكون نواة الخلية من جزئين أحدهما كروى موجب لصبغة فولجين feulgen والآخر هلالى الشكل سالب لصبغة فولجين ويسمى بالجسم المرافق companion body. ويوجد بداخل النواة أو ملاصقا لغلافها جسم مركزى centrosome. فى أثناء الإنقسام يستطيل الجزء الكروى ثم يضيق من الوسط ثم ينفصل إلى جزئين متساويين يكونا النواتين الجديدتين. وفى هذه الأثناء فان الجسم المرافق يستطيل ويستدق ويتجزء إلى أجزاء صغيرة حبيبية الشكل تتوزع بالتساوى تقريبا بين النواتين الجديدتين. كما أن السنتروسوم ينقسم أثناء الانقسام إلى سنتروليون centrioles ويتجه كل سنتروليون إلى أحد طرفى النواة ويتحد بغلاف النواة ويصل بين السنتروليون أنابيب سيتوبلازمية دقيقة microtubules تشابه خيوط المغزل (شكل ١٣٥). يلاحظ أنه لا تتميز كروموسومات واضحه أثناء هذا الأنقسام وبالرغم أن الخميره لها كروموسومات محده ومعروفه بل وأمكن تخليق كروموسوم الخميره وذلك بواسطة الهندسة الوراثيه.

نېذه عن البكتريا *Agrobacterium tumefaciens*

تسبب هذه البكتريا مرض هام فى النبات وهو التدرن التاجى crown gall ينتشر هذا المرض فى جميع أنحاء العالم. تصيب البكتريا عوائل خشبيه وعشبيه كثيره تشمل مائه وأربعون جنس تتبع ستون عائله. توجد على وجه الخصوص على التفاح والفاكهه ذات النواه الحجرية والعنب.

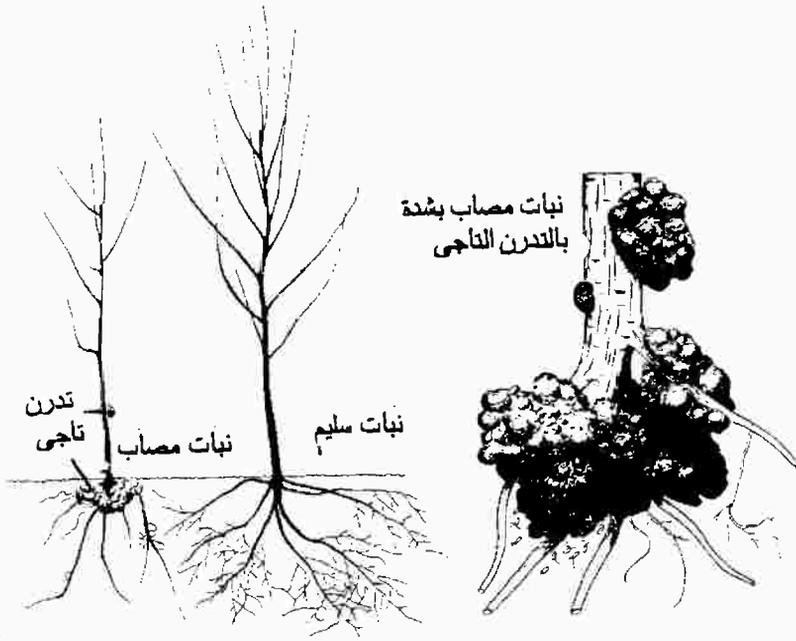
يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفه وتتكون عاده تحت سطح التربه مباشرة وهى الجزء من ساق النبات الذى يعرف بالتاج crown ومنه أشتق أسم المرض. يمكن أن تظهر أعراض المرض على الجذور الرئيسيه. يقل محصول النبات المصاب وقد يموت. يشابه المرض سرطان الإنسان والحيوان ولذلك فإن كفييه حدوته تمت دراستها بالتفصيل ولكن أيضا توجد إختلافات جوهريه فى الحائتين (شكل ١٣٦).

حديثا ونتيجة للدراسات المكثفه على هذه البكتريا وهذا المرض. فقد أمكن إثبات أن البكتريا تغير فى تركيب أى محور الماده الوراثيه لخلايا النبات العائل حيث أنه يوجد جزء من بلازميد هذه البكتريا ويعرف هذا البلازميد بإسم Ti Plasmid DNA ويعرف هذا الجزء بإسم



(شكل ١٣٥): الانقسام المباشر. خطوات الانقسام المباشر في الخميرة.

T-DNA ويمكن لهذا الجزء أن ينتقل ويلتحم في DNA الخلية ويصبح جزء من المادة الوراثية للخلية ويمكن أن يعبر *express* عن وظيفته أو وظائفه بكفاءة عالية في خلية النبات. ولذلك فإن من الممكن إستخلاص البلازميد Ti وإدخال جينات جديدة إليه من نبات الفاصوليا يتم إلتحام هذه الجينات أى أجزاء من DNA الفاصوليا مع البلازميد ثم يتم إدخال البلازميد في خلايا البكتريا *A. tumefaciens* ثم يتم عمل تلقيح بهذه البكتريا في نبات آخر مثل عباد الشمس



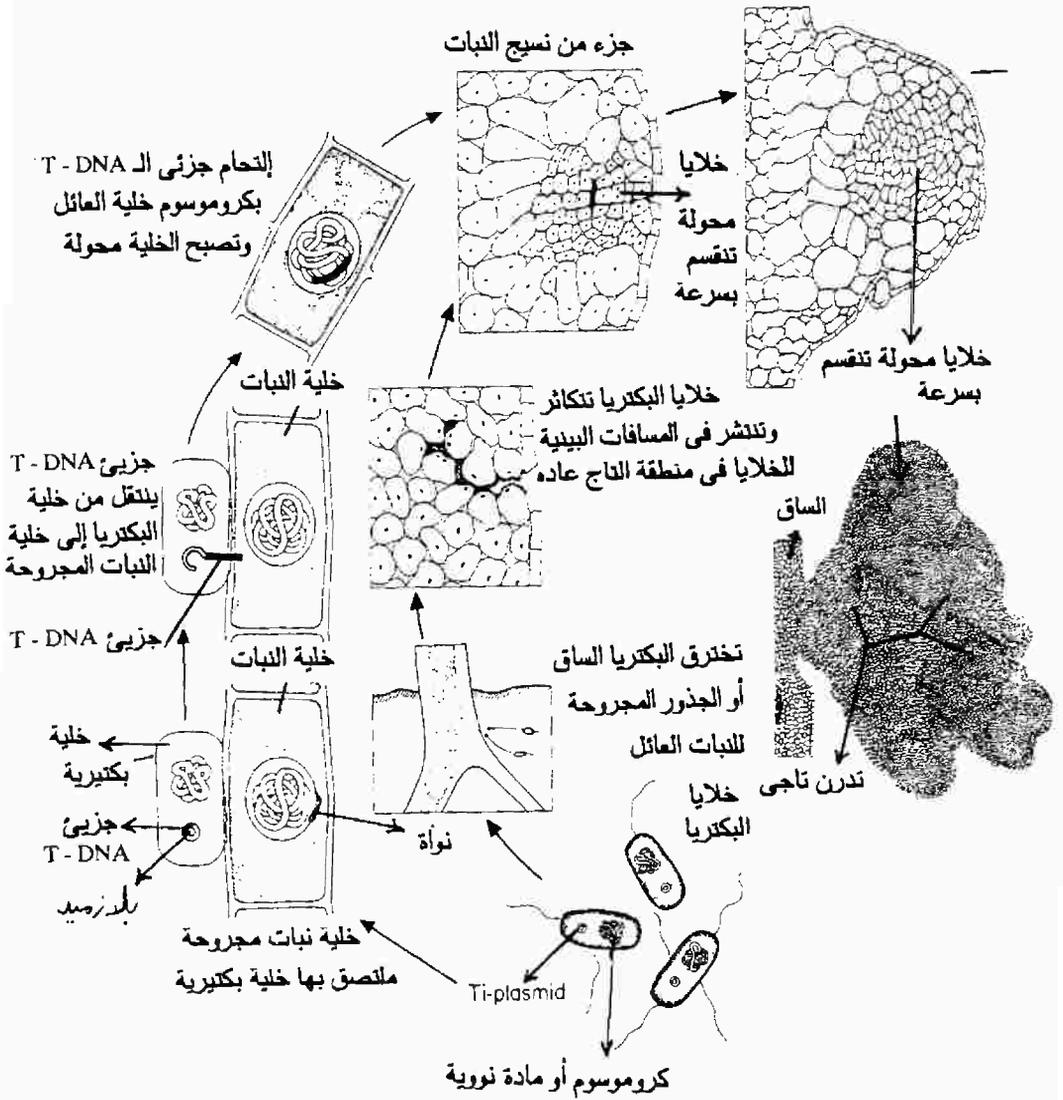
(شكل ١٣٦) : أعراض مرض التدرن التاجي .

وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من المادة الوراثية لنبات عباد الشمس. تستعمل هذه الطريقة بكثرة في نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتريا ويعتبر DNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA. حديثا يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عادية أو مهندسة وراثيا وذلك في عدم وجود البكتريا. يمكن الآن إزاله أجزاء من البلازميد Ti المسؤول عن تكوين الأورام في النبات ونقل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعالة وقادره على إظهار تأثيرها ولذلك فإنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتريا تكون غير قادره على إنتاج أورام في النبات. تعتبر هذه البكتريا مهندس وراثه طبيعى natural genetic engineer قادر على تحوير المادة الوراثية للنبات العائل وذلك بإدخال

جزء من المادة الوراثية لهذه البكتريا إلى كروموسومات النبات العائل. والآن تستخدم هذه البكتريا على نطاق واسع لنقل جميع أنواع الجينات بين نباتات مختلفة متقاربه ومتباعده وراثيا related and unrelated plants وأيضا بين كائنات حيه متباعده بين الحشرات أو الفيروسات والنبات أى أنه يمكن نقل صفه من حشره معينه إلى النبات عن طريق هذه البكتريا (شكل ١٣٧).

الأعراض المرضيه لهذه البكتريا على النبات: تظهر أورام صغيره على الساق أو الجذور بالقرب من سطح التربه فى البدايه. وفى الأطوار الأولى تكون الأورام تقريبا كرويه الشكل بيضاء أو لحميه اللون وطريه. وحيث أنه لكى تحدث الأصابه لايد من وجود جروح أى أن التدرن أو الورم ينتج فى منطقه الجرح فإنه فى البدايه لا يمكن تمييزه عن نسيج الكالس callus ولكن سرعة تكوين الورم تكون أكثر بكثير من سرعة تكوين الكالس. يكبر التدرن فى الحجم ويصبح سطحه ملتو ومتعرج. وفى النهايه تصبح الأنسجه الخارجيه للتدرن بنيه سوداء أو سوداء نتيجه لموت وتحلل الأنسجه السطحيه للورم. أحيانا لا يوجد خط فاصل واضح بين نسيج الورم وأنسجه النبات حيث يظهر الورم نتيجه لإنتفاخ غير مننظم الشكل فى الأنسجه ويحيط بالساق أو الجذر. عاده يكون الإنتفاخ خارجى وملاصق للجذر أو الساق عن طريق عنق ضيق من الأنسجه. وأحيانا يكون الورم أسفنجى القوام ويمكن أن يفصل بسهولة عن الساق أو الجذر أو يتحلل أو يفصل إلى أجزاء تسقط أو تتحلل. أحيانا أخرى يصبح الورم خشبي صلب ويصبح درنى الشكل ويصل قطره إلى ٣٠ سم أو أكثر. بعض الأورام يمكن أن تتعفن جزئيا أو كليا ويبدأ العفن من السطح ويتجه إلى داخل التدرن وذلك فى الخريف أو الشتاء ويتكون مرة أخرى فى نفس المكان فى الموسم التالي فى الربيع أو الصيف أى فى موسم النمو. أحيانا تتعفن أجزاء من الورم أو التدرن وتتحلل وتتكون أورام أخرى على الأجزاء المتبقيه من الورم.

تتكون الأورام على الجذور والسيقان عاده وعند سطح التربه ولكنها قد تتكون على بعد قد يصل متر ونصف من منطقه التاج للنبات وذلك فى بعض النباتات الزاحفه أو العشبيه وقد تتكون على أفرع الأشجار أو بتلات الأزهار أو عروق الأوراق. عاده يكون ورم أو تدرن واحد فقط ولكن يمكن أن يزيد ويصبح عديد من الأورام متصله على الجذر أو الساق أو كليهما أو على الفروع.



(شكل ١٣٧) : دوره حياة البكتريا المسببه لمرض التدرن التاجي .

قد لا يؤثر المرض تأثير ضار واضح على النبات ولكن قد يسبب قصر النبات وقد ينتج أوراق صغيره ذات لون أخضر باهت ويكون النبات قابل للتأثر بالظروف البيئيه غير الملائمه والتي تؤثر على نموه وإنتاجيته مثل ضرر الشتاء winter injury .

صفات البكتريا: عصبية الشكل ذات عدد قليل من الأسواط محيطى peritrichous . يوجد بداخل خلايا البكتريا للسلاطات الممرضة بلازميد أو أكثر. يتكون البلازميد من DNA ثنائى الشريط أو الخيط حلقى الشكل ووزنه الجزئى يتراوح بين مائه إلى مائه وأربعون مليون دالتون. يحمل أحد هذه البلازميدات جينات خاصة بتكوين التدرن أى الأورام ويسمى Ti Plasmid وهى إختصار لكلمتين وهما منتج الأورام tumor-inducing . خلو البكتريا من البلازميد Ti يجعلها غير ممرضة للنبات. كما أن المعاملة الحرارية للخلايا البكتريه المحتويه على بلازميد Ti تفقدها هذا البلازميد ويصبح غير فعال وتصبح البكتريا غير ممرضة للنبات أى تفقد قدره على إصابه النبات. يحمل البلازميد Ti الجينات التى تحدد نوع العوائل النباتيه التى يمكن أن تصيبها الخلايا البكتريه الحامله لهذا البلازميد وأيضا تحدد نوع الأصابه على النبات العائل حيث أنه توجد أنواع وحالات مختلفه من الأصابه سبق ذكرها وأهم خاصيه لهذه السلاطات من البكتريا أنها قادره على نقل جزء من DNA هذا البلازميد بسرعه وبكفاءه عاليه إلى ماده الوراثيه لخلايا النبات ولذلك تتحول خلايا النبات العاديه إلى خلايا أورام ينتج عنها التدرن وذلك فتره وجيزه. عندما يكتمل تحول بعض خلايا النبات العاديه إلى خلايا نشطه فى عمل الأورام فإن هذه الخلايا الأخيره تنقسم وتنمو بطريقه غير طبيعيه لتزيد أو تكون الأورام ويكون ذلك حتى فى عدم وجود البكتريا حيث يصبح الأنقسام غير مرتبط بالبكتريا. عند نقل جزء من هذه الأورام والذى يحتوى على خلايا نشطه فى الأنقسام إلى بيئه مغذيه وقد تكون بيئه سائله أو بيئه آجار فإن هذه الخلايا تكون نشطه فى الأنقسام فى عدم وجود هورمونات معينه تحتاجها الخلايا العاديه على نفس هذه البيئه لكى تصبح قادره على الأنقسام. أى أن الخلايا العاديه تحتاج إلى وجود هورمونات معينه فى البيئه لكى تنقسم ومن هذه الهورمونات إندول حامض الخليك ولكن خلايا التدرن لا تحتاج إلى هذه الهورمونات على نفس البيئه. تخلق خلايا النبات المكونه للورم أى المحتويه على جزء من DNA بلازميد Ti مركبات كيميائيه خاصه تسمى opines والتى يمكن أن تستعمل فقط بواسطه البكتريا المحتويه على بلازميد Ti مناسب بينما الخلايا العاديه غير قادره على تخليق هذه المركبات وحتى أستعمالها. وهذه حاله طفيل وراثى genetic parasite حيث أن جزء من DNA بلازميد البكتريا ينتقل إلى ماده الوراثيه لخليه النبات العائل وبذلك ينبه ويشجع الخلايا على تكوين مركبات معينه لازمه للبكتريا وغير لازمه لخلايا النبات العائل ولايكونها

أصلاً أى أنه يحدث تغيير فى عمليات التحول الغذائى فى خلايا النبات لصالح البكتريا وحيث تستفيد البكتريا فى غذائها بهذه المركبات.

حدوث المرض: تعيش البكتريا فى الشتاء فى التربة وحيث يمكنها أن تعيش كذلك لعدة سنوات ويكون نوع المعيشه رميه. عند نمو النبات العائل فى هذه التربة الملوثة بالبكتريا فإنها تخترق الجذور أو السيقان بالقرب من سطح التربة ولا بد من وجود جروح حديثه نسبيا لكى تحدث عليه الأخرق وبالتالي إصابه النبات. تتكون هذه الجروح نتيجة للعمليات الزراعيه والتطعيم والحشرات إلخ. توجد البكتريا فى بدايه الإصابه فى المسافات البينييه بين خلايا النبات وتنشط الخلايا المحيطه بها لكى تنقسم. يتكون نتيجة لذلك حلقات من الخلايا التى لها قدره فائقه على الأنقسام بالمقارنه بالخلايا العاديه وتظهر هذه الحلقات من الخلايا فى نسيج القشره أو الكميوم تبعاً لدرجه عمق الجروح. تحتوى هذه الخلايا على نواه أو أكثر. تنقسم هذه الخلايا بسرعه فائقه وتسمى هذه الحاله hyperplasia وتكون خلايا غير متشكله وغير متميزه فى تركيبها التشريحي وبعد حوالى عشره أيام إلى أسبوعين بعد التلقيح يظهر الورم ويمكن رؤيته بالعين المجرده. أمكن للمؤلف عدوى نباتات صغيره من عباد الشمس وظهر الورم بعد أربعة أيام. حيث أن الأنقسام السريع العشوائى للخلايا hyperplasia وأيضاً كبير حجم الخلايا بطريقه غير منتظمه فإن التدرن أو الورم يزداد فى الحجم تدريجياً ويكون تدرن صغير. عاده تكون البكتريا غير موجوده فى مركز التدرن أى أن هذا الجزء من الأنسجه خال من خلايا البكتريا إلا أن الطبقة أو الجزء السطحى من التدرن يحتوى على خلايا بكتيرييه فى المسافات البينييه للخلايا. فى هذه المرحله تتميز بعض خلايا التدرن إلى أوعيه خشبييه وقصيبيات ولكنها تكون غير متصله بنسيج الخشب للنبات أو يكون إتصالها فى مناطق قليله محدوده بنسيج الخشب للنبات. عند كبير الورم فى الحجم فإنه يضغط على الأنسجه المحيطه به وأيضاً الأنسجه أسفله التى تسبب سحق وتمزق لهذه الأنسجه فى النبات العائل. قد يحدث سحق لأوعيه الخشب بواسطه التدرن وقد يسبب ذلك ضعف إنسياب الماء إلى أعلى فى الأوعيه الخشبييه وبذلك يقل إنسياب الماء إلى المجموع الخضرى وقد يصل ذلك إلى ٢٠٪ فقط من الماء المناسب إلى المجموع الخضرى فى الحاله العاديه.

لا تغطى التدرنات الملساء الصغيره بنسيج البشره ولذلك فإنها تهاجم بالحشرات أو الكائنات

الحية الدقيقة الرمية. هذه الكائنات الأخيرة تسبب تلون الجزء السطحي من الورم باللون البنى أو الأسود كما قد تسبب تحلله. تحلل أو تمزق الجزء السطحي من الورم يسبب تحرر البكتريا وسقوطها في التربة والتي قد تحمل بمياه الري أو الأمطار لتصيب نباتات جديدة.

عند كبر الأورام تصبح أحيانا خشبيه وصلبه. تكوين الحزم الوعائيه الغير كامل والغير مرتب في الورم يكون غير فعال في تأديه وظيفته ونتيجة لذلك في بعض الحالات تكون الأورام غير قادره على الحصول على الماء أو التغذية بدرجة كافيه ولذلك يتوقف كبر التدرن في الحجم ويحدث تحلل لبعض أجزائه ويحدث موت لبعض الأجزاء ثم تتحلل وتتلاشى هذه الأجزاء الميتة. في بعض الحالات يضمم التدرن ولا يظهر تدرن جديد ولكن عاده يتبقى جزء حى من التدرن ويتكون منه أورام أخرى في نفس الموسم أو في الموسم التالى.

عند أصابه الأنسجه الغير بالغه والصغيره السن وأيضا الأنسجه التى لها درجة كبيره من الأستطاله فإنه يتكون في منطقة الأصابه primary tumor ورم إبتدائى وقد يتكون أسفل هذا الورم ولكن عاده يتكون أعلاه ورم آخر يسمى بالورم الثانوى أو التدرن الثانوى secondary tumor ويمكن أن يبعد هذا الورم أو التدرن الثانوى عن الورم الإبتدائى لمسافه صغيره أو متوسطه أو كبيره حيث يمكن أن يظهر الورم أو التدرن الثانوى على فرع النبات. أحيانا تظهر الأورام الثانويه على ندب الأوراق المتساقطه أو فى مكان الجروح الناتجه عن عوامل مختلفه أو حتى على أجزاء من الساق غير مجروحه ظاهريا أو على أعناق الأوراق وعلى العروق الوسطيه أو العروق الكبيره للأوراق. تبعد هذه الأوراق المصابه عن الورم أو التدرن الإبتدائى عدّه سلاميات. بدايه تكوين التدرن الثانوى تكون من نسيج خشب الحزم الوعائيه. وهذه الأورام أو التدرنات الثانويه تكون دائما خاليه من البكتريا المسببه للمرض. حيث أنه عند قطع هذه الأورام وتعليقها ووضعها على بيئه مغذيه مناسبه فإنه لم يمكن عزل هذه البكتريا وذلك دليل على أن هذه الأورام الثانويه خاليه من البكتريا. عند أخذ جزء من الورم أو التدرن الثانوى وتطعيمه على نبات سليم فإنه يسبب تكون أورام على النبات السليم وتكوين هذه الأورام خاليه من البكتريا أيضا ولكنها تشبه الأورام الإبتدائيه فى شكلها ومظهرها وتركيبها. يثبت ذلك أن البكتريا لها أهميه كبيره فى بدايه المرض فقط حيث أنها تسبب تأثير مهيج للخلايا والأنسجه irritant effect فى النبات المصاب. وبعد حدوث الاضطراب والهيلاج فى

الخلايا فإنها لا تحتاج إلى البكتيريا لحدوث إنقسام الخلايا الغير منتظم والمسبب لتكوين التدرن حيث أن هذه الخلايا تصبح قادره ذاتيا على إنتاج وحدوث العامل المؤثر والذي يحدث هياج للخلايا لتصبح قادره على الأنقسام بسرعه فائقه وبطريقه غير منتظمة وأيضا بطريقه غير متحكم فيها uncontrolled. ولذلك فإن البكتيريا لها أهميتها فقط في بداية حدوث الورم ولكن بعد ذلك يمكن للخلايا المكونه للورم أن تسبب هياج خلايا أخرى وأنقسامها إنقسام زائد في عدم وجود البكتيريا. بالرغم من وجود دراسات مكثفه لمعرفة طبيعه المسبب لهياج irritant خلايا النبات وميكانيكيه تحول الخلايا العاديه إلى خلايا أورام فإن المعلومات في هذين الموضوعين لازالت غير متكامله وغير حاسمه. عامه فإن كميته كبيره من هذه المعلومات قد عرفت خلال العشر سنوات الماضيه وهى أن خلايا البكتيريا للسلاطات المعرضه للنبات تحمل بلازميد من نوع معين يسمى بلازميد Ti وأن عدم وجود هذا البلازميد يفقد البكتيريا قدرتها على أصابه النبات ولا بد أن تكون الأصابه بالقرب من جرح حديث. تدخل هذه البكتيريا جزء من البلازميد يسمى T-DNA فى ماده الوراثيه لخلايا النبات المصابه بالقرب من الجروح وحيث تصبح خلايا النبات فى هذه المنطقه قابله لإستقبال هذا الجزء أى T-DNA. أى أن خلايا النبات تأخذ أعداد من T-DNA فى هذه المنطقه. ولذلك فإن خلايا النبات فى هذه المنطقه تتحور لكى تصبح قابله لأستقبال T-DNA وأما عن كفيته هذا التحور وكفيته حدوثه فهو غير معروف. تصبح أجزاء T-DNA ملتحمه بكروموسومات خلايا النبات فى أماكن عديده. تصبح هذه الخلايا النباتيه قادره على اظهار الصفات الموجوده فى T-DNA وتسمى هذه الخلايا بأنها محوله transformed. هذه الخلايا المحوله تنتج opines والتي تستخدم وتستهمل فقط بواسطه خلايا البكتيريا التى تحتوى على بلازميد Ti المحتوى على جزء T-DNA. يزداد تركيز مركبات أخرى فى هذه الخلايا النباتيه المحوله ومنها الهرمونات النباتيه مثل أندول حامض الخليك وأيضا بعض السيتوكينينات cytokinins وبعض الأنزيمات. حتى الآن غير معروف كيف يتم زياده تركيز الهرمونات والأنزيم وكفيته تخليق opines وما هى علاقتها بالخلايا المحوله وهل يوجد علاقه بين هذه التغيرات وبعضها أو لا توجد بالمره وما هو علاقه ذلك بجزء T-DNA وما هو علاقه ذلك كله بأنقسام وكبر الخلايا المحوله فى النبات والتي ينتج عنها نمو غير محكوم uncontrollable لتكوين الأورام.

مقاومة المرض: تبدأ مقاومة المرض بالمرور والتفتيش على الأشجار والشجيرات في المشاتل nursery ورفض المصاب منها وإيادته. فيمنع زراعه الأشجار والشجيرات القابلة للإصابة في حقول ذات تربه ملوثة بالبكتريا المسببه للمرض. تزرع الذره الشامية أو أحد محاصيل الحبوب الأخرى لعدة سنوات متتاليه في الحقول ذات التربه الملوثة بالبكتريا وقبل زراعتها بالشتلات أو الشجيرات القابلة للإصابة. حيث أن البكتريا تخترق النبات عن طريق الجروح الحديثه فيجب الحذر التام والعناية في عدم تجريح جذور أو ساق النبات أثناء الزراعه يجب أيضا مقاومه الحشرات القارضة للجذور مقاومه تامه في المشاتل لتقليل حدوث الإصابة كلما أمكن ذلك. يجب استعمال التطعيم بالبرعم budding وعند استعمال التطعيم بالقلم أى بعده براعم حيث أن درجه إنتشار مرض التدرن التاجى فى الحالة الأولى أقل بكثير من درجه إنتشاره فى حاله التطعيم بالقلم أى بعده براعم grafting.

يجب شراء وزراعه نباتات خاليه من الإصابة. يمكن مقاومه المرض وذلك بكشط التدرن مع مساحه حوله وأسفله ويتم دهان هذا الجزء بواسطه محلول elgetol-methanol ويكون ذلك بواسطه الفرشه. يتكون هذا المحلول من جزء واحد sodium dinitrocresol إلى أربعه أجزاء wood alcohol. يمكن دهان المكان بعجينه بوردر.

يمكن مقاومه المرض بدهان مكان الورم بمخلوط من مركبات هيدروكربونيه عطريه aromatic hydrocarbons يباع تجاريا ويكون هذا المخلوط إختيارى التأثير أى أنه يقتل خلايا وأنسجه التدرن دون أن يقتل الخلايا والأنسجه العاديه المجاوره ولكن لا يستعمل ذلك عمليا على نطاق واسع.

يمكن عمل مقاومه حيويه لهذا المرض وذلك بنقع البذور أثناء الأنبات أو غمر بادرات المشتل أو الأصول المستعمله كجذور فى معلق من سلاله خاصه من سلالات البكتيريا *Agrobacterium radiobacter* وهى رقم ٨٤ (strain No 84). تضاد هذه السلاله من البكتيريا كثير من سلالات البكتيريا المسببه لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابة. يمكن أيضا معامله البذور العاديه الغير نابته بهذه السلاله كما يمكن أيضا رش وغمر التربه فى مكان النبات بمعلق من خلايا البكتيريا لهذه السلاله. يعتقد أن هذه السلاله ٨٤ من البكتيريا توجد على سطح العائل وتفرز مركب bacteriocin agrocين. يعتبر هذا المركب مثبط

لكثير من السلالات الممرضه للبكتريا المسببه لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابه ومن حدوث التدرن. ولكن لسوء الحظ بعض سلالات بكتيريا التدرن التاجى الممرضه يمكنها أن تقاوم مركب 84 agrocin. ولذلك فإن هذه السلاله البكتيرييه فقدت قدرتها على مقاومه المرض فى بعض المناطق.

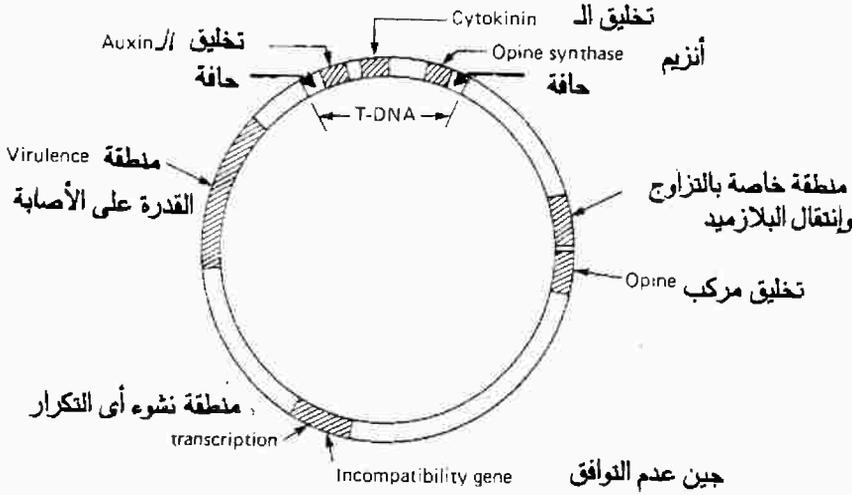
المتحركات المستعمله فى عزل ونقل الجينات

Cloning Vehicles Used For Gene Cloning In Plants

تعتبر Vectors أو Cloning Vehicles كائنات حيه دقيقه عاده أو أجزاء منها agent والتي تنقل ماده الوراثيه من كائن حى يسمى الواهب donor إلى كائن حى آخر يسمى المستقبل recipient ويحيث أن هذه ماده الوراثيه المنقوله يمكن أن تعبر عن نفسها وذلك بأظهار الصفه أو الصفات الخاصه بها فى الكائن المستقبل أو فى الخليه المستقبله recipient cell ومثال ذلك البلازميدات والفيروسات البكتيرييه أى البكتريوفاج bacteriophage والتي تسمى أيضا للأختصار بالفاج phage وذلك فى حاله البكتريا وأيضا الفيروس SV40 لخلايا الحيوان. تعتبر الكوزميدز cosmids أيضا كذلك وهى عباره عن نوع خاص من البلازميدات المهندسه وراثيا مشتقه من نوع خاص من الفاج وهو الفاج لامدا bacteriophage lambda وهذه البلازميدات والفاج و SV40 و cosmids تستعمل لأنها cloning vehicles أو vectors للماده الوراثيه المنقوله إلى البكتريا والخميره والحيوانات. يستعمل البلازميد الخاص بالبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وأيضا فيروس موزايك أى تبرقش القنبيط وهو عباره عن DNA ثنائى الشريط double stranded DNA أى ds DNA فى نقل ماده الوراثيه إلى النبات. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد فيروسات وحيدته الخيط أو الشريط ss-DNA وتسمى geminiviruses وأيضا فيروسات RNA وحيدته الشريط أو الخيط (ss-RNA) وهى فيروس موزايك أى تبرقش التبغ (TMV) tobacco mosaic virus وبعض الفيروسات الأخرى وأيضا أجزاء transposon تستعمل فى نقل ماده الوراثيه فى النبات. وفيما يلى شرح لأهم cloning vehicles أو vectors المستعمله فى نقل ماده الوراثيه فى النبات:.

١ - بلازميد Ti للبكتريا *Agrobacterium tumefaciens*: يستعمل هذا البلازميد بكثرة في نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره في الجزء السابق. يحتوي هذا البلازميد على عديد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها. يحتوي الجزء من هذا البلازميد المسمى T-DNA على عديد من الجينات منها. الجين الأول والذي يخلق أنزيم opine synthetase والذي يقوم بتخليق opines وهي مركبات تنتج فقط بواسطة خلايا النبات العائل المحولة transformed بواسطة هذه البكتريا. هذه المركبات وهي opines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطة خلايا البكتريا التي تحتوي على بلازميد Ti. خلايا البكتريا الخالية من بلازميد Ti غير قادرة على استعمال opines في التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتريا يجب أن تحتوي على جين خاص بتخليق opines. الجين الثاني أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم في تخليق السيبتوكينينات. حيث أن تثبيط تكوين السيبتوكينينات في النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة الجينات والتي تتحكم في تخليق الأوكسينات. حيث أن تثبيط تكوين إندول حامض الخليك في النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. والجين الرابع أو مجموعة الجينات وهي عبارة عن حافتي الجزء T-DNA من الناحية اليمنى والناحية اليسرى وتتكون كل من الحافة اليمنى والحافة اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النووية وهي التي تتحكم في عملية نقل جزء T-DNA من البلازميد إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل حيث وجد أن إزاله ٢٥ زوج من القواعد النووية أى الحافة اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل. وأيضا تؤثر على قدره البكتريا على الإصابة وتصبح غير فعاله فى إصابه النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزئى T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدره الطفيل أى البكتريا على الإصابة virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذه الجزء من البلازميد بمنطقه قدره البكتريا على إصابه النبات أى virulence region وهي بعيدة عن منطقة T-DNA. تتكون المنطقة الأخيره من عديد من الجينات. توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيويه أخرى مثل التزاوج الجنسي بين البكتريا ونقل بلازميد Ti من البكتريا الممرضة إلى البكتريا الغير ممرضة وأيضا جين أو جينات أخرى تتحكم فى تخليق مركب opine فى خلايا النبات العائل بعد أن تنتقل هذه الجينات من البلازميد Ti إلى كروموسومات النبات العائل. وأيضا جين أو جينات تتحكم فى

عدم التوافق بين بعض البلازميدات وبعض سلالات من بكتريا التدرن التاجي وأيضا جين أو جينات أخرى تتحكم في تحديد مكان أصل وبدايه إنقسام ونسخ وتصاعف البلازميد replication و origin of transcription (شكل ١٣٨).



(شكل ١٣٨) : البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التي تقوم بعمل بعض الوظائف الهامة .

يعتبر البلازميد Ti فعال في نقل DNA الخلية البكتيرية إلى المادة الوراثية في النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله في نقل ماده وراثيه غريبه أى غير موجوده به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصعب التعامل معه وراثيا manipulate genetically والأهم من ذلك أن الخلية للنبات العائل تتحول من خليه عاديه إلى خليه محوله تنقسم بسرعه كبيره وتدخل في تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعاده تكوين نبات عادى من هذه الخلايا المحوله transformed . أتضح أيضا أن الجينات الموجوده في T - DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) ليس لها دور في نقل جزء T - DNA من البكتريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بكموسوماته . ومما هو جدير بالذكر أن أذخال جينات أو أجزاء DNA من خلايا الحيوان أو البكتريا أو النباتات الزهرية التي ليس لها علاقه بالنبات

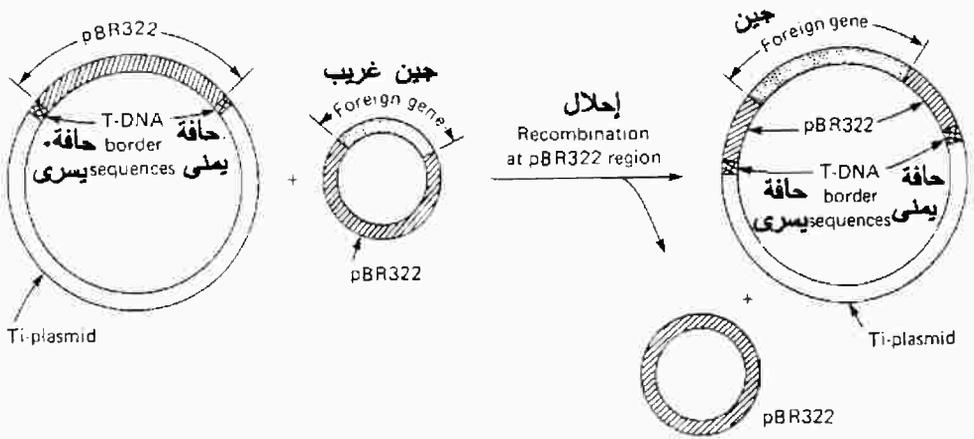
العائل إلى T-DNA البلازميد حيث توجد هذه الجينات في داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى المادة الوراثية في النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خامله أى غير قادره على التعبير عن وجودها في النبات العائل وأظهار صفاتها ولكن في بعض الحالات وعند إضافه جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيئ promoter region لجين أنزيم opine synthetase فإن هذا الجين يسمى جين كيميى chimaeric gene وبذلك يمكن لبعض الجينات المنقله أن تصبح نشطه أى قادره على أظهار صفاتها في خلايا النبات العائل وذلك نتيجة لنشاط بعض الأنزيمات الخاصه بها.

يمكن إزاله الجزء الخاص بتكوين التدرن أو الورم من البلازميد Ti وهو عباره عن الجزء المحتوى على الجينات الخاصه بتخليق الأوكسينات والسيتوكينينات فقط من T-DNA دون إزاله الحافتين اليمنى واليسرى واللتين تتحكمان في نقل T-DNA إلى خلايا العائل. يسمى الجزء الخاص من البلازميد Ti الذى يتحكم في تكوين الورم tumor inducing بأسم منطقه أونكوجينك oncogenic region. وهى الجزء الذى يحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم نقل هذا البلازميد إلى خلايا النبات العائل وتصبح خلايا النبات العائل المحتوية على هذا البلازميد فاقده للقدره على الهياج وأيضا فاقده القدره على عدم التأثر بأوكسينات و سيتوكينينات خلايا النبات العائل أو بمعنى آخر فإن الخلايا المحوله تصبح محكومه وتحت تأثير أوكسينات و سيتوكينينات خلايا النبات العاديه ولذلك فإن هذه الخلايا المحوله تكون فاقده القدره على الإنقسام السريع وتكوين الورم أو التدرن بالرغم من إحتوائها على البلازميد كما يمكن لهذه الخلايا المحوله والتي تحتوى على عوائل وراثيه جديده أن تنقسم إنقساماً عادياً ويسرعه عاديه لتكون نبات محول كامل جديد به عوامل وراثيه جديده. أى أنه بذلك تصبح الخلايا المحوله خلايا عاديه بها ماده وراثيه أو عوامل وراثيه جديده وبالطبع تفقد هذه الخلايا المحوله قدرتها على الهياج. يمكن شغل الأماكن الخاليه في بلازميد Ti في هذه الحاله وهى أماكن جينات الأوكسينات والسيتوكينينات في جزء T-DNA بواسطه جينات كيميى خاصه بمقاومه بعض المضادات الحيويه شديده السميّه مثل كاناميسين kanamycin وميثوتريكسيت methotrexate. يمكن وضع هذين المضادين الحيويين في البيئه وبذلك تصبح بيئه إنتخابيه حيث ينمو عليها فقط الخلايا المحوله والتي تحتوى على

جينات المقاومة لهذين المضادين الحيويين وأيضاً تنمو عليها النباتات المحولة فقط والتي لها صفة المقاومة لهذين المضادين الحيويين. وبذلك يسهل عزل الخلايا المحولة من الخلايا الأخرى.

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبة وذلك بإزالة الجزء الأساسي في T-DNA مع ترك الحافتين (الحافة اليمينية والحافة اليسرى) أى إزالة الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيبتوكينينات. يتم شغل هذا المكان الفارغ من البلازميد بواسطة بلازميد آخر صغير ومدروس وراثياً تماماً أى معروف فيه تتباع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتريا *E. coli* ومثال ذلك البلازميد pBR322 يتم أيضاً وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخر من نفس النوع أى pBR322 أى عمل cloning للجين فى البلازميد.

يسمح للبكتريا *A. tumefaciens* بأخذ هذين النوعين من البلازميد وهو النوع الحامل للجين المطلوب إدخاله فى المادة الوراثية والنوع الآخر هو الغير حامل للجين. يحدث homologous recombination بين البلازميدات pBR322 فى بعض خلايا البكتريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزئيين من بلازميد *E. coli* وهو pBR322 وذلك لبلازميد الخلية البكتيرية المسببه لمرض التدرن التاجى أى بلازميد Ti (شكل ١٣٩) عند إضافه هذه الخلية البكتيرية للنبات فإنها تنتقل إلى كروموسومات خليه النبات جميع جزء DNA الموجود بين حافتين جزء T-DNA أى أنها تنتقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل بلازميد *E. coli* أى pBR322 بما يحمله من الجين المطلوب نقله. ولقد أستعملت هذه البلازميدات بنجاح وكفاءه عاليه فى نقل الجينات المطلوبه إلى كروموسومات خليه أو خلايا النبات العائل ثم ينتج من هذه الخلايا نبات كامل خصب عادى يحتوى على الجينات المنقوله وتصبح هذه الجينات كجزء عادى من كروموسومات النبات وتنتقل أيضاً إلى نسل هذا النبات عن طريق حبوب اللقاح وخليه البيضة وبالطبع يسبق تكوين هذه الأجزاء الأنقسام الأختزالى والذى ينقسم فيه الجين المنقول بطريقه عاديه كما فى جينات النباتات الأخرى.



(شكل ١٣٩): نقل جين غريب إلى البلازميد Ti باستعمال بلازميد آخر صغير.

توجد طريقه أخرى تستعمل للتغلب على كبر حجم البلازميد Ti وهى نقل أى جين مطلوب أو جينات مطلوبه بين حافتي جزء T-DNA ثم نقل هذا الجزء وهو الحافتين والجين أو الجينات المطلوب نقلها إلى بلازميد صغير وبذلك يصبح هذا البلازميد الصغير محتوى على الحافتين لجزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوب نقلها. يتم نقل المنطقه أو الجزء من بلازميد Ti الخاص بقدره الطفيل على إصابه النبات virulence region من هذا البلازميد إلى بلازميدات أخرى صغيره. أى من هذين النوعين من البلازميدات الصغيره غير قادر على إصابه النبات على إنفراد. وعند السماح بخلط هذين النوعين من البلازميدات بالبكتريا المسببه لمرض التدرن التاجى فإنها تنتقل إلى داخلها وتصبح خلايا هذه البكتريا قادره على إصابه النبات لأحتوائها على جين أو جينات الإصابه كما أن حافتي جزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوبه تنتقل إلى كروموسومات خليه النبات العائل وتصبح جزء منها. وبذلك يتم نقل الجين أو الجينات إلى النبات العائل بكفاءه عاليه.

تزداد الآن المعلومات الخاصه بأستعمال بلازميد Ti فى نقل الجينات أى أستعماله cloning vehicle أو vector وكلها فى صالح هذا البلازميد حيث أنه يحدث تقدم ملحوظ فى إستعماله مع وجود طريق جديده بإستمرار لتسهيل أستعماله وزيادة كفاءه أستعماله فى حالات متعدده

لم يكن يستعمل فيها أصلا. ولذلك فإن نقل جينات من البكتيريا أو النبات أو الحيوان إلى خلايا النبات أصبح في الأماكن وأمكن أنجازه. ولكن مدى وكيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها في خلايا النبات العائل الجديد regulatory controls of expression of genes غير معروفه أو معروف عنها القليل. تصيب بكتريا التدرن التاجي النباتات ذات الفلقتين فقط ولا تصيب النباتات ذوات الفلقه الواحده وبالرغم من أن كثير محاصيل الغذاء مثل القمح والذره والأرز وقصب السكر تتبع نباتات ذوات الفلقه الواحده. وأيضا نفس الشيء بالنسبه للبلازميد Ti. ولكن أمكن الآن تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات فلتقتين مباشره بواسطه بلازميد Ti أو ببروتوبلاست خلايا بكتيرييه ويسمى البروتوبلاست الملقح بهذه الأجزاء sphaeroplasts ويمكن إنتاج نباتات كامله بعد ذلك من هذه sphaeroplasts. وأممكن الآن أيضا تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات الفلقه بواسطه بلازميد Ti ولكن حتى الآن لم يمكن إنتاج نباتات ذوات فلقه كامله من البروتوبلاست وذلك على العكس من ذوات الفلقتين.

زياده الدراسات والمعلومات عن بلازميد Ti لا تزيد فقط من معلوماتنا عن طبيعه الطفيل المرضيه أى طبيعه بكتريا التدرن التاجى بل أيضا تزيد من كفاءه نقل جينات مقاومه لأمراض النبات من نبات إلى آخر ويمكن أن يكون هذا النبات الأخير من جنس مختلف أو حتى من عائله مختلفه ومن مميزات هذه الطريقه أنها تنقل الجين المطلوب إلى خليه النبات العائل دون زياده فى جينات غير مرغوبه ودون حدوث نقص فى جينات مرغوبه ومن مميزاتا أيضا أنها سريعه ولا تحتاج إلى وقت لعمل التهجين بين النباتات crosses وأيضا لعمل التهجينات الرجعيه backcrosses. تعتبر العقبه الرئيسييه فى استعمال بلازميد Ti فى أمراض النبات هى نقص المعلومات عن مكان وجود جينات المقاومه فى النبات فى جينومات النباتات المختلفه وأيضا كيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها فى النباتات الجديده المنقوله إليها.

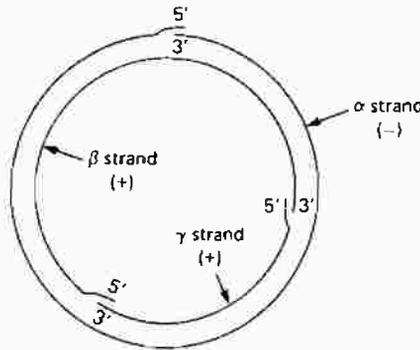
٢ - الفيروسات النباتيه plant viruses: تعتبر الفيروسات عامل هام فى حمل ونقل الماده الوراثيه الخاصه بالبكتريا والحيوان. عامه فإن بلازميد Ti يعتبر أفضل وسيله أى حامل cloning vehicle وناقل لجينات النبات. ولكن بالدراسات المكثفه على الفيروسات النباتيه كحامله وناقله لجينات النبات cloning vehicles أو vectors فإنه فى القريب العاجل يمكن استعمال بعض الفيروسات النباتيه بكفاءه عاليه فى هذا الصدد.

يجب الإشارة هنا إلى وجود إختلاف بين الفيروسات الناقله لجينات النبات plant viral vectors وبين البلازميد Ti . حيث يعتبر البلازميد Ti ناقل وحامل للجين من النوع أو الطراز المكمل أو المتكامل integration-type vector . ولا تعتبر الفيروسات الحاملة والناقله للجين من هذا النوع . يدخل الفيروس الجين المطلوب نقله إلى داخل النبات حيث أن الفيروس يصيب خليه النبات ويخترقها حاملا معه الجين المطلوب . يتضاعف الجين في خلايا النبات بلايين المرات نتيجة لتكاثر الفيروس داخل خلايا النبات بلايين المرات حيث يعتبر الجين أحد جينات جزيئات الفيروس . ونتيجة لذلك ينتقل الفيروس في جميع أجزاء النبات وبالتالي ينتشر الجين في جميع أجزاء النبات أى يكون إنتشاره جهازيا systemically . إدخال الجينات المرغوبه إلى داخل النبات وذلك فى النباتات الحوليه أو المعمره والتي تتكاثر خضريا بواسطة الفيروس أو فى النباتات التى تتكاثر بالبذور وذلك عن طريق حمل البذور للفيروس ويكون نتيجة لذلك تواجد الجين فى النبات نتيجة لوجود الفيروس كما أن درجة تكرار الجين فى النبات تكون مرتبطه تماما بسرعه تكاثر الفيروس ودرجة إنتشاره فى خلايا وأنسجة النبات المختلفه . يمكن أيضا إدخال الجين إلى خلايا النبات ومنها النباتات الحوليه بواسطة التلقيح الميكانيكى mechanical inoculation حيث يمكن إدخال الفيروس إلى داخل النبات بهذه الطريقة ويمكن إدخال الجين بواسطة الفيروس فى النباتات المعمره بواسطة التطعيم grafting . وفى هذه الحالات فإن الجين المنقول إلى النبات عن طريق الفيروس يمكن أن يسبب أو يظهر مقاومه جهازيه ضد أنواع أو سلالات أخرى من الطفيل شديده القدره على إصابه النبات وبذلك يقى النبات شر الإصابة . طبيعه نوع المقاومه التى يظهرها الجين ليقى النبات من الإصابة غير معروفه ولكن يعتقد أنها نوع من الحماية المختلطه أى الوقايه المتضاده ومن الصعب ترجمه الأصلاح الدال على هذه الحالة باللغة العربيه ولذلك يفضل أستعمال المصطلح الأنجليزى وهو cross protection ومعناه أن وجود الجين بأعداد كثيره فى داخل خليه النبات يمنع سلاله أخرى من الفيروس شديده القدره المرضيه على مهاجمه الخليه . يحدث ذلك بالنسبه لجميع خلايا النبات المحتويه على هذه الجينات وبالتالي تقى هذه الجينات المنقوله بالفيروس خلايا النبات وبالتالي من الإصابة بالسلاله الشديده القدره المرضيه . يمكن أيضا أن تكون طبيعیه المقاومه فى هذه الحالة نتيجة للمقاومه الجهازيه systemic resistance ولذلك فإنه يعتقد قبل نهاية القرن الحالى أن تستعمل الفيروسات التى تصيب النبات كحاملات وناقلات للجين المطلوب vectors وأنها

تختار وتلتخب بحيث أنها تكون قادرة على إختراق النبات وتتكاثر بداخله دون أن تسبب له أضرار أو نقص في المحصول وتكون مهندسه وراثيا بحيث أن ما تحمله من جين أو جينات تسبب وقاية خلايا النبات من السلالة المرضية للطفيل. وفيما يلي وصف لبعض الفيروسات النباتية التي يمكن أن تقوم بهذا الدور:

أ. Caulimoviruses وهي عبارة عن فيروسات متساوية الأقطار isometric وقطرها حوالي خمسون نانومتر وتحتوى على DNA ثنائي الشريط أو الخيط حلقى يتكون من حوالي ثمانية آلاف زوج من القواعد النووية. كل خيط أو شريط منهما غير متصل أى متقطع حيث يوجد طرف من خيط على طرف آخر overlaps ويتكرر ذلك فى بعض المناطق وطول الجزء الذى يحدث فيه overlaps حوالي ٦ - ١٨ زوج من القواعد النووية.

يعتبر فيروس تبرقش القنبيط cauliflower mosaic virus (CaMV) (شكل ١٤٠) أكثر فيروسات هذه المجموعة دراسة كناقل vector للجين. ينقل الفيروس بسهولة نقل ميكانيكى



(شكل ١٤٠): تركيب DNA فيروس موزايك القنبيط

وذلك بحكه على الأوراق وأيضا ينقل بواسطة حشرات المن وذلك فى نباتات العائلة الصليبية. كلا من الفيروس و DNA الفيروس المعزول يسبب الإصابة وتكون إصابه جهازيه وتحتوى كل خليه من خلايا العائل نصف مليون جزيئ فيرس. ينسخ DNA الفيروس فى نواه

خلية النبات العائل وأما عن mRNA المنسوخ في النواه فإنه ينتقل إلى السيتوبلازم ويتكون منه الشريط السالب (-) من DNA وذلك بواسطة عملية نسخ عكسي reverse transcription ثم يتكون من الشريط السالب شريط آخر موجب (+) من DNA ومنهما يتكون DNA الثنائي الشريط أو الخيط. أو أن mRNA يستخدم في تخليق أنواع مختلفه من البروتين من سته إلى ثمانية أنواع ومنها البروتين الخاص بغلاف الفيروس viral coat protein لا يدخل DNA الفيروس في تركيب المادة الوراثية للنبات العائل ولا ينقل عن طريق البذور. وبالرغم من إمكانية نقل ولصق DNA في بلازميد *E.coli* أى عمل cloning لـ DNA الفيروس وأن DNA الفيروس يمكن عزله مره أخرى من خلايا هذه البكتريا ويكون قادر على إصابه النبات. ولكن حتى الآن لا يمكن أستعمال هذا الفيروس CaMV كحامل وناقل للجين أو الجينات حيث توجد عقبات في ذلك. وأحد هذه العقبات أن غالبية جينوم الفيروس يجب أن يعبا مع مناطق الكودون coding regions التي يحتاجها الفيروس لتخليقه وحيث أن أى نقص ملحوظ deletion في هذه الأجزاء يفقد قابليه الفيروس على الإصابه وبالتالي يصبح عديم الفاعلية في عملية نقل الجينات. أحد مناطق الكود الخاص بالفيروس تتكون من ٤٠٠ زوج من القواعد النوويه. يمكن التغلب على صعوبه الحد من حجم الفيروس ومناطق الكود الخاص به بإستعمال نظام فيرس مساعد helper virus system وفيه يتم إزاله جزء من جينوم الفيروس ويتم إحلال مكانه بواسطة DNA غريب foreign. ويمكن التغلب على صعوبه عدم قدره الفيروس على الإصابه وذلك بتلقيح وإصابه نفس خليه النبات المحتويه على الحاله السابقه بـ DNA للفيروس أو بواسطة DNA فيرس ثم إزاله DNA الخاص بالكود منه وأن هذا الكود خاص بعدد من الوظائف. يجب لذلك الآن عمل هذه الخطوات بكفاءه عاليه وينجاح كبير ليتمكن أستعمال هذا الفيروس CaMV والفيروسات الأخرى في هذه المجموعه من الفيروسات كناقلات وحاملات vectors لجين وجينات النبات.

ب - Geminiviruses عباره عن زوج paired (أى gemini) من جزئيات الفيروس وكل جزئى يتراوح طول أحد قطريه ١٨ - ٢٠ نانومتر وطول القطر الآخر ٣٠ نانومتر. كل زوج من جزئيات الفيروس يحتوى جزئى DNA مفرد حلقي ومفرد الشريط أى الخيط (ssDNA) single stranded DNA ويتكون الخيط أى الشريط الواحد من ٢٥٠٠ قاعده نوويه. ولكن عديد من فيروسات هذه المجموعه له جينوم ينقسم إلى جزئين من DNA متساويين في الحجم

ولكنهما يختلفان في شفرتيهما ويكونان مكونات مختلفه coding for different things يبدو أن كل فيروس من فيروسات هذه المجموعة يحتوى على نوعين مختلفين من الجزيئات two populations أى عشيرتين مختلفتين حيث أن العشريتين تتماثلان فى نوع بروتين الغلاف أو الغطاء coat ولكنهما يختلفان فى تتابع النيكليوتيدات فى DNA . تدخل هذه المجموعة من الفيروسات إلى داخل نواه خلية النبات العائل وتتكاثر بداخلها. تنقل هذه الفيروسات فى الطبيعة بواسطة نطاطات الأوراق أو الذباب الأبيض وتكون من النوع والحاله persistent يمكن أن يصعب أو يستحيل نقلها ميكانيكيا. يعرف القليل عن عدد ونوع وموقع جينات هذه الفيروسات وأيضا تركيب المحفزات أى المهيئات promoters الخاصه بها. وبالرغم من أن هذه الفيروسات تكون DNA وحيد الشريط أى الخيط فأنها تكون فى مرحله وسطيه فى النواه لخلايا النبات العائل DNA ثنائى الشريط أى الخيط ds DNA أمكن عزل هذا النوع الأخير من DNA ويمكن أن يصيب بروتوبلاست خلايا النبات ويمكن أيضا إدخاله كجزء من بلازميدات خلايا البكتريا. تصيب الفيروسات التى تتبع هذه المجموعة نباتات نوات الفلقه وذوات الفلقتين. يوجد أيضا صعوبات تواجه استعمال هذه الفيروسات كحاملات وناقلات لجينات النبات vectors ومنها أنها تحتوى على جينومات صغيره الحجم وأيضا صعوبه نقلها ميكانيكيا بواسطة عصير الخليه cell sap. وعامه تبذل مجهودات كبيره لتسهيل إمكانيه استخدام هذه الفيروسات كناقلات وحاملات لجينات النبات vectors .

ج - فيروسات RNA (RNA Viruses) يمكن أن تكون مهمه فى المستقبل وخاصه الفيروسات عديده المكونات multicomponent viruses وهى تتكون من ثلاث مكونات وتحتوى مجاميع مختلفه ومنها مجموعه بروموفيرس bromovirus ومنها فيروس موزايك البروم brome mosaic virus ومجموعه الفيروسات التابعه satellite viruses وهى فيروسات تلتصق وترتبط بفيروسات أخرى وتسبب الفيروسات التابعه خفض سرعة تكاثر الفيروس المرتبطه به كما أنها تقلل من قدرته على أصابه النبات. وقد أمكن فى حاله فيروس موزايك البروم إحلال RNA أو cDNA محل RNA بروتين الغطاء أو الغلاف coat وذلك فى أصغر جزيئ من جزيئاته الثلاثه ودون تأثير على قدره الفيروس على الإصابة. وفى حاله الفيروسات ذات النوابع وفيروسات RNA والتى تتراوح أحجامها من 270 إلى 1500 زوج من القواعد النوويه فإن

هذه الفيروسات لا تحتاج RNA ويمكن إحلاله بـ RNA غريب foreign أو حتى بـ cDNA وبالتالي يمكن إدخال هذه الأجزاء الغريبة عن الفيروس إلى داخل خلية النبات العائل عن طريق إصابتها بجزيئات الفيروس. تركيب هذه الفيروسات وأستعمالها كحاملات وناقلات vectors لجينات النبات تحت الدراسة مع وجود احتمالات كبيرة لأنجازها.

٣ - الفيرويدات Viroids تعتبر جزيئات RNA عاربه صغيره الحجم حلقيه وحيداه الشريط أى الخيط ssRNA وتتكون من عدد من الوحدات يتراوح بين ٣٠٠ - ٤٠٠ قاعده نوويه. تنقل الفيرويدات ميكانيكيا وتتكاثر في نواه خليه العائل وإصابه النبات العائل فيها جهازيه. خواص الفيرويدات مشجعه جدا لأن تكون ناقله وحامله vectors لجينات النبات وبالرغم من ذلك فإنه حتى الآن لا يوجد أى فرد منها يقوم بذلك.

٤- مكونات جينومات النبات Plant genomic components:

يمكن لبعض أجزاء من الكروموسومات أو أجزاء DNA أخرى خارج الكروموسومات extrachromosomal elements فى خلية النبات أن تقوم بعملية نقل الجينات vector من خلية إلى أخرى أو من نبات إلى آخر. ومن هذه الأجزاء ما يأتى :-

أ - أجزاء قابله وسهله الأنتقال Transposable elements: وهى عباره عن أجزاء من DNA الخليه توجد عاده كجزء من الماده الوراثيه للخليه ولكنها تتميز بأنها تمضى فتره ملتحمه بالماده الوراثيه للخليه أى جينومات الخليه ولكنها فى فتره أو فترات أخرى تنفصل عنها وتصبح حره متحركه ومتنقله لكى تلتصق مره أخرى فى مكان آخر بالماده الوراثيه للخليه. ومثال ذلك أنها يمكن أن تكون جزء من كروموسومات خلية النبات ولكن فى فتره من الفترات تنفصل عن الكروموسوم وتتحرك حره لمسافه ما ويمكن أن تلتحم بالكروموسوم فى مكان آخر أو فى أماكن أخرى من نفس الكروموسوم أو كروموسومات أخرى. عند إلتحام هذا الجزء القابل للأنتقال t.e بين النيكلوتيدات المكونه للجين فإنه يؤثر على تعبير هذا الجين ex-pression ويغير من هذا التعبير وتحدث نتيجة لذلك الطفره. يعتبر وجود هذه الأجزاء القابله للأنتقال t.e شائع فى جينومات خلايا جميع أنواع الكائنات الحيه حيوانيه أو نباتيه دقيقه أو عاديه. يختلف حجم هذه الأجزاء القابله للأنتقال t.e من ٤٠٠ إلى عشرون ألف زوج من القواعد. يمكن عزل هذه الأجزاء القابله للأنتقال ويمكن إدخال جين غريب بين النيكلوتيدات

المكونه لهذا الجزء القابل للانتقال ويصبح جزء قابل للانتقال هجين hybrid transposable element ويمكن إدخال هذا الأخير في خليه نبات أو في بروتوبلاست خليه نبات ويصبح جزء مكمل لجينوم خليه النبات. عمليه إدخال جزء قابل للانتقال هجين إلى خلايا الكائن الحى بنجاح وتصبح ذات قيمه إقتصاديّه قد تم إنجازه بكفاءه عاليه فى حشره ذبابه الفاكهه ولكن لم يتم إنجازه حتى الآن فى خلايا النبات. تعتبر هذه الأجزاء القابله للانتقال أفضل من بلازميد Ti فى حاله إستعمالها كناقل للجين vector حيث يمكن إستعمالها فى نباتات ذوات الفلقه وأيضاً ذوات الفلقتين أما فى حاله بلازميد Ti فلا يمكن إستعماله إلا فى حاله نباتات ذوات الفلقتين فقط.

ب - أجزاء خارج الكروموسومات Extrachromosomal elements : وهى أجزاء خيطيه أو حلقية من DNA تتكاثر وتتضاعف ذاتيا وتوجد فى السيتوبلازم. تتراوح فى حجمها من ألف إلى سته آلاف زوج من القواعد. قدرتها على أستعمالها كناقل للجين فى النبات غير معروف حتى الآن.

ج - أجزاء الكروموسومات Chromosomal elements : تبذل محاولات لأستعمال أجزاء من الكروموسومات كناقل وحامل للجين vector وبذلك يمكن إضافه ماده وراثيه جديده أو غريبه إلى جينوم خليه العائل. حتى الآن لم يتم إنجاز ذلك فى النباتات الراقية أى الزهرية ولكن أمكن عمل ذلك بنجاح فى فطر الخميره. وعلاوه على ذلك فإنه أمكن عمل ذلك فى الخميره بأجزاء من الكروموسوم وأيضاً بأجزاء من سنتروميير الكروموسوم. يحدث فى سنتروميير الكروموسوم تكرار وتضاعف ذاتى تلقائى لتتابع النيوكليوتيدات فى DNA ويعتبر الأساس والأصل فى تضاعف DNA الكروموسومات. حدث تقدم هائل فى هذا الشأن فى فطر الخميره حيث أمكن تخليق كروموسوم صناعى لفطر الخميره بواسطة الهندسه الوراثيه. حتى الآن غير معروف إمكانيه نقل جينوم الخميره إلى جينوم النباتات الزهرية أو أجزاء منها وذلك بالرغم من وجود بحوث كثيره فى هذا الصدد. يعتبر إستعمال الخميره كناقل للجين ذو فاعليه ومن المتوقع فى القريب العاجل أن نجد إمكانيه أستخدام الخميره فى دراسه الجينات الخاصه بقدره الطفيل على الإصابه وأيضاً الجينات الخاصه بعدم قدره الطفيل على الإصابه avirulence وذلك فى حاله الفطريات المسببه أمراض للنبات. وأيضاً عن طريقها

يمكن دراسة جينات الفطريات التي تستخدم في المقاومة الحيوية antagonistic fungi للفطريات المسببة لأمراض النباتات.

النقل الميكانيكي والكيميائي للـ DNA في خلايا النبات mechanical and chemical delivery systems of DNA into cells وناقلات الجين الطبيعية natural vectors وهي البكتريا أو الفيروس أو أجزاء من جينومات النبات تستخدم في نقل الجينات إلى خلايا النبات العائل دون إحتياج للأنزيمات. ولكن بعض النباتات الزهرية لا يوجد لها حامل وناقل للجين وفي بعض الحالات الأخرى يكون للنبات حاملات وناقلات للجين ولكنها تنقل إليه ماده وراثيه أو جينات غير مرغوبه ومن هذه الحوامل الفيروسات وبلازميد Ti. ولذلك يستعمل في هذه الحالات نظم أو طرق أخرى بديله لأنجاز إمكانيه إدخال جينات معينه إلى الماده الوراثيه لخلايا النبات العائل. ومن هذه الأنظمة والطرق ما يأتي:

١ - إدخال أجزاء من DNA من أجزاء كروموسومات chromosome fragments أو من البلازميدات أو حتى إدخال كروموسومات كامله إلى داخل بروتوبلاست خلايا النبات وذلك بخلط أحد الأجزاء السابقه مع عدد كبير من البروتوبلاست أى خلط الأحماض النوويه الخاصه بها مع البروتوبلاست في وجود كاتيونات مناسبه مثل بولى إل أورنيثين-poly-L-ornithine أو بولى إيثلين جليكول polyethylene glycol يتم عمل مزارع البروتوبلاست وذلك بمعامله خلايا النبات المرغوبه بمخلوط من أنزيمات محلله للمركبات البكتنيه والسيليلوز.

٢ - التثقيب الكهربائي أو التحول الكهربائي Electroporation or electrotransformation وفيه يتم تعريض خليط من بروتوبلاست النبات و DNA غريب لصدمات كهربائيه قصيره الفتره والتي تسبب تثقيب غشاء الأكتوبلاست أى غشاء الخليه وبذلك تسمح بدخول DNA الغريب إلى داخل البروتوبلاست ويمكن لهذا DNA الغريب أن يعبر عن نفسه بعد أن يصبح جزء من الماده الوراثيه للبروتوبلاست. يمكن بعد ذلك زراعه البروتوبلاست عن طريق مزارع الأنسجه وتكوين نبات جديد يحمل صفات وراثيه منقوله إليه بهذه الطريقه ويمكن أن يسمى ذلك نبات محول transformed. يمكن للنباتات ذوات الفلقه وذوات الفلقتين أن يتم تحويلها بهذه الطريقه.

٣ - الحقن المباشر microinjection للأحماض النووية في خلايا النبات.

٤ - إدخال DNA أو RNA في الليبوسومات liposomes . حيث يمكن خلط أجزاء من DNA المراد إدخالها داخل الليبوسوم مع حويصلات صناعية صغيرة مكونة من الدهون وهذه الحويصلات يمكن أن تلتف حول الجزيء وتحتويه بداخلها . هذه الحويصلات الصناعية تسمى ليبوسومات وتستخدم في إحتواء RNA أو DNA بداخلها enclosure of DNA or RNA . ثم يتم خلط هذه الليبوسومات مع بروتوبلاست النبات حيث يتم إتحاد بين هذه الليبوسومات وبروتوبلاست النبات وبذلك ينقل DNA إلى المادة الوراثية لبروتوبلاست النبات . ومن هذا البروتوبلاست يمكن عمل نبات كامل .

٥ - إتحاد مباشر بين بروتوبلاست النبات مع البكتريا المحولة transformed bacteria أو sphaeroplasts بكتيرييه . والأخيره عباره عن بروتوبلاست خلايا بكتيرييه تحتوى بلازميد Ti يحمل جينات غريبه مرغوبه مطلوب نقلها .

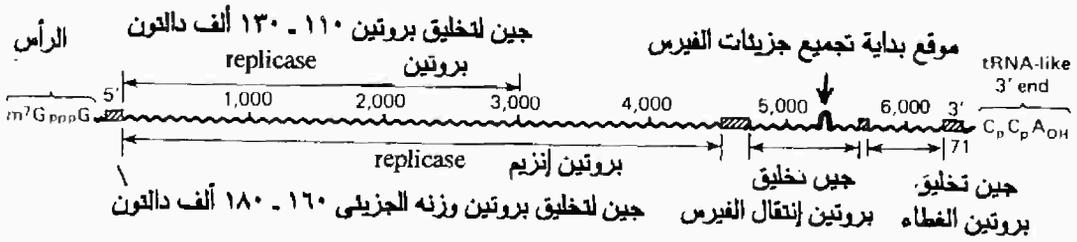
البيولوجيا الجزيئية لفيروس تبرقش التبغ (TMV)

يوجد لكل جزئيات الفيروس غطاء من البروتين ووظيفته الرئيسية هي حماية المادة النووية للفيروس. يعتبر البروتين خامل من الوجهة المرضية حيث أنه منفردا غير قابل على إصابة الخلية والعكس صحيح للمادة النووية التي يتكون منها الفيروس فهي قادرة بمفردها وبدون وجود البروتين على إصابة الخلية وحدث المرض وتنطبق القاعدة على كل من RNA أو DNA. ولكن وجود البروتين في جزيئ الفيروس يساعد على كفاءة الإصابة بالمادة النووية ولكنه يعتبر عامل غير محدد في الإصابة. حيث أن الإصابة متوقفة تماما على المادة النووية. ولذلك يمكن أن تعتبر هذه وظيفة أخرى للبروتين. وبالتالي فإن بروتين الفيروس ليس له أي دور في تضاعف المادة النووية في داخل الخلية المصابة وأيضا ليس له دور في تكوين المادة النووية وبروتين جزيئ الفيروس في الخلية المصابة وأن الأساس في ذلك هو بالطبع المادة النووية للفيروس الموجودة بداخل الخلية المصابة. بعض الفيروسات يوجد في تركيبها بروتين إنزيم RNA transcriptase وهو لازم للإصابة وتكاثر الفيروس. ولذلك فإن المادة النووية للفيروس تحمل جينات وهي تتكون من تتابع للنوكليوتيدات في مناطق معينة محددة ويسمى تتابع النوكليوتيدات في منطقة معينة محددة بالسسترون cistron. تحدد هذه الجينات خواص بروتين والأحماض النووية المكونة للفيروس وذلك عن طريق الشفرة وهي تماثل الشفرة في النبات والحيوان.

تحدد كمية RNA الموجودة في الفيروس عدد النوكليوتيدات المكونة للمادة النووية وبالتالي فإنها تحدد طول جزيئ RNA. وبالتالي فإن هذه النوكليوتيدات تحدد عدد الشفرات في جزيئ RNA الفيروسي وبالتالي تحدد هذه الشفرات عدد الأحماض الأمينية الداخلة في تركيب بروتين الفيروس. وحيث أن تحت وحده البروتين protein subunit في الفيروس تحتوي على عدد قليل من الأحماض الأمينية وهي ١٥٨ حامض أميني في فيروس موزايك التبغ ولذلك فإن عدد الكودونات المستعملة في تخليق هذا البروتين جزء من مجموع الكودونات الكلي. ولذلك فإنها في فيروس تبرقش (موزايك) الدخان هي ١٥٨ كودون من المجموع الكلي وهو ٢١٣٠ كودون. ولذلك فإن بقية الكودونات تستخدم إفتراضا في تخليق أنواع أخرى من البروتين ومنها البروتين التركيبي والأنزيمات وأحد هذه الأنزيمات هو RNA

polymerase ويسمى أيضا بأسماء أخرى وهي RNA synthetase و RNA replicase وهو المسئول عن تضاعف RNA الفيروس. وبالطبع فإن المادة النووية للفيروس الموجودة في خلية العائل تتحكم في التفاعلات الحيوية في الخلية وتسخرها لصالح تكوين بروتين والمادة النووية للفيروس. ومما هو جدير بالذكر أن التركيب الجزيئي وتتابع الأحماض الأمينية في بروتين غلاف جزيئ فيروس بترقش التبغ قد عرف بالتفصيل على مستوى البيولوجيا الجزيئية molecular biology في النصف الثاني من السبعينيات.

يتكون جينوم genome فيروس تبرقش التبغ من ستة آلاف وأربعمائة نيوكليوتيد. يوجد أربعة جينات تنتج 4 أنواع مختلفة من البروتين حيث أنها تختلف في وزنها الجزيئي وأحد هذه الجينات ينتج بروتينات تتراوح أوزانها الجزيئية بين مائة وعشر ألف ومائة وثلاثون ألف دالتون. والجين الثاني ينتج بروتين يتراوح وزنه الجزيئي من مائة وستون ألف إلى مائة وثمانون ألف دالتون والجين الثالث ينتج بروتين وزنه الجزيئي ثلاثون ألف دالتون والجين الرابع ينتج بروتين وزنه الجزيئي سبعة عشر ألف دالتون. يستعمل البروتين الأول والثاني وهما ذات أوزان جزيئية مرتفعة في عمل إنزيم أو أنزيمات الفيروس (s) viral replicase . ويعتقد أن البروتين الثالث يسهل انتقال جزيئ الفيروس من خلية نبات إلى الخلية المجاورة وهكذا ويكون ذلك عبر خيوط البلازمودينز ماتا والتي تصل الخلايا النباتية الحية ببعضها. يكون البروتين الرابع الغلاف أو الغطاء coat البروتيني للفيروس. يوجد على الجينوم أجزاء غير معروف وظيفتها حتى الآن وهي أربعة أجزاء قصيرة ويعتقد أنها تشمل على إشارات لبدء عملية التخليق signals for initiation وأيضا للتهيؤ promotion وأيضا لخاتمة عملية الترجمة termination of translation . موضع الجينوم وحيث يحدث عنده تجميع للبروتين assembly المكون للغطاء أو الغلاف وينتج عن ذلك جزيئ فيرس متكامل هو الموقع 5 وهو القمة cap والموقع 3 وهو النهاية ويسمى 3' end - like tRNA . كما أن موقع بداية تجميع جزيئات الفيروس موجوده على الجزيئ (شكل ١٤١).



(شكل ١٤١) : جزيء RNA فيروس تبرقش التبغ. يتميز إلى أربعة جينات وكل جين يكون نوع معين من البروتين له وزن جزيئي معين ويوجد أربعة أجزاء قصيرة (مخططة) لا تشترك في تكوين البروتين وغير معروف وظيفتها بالضبط ويعتقد أن لها دور في بداية وتهيئة التخليق وأيضاً في نهاية وخاتمة عملية التخليق. الموقع 5 هو الرأس ومكان لتجميع بروتين غلاف الفيروس وهو cap أما الموقع 3 فهو لتجميع بروتين الفيروس ويسمى الموقع 3' end - like tRNA. الأرقام من ألف إلى ستة آلاف هي عدد النيوكليوتيدات.

أمراض النبات والتكنولوجيا الحيوية : البداية

Biotechnology and Plant Pathology : The Beginning

تم الآن إستعمال بلازميد Ti و T - DNA ثم فيروس تبرقش القنبط وفيروسات أخرى وكائنات شبيهه بالفيروس في هذا المجال. توجد بحوث كثيرة ومعامل كثيرة في أنحاء العالم تقوم بدراسة ونقل وعمل خزائن للجينات على المادة الوراثية في الكثير من البكتيريا المسببة أمراض للنبات. توجد دراسات مشابهه للكشف عن عدد وأنواع والقدرة على عمل تفاعلات معينة لجينات كثير من الفيروسات المسببة لأمراض النبات. ولكن بالنسبة للفطريات فقد إبتدأ الآن فقط العمل في نقل cloning جينات الفطريات المسببة لأمراض النبات وذلك لدراسة تركيبها وقدرتها على عمل التفاعلات الحيوية وأنواعها وقدرتها على تنظيم هذه التفاعلات. وعند التعرف على جينات الطفيل وعزلها ونقلها والتعامل معها معملياً بكفاءة عالية manipulate them فإنه يمكن تحويلها وتغيير تركيبها ونقلها إلى النبات العائل ودراسة طبيعة العلاقة بين

هذه الجينات المنقولة والمحورة وجينات العائل وبالتالي تثبيط هذه الجينات أو معادلتها لوقاية النبات من أضرارها أو تستعمل في وقاية النبات من سلالات الطفيل شديدة القدرة على الإصابة. يمكن أن يكون ذلك باستعمال سلالات الكائنات الحية الدقيقة والمنقولة إليها جينات مثبتة بنثرها على سطح النبات وبذلك فإنها تضاد السلالات الممرضة وذلك عن طريق التضاد antagonism وبذلك تبقى النبات من الإصابة وتكون هذه إحدى حالات المقاومة الحيوية biological control لمسببات أمراض النبات.

ومن وجهه النظر الأخرى بعيدا عن مسببات أمراض النبات فإن الدراسة تنصب على العائل للتعرف على طبيعة المقاومة في النبات العائل وكيف أن جينات النبات العائل تعبر express عن ذلك أى ميكانيكية عمل الجين أو الجينات والتفاعلات الحيوية المختلفة الخاصة بهذه الجينات لكي يصبح النبات مقاوم. وبذلك تصبح للتكنولوجيا الحيوية دور رائع في ذلك أى في مجال مقاومة أمراض النبات. وغير معروف بالضبط ما هو نتيجة هذه الدراسات ولكن الأمل كبير في ذلك.

توجد علاقة كبيرة بين التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية في مجال أمراض النبات ولذلك أمثلة كثيرة وأهمها ما يأتي. نقل جين المقاومة لمرض الدرن التاجي إلى نبات التبغ. نقل الجين الخاص ببروتين غطاء أو غلاف coat protien جزئى الفيروس المسبب لمرض موزايك التبغ إلى نبات التبغ وبذلك تصبح هذه النباتات مقاومة لهذا الفيروس وطبيعية مقاومة النبات العائل في هذه الحالة غير معروفة ولكن يعتقد أنها نوع من cross protection أى المقاومة نتيجة التلقيح بسلالات مختلفة من الطفيل. أمكن نقل مقاومة مرض ألتفاف أوراق البطاطس وذلك بواسطة تزاوج البروتوبلاست protoplast fusion وذلك نتيجة للتزاوج بين بروتوبلاست أنواع بطاطس برية لانتج درنات بطاطس وتحمل جين أو جينات المقاومة وبروتوبلاست أصناف البطاطس العادية القابلة للإصابة. يستعمل فيروس موزايك البروم brome mosaic virus في نقل DNA غريب عن النبات في بروتوبلاست نبات الشعير وبذلك أمكن لـ DNA المنقول أن يعبر عن وجوده express في بروتوبلاست الشعير أى أنه نشط في عمل التفاعلات الكيموحيوية الخاصة به والتي تظهر الصفة أو الصفات الخاصة به. وبذلك أصبح هذا الفيروس وهذا البروتوبلاست عامل نقل فعال powerful vehicle لنقل الجينات إلى

نباتات ذوات الفلقة ونباتات ذوات الفلقتين. يمكن للنباتات المهندسة وراثيا أن تصبح مقاومة للمضادات الحيوية التي تقاوم بعض مسببات أمراض النبات ولذلك فإنها لا تتأثر بتأثير ضار عند استعمال هذه المضادات الحيوية في مقاومة أمراض النبات. ترش بعض البكتيريا المهندسة وراثيا وأيضا بعض الفاج والفيروسات المهندسة وراثيا على النباتات لتمنع ضرر الصقيع. تباع تجاريا الآن أجسام مضاده monoclonal antibodies لكثير من البكتيريا والفيروسات المسببة لأمراض للنبات وذلك للتعرف بسهولة وبسرعة على هذه الطفيليات. تستخدم إختبارات التهجين بين الأحماض النووية nucleic acid hybridization للتعرف على الفيرويدات وأيضا تشخيص أمراضها ويوجد لذلك أيضا تجهيزات لذلك تباع تجاريا test kits للتعرف على الفيرويدات وتشخيص أمراضها بسهولة وبسرعة.

هذه هي بعض الأنجازات في مجال التكنولوجيا الحيوية ولا زلنا في إنتظار إنجازات الغد.

ملخص تاريخى عن التقنية الحيوية وأمراض النبات

كانت البكتيريا ديبلوكوكس نيومونى *Diplococcus pneumoniae* موضع دراسة مستفيضة قام بها العالم البكتريولوجى جريث Griffith عام ١٩٢٨. توجد من هذه البكتيريا التى تسبب مرض الالتهاب الرئوى فى كثير من الحيوانات سلالات قادرة على إحداث إصابة، يطلق عليها سلالات نشطة virulent وأخرى خاملة avirulent لا تحدث إصابة، تختلف السلالة النشطة عن الخاملة فى صفة مورفولوجية ظاهرة هى أن بكتيريات السلالة النشطة مغطاه بغلاف capsule نوسطح ناعم، لذلك يطلق عليها لمساء smooth ، ويرمز إليها بحرف (S) ، فى حين أن السلالة الخاملة عديمة الغلاف خشنة السطح rough ويرمز إليها بحرف (R) . توجد من البكتيريات الملساء (S) (النشطة) طرز كثيرة من بينها الطرزان S_{11} و S_{111} ويختلفان عن بعضهما فى التركيب الكيماوى للمركب عديد السكريات الذى يتكون منه الغلاف. كما يوجد كذلك من السلالة الخشنة طرز يعرف R_{11} . تنتقل الصفات الخاصة بكل طرز من S_{11} و S_{111} و R_{11} إلى نسله بحالة نقيه بالتكاثر الخضرى، مما يدل على أنها صفات وراثية ترجع إلى التركيب الخاص بكل طرز. تظهر أحيانا فى هذه الطرز طفرات تحولها من طرز إلى آخر منها أو إلى غيرها، طفرة فى كل نحو ٧١٠ أفراد، فالطرز S_{11} مثلا يطفر إلى S_{111} أو R_{11} وهكذا، مما يشير إلى أن هذه الصفات الليلية متبادلة لمكان locus وراثى واحد. فإذا حقن فأر مثلا بأحد السلالات النشطة ظهرت عليه أعراض الإصابة بالالتهاب الرئوى، أما السلالات الخاملة فلا تسبب إصابة بهذا المرض. غير أنه قد وجد أنه إذا حقن فأر بسلالة خاملة مع بكتيريات نشطة غير حية، بعد قتلها بالتسخين، تظهر على الحيوان أعراض المرض، وبفحص البكتيريات فيه وجد أنها تحتوى على سلالات نشطة.

يستنتج من ذلك أن اختلاط السلالتين في جسم حيوان عائل أدى إلى تحول أحدهما تحولا وراثيا من صفة إلى اليلتها، من صفة الخمول إلى النشاط، أو صفة سلالة خشنة إلى ملساء حتى لو كانت السلالة الواهبة - وهي هنا البكتيريات النشطة - بكتيريات ميهة (شكل ١٤٢) .

نوع الخلايا المحقونة

النتيجة



خلايا مغلقة



مرض وموت الفأر



خلايا غير مغلقة



لم تحدث عدوى



خلايا مغلقة ومقتولة بالحرارة



لم تحدث عدوى



خلايا حية



خلايا مقتولة بالحرارة



مرض وموت الفأر

عزل خلايا حية ومغلقة من الفأر



(شكل ١٤٢) : التحول الوراثي في *Pneumococci*

بعد نحو ١٦ عاما من دراسة جريفت، أى فى عام ١٩٤٤ ، أعاد أفيرى Avery وزملاؤه ماكلويد، وماك كارتى Macleod & McCarty التجريه السابقه، ولكن كان اختلاط السلالة الخامله الحيه بالسلاله النشطه الميتة فى بيئه medium خارج جسم الحيوان العائل، فتحوالت بعض البكتيريات غير النشطه R₁₁ إلى بكتيريات نشطه بإختلاطها بالطرز S₁₁₁ النشط. كان هذا دليلا على أن السلاله غير النشطه ينقصها مركب خاص حتى تتحول من الطرز الخامل إلى الطرز النشط، فتحوالت من الخمول إلى النشاط بعد حصولها عليه من الخلايا النشطه المقتوله. وقد تأيد هذا الاستنتاج عندما وجد أن إضافة (ح د ن،) مستخلص من الطرز الثلاثه السابقه إلى مزرعه ينمو فيها طرز آخر، يحدث التحول الوراثى تماما كما حدث فى حاله الجمع بين البكتيريات نفسها. ويكون التحول وفق طرز البكتيريا التى استخلص منها (ح د ن،) المضاف إلى البيئه. كذلك امتدت التجريه إلى إحداث التحول الوراثى بين الطرزين S₁₁ و S₁₁₁ ، اللذين يختلفان عن بعضهما فى نوع المركب الكربوهيدراتى عديد السكريات الموجود فى الغلاف، مما يشير إلى أن نوع المركب عديد السكريات يرجع إلى عامل وراثى، أى إلى جين مكون من (ح د ن،) وأن نوعى المركب عديد السكريات صفتان الليليتان مثل الصفتين S₁₁ و S₁₁₁. مما يؤيد أن (ح د ن،) هو الماده التى تحدث التحول الوراثى، هو أنه إذا عومل بإنزيم ديزوكسى ريبونوكلييز قبل إضافته إلى البيئه فإنه لا يحدث التحول فى البكتيريات الناميه فيها، لأن الإنزيم يحلل (ح د ن،) ويعطل تأثيره كما أن إضافة البروتين الموجود فى البكتيريا الواهبه، بدلا من (ح د ن،) لا يحدث تحولا وراثيا. وكان ذلك أول دليل علمى على أن DNA يحمل معلومات أو صفات وراثيه.

قام هيرشى وشيس Hershey and Chase عام ١٩٥٢ بإقامه الدليل على أن ما يدخل البكتيريا العائل من جسم الفيروس هو رأسه المكون من (ح د ن،) وأن الذنب المكون من البروتين يبقى فى الخارج، وذلك باستعمال عناصر مشعه مميزه لكل من (ح د ن،) يحتوى على فوسفور ولا يشمل الكبريت فى حين أن جزئى البروتين الموجود فى الفيروس يشمل الكبريت ولا يشمل الفوسفور. فإذا نما فيروس على مزرعه بكتيرية تحتوى على ك^{٣٥} كان ذيل الفيروس مشعا. فإذا أصاب هذا الفيروس بكتيريات غير مشعه تبين أن ذيل الفيروس المشع يبقى خارج البكتيريات المصابه ولا يدخلها. إذا أجريت مثل هذه التجريه باستعمال

فوسفور مشع فور^{٣٢}. تبين أن المادة المشعة هي التي تدخل البكتيريا العائل. وهو ما يدل على أن ح د ن، وحده هو الذى ينتقل كما هو من جيل إلى آخر.

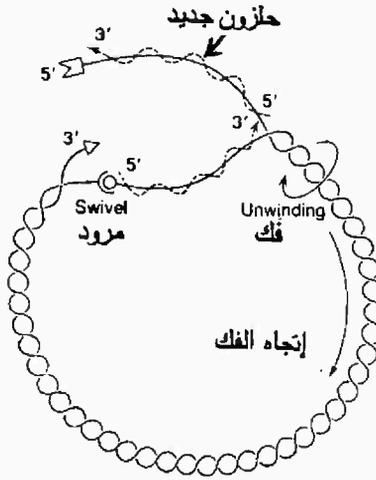
غير أن الفيروسات التى تصيب النباتات تحتوى على حامض ريبونوكلييك، بدلا من ديزوكسى ريبونوكلييك، مثل فيروس تبرقش التبغ tobacco mosaic virus، وهو مكون من جزيئ ح ر ن، حلزوني الشكل ويحاط بمركب البروتين. أمكن فصل هذين المركبين عن بعضهما بحالة نقية، واختبار مقدرة كل منهما على إحداث عدوى فى نبات تبغ سليم، فبين أن ح ر ن، وحده هو الذى يحدث الإصابة، ويتكاثر داخل النبات العائل مكونا فيروسات جديدة تحتوى على ح ر ن، وبروتينات، وتحمل الفيروسات الجديدة صفات الفيروس الأصلى وتحدث نفس الأعراض إذا أصابت نباتا عائلا.

يوجد فى البكتيريا د. نيومونى سلالتان أخريتان، إحداهما مقاومة للمضاد الحيوى سترپتومايسين streptomycin - وهو مضاد لنمو بعض البكتيريا - فيطلق عليها مقاومة للسترپتومايسين، (SR) streptomycin resistant، (م . س) والأخرى حساسة له ويطلق عليها حساسة للسترپتومايسين، (ح . س) (SS) streptomycin sensitive . تنتقل هذه الصفة من البكتيريا إلى نسلها كصفة وراثية. إذا أصيب ح د ن، مستخلص من بكتيريا مقاومة سترپتومايسين (م . س)، إلى بيئة بكتيريا حساسة (ح . س). تحولت بعض البكتيريا الناتجة فى المزرعة إلى مقاومة. أجريت دراسة التحول الوراثى فى أنواع أخرى من البكتيريا، من بينها البكتيريا باسيلوس سابتيليس *Bacillus subtilis* . تستطيع سلالة منها أن تنمو فى مزرعة تحتوى على الحامض الأمينى تريبتوفان ، ويطلق عليها ذاتية التريبتوفان tryptophan independent ، فى حين توجد سلالة أخرى ينجم وجوده فى غذائها فيطلق عليها ناقصة التريبتوفان tryptophan dependent . فالأولى يمكنها بناء هذا الحامض فى خلاياها، أما الثانية فلا يمكنها بناؤه وتعتمد فى حصولها عليه من مصدر خارجى من البيئة. هاتان الصفتان وراثيتان الليليتان. وقد تبين أن إضافة ح د ن، مستخلص من السلالة الذاتية التريبتوفان إلى مزرعة من السلالة الناقصة إليه، تحول كثيراً من بكتيريا هذه المزرعة إلى بكتيريا ذاتية التريبتوفان.

استعمل الفوسفور المشع ^{32}P في تتبع انتقال ح د ن، من البكتيريا الواهبة التي تحدث التحول، إلى البكتيريا المستقبلة التي يحدث فيها التحول، وذلك بإضافته إلى المزرعة الواهبة واستخلاص ح د ن، المشع منها ثم إضافته إلى مزرعة مستقبلة فانقل الفوسفور المشع إليها وحدث التحول الوراثي إلى صفة البكتيريا الواهبة. قد يتبادر إلى الذهن أن جزئيات ح د ن، التي تحدث التحول الوراثي تعمل كحافز على ظهور طفرة في البكتيريا المستقبلة recipient . لكن الدليل على أن ما يحدث هو تحول وراثي حقا، وليس طفرة، هو أولاً، أن التحول يحدث نتيجة دخول ح د ن، جديد من البكتيريا الواهبة، كما يتبين بوضوح من تجربة الفوسفور المشع، وثانياً، أن التحول يكون فقط إلى الصفة التي تأتي من الواهب، وليس إلى أى طفرة جديدة.

أما عن طريق إنقسام الكروموسوم البكتيري في البكتيريا *E. coli* فقد تمكن كيرنس Cairns عام ١٩٦٣ من وضع أسس إنقسام هذا الكروموسوم. حيث أن تضاعف الكروموسوم يبدأ عند منطقة معينة في محيط الكروموسوم ثم يحدث فك لحلزونى الكروموسوم تدريجياً ويحدث في نفس الوقت تضاعف لكل شريط وهكذا تحدث عملية الفك والتضاعف تدريجياً حتى يتم تضاعف الكروموسوم تماماً. وملخص هذه العملية أنه يحدث كسر في أحد حلزونى DNA عند منطقة معينة تسمى منطقة البداية initiation site ثم يحدث فك لحلزونى DNA تدريجياً وفي نفس الوقت يتضاعف DNA (شكل ١٤٣).

أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء أنقسام الخلايا تنفصل الأنويه المنقسمة أى المادة النووية عن بعضها أى تتباعد عن بعضها. يلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخلية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيوان العادية eucaryotes . حيث أن انفصال الكروموسوم فى خلايا النبات العادية أثناء الأنقسام يحدث نتيجة لأتصال سنترولين الكروموسوم ببعض خيوط المغزل وهى عبارته عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكش هذه الخيوط أو الأنابيب فى اتجاه أحد قطبي الخلية وبذلك تتباعد الكروموسومات عن بعضها متحركة فى اتجاه أحد قطبي الخلية أثناء الطور الأنفصالي . هذه الخيوط وهذه الأنابيب غير موجودة فى الخلية البكتيرية فكيف يحدث الأنفصال بين الكروموسومين فى الخلية البكتيرية؟. وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب ويريندر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin



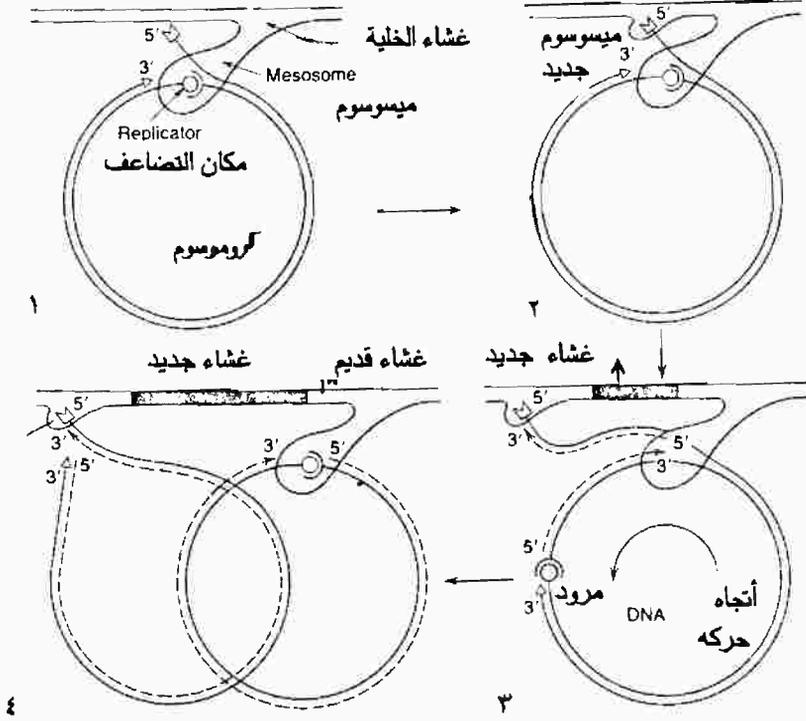
(شكل ١٤٣) : تضاعف DNA حلقي

الخط العادي حلزون DNA قديم

الخط المتقطع حلزون DNA جديد

عام ١٩٦٣. نظرية التضاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيري (شكل ١٤٤) وهي كما يلي :

١ - عندما يبدأ تضاعف الكروموسوم البكتيري فإن منطقة معينة specific site على محيط الكروموسوم ترتبط بمنطقة معينة على الميسوسوم mesosome تسمى منطقة التضاعف replicator site . يتكون الميسوسوم نتيجة لأنبعاغ غشاء الخلية المبطن للجدار للداخل cell membrane كما أنه يتداخل مع بعضه مرات عديدة ليكون كتله من الأغشية تسمى الميسوسوم . وفي منطقة التضاعف تنشط الأنزيمات المسؤولة عن كسر وتضاعف حلزوني DNA مثل إنزيم بلمره الـ DNA polymerase . وفي هذه الأثناء ينكسر أحد حلزوني DNA عند الموقع 5' إلى 3' وتعمل منطقة التضاعف replicator site على فك حلزوني DNA مبتدئا من مكان الكسر أو القطع ويزداد تدريجيا على طول الكروموسوم . تعمل منطقة التضاعف في هذه الحالة كمروود swivel .



(شكل ١٤٤): تضاعف الكروموسوم البكتيري

- ١ - إتصال الكروموسوم بغشاء الخلية ومكان التضاعف وكسر أحد حلزوني الـ DNA .
- ٢ - إتصال أحد طرفي الحلزون المقطوع 5' بغشاء الخلية في منطقة ميسوسوم جديد.
- ٣ - فك حلزوني DNA وحركة الكروموسوم في إتجاه عكس عقرب الساعة وبناء حلزونين جديدين. الحلزون القديم بخط عادي والحلزون الجديد بخط متقطع. كبر مساحة سطح الغشاء وهي منطقة غامقة.
- ٤ - تكوين كروموسومين جديدين مع كبر مساحة سطح الغشاء وبذلك تزداد المسافة بين الكروموسومين (منطقة غامقة).

٢ - بعد قطع أحد حلزوني DNA فإن أحد طرفي الحلزون المقطوع ⁵ يتصل بمنطقة تضاعف أخرى مجاورة لمنطقة التضاعف الأولى وذلك قبل حدوث تضاعف لحلزوني DNA. أى يحدث الألتحام بين الطرف المقطوع ومنطقة التضاعف قبل بدء حدوث التضاعف.

٣ - تحدث بداية فك حلزوني DNA فى منطقة التضاعف. وأن التفاعل المسئول عن فك حلزوني DNA يبدأ من منطقة التضاعف وأيضا الأنزيمات المسئولة عن تضاعف حلزوني DNA أثناء الانفصال تبدأ من منطقة التضاعف replication fork. وأثناء عملية فك وتضاعف DNA يتحرك الكروموسوم حركة دائرية فى عكس اتجاه عقارب الساعة. وتتحرك أيضا منطقة التضاعف والتي تعمل كمروود ويتضاعف الكروموسوم.

٤ - ينفصل الكروموسومين عن بعضهما نتيجة لتخليق أجزاء فى الغشاء بين موضع الألتصاق الأول وموضع الألتصاق الثانى الجديد. أى أن الغشاء يستطيل بين موضعى الألتصاق. ونتيجة لتخليق مركبات جديدة ونتيجة لزيادة فى طول الغشاء تزداد المسافة بين موضعى الألتصاق ويتباعد الكروموسومان الجديدان عن بعضهما.

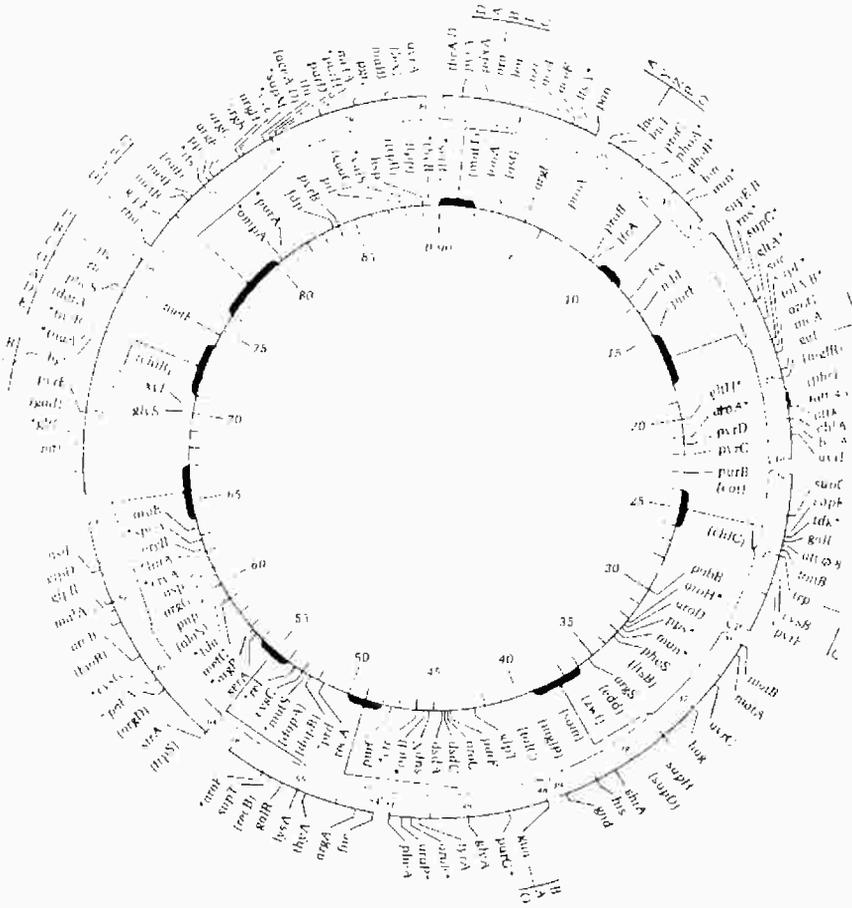
أمكن إثبات كثير من خطوات هذه النظرية فيما بعد. حيث أمكن بواسطة المجهر الألكترونى إثبات إلتصاق منطقة معينة على الكروموسوم بغشاء خلية البكتريا. أمكن إثبات أيضا وجود إرتباط كبير بين غشاء خلية البكتريا و DNA المخلق الجديد وذلك بإستعمال DNA مشع حيث يتم تعليم الثيميدين ³H thymidine. وجد أيضا أن أنزيم بلمره DNA أى DNA polymerase مرتبط بأغشية خلية البكتريا.

أما عن طريقة عمل الخرائط الكروموسومية فى خلايا البكتريا فإنه يمكن وصف ذلك فى البكتريا إشيرشياكولاي *E. coli*. عندما يوجد فى الخلية الذكرية العامل F أى F factor ملتصق بالكروموسوم فإن النزاوج يحدث وينتقل جزء من الكروموسوم من الخلية المذكره إلى الخلية المؤنثة. يكون إنتقال الكروموسوم من الخلية المذكره إلى الخلية المؤنثة بطيئ. وفى الظروف العادية ينتقل جزء فقط من الكروموسوم ولا ينتقل الكروموسوم كله إلى الخلية المؤنثة. يظهر فى النسل الصفات الذكرية المنقولة فقط. يكون النسل الناتج عادة مؤنث لأنه نادرا ما ينتقل

F factor إلى الخلية المؤنثة وهو في حالة كروموسوميه. يمكن منع إنتقال الكروموسوم أثناء التزاوج بواسطة الرج الشديد. ولو أجرى الرج ميكرا فإن جينات ذكرية قليلة ستنقل للأنتى وكلما تأخرت عملية الرج كلما إنتقلت جينات أكثر وهكذا. توجد سلالات ذكرية كثيرة وكل سلالة ذكرية لها كروموسوم واحد وأول جين موجود على الكروموسوم يكون واحد كما أن ترتيب الجينات على الكروموسوم واحد. وأول جين موجود على الكروموسوم هو أول جين ينتقل إلى الخلية المؤنثة. تختلف السلالات الذكرية فيما بينها حيث أن أول جين على الكروموسوم غير متماثل أو ترتيب الجينات غير متماثل أو كلاهما. ولذلك عند وجود مجموعة من السلالات فإن الصفات التي ستنقل ستختلف. بفحص هذه الصفات وتحديدتها يمكن تحديد صفات الكروموسوم في كل سلالة.

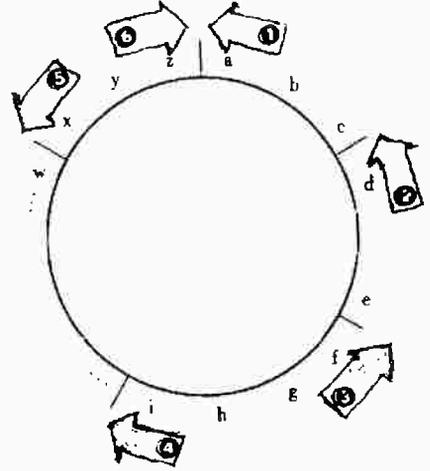
يحمل الكروموسوم البكتيري جينات (شكل ١٤٥) وسيتم لهذه الصفات لتسهيله بالحروف الأبجديه من A إلى Z (شكل ١٤٦). عند قطع الكروموسوم في المكان 1 فإن العوامل الوراثية أى الجينات المنقلة هي بالترتيب a ثم b ثم c ثم d ثم e وبذلك يكون الأنتقال في عكس إتجاه عقارب الساعة وإذا كان القطع في المكان 6 فإن الجينات المنقلة تكون z ثم y ثم x ثم w ثم v أى يكون الأنتقال في إتجاه عقارب الساعة وفي حالة القطع في المكان رقم 2 فإن الجينات المنقلة تكون d ثم e ثم f ثم g ثم h وفي حالة القطع في المكان رقم 3 فإن الجينات المنقلة تكون f ثم g ثم h ثم i ثم j وهكذا. عادة يحدث إنتقال لعدد قليل من الجينات يتراوح بين ثلاثة إلى خمسة جينات. وبذلك يمكن تحديد صفات الكروموسوم البكتيري في السلالات المختلفة.

يعتبر DNA جزيئ يكرر نفسه ذاتيا self-replicating ويوجد في صورته جزيئ طويل يحتوى ملايين من أزواج النيوكليوتيدات في الكروموسوم وقد يوجد في صورته أصغر حيث يحتوى على آلاف أو مئات الآلاف من أزواج النيوكليوتيدات في البلازميدات. يمكن أن تنتقل بعض البلازميدات في داخل الخلية وتلتحم بالكروموسوم وتصبح جزء منه وذلك في نفس الخلية ونفس العائل ويمكن أن يكون أكثر من ذلك أنها يمكن أن تلتحم بكروموسومات أى صيغيات عائل آخر. تحتوى الفيروسات على DNA أو RNA، ويمكن أن تعبر عن expression



(شكل ١٤٥) : خريطة كروموسومية للبكتريا *E. coli* K12. توجد في الحلقة الداخلية وحدات أرقام هي عبارته عن الزمن النسبي اللازم لدخول الجينات المعروفة المعلمة markers أثناء التزاوج الجنسي بين البكتريا على درجة حرارته ٣٧م. تم افتراض منطقة الصفر عند الجين thr D. الأجزاء السوداء على الخريطة موضحة بالتفصيل داخل قوس وفيها الجينات محدده في أماكنها تقريبا والزمن اللازم أيضا مدون لها وأما عن الجينات ذات النجمة فهي معلمة ومحدده أماكنها بدقه على الخريطة. توضح الأسهم إتجاه نسخ mRNA بالنسبة لكل جين.

الأجزاء المنتقلة من الكروموسوم لكل مكان قطع



(شكل ١٤٦) : كروموسوم بكتيري والتزاوج

كروموسوم بكتيري مبسط وأماكن قطع مختلفة على الكروموسوم من رقم ١ إلى رقم ٦ ويرمز للجينات المختلفة على الكروموسوم البكتيري بالحروف الأبجدية وذلك للتبسيط.

تركيبها الجيني بواسطة mRNA خاص بكل جين. أكتشف هاملتون Hamilton عام ١٩٧٠ أول أنزيم قطع لجزيئ DNA restriction nuclease وهو أنزيم يقوم بقطع جزيئ DNA في أماكن معينة بعد تتابع نيوكليوتيدات معينة. تمكن كل من بوير وكوهين Cohen و Boyer عام ١٩٧٣ من إدخال جينات غريبة إلى البلازميد ثم إدخال البلازميد في خلايا البكتريا وهذه الخلايا الأخيره بدورها تتكاثر ونتيجة لذلك يتكاثر أيضا الجين الغريب الذي يحمله البلازميد وهذه الخطوات المختلفة تسمى gene cloning . أمكن إدخال جين من الثدييات في DNA الفاج وذلك لأول مره عام ١٩٧٥. وفي نفس العام أمكن الحصول على خليه هجين a hybrid cell بين خليه طحال spleen cell قادره على تكوين أجسام مضاده antibody - producing spleen cell وخليه ورم سرطاني tumor cell تنقسم تلقائيا بدرجة ملحوظه. تسمى الخليه الهجين الناتجة hybridoma وهذه الخليه تكون نوع واحد من الأجسام المضاده monoclonal باستمرار. وأمكن التعرف على تتابع أزواج النيوكليوتيدات في جزيئ DNA هذه الخليه الهجين بواسطة أنزيمات

القطع restriction enzymes . تمكن Sanger ومساعدوه عام ١٩٧٧ من معرفه تركيب وتتابع ٥٣٨٦ زوج من النيوكليوتيدات فى DNA الفاج المعروف باسم ϕ X 174 . وفى نفس العام أيضا أكتشف أن جزيئى DNA فى النواه توجد فيه أجزاء عباره جينات وأجزاء أخرى ليست جينات ولذلك فإن الجينات المختلفة لا تكون مستمره على جزيئى DNA بل تنفصل إلى أجزاء نتيجة لوجود أجزاء DNA غير جينية non gene DNA . وفى نفس السنة أيضا أكتشف لأول مره تتابع كامل للنيوكليوتيدات لأحد جينات الثدييات وهو جين خاص بالجلوبين globin . ولأول مره فى عام ١٩٧٩ أمكن إدخال DNA غريب فى DNA خليه كائن حقيقى النواه وهى خليه فطر الخميره . ولأول مره فى عام ١٩٨٠ أمكن إدخال جينات غريبة فى نواه خلايا الثدييات وذلك فى الفيران وأيضا أظهرت هذه الجينات خواصها expressed فى خلايا الفيران .

يعتبر ما سبق إضافات فى علم الهندسة الوراثية ويوجد أيضا إضافات فى علم مزارع الأنسجة وفيما يلى موجز لذلك . يعتبر عام ١٩٣٤ هو بداية علم مزارع الأنسجة عندما تمكن هوايت White من فصل القمه النامية لجذور الطماطم وتنميتها على بيئه سائلة ونتج عن ذلك جذور عادية . تمكن هوايت وآخرون عام ١٩٣٩ من الحصول على مزارع صناعية لنسيج الكالس من نخاع ساق الدخان وأيضا من جذور الجزر . تمكن بول Ball عام ١٩٤٦ من قطع القمه النامية للساق وزراعتها على بيئه صناعية وأنتج منها نبات كامل . أمكن إثبات عام ١٩٥١ أن قطع القمه النامية للساق بطول ١٠٠ إلى ٢٥٠ ميكرون وتحمل بدائيات ورقتين خضريتين فقط يمكن أن يتكون منها نبات كامل . تمكن Muir عام ١٩٥٣ من فصل خلايا مفردة من نسيج الكالس وأمكن تنميه هذه الخلايا المنفرده . أثبت ستوروات Stewart عام ١٩٥٨ أن معلق خلايا الجزر carrot suspension cultures يمكن أن يزرع على بيئات صناعية وينتج منه أشباه أجنة embryoid أى أنه لأول يمكن إنتاج أجنه من خلايا خضريه غير تناسليه . تمكن كوكنج Cocking عام ١٩٦٠ من الحصول على بروتوبلاست خلايا النبات وذلك نتيجة لمعامله جدر الخلايا بأنزيمات هاضمه أى محله لجدر الخلايا . تمكن تاكيبا Takeba ومساعدوه عام ١٩٧١ من إنتاج نبات كامل من بروتوبلاست خلايا النسيج الوسطى أى الميزوفيل لنبات التبغ . تمكن جوها Guha عام ١٩٦٦ من الحصول على نبات أحادى haploid من حبوب اللقاح .

وفي مجال التطبيق للهندسة الوراثية ومزارع الأنسجة بالنسبة لأمراض النبات تستعمل البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجي في كثير من النباتات. يعتبر كلا من هويت وبروان White و Braun عام ١٩٤٢ أول من تمكنا من الحصول على ورم لهذه البكتريا خال من البكتريا قادر على النموذاتيا *autonomously growing* . أستخدمت أيضا مزارع الأنسجة للقمة النامية للساق للحصول على نباتات خالية من الإصابة بالفيروس. أستخدمت مزارع البروتوبلاست في دراسة عمليه الإصابة بالفيروسات وأيضا دراسة تكاثر الفيروسات ودراسة تأثير سموم الطفيليات النباتية على النبات. أستخدم التزاوج بين البروتوبلاست للحصول على هجين مقاوم للأمراض. أستخدمت الهندسة الوراثية في التعرف على طبيعه مسبب تكوين الأورام *nature of the tumor - inducing principal* في حالة بكتريا التدرن التاجي كما أستخدمت الهندسة الوراثية أيضا في التعرف على التركيب الوراثي للبكتريا والفيروس.

يعتبر إستخدام البكتريا *Agrobacterium* وبعض الفيروسات النباتية كمستقبل وحامل وناقل لجينات غريبة ثم نقل هذه الجينات الغريبة إلى النبات سيفتح مجال كبير في عمل تحوير في التركيب الوراثي للنبات *genetic transformations of plants* وبذلك يتم عمل ثوره في التركيب الوراثي للنبات غير معروف مداه ودرجة الأستفاده منه في الوقت الحاضر.

يمكن إستخدام التقنيه الحيويه في إنتاج نباتات مقاومة للأمراض حيث يتم نقل الجين المرغوب فيه من نبات إلى آخر بواسطة طرق التقنيه الحيويه المختلفه وفيما يلي أمثله لذلك:

١ - أستخدام مزارع الأنسجة في أنتاج أعداد كبيره من النباتات مقاومة للأمراض

Tissue culture of disease resistant plants

يمكن أستخدام مزارع الأنسجة في أنتاج أعداد كبيره جدا من نباتات لها نفس التركيب الوراثي ومقاومة للأمراض مثل الشليك والتفاح والموز وقصب السكر والبطاطس والكاسافا *cassava* . حيث يمكن أكتثار النبات المقاوم عن طريق مزارع القمة النامية للساق أو مزارع حبوب اللقاح أو مزارع البروتوبلاست وبذلك يمكن إنتاج كميات هائلة من هذا النبات ذات تركيب وراثي متماثل مرغوب ومقاوم للأمراض.

٢ - عزل طفرات مقاومة للأمراض من مزارع الأنسجة

Isolation of disease resistant mutants from plant cell cultures

عند أستعمال نبات فى مزارع الأنسجة وذلك للحصول على خلايا منفردة أو نسيج كالس أو بروتوبلاست فإن الخلايا المنفردة أو البروتوبلاست تظهر إختلاف واضح فى تركيبها بالرغم من أنها مأخوذة من نبات واحد وتسمى هذه بالأختلافات الجسدية أو الخضرية somaclonal variation . يكون كثير من هذه الأختلافات غير مفيد أوصار ولكن النادر أو القليل منها مفيد . ومثال ذلك نبات البطاطس القابل للأصابة بفطر *Alternaria solani* وفطر *Phytophthora infestans* حيث وجد أن مزارع البروتوبلاست للأوراق أن حوالى خمسة بروتوبلاست لكل ٥٠٠ مقاوم للفطر الأول وحوالى عشرون بروتوبلاست لكل ٨٠٠ مقاوم للفطر الثانى . وجدت أيضا نتيجة مشابهه فى حالة قصب السكر حيث أمكن الحصول على نباتات ذات مقاومه ملحوظة للفطريات *Ustilago* و *Helminthosporium* .

٣ - إنتاج نباتات ثنائية dihaploids من نباتات أحادية haploids مقاومة

Production of resistant dihaploids from haploid plants

يمكن إنتاج نباتات أحادية من حبوب لقاح غير تامه اللصنع immature وأحيانا قليلة يمكن إنتاج هذه النباتات من جرثومة كبيره megaspore أى الخليه التى يتكون منها الكيس الجنينى . وفى هذه الحالة فإن أليل allele لكل جين يعبر عن الصفة بوضوح حيث أن النبات أحادى وبذلك يمكن إكتشاف الصفات بسهولة . ولذلك فإنه يمكن إنتخاب النباتات الأحادية المقاومة للأمراض بسهولة . ثم تجرى مضاعفة لهذا النبات بواسطة الكولشيسين فيصبح ثنائى متمائل تماما فى جميع الصفات dihaploid بما فيها صفة المقاومة وحيث توجد بحالة أصيلة homozygous وهذه ميزه أخرى بالمقارنه عندما تكون صفة المقاومة غير أصيلة أى خليط

heterozygous

٤ - زيادة درجة مقاومه المرض بواسطه تزاوج البروتوبلاست

Increasing disease resistance by protoplast fusion

يحدث تزاوج بين بروتوبلاست النباتات المتقاربه وراثيا . حيث أن البروتوبلاست المعزول يمكن أن يتزاوج طبيعيا أو في وجود مركبات تساعد على ذلك مثل بولى إيثيلين جليكول ويسمى فيوزاجين fusagen . عند حدوث تزاوج بين البروتوبلاست فيحدث تزاوج سيتوبلازمى ونوى فتسمى الخلية فى هذه الحالة خليه هجين hybrid cell حيث توجد نواه واحده فى البروتوبلاست المتزاوج وقد يحدث تزاوج سيتوبلازمى دون تزاوج نوى ويسمى البروتوبلاست الناتج فى هذه الحالة cybrid cell . يحدث عادة عقم للبروتوبلاست المتزاوج وقد ينتج عنه كالس ولا ينتج منه نباتات إطلاقا . بعد حدوث تزاوج للبروتوبلاست يحدث له إنقسام وأثناء الأنقسام يحدث حالة تلكؤ lagging لكروموسوم أو أكثر ونتيجة لذلك فإن البروتوبلاست المنقسم ينتج عنه خلايا ناقصة كروموسوم أو أكثر وخلايا أخرى زائده كروموسوم أو أكثر ولذلك تنتج صفات جديده نتيجة لوجود هذه الخلايا . يفيد تزاوج البروتوبلاست بين بروتوبلاستين أحاديين من نفس النوع أو الصنف كلا منهما عال المقاومه لمرض معين حيث ينتج عن ذلك بروتوبلاست ثنائى ينتج منه نبات ثنائى diploid شديد المقاومه للمرض .

٥ - تكوين خلايا محوره transformed cells مقاومه للأمراض

Genetic transformation of plant cells for disease resistance

يمكن أذخال DNA أى ماده وراثية فى بروتوبلاست أو خلايا النبات بطرق عديده . ومن هذه الطرق أن يأخذ البروتوبلاست DNA مباشره direct DNA uptake أو حقن DNA فى الخليه أو البروتوبلاست microinjection of DNA أو بواسطه ليبوسومات liposomes والليبوسوم عباره عن حوصله دهنيه lipid vesicle وتعتبر الليبوسومات وسيط فى دخول DNA إلى البروتوبلاست أو الخلايا أو بواسطه كروموسومات صغيره minichromosomes وتسمى أيضا هذه الكروموسومات الصغيره باسم بلازميدات سنتروميديه centromer plasmids أو بواسطه الفيروسات أو بواسطه النظام الجينى الطبيعى للبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* . وفى جميع

هذه الحالات يتم إدخال أجزاء صغيرة أو كبيرة من DNA إلى داخل الخلايا أو البروتوبلاست وقد يصبح أو لا يصبح هذا الـ DNA جزء من DNA كروموسوم النبات. عندما يحتوى DNA المنقول إلى خلية النبات جينات منظمه regulatory genes أو يلتحم بالكروموسوم بالقرب من جينات منظمة فيكون DNA قادر على التعبير عن نفسه DNA is expressed حيث يتم نسخه إلى mRNA ويتكون من الأخير البروتين.

توجد حاله أستعملت فيها البكتريا *A. tumefaciens* بنجاح لنقل جين من نبات إلى آخر. حيث أمكن نقل جين خاص ببروتين البذور من نبات الفاصوليا إلى مكان مناسب على البلازميد Ti للبكتريا *A. tumefaciens* ثم عدوى نبات آخر بهذه البكتريا مثل نبات عباد الشمس. وبعد حدوث الأصابة إنتقل عشر DNA البلازميد والذي يحتوى على جينات جديده وهى بالطبع جينات الفاصوليا إلى جينوم النبات العائل. وأصبحت هذه الجينات المنقوله موجوده طبيعيا فى تركيب النبات العائل الجديد ينتقل طبيعيا فى الخلايا المنقسمه كما أنها تعبر عن نفسها فى النبات العائل الجديد أى أن الانتقال كامل وصحيح وطبيعى وفعال. حيث أصبحت الجينات جزء من تركيب العائل الجديد.

أما عن الطريقه أو الطرق التى يمكن بها لجينات النبات أن تقاوم المرض فهى غير معروفه ولكن يفترض أن صفه المقاومه كأى صفه عاديه فى النبات ولها نفس ميكانيكيه الصفات الأخرى مثل تخليق البروتين. أى أن الجين أو الجينات المقاومه تنتج mRNA خاص بها وهذا ينتقل ليرتبط بالريبوسومات ليتكون من ذلك عديد الريبوسومات. يستعمل الأخير فى تخليق نوع خاص من البروتين قد يدخل فى تركيب الأنزيمات أو يكون بروتين تركيبى. يكون للأنزيم المتكون نشاط معين ينتج عنه مركبات تسبب تحوير فى تركيب النبات أو تسبب تكوين مركبات خاصه مما ينتج عنه مقاومه النبات. تعتبر الجينات التى تحدد نوع وخواص البروتين المتكون أنها جينات تركيبيه structural genes. يتحكم فى نشاط الجينات السابقه وذلك بتنشيطها وتحديد مده عملها أو وقف عملها أى بتنشيط تخليق البروتين أو تثبيطه جينات أخرى تسمى جينات منظمه regulatory genes. يبدأ تخليق mRNA عند مواقع معينه على DNA تسمى هذه المواقع أو المناطق مواقع بدء التخليق (بدء العمل) operators. يتحكم موقع بدء التخليق operator فى نسخ mRNA لجين واحد أو أكثر من جين يشترك فى عمل عمليه حيويه

واحد ومثال ذلك تكوين مركب فينولى سام للفطريات أو تكوين مركب يعادل سميه الطفيل . تسمى مجموعه الجينات التى يتحكم فيها operator واحد باسم أوبيرون operon . يمكن شرح مثال لذلك فى حاله إصابة النبات بطفيل معين فإنه ينشط تكوين مركب سام أو أنزيم وفى هذه الحاله فإن الطفيل يفرز منشط stimulant or inducer يسبب تثبيط مركب أو جزئى مانع repressor molecule وينتج الأخير بواسطه جين منظم فى النبات العائل . وظيفة المركب أو الجزئى المانع هو الارتباط بموقع معين مخصص لذلك على موقع بدء التخليق لجزئى DNA أى على operator . نتيجة لهذا الارتباط فى هذا الموقع فإن عمليه نسخ mRNA بواسطه الأوبيرون تتوقف . نتيجة لذلك يتوقف تخليق هذا البروتين الخاص بهذا الأوبيرون فى غياب الطفيل أى فى عدم وجود الأصابه . والعكس صحيح تماما فى حاله الأصابه بطفيل معين حيث يحدث تثبيط للمركب أو الجزئى المانع repressor بواسطه مركب منشط والأخير يفرز بالطفيل pathogenic stimulant . نتيجة لذلك يكون الأوبيرون mRNA وبالتالي يتم تخليق البروتين الخاص به وقد يكون هذا البروتين أنزيم معين وقد يكون مركب سام أو أن الأنزيم يدخل فى تفاعل ينتج عنه تكوين مركب سام . عندما يكون هذا المركب سام للطفيل فإن الأصابه تتوقف ويصبح النبات مقاوم . والحاله العكسيه عندما تحدث فى هذا الطفيل طفره تسبب عدم تكوين أو إفراز للمنشط stimulant or inducer وبالتالي لا يحدث تثبيط للجزئى المانع فإن النبات يفقد قدرته على مقاومه وبالتالي فإن الطفيل ينمو ويتخلل أنسجة العائل وتحدث الأصابه وتظهر أعراض المرض ويعتبر النبات قابل للأصابه . وتفسر الحاله الأخيره بأنها كسر مقاومه النبات disease resistance is broken ولكنها فى الحقيقه ليست كذلك بل حدثت عمليه تخطى للمقاومه bypassed . توضح العبارة الآتيه ذلك بالتفصيل

the resistance of the host is actually bypassed by the pathogen rather than broken down.

ولكن فى حالات أخرى يمكن أن تحدث طفره فى الطفيل تسبب كسر مقاومه النبات breakdown the resistance of the host وفى هذه الحاله يفرز الطفيل الطفره مركب يعادل سميه المركب السام الناتج بواسطه النبات ويعباره أخرى يلغى الطفيل التأثير السام للنبات الضار به . أو أن تحدث طفره فى الطفيل تسبب سد أو غلق blocking مكان الاستقبال receptor site على الطفيل والذي عن طريقه يتصل المركب المنتج بواسطه العائل والمسبب لمقاومه

الطفيل وبذلك يصبح هذا المركب الأخير غير فعال وغير مؤثر على الطفيل. حيث أنه في الحالة الأخيرة لكي يصبح النبات مقاوم للطفيل لابد أن يرتبط أولاً المركب المسبب لمقاومه العائل بالطفيل وفي حالة عدم الارتباط يصبح الطفيل فعال ويفقد النبات صفة المقاومه ويصبح قابل للأصابة. تسمى الحالات الأخيرة بكسر مقاومه النبات العائل حيث أن الطفيل كسر فاعليه المركبات المسببه لمقاومه النبات.

توجد حاله يمكن أن تحدث في النبات تسمى بالمقاومه المستحثة المكتسبه induced resistance وهي عباره عن مقاومه غير طبيعيه في النبات بل تنتج نتيجة تلقيح النبات بكائن حي دقيق أو نتيجة معاملة كيميائيه أو طبيعيه. تعتبر حاله التلقيح المتبادل المختلط في الفيروسات cross inoculation والتي ينتج عنها مقاومه cross protection للنبات الملقح inoculated إحدى حالات المقاومه المستحثة المكتسبه. يوجد هذا النوع من المقاومه في كثير من النباتات مقاومه الفطريات والفيروس والبكتريا وحتى الحشرات. يكون عادة هذا النوع من المقاومه غير متخصص nonspecific لطفيل معين بل يكون لعدد من الطفيليات ومن أمثله ذلك حاله أصناف نبات التبغ الزائده الحساسيه hypersensitive لفيروس تبرقش التبغ TMV فإنها تصبح مقاومه لهذا الفيروس وعلاوه على ذلك فيروسات أخرى وفطر *Phytophthora* وبكتريا *Pseudomonas tabaci* والمن. والعكس صحيح أيضاً فإن إصابه نبات التبغ بواسطه فطر تقرح الجذور *Chalara = Thielaviopsis* أو ببكتريا تبقع الأوراق *Pseudomonas syringae* يسبب مقاومه جهازيه systemic resistance أى مقاومه في كثير من أجزاء النبات لفيروس تبرقش التبغ. يمكن عمل حاله المقاومه المستحثة المكتسبه في النبات بتلقيحه بسلاله ضعيفه أو غير متوافقه incompatible من الطفيل أو بتلقيحه بواسطه بكتريا أو جراثيم فطريات قتلت بالحراره العاليه أو بتلقيحه بسلاله ممرضه عاديه من الطفيل وهو صغير السن وغير قابل للأصابة بالطفيل. تظهر حاله المقاومه المستحثة المكتسبه في مكان الأصابة وتسمى موضعيه local induced resistance ولكن بعد ذلك بعده أيام فإن المقاومه تظهر في أماكن أخرى على الأوراق الملقحة بالطفيل وأيضاً الأوراق غير الملقحة أى تصبح مقاومه جهازيه systemic induced resistance. تظهر أعراض هذا النوع من المقاومه في صورته تكوين بثرات صغيره أو مقاومه تامه لنفس الطفيل أو أيضاً بعض طفيليات أخرى. توجد فتره بين حدوث الأصابة

وظهور حاله المقاومه تسمى فتره نشوء المقاومه lag period وهى الفتره اللازمه لتخليق مركب أو أكثر وأنتقاله جهازيا فى النبات من المناطق الملقحه إلى المناطق الغير ملقحه من النبات. يمكن عمل هذا النوع من المقاومه أيضا بمعامله النبات ببروتين غلاف الفيروس أو بروتين الفطر أو البكتريا أو بروتينات دهنيه أو مركبات عديده التسكر أو RNA الخميره أو بواسطه مركبات كيميويه بحته تخلق صناعيا مثل حامض بولى أكريلك polyacrylic acid أو حامض السيليسيك salicylic acid (الأسبرين) أو 2-chloroethylphosphonic acid . تعمل هذه المركبات على عمل مقاومه موضعيه local resistance للنبات عند رشها أو حقنها ولكنها تسبب مقاومه جهازيه systemic resistance عند أمتصاصها بواسطه الجذور أو أعناق الأوراق. وعامه كلما زاد تركيز المركبات السابقه كلما زادت سرعه ودرجه المقاومه للنبات العائل. تحتاج فتره نشوء المقاومه أى الفتره من حدوث التلقيح الإبتدائى وحتى حدوث المقاومه يومين أو ثلاثه أيام فى حاله المقاومه الموضعيه بينما تحتاج المقاومه الجهازيه إن وجدت أسبوع أو أكثر. تستمر المقاومه الجهازيه فى النبات مده تتراوح بين ثلاثه إلى خمس أسابيع وبعدها يفقد النبات هذا النوع من المقاومه. يمكن التحكم فى المقاومه المستحثة المكتسبه ومنع حدوثها وذلك بمعامله النبات بالمضاد الحيوى actinomycin D حيث يسبب ذلك المركب تثبيط عمليه نسخ mRNA من DNA وبالتالي لا تتكون بروتينات جديده والتي قد تدخل فى تركيب الأنزيمات. يمكن تفسير ميكانيكيه هذا النوع من المقاومه بأنه لا بد من تخليق أنزيمات جديده بواسطه خلايا النبات لكى تحدث حاله المقاومه أى أن العامل المنشأ للمقاومه inducer of resistance ينشط بعض جينات خاصه فى التركيب الوراثى للنبات مسئوله عن ميكانيكيه المقاومه للنبات عن طريق البروتينات ومنها الأنزيمات. تعتمد المقاومه المستحثة المكتسبه على تفاعل الحساسيه المفرطه (الزائده) hypersensitive reaction أو تليها. وعامه فإن كلا من المقاومه المستحثة المكتسبه وتفاعل الحساسيه المفرطه ينتج عنهما تكوين بروتينات جديده ذاتيه new soluble host protein بواسطه خلايا النبات العائل تسمى b - proteins . يتم تثبيط إنتاج b - proteins ومنع حدوث المقاومه المستحثة المكتسبه وأيضا منع تفاعل الحساسيه المفرطه نتيجة معامله النبات بالمضاد الحيوى actinomycin D . كما أن تعريض النبات لدرجة حرارة من ٣٠ إلى ٣٥م تسبب تثبيط جميع التفاعلات السابقه. حتى الآن غير معروف إذا كان لمركبات b - proteins أو تفاعلات الحساسيه المفرطه علاقه بالمقاومه المستحثة

المكتسبه أو لا. وجد في بعض حالات المقاومة المستحثة المكتسبه زياده في نشاط أنزيم البيروكسيداز وأنزيم فينيل ألانين أمونيا لياز phenylalanine ammonia lyase وزياده تركيز الفيتوالكسينات وتركيز لجنين الخلايا وتركيز عديدات التسكر المثبطه لأنزيم بروتيناز ويعتقد أن هذه التغيرات لها دور في حدوث هذا النوع من المقاومة. يعتقد أن جذور خلايا النبات تحتوى على bound elicitors أى elicitors مرتبطه، تكون elicitors الفيتوالكسينات، وأيضا منشآت المقاومة inducers of resistance. نتيجة للتلقيح والأصابة تتحرر elicitors وتصبح حره غير مرتبطه وتصبح فعاله موضعيا أى في مكان الأصابة ولعمده قصيره نسبيا وترجع فاعليه elicitors إلى أنها تنتج مركبات فيتوالكسينات بتركيزات فعاله. يمكن لبعض elicitors أخرى أن تنتقل جهازيا في النبات وتنتج مركبات خاصه مثل b - proteins وأنزيم البيروكسيداز ومثبطات إنزيم البروتيناز وهى مسئوله في مجموعها عن حدوث المقاومة المستحثة المكتسبه. كما يمكن لبعض elicitors أخرى أن تنشط بدء حدوث سلسله من التفاعلات في أجزاء النبات المختلفه ينتج عنها تخليق مركبات معينه هى المسئوله عن مقاومه النبات.

وجد أن بعض الطفيليات المسببه لأمراض النبات يمكن أن تؤثر على نسخ transcription mRNA من DNA وأيضا على ترجمه translation مركب mRNA إلى بروتين. وجد أن بعض الفيروسات وبعض الفطريات الأجارية التطفل مثل البياض الدقيقى والصدأ تؤثر على عمليه النسخ. في بعض الحالات تؤثر الطفيليات على عمليه النسخ وذلك بتغيير تركيب أو وظيفه الكروماتين المرتبط بجزيئ DNA في الخليه المصابه. وفي بعض الأمراض وخاصه الفيروسية فإن الطفيل بواسطه أنزيماته أو بواسطه أنزيمات العائل المحوره بواسطه الطفيل وخاصه أنزيم RNA polymerase فإنه يمكن للطفيل أن يسخر خليه النبات في تخليق RNA الخاص به وليست RNA الخاص بالنبات العائل ويكون ذلك باستعمال نيوكليوتيدات النبات العائل. وجد في بعض الأمراض زياده في نشاط أنزيمات ribonucleases في النبات المصاب وقد يكون ذلك راجع لتكوين أنزيمات جديده من هذا النوع من الأنزيمات في النبات المصاب وعدم تكونها في النبات السليم. وجد أيضا أن تركيز RNA يزيد في بعض الأحيان في الخلايا المصابه وخاصه في النباتات المقاومه وعلى وجه الخصوص في الفتره الأولى من الأصابة. يعتقد أن زياده تركيز RNA نتيجة لزياده عمليه النسخ في الخليه في النبات المصاب وذلك

يدل على أن النبات ينشط فى تكوين مركبات لها دور فى عمليه المقاومه . وجد زياده فى سرعه نشاط بعض الأنزيمات وخاصه أنزيمات التنفس فى الأنسجه المصابه وأيضا قد يحدث زياده فى نشاط الأنزيمات المنتجه أو المؤكسده للمركبات الفينوليه . بعض هذه المركبات الفينوليه لها دور فى مقاومه النبات . بالرغم من وجود الأنزيمات السابقه أثناء الأصابه إلا أن كميات منها تلتج من جديد *de novo* حيث أن ذلك ضرورى لزياده سرعه عمليه النسخ وأيضا ضرورى لزياده نشاط أنزيم RNA polymerase . لوحظ أيضا زياده سرعه تخليق البروتين فى الأنسجه المصابه للأصناف المقاومه فى الفتره ما بين ساعتين إلى عشرون ساعه بعد حدوث التلقيح أى فى الفترات الأولى من الأصابه . ومما يثبت علاقه تركيز البروتين بعمليه المقاومه فى النبات أن معامله أنسجه النبات المقاوم قبل أو أثناء الأصابه بمركبات مثبطه لتخليق البروتين يسبب نقص درجه مقاومه النبات العائل . يوضح ذلك أن زياده تخليق البروتين فى النبات المصاب راجع إلى زياده فى إنتاج الأنزيمات والبروتينات والتي لها دور فى مقاومه النبات .

بعض المراجع العربية المختاره

- ١ - أبصال الزينه وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومه
عماد الدين وصفى ومحمود خطاب - منشأه المعارف بالأسكندريه - ١٩٨٩ .
- ٢ - الأطلس النباتى
حسين العروسى وسمير ميخائيل وعماد الدين وصفى - دار المعارف الحديثه - الأسكندريه
١٩٨٩ .
- ٣ - المملكه النباتية
حسين العروسى وعماد الدين وصفى - دار المعارف الحديثه - الأسكندريه - ١٩٨٩ .
- ٤ - أمراض النبات
عباس فتحى الهلالى - دار المعارف - القاهره - ١٩٦٦ .
- ٥ - أمراض النبات
حسين العروسى وسمير ميخائيل ومحمد عبد الزحيم - منشأه المعارف بالأسكندريه ١٩٩٢ .
- ٦ - أمراض البذور
سمير ميخائيل وتركى بيدر - جامعه الموصل - العراق - ١٩٨١ .
- ٧ - أمراض أشجار الفاكهه وطرق مقاومتها
محمد وجدى السواح - دار المعارف - القاهره - ١٩٦٦ .
- ٨ - زهور القطف وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومه
عماد الدين وصفى ومحمود خطاب - منشأه المعارف بالأسكندريه - ١٩٨٩ .
- ٩ - علم أمراض النبات
كمال على ثابت ومحمود ماهر رجب وعبدالله الشهيدي ومصطفى فهيم - ١٩٦٦ .
- ١٠ - مورفولوجيا وتشريح النبات
عماد الدين وصفى وحسين العروسى - دار المعارف الحديثه - الأسكندريه - ١٩٩٠ .

بعض المراجع الأجنبية المختاره

- Agrios, G.N. 1988. Plant Pathology. Acad. Press, N.Y. and London.
- Alexopoulos, C. J. 1964. Introductory Mycology. John Wiley, N.Y.
- Barnes, E. H. 1978. Atlas and Manual of Plant Pathology. Prenum Press, N. Y.
- Dickson, J. G. 1956. Diseases of Field Crops. McGraw Hill, N. Y.
- Heald, F. D. 1933. Manual of Plant Diseases. McGraw Hill, N. Y.
- Horsfall, J. G. and E. B. Cowling. 1977. Plant Disease. An Advanced Treatise. Acad. Press, N. Y.
- Leach, J. G. 1940. Insect Transmission of Plant Diseases. McGraw Hill, N.Y.
- Marlin, H. C. 1973. The Scientific Principles of Crop Protection. Arnold, London.
- Mehrotra R. S. 1980. Plant Pathology. Tata McGraw-Hill, New Delhi.
- Roberts, D. A. and C.W. Boothroyd. 1972. Fundamentals of Plant Pathology. W. H. Freeman and Co, San Francisco.
- Roberts, D. A. 1978. Fundamentals of Plant-Pest Control. W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Siegel, M. R. and H. D. Sisler. 1977. Antifungal Compounds. Marcel Dekker, N. Y.
- Stakman, E. C. and J. G. Harrar. 1957. Principles of Plant Pathology. Ronald Press, N. Y.

- Stapp, C. 1961. Bacterial Plant Pathogens. Oxford Univ. Press, London.
- Stevens, R. B. 1974. Plant Disease. Ronald Press, N. Y.
- Streets, R. B. 1972. The Diagnosis of Plant Diseases. Univ. Arizona Press, Tucson.
- Strobel, G. A. and D. E. Mathre. 1970. Outlines of Plant Pathology. Van Nostrand Reinhold, N. Y.
- Thorne, G. 1961. Principles of Nematology. McGraw Hill, N. Y.
- Walker, J. C. 1952. Diseases of Vegetable Crops. McGraw Hill, N. Y.
- Walker, J. C. 1969. Plant Pathology. McGraw Hill, N. Y.
- Wallace, H. R. 1964. The Biology of Plant-Parasitic Nematodes. St. Martin's Press, N. Y.
- Wallace, T. 1961. The Diagnosis of Mineral Deficiencies in Plants. Chemical Publishing, N. Y.
- Westcott, C. and R. K. Horst. 1979. Plant Disease Handbook. Van Nostrand, N. Y.
- Wheeler, B. E. J. 1969. An Introduction to Plant Diseases. John Wiley, N. Y.
- Wood, R. K. S. 1967. Physiological Plant Pathology. Blackwell, Oxford and Edinburgh.

بعض المجلات العلمية المختاره

- American Journal of Botany-*Amer. J. Bot.*
- American Potato Journal-*Amer. Potato. J.*
- Annals of Applied Biology-*Ann. Appl. Biol.*
- Annals of Botany-*Ann. Bot.*
- Annals of the Missouri Botanical Garden-*Ann. Mo. Bot. Gard.*

Australian Journal of Agricultural Research-*Aust. J. Agr. Res.*

Australian Journal of Biological Sciences-*Aust. J. Biol. Sci.*

Australian Journal of Botany-*Aust. J. Bot.*

Botanical Gazette-*Bot. Gaz.*

Canadian Journal of Botany-*Can. J. Bot.* [continuation of *Can. J. Res.*
(C)]

Canadian Journal of Research. Section C-*Can. J. Res.* (C) [continued as
Can. J. Bot.]

Contributions of the Boyce Thompson Institute for Plant research-*Contrib*
Boyce Thompson Inst. Plant Res.

Journal of Agricultural Research-*J. Agr. Res.* [terminated in 1949]

Journal of General Microbiology-*J. Gen. Microbiol.*

Journal of Helminthology-*J. Helminthol.*

Mycologia-not abbreviated

Nature-not abbreviated

Netherlands Journal of Plant Pathology-*Neth. J. Plant Pathol.*
[continuation of *Tijdschr. Plantenziekten*]

Physiological Plant Pathology-*Physiol. Plant Pathol.*

Phytopathologische Zeitschrift-*Phytopathol. Z.*

Phytopathology-not abbreviated

Plant Disease-*Plant Dis.* [continuation of the *Plant Dis. Reporter*]

Plant Pathology-*Plant Pathol.*

بعض المجلات الناشرة للمقالات العلميه

Advances in Plant Pathology-*Advan. Plant Pathol.*

Advances in Virus Research-*Advan. Virus Res.*

Annual Review of Microbiology-*Annu. Rev. Microbiol.*

Annual Review of Phytopathology-*Annu. Rev. Phytopathol.*

Annual Review of Plant Physiology-*Annu. Rev. Plant Physiol.*

Bacteriological Reviews-*Bacteriol. Rev.*

Biological Review (Cambridge)-*Biol. Rev. (Cambridge)*

Botanical Review-*Bot. Rev.*

Quarterly Review of Biology-*Quart. Rev. Biol.*

تم بحمد الله تعالى

تعريف بالمؤلف

الأسـم: عماد الدين حسين وصفى (مصرى - مواليد القاهرة)
الدرجات العلمية: حاصل على بكالوريوس فى العلوم الزراعية من كلية الزراعة جامعة
الأسكندرية بتقدير جيد جدا وسنه تسعة عشر عاما.

- حاصل على الماجستير والدكتوراه فى أمراض النبات من كلية الزراعة
جامعة الأسكندرية وسنه ثمانية وعشرون عاما إلا قليل.

الجوائز : حاصل على جائزة جامعة الأسكندرية التشجيعية عام ١٩٧٨ . (تمنح الجائزة
لأفضل البحوث المقدمة من المدرسين والأساتذة المساعدون).

الوظائف : عين معيدا بقسم النبات الزراعى (أمراض نبات) كلية الزراعة جامعة الأسكندرية
ثم مدرس ثم أستاذ مساعد ثم أستاذ ثم رئيساً للقسم.

البحوث : له أكثر من خمسون بحث منشور فى مجلات عالمية متخصصة والكثير منها
منشور فى أفضل المجلات الأمريكية والأبجلىزية والألمانية الغربية والنمساوية
والهولندية والإيطالية والمجرية والسعودية وبالطبع أيضا مصر.

المهام العلمية: سافر مرات عديدة إلى الخارج (إلى أبلقنلرا والولايات المتحدة الأمريكية)
حيث قام بعمل بحوث مشتركة وأبضا القاء محاضرات عن بحوثه - عضو
مجموعة Wolfson College جامعة أكسفورد.

التقدير على المستوى القومى : أختير من مجموعة البارزين على المستوى القومى - حيث
تقوم - هيئة الاستعلامات المصرية بعمل دليل عن الأفراد ذو الأنشطة المرموقة على مستوى
مصر.

أنشطة علمية أخرى:

١ - عضو هيئة تحرير مجلة بحوث كلية الزراعة جامعة الأسكندرية.

٢ - يشارك فى كثير من المجلات والهيئات العالمية والمحلية ومنها Transactions of British
Mycological Society و Plant Pathology ومجلة أمراض النبات المصرية.

٣ - أختير كثيراً فى لجان الحكم على رسائل الماجستير والدكتوراه فى جامعات
الأسكندرية وعين شمس وطنطا.

تصويب الأخطاء المطبعية

رقم الصفحة	رقم السطر	الخطأ	الصواب
١٣٩	٤	PL	PG
١٣٩	قبل الأخير	PL	PG
١٨٥	التفاعل الأول	catecholase → cresolase	→ cresolase
١٩٤	شكل ٥٦ ب الأحداثى السيني الأحداثى الصادي	سقطت سهوا 50 ثم 00 ثم 50 ثم 200 برى مصدره وسط أفريقيا وأصناف	عدد الأيام بعد التلقيح 50 ثم 100 ثم 150 ثم 200 برى وأصناف الباب الحادى عشر ٢٥٠٠ كيلومتر لكل سم على الخريطة الباب الثانى عشر الباب الثالث عشر الباب الرابع عشر tabtoxin
٢٢٦	الأخير	الباى الرابع العاشر	٢٥٠٠ كيلومتر
٢٣١	الأول	الباب الثانى العاشر	الباب الثانى عشر
٢٥٩	على الخريطة	الباب الثالث العاشر	الباب الثالث عشر
٢٧٣	الأول	الباب الرابع العاشر	الباب الرابع عشر
٢٨١	الأول	tabtoxin	tabtoxin
٣١١	الأول	الألمانيه الغربه	الألمانيه الغربيه
٣٦٢	١٤ و ١١	العالميه الدائم	العلميه الدائمه
تعريف بالمؤلف الصفحة الثانية	١١ ٢٠١		

- ٤ - عضو اللجنة العالمية الدائم لوظائف الأساتذة المساعدون وبعد ذلك أصبح عضو اللجنة العالمية الدائم لوظائف الأساتذة لعلم النبات الزراعى وأمراض النبات.
- ٥ - أختير فى لجان كثيرة كعضو فى لجان فحص الانتاج العلمى لأعضاء هيئة التدريس فى الجامعات العربية ومنها جامعة الملك سعود (الرياض) والجامعة الأردنية.
- ٦ - عمل فى كثير من المشاريع العلمية كرئيس للمشروع أو مساعد رئيس المشروع ومنها مشاريع الترابط بين الجامعات الأمريكية والمصرية وأيضاً مشروع مصر - كاليفورنيا. وقد ألقى محاضرات عن بحوثه فى جامعات ومعاهد عديدة منها تنسى Tennessee State University وأيضاً لويزيانا وأيضاً International Mycological Institute. وأيضاً فى دورة الزراعة المحمية المتعددة بتونس تحت إشراف الفاو العربية.
- ٧ - قام بتحكيم كثير من البحوث فى المجالات المختلفة كما أنه يقوم بتحكيم كثير من المشاريع المقدمة للمجلس الأعلى للجامعات وأيضاً لجامعة الإسكندرية.
- ٨ - أشارك فى كثير من المؤتمرات العلمية فى الخارج وفى مصر أيضاً. كما شارك فى الأعداد لبعض المؤتمرات.
- ٩ - أختير كأستشارى لأمراض الزراعة المحمية. كما أختير عضو فى لجنة وقاية النبات بوزارة الزراعة المصرية.
- المؤلفات :** قام بتأليف سبعة كتب حتى الآن وهى ١ - مورفولوجيا وتشريح النبات ٢ - المملكة النباتية ٣ - الأطلس النباتى ٤ - زهور القطف وأمراضها وآفاتنا وطرق المقاومة ٥ - أبصال الزينة وأمراضها وآفاتنا وطرق المقاومة ٦ - فسيولوجيا النبات العملى ٧ - أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية ثم كتاب منظمات النمو والأزهار وتطبيقها فى الزراعة.
- الأنشطة الأخرى:** أنتخب أربعة مرات كل فترة أربعة سنوات كعضو ممثل لمحافظة الإسكندرية ومرسى مطروح لنقابة المهن الزراعية فى النقابة العامة بالقاهرة. وأختير أيضاً مفوضاً على فرع النقابة بالإسكندرية عام ١٩٩١.