الباب الخامس عشر

أستعمال التكنولوجيا الحيوية فى أمراض النبات

Applications Of Biotechnology In Plant Pathology

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

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

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

يمكن تلخيص أهمية أستعمال التكنولوجيا الحيويه فى أمراض النبات فيما يأتى:

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

مفاجأه outbreak من طفيل ممرض شديد القدره على الأصابة وينتج عن ذلك كارثه مرضيه.

٢ ـ أحيانا تكون الأصناف الجديده الناتجة عن الهندسه الوراثيه نتيجه نقل جين أو أكثر إليها غير قابله للتأقلم مع التغييرات المفاجئة فى الظروف البيئية أو حتى مع الكائنات الحيه الدقيقة وخاصة النباتية منها الموجوده فى البيئه. وتصبح هذه الأصناف متأثره بذلك وقد يقل إنتاجها أو تفقد بعض أو كل مواصفاتها المتميزه.

٣ ـ يمكن أن يكون فى المستقبل الحامل والناقل الرئيسى للجين vector من نبات معطى donor إلى نبات مستقبل recipient هى مسببات أمراض النبات مثل البكتيريا*Agrobacterium tumefaciens* المسببه لمرض التدرن التاجى فى كثير من العوائل النباتية وفيروس موزايك (تبرقش) القنبيط cauliflower mosaic virus وأيضا فيروسات أخرى.

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

مزارع الأنسجة وأمراض النبات

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

أستعملت مزارع الأنسجة كثيرا فى المحاصيل البستانيه لأنتاج نباتات ذات صفات مرغوبه وقد أستعملت أيضا فى أمراض النبات لأنتاج نباتات خاليه من الأمراض أو مقاومه لها.

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

أمكن بعد ذلك تطبيق هذه الطريقة على كثير من النباتات بطريقة إقتصاديه لأنتاج نباتات خاليه من الفيروس مثل القرنفل والبطاطس وقصب السكر والشليك والموز. فى حالة نباتات القرنفل توضع النباتات فى بيئه يمكن التحكم فى درجه حرارتها وترفع درجة الحرارة تدريجيا لمده أسبوعين حتى تصل إلى ٣٨° مع وجود رطوبه نسبيه ٩٠٪. وتترك النباتات تحت هذه الظروف لمدة شهرين ثم تؤخذ القمم الناميه وتزرع على بيئات معقمه صناعيه وتعطى هذه القمم سيقان ونباتات خاليه من الفيروس. تطبق هذه الطريقه أيضا فى نبات قصب السكر.

أنتاج نباتات خاليه من الفيروسات أو الفطريات

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

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

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

يمكن أن تتبع نفس الطريقة للحصول على نباتات خاليه من فطريات الذبول وهى *Fusarium oxysporum* و *Verticillium albo - atrum*.

إنتاج نباتات مقاومه للأمراض

يمكن بإستعمال مزارع حبوب اللقاح إنتاج نباتات مقاومه للأمراض. تجرى فى هذه الطريقة زراعه المتك أو أجزاء منه أو حبوب اللقاح على بيئه صناعية فى المعمل تتكون هذه البيئة من بعض الأملاح المعدنية وبعض الفيتامينات وبعض منظمات النمو والأحماض الأمينية والسكروز والآجار. يحدث نمو فى داخل حبه اللقاح وتتكون عده خلايا داخل حبه اللقاح ثم تنقسم هذه الخلايا لتكون كميه كبيره من الخلايا تضغط على الجدار وتمزقه. يتكون من هذا النمو بعد تحرره من جدار حبه اللقاح شكل كروى ثم قلبى ثم طوربيدى torpedo ومن الأخير يتكون النبات الصغير على البيئه. يلاحظ أن النباتات المتكونه بهذه الطريقة تكون أحاديه (١ن) لأنها ناتجه من حبوب اللقاح. تعتبر النباتات العاديه ثنائية (٢ن) ولذلك فإنه أثناء تكوين هذه النباتات الأحاديه من حبوب اللقاح تعامل البيئة أو النموات بمركب الكولشيسين والذى يسبب تضاعف فى عدد الكرموسومات فتصبح النباتات الناتجه (٢ن) بدلا من (١ن) . أهميه هذه الطريقة فى أمراض النبات أنه يمكن عن طريقها إنتاج نباتات مقاومه للأمراض. أمكن فى اليابان إنتاج نباتات تبغ مقاومه لمرض الذبول بهذه الطريقه. وجد فى التبغ صنف مقاوم لسلاله معينه من الطفيل المسبب للمرض وتركيب النبات فى هذه الحالة AA ووجد صنف آخر مقاوم لسلاله أو سلالات أخرى من الطفيل وتركيب النبات فى هذه الحالة BB. وجد أن الصنف الأول قابل للأصابة بالسلاله الثانية من الطفيل ولذلك فتركيبه الوراثى AAbb ووجد أن الصنف الثانى من نبات التبغ عكس الصنف الأول ولذلك فتركيبه الوراثى BBbb . عند تهجين هذين الصنفين ينتج فى الجيل الأول نبات تركيبه الوراثى Aa Bb. عند أخذ حبوب اللقاح من هذا النبات وزراعتها على البيئة المحتويه على الكولشسين ينتج نباتات ثنائية بتركيبها الوراثى AAbb، AABB ، aaBB، aabb، ناتجه من حبوب اللقاح تركيبها Ab و AB و aB و ab . عند زراعة هذه النباتات فى بيئه ملوثه بسلالات الطفيل فإن جميع هذه النباتات تموت عدا النباتات ذات التركيب الوراثى AABB حيث تكون مقاومه للمرض وأيضا أصيله فى هذه الصفه. يلاحظ أيضا أن نسبه النباتات المقاومه الأصيله فى هذه الصفة تكون نسبتها ٢٥ ٪. تفضل هذه الطريقة حيث أن نسبه

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

AAbb × aaBB — تركيب الأبوين

AaBb F_1 *hybrid*

تركيب حبوب اللقاح / تركيب خلية البيضة	AB	aB	Ab	ab
AB	AABB	AaBB	AABb	AaBb
aB	AaBB	aaBB	AaBb	aaBb
Ab	AABb	AaBb	AAbb	Aabb
ab	AaBb	aaBb	Aabb	aabb

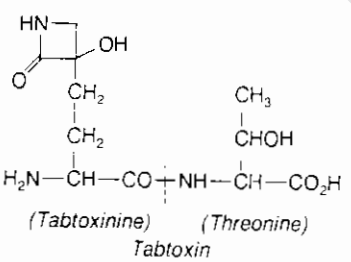
(شكل٨١) : التركيب الوراثى لنسل الجيل الثانى وبه تركيب واحد فقط مرغوب نسبته ١ إلى ١٦ .

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

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

oberkanan.com

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



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

الأنواع المختلفة لمزارع الأنسجه وأهميتها فى أمراض النبات:

توجد أنوع عديده من مزارع الأنسجه وهى كما يلى. ومع ذكر أهمية كل نوع من هذه المزارع فى أمراض النبات.

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

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

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

أ ـ عمل التلقيح بالفيرس ودراسه فسيولوجيا وتكاثر الفيرس: يتم تلقيح البروتوبلاست بفيرس أو أكثر. يحدث ذلك بخلط البروتوبلاست مع تحضير نقى من الفيرس وأيضا مركب fusagen والأخير تركيبه poly-L- ornithine أو polyethylene glycol . يتم رج المخلوط لمده ١٠ إلى عشرون دقيقه فى درجة حراره الغرفه ثم يتم غسل مخلوط البروتوبلاست بالمانيتول أو محلول مغذى أو بمخلوط منهما وذلك لإزاله الزياده من الفيرس والفيوساجين. تختلف نسبه إصابه البروتوبلاست بالفيرس تبعا لنوع الفيرس والبروتوبلاست لكنها قد تصل أحيانا من ٧٠ إلى ٩٥ ٪ يتم دوره تكاثر الفيرس فى البروتوبلاست كل ٢٤ إلى ٣٦ ساعه بعد التلقيح. يمكن التعرف على سرعه تكاثر الفيرس فى البروتوبلاست بإستعمال المجهر الإلكترونى أو الأختبار على عائل مناسب يصاب بالفيرس ويظهر عليه أعراض عباره عن بقع موضعيه local lesion on host أو بالإختبارات السيريولوجيه ومنها الأن إختبار ELISA وتكون هذه الإختبارات على فترات مختلفه بعد عمليه التلقيح.

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

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

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

صغيره تسمى liposomes . بوضع هذه الليبوسومات مع البروتوبلاست وحفظ هذا المخلوط لفتره فى حضان فى درجه حراره مناسبه فإن البروتوبلاست يمكن أن يحتوى هذه الليبوسومات فى داخله وتصبح الماده الوراثيه الموجوده داخل الليبوسومات موجوده داخل بروتوبلاست النبات.

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

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

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

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

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

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

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

يمكن الحصول على بروتوبلاست أحادى haploid وذلك من مزارع المتك حيث ينتج خلايا أحاديه يمكن أن يتكون منها كالس أحادى ويمكن معامله هذه الخلايا أو خلايا الكالس للحصول على بروتوبلاست أحادى. من مميزات البروتوبلاست الأحادى أن الجينات توجد بصوره منفرده وليست فى أزواج وبذلك يمكن التعرف على الصفات المختلفة للجينات ومنها المتنحية وأيضا minor genes . وفى حالة وجود صفه مرغوبه أو مقاومه لمرض معين فإنه يمكن مضاعفه البروتوبلاست بإستخدام مركبات كيماويه منها الكولشسين. تصبح صفه المقاومه موجوده بحاله أصيله. سبق شرح ذلك بالتفصيل فى حالة إستعمال مزارع المتك لإنتاج حبوب لقاح يمكن منها إنتاج نباتات مقاومه للأمراض مثل مقاومة نبات التبغ لمرض الذبول.

يمكن إستعمال مزارع البروتوبلاست الأحادى لتحديد موقع جينات المقاومة وعددها حتى لو كانت minor genes يمكن عن طريق هذه المزارع دراسه علاقه جينات المقاومه بالسلالات المختلفة للفطريات أو البكتريا أو الفيروسات المسببه لأمراض النبات.

أساسيات الهندسة الوراثيه

بعض الأجزاء الهامة فى الخلية النباتية:

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

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

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

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

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

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

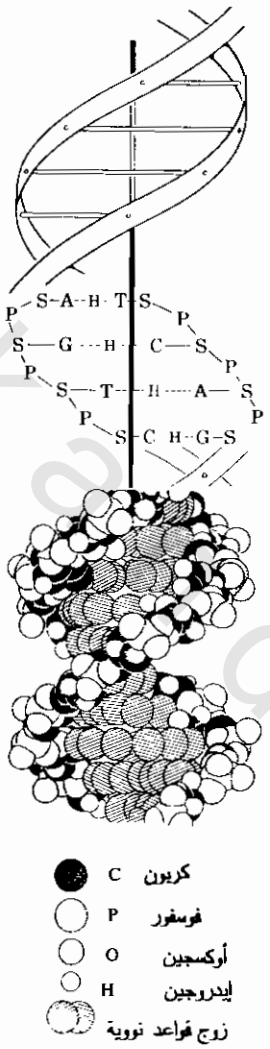
الخماسى دى اكسى ريبوز فى حالة الحمض RNA أو سكر ريبوز فى حالة الحمض RNA يرتبط مع السكر جزيء فوسفات من ناحية وقاعدة نيتروجينية من ناحية أخرى. تتكون القاعدة النيتروجينية من أدينين adenine، وجوانين guanine وسيتوسين cytosine، يضاف إليهم ثيمين thymine فى حالة الحمض DNA ويوراسيل uracil فى حالة الحمض RNA. القواعد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

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

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

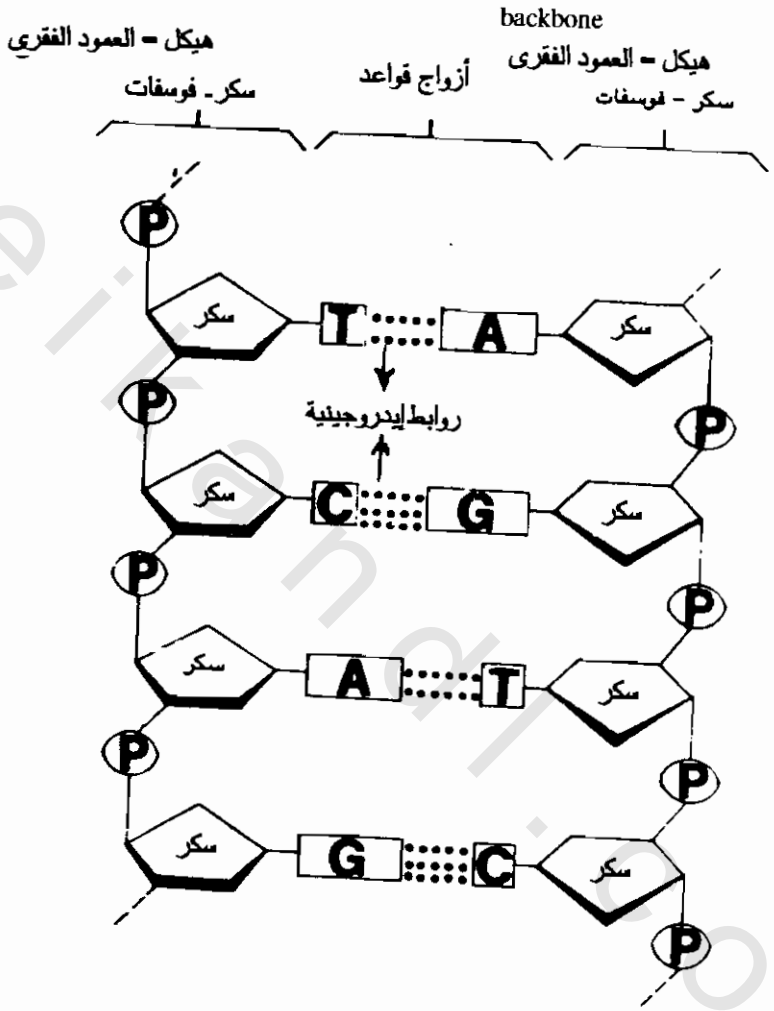
تحتوى الخلية الجسدية للإنسان على ٤٦ كروموسوم. فإذا تصورنا أنه أمكن فك اللولب المزدوج لجزئ DNA فى كل صبغى ووضعت هذه الجزيئات على امتداد بعضها البعض لوصل طولها إلى ٢ متر، والهستونات وغيرها من البروتينات هى المسئولة عن ضم هذه الجزئيات الطويلة لتقع فى حيز نواة الخلية والتى يتراوح قطرها من ٢ ـ ٣ ميكرون، ولقد أوضح التحليل البيوكيميائى وصور المجهر الإلكترونى أن جزئ DNA فى الصبغى يلتف حول مجموعات من الهستون مكونا حلقات من النيوكليوسومات nucleosomes (شكل ٨٧) مما يؤدى إلى تقصير طول جزيئ DNA عشر مرات، إلا أنه يتعين أن يضم الجزيئ ويقصر حوالى ١٠٠ر٠٠٠ مرة حتى تستوعبه النواة، ولهذا فإن حلقات النيوكليوسومات تلتف مرة أخرى لتنضم مع بعضها ومع ذلك فإن كل ما سبق ليس بكاف لتقصير جزئ DNA إلى الطول الملاحظ، وأشرطة النيوكليوسومات الملتفة بشدة ترتب على شكل حلقة كبيرة بواسطة البروتينات التركيبية غير الهستونية للكروماتين. والكروماتين الملتف والمكدس بشكل كبير يشار إليه على أنه مكثف، وعندما يكون جزئ DNA على هذه الحالة لا تستطيع الإنزيمات

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

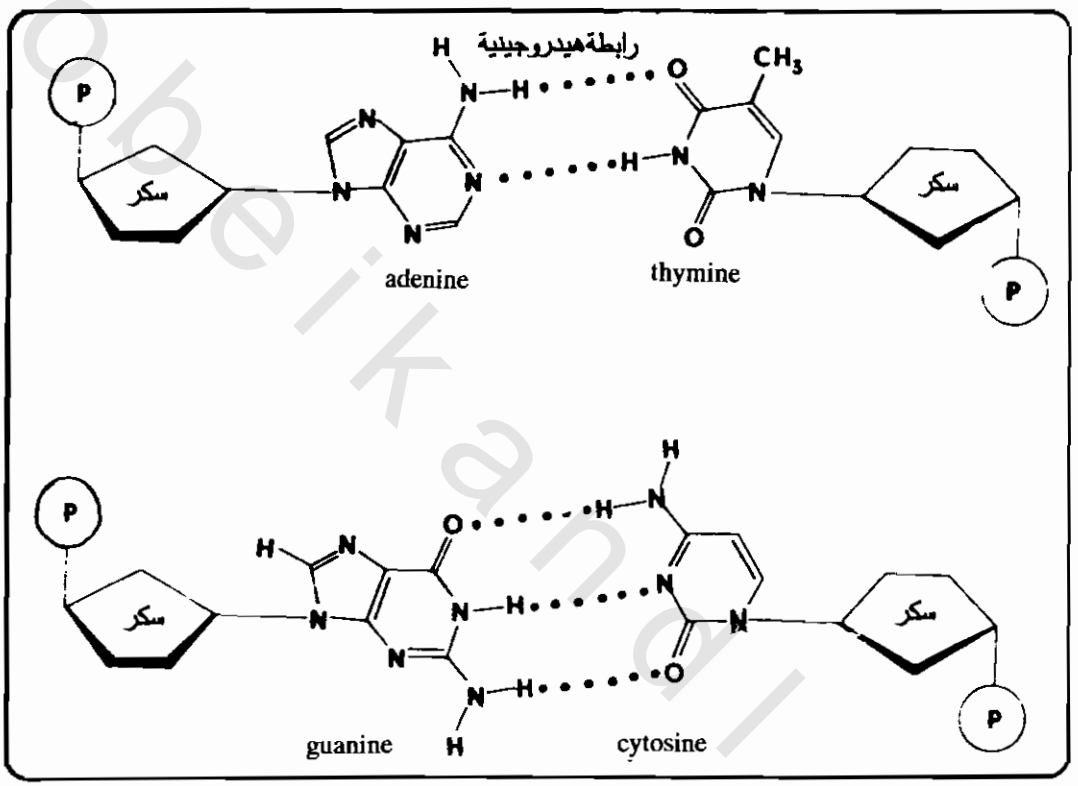


(شكل ٨٣) : تركيب جزيئ DNA

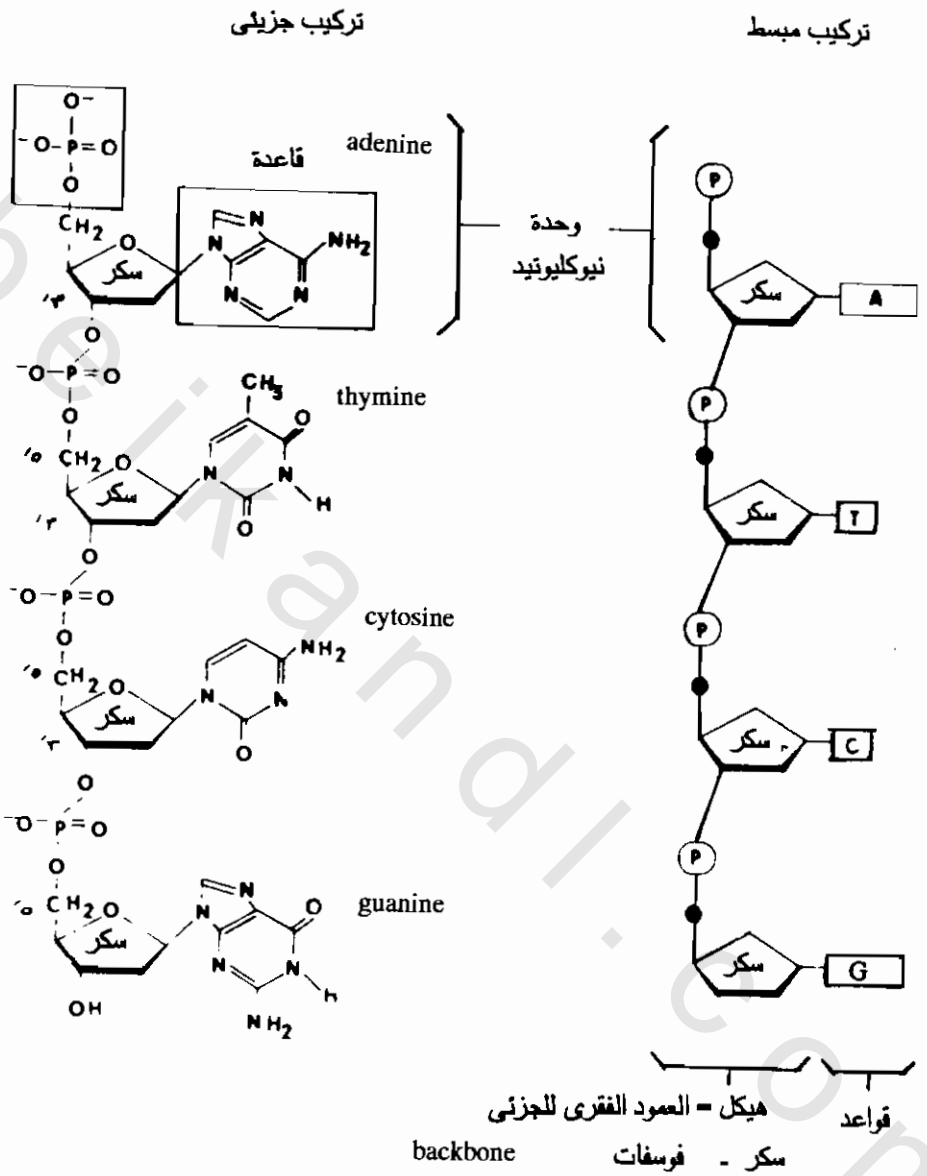
obeikandl.com



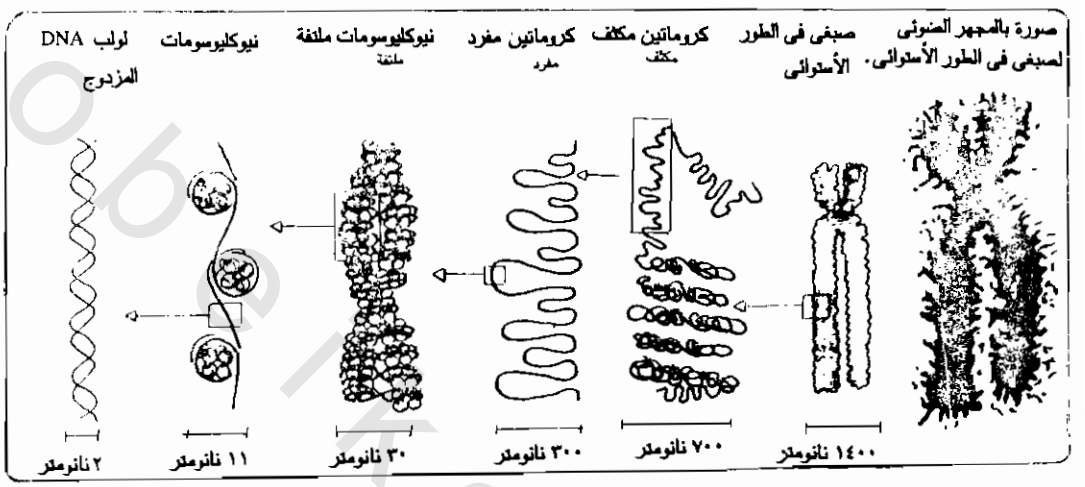
(شكل ٨٤) : شريطان من DNA يربط بينهما روابط إيدروجينية.



(شكل ٨٥) : أزدواج القواعد فى DNA وتكوين الروابط الإيدروجينية.



(شكل ٨٦) : قطعه من DNA تركيب مبسط وتركيب جزيئى.



(شكل ٨٧) : الطريقة التى يغلف بها DNA فى الكروماتين.

تضاعف DNA

DNA Replication

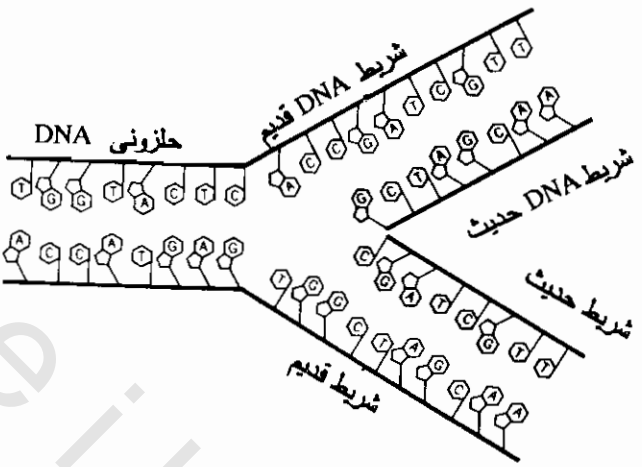
قبل أن تبدأ الخلية فى الانقسام تتضاعف كمية DNA بها حتى تستقبل كل خلية جديدة نسخة طبق الأصل من المعلومات الوراثية الخاصة بالخلية الأم، ويحدث ذلك أثناء الطور البينى interphase فى أثناء خطوات إنقسام الخليه، ولقد أشار كل من واطسن وكريك إلى أن تركيب الشريط المزدوج ذى القواعد المتزاوجة لجزئ DNA يحتوى على وسيلة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

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

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

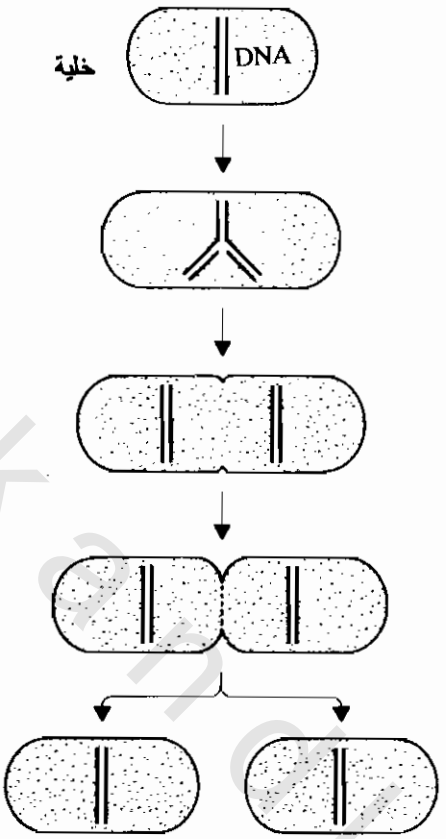
تبدأ العملية بأن يرتبط بروتين معين بحلزونى DNA وهذا البروتين هو عباره عن أنزيمات فك حلزونى DNA وتسمى DNA - helicases. تتحرك هذه الأنزيمات على جزيئ DNA من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر مسببه فك وفصل حلزونى DNA وينفصل الشريطان عن بعضهما ويبتعد كل منهما عن الآخر. يمكن تشبيه ذلك بأن الأنزيم هو أبزيم السوسته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

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



(شكل ٨٨) : تضاعف الـ DNA ـ أى تضاعف شريطين أى حلزونى الـ DNA .

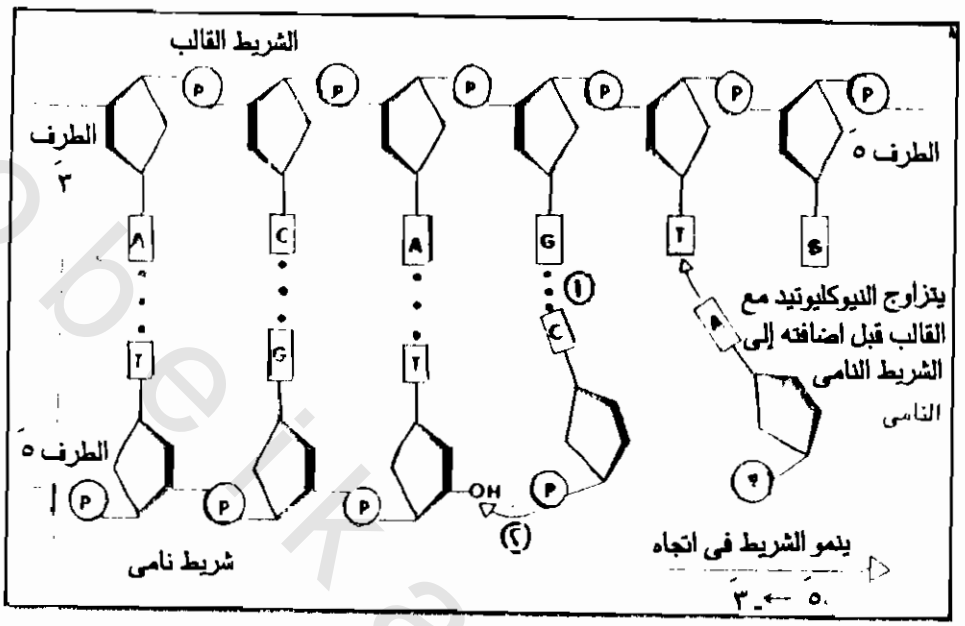
النيوكليويتدات واحده بعد الأخرى إلى النهاية ٣ لشريط DNA الجديد ولكى يتم إضافة النيوكليوتيده إلى الشريط الجديد لابد أن تتزاوج القاعده النيتروجينيه فى النيوكليوتيده مع القاعدة النيتروجينيه الموجوده على شريط القالب (شكل ٩٠) وهكذا يتكرر ذلك فى جميع الحالات وعامه ومن المعروف أن أنزيم البلمرة يعمل فى اتجاه واحد فقط من الطرف٥َ فى اتجاه٣َ للشريط الجديد الذى يجرى بناؤه. ولقد سبق أن ذكرنا أن شريطى لولب DNA المزدوج متوازيان عكسيا، أى أن أحدهما يكون فى اتجاه ٥َ إلى ٣َ بينما الشريط المتزاوج معه يتوجه فى الاتجاه المعاكس أى فى اتجاه ٣َ إلى ٥َ . وعلى ذلك فعندما يعمل أنزيم فك الحلزون على فصل شريطى جزئ DNA يتم ذلك فى اتجاه النهاية ٣َ لأحد الشريطين والنهاية ٥َ للشريط الآخر. وبالنسبة للشريط القالب ٣َ ـ ٥َ ليست هناك مشكلة حيث أن أنزيم البلمرة يتبع أنزيم فك الحلزون مباشرة مضيفا نيوكليوتيدات جديدة إلى النهاية ٣َ. إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس، وذلك لأن أنزيم البلمرة لا يعمل فى اتجاه ٣َ ـ ٥َ ولذا فإن هذا الشريط يتم بناؤه



(شكل٨٩) : خطوات إنقسام خليه إلى خليتين وتضاعف جزيئ DNA .

على شكل قطع صغيرة فى اتجاه ٥َ ـ ٣َ بواسطة إنزيم بلمرة آخر Polymerase B (شكل ٩١) ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها البعض بواسطة أنزيم الربط DNA-ligase .

أما فى أوليات النواة فإن جزئ DNA يوجد على شكل حلزونى مزدوج إلا أن نهاياته تلتحم بعضها مع بعض مكونه شكل حلقى وهذا الجزئ يتصل بالغشاء البلازمى للخلية عند نقطة واحدة يبدأ عندها نسخ جزئ DNA .



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

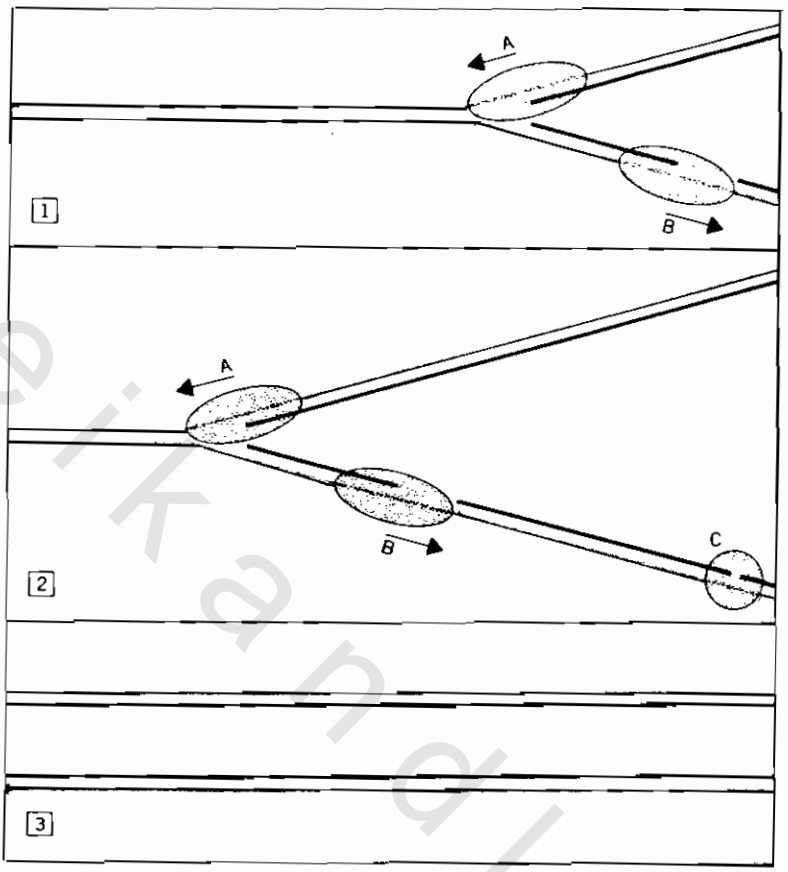
١ـ تتزاوج القواعد النيتروجينية مع المتكامل معها على الشريط القالب.

٢ ـ يقوم DNA - polymerase بربط النيوكليوتيدات المتزاوجة فى الشريط النامى.

الشفرة الوراثية The Genetic Code

من المعروف أنه توجد أحماض أمينيه كثيره ولكن يوجد منها أحماض أمينيه أساسيه essential amino acids وهى الأحماض التى تدخل فى تركيب البروتينات وأما الأحماض الأمينيه الأخرى الغير أساسيه فإنها لا تدخل فى تركيب البروتينات. ومن المعروف أنه يوجد عشرون حامض أمينى أساسى وسيتناول شرح الشفره الوراثية هذه الأحماض الأمينيه الأساسيه دون غيرها.

من المعروف أن هناك عشرين حمضا أمينيا مختلفا تدخل فى بناء البروتينات وأن هناك أربع قواعد نيتروجينيه ـ نيوكليوتيدات ـ فقط تدخل فى بناء كل من DNA و RNA وعلى ذلك



(شكل ٩١) : إنزيم DNA Polymerase منه النوع A الذى يخلق شريط متكامل من DNA فى أتجاه فرع الشوكه ولكن النوع B من هذا الأنزيم لا يخلق شريط متكامل من DNA بل يخلق أجزاء متقطعه من شريط DNAفى الأتجاه العكسى على الشريط الآخر من DNA ثم تربط هذه الأجزاء بواسطة إنزيم الربط DNA ligase ويرمز له بالرمز C وفى النهاية يتكون شريطين جديدين متكاملين من DNA (3) .

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

هى A,G,C,U والبروتينات بذلك تحتوى على أربعة أحماض أمينية فقط وبالمثل فإن الكلمات لا يمكن أن تتكون من حرفين (نيوكليوتيدتين) وذلك لأن القواعد النيتروجينيه الأربعة اذا رتبت فى كل الاحتمالات الممكنة لاثنين معا تعطى $٤^{٢}$-١٦ كلمة شفرة codon مختلفة وهذا مازال غير كاف للعشرين حمضا أمينيا التى تدخل فى بناء البروتين، أما اذا رتبت الأربع حروف (قواعد نيتروجينه - نيوكليوتيدات) على شكل ثلاثيات فإنها ستنتج $٤^{٣}$-٦٤ كلمة شفرة وهذا أكثر من الحاجة لتكوين كلمة شفرة لكل حمض أمينى، وعلى ذلك فأصغر حجم نظرى لكلمة شفرة DNA هو ثلاث نيوكليوتيدات أى ثلاثه قواعد نيتروجينيه. الأختلاف الوحيد بين النيوكليوتيدات فى القواعد النيتروجينيه. تم فى عام ١٩٦٥ الوصول إلى الشفرات الخاصة بكل حمض أمينى والتى يطلق عليها اسم كودونات. وهذه الكودونات موجودة فى جدول (رقم ٢) مع ملاحظة أن الكودونات فى هذا الجدول هى الكودونات التى توجد فى mRNA، أما ثلاثيات شفرة DNA فهى النيوكليوتيدات التى تتكامل قواعدها مع تلك الموجودة فى الجدول. كما يتضح من الجدول أن هناك أكثر من شفرة لكل حمض أمينى، كما أن هناك كودونا لبدء البروتين وهو AUG وثلاثة كودونات (UGA, UAA, UAG) توقف بناء البروتين أى أنها تعطى إشارة عن النقطة التى يجب أن تقف عندها آلية بناء البروتين وتنتهى سلسلة عديد الببتيد.

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

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

(جدول ٢): الكودونات كما توجد فى mRNA

تخليق البروتينات Protein Synthesis

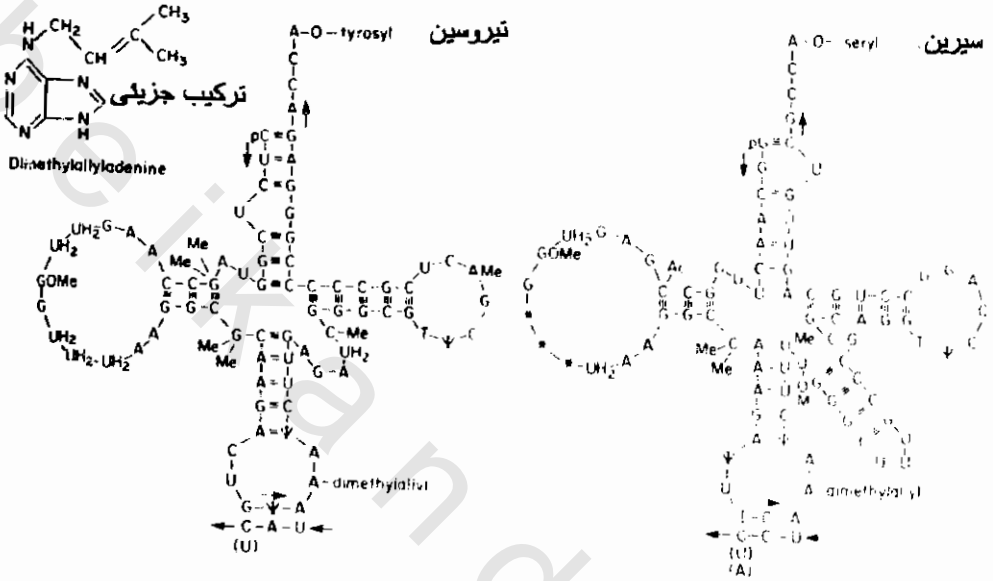
تخليق البروتين يحتاج تواجد أحماض أمينية حره بالخليه ويحتاج أيضا بعض من الأنزيمات ولابد أيضا من تواجد الريبوسومات بالخليه. كما يقوم RNA بدور رئيسى فى هذه العمليه. يوجد ثلاثة أنواع من RNA تسهم فى بناء البروتين وهى

١ ـ حمض RNA الرسول Messenger RNA (mRNA) وهو عباره عن خيط رفيع ويمكن رؤيته بالمجهر الألكترونى وهو غير ثابت ويتغير وزنه الجزيئى تبعا لنوع الخليه وتبعا لنوع البروتين الذى يقوم ببناء فقد نجده قصير كما فى نوع يسمى leader RNA أى RNA القائد وقد يكون طوله عادى فى كثير من الأحوال. يتراوح وزنه الجزيئى من خمسون ألف إلى ٥ مليون دالتون. وهو الذى يحمل الشفرة التى تحدد تتابع الأحماض الأمينيه الداخله فى تركيب البروتين.

٢ ـ حمض RNA الريبوسومى Ribosomal RNA (rRNA) ـ يدخل فى بناء الريبوسومات (أماكن بناء البروتين) عدة أنواع من RNA الريبوسومى وحوالى ٧٠ نوعا من عديد الببتيد، ويتم بناء الريبوسومات فى حقيقيات النواة فى منطقة من النواة تسمى النوية، يتم بها بناء الالاف من الريبوسومات فى الساعة، ومما يجعل هذا المعدل السريع ممكنا هو أن DNA فى خلايا حقيقيات النواة يحتوى على ما يزيد على ٦٠٠ نسخة من جينات RNA الريبوسومى التى ينسخ منها rRNA، وهناك أربعة أنواع مختلفة من rRNA تدخل مع البروتين فى بناء الريبوسومات. وهو مكون رئيسى للريبوسومات وإن كان الدور الذى يلعبه فى بناء البروتين مازال غير معروف حتى الآن.

٣ ـ حمض RNA الناقل Transfer RNA (tRNA) ـ تلتف أجزاء من الجزيئ لتكون حلقات وبذلك يصبح الجزيئ عباره عن قدم وساق وفروع تنتهى بحلقات. يختلف عدد الفروع والحلقات بإختلاف الجزئى وعاده تكون الفروع إثنان أو ثلاثة وكذلك الحلقات. وهو يتكون من نيوكليوتيدات عديده وعاده عددها حوالى ثمانون. توجد روابط إيدروجينيه تصل أدنين ويوراسيل وبين سيتوسين وجوانين فى كل من الساق والفروع أما القاعدة والحلقات فلا يوجد بها قواعد إيدروجينيه.

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



(شكل ٩٢) : جزيئ t RNA ناقل للحامض الأمينى سيرين وآخر ناقل للحامض الأمينى تيروسين مع وجود مركب dimethylallyl adenine (DMAA) بالقرب من anticodon

الداى ميثيل الايل أدينين DMAA. وفى حالة tRNA للحامض الأمينى أرجينين وفالين وجليسين وفينيل ألانين لا يتكون ولا يحتاج إلى مركب سيتوكينينى. أما أهمية المركب السيتوكينينى لـ tRNA فإنه لابد من وجوده لكى يحدث ارتباط بين مقابل الكودون anticodon فى tRNA والجزء المخصص له على كودون mRNA.

وهناك موقعان هامان على جزىء RNA لهما دخل ببناء البروتين، الموقع الأول يوجد فى قمه الجزيئ هو الذى يتحد فيه الجزيئ بالحمض الأمينى الخاص به، ويتكون هذا الموقع من الثلاث قواعد CCA أما الموقع الآخر هو السطح السفلى للقاعده مقابل الكودون anticodon

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

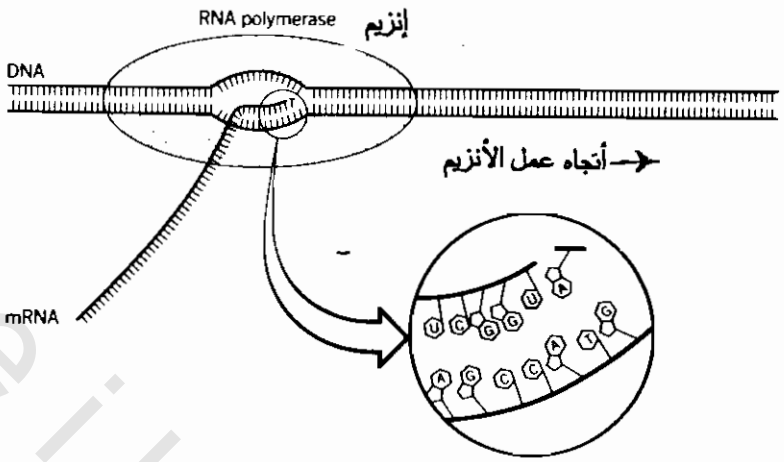
خطوات تخليق البروتين

تحدث خطوات عديده متعاقبه فى بناء البروتين وهى ما يأتى:

١ ـ النسخ Transcription

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

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

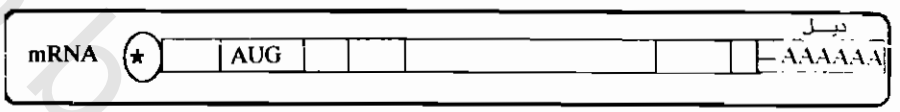


(شكل ٩٣) : فك شريطى DNA عن بعضهما فى مكان عمل الأنزيم RNA polymerase وتكوين شريط جديد من mRNA أى عمليه النسخ.

٢ ـ الترجمة Translation

يتكون الريبوسوم من تحت وحدتين احداهما كبيرة والأخرى أصغر، وعندما لا يكون الريبوسوم قائما بعمله فى إنتاج البروتين فإن تحت الوحدتين تنفصلان عن بعضهما وتتحرك كل منهما بحرية، وقد يرتبط كل منهما بتحت وحدة أخرى من النوع المقابل عندما تبدأ عمليه بناء البروتين مرة أخرى. توجد الريبوسومات حره فى سيتوبلازم الخليه أو توجد ملتصقة بسطح الشبكة الأندوبلازميه ويتكون نتيجة لذلك الشبكه الأندوبلازميه الخشنه. تبدأ عمليه الترجمه بإرتباط mRNA بالريبوسوم وغير معروف التفاصيل الدقيقة لعمليه الربط. ولكن من المعروف أنه لكل mRNA موقع إرتباط بالريبوسوم وهو عباره عن تتابع للنيوكلوتيدات يرتبط بالريبوسوم وأول ثلاثه نيوكليوتيدات ترتبط بالريبوسوم تسمى كودون البداية start codon ويمكن شرح ذلك فى حاله أوليات النواه حيث يرتبط mRNA بالريبوسوم وبحيث يصبح أول كودون أى كودون البدايه متجها إلى أعلى أى أن العمود الفقرى back bone للجزئ يكون لأسفل والقواعد النيتروجيه لأعلى وهو الوضع الصحيح للترجمه. يكون هذا الكودون (شكل

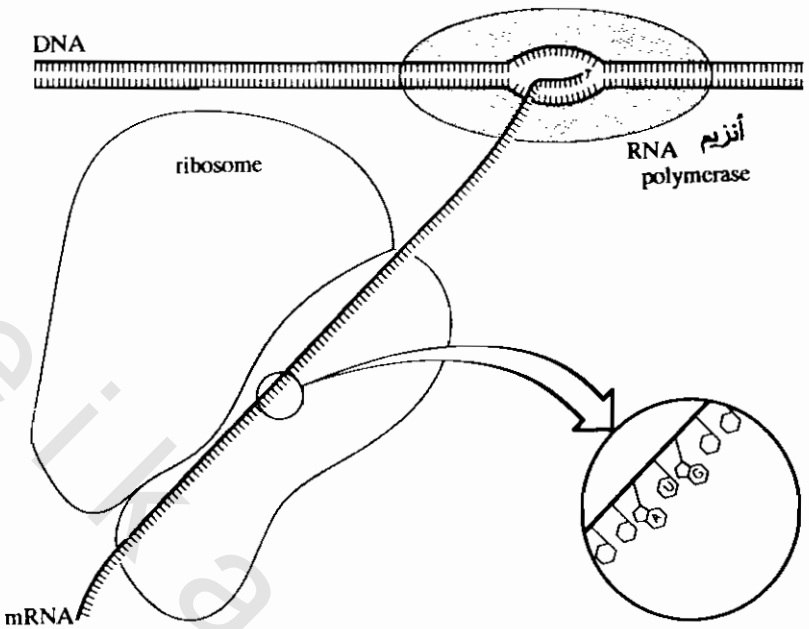
٩٤) هو AUG كما فى الجدول إما فى الطرف الآخر من mRNA فيوجد ذيل مكون من حوالى مائتين أدنين A يعتقد أن هذا الذيل يحمى mRNA من التحليل بواسطة الأنزيمات الموجودة فى السيتوبلازم.



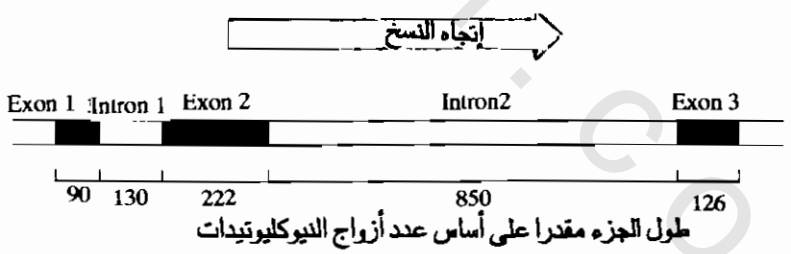
(شكل ٩٤) : شكل تخطيطى لجزىء mRNA يظهر به موقع الارتباط بالريبوسوم (*) وذيل عديد الأدينين ويتجه أول كودون به إلى أعلى

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

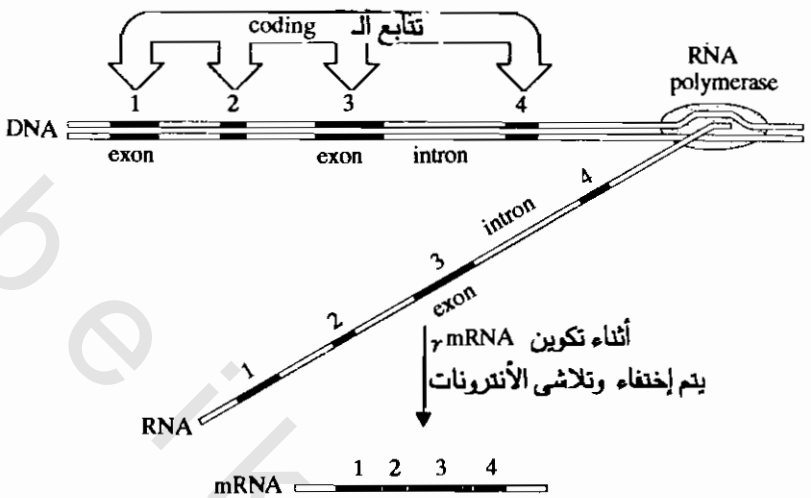
تختلف أوليات النواه عن حقيقيات النواه فى فرق آخر جوهرى وهو أن الجين فى حقيقيات النواه يتكون من أجزاء فعاله من الديوكليوتيدات أى أجزاء لها شفره coding regions وتدخل فى بناء البروتين وتسمى أكسونات exons ويفصل بين هذه الأجزاء الفعاله أجزاء غير فعاله من النيوكليوتيدات أى أجزاء ليس لها شفره moncoding regions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



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



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



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

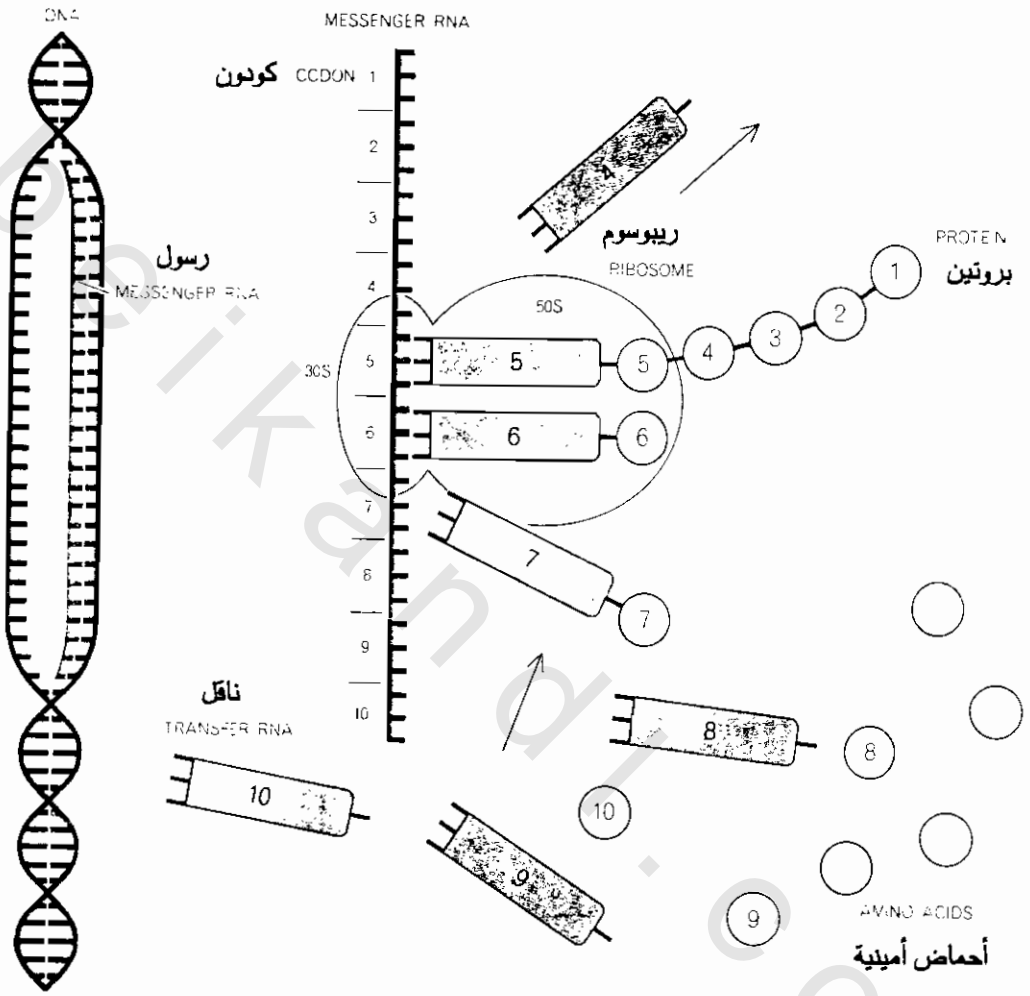
تختلف هذه الأجزاء فى عدد النيكليوتيدات ففى أكسون رقم ١ يتكون من تسعون زوج وفى أكسون رقم ٢ يتكون من ٢٢٢ زوج وفى أكسون رقم ٣ يتكون من ١٢٦ زوج وفى أنترون رقم ١ يتكون من ١٣٠ زوج وفى أنترون رقم ٢ يتكون من ٨٥٠ زوج. وفى أنواع أخرى من الجينات قد يكون فى الجين الواحد أكثر من خمسون أنترون. ولكن فى أوليات النواه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

فهو غير معروف. أما فى بدائيات النواه مثل البكتريا فإن mRNA لا يحتوى على مناطق أنترونات فى أثناء تكوينه ولذلك فإن طوله لا يقصر عند إرتباطه بالريبوسوم يعتقد أن البكتريا كانت تكون mRNA به أنترونات ولكن أثناء التطور عبر ملايين السنين فقدت البكتريا هذه الصفه وأصبح الآن mRNA البكتيرى خال من الأنترونات.

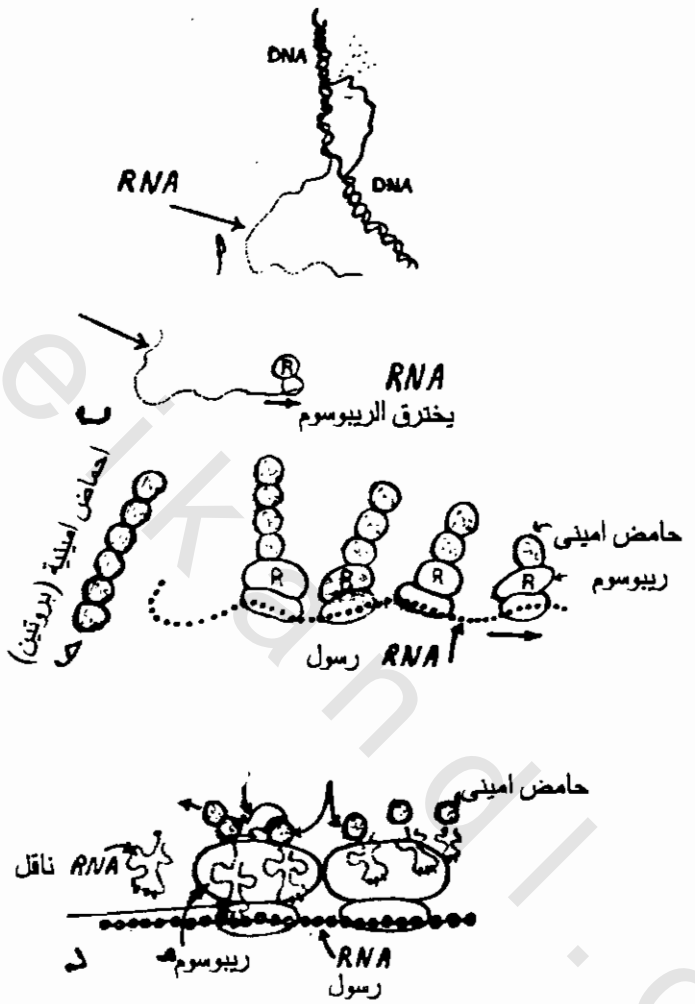
يوجد على الريبوسوم موقعان يمكن أن ترتبط بهما جزيئات tRNA . الموقع p على الريبوسوم يسمى موقع الببتيديل peptidyl والموقع A الذى يليه يسمى موقع أمينوأسيل aminoacyl. ولذلك فإن فى البدايه يكون كودون البدء AUG عند موقع الببتيديل. لكل حامض أمينى tRNAخاص به ويرتبط الحامض الأمينى فى قمم tRNA الخاص به بواسطه أنزيم aminoacyl tRNA synthetase. وحيث أنه يوجد عشرون حامض أمينى فإنه يوجد عشرون tRNA وعلى الأقل عشرون نوع من إنزيم tRNA synthetase حيث أنه على الأقل يوجد إنزيم خاص لكل حامض أمينى. وكل إنزيم قادر على التعرف على نوع tRNA الخاص به ويلتصق به ويقوم بربط الحامض الأمينى الخاص به بـ tRNA . الأحماض الأمينيه المختلفة توجد حره فى الخليه وذلك قبل إرتباطها بـ tRNA . وبعد ربط الحامض الأمينى بـ tRNA الخاص به فإن الأنزيم يتحرر ويصبح حر ويكرر عمليه الربط مره أخرى. يتداخل tRNA بما يحمله من حامض أمينى مع الريبوسوم وغير معروف حتى الآن كيفيه حدوث وطبيعه التداخل. ولكن يوجد عده تفسيرات لكيفيه حدوث العمليه ومنها أن tRNA المرتبط بالحامض الأمينى يتحرك ويستقر على المنطقة المخصصه له على mRNA المتداخل مع تحت الوحده الصغرى من الريبوسوم وهى موقع أمينوأسيل فى الريبوسوم وبعد ذلك ترتبط تحت الوحده الكبرى الحره بتحت الوحده الصغرى السابقه لتتكون وحده الريبوسوم الكامله. ولكى تحدث الخطوات ويتكامل الريبوسوم يحتاج إلى أنواع خاصه من البروتين وتسمى بعوامل البداية (البدء) initiation factors (IF) وهى IF_1, IF_2 و IF_3 . أول كودون فى mRNA هو AUG وتكون القواعد النيتروجينيه متجهه لأعلى ثم تتزاوج بواسطة الروابط الإيدروجينية قواعد مقابل الكودون UAC لجزيئ tRNA الخاص بالميثيونين مع كودون AUG وذلك فى موقع الببتيديل وبذلك يصبح الحامض الأمينى مثيونين methionine أول حامض أمينى فى سلسله عديد الببتيد التى ستبنى. وأما عن عمليه ربط ثان الأحماض الأمينية فى سلسلة عديد الببتيد فإن tRNA الثانى والذى يرتبط بحامض أمينى معين يرتبط مقابل الكودون الخاص به بالكودون التالى على جزيئ mRNA وبالتالى يصبح الحامض الأمينى

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

وبعد ذلك ينفصل تحت وحدتين الريبوسوم الصغيره والكبيره عن بعضهما وعن mRNA وذلك فى وجود نوع خاص من البروتين يسمى عامل البداية initiation factor (IF_3). توجد أعداد كبيره من الريبوسومات متصله بجزئى واحد من mRNA وتعمل فى آن واحد ويسمى ذلك التركيب بعديد الريبوسومات polysomes أو polyribosomes حيث أنه عند بروز طرف mRNA من الريبوسوم ترتبط بتحت وحده ريبوسوم أخرى صغيره تبدأ بدورها بناء عديد الببتيد وهكذا تتكرر العملية والأرتباط بالريبوسوم حتى يلتصق عدد كبير من الريبوسومات قد يصل مائه (شكل ٩٨ ـ ١٠١). كان يعتقد أن mRNA يخترق تحت الوحدة الصغرى من الريبوسوم ولكن الآن يفضل الرأى أن mRNA يوجد بين تحت الوحدتين الملتصقتين ببعضهما.



(شكل ٩٨) : خطوات تخليق البروتين. يلاحظ أن RNA الناقل مستطيل الشكل للسهولة ولكنه يتكون من ساق ورأسين أو ثلاثة وقاعده.



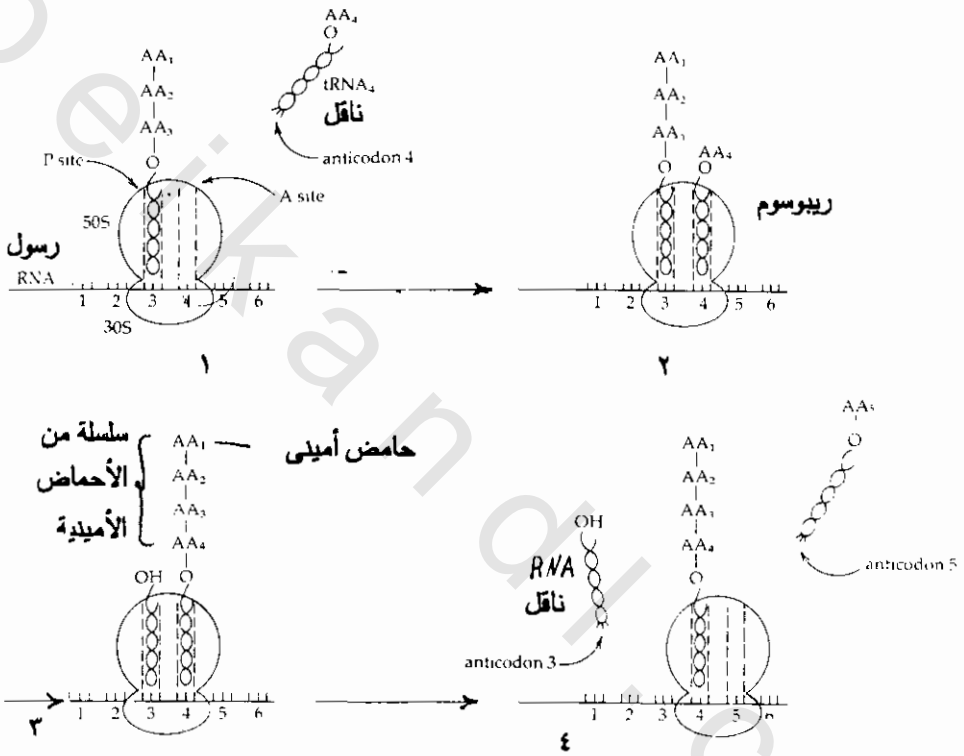
(شكل ٩٩) : خطوات تكوين بروتين الخلية

(أ) تكوين RNA رسول من DNA .

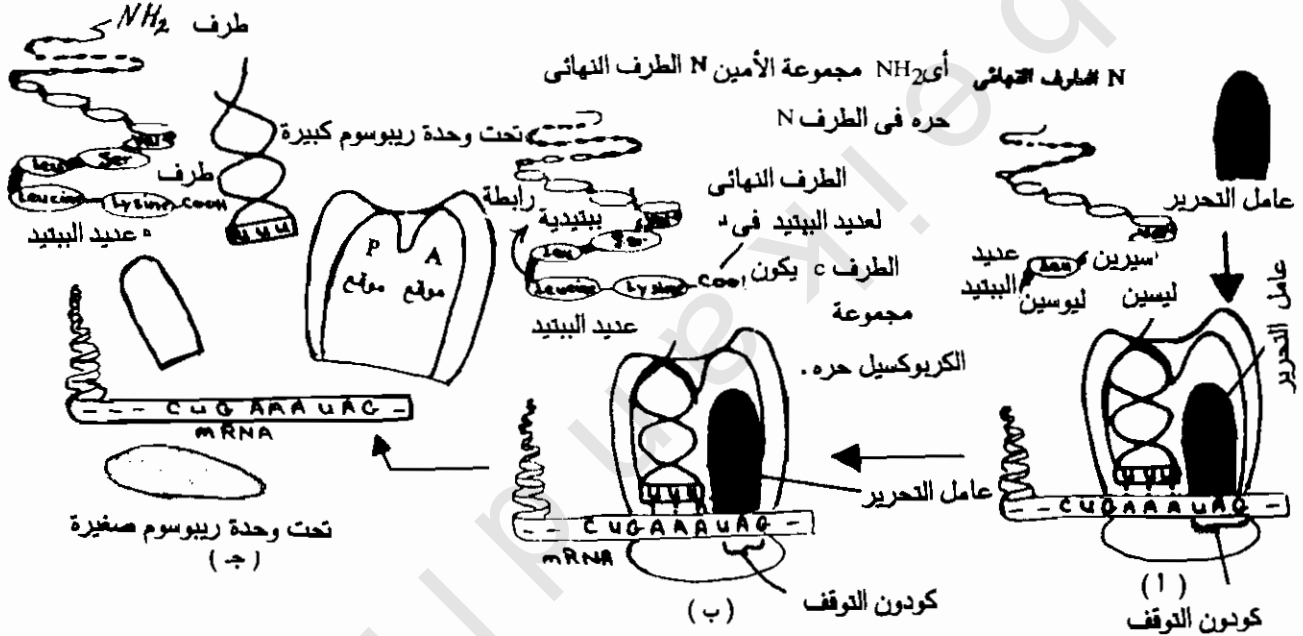
(ب) اختراق RNA رسول للريبوسوم.

(جـ) عديد الريبوسومات يكون البروتين .

(د) منظر تفصيلى لعديد الريبوسومات وتكوين البروتين.



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



(شكل ١٠١) : إنهاء تكون سلسلة عديد الببتيد.

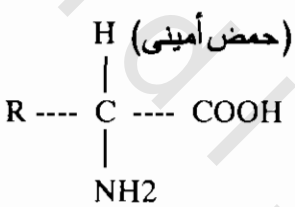
(أ) عندما يصل كودون إيقاف عند الموقع A يرتبط به عامل التحرير.

(ب) ينتهى بناء عديد الببتيد ويتحرر.

(جـ) تستقل تحت وحدات الريبوسوم عن mRNA .

خطوات تكوين البروتين

هناك خطة مشتركة لتكوين آلاف الأنواع من البروتينات التى توجد فى الأنظمة الحية، فهناك عشرون نوعا من الوحدات البنائية للبروتين هى الأحماض الأمينية، وللأحماض الأمينية العشرين تركيب أساسى واحد حيث يحتوى كل حمض أمينى على مجموعة كربوكسيلية COOH ومجموعة أمينية NH_2 يرتبطان بأول ذرة كربون، كما توجد ذرة هيدروجين تعتبر المجموعة الثالثة التى ترتبط بنفس ذرة الكربون، وفيما عدا الحمض الأمينى جلايسين glycine الذى يحتوى على ذرة هيدروجين أخرى مرتبطة بذرة الكربون الأولى فإن الأحماض الأمينية التسعة عشر الباقية تحتوى على مجموعة رابعة (R) تختلف باختلاف الحمض الأمينى، وترتبط الأحماض الأمينية مع بعضها فى وجود الإنزيمات الخاصة فى تفاعل نازع للماء بروابط ببتيدية peptide bonds لتكوين حامضين أمينيين مرتبطين ببعضهما ويسمى ثنائى الببتيد dipeptide ثم يرتبط حامض أمينى ثالث فيسمى ثلاثى الببتيد tripeptide ثم يرتبط حامض أمينى رابع فيسمى رباعى الببتيد وهكذا حتى تصبح السلسلة مكونة من أحماض أمينية عديدة فتسمى عديد الببتيدات polypeptide ويعتبر عديد الببتيدات بوليمر polymer .

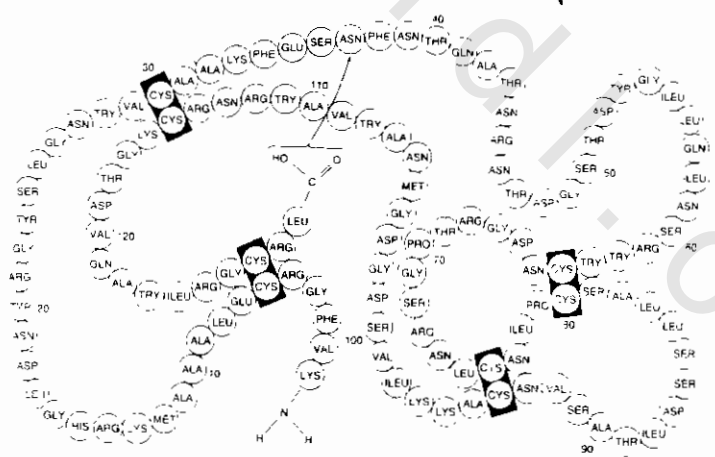


يوجد عديد الببتيد على هيئة شريط ويسمى التركيب الأولى primary structure ويكون فى هذه الحالة وهو لايزال متصل بالريبوسوم ثم يحدث بعد ذلك أن بعض أجزاء الشريط تلتف حلزونيا ويسمى هذا التركيب & - helix ويعتبر فى هذه الحالة أنه التركيب الثانوى secondary structure للبروتين. يمكن أن يحدث ذلك ولازال عديد الببتيد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

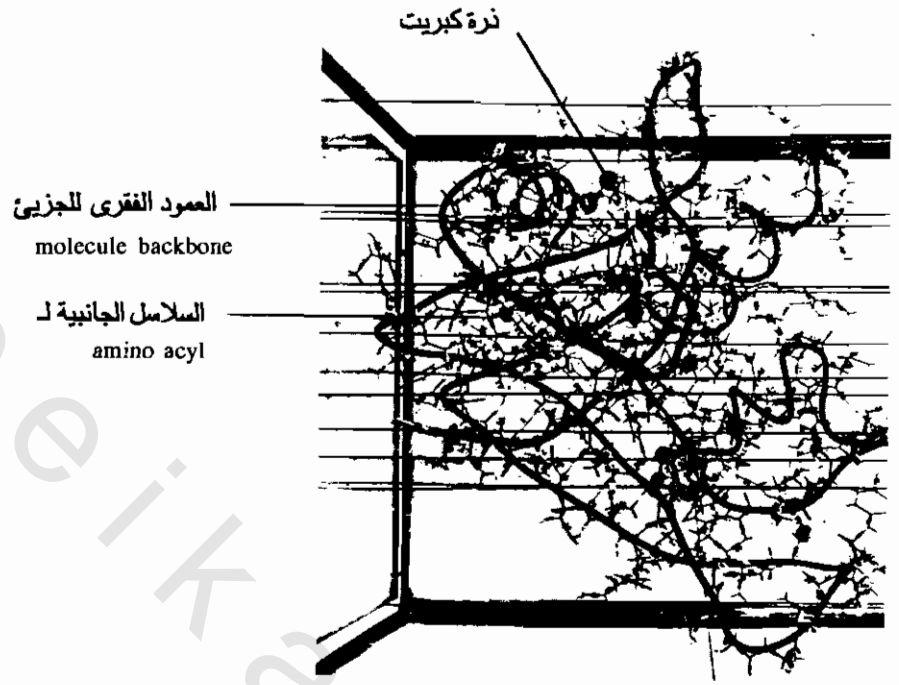
shape وقد أمكن معرفة هذا التركيب بواسطة أشعة x . فى التركيب الثالثى وبعد حدوث الألتفاف تتكون أنواع كثيرة من الروابط وأهمها disulfide bridges والروابط الكارهه للماء hydrophobic bonds والروابط الإيدروجينية hydrogen bonds . وتعمل هذه الروابط على الحفاظ على الألتفاف وشكل البروتين حيث أنه فى عدم وجود هذه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

يمكن أن يتكون التركيب الرباعى للبروتين the quaternary structure of a protein وذلك بأتحاد أكثر من عديد الببتيد أى يكون أثنين أو ثلاثة أو أكثر ويكون لكل عديد الببتيد على حده التركيب الإبتدائى والثانوى والثالثى الخاص به ومثال ذلك بروتين أنزيم جلوتاميك ديهيدروجينيز.

تختلف البروتينات فى ترتيب ونوع وعدد الأحماض الأمينية الداخلة فى التركيب الأولى وأن التركيب الأولى هو الذى يحدد مواصفات التركيب الثانوى والثالثى وأيضا الرباعى إن وجد. يتضح أن الجينات تتحكم فى التركيب الأولى ولذلك فإن الجنيات تتحكم فى تركيب البروتين (شكل ١٠٢، ١٠٣).



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



(شكل ١٠٣): جزيئ بروتين ذو ثلاث أبعاد وهو عبارة عن أنزيم ribonuclease . العمود الفقرى للجزيئ وهو سلسلة عديد الببتيدات polypeptide عبارة الخط الأسود الثقيل وأما عن السلاسل الجانبية لـ amino acyl عبارة عن الخطوط الرفيعة وذرات الكبريت عبارة عن شكل كروى تكون أربعة disulfide bridges .

توجد أنواع كثيرة من البروتين فى الكائنات الحية ويمكن تصنيفها إلى مجموعتين كما يأتى :

١ ـ البروتينات التركيبية Structural Proteins :

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

أما البروتينات الهستونية فهى مجموعة محددة من البروتينات التركيبية توجد فى النواه، والهستونات بروتينات صغيرة تحتوى على قدر كبير من الحمضين الأمينيين القاعديين أرجلين Arginine وليسين Lysine ، وتحمل المجموعة الجانبية (R) لهذين الحمضين الأمينيين عند الأس الهيدروجينى (pH) للخلية شحنات موجبة. وعلى ذلك فهى ترتبط بقوة بمجموعات الفوسفات الموجودة فى جزئ DNA والتى تحتوى على شحنات سالبة، وتوجد الهستونات بكميات ضخمة فى كروماتين أى خلية.

٢ ـ البروتينات التنظيمية Regulatory Proteins :

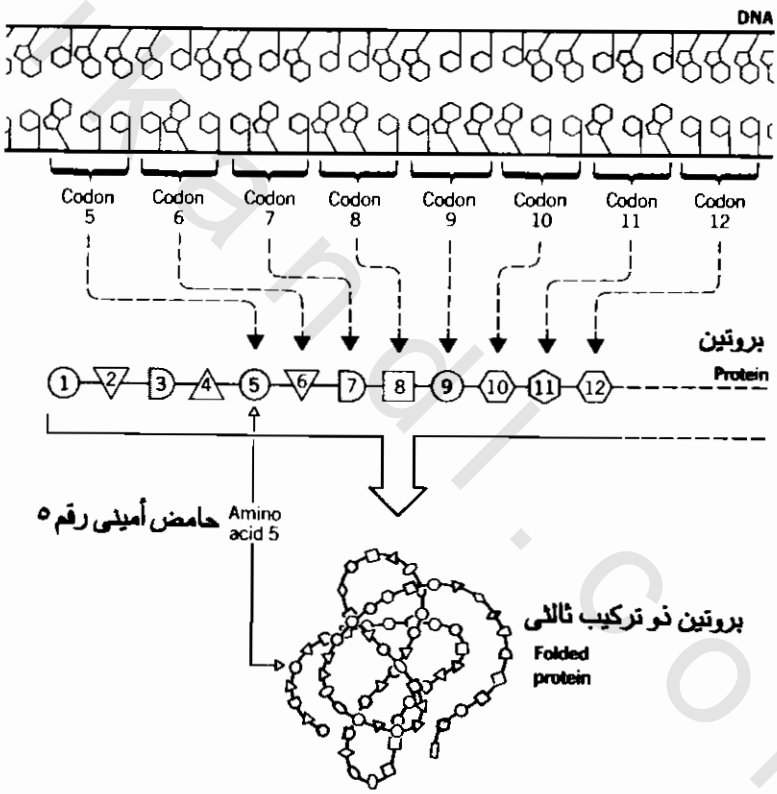
أى التى تنظم العديد من عمليات وأنشطة الكائن الحى، وهى تشمل الإنزيمات التى تعدل التفاعلات الكيميائية بالكائنات الحية والأجسام المضادة التى تعطى الجسم مناعة ضد الأجسام الغريبة والهرمونات وغير ذلك من المواد التى تمكن الكائنات الحية من الاستجابة للتغير المستمر فى البيئة الداخلية والخارجية.

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

ملخص لعملية تخليق البروتين

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

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



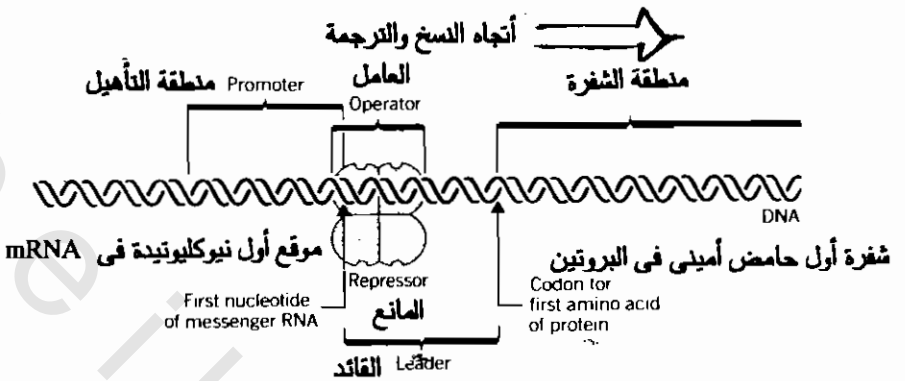
(شكل ١٠٤) : خطوات تخليق البروتين من DNA .

التثبيط والتوهين

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

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

تأثيره (شكل ١٠٥) أى أنه يمنع تكون الرسالة الخاصة بتكوين أنزيم اللاكتيز وبمعنى آخر

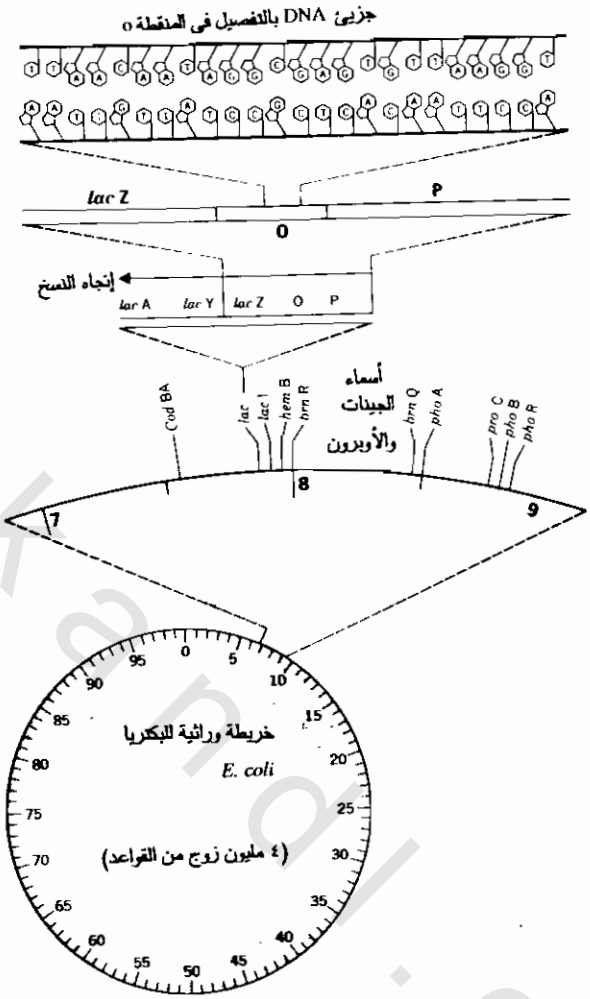


(شكل ١٠٥) : التحكم فى إبراز صفة الجين بواسطة gene expression repressor

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

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

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



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

P أى pormoter وهى المنطقة التى فيها بإنزيم RNA polymerase يرتبط بجزيئ DNA أما عن O أى operator وهى المنطقة التى فيها يرتبط repressor بالجزيئ. Lac Z هى عبارة عن الجين المسئول عن تكوين الأنزيم الذى يحلل اللاكتوز. ترتيب النيوكليوتيدات فى DNA فى الجين الخاص بسكر اللاكتوز معروف تماما. أعلى الرسم جزيئ تفصيلى لمنطقة O على الكروموسوم البكتيرى.

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

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

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

الأنزيمات والهندسة الوراثية

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

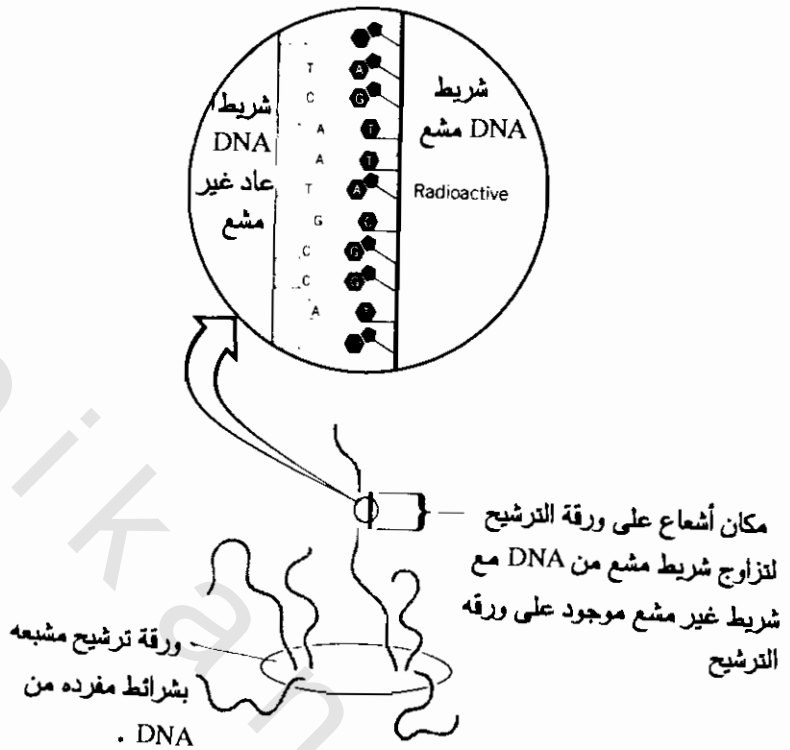
بعد عملية الإستخلاص يجب تنقية الأنزيم ويكون ذلك عادة بواسطة طريقة العمود للتحليل الكروماتوجرافى column chromatography . حيث توجد أنبوبة زجاجية رأسية مفتوحة من أسفل ممتلئة بمواد صلبة معينة فقد تكون نوع معين من سليكا جل silica gel أو مسحوق الورق ground - up paper المعامل كيماويا آلخ. ثم يصب السائل الناتج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

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

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

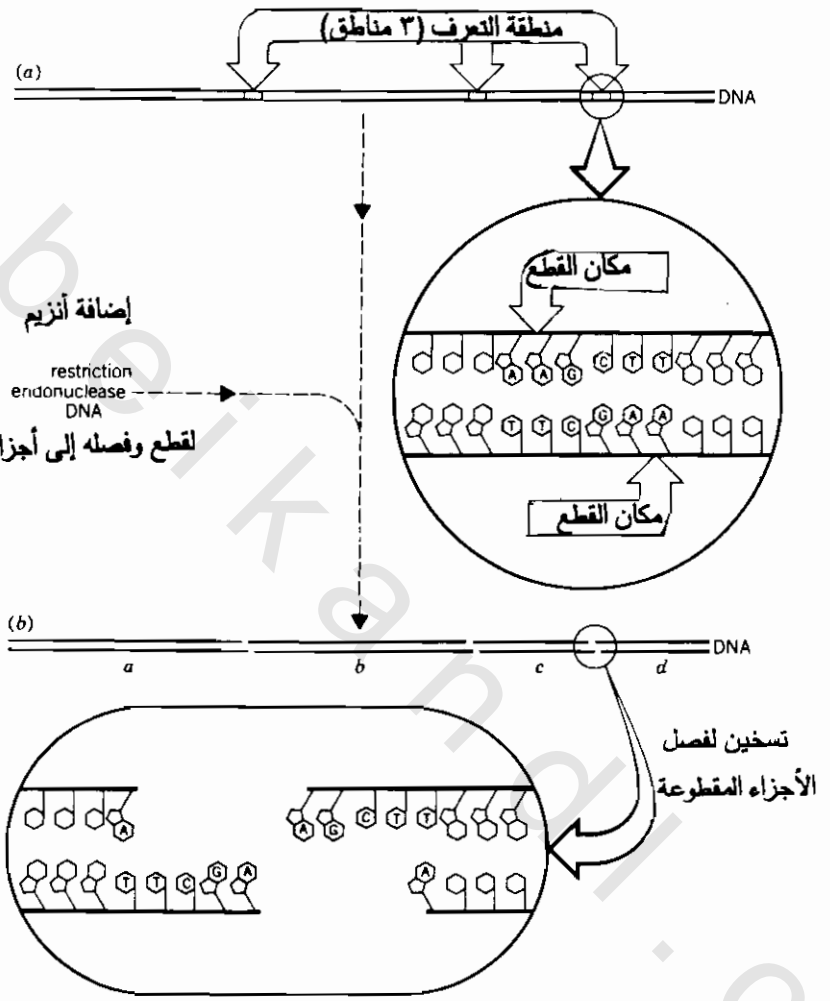
أنزيمات القطع (التجزيئ) Restriction Endonucleases

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



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

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



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

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

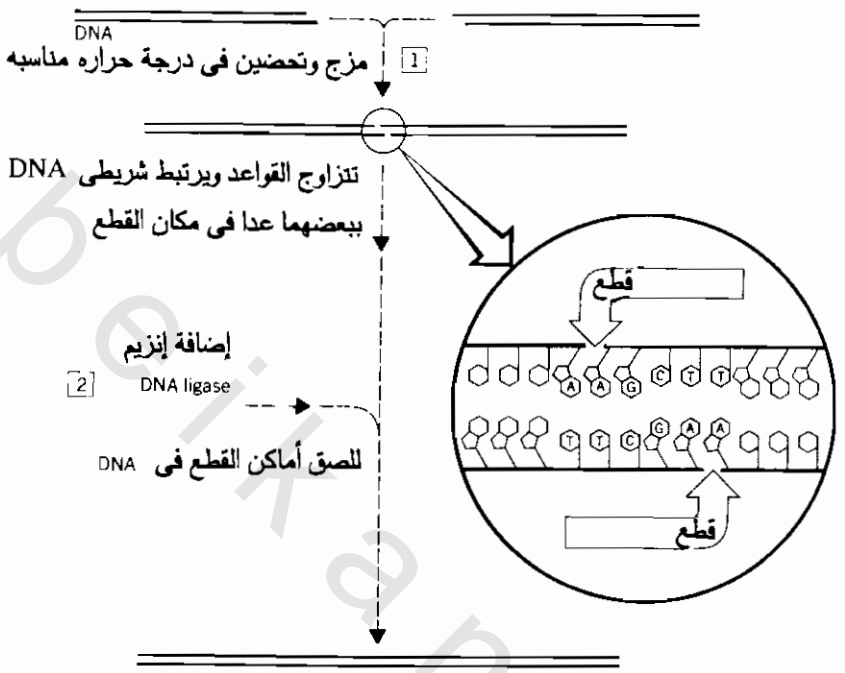
توجد أنواع عديدة من هذه الأنزيمات ـ أى أنزيمات قطع الـ DNA ـ والتى تختلف فيما بينها فى نوع تتابع النيوكليوتيدات الذى تعمل عليه recognition sequences . حيث أن كل أنزيم يعمل على نوع من التتابع معين ويساعد ذلك فى قطع جزيئ DNA إلى أجزاء عديدة وفى مناطق كثيرة تبعا لنوع الأنزيمات المستعملة وبذلك يمكن التحكم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

إنزيمات الربط (الألتحام) Ligases

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

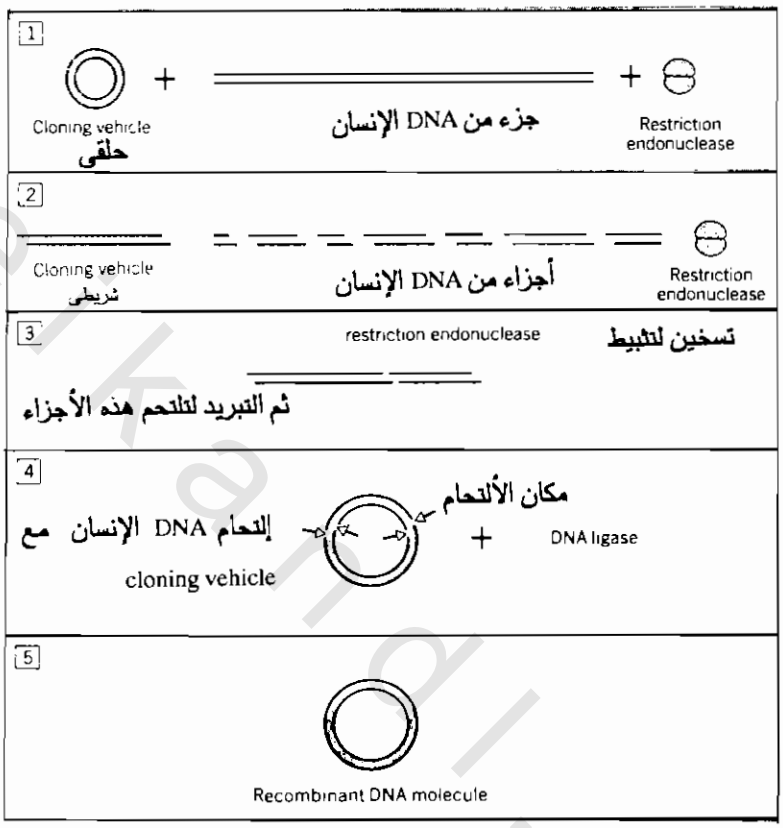
القطع والإلتحام Cutting and Splicing

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



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

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



(شكل ١١٠) : تكوين recombinant جزيئ DNA .

١ ـ جزء من DNA الإنسان و cloning vehicle وأنزيم R. E. .

٢ ـ قطع فى cloning vehicle ليصبح شريطى وتجزيئ DNA الإنسان إلى أجزاء كثيرة فى وجود إنزيم R. E. وجميع هذه الأجزاء لها أطراف لزجة.

٣ ـ التسخين الهين والتبريد يمكن أن تلتقى وتلتصق أجزاء من DNA الإنسان مع cloning vehicle .

٤ ـ إلتحام DNA و cloning vehicle تماما فى وجود DNA ligase فى أماكن الأطراف اللزجة.

٥ ـ تكوين جزيئ حلقى من cloning vehicle و DNA الإنسان أى recombinant.

المجسات The Probes

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

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

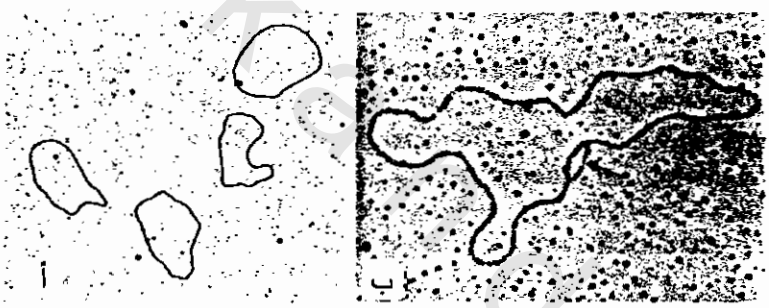
على هذا الأنزيم بتنقية فيروسات RNA مسببة الأورام RNA tumor viruses . ينتج عن ذلك الأنزيم خيط واحد من DNA ثم يعامل الأخير بأنزيم البلمرة DNA polymerase فينتج الخيط الآخر لجزيئ DNA . وحيث أن DNA الناتج بهذه الطريقة يمكن الحصول عليه عمليا من تجارب فى أنبوبة الإختبار والذى يسمى DNA تكميلى complementary DNA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

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

البلازميدات Plasmids

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

أتساع وقطر الحلقة وعدد الجينات التى تحتويها. بعض البلازميدات الصغيرة تتكون من ٥٠٠٠ نيوكليوتيد (زوج) ـ خمسة آلاف ـ وهى كافية لتكوين خمسة أنواع من البروتين متوسطة الحجم. يستعمل ويفضل هذا البلازميد الصغير فى الهندسة الوراثية وفى نقل الجينات. يتضح صغر حجم هذا البلازميد بالمقارنة بالكروموسوم البكتيرى فى E. coli حيث أن DNA هذه البكتيريا يتكون من أربعة مليون زوج من النيوكليوتيدات وقد يزيد قليلا وأما فى جسم الإنسان فإنه توجد أربعة بلايين زوج من النيوكليوتيدات فى نواه الخلية. توجد بلازميدات كبيرة الحجم وهى قابلة للإنتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى ولكنها غير مفضلة للعمل بها فى الهندسة الوراثية ونقل الجينات لصعوبة التعامل معها وذلك طبعا لكبر حجمها (شكل١١١).



(شكل١١١) :البلازميدات

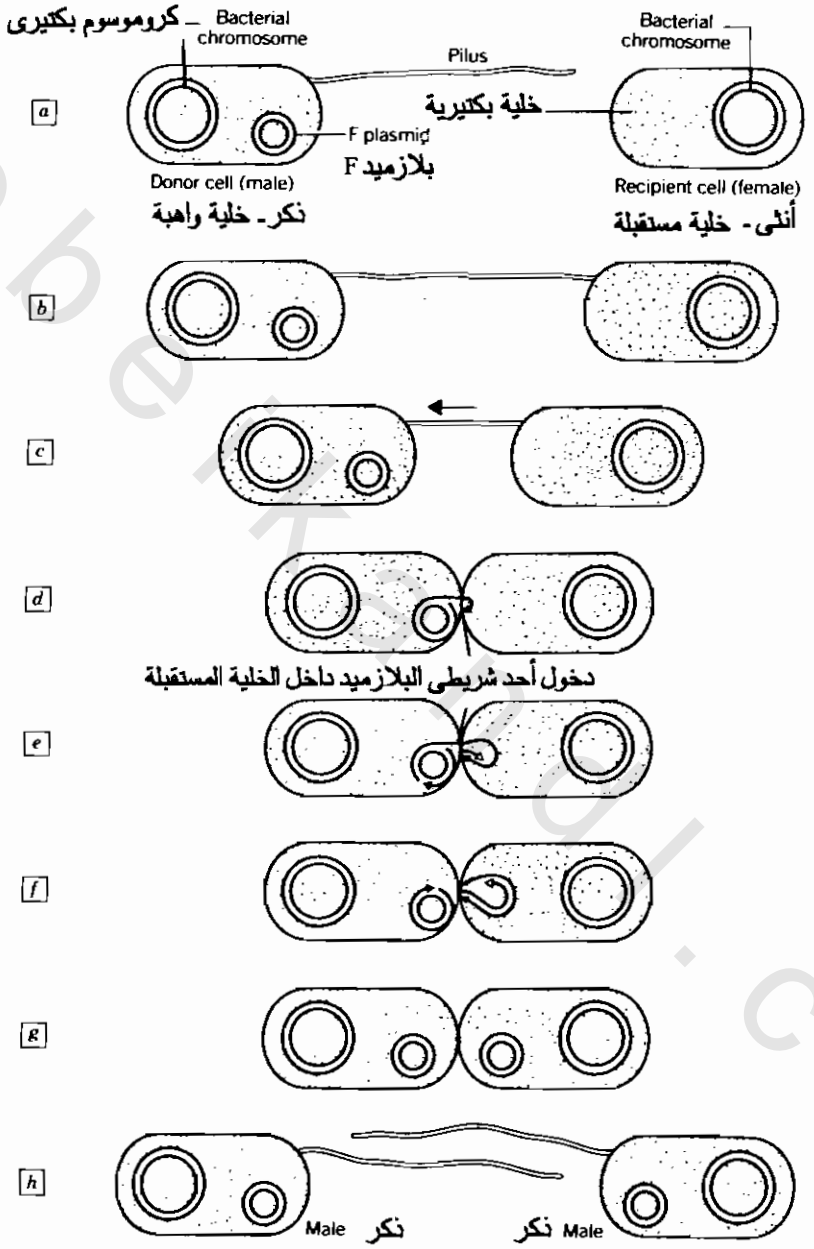
أ ـ أربعة بلازميدات.

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

أتضح أن العامل F يوجد فى خلية الذكر فى السيتوبلازم وقد سمى F particle ويتبع فى وراثته الوراثة السيتوبلازمية وينقسم مستقلا عن الكروموسوم. وفى بعض الأحيان القليلة قد يوجد بالكروموسوم ويسمى F factor العامل F ويعتبر كجزء مكمل للكروموسوم وتبعا لذلك ينقسم تبعا لانقسام الكروموسوم . وقد وجد أن ألتحام العامل F بالكروموسوم وإنفصاله ليصبح موجود بالسيتوبلازم وغير مرتبط بالكروموسوم يحدث عكسيا فى مناطق عديدة من الكروموسوم. أحيانا نجد أن المستعمرات الناتجة من خلية واحدة فيها F particle موجود فى

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

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



(شكل ١١٢) : خطوات تزاوج خليتين بكتيريتين أحدهما مذكره والأخرى مؤنثة.

تعتبر البلازميدات القابلة للإنتقال transmissible plasmids غير مفضلة كحاملات وناقلات للجنيات cloning vehicles لأنها يمكن أن تؤدى إلى حوادث أو أضرار للإنسان. حيث أن سلالات البكتيريا *E. coli* المستعملة فى المعاملة تكون أداه جيده للدراسة الوراثية لأنها تحتوى على طفرات تجعلها ينقصها حامض أمينى أو أكثر أو فيتامين أو أكثر ولذلك فإن هذه السلالات تكون ضعيفة. ونتيجةلذلك فإن هذه السلالات لا يمكنها المعيشة طبيعيا خارج المعمل. وعامة سلالات المعمل من هذه البكتيريا تكون غير قادرة على عمل إصابة للإنسان حيث أنه توجد سلالات عادية من هذه البكتريا يمكن أن تسبب ضرر للإنسان فى الجهاز الهضمى. تسمى السلالات العادية دائما بالسلالات البرية wild strains . ليست كل السلالات العادية ممرضة للإنسان بل بعض منها فقط.

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

أستخدام البلازميدات فى الهندسة الوراثية ونقل الصفات الوراثية :

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

١ ـ خلايا بكتيرية لا تحتوى على أى بلازميد.

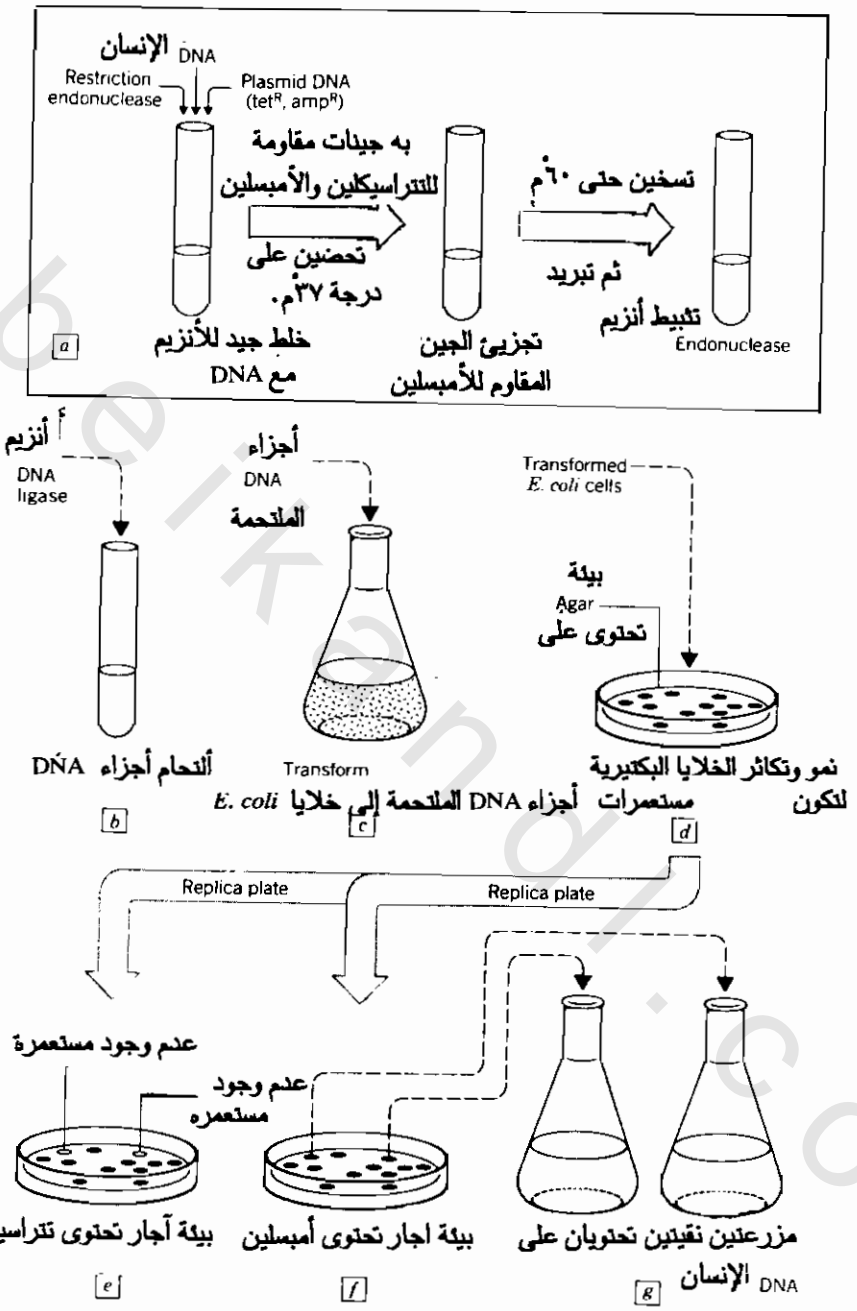
٢ ـ خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير لا يحتوى على DNA من الإنسان.

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

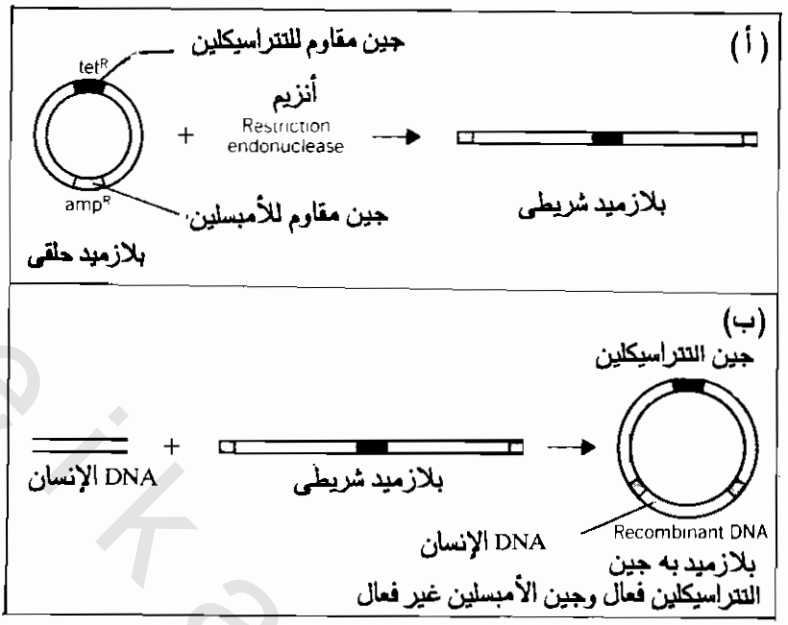
٤ ـ خلايا بكتيرية تحتوى على DNA بلازميد وهذا الأخير يحتوى DNA الإنسان كما يحتوى الجين المطلوب.

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

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



(شكل ١١٣) : طريقة للحصول على مزارع نقية من البكتريا تحتوى على DNA الإنسان cloned human DNA

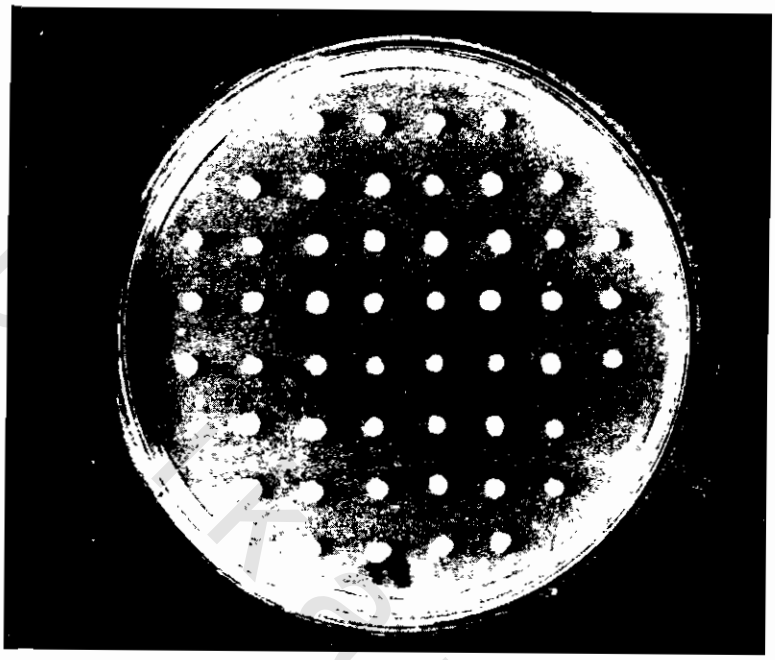


(شكل ١١٤) : تثبيط الجين

أ ـ بلازميد حلقى به جين مقاوم للتتراسيكلين وجين مقاومة للأمبسيلين. وفى وجود أنزيم R. E. يصبح البلازميد شريطى.

ب ـ جزء من DNA الإنسان إلتحم بالبلازميد فى منتصف منطقة الجين المقاومة للأمبسلين وسبب ذلك فصل منطقة الجين إلى جزئين وبذلك يصبح الجين مثبط وغير فعال فى أظهار الصفة.

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



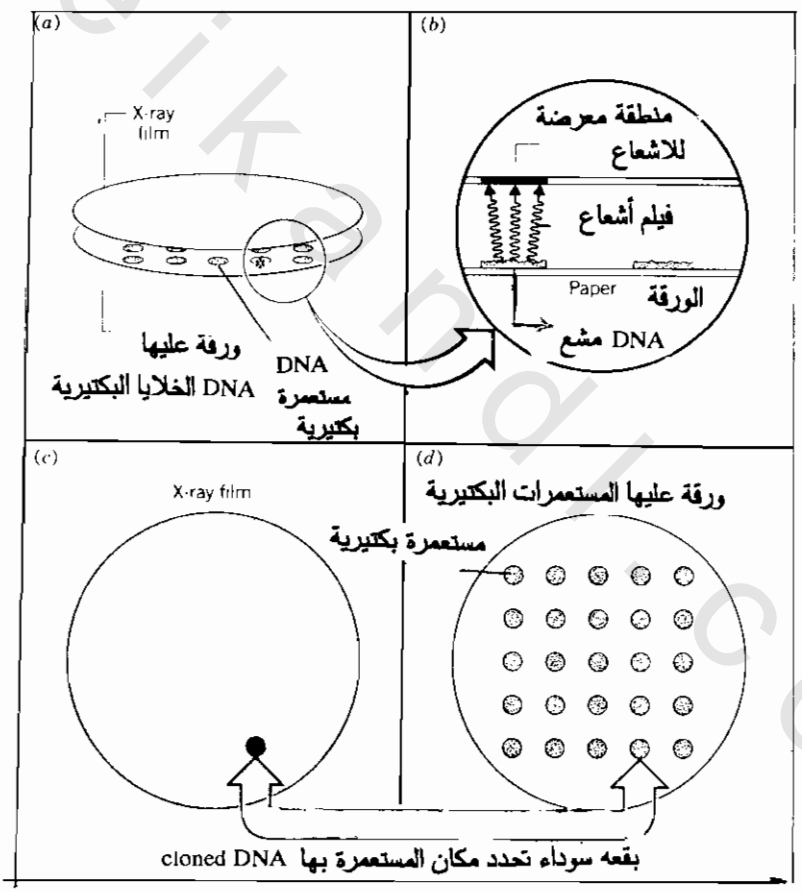
(شكل ١١٥) : طبق بترى يحتوى على بيئة آجار عليها مستعمرات بكتيرية مرتبة فى صفوف grid pattern.

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

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

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

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



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

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

تخليق الأنسولين بواسطة البكتريا:

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

كيفية فصل DNA البلازميد والجين المنقول :

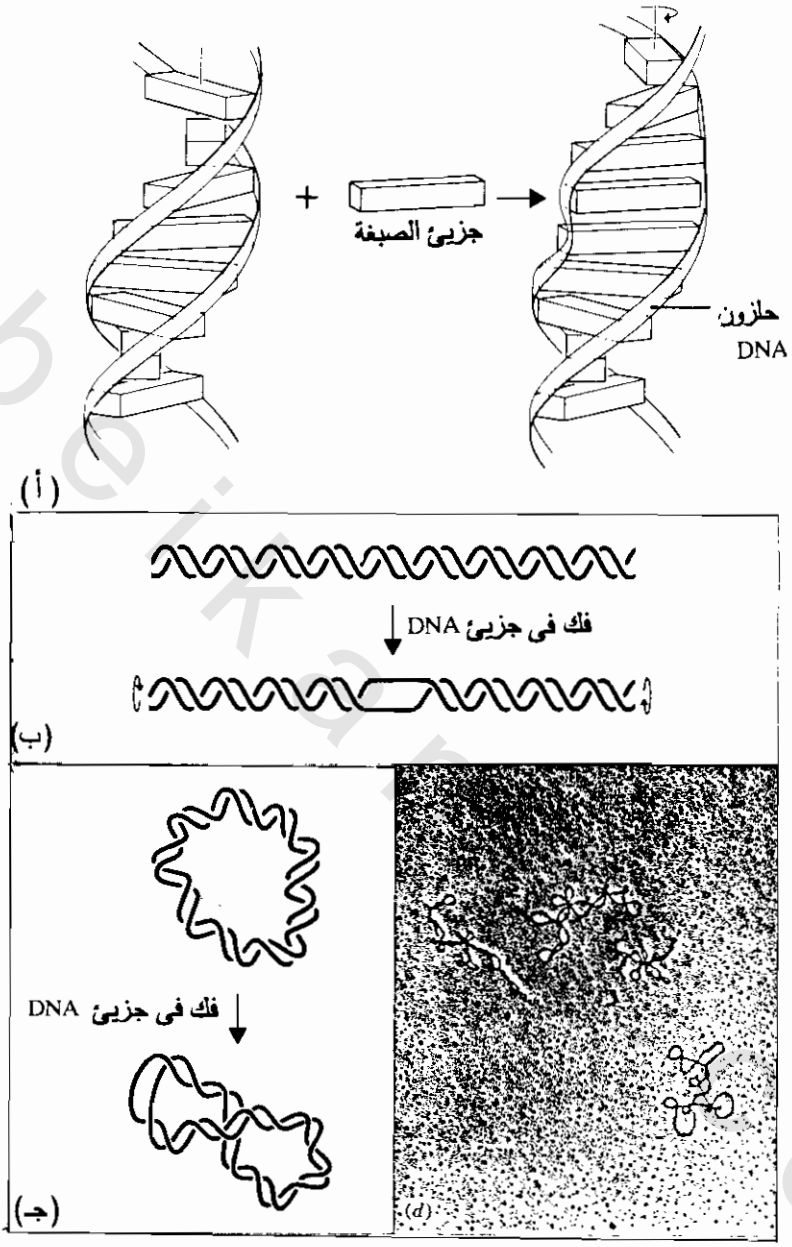
فى التجربة السابقة وبعد الحصول على بلايين من الخلايا البكترية التى تحتوى جين الإنسان والنامية على بيئة سائلة broth فإنه يمكن فصل DNA البلازميد عن DNA الجين

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

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

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

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



(شكل ١١٧) : تداخل الصبغة فى داخل حلزونين DNA .

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

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

الفاج البكتيرى Bacteriophages

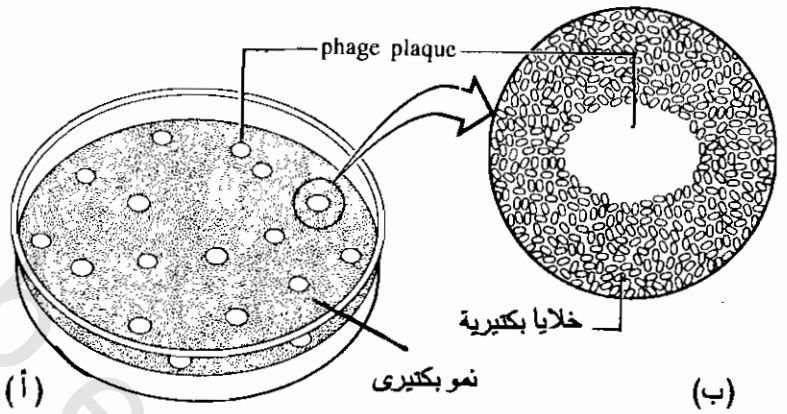
تعتبر البكتيريوفاجات فيروسات تصيب البكتيريا وتسمى أيضا بالفاج phages . يحتوى DNA الفاج على جينات تتحكم فى بناء البروتين والذى يكون غلاف يحيط بـ DNA . وبالرغم من إحتواء الفاج على بروتين إلا أنه غير قادر على تخليقه ذاتيا حيث لا يوجد بالفاج الأجزاء اللازمة لبناء البروتين ومثال ذلك الريبوسومات ولذلك فإنه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

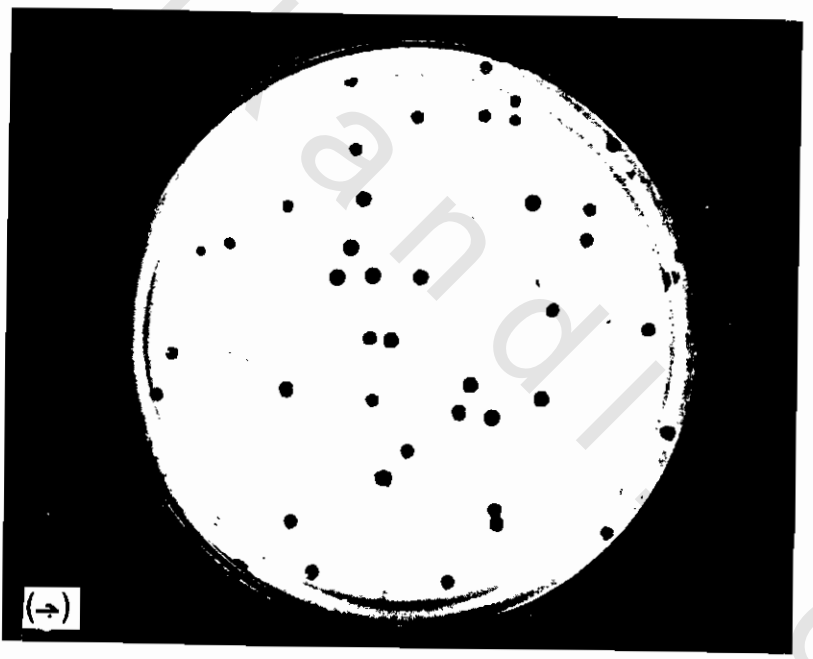
وذلك بإستعمال ريبوسومات الخلية البكتيرية. بعض أنواع الفاج وفى المراحل الأولى بعد إصابة الخلية البكتيرية فإنها تكون أنواع من البروتينات تسبب تحطيم DNA الخلية البكتيرية وتجزئته إلى أجزاء صغيرة. ولذلك تموت الخلايا البكتيرية. بعض أنواع الفاج بها جينات خاصة بها ويمكنها أن تكون إنزيم بلمرة RNA (RNA polymerase)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

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

وتغطى سطح الآجار. وبعد أن يغطى سطح البيئة تماما بالخلايا البكتيرية تتوقف الخلايا عن التكاثر وأيضا يتوقف الفاج عن التكاثر لأنه معتمد على الخلايا البكتيرية. وفى النهاية توجد بعض الحفر holes المستديرة فى سطح النمو البكتيرى وهذه تحتوى على خلايا ميتة نتيجة لتأثير الفاج وتسمى plaques . يعتبر كل plaque ناتج من فاج واحد عادة. يكون قطر plaque حوالى ٣ ـ ٤مم. يمكن تعريب كلمة plaque أى مكان وجود الفاج وموت الخلايا البكتيرية (شكل ١١٨).

عند أدخال جزء من DNA إلى DNA الفاج ثم يلتحم هذا DNA مع DNA الفاج دون أى تأثير ضار على DNA الفاج فإن هذا الـ DNA سيتكاثر مع DNA الفاج عادى. يمكن لمهندس الوراثة أن يحدد الـ plaque المحتوى على DNA المنقول وذلك بإستخدام مجس معلم وذلك بإستخدام توافق القواعد النيتروجينية المكملة لبعضها فى المجس والـ DNA المنقول أو الجين تحت الدراسة. وبعد التعرف على plaque المطلوب يتم غمس أبره التلقيح البكتيرية ذات العقدة فى plaque وينتج عن ذلك إلتصاق بعض الفاج بالأبره ثم يتم غمس عقده الأبرة فى المزرعة البكتيرية وينتج إنتقال جزئيات الفاج إلى خلايا المزرعة البكتيرية. يصيب الفاج خلايا البكتيريا وهكذا تتكون أعداد هائلة من الفاج نتيجة لتكاثر الخلايا البكتيرية وتكوين ملايين من الخلايا. ولذلك فإن الجين تحت الدراسة يتواجد بداخل الفاج وبكميات هائلة حيث أن الفاج يتكون بكميات هائلة. يمكن بعد ذلك فصل وتنقية DNA الفاج عن بروتين الفاج وعن بقايا الخلايا البكتيرية وذلك بطريقة الكثافة النسبية مع قوة الطرد المركزى density gradient centrifugation كما سبق ذكره تماما فى فصل البلازميدات. ولا نحتاج فى هذه الحالة إلى أى نوع من الصبغات حيث أن الكثافة النسبية للبروتين، DNA للفاج مختلفة تماما. يتم وضع الفاج فى أنبوبة بها ملح ثقيل heavy salt مثل كلوريد السيزيوم وتوضع فى جهاز الطرد المركزى حيث يتم عمل عملية الطرد المركزى لمدة يوم على سرعة ٢٥٫٠٠٠ لفة فى الدقيقة وبعد إنتهاء عملية الطرد المركزى يمكن فصل الفاج عن DNA البكتيريا وعن مكونات الخلايا البكتيرية الأخرى حيث يظهر الفاج (شكل ١١٩) عند تعريض الأنبوبة للأشعة فوق البنفسجية على هيئة حزمة أى خط فى الأنبوبة بلون متعدد opalescent نتيجة لعملية فلوره الضوء. يمكن سحب هذه الحزمة band بواسطة ماصة. ثم يجرى إعادة عملية الطرد المركزى بسرعات مختلفة لفصل بروتين ، DNA عن بعضها. وفى أثناء عملية الطرد المركزى تجرى ملئ الجزء العلوى من الأنبوبة بواسطة زيت معدنى وذلك لعدم تحطيم أو أنبعاج الأنبوبة البلاستيك أثناء عملية الطرد المركزى.



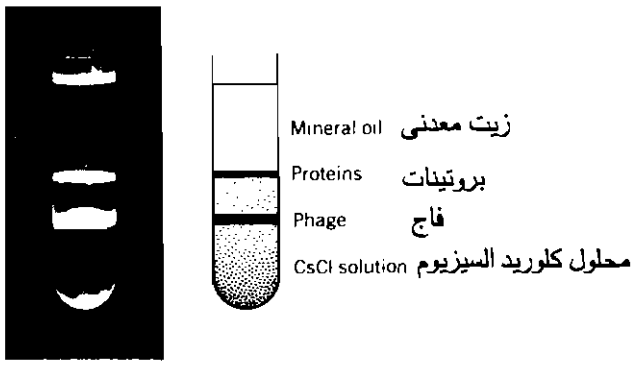


(شكل ١١٨) : Phage plaques

أ- طبق بترى به نمو بكتيرى على بيئة وبه plaques .

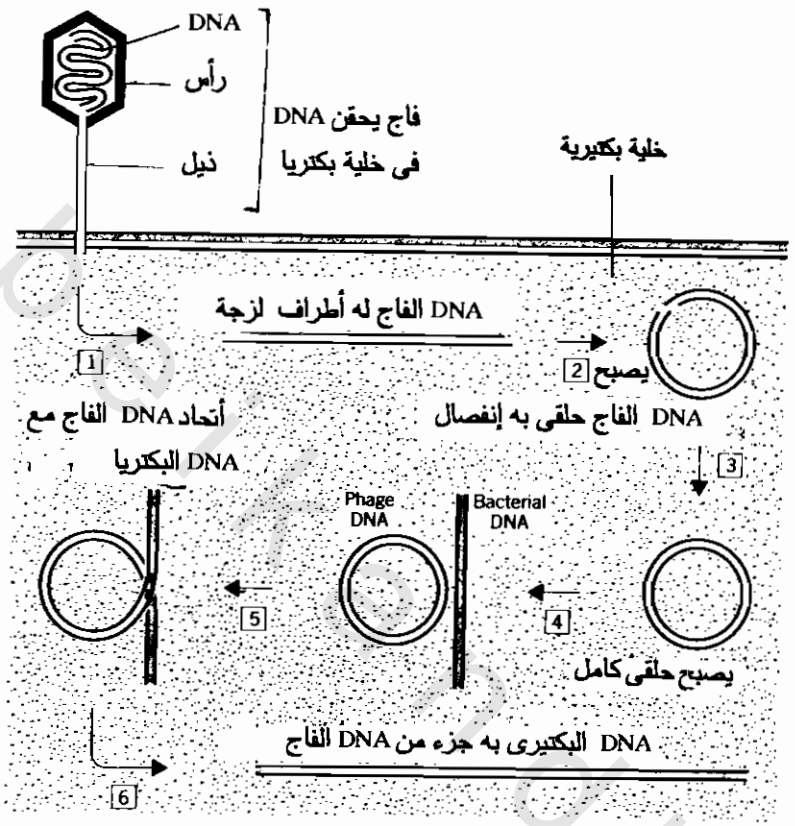
ب- plaque مكبر.

جـ- طبق بترى به نمو بكتيرى على بيئة و plaques غامقة.



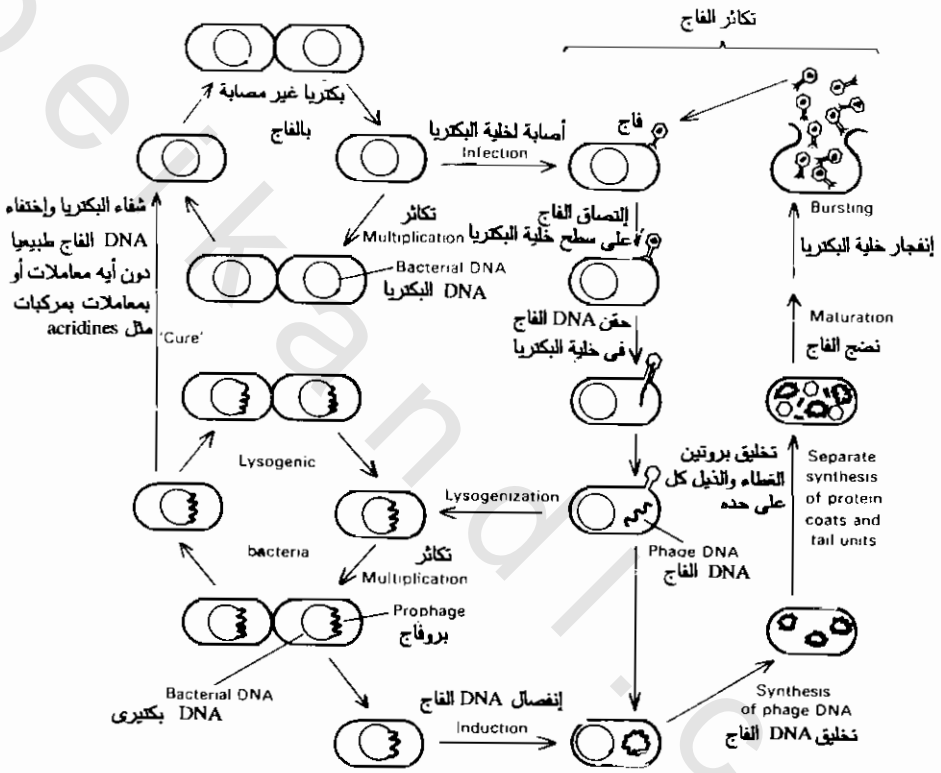
(شكل ١١٩) : المحتويات المختلفة بعد عملية الطرد المركزى فى أنبوبة طرد مركزى لمخلوط من الفاج والبروتينات ومحلول كلوريد السيزيوم وزيت معدنى.

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



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

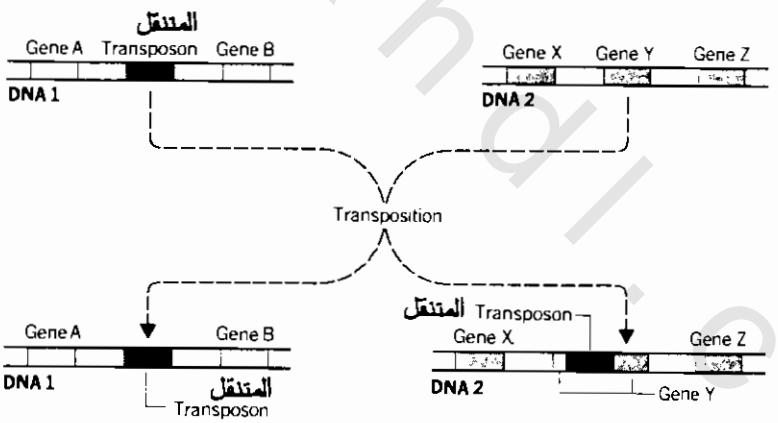
أكثار خلية lysogen للحصول على أعداد هائلة فلكية من خلايا البكتريا lysogen الحاملة للجين الجديد. وعند عمل مناطق منظمة regulatory regions على الجين الجديد أى أنها مناطق من DNA يمكن بها التحكم فى بدء نشاط الجين وإظهار تأثيره turn on وأيضا يمكن بها التحكم فى توقف نشاطه turn off. يمكن عمل ذلك بكفاءة عالية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



(شكل ١٢١) : خطوات تكاثر الفاج و Lysogenization

المتنقلات Transposons

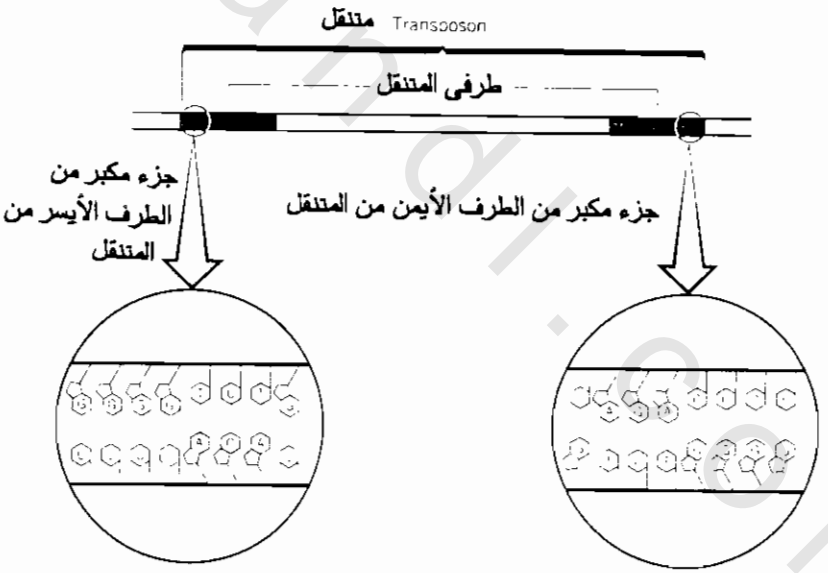
يمكن لمهندس الوراثة نقل جين أو جينات أو DNA من مكان إلى مكان آخر على جزيئ DNA آخر. يمكن أن يحدث ذلك طبيعيا فى جينات خلايا الكائنات الحية. حيث توجد أجزاء متصلة من DNA يمكن أن تضاعف نفسها وأن هذه الأجزاء الجديدة المكررة من DNA يمكن أن تنتقل وتلتصق بجزئى DNA آخر. يسمى هذا الجزء المنتقل من DNA والذى يتكون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



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

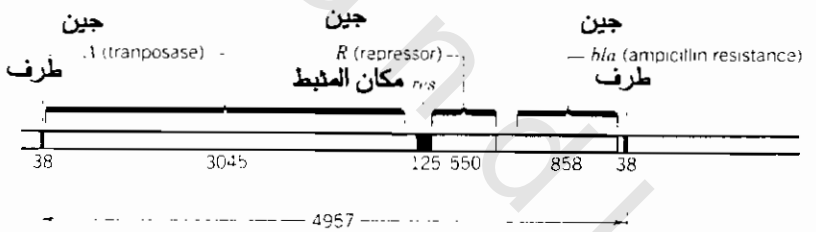
توجد المتنقلات فى مجموعات كبيرة من الكائنات الحية ويمكن القول أن جميع الكائنات الحية تحتوى المتنقلات. تتميز هذه المتنقلات فى جميع الكائنات الحية المختلفة بثلاث

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



(شكل ١٢٣) : المتنقل وتركيب طرفيه

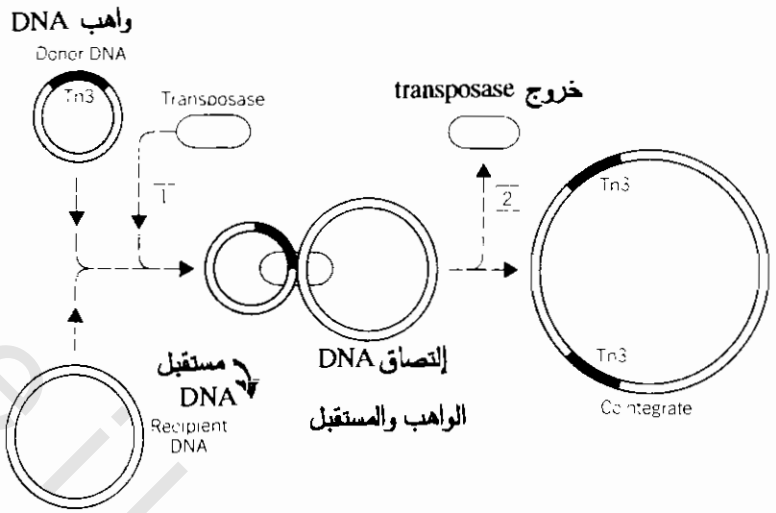
تختلف عملية نقل المكان transposition للمتنقلات فهى تختلف فى التفاصيل الجزيئية من متنقل إلى آخر. سيتم وصف هذه العملية فى أحد المتنقلات وهو Tn 3 . يوجد هذا المتنقل فى خلايا البكتيريا ويحتوى على ثلاث جينات وهى A و R و bla (شكل ١٢٤) وبالأضافة إلى ذلك يوجد ثمانية وثلاثون زوج من القواعد النووية فى أحد الطرفين ويوجد نفس العدد فى الطرف الآخر ولكن مرتبة بطريقة عكسية أى مقلوبة بالنسبة للطرف الآخر. يكون الجين bla بروتين يفسد الأمبسيللين ولذلك فإن أى خلية بكتيرية تحتوى Tn 3 تكون مقاومة للأمبسيللين. يكون الجين A بروتين يسمى transposase وهو مسئول عن إنتقال وحركة Tn 3 . عند إزالة الجين A فإن Tn 3 تكون غير قادرة على الحركة. يكون الجين R مثبط والذى يرتبط بالجين A ويمنعه من تكوين transposase ويسمى المثبط repressor . ولذلك فإن المثبط والذى يتكون من البروتين يؤثر على حركة المتنقلات ويقلل إلى حد ما من درجة حدوثها. عند منع نشاط جين R وذلك نتيجة لحدوث طفرة فى هذا الجين فإن الخطوة الأولى فى حدوث عملية نقل المكان للمتنقل Tn 3 تزداد كثيرا.



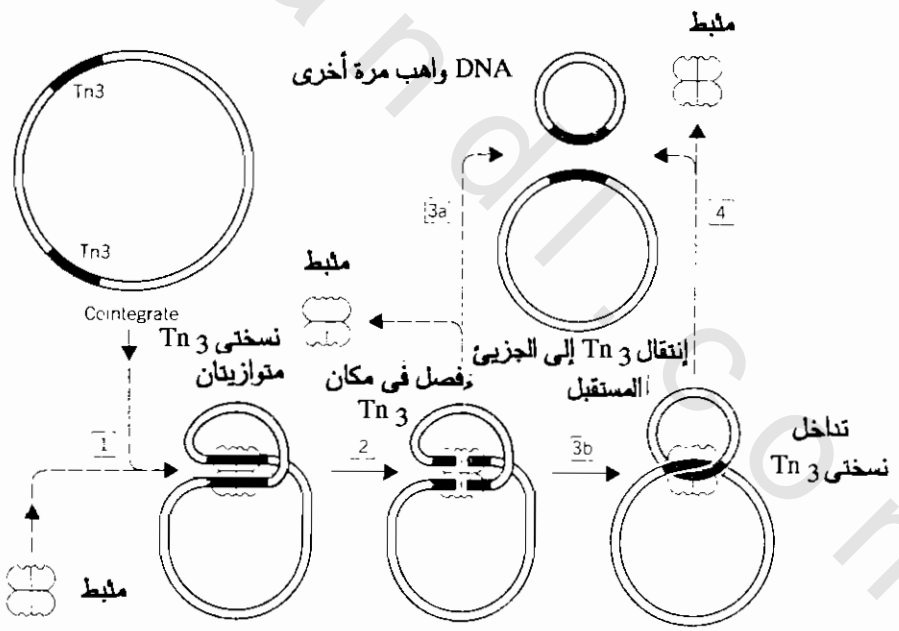
(شكل ١٢٤) : تركيب المتنقل

يحتوى Tn 3 على ثلاث جينات ومكان res هو مكان إلتصاق المثبط بالمتنقل. توضح الأرقام عدد الديوكليوتيدات فى كل جزء.

تحدث عملية نقل المكان فى المتنقل فى خطوتين (شكل ١٢٥، ١٢٦). وفى الخطوة الأولى تحدث عملية إلتصاق أو ألتحام بين جزيئ DNA المحتوى على المتنقل Tn 3 وبين جزيئ DNA آخر لا يحتوى على Tn 3 . يسمى الجزيئ المعطى للمتنقل بالـ DNA الواهب donor ويسمى الجزيئ المستقبل للمتنقل باسم DNA المستقبل recipient . يتوسط هذه الخطوة وجود بروتين transposase . ثم يتضاعف أى يتكرر جزيئ Tn 3 بواسطة أنزيم DNA polymerase ويتم إلتحام طرفى الجزيئ الواهب بطرفى الجزيئ المستقبل لتتكون حلقة كبيرة تسمى



(شكل ١٢٥) : خطوات تكوين cointegrate



(شكل ١٢٦) : خطوات حدوث recombination من الـ cointegrate

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

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

إضافة المتنقلات تقلل إلى حد ما من هذا النشاط الزائد للجينات ويتم الشفاء من المرض الوراثى.

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

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

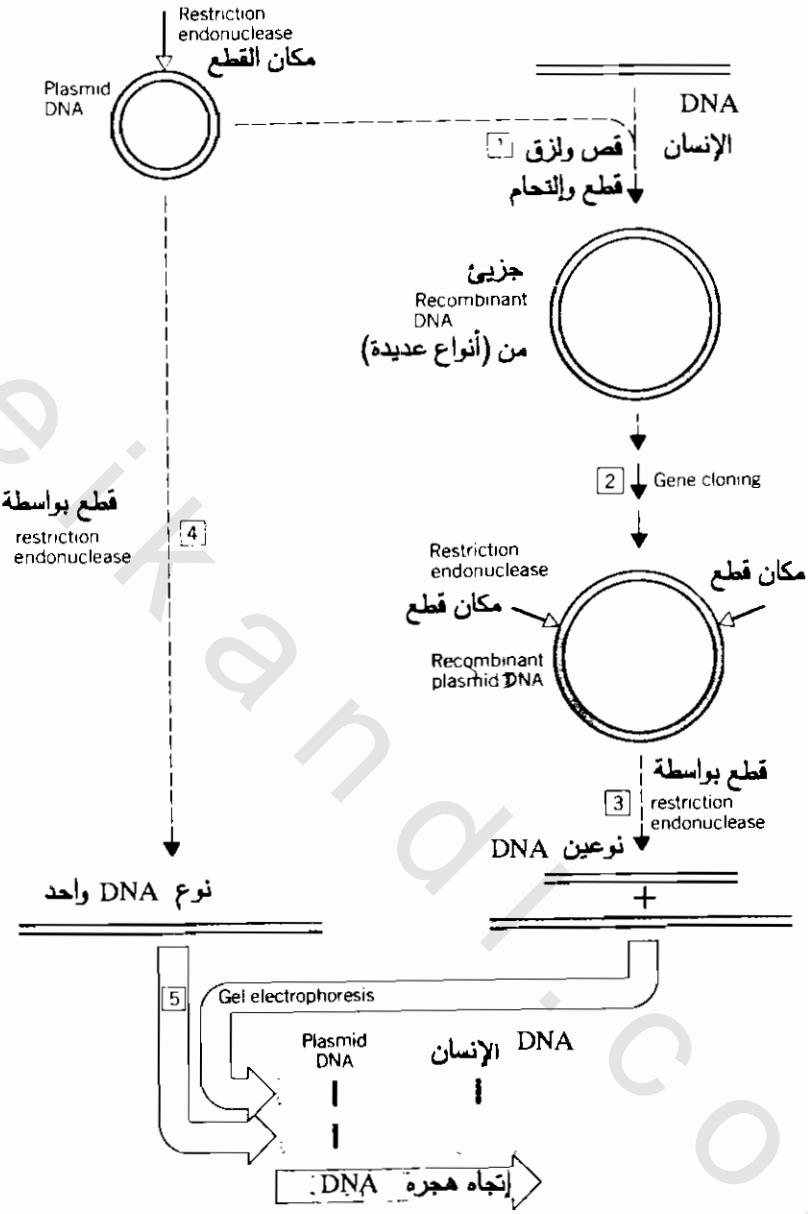
بعد نقل الجين المطلوب إلى البلازميد أو الفاج فإنه من الصعب على مهندس الوراثة معرفة ذلك وقد أمكن معرفة ذلك بالطرق الكيموحيوية وبالأختبارات الوراثية ولكن من الأفضل هو التأكد من ذلك برؤية ذلك بواسطة العين المجردة وسيكون ذلك خير دليل. يكون ذلك بإحدى طريقتين.

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

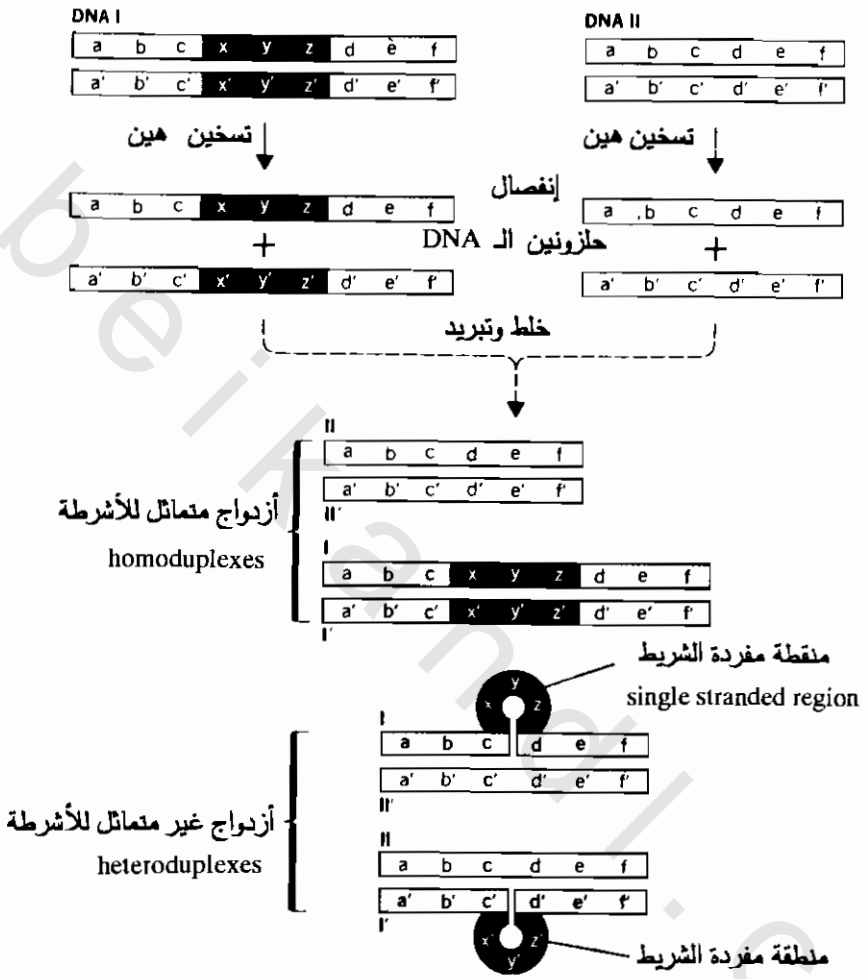
جزء البلازميدات) . تحتوى البلازميدات المعزولة على DNA الجين المطلوب ويستخدم مرة أخرى أنزيمات القطع (r. e.) متخصصة حيث يتم قطع البلازميد فى نقطتين أى مكانين وينتج عن ذلك جزء خيطى (شريطى) للبلازميد وأيضا جزء خيطى (شريطى) لـDNA الإنسان. أما فى حالة البلازميد العادى فإن له نقطة أو مكان قطع واحد بواسطة إنزيم قطع متخصص ويصبح شريطى كما سبق ذكره فى أول التجربة. ولذلك بإستخدام طريقة الهجرة فى وسط غروى فى مجال كهربائى electrophoresis فإنه يمكن فصل البلازميد العادى فى حزمة واحدة أما البلازميد المحتوى على DNA الإنسان فإنه سيكون حزمتين. تكون الحزمة البعيدة عن بداية مكان الفصل هى حزمة DNA الإنسان والحزمة القريبة من بداية مكان الفصل هى حزمة البلازميد. وبذلك يمكن الحصول على DNA فى صورة نقية (شكل ١٢٧) .

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

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



(شكل ١٢٧): الأستدلال على مكونات recombinant DNA بواسطة gel electrophoresis . قطع البلازميد ينتج عنه نوع واحد من DNA ولكن قطع والتحام البلازميد مع DNA الإنسان ينتج عنه بلازميد recombinant حلقى. ثم تجزيئ هذا البلازميد الأخير ينتج عنه نوعين من DNA يمكن الأستدلال على ذلك بواسطة الهجرة فى مجال كهربائى فى وسط غروى gel electrophoresis .



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

عزل ونقل الجين Gene Cloning

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

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

١ - تحديد مصدر مناسب أى كائن حى مناسب للحصول على الجين DNA .

٢ - فصل DNA المطلوب عن DNA الكائن الحى.

٣ - مزج الـ DNA المفصول مع DNA الفاج.

٤ - الحصول على مجس معلم.

ا - قول الآية الكريمة { ويخلق الحى من الميت} :

١ - تحديد مصدر مناسب للحصول على الجين المطلوب:

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

DNA يحمل معلومات وراثية ودون أن يكون هذا DNA جزء من كائن حى. ولذلك فإن جينات الهيموجلوبين يمكن الحصول عليها من كائن حى أو ميت ويمكن تخزينها فى ظروف مناسبة أى فى درجة حرارة منخفضة مناسبة لعملية التجمد ويمكن حفظها بذلك إلى زمن لانهائى. ولذلك يمكن أن يكون الميت مصدر للحياه. ويمكن أن يكون ذلك تفسير للآية القرآنية ويخلق الحى من الميت والتى إحتار فيها مفسرو القرآن كثيرا.

٢ ـ فصل DNA المطلوب عن DNA الكائن الحى:

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

٣ ـ مزج الـ DNA المفصول مع DNA الفاج :

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

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

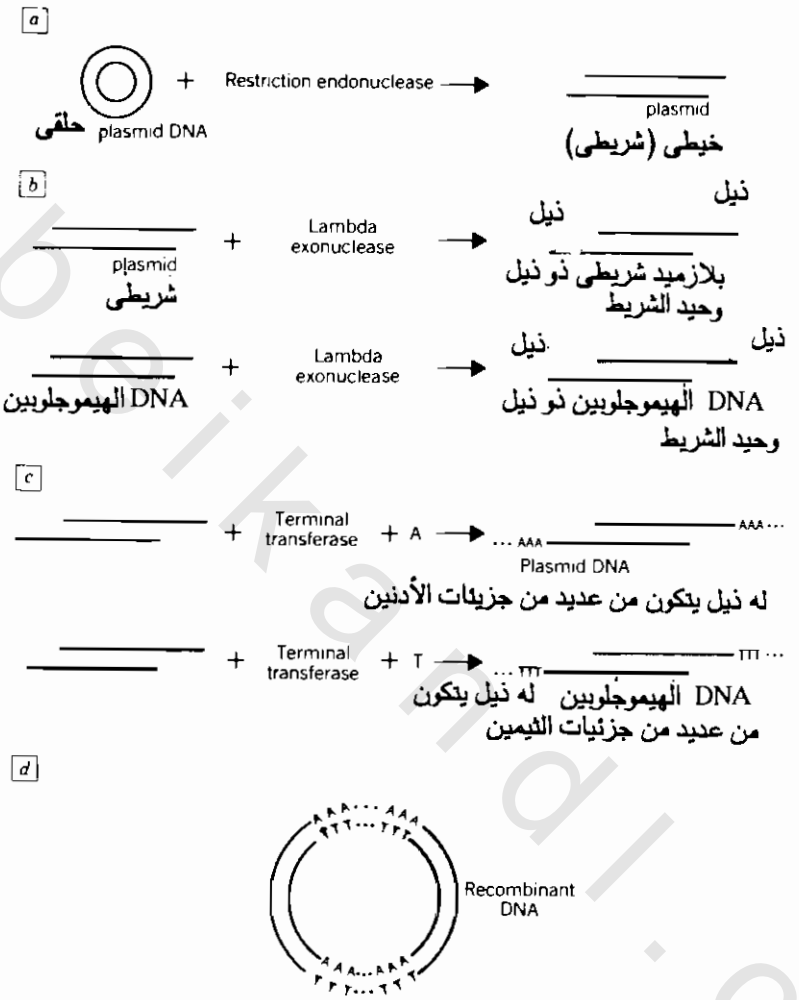
٤ ـ الحصول على مجس معلم:

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

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

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

يكون كل خيط له ذيل طويل وذلك بنفس الأنزيم السابق. يستخدم إنزيم لربط مائة نيوكليوتيد بها قاعدة نيتروجينية واحدة هى الثيمين فى نهاية أى فى ذيل DNA الهيموجلوبين وأيضا يستخدم نفس الأنزيم لربط مائة نيوكليوتيد بها قاعدة نيتروجينية واحدة هى الأدينين وذلك فى نهاية خيوط البلازميد. يسمى هذا الأنزيم باسم إنزيم النقل الطرفى terminal transferase . يتم خلط DNA الهيموجلوبين مع DNA البلازميد فيحدث تقابل وتوافق بين الأدينين والثيمين ويكمل كل منهما الآخر وذلك بالأرتباط بروابط إيدروجينية وينتج عن ذلك تكوين بلازميد حلقى به جزء من DNA خاص بالهيموجلوبين ويسمى هذا البلازميد recombinant DNA (شكل ١٢٩). توضع هذه البلازميدات فى مزارع بكتيرية *E. coli*. بعض هذه البلازميدات يمكن أن تخترق الخلايا البكتيرية وتسكن بداخلها. يوجد فى البلازميد المستعمل جين خاص بمقاومة مضاد حيوى معين ولذلك فإن وضع الخلايا البكتيرية على بيئة آجار مناسبة بها مضاد حيوى معين فإن الخلايا البكتيرية الغير محتوية على البلازميد لن تتكاثر أما البكتريا التى تحتوى على البلازميد فإنها تتكاثر وتكون مستعمرات بكتيرية. وبذلك نحصل على كميات كبيرة من الخلايا البكتيرية بها البلازميد الناقل لـ DNA الهيموجلوبين. تختبر هذه المستعمرات البكتيرية لوجود DNA الهيموجلوبين بواسطة طريقة التهجين بين DNA والتى سبق شرحها فى الجزء الخاص بالبلازميد يمكن أن نجد أن ٨٠٪ من المستعمرات البكتيرية تحتوى على DNA الهيموجلوبين. تصبح هذه المستعمرات أيضا مصدر رئيسى للحصول على فاجات بها DNA الهيموجلوبين. يستعمل البلازميد الحامل لـ DNA الهيموجلوبين والذى يسمى DNA recombinant وأيضا يسمى c DNA plasmids وبه درجة من الأشعاع وذلك بإستعمال إنزيم خاص قادر على إضافة فوسفور مشع فى نهاية DNA . يستعمل ذلك فى إختبار سبعمائة وخمسون ألف ٧٥٠ر٠٠٠ plaques لإكتشاف plaques محتوية على DNA الهيموجلوبين. فى أثناء الأختبار يجرى عملية تهجين بين DNA وتستعمل طريقة سبق شرحها فى البلازميد. يمكن أن نتعرف على وجود plaques بها DNA الهيموجلوبين. يمكن التعرف على تتابع وترتيب النيوكليوتيدات فى DNA أى فى جينات الهيموجلوبين.

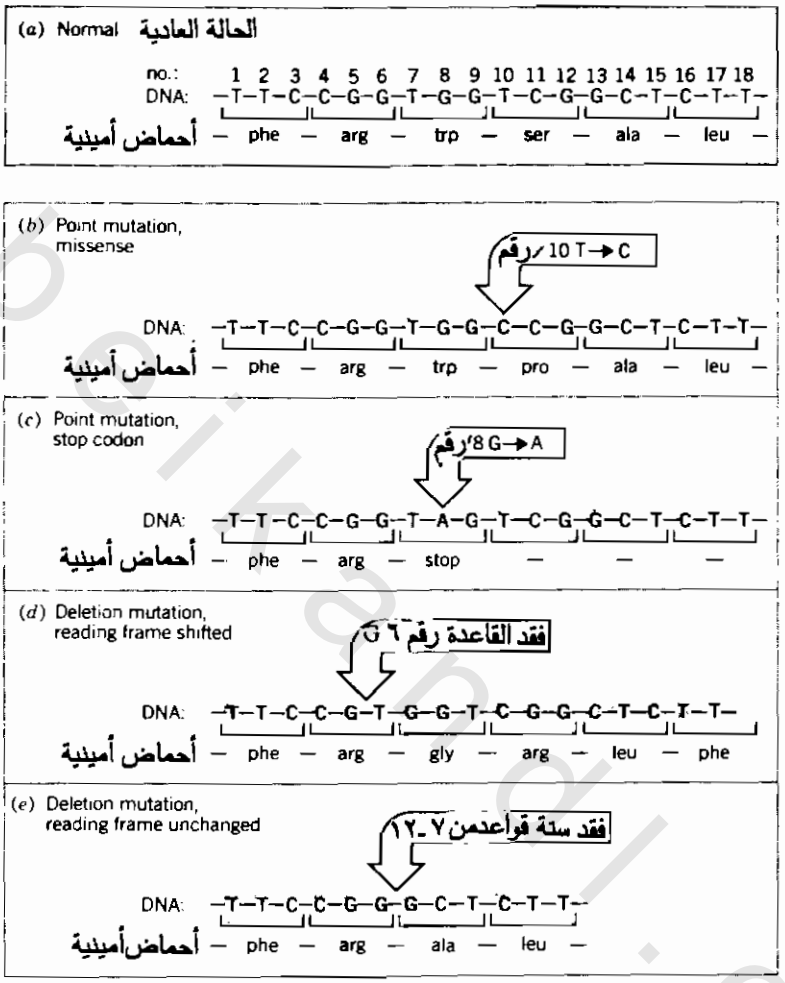


(شكل ١٢٩) : لصق أو إلتحام DNA الهيموجلوبين فى بلازميد حلقى. تحويل البلازميد الحلقى إلى شريطى بواسطة إنزيم R. E. . تكون ذيل وحيد الشريط single stranded tail فى حالة البلازميد وحالة الهيموجلوبين بأستعمال أنزيم lambda exonuclease .

إضافة نيكليوتيدات إضافية فى حالة البلازميد تتكون من عديد من الأدنين وفى حالة الهيموجلوبين تتكون من عديد من الثيمين مكونة فى كلتا الحالتين ذيل طويل. يتم إلتحام A مع T ويتكون recombinant DNA .

الطفرات Mutations

تعتبر الطفرات عبارة عن أخطاء تحدث فى تركيب DNA أثناء التضاعف وتنتقل إلى الأجيال التاليه أى أنها تورث عند وجود تغيير فى زوج واحد من النيوكليوتيدات الداخله فى تركيب الجين ومثال ذلك أن يتغير AT إلى TA. ولذلك فإن RNA polymerase إنزيم البلمره يقوم بعمل عمليه النسخ دون أى أكتشاف للخطأ ولذلك فإن يتكون mRNA به يوراسيل بدلا من أدنين. أى أن mRNA العادى يوجد به فى مكان الطفره الأدنين ولكن mRNA الطفره يوجد فى نفس المكان يوراسيل بدلا من الأدنين. ونتيجة لذلك يتغير الكودون علىmRNA الطفره ويصبح GUG بدلا من GAG. نتيجة لذلك يتكون الحامض الأمينى فالين بدلا من الحامض الأمينى جلوتاميك وبذلك يتغير تركيب البروتين نتيجة لحدوث الطفره. وقد وجدت هذه الحالة فى الأشخاص التى تعانى من الأنيميا Sickle - cell anemia حيث أن الشخص العادى يكون الجلوتاميك بينما الذى يعانى من الأنيميا فإن يكون فالين بدلا من الجلوتاميك. وفى بعض الحالات يتغير T إلى C فى DNA وينتج عن ذلك الحامض الأمينى برولين بدلا من سيرين وحيث أن ذلك لا يؤثر على ترتيب الأحماض الأمينية المرتبطة ببعضها فتسمى طفره مفتقده الحاسه missense mutation. وفى بعض الحالات قد يكون التغير فى تركيب البروتين جوهرى. نتج لحدوث الطفره ويتحول البروتين الذى يؤدى وظيفة هامة إلى بروتين خامل وفى بعض الحالات ينتج عن ذلك موت الكائن الحى وتسمى هذه بالطفره المميته lethal mutation يمكن أن تحدث الطفره فيتغير تركيب الكودون ويتحول إلى كودون التوقف stop (وتسمى كودونات التوقف أيضا بـ nonsense codon)ولذلك ميكانيكيه تخليق البروتين تتوقف مبكرا ولا يصبح البروتين كامل. وإذا حدثت الطفره فى بدايه الجين فإن جزء بسيط جدا من البروتين سيتكون ويكون له تأثير ضار بالكائن الحى (شكل ١٣٠ ـ ١٣٣). يمكن أن تحدث أنواع أخرى من الطفرات وذلك بأن يفقد أو يضاف حرف أى قاعده نيتروجينية أى نيوكليوتيد. ولذلك فإن mRNA يفقد أو يزيد هذا الحرف وينتج عن ذلك تغيير فى شفره الكودونات وتنتج أحماض أمينيه فى ترتيب مختلف فى البروتين ويختلف عن البروتين الأصلى. تسمى هذه الحاله بطفره تغيير الإطار frameshift mutation أحيانا يحدث هذا النوع من الطفرات ولكن يزيد أو يفقد أكثر من حرف وقد يكون إثنين أو أربعه أو خسمه



(شكل ١٣٠) : أنواع الطفرات

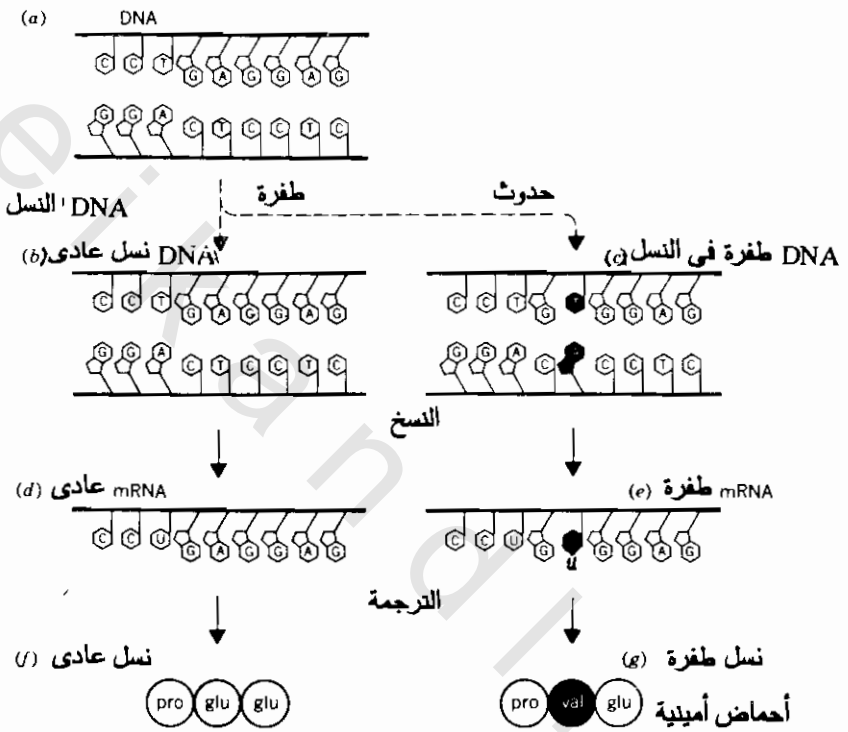
a- حالة عاديه

b- تحويل القاعده T إلى القاعده C وحدوث طفره missense .

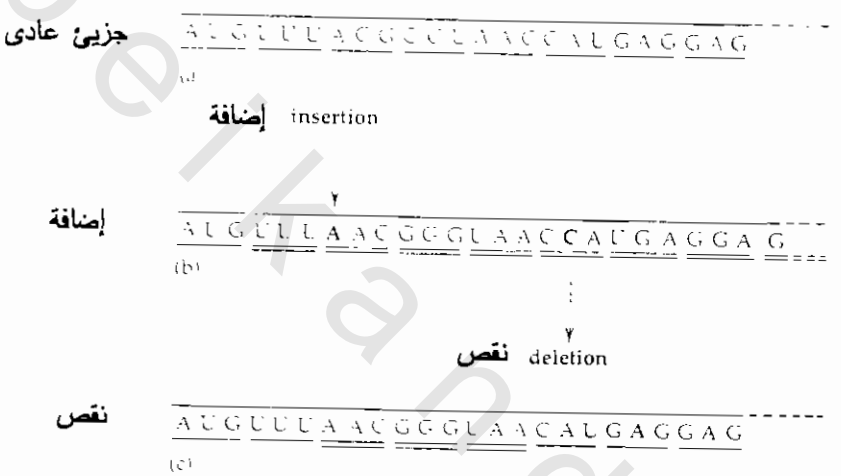
c- تحويل القاعده G إلى القاعده A وحدوث توقف لتخليق البروتين stop codon .

d- فقد القاعده G وحدوث طفره deletion من نوع frame shifted .

e- فقد سته قواعد وحدوث طفره deletion من نوع frame unchanged .

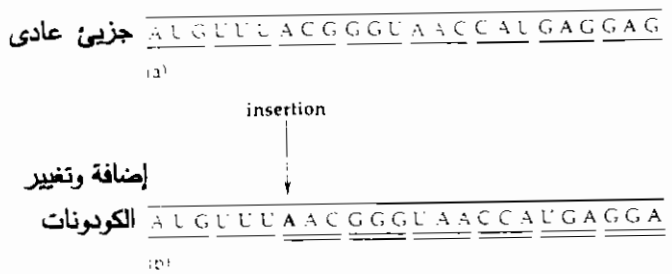


(شكل ١٣١) : حدوث طفرة فى DNA ويصبح T بدلا من A . ولذلك يتكون فى m RNA يوراسيل بدلا من الأدنين فى حالة الطفرة. ولكن فى النسل العادى يتكون الأدنين. ولذلك يختلف نوع البروتين فى النسل العادى عنه فى الطفره إذ يتكون فى الطفره الحامض الأمينى فالين بدلا من جلوتاميك. فى النسل العادى الكودون G - A - G يعطى حامض الجلوتاميك وفى الطفرة يكون الكودون G - U - G يعطى الحامض الأمينى فالين.



(شكل ١٣٢) : طفره تغيير الأطار نتيجة إضافة جزيئ أديدين ثم نقص جزيئى سيتوسين. يكون نتيجة ذلك حدوث تغيير فى تركيب ثلاث كودونات أسفلهم خطين. ثم يصبح تتابع الكودونات عادى. الكودونات الموجود أسفلها خط واحد عادية الكودونات الموجود أسفلها خطين تكون مختلفة نتيجة لحدوث طفره تغيير الأطار frameshift .

obeikandl.com



(شكل ١٣٣) : طفره تغيير الأطار نتيجه إضافه insertion جزيئ أدنين. a جزيئ عادى، b جزيئ به إضافه أدينين ونتيجه لذلك تغيرت الكودونات. إبتداء من الكودونات التى أسفلها خطين.

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

أهمية الهندسة الوراثيه فى أمراض النبات

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

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

البيولوجية الجزيئية للنبات Plant molecular biology :

تحتوى الخلايا النباتيه على DNA ثنائى الشريط أو الخيط double - stranded DNA (ds DNA) فى ثلاثه أماكن رئيسيه بالخليه وهى النواه والمتيوكوندريا والبلاستيدات الخضراء. كل مجموعه من هذه ds DNA تكون جينوم genome. يتكون الجينوم النووى من عديد من الكروموسومات وهو أكبر جينوم موجود فى الخليه أى أنه أكبر من جينوم الميتوكوندريا وأيضا جينوم البلاستيدات الخضراء حيث يتراوح فى حجمه من $٠,٢ \times ١٠^{٩}$ إلى أكثر من ٤٠×١٠^{٩} زوج من القواعد النوويه أى النيتروجينية. يكون الإختلاف فى الحجم تبعا لنوع النبات. وفى حالة جينوم الميتوكوندريا فإنه يتكون من DNA حلقى عاده ولكن أحيانا يكون شريطى أى خيطى linear ويحتوى الجينوم على أكثر من جزيئ وقد يحتوى بالإضافه إلى ذلك على جزيئات DNA صغيره الحجم تشبه جزيئات البلازميد plasmidlike وعامه يتراوح حجم الجينوم فى الميتوكوندريا من $٠,٢ \times ١٠^{٦}$ إلى $٢,٥ \times ١٠^{٦}$ زوج من القواعد النوويه. وفى حاله جينوم البلاستيدات الخضراء يتكون من جزئى DNA حلقى وعامه يتراوح حجمه بين $٠,١٢ \times ١٠^{٦}$ إلى $٠,١٩ \times ١٠^{٦}$ زوج من القواعد النوويه. تحتوى كل بلاستيده خضراء على عدد يتراوح بين ٣٠ إلى مائتين نسخه من الجينوم copies of its genome . يحدث تكرار للـ DNA الخاص بالجينوم وقد يكون التكرار فى جزء من DNA أو جميع DNA الجينوم. وينتقل الجزء المتكرر إلى الخليه الناتجه من الأنقسام أو يبقى فى نفس الخليه. يتم نسخ DNA الجينوم إلى RNA ومنه الريبوسومى والرسول والناقل. كل جزء من الـ DNA يمكن نسخه ليقوم بوظيفه معينه يسمى جين. يعتبر mRNA هو الوحيد الذى يترجم لبناء البروتين. تتابع الشفرات الوراثيه لكثير من mRNA يتأثر نتيجه لتداخل الأنترونات introns أثناء تخليقه ولكن تزال الأنترونات قبل أن يصبح mRNA صالح للنسخ لتخليق البروتين. ولذلك فإن RNA فى الخليه يصنع ويعدل processed تركيبه بواسطه الخليه قبل أن يصبح ناضج mature أى قابل لنسخ البروتين.

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

obeikandi.com

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

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

البيولوجيه الجزيئيه لمسببات أمراض النبات:

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

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

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

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

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

أ - تكوين DNA تكميلى من RNA رسول: Cloning Complimentary DNA from mRNA

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

الحصول على المستعمره البكتيريه المحتويه على الجين فإنه يتم إكثار هذه البكتريا للحصول على كميه كافيه من DNA الجين أو حتى البروتين الذى ينتجه هذا الجين. تستعمل هذه المستعمرات البكتيرية لدراسات تاليه منها عزل الجين وكيفيه التعامل معه ونقله.

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

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

جـ - تعبير الجينات المعزوله المنقوله: Expression of cloned genes

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

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

الحصول على أصناف مقاومه من النباتات المختلفة. حيث أن الأصناف المقاومه لا تحتاج إلى مقاومه كيماويه أو خلافه من طرق المقاومه الأخرى. ومما هو جدير بالذكر أن المقاومه الكيماويه الآن أصبحت مرفوضه حيث أن المبيدات المستعمله تلوث البيئة وضررها بليغ على الإنسان والحيوان وذلك بالإضافه إلى إرتفاع أسعارها وأنها تحتاج إلى مجهود كبير لعمل رش دورى لضمان فاعليه عمليه المقاومه.

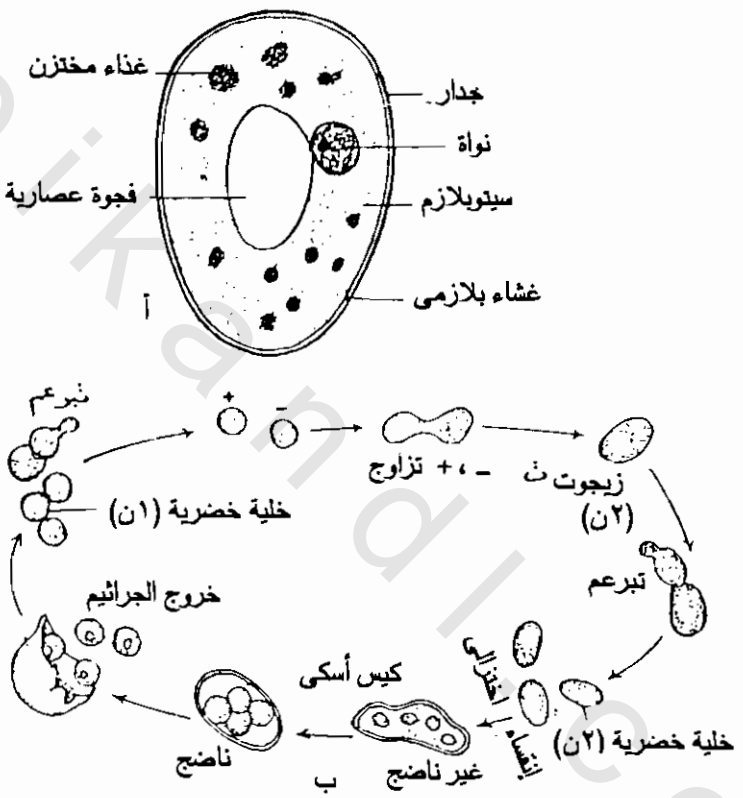
نبذه عن فطر الخميرة:

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

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

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

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



(شكل ١٣٤) : فطر الخميره

أ- تركيب الخليه

ب- دوره الحياه

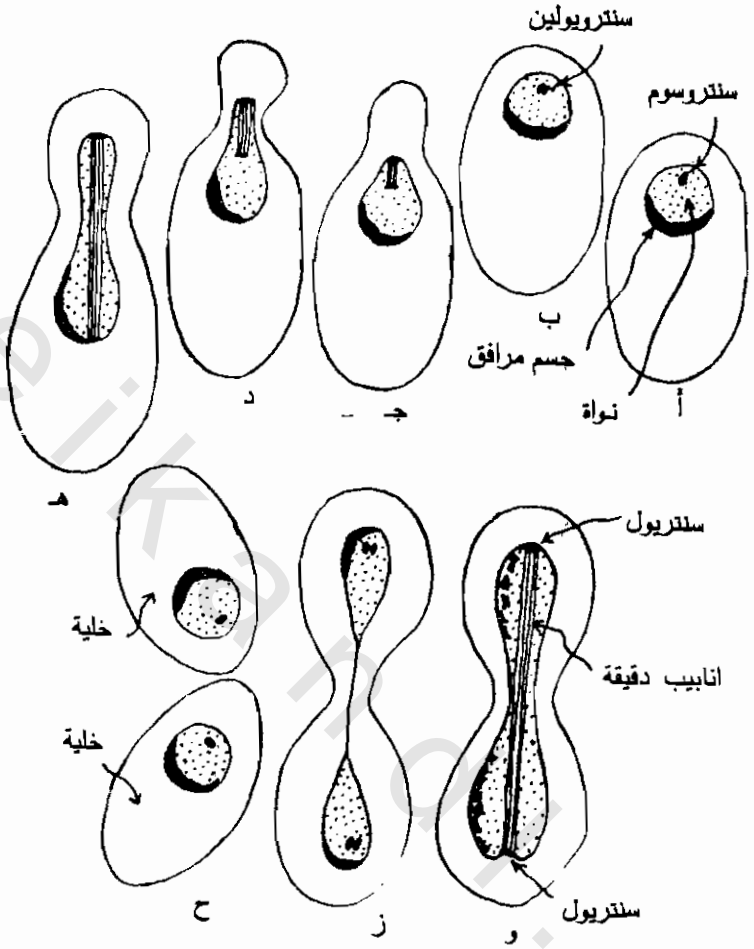
الإنقسام المباشر amitosis يعرف أيضاً، بالإنقسام البسيط، ويحدث عادة فى بعض النباتات الدنيئة وحيدة الخلية كالبكتريا والخمائر. وفى فطر الخميرة تتكون نواة الخلية من جزئين أحدهما كروى موجب لصبغة فولجين feulgen والآخر هلالى الشكل سالب لصبغة فولجين ويسمى بالجسم المرافق companion body. ويوجد بداخل النواة أو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

نبذه عن البكتريا *Agrobacterium tumefaciens*:

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

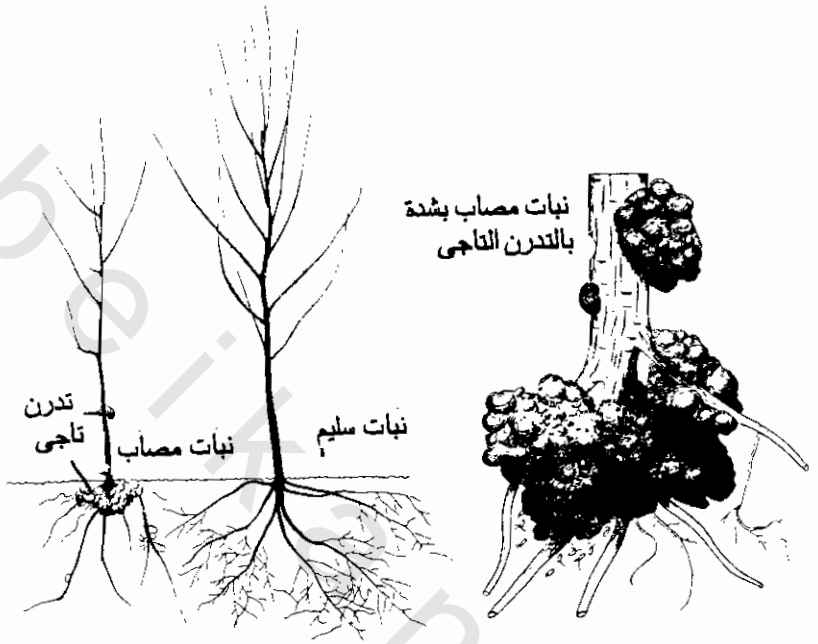
يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفة وتتكون عاده تحت سطح التربه مباشرة وهى الجزء من ساق النبات الذى يعرف بالتاج crown ومنه أشتق أسم المرض. يمكن أن تظهر أعراض المرض على الجذور الرئيسية. يقل محصول النبات المصاب وقد يموت. يشابه المرض سرطان الإنسان والحيوان ولذلك فإن كيفيه حدوثه تمت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

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



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

T-DNA ويمكن لهذا الجزء أن ينتقل ويلتحم فى DNA الخليه ويصبح جزء من الماده الوراثيه للخليه ويمكن أن يعبر express عن وظيفته أو وظائفه بكفاءه عاليه فى خليه النبات. ولذلك فإن من الممكن إستخلاص البلازميد Ti وإدخال جينات جديده إليه من نبات الفاصوليا يتم إلتحام هذه الجينات أى أجزاء من DNA الفاصوليا مع البلازميد ثم يتم إدخال البلازميد فى خلايا البكتريا *A.tumefaciens* ثم يتم عمل تلقيح بهذه البكتريا فى نبات آخر مثل عباد الشمس



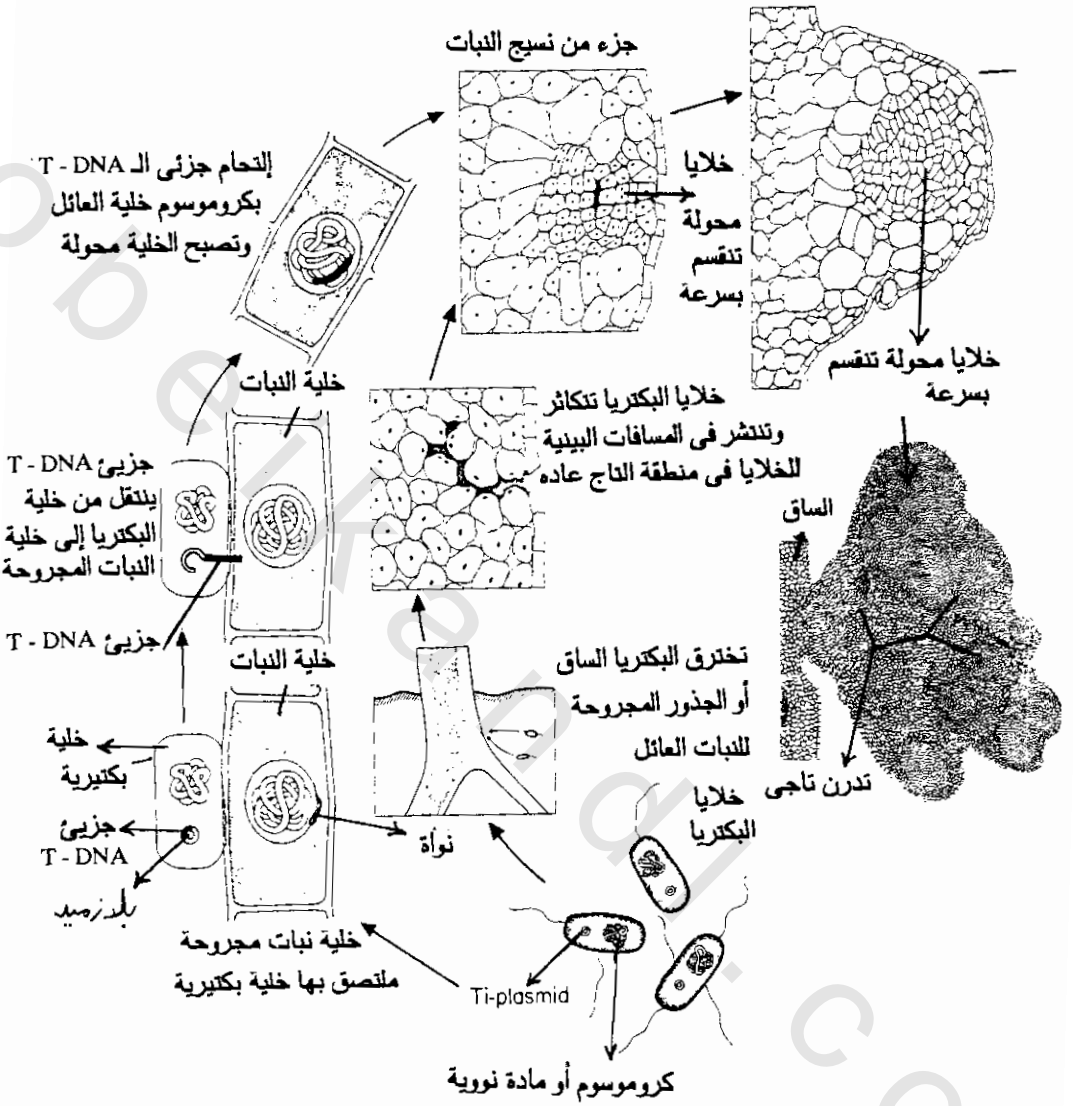
(شكل ١٣٦) :أعراض مرض التدرن التاجى.

وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من الماده الوراثيه لنبات عباد الشمس. تستعمل هذه الطريقة بكثره فى نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتريا ويعتبر DNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA. حديثا يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عاديه أو مهندسه وراثيا وذلك فى عدم وجود البكتريا. يمكن الآن إزاله أجزاء من البلازميد Ti المسئول عن تكوين الأورام فى النبات وتظل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعاله وقادره على إظهار تأثيرها ولذلك فأنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتريا تكون غير قادره على أنتاج أورام فى النبات. تعتبر هذه البكتريا مهندس وراثه طبيعى natural genetic engineer قادر على تحوير الماده الوراثيه للنبات العائل وذلك بإدخال

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

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

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



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

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

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

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

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

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

الحيه الدقيقه الرميه. هذه الكائنات الأخيره تسبب تلون الجزء السطحى من الورم باللون البنى أو الأسود كما قد تسبب تحلله. تحلل أو تمزق الجزء السطحى من الورم يسبب تحرر البكتريا وسقوطها فى التربه والتى قد تحمل بمياه الرى أو الأمطار لتصيب نباتات جديده.

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

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

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

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

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

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

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

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

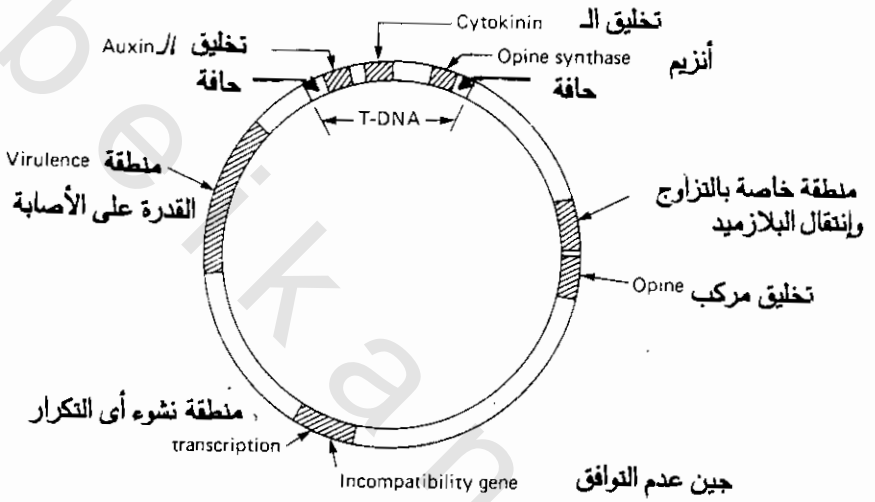
المتحركات المستعمله فى عزل ونقل الجينات

Cloning Vehicles Used For Gene Cloning In Plants

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

١ ـ بلازميد Tiللبكتريا *Agrobacterium tumefaciens*: يستعمل هذا البلازميد بكثره فى نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره فى الجزء السابق. يحتوى هذا البلازميد على عديد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها. يحتوى الجزء من هذا البلازميد المسمى T-DNA على عديد من الجينات منها. الجين الأول والذى يخلق أنزيمopine synthetase والذى يقوم بتخليق opines وهى مركبات تنتج فقط بواسطه خلايا النبات العائل المحوله transformed بواسطه هذه البكتريا. هذه المركبات وهىopines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطه خلايا البكتريا التى تحتوى على بلازميد Ti. خلايا البكتريا الخاليه من بلازميد Ti غير قادره على أستعمال opines فى التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتريا يجب أن تحتوى على جين خاص بتخليق opines. الجين الثانى أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم فى تخليق السيتوكينينات. حيث أن تثبيط تكوين السيتوكينينيات فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة الجينات والتى تتحكم فى تخليق الأوكسينات. حيث أن تثبيط تكوين إندول حامض الخليك فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. والجين الرابع أو مجموعه الجينات وهى عباره عن حافتى الجزء T-DNA من الناحيه اليمنى والناحيه اليسرى وتتكون كل من الحافه اليمنى والحافه اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النوويه وهى التى تتحكم فى عمليه نقل جزء T-DNA من البلازميد إلى الماده الوراثيه لخليه النبات العائل حيث وجد أن إزاله ٢٥ زوج من القواعد النوويه أى الحافة اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى الماده الوراثيه لخليه النبات العائل. وأيضا تؤثر على قدره البكتريا على الإصابه وتصبح غير فعاله فى إصابه النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزئى T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدره الطفيل أى البكتريا على الإصابه virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذا الجزء من البلازميد بمنطقه قدره البكتريا على إصابه النبات أى virulence regionوهى بعيده عن منطقة T-DNA. تتكون المنطقة الأخيره من عديد من الجينات. توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيويه أخرى مثل التزاوج الجنسى بين البكتريا ونقل بلازميد Ti من البكتريا الممرضه إلى البكتريا الغير ممرضه وأيضا جين أو جينات أخرى تتحكم فى تخليق مركب opine فى خلايا النبات العائل بعد أن تنتقل هذه الجينات من البلازميد Ti إلى كروموسومات النبات العائل. وأيضا جين أو جينات تتحكم فى

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



(شكل ١٣٨) : البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التى تقوم بعمل بعض الوظائف الهامه.

يعتبر البلازميد Ti فعال فى نقل DNA الخليه البكتيريه إلى الماده الوراثيه فى النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله فى نقل ماده وراثيه غريبه foreign أى غير موجوده به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصعب التعامل معه وراثياmanipulate genetically والأهم من ذلك أن الخليه للنبات العائل تتحول من خليه عاديه إلى خليه محوله تنقسم بسرعه كبيره وتدخل فى تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعاده تكوين نبات عادى من هذه الخلايا المحوله transformed . أتضح أيضا أن الجينات الموجوده فى T - DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافه اليسرى) ليس لها دور فى نقل جزء T - DNA من البكتريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بكروموسوماته. ومما هو جدير بالذكر أن أدخال جينات أو أجزاء DNA من خلايا الحيوان أو البكتريا أو النباتات الزهرية التى ليس لها علاقه بالنبات

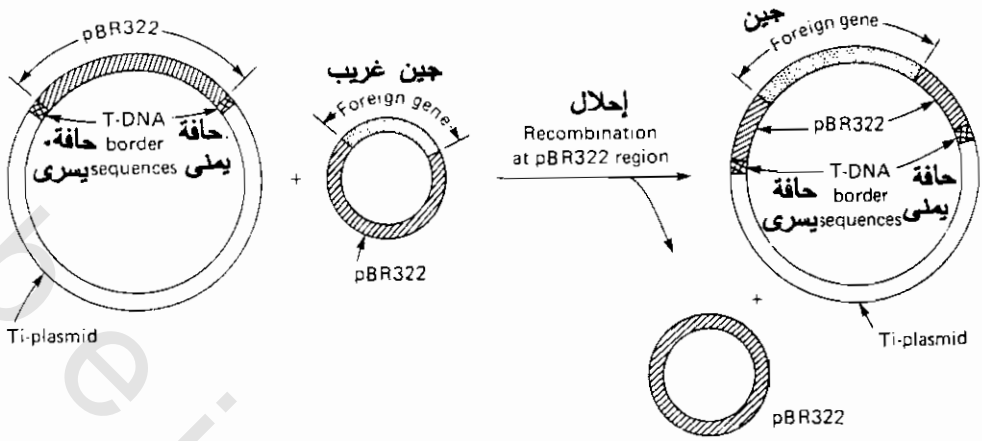
العائل إلى T - DNA البلازميد حيث توجد هذه الجينات فى داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى الماده الوراثيه فى النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خامله أى غير قادره على التعبير عن وجودها فى النبات العائل وأظهار صفاتها ولكن فى بعض الحالات وعند إضافه جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيئ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

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

جينات المقاومه لهذين المضادين الحيويين وأيضا تنمو عليها النباتات المحوله فقط والتى لها صفه المقاومه لهذين المضادين الحيويين. وبذلك يسهل عزل الخلايا المحوله من الخلايا الأخرى.

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبه وذلك بإزاله الجزء الأساسى فى T-DNA مع ترك الحافتين (الحافه اليمنى والحافه اليسرى) أى أزاله الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم شغل هذا المكان الفارغ من البلازميد بواسطه بلازميد آخر صغير ومدروس وراثيا تماما أى معروف فيه تتباع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتريا *E.coli* ومثال ذلك البلازميد pBR_{322} يتم أيضا وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخر من نفس النوع أى pBR_{322} أى عمل cloning للجين فى البلازميد.

يسمح للبكتريا *A.tumefaciens* بأخذ هذين النوعين من البلازميد وهو النوع الحامل للجين المطلوب إدخاله فى الماده الوراثيه والنوع الآخر هو الغير حامل للجين. يحدث homologous recombination بين البلازميدات pBR_{322} فى بعض خلايا البكتريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزيئين من بلازميد *E.coli* وهو pBR_{322} وذلك لبلازميد الخليه البكتريه المسببه لمرض التدرن التاجى أى بلازميد Ti (شكل ١٣٩) عند إضافه هذه الخليه البكتيريه للنبات فإنها تنقل إلى كروموسومات خليه النبات جميع جزء DNA الموجود بين حافتين جزء T-DNA أى أنها تنقل إلى الماده الوراثيه لخليه النبات العائل بلازميد *E.coli* أى pBR_{322} بما يحمله من الجين المطلوب نقله. ولقد أستعملت هذه البلازميدات بنجاح وبكفاءه عاليه فى نقل الجينات المطلوبه إلى كروموسومات خليه أو خلايا النبات العائل ثم ينتج من هذه الخلايا نبات كامل خصب عادى يحتوى على الجينات المنقوله وتصبح هذه الجينات كجزء عادى من كروموسومات النبات وتنتقل أيضا إلى نسل هذا النبات عن طريق حبوب اللقاح وخليه البيضة وبالطبع يسبق تكوين هذه الأجزاء الأنقسام الأختزالى والذى ينقسم فيه الجين المنقول بطريقه عاديه كما فى جينات النباتات الأخرى.



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

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

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

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

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

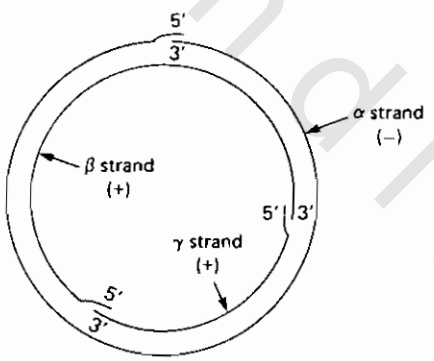
٢ ـ الفيروسات النباتيه plant viruses: تعتبر الفيروسات عامل هام فى حمل ونقل الماده الوراثيه الخاصه بالبكتريا والحيوان. عامه فإن بلازميد Ti يعتبر أفضل وسيله أى حامل cloning vehicle وناقل لجينات النبات. ولكن بالدراسات المكثفه على الفيروسات النباتيه كحامله وناقله لجينات النبات cloning vehicles أو vectors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

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

تختار وتنتخب بحيث أنها تكون قادره على إختراق النبات وتتكاثر بداخله دون أن تسبب له أضرار أو نقص فى المحصول وتكون مهندسه وراثيا بحيث أن ما تحمله من جين أو جينات تسبب وقاية خلايا النبات من السلاله المرضية للطفيل. وفيما يلى وصف لبعض الفيروسات النباتية التى يمكن أن تقوم بهذا الدور:

أ ـ Caulimoviruses وهى عباره عن فيروسات متساويه الأقطار isometric وقطرها حوالى خمسون نانومتر وتحتوى على DNA ثنائى الشريط أو الخيط حلقى يتكون من حوالى ثمانيه آلاف زوج من القواعد النوويه. كل خيط أو شريط منهما غير متصل أى متقطع حيث يوجد طرف من خيط على طرف آخر overlaps ويتكرر ذلك فى بعض المناطق وطول الجزء الذى يحدث فيه overlaps حوالى ٦ ـ ١٨ زوج من القواعد النوويه.

يعتبر فيروس تبرقش القنبيط cauliflower mosaic virus (CaMV) (شكل ١٤٠) أكثر فيروسات هذه المجموعة دراسه كناقل vector للجين. ينقل الفيرس بسهوله نقل ميكانيكى



(شكل١٤٠) : تركيب DNA فيروس موزايك القنبيط

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

خليه النبات العائل وأما عن mRNA المنسوخ فى النواه فإنه ينتقل إلى السيتوبلازم ويتكون منه الشريط السالب (-) من DNA وذلك بواسطه عمليه نسخ عكسى reverse transcription ثم يتكون من الشريط السالب شريط آخر موجب (+) من DNA ومنهما يتكون DNA الثنائى الشريط أو الخيط. أو أن mRNA يستخدم فى تخليق أنواع مختلفه من البروتين من سته إلى ثمانية أنواع ومنها البروتين الخاص بغلاف الفيرس viral coat protein لا يدخل DNA الفيرس فى تركيب الماده الوراثيه للنبات العائل ولا ينقل عن طريق البذور. وبالرغم من إمكانيه نقل ولصق DNA فى بلازميد *E.coli* أى عمل cloning لـ DNA الفيرس وأن DNA الفيرس يمكن عزله مره أخرى من خلايا هذه البكتريا ويكون قادر على إصابه النبات. ولكن حتى الآن لا يمكن أستعمال هذا الفيرس CaMV كحامل وناقل vector للجين أو الجينات حيث توجد عقبات فى ذلك. وأحد هذه العقبات أن غالبيه جينوم الفيرس يجب أن يعبأ مع مناطق الكودcoding regions التى يحتاجها الفيرس لتخليقه وحيث أن أى نقص ملحوظ deletion فى هذه الأجزاء يفقد قابليه الفيرس على الإصابه وبالتالى يصبح عديم الفاعلية فى عملية نقل الجينات. أحد مناطق الكود الخاص بالفيرس تتكون من ٤٠٠ زوج من القواعد النوويه. يمكن التغلب على صعوبه الحد من حجم الفيرس ومناطق الكود الخاص به بإستعمال نظام فيرس مساعدhelper virus system وفيه يتم إزاله جزء من جينوم الفيرس ويتم إحلال مكانه بواسطه DNA غريب foreign . ويمكن التغلب على صعوبه عدم قدره الفيرس على الإصابه وذلك بتلقيح وإصابه نفس خليه النبات المحتويه على الحاله السابقة بـ DNA للفيرس أو بواسطة DNA فيرس ثم إزاله DNA الخاص بالكود منه وأن هذا الكود خاص بعديد من الوظائف. يجب لذلك الآن عمل هذه الخطوات بكفاءه عاليه وبنجاح كبير ليمكن أستعمال هذا الفيرس CaMV والفيروسات الأخرى فى هذه المجموعة من الفيروسات كناقلات وحاملات vectors لجين وجينات النبات.

ب ـ Geminiviruses عباره عن زوج paired (أى gemini) من جزئيات الفيرس وكل جزيئ يتراوح طول أحد قطريه ١٨ ـ ٢٠ نانومتر وطول القطر الآخر ٣٠ نانومتر. كل زوج من جزيئات الفيرس يحتوى جزيئ DNA مفرد حلقى ومفرد الشريط أى الخيط (ssDNA) single stranded DNA ويتكون الخيط أى الشريط الواحد من ٢٥٠٠ قاعده نوويه. ولكن عديد من فيروسات هذه المجموعة له جينوم ينقسم إلى جزئين من DNA متساويين فى الحجم

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

جـ - فيروسات RNA (RNA Viruses) يمكن أن تكون مهمه فى المستقبل وخاصه الفيروسات عديده المكونات multicomponent viruses وهى تتكون من ثلاث مكونات وتحتوى مجاميع مختلفه ومنها مجموعة بروموفيرس bromovirus ومنها فيروس موزايك البروم brome mosaic virus ومجموعة الفيروسات التابعه satellite viruses وهى فيروسات تلتصق وترتبط بفيروسات أخرى وتسبب الفيروسات التابعة خفض سرعة تكاثر الفيرس المرتبطه به كما أنها تقلل من قدرته على أصابه النبات. وقد أمكن فى حاله فيروس موزايك البروم إحلال RNA أو cDNA محل RNA بروتين الغطاء أو الغلاف coat وذلك فى أصغر جزيئ من جزئياته الثلاثه ودون تأثير على قدره الفيرس على الأصابة. وفى حالة الفيروسات ذات النوابع وفيروسات RNA والتى تتراوح أحجامها من ٢٧٠ إلى ١٥٠٠ زوج من القواعد النوويه فإن

هذه الفيروسات لا تحتاج RNA ويمكن إحلاله بـ RNA غريب foreign أو حتى بـ cDNA وبالتالى يمكن إدخال هذه الأجزاء الغريبه عن الفيرس إلى داخل خليه النبات العائل عن طريق إصابتها بجزيئات الفيرس. تركيب هذه الفيروسات وأستعمالها كحاملات وناقلات vectors لجينات النبات تحت الدراسة مع وجود إحتمالات كبيره لأنجازها.

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

٤ـ مكونات جينومات النبات Plant genomic components:

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

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

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

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

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

يمكن دراسه جينات الفطريات التى تستخدم فى المقاومه الحيويه antagonistic fungi للفطريات المسببه أمراض للنبات.

النقل الميكانيكى والكيماوى لـ DNA فى خلايا النبات mechanical and chemical delivery systems of DNA into cells حاملات وناقلات الجين الطبيعية natural vectors وهى البكتريا أو الفيرس أو أجزاء من جينومات النبات تستخدم فى نقل الجينات إلى خلايا النبات العائل دون إحتياج للأنزيمات. ولكن بعض النباتات الزهريه لا يوجد لها حامل وناقل للجين وفى بعض الحالات الأخرى يكون للنبات حاملات وناقلات للجين ولكنها تنقل إليه ماده وراثيه أو جينات غير مرغوبه ومن هذه الحوامل الفيروسات وبلازميد Ti. ولذلك يستعمل فى هذه الحالات نظم أو طرق أخرى بديله لأنجاز إمكانيه إدخال جينات معينه إلى الماده الوراثيه لخلايا النبات العائل. ومن هذه الأنظمه والطرق ما يأتى:

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

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

٣ ـ الحقن المباشر microinjection للأحماض النوويه فى خلايا النبات.

٤ ـ إدخال DNA أو RNA فى الليبوسومات liposomes. حيث يمكن خلط أجزاء من DNA المراد إدخالها داخل الليبوسوم مع حويصلات صناعيه صغيره مكونه من الدهون وهذه الحويصلات يمكن أن تلتف حول الجزيئ وتحتويه بداخلها. هذه الحويصلات الصناعيه تسمى ليبوسومات وتستعمل فى إحتواء RNA أو DNA بداخلها enclosure of DNA or RNA. ثم يتم خلط هذه الليبوسومات مع بروتوبلاست النبات حيث يتم إتحاد بين هذه الليبوسومات وبروتوبلاست النبات وبذلك ينقل DNA إلى الماده الوراثيه لبروتوبلاست النبات. ومن هذا البروتوبلاست يمكن عمل نبات كامل.

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

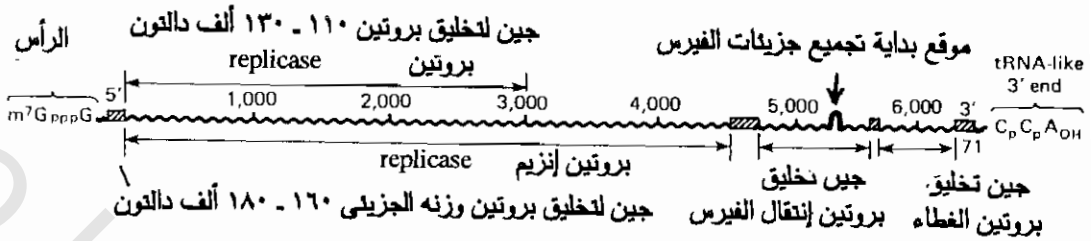
البيولوجيا الجزيئية لفيروس تبرقش التبغ (TMV)

يوجد لكل جزئيات الفيرس غطاء من البروتين ووظيفته الرئيسية هى حماية المادة النووية للفيرس. يعتبر البروتين خامل من الوجهه المرضية حيث أنه منفردا غير قابل على إصابة الخلية والعكس صحيح للمادة النووية التى يتكون منها الفيرس فهى قادرة بمفردها وبدون وجود البروتين على إصابة الخلية وحدوث المرض وتنطبق القاعدة على كل من RNA أو DNA . ولكن وجود البروتين فى جزيئ الفيرس يساعد على كفاءة الأصابة بالمادة النووية ولكنه يعتبر عامل غير محدد فى الأصابة. حيث أن الأصابة متوقفة تماما على المادة النووية. ولذلك يمكن أن تعتبر هذه وظيفة أخرى للبروتين. وبالتالى فإن بروتين الفيرس ليس له أى دور فى تضاعف المادة النووية فى داخل الخلية المصابة وأيضا ليس له دور فى تكوين المادة النووية وبروتين جزيئ الفيرس فى الخلية المصابة وأن الأساس فى ذلك هو بالطبع المادة النووية للفيرس الموجودة بداخل الخلية المصابة. بعض الفيروسات يوجد فى تركيبها بروتين إنزيم RNA transcriptase وهو لازم للأصابة ولتكاثر الفيرس. ولذلك فإن المادة النووية للفيرس تحمل جينات وهى تتكون من تتابع للنيوكليوتيدات فى مناطق معينة محددة ويسمى تتابع النيوكليوتيدات فى منطقة معينة محددة بالسسترون cistron . تحدد هذه الجينات خواص بروتين والأحماض النووية المكونة للفيرس وذلك عن طريق الشفرة وهى تماثل الشفرة فى النبات والحيوان.

تحدد كمية RNA الموجودة فى الفيرس عدد النيوكليوتيدات المكونة للمادة النووية وبالتالى فإنها تحدد طول جزيئ RNA . وبالتالى فإن هذه النيوكليوتيدات تحدد عدد الشفرات فى جزيئ RNA الفيرسى وبالتالى تحدد هذه الشفرات عدد الأحماض الأمينية الداخلة فى تركيب بروتين الفيروس. وحيث أن تحت وحده البروتين protein subunit فى الفيرس تحتوى على عدد قليل من الأحماض الأمينية وهى ١٥٨ حامض أمينى فى فيروس موزايك التبغ ولذلك فإن عدد الكودونات codons المستعملة فى تخليق هذا البروتين جزء من مجموع الكودونات الكلى. ولذلك فإنها فى فيروس تبرقش (موزايك) الدخان هى ١٥٨ كودون من المجموع الكلى وهو ٢١٣٠ كودون. ولذلك فإن بقية الكودونات تستخدم إفتراضا فى تخليق أنواع أخرى من البروتين ومنها البروتين التركيبى والأنزيمات وأحد هذه الأنزيمات هو RNA

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

يتكون جينوم genome فيروس تبرقش التبغ من ستة آلاف وأربعمائة نيوكليوتيد. يوجد أربعة جينات تنتج ٤ أنواع مختلفة من البروتين حيث أنها تختلف فى وزنها الجزيئى وأحد هذه الجينات ينتج بروتينات تتراوح أوزانها الجزيئية بين مائة وعشر ألف ومائة وثلاثون ألف دالتون. والجين الثانى ينتج بروتين يتراوح وزنه الجزيئى من مائة وستون ألف إلى مائة وثمانون ألف دالتون والجين الثالث ينتج بروتين وزنه الجزيئى ثلاثون ألف دالتون والجين الرابع ينتج بروتين وزنه الجزيئى سبعة عشر ألف دالتون. يستعمل البروتين الأول والثانى وهما ذات أوزان جزيئية مرتفعة فى عمل إنزيم أو أنزيمات الفيرس viral replicase (s) . ويعتقد أن البروتين الثالث يسهل إنتقال جزيئ الفيرس من خلية نبات إلى الخلية المجاورة وهكذا ويكون ذلك عبر خيوط البلازموديزما ماتا والتى تصل الخلايا النباتية الحية ببعضها. يكون البروتين الرابع الغلاف أو الغطاء coat البروتينى للفيرس. يوجد على الجينوم أجزاء غير معروف وظيفتها حتى الآن وهى أربعة أجزاء قصيرة ويعتقد أنها تشتمل على إشارات لبدء عملية التخليق signals for initiation وأيضا للتهيؤ promotion وأيضا لخاتمة عملية الترجمة termination of translation . موضع الجينوم وحيث يحدث عنده تجميع للبروتين assembly المكون للغطاء أو الغلاف وينتج عن ذلك جزيئ فيرس متكامل هو الموقع 5 وهو القمة cap والموقع 3 وهو النهاية ويسمى tRNA - like 3` end . كما أن موقع بداية تجميع جزيئات الفيرس موجوده على الجزيئ (شكل ١٤١).



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

أمراض النبات والتكنولوجيا الحيوية : البداية

Biotechnolgy and Plant Pathology : The Beginning

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

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

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

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

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

هذه هى بعض الأنجازات فى مجال التكنولوجيا الحيوية ولا زلنا فى إنتظار إنجازات الغد.

obeikandl.com

ملخص تاريخى عن التقنية الحيوية وأمراض النبات

كانت البكتيريا ديبلوكوكس نيومونى *Diplococcus pneumoniae* موضع دراسة مستفيضة قام بها العالم البكتريولوجى جريفث Griffith عام ١٩٢٨ . توجد من هذه البكتيريا التى تسبب مرض الالتهاب الرئوى فى كثير من الحيوانات سلالات قادرة على إحداث إصابة، يطلق عليها سلالات نشطة virulent وأخرى خاملة avirulent لا تحدث إصابة، تختلف السلالة النشطة عن الخاملة فى صفة مورفولوجية ظاهرة هى أن بكتيريات السلالة النشطة مغطاه بغلاف capsule ذو سطح ناعم، لذلك يطلق عليها ملساء smooth ، ويرمز إليها بحرف (S) ، فى حين أن السلالة الخاملة عديمة الغلاف خشنة السطح rough ويرمز إليها بحرف (R) . توجد من البكتيريات الملساء (S) (النشطة) طرز كثيرة من بينها الطرزان S_{11} و S_{111} ويختلفان عن بعضهما فى التركيب الكيماوى للمركب عديد السكريات الذى يتكون منه الغلاف. كما يوجد كذلك من السلالة الخشنة طرز يعرف R_{11} . تنتقل الصفات الخاصة بكل طرز من S_{11} و S_{111} وR_{11} إلى نسله بحالة نقية بالتكاثر الخضرى، مما يدل على أنها صفات وراثية ترجع إلى التركيب الخاص بكل طرز. تظهر أحيانا فى هذه الطرز طفرات تحولها من طرز إلى آخر منها أو إلى غيرها، طفرة فى كل نحو 10^7 أفراد، فالطرز S_{11} مثلا يطفر إلى S_{111} أو R_{11} وهكذا، مما يشير إلى أن هذه الصفات الليلية متبادلة لمكانlocus وراثى واحد. فإذا حقن فأر مثلا باحد السلالات النشطة ظهرت عليه أعراض الإصابة بالالتهاب الرئوى، أما السلالات الخاملة فلا تسبب إصابة بهذا المرض. غير أنه قد وجد أنه إذا حقن فأر بسلالة خاملة مع بكتيريات نشطة غير حية، بعد قتلها بالتسخين، تظهر على الحيوان أعراض المرض، وبفحص البكتيريات فيه وجد أنها تحتوى على سلالات نشطة.

يستنتج من ذلك أن اختلاط السلالتين فى جسم حيوان عائل أدى إلى تحول احدهما تحولا وراثيا من صفة إلى اليلتها، من صفة الخمول إلى النشاط، أو صفة سلالة خشنه إلى ملساء حتى لو كانت السلالة الواهبة - وهى هنا البكتيريات النشطة - بكتيريات ميته (شكل ١٤٢) .

(شكل ١٤٢) : التحول الوراثى فى *Pneumococci*

بعد نحو ١٦ عاما من دراسة جريفث، أى فى عام ١٩٤٤ ، أعاد أفيرى Avery وزملاؤه ماكلويد، وماك كارتى Macleod & McCarty التجربة السابقة، ولكن كان اختلاط السلالة الخاملة الحية بالسلالة النشطة الميتة فى بيئة medium خارج جسم الحيوان العائل، فتحولت بعض البكتيريات غير النشطة R_{11} إلى بكتيريات نشطة بإختلاطها بالطرز S_{111} النشط. كان هذا دليلا على أن السلالة غير النشطة ينقصها مركب خاص حتى تتحول من الطرز الخامل إلى الطرز النشط، فتحولت من الخمول إلى النشاط بعد حصولها عليه من الخلايا النشطة المقتولة. وقد تأيد هذا الاستنتاج عندما وجد أن إضافة «ح د ن» مستخلص من الطرز الثلاثة السابقة إلى مزرعة ينمو فيها طرز آخر، يحدث التحول الوراثى تماما كما حدث فى حالة الجمع بين البكتيريات نفسها. ويكون التحول وفق طرز البكتيريا التى استخلص منها «ح د ن» المضاف إلى البيئة. كذلك امتدت التجربة إلى إحداث التحول الوراثى بين الطرزين S_{11} و S_{111} ، اللذين يختلفان عن بعضهما فى نوع المركب الكربوإيدراتى عديد السكريات الموجود فى الغلاف، مما يشير إلى أن نوع المركب عديد السكريات يرجع إلى عامل وراثى، أى إلى جين مكون من «ح د ن» وأن نوعى المركب عديد السكريات صفتان الليليتان مثل الصفتين S_{11} و S_{111} . مما يؤيد أن «ح د ن» هو المادة التى تحدث التحول الوراثى، هو أنه إذا عومل بإنزيم ديزوكسى ريبونيوكلييز قبل إضافته إلى البيئة فإنه لا يحدث التحول فى البكتيريات النامية فيها، لأن الإنزيم يحلل « ح د ن» ويعطل تأثيره كما أن إضافة البروتين الموجود فى البكتيريا الواهبة، بدلا من «ح د ن» لايحدث تحولا وراثيا. وكان ذلك أول دليل علمى على أن DNA يحمل معلومات أو صفات وراثية.

قام هيرشى وشيس Hershey and Chase عام ١٩٥٢ بإقامة الدليل على أن ما يدخل البكتيريا العائل من جسم الفيروس هو رأسه المكون من «ح د ن» وأن الذنب المكون من البروتين يبقى فى الخارج، وذلك باستعمال عناصر مشعة مميزة لكل من «ح د ن» يحتوى على فوسفور ولا يشمل الكبريت فى حين أن جزئ البروتين الموجود فى الفيروس يشمل الكبريت ولا يشمل الفوسفور. فإذا نما فيروس على مزرعة بكتيرية تحتوى على كب^{35} كان ذيل الفيروس مشعا. فإذا أصاب هذا الفيروس بكتيريات غير مشعة تبين أن ذيل الفيروس المشع يبقى خارج البكتيريات المصابة ولا يدخلها. إذا أجريت مثل هذه التجربة باستعمال

فوسفور مشع فو^{32} تبين أن المادة المشعة هى التى تدخل البكتيريا العائل. وهو ما يدل على أن «ح د ن» وحده هو الذى ينتقل كما هو من جيل إلى آخر.

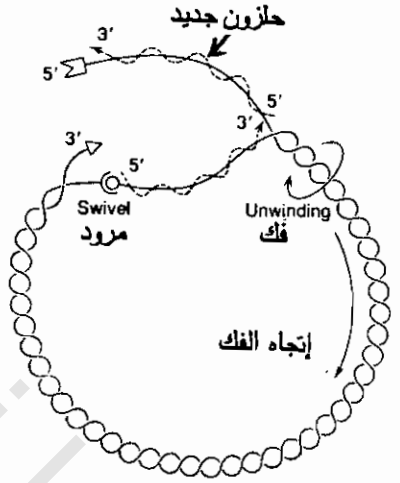
غير أن الفيروسات التى تصيب النباتات تحتوى على حامض ريبونيوكلييك، بدلا من ديزوكسى ريبونيوكلييك، مثل فيروس تبرقش التبغ tobacco mosaic virus ، وهو مكون من جزيئ «ح ر ن» حلزونى الشكل ويحاط بمركب البروتين. أمكن فصل هذين المركبين عن بعضهما بحالة نقية، واختبار مقدرة كل منهما على إحداث عدوى فى نبات تبغ سليم،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

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

استعمل الفوسفور المشع فو٣٢ فى تتبع انتقال «ح د ن» من البكتيريا الواهبة التى تحدث التحول، إلى البكتيريا المستقبلة التى يحدث فيها التحول، وذلك بإضافته إلى المزرعة الواهبة واستخلاص «ح د ن» المشع منها ثم إضافته إلى مزرعة مستقبلة فانتقل الفوسفور المشع إليها وحدث التحول الوراثى إلى صفة البكتيريا الواهبة. قد يتبادر إلى الذهن أن جزئيات «ح د ن» التى تحدث التحول الوراثى تعمل كحافز على ظهور طفرة فى البكتيريا المستقبلة recipient . لكن الدليل على أن ما يحدث هو تحول وراثى حقا، وليس طفرة، هو أولا، أن التحول يحدث نتيجة دخول «ح د ن» جديد من البكتيريا الواهبة، كما يتبين بوضوح من تجربة الفوسفور المشع، وثانياً، أن التحول يكون فقط إلى الصفة التى تأتى من الواهب، وليس إلى أى طفرة جديدة.

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

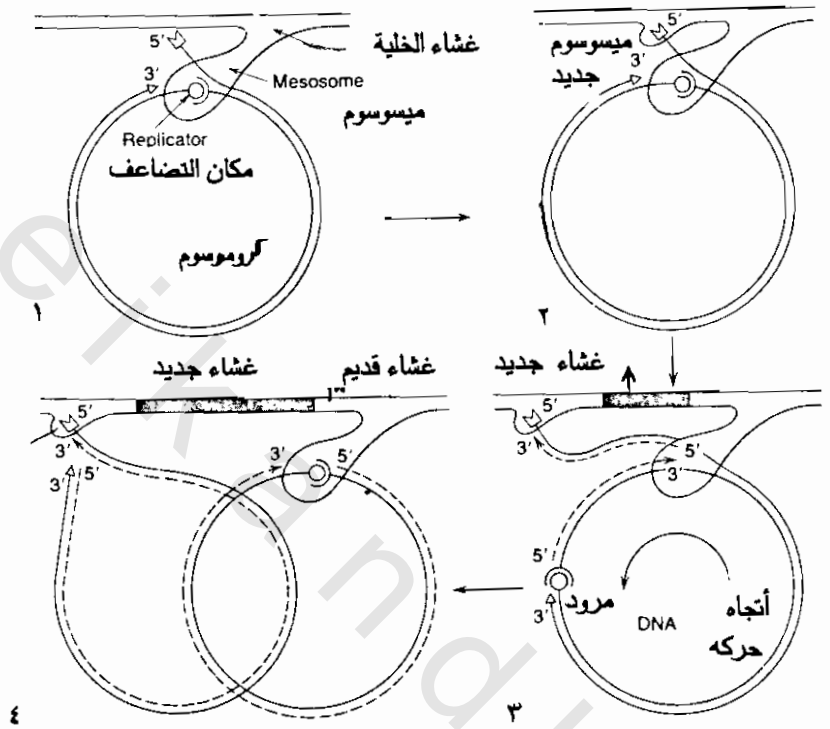
أثناء نمو المستعمرة البكتيرية أى أثناء أنقسام الخلايا تنفصل الأنويه المنقسمه أى المادة النووية عن بعضها أى تبتعد عن بعضها. يلاحظ عدم وجود أى جهاز فى الخلية البكتيرية مسئول عن ذلك وذلك بالمقارنة بخلايا النبات أو الحيوان العادية eucaryotes . حيث أن أنفصال الكروموسوم فى خلايا النبات العادية أثناء الأنقسام يحدث نتيجة لأتصال سنترومين الكروموسوم ببعض خيوط المغزل وهى عباره عن أنابيب صغيرة دقيقة microtubules ثم تنكمش هذه الخيوط أو الأنابيب فى أتجاه أحد قطبى الخلية وبذلك تبتعد الكروموسومات عن بعضها متحركة فى أتجاه أحد قطبى الخلية أثناء الطور الأنفصالى. هذه الخيوط وهذه الأنابيب غير موجودة فى الخلية البكتيرية فكيف يحدث الأنفصال بين الكرموسومين فى الخلية البكتيرية؟. وللإجابة على هذا السؤال وضع يعقوب وبرينر وكوزين Jacob و Brenner و Cuzin



(شكل ١٤٣) : تضاعف DNA حلقى
الخط العادى حلزون DNA قديم
الخط المتقطع حلزون DNA جديد

عام ١٩٦٣ نظرية التضاعف replicon hypothesis للكروموسوم البكتيرى (شكل ١٤٤) وهى كما يلى :

١ ـ عندما يبدأ تضاعف الكروموسوم البكتيرى فإن منطقة معينة specific site على محيط الكروموسوم ترتبط بمنطقة معينه على الميسوسوم mesosome تسمى منطقة التضاعف replicator site . يتكون الميسوسوم نتيجة لأنبعاج غشاء الخلية المبطن للجدار للداخل cell membrane كما أنه يتداخل مع بعضه مرات عديده ليكون كتله من الأغشية تسمى الميسوسوم. وفى منطقة التضاعف تنشط الأنزيمات المسئولة عن كسر وتضاعف حلزونى DNA مثل إنزيم بلمره الـ DNA polymerase DNA . وفى هذه الأثناء ينكسر أحد حلزونى DNA عند الموقع 5′ إلى 3′ وتعمل منطقة التضاعف replicator site على فك حلزونى DNA مبتدئا من مكان الكسر أو القطع ويزداد تدريجيا على طول الكروموسوم. تعمل منطقة التضاعف فى هذه الحالة كمرود swivel .



(شكل ١٤٤) : تضاعف الكروموسوم البكتيرى

١ ـ إتصال الكروموسوم بغشاء الخلية ومكان التضاعف وكسر أحد حلزونى الـ DNA .

٢ ـ إتصال أحد طرفى الحلزون المقطوع 5´ بغشاء الخلية فى منطقة ميسوسوم جديده .

٣ ـ فك حلزونى DNA وحركة الكروموسوم فى إتجاه عكس عقرب الساعة وبناء حلزونين جديدين. الحلزون القديم بخط عادى والحلزون الجديد بخط متقطع. كبر مساحة سطح الغشاء وهى منطقة غامقه.

٤ ـ تكوين كروموسومين جديدين مع كبر مساحة سطح الغشاء وبذلك تزداد المسافة بين الكروموسومين (منطقة غامقة).

٢ ـ بعد قطع أحد حلزونى DNA فإن أحد طرفى الحلزون المقطوع 5´ يتصل بمنطقة تضاعف أخرى مجاورة لمنطقة التضاعف الأولى وذلك قبل حدوث تضاعف لحلزونى DNA. أى يحدث الألتحام بين الطرف المقطوع ومنطقة التضاعف قبل بدء حدوث التضاعف.

٣ ـ تحدث بداية فك حلزونى DNA فى منطقة التضاعف. وأن التفاعل المسئول عن فك حلزونى DNA يبدأ من منطقة التضاعف وأيضا الأنزيمات المسئولة عن تضاعف حلزونى DNA أثناء الأنفصال تبدأ من منطقة التضاعف replication fork . وأثناء عملية فك وتضاعف DNA يتحرك الكروموسوم حركة دائرية فى عكس أتجاه عقارب الساعة. وتتحرك أيضا منطقة التضاعف والتى تعمل كمرود ويتضاعف الكروموسوم.

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

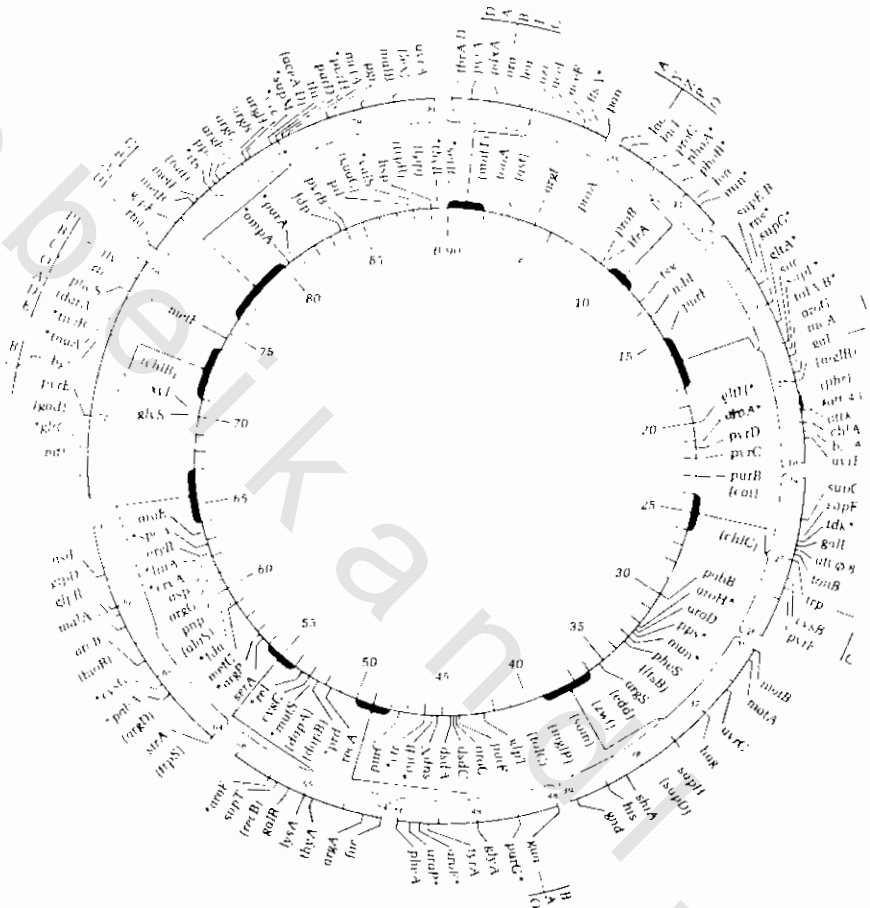
أمكن إثبات كثير من خطوات هذه النظرية فيما بعد. حيث أمكن بواسطة المجهر الألكترونى إثبات إلتصاق منطقة معينة على الكروموسوم بغشاء خلية البكتريا. أمكن أثبات أيضا وجود إرتباط كبير بين غشاء خلية البكتريا و DNA المخلق الجديد وذلك بإستعمال DNA مشع حيث يتم تعليم الثيميدين tritiated thymidine . وجد أيضا أن أنزيم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

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

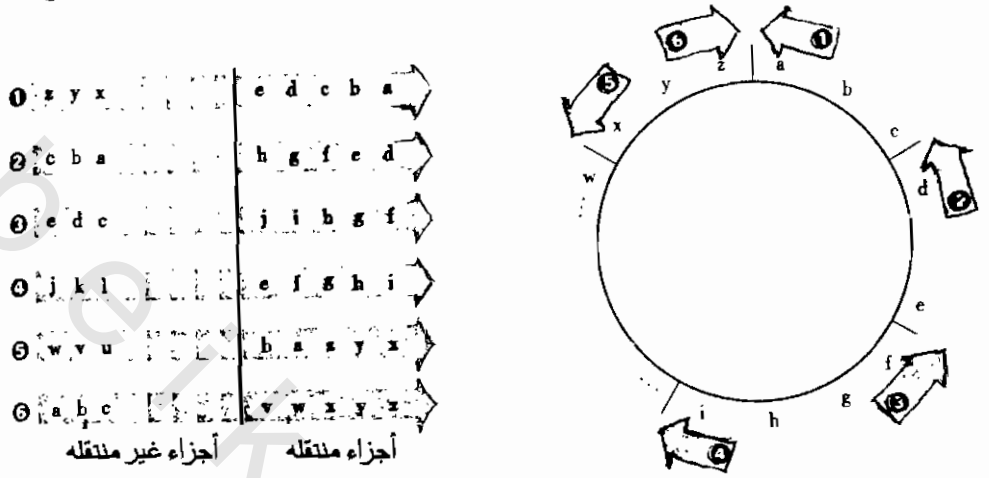
F factor إلى الخلية المؤنثة وهو فى حالة كروموسوميه. يمكن منع إنتقال الكروموسوم أثناء التزاوج بواسطة الرج الشديد. ولو أجرى الرج مبكرا فإن جينات ذكرية قليلة ستنتقل للأنثى وكلما تأخرت عملية الرج كلما إنتقلت جينات أكثر وهكذا. توجد سلالات ذكرية كثيرة وكل سلالة ذكرية لها كروموسوم واحد وأول جين موجود على الكروموسوم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

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

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



(شكل ١٤٥) : خريطة كروموسومية للبكتريا *E.coli* K_{12}. توجد فى الحلقة الداخلية وحدات أى أرقام هى عباره عن الزمن النسبى اللازم لدخول الجينات المعروفة المعلمه markers أثناء التزاوج الجنسى بين البكتريا على درجة حراره ٣٧م. تم إفتراض منطقة الصفر عند الجين thr D . الأجزاء السوداء على الخريطة موضحه بالتفصيل داخل قوس وفيها الجينات محدده فى أماكنها تقريبا والزمن اللازم أيضا مدون لها وأما عن الجينات ذات الدجمه فهى معلمه ومحدده أماكنها بدقه على الخريطة. توضح الأسهم إتجاه نسخ mRNA بالنسبة لكل جين.



(شكل ١٤٦) : كروموسوم بكتيرى والتزاوج

كروموسوم بكتيرى مبسط وأماكن قطع مختلفه على الكروموسوم من رقم ١ إلى رقم ٦ ويرمز للجينات المختلفة على الكروموسوم البكتيرى بالحروف الأبجديه وذلك للتبسيط.

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

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

يعتبر ما سبق إضافات فى علم الهندسة الوراثية ويوجد أيضا إضافات فى علم مزارع الأنسجة وفيما يلى موجز لذلك. يعتبر عام ١٩٣٤ هو بداية علم مزارع الأنسجة عندما تمكن هوايت White من فصل القمة النامية لجذور الطماطم وتنميتها على بيئة سائلة ونتج عن ذلك جذور عادية. تمكن هوايت وآخرون عام ١٩٣٩ من الحصول على مزارع صناعية لنسيج الكالس من نخاع ساق الدخان وأيضا من جذور الجزر. تمكن بول Ball عام ١٩٤٦ من قطع القمة النامية للساق وزراعتها على بيئة صناعية وأنتج منها نبات كامل. أمكن إثبات عام ١٩٥١ أن قطع القمة النامية للساق بطول ١٠٠ إلى ٢٥٠ ميكرون وتحمل بدائيات ورقتين خضريتين فقط يمكن أن يتكون منها نبات كامل. تمكن مويرMuir عام١٩٥٣ من فصل خلايا مفرده من نسيج الكالس وأمكن تنميه هذه الخلايا المنفرده. أثبت ستيورات Stewart عام ١٩٥٨ أن معلق خلايا الجزر carrot suspension cultures يمكن أن يزرع على بيئات صناعية وينتج منه أشباه أجنة embryoid أى أنه لأول يمكن إنتاج أجنه من خلايا خضريه غير تناسليه. تمكن كوكنج Cocking عام ١٩٦٠ من الحصول على بروتوبلاست خلايا النبات وذلك نتيجة لمعامله جدر الخلايا بأنزيمات هاضمه أى محلله لجدر الخلايا. تمكن تاكيبا Takeba ومساعدوه عام ١٩٧١ من أنتاج نبات كامل من بروتوبلاست خلايا النسيج الوسطى أى الميزوفيل لنبات التبغ. تمكن جوها Guha عام ١٩٦٦ من الحصول على نبات أحادى haploid من حبوب اللقاح.

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

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

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

١ ـ أستخدام مزارع الأنسجة فى أنتاج أعداد كبيره من النباتات مقاومة للأمراض

Tissue culture of diseae resistant plants

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

٢ ـ عزل طفرات مقاومة للأمراض من مزارع الأنسجة

Isolation of disease resistant mutants from plant cell cultures

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

٣ ـ إنتاج نباتات ثنائية dihaploids من نباتات أحادية haploids مقاومة

Production of resistant dihaploids from haploid plants

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

٤ ـ زيادة درجة مقاومه المرض بواسطة تزاوج البروتوبلاست

Increasing disease resistance by protoplast fusion

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

٥ ـ تكوين خلايا محوره transformed cells مقاومه للأمراض

Genetic transformation of plant cells for disease resistance

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

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

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

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

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

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

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

الطفيل وبذلك يصبح هذا المركب الأخير غير فعال وغير مؤثر على الطفيل. حيث أنه فى الحاله الأخيره لكى يصبح النبات مقاوم للطفيل لابد أن يرتبط أولا المركب المسبب لمقاومه العائل بالطفيل وفى حاله عدم الأرتباط يصبح الطفيل فعال ويفقد النبات صفه المقاومه ويصبح قابل للأصابه. تسمى الحالات الأخيره بكسر مقاومه النبات العائل حيث أن الطفيل كسر فاعليه المركبات المسببه لمقاومه النبات.

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

وظهور حاله المقاومه تسمى فتره نشوء المقاومه lag period وهى الفتره اللازمه لتخليق مركب أو أكثر وأنتقاله جهازيا فى النبات من المناطق الملقحه إلى المناطق الغير ملقحه من النبات. يمكن عمل هذا النوع من المقاومه أيضا بمعامله النبات ببروتين غلاف الفيروس أو ببروتين الفطر أو البكتريا أو بروتينات دهنيه أو مركبات عديده التسكر أو RNA الخميره أو بواسطه مركبات كيماويه بحته تخلق صناعيا مثل حامض بولى أكريلك polyacrylic acid أو حامض السيلسيلك salicylic acid (الأسبرين) أو 2 - chloroethylphosphonic acid . تعمل هذه المركبات على عمل مقاومه موضعيه local resistance للنبات عند رشها أو حقنها ولكنها تسبب مقاومه جهازيه systemic resistance عند أمتصاصها بواسطه الجذور أو أعناق الأوراق. وعامه كلما زاد تركيز المركبات السابقه كلما زادت سرعه ودرجه المقاومه للنبات العائل. تحتاج فتره نشوء المقاومه أى الفتره من حدوث التلقيح الإبتدائى وحتى حدوث المقاومه يومين أو ثلاثه أيام فى حاله المقاومه الموضعيه بينما تحتاج المقاومه الجهازيه إن وجدت أسبوع أو أكثر. تستمر المقاومه الجهازيه فى النبات مده تتراوح بين ثلاثه إلى خمسه أسابيع وبعدها يفقد النبات هذا النوع من المقاومه. يمكن التحكم فى المقاومه المستحثه المكتسبه ومنع حدوثها وذلك بمعامله النبات بالمضاد الحيوى actinomycin D حيث يسبب ذلك المركب تثبيط عمليه نسخ mRNA من DNA وبالتالى لا تتكون بروتينات جديده والتى قد تدخل فى تركيب الأنزيمات. يمكن تفسير ميكانيكية هذا النوع من المقاومه بأنه لابد من تخليق أنزيمات جديده بواسطه خلايا النبات لكى تحدث حاله المقاومه أى أن العامل المنشأ للمقاومه inducer of resistance ينشط بعض جينات خاصه فى التركيب الوراثى للنبات مسئوله عن ميكانيكية المقاومه للنبات عن طريق البروتينات ومنها الأنزيمات. تعتمد المقاومه المستحثة المكتسبه على تفاعل الحساسيه المفرطه (الزائده) hypersensitive reaction أو تليها. وعامه فإن كلا من المقاومه المستحثة المكتسبه وتفاعل الحساسيه المفرطه ينتج عنهما تكوين بروتينات جديده ذائبه new soluble host protein بواسطه خلايا النبات العائل تسمى b - proteins . يتم تثبيط إنتاج b - proteins ومنع حدوث المقاومه المستحثة المكتسبه وأيضا منع تفاعل الحساسيه المفرطه نتيجة معامله النبات بالمضاد الحيوى actinomycin D . كما أن تعريض النبات لدرجة حرارة من ٣٠ إلى٣٥°م تسبب تثبيط جميع التفاعلات السابقه. حتى الآن غير معروف إذا كان لمركبات b - proteins أو تفاعلات الحساسيه المفرطه علاقه بالمقاومه المستحثة

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

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

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

obeikandl.com

بعض المراجع العربيه المختاره

١ ـ أبصال الزينه وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومه

عماد الدين وصفى ومحمود خطاب ـ منشأه المعارف بالأسكندريه ـ ١٩٨٩ .

٢ ـ الأطلس النباتى

حسين العروسى وسمير ميخائيل وعماد الدين وصفى ـ دار المعارف الحديثه ـ الأسكندريه ـ١٩٨٩ .

٣ ـ المملكه النباتية

حسين العروسى وعماد الدين وصفى ـ دار المعارف الحديثه ـ الأسكندريه ـ ١٩٨٩ .

٤ ـ أمراض النبات

عباس فتحى الهلالى ـ دار المعارف ـ القاهرة ـ ١٩٦٦ .

٥ ـ أمراض النبات

حسين العروسى وسمير ميخائيل ومحمد عبد الرحيم ـ منشأه المعارف بالأسكندريه ١٩٩٢ .

٦ ـ أمراض البذور

سمير ميخائيل وتركى بيدر ـ جامعة الموصل ـ العراق ـ ١٩٨١ .

٧ ـ أمراض أشجار الفاكهه وطرق مقاومتها

محمد وجدى السواح ـ دار المعارف ـ القاهرة ـ ١٩٦٦ .

٨ ـ زهور القطف وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومه

عماد الدين وصفى ومحمود خطاب ـ منشأه المعارف بالأسكندريه ـ ١٩٨٩ .

٩ ـ علم أمراض النبات

كمال على ثابت ومحمود ماهر رجب وعبدالله الشهيدى ومصطفى فهيم ـ ١٩٦٦ .

١٠ ـ مورفولوجيا وتشريح النبات

عماد الدين وصفى وحسين العروسى ـ دار المعارف الحديثه ـ الأسكندريه ـ ١٩٩٠ .

obeikandl.com

obeikandl.com

بعض المراجع الأجنبية المختاره

Agrios, G.N. 1988. Plant Patholagy. Acad. Press, N.Y. and London.

Alexopoulos, C. J. 1964. Introductory Mycology. John Wiley, N.Y.

Barnes, E. H. 1978. Atlas and Manual of Plant Pathology. Prenum Press, N. Y.

Dickson, J. G. 1956. Diseases of Field Crops. McGraw Hill, N. Y.

Heald, F. D. 1933. Manual of Plant Diseases. McGraw Hill, N. Y.

Horsfall, J. G. and E. B. Cowling. 1977. Plant Disease. An Advanced Treatise. Acad. Press, N. Y.

Leach, J. G. 1940. Insect Transmission of Plant Diseases. McGraw Hill, N.Y.

Marlin, H. C. 1973. The Scientific Principles of Crop Protection. Arnold, London.

Mehrotra R. S. 1980. Plant Pathology. Tata McGraw-Hill, New Delhi.

Roberts, D. A. and C.W. Boothroyd. 1972. Fundamentals of Plant Pathology. W. H. Freeman and Co, San Francisco.

Roberts, D. A. 1978. Fundamentals of Plant-Pest Control. W. H. Freeman and Co., San Francisco.

Siegel, M. R. and H. D. Sisler. 1977. Antifugal Compounds. Marcel Dekker, N. Y.

Stakman, E. C. and J. G. Harrar. 1957. Principles of Plant Pathology. Ronald Press, N. Y.

Stapp, C. 1961. Bacterial Plant Pathogens. Oxford Univ. Press, London.

Stevens, R. B. 1974. Plant Disease. Ronald Press, N. Y.

Streets, R. B. 1972. The Diagnosis of Plant Diseases. Univ. Arizona Press, Tucson.

Strobel, G. A. and D. E. Mathre. 1970. Outlines of Plant Pathology. Van Nostrand Reinhold, N. Y.

Thorne, G. 1961. Principles of Nematology. McGraw Hill, N. Y.

Walker, J. C. 1952. Diseases of Vegetable Crops. McGraw Hill, N. Y.

Walker, J. C. 1969. Plant Pathology. McGraw Hill, N. Y.

Wallace, H. R. 1964. The Biology of Plant-Parasitic Nematodes. St. Martin's Press, N. Y.

Wallace, T. 1961. The Diagnosis of Mineral Deficiencies in Plants. Chemical Publishing, N. Y.

Westcott, C. and R. K. Horst. 1979. Plant Disease Handbook. Van Nostrand, N. Y.

Wheeler, B. E. J. 1969. An Introduction to Plant Diseases. John Wiley, N. Y.

Wood, R. K. S. 1967 Physiological Plant Pathology. Blackwell, Oxford and Edinburgh.

بعض المجلات العلميه المختاره

American Journal of Botany-*Amer. J. Bot.*

American Potato Journal-*Amer. Potato. J.*

Annals of Applied Biology-*Ann. Appl. Biol.*

Annals of Botany-*Ann. Bot.*

Annals of the Missouri Botanical Garden-*Ann. Mo. Bot. Gard.*

obeikandi.com

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

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

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

Botanical Gazette-*Bot. Gaz.*

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

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

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

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

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

Journal of Helminthology-*J. Helminthol.*

Mycologia-not abbreviated

Nature-not abbreviated

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

Physiological Plant Pathology-*Physiol. Plant Pathol.*

Phytopathologische Zeitschrift-*Phytopathol. Z.*

Phytopathology-not abbreviated

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

Plant Pathology-*Plant Pathol.*

obeikandl.com

بعض المجلات الناشره للمقالات العلميه

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

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

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

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

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

Bacteriological Reviews-*Bacteriol. Rev.*

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

Botanical Review-*Bot. Rev.*

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

obeikandl.com

تم بحمد الله تعالى

obeikandl.com

obeikandl.com

تعريف بالمؤلف

الأسم: عماد الدين حسين وصفى (مصرى ـ مواليد القاهرة)

الدرجات العلمية: حاصل على بكالوريوس فى العلوم الزراعية من كلية الزراعة جامعة الأسكندرية بتقدير جيد جدا وسنه تسعة عشر عاما.

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

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

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

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

المهمات العلمية: سافر مرات عديدة إلى الخارج (إلى أنجلترا والولايات المتحدة الأمريكية) حيث قام بعمل بحوث مشتركة وأيضا القاء محاضرات عن بحوثه ـ عضو مجموعة Wolfson College جامعة أكسفورد.

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

أنشطة علمية أخرى:

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

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

٣ ـ أختير كثيراً فى لجان الحكم على رسائل الماچستير والدكتوراه فى جامعات الأسكندرية وعين شمس وطنطا.

openkandil.com

obeikandl.com

تصويب الأخطاء المطبعية

رقم الصفحة	رقم السطر	الخطـــأ	الصواب
١٣٩	٤	PL	PG
١٣٩	قبل الأخير	PL	PG
١٨٥	التفاعل الأول	eatecholase → cresolase	→ cresolase
١٩٤	شكل ٥٦ ب		
	الأحدائى السينى	سقطت سهوا	عدد الأيام بعد التلقيح
	الأحدائى الصادى	50 ثم 00 ثم 50 ثم 200	50 ثم 100 ثم 150 ثم 200
٢٢٦	الأخير	برى مصدره وسط أفريقيا وأصناف	برى وأصناف
٢٣١	الأول	الباب الحادى العاشر	الباب الحادى عشر
٢٥٩	على الخريطة	٢٥٠٠ كيلو متر	٢٥٠٠ كيلومتر لكل سم على الخريطة
٢٧٣	الأول	الباب الثانى العاشر	الباب الثانى عشر
٢٨١	الأول	الباب الثالث العاشر	الباب الثالث عشر
٣١١	الأول	البابا الرابع العاشر	الباب الرابع عشر
٣٦٢	١١و١٤	tabotoxin	tabtoxin
تعريف بالمؤلف	١١	الألمانيه الغربه	الألمانية الغربية
الصفحة الثانية	١و٢	العالميه الدائم	العلمية الدائمة

obeikandl.com

٤ ـ عضو اللجنة العالمية الدائم لوظائف الأساتذة المساعدون وبعد ذلك أصبح عضو اللجنة العالمية الدائم لوظائف الأساتذة لعلوم النبات الزراعى وأمراض النبات.

٥ ـ أختير فى لجان كثيرة كعضو فى لجان فحص الانتاج العلمى لأعضاء هيئة التدريس فى الجامعات العربية ومنها جامعة الملك سعود (الرياض) والجامعة الأردنية.

٦ ـ عمل فى كثير من المشاريع العلمية كرئيس للمشروع أو مساعد رئيس المشروع ومنها مشاريع الترابط بين الجامعات الأمريكية والمصرية وأيضا مشروع مصر ـ كاليفورنيا. وقد ألقى محاضرات عن بحوثه فى جامعات ومعاهد عديدة منها تنسى Tennessee State University وأيضا لويزيانا وأيضا International Mycological Institute. وأيضا فى دورة الزراعة المحمية المتعددة بتونس تحت أشراف الفاو العربية.

٧ ـ قام بتحكيم كثير من البحوث فى المجالات المختلفة كما عنه يقوم بتحكيم كثير من المشاريع المقدمة للمجلس الأعلى للجامعات وأيضا لجامعة الأسكندرية.

٨ ـ أشترك فى كثير من المؤتمرات العلمية فى الخارج وفى مصر أيضا. كما شارك فى الأعداد لبعض المؤتمرات.

٩ ـ أختير كأستشارى لأمراض الزراعة المحمية. كما أختير عضو فى لجنة وقاية النبات بوزارة الزراعة المصرية.

المؤلفات : قام بتأليف سبعة كتب حتى الآن وهى ١ ـ مورفولوچيا وتشريح النبات ٢ ـ المملكة النباتية ٣ ـ الأطلس النباتى ٤ ـ زهور القطف وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة ٥ ـ أبصال الزينة وأمراضها وآفاتها وطرق المقاومة ٦ ـ فسيولوجيا النبات العملى ٧ ـ أساسيات أمراض النبات والتقنية الحيوية ثم كتاب منظمات النمو والأزهار وتطبيقها فى الزراعة.

الأنشطة الأخرى: أنتخب أربعة مرات كل فترة أربعة سنوات كعضو ممثل لمحافظتى الأسكندرية ومرسى مطروح لنقابة المهن الزراعية فى النقابة العامة بالقاهرة. وأختير أيضا مفوضا على فرع النقابة بالأسكندرية عام ١٩٩١.

رقم الإيداع

٩٣/٧٥٥٦

obeikandi.com