الباب الثالث

الفصل الأول

الطفرة Mutation

الأهداف : من المتوقع في نهاية دراسة هذا الفصل ان يكون المتخصص فى علم الوراثة وبرنامج أمراض النبات قادرا علي أن :

١- يتفهم معنى الطفرة
Mutation

٢- يستوعب التغيرات الكروموسومية العددية و التركيبية
Chromosomal aberrations

٣- يتفهم معنى التغير فى الجين
Point mutation

٤- يتفهم معنى الطفرة التلقائية والمستحدثة
Spontaneous Versus Induced Mutation

٥- يتعرف على التأثيرات المظهرية للطفرات
Phenotypic Effects of Mutations

٦- يتفهم معنى الطفرات الجسمية والجرثومية (الجنسية)
Somatic and Germinal Mutations

٧- يستوعب الأساس الجزيئى للطفور
The Molecular Basis of Mutation

المقدمة :

الطفرة mutation هى عبارة عن تغير مفاجىء فى التركيب الوراثى للفرد بحيث أن هذا التغير يورث إلى النسل، شريطة ألا يكون ناتجاً عن الإتحادات الجديدة للتباين الوراثى الموجود ، والكائن الذى يبدى شكلاً مظهرياً جديداً نتيجة لوجود الطفرة يسمى بالطافر mutant.

يعتمد التوارث على الجينات التى تنتقل بدقة من الآباء إلى النسل فى عملية التكاثر للكائنات الراقية حيث توجد الجينات فى كروموسوماتها التى تتكرر وتنتقل إلى النسل عبر الجاميطات خلال عملية التكاثر الجنسى. وتتكون هذه الجينات من

DNA ويتمثل محتواها فى تتابعات من أزواج القواعد التى تتكرر بدقة خلال عملية التناسخ شبه المحافظ. وتشتمل إنزيمات بلمرة الـ DNA التى تساعد فـي عمليـة تكراره على نشاط إنزيم إكسونيوكليز (هدم DNA من طرفه) فى الإتجـاه 5′←3′ مما يمكنها من مراجعة جزيئات DNA الناتجة وتصحيح الأخطاء الحادثـة خـلال تفاعل البلمرة أى أن هناك ميكانيكيات قد نشأت لتسهيل النقل الصحيح للمعلومـات الوراثية من جيل إلى آخر . ومع ذلك تحدث بعض "الأخطاء" أو التغيرات فى مادة الوراثة. وهذه الأخطاء المفاجئة والمتوارثة فى مادة الوراثـة تسـمى بـالطفرات mutations. مثل هذه التغيرات قد تكون فى العـدد الكروموسـومى (التضـاعف المنتظم euploidy وغير المنتظم aneuploidy ، أو فى تركيـب الكروموسـومات (الشذوذات الكروموسومية Chromosomal aberrations) أو فى جينات بعينهـا . وكثيراً ما يستعمل مصطلح طفرة فى الوقت الحاضر للدلالة على التغيرات الجينية، وسوف نعطى نبذة عن كل جزء من هذه التغيرات .

ويشمل التضاعف المنتظم وغير المنتظم .

١- التغير فى العدد الكروموسومى Change in chromosomal number
٢- التغير فى تركيب الكروموسوم Change in chromosome structure
٣- تغير فى الجين Point mutation

أولاً: التغيرات فى العدد الكروموسومى :

Change in chromosomal number

١- التغيرات المجموعية (التضاعف المنتظم) :

Euploidy

وتشمل فقد أو زيادة مجموعة كاملة متماثلة للهيئة الكروموسومية (n)أو 2n أو 3n ـــ الخ .

* فلو أن الهيئة الكروموسومية كانت من ٤ أزواج كروموسومية كما يلى AA BB (2n) CC DD .

- فإن فقد مجموعة كروموسـومية كاملـة (n) يجعلهـا تصـبح (n) وتكـون A B C D .

- وإن زيادة مجموعة كروموسومية كاملة (n) يجعلها تصبح (3n) وتكون AAA BBB CCC DDD .
- وبالتالى زيادة مجموعتين (2n) يجعلها تصبح (4n) وتكون AAAA BBBB CCCC DDDD .

وهكذا ويسمى هذا النوع من التضاعف بالتضاعف الذاتى و ينشأ نتيجة تهجين جاميطات غير مختزلة بأخرى عادية أو غير مختزلة أو قد يحدث صناعيا بالكلوشيسين .

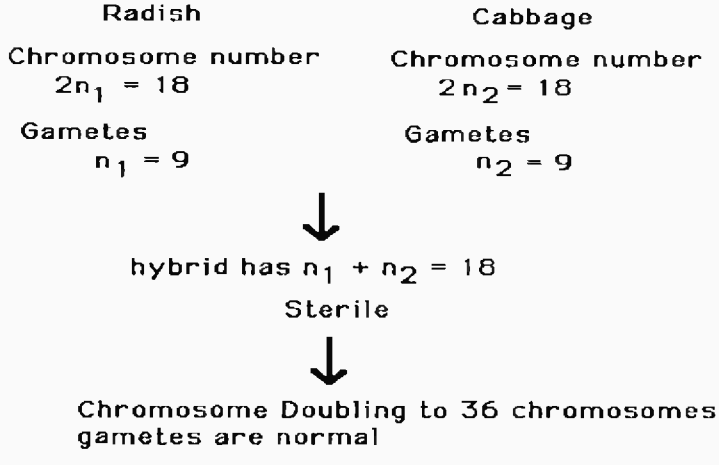
جاميطة n × جاميطة 2n ← أفراد 3n

جاميطة 2n × جاميطة 2n ← أفراد 4n

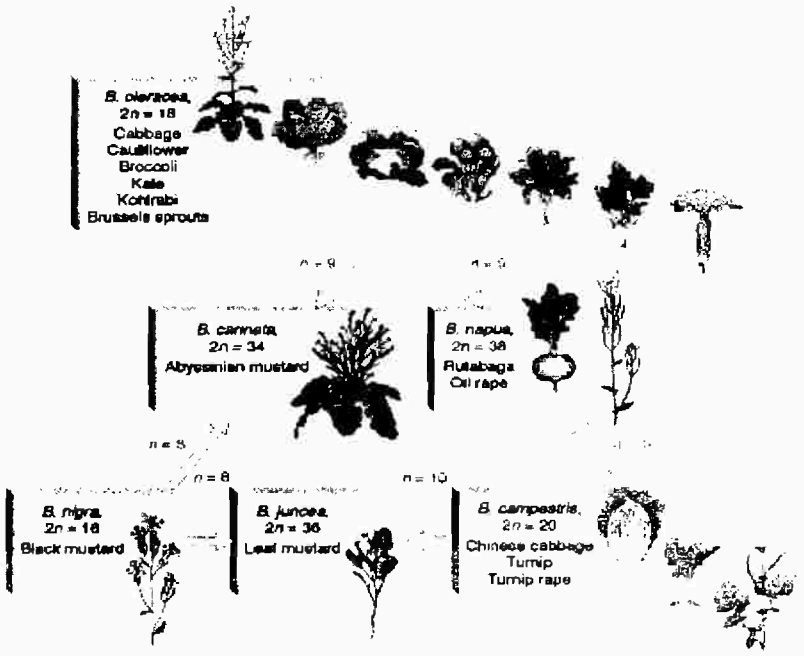
أو قد تنشأ الأفراد الرباعية بتضاعف الأفراد الثنائية بالكلوشيسين .

أفراد 2n ← أفراد 4n

وقد يحدث التضاعف نتيجة التهجين بين الأنواع مثل التهجين بين الفجل Radish والكرنب Cabbage (شكل رقم ٤١، ٤٢) حيث يحتوى كل منهما على تسعة أزواج من الكروموسومات فعند التهجين بينهما فالجيل الأول الناتج يكون عقيما وبإجراء التضاعف لـ F1 بالكولشيسين تنتج أفراد رباعية خصبة تسمى شبيهه الثنائى amphidiploid كما هو موضح بالشكلين التاليين :



شكل رقم ٤١ : التهجين بين الفجل Radish والكرنب Cabbage



شكل رقم ٤١ : التهجين بين الفجل Radish والكرنب Cabbage

٢- التغيرات العددية (التضاعف غير المنتظم) :

Aneuploidy

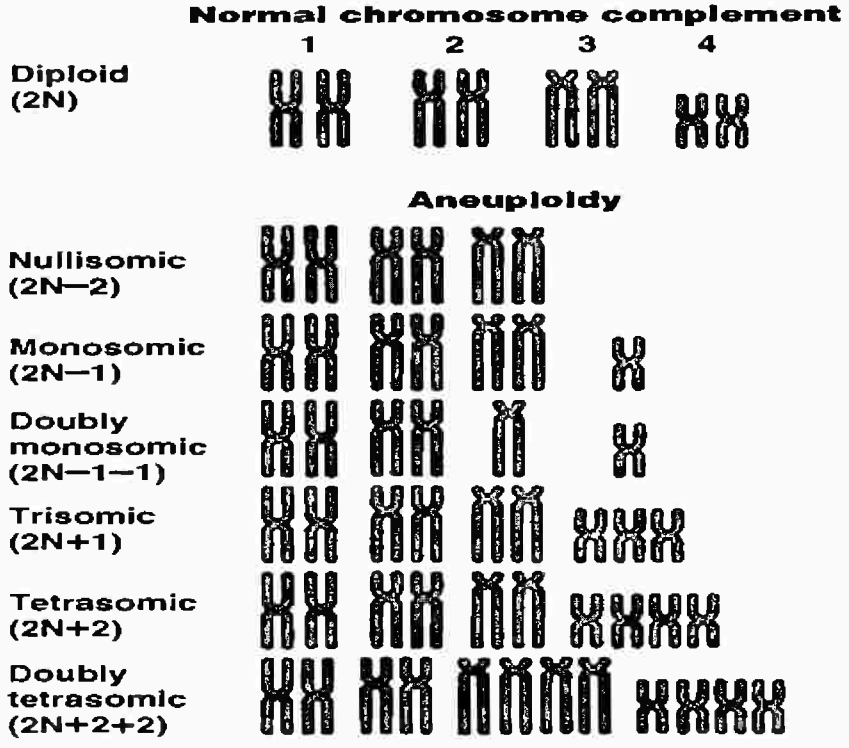
وهو يشمل زيادة أو نقص فى أحد الكروموسومات فالهيئة الكروموسومية تحتوى على 2n فيمكن أن ينقص واحد أو أكثر من الكروموسومات كالآتى (شكل رقم ٤٣) .

Normal diplid	2N	AA BB CC
Monosomic	2N-1	AA BB C -
Nullisomic	2N-2	AABB - -

أو قد يزيد كروموسوم أو أكثر للهيئة الكروموسومية :

Trisomic	2N +1	AA BB CCC
Double trisomic	2N+1+1	AABBB CCC
Tetrasomic	2N+2	AA BB CCCC

إن هذا التباين يؤدى إلى وجود خلايا تكون أنويتها تحتوى علـــى عـــدد مـــن الكروموسومات يختلف عن الوضع الطبيعى 2n .



شكل رقم ٤٣ : التغيرات الكروموسومية العددية

ثانياً:التغيرات فى تركيب الكروموسوم :

Changes in chromosome stracture

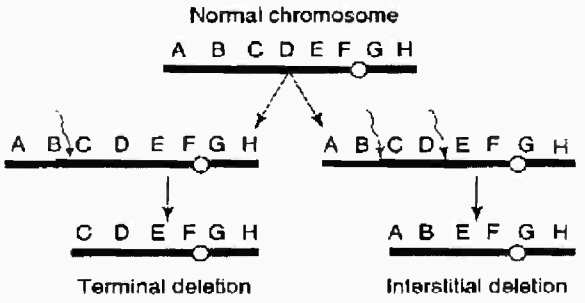
وتشتمل على :

أ-النقص. ب -التكرار. ج-الإنقلاب. د- الإنتقال.

جميع هذه التغيرات تكون أصيلة أو خليطة وما نركز عليـــه هـــو التغيـــرات الخليطة حيث إن الأصيلة لم تسبب أى مشكلة فى إقتران الكروموســـومات أثنـــاء الإنقسام الإختزالى .

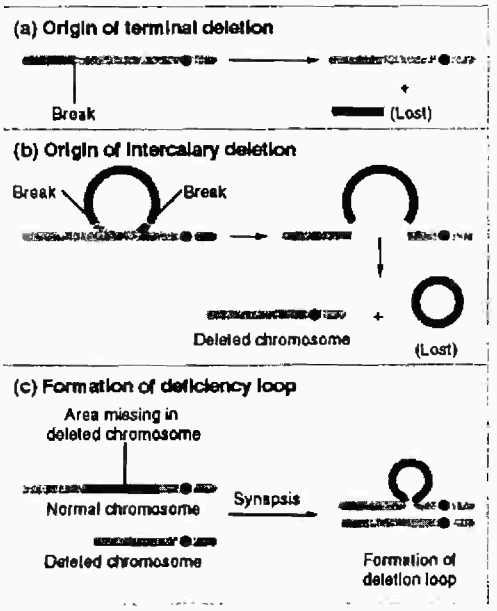
أ- النقص :

Deficiencies or Deletion



شكل رقم ٤٤ : النقص الكروموسومي الوسطى والطرفي

النقص قد يكون طرفى وينتج عن كسر واحد فى الكروموسوم أو يكون وسطى (شكل ٤٤) وينتج عن كسرين فى الكروموسوم ويؤثر ذلك على الفـرد الحامـل للنقص ويمكن التعرف على النقص سيتولوجيا بظهور العروة loop (شكل ٤٥) .

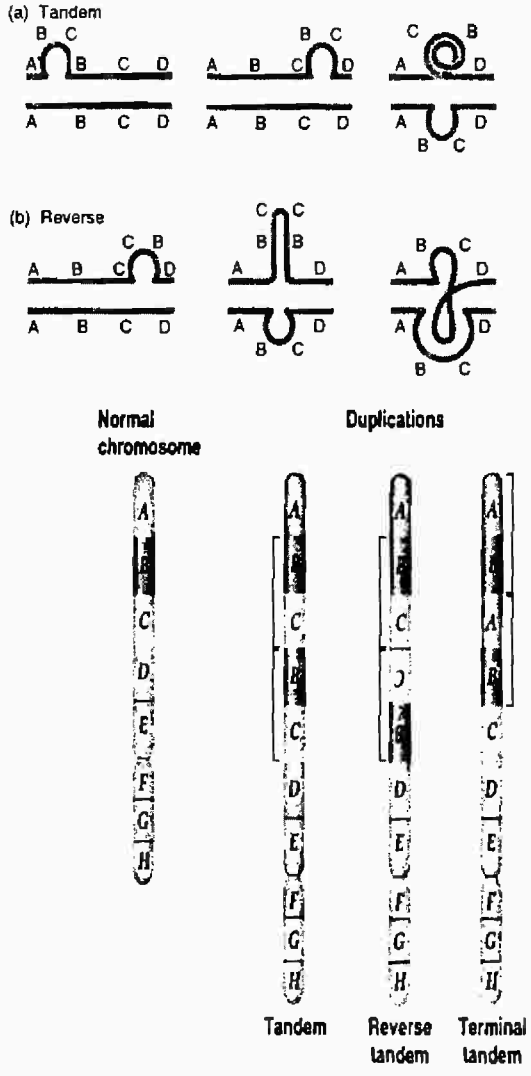


شكل رقم ٤٥: يوضح الأثار السيتولوجية المترتبة على النقص

ب- التكرار :

Duplication

ويشمل إضافة قطعة كروموسومية تكون بنفس الترتيب الموجود على الكروموسوم الأصلى أو بترتيب عكسى على نفس زراع الكروموسوم أو على الزراع الأخر أو قد تضاف إلى مكان آخر فى الهيئة الكروموسومية، ويمكن التعرف على التكرار الخليط سيتولوجياً عن طريق العروة Loop (شكل رقم ٤٦).

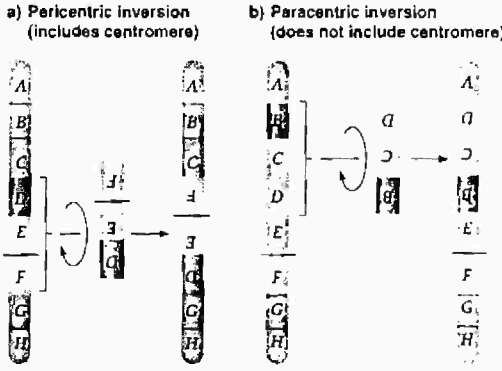


شكل رقم ٤٦ : يوضح الأثار السيتولوجية المترتبة على التكرار

ج- الإنقلاب :

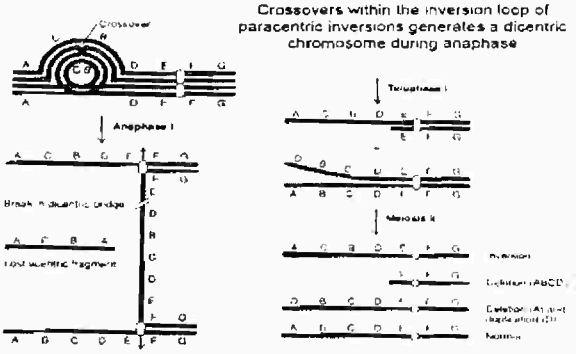
Inversion

حدوث كسر فى الكروموسوم ودوران القطعة المكسورة حول نفسها بزاوية مقدارها ١٨٠درجة وبالتالى يتغير ترتيب الجينات و قد يشمل الانقلاب منطقة السنترومير Pericentric inversion أو لايشمل منطقة السنترومير paracentric inversion (شكل رقم ٤٧).



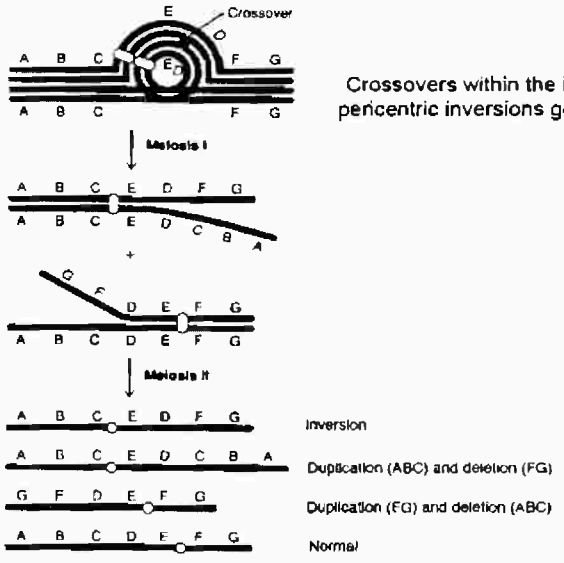
شكل رقم ٤٧ : يوضح الصور المختلفة للإنقلاب الكروموسومي

ففى حالة الانقلاب الذى لايشمل السنترومير يمكن التعرف عليه أثناء الإنقسام بظهور العروة loop ، وعند حدوث العبور بين أى كروماتيدتين يتكون كروموسوم ذو سنتروميرين Dicentric chromosome وكروموسوم به إنقلاب وشظية كروموسومية (شكل رقم ٤٨) .



شكل رقم ٤٨ : يوضح الأثر السيتولوجي المترتب على الإنقلاب الكروموسومي

أما الإنقلاب الذى يشمل السنترومير فيمكن التعرف عليه كذلك عن طريق العروة loop . وبحدوث العبور داخل القطعة المنقلبة فتكون المحصلة هو الحصول على كروموسومات تحتوى على نقص وتكرار وكروموسوم عادى وأخر به إنقلاب (شكل رقم ٤٩) .



Crossovers within the inversion loop of pericentric inversions generate deletions

شكل رقم ٤٩ . يوضح النتائج المترتبة على حدوث عبور وراثي داخل منطقة الإنقلاب وأثر ذلك على التركيب الكروموسومي فى الجاميطات الناتجة

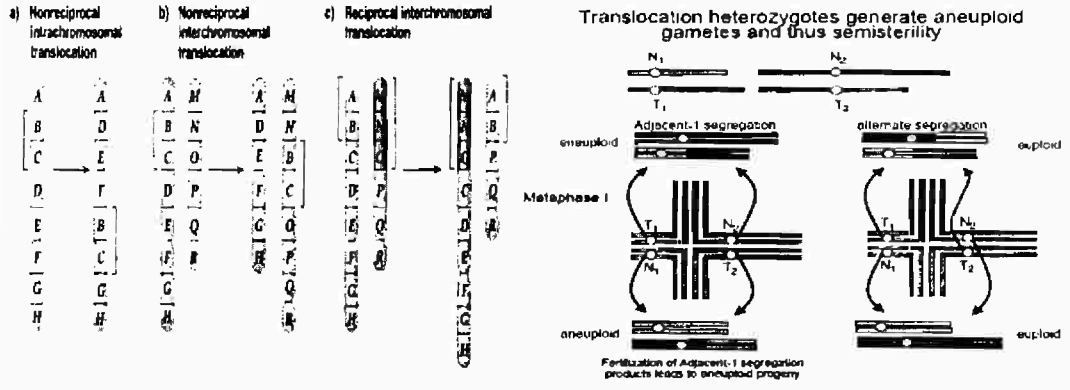
د- الإنتقال :

Translocation

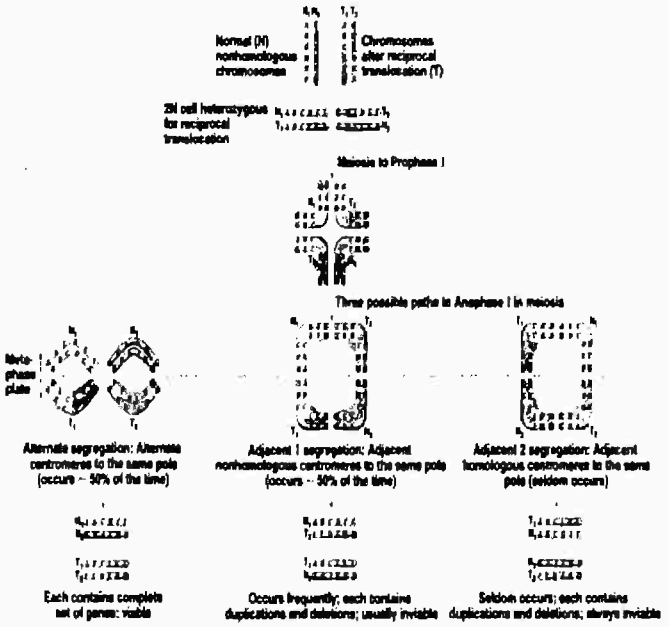
إنتقال جزء من كروموسوم إلى كروموسوم آخر غير نظير ويرتبط به، ويمكن التعرف عليه من تغير المجموعة الإرتباطيه وظهور الشكل الصليبىأثناء الدور الضام فى الإنقسام الميوزى ويسمى إنتقال عكسى Reciprocal translocation وتكون المحصلة النهائية لإنفصال الكروماتيدات فى الدور الإنفصالى كالآتى :

إذا كان الإنفصال متجاور adjacent (فى الشكل الصليبى) للكروموسومات II, I فالنتيجة هى الحصول على جاميطات غير حية بها نقص وتكرار للجينات .

أما إذا كان الإنفصال متبادلalternate فالمحصلة هى الحصول على جاميطات حية تحتوى كل جاميطة على جميع الجينات (شكل رقم ٥٠،٥١) .



شكل رقم ٥٠ . يوضح الأنواع المختلفة للإنتقال الكروموسومي والآثار السيتولوجية المترتبة عليه عند إقتران الكروموسومات فى الإنقسام الميوزي



شكل رقم ٥١ . يوضح الأثار السيتولوجية للإنتقال الكروموسومي عند إقتران الكروموسومات فى الإنقسام الميوزي

ثالثاً: تغير فى الجين (الطفرة الجينية) :

Point mutation

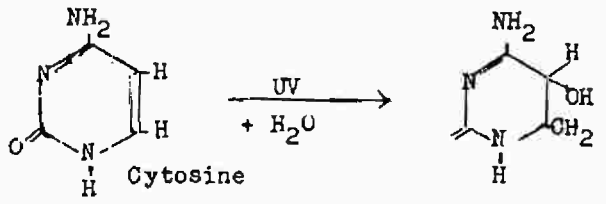
الطفرة هى المصدر الأساسى لجميع الإختلافات الوراثية ؛ أى أنها توفر المادة الخام اللازمة لحدوث الإنتخاب الطبيعي والتطور . فالإتحادات الجديدة التى تحدث نتيجة العبور أثناء الإنقسام الإختزالى تقوم بإعادة ترتيب التباين الوراثى فى تباديل وتوافيق جديدة ، والإنتخاب الطبيعى (أو الصناعى) يحافظ على التراكيب الأكثر تكيفاً مع الظروف البيئية الموجودة (أو المرغوبة) ، ولولا الطفرة لوجدت كل الجينات فى صورة واحدة ، وبالتالى لما وجدت الأليلات ولما كان التحليل الوراثى ممكناً . والأهم من ذلك هو كون الكائنات القادرة على التطور أن تتكيف مع الكائنات القادرة على التطور evolve وأن تتكيف مع التغيرات البيئية. والطفرة على ذلك ظاهرة هامة، فمن الضرورى وجود قدر من الطفور يؤدى إلى التباين الوراثى ويسمح للكائنات بالتكيف مع البيئات الجديدة. وفى نفس الوقت قد يؤدى إزدياد معدل الطفور إلى عدم إنتظام disrupt إنتقال المعلومات الوراثية بدقة من جيل إلى آخر .

الطفرة التلقائية والمستحدثة :

Spontaneous Versus Induced Mutation

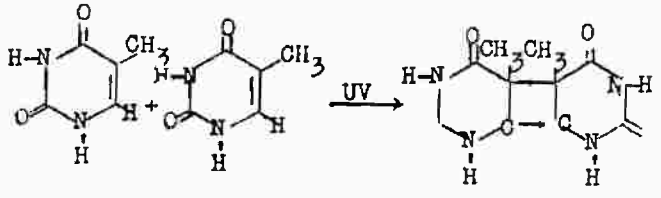
الطفرة التلقائية هى الطفرة التى تحدث بدون سبب معلوم . وهى قد تكون تلقائية وناتجة عن أخطاء التمثيل الغذائى التى تحدث طبيعياً فى تناسخ الـ DNA بمعدل ضئيل ، أو قد تكون ناتجة عن عوامل مطفرة موجودة بالبيئة . والطفرات المستحدثة هى التى تنتج عن تعرض الكائنات لعوامل مطفرة كالأشعة المرئية والأشعة فوق البنفسجيةUV ومختلف الكيماويات التى تتفاعل مع الـ DNA أو RNA فى حالة الفيروسات المحتوية عليه) . والواقع أنه من المستحيل إثبات أن طفرة معينة قد حدثت تلقائياً أو أن طفرة أخرى قد استحدثت بواسطة عامل ما .

وقد دعمت العلاقة المباشرة بين UV و DNA حيث وجد أن البيريميدينات (الثيامين والسيتوزين)لها قدرة إمتصاص خاصة لموجات UV حيث يحدث للسيتوزين هيدرة hydrated بواسطة UV بدخول جزيئات الماء المزدوجة لذرتي الكربون c=c كما فى الشكل التالى (شكل رقم ٥٢) .



شكل رقم ٥٢ : يوضح تأثير أشعة الـ UV على القاعدة الأزوتية سيتوزين

وكذلك فان الرابطة المزدوجة فى الثيامين يحدث لها أيضا إستبعاد disrupted وقد تتحد قاعدتين من الثيامين معا لتكون ثنائيات كما فى الشكل التالى (شكل رقم ٥٣) .



شكل رقم ٥٣ : يوضح تأثير أشعة الـ UV على القاعدة الأزوتية ثيامين

وفى الدراسات المعملية تدعم معظم الملاحظات فكرة حدوث الطفرات التلقائية بمعدل ثابت ولكنها تتعدل بعض الوقت. والأدلة على ذلك كثيرة فى التجارب الخاصة بتأثير الموقع حيث يحدث نشاط طفرى من خلال تغير بسيط فى موقع الجين، وكذلك فى حالة النقص والإنقلابات فى المادة الوراثية التى لا يمكن مشاهدتها سيتولوجياً مع إمكانية تميزها عن الطفرات العاملية. وقد أجريت إختبارات لمعرفة أن الإشعاعات المؤينة هى التى تؤدى حقيقةً إلى تكون الطفرات العاملية أو الجينية gene or point mutions وذلك بإيجاد الظروف التى تؤدى إلى ظهور طفرات تقدمية Forward بواسطة الإشعاعات المؤينة، تستطيع الطفرات أن ترتد أيضا إلى الطراز البرى بهذة الأشعة، ونتيجه لهذا الجدل فإن التغيرات الكروموسومية لا يمكن أن ترتد أو تنعكس حتى أن المشععات الجديدة لا يمكن أن

تكمل ما حدث من نقص أو أن تعيد الشظايا للإلتحام ولكن الذى يحدث فقط هو إعادة تنظيم أو ترتيب المادة الوراثية التى لم يحدث لها تلف أو تغيير مكانها فى حالة الطفرات العاملية point mutation ولكن هذا النوع لا يوجد حقيقة فى الدروسوفلا ولكنه لوحظ فى النيوروسبورا والبكتريا والخمائر .

وتدل هذه الملاحظات على أن الإشعاع قد يؤدى إلى تأثيرات وراثية صغيرة عكسية بالإضافة إلى التغيرات الكروموسومية غير المرتدة، مما سبق يمكن أن يقال أن نظرية الهدف target theory(التأثير المباشر للإشعاع يكون على الـDNA) لا تكفى وحدها لتفسير التأثيرات التى تحدثها الأشعة ولكن فيسيولوجيا الخلية والحالة الكروموسومية ودرجة الحرارة وضغط الأكسجين كلها من العوامل التى تساعد على إستخدام الطفرات، وبالإضافة إلى ذلك فإن موقع الجين على الكروموسوم بالنسبه للإصابة بالإشعاع له أهمية كبيرة حيث لوحظ أن معدل التغيرات الكروموسومية يزداد فى بعض المواقع القريبه من منطقة السنترومير The Centromerel region عن مواقع أخرى وقد لوحظ أن تأثير معاملة الخلايا بالطرد المركزى أثناء الإشعاع يبدو أنها تمنع إعادة الإلتحام وتزيد عدد الكسور. ويؤدى الكولشيسين كذلك إلى التأثير على التحرك الكروموسومى نتيجة عدم تكون خيوط المغزل . وقد دلت الدراسات المعملية أن عملية الإتحاد بين جزئين من الثيامين dimerization قد تكون التأثير الطفرى الأولى الناتج عن مثل هذه الثنائيات التي قد تؤثر على سلوك حلزون DNA وبالتالي تؤثر فى عملية التكرار . وبخلاف التأثير المباشر على الـ DNA فهناك إحتمال لأن تحدث تأثيرات أخرى غير مباشرة بواسطةUV من خلال إمتصاص المكونات الوسيطة ، فمثلا يزيد معدل الطفور فى بكتريا *Staphylococcus aurous*، وعند تعريض مزرعة من البكتريا لأشعة UV تزيد معدل الطفور، ومن ناحية أخرى فإن وضع البكتريا المعاملة بالإشعاع فى مركب يمنع تكوين البروتين Chloramphenicol يؤدى إلى نقص معدل الطفور. ومن هذا يتضح أن UV تعمل على نشاط كل منDNA والأنزيمات مما يؤدى بالتالي إلى حدوث طفرات .

والطفرات التلقائية نادرة الحدوث ، برغم أن تكرارها يختلف من جين إلى آخر ، ومن كائن إلى آخر . وتتراوح قياسات تكرارات الطفرات التقدمية التلقائية لمختلف الجينات فى البكتريا والفاج بين ١٠-٨ و ١٠-١٠ لكل زوج من أزواج النيوكليوتيدات فى الجيل الواحد . وفى حقيقيات الأنوية ، يتراوح معدل الطفرات

التقدمية بين ١٠-٧ و ١٠-٩ لكل زوج من النيوكليوتيدات فى الجيل .تزيد المعاملة بالمطفرات تكرار الطفرات بدرجات كبيرة . فتكرار الطفرات لكل جين per gene فى البكتريا والفيروسات على سبيل المثال يتعدى ١% عند المعاملة بمطفر كيماوى قوى. أى أن مايزيد على ١% من جينات الكائنات المعاملة ستتضمن طفرات ، أو بصورة أخرى يمكن أن نقول أن أكثر من ١% من أفراد عشيرة الفيروسات أو البكتريا المعاملة ستحتوى على طفرة فى أى جين .

التأثيرات المظهرية للطفرات :

Phenotypic Effects of Mutations

تؤدى الطفرات إلى بعض التغيرات المظهرية phenotypic changes التى يمكن إكتشافها حتى يتسنى التعرف على وجودها . ويترواح تأثير الطفرات مابين التغيرات متناهية الصغر والتى لايمكن إكتشافها إلا بتقنيات وراثية وبيوكيماوية خاصة، وبين تحورات كبيرة فى الشكل الظاهرى ، إلى أن تصل إلى درجة موت الأفراد الحاملة لها . والجينات عبارة عن تتابع معين من أزواج النيوكليوتيدات يشفر كل منها إلى نوع معين من السلاسل عديدة الببتيد . وأى طفرة تحدث فى جين معين تنتج بالتالى شكلاً جديداً أو أليلاً جديداً new allele لهذا الجين . وبسبب تعدد الشفرات للحامض الأميني الواحد بعض التغيرات فى أزواج القواعد لا تؤدي إلى تغير الناتج البروتينى الذى تشفر له الجينات(طفرات لها نفس المعنى samesense mutations). والجينات التى تحتوى على طفرات تؤدى إلى تأثيرات صغيرة لا يمكن تميزها إلا بطرق خاصة تسمى الأليلات المتشابهة Iso alleles بينما تؤدى طفرات أخرى إلى فقد كامل فى نشاط الناتج الجينى، وإذا ماحدثت طفرات من الطراز الأخير فى جينات أساسية (الجينات اللازمة للحيوية) فإنها تكون مميتة بالطبع. والطفرات قد تكون متنحية أو سائدة ففى الكائنات الأحادية haploid مثل الفيروسات والبكتريا يمكن إكتشاف كل من الطفرات المتنحية والسائدة كنتيجة لتأثيراتها المباشرة على مظهر الكائن الذى تنشأ فيه، حيث لا يمكن تحديد السيادة والتنحى فى البكتريا إلا بدراسة الكائنات الثنائية جزئياًpartial diploid وفى الكائنات الثنائية(أو المتضاعفة) لا تميز الطفرات المتنحية إلا عند وجودها فى الحالة الأصيلة ، وبالتالى فإن أغلب الطفرات المتنحية فى الكائنات الثنائية لا يمكن إكتشافها وقت حدوثها لأنها توجد فى الحالة الخليطة . ويستثنى من ذلك الطفرات المتنحية المرتبطة بالجنس لأنها تعبر عن نفسها فى الحالة النصفية شبه الأصيلة فى

الجنس متباين الجاميطات (ذكور الإنسان وذبابة الفاكهة وإناث الطيور) وبالتالى فإن الطفرات المتنحية المرتبطة بالجنس سوف تغير النسبة الجنسية ، لأن الأفراد شبه الأصيلة الحاملة للأليل المميت لا تستطيع البقاء .

الطفرات الجسمية والجرثومية (الجنسية) :

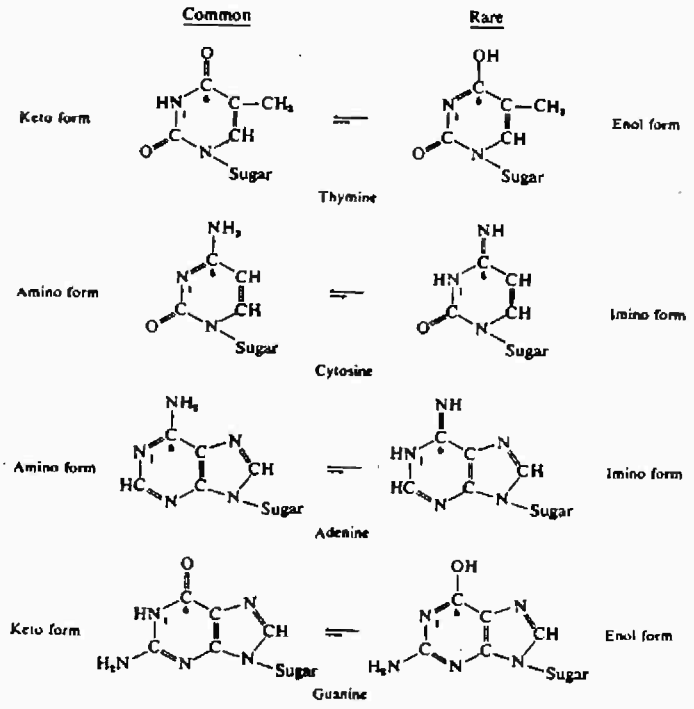
Somatic and Germinal Mutations

قد تحدث الطفرات فى أى خلية وفى أى مرحلة من مراحل دورة الخلية. فإذا ما حدثت الطفرة فى خلية جسمية (كل الخلايا ما عدا خلايا التكاثر) والتى يمكنها أن تنتج خلايا مماثلة ، فإن التغير الطفرى سيكون ممثلاً فقط فى الخلايا الجسمية الناتجة عن الخلية التى حدثت بها هذه الطفرة . فقد نشأ التفاح "دليشيوس" والبرتقال "أبوسرة" مثلاً كموزايك فى الأنسجة الجسمية. وقد حدثت التغيرات التى أدت إلى هذه النوعية المرغوبة فى خلايا مفردة . وفى كلا الحالتين تكاثرت الخلية الحاملة للجين الطافر حتى كونت فرعاً له هذه الصفات الخاصة بالطراز الطافر . ومن حسن الحظ فإن التكاثر الخضرى vegetative propagation كان ممكناً فى هاتين الحالتين ، حيث يستمر تواجد الطفرتين فى النسل الناتج من الطعوم والبراعم . وينتشر الآن نواتج هذين الطرازين الطافرين فى بساتين التفاح والبرتقال. أما إذا كانت الطفرة فى الخلايا الجرثومية (الخلايا الجنسية) سائدة فإن تأثيرها يظهر مباشرة فى النسل . وإذا ما كانت الطفرة متنحية فإن تأثيرها سيختفى فى التركيب الثنائى . وتتشابه الطفرات الجنسية مع الجسمية في أنها قد تحدث فى أى مرحلة من دورة التكاثر للكائن الحى ولكنها أكثر شيوعاً فى بعض المراحل عن الأخرى. فإذا ما حدثت الطفرات فى جاميطة ، نجد أن فرد واحد من النسل يحمل هذا الجين الطافر ، وعلى الجانب الآخر ، إذا ما وقعت الطفرة فى الخلايا الأولية Gonial cell فإننا نتوقع أن عدة جاميطات يمكن أن تستقبل هذا الجين الطافر ، وبالتالى يزيد من إحتمال إستمرارية هذه الطفرة وبذا ، فإن العوامل الرئيسية التى تساعد على إحتمال ظهور الطفرة فى الكائن الحى والعشيرة هما السيادة والمرحلة من دورة التكاثر للكائن الذى تقع فيه الطفرة .

الأساس الجزيئى للطفور :

The Molecular Basis of Mutation

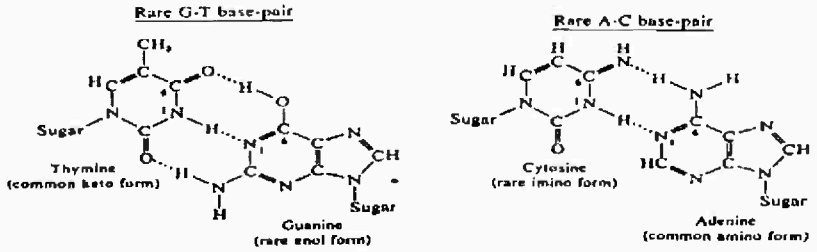
وصف واطسون وكريك تركيب سلسلة الـ DNA المزدوجة وإفترضوا أن التناسخ يتم بالطريقة شبه المحافظ semiconservative المبنى على تكامل القواعد وذلك لتفسير عملية إنتقال المعلومات الوراثية من جيل إلى جيل ، وأفترضوا أيضاً ميكانيكية توضح الطفور التلقائى . وقد أستنتج واطسون وكريك أن تركيب القواعد ليس ثابتاً ، فذرات الأيدروجين تستطيع التحرك من وضع أو مكان معين فى البيورين أو البيريميدين إلى مكان آخر ، فمثلاً من مجموعة أمين إلى حلقة النتروجين. هذا التغير أو التردد الكيميائى يسمى التبادل المتردد tautomeric shifts (شكل رقم ٥٤). ورغم أن هذا النظام يعد نادراً . إلا أنه يمكن إعتباره مهماً فى بناء الـ DNA حيث أنه يغير أو يبدل نظام ازدواج القواعد المحتمل الوقوع. ومن المعروف أن الأدينين يرتبط مع الثيامين والجوانين يرتبط مع السيتوزين .



شكل رقم ٥٤ : يوضح الحالات الشائعة والنادرة للقواعد النيتروجينية المختلفة

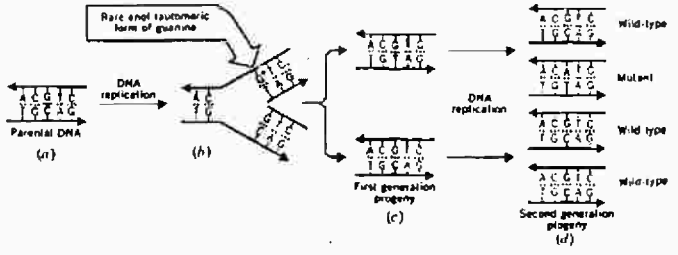
إن شكل أو حالة الكيتو keto للثيمين والجوانين وحالة الأمينو Amino للأدينين والسيتوزين هى الأكثر شيوعاً وثباتاً وإن كانا يتحولا بقلة تبعاً لنظام التبادل المشابه إلى حالة الإينول Enol والإمينو Imino الأقل ثباتاً بالنسبة لكل منهما .

إن القواعد تبقى أو توجد لأقل فترة زمنية ممكنة فى صورة النظام المشابه الأقل ثباتاً . ولو أن قاعدة وجدت فى الشكل النادر فى اللحظة التى يوجد فيها تناسخ أو إتحاد لسلسلة الـ DNA القديمة فالنتيجة هى الطفور . وعندما توجد القواعد فى حالتها النادرة الإمينو Imino أو الإنول Enol ، يمكن أن يحدث ازدواج قواعد الأدنين مع السيتوزين والجوانين الثيامين (شكل٥٥) .



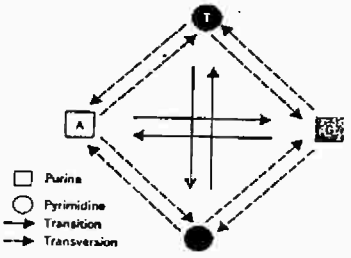
شكل رقم ٥٥ : أمثلة للإرتباط الخاطيء لأزواج القواعد النيتروجينية المختلفة الأدنين والسيتوسين ، الجوانين والثيامين

والتأثير الحقيقى لهذا التبادل المتردد بعد عمليات التناسخ المطلوبة هو إنعزال القواعد ذات الإزدواج الخاطئ mismatched ويؤدى ذلك إلى إبدال قواعد AT إلى GC أو GC إلى AT (شكل٥٦) .



شكل رقم ٥٦ : أشكال الطفرات التى تحدث فى القواعد النيتروجينية للمادة الوراثية DNA

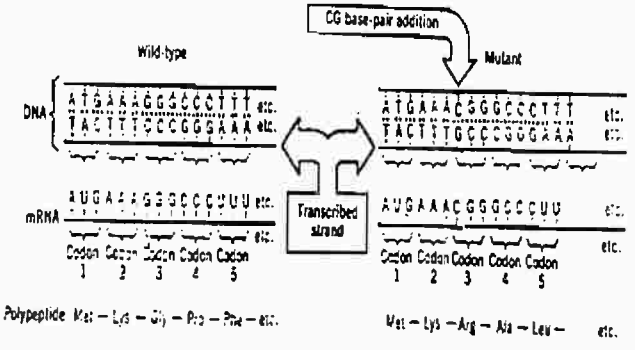
يحدث الطفور نتيجة التبادل المشابه فى قواعد DNA عـن طريـق إحـلال أو إستبدال البيورين فى شريط واحد من الـ DNA بالبيورين الأخر وإحلال البيريميدين فى الشريط المكمل بالبيريميدين الآخر. إحلال مثل هذه القاعـدة يسـمى الإسـتبدال المتكافئ transitions . وإحلال قاعدة مستخدما البيورين للبيريميدين أوالعكس يسمى الإستبدال المتعاكس أو غير المتكافئ transversions . وتوجد أربع إحتمالات مختلفة للإستبدال المتكافئ وثمانى حالات مختلفة للإنتقال المتعاكس(شكل رقم ٥٧) .



شكل رقم ٥٧ : يوضح طفرات الإستبدال المتكافيء

وغير المتكافيء المحتمل حدوثها فى DNA

وهناك طراز ثالث للطفرة الموضعية يتضمن إضافة أو فقد واحداً أو عدد قليل من أزواج القواعد. فإضافة أو فقد قاعدة جميعها تشير إلى طفرات تغيير الإطـار frameshift mutations حيث تؤدى جميعاً إلى تغير طريقة قـراءة إطـار جميـع ثلاثيات أزواج القواعد (حيث تتخصص الشفرات فى RNA الرسول والأحمـاض الأمينية فى ناتج الجين من عديد الببتيدات) فى موضع الطفور حتى نهاية الجـين (شكل رقم ٥٨) .



شكل رقم ٥٨ : يوضح رسم تخطيطى للطفور الناتج

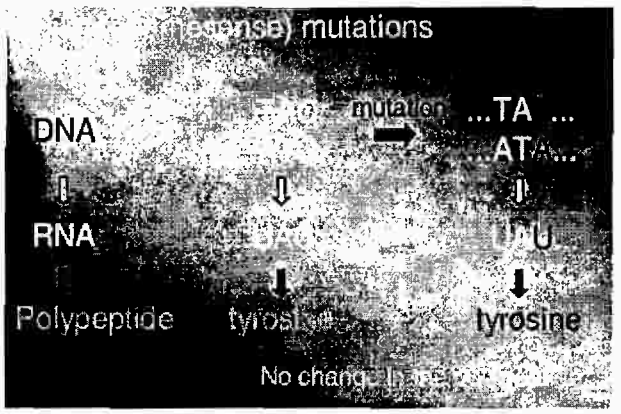
عن إضافة قاعدة واحدة مفردة إلى تركيب الجين

كل الطرز الثلاثة للطفرات الموضعية وهي طفـرات الإسـتبدال المتماثـل ، الإستبدال المتعاكس وتغيير الإطار توجد بين الطفرات التى تحدث تلقائياً والمدهش أن نسبة كبيرة من الطفرات التلقائيـة المدروسـة فـى الخلايـا أوليـة الأنويـة prokaryotes وجدت أنها تعزى إلى إضافة أو فقد قاعدة واحدة أكثر من رجوعهـا إلى إحلال القواعد. ويمكن تقسيم الطفرات كذلك إلى :

١- طفرات لها نفس المعنى :

Silent(samesenses) mutations

إذا حدث تغير فى قاعدة يعطى نفس الحامض الأمينى ولايتغير البروتين وذلك لأن الحامض الأمينى له أكثر من شفرة (شكل ٥٩) .

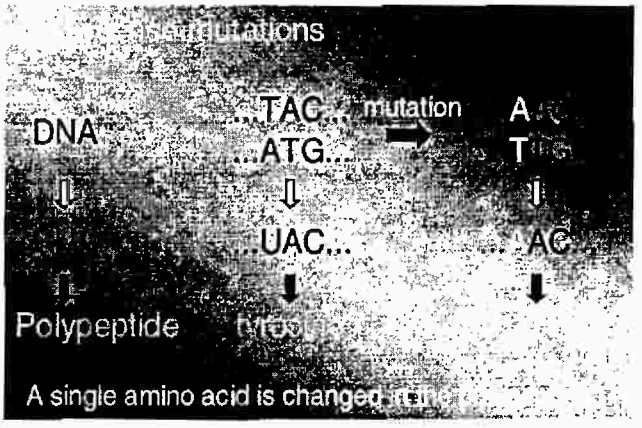


شكل رقم ٥٩ : طفرات لها نفس المعنى

٢- طفرات خاطئة :

Missense mutations

إذا حدث تغير فى قاعدة نتج عنه تغير فى الحمض الأمينـى فإنـه يتغيـر البروتين الناتج (شكل رقم ٦٠) .

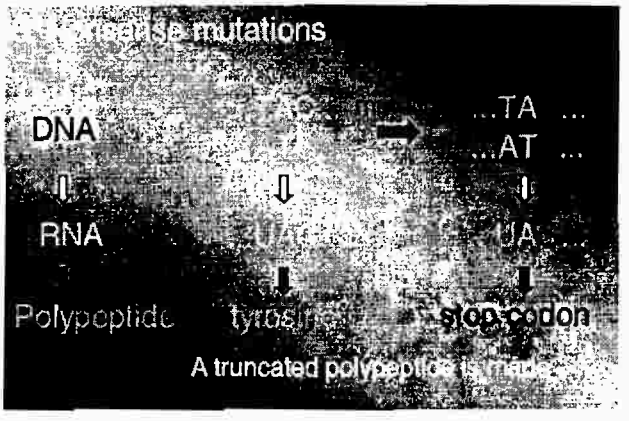


شكل رقم ٦٠ : طفرات خاطئة المدلول

٣- طفرات عديمة المعنى :

Nonsense mutations

إذا حدث تغير فى أى قاعدة لاتترجم إلى حمض أمينى فإنه بالتالى يتم توقف عملية الترجمة (شكل رقم ٦١) .



شكل رقم ٦١ : طفرات عديمة المعنى

الخلاصة :

الطفرة هى عبارة عن تغير فجائى فى التركيب الوراثى للفرد وتحدث الطفرة إما تلقائيا أو مستحدثة نتيجة تعرض الكائن للأشعة أو المواد الكيماوية المحدثة

للطفرات، ونتيجة ذلك الحصول على مختلف الطفرات منها : التغيرات فى العـــدد الكروموسومى ويشمل التضاعف المنتظم والغير منتظم .

تغيرات فى تركيب الكروموسومات وتشمل (الـــنقص، التكـــرار، الإنقـــلاب، الإنتقال) تغير فى تركيب الجين (إما بفقد قاعدة أو زيادة قاعدة نتروجينية أو إحلال قاعدة محل أخرى) وتحدث الطفرات فى أى مرحلة من مراحل نمو الكائن وقـــد تحدث فى الخلية الجسمية أو فى الخلية الجنسية .

الأسئلة :

١- عرف الطفرة ومارأيك فى الطفرات التى تحدث فى النبات ؟

٢- ما الفرق بين الطفرة التلقائية والمستحدثة ؟

٣- ما هو التأثير المظهرى للطفرات (أشرح ذلك) ؟

٤- قسم الطفرات إلى أقسامها المختلفة مع شرح إحداها بالتفصيل ؟

٥- وضح الأساس الجزئ للطفور ؟

٦- ما هى طرز الطفرة الجينية ؟

أجب بنعم أو لا :

أ- النباتات الرباعية دائما خصبة .

ب- الـــ aneuploidy نتيجة عدم إنفصال الكروموسومات فى الإنقسام الميتوزى .

ج- Missense mutation هى طفرات توقف عملية الترجمة .

د- 4n هو نبات رباعى المجموعة الكروموسومية .

هـــ- الطفرة الطبيعية تورث أما الصناعية لا تورث .

و- النباتات الناتجة من ال aneuploidy تكون خصبة .

ل- قد تحدث طفرة لا تغير من شكل الفرد .

الفصل الثاني

تطبيقات على التكنولوجيا الحيوية

في أمراض النبات

الأهـداف : من المتوقع في نهاية دراسة هذا الفصل أن يكون المتخصص فى علم الوراثة وبرنامج أمراض النبات قادرا على فهم الأسس الخاصة بكل مما يلى :

١- التكنولوجيا الحيوية .

٢- زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية .

٣- الطرق المستخدمة فى زراعة الأنسجة .

٤- زراعة الكالوس ، الخلايا المفردة،الخلايا المرستيمية ، ومزارع الإكثار الدقيق

٥- تنمية أو زراعة البروتوبلاستس ومعاملته بالطرق المختلفة .

٦- حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيروس .

٧- حقن البروتوبلاست بنواقل مهندسة وراثيا .

٨- إختيار النباتات المشتقة من البروتوبلاست المقاومة للإصابة المرضية والمقاومة لتوكسينات الكائن الممرض .

٩- حقن البروتوبلاست المصاب بالفيروس بمواد مضادة للفيروس .

١٠-نقل جين المقاومة إلي النباتات الغير متوافقة جنسيا .

١١-عمل مزارع المتوك لإنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية .

١٢-دراسة النتائج المتحصل عليها فى مصر .

١٣-التعرف على الهندسة الوراثية وأهميتها في أمراض النبات :

١٤-دور الفيروسات النباتية كعوامل ناقلة ،الفيرويدات والعناصر القادرة على التنقل .

١٥-تكاثر الجين Gene Cloning، تكاثر DNA متمم عن mRNA تكاثر الجينات من المجموعة الوراثية DNA، ناقلات الكلونة، أنزيمات القطع وأنزيمات الإلتحام .

المقدمة

تعرف التكنولوجيا الحيوية فى الإصطلاحات الحديثة بأنها المعالجة بالوسائل الميكانيكية والتحورات الوراثية ومضاعفة الكائنات الحية خلال طرق حديثة مثل مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية مؤدية إلي إنتاج كائنات جديدة أو محسنة أو منتجات يمكن إستعمالها بطرق مختلفة .

ويغطى تعريف (منظمة الأغذية والزراعة) التكنولوجيا الحيوية، بمعناه الواسع، الكثير من الأدوات والتقنيات التى أصبحت مألوفة فى نطاق الإنتاج الزراعى والغذائى. أما بمعناه الضيق، الذى لا يراعى سوى تقنيات الـ (DNA) الجديدة، والبيولوجيا الجزيئية وتطبيقات الإكثار التكنولوجية، فيغطى طائفة من التكنولوجيات المختلفة، مثل معالجة الجينات ونقلها، وتنميط الـ DNA وإستنساخ النباتات والحيوانات..

تُبنى التكنولوجيا الحيوية علي الفهم الكامل للمادة الوراثية فى النبات وعلى إستعمال الطرق المختلفة في مزارع أنسجة النبات وعلى المقدرة في عزل وتعريف الجينات المتخصصة من أي نوع من أنواع النبات (الكائن الحي) وتنقل إلي كائن حي آخر .

إن التكنولوجيا الحيوية في النبات تجعل من الممكن إسراع تكاثر طرز النبات وتجعل من الإمكان إنتاج المنتجات النباتية المتخصصة صناعيا تحت ظروف مزارع الأنسجة .

ترتبط التكنولوجيا الحيوية في النبات إرتباطا وثيقا مع أمراض النبات بعدة طرق وإن أكثر الطرق وضوحا كما يلي :

١- إنتاج النباتات وذلك عن طريق سرعة تكاثر الطرز النباتية Clonal التي تؤدي الحاجة الكبيرة إليها، الحصول علي نباتات أم خالية من الكائن الممرض وما يتبع ذلك من وقاية النباتات الحية (الأبناء) من الكائنات الممرضة .

٢- النباتات المحولة وراثياً التي أضيفت لها الجينات عن طريق الهندسة الوراثية من المحتمل أن يظهر عليها عدم ثبات كبير أو عدم ثبات غير متوقع جهة بعض المجموعات من الظروف البيئية غير المتوقع التنبوء بها.

٣- تكون أداة النقل الرئيسية لإنتقال الجينات من النباتات المعطية إلي النباتات المستقبلة هي كائنات ممرضة نباتيا وبشكل خاص بكتريا التدرن التاجي *Agrobacterium turnefaciens* وفيروس موزايك القرنبيط .

٤- حدث تقدم كبير فى دراسة جينات النباتات ومقاومتها للمرض ودراسة جينات الكائنات الممرضة لمعرفة شدتها في الكائنات الممرضة بواسطة الهندسة الوراثية .

فمقاومة كثير من أمراض النبات أصبحت إما عن طريق زراعة جينات مقاومة في النبات بواسطة طرق الهندسة الوراثية أو عن طريق هندسة وراثة الكائنات الحية الدقيقة والتي بها يمكن الوصول إلي كائنات دقيقة تضاد أو تنافس كائن ممرض معين . فمعرفة طبيعة السلوك الوراثي لجينات العائل لمقاومة المرض بجانب دراسة جينات الشدة فى الكائنات الممرضة فإنه يساعد على إنتاج نسبة كبيرة من النباتات المقاومة للمرض بواسطة التكنولوجيا الحيوية لمقاومة أمراض النبات . والأمل كبير فى الحصول على نباتات مقاومة لنسبة كبيرة من الأمراض. ولذا سنلقى الضوء على كل من زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية .

زراعة الأنسجة :

Tissue Culture

لقد أصبح علم زراعة الأنسجة من أهم التقنيات الحديثة المستخدمة فى مجال الزراعة وذلك لما له من فوائد عديدة فى مواجهة المشاكل الزراعية على المستوى المحلى فى مصر وعلى المستوى العالمى. وقد حقق علم زراعة الأنسجة إنتشارا واسعا بين العلوم المختلفة التى تهتم بدراسة الكائن الحى ومراحل تطوره المتعاقبة

كما أنه ساهم فى تقدم العديد من الدراسات فى مجالات العلوم المتعددة والتى ليس بآخرها علم الهندسة الوراثية .

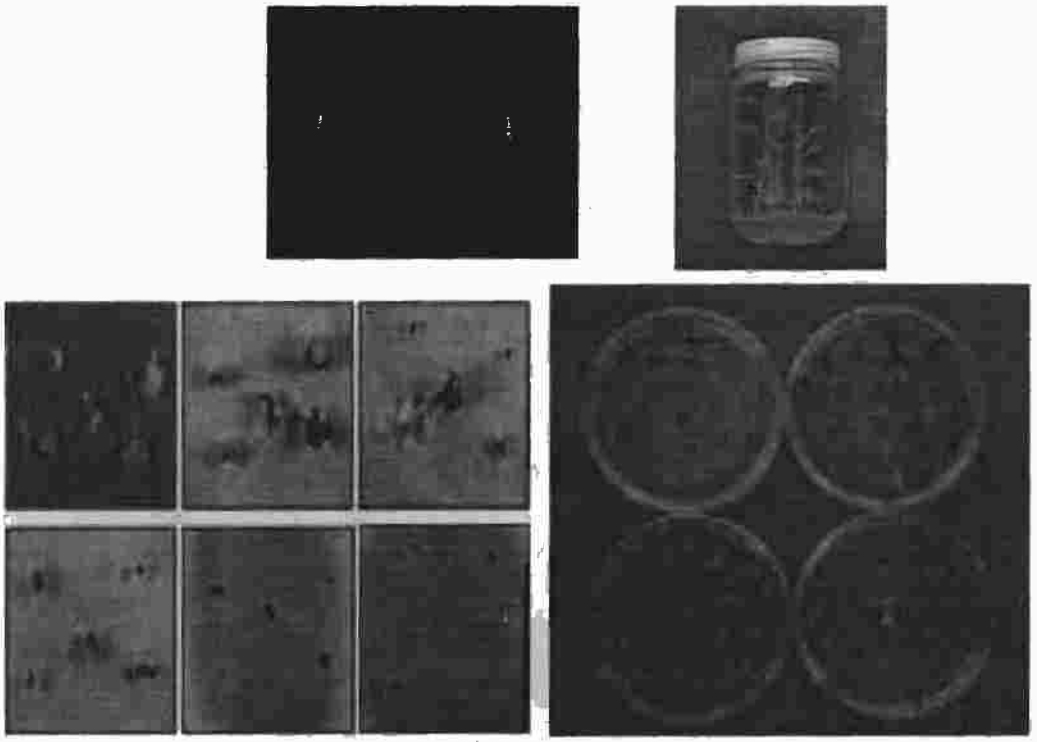
ما المقصود بزراعة الأنسجة :

يمكن تعريف زراعة الأنسجة النباتية بأنه علم يتألف من عدد من الطرق المختلفة لإنماء الأعضاء النباتية أو الأنسجة أو الخلايا على بيئات صناعية أمكن تركيب محتوياتها فى المعمل و يتم النمو فى ظروف متحكم فيها و قد شغل هذا العلم الجديد العديد من العلماء و الباحثين فى العالم خلال الثلاثين سنة الأخيرة وأجريت العديد من الأبحاث الأكاديمية كانت من نتيجتها زيادة الفهم عن كيفية تمييز وكشف وتكوين الأعضاء أو الأجزاء النباتية المفصولة والمنماة فى البيئات الصناعية و أدت أيضاً إلى إبتكار العديد من الطرق الحديثة فى هذا المجال و أمكن توجيه تلك الأبحاث الأكاديمية لخدمة النواحي التطبيقية فى سبيل تطوير الإنتاج الزراعي والتغلب على العديد من المشاكل التي تواجه إنتاج تقاوي الحاصلات الزراعية الإقتصادية الهامة. وفى الوقت الحالى إنتشرت المعامل التجارية التي تستخدم أسلوب زراعة الأنسجة فى العديد من الدول المختلفة ومن بينها مصر التي لم تتخلف عن هذا الركب .

ما هى زراعة الأنسجة :

زراعه الأنسجه هى زراعه خلايا أو أنسجه أو أعضاء نباتية فى بيئات صناعيه ذات عناصر غذائيه معينه بغرض الحصول على نبات كامل (شكل رقم ٦٢) .

وزراعه الأنسجه النباتيه هى تقنيه تطبق منذ حوالى ثلاثون عاما. فهى تعتبر تكنولوجيا هامه للبلاد الناميه لإنتاج نباتات خاليه من الأمراض وعاليه الجوده ، كما تتميز بالإنتاج السريع لنباتات متماثله تماما .



شكل رقم ٦٢ : يوضح نمو الأنسجة النباتية فى المزارع الصناعية

فوائد زراعة الأنسجة :

١-إكثار النباتات التى يصعب إكثارها بالطرق المعتادة فى وقت قصير .

٢-تربية النباتات المرغوبة والحصول على طفرات أو هجن جديدة جيدة الصفات .

٣-الحصول على سلالات خالية من الفيروس .

٤-إستخدام الهندسة الوراثية بصورة أكثر سهولة بإدخال أو نقل صفات جيدة مرغوبة كمادة إلى نواة الخلية الأم .

ولا تقتصر أهمية علم زراعة الأنسجة النباتية على هذا فقط بل تمتد إلى أنها تعتبر الوسيلة الفريدة التى لم تكن فى متناول العلماء من قبل لدراسة فسيولوجيا النباتات والتطوير البيولوجى للكائن النباتى الحى من صور بسيطة إلى صور متراكبة معقدة البناء ولكنها متوافقة الوظائف .

تزداد أهمية هذا العلم مع التطور التكنولوجى وبخاصة الثورة العلمية الهائلة فى مجال الهندسة الوراثية التى تشمل التعرف الدقيق والمحدود على الجينات الوراثية التى تحكم سلوك وصفات الكائن الحى فى مراحل تطورة المختلفة وما يتلو هذا من محاولة تعديل التركيب الجينى ليتوافق مع البيئة التى يعيش فيها ولتتواءم مع رغبات الشعوب . وزراعة الأنسجة النباتية فى المعمل تحت ظروف خالية من إمكانية التلوث بهدف الوصول إلى تلك الأهداف وهو ما يعرف بتكنيك زراعة الأنسجة ويستعمل مصطلح Tissue Culture للدلالة على زراعة أى جزء نباتى على بيئة صناعية فى المعمل وقد تكون الزراعة زراعة خلية أو مجموعة خلايا أو زراعة الأعضاء أو أجزاءها أو زراعة البروتوبلاست أوحبوب اللقاح .

زراعة الأنسجة وأهميتها في أمراض النبات :

جميع طرق زراعة الأنسجة ذات أهمية لأمراض النبات ، فمثلا بعض هذه الطرق مثل الطريقة الدقيقة لإكثار النبات Plant micro - propagation تحمل في ثناياها خطر إنتشار الكائنات الممرضة أو علي العكس فإن هذه الطريقة تستعمل لإنتاج نباتات خالية من الكائن الممرض كإنتاج شتلات خالية من المسببات المرضية أهمها الفيروس. فمن المعروف أن بعض النباتات التي تتكاثر خضريا مثل البطاطس والفراولة والموز والثوم وغيرها تصاب بالفيروسات العديدة التي تؤدى إلى ضعف النباتات ونقص الإنتاجية وردائة التقاوي والشتلات، وحيث أن هذه الإصابة تنتشر فى جميع أجزاء النباتات فإن هذه الأمراض يمكن أن تنتقل عن طريق التكاثر بالطرق التقليدية باستخدام الدرنات أو الريزومات أو المدادات الأمر الذى يؤدى إلى تدهور التقاوي عاماً بعدعام و يؤدى أيضا إلى ضرورة إستيراد العديد من النباتات من الخارج مما يكلف الدولة ملايين الجنيهات سنويا، و لكن بإستخدام أسلوب زراعة الأنسجة يمكن إنتاج نباتات خالية من هذه المسببات المرضية سواء كانت متسببة عن أمراض فطرية أو بكتيرية أو نيماتودية أو حتى فيروسية و بالتالى ينعكس ذلك على جودة و كفاءة التقاوي والشتلات الناتجة من زراعة الأنسجة. والأكثر أهمية فإن كثيرا من هذه الطرق يمكن أن تستعمل لدراسة مواقع وإمكانية عزل جينات المقاومة لبعض الكائنات الممرضة وطرق أخرى تستعمل لتطوير ونقل مثل هذه الجينات إلي النباتات القابلة للإصابة . إن أكثر طرق زراعة الأنسجة أهمية ودورها في أمراض النبات مشروحة بإختصار فيما يلي : -

أولا: مزرعة الكالوس ،مزرعة الخلايا المفردة ،مزرعة القمة المرستيمية ومزارع الإكثار الدقيق :

١- مزرعة الكالوس أو الخلية المفردة :

الكالوس هو كتلة غير متميزة تقسيميا وتنتج عند وضع نسيج حى على بيئة غذائية تحتوى على مواد غذائية مثل الأوكسينات ويعاد زراعة الكالوس من كل مزرعة سابقة على بيئة غذائية سائلة تحت الرج المستمر لإعطاء خلايا مفردة عديدة وعندما أخذ أحد من الاثنين الكالوس أو الخلايا المفردة ووضعت فى بيئة غذائية مناسبة تتكشف الخلايا إلى اجنة ومنها إلى نموات كاملة يمكن أن توضع فى قصارى ثم تنقل للحقل .

٢- مزارع الخلايا المفردة :

تعتبر أول خطوة في عمل مزارع الخلايا هي عزل الخلايا المفردة وتتم عملية عزل الخلايا المفردة إما بالوسيلة الميكانيكية وإما أنزيمياً من الأعضاء النباتية وإما تؤخذ من نسيج كالوس نامي. يلي هذه الخطوة زراعة الخلايا المفردة علي البيئة المناسبة، وتعد طريقة برجمان من أكثر الطرق شيوعاً في زراعة الخلايا المفردة ويراعي في هذه الطريقة أن يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة وتتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا علي تركيز الهرمونات في بيئة النمو حيث أنه قد يكون النمو متميز أي يتكون نموات خضرية أو جذرية أو كليهما أو قد يكون النمو غير متميز أي تتكون كتلة من الخلايا تسمي كالوسCallus. وينتج الكالوس من أي نسيج نباتي متميز . بوضع الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا في بيئة تحتوي علي تركيز مرتفع من الأوكسين وتركيز منخفض من السيتوكينين حيث يتكون الكالوس عند ذلك ويمكن أن يستمر في النمو إما علي صورة كتل متعددة الخلايا في البيئات الصلبة أو علي أشكال تجمعات صغيرة من الخلايا في البيئات السائلة. ومع إستعمال تركيز مرتفع من السيتوكينين ومنخفض من الأوكسين فأنه يمكن أن تتكون الجذور والسيقان والأوراق. .

أهمية مزارع الخلايا أو الأنسجة في تربية النبات :

يمكن الإستفادة من مزارع الأنسجة أو الخلايا في تربية النبات كالتالي :

يمكن الحصول علي الإختلافات الوراثية التي يحتاج إليها المربي في برامج التربية من مزارع الأنسجة فمثلا :

- تعتبر مزارع الخلايا مصدراً هاماً للطفرات التي تعتبر أحد مصادر التصنيفات الوراثية وذلك لأن كل خلية لها القدرة علي أن تصبح فرد جديد وبالتالي إحتمالات الحصول علي طفرات يكون كبير . ولقد لوحظت هذه الطفرات في مزارع محاصيل الخس، الثوم، الأرز، وغيرها .
- يمكن عن طريق مزارع الأنسجة إنتخاب نباتات مقاومة للأمراض والظروف البيئية الغير مناسبة .
- كذلك أمكن إنتاج سلالات مقاومة للفيروس من نبات الدخان من مزارع الخلايا. .

٣- مزارع القمة الخضرية المرستيمية :

يستفاد منها في إنتاج نباتات خالية من الفيروس ويعد ذلك أمر بالغ الأهمية في المحاصيل خضرية التكاثر والتي ينتقل فيها الفيروس تلقائياً مع الأجزاء الخضرية المستخدمة في التكاثر. وبالرغم من أن النباتات قد تكون مصابة جهازياً بالفيروس إلا أن القمة المرستيمية تكون خالية غالباً أو تحتوى على عدد قليل جدا من الفيروسات وذلك للاسباب التالية :

- خلو القمة المرستيمية من الأنسجة الوعائية التي يكون إنتقال الفيروس فيها سريع.
- يكون النشاط الأيضي في القمة المرستيمية غالباً بدرجة يقل معها تكاثر الفيروس.
- نظم المقاومة لتكاثر الفيروس تكون أعلي في الأنسجة المرستيمية عن أي نسيج آخر.
- التركيز العالي للأوكسين في القمم النامية يثبط نشاط الفيروس.

ولهذه الأسباب فإن زراعة القمم المرستيمية تؤدي إلي إنتاج نباتات خالية من الفيروس. ويكون طول القمة المرستيمية ٢٥٠ ميكرون وعرضها ١٠٠ ميكرون ولصعوبة فصل هذه القمة فإنه تستعمل القمة النامية كلها ويطلق على هذه المزارع

Shoot Tip Culture .المزارع أيضاً تحتوى على نباتات خالية من الفيروس فـى أغلب الأحيان . والذي يحدد مستويات النجاح في هذه العملية هي الدقة في فصـل القمة النامية بدون الإضرار بها وكذلك في إختيار البيئة المناسبة للزراعة التي يجب أن تكون محفزة لتكوين الجذور والأوراق من القمم المزروعة. ويلاحظ أن :

البيئة الصلبة تشجع تكوين الكالوس وهو أمر غير مرغوب في هذه المـزارع ويجب ملاحظة أنه كلما زاد حجم القمة المرستيمية كلما زادت فرصة تمييز نباتات منها أما القمة المرستيمية الصغيرة فإنها تنتهي بتكوين بذور وكالوس فقط وقـد لا تتكون جذور..

وعلي ذلك فالقاعدة العامة هي أن تكون القمم المرستيمية صغيرة بحيث تكوّن نباتات خالية من الفيروس وكبيرة بحيث تسمح بإعطاء نباتات كاملة القمة الخضرية Apical . M . T . C (من ضمن فوائد زراعة القمة النامية، الإكثـار الخضـري السريع للنباتات الممتازة لإجراء التجارب عليها أو بيعها في الأسواق)..

٤-مزارع الإكثار الدقيق :

يستفاد من مزارع الإكثار الدقيق في إنتاج سلالات خضرية تحتـوي علـي عشرات الآلاف من النباتات الصغيرة خلال فترة وجيزة. ويفضل دائماً إسـتخدام القمة المرستيمية لأنها تكون خالية من الفيروس كما يجب إستخدام أجزاء صـغيرة من ساق النبات تحتوي كل منها علي عقد وبرعم جانبي وذلك لأن البراعم الجانبية المفصولة من الأشجار لا تنمو بمفردها لذلك فإن النسيج الأمـي الموجـود معـه يساعده علي النمو. كما أن البراعم الجانبية تتحمل التعقيم عن البراعم الطرفية.

ويحدث الإكثار الدقيق في المزارع بواحدة من ثلاث طرق :

١- من خلال الكالس :

Callus culture

الكالوس :- هو عبارة عن تجمع بروتوبلازمي من خلايا غيـر مميـزة أو غيـر مشكلة (أي توجد جذور وسيقان وأوراق)] غيرمنتظمة..

تعد هذه الطريقة من أسرع طرق الإكثار الدقيق إلا أن هذه الطريقة غير مفضـلة للأسباب التالية :-

أ- الكالوس غير ثابت وراثياً حيث تظهر به حالات مختلفة من التضاعف الكروموسومي .

ب- لم يتميز الكالوس إلي نموات نباتية في العديد من المحاصيل الهامة .

فوائد إستخدام زراعة الكالوس :-

أ - يعتبر الكالوس مصدر للإختلافات الوراثية الكروموسومية التي تزيد بزيادة عمر مزرعة الكالوس .

ب- الحصول علي نباتات خالية من الفيروس .

٢- من خلال تكوين البراعم العرضية :

يقصد بالبراعم العرضية تلك البراعم التي تتكون مباشرة من العضو النباتي دون أن يفصل بينها نسيج كالوس وتتكاثر أعداد كبيرة من المحاصيل الإقتصادية بهذه الطريقة .

٣- من خلال تحفيز التفرع الجانبي :

يتم تحفيز التفرع الجانبي في المزارع بتوفير السيتوكينين بها بتركيز معين إما مع الأكسين أو بدونه حيث يؤدي توافر السيتوكينين بالمزرعة إلي نمو البراعم الجانبية التي تكون في القمم المرستيمية التي تنمو من البراعم المزروعة ثم تنمو البراعم الجانبية التي تكون في القمم المرستيمية الجديدة وهكذا .

ويؤدي إستمرار هذه العملية لعدة مرات إلي تكوين كتلة من النموات الجديدة. ثم يلي ذلك نقل هذه النموات إلي بيئة أخرى تختلف في مكوناتها الهرمونية حتى تتم عملية التجذير ومع تكوين الجذور تنقل هذه النباتات إلي أصص معقمة بحرص تام ويجب رعايتها تماماً حتي يتم نقلها إلي البيوت المحمية .

ثانيا مزارع البروتوبلاست :

Protoplast culture

تعرف مزارع البروتوبلاست علي أنها زراعة الخلايا بدون جدرها الخلوية. تفيد مزارع البروتوبلاست فى عملية دمج البروتوبلاست Protoplast Fusion عند الرغبة فى إجراء تهجينات نوعية بعيدة وكذلك عملية إدخال أجزاء

غريبة من DNA أو بكتريا أو فيروسات معينة في الهندسة الوراثية حيث يتم عزل البروتوبلاست عن الجدر الخلوية ويزرع في بيئة مناسبة ويتم هذا بواسطة أنزيم السليوليز الذي يحفز من مزارع الفطر .

تعد الأوراق الحديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلاست حيث يظهر النسيج النباتى المستعمل سطحياً ثم تسلخ بشرة الورقة أو يقطع الجزء النباتي إلي أجزاء صغيرة ويوضع في محلول الأنزيمات ويتكون من أنزيم البكتينيز pectinase الذى يفصل الصفيحة الوسطى وأنزيم السلوليز cellulase الذى يحلل السليلوز ويفضل أن تكون المعاملة بالأنزيمات الهاضمة تحت تفريغ لإسراع عملية تخلل الأنزيمات بين الخلايا وتستمر المعاملة بالأنزيمات ٢/١ ساعة إلي ساعة . ثم تزرع علي البيئة الملائمة ويفضل أن تكون سائلة وتظهر الجدر السيليوزية حول البروتوبلاست بعد ٢-١٤ يوم .ونجحت هذه الطريقة في العائلة الباذنجانية كالفلفل، الباذنجان والبطاطس..

أهمية مزارع البروتوبلازم :

١- يمكن الإستفادة منها في الإكثار وعزل السلالات الفطرية..

٢- دمج بروتوبلازم الأنواع النباتية البعيدة عن بعضها وهو يعد وسيلة فعالة لإجراء التهجينات البعيدة .

٣- إدخال صفة العقم الذكري السيتوبلازمي في النباتات..

٤- الحصول علي نباتات وراثية يمكن الاستفادة منها في تحسين النباتات وخاصاً العقيمة منها .

٥- إدخال أجزاء من الـ DNA أو البكتريا أو الفيروسات عن طريق الهندسة الوراثية..

ويمكن تحقيق هذه الأهمية فبعد الحصول على البروتوبلاستس يكون جاهزا للإستعمالات التى تحقق هذه الأهمية بالطرق التالية :

١- حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيروس :

يمكن حقن البروتوبلاستس لكثير من النباتات بواحد أو أكثر من الفيروسات التي تصيب النبات تتضمن عملية الحقن خلط البروتوبلاستس مع كمية قليلة من الفيروس النقي الذي أضيف إليه عامل مشجع علي الإندماج يسمى فيوزاجين (Fusagen) مثل poly L-ornithine أو مادة Polyethlene glycol ، يحضن خليط (الفيروس + فيوزاجين + بروتوبلاست) مع قليل من المنشط علي حرارة الغرفة العادية لمدة ١٠ – ٢٠ دقيقة بعدئذ يغسل البروتوبلاست بالمانيتول أو بمحلول مغذى أو بكليهما لإزالة الفيوزاجين والفيروس الزائد في زمن معين يختلف باختلاف علاقة الفيروس مع العائل إن تكاثر الفيروس في البروتوبلاستس عادة ما تكتمل خلال ٢٤ – ٣٦ ساعة من الحقن ، يمكن مراقبة سرعة تكاثر الفيروس بإستعمال جزء من البروتوبلاستس المحقون وفحصه بالميكروسكوب الإلكتروني أو بالإختبارات الحيوية علي عائل يظهر أعراض البقع الموضعية ، أو باستعمال الإختبارات السيرولوجية .

٢- حقن البروتوبلاست بنواقل مهندسة وراثيا : ٢

العوامل الناقلة التى أستعملت بنجاح لإدخال مواد وراثية غريبة فى خلايا النبات هى :

أ- **البلازميد** مثل بلازمد Ti ، فى البكتريا *Agrobacterium Tumefaciens* .

ب- **الفاج** ومنه الذى يصيب الخلية البكتيرية وكذلك حمض DNA الفيروسي ثنائي الخيط لفيروس موزايك القرنبيط ، هناك فيروسات أخرى ذات الخيط الواحد من DNA مثل فيروسات الجوزاء ، الفيروسات متعددة الأجزاء ، الفيرويدات والعناصر المتنقلة كلها أستعملت في هذا المجال .

ج- **الكوزميد** وهو يجمع فى خواصه بين البلازميد والفاج(انظر ناقلات الكلونة) .

إن المادة الوراثية (النواة ، البلازميد ، DNA أو RNA الفيروسي) يمكن أيضا إدخالها فى البروتوبلاست إما بواسطة تحضينها مع البروتوبلاست في وجود الفيوزاجين وهو عامل مشجع على الإندماج أو بواسطة تغليف المادة الوراثية بحويصلات من الدهون الصناعية تسمى Liposomes ليبوسومات ، فعند تحضينها مع البروتوبلاست تسحب إلى الداخل بواسطة البروتوبلاست وبالتالى تأخذ معها

المادة الوراثية التى تحتويها . وهذه الطريقة أكثر الطرق إستخداماً لإدخال جينات المقاومة .

٣- إختيار النباتات المشتقة من البروتوبلاست المقاومة للإصابة المرضية والمقاومة لتوكسينات الكائن الممرض :

في زراعات الأنسجة النباتية بطريقة إعادة تخليقها من الكالوس، خلايا مفردة أو من البروتوبلاست المأخوذ من نبات مفرد وجد أن تلك النباتات تظهر واحدا أو أكثر من تلك الصفات تختلف عن تلك التي تظهرها نباتات أخرى (أفراد من نفس المجموعة) أو نباتات الآباء ، هذه الظاهرة تسمى Somaclonal Variation يقصد بها الإختلافات الموجودة ببعض النباتات النامية من خلايا جسمية علي بيئات زراعة الأنسجة. إن كثيراً من مثل هذه النباتات تختلف عن الآباء وتختلف عن بعضها البعض فى درجة المقاومة التى تظهرها ضد كائن ممرض معين. فإذا تم الحصول علي بروتوبلاست هذه النباتات فإنه يمكن حقنها بالكائن الممرض مثل فيروسات أو يمكن وضعها في بيئة غذائية أضيف إليها تركيزات مختلفة من توكسين الكائن الممرض أو من المضادات الحيوية أو مبيد فطرى أو مبيد فيروسى، ثم يختار البروتوبلاست والنباتات المشتقة من البروتوبلاست وتقيم من حيث المقاومة لكائن ممرض معين عند أى معاملة من المعاملات السابقة ، ثم تدرس وتدمج في برامج التربية .

٤- حقن البروتوبلاست المصاب بالفيروس بمواد مضادة للفيروس :

المركبات المضادة للفيروسات يمكن إختبارها بسرعة إذا أضيفت المركبات المعنية إلي البيئة التى وضع فيها البروتوبلاست فوراً بعد حقنه بالفيروس ، إن هذه المادة المضادة للفيروس تستطيع أن تثبط أو تقلل بشكل كبير تكاثر الفيروس في البروتوبلاست المحقون (تحدد بواسطة الإختبارات الحيوية بدون أن تؤثر علي بقاء البروتوبلاست حياً ولا تؤثر علي إمكانية إعادة تخليقه) .

٥- نقل جين المقاومة إلي النباتات الغير متوافقة جنسيا من خلال دمج البروتوبلاست :

عند خلط البروتوبلاست المتحصل عليه المأخوذ من أنواع نباتية ليست بينهما قرابة فى وجود مادة الفيوزاجين (مادة تساعد على الإندماج) فإن كثيرا من هذه

البروتوبلاستات تندمج مع بروتوبلاستات أخرى من نفس النوع أو أنواع أخرى ، هذا ما يسمى التهجين الجسمىSomatic hybridization فإن هذه الهجن تظهر إختلافاً واسعاً نتيجة لاتحادات الأنوية و DNA السيتوبلازمى (خصوصا DNA الميتوكوندريا) .

الإندماج للبروتوبلاست ضمن نفس الجنس أو بين أجناس متقاربة يؤدى إلى تكوين هجن تكون أكثر قابلية للحياة بعكس إذا حدث الإندماج بين أنواع بعيدة القرابة فإن الهجن الناتجة لا تنمو أوتكون عقيمة. وتكون هذه الهجن ذات أهمية كبرى فى أمراض النبات إذا احتوت هذه الهجن على المجموعة الكروموسومية لأحد الآباء بالإضافة إلى أجزاء من المجموعة الكروموسومية التى قد تحتوى على جينات المقاومة من الأب الآخر ضد أحد الكائنات الممرضة ويمكن الحصول على هذه الهجن من البروتوبلاست أحادى المجموعة الكروموسومية سواء من أنواع متوافقة أو غيرمتوافقة جنسيا .

ثالثا : مزارع المتوك وأهميتها في إنتاج نباتات أحادية :

تفيد مزارع المتوك في إنتاج نباتات أحادية Haploid من حبوب اللقاح إما من خلال تكوين أجنة أو من خلال تكوين الكالوس..

ما يراعى عند عمل مزارع المتوك :

١- يجب أن تؤخذ المتوك من نباتات حديثة الإزهار ويكون ذلك في مرحلة معينة من تكوين حبوب اللقاح قبل تفتح الزهرة. لذلك يفضل زراعة النباتات التي تؤخذ منها المتوك في ظروف متحكم فيها بيئياً ليمكن الربط بين المظهر الخارجي للبرعم الزهري والمرحلة المناسبة لتكوين حبوب اللقاح .

٢- يجب تطهير البراعم الزهرية المنتخبة بأحد المطهرات المناسبة ثم تفصل الأسدية كاملة (متك + خيط) وتوضع في طبق بتري معقم .

٣- يجب أن تسحق أحد المتوك في صبغة أسيتوكارمن لإختبار مرحلة تكوينه فإذا كانت المرحلة مناسبة تفصل بقية المتوك عن الخيوط وتوضع أفقياً في بيئات زراعية .

٤- يجب الحذر والحرص عند فصل وزراعة المتوك حتى لا تحدث أضراراً لهـا حيث أن تجريحها يؤدي إلي تحفيز تكوين كالوس من خلال جدر المتوك وهي خلايا ثنائية .

٥- تحضين مزارع المتوك من الضوء لمدة ١٢-18 – ساعة وعلي درجة حرارة ٢٨ م بالتبادل مع فترة ظلام مدتها ٦ – ١٢ ساعة علي درجة حـرارة ٢٢ م ، بعد ٣ – ٨ أسابيع يبدأ تفتح المتوك وتحولها إلي اللون البني وذلك بسبب ضغط الكالوس المتكون من حبوب اللقاح علي المتـوك أو بسـبب النباتـات الصغيرة التي تنمو فيها .

٦- تفصل النباتات المفردة أو النموات الخضرية المتكونة من الكـالوس بعـد أن يصل ٣ : ٥ سم وتنقل إلي بيئة مناسبة لتكوين الجذور ثم بعـد ذلـك تنقـل النباتات التي تكونت جذورها إلي أصص صغيرة معقمة .

أهمية مزارع المتوك وحبوب اللقاح :

ترجع أهمية هذه المزارع إلي الحصول علـي نباتـات أحاديـة المجموعـة الكروموسومية إما من خلال تكوين الأجنة أو تكوين الكالوس ويفيد ذلك في الآتي:

أ – تستخدم النباتات الأحادية في الحصول علي نباتات ثنائيـة أصـيلة متماثلـة العوامل الوراثية لجميع الجينات في جيل واحد بدلا من إستعمال طرق التربية العادية من المحاصيل الخلطية التلقيح وذلك بمعاملتها بالكولوشيسـين . وهـذا يوفر من ٦: ٨ أجيال للتربية الذاتية .

ب –تفيد النباتات الأحادية في الحصول علي مختلف حالات التعدد الكروموسومي الغير تام..

ونظرا لأن الجراثيم الدقيقة (حبوب اللقاح) هى نـواتج الإنقسـام الميـوزي (الإختزالي) فإن المادة الوراثية المكونة لكل جرثومة دقيقة تكون متباينه وكـذلك يتباين الكالوس والنباتات الأحادية المجموعة الصبغية تكون مختلفة عـن المـادة الوراثية المكونة لجراثيم دقيقة أخرى أيضا نظرا لتباين ناتج الإنقسام الميوزى لأن خلايا الأنسجة والنباتات الأحادية المجموعة الكروموسومية تحتوى مجموعة جينات واحدة (1 N) فإن كل جين يستطيع أن يظهر مفعوله ويعبر عن نفسه وبالتالى يمكن

أن يكون ممكنا الكشف وتعيين أماكن وعزل حتى الجينات ذات الأهمية القليلة فى المقاومة لكائن ممرض معين .

(نباتات متماثلة العوامل الوراثية لجميع الجينات فى جيل واحد بدلا من إستعمال طرق التربية العادية التى تستغرق عدة أجيال) .

التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية فى مصر :

يعد إستخدام التكنولوجيا الحيوية وتطبيقاتها المختلفة ثورة علمية وحضارية بدأتها الدول المتقدمة وأحرزت إنتصارات علمية كبيرة وإنجازات مشهودة، مما دعى دول أخرى إلى أن تحذو حذو تلك الدول المتقدمة وذلك للإستفادة من التكنولوجيا الحيوية فى تنمية مجتمعاتهم والنهوض بها .

وتعتبر الهندسة الوراثية وتطبيقات التكنولوجيا الحيوية علامة مميزة على مدى تقدم الشعوب نظرا لما تتطلبه من إمكانيات علمية عالية وأبحاث متطورة وتجارب معملية وحقلية تأخذ سنوات عديدة وتخضع لتقييم دقيق من عدة جهات مختصة، كما تخضع لقواعد وإرشادات وقوانين صارمة حرصا على سلامة الإنسان والحيوان والبيئة .

لذلك حرصت مصر على أن يكون لها السبق فى مجال إستخدام التكنولوجيا الحيوية كدولة عربية ونامية، وهى أحوج ماتكون لتلك التكنولوجيا نظراً للزيادة السكانية المطردة وتناقص الرقعة الزراعية ومشاكل ملوحة التربة ونقص المياه والجفاف والتصحر وغيرها .

ويوجد فى مصر معاهد وشركات متخصصة تستخدم التكنولوجيا الحيوية والهندسة الوراثية منذ عدة سنوات وتنتج اللقاحات الواقية من الأمراض كما تنتج الأدوية مثل الأنسولين .

أما عن إستخدام الهندسة الوراثية فى مجال الزراعة، فهناك جامعات ومعاهد فى مصر تعمل بدأب وإجتهاد، وإنجازاتها متعددة وقيمة و تجاربها المعملية والحقلية التى أستمرت عدة سنوات فى مجال البحث والتطبيق والتقييم مؤهلة إلى الدخول فى مجال التسويق بمنتجات عالية الجودة ومنافسة للمنتجات العالمية .

ويعتبر معهد بحوث الهندسة الوراثية الزراعية بمركز البحوث الزراعية قلعة علمية ومنارة فكرية نظراً لإنجازاته الهامة فى مجال الهندسة الوراثية، وفيما يلى موجز عن إنجازات المعهد .

١- إنتاج مبيد حيوى لمكافحة الافات :

- قام المعهد بإ نتاج مبيد حيوى أطلق عليه " أجيرين Agerin" من سلالة مصرية من بكتيريا "Bt" *Bacillus thuringiensis* وقد تم تسجيل براءة إختراع هذا المركب فى كل من مصر والولايات المتحدة الأمريكية. ويتم إنتاج هذا المبيد الحيوى بالتعاون مع شركة " بيوجرو إنترناشيونال" وهى الشريك المسئول عن إنتاج المركب تجاريا، ويتم تسويقه من خلال "وحدة خدمات الهندسة الوراثية" وهذا المبيد الحيوى تم تسجيله فى وزارة الزراعة. وقد تم إستخدام هذا المبيد فى مقاومة آفات القطن فى مساحة بلغت حوالى" ١٦٠ ألف فدان خلال موسم ٢٠٠٢، كما أمكن إنتاج مركبات أخرى من " الأجيرين" لمقاومة آفات الخضر والفاكهة المختلفة .

- تم عزل خمسة عزلات مصرية من فطريات التريكودرما وتعريفها عن طرق المعهد الدولى للفطريات بالمملكة المتحدة، وهذه العزلات لها قدرة عالية فى القضاء على النيماتودا .

- تم تعريف عزلتين من بكتيريا "باسيلس" و "سيدومونس" أظهرت النتائج أن لها تأثير فعال فى منع فقس بيض النيماتودا، وسوف يتم إستخدام بعض هذه السلالات فى إنتاج مبيدات حيوية لمقاومة النيماتودا .

٢- إنتاج نباتات مقاومة للآفات :

تم التقييم الحقلى فى مصر لسلالات من البطاطس المعدلة وراثيا " محتوية على جين Bt " وذلك فى الحقل الملحق بالمعهد وفى محطة المركز الدولى للبطاطس بكفر الزيات، وقد أظهرت النتائج أن النباتات المعدلة وراثيا من صنف سبونتا (صنف يتم زراعته محليا) قد أظهرت مقاومة عالية للإصابة بفراشة درنات البطاطس، وجارى إستيفاء الإختبارات المطلوب تقديمها إلى لجنة الأمان الحيوى على هذا المنتج لتسجيله كصنف تجارى .

- إنتاج سلالات من الذرة الشامية المصرية مقاومة للثاقبات عن طريق نقل " جين Bt " باستخدام تقنيات التعديل الوراثى .
- يشارك المعهد مع معهد بحوث القطن بمركز البحوث الزراعية وبالتعاون مع شركة مونسانتو فى تنفيذ برنامج إستنباط سلالات من القطن المصرى معدلة وراثيا لمقاومة الحشرات، وسوف يطلق على هذه الأصناف الجديدة " جيزة – بولجارد I I " .

٣- إنتاج نباتات مقاومة للفيروسات :

أ- إنتاج قرعيات مقاومة للفيروسات :

تم إنتاج كوسة "صنف إسكندرانى" معدلة وراثيا لمقاومة فيروس التبرقش الزوكينى الأصفر (ZYMV) ، كما تم التوصل إلى أفضل الطرق لإجراء التعديل الوراثى لكل من الشمام والخيار والبطيخ، ويتم حاليا تقييم تلك النباتات المعدلة وراثيا لمقاومة فيروس (ZYMV) .

ب- إنتاج طماطم مقاومة للفيروسات :

يجرى العمل على إنتاج نباتات طماطم مقاومة للفيروسات خاصة " فيروسات الجيمينى " Gemini viruses ، والتى تنتقل عن طريق الذبابة البيضاء، وقد تم نقل جين يسبب موت الخلايا النباتية التى يحدث بها العدوى فقط ويمنع أو يحد من إنتشار الفيروس إلى باقى خلايا النبات. وقد أظهرت نباتات الطماطم المعدلة وراثيا بهذه الطريقة مقاومة للفيروس تحت ظروف العدوى الصناعية داخل الصوب .

جـ- إنتاج نباتات موز مقاومة للفيروسات :

تم عزل وتنقية فيروس " تورد القمة BBTV " فى الموز، وكذلك فيروس" تبرقش الموز CMV "، كما تم عزل وكلونة جين الغلاف البروتينى لهذه الفيروسات وتم إستخدام هذه الجينات فى عملية التعديل الوراثى لنبات الموز ليقاوم تلك الفيروسات .

د- تحديد البصمة الوراثية ورسم الخرائط الوراثية :

مع ظهور تقنيات البيولوجيا الجزيئية أمكن الكشف عن التباين الوراثى بين أفراد الكائنات الحية باستخدام الحمض النووى .

ويستخدم المعهد هذة التقنيات الحديثة لخدمة الزراعة فى عديد من المجالات منها :

- تقدير درجة نقاوة الأصناف النباتية .
- رسم الخرائط الوراثية للنباتات الاقتصادية الهامة .
- الإسراع ببرامج تربية المحاصيل .
- تحديد البصمة الوراثية للسلالة أو الصنف أو الهجين .

ومن أهم المحاصيل التى تم دراسة التباين الوراثى بين أصنافها ورسم الخريطة الوراثية لها هى :

الطماطم - الذرة - نخيل البلح - الكانولا - القطن .

طرق الهندسة الوراثية وأهميتها في أمراض النبات :

تهتم تقنيات الهندسة الوراثية بفصل الجينات من خلايا الكائنات الراقية ونقلها إلى خلايا الكائنات الدقيقة Microorganisms بغرض إنتاج منتجاتها البروتينية بصورة إقتصادية وكذلك نقل الجينات إلى النباتات والحيوانات لتحسين صفاتها الإقتصادية علاوة على إستخدام الطرق الحديثة لهذا العلم في تشخيص الأمراض الوراثية للإنسان ومحاولة علاجها .

فى السنوات العشر الماضية حدث تطور هائل في تطبيقات الهندسة الوراثية والتي أمكن بواسطتها إنتاج الإنسولين البشرى ، هرمونات النمو واللقاحات المضادة للفيروسات Vaccines بواسطة بكتريا الأمعاء *Escherichia coli* وخلايا الخميرة .

هذا التطور الغير متوقع أدى إلى نشأة فرع علمي جديد يسمى بالوراثة الجزئية Molecular genetics أو الهندسة الو راثية والذي أدت إستخداماته إلى تأسيس قطاع جديد من التكنولوجيا الصناعية يطلق عليه تكنولوجيا الجينات Gene

technology والذى سوف يتشابه حجمه الصناعى فى بداية القرن القادم مع الصناعات الإلكترونية الدقيقة Microelectronic والتكنولوجيا الذرية .

من المحتمل أن معظم إن لم يكن جميع الطرق العملية المستعملة فى الجزيئ الحيوى (المادة الوراثية) في النبات بشكل خاص تستعمل في الهندسة الو راثية في النباتات أو الكائنات الممرضة للنباتات وعلاقتها في تكشف ومقاومة المرض. وبعض أكثر الطرق أهمية فى الهندسة الوراثية وثيقة الصلة بأمراض النبات .

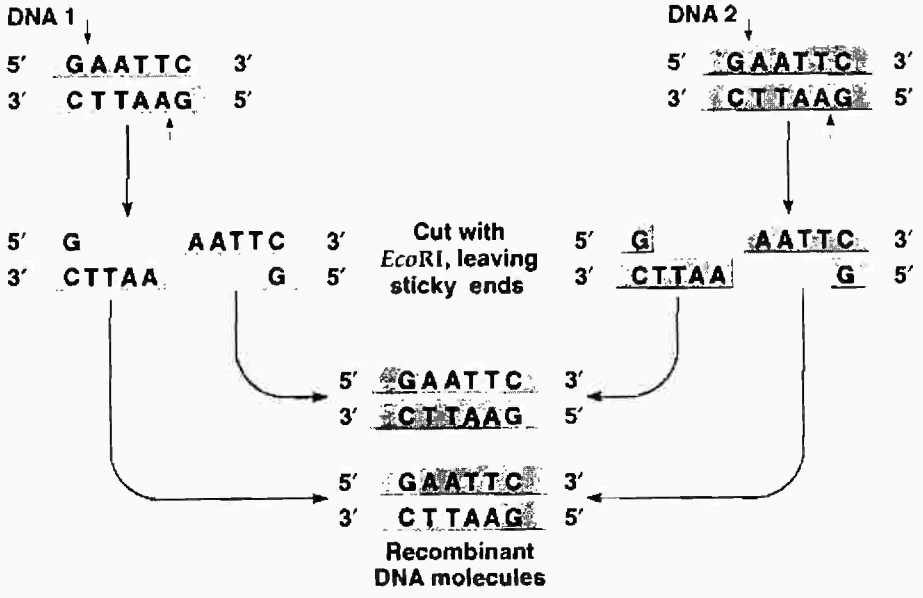
المادة الوراثية فى النبات والكائنات الممرضة النباتية : ذكرت سابقاً فى الباب الأول..

الكائنات الممرضة النباتية إما أن تكون مميزة النواة مثل (الفطريات ، النيماتودا ، النباتات الراقية المتطفلة والبروتوزوا الهدبية) أو تكون غير مميزة النواة مثل (البكتريا ، والكائنات الدقيقة الشبية بالميكوبلازما) أو فيروسات شاملة الفيرويد. ففى الكائنات الممرضة مثل الفطريات والنباتات الراقية المتطفلة فإن النظم الوراثية مشابهة للنظام الوراثى فى النبات ومشابهة مع تلك الموجودة في النيماتودا. إن النظم الوراثية في البكتريا الممرضة النباتية والميكوبلازما مشابهة لما هو موجود في كل البكتريا . أما النظم الوراثية في الفيروسات الممرضة للنبات، تختلف عن كل من مميزة النواة وغير مميزة النواة ولكن تعتمد التفاعل بين الـ DNA الفيروسى أوالـ RNA مع الوحدات الوراثية في عوائلها، إن معرفة النظم الوراثية فى بعض الكائنات الممرضة مثل البكتريا الممرضة *Agrobacterium tumefaciens* وفيروس موزايك القرنبيط يمكن إستعمالها كعوامل ناقلة لمادة وراثية غريبة إلى المجموعات الوراثية وبالتالي لإحداث تحويرا وراثياً في النباتات .

تطور تقنيات الهندسة الوراثية :

توالت إعتقادات العلماء أن الحامض النووى DNA هو الحامل للمادة الوراثية حتى أثبت ذلك Avery ١٩٤٤ بواسطة تجارب التحول Transformation على بكتيريا *Streptococcus pneumoniae* بأن الـ DNA وليس البروتينات هو الذى يحمل العوامل الوراثية فى خلايا الكائنات الحية. وقد عزز هذا الإعتقاد ظاهرة الإستقطاع Transduction فى الفيروسات Bacteriophages فى عام ١٩٥٢ وقد صمم Watson and Crick سنة ١٩٥٣

نموذجاً للتركيب الفراغى والكيماوى لجزىء الـ DNA وأيضا إكتشف العالم Arber فى ١٩٦٢ بالصدفة أن الإنزيمات المحددة Restriction endonucleases تقطع سلاسل الـ DNA فى أماكن محددة أو بمعنى أوضح فإن كل إنزيم يتعرف على تتابع محدد من ٤ أو ٦ نيوكليوتيدات حيث يقطع الـ DNA عند هذا التتابع فنجد أن إنزيم EcoRI وهو أحد هذه الإنزيمات المحددة يقوم بقطع سلاسل جزىء الـ DNA فقط عند المواقع التى تحتوى على تتابع من ٦ نيوكليوتيدات هى GAATTC (شكل رقم ٦٣) :



شكل رقم ٦٣ طبيعة عمل إنزيمات القطع

كما تمكن Gellert من فصل إنزيمات تسمى الإنزيمات اللاحمة DNA ligases والتى تلحم قطع الـ DNA مع بعضها وفى هذه الفترة الزمنية تطورت طرق فصل الـ DNA من الكائنات المختلفة وقد أمكن فصل جزىء DNA البلازميدى من بعض الأنواع البكتيرية ومنها *E. coli* ، البلازميد مكون من سلسلة صغيرة مزدوجة حلقية من DNA حيث يتواجد بجانب الـ DNA الكروموسومى داخل البكتريا ويتضاعف Duplication مستقلا عن الـ DNA الكروموسومى ، ويتراوح عدد البلازميدات داخل الخلية البكتيرية الواحدة بين ١-٢٠ بلازميد وقد أمكن تصميم بعض البلازميدات وإستخدامها كناقل للجينات Vectors بين الكائنات الحية .

فى الفترة من عام ١٩٧١ – ١٩٧٣ تمكن Chang and Cohen من تطـوير طريقة لمضاعفة قطعة DNA من بكتريا *Staphylococcus* داخل خلايـا *E. coli* وتتلخص خطوات هذه الطريقة فيما يلى :

١. قطع DNA البلازميدى بواسطة أحد الإنزيمات القاطعة .

٢. قطع الـ DNA الكروموسومى لبكتريا *Staphylococcus* بواسـطة نفـس الإنزيم القاطع وفصل قطعة الـ *DNA* المراد نقلها ومضاعفتها داخل *E. coli*

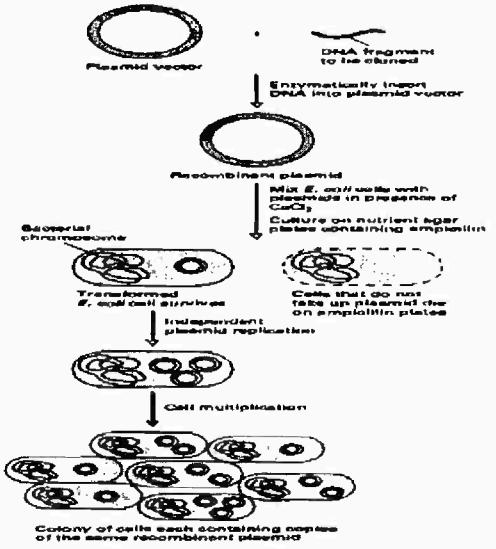
٣. لحم أو ربط قطعة الـ *DNA* المفصولة من *Staphylococcus* مع البلازميد بواسطة الإنزيم اللاحـم DNA ligase وبالتـالى يتكـون بلازميـد هجـين Recombinant plasmid .

٤. يتم إدخال هذا البلازميد الهجين داخل بكتريا *E. coli* بواسطة طريقة التحول Transformation .

٥. تترك الخلايا البكتيرية المتحولة والمحتواة على البلازميد الهجين تتكاثر داخل بيئة غذائية .

٦. فصل البلازميد الهجين من هذه الخلايا الناتجة .

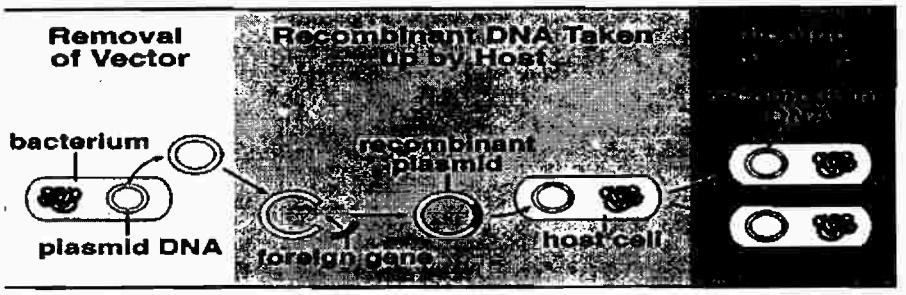
بهذه الطريقة والمسماة DNA cloning يمكن مضاعفة قطعة DNA من كائن حى عدة ملايين من المرات داخل البكتريا (شكل رقم ٦٤، ٦٥) .



شكل رقم٦٤ : شكل يوضح تكاثر الجين Gene Cloning

Sylvia S Mader, Biology, 6th edition. © 1998 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Genomic Library (1)



شكل رقم٦٤ : شكل يوضح طريقة عمل مكتبة جينية

ناقلات الكلونة :

النواقل التى تستخدم لعملية الكلونة Cloning (لإنتاج أعداد كبيرة من جزيئات الـ DNA المتماثلة أو إنتاج نسخ عديدة من جين ما) هي كائنات حية والتي تستطيع نقل المادة الوراثية من كائن حى يسمى المعطى إلي كائن حى آخر يسمى المستقبل وسوف تستمر المادة الوراثية الحية وتستطيع إظهار تأثيرها الوراثى فى الخلية المستقبلة ، فمثلا البلازميدز ، الفيروسات (مثل البكتيريوفاج للبكتيريا) تستعمل كناقلات للمادة الوراثية في البكتيريا ، الخمائر و بلازميدز البكتيريا الممرضة النباتية *Agrobacterium tumefaciens* وفيروس موزايك القرنبيط الذي يصيب النباتات وفيروس الجوزاء بالإضافة إلى فيروس موزايك الدخان تستعمل كعوامل ناقلة للمادة الوراثية في النباتات وبعض النظم الفيروسية الأخرى ، هذه العومل الناقلة قد حدث لها تطورا كناقلات لجينات النباتات المقاومة من نبات إلي آخر وأحيانا بين نباتات ليست بينها قرابة .

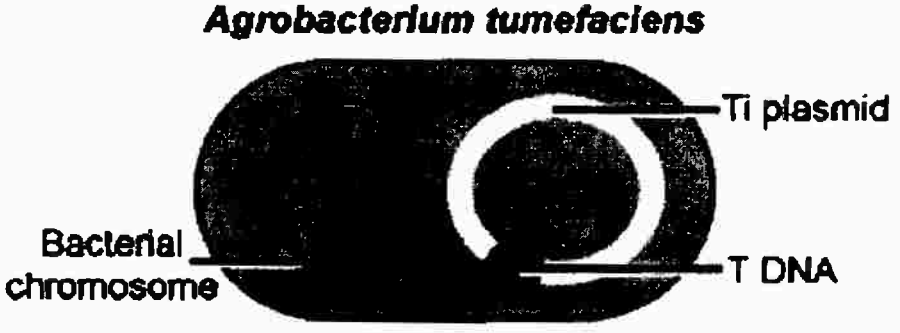
أنواع ناقلات الكلونة :

١- البلازميدات :

Plasmides

تكون البلازميدات عادة مكونه من جزئ صغير حلقى مزدوج من الـ DNA تكون وظيفته الطبيعية هى إكساب الخلية المضيفة صفة المقاومة ضد بعض

الأمراض، وللبلازميد عدة خواص تجعلها مفيدة جدا كناقلات الكلونة إذ أنها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ فى البكتريا، وتتناسخ مستقلة عن الـ DNA البكتيرى كما أن تتابع القواعد فى جزئ الـ DNA البلازميدى معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان المضبوط لنشاط القطع للأنزيم والذى يتم فيه إدخال الـ DNA المراد إضافته يكون البلازميد أصغر بكثير من كروموسوم الخلية المضيفة مما يسهل عزله. ومن أشهر البلازميدات المستخدمة فى مجال الهندسه الوراثيه بلازميد لبكتريا *Agrobacterium Tumefaciens* أو ما هو متحور عنها والذي يسمى بلازميد – Ti (شكل رقم ٦٦) .

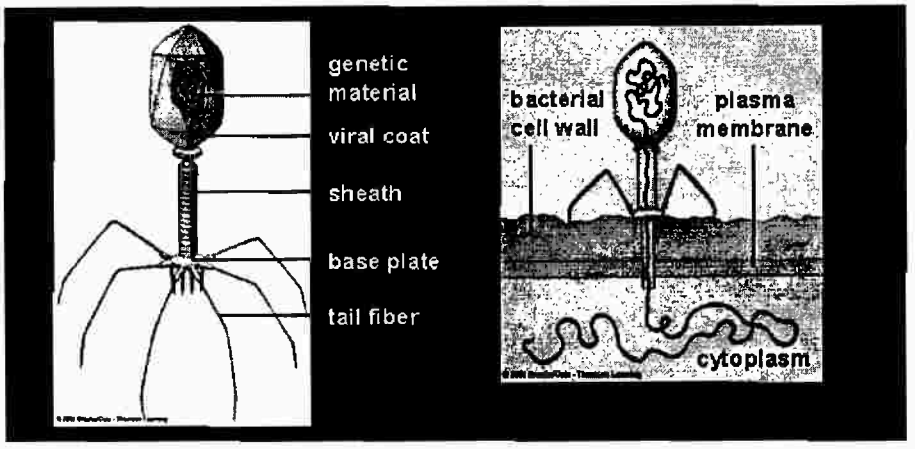


شكل رقم ٦٦ : يوضح الـ Ti - plasmid للأجروبكتيريم

٢- الفاج :

Phage

يتكون DNA الفاج من جزئ خطى من الـ DNA الذى يمكن فيه إدخال القطع المرغوبة من الـ DNA الجديد فى عدة مواقع للقطع الأنزيمى المحدد، يجمع الـ DNA الهجينى بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Lytic cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية ويتميز هذا الناقل بإستيعاب شظايا الـDNA الأجنبى بطول من ١٠-٢٠ كيلو قاعدة فى حين يستوعب البلازميد شظايا بطول ٦-١٠ كيلو قاعدة، ومن أمثلة الفيروسات فيروس موزايك القرنبيط ويوضح الرسم التركيب العام للفيروس (شكل رقم ٦٧) .

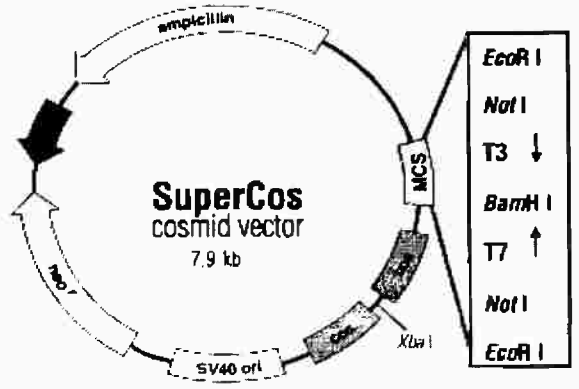


شكل رقم ٦٧ : يوضح التركيب العام للفيروس

١- الكوزميد :

Cosmid

وهى ناقلات تستقبل شظايا بطول ٢٥-٥٠ كيلو قاعدة وهى تجمع بين مميزات البلازميد والفاج وهو عياره عن بلازميد يحتوى على تتابع الموقع المسمى Cos (Cos sites)المطلوبة لتعبئة الـ DNA لامبدا فى حبيبة الفاج، وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا وحيث أن DNA اللامبدا قد يتم إستبعاده فإنه يمكن إدخال قطع أكبر من الـ DNA الكيميرى فى رأس الحبيبة الفيروسية، ومن أمثلتها super Cos cosmid vector كما هو موضح بالرسم (شكل رقم ٦٨) .



شكل رقم ٦٨ : يوضح تركيب الـ super Cos cosmid vector

الفيروسات النباتية كعوامل ناقلة :

الفيروسات من أكثر العوامل الناقلة فعالية في نقل المادة الوراثية في البكتيريا وفي الحيوانات، ويعتبر Ti بلازميد من أفضل العوامل الناقلة (إن لم يكن هو الناقل الوحيد) لجينات النبات . وتختلف العوامل الفيروسية النباتية الناقلة عن Ti بلازميد فى أنها ليست عوامل ناقلة من النوع المدمج بل من المحتمل أن تنقل جين إلي خلية النبات حيث تتضاعف إلي ملايين الأضعاف مع الفيروس ويمكن أيضا أن ينتشر الجين جهازيا خلال النبات. أن الفيروسات النباتية التى سوف تستعمل كعوامل ناقلة للجينات سوف تكون مختارة جيدا أو مهندسة بحيث أنها سوف تكون قادرة علي إصابة خلايا النبات وتضاعف نفسها هي والجين الغريب أو الجينات الغريبة التي تحملها دون أن تسبب أعراضا مرضية وخسارة في إنتاج النبات ، كل هذه الأهداف قد تحقق قدر منها وبإستمرار الأبحاث على مدى الزمن سوف تتحقق الأهداف المرجوه بإذن الله إن شاء الله .

مجموعة فيروس تبرقش القرنبيط :

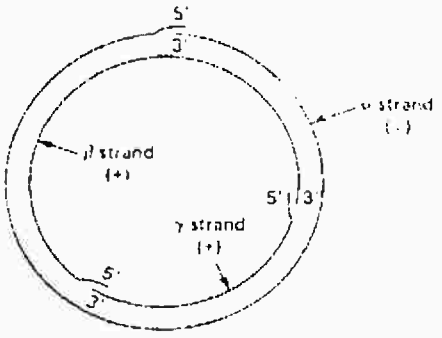
Caulimovirus group

تضم هذه المجموعة ثلاثة فيروسات وهي: Carnationetched ring virus و Dahlia mosaic virus والثالث هو فيروس موزاييك القرنبيط الممثل للمجموعة حيث يكون الحامض النووي في هذه الفيروسات من نوع الـ DNA وتكون جسيماتها متساوية الأبعاد، ويبلغ قطرها حوالي ٥٠ نانومتر، تنتقل ميكانيكيا وبواسطة عدة أنواع من حشرات المن، لا تبقى هذه الفيروسات في الحشرات الناقلة أكثر من بضعة ساعات، لها مدى عوائلي ضيق، تسبب أمراض الموزاييك والتبرقش في النباتات التي تصيبها .

إن فيروسات موزايك القرنبيط هي فيروسات تحتوى علي حمض نووي الـ DNA ثنائي الخيط دائري يتكون من ٨٠٠٠ زوج من القواعد. كل خيط من خيوط DNA له إنقطاع أو إنقطاعين يتكون هذا الإنقطاع من ٦ – ١٨ زوج قاعدي تتداخل أو تتشابك في مواقع معينة .

إن أكثر فيروسات القرنبيط والذي دُرس كناقل للجين هو فيروس موزايك القرنبيط CaMV) إن كل من الفيروس والحمض النووي DNA المعزول منه معدية ، تسبب إصابات جهازية للعائل وتنتج حوالي نصف مليون من جزيئات

الفيروس في كل خلية . مع أن الـ DNA الفيروسي ينسخ في نواة النبات فإن النسخة الناتجة تكون (mRNA) والتي تنقل إلي السيتوبلازم، فإما أن mRNA يخضع لنسخ عكسي بواسطة أنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase وينتج الخيط السالب (–) من (DNA) والذي ينتج عنه الخيط الموجب (+) DNA وكذلك الخيط المزدوج من DNA ، أو أنه يترجم إلي عديد من البروتينات (شكل رقم ٦٩) شاملة غطاء الفيروس البروتيني، والـ DNA الفيروسي لا يندمج مع المجموعة الوراثية للنبات ولا حتى ينتقل خلال البذرة .



شكل رقم ٦٩: يوضح الـ DNA في فيروس موازيك القرنبيط

فيروسات الجوزاء :

Gemini viruses

يحتوى كل زوج فيروسي من فيروسات الجوزاء(فيروسات مزدوجة)علي دائرة مفردة من الـ DNA مفرد الخيط حوالي ٢٥٠٠ قاعدة إلا أنها تنتج خيط مزدوج من الـ DNA في طور وسيط فى النواة، هذا الخيط المزدوج له القدرة لإصابة بروتوبلاست النبات ولكن عديدا من فيروسات الجوزاء لها مجموعة وراثية منقسمة تتألف من جزئين من الـ DNA ذات حجم متماثل، أن كل فيروس من فيروسات الجوزاء يتكون من تجمعين من الجزيئات المزدوجة والتي لها أغطية بروتينية متطابقة ولكن الأحماض النووية التي فيها يعنى (DNAs) تتركب من سلاسل نيكليوتيدية مختلفة التركيب، تدخل فيروسات الجوزاء في نواة النبات وتتكاثر هناك. تنتقل هذه الفيروسات في الطبيعة بواسطة نطاطات الأوراق أو الذباب الأبيض وهي فيروسات عابرة وبصعوبة (إذا حدث) أن تنتقل ميكانيكيا .فيروسات هذه المجموعة تصيب كل من نباتات أحادية وثنائية الفلقة،

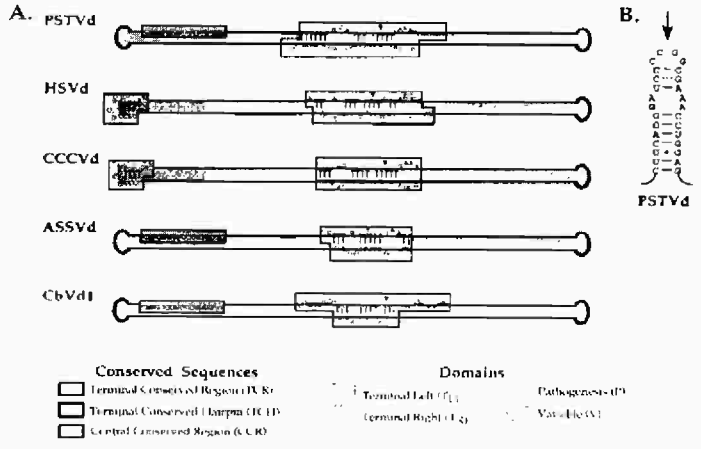
تنتقل هذه الفيروسات ميكانيكيا بالعصارة، إلا أن هناك إجراءات كثيرة قد ساعدت على زيادة تطوير وإستعمال فيروسات الجوزاء كعوامل ناقلة للجين النباتى حيث أمكن إنتاج نباتات طماطم مقاومة لفيروسات الجوزاء والتى تنتقل عن طريق الذبابة البيضاء وأظهرت النباتات المعدلة وراثيا مقاومة للفيروس تحت ظروف العدوى الصناعية داخل الصوب .

الفيرويدات :

Viroids

فيروسات بدون غلاف بروتينى وقد أطلق عليها داينر إسم Viroid لتمييزها عن الفيروسات الإعتيادية التي لها غلاف بروتيني تضم ثلاثة فيرويدات هي فيرويد درنة البطاطس المغزلية Potato spindle tuber viroid فيرويد تقزم الداودي Chrysanthemum stunt viroid فيرويد الإكسوكورتس في الحمضيات Citrus exocortis viroid تتكون هذه المسببات المرضية من حامض نووى RNA أحادي الخيط فقط ليس لها غلاف بروتينى، يتراوح وزنها الجزيئى بين ٥٠,٠٠٠ – ١٢٥,٠٠٠ دالتون، تنتقل هذه الفيرويدات ميكانيكياً، لها مدى عوائلى محدود، الفيرويدات صغيرة دائرية مفردة الخيط فيهاجزيئات الـ RNA عارية طولها ٢٠٠ – ٤٠٠ قاعدة وهي قابلة للنقل ميكانيكيا وتضاعف نفسها في نواة العائل وتصيب النبات جهازيا (شكل رقم ٧٠) .

إن بعضاً من هذه الصفات تجعلها مرشحة كعوامل ناقلة للمادة الوراثية في النبات ولكن إلى الآن لم يذكر أى منها كعامل ناقل .

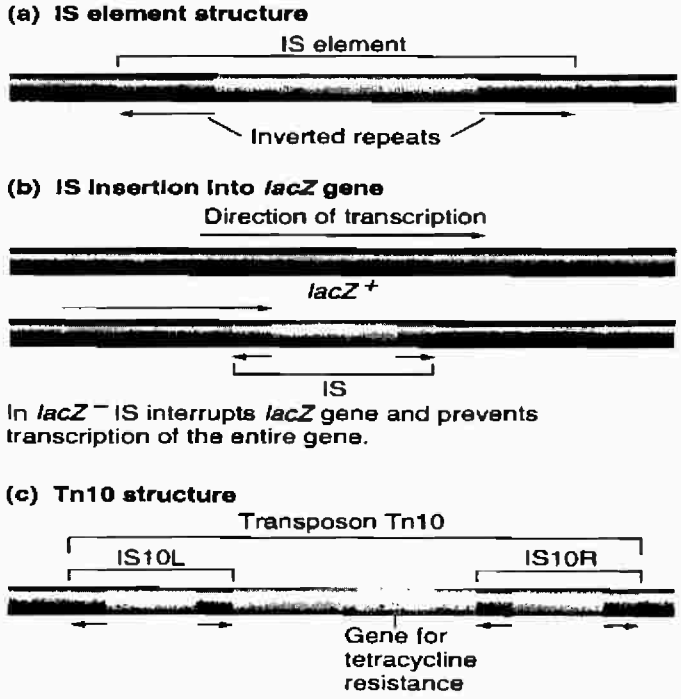


شكل رقم ٧٠ :يوضح تركيب الـRNA فى عدد من الفيرويدات

العناصر القادرة علي التنقل :

Transposable element

إن هذه العناصر هي قطعا من الـــ DNA من المحتمل أن تكـون مندمجـة في المجموعة الوراثية في كل أنواع الكائنات ، لها صفات متنوعة ولكنهـا كلهـا تشترك في صفة ، أنه يمكنها أن تتحرك دائريا (يعني أنها قادرة علي التنقل) في الوحدة الوراثية وتندمج في مواقع مختلفة، فإذا إنتقلت هذه العناصر مـن منطقـة معينة إلى منطقة أخرى أدت إلى تعطيل عمل جين معين فقدته إظهـار مفعولـه الوراثى فإنها تؤدي إلي حدوث الطفرة . يمكن عزل العنصر القادر على التنقـل و أن يزرع فى جين نباتي غريب وأن العنصر القادر علي التنقل المهجن يمكـن أن يدخل في خلايا النبات أو البروتوبلاستس حيث تستطيع أن تصبح مندمجـة فـي المجموعة الوراثية في الخلية . ولكن إلى الآن لم يذكر أنه قد أجرى في النباتات . إن العناصر القادرة علي التنقل طبعا ، يمكن إستعمالها مع النباتات أحادية الفلقـة بالإضافة إلي النباتات ثنائية الفلقة ، بينما نظام بلازميد - Ti يصيب ثنائية الفلقـة (شكل رقم ٧١) .

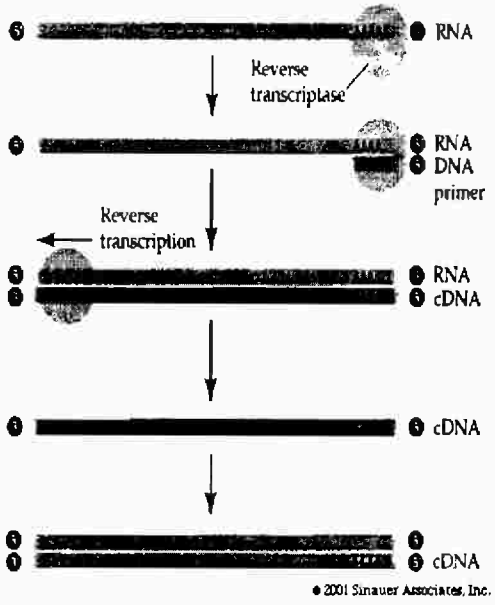


شكل رقم ٧١ : يوضح العناصر الوراثية المتنقلة

تخليق الـDNA المتمم أو المكمل لـ mRNA :

فى هذه التقنية يستخلص الـــmRNA الخاص بجين معين فى مرحلة معينة من نمو الخلية حيث يكون الجين أكثر نشاطاً مثل الجين المسئول عن تكوين التوكسين الذى ينتجه الكائن الممرض أوالجين المسئول عـــن تكـــوين الـــــ Phytoalexsans الفايتوالكسانات التى تنتج بواسطة العائل . هذا الـــ mRNA المستخلص سواء مـــن الكائن الممرض أو العائل يعاد نسخه بأنزيم النسخ العكسى reverse transcriptase لتبنى خيط مفرد من الـــ DNA يسمى الـــ cDNA ثم تهضم سلسلة الـــــ mRNA ثم يستخدم أنزيم آخرلبناء سلسلة أخـــرى للـــــ DNA (بواســـطة أنـــزيم DNA polymerase) والذى يجعلهـــا ثنائيـــة الخـــيط cDNAs . كمـــا هـــو موضـــح بالرسم(شكل رقم ٧٢) حيث يتم بعد ذلك أخذ هذه الخيـــوط المزدوجـــة المكملـــة للـــmRNA والتى تماثل التتابع المشفر من الجين وتحميلها على بلازميد أو ناقـــل خاص والذى عادة ما يحمل جزيئ واحداً من (cDNAs) .

ويجب علينا أن نلاحظ هنا أن البلازميدات المستعملة تحمل جينات قد تكـــون للمقاومة للمضادات الحيوية أو أى جينات أخرى هذه البلازميدات يتم بعـــد ذلـــك ببكتيريا الـــ *E-coli* والتى تستقبل البلازميدات هذا يعنى أن البكتريا تصبح محولة وراثياً Transformed .

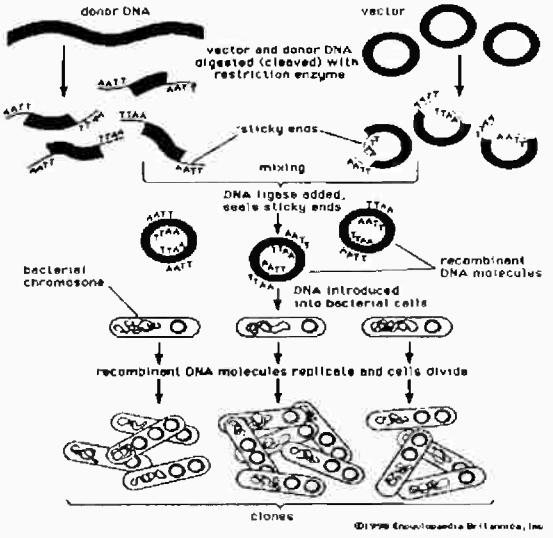


شكل رقم ٧٢: يوضح طريقة نسخ DNA من على RNA بإستخدام إنزيم النسخ العكسى

بعد ذلك يتم إنتخاب المستعمرات البكتيرية التى تحتوى الجين موضوع الدراسة ويتم إكثارها لتنتج كميات كبيرة كافية من الجين المطلوب أو من منتجاته البروتينية بعدئذ تستعمل المستعمرة البكتيرية لدراسات أخرى مستفيضة متضمنة عزل الجين ونقله .

عزل وإكثار جينات المجموعة الوراثية لكائن :

لعزل وإكثار جينات مرغوبة من المجموعة الوراثية لكائن يتم عزل خلايا مناسبة وإستخلاص الـ DNA منها والذى غالبيته تكون من النواة بالإضافة لـDNA من البلاستيدات والميتوكندريا وذلك بواسطة محاليل إنزيمية متخصصة يمكنها أيضاً عزل كل نوع من الـ DNA على حدا ثم ينقى الـ DNA ليتم بعد ذلك هضمه جزئياً بأحد إنزيمات القطع المحددة Restriction enzyme ليعطى قطعاً من الـ DNA قد تصل أحجامها إلى حوالى ٢٠٠٠٠ زوج من النيوكليوتيدات ، تؤخذ هذه القطع من الـ DNA وتخلط مع ناقل مناسب مثل البلازميد البكتيرى أو مجموعات وراثية محورة خاصة مثل الفاج البكتيرى Bacteriophage lambda حيث تؤخذ قطع الـ DNA بواسطة البلازميد أو بواسطة جينوم البكتريوفاج فى وجود أنزيم الـDNA ligase الذى يعمل على لحم النهايات اللزجة لقطع الـ DNA مع الناقل ليتم إكاثرها لتعطى نسخ عديدة من الجينات المختلفة للكائن (شكل رقم (٧٣). ليتم بذلك عمل المكتبة الجينية للكائن .



شكل رقم ٧٣ : يوضح إكثار الجينات من المجموعة الوراثية ال DNA

أهمية التكنولوجيا الحيوية فى أمراض النبات :

بدأت إنطلاقة التكنولوجيا الحيوية عن طريق بلازميد Ti الحامل لتتابع الـT-DNA المحدث للورم فى بكتيريا التدرن التاجى *Agrobacterium Tumefaciens* ثم بعد ذلك فيروس موازيك القرنبيط والفيروسات الأخرى والأنظمة الشبيهة بالفيروس .أصبح للتكنولوجيا الحيوية فضل كبير فى معرفة بعض جينات الشدة المرضية أو التثبيط فإذا حدث و أصبحت الجينات معروفة ومتوفرة لدينا عندها يمكن نقلها إلى كائنات حية دقيقة مضادة للكائنات الممرضة التى عندئذ يمكن إستعمالها على سطوح النبات لوقاية النباتات من الكائنات الممرضة .

بجانب دراسة جينات الشدة فى الكائنات الممرضة فإن معرفة طبيعة السلوك الوراثى لجينات العائل لمقاومة المرض عندما يكون من المحتمل إنتاج نسبة كبيرة من النباتات المقاومة لأمراض النبات بإستخدام التكنولوجيا الحيوية. فإن التوقعات والآمال بإذن الله كبيرة فى إستخدام التكنولوجيا الحيوية فى إنتاج نباتات مقاومة للمرض.

الخلاصة :

تعرف التكنولوجيا الحيوية فى الإصطلاحات الحديثة بأنها المعالجة بالوسائل الميكانيكية والتحورات الوراثية ومضاعفة الكائنات الحية خلال طرق حديثة مثل مزارع الأنسجة والهندسة الوراثية مؤدية إلى إنتاج كائنات جديدة أو محسنة أو منتجات يمكن إستعمالها بطرق مختلفة .

الطرق المستخدمة فى زراعة الأنسجة هى :

أولا- مزرعة الكالس والخلايا المفردة، القمة المرستيمية ومزارع الإكثار الدقيق

ثانيا- تنمية أو زراعة البروتوبلاستس ثم يعامل البروتوبلاست بالطرق الاتية :

١. حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيرس .

٢. حقن البروتوبلاست بنواقل مهندسة وراثيا .

٣. إختيار النباتات المشتقة من البروتوبلاست المقاومة للإصابة المرضية والمقاومة لتوكسينات الكائن الممرض .

٤. حقن البروتوبلاست المصاب بالفيروس بمواد مضادة للفيروس .

٥. نقل جين المقاومة إلي االنباتات الغير متوافقة جنسيا .

ثالثا- أهمية مزارع المتوك فى إنتاج نباتات أحاديةالمجموعة الكروموسومية :

لأن خلايا الأنسجة أحادية المجموعة الكروموسومية كثيراً ما تتضاعف ذاتياً أو يمكن أن تُستحث على أن تتضاعف وذلك بمعاملتها بالكولشيسين والكيماويات الأخرى فيمكن الحصول على أنسجة متضاعفة المجموعة الكروموسومية والحصول على نباتات متماثلة ثنائية المجموعة الكروموسومية لجميع الجينات وتكون هذه االنبات الثنائيه مفيدة لدراسة تفاعل مثل هذه النباتات لبعض الكائنات الممرضة .

فى السنوات العشر الماضية حدث تطور هائل فى تطبيقات الهندسة الوراثية والتي أمكن بواسطتها إنتاج ، هرمونات النمو واللقاحات المضادة للفيروسات Vaccines بواسطة بكتريا الأمعاء Escherichia coli وخلايا الخميرة حيث تستخدم عوامل لنقل الجين المرغوب من كائن إلى آخر بواسطة البلازميد والفاج والكوزميد والفيرويدات والعناصر المتنقلة بإستخدام أنزيمات القطع والإلتحام .

الأسئلة :

١. عرف كل من زراعة االأنسجة والهندسة الوراثية .؟

٢. ماهى طرق زراعة الأنسجة وما هى أنسب طريقة للحصول على نباتات مقاومة ؟

٣. عرف الهندسة الوراثية وما أهميتها للحصول على نبات مقاوم ؟

٤. ماهى ناقلات الكلونة، وكيف يتم نقل الجين خلالها ؟

٥. عرف Tiبلازميد وفيروس موزايك القرنبيط ؟

أجب بنعم أولا :

أ- زراعة الأنسجة هى زراعة أجزاء نباتية بغرض الحصول على نبات متماثل وراثيا .

ب- النباتات المحولة وراثيا تُظهر عدم ثبات كبير تحت ظروف بيئية معينة .

ت- إندماج البروتوبلاست يؤدى الى العقم فى كل الحالات .

ث- مزارع المتوك سببا فى الحصول على نباتات ثنائية متماثلة .

ج- تستخدم أنزيمات محددة لقطع DNA وهى نفس الإنزيمات للصق .

ح- من أشهر البلازميدات هو بلازميد Agrobacterium .

خ- تكاثر الجين هو cDNA .

د- يمكن تكوين DNA من mRNA .

الفصل الثالث

المحتوى البلازميدي للأجروبكتيريم وعلاقته بالمقدرة المرضية

الأهـــداف : بنهاية هذا الفصل ينبغي أن يكون المتخصص فى علم الوراثة وبرنامج أمراض النبات قادرا على أن :

١- يعرف ما هى الأجروباكتيريم ومحتواها البلازميدي وما تسببه مـــن أمـــراض للنبات وعلاقة قدرتها المرضية بمحتواها البلازميدي .

٢- يستوعب كيف تسبب الأجروباكتيريم مرض التدرن التاجي فى النبات وكيـــف يمكن استخدامها فى نقل الجينات إلى النباتات لهندسة المحاصيل الحقلية وراثيا.

٣- يعرف الفروق الرئيسية بين الأجروباكتيريم والرايزوبيم على أساس المحتـــوى البلازميدي لكل منهم كونهم كائنات تتبع نفس العائلة .

٤- يستوعب دور الهندســـة الوراثيـــة فـــي تطـــور طـــرق المكافحـــة الحيويـــة للأجروباكتيريم من خلال استخدام طرق الهندسة الوراثية في إستئصال منطقـــة Transfer region (Tra) والتى لها علاقـــة بتحريـــك agrocin plasmid لإنتـــاج طافرات من السلالة K84 وهى السلالة *A. radiobacter K1026* .

٥- يفهم أهمية استخدام السلالات المهندسة وراثيّاً حالياً فى أســـتراليا بـــدلاً مـــن السلالة K84 فى برامج المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم .

٦- يعي دور السلالة K1026 كأول سلالة تتم هندستها وراثيّـــاً اســـتخدمت فـــى المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم ، علما بأنها تطابق فى كل الصـــفات جميـــع السلالات الطبيعية الأخرى منها والتى تنتمى لنفس السلالة.

٧- يستوعب أهمية منطقة T-DNA الموجودة فـــى Ti- plasmid فـــي اســـتخدام الأجروباكتيريم *A. tumefaciens* فى برامج الهندسة الوراثيـــة كـــون منطقـــة T-DNA تنفصل عن البلازميد وتلتحم بجينوم الخلية النباتية عندما تحدث لهـــا إصابة بالأجروباكتيريم .

٨- يفهم أن أى جزىء DNA غريب يتم التحامه بمنطقة T-DNA فإنه سوف يحدث له التحام بجينوم الخلية النباتية إذا ماأصيبت بالأجروباكتيريم.

٩- يعي اكتشاف العالم Kerr لنظام المكافحة البيولوجية للـ A. tumefaciens من خلال عزل السلالات غير الممرضة من *Agrobacterium radiobacter* وهي السلالة strain K84 والتى عملت على الوقاية من الإصابة ومن المرض بشكل تام عندما أضيفت للمواقع المجروحة بمعدل ١ : ١ منسوبة لخلايا *A. tumefaciens* .

١٠- يوضح أن سلالات *A. radiobacter* strain K84 هى السلالات التى تم اكتشافها وتكوينها بواسطة Allan Kerr فى استراليا ، والتى قد تم استخدامها فى أستراليا منذ عام ١٩٧٣ كأول سلالة استخدمت فى المكافة البيولوجية على النطاق التجارى لأى مرض نباتى .

مقدمة :

ينشأ عن الأجروباكتيريم *Agrobacterium tumefaciens* مرض التدرن التاجى فى مدى واسع من النباتات ذوات الفلقتين ، خاصة تلك التى تتبع العائلة الوردية مثل التفاح ، الكمثرى ، الخوخ ، الكريز (القراسيا) ، اللوز ، التوت ، الورد. وهذه السلالة من الأجروباكتيريم يتبعها ثلاثة أنواع تسبب مرض التدرن التاجى للعنب . وقد أخذ اسم المرض الذى تسببه الأجروباكتيريم من النمو السرطانى الكبير الذى يحدث فى منطقة التاج للنبات ويسبب عادة أضراراً كبيرة للنباتات القديمة فى العمر ، وهذا المرض من أكثر الأمراض المعروفة لعلاماته البيولوجية الواضحة التى تشاهد على النباتات . وعلى هذا الأساس فإن هذه البكتيريا تقوم بنقل جزء من محتواها من DNA إلى النبات ، وهذا الـ DNA يحدث له اندماج مع جينوم الخلايا النباتية مسبباً نشأة التورمات والتى عادة ما يصاحبها تغيير فى ميتابولزم الخلايا النباتية ، والأشكال التالية توضح أعراض هذا المرض على النبات والشكل الميكروسكوبى لخلايا الأجروباكتيريم (شكل رقم ٧٠، ٧١) .

شكل رقم ٧٤ . يوضح الشكل الميكروسكوبى لخلايا الأجروباكتيريم

شكل رقم ٧٤ . يوضح مرض التدرن التاجى الذى تسببه الأجروبكتيريم

ولذلك فإن طبيعة هذه البكتريا تمكننا من استخدامها فى مجال تربية النبات لنقل الجينات إلى النباتات ، وبذلك فإن الجينات المراد نقلها للنبات مثل الجينات المنتجة للمواد البروتينية السامة المضادة للحشرات (Insecticidal toxin genes) الموجودة فى الباسيلس ثيرونجنسز أو جينات المقاومة للحشائش ، يمكن إدخالها فى DNA البكتيرى للأجروباكتيريم الأمر الذى يتيح إمكانية حقنها داخل جينوم النبات . ولذا فإن استخدام الأجروباكتيريم ليس قاصراً فقط على عمليات تربية النبات بل أيضاً يمكن استخدامها فى نقل الجينات غير النباتية لهندسة المحاصيل الحقلية وراثياً . وهذه النظرية جعلت من الأجروباكتيريم واحداً من أكثر الاهتمامات فى الدراسات التفصيلية فى مجال التكنولوجيا الحيوية ، وبذلك فالمرض الذى تسببه الأجروباكتيريم يمكن مكافحته بيولوجيا بكفاءة عالية جداً . حيث توجد ثلاثة اعتبارات رئيسية لهذا المرض اللعين المسمى بمرض التدرن التاجى والذى تكمن أخطاره بشدة مع النباتات القديمة فى العمر ، وهذه الاعتبارات هى :

١- بيولوجية هذه البكتيريا وعمليات إصابتها للنبات .

٢- تكوين أنظمة مكافحة بيولوجية ناجحة جداً ضد مرض التدرن التاجى .

٣- الاستخدام الواسع للأجروباكتيريم كأداه فى مجال الهندسة الوراثية للنبات .

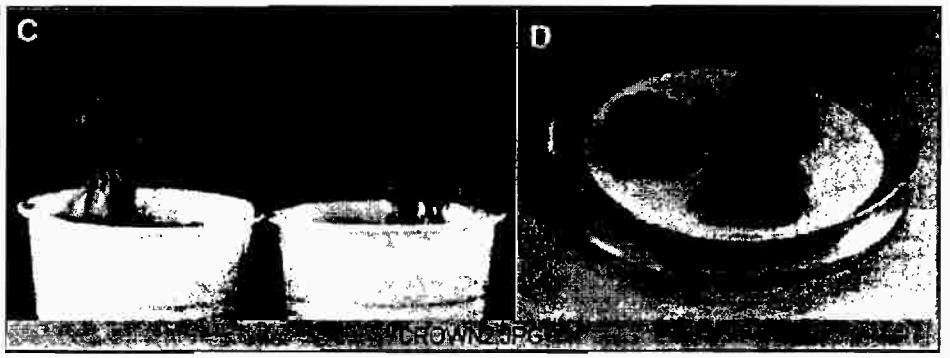
الأجروباكتيريم ومحتواها البلازميدى :

الأجروباكتيريم *A. tumefaciens* هى من الكائنات الدقيقة السالبة لصبغة جرام، ولا تكون جراثيم ، شكلها عصوى ، قريبة جداً من الرايزوبيوم التى تكوّن عقداً يتم فيها تثبيت النيتروجين الجوى على البرسيم والنباتات البقولية الأخرى. وتقسم سلالات الأجروباكتيريم إلى ثلاث مجموعات على أساس تمثيلها لمصادر مختلفة من الكربوهيدرات . الإختبارات البيوكيماوية الأخرى والاختلافات بين هذه المجاميع الثلاثة Biovars يتم تحديدها بواسطة الجينات المحمولة على الكروموسوم البكتيرى الدائرى . وهذه الاختلافات لا يتم تحديدها من خلال الأعراض المرضية للأجروباكتيريم ، فمعظم الجينات الموجودة فى منطقة التدرن التاجى ليست محمولة على كروموسوم الأجروباكتيريم بل تحمل على بلازميد كبير الحجم يسمى بالـ Ti-plasmid (inducing plasmid – Tumor) ، بينما معظم الجينات التى تمكن سلالات الرايزوبيا من تكوين عقد جذرية يتم بها تثبيت النيتروجين توجد أيضا على بلازميد كبير يسمى Symbiotic (Sym) plasmid .

لذلك فإن التصنيف البيولوجى لهذه البكتيريا يعتمد أساساً على البلازميدات وليس على الكروموسوم البكتيرى٠ وهنا نود توضيح أن البلازميد هو عبارة عن حلزون حلقى من DNA يوجد منفصلاً عن الكروموسوم البكتيرى وله القدرة على التضاعف مستقلاً عن الكروموسوم الرئيسى للخلية وله القدرة على أن ينتقل من خلية بكتيرية لأخرى بواسطة التزاوج٠ والبلازميدات تقوم بالتعبير عن وظائف غير هامة لحياة الخلية فى الغالب ، وفى هذه الحالة فإن الخلايا البكتيرية تستطيع أن تنمو فى الأوساط البيئية العادية حتى إذا فقدت بلازميداتها٠ ويمكن ملاحظة الدور الرئيسى للبلازميدات فى الخلايا البكتيرية بواسطة استئصالها من السلالات ، وفى هذه الحالة إذا كانت البكتيريا نموها يقترب من النمو عند أقصى درجة حرارة وهى حوالى ٣٠ °م بالنسبة للأجروباكتيريم والرايزوبيوم فإن هذا يعنى حينئذ فقد البلازميد ، وأن المقدرة المرضية فى حالة الأجروباكتيريم والمقدرة على تكوين العقد الجذرية فى حالة الرايزوبيوم قد فقدا٠ ومع ذلك فإن عملية فقد البلازميد لم تؤثر على نمو البكتيريا فى المزارع حيث إن الخلايا البكتيرية الخالية من البلازميدات تعتبر خلايا نشطة من الناحية الوظيفية . وتسبب عملية إدخال Ti-plasmid فى خلايا الرايزوبيوم تكوين تورمات ، بينما تسبب عملية إدخال Sym plasmid فى الأجروباكتيريم تكوين ما يشبه العقد من الناحية التركيبية ولكنها غير فعالة من الناحية الوظيفية .

عملية الإصابة بالأجروبا كتيريم :

توجد الأجروباكتيريم بشكل عام فى المنطقة المحيطة بسطح الجذور والتى تسمى بمنطقة الريزوسفير حيث تعيش فى تلك المنطقة مستخدمة العناصر الغذائية التى تسيل أو تتسرب من أنسجة الجذور ، ولكنها لا تستطيع إحداث الإصابة إلا من خلال الأماكن المجروحة سواء طبيعيّاً أو تلك الناتجة عن العمليات الزراعية المختلفة٠ وعلى سبيل المثال إذا وضع على ساق نباتين متقدمين فى العمر من الطماطم معلق من خلايا الأجروباكتيريم *A. tumefaciens* وقد تم عمل جرح فى هذه المنطقة فإنه بعد خمسة أسابيع سوف تظهر النموات السرطانية ، أما إذا وضع معلق من خلايا الأجروباكتيريم على سطح القطع الدائرية الطازجة المقطوعة من الجزر فى أطباق معملية كما هو موضح فى الشكل التالى (شكل رقم ٧٥) فإنه وبعد حوالى أسبوعين سوف تتكون نموات من الأنسجة الميرستيمية تحيط بالنظام الوعائى المركزى٠



شكل رقم ٧٥ . يوضح أنه إذا وضع معلق من خلايا الأجروباكتيريم على سطح القطع الدائرية الطازجة المقطوعة من الجزر فإنه بعد حوالى أسبوعين سوف تتكون نموات من الأنسجة الميرستيمية تحيط بالنظام الوعائى المركزى (يمين الشكل) ، وظهور النموات السرطانية بعد خمسة أسابيع من العدوي لساق نباتين من الطماطم متقدمين فى العمر وضع عليهما معلق من خلايا الأجروباكتيريم *A. tumefaciens* بعد عمل جرح فى هذه المنطقة (يسار الشكل)

وتحت الظروف الطبيعية تنجذب خلايا الأجروباكتيريم للمناطق المجروحة ، وهذا جزء من استجابة الخلايا للسكريات المتحررة ونواتج الجذور بوجه عام . وهذه الخاصية توجد حتى فى الخلايا البكتيرية المتحررة من البلازميدات والتى فقدت بلازميداتها. بينما الخلايا البكتيرية المحتوية على Ti plasmid تستجيب لهذه الظروف بشدة أكبر. وهذا لأنها تتعرف على المركبات الفينولية فى المناطق المجروحة مثل Acetosyringone حيث تنجذب إليها بسرعة عند التركيزات المنخفضة منها والتى تصل إلى $١٠^{-٧}$ مولر Molar ، وذلك لأن Ti plasmid يعبر عن وظائف إضافية بالخلايا تتعلق بمستقبلات خاصة Specific chemotactic receptors توجد بداخل الغشاء البكتيرى وتمكن الخلايا البكتيرية من التعرف علي المناطق المجروحة ، حيث تلعب المركبات الفينولية مثل Acetosyringone دوراً رئيسيا فى عملية الإصابة ؛ لأنه عند التركيزات العالية التى تتراوح مابين $١٠^{-٥}$ إلى $١٠^{-٤}$ مولر يحدث تنشيط لجينات الإصابة Vir genes (Virulence genes) الموجودة على Ti plasmid والتى بدورها تحفز من عملية الإصابة للنباتات وخاصة أنها تعمل على ما يلى :

١- تؤدى إلى إنتاج البروتينات مثل Permeases والتى تدخل فى غشاء الخلايا البكتيرية لتعمل على التقاطها للمركبات المزعومة (Opines) والتى سوف يتم إنتاجها بواسطة النموات السرطانية النباتية .

٢- تسبب إنتاج إنزيم Endonuclease وهو أحد إنزيمات القطع والذى يعمل على قطع منطقة T-DNA (Transferred DNA) من Ti-plasmid.

وكما هو معروف أن جزء DNA المثار أو المهيج وهو منطقة T-DNA تتحرر من خلايا الأجروباكتيريم وتدخل فى الخلية النباتية حيث تندمج مع كروموسومات الخلية النباتية وتسيطر على وظائف تلك الخلايا ، ولازالت الميكانيكية الحقيقية لانتقال DNA غير واضحة ، ولكن يستلزمها ظروفاً خاصة ، فربما تتحدد بواسطة إنتاج الأجروباكتيريم للـ Cytokinins (وهى هرمونات نباتية) ، حيث يشفر جين Transzeatin (Tzs) الموجود على Ti-plasmid إلى الهرمون .

ومن المهم هنا أن نلاحظ أن جزئاً صغيراً من البلازميد وهو T-DNA هو الذى يدخل للخلية النباتية ، أما باقى البلازميد فإنه يستمر وجوده فى الخلية البكتيرية ليقوم بأدوار أخرى ، وعندما يندمج هذا الجزء فى جينوم الخلية النباتية فإن الجينات الموجودة على منطقة T-DNA تشفر إلى :

- إنتاج السيتوكينينات Cytokinins .
- إنتاج Indoleacetic acid .
- تخليق وتحرر نواتج عمليات التمثيل الغذائى الجديدة فى النبات وهى Opines، Agrocinopines .

والسؤال الآن هو : ما هى التغيرات الوراثية التى تحدث بين البكتريا فى الظروف الطبيعية ؟

عندما يتم عزل البكتريا من على سطح جذور النباتات فى الطبيعة أو من بيئة المحاصيل الحقلية المنزرعة نجد أن معظم السلالات (حوالى ٩٠% أو أكثر) غير مرضية حتى إذا تم عزلها من النباتات المصابة. هذه السلالات غير المرضية تنتمى للـ *Agrobacterium radiobacter* ، ولذلك فإنه يمكن لنا أن نستنتج أن الأجروباكتيريم تقطن بالضرورة منطقة الريزوسفير وأن نسبة بسيطة منها هى المرضية وهى تلك التى تحتوى على Ti-plasmid. وعلى نفس المنوال فإن ما يشبه ذلك هى سلالات الرايزوبيوم التى تعزل من منطقة الجذر ولها المقدرة على تكوين عقد جذرية على النباتات .

وعلى العموم فإن الأجروباكتيريم توجد أساساً فى منطقة الريزوسفير وذلك لأن السلالات الممرضة من الأجروباكتيريم تستجيب بسرعة للمناطق المجروحة فى حالة وجود عشائر ثابتة من الأجروباكتيريم تقطن منطقة الجذر. ونظرا لأن Ti-plasmid هو Conjugative plasmid فإنه يمكن له أن ينتقل من خلية لأخرى . وتحت الظروف المعملية فإن انتقال هذا البلازميد من خلال التزاوج يتم تنظيمه بشدة من خلال وجود nopaline ؛ ولذا فإنه من الواضح أن السلالة الممرضة من الأجروباكتيريم تخلق الظروف المناسبة وهى إنتاج nopaline من الأماكن المجروحة المصابة والتى تمكنها من انتقال محتواها البلازميدى لسلالات أخرى فى منطقة الريزوسفير .

المكافحة البيولوجية لمرض التدرن التاجى :

نود هنا الإشارة إلى أن مكافحة الأمراض البكتيرية أمر فى غاية الصعوبة وذلك لنقص الكيماويات الفعالة فى هذا الإطار. كما أنه يمكن استخدام المضادات الحيوية إلا أنها غالية الثمن ، وعلى العموم فإن أى مركبات متاحة لعلاج الإنسان لا يمكن إباحتها للاستخدام فى مجال الزراعة . فمعظم الخيارات الفعالة هى استخدام مركبات النحاس والتى تعتبر ذا كفاءة فعالة ضد الفطريات Phytotoxic. بينما سلالات الأجروباكتيريم من النوع nopaline-producing strains of *A. tumefaciens* تعتبر ذو كفاءة عالية جداً فى نظام المكافحة البيولوجية وهى السلالات التى تم اكتشافها وتكوينها بواسطة Allan Kerr فى أستراليا والتى قد تم استخدامها فى أستراليا منذ عام ١٩٧٣ وتعتبر هى أول سلالة مستخدمة فى المكافحة البيولوجية على النطاق التجارى لأى مرض نباتى. وقد تم استخدامها الآن على نطاق واسع فى العالم بواسطة العديد من الشركات تحت مسميات عديدة منها Galltrol .

وقد اكتشف العالم Kerr هذا النظام فى المكافحة البيولوجية بواسطة عزل السلالات غير الممرضة من *Agrobacterium radiobacter* من المواقع المصابة واختبار قدرتها التنافسية مع السلالات الممرضة فى خليط من لقاحات كلتا السلالتين، فوجد أن العديد من السلالات غير الممرضة عملت على انخفاض معدل الإصابة ، بينما سلالة واحدة فقط بصفة خاصة وهى *A. radiobacter strain K84* عملت على الوقاية من الإصابة والمرض بشكل تام عندما أضيفت للمواقع المجروحة بمعدل ١ : ١ منسوبة لخلايا *A. tumefaciens*. وهذه السلالة من

الأجروباكتيريم المستخدمة فى المكافحة الحيوية تعتبر واحدة من السلالات المسجلة فى هذا النظام الحيوى. ويتم تداولها على بيئة الأجار أو فى Peat substrate ، والتى بدورها يمكن استخدامها من خلال عمل معلق منها فى الماء ، ثم توضع فيه البذور ويجرى جرح البذور أو المادة الحية فى هذا المعلق قبل الزراعة ، حيث يأخذ من هنا العلاج الواقى من الإصابة ؛ ولذا يجب استخدام المعلق بكثافة عالية جداً لحماية أى مواقع مجروحة ضد المسببات المرضية .

طبيعة فعل السلالة المستخدمة فى المكافحة البيولوجية

A. radiobacter strain K84 :

اتضح من الدراسات المعملية أن أعلى كفاءة فى المكافحة البيولوجية للأجروباكتيريم كانت بواسطة سلالات *A. radiobacter* strain k84 مقارنة بالسلالات الأخرى ، وهذا يرجع لإنتاج هذه السلالة لمادة مثبطة فى المزارع المعملية. فلقد وجد أن سلالات الأجروباكتيريم التى يحدث لها تثبيط فى تجارب الأطباق المعملية هى سلالات *A. tumefaciens* المحتوية على nopaline-type Ti plasmid ، وقد وجد أن هذه السلالات فقط هى التى يتم السيطرة عليها بيولوجيا بكفاءة بواسطة سلالة الأجروباكتيريم K84 فى اختبارات النباتات. ولسوء الحظ ، فإن السلالات التى تقوم بتمثيل nopaline هى السلالات المرضية بوجه عام فى العديد من المواقع الزراعية والبستانية. أما السلالات المرضية المحتوية على البلازميدات من النوع octopine-agropine type لا يحدث لها تثبيط ولا حتى بالسلالات غير المتعلقة أو تنتمى لجنس البكتريا .

وعلى العموم فإن المضادات الحيوية ذات المدى الواسع لها طبيعة فعل مماثلة لمركبات Bacteriocins التى تنتجها العديد من السلالات البكتيرية مثل *E. coli*. بينما الذى لا يشبه معظم Bacteriocins هى التى تكون bacteriocin, proteinaceous المنتجين بواسطة السلالة K84 والتى وجد أن لهما نفس التركيب وتسمى بالـ agrocin 84 ، حيث توجد بهذا المركب نيوكلتيدة أدنين مع مجموعتين سكر ومجموعة فوسفات ترتبط بذرة الكربون رقم ٦ بالإضافة إلى Methylated pentanamide .

تحتوى السلالتين الممرضتين ٥٢٩ ، T57 على Ti plasmid والذى يقوم بإنتاج nopaline ويتم مكافحتهم بيولوجيا بواسطة السلالة K84 ، بينما تحتوى السلالتين ٥٠٢ ، ٨١٥٠ على Ti plasmid والذى يقوم بإنتاج Opines أخرى ولا يمكن مكافحتهما بيولوجيا بواسطة السلالة K84 .

ويتم توضيح السمية الانتخابية للـ agrocin 84 بالنسبة للسلالات المنتجة للنوبالين nopaline producing strains من خلال ما تسببه هذه السلالات نحو قيام النبات بإنتاج Agrocinopines ، قيام Ti plasmid بتشفير إنتاج Agrocinopine permease لتقوم بالتقاط هذه العناصر الغذائية ، حيث يتم التقاط Agrocin 84 من خلال هذا الـ Permease (والذى يتعرف على مجموعة السكر ، ويقوم بقفل نظام تخليق DNA فى هذا المسبب المرضى) .

تطور عملية المكافحة الحيوية ومشاكلها :

تعتبر سلالة *A. radiobacter* strain K84 فى الغالب من أفضل السلالات التى يمكن استخدامها فى المكافحة الحيوية ، فإذا حاولنا إيجاد وسيلة للمكافحة الحيوية للأجروباكتيريم فإن هذه السلالة سوف تكون أفضل السلالات فى هذا البرنامج ، وتحتوى هذه السلالة على البلازميد المسمى pAg K84 والذى يقوم بتشفير إنتاج agrocin 84 ، كما تحتوى أيضا على بلازميد اخر وهو pNOC والذى يقوم بتشفير إنتاج التقاط وهدم nopaline . ولذلك فإنه تحت الظروف الطبيعية ربما تفضل السلالة K84 التواجد فى المناطق التاجية حيث إن هذه المناطق تعتبر مصدر للعناصر الغذائية مثل Opines ، ولذا تعمل تلك السلالة على قتل المسبب المرضى بواسطة إنتاجها للـ agrocin84 ، وبالإضافة لهذه النقاط نجد أن السلالة K84 تعتبر ذات كفاءة عالية جداً فى تكوين مستعمرات على جذور النباتات السليمة وعلى المناطق المجروحة معطية على الأقل بعض درجات المقاومة التى تبقى فى المكان بعد تطبيق استخدامه . ولذلك فإن كفاءة هذه السلالات فى تكوين المستعمرات والبقاء على الجذور يتحكم فيها على الأقل بعض الجينات المحمولة على الكروموسومات .

أوضحت دراسات عديدة أن انتقال agrocin plasmid (pAg K84) لسلالات أخرى من *A. radiobacter* يترتب عليه أن تصبح كفاءة هذه السلالات ضعيفة مقارنة بالسلالة K84. ومن أحد المشاكل التى تواجه استمرار النجاح لنظام

المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم ، هى انتقال agrocin plasmid من الناحية النظرية لخلايا أخرى متضمنة خلايا السلالات الممرضة. وقد لوحظ ذلك تحت الظروف المعملية ، وإذا حدث هذا فى الطبيعة فإنه سوف يتسبب فى أن تصبح السلالات المرضية مقاومة للـ agrocin-84 ، وذلك علماً بأن كل الكائنات التى تنتج مثبطات تتسبب بالضرورة فى أن تصبح هذه السلالات فى الغالب مقاومة لتأثير مثل هذه المثبطات. وقد اتضح أن agrocin plasmid ليس له علاقة بالتزاوج ولكن بلازميد pNOC والذى يوجد فى السلالة التى تستخدم فى المكافحة الحيوية هو بلازميد له علاقة بالتزاوج حيث يستطيع تحريك agrocin plasmid خلال عملية التزاوج مما يؤدي إلى انتقال المادة الوراثية بين السلالات .

يعمل وجود nopaline على تعزيز تكرار عملية انتقال المادة الوراثية. ولتجنب المشاكل التى تؤثر على المكافحة الحيوية فإنه يمكن باستخدام طرق الهندسة الوراثية استئصال منطقة Transfer region (Tra) والتى لها علاقة بتحريك agrocin plasmid لإنتاج طافرات من السلالة K84 هى السلالة *A. radiobacter* K1026 و تسمى Transfer deleted - Tra . وقد استخدمت هذه السلالات المهندسة وراثياً حالياً فى أستراليا بدلاً من السلالة K84 . واتضح أن هذه السلالات المهندسة وراثياً لها كل مميزات وأمان السلالة K84 والتى يمكن إضافتها دائما للتربة فى برنامج المكافحة البيولوجية. وهنا أود أن أشير إلى أن السلالة K1026 هى أول سلالة تم هندستها وراثياً واستخدمت فى البيئة وهى آمنة بالنسبة لكل من الإنسان والحيوانات الأخرى (التى لا تستطيع الحياة عند ٣٧ °م) والنبات ، وفيما عدا استئصال الجزء من الجينوم الخاص بها إلا أنها تطابق فى كل الصفات جميع السلالات الطبيعية الأخرى منها والتى تنتمى لنفس السلالة .

الهندسة الوراثية للنباتات باستخدام الأجروباكتيريم (*A. tumefaciens*) :

استخدمت الأجروباكتيريم *A. tumefaciens* على نطاق واسع فى هندسة النباتات وراثياً ويتم ذلك من خلال وضع الجينات المرغوبة فى منطقة T-DNA للبلازميد البكتيرى تحت الظروف المعملية ، وحينئذ يحدث التحام لهذا المقطع من T-DNA داخل الكروموسومات النباتية عندما ينتقل إليها T-DNA. وتوجد بعض من تطبيقات هذه التكنولوجيا على نطاق تجارى يوضحها الجدول رقم ٧ .

جدول رقم ٧ : يوضح النباتات المحولة وراثياً والتى انتشرت على نطاق تجارى (Brich, 1997) :

المحصول وتاريخ انتشاره	الإسم التجارى	الشركة المنتجة	المدخلات الجديدة
الطماطم (١٩٩٤)	Flavr Savr	Colgene	سرعة النضج والنكهة الجيدة والنمو الجيد .
الطماطم (١٩٩٦)		Zeneca	عجينة صلصة مناسبة .
القطن البطاطس الذرة (١٩٩٦-١٩٩٧)	Bollgard New leaf Yield guard	Monsanto	المقاومة للحشرات باستخدام جين المادة البروتينية السامة من *Bt* .
فول الصويا الكانولا القطن (١٩٩٥-١٩٩٦)	Roundup Ready	Monsanto	المقاومة لمبيدات الحشائش المحتوية على Glyphosate .

وهنا يجب أن يُلاحظ أنه لا يحدث فى نباتات الطماطم المعدلة وراثيًا تعبير لجين Polygalacturonase . هذا الإنزيم الذى يقوم بتكسير البكتين Pectin مما كان يؤدى إلى طراوة أو ليونة أنسجة الثمار فى النباتات غير المعدلة وراثيا ، بينما فى نباتات الطماطم المعدلة وراثيا يمكن أن تترك ثمار الطماطم على النبات لمدة طويلة حتى يتراكم بها المكونات الطيارة Flavour components وهذه تجعل الثمار ذو طعم أفضل ومناسب .

فالعديد من النباتات قد تم هندستها وراثيًا كى يحدث بها تعبير لجين Insecticidal toxin gene من الباسيلس *Bt* ، ولذا فإن الحشرات تموت عندما

تحاول أن تتغذى على هذه النباتات المهندسة وراثياً بجين Bt . وهذه طريقة ناجحة جداً ولكن عيبها أنها تجعل الحشرات معرضة بصفة مستمرة للمادة البروتينية السامة والتى يترتب عليها تكوين صفة المقاومة ضدها. وبالإضافة لذلك فإن العديد من المحاصيل قد تم هندستها وراثيّاً لتصبح مقاومة لمبيد الحشائش Glyphosate والذى يستخدم فى مكافحة الأعشاب الضارة دون الإضرار بالمحصول. ومن أحسن أمثلة هذه النباتات هى محاصيل Roundup ready التى تنتجها شركة مونسانتو .

وتتضمن إستراتيجيات إنتاج نباتات معدلة وراثيّاً ما يلى :

- هندسة صفة المقاومة للفيروس فى النبات بواسطة إدخال الجينات التى تعمل على تكوين الغلاف البروتينى للفيروس أو تلك التى تعمل Antisense RNA.
- هندسة صفة المقاومة للفطريات الممرضة للنبات ، بتعزيز تعبير الإنزيمات المحللة لجدر الفطريات مثل كل من Chitinase and glucanases.
- هندسة النباتات أثناء المراحل المتأخرة من تكوين البذور بحيث يحدث فيها تعبير للجينات التى تجعل البذور عقيمة بحيث لا يمكن استخدامها فى العام التالى ويضطر المزارع إلى تجديدها سنويّاً من المنتج التجارى للبذور.

ومع ذلك فإن الجزء المهم فقط فى منطقة T-DNA هو منطقة صغيرة جداً تتكون من ٢٥ زوجاً من القواعد هى عبارة عن Border repeats. وهى ضرورة لعمل تحول وراثى للنباتات. ولذلك فإن الهندسة الوراثية لمنطقة T-DNA تتم لإزالة الجينات المسئولة عن تكوين الهرمونات النباتية ، وعلى مستوى هذه المنطقة يتم إدخال الجينات الانتخابية مثل جينات المقاومة للمضادات الحيوية كالـ Kanamycin ولذلك فإنه يجب أن يحتوى هذا الجزء على منطقة القطع وهى المنطقة التى يوجد بها تتابع النيوكليتدات الخاص بالقطع والذى فيه يعمل إنزيم القطع على قطع DNA. وعلى سبيل المثال فإن إنزيم القطع Bam HI يقوم بقطع DNA فى المنطقة التى يوجد بها تتابع النيوكليتدات GGATCC ، وعلى الخيط الآخر التتابع المكمل وهو CCTAGG وهذا يعمل على تكوين مناطق متداخلة تسمى بالنهايات اللزجة Sticky ends ولذلك فإن أى قطعة أخرى من DNA يتم قطعها بنفس الإنزيم يمكن أن تلتحم أو يتم إدخالها فى نفس المنطقة المقطوعة سابقاً بذات الإنزيم.

ولذلك فإن عملية التحول الوراثى للنباتات تستلزم ما يلى :

- خلايا أجروباكتيريم لنقل البلازميد المبرمج وراثيّاً بجين أو جينات معينة.
- Ti plasmid يحتوى على جينات Vir genes الفعالة وظيفيّاً للتعرف على العائل النباتى ولإستئصال T-DNA.
- إحداث قطع مناسب بمنطقة T-DNA وإدخال الجينات المرغوبة.

وعلى هذا فإن منطقة T-DNA ليست بحاجة إلى أن تبقى على نفس البلازميد مثل Vir genes ، فهى فى الغالب تركيب صغير والبلازميد الذى يحتوى عليها يتضاعف ذاتيّاً. وتتم عملية التحول الوراثى للخلايا النباتية بواسطة تلقيح البروتوبلاست النباتى بالـ *Agrobacterium* . وبعد ذلك يتم قتل البكتريا بواسطة المضادات الحيوية ، ومن ثم يعمل البروتوبلاست على تكوين الجدار الخلوى وتكوين مزرعة من النسيج ، أما الخلايا غير المتحولة وراثيّاً فإنها تقتل بواسطة إضافة Kanamycin ، بينما الخلايا المتبقية هى التى تعيش حيث تحتوى على جين المقاومة للمضاد الحيوى كانااميسين ، وهى تلك التى تعمل على تكوين النبات فى مزارع الأنسجة. ومع ذلك فإنه يمكن إضافة الأجروباكتيريم لقطع الأوراق المعقمة فى البيئة السائلة ، وهنا تعمل الهرمونات على استحداث تكوين الجذور من قطع الأوراق والتى منها تتكون النباتات فيما بعد. أما الطريقة الثالثة يمكن استخدامها مع بعض النباتات مثل Arabidopsis ، ومع ذلك فإن البكتريا أو حتى DNA العارى يمكن أن يقوم بعمل تحول وراثى من خلال الاندماج مع غلاف البذرة .

الخلاصة :

هي أن الأساس فى عملية استخدام الأجروباكتيريم فى برامج الهندسة الوراثية هى منطقة T-DNA الموجودة فى Ti- plasmid للـ *A. tumefaciens* والتى تنفصل عن البلازميد وتلتحم بجينوم الخلية النباتية عندما يحدث لها إصابة بالأجروباكتيريم ، ولذلك فإن أى جزىء DNA غريب يتم التحامه بمنطقة T-DNA سوف يحدث له إلتحام بجينوم الخلية النباتية إذا ما أصيبت بالأجروباكتيريم. وبنهاية هذا الفصل نكون قد أدركنا ما هي الأجروباكتيريم وطبيعة محتواها البلازميدي وعلاقته بمقدرتها المرضية وكيف تسبب هذه البكتيريا مرض التورم

التاجي فى النباتات ذوات الفلقتين وأعراض هذا المرض ، وكيف يمكن استخدامها فى نقل الجينات للنباتات ، والصفات التى نقلت للنباتات باستخدام الأجروباكتيريم ، ودور الوراثة فى تطور طرق المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم .

الأسئلة :

١- لماذا تستخدم الأجروباكتيريم فى نقل الجينات للنباتات ذوات الفلقتين ؟

٢- بالرغم من أن الأجروباكتيريم والرايزوبيم كائنات تتبع نفس العائلة ، إلا أنهما يختلفان عن بعضهما من الناحية الوراثية ، حيث يعتمد التصنيف البيولوجي لهذه البكتيريا أساسا على البلازميدات وليس على الكروموسوم البكتيري ، علل ذلك ؟

٣- ماذا يحدث للأجروباكتيريم والرايزوبيم لو تعرضا لدرجة حرارة مرتفعة عند ٣٠ درجة مئوية أو أعلى ؟

٤- إلى ماذا تشفر الجينات الموجودة فى منطقة T-DNA ؟

٥- ما أفضل السلالات البكتيرية التى تستخدم فى المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم؟

٦- ما المشاكل التى تواجه استمرار النجاح فى برنامج المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم ؟

٧- كيف يمكن استخدام طرق الهندسة الوراثية فى تجنب المشاكل التى تواجه المكافحة الحيوية للأجروباكتيريم ؟

٨- كيف أدت الهندسة الوراثية إلى التغلب على طراوة الثمار فى الطماطم ؟

٩- ما هي الضمنيات الموجودة فى إستراتيجيات إنتاج نباتات معدلة وراثيا ؟

١٠- ما هي مستلزمات عملية التحول الوراثي للنبات ؟

أجب بنعم أم لا مع التعليل :

١-ينشأ مرض التدرن التاجي فى النباتات ذوات الفلقة الواحدة بسبب أن الأجروبكتيريم تقوم بنقل جزء من محتواها من DNA إلى النباتات والذى يندمج مع جينوم الخلايا النباتية مسببا نشأة التورمات ؟

٢-يمكن أن تستخدم الأجروبكتيريم فى نقل الجينات غير النباتية لهندسة المحاصيل الحقلية وراثيا ؟

٣-معظم الجينات الموجودة فى منطقة التدرن التاجي كانت محمولة على كروموسوم الأجروبكتيريم وليس على Ti-plasmid .

٤-يتركز الفرق الوراثي بين الأجروبكتيريم والرايزوبيم فى احتواء الأجروبكتيريم على Ti-plasmid واحتواء الرايزوبيم على Symbiotic plasmid ؟

٥-يمكن للخلايا البكتيرية أن تنمو فى الأوساط البيئية العادية حتى إذا فقدت بلازميداتها وذلك لأن البلازميدات تعبر عن وظائف إضافية بالخلايا البكتيرية ؟

٦-اندماج منطقة T-DNA من خلايا الأجروبكتيريم بكروموسومات الخلية النباتية يسيطر على وظائف تلك الخلايا النباتية ؟

٧-البكتيريا المرضية من الأجروبكتيريم هى التى تحتوى على Ti - plasmid وهى تمثل نسبة بسيطة من هذا الجنس ؟

٨-لا يمكن للـ Ti – plasmid أن ينتقل بالتزاوج إلى سلالات أخرى من الأجروبكتيريم تقطن منطقة الريزوسفير لأنه Conjugative plasmid ؟

٩-يعتبر Allan Kerr هو أول من اكتشف *Agrobacterium radiobacter k84* فى أستراليا عام ١٩٧٣ والتى تعتبر أول سلالة استخدمت فى المكافحة البيولوجية على النطاق التجاري ؟

١٠-عملية انتقال Agrocin plasmid من *Agrobacterium radiobacter k84* إلى سلالات أخرى ممرضة يترتب عليه أن تصبح السلالات الممرضة مقاومة للـ Agrocin - 84 مما سيجعل هذه السلالات فى الغالب مقاومة لتأثير مثل هذه المثبطات ؟

١١-Agrocin plasmid هو بلازميد لا ينتقل خلال عملية التزاوج ولكن يوجد بنفس السلالات بلازميد آخر يقوم بتحريكه مؤديا إلى انتقال المادة الوراثية بين السلالات ؟

١٢- اختر الإجابة الصحيحة من بين الإجابات التالية :

يمكن تجنب المشاكل التى تؤثر على برنامج المكافحة الحيوية للأجروبكتيريم عن طريق :

أ- استئصال منطقة Tra region بإنتاج طفرات من السلالة K84 تسمى Transfer deleted ؟

ب- الهندسة الوراثية للسلالات المستخدمة فى برنامج المكافحة الحيوية ؟

ج- زيادة عدد نسخ Agrocin plasmid فى خلايا *Agrobacterium radiobacter* k84 ؟

د- استئصال البلازميد pNOC التزاوجي من هذه السلالات والذي يستطيع تحريك Agrocin plasmid خلال عملية التزاوج ؟

هـ- جميع الإجابات السابقة صحيحة عدا (ج) ؟