الباب الرابع والعشرون
الهندسة الوراثية وفسيولوجيا النبات

Genetic Engineering and Plant Physiology

يوجد للهندسة الوراثية الآن دور حيوى فى جميع علوم الحياة biology ويوجد دور للهندسة الوراثية فى فسيولوجيا النبات فى بعض الحالات وسنختار مثالين على سبيل المثال لا للحصر ، وهما أولاً: أهمية الهندسة الوراثية فى إثبات آلية حدوث مرض التدرن التاجى فى العنب والورد والتفاح وغيرهما من العوائل ويتسبب هذا المرض عن البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* وأيضاً فى إثبات آلية حدوث مرض تعقد الزيتون والذى يتسبب عن البكتريا *Pseudomonas savastanoi* وكلا المرضين يسببان تكون أورام على النبات أى عقد أى تدرنات فى المرض الأول تكون التدرنات فى منطقة التاج وفى المرض الثانى تكون التدرنات على الأفرع والسيقان والجذور. ثانيا: دور الهندسة الوراثية فى تثبيت الأزوت الجوى.

أولاً : مرض التدرن التاجى ومرض تعقد الزيتون

بالرغم من أن هذين المرضين ينشأن عن جنسين مختلفين من البكتريا وهما *Agrobacterium* و *Pseudomonas* إلا أن الهندسة الوراثية قد أثبتت عن طريق فسيولوجيا النبات أن هذين الجنسين قد كانا منذ أجيال جيولوجية سحيقة جنس واحد أو أنهما من أصل واحد أى جد سحيق واحد لهذين الجنسين ثم تميزا بعد ذلك بمرور العصور والأزمنة والأحقاب الجيولوجية إلى جنسين مختلفين حاليين.

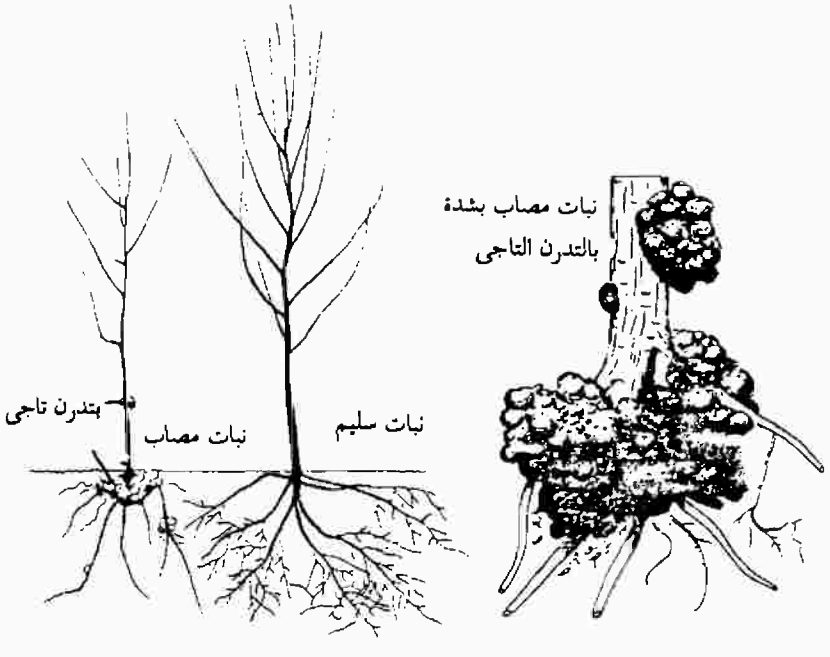
تعتبر البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من أهم الكائنات الحية المستخدمة فى دراسة الهورمونات النباتية حيث أمكن إثبات وجود مناطق معينة على المادة النووية تتحكم فى إنتاج بعض الهرمونات النباتية.

نبذة 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 خشبية وعشبية كثيرة تشمل مائة وأربعون جنس تتبع ستون عائلة. توجد على وجه الخصوص على التفاح والفاكهة ذات النواة الحجرية والعنب وعباد الشمس.

يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفة وتتكون عادة تحت سطح التربة مباشرة وهى الجزء من ساق النبات الذى يعرف بالتاج ومنه أشتق أسم المرض. يمكن أن تظهر أعراض المرض على الجذور الرئيسية. يقل محصول النبات المصاب وقد يموت. يشابه المرض سرطان الأنسان والحيوان ولذلك فأن كيفية حدوثه تمت دراستها بالتفصيل ولكن أيضاً توجد إختلافات جوهرية فى الحالتين (شكل١٩٩).

حديثاً ونتيجة للدراسات المكثفة على هذه البكتريا وهذا المرض. فقد أمكن إثبات أن البكتريا تغير فى تركيب أى تحور المادة الوراثية لخلايا النبات العائل حيث أنه يوجد جزء من بلازميد هذه البكتريا ويعرف هذا البلازميد بإسم Ti Plasmid DNA ويعرف هذا الجزء بإسم T-DNA ويمكن لهذا الجزء أن ينتقل ويلتحم فى DNA الخلية ويصبح جزء من المادة الوراثية للخلية ويمكن أن يعبر express عن وظيفته أو وظائفه بكفاءة عالية فى خلية النبات. ولذلك فإنه من الممكن إستخلاص البلازميد بعد إدخال جينات جديدة إليه من نبات الفاصوليا. يتم إلتحام هذه الجينات أى أجزاء من DNA الفاصوليا مع البلازميد فى خلايا البكتريا *A. tumefaciens* ثم

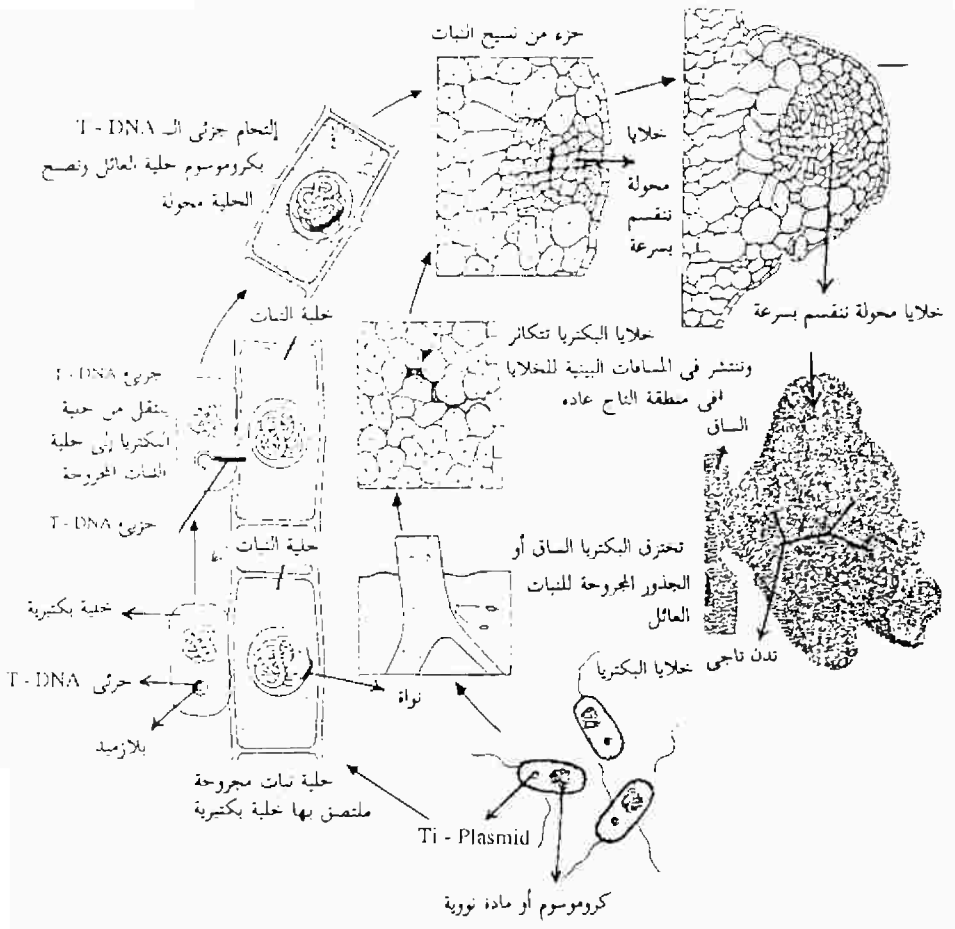


(شكل ١٩٩) : أعراض مرض مرض التدرن التاجى .

يتم عمل تلقيح بهذه البكتريا فى نبات آخر مثل عباد الشمس وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من المادة الوراثية لنبات عباد الشمس. تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتريا ويعتبرDNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA. حديثاً يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عادية أو مهندسة وراثياً وذلك فى عدم وجود البكتريا. يمكن الآن إزالة أجزاء من البلازميد المسئول عن تكوين الأورام فى النبات وتظل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعالة وقادرة على إظهار تأثيرها ولذلك فأنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتريا تكون غير قادرة على أنتاج أورام فى النبات. تعتبر هذه البكتريا مهندس وراثة 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 متقاربة ومتباعدة وراثيا related and unrelated plants وأيضاً بين كائنات حية متباعدة بين الحشرات أو الفيروسات والنبات أى أنه يمكن نقل صفة من حشرة معينة إلى النبات عن طريق هذه البكتريا (شكل ٢٠٠).

الأعراض المرضية لهذه البكتيريا على النبات :

تظهر أورام صغيرة على الساق أو الجذور بالقرب من سطح التربة فى البداية، وفى الأطوار الأولى تكون الأورام تقريباً كروية الشكل بيضاء أو لحمية اللون وطرية. وحيث أنه لكى تحدث الأصابة لابد من وجود جروح أى أن التدرن أو الورم ينتج فى منطقة الجرح فإنه فى البداية 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. فى النهاية تصبح الأنسجة الخارجية للتدرن بنية سوداء أو سوداء نتيجة لموت وتحلل الأنسجة السطحية للورم. أحياناً لا يوجد خط فاصل واضح بين نسيج الورم وأنسجة النبات حيث يظهر الورم نتيجة لإنتفاخ غير منتظم الشكل فى الأنسجة ويحيط بالساق أو الجذر. عادة يكون الأنتفاخ خارجى وملاصق للجذر أو الساق عن طريق عنق ضيق من الأنسجة . وأحياناً يكون الورم أسفنجى القوام ويمكن أن ينفصل بسهولة عن الساق أو الجذر أو يتحلل أو ينفصل إلى أجزاء تسقط أو تتحلل. أحياناً أخرى يصبح الورم خشبى ويصبح درنى الشكل ويصل قطره إلى ٣٠ سم أو أكثر. بعض الأورام يمكن أن تتعفن



(شكل ٢٠٠) : دورة حياة البكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى.

جزئياً أو كلياً ويبدأ العفن من السطح ويتجه إلى داخل التدرن وذلك فى الخريف أو الشتاء ويتكون مرة أخرى فى نفس المكان فى الموسم التالى فى الربيع أو الصيف أى فى موسم النمو. أحياناً تتعفن أجزاء من الورم أو التدرن وتتحلل وتتكون أورام أخرى على الأجزاء المتبقية من الورم.

تتكون الأورام على الجذور والسيقان عادة عند سطح التربة ولكنها قد تتكون على بعد قد يصل متر ونصف من منطقة التاج للنبات وذلك فى بعض النباتات الزاحفة أو العشبية وقد تتكون على أفرع الأشجار أو بتلات الأزهار أو عروق الأوراق. عادة يكون ورم أو تدرن واحد فقط ولكن يمكن أن يزيد ويصبح عديد من الأورام متصلة على الجذر أو الساق أو كليهما على الفروع.

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

صفات البكتريا :

عصوية الشكل ذات عدد قليل من الأسواط محيطى peritrichous يوجد بداخل خلايا البكتريا للسلالات الممرضة بلازميد أو أكثر. يتكون البلازميد من DNA ثنائى الشريط أو الخيط، حلقى الشكل ووزنه الجزيئى يتراوح بين مائة إلى مائة 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 البكتيرية المحتوية على بلازميد Ti تفقدها هذا البلازميد ويصبح غير فعال وتصبح البكتريا غير ممرضة للنبات أى تفقد القدرة على إصابة النبات. يحمل البلازميدTi الجينات التى تحدد نوع العوائل النباتية التى يمكن أن تصيبها الخلايا البكتيرية الحاملة لهذا البلازميد وأيضاً تحدد نوع الأصابة على النبات العائل حيث أنه توجد أنواع وحالات مختلفة من الأصابة سبق ذكرها وأهم خاصية لهذه السلالات من البكتريا أنها قادرة على نقل جزء من DNA هذا البلازميد بسرعة وبكفاءة عالية إلى المادة الوراثية لخلايا النبات ولذلك تتحول خلايا النبات العادية إلى خلايا أورام ينتج عنها التدرن وذلك فى فترة وجيزة. عندما يكتمل تحول بعض خلايا النبات العادية إلى خلايا نشطة فى عمل الأورام فإن هذه الخلايا الأخيرة تنقسم وتنمو بطريقة غير طبيعية 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 نشطة فى الأنقسام إلى بيئة مغذية وقد تكون بيئة سائلة أو بيئة آجار فإن هذه الخلايا تكون نشطة فى الأنقسام فى عدم وجود هورمونات معينة تحتاجها الخلايا العادية على نفس هذه البيئة لكى تصبح قادرة على الأنقسام. أى أن الخلايا العادية تحتاج إلى وجود هورمونات معينة فى البيئة لكى تنقسم ومن هذه الهورمونات إندول حماض الخليك ولكن خلايا التدرن لا تحتاج إلى هذه الهورمونات على نفس البيئة. تخلق خلايا النبات المكونة للورم أى المحتوية على جزء من DNA بلازميد Ti مركبات كيماوية خاصة تسمى opines والتى يمكن أن تستعمل فقط بواسطة البكتريا المحتوية على بلازميد Ti مناسب بينما الخلايا العادية غير قادرة على تخليق هذه المركبات وحتى أستعمالها. وهذه حالة طفيل وراثى genetic parasite حيث أن جزء من DNA بلازميد البكتريا ينتقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وبذلك ينبه ويشجع الخلايا على تكوين مركبات معينة لازمة للبكتريا وغير لازمة لخلايا النبات العائل ولا يكونها أصلاً أى أنه يحدث تغيير فى عمليات التحول الغذائى فى خلايا النبات لصالح البكتريا وحيث تستفيد البكتريا فى غذائها من هذه المركبات.

حدوث المرض :

تعيش البكتريا فى الشتاء فى التربة وحيث يمكنها أن تعيش كذلك لعدة سنوات ويكون نوع المعيشة رمية. عند نمو النبات العائل فى هذه التربة الملوثة بالبكتريا فإنها تخترق الجذور أو السيقان بالقرب من سطح التربة ولابد من وجود جروح حديثة نسبياً لكى تحدث عملية الأختراق وبالتالى إصابة النبات. تتكون هذه الجروح نتيجة للعمليات الزراعية والتطعيم والحشرات إلخ. توجد البكتريا فى بداية الإصابة فى المسافات البينية بين خلايا النبات وتنشط الخلايا المحيطة بها لكى تنقسم. يتكون نتيجة لذلك حلقات من الخلايا التى لها قدرة فائقة على الأنقسام بالمقارنة بالخلايا العادية وتظهر هذه الحلقات من الخلايا فى نسيج القشرة أو الكمبيوم تبعاً لدرجة عمق الجروح. تحتوى هذه الخلايا على نواه أو أكثر. تنقسم هذه الخلايا بسرعة فائقة تسمى هذه الحالة hyperplasia وتكون خلايا غير متشكلة وغير متميزة فى تركيبها التشريحى وبعد حوالى عشرة أيام إلى أسبوعين بعد التلقيح يظهر الورم ويمكن رؤيته بالعين المجردة. أمكن للمؤلف عدوى نباتات صغيرة من عباد الشمس وبدء ظهور الورم بعد أربعة أيام. حيث أن الأنقسام السريع العشوائى للخلايا وأيضاً كبر حجم الخلايا بطريقة غير منتظمة فإن التدرن أو الورم يزداد فى الحجم تدريجياً ويكون تدرن صغير. عادة تكون البكتريا غير موجودة فى مركز التدرن أى أن هذا الجزء من الأنسجة خال من خلايا

البكتريا إلا أن الطبقة أو الجزء السطحى من التدرن يحتوى على خلايا بكتيرية فى المسافات البينية للخلايا. فى هذه المرحلة تتميز بعض خلايا التدرن إلى أوعية خشبية وقصيبات ولكنها تكون غير متصلة بنسيج الخشب للنبات أو يكون إتصالها فى مناطق قليلة محدودة بنسيج الخشب للنبات. عند كبر الورم فى الحجم فإنه يضغط على الأنسجة المحيطة به وأيضاً الأنسجة أسفله والتى تسبب سحق وتمزق لهذه الأنسجة فى النبات العائل. قد يحدث سحق لأوعية الخشب بواسطة التدرن وقد يسبب ذلك ضعف إنسياب الماء إلى أعلى فى الأوعية الخشبية وبذلك يقل إنسياب الماء إلى المجموع الخضرى قد يصل ذلك إلى ٢٠٪ فقط من الماء المنساب إلى المجموع الخضرى فى الحالة العادية.

لا تغطى التدرنات الملساء الصغيرة بنسيج البشرة ولذلك فإنها تهاجم بالحشرات أو الكائنات الحية الدقيقة الرمية. هذه الكائنات الأخيرة تسبب تلون الجزء السطحى من الورم البنى أو الأسود كما قد تسبب تحلله. تحلل أو تمزق الجزء السطحى من الورم يسبب تحرر البكتريا وسقوطها فى التربة والتى قد تحمل بمياه الرى أو الأمطار لتصيب نباتات جديدة.

عند كبر الأورام تصبح أحياناً خشبية وصلبة. تكوين الحزم الوعائية الغير كامل والغير مرتب فى الورم يكون غير فعال فى تأدية وظيفته ونتيجة لذلك فى بعض الحالات تكون الأورام غير قادرة على الحصول على الماء أو التغذية بدرجة كافية ولذلك يتوقف كبر التدرن فى الحجم ويحدث تحلل لبعض أجزاؤه ويحدث موت لبعض الأجزاء ثم تتحلل وتتلاشى هذه الأجزاء الميتة. فى بعض الحالات يضمر التدرن ولا يظهر تدرن جديد ولكن عادة يتبقى جزء حى من التدرن ويتكون منه أورام أخرى فى نفس الموسم أو فى الموسم التالى .

عند أصابة الأنسجة الغير بالغة والصغيرة السن وأيضاً الأنسجة التى لها درجة كبيرة من الأستطالة فإن يتكون فى منطقة الأصابة ورم إبتدائى primary tumor وقد يتكون أسفل هذا الورم ولكن عادة يتكون أعلاه ورم آخر يسمى بالورم الثانوى أو التدرن الثانوى secondary tumor ويمكن أن يبعد هذا الورم أو التدرن الثانوى عن الورم الإبتدائى لمسافة صغيرة أو متوسطة أو كبيرة حيث يمكن أن يظهر الورم أو التدرن الثانوى على فرع النبات. أحياناً تظهر الأورام الثانوية على ندب الأوراق المتساقطة أو فى مكان الجروح الناتجة عن عوامل مختلفة أو حتى على أجزاء من الساق غير مجروحة ظاهرياً أو على أعناق الأوراق وعلى العروق الوسطية أو العروق الكبيرة للأوراق. تبعد هذه الأوراق المصابة عن الورم أو التدرن الإبتدائى عدة سلاميات. بداية تكوين التدرن الثانوى تكون من نسيج خشب الحزم الوعائية. وهذه الأورام أو التدرنات الثانوية تكون دائماً خالية من

البكتريا المسببة للمرض. حيث أنه عند قطع هذه الأورام وتعقيمها ووضعها على بيئة مناسبة فإنه لم يمكن عزل هذه البكتريا وذلك دليل على أن هذه الأورام الثانوية خالية من البكتريا. عند أخذ جزء من الورم أو التدرن الثانوى وتطعيمه على نبات سليم فإنه يسبب تكون أورام على النبات السليم وتكون هذه الأورام خالية من البكتريا أيضاً ولكنها تشبه الأورام الأبتدائية فى شكلها ومظهرها وتركيبها.

يثبت ذلك أن البكتريا لها أهمية كبيرة فى بداية المرض فقط حيث أنها تسبب تأثير مهيج للخلايا والأنسجة irritant effect فى النبات المصاب. وبعد حدوث الإضطراب والهياج فى الخلايا فإنها لا تحتاج إلى البكتريا لحدوث إنقسام الخلايا الغير منتظم والمسبب لتكوين التدرن حيث أن هذه الخلايا تصبح قادرة ذاتياً على إنتاج العامل المؤثر والذى يحدث هياج للخلايا لتصبح قادرة على الأنقسام بسرعة فائقة وبطريقة غير منتظمة وأيضاً بطريقة غير متحكم فيها uncontrolled ولذلك فإن البكتريا لها أهميتها فقط فى بداية حدوث الورم ولكن بعد ذلك يمكن للخلايا المكونة للورم أن تسبب هياج خلايا أخرى وأنقسامها إنقسام زائد فى عدم وجود البكتريا. بالرغم من وجود دراسات مكثفة لمعرفة طبيعة المسبب لهياج irritant خلايا النبات وميكانيكية تحول الخلايا العادية إلى خلايا أورام فإن المعلومات فى هذين الموضوعين لازالت غير متكاملة وغير حاسمة. عامة فإن كمية كبيرة من هذه المعلومات قد عرفت خلال العشر سنوات الماضية وهى أن خلايا البكتريا للسلالات الممرضة للنبات تحمل بلازميد من نوع معين يسمى بلازميد Ti وأن عدم وجود هذا البلازميد يفقد البكتريا قدرتها على أصابة النبات ولابد أن تكون الأصابة بالقرب من جرح حديث. تدخل هذه البكتريا جزء من البلازميد يسمى T-DNA فى المادة الوراثية لخلايا النبات المصابة بالقرب من الجروح وحيث تصبح خلايا النبات فى هذه المنطقة قابلة لأستقبال هذا الجزء أى T-DNA أى أن خلايا النبات تأخذ أعداد من T-DNA فى هذه المنطقة. ولذلك فإن خلايا النبات فى هذه المنطقة تتحور لكى تصبح قابلة لأستقبال T-DNA وأما عن كيفية هذا التحور وكيفية حدوثه فهو غير معروف. تصبح أجزاء T-DNA ملتحمة بكروموسومات خلايا النبات فى أماكن عديدة. تصبح هذه الخلايا النباتية قادرة على أظهار الصفات الموجودة فى T-DNA وتسمى هذه الخلايا بأنها محولة. هذه الخلايا المحولة transformed تنتج opines والتى تستخدم وتستعمل فقط بواسطة خلايا البكتريا التى تحتوى على بلازميد المحتوى على جزء T-DNA. يزداد تركيز مركبات أخرى فى هذه الخلايا النباتية المحولة ومنها الهورمونات النباتية مثل أندول حامض الخليك وأيضاً بعض السيتوكينينات cytokinins وبعض الأنزيمات.

حتى الان غير معروف كيف يتم زيادة تركيز الهورمونات والأنزيمات وكيفية تخليق opines وما هى علاقتها بالخلايا المحولة وهل يوجد علاقة بين هذه التغيرات وبعضها أو لا توجد بالمرة وما هو علاقة ذلك بجزء T-DNA وما هو علاقة ذلك كله بأنقسام وكبر الخلايا المحولة فى النبات والتى ينتج عنها نمو غير محكوم uncontrollable لتكوين الأورام.

مقاومة المرض :

تبدأ مقاومة المرض بالمرور والتفتيش على الأشجار والشجيرات فى المشاتل nursery ورفض المصاب منها وإستبعاده وإبادته. فيمنع زراعة الأشجار والشجيرات القابلة للأصابة فى حقول ذات تربة ملوثة بالبكتريا المسببة للمرض. تزرع الذرة الشامية أو أحد محاصيل الحبوب الأخرى لعدة سنوات متتالية فى الحقول ذات التربة الملوثة بالبكتريا وقبل زراعتها بالشتلات أو الشجيرات القابلة للأصابة. حيث أن البكتريا تخترق النبات عن طريق الجروح الحديثة فيجب الحذر التام والعناية فى عدم تجريح جذور أو ساق النبات أثناء الزراعة. يجب أيضاً مقاومة الحشرات القارضة للجذور مقاومة تامة فى المشاتل لتقليل حدوث الأصابة كلما أمكن ذلك. يجب إستعمال التطعيم بالبراعم budding وعدم إستعمال التطعيم بالقلم أى بعده براعم حيث أن درجة إنتشار مرض التدرن التاجى فى الحالة الأولى أقل بكثير من درجة إنتشاره فى حالة التطعيم بالقلم أى بعده براعم grafting.

يجب شراء وزراعة نباتات خالية من الأصابة. يمكن مقاومة المرض وذلك بكشط التدرن مع مساحة حوله وأسفله ويتم دهان هذا الجزء بواسطة محلول elgetol - methanol ويكون ذلك بواسطة الفرشة. يتكون هذا المحلول من جزء واحد sodium dinitrocresol إلى أربعة أجزاء wood alcohol . يمكن دهان المكان بعجينة بوردو.

يمكن مقاومة المرض بدهان مكان الورم بمخلوط من مركبات هيدروكربونية عطرية aromatic hydrocarbons يباع تجارياً ويكون هذا المخلوط إختيارى التأثير أى أنه يقتل خلايا وأنسجة التدرن دون أن يقتل الخلايا والأنسجة العادية المجاورة ولكن لا يستعمل ذلك عملياً على نطاق واسع.

يمكن عمل مقاومة حيوية لهذا المرض وذلك بنقع البذور أثناء الأنبات أو غمر بادرات المشتل أو الأصول المستعملة كجذور فى معلق من سلالة خاصة من سلالات

البكتريا *Agrobacterium radiobacter* وهى رقم ٨٤ (strain No 84) تضاد هذه السلالة من البكتريا كثير من سلالات البكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابة. يمكن معاملة البذور العادية الغير نابتة بهذه السلالة كما يمكن أيضاً رش وغمر التربة فى مكان النبات بمعلق من خلايا البكتريا لهذه السلالة. يعتقد أن هذه السلالة ٨٤ من البكتريا توجد على سطح العائل وتفرز مركب bacteriocin agrocin . يعتبر هذا المركب مثبط لكثير من السلالات الممرضة للبكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابة ومن حدوث التدرن، ولكن لسوء الحظ بعض سلالات بكتريا التدرن التاجى الممرضة يمكنها أن تقاوم مركب agrocin 84 ولذلك فإن هذه السلالة البكتيرية فقدت قدرتها على مقاومة المرض فى بعض المناطق.

المتحركات المستعملة فى عزل ونقل الجينات

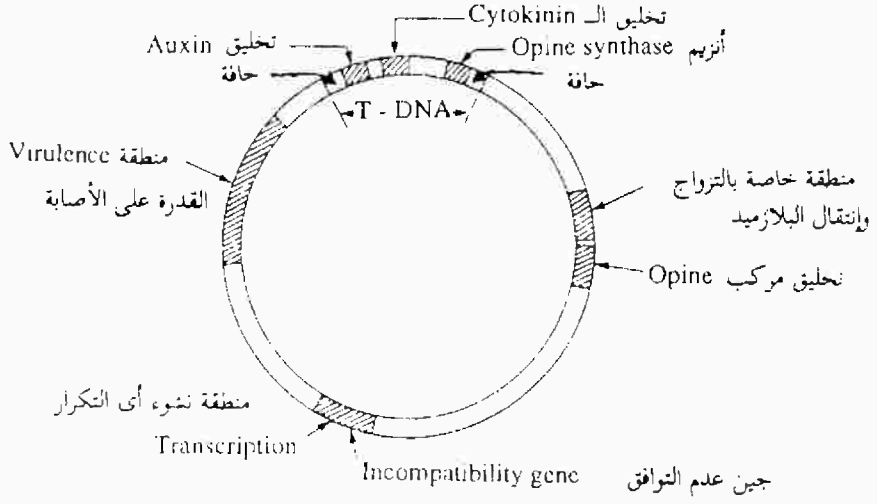
Cloning Vehicles Used For Gene Cloning In Plants

تعتبر vectors أو cloning vehicles كائنات حية دقيقة عادة أو أجزاء منها agent والتى تنقل المادة الوراثية من كائن حى يسمى الواهب donor إلى كائن حى آخر يسمى المستقبل recipient وبحيث أن هذه المادة الوراثية المنقولة يمكن أن تعبر عن نفسها وذلك بأظهار الصفة أو الصفات الخاصة بها فى الكائن المستقبل أو فى الخلية المستقبلة recipient cell ومثال ذلك البلازميدات والفيروسات البكترية أى البكتريوفاج bacteriophage والتى تسمى أيضاً للأختصار بالفاج phage وذلك فى حالة البكتريا وأيضاً الفيروس SV40 لخلايا الحيوان. تعتبر الكوزميدز cosmids أيضاً كذلك وهى عبارة عن نوع خاص من البلازميدات المهندسة وراثياً مشتقة من نوع خاص من الفاج وهو الفاج لامدا bacteriophage lambda وهذه البلازميدات والفاج و SV40 و cosmids تستعمل لأنها cloning vehicles أو vectors للمادة الوراثية المنقولة إلى البكتريا والخميرة والحيوانات. يستعمل البلازميد الخاص بالبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وأيضاً فيروس موازيك أى تبرقش القنبيط وهو عبارة عن DNA ثنائى الشريط DNA double stranded أى ds DNA فى نقل المادة الوراثية إلى النبات. بالإضافة إلى ذلك فإنه توجد فيروسات وحيدة الخيط أو الشريط ss - DNA وتسمى geminiviruses وأيضاً فيروسات RNA وحيدة الشريط أو الخيط single stranded RNA (ss- RNA) وهى فيروس موازيك أى تبرقش التبغ tobacco mosaic virus (TMV) وبعض الفيروسات الأخرى وأيضاً المتنقلات transposons تستعمل فى نقل المادة الوراثية فى النبات. وفيما يلى شرح

لأهم cloning vehicle فى نقل المادة الوراثية فى النبات وهو البلازميد Ti .

بلازميد Ti للبكتريا *Agrobacterium tumefaciens* : يستعمل هذا البلازميد بكثرة فى نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره فى الجزء السابق. يحتوى هذا البلازميد على عديد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها . يحتوى الجزء من هذا البلازميد المسمى T- DNA على عديد من الجينات منها. الجين الأول والذى يخلق أنزيمopine synthetase والذى يقوم بتخليق opines وهى مركبات تنتج فقط بواسطة خلايا النبات العائل المحولة transformed بواسطة هذه البكتريا. هذه المركبات وهى opines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطة خلايا البكتريا التى تحتوى على بلازميد Ti . خلايا البكتريا الخالية من بلازميد Ti غير قادرة على أستعمال opines فى التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتريا يجب أن تحتوى على جين خاص بتخليق opines. الجين الثانى أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم فى تخليق السيتوكينينات. حيث أن تثبيط تكوين السيتوكينينات فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة من الجينات والتى تتحكم فى تخليق الأوكسينات. حيث أن تثبيط تكوين إندول حامض الخليك فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. الجين الرابع أو مجموعة من الجينات وهى عبارة عن حافتى الجزء T-DNA من الناحية اليمنى والناحية اليسرى وتتكون كل من الحافة اليمنى والحافة اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النووية وهى التى تتحكم فى عملية نقل جزء من T-DNA من البلازميد إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل حيث وجد أن إزالة ٢٥ زوج من القواعد النووية أى الحافة اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وأيضاً تؤثر على قدرة البكتريا على الإصابة وتصبح غير فعالة فى إصابة النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزيئ T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدرة الطفيل أى البكتريا على الإصابة virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذا الجزء من البلازميد بمنطقة قدرة البكتريا على إصابة النبات أى virulence region وهى بعيدة عن منطقةT-DNA. تتكون المنطقة الأخيرة من عديد من الجينات. توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيوية أخرى مثل التزاوج الجنسى بين البكتريا ونقل بلازميد Ti من البكتريا الممرضة إلى البكتريا الغير ممرضة وأيضاً 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. وأيضاً جين أو جينات تتحكم فى عدم التوافق بين بعض البلازميدات وبعض سلالات من بكتريا التدرن التاجى وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تحديد مكان أصل وبداية إنقسام ونسخ وتضاعف

البلازميد replication , origin of transcription (شكل ٢٠١).



(شكل ٢٠١) : البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التى تقوم بعمل بعض الوظائف الهامة.

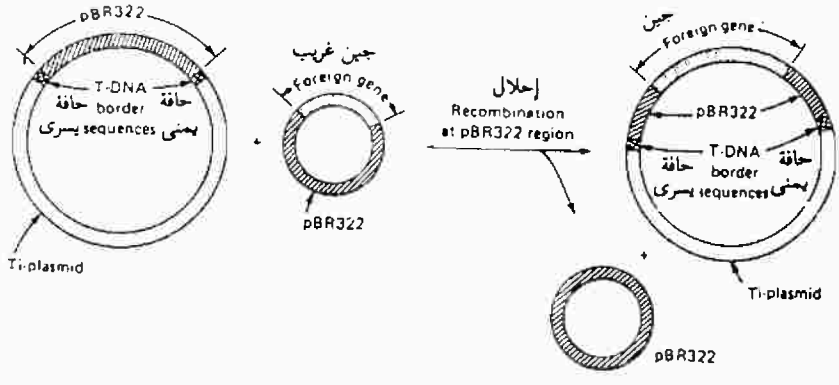
يعتبر البلازميد Ti فعال فى نقل DNA الخلية البكترية إلى المادة الوراثية فى النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله فى نقل مادة وراثية غريبة foreign أى غير موجودة به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصعب التعامل معه وراثيا manipulate genetically والأهم من ذلك أن الخلية للنبات العائل تتحول من خلية عادية إلى خلية محولة تنقسم بسرعة كبيرة وتدخل فى تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعادة تكون نبات عادى من هذه الخلايا المحولة transformed . أتضح أيضاً أن الجينات الموجودة فى T-DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) ليس لها دور فى نقل جزيئ T-DNA من البكتريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بكروموسوماته. ومما هو جدير بالذكر أن أدخال جينات أو أجزاء DNA من خلايا الحيوان أو البكتريا أو النباتات الزهرية التى ليس لها علاقة بالنبات العائل إلى T-DNA

البلازميد حيث توجد هذه الجينات فى داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى المادة الوراثية فى النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خاملة أى غير قادرة على التعبير عن وجودها فى النبات العائل وإظهار صفاتها. ولكن فى بعض الحالات وعند إضافة جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيئ promoter region لجين أنزيم opine synthetase فإن هذا الجين يسمى جين كيميرى chimaeric gene وبذلك يمكن لبعض الجينات المنقولة أن تصبح نشطة أى قادرة على إظهار صفاتها فى خلايا النبات العائل وذلك نتيجة لنشاط بعض الأنزيمات الخاصة بها.

يمكن إزالة الجزء الخاص بتكوين التدرن أو الورم من البلازميد وهو عبارة عن الجزء المحتوى على الجينات الخاصة بتخليق الأوكسينات والسيتوكينينات فقط من T-DNA دون إزالة الحافتين اليمنى واليسرى واللذين تتحكمان فى نقل T-DNA إلى خلايا العائل يسمى الجزء الخاص من البلازميد Ti الذى يتحكم فى تكوين الورم tumor inducing بإسم منطقة أو نكوجينك 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 فاقدة للقدرة على الهياج وأيضاً فاقدة القدرة على عدم التأثر بأوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العائل أو بمعنى آخر فإن الخلايا المحولة تصبح محكومة وتحت تأثير أوكسينات وسيتوكينينات خلايا النبات العادية ولذلك فإن هذه الخلايا المحولة تكون فاقدة الإنقسام السريع وتكوين الورم أو التدرن بالرغم من إحتوائها على البلازميد كما يمكن لهذه الخلايا المحولة والتى تحتوى على عوامل وراثية جديدة أن تنقسم إنقساماً عادياً وبسرعة عادية لتكون نبات محول كامل جديد به عوامل وراثية جديدة.

أى أنه بذلك تصبح الخلايا المحولة خلايا عادية بها مادة وراثية أو عوامل وراثية جديدة وبالطبع تفقد هذه الخلايا المحولة قدرتها على الهياج. يمكن شغل الأماكن الخالية فى بلازميد Ti فى هذه الحالة وهى أماكن جينات الأوكسينات والسيتوكينينات فى جزئى T-DNA بواسطة جينات كيميرية خاصة بمقاومة بعض المضادات الحيوية شديدة السمية مثل كاناميسين kanamycin وميثوتريكسيت methotrexate . يمكن وضع هذين المضادين الحيويين فى البيئة وبذلك تصبح بيئة إنتخابية حيث ينمو عليها فقط الخلايا المحولة والتى تحتوى على جينات المقاومة لهذين المضادين الحيويين وأيضاً تنمو عليها النباتات المحولة فقط والتى لها صفة المقاومة لهذين المضادين الحيويين. وبذلك يسهل عزل الخلايا المحولة من الخلايا الأخرى حيث أن الخلايا المحولة تعيش والخلايا العادية تموت.

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبة وذلك بإزالة الجزء الأساسى فى T- DNA مع ترك الحافتين (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) أى أزالة الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم شغل هذا المكان الفارغ من البلازميد بواسطة بلازميد آخر صغير ومدروس وراثياً تماماً أى معروف فيه تتابع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتريا *E.coli* ومثال البلازميد pBR322 يتم أيضاً وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخر من نفس النوع أى pBR 322 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 pBR 322 فى بعض خلايا البكتريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزيئين من بلازميد *E.coli* وهو pBR 322 وذلك لبلازميد الخلية البكترية المسببة لمرض التدرن التاجى أى بلازميد Ti (شكل٢٠٢). عند إضافة الخلية البكترية للنبات فإنها تنقل إلى كرموسومات خلية النبات جميع جزء DNA الموجود بين حافتين جزء



(شكل ٢٠٢) نقل جين غريب إلى البلازميد Ti بإستعمال بلازميد آخر صغير.

T-DNA أى أنها تنقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل بلازميد *E.coli* أى pBR 322 بما يحمله من الجين المطلوب نقله. ولقد أستعملت هذه البلازميدات بنجاح وبكفاءة عالية فى نقل الجينات المطلوبة إلى كروموسومات خلية أو خلايا النبات العائل ثم ينتج من هذه الخلايا نبات كامل خصب عادى يحتوى على الجينات المنقولة وتصبح هذه الجينات كجزء عادى من كروموسومات النبات. وتنتقل أيضاً إلى نسل هذا النبات عن طريق حبوب اللقاح وخلية البيضة وبالطبع يسبق تكوين هذه الأجزاء الأنقسام الأختزالى والذى ينقسم فيه الجين المنقول بطريقة عادية كما فى جينات النبات الأخرى.

توجد طريقة أخرى تستعمل للتغلب على كبر حجم البلازميد Ti وهى نقل أى جين مطلوب أو جينات مطلوبة بين حافتى 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 المنطقة أو الجزء من البلازميد الخاص بقدرة الطفيل على إصابة النبات virulence region من هذا البلازميد إلى بلازميدات أخرى صغيرة. كلا من هذين النوعين من البلازميدات الصغيرة غير قادر على إصابة النبات على إنفراد. وعند السماح بخلط هذين النوعين من البلازميدات بالبكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى فإنها تنتقل إلى داخلها وتصبح خلايا هذه البكتريا قادرة على إصابة النبات لأحتوائها على جين أو جينات الإصابة كما أن حافتى جزء T- DNA والجين أو الجينات المطلوبة تنتقل إلى كروموسومات خلية النبات العائل وتصبح جزء منها . وبذلك يتم نقل الجين أو الجينات إلى النبات العائل بكفاءة عالية.

تزداد الآن المعلومات الخاصة بأستعمال بلازميد Ti فى نقل الجينات أى أستعمالهcloning vehicle أو vector وكلها فى صالح هذا البلازميد حيث أنه يحدث تقدم ملحوظ فى إستعماله مع وجود طرق جديدة بإستمرار لتسهيل أستعماله وزيادة كفاءة أستعماله فى حالات متعددة لم يكن يستعمل فيها أصلاً. ولذلك فإن نقل جينات من البكتريا أو النبات أو الحيوان إلى خلايا النبات أصبح فى الأمكان وأمكن أنجازه. ولكن مدى وكيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها فى خلايا النبات العائل الجديد regulatory controls of expression of genes غير معروفة أو معروف عنها القليل. تصيب بكتريا التدرن التاجى النباتات ذات الفلقتين فقط ولا تصيب النباتات ذوات الفلقة الواحدة وبالرغم من أن كثير من محاصيل الغذاء مثل القمح والذرة والأرز وقصب السكر تتبع نباتات ذوات الفلقة الواحدة. وأيضاً نفس الشىء بالنسبة للبلازميدات Ti . ولكن أمكن

الآن تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات فلقتين مباشرة بواسطة بلازميد Ti أو ببروتوبلاست خلايا بكترية ويسمى البروتوبلاست الملقح بهذه الأجزاء sphaeroplasts ويمكن إنتاج نباتات كاملة بعد ذلك من هذه sphaeroplasts. وأمكن الآن أيضاً تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات الفلقة بواسطة بلازميد Ti ولكن حتى الآن لم يمكن إنتاج نباتات ذوات فلقة كاملة من البروتوبلاست وذلك على عكس من ذوات الفلقتين.

زيادة الدراسات والمعلومات عن بلازميد Ti لا تزيد فقط من معلوماتنا عن طبيعة الطفيل المرضية أى طبيعة بكتريا التدرن التاجى بل أيضاً تزيد من كفاءة نقل جينات مقاومة لأمراض النبات من نبات إلى آخر ويمكن أن يكون هذا النبات الأخير من جنس مختلف أو حتى من عائلة مختلفة. ومن مميزات هذه الطريقة أنها تنقل الجين المطلوب إلى خلية النبات العائل دون زيادة فى جينات غير مرغوبة ودون حدوث نقص فى جينات مرغوبة ومن مميزاتها أيضاً أنها سريعة ولا تحتاج إلى وقت لعمل التهجين بين النباتات crosses وأيضاً لعمل التهجينات الرجعية backcrosses. تعتبر العقبة الرئيسية فى أستعمال بلازميد Ti فى مقاومة أمراض النبات هى نقص المعلومات عن مكان وجود جينات المقاومة فى النبات فى جينومات النباتات المختلفة وأيضاً كيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها فى النباتات الجديدة المنقولة إليها.

ولكن على العكس من ذلك فى صفات أخرى فقد أمكن حديثاً تحديد مكان وجود الجينات المسئولة عن إزهار نبات الطماطم وأمكن عزل هذه الجينات وبالتالى أمكن عمل DNA تكميلى cDNA لها. وبالتالى عمل دراسات عن الأزهار بواسطة cDNA .

الأوكسينات والبكتريا (مرض تعقد الزيتون) *Pseudomonas savastanoi*:

تصيب هذه البكتريا نباتات الزيتون والدفله *Nerium oleander* وتسبب حدوث أورام على الجذور والسيقان والفروع والأوراق وأعناق الثمار. تبدأ الأورام صغيرة ثم تكبر تدريجياً وقد تصل الأورام إلى أحجام كبيرة قطرها عشرة سم أو يزيد. كما أن الأفرع الطرفية فى النبات تتقزم أو تموت. وقد تسبب الأصابة الشديدة موت الأشجار. تعيش هذه البكتريا فى داخل هذه الأورام. وبدراسات البيولوجيا الجزيئية molecular biology والهندسية الوراثية لهذه البكتريا أتضح أن البكتريا المسببة لتعقد الدفله تختلف عن البكتريا المسببة لتعقد الزيتون فى موقع الجينات اللازمة لتخليق أندول حامض الخليك حيث وجد فى الحالة الأولى جينات مسئولة عن تخليق IAA على البلازميد وهى الجينات iaaM وهى مسئولة عن تخليق أنزيم تربتوفان mono oxygenase

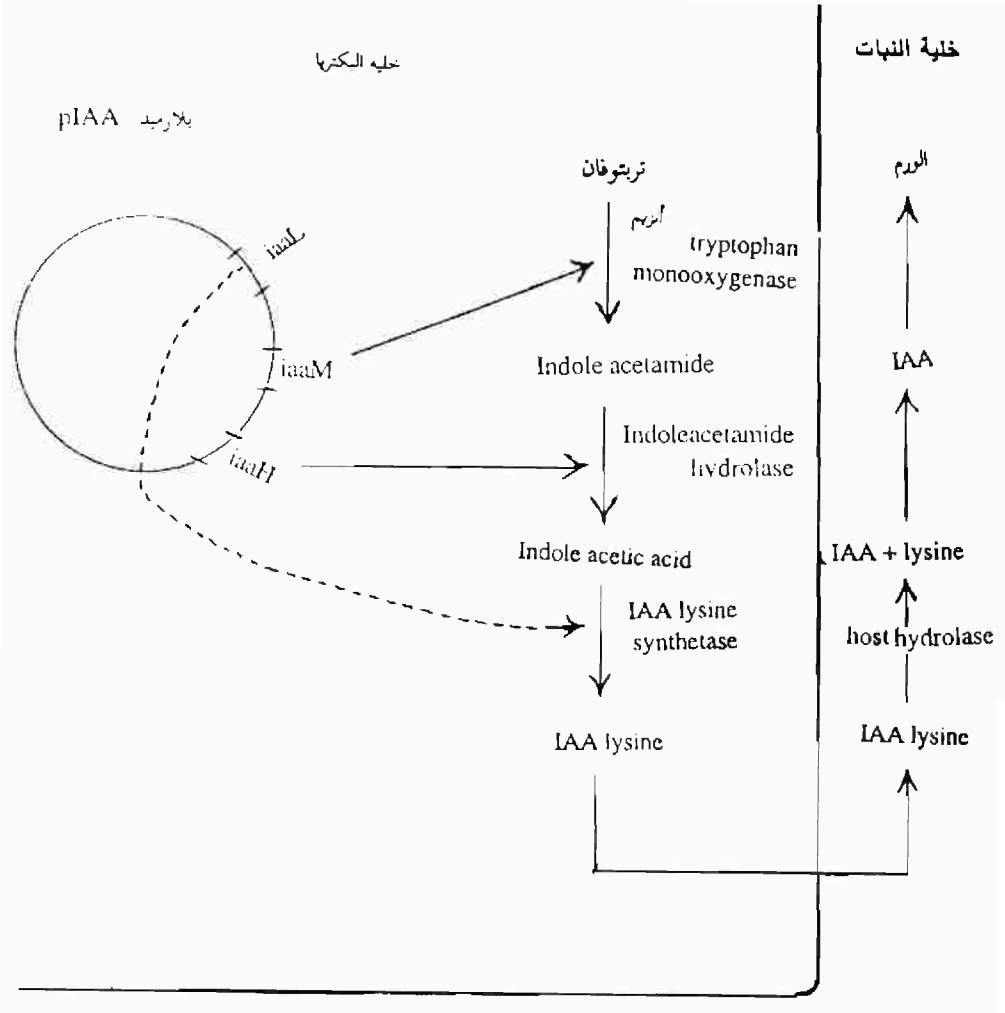
والذى يقوم بتحويل الحامض الأمينى تربتوفان داخل خلية البكتريا إلى indoleacetamide وأيضاً الجينات iaa H المسئولة عن تخليق أنزيم indoleacetamide hydrolase وهذا الأنزيم الأخير يقوم بتحويل indoleacetamide إلى أندول حامض الخليك كما يوجد أيضاً iaa L وهى جينات مسئولة عن تخليق أنزيم IAA lysine synthetase وهو يسبب أرتباط IAA مع الحامض الأمينى ليسين ليتكون IAA المرتبط أى IAA lysine. تحدث جميع الخطوات السابقة داخل خلية البكتريا. ينتشر IAA lysine من داخل خلية البكتريا إلى خلية النبات وحيث تفرز خلية النبات أنزيم IAA lysine hydrolase وحيث يسبب ذلك فصل الأخير إلى IAA والحامض الأمينى ليسين ويصبح أندول حامض الخليك حر وفعال حيث أنه فى الصورة المرتبطة يكون غير فعال. يسبب أندول حامض الخليك تنشيط وتشجيع خلية وخلايا النبات على الأنقسام السريع ولذلك يتكون الورم. وجد نفس الشيء فى بكتريا تعقد الزيتون إلا أن هذه الجينات لا توجد على البلازميد كما فى الدفلة (شكل ٢٠٣) بل توجد على الكروموسوم البكتيرى أى الخاص بالخلية البكتيرية. أى أن فى البكتريا التى تصيب الدفلة توجد هذه الجينات على البلازميد أما البكتريا التى تصيب الزيتون توجد هذه الجينات على الكروموسوم البكتيرى. يسمى هذا البلازميد الموجود فى داخل خلية البكتريا بأسم بلازميد أندول حامض الخليك pIAA (شكل ٢٠٣).

أمكن تثبيط جينات iaa L على البلازميد فى خلايا بكتريا الدفلة ولم تتمكن خلايا البكتريا فى هذه الحالة من تكوين الأورام على نبات الدفلة، أى أن تكوين الأورام على النبات مرتبط بنشاط وفاعلية وكفاءة جينات iaa L الموجودة على بلازميد الخلية البكترية.

أمكن أدخال جينات iaa M، iaa H من هذه البكتريا إلى نوع آخر من البكتريا لا يحدث أورام على النبات وهى *Erwinia herbicola pv gypsophila* وأصبحت البكتريا الأخيرة قادرة على عمل أورام على النبات oncogenic activity.

تعتبر جينات iaa M و iaa H عبارة عن IAA operon توجد هذه الجينات نفسها على البلازميد Ti أى Ti plasmid فى البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى. يثبت ذلك أن هذين النوعين من البكتريا *P. savastanoi* و *A. tumefaciens* لهما أصل مشترك واحد أى أنهما نسل وأحفاد لأصل واحد وجد منذ أزمنة أو عصور أو أحقاب جيولوجية أو منذ زمن بعيد.

حالة الجينات المسئولة عن تكوين السيتوكينينات فى بكتريا *P. savastonoi* غير واضحة وغير معروفة بالتفصيل كما فى حالة بكتريا التدرن التاجى وكما سبق شرحه.



(شكل٢٠٣) : خطوات تخليق إندول حامض الخليك في داخل البكتريا *Pseudomonas savastanoi* ودورة في تكوين الورم في النبات العائل

ثانياً : تثبيت الأزوت الجوى

تم الحديث عن تثبيت الأزوت الجوى فى الباب السابق كما تم حصر الكائنات الحية الدقيقة التى لها دور كلى أو جزئى فى ذلك. وقد كان أمل وأمنية علماء الزراعة هو إمكانية إدخال صفة تثبيت الأزوت الجوى فى النباتات. وقد تم تناول هذا الموضوع أولا: بإستعمال مزارع الأنسجة إلا أن التجارب قد باءت بالفشل ولم يمكن عمل ذلك بواسطة مزارع الأنسجة. وفيما يلى مختصر لما تم عمله عن طريق مزارع الأنسجة. وقد كان ذلك عن طريق مزارع البروتوبلاست وحيث يمكن الحصول على بروتوبلاست الخلايا دون الجدار وذلك بطرق عديدة (راجع باب مزارع الأنسجة – مزارع البرتوبلاست).. بعد الحصول على البروتوبلاست العادى العارى أى عديم الجدار فقد وجد أن البروتوبلاست العارى عديم الجدار يمكن أن يتميز بأحد خصائص الخلايا الحيوانية وهى تكوين الحويصلات وإنتقالها إلى داخل الخلية كما وجد أيضاً أنه يمكن أن يلتقم جزيئات صلبة من ferritin وأيضاً thorium oxide كما وجد أيضاً أن يمكنه أن يلتقم جزيئات الفيروس ولذلك تصبح هذه الجزيئات داخل البروتوبلاست العارى وتشبه هذه الحالة خلية الأميبا التى تتميز بتكوين أقدام كاذبة من البروتوبلاست ثم تلتقم الأجزاء الصلبة الموجودة فى البيئة وتصبح داخل البروتوبلازم وهكذا لتتغذى عليها. وهكذا يمكن تطبيق ذلك على بكتريا العقد الجذرية *Rhizobium* وحيث تجرى محاولات لجعل البروتوبلاست يلتقم بكتريا العقد الجذرية وبذلك تثبت هذه الخلايا الأزوت الجوى وبذلك تتمتع هذه الخلايا بصفة تثبيت الأزوت الجوى وبذلك يمكن إنتاج نباتات دون البقوليات تتمتع بصفة تثبيت الأزوت الجوى. ولكن باءت جميع هذه التجارب بالفشل، وقد تم إستبدال ذلك ثانياً: بالهندسة الوراثية. والفكرة فى ذلك أنه لو أمكن جعل النباتات الغير بقولية قادرة على عمل معيشة تعاونية مع البكتريا المثبتة للنيتروجين وبذلك تكون مستقلة من حيث التسميد الأزوتى فإن ذلك يكون إنجاز أكثر من رائع. ويمكن عمل ذلك أولاً بتحسين كفاءة تثبيت الأزوت الجوى فى بكتريا العقد الجذرية أى زيادة معدل وكفاءة تثبيتها للأزوت الجوى، أى عمل سلالات ذات كفاءة عالية فى تثبيت الأزوت الجوى ويكون ذلك عن طريق الهندسة الوراثية وثانياً عمل هندسة وراثية للنباتات ذاتها بحيث تكون وراثياً لها كفاءة عالية فى تثبيت الأزوت الجوى وهذا العمل إن تم إنجازه لا يماثله من ناحية العظمة والمنفعة إنجاز آخر فى الزراعة.

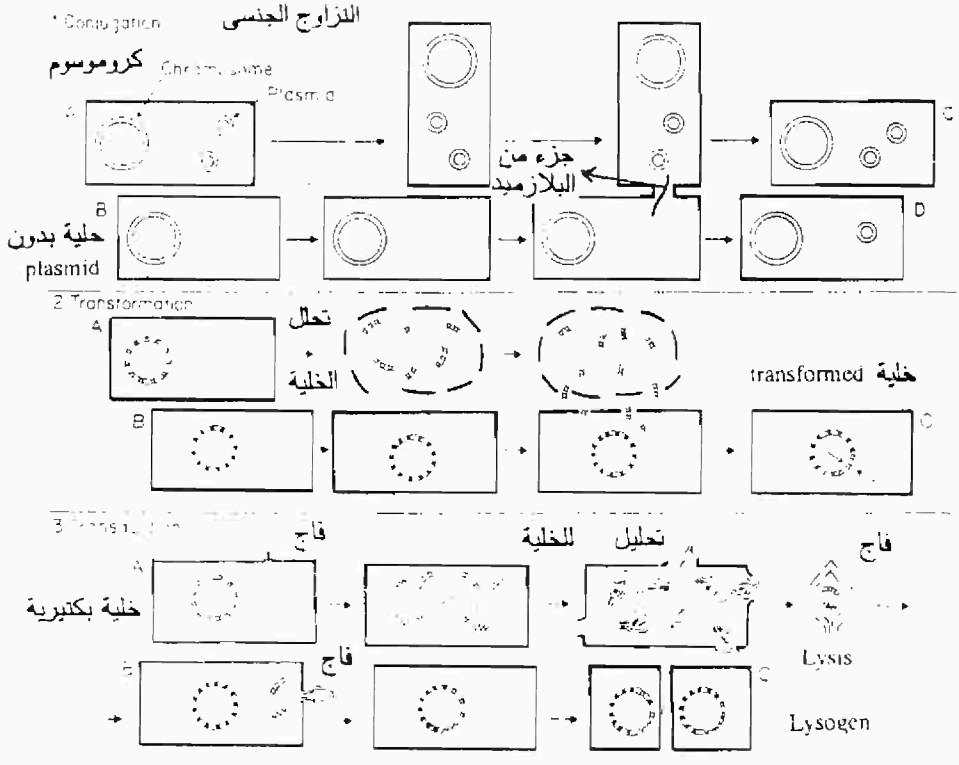
أولاً جينات تثبيت الأزوت الجوى *nif* تم عزلها من البكتريا العقدية لصنف هام من فول الصويا وذلك للبكتريا *R. japonicum* للسلالة رقم ١١٠. بعد تنقية دنا من هذه السلالة

البكتيرية فإن شظايا مأخوذة إعتباطياً يتم إدخالها فى بلازميدات مناسبة ثم تم نقل هذه البلازميدات إلى خلايا البكتريا إ.كولاى *E. coli*. تم عمل الحسابات التى أوضحت أن كروموسوم بكتريا الريزوبيم يمكن أن يمثل فى حوالى ٣٠٠٠ إلى أربعة آلاف طراز متحول من خلايا بكتريا إ.كولاى مستقلة *E. coli* transformants independant. وتم عمل حصر لـ ٣٣٢٥ خلية متحولة مختلفة من البكتريا إ. كولاى فإن ٢١ منهم يحتوى على دنا يحتوى على جينات نف. وبتحليل البلازميدات فى هذه الواحد والعشرون خلية متحولة مختلفة أوضحت أن جميعهم لهم نفس الحجم من دنا ٥,٨ × ١٠^{٦} دالتون. وأثبتت التجارب بعد ذلك أن هذه الأجزاء من دنا تحمل جينات نف. وجد أن جينات نف تزيد عددها عن عشرون جين. ولكن فى البداية كان العدد أقل حيث أنه بمرور الزمن يزداد أكتشاف جينات أخرى خاصة بنف وهكذا يزداد عدد الجينات.

ومن الحالات المدروسة جيداً وتحتوى جينات نف وتقوم بتثبيت الأزوت الجوى البكتريا حرة المعيشة *Klebsiella pneumoniae*. وقد وجد فى هذه البكتريا بمفردها ١٧ جين خاص بتثبيت الأزوت والتى توجد فى ثمان أوبرون operons والتى تشفر لثلاث تحت وحدات subunits المكونة لأنزيم النيتروجينيز nitrogenase . التحكم فى النسخ صعب ومعقد. وباختصار نواتج *ntr* A و C *ntr* تنشط عملية النسخ فى حالة A *nif* والناتج من ذلك مع الناتج من A *ntr* ينشط عملية النسخ فى الجينات الأخرى. وهكذا وكما سبق القول فإنه يوجد خطة لتحسين كفاءة هذه البكتريا وهى بتحسين وتنشيط هذه السلالات من حيث تثبيتها للأزوت الجوى وذلك بزيادة نشاطها وكفاءتها وأيضاً بتحويل السلالات من هذه البكتريا الغير قادرة على تثبيت الأزوت الجوى سالبة لنف - *nif* إلى سلالات موجبة لنف $^{+}$ *nif* أى قادرة على تثبيت الأزوت الجوى. ويكون ذلك بإحدى ثلاث طرق وهى التحول والتحول عن طريق الفيرس والتكاثر الجنسى (شكل٢٠٤).

١ – التحول Transformation : هى عبارة عن إكتساب خلايا البكتريا لوحدات وراثية أو عوامل وراثية تصل إليها عن طريق البيئة النامية عليها. وبذلك تغير هذه العوامل من التركيب الوراثى وعادة تظهر صفات جديدة للخلايا البكتيرية. أكتشفت هذه الحالة فى البكتريا *Diplococcus pneumoniae* حيث تتميز هذه البكتريا بوجود سلالات ملساءsmooth لها غلاف capsule وذات قدرة مرضية شديدة للإنسان والحيوان وسلالات أخرى عديمة الغلاف خشنة rough عديمة القدرة المرضية. تتحول السلالات الأخيرة إلى سلالات لها غلاف ملساء ذات قدرة مرضية عالية للحيوان والإنسان عند تنميتها على بيئة تحتوى على خلايا ميتة للسلالة

ذات الغلاف الملساء. وجد بعد ذلك أنه يمكن وضع الحامض النووى DNA النقى المأخوذ من السلالة الخشنة فى البيئة ويحدث نفس التأثير على السلالة الملساء. وهكذا تتحول السلالة الخشنة إلى سلالة ملساء ممرضة وذلك عن طريق إنتقال المادة النووية من سلالة إلى أخرى عن طريق البيئة وليست عن طريق التزاوج. وجدت هذه الظاهرة فى البكتريا الممرضة للنبات *Xanthomonas phaseoli* وهى المسببة لمرض لفحة الفاصوليا البكترية وفى البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* المسببة لمرض التدرن التاجى (شكل ٢٠٤).



(شكل ٢٠٤) : كيفية حدوث الإختلافات الوراثية variability فى خلايا البكتريا بالطرق المختلفة

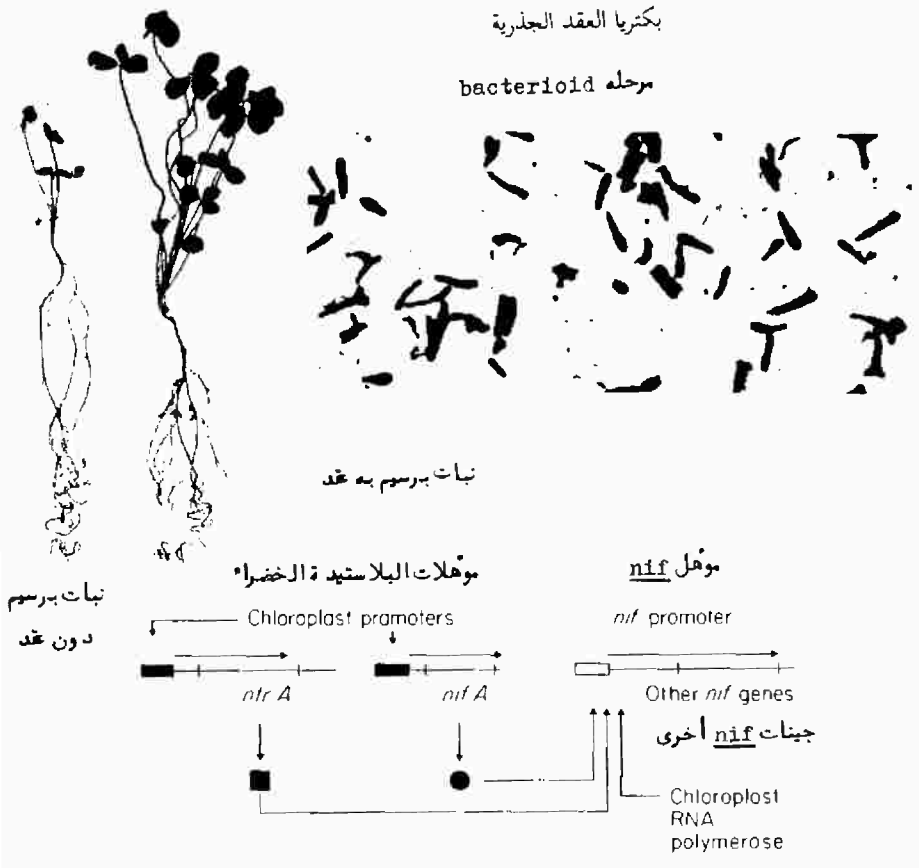
٢- التحول عن طريق الفيروس البكترى Transduction: يمكن للفيرس البكتيرى Cphage أو bacteriophage أن يعيش داخل الخلية البكتيرية ويكتسب بعض أجزاء الحامض النووى DNA الخاص بالخلية البكتيرية والمسئول عن بعض صفات الخلية البكتيرية. يتحرر الفيرس البكتيرى أى الفاج من الخلية البكتيرية بعد موتها أو تحللها ويصيب خلية بكتيرية أخرى ويحقن مادته النووية فى الخلية البكتيرية الجديدة. تصبح المادة النووية المحقونة متداخلة مع المادة النووية للخلية البكتيرية وبذلك تكتسب هذه الخلية صفات جديدة. يتضح أن الصفات تنقل من خلية بكتيرية إلى أخرى عن طريق الفاج وذلك عن طريق نقله للجينات أى العوامل الوراثية الموجودة فى DNA . وجدت هذه الحالة فى البكتريا الممرضة للنبات مثل *Pseudomonas solanacearum* المسببة لمرض العفن البنى فى البطاطس ومرض الذبول فى الطماطم والتبغ (شكل ٢٠٤).

٣- التكاثر الجنسى : يحدث التكاثر الجنسى بقلة فى البكتريا حيث يحدث فى بعض الأنواع مثل *Escherichia coli* . حيث وجد أن لها سلالتين تختلفان جنسياً. يحدث تزاوج جنسى إذا وضعت خلايا السلالتين مع بعضها. عند إقتراب خليتان مختلفتان جنسياً من بعضهما يعتقد البعض فى تكوين تزاوج عن طريق زوائد تسمى بيلى pili أو عن طريق قنطرة تزاوج سيتوبلازمية تصل بين الخليتين ولكن من الثابت حتى الآن أنه غير معروف بالضبط تفاصيل إنتقال جزء من DNA من خلية إلى أخرى. ينتقل جزء من مركب الحامض النووى DNA من أحد الخليتين وهى الخلية الواهبة إلى الخلية الأخرى وهى الخلية المستقبلة. تموت الخلية الواهبة donor وتتحول الخلية المستقبلة acceptor إلى الزيجوت ويسمى merozygote. يلى ذلك حدوث إنقسام شبيه بالإنقسام الإختزالى غير معروف طريقه حدوثه بالضبط منتجاً خلايا بكتيرية جديدة تحمل عادة صفات خليطة من كل من الخليتين الواهبة والمستقبلة. يلاحظ دائماً أن أحد السلالتين المتزاوجتين خلاياها دائماً واهبة وعليها هديبات pili وأن السلالة الأخرى خلاياها دائماً مستقبلة وعديمة الهديبات. تعتبر السلالة الواهبة ذكر بينما تعتبر السلالة المستقبلة أنثى (شكل ٢٠٤). نتيجة للتزاوج الجنسى تتحول الخلية المؤنثة إلى خلية مذكرة.

وهكذا بأحد الطرق السابقة أو بأكثر من طريقة يمكن نقل جينات نف من السلالات السالبة لنف لتصبح موجبة أو تحسين خواص السلالات الموجبة لتصبح أكثر كفاءة (لشرح هذه الطرق بالتفصيل راجع كتاب أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية للمؤلف) أما عن الطريقة الأخرى لتحسين وتنشيط صفة تثبيت الأزوت الجوى فى النبات وذلك بإدخال المادة الوراثية الخاصة

بجينات نف فى النبات أى إدخالها فى المادة الوراثية للنبات ويمكن تنفيذ ذلك كما سبق ذكره فى حالة مرض التدرن التاجى المذكور فى بداية هذا الباب وذلك بإستخدام البلازميد ولكن لسوء الحظ فإن ذلك غير ملائم أو حتى مناسب لنباتات ذوات الفلقة مثل النجيليات. ولكن يمكن التغلب على ذلك بإستخدام البلاستيدات الخضراء حيث أتضح أن البلاستيدات الخضراء يمكن أن تكون موقع مناسب لجينات نف عن النواة. حيث أن الآلية التى تتحكم فى تعبير الجين فى النواة تختلف عن الآلية الموجودة فى البكتريا ولكن لا يعنى ذلك إستحالة ذلك أذ أنه يمكن نقل ١٥ جين من جينات نف السبعة عشر إلى خلايا بكتريا وتعمل بكفاءة حيث يتم النسخ والترجمة بكفاءة عالية فى داخل خلية البكتريا المحولة وذلك بإستخدام منشطات T دنا للبلازميد *nif* Ti (by using Ti plasmid T- DNA promoters for 15 genes of clusters). ولو أن ذلك سيحتاج إلى تجارب كثيرة مضنية بدرجة كبيرة جداً. ولكن البلاستيدات الخضراء تعتبر أسهل لأنها من المحتمل أنها تعتبر منحدرة من خلايا بدائية النواة قد تكون خلايا بكتيرية أو ما يشابها ولذلك لها ما يماثل أو يشابه النظام الوراثى فى البكتريا bacterial - type genetic system. ولذلك فإنه من المحتمل أن البلاستيدات الخضراء يمكن أن تعبر عن جينات نف المنقولة إليها بتجارب أسهل من نقل هذه الجينات لدنا نواة خلية النبات. أى أن التجارب تكون أسهل بكثير فى حالة البلاستيدات الخضراء عنه فى حالة النقل للنواة، خاصة وأن إ. كولاى يمكن أن تعبر بسهولة عن جين ريبليوز ثنائى الفوسفات كاربوكسيليز الموجود فى البلاستيدات الخضراء والخاص بمدخل دورة كالفن وبنسون (chloroplast ribulose diphosphate carboxylase gene). وفيما يلى توضيح شكل مقترح لكيفية تعبير جينات نف عن نفسها فى البلاستيدات الخضراء للنبات (شكل ٢٠٥). وبالرغم من ذلك فإن سلالات من نباتات الذرة والقمح وغيرها بها هذه الصفة فإنها حتى الآن بعيدة المنال وقد تكون ممكنة فى المستقبل وقد تكون مستحيلة أيضاً فى المستقبل.

بعض السلالات من *R. japonicum* تحتوى على جينات قادرة على أخذ الإيدروجين تسمى جينات هب *hup*. وأن نباتات فول الصويا المحتوية على هذه السلالة من البكتريا تكون أكثر كفاءة فى الطاقة عن النباتات الأخرى الغير محتوية على هذه السلالة. توجد جينات هب على البلازميدات والتى يمكن أن تنتقل من خلية إلى أخرى بالتزاوج بين البكتريا. ولذلك يمكن إدخال هذه الجينات على بلازميدات الخلايا الغير محتوية على الجينات لسلالات البكتريا الخالية من جينات هب وهكذا نزيد من كفاءة الطاقة دون نقص أو مساس قدرة الخلايا البكتيرية على المنافسة فى البيئة الأصلية أو على معيشتها فى البيئة. وهذه الحالة هامة حيث أن العوامل البيئية



(شكل ٢٠٥) : إقتراح للجينات المنظمة لنف لهندسة تعبير جينات نف عن نفسها فى البلاستيدات الخضراء.

الجينات المنظمة *ntr* A للجينات نف ذاتها يمكن أن توضع تحت تحكم مؤهلات البلاستيدات الخضراء chlorophast promoters للتأكد من تعبير مثالى. بإفتراض أن *ntr* وجين نف لهما نواتج معينة وهذه يمكن أن تتفاعل بفاعلية مع أنزيم بلمرة دنا للبلاستيدات الخضراء. تعبير جينات نف يمكن أن تقع تحت تأثير مؤهلات البلاستيدات الخضراء الملتحمة مع *ntr* A و *nif* A .

Proposed manipulation of *nif* regulatory genes to engineer *nif* gene expression in a plant chloroplast. The *ntr* A and *nif* genes could be placed under the control of chloroplast promoters to ensure optimal expression. Assuming the *ntr* and *nif* A gene products could interact effectively with chloroplast RNA polymerase, expression of *nif* genes would come under the control of the chloroplast promoters fused to *ntr* A and *nif* A.

مثل pH والجفاف والملح والأيونات السامة وغيرها يمكن أن تؤثر بدرجة كبيرة على إدخال سلالات بكتيرية عقدية جديدة وحيث تكون السلالات القديمة أى المتأقلمة فى هذه التربة قادرة على المعيشة فى هذه الظروف البيئية الصعبة التى لا تلائم سلالات جديدة من البكتريا. وحيث أن أخذ الإيدروجين عبارة عن عملية تؤثر على كفاءة تثبيت الأزوت فإنه تم عمل نقل للبلازميدات عن طريق التزاوج البكتيرى لإنتاج سلالات من البكتريا العقدية أكثر كفاءة فى أخذ الإيدروجين من كلا الأبوين. يوجد بلازميد حيوى فى هذا الصدد وهو pIJ 1008 يحمل جينات هب والغير موجودة فى سلالات الريزوبيم الموجودة فى البرسيم الحجازى والبرسيم. بالرغم من أن هذا البلازميد موجود وفعال فى سلالات الريزوبنيم فى البسلة وقد تم نقله إلى سلالات البرسيم والبرسيم الحجازى.

يوجد أحد الأمثلة الهامة والتى فيها يحدث تشجيع تثبيت الأزوت الجوى مع جودة الصفات المحصولية عن طريق التغيير الوراثى للرايزوبيم أى تغيير التركيب الوراثى لهذه البكتريا فى البلازميدات المختلفة تم إثباته فى فول الصويا. فإن طفرة فى السلالة التجارية للبكتريا *R. japonicum* وهذه السلالة التجارية تسمى USDA 110 قد تم إنتخاب طفرة منها لقدرتها العالية على تثبيت الأزوت الجوى وهذه الطفرة تسمى C33 ولها قدرة على تثبيت الأزوت الجوى بدرجة ٩٤٪ زيادة على السلالة الأصلية أى أن كفاءتها تقريباً ضعف كفاءة السلالة الأصلية. وقد وجد بالفعل فى نباتات فول الصويا المعاملة بهذه السلالة من البكتريا زيادة فى المادة الجافة لهذه النباتات ٤٠٪ عن المعتاد أى عنه فى حالة السلالة العادية من البكتريا ١١٠ . وبالفعل حدث زيادة فى محصول البذور وأيضاً زيادة فى محتوى البذور بالنسبة للأزوت الكلى أى بالنسبة للبروتين بدرجة مؤكدة فى حالة معاملة صنف فول الصويا كلارك Clark المعامل بهذه السلالة. وقد أتضح أن السلالة البكتيرية C33 تماثل فى جودتها السلالة ١١٠ فى الأراضى ذات المحتوى المتوسط من الأزوت وتتفوق كثيراً على السلالة ١١٠ فى الأراضى القليلة أى الناقصة الأزوت أى الفقيرة فى الأزوت. وأصبحت هذه الحالة حقيقة فى كثير من السلالات البكتيرية المحسنة فأصبح كثير منها تنطبق عليه هذه القاعدة حيث أنها تكون مناسبة جداً وفعالة جداً فى الأراضى المستصلحة أو الفقيرة فى النيتروجين وقد تكون غير فعالة بدرجة كبيرة فى الأراضى المتوسطة النيتروجين.

وما تم عمله فى البكتريا *Klebsiella* أمكن عمله فى أجناس أخرى من البكتيريا مثل *Spirillum* وغيرها حيث تم نقل جينات مرغوبة فى هذا الصدد عن طريق البلازميدات أو غيرها كما تم عمله تماماً فى *Klebsiella* .