الباب الحادى عشر

الهندسة الوراثية ومنظمات النمو

تعتبر البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* من أهم الكائنات الحية المستخدمه لدراسة هذا الموضوع حيث أمكن إثبات وجود مناطق معينه على الماده النوويه تتحكم فى أنتاج بعض الهورمونات النباتية.

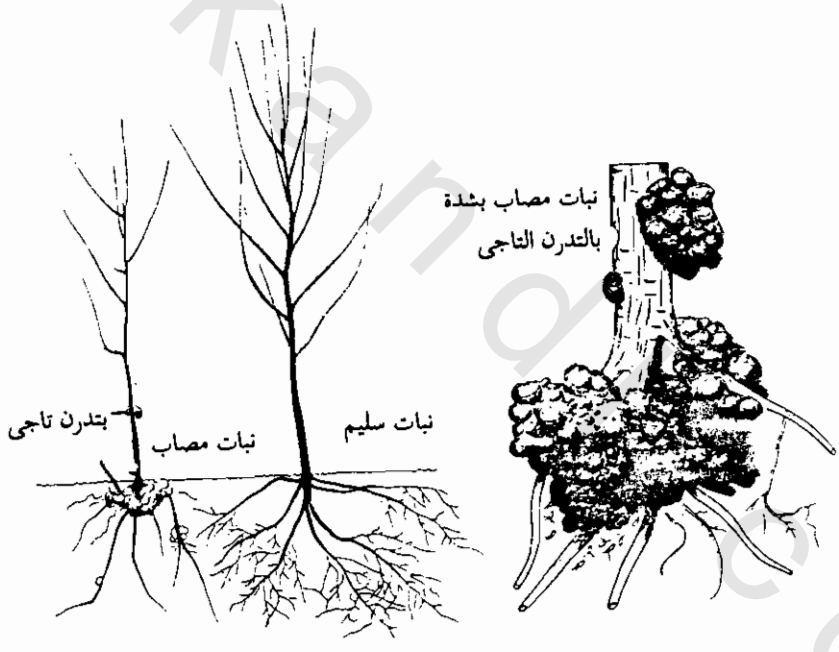
نبذة عن البكتريا *Agrobacterium tumefaciens*:

تسبب هذه البكتريا مرض هام فى النبات وهو التدرن التاجى crown gall ينتشرهذا المرض فى جميع أنحاء العالم. تصيب البكتريا عوائل خشبية وعشبيه كثيرة تشمل مائة وأربعون جنس تتبع ستون عائلة. توجد على وجه الخصوص على التفاح والفاكهة ذات النواه الحجرية والعنب وعباد الشمس.

يتميز المرض بتكوين تدرنات أى أورام ذات أشكال وأحجام مختلفة وتتكون عادة تحت سطح التربْة 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 الأنسان والحيوان ولذلك فأن كيفية حدوثه تمت دراستها بالتفصيل ولكن أيضا توجد إختلافات جوهرية فى الحالتين (شكل ٢١٢).

حديثا ونتيجة للدراسات المكثفة على هذه البكتريا وهذا المرض. فقد أمكن إثبات أن البكتريا تغير فى تركيب أى تحور المادة الوراثية لخلايا النبات العائل حيث أنه يوجد

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

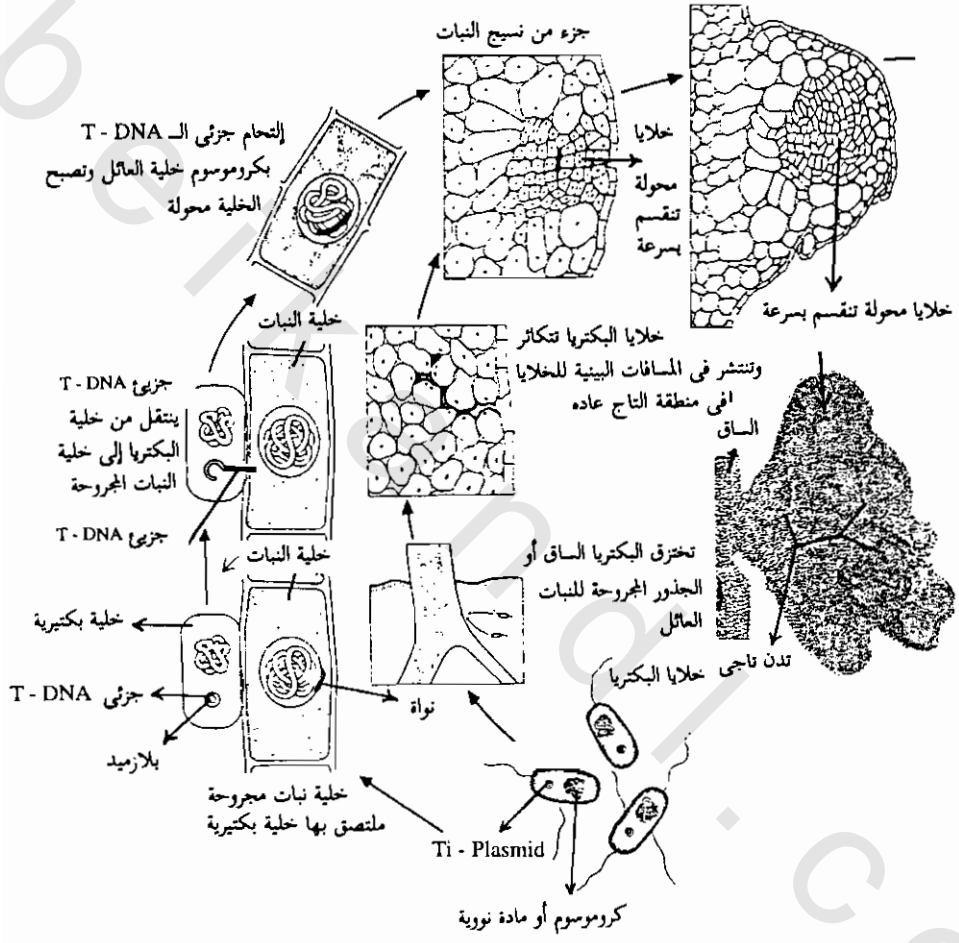


(شكل ٢١٢) : أعراض مرض التدرن التاجى.

وبذلك يمكن أن تنتقل جينات الفاصوليا إلى كروموسومات عباد الشمس وتصبح جزء من المادة الوراثية لنبات عباد الشمس. تستعمل هذه الطريقة بكثرة فى نقل جينات من نبات إلى آخر عن طريق هذه البكتريا ويعتبر DNA عباد الشمس المحتوى على جينات من الفاصوليا أنه recombinant DNA. حديثا يمكن تلقيح بروتوبلاست النبات العائل مباشرة بواسطة بلازميدات عادية أو مهندسة وراثيا وذلك فى عدم وجود البكتريا. يمكن الآن إزالة أجزاء من البلازميد Ti المسئول عن تكوين الأورام فى النبات وتظل الأجزاء الأخرى من البلازميد فعاله وقادرة على إظهار تأثيرها ولذلك فأنه يحدث تأثير عاد لهذه البلازميدات إلا أن خلايا البكتريا تكون غير قادرة على أنتاج أورام فى النبات. تعتبر هذه البكتريا مهندس وراثة طبيعى natural genetic engineer قادر على تحوير المادة الوراثية للنبات العائل وذلك بإدخال جزء من المادة الوراثية لهذه البكتريا إلى كروموسومات النبات العائل. والآن تستخدم هذه البكتريا على نطاق واسع لنقل جميع أنواع الجينات بين نباتات مختلفة متقاربة ومتباعدة وراثياً related and unrelated plants وأيضاً بين كائنات حية متباعدة بين الحشرات أو الفيروسات والنبات أى أنه يمكن نقل صفة من حشره معينة إلى النبات عن طريق هذه البكتريا (شكل ٢١٣).

الأعراض المرضية لهذه البكتريا على النبات:

تظهر أورام صغيرة على الساق أو الجذرو بالقرب من سطح التربة فى البداية، وفى الأطوار الأولى تكون الأورام تقريباً كروية الشكل بيضاء أو لحمية اللون وطرية. وحيث أنه لكى تحدث الأصابة لابد من وجود جروح أى أن التدرن أو الورم ينتج فى منطقة الجرح فإنه فى البداية لايمكن تمييزه عن نسيج الكالس ولكن سرعة تكوين الورم تكون أكثر بكثير من سرعة تكوين الكالس callus. يكبر التدرن فى الحجم ويصبح سطحه ملتو ومتعرج. فى النهاية تصبح الأنسجة الخارجية للتدرن بنيه سوداء أو سوداء نتيجة لموت وتحلل الأنسجة السطحية للورم. أحياناً لايوجد خط فاصل واضح بين نسيج الورم وأنسجة النبات حيث يظهر الورم نتيجة لإنتفاخ غير



(**شكل ٢١٣**) : دودة حياة البكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى.

منتظم الشكل فى الأنسجة ويحيط بالساق أو الجذر. عادة يكون الأنتفاخ خارجى وملاصق للجذر أو الساق عن طريق عنق ضيق من الأنسجة. وأحياناً يكون الورم أسفنجى القوام ويمكن أن ينفصل بسهولة عن الساق أو الجذر أو يتحلل أو ينفصل إلى أجزاء تسقط أو تتحلل. أحيانا أخرى يصبح الورم خشبى ويصبح درنى الشكل ويصل قطره ألى ٣٠ سم أو أكثر. بعض الأورام يمكن أن تتعفن جزئياً أو كلياً ويبدأ العفن من السطح ويتجه إلى داخل التدرن وذلك فى الخريف أو الشتاء ويتكون مرة أخرى فى نفس المكان فى الموسم التالى فى الربيع أو الصيف أى فى موسم النمو. أحياناً تتعفن أجزاء من الورم أو التدرن وتتحلل وتتكون أورام أخرى على الأجزاء المتبقية من الورم.

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

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

صفات البكتريا:

عصويه الشكل ذات عدد قليل من الأسواط محيطى peritrichous يوجد بداخل خلايا البكتريا للسلالات الممرضة بلازميد أو أكثر. يتكون البلازميد من DNA ثنائى الشريط أو الخيط، حلقى الشكل ووزنه الجزيئى يتراوح بين مائه إلى مائه وأربعون مليون دالتون. يحمل أحد هذه البلازميدات جينات خاصة بتكوين التدرن أى الأورام ويسمى Ti plasmid وهى إختصار لكلمتين وهما منتج الأورام tumor-inducing. خلو البكتريا من البلازميد Ti يجعلها غير ممرضه للنبات. كما أن المعاملة الحرارية

للخلايا البكتيريه 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 النباتية التى يمكن أن تصيبها الخلايا البكتيريه الحاملة لهذا البلازميد وأيضاً تحدد نوع الأصابة على النبات العائل حيث أنه توجد أنواع وحالات مختلفة من الأصابة سبق ذكرها وأهم خاصية لهذه السلالات من البكتريا أنها قادرة على نقل جزء من DNA هذا البلازميد بسرعة وبكفاءة عالية إلى المادة الوراثية لخلايا النبات ولذلك تتحول خلايا النبات العادية إلى خلايا أورام ينتج عنها التدرن وذلك فى فترة وجيزة. عندما يكتمل تحول بعض خلايا النبات العادية إلى خلايا نشطة فى عمل الأورام فإن هذه الخلايا الأخيرة تنقسم وتنمو بطريقة غير طبيعية لتزيد أو تكون الأورام ويكون ذلك حتى فى عدم وجود البكتريا حيث يصبح الأنقسام غير مرتبط بالبكتريا.

عند نقل جزء من هذه الأورام والذى يحتوى على خلايا نشطة فى الأنقسام إلى بيئة مغذية وقد تكون بيئة سائلة أو بيئة آجار فإن هذه الخلايا تكون نشطة فى الأنقسام فى عدم وجود هورمونات معينة تحتاجها الخلايا العادية على نفس هذه البيئة لكى تصبح قادرة على الأنقسام. أى أن الخلايا العادية تحتاج إلى وجود هورمونات معينة فى البيئة لكى تنقسم ومن هذه الهورمونات إندول حامض الخليك ولكن خلايا التدرن لا تحتاج إلى هذه الهورمونات على نفس البيئة. تخلق خلايا النبات المكونة للورم أى المحتوية على جزء من DNA بلازميد Ti مركبات كيماوية خاصة تسمى opines والتى يمكن أن تستعمل فقط بواسطة البكتريا المحتوية على بلازميد Ti مناسب بينما الخلايا العادية غير قادرة على تخليق هذه المركبات وحتى أستعمالها. وهذه حالة طفيل وراثى genetic parasite حيث أن جزء من DNA بلازميد البكتريا ينتقل إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وبذلك ينبه ويشجع الخلايا على تكوين مركبات معينه لازمه للبكتريا وغير لازمه لخلايا النبات العائل ولا يكونها أصلاً أى أنه يحدث تغيير فى عمليات التحول الغذائى فى خلايا النبات لصالح البكتريا وحيث تستفيد البكتريا فى غذائها من هذه المركبات.

حدوث المرض:

تعيش البكتريا فى الشتاء فى التربه وحيث يمكنها أن تعيش كذلك لعدة سنوات ويكون نوع المعيشة رميه. عند نمو النبات العائل فى هذه التربه الملوثه بالبكتريا فإنها تخترق الجذور أو السيقان بالقرب من سطح التربه ولابد من وجود جروح حديثه نسبياً لكى تحدث عملية الأختراق وبالتالى إصابه النبات. تتكون هذه الجروح نتيجة للعمليات الزراعية والتطعيم والحشرات إلخ. توجد البكتريا فى بداية الإصابة فى المسافات البينية بين خلايا النبات وتنشط الخلايا المحيطه بها لكى تنقسم. يتكون نتيجة لذلك حلقات من الخلايا التى لها قدره فائقة على الأنقسام بالمقارنه بالخلايا العادية وتظهر هذه الحلقات من الخلايا فى نسيج القشرة أو الكمبيوم تبعاً لدرجة عمق الجروح. تحتوى هذه الخلايا على نواه أو أكثر. تنقسم هذه الخلايا بسرعة فائقة تسمى هذه الحالة hyerplasia وتكون خلايا غير متشكلة وغير متميزه فى تركيبها التشريحى وبعد حوالى عشره أيام إلى أسبوعين بعد التلقيح يظهر الورم ويمكن رؤيته بالعين المجردة. أمكن للمؤلف عدوى نباتات صغيره من عباد الشمس وبدء ظهور الورم بعد أربعة أيام. حيث أن الأنقسام السريع العشوائى للخلايا وأيضا كبر حجم الخلايا بطريقة غير منتظمة فإن التدرن أو الورم يزداد فى الحجم تدريجيا ويكون تدرن صغير. عادة تكون البكتريا غير موجودة فى مركز التدرن أى أن هذا الجزء من الأنسجة خال من خلايا البكتريا إلا أن الطبقة أو الجزء السطحى من التدرن يحتوى على خلايا بكتيريه فى المسافات البينية للخلايا. فى هذه المرحلة تتميز بعض خلايا التدرن إلى أوعية خشبية وقصيبات ولكنها تكون غير متصلة بنسيج الخشب للنبات أو يكون إتصالها فى مناطق قليله محدوده بنسيج الخشب للنبات. عند كبر الورم فى الحجم فإنه يضغط على الأنسجة المحيطة به وأيضاً الأنسجة أسفله والتى تسبب سحق وتمزق لهذه الأنسجة فى النبات العائل. قد يحدث سحق لأوعية الخشب بواسطة التدرن وقد يسبب ذلك ضعف إنسياب الماء إلى أعلى فى الأوعية الخشبية وبذلك يقل إنسياب الماء إلى المجموع الخضرى قد يصل ذلك إلى ٢٠ ٪ فقط من الماء المنساب إلى المجموع الخضرى فى الحالة العادية.

لا تغطى التدرنات الملساء الصغيرة بنسيج البشره ولذلك فإنها تهاجم بالحشرات أو الكائنات الحية الدقيقة الرمية. هده الكائنات الأخيرة 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 جديدة.

عند كبر الأورام تصبح أحياناً خشبية وصلبة. تكوين الحزم الوعائية الغير كامل والغير مرتب فى الورم يكون غير فعال فى تأدية وظيفته ونتيحه 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 عادة يتبقى جزء حى من التدرن ويتكون منه أورام أخرى فى نفس الموسم أو فى الموسم التالى.

عند أصابة الأنسجة الغير بالغة والصغيرة السن وأيضاً الأنسجة التى لها درجه كبيره من الأستطالة فإن يتكون فى منطقه الأصابه ورم إبتدائى primary tumor وقد يتكون أسفل هذا الورم ولكن عادة يتكون أعلاه ورم آخر يسمى بالورم الثانوى أو التدرن الثانوى secondary tumor ويمكن أن يبعد هذا الورم أو التدرن الثانوى عن الورم الإبتدائى لمسافة صغيرة أو متوسطه أو كبيرة حيث يمكن أن يظهر الورم أو التدرن الثانوى على فرع النبات. أحياناً تظهر الأورام الثانوية على ندب الأوراق المتساقطة أو فى مكان الجروح الناتجة عن عوامل مختلفة أو حتى على أجزاء من الساق غير مجروحة ظاهرياً أو على أعناق الأوراق وعلى العروق الوسطية أو العروق الكبيرة للأوراق. تبعد هذه الأوراق المصابة عن الورم أو التدرن الإبتدائى عدة سلاميات. بداية تكوين التدرن الثانوى تكون من نسيج خشب الحزم الوعائية. وهده الأورام أو التدرنات الثانوية تكون دائماً خالية من البكتريا المسببة للمرض. حيث أنه عند قطع هذه الأورام وتعقيمها ووضعها على بيئة مناسبة فإنه لم يمكن عزل هذه البكتريا

وذلك دليل على أن هذه الأورام الثانوية خالية من البكتريا . عند أخذ جزء من الورم أو التدرن الثانوى وتطعيمه على نبات سليم فإنه يسبب تكون أورام على النبات السليم وتكون هذه الأورام خالية من البكتريا أيضاً ولكنها تشبه الأورام الأبتدائية فى شكلها ومظهرها وتركيبها .

يثبت ذلك أن البكتريا لها أهمية كبيرة فى بداية المرض فقط حيث أنها تسبب تأثير مهيج للخلايا والأنسجة irritant effect فى النبات المصاب. وبعد حدوث الأضطراب والهياج فى الخلايا فإنها لا تحتاج إلى البكتريا لحدوث إنقسام الخلايا الغير منتظم والمسبب لتكوين التدرن حيث أن هذه الخلايا تصبح قادرة ذاتياً على إنتاج العامل المؤثر والذى يحدث هياج للخلايا لتصبح قادرة على الأنقسام بسرعه فائقة وبطريقة غير منتظمه وأيضاً بطريقة غير متحكم فيها uncontrolled ولذلك فإن البكتريا لها أهميتها فقط فى بداية حدوث الورم ولكن بعد ذلك يمكن للخلايا المكونة للورم أن تسبب هياج خلايا أخرى وأنقسامها إنقسام زائد فى عدم وجود البكتريا. بالرغم من وجود دراسات مكثفة لمعرفة طبيعة المسبب لهياج irritant خلايا النبات وميكانيكية تحول الخلايا العادية إلى خلايا أورام فإن المعلومات فى هذين الموضوعين لازالت غير متكامله وغير حاسمه. عامة فإن كمية كبيرة من هذه المعلومات قد عرفت خلال العشر سنوات الماضية وهى أن خلايا البكتريا للسلالات الممرضه للنبات تحمل بلازميد من نوع معين يسمى بلازميد Ti وأن عدم وجود هذا البلازميد يفقد البكتريا قدرتها على أصابة النبات ولابد أن تكون الأصابه بالقرب من جرح حديث. تدخل هذه البكتريا جزء من البلازميد يسمى T-DNA فى المادة الوراثية لخلايا النبات المصابة بالقرب من الجروح وحيث تصبح خلايا النبات فى هذه المنطقة قابلة لأستقبال هذه الجزء أى T-DNA أى أن خلايا النبات تأخذ أعداد من T-DNA فى هذه المنطقة. ولذلك فإن خلايا النبات فى هذه المنطقة تتحور لكى تصبح قابلة لأستقبال T-DNA وأما عن كيفية هذا التحور وكيفية حدوثه فهو غير معروف. تصبح أجزاء T-DNA ملتحمه بكروموسومات خلايا النبات فى أماكن

عديدة. تصبح هذه الخلايا النباتية قادرة على أظهار الصفات الموجودة فى T-DNA وتسمى هذه الخلايا بأنها محولة. هذه الخلايا المحوله transformed تنتج opines والتى تستخدم وتستعمل فقط بواسطة خلايا البكتريا التى تحتوى على بلازميد Ti المحتوى على جزء T-DNA. يزداد تركيز مركبات أخرى فى هذه الخلايا النباتية المحولة ومنها الهورمونات النباتية مثل أندول حامض الخليك وأيضاً بعض السيتوكينينات cytokinins وبعض الأنزيمات.

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

مقاومة المرض:

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

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

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

يمكن عمل مقاومة حيوية لهذا المرض وذلك بنقع البذور أثناء الأنبات أو غمر بادرات المشتل أو الأصول المستعملة كجذور فى معلق من سلاله خاصه من سلالات البكتريا *Agrobacterium radiobacter* وهى رقم ٨٤(strain No84). تضاد هذه السلاله من البكتريا كثير من سلالات البكتريا المسببه لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابه. يمكن معاملة البذور العادية الغير نابته بهذة السلاله كما يمكن أيضاً رش وغمر التربه فى مكان النبات بمعلق من خلايا البكتريا لهذه السلاله. يعتقد أن هذه السلاله ٨٤ من البكتيريا توجد على سطح العائل وتفرز مركب bacteriocin agrocin . يعتبر هذا المركب مثبط لكثير من السلالات الممرضة للبكتيريا المسببه لمرض التدرن التاجى وبذلك تقى النبات من الإصابه ومن حدوث التدرن، ولكن لسوء الحظ بعض سلالات بكتريا التدرن التاجى الممرضه يمكنها أن تقاوم مركب agrocin 84 ولذلك فإن هذه السلاله البكتيريه فقدت قدرتها على مقاومة المرض فى بعض المناطق.

المتحركات المستعمله فى عزل ونقل الجينات

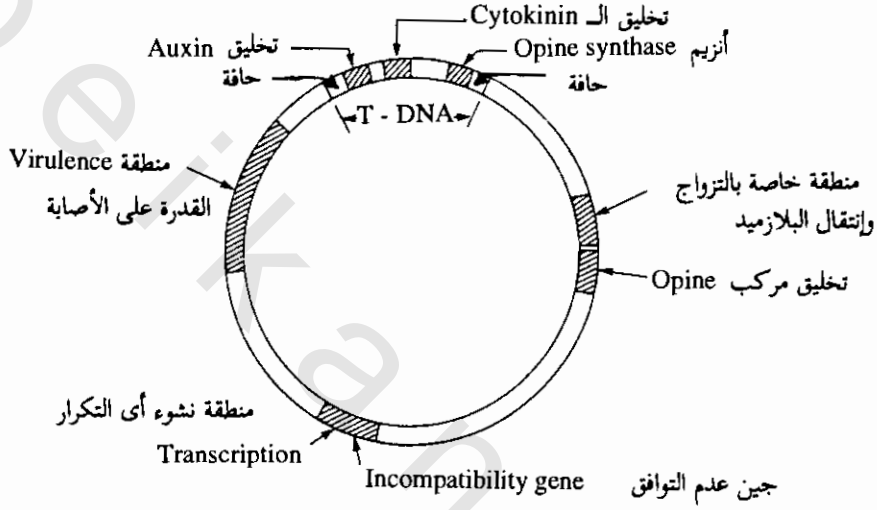
Cloning Vehicles Used For Gene Cloning In Plants

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

بلازميد Ti للبكتريا *Agrobacterium tumefaciens*: يستعمل هذا البلازميد بكثرة فى نقل صفات إلى خلايا النبات كما سبق ذكره فى الجزء السابق. يحتوى هذا البلازميد على عديد من الجينات وقد تم التعرف على بعضها وتحديد وظائفها.

يحتوى الجزء من هذا البلازميد المسمى T-DNA على عديد من الجينات منها . الجين الأول والذى يخلق أنزيم opine synthetase والذى يقوم بتخليق opines وهى مركبات تنتج فقط بواسطة خلايا النبات العائل المحوله transformed بواسطة هذه البكتريا . هذه المركبات وهى opines يمكن أن تستخدم كمصدر للكربون والأزوت بواسطة خلايا البكتريا التى تحتوى على بلازميد Ti . خلايا البكتريا الخالية من بلازميد Ti غير قادرة على أستعمال opines فى التغذية كمصدر للكربون والأزوت. كما أن خلايا البكتريا يجب أن تحتوى على جين خاص بتخليق opines. الجين الثانى أو مجموعة أخرى من الجينات تتحكم فى تخليق السيتوكينينات. حيث أن تثبيط تكوين السيتوكينينات فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الجذور. الجين الثالث أو مجموعة من الجينات والتى تتحكم فى تخليق الأوكسينات. حيث أن تثبيط تكوين إندول حامض الخليك فى النبات ينتج عنه تكوين أورام الساق. الجين الرابع أو مجموعة من الجينات وهى عبارة عن حافتى الجزء T-DNA من الناحية اليمنى والناحية اليسرى وتتكون كل من الحافة اليمنى والحافة اليسرى من ٢٥ زوج من القواعد النووية وهى التى تتحكم فى عملية نقل جزء من T-DNA من البلازميد إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل حيث وجد أن إزالة ٢٥ زوج من القواعد النووية أى الحافة اليمنى لجزئى T-DNA من البلازميد منع إنتقال هذا الجزء إلى المادة الوراثية لخلية النبات العائل وأيضا تؤثر على قدره البكتريا على الإصابه وتصبح غير فعالة فى إصابه النبات. تتأثر هاتين الحالتين وهما إنتقال جزيئ T-DNA إلى خلايا النبات العائل وقدرة الطفيل أى البكتريا على الإصابة virulence بجزء آخر من البلازميد فى مكان آخر منه ويسمى هذه الجزء من البلازميد بمنطقة قدرة البكتريا على إصابة النبات أى virulence region وهى بعيدة عن منطقة T-DNA . تتكون المنطقة الأخيره من عديد من الجينات . توجد جينات أخرى على البلازميد تتحكم فى عمليات حيوية أخرى مثل التزاوج الجنسى بين البكتريا ونقل بلازميد Ti من البكتريا الممرضة إلى البكتريا الغير ممرضة وأيضاً جين أو جينات أخرى تتحكم فى تخليق مركب opine فى خلايا النبات العائل بعد أن تنتقل هذه الجينات من

البلازميد Ti إلى كروموسومات النبات العائل. وأيضاً جين أو جينات تتحكم في عدم التوافق بين بعض البلازميدات وبعض سلالات من بكتريا التدرن التاجي وأيضاً جين أو جينات أخري تتحكم في تحديد مكان أصل وبداية إنقسام ونسخ وتضاعف البلازميد origin of transcription وreplication (شكل ٢١٤).



(شكل ٢١٤) : البلازميد Ti وموقع بعض الجينات التي تقوم بعمل بعض الوظائف الهامة.

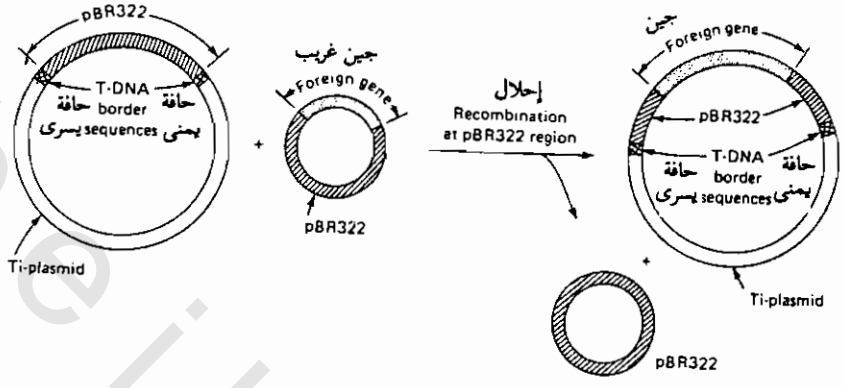
يعتبر البلازميد Ti فعال فى نقل DNA الخلية البكتيرية إلى المادة الوراثية فى النبات ولكن له بعض العيوب حيث أن أستعماله فى نقل مادة وراثية غريبة foreign أى غير موجوده به صعب حيث أن البلازميد كبير الحجم ومن الصعب التعامل معه وراثياً manipulate genetically والأهم من ذلك أن الخلية للنبات العائل تتحول من خلية عادية إلى خلية محوله تنقسم بسرعة كبيرة وتدخل فى تكوين الأورام أو التدرنات ولذلك من الصعب إعادة تكوين نبات عادى من هذه الخلايا المحولة transformed.

أتضح أيضاً أن الجينات الموجودة فى T-DNA عدا جينات الحواف (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) ليس لها دور فى نقل جزيئ T-DNA من البكتريا إلى خلايا النبات العائل أو التحامه بكروموسوماته. ومما هو جدير بالذكر أن أدخال جينات أو أجزاء DNA من خلايا الحيوان أو البكتريا أو النباتات الزهرية التى ليس لها علاقة بالنبات العائل إلى T-DNA البلازميد حيث توجد هذه الجينات فى داخل T-DNA فإن هذه الجينات يمكن نقلها إلى المادة الوراثية فى النبات العائل وتصبح جزء منها ولكنها تكون خاملة أى غير قادرة على التعبير عن وجودها فى النبات العائل وإظهار صفاتها . ولكن فى بعض الحالات وعند إضافة جين غريب ثم يضاف إليه الجزء المحفز أو المهيئ promoter region لجين أنزيم opine synthetase فإن هذا الجين يسمى جين كيميرى chimaeric gene وبذلك يمكن لبعض الجينات المنقولة أن تصبح نشطة أى قادرة على إظهار صفاتها فى خلايا النبات العائل وذلك نتيجة لنشاط بعض الأنزيمات الخاصة بها.

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

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

يعتبر كبر حجم بلازميد Ti غير مرغوب حيث يصعب نقله والعمل به والتعامل معه. يمكن التغلب على هذه الصعوبة وذلك بإزالة الجزء الأساسى فى T-DNA مع ترك الحافتين (الحافة اليمنى والحافة اليسرى) أى أزالة الجزء المحتوى على جينات تخليق الأوكسينات والسيتوكينينات. يتم شغل هذا المكان الفارغ من البلازميد بواسطة بلازميد آخر صغير ومدروس وراثياً تماماً أى معروف فيه تتابع الجينات المختلفة وهذا البلازميد يكون أحد بلازميدات البكتريا *E.coli* ومثال البلازميد pBR 322. يتم أيضاً وضع الجين المطلوب فى بلازميد آخرمن نفس النوع أى pBR 322 أى عمل cloning للجين فى البلازميد. يسمح للبكتريا *A.tumefaciens* بأخذ هذين النوعين من البلازميد وهو النوع الحامل للجين المطلوب إدخاله فى المادة الوراثية والنوع الآخر هو الغير حامل للجين. يحدث homologous recombination بين البلازميدات pBR 322 فى بعض خلايا البكتريا وتكون النتيجة نقل الجين المطلوب فى الجزء المخصص له فى جزء T-DNA أى بين الحافتين وبين جزيئين من بلازميد *E.coli* وهو pBR 322 وذلك لبلازميد الخلية البكتيريه المسببه لمرض التدرن التاجى أى بلازميد Ti (شكل ٢١٥). عند إضافة الخلية البكتيريه للنبات فإنها تنقل إلى كرموسومات خلية النبات جميع جزء DNA الموجود بين حافتين جزء T - DNA



(شكل ٢١٥) : نقل جين غريب إلى البلازميد Ti بإستعمال بلازميد آخ صغير.

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

توجد طريقة أخرى تستعمل للتغلب على كبر حجم البلازميد Tiوهى نقل أى جين مطلوب أو جينات مطلوبة بين حافتى جزء T-DNA ثم نقل هذا الجزء وهو

الحافتين والجين أو الجينات المطوب 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 الخاص بقدرة الطفيل على إصابة النبات virulence region من هذا البلازميد إلى بلازميدات أخرى صغيرة. كلا من هذين النوعين من البلازميدات الصغيرة غير قادر على إصابة النبات على إنفراد . وعند السماح بخلط هذين النوعين من البلازميدات بالبكتريا المسببة لمرض التدرن التاجى فإنها تنتقل إلى داخلها وتصبح خلايا هذه البكتيريا قادرة على إصابة النبات لأحتوائها على جين أو جينات الإصابة كما أن حافتى جزء T-DNA والجين أو الجينات المطلوبة تنتقل إلى كروموسومات خلية النبات العائل وتصبح جزء منها. وبذلك يتم نقل الجين أو الجينات إلى النبات العائل بكفاءة عالية.

تزداد الآن المعلومات الخاصة بأستعمال بلازميد Ti فى نقل الجينات أى أستعماله cloning vehicle أو vector وكلها فى صالح هذا البلازميد حيث أنه يحدث تقدم ملحوظ فى إستعماله مع وجود طرق جديدة بإستمرار لتسهيل أستعماله وزيادة كفاءة أستعماله فى حالات متعددة لم يكن يستعمل فيها أصلاً . ولذلك فإن نقل جينات من البكتريا أو النبات أو الحيوان إلى خلايا النبات أصبح فى الأمكان وأمكن أنجازه . ولكن مدى وكيفية تعبير هذه الجينات عن وظائفها فى خلايا النبات العائل الجديد regulatory controls of expression of genes غير معروفة أو معروف عنها القليل. تصيب بكتيريا التدرن التاجى النباتات ذات الفلقتين فقط ولا تصيب النباتات ذوات الفلقة الواحدة وبالرغم من أن كثير من محاصيل الغذاء مثل القمح والذرة والأرز وقصب السكر تتبع نباتات ذوات الفلقة الواحدة. وأيضاً نفس الشيء بالنسبة للبلازميدات Ti. ولكن أمكن الأن تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات فلقتين مباشرة بواسطة بلازميد Ti أو ببروتوبلاست خلايا بكتيرية ويسمى البروتوبلاست الملقح بهذه الأجزاء sphaeroplasts ويمكن إنتاج نباتات كاملة بعد ذلك من هذه sphaeroplasts. وأمكن الآن أيضاً تلقيح بروتوبلاست خلايا نباتات ذوات الفلقة

بواسطة بلازميد Ti ولكن حتى الآن لم يمكن إنتاج نباتات ذوات فلقة كاملة من البروتوبلاست وذلك على العكس من ذوات الفلقتين.

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

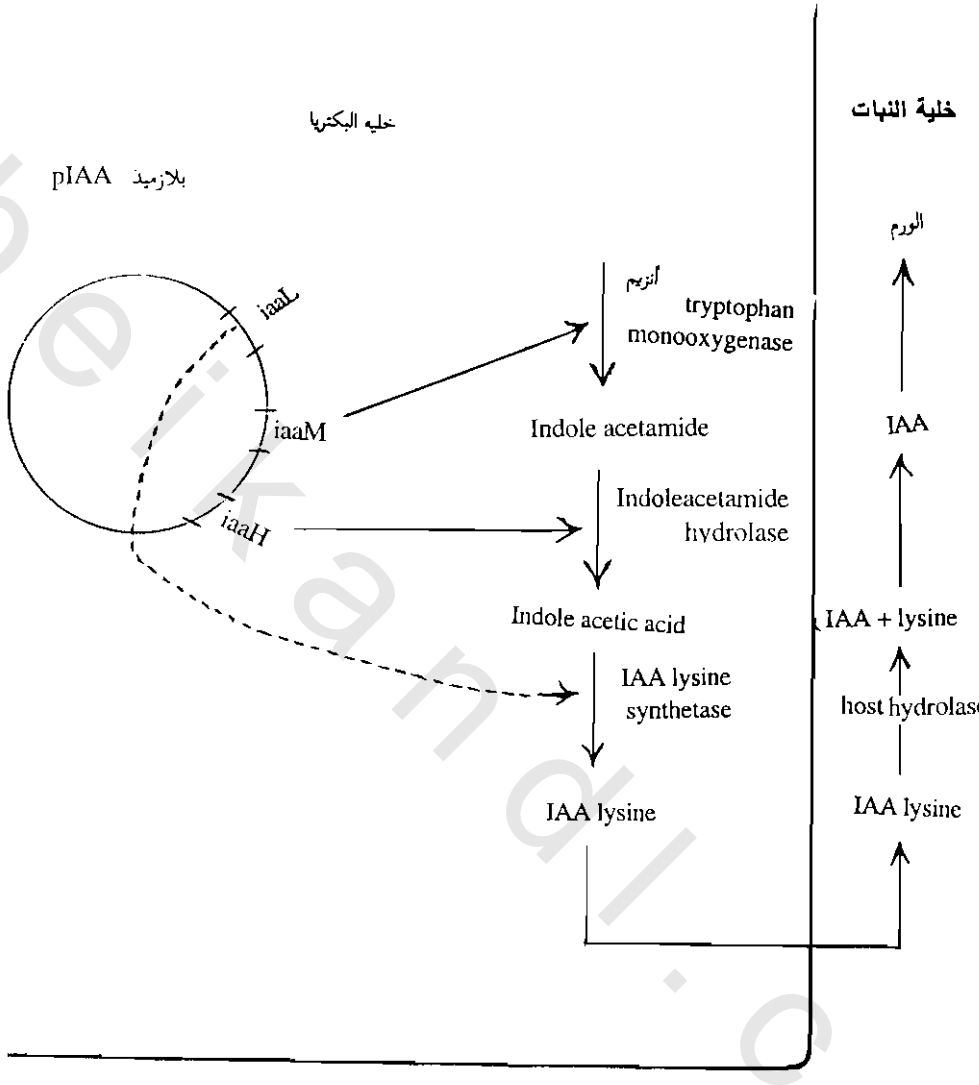
ولكن على العكس من ذلك فى صفات أخرى فقد أمكن حديثا تحديد مكان وجود الجينات المسئولة عن أزهار نبات الطماطم وأمكن عزل هذه الجينات وبالتالى أمكن عمل DNA تكميلى c DNA لها. وبالتالى عمل دراسات عن الأزهار بواسطة cDNA.

الأوكسينات والبكتريا *Pseudomonas savastanoi*:

تصيب هذه البكتريا نباتات الزيتون والدفله *Nerium oleander* وتسبب حدوث أورام على الجذور والسيقان والفروع والأوراق وأعناق الثمار. تبدأ الأورام صغيرة ثم تكبر تدريجياً وقد تصل الأورام إلى أحجام كبيرة قطرها عشرة سم أو يزيد. كما أن الأفرع الطرفية فى النبات تتقزم أو تموت. وقد تسبب الأصابة الشديدة موت الأشجار. تعيش هذه البكتريا فى داخل هذه الأورام. وبدراسات البيولوجيا الجزيئية molecular biology والهندسة الوراثية لهذه البكتريا أتضح أن البكتريا المسببة لتعقد

الدفله تختلف عن البكتريا المسببة لتعقد الزيتون فى موقع الجينات اللازمة لتخليق أندول حامض الخليك حيث وجد فى الحالة الأولى جينات مسئولة عن تخليق IAA على البلازميد وهى الجينات iaaM وهى مسئولة عن تخليق أنزيم تربتوفان mono oxygenase والذى يقوم بتحويل الحامض الأمينى تربتوفان داخل خلية البكتريا إلى indoleacetamide وأيضاً الجينات iaa H المسئولة عن تخليق أنزيم indoleacetamide hydrolase وهذا الأنزيم الأخير يقوم بتحويل indolacetamide إلى أندول حامض الخليك كما يوجد أيضا iaa L وهى جينات مسئولة عن تخليق أنزيمIAA lysine synthetase وهو يسبب أرتباط IAA مع الحامض الأمينى ليسين ليتكون IAA المرتبط أى IAA lysine. تحدث جميع الخطوات السابقة داخل خلية البكتريا. ينتشر IAA lysine من داخل خلية البكتريا إلى خلية النبات وحيث تفرز خلية النبات أنزيم IAA lysine hydrolase وحيث يسبب ذلك فصل الأخير إلى IAA والحامض الأمينى ليسين ويصبح أندول حامض الخليك حر وفعال حيث أنه فى الصورة المرتبطة يكون غير فعال. يسبب أندول حامض الخليك تنشيط وتشجيع خلية وخلايا النبات على الأنقسام السريع ولذلك يتكون الورم. وجد نفس الشيئ فى بكتريا تعقد الزيتون إلا أن هذه الجينات لاتوجد على البلازميد كما فى الدفله (شكل ٢١٥ أ) بل توجد على الكروموسوم البكتيرى أى الخاص بالخلية البكترية. أى أن فى البكتريا التى تصيب الدفله توجد هذه الجينات على البلازميد أما البكتريا التى تصيب الزيتون توجد هذه الجينات على الكروموسوم البكتيرى. يسمى هذا البلازميد الموجود فى داخل خلية البكتريا بأسم بلازميد أندول حامض الخليك pIAA (شكل ٢١٥ أ).

أمكن تثبيط جينات iaa L على البلازميد فى خلايا بكتريا الدفله ولم تتمكن خلايا البكتريا فى هذه الحالة من تكوين الأورام على نبات الدفله. أى أن تكوين الأورام على النبات مرتبط بنشاط وفاعليه وكفاءه جينات iaa L الموجودة على بلازميد الخلية البكتيرية.



(شكل ٢١٥أ) : خطوات تخليق أندول حامض الخليك فى داخل خلية البكتريا *Pseudomonas savastanoi* ودوره فى تكوين الورم فى النبات العائل.

obeikandl.com

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

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

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

openkandl.com