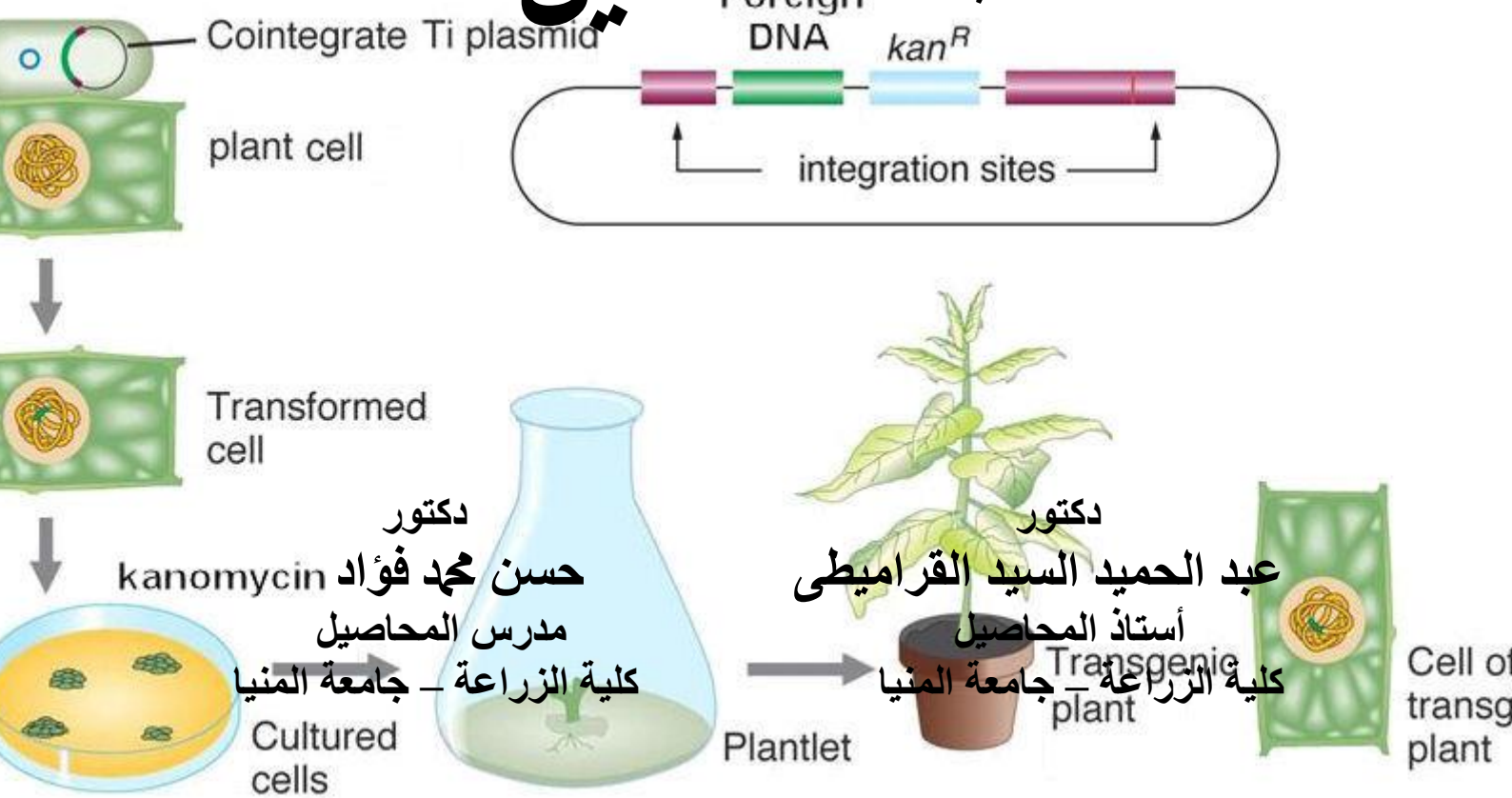
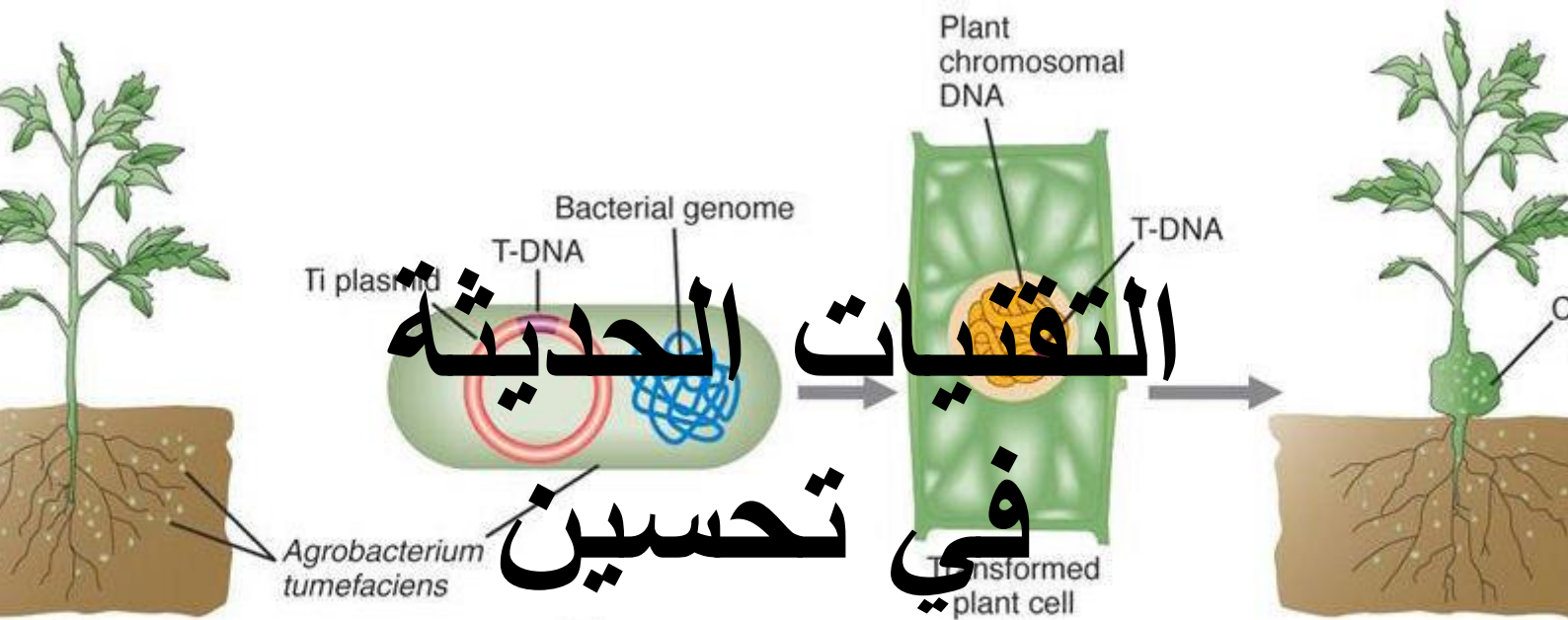


التقنيات الحديثة في تحسين المحاصيل



المحتويات

م	الموضوع	الصفحة
1	مقدمة عن تقنيات تحسين المحاصيل	1
2	الفصل الاول: زراعة الانسجة	2
3	الفصل الثاني: مزارع الخلايا المفردة	18
4	الفصل الثالث: مزارع الاجنة	27
5	الفصل الرابع: مزارع إنتاج النباتات الاحادية	37
6	الفصل الخامس: مزارع البروتوبلاست	47
7	الفصل السادس: مزارع المعلقات والجذور والاندوسبيرم	52
8	الفصل السابع: تركيب الحامض النووى	55
9	الفصل الثامن: تضاعف الحامض النووى	69
10	الفصل التاسع: الهندسة الوراثية	80
11	المراجع	101

مقدمة عن تقنيات تحسين المحاصيل

كلمة تقنية تعنى أسلوب منظم يختص بفن أو مهنة أو حرفة معينة وقد إستقر الكثير علي إطلاق لفظ تكنولوجيا Technology علي كلمه تقنية كما ارتبط سماع كلمة تكنولوجيا بالنشاطات غير الحية مثل تكنولوجيا صناعة الحاسبات أو السيارات أو الطائرات وغيرها ، إلا أن كلمة تكنولوجيا شملت النشاطات الحية أيضا (نبات ، حيوان ، كائنات دقيقة) وعرفت بمصطلح التكنولوجيا الحيوية Biotechnology وهو مكون من مقطعين الأول Bio المشتق من الكلمة اللاتينية Bios التي تعنى الحياة والمقطع الثاني Technology الذي يعنى الطريقة المنظمة لعمل الأشياء ، واستخدمت التكنولوجيا الحيوية في تحسين النباتات والحيوانات.

التكنولوجيا الحيوية النباتية إما أن تكون قديمة old plant biotechnology وتتضمن طرق التربية التقليدية للنباتات وإما جديدة new plant biotechnology وتتضمن تقنيات الإكثار وزراعة الأنسجة والخلايا والبروتوبلازم والأعضاء التكاثرية واندماج البروتوبلازم و تقنيات الـ DNA وتقنيات الهندسة الوراثية.

ويجمع تعريف الكونجرس الامريكى للتكنولوجيا الحيوية بين نوعى التكنولوجيا الحيوية القديمة والحديثة فهي اى تقنية تستعمل فيها الكائنات الحية أو أجزاء منها لعمل منتجات جديدة أو محورة بهدف تحسين النباتات أو الحيوانات أو تطوير كائنات دقيقة لاستعمالات خاصة.

أهمية التكنولوجيا الحيوية في تحسين المحاصيل

- 1- إنتاج أصناف محاصيل ذات صفات مرغوبة عالية الإنتاج
- 2- إنتاج أصناف مقاومة للأمراض والحشرات
- 3- إنتاج أصناف تتحمل ملوحة التربة وماء الري
- 4- إنتاج أصناف تتحمل الجفاف
- 5- إنتاج أصناف الحرارة العالية والمنخفضة
- 6- إنتاج أصناف ذات جودة عالية
- 7- إنتاج أصناف مقاومة للأمراض الفيروسية

الفصل الأول

زراعة الأنسجة Tissue Culture

يقصد بها زراعة أى جزء صغير معقم من أجزاء النبات في أوعية صغيرة أو كبيرة تحتوى على بيئة مغذية معقمة وتتم الزراعة في ظروف معقمة في كابينة الزراعة وتحضن في حضان تحت ظروف معينة من الحرارة والفترة الضوئية والكثافة الضوئية وذلك لفترة محددة

تطبيقات زراعة الأنسجة: Applications of Plant Tissue Culture:

- 1- المحافظة على الجيرم بلازم.
- 2- إنتاج المركبات والنواتج الثانوية للتمثيل الغذائي عن طريق زراعة الأنسجة المهندسة وراثياً.
- 3- الإكثار الدقيق يرفع معدل تضاعف النباتات المهمة اقتصادياً.
- 4- إنتاج نباتات خالية من الفيروسات.
- 5- التباينات الوراثية الجسدية تعتبر مصدر لإنتاج تباينات وراثية لها قيمة في النباتات.
- 6- تساعد في نقل صفات المقاومة للاجهادات الغير حية الى النباتات.
- 7- الهجن الجسمية والسيتوبلازمية تمكن من التغلب على مشاكل اختلاف الأنواع وعدم التوافق الجنسي وإنتاج هجن ذات صفات مرغوبة.
- 8- زراعة الأجنة تساعد في التغلب على سكون البذور.
- 9- النباتات الأحادية تساعد في حل المشكلات المتعلقة بالدراسات الوراثية وتساعد مربين النبات على إنتاج أصناف جديدة.
- 10- إنتاج الوقود الحيوي.
- 11- تساعد في إنتاج النباتات المتحولة وراثياً.
- 12- يمكن حث النباتات على الإزهار المبكر.
- 13- إنتاج النباتات الثلاثية المجموعة الكروموسومية.
- 14- إنتاج الفاكهة والخضروات اللابذرية عن طريق زراعة الاندوسبيرم.
- 15- يمكن زيادة القدرة على تثبيت النيتروجين الجوى من خلال الربط بين زراعة الأنسجة والهندسة الوراثية.
- 16- مزارع الكالس تفيد في دراسات أمراض النبات حيث تعمل كأداة فعالة في دراسة ميكانيكية المقاومة والحساسية للمرض.

17- تساعد الطرق المختلفة لزراعة الأنسجة في دراسة عمليات التخليق الحيوي والتغيرات الفسيولوجية والسيولوجية.

18- التهجين بين الخلايا الجسمية من خلال تقنية دمج البروتوبلاست بهدف الاتى:

- إنتاج هجن جسمية ثنائية المجموعة الكروموسومية من أنواع نباتية غير متوافقة جنسيا

- إنتاج سلالات خليطه من نوع نباتي لا يتم إكثاره إلا بالتكاثر الخضري

19- إنتاج هجن جنسية أو نوعية

20- الحصول على طفرات مقاومة لمبيدات الحشائش والسموم المرضية والحصول على نباتات نقية للطفرات المتنحية

زراعة الأنسجة النباتية لها أهمية كبيرة فى التكنولوجيا الحيوية النباتية خاصة فى برامج تحسين المحاصيل ، ومصطلح زراعة الأنسجة يعنى عملية زراعة الجزء النباتي (قطع من الأنسجة المتميزة الحية) فى المعمل in-vitro فى بيئة مغذية تحت ظروف تعقيم وتشمل زراعة الأنسجة على زراعة الخلايا ، زراعة الأعضاء ، مزارع المعلقات ... الخ.

زراعة الأنسجة النباتية هى أساس لكل أوجه التكنولوجيا الحيوية النباتية حيث يمكن نقل منتجاتها بسرعة من المعامل إلى الحقول

كما أصبحت زراعة الأنسجة النباتية الهدف الأهم لعلماء البيولوجيا الجزيئية ومربين النبات و حتى المصنعين لذلك فهى تساعد فى تحسين الأهمية الاقتصادية للنباتات ، بالإضافة لكل ذلك فإن زراعة الأنسجة تساهم بشكل كبير فى فهم الأساليب والعوامل المسؤولة عن النمو والتمثيل الغذائي والشكل الخارجي والتمايز فى النباتات.

مصطلحات:

زراعة المعلق Suspension Culture: هى زراعة خلية او مجموعة خلايا معلقة فى بيئه سائلة

المنفصل النباتى Explant: هو الجزء المقطوع من النسيج المتميز او العضو والمستخدم فى الزراعة مثل الاجنه الأوراق الجديدة البراعم ... الخ.

الكالس Callus: الكتله الغير متميزة من الخلايا وخلايا الكالس هى خلايا مريستيمه فى الطبيعة

تاريخ زراعة الأنسجة History of Tissue Culture

G. Haberlandt عالم نبات المانى فى عام 1902 قام بأول خطوة فى زراعة الخلايا والأنسجة بزراعة خلايا عزلت من نباتات كاملة مختلفة. وهى أكدت القدرة الذاتية الكامنة فى الخلايا النباتية totipotency

Gautheret, White and Nobecourt أوضحوا دور السيتوكينين والاكسين والهرمونات الأخرى والفيتامينات فى التأثير على انقسام الخلية والتمايز وتطوير طرق زراعة الأنسجة ، كما طوروا عدة أنواع من البيئات المناسبة لزراعة الخلايا والأنسجة والبروتوبلاست والأجنة والمتوك والقمم النامية للجذور ... الخ ، وأوضحوا أهمية دور الهرمونات فى مضاعفة الخلية كما ساعدوا فى تطوير طرق الزراعة فى المعمل

Gottlieb Haberlandt أول شخص حاول زراعة الأنسجة وطور مفهوم زراعة الخلايا فى المعمل وحدث بعدها تقدم هائل فى تقنيات زراعة الأنسجة

Braun عام 1959 أنتج أول نبات من خلية نبات ناضج

G.M.Morel عام 1960 حقق الإنتاج التجاري لزراعة الأنسجة بمضاعفة نبات الاوركيد لما يزيد على الضعف

وفيما يلى جدول يبين إسهامات بعض العلماء فى زراعة الأنسجة:

Year	Worker	Advancement
1902	Haberlandt	First attempt of <i>in-vitro</i> culture of plant cell
1904	Hannig	Culture of embryogenic tissue of crucifers
1922	Robbins	<i>In-vitro</i> culturing of roots
1925	Laibach	Zygotic embryo culture in <i>Linum</i>
1934	White	Culture of roots of tomato plant
1939	Gautheret, White and Nobecourt	Successful establishment of indefinite callus culture
1941	Braun	Culture of Crown Gall Tissues
1945	Loo	Cultures from stem tip
1955	Miller	Hormone Kinetin discovered
1957	Skoog, Miller	Discovered that Auxin : Cytokinin ratio regulates the organ formation
1960	Bergmann	Development of Plating technique for isolation of single cell
1970	Power	Successful Protoplast fusion
1970	Maheshwari and Guha	Successful Anther Culture
1971	Takabe	Plants regenerated from protoplasts
1974	Reinhard	Biotransformation in plant tissue culture
1978	Melchers	Production of somatic hybrid <i>Pomato</i>

- المتطلبات الأساسية وتقنيات زراعة الأنسجة

Requirements and Techniques of Tissue Culture

المتطلبات الرئيسية لزراعة الأنسجة هي :

1- معمل 2- بيئة الزراعة 3- ظروف التعقيم

1- المعمل

المعمل النموذجي لزراعة الأنسجة لابد من يوجد فيه بعض الأشياء الأساسية مثل:

- غرفة إعداد وتعقيم وتخزين بيئة الزراعة
- مصدر غسيل أدوات المعمل والأجزاء النباتية... الخ.
- مكان لتخزين الأدوات المعملية
- غرف زراعة او حضانات متحكم في ظروفها من حرارة ورطوبة وإضاءة
- مكان للمشاهدة وجمع البيانات

2 - بيئة الزراعة

هى الوسط الذي يزرع عليه الجزء النباتى وهى تحتوى على مغذيات متنوعة لازمة للزراعة وهى تختلف باختلاف النوع او العضو النباتى ومن اهم بيئات زراعة الانسجة بيئة MS (Murashige and Skoog) وبيئة LS (Linsmaier and Skoog) وبيئة B5 (Gamborg's) وبيئة White

أهم مكونات بيئة الزراعة:

1- المواد العضوية : تشمل الفيتامينات مثل الثيامين B1 والبيردوكسين B6 وحمض النيكوتينيك B3 ... الخ والمضادات الحيوية مثل الاستربتوميسين والكاناميسين والاحماض الامينية مثل الارجينين والاسباراجين.

2- المواد الغير عضوية : وتشمل المغذيات الصغرى مثل الحديد والمنجنيز والزنك والموليبدنيوم والنحاس والبورون والمغذيات الكبرى مثل النيتروجين والكبريت والفوسفور واليوتاسيوم والكالسيوم والمغنسيوم

3 - الكربون ومصدر الطاقة : مثل سكر السكروز وهو اهم مصدر للكربون وتوجد سكريات اخرى مثل اللاكتوز والمالتوز والجلالكتوز والرافينوز والسيلوبايوز ... الخ

4- منظمات النمو : ومنها الاوكسينات وهى ضرورية لانقسام الخلايا والسيتوكينينات وهى ضرورية لتعديل السيادة القمية وتمايز الاشطاء وحمض الابسيسيك والجبريلينات وهما يستخدمان احيانا.

- مواد التصلب : وهى تضاف للبيئة لجعلها صلبة او شبة صلبة مثل الاجار والجيلاتين والالجينات

- مستخلصات عضوية اخرى : مثل لبن جوز الهند و عصير البرتقال وعصير الطماطم ومستخلص البطاطس

وفيما يلى مكونات بيئة MS والمحالييل المستخدمه فيها:

Table : Stock solutions of MS basal medium

Constituents	Quantity (gm/litre)
Stock Solution I	
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	7.400
KH ₂ PO ₄	3.400
KNO ₃	38.000
NH ₄ NO ₃	33.000
CaCl ₂ . 2H ₂ O	8.800
Stock Solution II	
H ₃ BO ₃	1.240
MnSO ₄ . 4H ₂ O	4.460
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.720
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0.050
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0.005
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.005
Stock Solution III	
FeSO ₄ . 7H ₂ O	5.560
Na ₂ . EDTA . 2H ₂ O	7.460
Stock Solution IV	
Inositol	20.000
Thiamine HCl	0.100
Pyridoxine HCl	0.100
Nicotinic acid	0.100
Glycine	0.400

1 ltr of MS medium = (50 ml of stock solution I) + (5ml of each stock solutions II, III, IV)

3 - ظروف التعقيم:

المحافظة على الظروف المعقمة هو العامل الأهم والأصعب في تجارب زراعة الأنسجة لمنع تلوث التجربة بالكائنات الدقيقة ولهذا لابد من قتل جميع الميكروبات وإهمها الفطريات والبكتيريا.

المقاييس المأخوذة للمحافظة على التعقيم خلال زراعة الأنسجة:

- تعقيم اوعية الزراعة باستخدام المحاليل او الاوتوكلاف
- تعقيم ادوات الزراعة باللهب
- تعقيم بيئة الزراعة باستخدام التعقيم بالترشيح او الاوتوكلاف

يجرى التعقيم السطحي للأجزاء النباتية باستخدام نترات الفضة 1% او ماء البروم 1 - 2 % او فوق اكسيد الهيدروجين 10-12% او محلول هيبوكلوريت الصوديوم 0.3-0.6%...الخ.

General Technique of Tissue Culture الطريقة العامة لزراعة الأنسجة

الطريقة العامة لزراعة الخلية والنسيج والأعضاء واحده مع بعض الاختلافات الطفيفة مع اختلاف المواد النباتية ، وهناك خطوات أساسية لاستيلاء او تجديد نمو النباتات الكاملة من الجزء النباتي المزروع على البيئة المغذية كما فى الشكل التالي:

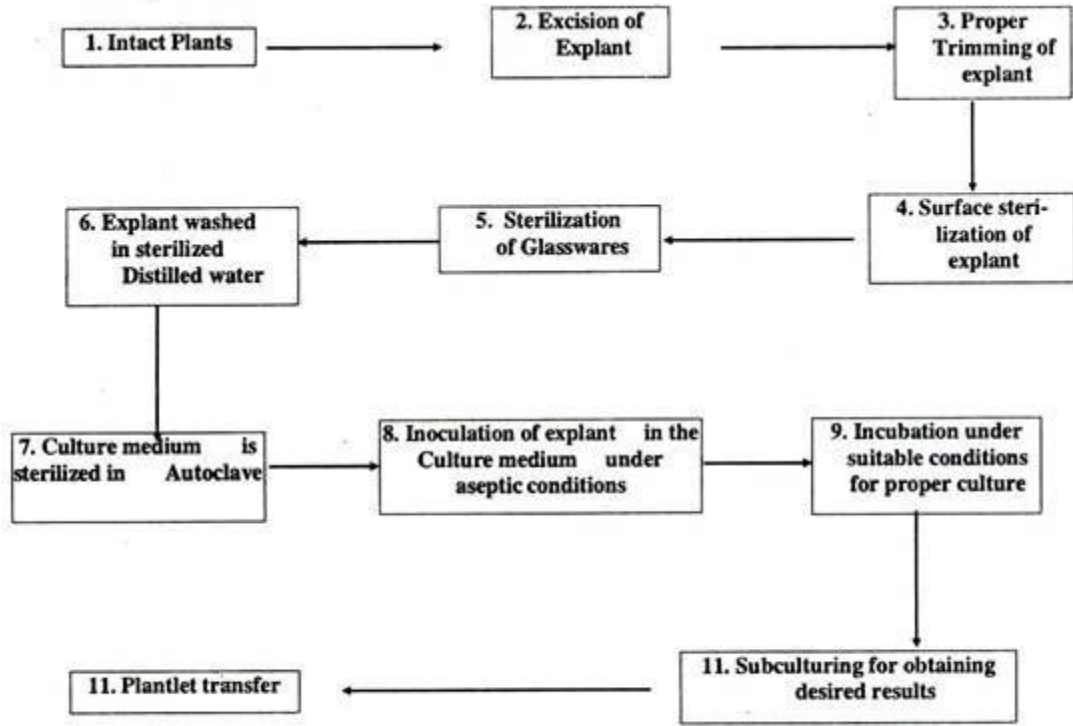


Fig. 1. Steps in general technique of Plant tissue culture.

شكل 1 . الخطوات العامة لزراعة الانسجة النباتية

أ- انتخاب وتعقيم الجزء النباتى
Selection and Sterilization of Explant

يُنْتخَب الجزء النباتى المناسب ويقطع من النبات المعطى ويعقم باستخدام المحاليل

ب- اعداد وتعقيم بيئة الزراعة
Preparation and Sterilization of Culture Medium

تعد بيئة الزراعة المناسبة مع الاخذ فى الاعتبار اهداف الزراعة ونوع الجزء النباتى المنزرع ثم تنقل البيئة المعدة للزراعة الى اوعية معقمة ثم تعقم فى الاوتوكلاف

ج- التلقيح
Inoculation

يلقح (ينقل) الجزء النباتى المعقم الى بيئة الزراعة تحت ظروف معقمة

د- التحضين
Incubation

تحضن المزارع في غرفة الزراعة حيث تتوفر الظروف الملائمة من ضوء وحرارة ورطوبة لنجاح الزراعة.

هـ- نقل المزرعة Sub culturing

تنقل الخلايا المنزرعة الى بيئة مغذية جديدة للحصول على النبيتات

و- نقل النبيتات Transfer of Plantlets

بعد عملية التقسية (اقلية النبيتات الى البيئة) للنبيتات يتم نقلها الى الصوبة الزجاجية في الاصص.

أدوات معمل زراعة الأنسجة: Equipment in Tissue Culture Lab

شكل 2 . يوضح ادوات معمل زراعة الانسجة

- أوتوكلاف - ميزان حساس - مقالب مغناطيسي - جهاز قياس الحموضة
- كابينة زراعة - زجاجيات - ماصات قياس - جهاز قياس شدة الضوء
- ثلاجة - ديب فريزر - حضان - فرن هواء جاف
- ميكروسكوبات - هزاز دائري - لمبات سبيرييت - ماصات دقيقة

- Autoclave
- Weighing Balance
- Magnetic stirrer
- pH meter
- Laminar Air flow Hood (Fig. 2)
- Light meter
- Glasswares
- Measuring cylinders
- Forceps, needles, spatulas
- Refrigerator
- Deep freeze
- Incubator
- Hot air oven
- Microscopes
- Rotary Shaker
- Spirit lamps
- Micropipettes.

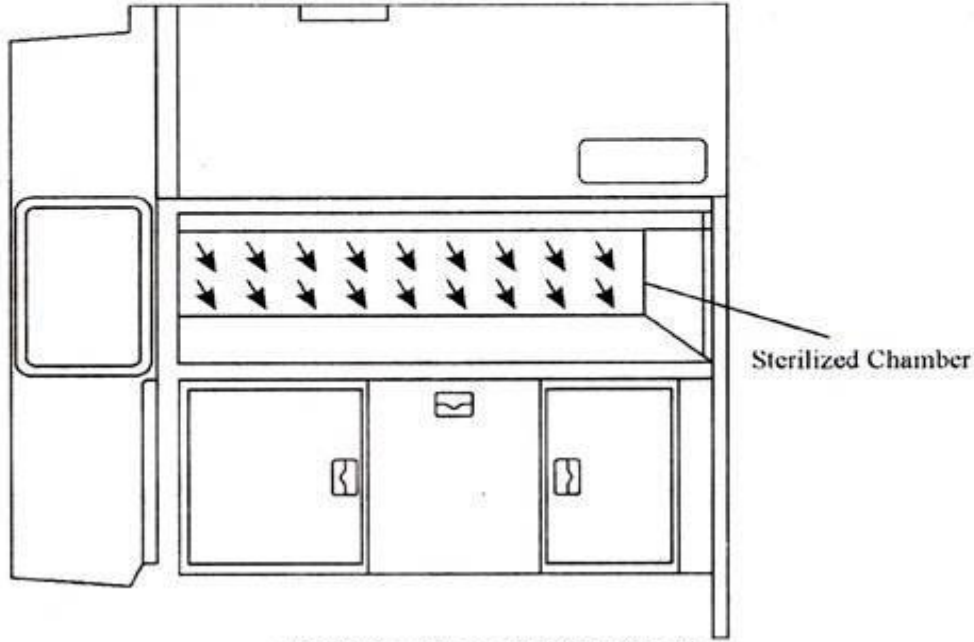


Fig. 2. Laminar Air Flow Hood.

شكل 2 . يوضح ادوات معمل زراعة الانسجة

الجوانب الأساسية في زراعة الانسجة Basic Aspects of Tissue Culture

في زراعة الانسجة يؤخذ جزء نباتي ويزرع على بيئة مغذية تحت ظروف تعقيم وفي النهاية نحصل على نبات كامل جديد . كيف يحدث ذلك؟

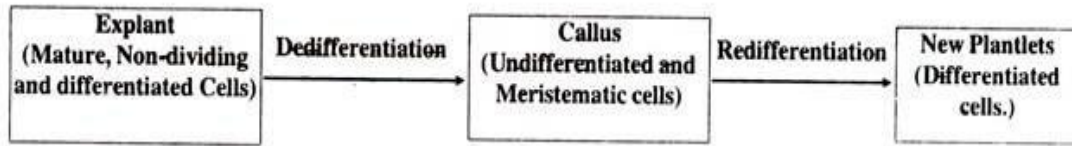
للإجابة على هذا السؤال نتجة ناحية القدرات الموروثة في الخلايا النباتية الى تعرف بالقدرة الكامنة الذاتية للخلايا على التمايز cellular totipotency

القدرة الكامنة الذاتية الخلوية Cellular Totipotency

القدرة الكامنة الذاتية للخلايا تعرف بأنها قدرة الخلية النباتية على النمو والتطور إلى نبات كامل جديد ، أو تعرف بأنها قدرة الخلية المفردة على التميز إلى عدة أنواع أخرى من الخلايا وهي خاصية توجد فقط في الخلايا النباتية الحية ولا توجد في الخلايا الحيوانية (باستثناء الخلايا الجرعية في الحيوانات). وبدأ استخدام هذا المصطلح في عام 1901 بواسطة العالم Morgan

ويلاحظ أن الجزء النباتي المأخوذ من نسيج ناضج متميز فان الخلايا في الجزء النباتي عادة ما تكون غير منقسمة او ساكنة في الطبيعة.

والخلايا الناضجة والخلايا الغير منقسمة تخضع لتغيرات تعيدها إلى الحالة المرستيمية (عادة حالة الكالس) ، وظاهرة عودة او ارتداد الخلايا الناضجة الى الحالة المنقسمة تعرف بانعكاس التمايز dedifferentiation وهي خلايا لها القدرة على تكوين نبات او عضو نبات كامل وهذه الظاهرة يطلق عليها إعادة التمايز re-differentiation وكلا الظاهرتين وراثيتان توجد في خاصية القدرة الكامنة للخلايا totipotency (شكل 3) والتي توضح ان الخلية الغير متميزة في الكالس تحمل معلومات وراثية ضرورية لازمة لاستيلاد نبات كامل ، كذلك فان الجينات المسؤولة عن انعكاس التمايز وإعادة التمايز توجد في الخلية الفردية التي تصبح نشطة للتعبير تحت ظروف الزراعة المثلى ، وبالتالي فان الخلايا ذات القدرة الكامنة totipotent cells هي اساس تقنيات زراعة انسجة النبات الكامل وباستغلال قدرة هذه الخلايا النباتية فيحاول علماء التكنولوجيا الحيوية تحسين المحاصيل والنباتات الاخرى المهمة تجارياً.



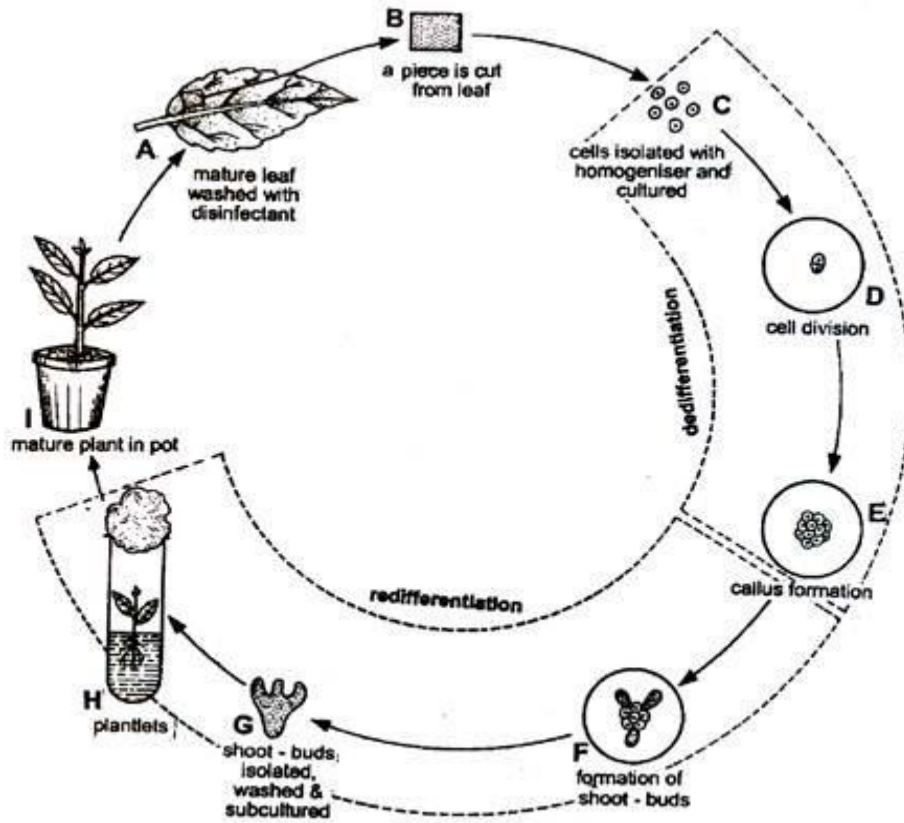


Fig. 3. Scheme depicting the totipotency of plant cells.

شكل 3. يوضح ظاهرة القدرة الذاتية الكامنة للخلايا النباتية

التمايز Differentiation

مصطلح التمايز يصف تطور انواع الخلية المختلفة مثل نمو اعضاء النبات مثل الجذور والاشطاء والبراعم ... الخ من الخلايا او النسيج المنزرع ، كما ان التمايز يعنى حدوث تغير فى نمو الخلية الذى يؤدى الى اداء او سلوك وظيفى متخصص بالاضافة الى الخصائص المورفولوجية العادية.

أنواع التمايز Types of Differentiation

الخلايا النباتية تميل لان تبقى فى طور سكون الذى ينقلب الى الطور المريستيمى وهذه العملية تعرف بعكس التمايز وكنتيجه لذلك تتكون كتلة متماثلة من نسيج غير متمايز، حيث ان خلايا الكالس تتمايز الى أنواع مختلفة من الخلايا او الأعضاء او الأجنة . وعلى هذا الأساس فان التمايز قد يكون من الأنواع التالية:

Cytodifferentiation

1- تمايز سيتولوجى

Organ Differentiation

2- تمايز الاعضاء

Embryo Genic Differentiation

3- تمايز جنيني

1- التمايز السيتولوجي او الخلوى Cytodifferentiation

تمايز الخلايا مهم لتكوين النباتات ، حيث يعرف تمايز أنواع مختلفة من الخلايا المنزرعة باسم التمايز السيتولوجي او الخلوى وهو يحدث للكالس الغير متميز عند إعادة تمايزة الى نبات كامل. ومن بين التمايزات الخلوية المختلفة فان التحول الى الانسجة الوعائية التى تأخذ اهتمام كبير فان خلايا الخشب واللحاء لايمكن ان يعاد تمايزها ولايمكن ان تعود الى الحالة المريستيمية بسبب عدم احتوائها على السيتوبلازم ، هذا بالرغم من ان خلايا الخشب فى اطوار نموها الاولى يمكنها ان تعود الى خلايا مريستيمية حيث ان تكوين الخشب عبارة عن تمايز الخلايا البرانشيمية الى خلايا تشبة الخشب وكذلك تمايز اللحاء عبارة عن تحول الخلايا البرانشيمية الى خلايا اللحاء.

العوامل المؤثرة على التمايز الخلوى Factors affecting cytodifferentiation

- 1- عوامل طبيعية مثل الضوء والحرارة ورقم الحموضة
- 2- عوامل كيميائية مثل المحتوى النيتروجينى المنخفض و المستويات العالية من ايونات الكالسيوم و التركيزات العالية من السكر
- 3- الهرمونات وبعضها يلعب دور هام فى التمايز الخلوى مثل الاوكسينات والسيتوكينينات والجبريلينات التى تحفز التمايز الخلوى وتكوين الاوعية وحمض الابسيسيك الذى عادة ما يثبته.

Organ Differentiation

2- تمايز الأعضاء

لـ مترادفين اما تمايز لتكوين الاعضاء organogenesis او تكوين اعضاء الجنين organogenic وهو يشير الى تكوين او استيلاد الاعضاء الكاملة (او النبات كلة) من الخلايا او الانسجة المنزرعة كما بالشكل 4 التالى :

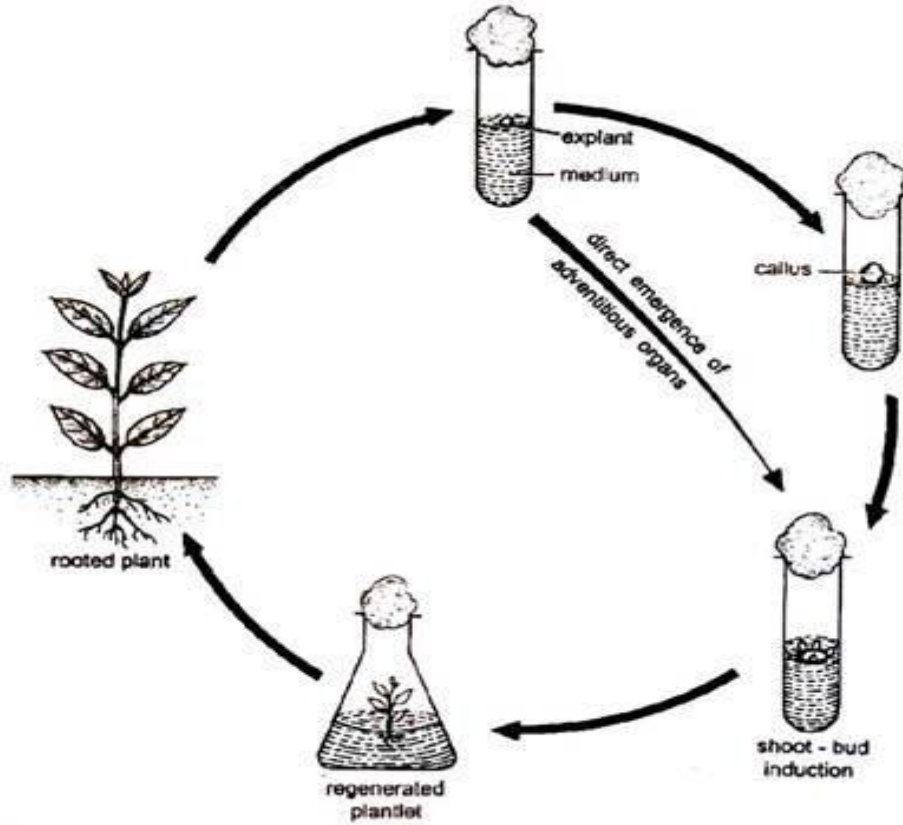


Fig. 4. Organogenic Differentiation.

شكل 4. التمايز العضوي

تكوين الأعضاء Organogenesis يعنى ميلاد أو تكوين عضو وهو يحدث لكلا من تمايز براعم الاشطاء أو بتكوين الجذور، ويتم تحفيز تكوين الأعضاء بواسطة مكونات البيئة والمواد الأولية الموجودة في الأجزاء النباتية الأصلية والمركبات الناتجة أثناء الزراعة.

ومن بين الأعضاء المختلفة التي تستحث لزراعة الانسجة الجذور والاشطاء والبراعم الزهرية والاوراق الا ان اعادة تجديد نمو البراعم الزهرية والاوراق يحدث بنسبة قليلة جداً بعكس اعادة تجديد نمو الجذور والاشطاء ، وبخلاف كل انواع تمايز الاعضاء فان تمايز براعم الاشطاء ينتج نباتات كاملة وهى لها اهمية كبيرة فى زراعة الانسجة.

يبدأ تكوين الجذور بالشعيرات الجذرية بينما يبدأ تكوين الاشطاء بتكوين براعم الاشطاء وهاتين الظاهرتين يتأثروا بالتغيرات فى نسب الاوكسين : السيتوكينين فى البيئة .

تكوين الاعضاء Organogenesis يحدث اثناء تكوين الكالس او اثناء التكوين المباشر للاعضاء (مثل الاشطاء العرضية) الذى لا يتخلله طور الكالس.

العوامل المؤثرة على تكوين الاعضاء Factors affecting organogenesis

1- نسبة الاوكسين : السيتوكينين في البيئة هي العامل الالهم المؤثر على نسبة الجذور/ الاشطاء في معظم النباتات

↑ سيتوكينين / ↓ اوكسين ← تكوين اشطاء

↓ سيتوكينين / ↑ اوكسين ← تكوين جذور

سيتوكينين معتدل / اوكسين معتدل ← تكوين اشطاء وجذور

سيتوكينين معتدل / اوكسين اقل ← تكوين الكالس

2- حمض الجبريلليك عادة ما يثبط تكوين الأعضاء

3- الحالة الفسيولوجية وحجم الجزء النباتي

4- التركيب الوراثي للنبات المعطى

5- العوامل الفسيولوجية مثل الضوء ودرجة الحرارة والرطوبة ... الخ.

3- تمايز الأجنة Embryo Genic Differentiation

الأجنة المتكونة من الخلايا الجسمية المنزرعة تحت ظروف المعمل تعرف بالاجنة الجسمية او الجسدية. وتعرف هذه العملية باسم تكوين الاجنة الجسمية somatic embryogenesis او تمايز الاجنة الجسمية embryo genic differentiation او تكوين الاجنة embryogenesis كما بالشكل 5 التالى.

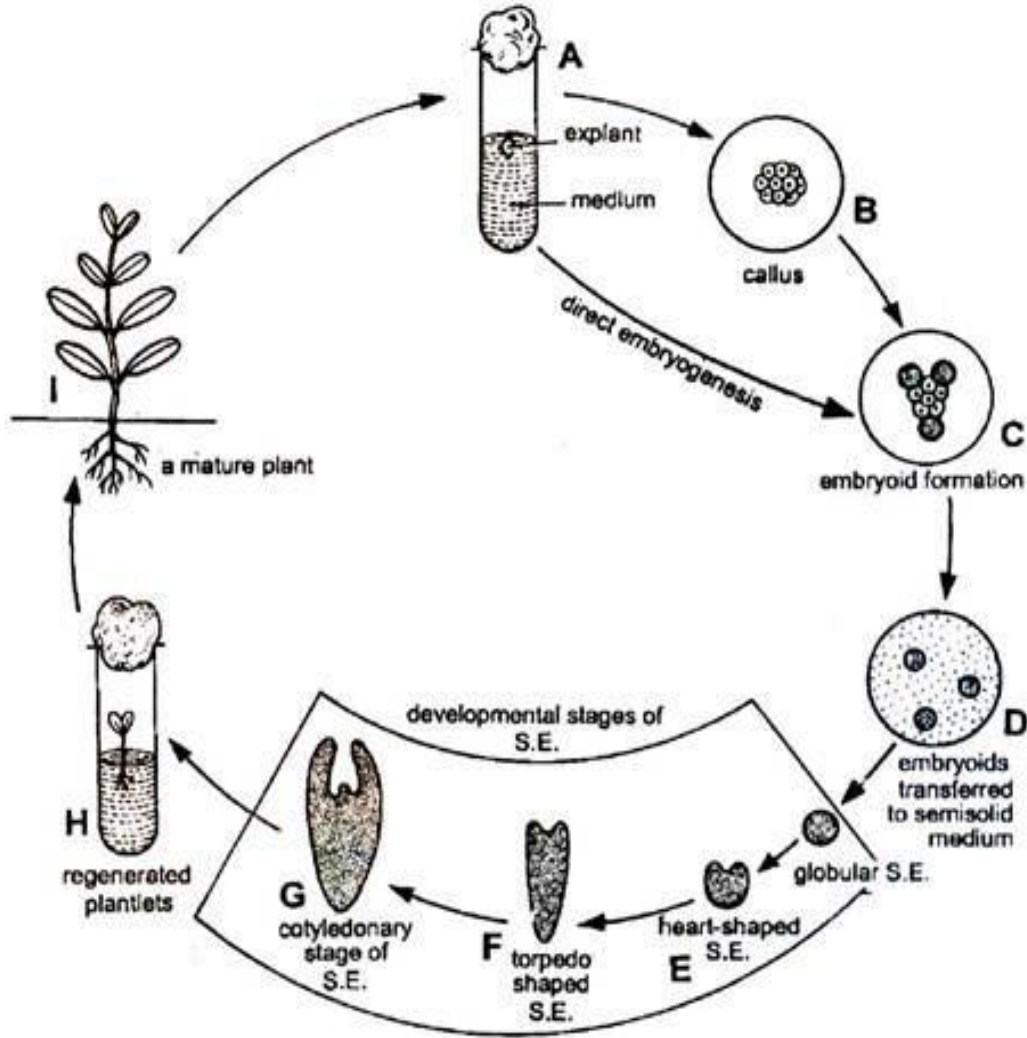


Fig. 5. Somatic Embryo (S.E.) Differentiation

شكل 5. تمايز الأجنة

كما يشار للأجنة الجسمية بـ *embryoids* ويمكن الحصول عليها بطريق غير مباشر بتكوين الكالس أو بطريق مباشر من الجزء النباتي بدون تكوين كالس ، إلا أن التكوين المباشر للأجنة عملية غير طبيعية بسبب تعقد البيئة المطلوبة.

أول من قام بتكوين أجنة جسمية في المعمل هو Steward et. al. (1958) على الجزر وتلا ذلك العديد من النباتات مثل الموالح والبن والذرة الشامية. ويمر تكوين الأجنة الجسمية بمراحل الشكل الكروي والقلبي والتوربيدو وينتهي بتكوين الفلقات للجنين ، ولا تتصل الأجنة الجسمية وعائيا بالجزء النباتي أو الكالس لذلك يمكن فصلها بسهولة ، وتكوين الأجنة الجسمية لا يستخدم كثيرا في أكثر النباتات لانه غالبا صعب وهناك خطورة كبيرة من حدوث الطفرات ، وهناك أيضا فرص كبيرة لفقد القدرة على إعادة تجديد النمو في الزراعة المتكررة.

Factors affecting Embryogenesis

العوامل المؤثرة على تكوين الاجنة

1. الحالة الفسيولوجية ونوع الجزء النباتى
2. التركيب الوراثى للنبات المعطى
3. منظمات النمو منها الاوكسين ضرورى لبداية تكوين الجنين والسيبتوكينين يحفز تكوين الجنين والجبريلينات تثبط تمايز الجنين وحمض الابسيسيك يعوقه
4. تركيز النيتروجين والاكسجين
5. العوامل الطبيعية مثل درجة الحرارة والضوء

أنواع مزارع الأنسجة

تنقسم مزارع الأنسجة حسب المادة النباتية المنزرعة إلى الأنواع الآتية:

- 1- مزارع الخلايا
- 2- مزارع الاجنة
- 3- مزارع الميرستيم
- 4- مزارع النباتات الاحادية
- 5- مزارع البروتوبلاست
- 6- مزارع الجذور
- 7- مزارع الاندوسبيرم

الفصل الثانى

مزارع الخلايا المفردة

Single Cell Culture

زراعة الخلية هى عملية انتاج سلالات خلية مفردة ، وسلالات الخلية هى الخلايا التى تنتج من الخلية المفردة عن طريق الانقسام الميتوزى وهى طبق الاصل من السلالة الابوية ، وقام Haberlandt عام 1902 باول محاولات لزراعة الخلية المفردة (ناتجة من اوراق نباتات مزهرة) الا ان محاولات باءت بالفشل ولكنها شجعت العديد من الباحثين الاخرين على تحقيق نجاح فى هذا الاتجاه.

طريقة زراعة الخلية تعتبر افضل طريقة لتحليل وفهم التمثيل الغذائى للخلية وتأثيرات المواد الكيميائية المختلفة على الاستجابات الخلوية ، كما ساعدت زراعة الخلية المفردة بشكل كبير فى برامج تحسين المحاصيل عن طريق توسيع طرق الهندسة الوراثية لتشمل النباتات الراقية.

تطبيقات زراعة الخلية :

- 1- شرح عمليات التمثيل الغذائى فى الخلايا
- 2- انتاج طفرات وانتخاب المرغوب منها
- 3- انتاج النواتج الثانوية للتمثيل الغذائى
- 4- لها أهمية كبيرة فى تحسين المحاصيل

زراعة الخلية المفردة تجرى فى ثلاث خطوات رئيسية :-

- 1- عزل الخلية المفردة من نبات سليم باستخدام الطرق الإنزيمية او الميكانيكية
 - 2- زراعة الخلية المفردة فى المعمل باستخدام طريقة غرفة النمو الدقيقة او طريقة القطرة الدقيقة او طريقة برجمان لزراعة الخلية كما بالشكل 6
 - 3- اختبار حيوية الخلية باستخدام صبغات خاصة
- زراعة الخلية تحتاج لبيئة مغذية غنية مناسبة وتجرى فى الظلام لان الضوء يفسد زراعة الخلية.

يتم عزل الخلايا المفردة من أعضاء النبات أو من الأنسجة المنزرعة كما يلي :

1- من أعضاء النبات: From plant organs:

أوراق النبات بها خلايا متماثلة وهى المصدر الرئيسي لخلية الزراعة ويمكن عزل الخلايا المفردة من الأوراق بالطريقة الميكانيكية أو بالطريقة الإنزيمية.

- **الطريقة الميكانيكية :** يتم قطع الأوراق المعقمة سطحيا الى قطع صغيرة (اقل من 1 سم²) وتوضع معلقة فى بيئة و تعرض للسحق فى أنبوب الخلط المتجانس الزجاجية ، ثم يرشح الخليط المتجانس بالمرشحات ويجرى بعد ذلك الطرد المركزى على سرعة منخفضة لإزالة البقايا الخلوية ويزال الرائق ويخفف للحصول على الكثافة الخلوية اللازمة.

- **الطريقة الإنزيمية :** يستخدم إنزيم ماسيروإنزيم macerozyme (تحت ضغط اسموزى مناسب) لإخراج الخلايا الفردية من أنسجة الورقة ، وهذا الإنزيم يحطم الصفيحة الوسطى وجدر الخلايا للأنسجة البرانشيمية.

2- من الأنسجة المنزرعة: From cultured tissues:

يمكن عزل الخلايا الفردية من مزارع الكالس (النامية من الأجزاء المقطوعة من أوراق معقمة السطح) ، وتكرار زراعة الكالس على بيئة الاجار يحسن تفتيت الكالس للحصول على معلق خلايا.

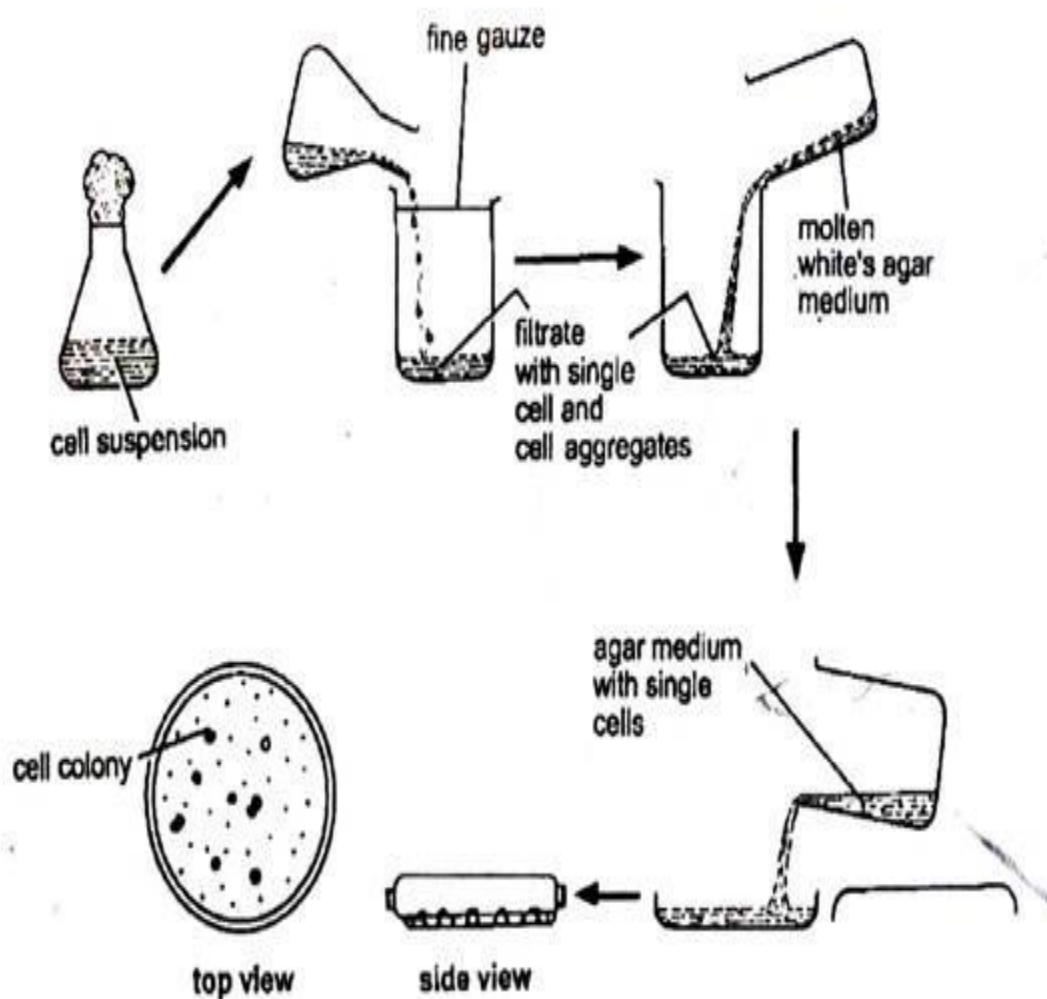


Fig. 6. Steps in Bergmann cell plating technique.

شكل 6. طريقة برجمان

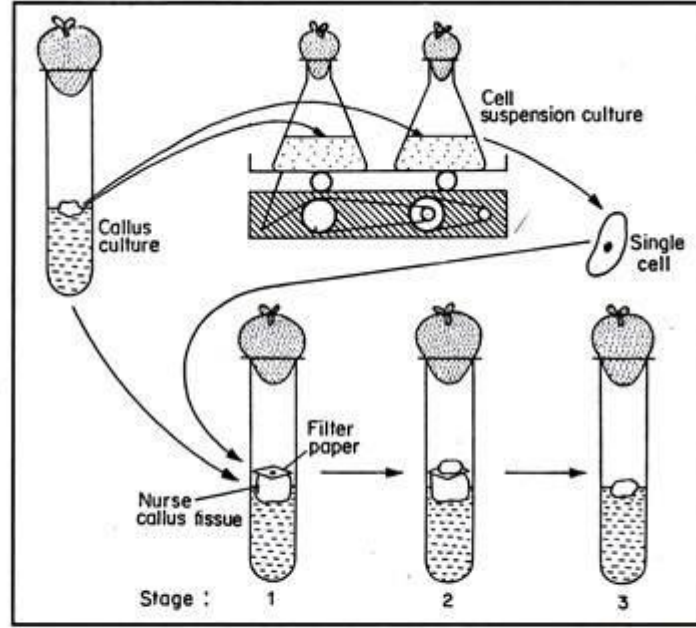
توجد 5 طرق هامة لزراعة الخلايا المفردة وهى كالاتى:-

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| The Paper Raft Nurse Technique | 1. تقنية الورقة الرقيقة المغذية |
| The Petri Dish Plating Technique | 2. تقنية الزراعة فى اطباق بترى |
| The Micro-chamber Technique | 3. تقنية غرف النمو الدقيقة |
| The Nurse Callus Technique | 4. تقنية نسيج الكالس المغذى |
| The Micro-droplet Technique | 5. تقنية القطرة الدقيقة |

The Paper Raft Nurse Technique

1- تقنية الورقة الرقيقة المغذية

- 1- يتم عزل الخلايا المفردة من المزارع المعلقة او الكالس باستخدام ماصة صغيرة
 - 2- قبل عزل الخلايا بأيام قليلة يتم تعقيم ورق ترشيح 8 مم * 8 مم ويوضع تحته سطح نسيج الكالس النامى والنشط لنفس النوع الخلية المفردة او لانواع اخرى
 - 3- يتبلل ورق الترشيح نتيجة امتصاص الماء والغذاء من نسيج الكالس
 - 4- توضع الخلية المفردة المعزولة على ورق الترشيح المعقم
 - 5- يتم تحضين المزرعة كاملة تحت تبريد لمدة 16 ساعة وشدة إضاءة 3000 لكس أو تحت إظلام مستمر على 25م
 - 6- تنقسم الخلية المفردة عدة مرات وتتشكل الى مستعمرة خلوية صغيرة وعندما تصل الى الحجم المناسب تنقل الى وسط جديد حيث تعطى نسيج كالس
- نسيج الكالس الذى تنمو عليه الخلية المفردة يعرف بالنسيج المغذى وهو يمدها بالغذاء من وسط الزراعة وهو العامل الحاسم لانقسام لخلية ، حيث تمتص الخلية الغذاء من خلال ورق الترشيح والذى ينتشر من وسط الزراعة خلال نسيج الكالس وورقة الترشيح الى الخلية المفردة ، ونسيج الكالس الناتج من خلية مفردة يعرف بسلالة الخلية المفردة.



□ Fig 9.1

Growth of single cells using a 'nurse' technique. Stage 1 : a single cell taken from a friable callus is placed on upper surface of filter paper which is in contact with nurse callus. Stage 2 : the single cell divides and daughter cells proliferate to form colony. Stage 3 : when colony reaches a suitable size it is transferred to fresh medium where it gives rise to a single cell clone.

شكل 7. تقنية الورقة الرقيقة المغذية

2- الزراعة في أطباق بترى The Petri Dish Plating Technique

- 1- يتم اعداد معلق الخلايا المفردة المعقم من مخزون المزرعة المعلقة عن طريق الترشيح والطررد المركزى ويضبط معلق الخلايا المفردة بزيادة او تقليل البيئة السائلة
- 2- يتم اذابة البيئة الصلبة في حمام مائى
- 3- بداخل غرفة الزراعة يستخدم طبق بترى مغلق باحكام ويؤخذ 15 مل من معلق خلايا مفردة باستخدام ماصة باستير المعقمه وتوضع على كمية من بيئة الاجار الذائب
- 4- يستبدل الغطاء بسرعة ويجرى هز دائرى خفيف لنشر الخلايا فى الوسط بتمائل فى نصف الطبق

5- عندما تتصلب البيئة يحفظ الطبق مقلوباً

6- تحضن المزارع تحت ظروف 16 ساعة اضاءة او فى اظلام مستمر على 25 م

7- تلاحظ الاطباق فى فترات منتظمة تحت الميكروسكوب لملاحظة انقسام الخلايا من عدمة

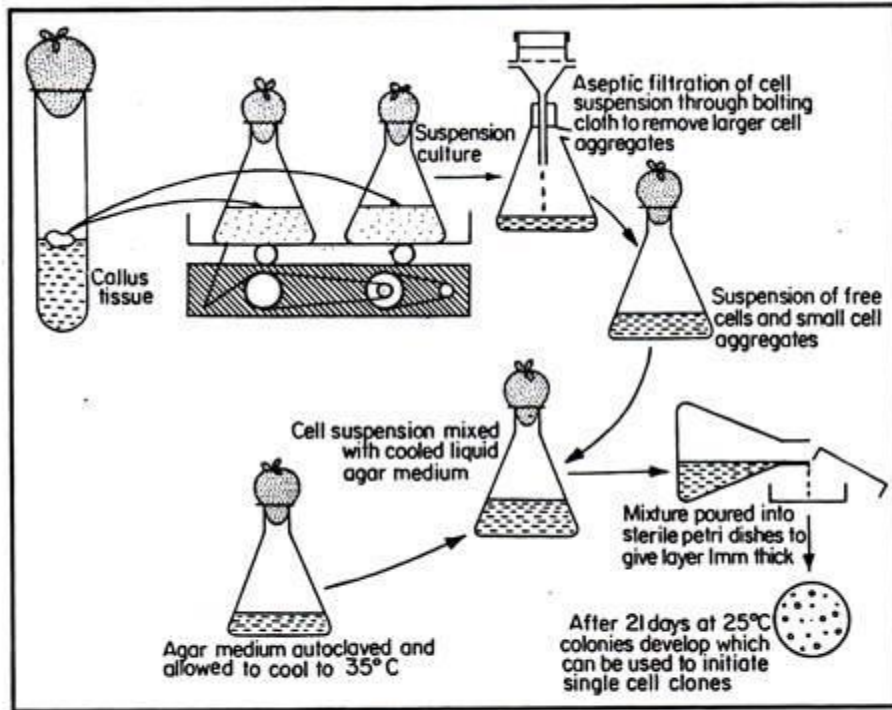
8- بعد عدة ايام من التحضين وعندما تبدأ الخلايا فى الانقسام يتم رسم شبكة اسفل سطح الطبق لتسهيل عد الخلايا المنقسمة

9- الخلايا المنقسمة تكون مستعمرات خلايا بشكل رأس الدبوس خلال 21 يوم من التحضين

10- تحسب كفاءة الزراعة (PE) plating efficiency

$$PE = (\text{عدد المستعمرات لكل طبق} / \text{العدد الكلى للخلايا لكل طبق}) \times 100$$

11- تنقل المستعمرات التى اخذت شكل رأس الدبوس وذات الحجم المناسب الى بيئة جديدة لزيادة النمو.



□ Fig 9.2

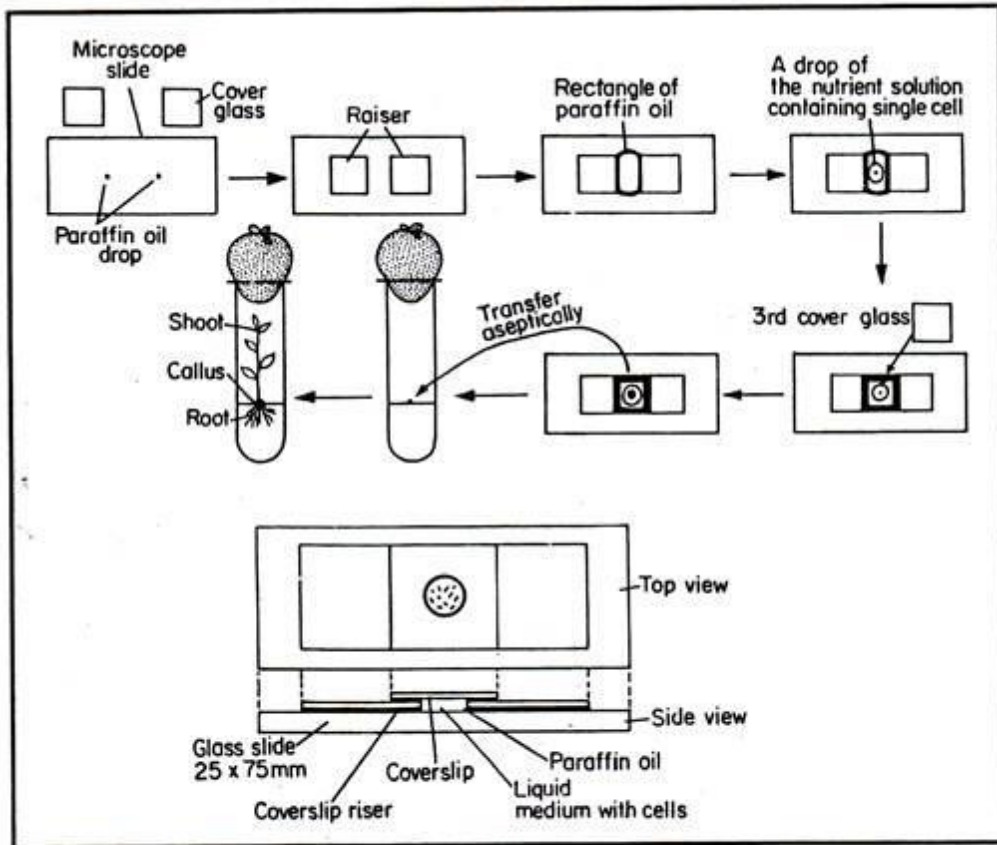
Procedure for obtaining single cell clones using a petri dish plating technique

شكل 8. الزراعة فى اطباق بترى

3- طريقة غرف النمو الدقيقة The Micro-chamber Technique

1- يتم عزل نقطة من بيئة مغذية سائلة محتوية على خلية مفردة من مخزون المزرعه المعلقة باستخدام ماصة باستير الدقيقة

- 2- توضع نقطة الزراعة في وسط شريحة معقمة وتحاط او تلف بزيت البرافين
- 3- توضع نقطتان من زيت البرافين على جانبي نقطة الزراعة ويوضع عليهما غطاء شريحة يعرف بالرافع
- 4- يوضع اعلى كل غطاء شريحة من جهة نقطة الزراعة غطاء شريحة ثالث يلصق بزيت البرافين ليعمل كقنطرة بين الغطائين ويغطي نقطة الزراعة مكوناً غرفة نمو دقيقة بها خلية مفردة ويمنع زيت البرافين فقد الماء من المزرعة ويسمح بتبادل الغازات.
- 5- توضع شريحة غرفة النمو الدقيقة في طبق بترى وتحضن تحت ظروف 16 ساعة اضاءة على 25 م
- 6- ينتج عن المستعمرة الخلوية الناتجة من خلية مفردة مايعرف بمستعمرة الخلية المفردة
- 7- عندما تصبح مستعمرة الخلية كبيرة بدرجة كافية يزال الغطاء الزجاجي وينقل النسيج الى بيئة صلبة او شبه صلبة جديدة.



□ Fig 9.3

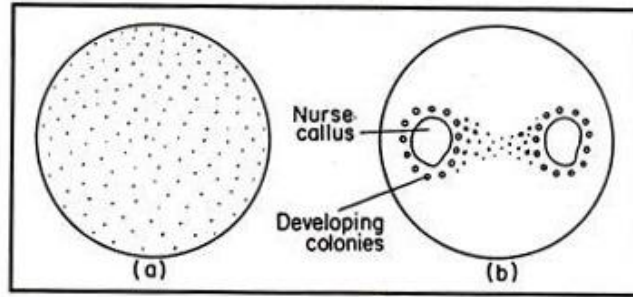
Microchamber used to observe the growth of single cells

شكل 9. طريقة غرف النمو الدقيقة

4- طريقة الكالس المغذى The Nurse Callus Technique

هذه الطريقة محورة من طريقتي أطباق بتري ومزرعة الورقة المغذية الصغيرة ، وفيها توضع الخلايا المفردة على بيئة اجار في طبق بتري كما وصف سابقاً وتوضع 2 أو 3 من كتل الكالس (النسيج المغذى) ناتجة من نفس النسيج النباتي توضع وتحاط بها الخلايا المفردة في نفس البيئة

تزال الورقة الحاجز بين الخلايا المفردة والنسيج المغذى واول خلايا تبدأ في الانقسام هي الموجودة قرب نسيج الكالس المغذى وهي التي تكون المستعمرات الخلوية.



□ Fig 9.4

Growth of colonies from a low density cell suspension in the presence of callus tissue. A. Petri dish inoculated with low density suspension of cells—no colonies develop. B. Petri dish inoculated with low density suspension plus nurse callus—colonies grow near to nurse calluses only

شكل 10. طريقة الكالس المغذى

The Micro-droplet Technique

5- تقنية القطرة الدقيقة

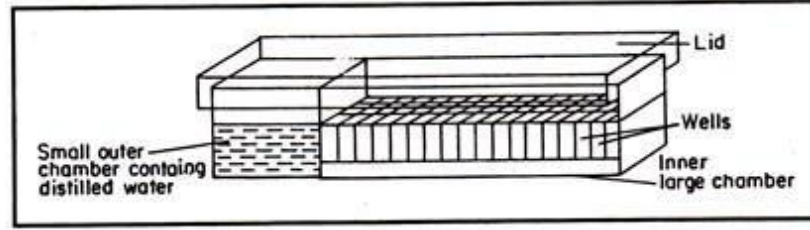
1- تزرع الخلايا المفردة في أطباق خاصة بها غرفتين غرفة خارجية صغيرة وغرفة داخلية كبيرة وتحتوى الغرفة الداخلية الكبيره على عدد كبير من الحواجز كل منها سعة 0.25-25مل بيئة مغذية

2- يملأ كل حاجز بالغرفة الكبيرة بقطرة دقيقة من البيئة السائلة المحتوية على خلية مفردة بينما تملأ الغرفة الصغيرة الخارجية بماء مقطر معقم للمحافظة على رطوبة الطبق

3- يتم اغلاق الطبق بغطاء مناسب بواسطة البرافين

4- يحضن الطبق تحت ظروف 16 ساعة اضاءة ودرجة حرارة 25 م

5- تنقل مستعمرة الخلية الناتجة من خلية مفردة الى انبوبة زراعة تحتوى بيئة صلبة او شبة صلبة لزيادة النمو



□ Fig 9.5

Diagrammatic view of Cuprak dish used for the microdroplet technique of single cell culture

شكل 11. تقنية القطرة الدقيقة

الفصل الثالث

مزارع الأجنة

Embryo Culture

ماهى مزارع الاجنه؟

اطوار النمو المختلفة للجنين المتكون داخل الطور الجاميطة المؤنث اثناء عملية الاخصاب يمكن عزلها معقمة من مجموعة الانسجة الامية مثل المبيض او البذرة او الكبسولة وزراعتها فى اوعية زجاجية تحتوى بيئة مغذية صلبة او سائلة تحت ظروف معقمة حتى تتكون النبيتات الصغيرة

انواع مزارع الاجنة واغراضها

1- زراعة اجنة البذور الناضجة والسليمة **Culture of Mature and Intact Seed Embryo**

الاجنة الناضجة هى المفصولة من البذور الناضجة والمنزرعة فى المعمل وغرضها تحليل مقاييس النمو المختلفة للجنين وعمليات التمثيل الغذائى والعمليات البيوكيميائية اثناء السكون والانبات وتجرى زراعة الاجنة الناضجة فى الحالات الاتية :-

1- بقاء الاجنة ساكنة لفترة طويلة

2- قلة بقاء الاجنة حية فى الحقل

3- تجنب تثبيط انبات البذور

4- تحويل البذور العقيمة الى بادرات حية

2- زراعة الاجنة التى تم تشريحها جراحيا **Culture of Surgically Disected Embryo**

غرضها زراعة اجزاء من الجنين لتحليل علاقة اجزاء الجنين المختلفة بالمكون النهائى فى الزراعة

3- زراعة الاجنة الغير ناضجة او طور ما قبل الاجنة **Culture of Immature Embryos or Pro-embryo's**

مصطلح ما قبل الاجنة يطلق على اطوار النمو المبكرة للجنين والتي تسبق تكوين الفلقات مثل اطوار الشكل الكروى او القلبي ، وغرض زراعتها معرفة التمايز والاحتياجات الغذائية للأجزاء النامية

4- زراعة البذور السليمة المحتوية على اجنة غير متميزة **Culture of Intact Seed Containing Undifferentiated Embryo**

قد تصاب هذه البذور بالفطريات او تفقد عند انباتها لذلك يتم زراعة ومعاملة هذه البذور مثل زراعة الاجنة فى المعمل لزيادة تكاثرها

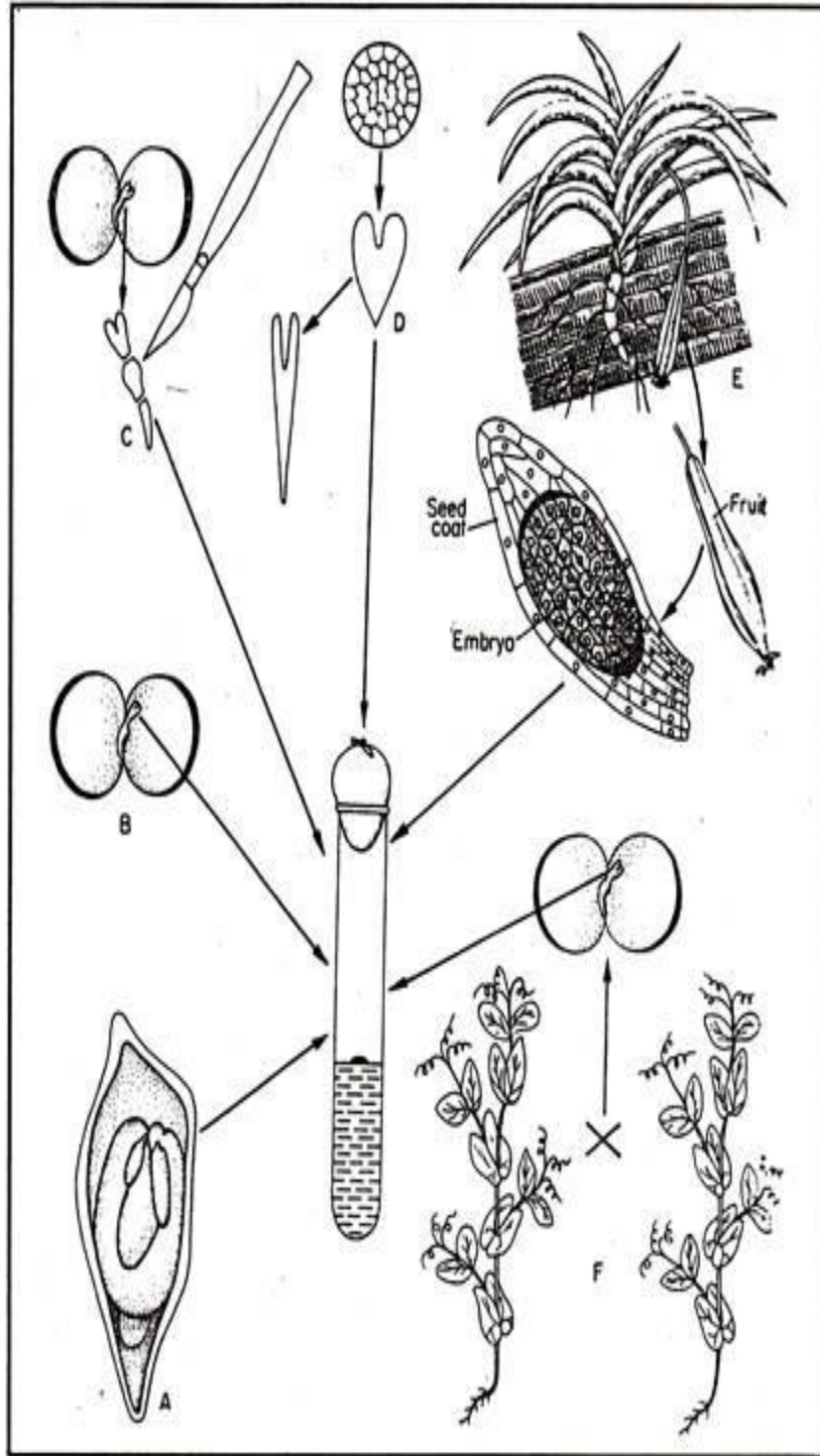
5- زراعة الاجنة العرضية الناتجة من البذور عديدة الاجنة **Culture of Adventives Embryos from Polyembryonic Seeds**

بالاضافة الى الجنين الزيجوتى الناتج من اخصاب خلية الببيضة توجد اجنة اضافية اخرى فى البذور عديدة الاجنة مثل الموالح يمكن استغلالها فى الزراعة

6- زراعة الاجنة الغير حية **Culture of Inviabile or Abortive Embryos**

فى تجارب التهجين بين الأجناس او بين الأنواع احياناً تنتج اجنة غير حية او ميتة نتيجة عدم نجاح التهجين وهذه الاجنة لايمكن انباتها طبيعياً ولكن حالياً يمكن الحصول على النبات الهجين بزراعة الاجنة الغير حية فى المعمل

وفيما يلى رسم يوضح الانواع المختلفة لمزارع الاجنة



□ Fig 10.1

Different categories of embryo culture. A. Culture of adventive embryos from polyembryonic seeds. B. Culture of mature and intact seed embryo. C. Culture of dissected embryo. D. Culture of immature embryo. E. Culture of undifferentiated embryo of orchid. F. Culture of abortive or inviable embryos.

شكل 12 . الانواع المختلفة لمزارع الاجنة

إنقاذ الاجنة Embryo Rescue

انقاذ الاجنة يتضمن حالات زراعة الاجنة الغير ناضجة وزراعة البذور السليمة المحتوية على اجنة غير متميزة وزراعة الاجنة الغير حية لانقاذها في حالة عدم نضج البذور او البذور الهجين التي تفشل في الانبات ، مما يؤدي لتجنب تدهور الجنين وانتاج نبات حى ، حيث يفشل التهجين بين نوعين او جنسين مختلفين نتيجة الاختلافات الوراثية ، وبالتالي يفشل تكوين الاندوسبيرم مما يؤدي الى موت الجنين ، وفى الظروف العادية يتكون الاندوسبيرم اولاً ليمد الجنين بالغذاء ويمكن ان يعزل الجنين الهجين قبل موته ويزرع ، ومعظم تطبيقات انقاذ الاجنة تستخدم فى انتاج هجن نوعية وهجن جنسية.

هناك صعوبة فى عزل الاجنة الغير ناضجة وزراعتها معقمة فى بيئة مناسبة تحت الظروف المثلى ، وغالبا ما تكون البيئة المغذية معقدة ولذلك استخدمت طريقة لامداد الاجنة الغير ناضجة بمصدر غذائى كافى لها وهى طريقة نقل الجنين الى اندوسبيرم جديد embryo-endosperm transplant وهي تتم كما بالشكل 13 التالى :

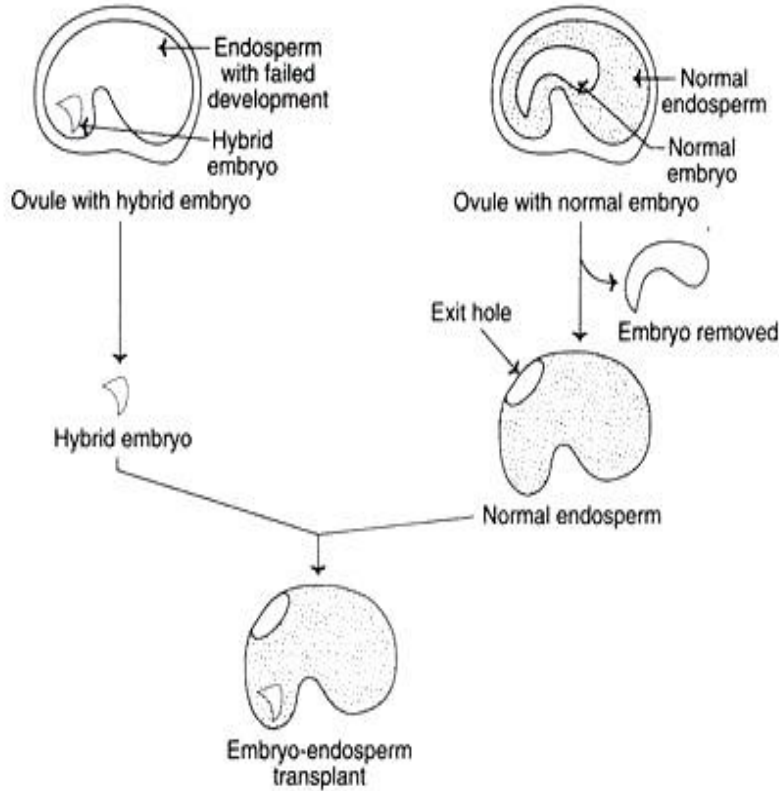


Fig. 47.7 : Embryo-endosperm transplant technique used in embryo rescue (or immature embryo culture) .

شكل 13. طريقة انقاذ الاجنة بالشتل على الاندوسبيرم

يتم قطع الجنين الهجين الناتج من بويضة فشل تكوين الاندوسبيرم لها ثم ينقل هذا الجنين الى اندوسبيرم اخر مكتمل النمو ثم يزرع الاندوسبيرم بما فيه من جنين على بيئة مغذية مناسبة ومن اكثر الامثلة على نقل او شتل الجنين فى الاندوسبيرم هى الهجن النوعية والجنسية فى البقوليات.

الاحتياجات الغذائية لمزارع الاجنة :

هناك طورين متلازمين لاحتياجات الغذاء ونمو الاجنة :

1- طور التغذية المختلطة **Heterotrophic phase** وهو طور مبكر وغالبا ما يعتمد

الجنين على الاندوسبيرم والانسجة الامية للمصدر المغذى

2- طور التغذية الذاتية **Autotrophic phase** وهو يتميز بقدرة الجنين على التمثيل

الغذائى وتكوين المواد اللازمة للنمو حيث يكون الجنين مستقل عن المصدر المغذى ،

وهناك مرحلة حرجة بين هذين الطورين.

مكونات بيئة مزارع الاجنة :

1- المواد الغير عضوية فى بيئة MS او B5 او وايت

2- سكر السكروز كمصدر للطاقة

3- نترات الامونيوم كمصدر للنيتروجين

4- الكازين كمصدر للاحماض الامينية

5- المستخلصات النباتية الطبيعية مثل لبن جوز الهند

6- لا توجد حاجة لاستخدام منظمات النمو

7- رقم حموضة البيئه 5 – 7.5

8- درجة حرارة التحضين 24 – 26 م

9- فترة اظلام لنمو الاجنة المنقولة ثم التحول للاضاءة لحدوث الانبات الجيد

Applications of Embryo Culture:

تطبيقات زراعة الاجنة

Prevention of Embryo Abortion

1- منع اجهاض الاجنة

خاصة فى حالة التهجين بين الانواع interspecific وبين الاجناس inter-generic وفيما

يلى بعض الامثلة لبعض الهجن البعيدة وصفات المقاومة المنقولة

TABLE 47.2 A selected list of distant plant species crossed and the resistance traits developed through embryo rescue technique

<i>Distant plant species crossed</i>	<i>Resistance trait(s)</i>
<i>Oryza sativa</i> × <i>O. minuta</i>	Bacterial blight and blast
<i>Solanum tuberosum</i> × <i>S. etuberosum</i>	Potato leaf roll virus
<i>Solanum melanogena</i> × <i>S. khasianum</i>	Brinjal shoot and fruit borer
<i>Brassica napus</i> × <i>B. oleracea</i>	Cabbage aphid
<i>Lycopersicon esculentum</i> × <i>L. peruvianum</i>	Virus, fungi and nematodes
<i>Hordeum sativum</i> × <i>H. vulgare</i>	Powdery mildew and spot blotch
<i>Triticum aestivum</i> × <i>Thinopyrum scirpeum</i>	Salt tolerance

- | | |
|------------------------------|-----------------------------------|
| Overcoming Seed Dormancy | 2- التغلب على سكون البذور |
| Shortening of Breeding Cycle | 3- تقليل دورة التربية |
| Production of Haploids | 4- انتاج النباتات الاحادية |
| Overcoming Seed Sterility | 5- التغلب على عقم البذور |
| Clonal Propagation | 6- الاكثار الدقيق للسلالة الخضرية |

الفصل الرابع

مزارع القمة النامية للأشطاء و الميريستيم

Shoot Tip/Meristem Culture

مزارع الاشطاء لها اهمية كبيرة فى حقول البساتين والمحاصيل والاشجار ، واقترح التطبيق العملى لهذه الطريقة بواسطة (Morel and Martin 1952) بعد محاولاتهم الناجحة لانتاج نبات داليا كامل من مزارع القمة النامية للأشطاء.

واكد مورال Moral ان طريقة زراعة الاشطاء لاتعتبر طريقة فعالة وسريعة لاكثر النباتات (بالاكثار الدقيق) ، وفى هذه الطريقة يتم زراعة القمة الميريستيمية للشطاء على بيئة مغذية مناسبة فيما يعرف بمزرعة الميريستيم كما بالشكل التالى14

والقمة الميريستيمية للشطاء هى الجزء المحاط بالاوراق المغلفة الصغيرة ، وزراعة القمة الميريستيمية تفيد ايضا فى انتاج نباتات خالية من الفيروسات بتقنيات زراعة الانسجة ، والمراحل المختلفة لعملية الزراعة تبدأ بالزراعة ومضاعة الاشطاء وتجزير الاشطاء و تنتهى بنقل النبيتات الى الاصص او الحقول.

تعنى زراعة القمة النامية للأشطاء بزراعة الجزء الطرفى 0.1 – 1 مم من القمة النامية المحتوية على الميريستيم 0.05-0.1 مم مع الاوراق المغلفة للميريستيم والاوراق النامية وحافة نسيج الساق

زراعة الميريستيم هى زراعة جزء صغير جداً يقل طوله عن 0.1 مم وبة زوج او زوجين من الاوراق الحديثة المغلفة وهذا الجزء غالباً مفصول من القمة النامية للشطاء

خطوات زراعة القمة النامية

- 1- إزالة الاجزاء الطرفية الحديثة من النبات السليم وتقطع منة القمة النامية 1 سم
- 2- يجرى تعقيم سطحى لقطع الاشطاء بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 1% لمدة 10 دقائق ثم تشطف الاجزاء النباتية 4 مرات بماء مقطر.
- 3- نقل الاجزاء النباتية الى طبق بترى معقم.
- 4- إزالة الأوراق الخارجية من أطراف الاشطاء. .

- 5- عند ظهور القمه النامية يتم تقطيعها وتنقل القطع الاقل من طول 1 مم الى سطح بيئة الاجار او إلى ورق ترشيح ، واذا استخدمت انابيب زراعة يعرض عنق الانبوبة الى لهب قبل وبعد نقل القمم المقطوعة لتعقيمها.
 - 6- تحضن المزرعة في ظروف 16 ساعة ضوء و 25 °م
 - 7- عند تكون ورقة او عدة اشطاء من قمة او مريستيم واحد وكذلك تكون جذر يتم نقلها الى بيئة خالية من الهرمونات.
 - 8- تنقل النباتات المتكونة الى اصص بها كمبوست وتوضع في صوبة زجاجية كما بالشكل
- 14 و 15 التاليين

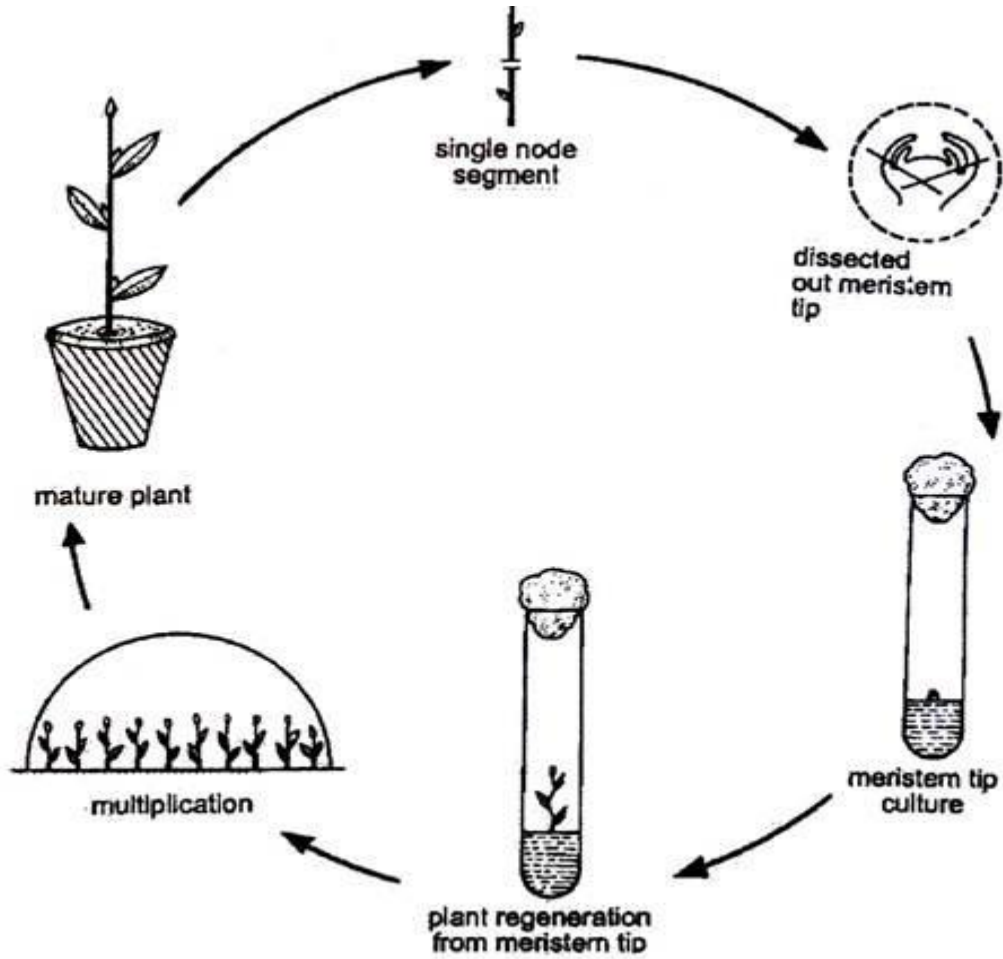
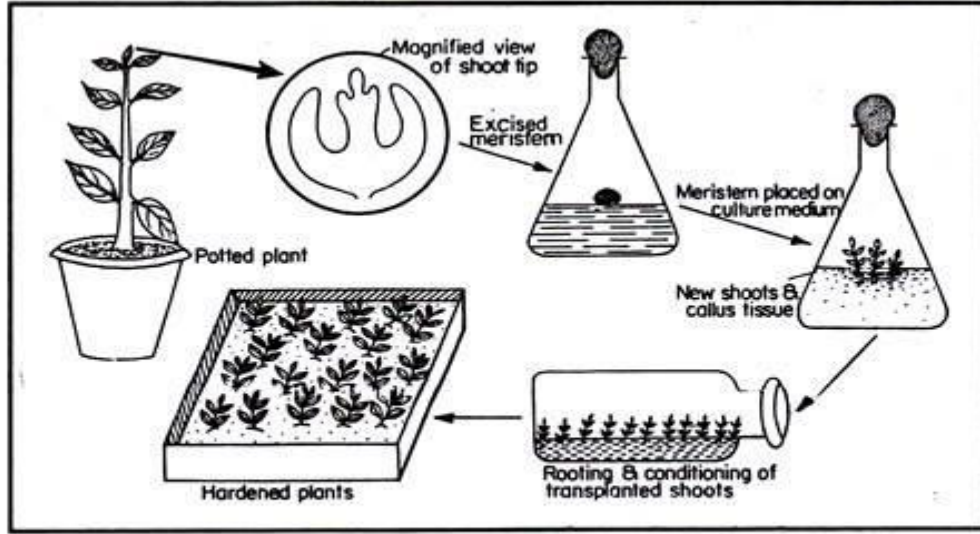


Fig. 8. Regeneration of plants through Meristem Culture.

شكل 14. زراعة القمة النامية



□ Fig 2.3

Flow diagram illustrating the technique of shoot tip or meristem culture

شكل 15. زراعة القمة النامية

أهمية مزارع القمة النامية او المريستيم فى زراعة الانسجة

- 1- استئصال الفيروسات
- 2- الاكثار الدقيق
- 3- تخزين الاصول الوراثية

ويمكن استغلال زراعة القمة النامية والمريستيم فى مجالات مختلفة مثل:

تربية النبات : حيث ان النباتات الهجين تنتج بذور ميتة او غير حية غير قادرة على النمو والتطور الى نباتات هجينة ناضجة ولذلك يمكن زراعة القمة النامية او المريستيم لهذه النباتات لتسريع برنامج التربية

الاكثار الدقيق للنباتات الاحادية : وهى نباتات تظل عقيمة اذا لم يتم مضاعفتها للحصول على نباتات ثنائية متماثلة ويمكن اجراء الاكثار الدقيق لها بزراعة القمة النامية او المريستيم

مزارع القمة النامية او المريستيم والحجر الزراعى : هناك قيود تتعلق بالحركة الدولية للمواد النباتية الخضراء وبعد الفحص الكامل لها قد ترفض فى الحجر الزراعى اذا كانت حاملة لبعض الامراض الا ان النبيتات الناتجة من زراعة القمه النامية او المريستيم تقبل

بسهولة في الحجر الزراعي بدون أي فحص لذلك يمكن استخدام هذه الطريقة في استبدال المواد النباتية في برامج تحسين المحاصيل.

الفصل الخامس

مزارع إنتاج النباتات الأحادية Haploid Production

النباتات الأحادية هي التي تحتوي على نصف عدد الكروموسومات (ن) ولها أهمية كبيرة في تربية النبات والوراثة وتعتبر مصدر مهم للحصول على السلالات المتماثلة وراثياً.

هناك طريقتان لإنتاج النباتات الأحادية في المعمل :-

1- التكوين الذكري المنشأ Androgenesis

وهو إنتاج نباتات أحادية عن طريق زراعة المتوك أو الميكروسبورات (اللقاح) وهي الطريقة الأكثر استخداماً في إنتاج النباتات الأحادية.

2- التكوين الانثوي المنشأ Gynogenesis

وهو إنتاج نباتات أحادية من زراعة المبيض ovary culture أو زراعة البويضة ovule culture وهي طريقة نجحت في عدد قليل جداً من النباتات لذلك هي غير شائعة كثيراً في إنتاج النباتات الأحادية بخلاف التكوين الذكري المنشأ.

أولاً : التكوين الذكري

مزارع المتوك وحبوب اللقاح Anther and Pollen Culture

زراعة المتوك هي نمو المتوك المعقمة والمفصولة من براعم زهرية غير متفتحة وتزرع على بيئة مغذية حيث أن الميكروسبورات (اللقاح) بداخل المتك المنزرعة تنمو إلى نسيج كالس أو اجنة تتحول إلى نبيتات أحادية إما عن طريق تكوين الأعضاء أو الاجنة

زراعة حبوب اللقاح أو الميكروسبورات المفصولة من المتك يتم فيها زراعة حبوب اللقاح ويفضل أن تكون في طور وحيد النواة uniculeat قبل أن تصبح جاميطه مذكرة وهي تؤخذ من متوك سليم وتزرع على بيئة مغذية حيث تنمو الميكروسبورات إلى اجنة أحادية أو نسيج كالس تتحول إلى نبيتات أحادية إما عن طريق تكوين الأعضاء أو الاجنة

. وهناك نظامين للتكوين الذكري المنشأ Androgenesis هما:

- 1- التكوين الذكري المنشأ المباشر Direct androgenesis: حيث تسلك الميكروسبورات نفس سلوك الزيجوت الذي يمر بمرحلة الجنين ثم يتحول الى النبتة
- 2- التكوين الذكري المنشأ الغير مباشر Indirect androgenesis: وفيه تنقسم الميكروسبورات عدة مرات مكونه نسيج الكالس الذى يتميز الى نبيتات احادية.

الاساس العلمى زراعة المتوك واللقاح :-

الاساس العلمى لزراعة المتوك واللقاح هو انتاج النباتات الاحادية باستغلال القدرة الذاتية totipotency لنمو الميكروسبورات والعدد الاحادى للكروموسومات ، حيث يتوقف النمو الطبيعى لخلية اللقاح وتكوين الجامطة المذكرة ، ولهذا الغرض فان الميكروسبورات المفصولة او الموجودة بداخل المتك تزرع معقمة على بيئة مغذية وتعطى حبوب اللقاح النامية نسيج كالس او اجنة ينتج عنها نبيتات احادية.

وفى الاساس فان زراعة المتوك هى زراعة اللقاح ، حيث ان اللقاح تنمو عن طريق زراعة المتوك السليم ، وخلال الزراعة فان نسيج المتك الثنائى يبقى حى بدون تجديد نموة فى البيئة وفى نفس الوقت يشجع على نمو اللقاح بواسطة البيئة المغذية

الاجنة الاحادية او نسيج الكالس تظهر فى المتك المنفتح فى المزرعة ، وهناك دائماً امكانية لاستجابة الخلايا الثنائية للمتوك للزراعة وانتاج نبيتات او كالس ثنائى غير مرغوب فيه ، ولتجنب هذه المشكلة يتم فصل اللقاح من المتك ويزرع فى بيئة مغذية ، ويعرف الفرق بين اللقاح وخلايا المتك حيث تؤخذ اللقاح فى الطور وحيد النواه uni-nucleate stage قبل الانقسام الميتوزى الاول او اثناء وهو الاكثر ملائمة لتكوين النباتات الاحادية.

دفع او حث النباتات الاحادية على التكوين يتم بحفظ المتك او البرعم الزهرى فى درجة حرارة منخفضة ، او اجراء معاملة البرودة التى تساعد على تكوين الاجنة عن طريق تثبيط تمايز الطور الجاميطى او عن طريق خفض محتوى حمض الابسيسيك بالمتك والمثبط لانتاج النباتات الاحادية.

البيئة الغنية بالغذاء تشجع على نمو النسيج الثنائى لجدار المتك ويجب تجنب ذلك ، وادخال الفحم النشط الى البيئة يحفز التكوين الذكري المنشأ ، والحديد يلعب دور مهم جداً فى انتاج

النباتات الاحادية ، ومستخلص البطاطس ولبن جوز الهند ومنظمات النمو مثل الاوكسين والسيتوكينين تستخدم في زراعة المتك واللقاح بسبب تأثيرها المحفز للتكوين الذكري.

في المزرعة قد تنقسم اللقاح ميتوزياً ويمكن تتبع المسار الطبيعي لتكوين النواة الخضرية والتناسلية ، حيث تتحلل النواة التناسلية بينما النواة الخضرية تنقسم عدة مرات مكونة لقاح متعدد الانوية يمكن تجزئته وينتج جنين او نسيج كالس وفي كلا الحالتين ينتج نباتات احادية كما بالشكل 16 التالي

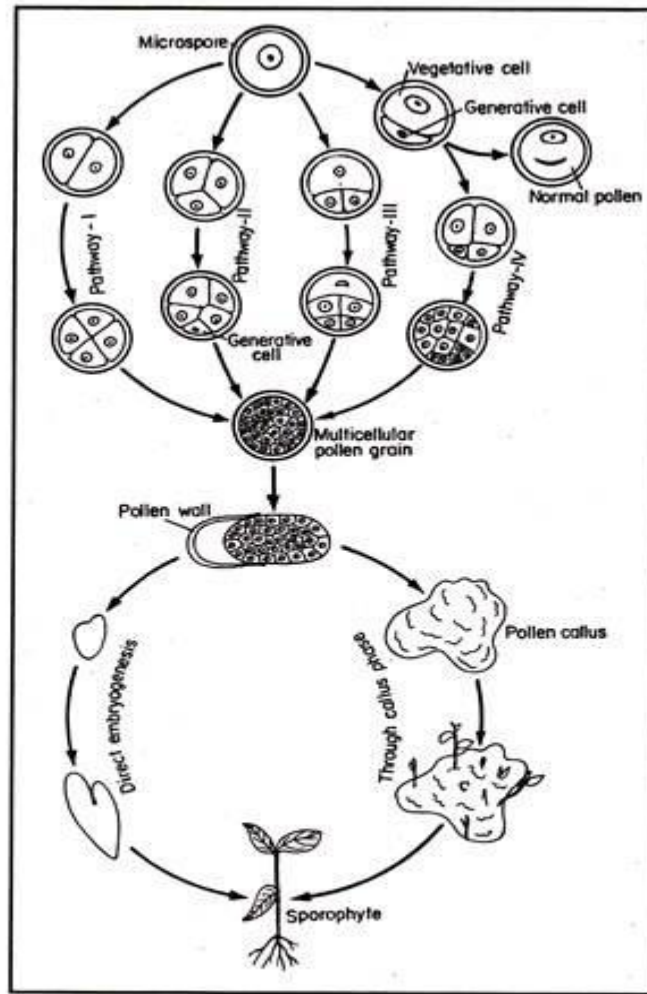


Fig 11.1

Diagram showing the origin of sporophytes from pollen grains in anther cultures. A microspore may follow any one of the four pathways to form a multicellular pollen grain. The latter may directly form an embryo or produce callus tissue (After Bhojwani and Razdan 1983)

شكل 16. مسارات تكوين نبات احادى من اللقاح

النباتات الاحادية عقيمة ذاتياً بسبب العدد الاحادى للكروموسومات الذي لا يمكن اختزاله ميوزياً ، وبالمعاملة بالكولشيسين فان النباتات الاحادية تصبح نباتات ثنائية متماثلة وراثياً

homozygous diploid or isogenic diploid خصبة تنقل الى اصص وتزرع حتى النضج في الصوبة الزجاجية ويمكن استخدامها كسلالات نقية في برامج التربية .

طرق زراعة حبوب اللقاح المفصولة من المتوك

1- الطريقة الاولى : طريقة زراعة حبوب لقاح الدخان وهى طريقة مثالية وخطواتها شكل 17 كما يلي:

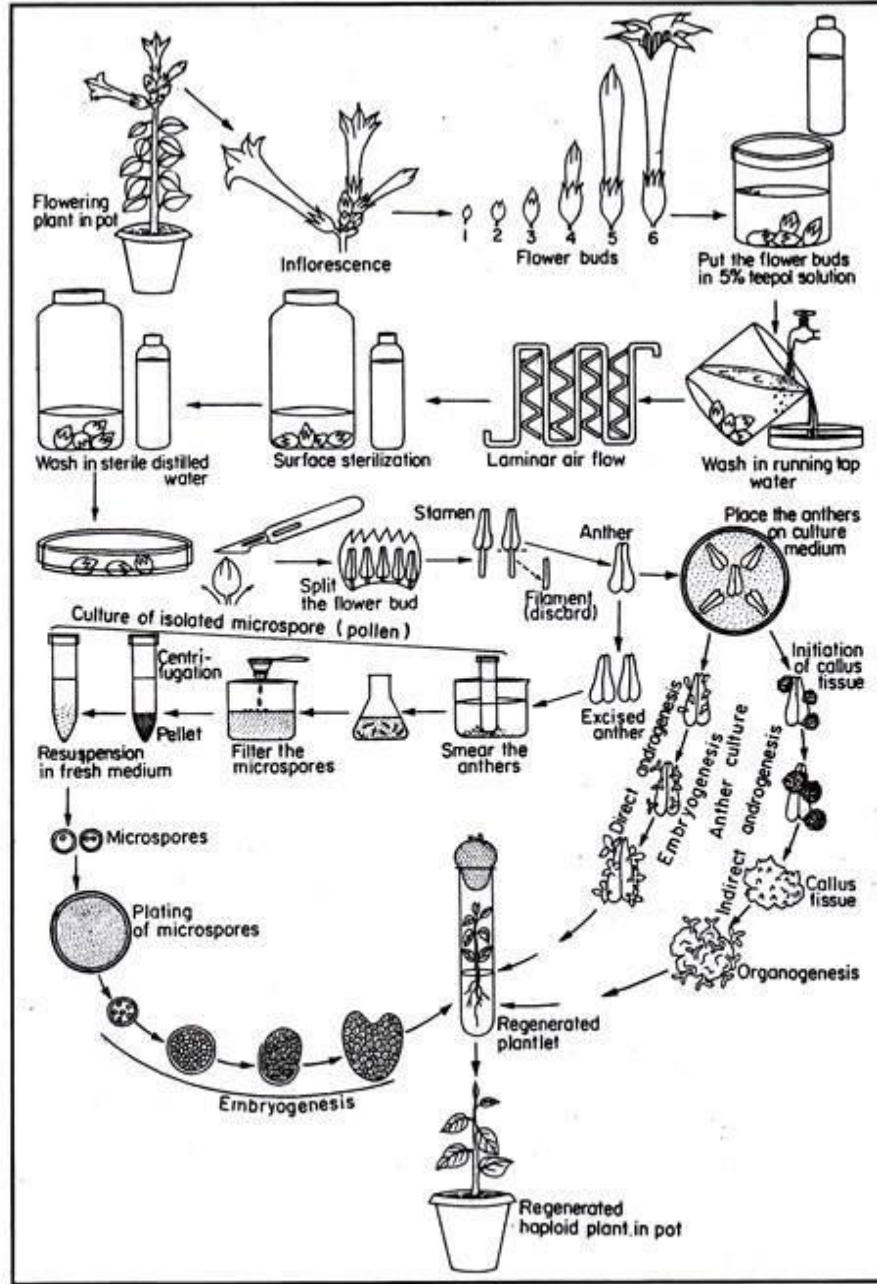
اختيار براعم زهرية غير متفتحة وتعقم وتفصل المتك بدون خيوط

يوضع حوالى 50 متك في وعاء صغير معقم بـ 20 مل بيئة سائلة (MS, White, Nitch)

يضغط على المتك في جانب الوعاء لاجراج اللقاح

يتم غربلة المتك على منخل نايلون لازالة بقايا انسجة المتك

يجرى طرد مركزى للقاح المعلق لمدة 5 ق وتستبعد الاجزاء الصغيرة المتبقية من اغلفة المتك بينما يوخذ الرائق المحتوى على اللقاح عالقة بـ ويعاد اجراء الطرد المركزى لـ ويوضع في بيئة سائلة جديدة



□ Fig 11.2

Schematic representation of the culture of excised anther and isolated microspores and the development of haploid plant directly by embryo formation or through haploid callus

شكل 17. تكوين نبات احادى من زراعة المتوك او اللقاح

يتم خلط حبوب اللقاح بحيث يحتوى كل ملم من البيئة السائلة على 103-104 لقاح

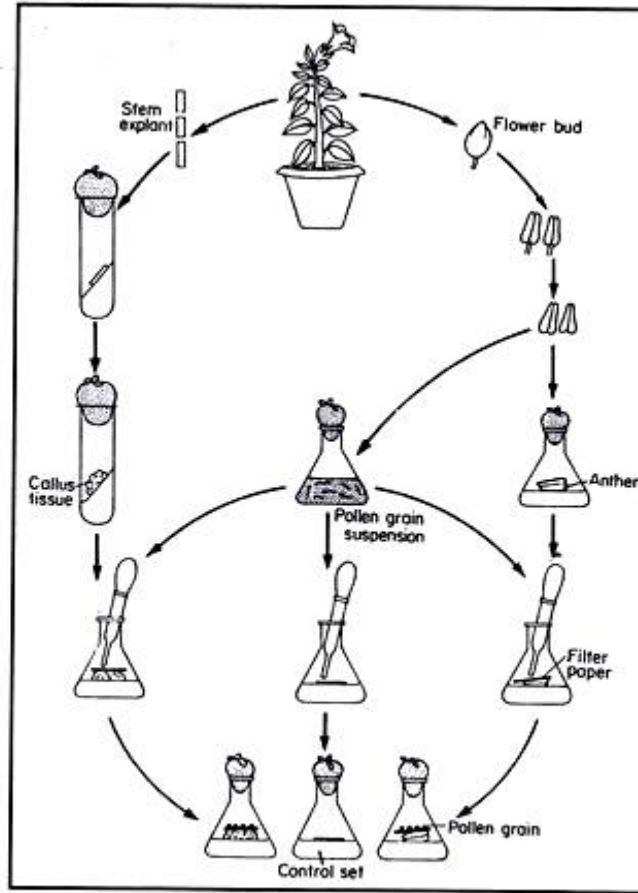
يؤخذ 2.5 ملم من معلق اللقاح ويزرع في أطباق بترى 5 سم على سطح بيئة مغذية صلبة ويحكم غلق الأطباق لمنع التلوث والجفاف

تحضن الأطباق على 27-30°م وإضاءة منخفضة لمدة 16 ساعة

- 1- بعد شهر تلاحظ الاجنة التي تنتج نباتات احادية
- 2- تحضن النباتات الاحادية على درجة 27-50°م وإضاءة خفيفة وتنقل النبيتات الناضجة الى تربة زراعة المتوك

2- الطريقة الثانية: تعرف بمشتل الزراعة شكل 18 واول من استخدمها Sharp et al. (1972)

- 1- نختر برعم زهرى ويعقم وتفصل منه المتوك وتفصل منه حبوب اللقاح
- 2- ترص المتوك السليمة افقيا على بيئة صلبة او شبة صلبة
- 3- توضع اقراص صغيرة من ورق الترشيح على المتوك السليمة ويوضع فوقها حوالى 10 حبة لقاح معلقة وبالتالي يصبح المتوك بمثابة مشتل لرعاية وتغذية حبوب اللقاح ، وفى نفس الوقت يتم عمل انبوبة اخرى ككنترول تزرع فيها حبوب اللقاح مباشرة على بيئة مغذية صلبة
- 4- بهذه الطريقة فان حبوب اللقاح فى الكنترول لا تنمو كلها بينما حبوب اللقاح التى على نسيج المتك تنمو وتعطى نسيج برانشيى اخضر بعد اسبوعين الذى يكون نبات احادى



□ Fig 11.3

Diagram showing the technique of nurse culture for raising tissue clones from isolated pollen grains

شكل 18 طريقة مشتل اللقاح لإنتاج نبات احادى

مميزات زراعة اللقاح عن زراعة المتوك :

زراعة المتك طريقة جيدة لإنتاج النباتات الاحادية من الميكروسبورات الموجودة بداخل المتك السليم ، وهناك امكانية دائمة لاستجابة الخلايا الجسمية الثنائية للمتك للنمو وإنتاج نبيتات او كالس ثنائى ، واحياناً نمو الميكروسبورات فى المتك قد يفشل بسبب المواد المثبطة للنمو المتسربة من جدار المتك الى البيئة ، واجريت عدة محاولات لتجنب حدوث هذه المشكلات. وفيما يلى مميزات زراعة اللقاح:-

1- استبعاد تزاخم حبوب اللقاح فى المتك وفصل عدد معين منها وزراعتها وتعرضة للبيئة بالتساوى

2- استبعاد النمو الغير مرغوب لجدار المتك والانسجة المرتبطة به.

3- ملاحظة مراحل التكوين الذكرى بدءاً من الخلية المفردة.

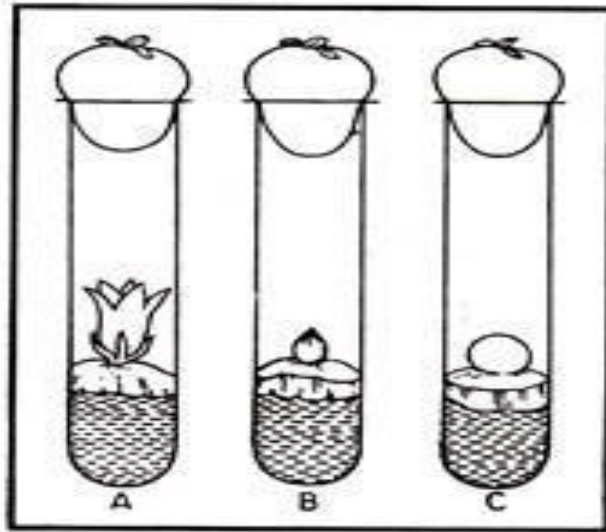
4- تنظيم افضل للعوامل المختلفة المتحكمه فى التكوين الذكرى.

- 5- تمكن اللقاح من دراسة الطفرات والتحول والوراثي والامتصاص لان حبوب اللقاح يمكن تعريضها للمطفرات الكيميائية والطبيعية.
- 6- ملائمة جداً لفهم فسيولوجيا التكوين الذكرى لان حبوب اللقاح تتحول مباشرة الى اجنة
- 7- ارتفاع عدد النباتات الاحادية الناتجة من كل متك عند استخدام زراعة اللقاح مقارنة بزراعة المتك.

التكوين الانثوى المنشأ Gynogenesis

مزارع المبايض Ovary Culture

زراعة المبيض هي طريقة لزراعة المبايض المفصولة من ازهار ملقحة او غير ملقحة المبيض يوجد محمولا على الميسم ويمكن زراعة المبايض في المعمل على بيئات مناسبة واجريت في كثير من الانواع النباتية مثل الطماطم والكمون وكونت ثمار ناضجة بها بذور حية وتجرى العملية على بيئة مغذية بسيطة تحتوى على املاح معدنية وسكروز تمد الازهار المخصبة بالغذاء لمدة يومين او اكثر قبل فصل المبايض منها كما بالشكل 19 التالى



□ Fig 2.4

**Ovary culture of *Lycopersicon esculentum*.
A. Just excised flower. B. Culture of excised ovary. C. Small fruit product on culture**

شكل 19. زراعة المبايض

بينما مبايض الازهار الغير ملقحة لاتنمى على بيئة مغذية بسيطة ولكن يضاف لها بعض الاوكسينات المخلقة مثل 2.4-D او NOA

وغالبا ماتفشل المبايض فى النمو الى ثمار كاملة الحجم عند الزراعة فى اوعية ضيقة وللتغلب على هذه المشكلة تجرى الزراعة فى ظروف معقمة حيث يوضع حامل الزهرة الطويل فى بيئة معقمة وتزال سداة وعاء الزراعة لتترك الحرية لنمو المبيض خارج الوعاء

خطوات الزراعة

- 1- تجمع ازهار ملقحة وغير ملقحة من نباتات سليمة
- 2- تغسل بماء الصنبور وتترك فى محلول مطهر لمدة 10ق ثم يعاد غسلها لازالة اثار المطهر
- 3- تنقل الازهار الى غرفة الزراعة وتعقم سطحيا بغمرها فى محلول معقم لمدة 5-7 ق ثم تغسل بماء مقطر معقم
- 4- تنقل الازهار الى اطباق بترى معقمة وباستخدام ملقط يزال الكأس والتويج وخيط المتوك وذلك لتسهيل عزل الميسم بعناية لضمان عدم الاضرار بالمبيض
- 5- توضع المبايض فى بيئة اجار صلبة
- 6- تحضن مزارع المبايض على 25°م لمدة 16 ساعة وإضاءة خفيفة بلمبات فلورسنت

أهمية مزارع المبايض: Importance's of Ovary Culture are:

- 1- دراسة النمو المبكر الاجنة والثمار وكذلك فسيولوجيا الاثمار
- 2- دراسة تأثير الهرمونات النباتية على نمو الثمار عذريا parthenocarpic فى مزارع المياسم الغير ملقحة
- 3- دراسة دور اعضاء الزهرة فوجد فى بعض الحالات ان المبايض الملقحة تنتج ثمار طبيعية اذا لم تزال السبلات قبل الزراعة وفى الشعير فان العصافة الداخلية (الاتب) والخارجية مهمة جدا للنمو
- 4- فى التهجين فان مربى النبات يواجه مشاكل عديدة مثل فشل انبات حبوب اللقاح على الميسم او بطء وعدم كفاءة نمو انبوبة حبة اللقاح فيستخدم زراعة المبايض او المياسم فيما يعرف بالاخصاب المعملى فى مثل هذه الحالات

5- تتج زراعة المبايض في حالة تعدد الاجنة بالمبيض حيث تعطى عدة اشطاء بدلاً من نبيطة فردية

6- عملية الاخصاب المزدوج لاينتج عنها فقط الجنين والاندوسبيرم ولكن ايضا تحفز نمو المبيض الى ثمرة وفي معظم النباتات اللااخصابية apomictic رغم عدم حدوث اخصاب فان التلقيح وحدة يحفز على نمو المبيض والبذور وزراعة المبايض في هذه الحالة تساعد في فهم طبيعة التحفيز الناتج من التلقيح

الفصل الخامس

زراعة البروتوبلاست

Protoplast Culture

البروتوبلاست هو الغشاء البلازمي مرتبط مع الحويصلة مكوناً ما يشكل خلية عارية نتيجة إزالة الجدار الخلوي. ويزال الجدار الخلوي بالطرق الميكانيكية أو الانزيمية ، ولطرق زراعة البروتوبلاست في المعمل تطبيقات كثيرة في التكنولوجيا الحيوية في النبات ، فهي لا تفيد فقط في الهندسة الوراثية في النبات ولكن أيضاً في الدراسات البيوكيميائية والتمثيل الغذائي ، وتبدأ زراعة البروتوبلاست بعزله من النباتات باستخدام الطريقة الكيميائية أو الانزيمية ، ويوجد حالياً عدد من الانزيمات المتوفرة لعزل البروتوبلاستات من أغلب أنسجة النبات ، وبعد العزل يتم تنقيتها واختبار حيويتها ، وتنتهي بتنقية البروتوبلاستات الحية وتزرع في بيئة مناسبة عادة ما تكون بيئة سائلة أو بيئة آجار شبه صلبة.

معروف ان كل الخلايا النباتية لها جدار خلوي سليلوزي كامل وان البروتوبلاست يمتد بداخل جدار الخلية فيما عدا بعض الخلايا التكاثرية والخلايا الحرة العائمة في بعض عصائر الفاكهة مثل لبن جوز الهند لذلك فان البروتوبلاست يحتوى على الغشاء البلازمي وبداخلة كل المكونات.

طريقة عزل وزراعة البروتوبلاست:

يمكن إعداد البروتوبلاست من مختلف الأنسجة ولكن أكثرها انتشاراً نسيج ميزوفيل الأوراق فهو يعتبر مصدر مثالي لعزل البروتوبلاست منه كما بالشكل 20 التالي

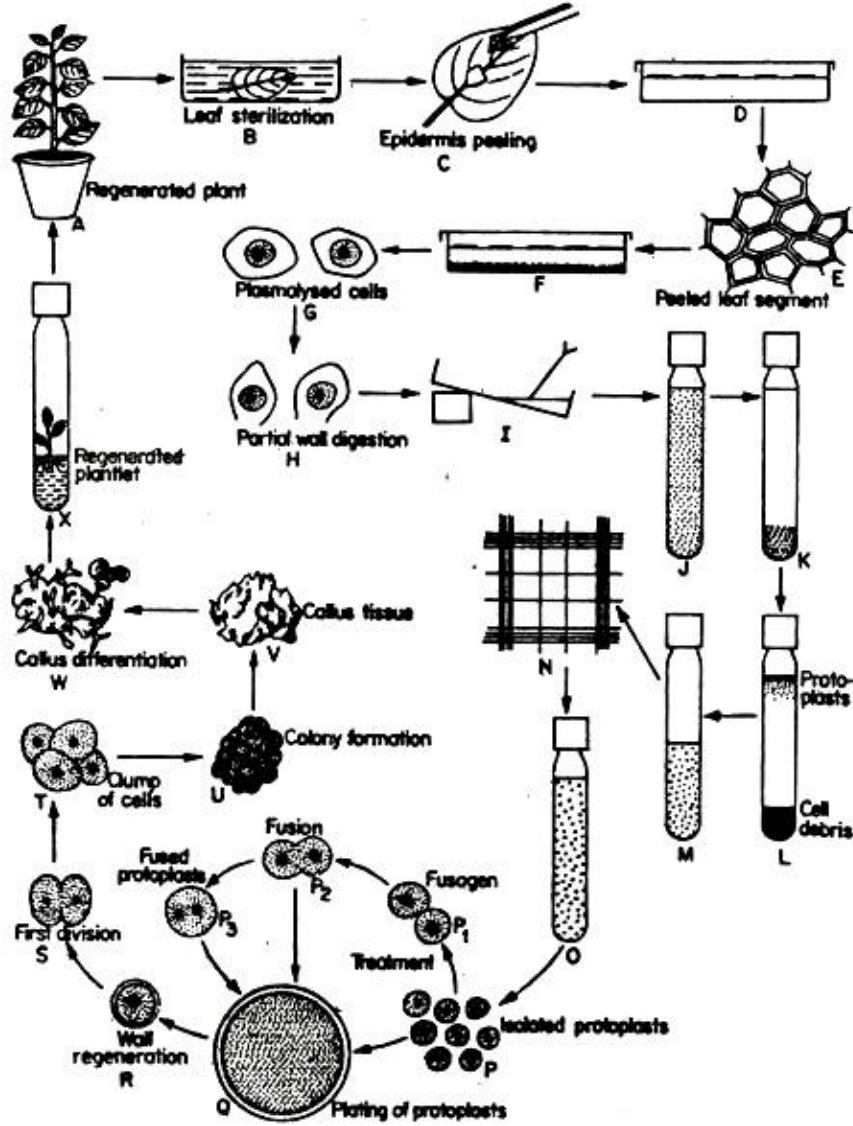


Fig. 6.5: Flow diagram of isolation, culture and fusion of leaf-cell protoplasts. A. Potted plant. B. Leaf sterilisation. C. Epidermis peeling. D. Leaf piece floated on enzyme solution plus osmotic stabilizer. E. Peeled leaf segment. F. Protoplast sinks to bottom of petridish. G. Plasmolysed cells in enzyme mixture. H. Partial wall digestion. I. Removal of enzyme solution. J. Protoplast in CPW 13M. K. Pellet of protoplasts after centrifugation. L. Protoplasts in CPW 21S. M. Resuspended in culture medium. N. Counting of protoplast density by hemocytometer. O. Resuspended in culture medium to give correct pre-plating density.

شكل 20. عزل وزراعة ودمج بروتوبلاستات خلايا الورقة

عزل البروتوبلاست من خلايا نسيج ميزوفيل اوراق نبات الدخان باستخدام الانزيمات

1- تفصل الاوراق الحديثة من الجزء العلوى لنباتات منزوعة في الصوبة بعمر 7-8 اسابيع وتغسل بالماء

2- تعقم الاوراق سطحيا بغمرها في كحول ايثايل 70% لمدة 1 ق ثم في محلول هيبوكلوريت الصوديوم 0.4-0.5% لمدة 30 ثانية كما تعقم الاطباق وغرفة الزراعة

3- بعد 30 ق تغسل الاوراق والادوات 3-4 مرات بالماء المقطر لازالة اثار المطهرات

- 4- توضع قطع الورقة المقشرة في 30 ملم محلول CPW13M في طبق بترى 14 سم حيث يغطي سطح المحلول تماما بقطع الورقة ثم يستبدل هذا المحلول بمحلول بكتيري مرشح معقم يحتوى على إنزيم السيلوليز 2% ، إنزيم الماسيروزي 0.5% والمانيتول 13%
- 5- تحضن قطع الورق الموجودة في محلول الإنزيم في الظلام على درجة 24-26°م لمدة 16-18 ساعة
- 6- تؤخذ قطع الورقة المهضومة ويستبدل المحلول الانزيمى بمحلول CPW13M ثم تدهس بطرف ملقاط معقم لتسهيل خروج البروتوبلاست ثم يؤخذ معلق البروتوبلاست ويمرر خلال مرشح نايلون بقطر 60-80 نانوميتر لازالة البقايا الكبيرة للنسيج الغير مهضوم
- 7- يجرى الطرد المركزى للراشح
- 8- وتؤخذ الرائق بالماصة ويعاد تعليق قشور الورق في محلول CBW21S ويعاد الطرد المركزى لة لمدة 5-7 ق فتبقى البروتوبلاستات الحية معلقة على سطح المحلول بينما الخلايا والبقايا تظل مترسبة في قاع الانبوبة
- 9- تجمع البروتوبلاستات الحية من سطح المحلول ويعاد تعليقها في محلول CPW13M لازالة السكروز ويكرر الطرد المركزى 2-3 مرات للغسيل
- 10- تعلق البروتوبلاستات في حجم مناسب من محلول مكون من بيئة سائلة Nagata and Takebe (1971) مضافا اليها 3 ملجم/لتر NAA ، 1 ملجم/لتر 6-BAP ، 13% مانيتول

CPW تعنى بيئة غسل الخلايا والبروتوبلاست cell and protoplast washing medium وتتكون من الاتى

KH ₂ PO ₄	...	27.2 mg/L
KNO ₃	...	101 mg/L
CaCl ₂ 2H ₂ O	...	1,480 mg/L
MgSO ₄ 7H ₂ O	...	246 mg/L
KI	...	0.16 mg/L
CuSO ₄ 5H ₂ O	...	0.025 mg/L
pH	...	5.8

CPW 13M = CPW + 13% mannitol (13M)

CPW 21S = CPW + 21% sucrose (21S)

عزل البروتوبلاست من مزرعة معلق الخلايا:

مزارع معلقات الخلايا السريعة النمو هي المصدر المناسب لعزل البروتوبلاست ، ومعلق الخلايا الحديث لا يعطى عدد كبير من البروتوبلاستات وكذلك مزارع المعلقات القديمة تعطى خلايا طويلة كبيرة الحجم جدارها سميك فيصعب كثيرا عزل البروتوبلاست منها كما يوجد بها كثير من تجمعات الخلايا وهي أيضا غير مرغوبة لعزل البروتوبلاست ، وإضافة الكولشيسين وبعض الكيماويات المخلبة للمعلق يمنع تكوين تجمعات الخلايا كما ان إضافة تركيزات قليلة من إنزيم السيوليز 0.1% للمعلق قبل الاستخدام بيومين يثبط تكوين الجدار الخلوى السميك. وفيما يلي خطوات عزل البروتوبلاست من مزرعة معلق الخلايا:

1- ترشيح معلق الخلايا:

يمرر المعلق خلال منخل نايلون دقيق للحصول على الخلايا الفردية

2- اعداد بيئة سائلة خالية من الخلايا للتحلل البلازمى **plasmolysis** :

يبقى الراشح فى قاع البيئة ومعظم البيئة والخلايا تنقل الى وعاء زجاجى اخر وباستخدام ماصة تزال وسط المزرعة وهذه الطريقة حققت نجاح كبير

3- مرحلة ما قبل التحلل المائى:

توضع الخلايا معلقة فى محلول CPW13M لمدة ساعة

4- التحضين بالانزيمات :

يضاف محلول الإنزيم الى الخلايا فى وعاء ويوضعوا على هزاز دائرى بطيء لمدة

4-6 ساعة

5- الغسيل والتنقية :

يرشح معلق البروتوبلاست بمرشح قطر ثقبه 60-100 نانومتر لإزالة البقايا الكبيرة ثم ينقل الراشح الى انابيب الطرد المركزى لمدة 5-10 ق فيتسرب البروتوبلاست ويؤخذ الرائق بالماصة ويعاد تعليق القشور فى محلول CPW 21S ويجرى الطرد المركزى لمعلق البروتوبلاست مرة اخرى 5-7 ق ثم يجمع البروتوبلاستات الحية الخالية من البقايا من على سطح ثم تغسل البروتوبلاستات بمحلول CPW 13M مع تكرار الطرد المركزى ثم توضع البروتوبلاستات فى حجم مناسب من بيئة زراعة سائلة ثم يقدر محصول البروتوبلاستات بجهاز الهموسيتومتر

hemocytometer

Isolation of Haploid Protoplast

عزل البروتوبلاست الاحادى :

الخلية الامية للقاح (PMC) والطور الرباعى لحبوب اللقاح pollen tetrad (PT) وحبوب اللقاح الناضجة هي المصار الطبيعية للخلايا الاحادية وهي تنتج باعداد كثيرة في المتوك ويسهل جدا عصر المتوك لإخراجها منها ويمكن عزل البروتوبلاست منها ، كذلك خلية البيضة خلية احادية وعادة ماتنتج خلية بيضة واحد لكل بويضة ويصعب جدا فصلها من نسيج المبيض ، وعزل البروتوبلاست من الخلايا الذكرية الاحادية يعتمد على تركيب جدار الخلية ، والجدار الخلوى لحبوب اللقاح الناضجة يتكون من مواد يصعب جدا هضمها بالانزيمات ، لذلك فان عزل البروتوبلاست من حبوب اللقاح الناضجة يظل محدود النجاح ، بينما يفضل عزل البروتوبلاست من الخلية الامية للقاح والطور الرباعى لحبوب اللقاح ، ويعرف عزل البروتوبلاست من الخلايا الاحادية باسم البروتوبلاست الاحادى او البروتوبلاست الجاميى gametoplast ، كما ان عزل وزراعة البروتوبلاست الاحادى يفيد في عمل الطفرات ودراسة تأثير الاشعاع والمواد الكيماوية المطفرة

الفصل السادس

زراعة المعلقات والجذور والاندوسبيرم

مزارع المعلقات

هي المزارع التي تحتوى على خلايا او مجموعة خلايا تبدأ بوضع نسيج الكالس فى بيئة مغذية سائلة ، ولابد من المحافظة على استمرار تماثل انتشار وتوزيع الخلايا فى البيئة السائلة عن طريق استخدام هزاز او منضده هزازة لكسر تجمعات الخلايا وتحويلها الى خلايا مفردة او مجموعات صغيرة من الخلايا . والمعلق الجيد هو المحتوى على نسبة كبيرة من الخلايا المفردة مقارنة بمجموعات الخلايا ، وعمل تغييرات فى المكون الغذائى للبيئة يؤدى لكسر التجمعات الخلوية الكبيرة كما بالشكل 21

تقنية زراعة المعلق تشمل على نوعين اساسيين هما زراعة دفعة من الخلايا فى المعلق والزراعة المستمرة
زراعة دفعة من الخلايا batch culture هي مزرعة المعلق التي تحتوى خلايا نامية فى حجم معين من البيئة وكنتيجه لذلك فان البيئة تستنفذ تدريجياً.
الزراعة المستمرة continuous culture وهى التي تتضمن امداد مستمر بالمغذيات عن طريق صب البيئة الجديدة ولكن حجم المزرعة يظل ثابت عادة.

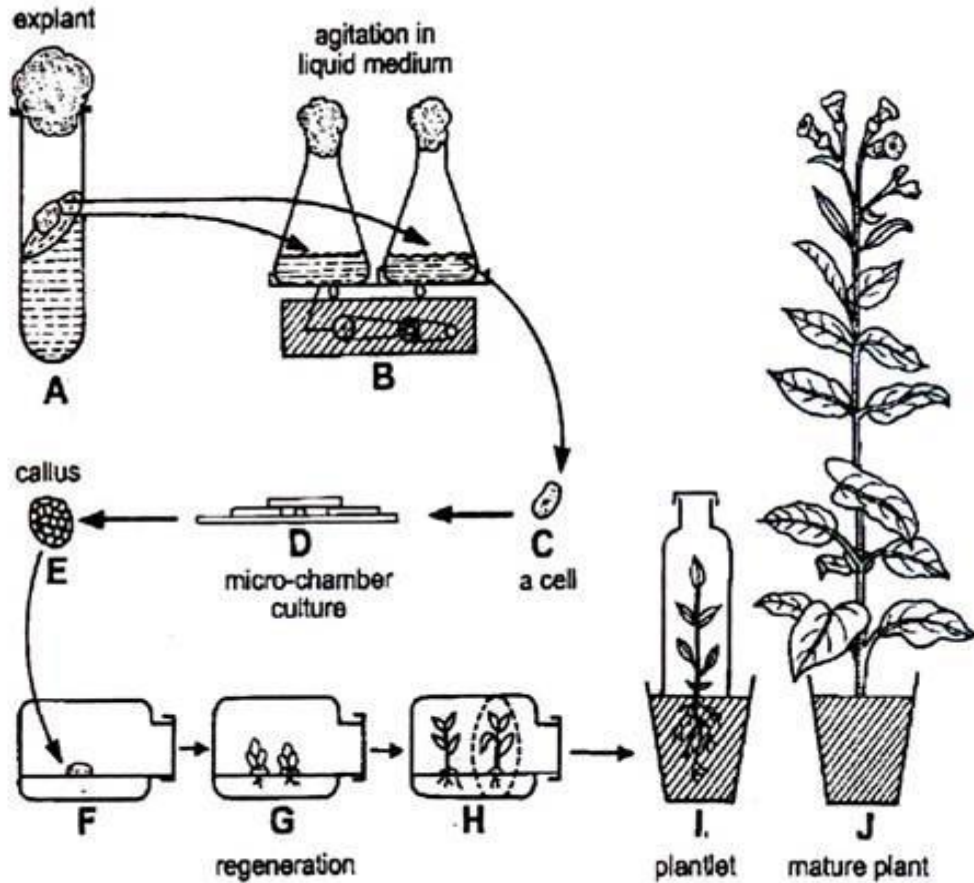


Fig. 7. Diagrammatic summary of Suspension Culture.

شكل 21. مزارع المعلقات

Root Culture

زراعة الجذور

أجريت المحاولات الأولى لزراعة الجذور بواسطة Robbins and Kotte عام 1902 لتحقيق نجاح زراعة الجذور وفي عام 1934 نجح White في زراعة القمم النامية لجذور الطماطم .

ونجحت زراعة الجذور في عدد من انواع مغطاة ومعرفة البذور ، وعادة لا تساعد زراعة الجذور في انتاج نباتات كاملة ولكن لها اهمية في معرفة المعلومات المتعلقة بالاحتياجات الغذائية والانشطة الفسيولوجية والتلقيح البكتيري والعدوى بالبكتريا الممرضة المختلفة او بالميكروبات الاخرى.

Endosperm Culture (Triploid Production)

زراعة الاندوسبيرم (انتاج النباتات الثلاثية)

نسيج الاندوسبيرم ثلاثي المجموعة الكروموسومية triploid لذلك فان النباتات الناتجة من زراعة الاندوسبيرم هي أيضاً ثلاثية المجموعة الكروموسومية triploid ، ومعظم العائلات النباتية الزهرية (فيما عدا بعض العائلات مثل العائلة السحلبية الاوركيد Orchidaceae) بها نسيج الاندوسبيرم الذي يتكون بعد الإخصاب المزدوج للنواتين القطبيتين مع النواة الذكرية ، وتنتج النباتات الثلاثية بالطريقة العادية من التضاعف الكروموسومي بتهجين نباتات رباعية مع نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية ومن النباتات الثلاثية التي نتجت من زراعة الاندوسبيرم الحور والتفاح والخوخ، والنباتات الثلاثية عادة عديمة البذور ولها قيمة تجارية كبيرة مثل التفاح والبطيخ والمانجو والعنب الثلاثي.

الفصل السابع

تركيب الحامض النووي

الحامض النووي DNA

تتكون الكائنات الحية من اجزاء رئيسية كالأعضاء والتي تتكون من أنسجة والتي تتكون من ملايين من الخلايا كما في حقيقيات النواة مثل الإنسان والحيوان والنبات ، او قد يتكون الكائن الحي من خلية واحدة كما في بدائيات النواة مثل البكتيريا والفطريات ، ويوجد في كل خلية نواة تحتوى على نوية يوجد بها عدد من الكروموسومات الحاملة للمادة الوراثية (الجينات) وتستفيد الخلية من جينات المادة الوراثية في انتاج البروتينات المطلوبة بحسب وظيفتها وحاجتها ، وفي بدائيات النواة prokaryotes تنتقل المعلومات الوراثية من الالباء الى الابناء اثناء انقسام الخلية ، بينما في حقيقيات النواة eukaryotes تنتقل المعلومات الوراثية بعد اندماج خليتين ابويتين احاديتا المجموعة الكروموسومية ويعرف المركب الحامل لهذه المعلومات الوراثية باسم الحامض النووي منقوص الاكسجين deoxyribonucleic acid DNA ويتكون الكروموسوم من شريطين متوازيين متكاملين من المادة الوراثية (DNA) على شكل حلزون مزدوج double helix وتخزن معظم الكائنات الحية معلوماتها الوراثية في جزيئات DNA مما يجعل انتقاله بين الانواع المختلفة من الكائنات الحية امرا ممكناً مما أدى الى تطوير طرق جديدة تسمح بنقل المعلومات الوراثية بين الكائنات الحية المختلفة فيما يعرف بالهندسة الوراثية وبذلك احدثت هذه التقنيات ثورة في علم الاحياء الخلوية وتطورات هامة في التقنيات الحيوية.

انواع الاحماض النووية

- حامض الديوكسي ريبونوكليك deoxyribonucleic acid DNA
- حامض الريبونوكليك ribonucleic acid RNA ويوجد منه ثلاثة انواع :
 - 1- الحامض النووي الرسول mRNA
 - 2- الحامض النووي الناقل tRNA
 - 3- الحامض النووي الرايبوسومي rRNA

وفيما يلي اهم الفروق بين DNA و RNA

وجه المقارنة	DNA	RNA
وجوده	النواة	النواة و السيتوبلازم
الوظيفة	المادة الوراثية و مكون للكروموسومات	يساعد DNA في الوظيفة
أنواعه	ليس له أنواع	الرسول (mRNA) ، الناقل (tRNA) و الرايبوسومي (rRNA)
السكر الخماسي	سكر الديوكسي رايبوز	سكر الرايبوز
القواعد النيتروجينية	الأدينين - الثايمين الجوانين - السيتوسين	الأدينين - اليوراسيل الجوانين - السيتوسين
الشكل	حلزون ثنائي (Double helix) من سلسلتين متعددة النيوكليوتيدات	خيوط واحد متعدد النيوكليوتيدات

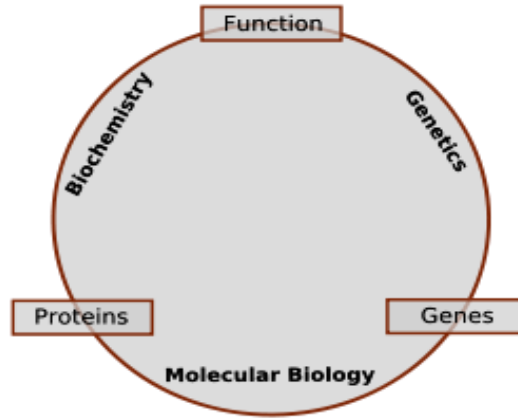
مكونات الأحماض النووية

جميع الدراسات والنتائج السابقة مهدت لظهور علم الوراثة الجزيئية أو البيولوجيا الجزيئية Molecular Biology والذي بدأ فعلياً عندما شهد العام 1953 ظهور نموذج الحلزون المزدوج لواطسون وكريك Watson & Crick لتفسير تركيب جزئ الـ DNA .

ظهرت نتائجها بعد دراسات مستفيضه بالجوء إلى تقنيات الفيزياء الجزيئية لإستعمال طرق الاشعة الفائقة لتحليل التركيب الثلاثي الابعاد DNA ، عن طريق حيود إشعة أكس (الاشعة السينية) المميزة والتي أظهرت التركيب الحلزوني للمادة الوراثية

كذلك استخدمت تقنيات الكيمياء الحيوية للتحليل الكمي لمكونات البروتينات وايضا لتحليل مكونات الاحماض النووية من القواعد وتركيبها وايضا كان لها دوراً حيويًا في اقتفاء النظائر المشعة مما اتاح الفرصة للتوصل إلى معرفة عملية التركيب الحيوي الانزيمي للاحماض النووية والبروتينات

يشير علم الوراثة الجزيئية إلى تداخل أكثر من حقل علمي في سبيل الكشف والتعرف على المستوى الجزيئي للمادة الوراثية والباحثون في الأحياء الجزيئية استخدموا تقنيات محددة منشؤها علم الأحياء الجزيئي، ولكن مع تزايد الجمع بين هذه الأفكار من تقنيات و علم الوراثة وعلم الكيمياء الحيوية و الفيزياء الحيوية مع انه ليس هناك ترابط بين هذه المجالات كما كان من قبل. ويتلخص إرتباط هذه العلوم مع بعضها البعض كما يلي:



شكل: رسم توضيحي العلاقة بين الكيمياء الحيوية،
وعلم الوراثة، وعلم الأحياء الجزيئي.

فالكيمياء الحيوية: هي دراسة المواد الكيميائية والعمليات الحيوية التي تحدث في الكائنات الحيّة.
وعلم الوراثة: هو دراسة تأثير الاختلافات الوراثية على الكائنات الحية.

أما علم الأحياء الجزيئي : فهو لدراسه الاسس الجزيئية من عمليه التضاعف والنسخ والترجمه الجينيه. لدراسة المبدأ المركزي central dogma للوراثة الجزيئية الذي ينص على سريان المعلومات الوراثية من DNA إلى RNA ثم البروتينات وهي علاقة غالبا مايرمز لها كالأتي :

DNA ← RNA ← Protein

وهذه العلاقة تركز على ثلاث عمليات رئيسية في الحفاظ وانتقال المعلومات الوراثية وهي
كما يلي :

1- التكرار أو التضاعف للمادة الوراثية Replication

2- النسخ Transcription وهي استنساخ المعلومة الوراثية في المادة الوراثية بشكل RNA
لتحمل الرسالة إلى الريبوسومات

3- الترجمة Translation وهي ترجمة الشفرة الوراثية بنوع معين من الاحماض الامينية

كما ان دراسة الاحماض النووية على اساس جزيئي أدى إلى التعرف على خواصها من حيث الحجم والتواجد في الخلية والنوع والتركيب حيث انها تتركب من وحدات تعرف بالنيوكليدات Nucleotides وهي بدورها تتركب من مركبات ثانوية ، فعند تحليل النيوكليدات تحللأ مائياً ينتج مايلي :

1- القواعد النيتروجينية Nitrogen base

وجدت أربعة أنواع من القواعد النيتروجينية وهي قواعد بيريميدينية Pyrimidine و البيورينية Purine كما في الشكل التالي



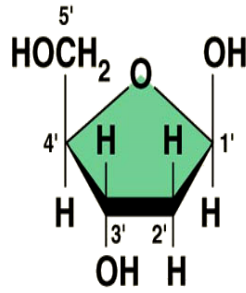
2- السكر الخماسي Pentose

تحتوي النيوكليدات نوعين من السكر الخماسي

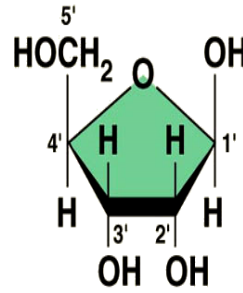
1- سكر خماسي ريبوزي ويعرف بـ ribose

2- سكر خماسي ريبوزي منقوص الأكسجين 2- deoxyribose ، كما في الشكل

Sugars

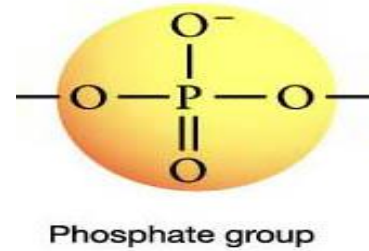
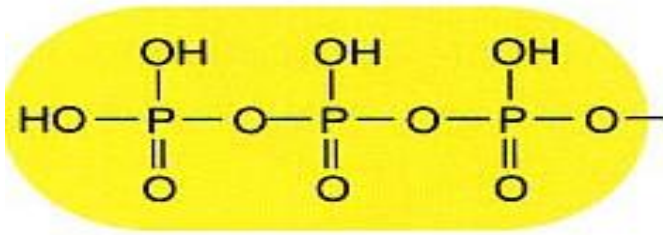


Deoxyribose (in DNA)



Ribose (in RNA)

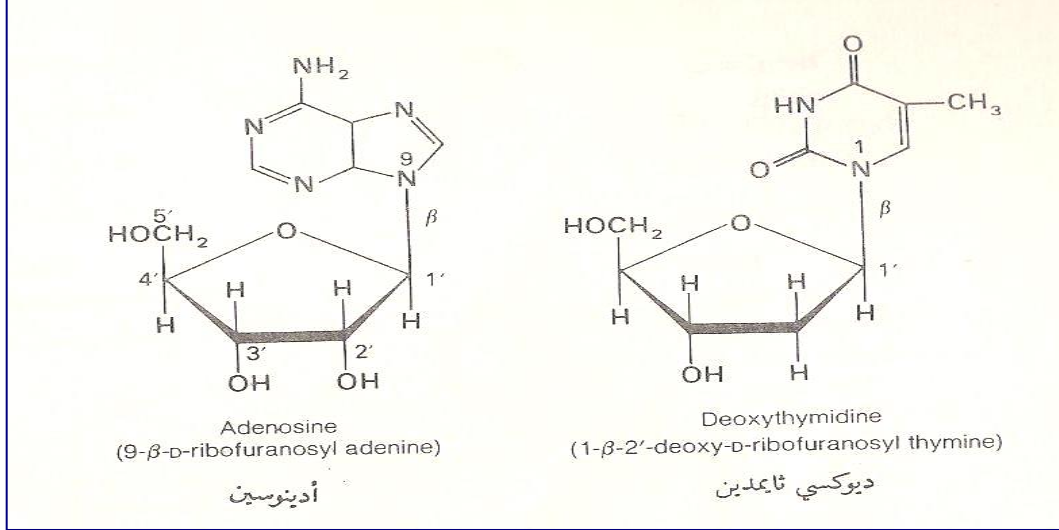
3- حمض الفوسفوريك Phosphoric acid



Phosphate group

تتميز الأحماض النووية بأنها مركبات ذات أوزان جزيئية عالية وتتكون من سلاسل من وحدات تركيبية متكررة تسمى بالنيوكليوتيدات Nucleotides وتسمى أيضا بالنيكليوتيدات الأحادية Mononucleotide ، والتي تتميز بأن لها القابلية للتحلل المائي الكامل لينتج ثلاث وحدات ثانوية (القاعدة النيتروجينية ، السكر الخماسي ، حمض الفسفوريك)

عند تحلل النيكليوتيد الأحادي إلى (قاعدة نيتروجينية مرتبطة بالسكر فقط) ينتج ما يسمى بالنيكليوسيد Nucleoside الناتج من ارتباط احدى ذرات النيتروجين للقاعدة النيتروجينية مع ذرة الكربون الجلايكوسيدية للسكر الخماسي، حيث تتكون الرابطة بين ذرة النيتروجين رقم (1)



للقاعدة مع ذرة الكربون رقم (1') للسكر الخماسي لتنتج النيوكلييدات منقوصة الاكسجين Deoxyribonucleoside ، أما الرابطة بين ذرة النيتروجين رقم (9) للقاعدة مع ذرة الكربون رقم (1') للسكر الخماسي تنتج النيوكلييدات الرايبوزية Ribonucleoside

تركيب النيوكليوسيد Structure of Nucleosides:-

يتكون النيكليوسيد من قاعدة بيورنية أو بيريميدينية مرتبطة مع السكر الخماسي الرايبوز أو الرايبوز منقوص الاكسجين من خلال ارتباط ذرة نيتروجين في القاعدة النيتروجينية مع ذرة الكربون للسكر الخماسي ونتيجة لذلك ينتج نوعين من النيوكليوسيدات

1- النيوكلييدات الرايبوزية Ribonucleoside

2- النيوكلييدات منقوصة الاكسجين Deoxyribonucleoside

- أسماء النيوكلييدات الرئيسية

قاعدة	سكر	نيوكليوسيد
أدينين	رايبوز ديوكسي رايبوز	ادينوسين ديوكسي ادينوسين
سايٲوسين	رايبوز ديوكسي رايبوز	سايٲيدين ديوكسي سايٲيدين
جوانين	رايبوز ديوكسي رايبوز	جوانوسين ديوكسي جوانوسين
ٲايمين	ديوكسي رايبوز	ٲايميدين
يوراسل	رايبوز ديوكسي رايبوز	يوردين ديوكسي يوردين

مع ملاحظة أن النيوكليوسيدات المشتقة من البيورينات تنتهي بالمقطع osine والمشتقة من البريميدينات تنتهي بالمقطع idine

تركيب النيوكليٲيده Structure of Nucleotide:-

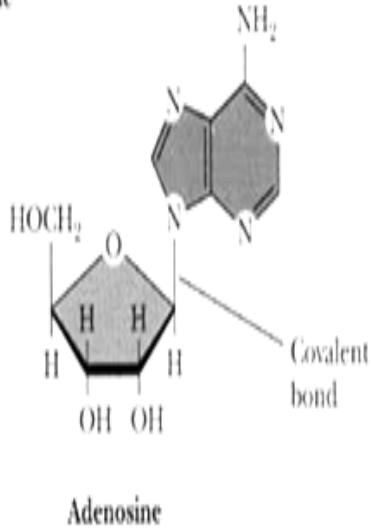
عبارة عن استرات حامض الفوسفوريك للنيكليوسيدات والتي يتأستر فيها الحامض مع إحدى مجاميع الهيدروكسيل الطليق للسكر الخماسي الكربون ، وكما في النيوكليوسيدات يوجد نوعين من النيوكليدات وهي النيوكليٲيدات الريبوزية والديوكسي ريبوزية، كما ان النيوكليٲيدات الموجودة في الحامض النووي هي غالباً النيوكليٲيدات التي يرتبط فيها الفوسفيت مع مجموعة الهيدروكسيل في ذرة الكربون رقم (5)

- أسماء النيوكليدات

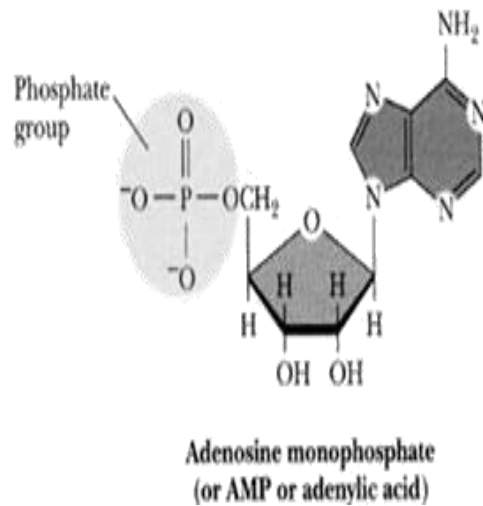
الرايبوز	ديوكسي رايبوز
أدينوسين 5 - أحادي الفوسفات Adenosine 5 – monophosphate AMP	ديوكسي أدينوسين 5 - أحادي الفوسفات Deoxyadenosine 5 – monophosphat dAMP
جوانوسين 5 - أحادي الفوسفات Guanosine 5 - monophosphate GMP	ديوكسي جوانوسين 5 - أحادي الفوسفات Deoxyguanosine 5 - monophosphate dGMP
سايتدين 5 - أحادي الفوسفات Cytidine 5 – monophosphate CMP	ديوكسي سايتدين 5 - أحادي الفوسفات Deoxycytidine 5 – monophosphate dCMP
يوردين 5 - أحادي الفوسفات Uridine 5 – monophosphate UMP	ديوكسي يوردين 5 - أحادي الفوسفات Deoxyuridine 5 – monophosphate dUMP

مثال: القاعدة النيتروجينية الأدينين

(b) Nucleoside



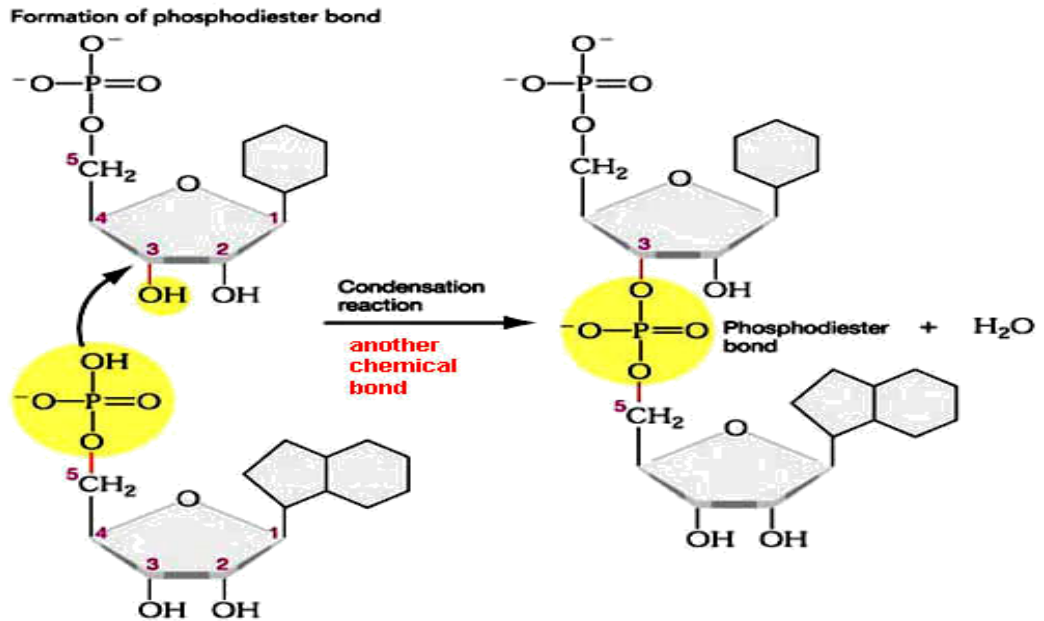
(c) Nucleotide



- طبيعة الأحماض النووية

عبارة عن بوليمرات تتألف من مئات أو ملايين النيوكليدات مرتبطة مع بعضها من خلال روابط فسفورية ثنائية الأستر Phosphodiester bond، مكونة سلسلة متكررة (polymers) من وحدات احادية متشابهة (النيوكليدات) تتصل الوحدات الأحادية مع بعضها بواسطة راوابط تساهمية، ويكون الارتباط بين الوحدات الأحادية المتكررة في هذه السلاسل بين وحدات الفوسفيت، لتكون مايعرف بالجسور الفوسفاتية ثنائية الأستر Phosphodiester bridges بين هذه الوحدات، وفي نهاية السلسلة من الطرفين توجد مجموعة الفوسفيت مرتبطة مع الكربون رقم 5 (P - 5) ومجموعة هيدروكسيل عند الكربون رقم 3 (OH - 3)

عادة ماتكون هذه الاحماض بشكل سلاسل مزدوجة double stranded، مثل الحمض النووي الرايبوزي منقوص الأكسجين DNA.



- يوضح الشكل ارتباط النيوكليدات مع بعضها البعض بواسطة الرابطة الفسفورية ثنائية الأستر لتكون سلسلة الأحماض النووية

كروموسومات الخلايا غير مميزة النواة تتكون من جزيئة DNA واحدة متجمعة في منطقة تسمى المنطقة النووية nuclear zone وهذه الخلايا لاتحوي غشاء يحيط بالمادة الوراثية، بينما كروموسومات الخلايا مميزة النواة تحوي العديد من جزيئات الـ DNA وهي بصورة عامة أكبر من جزيئة الـ DNA في الخلايا غير مميزة النواة

يتحد الـ DNA في الخلايا مميزة النواة مع بروتينات وتنظم بهيئة ألياف تسمى الألياف الكروماتينية في النواة والتي تحاط بنظام غشائي مزدوج معقد. كما يتميز الـ DNA الحامل للمعلومات بثبات كمية لأي نوع من أنواع الخلايا أو الكائنات ولا يتغير بتغير الظروف المحيطة أو التغذية أو أيض الخلايا

أما النوع الآخر من الأحماض النووية هي الأحماض النووية الرايبوزية RNA ، والتي تتكون من سلسلة مفردة من متعدد النيوكليدات ، وهي أكثر انتشاراً في الخلايا وتوجد بأشكال جزيئية متعددة حيث توجد ثلاثة أنواع من الأحماض الرايبوزية

1- الحمض النووي الرايبوزي الرسول messenger RNA

تتكون من سلسلة من النيوكليوتيدات الرايبوزية والمشفرة لسلسلة ببتيدية محددة (البروتين)، كل جزئي من messenger RNA في الكائنات مميزة النواة تكون مسئوله عن التشفير لبروتين واحد فقط، بعكس الكائنات غير مميزة النواة فنجد ان messenger RNA من الممكن ان يشفر لعدد من السلاسل الببتيدية

2- الحمض النووي الرايبوزي الريبوسومي ribosomal RNA

يشكل جزء من التركيب العام للريبوسومات ، حيث يتم انتاج البروتين ، كل وحده من الريبوسوم قد تتكون من ثلاثة أو أربعة من جزئي الـ ribosomal RNA ترتبط بعدد من البروتينات قد تصل من 50 إلى 75 بروتين

3- الحمض النووي الرايبوزي الناقل transfer RNA

تقوم هذه الأحماض بنقل الأحماض الأمينية إلى الريبوسومات ، حيث تتصل بسلسلة الببتيدية ، وفي حالة تطابق الشفرتين المحموله على transfer RNA و messenger RNA ويوجد transfer RNA واحد على الأقل لكل حمض اميني

بالإضافة إلى أنواع الأحماض الرايبوزيه الثلاثة السابقة يوجد نوع يعرف بـ snRNA أو الحمض النووي الرايبوزي الصغير حيث تتميز بأنها احماض صغيرة الحجم وينحصر نشاطها في النواة فقط وتعمل كمحفز للبدء في عملية تشكيل الـ hnRNA (herterogeneous nuclear RNA) الحمض النووي الرايبوزي غير الناضج وهو الناتج من عملية النسخ ليأخذ الشكل النهائي له وهو الحمض النووي الرايبوزي الرسول messenger RNA

- تحليل مكونات الـ DNA من القواعد النيتروجينية Base Composition Analysis

أهم المعلومات حول تركيب الحامض النووي منقوص الأكسجين جاءت من الاكتشاف الذي تم من قبل العالم شاركاف Chargaff ، حيث وضحت النتائج وجود إختلافات واسعة في النسب المولية للقواعد الموجودة في الـ DNA لأنواع مختلفة على الرغم من كون الأحماض النووية منقوصة الأكسجين الرايبوزية في الأعضاء المختلفة والأنسجة لأي نوع تكون أساسا نفسها، سميت هذه العلاقة المتبادلة بقاعدة شاركاف

والمعلومات التي جمعت من عدد كبير من الأنواع المختلفة من الـ DNA أوصلت شاركاف ومن ثم باحثين آخرين إلى النتائج التالية:

1- نماذج الـ DNA المعزولة لنفس النوع تمتلك نفس المكونات من القواعد النيتروجينية

2- تختلف مكونات الـ DNA من القواعد من نوع إلى آخر

3- إن مكونات الـ DNA من القواعد لأي نوع لا يتغير مع تغير عمر الكائن أو حالته الغذائية أو التغيرات في البيئة المحيطة

4- ان عدد وحدات الأدينين في جميع الأحماض النووية منقوصة الأكسجين بدون وضع اعتبار للنوع تكون مساوية لعدد وحدات الثايمين بمعنى ($T = A$) ، وعدد وحدات الجوانين مساوية دائما لعدد وحدات السايتوسين ($C = G$) ومن هذه العلاقة نجد ان مجموع وحدات البيورينات تساوي عدد وحدات البيريميدينات ($T + C = A + G$) تسمى هذه بتكافؤ القواعد في الـ DNA (Base equivalences)

5- ان الـ DNA المستخلص من أنواع ذات علاقة قريبة تمتلك مكونات من القواعد متشابهة بينما تمتلك الأنواع المتباعدة مكونات من القواعد مختلفة

Primary Structure of Nucleic acids - التركيب الأولي للأحماض النووية

يعرف تسلسل أو تعاقب النيوكليوتيدات بالتركيب الأولي لحامض نووي معين ، وهو الناتج من ارتباط النيوكليدات الأحادية مع بعضها البعض بواسطة الرابطة الفوسفيتية بين ذرة الكربون 3' من أحد النيوكليدات وكربون 5' من النيوكليدات التي تليها ، لكل من DNA و RNA يمكن التمييز بين نهايتي السلسلة وهي النهاية 5' التي تحمل مجموعة الفوسفيت والنهاية 3' التي تحمل مجموعة هيدروكسيل غير متفاعلة

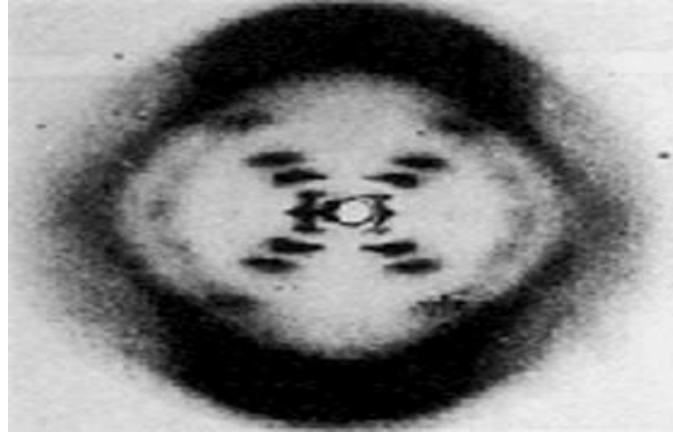
التركيب الأولي للـ DNA يعتبر هو مخزن المعلومات الوراثية ، وان الجين gene هو عبارة عن تسلسل قطعة منفردة

Secondary Structure of DNA - التركيب الثانوي للأحماض النووية

تم التعرف على التركيب الثانوي للـ DNA بنشر واتسن وكريك 1953م نموذج التركيب الثلاثي الأبعاد للـ DNA

نموذج واتسن وكريك (B – DNA) :The Watson – Crick Model

النموذج الذي افترضه كان نتيجة للدراسات السابقة والمعلومات التي عملوا على تجميعها وتحليلها بدراسة الصورة المأخوذة من قبل الباحثة البريطانية Rosalind Franklin وأعتدما عليها وعلى معلومات أخرى في تصميم النموذج الذي عُرف بنموذج واتسن وكريك سُمي نموذجهما بتركيب B- DNA استنادا إلى دراسة حيود إشعة إكس باستخدام فلز قاعدي ورطوبة نسبية 92%



شكل: يوضح نتائج حيود إشعة إكس بعد معاملة المادة الوراثية

التركيب الحلزوني للمادة الوراثية منقوصة الأكسجين

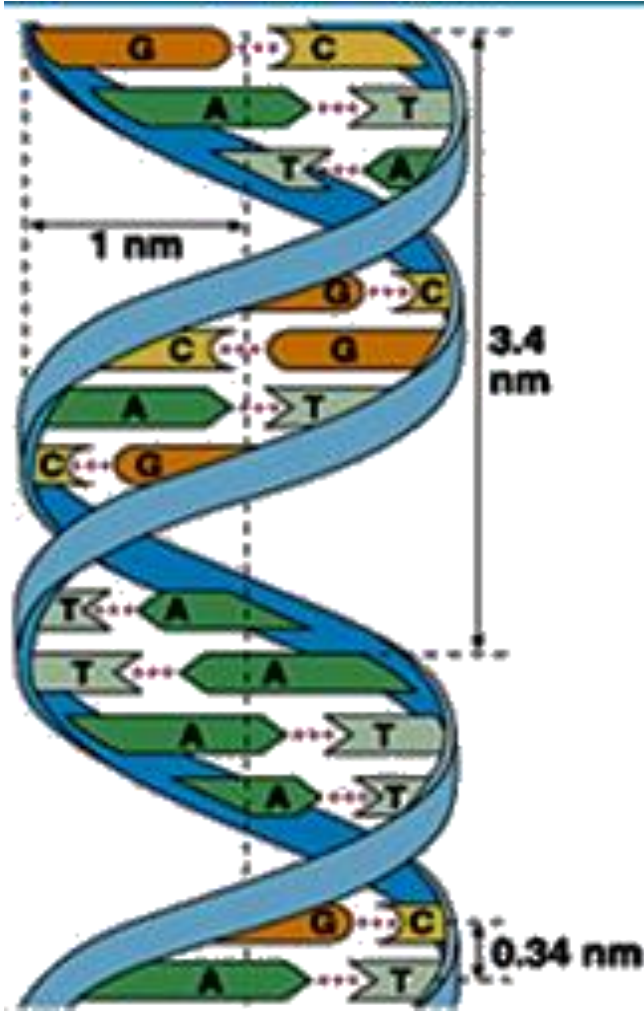
1- يتكون هذا التركيب من سلسلتين حلزونيتين من النيوكليوتيدات المتعددة ملتفتين حول محور واحد لتكوين حلزون مزدوج Double helix ويكون اتجاه الحلزون ناحية اليمين ، حيث يلتف إثنان من سلاسل متعدد النيوكليوتيد بعضها حول بعض

2- يوجد في كل إلتفافه للحلزون عشرة أزواج من القواعد

- للحلزون المزدوج أخدودان أحدهما رئيسي والآخر ثانوي

3- السلسلتين غير متوازيتين بمعنى ان الجسر الفوسفاتي ثنائي الرابطة (3 - 5) يسير باتجاهين متعاكسين

4- قواعد البيورينات والبريميدينات لكل سلسلة مرتبة إلى الداخل من الحلزون المزدوج وموازية للسلسلة الاخرى ، كما انها تكون عمودية على المحور الطولي للحلزون المزدوج



5- يستطيع كل زوج من القواعد ان يستدير بمقدار 36° نسبة إلى الزوج الذي يليها ، وهكذا وجد ان كل لفه من الحلزون المزدوج يتسع لعشرة أزواج من القواعد

6- أظهرت نتائج حيود الأشعة ان طول اللفة الكاملة للحلزون هي حوالي 3.4 نانومتر والمسافة بين كل زوج من القواعد هي حوالي 0.34 نانومتر

7- يتم إزدواج القواعد للسلسلتين بحيث تكون بعض الأزواج من القواعد تتلائم فقط داخل هذا التركيب ، بحيث تؤدي إلى تكوين روابط هيدروجينية مع بعضها ، الأزواج المسموح بتكوين روابط هيدروجينية مع بعضها البعض هي A - T و C - G وهي الملائمة البيئة للتماثل التام في الـ

DNA

أزواج القواعد الأخرى لا تلائم التركيب حيث أن $A - G$ كبير جداً داخل الحلزون والزوج الآخر $G - T$ يكونان بعيدان عن بعضهما لتكوين روابط هيدروجينية ثابتة مع بعضهما البعض ، كما الروابط الهيدروجينية المتكونة بين هذه الأزواج تكون ضعيفة جداً ، وارتباط أزواج القواعد في نموذج واتسون وجريك احتوت على الأزواج التي تعطي ثباتاً واستقراراً أكبر

8- تقع القواعد غير المحبة للماء والقليلة الذوبان نسبياً إلى الداخل من الحلزون المزدوج حيث تختبئ من الماء، أما وحدات السكر المحبة للماء ومجاميع الفوسفات المشحونة كهربائياً (أيون) تقع على المحيط الخارجي وتكون معرضة للماء هذا الشكل والترتيب يثبت الحلزون (هيدروفوبك)

9- ترتبط القواعد النيتروجينية المتقابلة بين السلسلتين بروابط هيدروجينية بحيث ترتبط G مع C بثلاث روابط هيدروجينية ، في حين ترتبط A مع T برابطتين فقط

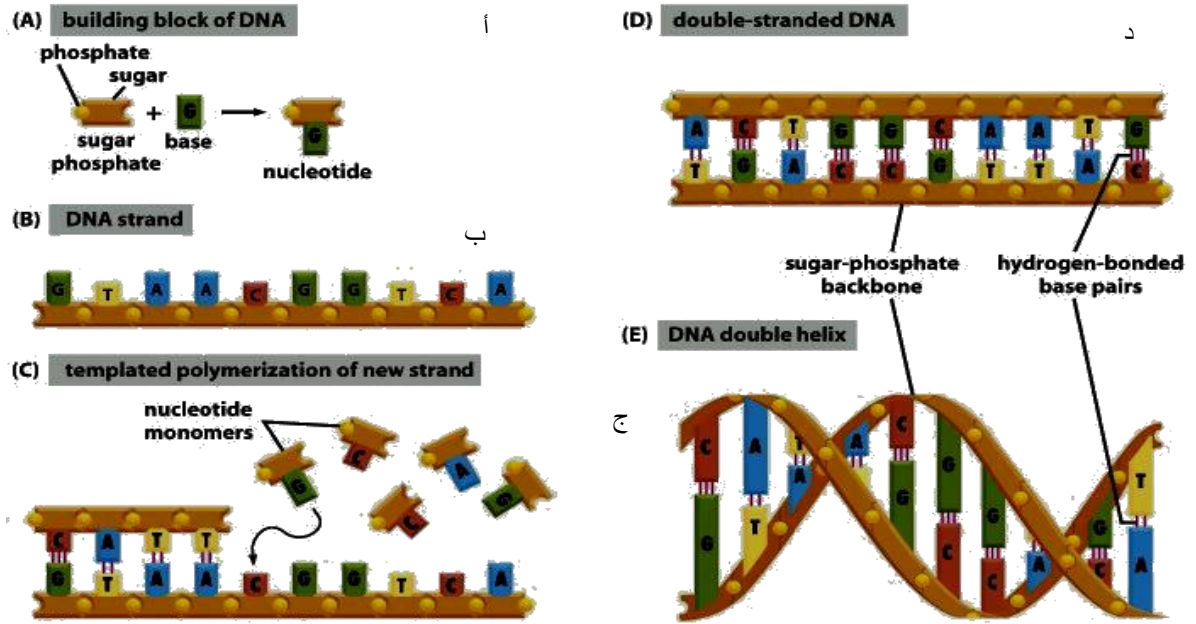


Figure 1-2 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

شكل : أ/يوضح تكوين النيوكليوتيد ، ب/السلسلة المفردة ، ج/ تكوين السلسلة المكتملة ، د/السلسلتين وه/الحلزون المزدوج

الفصل الثامن

تضاعف الحمض النووي

DNA Replication

خواص جزئ DNA

1- ثبات التناظر Stability of Tauameric form

تبين ان ذرات الهيدروجين المرتبطة بالأكسجين تفضل صوراً ارتباطية معينة ، وتميل للبقاء في أماكن معينة ولا تنتقل بين ذرات الأكسجين أو النيتروجين في القواعد النيتروجينية ، وهذا ما يجعل الذرات ثابتة أو مستقرة التناظر، حيث أن عدم الاستقرار يعني ان ذرات الهيدروجين تكون حرة الحركة مما ينتج عنه إمكانية ارتباط القواعد البرميدنية مع القواعد البيورنية بدون تحديد، مما يؤدي إلى الإخلال في تتابع القواعد بين السلسلتين وتفقد صفة التكامل. كذلك تفقد المادة الوراثية أهم خاصية من خصائصها وهي التناسخ الذاتي بدون أخطاء ، حيث ان حرية حركة الهيدروجين يؤدي إلى زيادة الأخطاء مما ينتج عنه ظهور الطفرات الوراثية بنسب عالية جداً

2- الذنترة وإعادة الإتحاد Denaturation and Annealing

من خصائص الحلزون المزدوج القدرة على الانفصال من الداخل والإبتعاد عن بعضهما ، وتتم هذه العملية تحت ظروف معينة . تعرف هذه العملية بالذنترة Denaturation ، وعادة ماتم عند درجات حرارة تصل إلى 100°م ، بحيث ينتج عنه كسر الروابط الهيدروجينية، كما أن حرارة الذنترة أو (نقطة الإنصهار Tm) تعتمد على نسبة C+G / A + T . وإذا ماتم التبريد البطئ لجزئ DNA فإن السلسلتين سيعود إتحادهما بعودة تجاذب الروابط الهيدروجينية Redenaturation أو Annealing بحسب قاعدة شاركاف وبذلك يستعيد الجزئ التركيب الحلزوني الأصلي

3- الخواص القاعدية – الحامضية:

تمتلك مجاميع الفوسفات المتكررة في تركيب الـ DNA معامل تفكك منخفض (Pk) فتكون متأينة بصورة كاملة عند أس هيدروجيني أعلى من 4 ، وهكذا يكون الـ DNA حامضياً ، وكما ذكر سابقاً تقع المجاميع الفوسفاتية إلى الخارج من المنحنى الحلزوني ،

لذلك تكون معرضة للماء وتتحد بقوة مع الايونات الموجبة مثل مع أيون Mg^{++} , Ca^{++} ، وبما ان خاصية التآصر الهيدروجيني لمختلف القواعد يعتمد على الشكل الأيوني والتي تعتمد بدورها على الأس الهيدروجيني ، فأن ثبات الروابط الهيدروجينية يعتمد على الأس الهيدروجيني، ووجد ان الترابط بين القواعد يكون أكثر ثباتاً عند أس هيدروجيني 4 و 11 ، وفي حالة تواجد خارج هذه الحدود الفسيولوجية ، فيكون غير مستقر وينفك الحلزون المزدوج والألتواءات .

تضاعف المادة الوراثية DNA Replication

النظريات المبكرة حول تضاعف المادة الوراثية ، افترضت تكوين قالب منها ، تنتج عنه نسخ مطابقة له، وقد تم اقتراح عدة نظريات كتفسير لآلية عملية تناسخ المادة الوراثية بناءً على نموذج الحلزون المزدوج، والتي يمكن حصرها فيما يلي :

1- التضاعف بالطريقة شبه المحافظة Semiconservative model

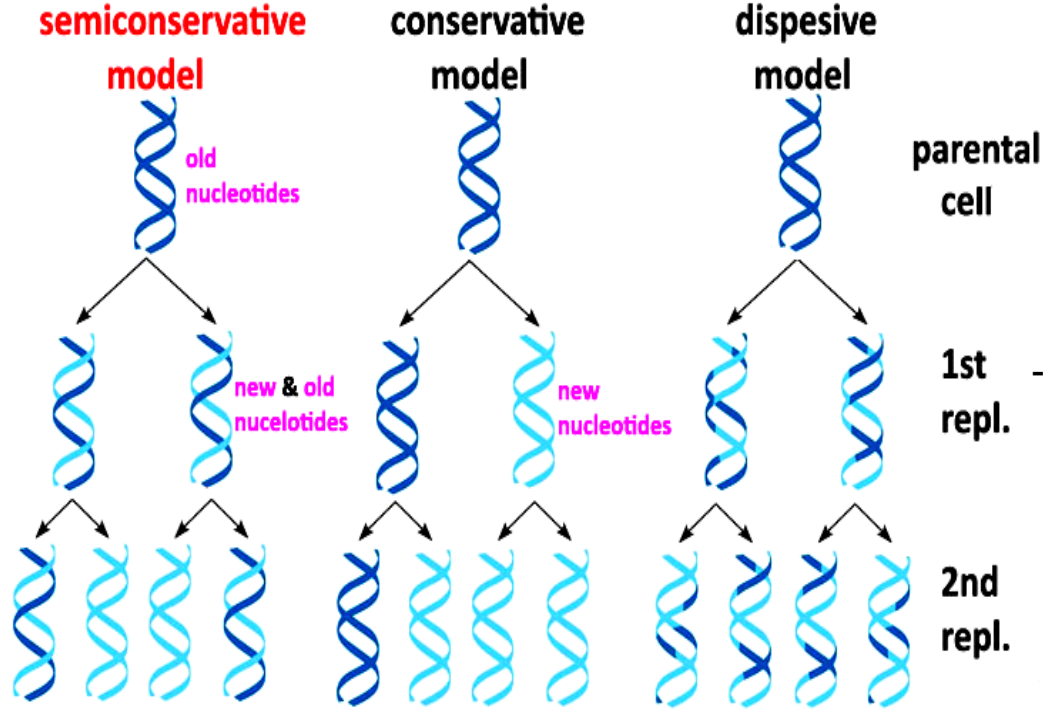
اقترحها كل من واتسون وكريك، وتتلخص في أن كلا من خيطي الحلزون المزدوج يعمل كقالب لتوليف الخيط المكمل له ، وهذا يعني فك عدد ضخم من اللفات ، ولحل هذه المشكلة اقترح واتسون وكريك أن السلسلتين لاحتاجان إلى الفك الكامل قبل بداية النسخ وقد سميت الطريقة بشبه المحافظة بسبب الحفاظ على كل من السلسلتين الأصليتين للحلزون المزدوج، حيث أن الحلزون المزدوج الناتج يتكون من سلسلتين، أحدهما يمثل السلسلة الأصلية والأخرى تمثل السلسلة الجديدة في الجيل الأول

2- التضاعف بالطريقة المحافظة Conservative model

تبقى السلسلة في الحلزون المزدوج كما هي ، ويوجه كل حلزون مزدوج بطريقة ما إلى تكوين حلزون مزدوج جديد ، مكون سلسلتين يختلف كل منهما عن الآخر، وينتج عن هذه النظرية تكوين الجيل الأول من حلزون مزدوج أصلي (أبوي) أو جديدة بالكامل ، أي ان المادة الوراثية الأبوية تنتقل كاملة إلى الجيل التالي وسميت بالطريقة المحافظة بسبب الحفاظ على الحلزون المزدوج الأبوي كاملة بدون إنحلال

3- التضاعف بطريقة التشتت Dispersive model

ينحل الحلزون المزدوج الأصلي بتجزئة السلاسل عند منتصف كل لفة ، ويتم تكوين السلسلة الجديدة على إمتداد كل جزء ، يتم إلتئام القطع مع بعضها البعض، مؤدياً إلى إنتاج نسل يحوي حلزون مزدوج من مكونات أصلية ومكونات جديدة بالتبادل



شكل : يوضح الطرق الثلاثة المقترحة لتناسخ المادة الوراثية

أول دراسة تجريبية أعطت إجابات محددة عن الطريقة التي يتناسخ بها جزئ المادة الوراثية في الكائنات الحية هي التجربة التي قام بها كل من ميسيلون وستال عام 1958م Meseleson and Stahl ،والتي أثبتت أن تناسخ المادة الوراثية يتم بالطريقة شبة المحافظة

بدء التضاعف من نقطة محددة Replication Origin :-

عند عزل الجزئ الخطي للمادة الوراثية لفيروس T₇ على فترات أثناء التناسخ، كان من المتوقع أن تبدأ عملية التضاعف عند أحد الطرفين أو النهايتين ، وليس في مناطق داخلية، إلا انه تبين أن التناسخ يبدأ من الداخل ومن نقطة معينة تسمى نقطة منشأ التناسخ Origin replication وكانت على مسافة حوالي 17% من نهاية السلسلة. كما وجد ان اتجاه التناسخ يبدأ ويستمر في الإتجاهين مما يعطي شكل مميز يعرف بفقاعة المسخ Denaturation bubbles لا تلبث ان تتقدم باتجاه النهاية، كما تعرف نقطتي التفرع

بشبكة التناسخ Replication Fork والتي تتحركان باتجاهين متضادين، كذلك تناسخ المادة الوراثية في الكائنات مميزة النواة يكون في اتجاهين متضادين و تحتوي على عدة نقاط لمنشأ أو لبدأ التناسخ.

في حالة جزئ الـ DNA الحلقي يؤدي التناسخ إلى ظهور الحلقة بشكل θ (ثيتا) ، ولفهم كيفية التناسخ أوضحت الدراسات وجود مجموعة من الإنزيمات تلعب دور في التناسخ وهي :-

1- إنزيم هيليكيز Helicases : يقوم هذا الإنزيم بكسر الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية

2- إنزيم بلمرة الـ DNA Polymerases I , II, III :مجموعة من الأنزيمات المسؤولة عن إستطالة سلسلة الـ DNA وتصحيح الأخطاء Proofreading

3- إنزيم الليجيز DNA Ligase: يعمل على ربط مناطق السلسلة المتقطعة

4- إنزيم البريميز Primases: لتكوين البادئ عند نقطة البداية أو المنشأ ، وايضا يسمى البريموسوم primosome أو معقد الـ RNA polymerase complex

بالأضافة إلى الأنزيمات السابقه توجد بروتينات تعرف باسم بروتينات الارتباط بسلسلة الـ DNA المفردة (SSB) Single stranded- binding proteins :وهي المسؤولة عن المحافظة على بقاء السلسلتين منفردتين

كذلك قالب الـ Template DNA : لتتمكن الأنزيمات من تكوين السلسلة الجديدة المكملة

كيف تتم عملية تضاعف سلسلة الـ DNA

تتشابه عملية تناسخ المادة الوراثية في خلايا الكائنات حقيقية النواة مع الكائنات بدائية النواة إلا في بعض الحالات حيث تظهر بعض الاختلافات، والتي تعود في الأغلب إلى شكل الكروموسوم فيما إذا كان خيطي أو دائري وايضا طول الكروموسوم

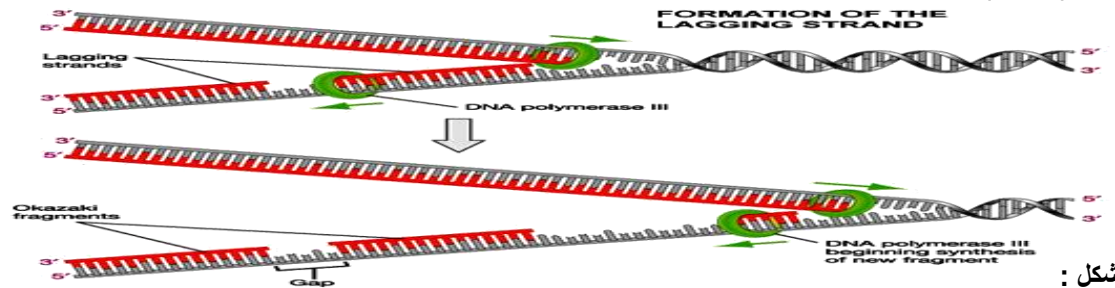
تتلخص عملية تناسخ المادة الوراثية كما يلي

1- يبدأ إنزيم Helicases بكسر الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية ويستمر عمل الإنزيم على طول السلسلة، ولضمان عدم عودة ارتباط القواعد النيتروجينية بالروابط الهيدروجينية يتم ارتباط السلسلة المفردة بـ SSB

2- لتنشيط إنزيم بلمرة الـ DNA Polymerases فلا بد من وجود أيون Mg^{++} والكالسيوم والبادئ وكذلك (dGTP, dCTP, dATP, dTTP)، ليتمكن من ربط النيوكلييدات بمجموعة $3-OH$ الحرة، وهذا يعني أن مسار بناء السلسلة الجديدة يكون من إتجاه $5'$ إلى $3'$

3- لتكوين البادئ عند نقطة البداية تنشط إنزيمات البريميز Primases فتعمل على تكوين قطع قصيرة من البادئ (نيوكلييدات ريبوزيه) وعادة مايكون طول قطع البادئ من 10 إلى 60 نيوكلييدة وحيث أن الحلزون المزدوج يتكون من سلسلتين متضادتين في الإتجاه، وإنزيم بلمرة الـ DNA لا يعمل إلا بالربط من إتجاه $5'$ إلى $3'$ ، فذلك يشير إلى أن السلسلة المقابلة لا يتم بها بناء مستمر بل متقطع، حيث سمي هذا الخيط بالخيط المتكأ Lagging strand لإتجاه البناء من $3'$ إلى $5'$ ، بينما المستمر بالخيط القائد Leading strand. ولقد اطلق على هذه القطع القصيرة المتكونة في الخيط المتكأ بقطع أوكازكي Okazaki Fragments

4- يعمل إنزيم DNA Polymerases باستئصال بوائى الـ RNA ويحل محلها نيوكلييدات الـ DNA، حيث ينشط بعدها إنزيم الليجيز DNA Ligase لربط ولحم قطع أوكازكي مع بعضها البعض ويستمر بناء سلسلة الـ DNA الجديدة على طول الخيط حتى نهايته لتتكون في النهاية كروماتيدتين بكل منها الحلزون المزدوج المكون من سلسلة أصلية (أبوية) وسلسلة جديدة



شكل : يوضح كيفية تناسخ السلسلتين بالحلزون المزدوج، والبناء المستمر في الخيط القائد كذلك القطع القصيرة (قطع أوكازكي) في الخيط المتكأ في الكروموسوم الخطي في خلايا الكائنات مميزة النواة

بدء شوكات التناسخ عند منشأ التناسخ:-

تبدأ عند تركيب معين يُعرف بفقاعة التناسخ Replication bubbles وهي المنطقة التي يتم عندها انفصال السلسلتين المستخدمتين كقالب بناء. حيث يبدأ ظهور الشوكة بارتباط بروتينات المستبدئي Initiator proteins بمواقع معينة عند منشأ التناسخ ، ترتبط ببروتينات أخرى لتعمل على فصل الخيطين عند نقطة منشأ التناسخ فينتج عن ذلك ظهور فقاعة التناسخ bubble ، يبدأ إنزيم البريموسوم بتكوين مناطق البادئ حيث تتكون منطقة واحدة من البادئ في الخيط القائد ، وعدد من مناطق البادئ في الخيط المتلكأ ، تستمر عملية البناء ثنائية الاتجاه بواسطة إنزيم DNA Polymerase حتى ينتهي التناسخ ، تتحرك كل شوكة بعيدا عن المنشأ بمعدل 500 نيوكليتيده حتى ينتهي التناسخ بأكمله

RNA البادئ لتناسخ جزئ المادة الوراثية DNA :-

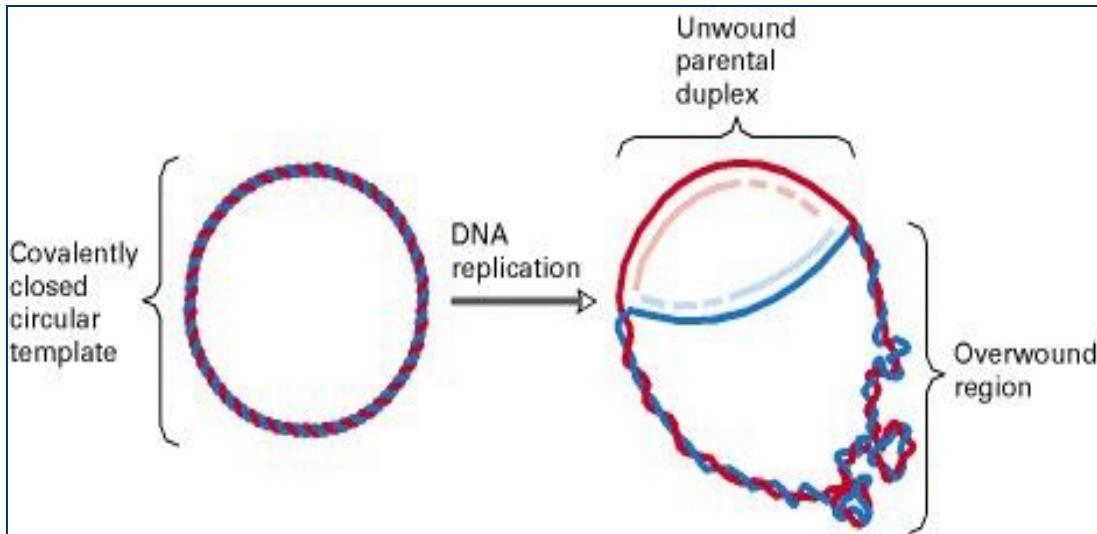
يتحرك إنزيم البريميز Primases أو البريموسوم Primosome خطوة خطوة (كل خطوة ينتج عنها إضافة نيوكليتيده للبناء الجديد) في الاتجاه 5' إلى 3' ، تؤدي حركة البريموسوم على خيط DNA على إزاحة بروتينات (SSB). ففي الخيط المتلكأ حيث يكون البناء باتجاه عكسي، تقوم بروتينات البريموسوم بالتعرف على مواقع المنشأ الصحيحة وبدء البلمرة لتكوين بادئ قصير جداً من سلسلة RNA (3 – 10 نيوكليتيده). في الخيط القائد يستمر البناء بعد انشاء البادئ بشكل مستمر في شوكة التناسخ ، أما في الخيط المتلكأ فبمجرد ان يتم بناء البادئ يبدأ نشاط إنزيم (DNA Pol III) على قطع أوكازاكي ويبدأ بأضافة النيوكليدات ، بحيث يتم التناسخ بصورة متقطعة على طول خيط شوكة التناسخ، ينتج عن ذلك تأخر الانتهاء من تكوين الخيط الجديد مقارنة مع الخيط القائد

يبدأ بعد ذلك نشاط إنزيم بلمرة (DNA Pol I) ، حيث يقوم باستبدال نيوكليتيدهات الـ RNA بنيوكليتيدهات الـ DNA ، تتبقى فجوات بين قطع أوكازاكي حيث يتم سدها بواسطة إنزيم الليجيز والذي يقوم بوصل نهاية 3' للشظية الجديدة بنهاية الشظية السابقة لها ، فيتم الحصول على خيط كامل

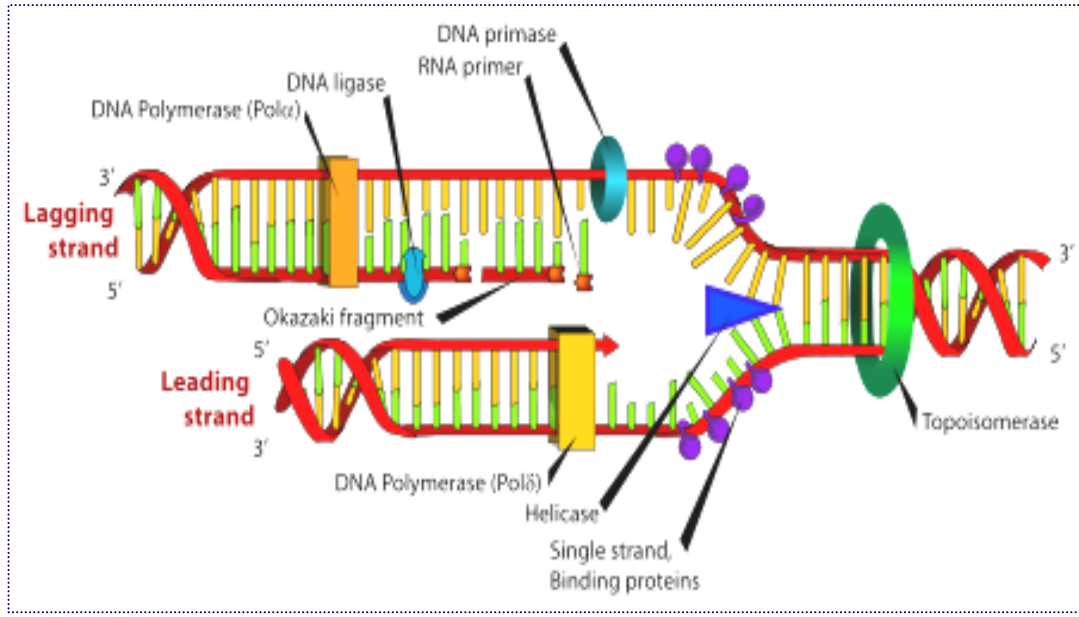
تناسخ المادة الوراثية الدائرية Replication of Circular DNA

تتميز المادة الوراثية في بعض الكائنات غير مميزة النواة مثل E . Coli بأخذها للشكل الحلقي (الدائري) لذا يلزم عند بدأ التناسخ ان تنحل الحلزنة ، والتي ينتج عنها حدوث توتر بالشكل الحلقي باستمرار فك الحلزنة ، لذا وإزالة التوتر في الكروموسوم الحلقي يتم عن طريق التحلزن السالب ، والذي يتم بكسر الخيط الحلقي ويتم التعرف على إنزيمات تحفز الكسر وإعادة الالتحام ، تسمى توبوايسومريز Topoisomerase I , II

يتميز إنزيم Topoisomerase I بقدرته على كسر خيط مفرد من الخيط المزدوج وإعادة إلتحام الخيط ، فنحصل على التحلزن السالب ، أما Topoisomerase II فيمتلك القدرة على كسر الخيطين وإعادة التحامهما فنحصل على التحلزن الموجب ، كما يوجد نوع ينتمي لإنزيم الـ Topoisomerase II يعمل على كسر الخيطين بعد الإنتهاء من التضاعف لينزلق الخيطين عن بعضهما ، ومن ثم إعادة الالتحام ليتكون الشكل الحلقي مرة أخرى . وعادة ما يبدأ التناسخ في الكروموسوم الحلقي عند نقطة بداية أو منشأ واحدة فقط ، ويكون التحرك باتجاهين وتستمر حتى تلتقي مرة ثانية ويتم انفصال الدوائر المزدوجة الوليدة



شكل : يبين التوتر أو الشد الذي يظهر في الكروموسوم الحلقي بعد بدء التناسخ ، والذي يتم معالجت عن طريق التحلزن السالب للخيط



شكل : يوضح آلية عمل الأنزيمات لتناسخ المادة الوراثية ، في الخيط القائد والخيط المتكافئ في الكروموسوم الحلقي

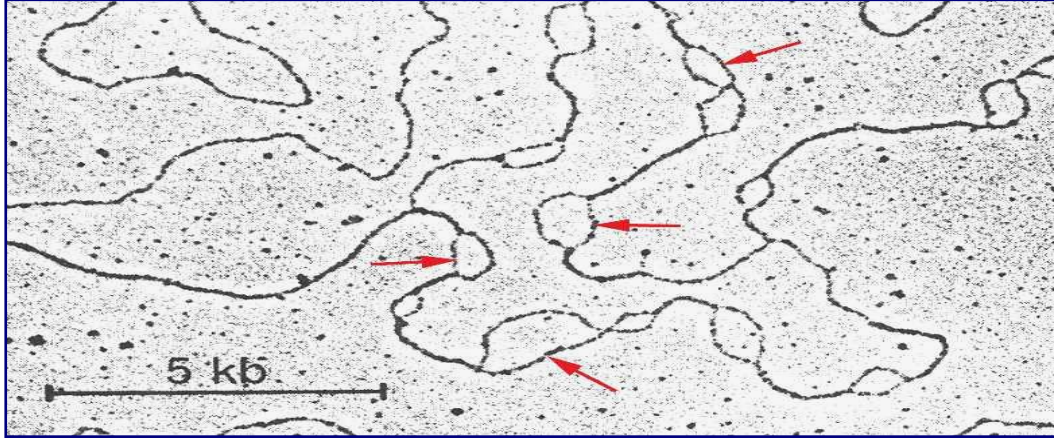
تناسخ الكروموسومات في الخلايا مميزة النواة:-

لقد تم التعرف على ان التناسخ يبدأ في المناطق الداخلية من الحلزون المزدوج بداية بتكون فقاعة التناسخ عند نقطة المنشأ ، ولقد وجد ان هذه الفقاعات تتكرر على طول خيط المادة الوراثية ، مما يشير إلى تعدد مناشئ التناسخ في كروموسومات الخلايا مميزة النوى، لتتم عملية التناسخ بدون إبطاء وأثبتت الدراسات ان حركة شوكة التناسخ في غير مميزة النواة اسرع من الموجودة في مميزة النواة ، وقد يرجع السبب إلى ارتباط المادة الوراثية بالبروتينات الهستونية لتكون النيكليوسومات

من نتائج التجارب حول تناسخ الكروموسومات في مميزة النواة مايتي:

- 1- ان كل كروموسوم من الممكن أن يحتوي على عدة الالاف من مناشئ التناسخ
- 2- تميل مناشئ التناسخ إلى العمل في مجاميع تسمى وحدات التناسخ (الريبليكون Replicons)
- 3- يبدأ نشاط وحدات التناسخ خلال مرحلة S خلال دورة الخلية
- 4- داخل وحدة التناسخ تكون المسافة بين المناشئ المفردة من 30.000 إلى 300.000 نيوكليوتيدة

5- تكون حركة التناسخ في اتجاهين متضادين وتتحرك كل شوكة إلى ان تلتقي رأسا برأس مع شوكة تناسخ أخرى



هل يوجد تتابعات محددة من المادة الوراثية تميز منشأ التناسخ؟

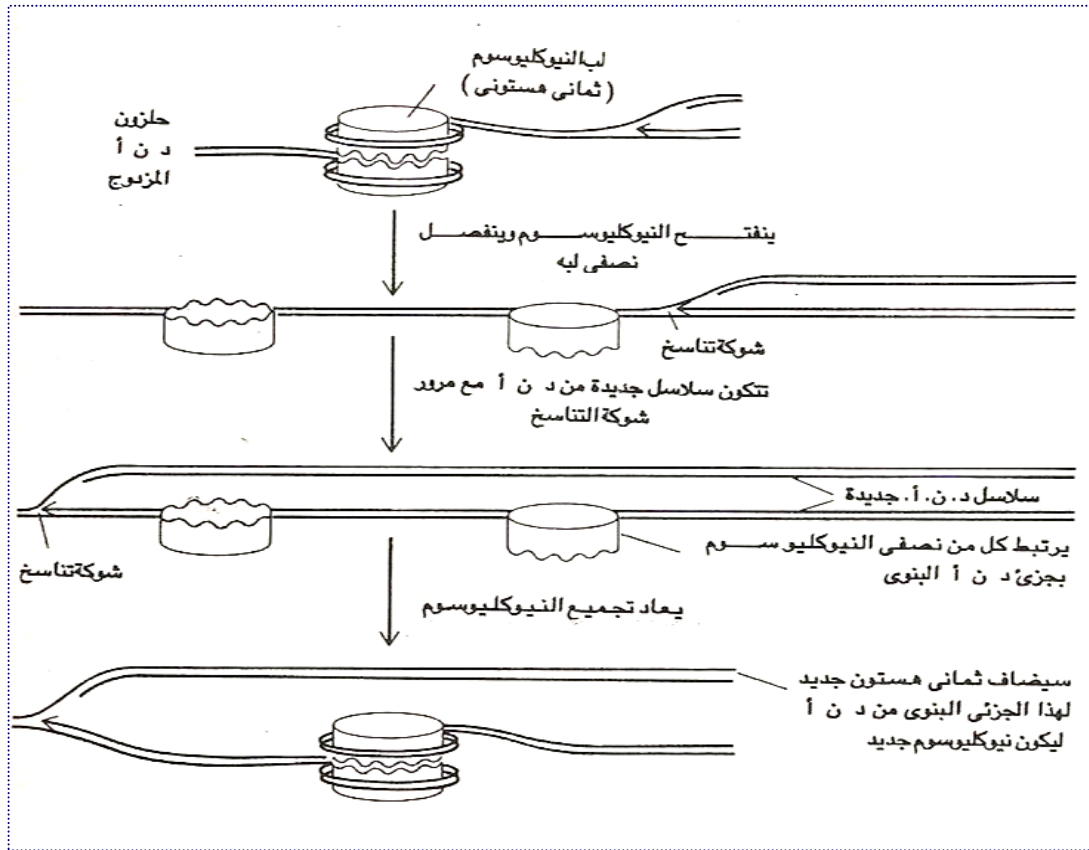
في البكتريا والفيروسات ثبت وجود تتابعات محددة للمناشئ ، أما في الخلايا مميزة النواة لم تحدد بصفة قاطعة، ولو ان التناسخ يبدأ في مواقع محددة وثابتة على الكروموسوم

الهستونات الجديدة في الكروماتين اثناء التناسخ:-

تحتاج السلسلة الجديدة إلى البروتينات الهستونية بكمية مساوية لكمية في الخيط المتناسخ ، والتي يتم بناءها اثناء مرحلة S ، ذلك ان الهستونات لاتنفصل عن الـ DNA المرتبطة به حتى اثناء التناسخ. وحيث ان شوكة التناسخ لابد ان تمر بطريقة ما خلال النيكليوسوم

فلقد افترض البعض بأن النيكليوسوم ينقسم بصورة مؤقتة إلى نصفي نيكليوسوم اثناء التناسخ ليسمح لإنزيمات البناء بالمرور والنسخ ، فيتم بناء الهستونات بأرتباط 8 هستونات مع بعضها البعض

يرتبط الخيط الجديد بالهستونات التي تم بنائها حديثا بعد فترة من انتهاء بناء الخيط الجديد لمدة لاتزيد عن الساعة



دور إنزيمات بلمرة DNA في تصحيح الأخطاء Proofreading:-

تمتلك الأنواع الثلاثة من إنزيمات البلمرة خاصية التحليل أو القطع الطرفي في الإتجاه 3 إلى 5 بالإضافة إلى وظيفة البلمرة الأساسية

هذه الخاصية لها أهمية في عملية تصحيح الأخطاء أثناء عملية بناء السلسلة الجديدة

احد الأسباب الي استند إليها لتفسير عملية إتجاه البناء من 5 إلى 3 ، إلى أن انتهاء البناء سيكون دائماً منتهي بمجموعة ثلاثية الفوسفات المتميزة بطاقة مرتفعة جداً، لذا فإن نزع نيوكليتيده مضافة خطأ سيؤدي إلى ظهور سلسلة منتهيه بمجموعة 5 -أحادية الفوسفيت والتي تتميز بمحتوى طاقة منخفض لايساعد على الإستطالة، مما يؤدي إلى وقف العملية ، بينما سيكون من السهل نزع نيوكليتيده غير صحيحة والمضافة إلى نهاية السلسلة 3 بدون فقد مصدر الطاقة اللازم لتكوين رابطة الفسفوالتنائيه ، ولكيفية تعرف الإنزيم على النيوكليتيده الخطأ ، يعتقد إنه بأضافة نيوكليتيده خطأ سيؤدي إلى إعاقه حركة الإنزيم للإمام مما يدفعه للحركة إلى الخلف، بحيث تعود القاعدة لموقع الهدم

فيتم إزالة القاعدة الخطأ من موقعها على السلسلة ويكمل الإنزيم تقدمه .

Enzyme Activity	DNA Polymerase I	DNA Polymerase II	DNA Polymerase III
5' to 3' polymerase	Yes	Yes	Yes
3' to 5' exonuclease	Yes	Yes	Yes
5' to 3' exonuclease	Yes	No	No

جدول : يوضح خصائص انواع إنزيم DNA Polymerase

الفصل التاسع

الهندسة الوراثية Genetic engineering

تعرف الهندسة الوراثية بأنها مجموعة التقنيات التطبيقية لعلم الوراثة والتكنولوجيا الحيوية المستخدمة في التعامل مع المادة الوراثية لكائن حي واحد أو أكثر بغرض تغيير واحدة أو أكثر من خصائصها

تطبيقات الهندسة الوراثية

- 1- اجراء ابحاث لدراسة تركيب ووظيفة جين ما
- 2- انتاج بروتينات مهمة بطرق جديدة
- 3- الحصول على نباتات وحيوانات محورة وراثياً
- 4- تحليل الجينوم كاملاً
- 5- التشخيص الطبى والعلاج

الخطوات العامة فى تجارب الهندسة الوراثية

- 1- إستخلاص الـ DNA المحتوى على الجين المرغوب واستخلاص الـ DNA الذي سيحمل الجين المرغوب من الكائنات المحتوية عليهما
- 2- تقطيع الـ DNA المحتوى على الجين المرغوب الى قطع صغيرة بحيث يحتوى احداها على الجين المرغوب
- 3- فصل قطع الـ DNA عن بعضها بالهجرة الكهربائية Electrophoresis
- 4- التعرف على القطعة المحتوية على الجين المرغوب وعزلها فى صورة نقية
- 5- ادماج قطعة الـ DNA المحتوية الجين المرغوب فى الناقل او الحامل
- 6- ادخال الناقل ومايحملة من جين الى خلية مناسبة
- 7- انتخاب الخلايا التى اكتسبت الناقل وما يحمل من جين من بين مجموعة الخلايا الاخرى
- 8- اكثار الخلية المحتوية على الناقل ومايحملة من جين مرغوب وذلك لاكثر الجين المرغوب

وفيما يلى شرح كل من هذه الخطوات على حدة

أولاً: إستخلاص الـ DNA

أ- عزل وتنقية الـ DNA من خلايا حقيقيات النواة

نظراً لكبر حجم الـ DNA في خلايا حقيقيات النواة فلا بد من تحطيمه وحيث ان الـ DNA ترتبط بة عدة بروتينات فلا بد من ازالتها وتبدأ عملية عزل الـ DNA بتجميد الانسجة المراد استخلاص الـ DNA منها باستخدام النيتروجين السائل للمساعدة على تكسير الخلايا عند طحنها في الهون في محلول منظم بة مادة sodium dodecyl sulphate SDS التى تفكك البناء الرباعى للبروتين ، كما يحتوى المحلول على احد انزيمات تحطيم البروتين مثل البرونيز او البروتينيز ، ويحتوى على مادة مخلبية EDTA لخلب الايونات الثنائية Ca, Mg التى تنشط انزيمات تحطيم الـ DNA فيتوقف نشاطها اثناء الاستخلاص .

ب- عزل وتنقية الناقل (البلازميد)

يستخلص البلازميد من خلايا بكتريا او فطر الخميرة او خلايا حيوانية او نباتية واكثرها بكتريا *E.coli* وفطر *Saccharomyces cerevesiae* بالخطوات الاتية:-

- 1- تنمية خلايا بكتريا *E.coli* على بيئة مغذية سائلة
- 2- تجميع الخلايا من البيئة بالطرد المركزي ثم تغسل لعدة مرات بمحلول ملحي منظم
- 3- تحطيم الخلايا المغسولة بتعريضها لمحلول منظم قلوى بة خليط من انزيمات Lysozyme ومركب الـ EDTA ومادة SDS ويلاحظ فى الوسط القلوى للمحلول المنظم حدوث دنثرة وانفصال لشريط الـ DNA المزدوج dsDNA ويصبح ssDNA
- 4- يعامل الخليط بمحلول منظم حامضى لمعادلة القلوية ثم يحضن على درجة صفر لمدة 30 ق فيعود شريطى البلازميد المنفصلين الى الازدواج ثنائية وهذا لايحدث للكروموسوم البكتيرى الكبير الحجم
- 5- يجرى الطرد المركزى للخليط لنحصل على البلازميد معلقاً فى الرائق
- 6- يتم ترسيب الـ DNA الخاص بالبلازميد من الرائق باستعمال كحول الايثايل فيرسب الـ DNA البلازميدى ومعة بعض جزيئات الـ RNA
- 7- يتم التخلص من جزيئات الـ RNA بالمعاملة بإنزيم RNase ثم يعاد الترسيب بالكحول الايثايل لنحصل على البلازميد نقياً

ثانياً: تقطيع الـ DNA للحصول على الجين المرغوب

وطرق تقطيع الـ DNA إما غير متخصصة أو متخصصة كما يلي:

أ- طرق القطع الغير متخصصة

ومنها استعمال انزيمات القطع الغير متخصصة او المعاملة ببعض المعاملات الكيماوية المحطمة للـ DNA او ببعض المعاملات الطبيعية (القص الميكانيكى) وهى اهمها حيث ان جزيئات الـ dsDNA طويلة ودقيقة ذات صلابة محدودة تجعلها عرضة للكسر فى المحاليل ببعض القوى الطبيعية مثل تعريضها الى اهتزازات فوق صوتية فتؤدى الى تكسيرها الى جزيئات صغيرة بطول حوالى 300 زوج من النيوكليوتيدات ، كما يمكن التحكم فى عملية القص بخلط محلول جزيئات الـ dsDNA فى خلاط خاص على سرعات عالية فنحصل على قطع قصيرة بطول 8000 زوج من القواعد (8kbp) بالتقليب على سرعة قدرها 1500 لفة/ق (1500 rpm) لمدة 30ق

ب- طرق القطع المتخصصة

وهى تعتمد على استعمال إنزيمات القطع المقيد من النوع الثانى وهى تقطع الـ DNA فى أماكن محددة هي أماكن القطع المقيد وبهذه الإنزيمات أمكن التحكم فى عملية القطع والحصول على نفس عدد القطع ونفس الطول ويتم اختيار الإنزيم المناسب لقطع الجين المرغوب إذا عرف تتابع نيوكليوتيدات المنطقة على يمينه ويساره وفيما يلي إنزيمات القطع المقيد :-

انزيمات القطع المقيد

هى انزيمات تكسر احد روابط الفوسفور الثنائى phosphodiester bonds الداخلية وهى متخصصة لانها تشترط وجود تتابعات معينة من النيوكليوتيدات لتكسر الرابطة بداخله وتوجد فى البكتريا *e.coli* وانواع واجناس اخرى كثيرة وامكن تمييز ثلاثة انواع من هذه الانزيمات اهمها النوع الثانى Type II ويعطى لكل إنزيم اسم مختصر من ثلاثة احرف الاول يمثل اسم الجنس والثانى والثالث يمثلان اول حرفين من اسم النوع للكائن الحى الذى يعزل منه الإنزيم وقد يتلو الاختصار الثلاثى رقم يدل على ترتيب الإنزيم اذا وجد اكثر من إنزيم فى نفس الكائن

مثل :

إنزيم *Pst* I المستخلص من بكتريا *Providencia stuartii*

إنزيم *Xma* I المستخلص من بكتريا *Xanthomonas malvacearum*

وفيما يلي امثلة لاشهر انزيمات القطع المقيد واختصاراتها وامكن القطع المقيد

Table 22.1: Source of restriction enzymes, cleavage sites and productions of cleavage

Microorganisms	Restriction enzymes	Cleavage sites	Cleavage products	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	Bam HI	5'-GGATCC-3' 3'-CCTAGG-5'	5'-G 3'-CCTAG	GATCC-3' G-5'
<i>B. globigii</i>	Bgl II	5'-AGATCT-3' 3'-TCTAGA-5'	5'-A 3'-TCTAG	GATCT-3' A-5'
<i>Escherichia coli</i> RY13	Eco RI	5'-GAATTC-3' 3'-CTTAAG-5'	5'-G 3'-CTTAA	AATTC-3' G-5'
<i>Haemophilus influenzae</i> Rd	Hin dIII	5'-AAGCTT-3' 3'-TTCGAA-5'	5'-A 3'-TTCGA	AGCTT-3' A-5'
<i>H. parainfluenzae</i>	Hpa I	5'-GTTAAC-3' 3'-CAATTG-5'	5'-GTT 3'-CAA	AAC-3' TTG-5'
<i>Klebsiella pneumoniae</i> OK 8	Kpn I	5'-GGTACC-3' 3'-CCATGG-5'	5'-GGTAC 3'-C	C-3' CATGG-5'
<i>Streptomyces albus</i> G	Sal I	5'-GTCGAC-3' 3'-CAGCTG-5'	5'-G 3'-CAGCT	TCGAC-3' G-5'
<i>Serratia marcescens</i>	Sma I	5'-CCCGGG-3' 3'-GGGCCC-5'	5'-CCC 3'-GGG	GGG-3' CCC-5'

وتقسم انزيمات القطع المقيد من النوع الثاني الى ثلاث مجاميع حسب شكل اطراف قطع الـ DNA الناتجة من القطع كما يلي:-

1- انزيمات قطع مقيد تعطى اطراف 5' بارزة لزجة

وأشهرها إنزيم *Eco RI* ويؤدي الى تكوين اطراف احادية بارزة طوله 4 نيوكليوتيدات وتنتهي بطرف 5' بمجموعة فوسفات واطراف 3' قصيرة بارزة تحمل مجموعة OH ويطلق على الاطراف البارزة اسم الاطراف اللزجة لقدرتها على الازدواج ببعضها مرة اخرى بسبب تكامل القواعد الموجودة على احداها بالقواعد

الموجودة على الأخرى ومن الأنزيمات الأخرى الشهيرة في هذه المجموعة *Hind III*

EcoR I



2- أنزيمات قطع مقيد تعطى أطراف 3 بارزة لزجة

مثل إنزيم *Pst I* يعطى أطراف لزجة تنتهي بنهاية 3 في الطرف العلوى للشريط

Pst I



3- أنزيمات قطع مقيد تعطى أطراف مستوية

مثل إنزيم *Hae III* حيث يقطع الشريط العلوى والسفلى في مكانين متقابلين



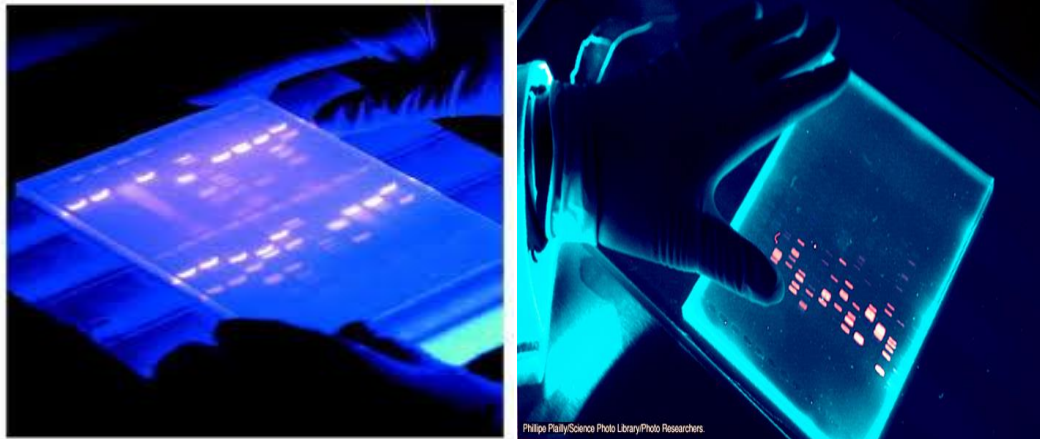
ثالثاً: فصل قطع الـ DNA بالهجرة الكهربائية Electrophoresis

الهجرة الكهربائية تستخدم في فصل أي مادة يحمل سطحها شحنة سالبة أو موجبة وبما أن مجاميع الفوسفات الموجودة على طول قطع الـ DNA أحادية أو ثنائية الشريط تحمل ثلاث مجاميع (-OH) تربط بين جزيئي السكر في وحدتي النيوكليوتيدات المتتالية برابطة ثنائية الاستر مما يؤدي إلى انشغال مجموعتين -OH وتبقى مجموعة -OH واحدة حرة وهذه المجموعة يمكنها التأين إذا كان الوسط قلوى معطية بروتون H⁺ تاركة شحنة سالبة على باقي مجموعات الفوسفات ولذلك فإن مجموعة الفوسفات عبارة عن حامض فوسفوريك يعطى الحامض النووي الصفة الحامضية ولهذا تستخدم الهجرة الكهربائية في فصل قطع الـ DNA

فكلما زاد طول قطعة الـ DNA وبالتالي وزنها الجزيئي كلما زاد عدد الشحنات السالبة التي تحملها وبالتالي فان سرعة هجرة الجزيء في المجال الكهربائي ستعتمد على وزنة الجزيئي ، فكلما قل الوزن الجزيئي لقطعة الـ DNA كلما كانت سرعته أكبر والعكس ، ولذلك يمكن فصل قطع الـ DNA عن بعضها بوضعها في مجال كهربائي بتيار ثابت وفي وسط قلوي حيث تتجه القطع في سباق الى القطب الموجب لانها سالبة الشحنة وتكون هجرتها متأثرة بوزنها الجزيئي كما ذكر سابقاً

تجرى عملية الهجرة الكهربائية في وسط من جيل الاجاروز Agarose والتي تستعمل لفصل قطع الـ DNA الاكبر من 200 زوج من القواعد او مادة polyacrylamide والتي تستعمل لفصل القطع الاقل من ذلك.

نظراً لان قطع الـ DNA ليس لها لون وان جيل الاجاروز شفاف فبعد الهجرة الكهربائية لن يستطيع الباحث رؤية اى شيء على الجيل لذلك لابد من غمر الجيل في محلول يحتوى على صبغة ايثيديوم بروميد حيث تنحسر الصبغة بين لفات الـ DNA مكونة معها معقداً ، وهذا المعقد ايضاً لايرى بالعين وعن تعريض الجيل لأشعة فوق بنفسجية من مصباح يصدرها ومثبت داخل صندوق الاشعة الفوق بنفسجية تظهر كل سطوح معتمة وسطحة العلوى بة مرشح شفاف يمرر الاشعة ويوضع عليه الجيل فتظهر قطع الـ DNA مضيئة في مواقعها حيث تمتص الاشعة فوق البنفسجية الغير مرئية وتعيد بثها بصورة مرئية فيما يعرف بظاهرة التفلور Fluorescence ويتم تصويرها بكاميرا بولارية مثبتة اعلى الصندوق فتظهر الصورة الناتجة بخلفية سوداء تكون فيها الحزم او القطع المفصولة مضيئة كما بالشكل



رابعاً : التعرف على القطعة المحتوية على الجين المرغوب وعزلها عن القطع الأخرى في صورة نقية

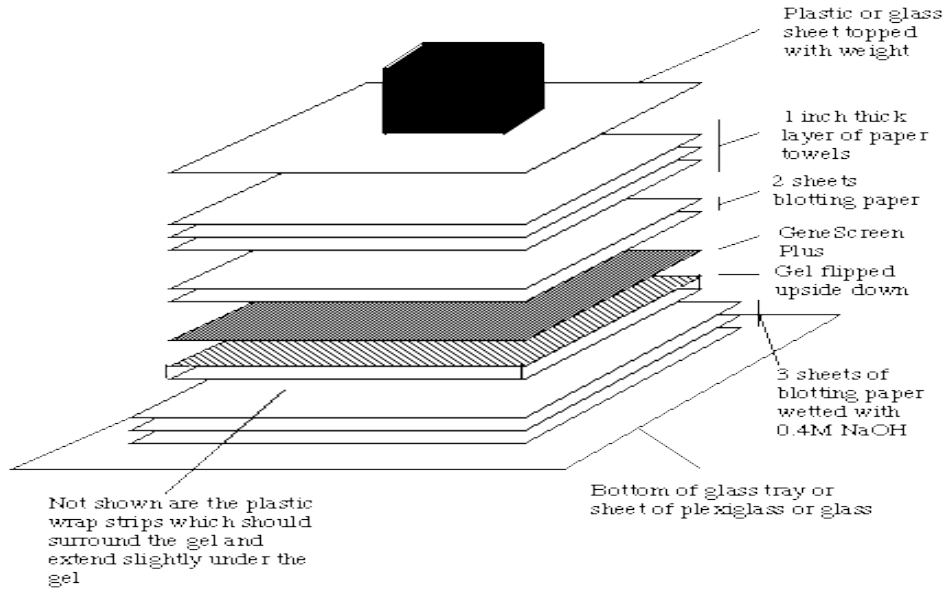
1- التعرف على موقع الجين على الجيل بطريقة الجس probing

أ- طريقة الاسقاط الجنوبي Southern blotting technique

اخترع العالم البريطاني الملقب بالجنوبي Southern عام 1975 طريقة دقيقة ومحكمة لنقل حزم الـ DNA مباشرة من الجيل الى غشاء من النيتروسيليلوز وسميت بطريقة الاسقاط الجنوبي او الطبع الجنوبي Southern blotting technique نسبة لاسمة وفيها يتم نقل حزم الـ DNA مباشرة من الجيل بعد انتهاء الفصل الكهربائي الى قطعة من غشاء النيتروسيليلوز مساحتها مساوية لمساحة طبقة الجيل باستعمال منظم قلوي يفصل شريطي الـ DNA المزدوج.

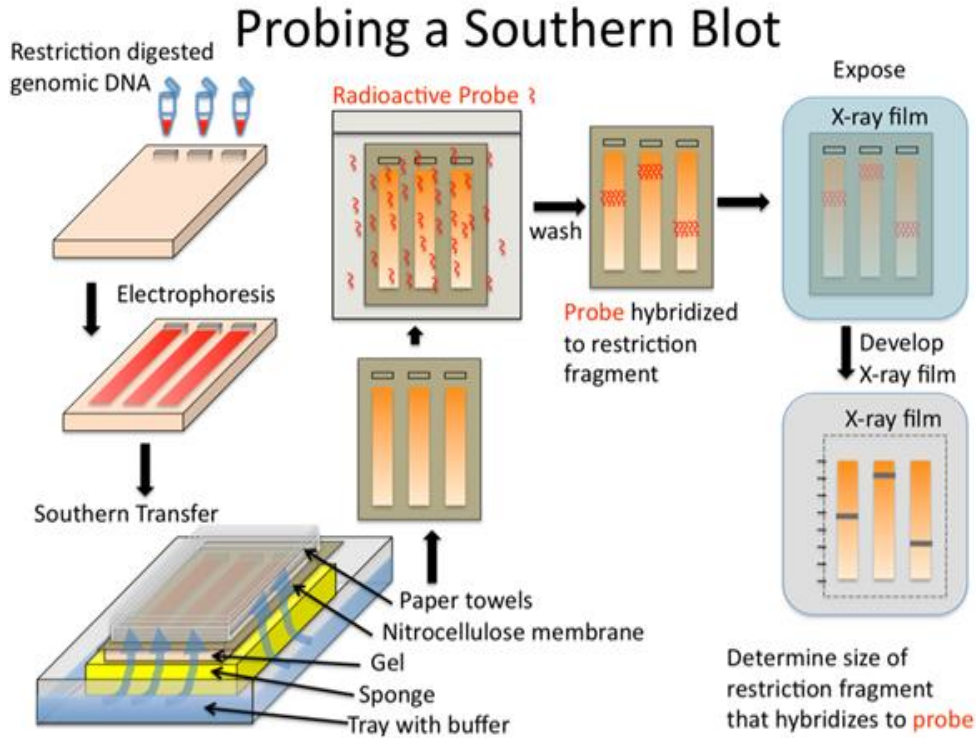
وتتلخص الطريقة بوضع كمية من المنظم القلوي في وعاء زجاجي مسطح منخفض العمق ويوضع بمنصفة كتلة من مادة لا تتفاعل مع المنظم مثل الزجاج او المطاط تستعمل كرف يوضع عليه لوح زجاجي مساحته اكبر قليلاً من الجيل ثم يوضع شريط عريض من ورق الترشيح على اللوح الزجاجي ويتدلى منه ليصل طرفي الورق الى المنظم ويبلل ورق الترشيح بنفس المنظم القلوي ثم يوضع الجيل بحرص فوق الورق ثم توضع عليه قطعة غشاء نيتروسيليلوز مبللة بالمنظم مساحتها ماثلة لمساحة الجيل وتمرر اصابع اليد برفق فوق الغشاء لطرد اي فقاعات هواء ويقص جزء صغير من الركن الايسر السفلي للغشاء لتحديد الاتجاهات ومواقع الحفر ، ثم توضع قطعة ورق ترشيح اخرى فوق الغشاء ثم يوضع فوقها مجموعة سميكة من صفائح المناديل الورق ثم يوضع عليها ثقل معقول (زجاجة مملوءة ماء مثلاً) ثم تغطى هذه التجميعية كلها بورق سيلوفان شفاف ليحافظ على نسبة الرطوبة ومنع الاتربة وتترك هكذا طوال الليل فيسحب ورق الترشيح المحلول المنظم ماراً بالجيل نتيجة سحب المناديل من اعلى دافعاً امامة قطع الـ DNA الى غشاء النيتروسيليلوز الموجب الشحنة وتلتصق به قطع الـ DNA السالبة الشحنة وفيما يلي شكل يوضح هذه الطريقة.

Stack of components for Southern Blot



ب- التصوير بالأشعاع الذاتي Autoradiography

بعد نقل حزم الـ DNA من الجيل إلى غشاء النيتروسيليلوز يزال هذا الغشاء ويحضر في خليط يحتوي على مجس عبارة عن جزئ من ssDNA أو ssRNA مشع مكمل لقطعة الـ DNA للجين المرغوب ثم يلي ذلك تصوير بالأشعاع الذاتي لغشاء النيتروسيليلوز بتجفيف الغشاء ووضعه ملامس لقطعة مماثلة المساحة من فيلم أشعة أكس داخل صندوق محكم الغلق وتحضين الصندوق لفترة مناسبة ثم يؤخذ الفيلم بعدها ويجرى لة اظهار لتحديد مكان البقعة السوداء التي ستظهر عليه ويطلق على فيلم أشعة أكس بعد الاظهار اسم Autoradiogram تتم مقارنة بالصورة الضوئية التي اخذت لة في بداية التجربة للجيل بعد المعاملة بصبغة الايثيديوم بروميد فيمكن تحديد موقع الجين المرغوب حيث يكون ممثل بالحزمة على الجيل التي سينطبق موقعها مع موقع البقعة السوداء على Autoradiogram كما بالشكل التالي :



ج- عزل الجين

بعد تحديد مكان الجين يتم فصل عينة اخرى من نفس تحضير الـ DNA بالهجرة الكهربائية على جيل الاجاروز وبعد فصل قطع الـ DNA المختلفة على الجيل يتم قص قطعة الـ DNA المحتوية على الجين المرغوب والسابق تحديد موقعة من التجربة السابقة ويستخلص منها الجين ويتم ذلك باحدى الطريقتين التاليتين:

1- طريقة الازاحة الميكانيكية

وتتم بتكسير قطعة الجيل لاجزاء صغيرة ثم هرسها بساق زجاجية فى كمية صغيرة من منظم قلوى داخل انبوبة صغيرة حتى تنتشر قطع الـ DNA خارج الجيل ثم تفصل قطع الجيل بالطرد المركزى ونحصل على قطع الـ DNA المطلوبة فى الرائق

2- طريقة الازاحة الكهربائية

يتم وضع قطع الجيل المحتوية على الجين المرغوب فى انبوبة فرز انتشارى مع منظم قلوى ويربط طرفى الانبوبة وتوضع فى وعاء هجرة كهربائية بها نفس المنظم القلوى ويوصل تيار كهربائي لفترة قصيرة فتبدأ قطع الـ DNA السالبة الشحنة فى الهجرة إلى المنظم تاركة قطعة الجيل

تخليق الجين صناعياً

في حالة تعذر عزل الجين المرغوب باستخدام أى من الطرق السابقة يتم تخليق الجين فى صورة نقية بالمعمل بأى من الطريقتين الآتيتين:-

1- تخليق الجين من البروتين

تعتمد هذه الطريقة على عزل البروتين الذى يتحكم فيه الجين المطلوب تخليقة صناعياً وعلى معرفة عدد الاحماض الامينية ونوعها وتتابعها داخل سلسلة الببتيدية حتى يمكن بعد ذلك معرفة الشفرة الوراثية التى يحملها mRNA الذى قام بتخليق هذا البروتين فى شكل كودونات مختلفة كل منها يشير الى حامض امينى معين وبالتالي تستنتج الشفرة الوراثية التى يحملها الشريط السالب من شريطى الـ DNA داخل الجين فى شكل شفرات ثلاثية والذى عمل كقالب لتخليق هذا الـ mRNA اثناء عملية النسخ ، وبنفس الطريقة تستنتج الشفرة المكملة على شريط الـ DNA الموجب المكمل لهذا الشريط السالب وبالتالي يمكن تخليق شريطى الـ DNA السالب والموجب أى تخليق الجين كاملاً. وأصبح ذلك يتم حالياً بآلات تعرف بمخلقات الجينات تعمل بالكمبيوتر

2- تخليق الجين من الـ mRNA (تقنية الـ DNA المكمل c DNA)

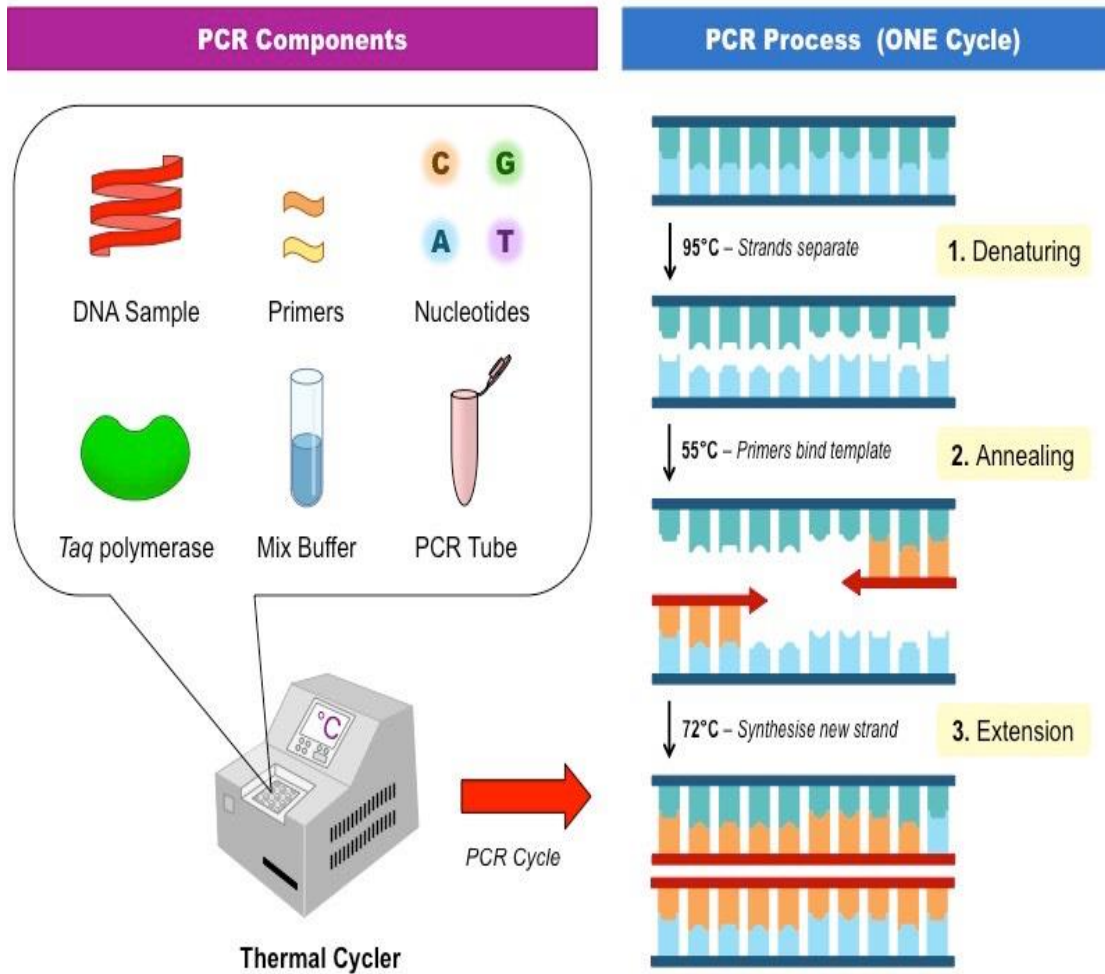
يتم عزل الـ mRNA الموجب الشحنة الذى يتحكم فى نسخة الجين المراد تخليقة ثم يستعمل هذا الـ mRNA كقالب يتم عليه تخليق شريط مكمل من الـ DNA السالب الشحنة يعرف بالـ complementary DNA او c DNA وذلك باستخدام إنزيم النسخ العكسى وبتعريض هذا الجزئ الهجين ds-(DNA/RNA) لبيئة قلوية يتحلل شريط الـ mRNA ويبقى فقط شريط c DNA السالب والذى يستعمل كقالب فى وجود إنزيم DNA polymerase لتخليق شريط مكمل موجب فينتج جزئ ds-c DNA يمثل الجين المطلوب.

3- تخليق الجين بمضاعفة بتفاعل البوليميرز المتسلسل PCR polymerase chain reaction

يعتمد على استعمال كمية ضئيلة من الـ DNA المحتوى الجين المرغوب ويتم مضاعفتها داخل اجهزة خاصة تعرف باسم PCR او Thermocyclers وهى تعتمد على استخدام مخلوط تفاعل الـ PCR وهو مكون من الـ DNA المحتوى الجين المرغوب وزوج من اشرطة قصيرة مفردة من الـ DNA معروف تتابعها وتعرف بالبودائى مع مخلوط من النيوكليوتيدات الاربعة الخاصة بالـ DNA وإنزيم بلمرة او تضاعف الـ DNA مثل Taq

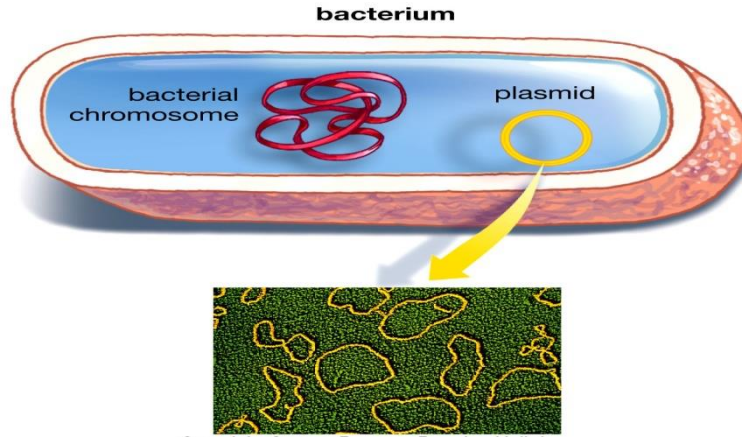
DNA-polymerase المستخلص من بكتريا *Thermus aquaticus* ويجرى التفاعل برفع درجة حرارة التفاعل الى 94-95 °م / 5ق لفك شريطى الـ DNA ثم تخفض الحرارة الى 30-65 °م / 30ث ليزدوج زوج البودائى primers مع شريطى الـ DNA للجين المرغوب ثم ترفع درجة الحرارة الى 65-76 °م / 2-5ق ليقوم إنزيم Taq DNA polymerase بإطالة البودائى بإضافة وحدات النيوكليوتيدات المكملة لشريطى الـ DNA المكونين للجين فينتج نسختين من الجين المرغوب وبتكرار الدورة من التفاعل تزداد نسخ الجين المرغوب

وللتأكد من ان تفاعل الـ PCR قد نجح يؤخذ مخلوط التفاعل ويفصل بالهجرة الكهربائية ثم يصبغ بالايثيديم بروميد ويظهر بالاشعة فوق البنفسجية بالتوازي مع مخلوط قياسى فإذا نجحت العملية فنحصل على حزمة واحدة single band فى الحارة Lane التى تم فيها التفاعل ، وفيما يلى شكل يوضح خطوات تفاعل الـ PCR



خامساً : ادماج قطعة الـ DNA المحتوية الجين المرغوب في الناقل او الحامل

أى قطعة من الـ DNA تمثل جين ما لأى كائن لايمكنها التضاعف بنفسها نظراً لخلوها من منطقة بدء التضاعف وتعتبر البلازميدات Plasmids من اهم الحوامل الجينية التى تستخدم فى الهندسة الوراثية وهى عبارة عن جزيئات DNA زائدة عن الكروموسوم توجد فى سيتوبلازم العديد من البكتريات او الكائنات الاخرى مثل الميكوبلازما والريكتسيا والفطريات والنباتات والحيوانات والانسان ، وهى جزيئات DNA ثنائية الشريط حلقيه ولها قدرة على التضاعف الذاتى حيث توجد بها منطقة بدء التضاعف Origin of Replication (O.R) اى أنها Replicons وتنقسم احياناً مستقلة عن الخلية الموجودة فيها ويمكن ان تحمل البلازميدات بعض الصفات مثل مقاومة المضادات الحيوية ومن اهم الصفات اللازم توافرها لاستخدام البلازميدات فى الهندسة الوراثية هى **صغر الحجم** وهو يمنح البلازميدات عدة مميزات منها مقاومة التحطم اثناء عزلة وتداوله وادخاله الخلايا المراد تحويلها - **سريعة التضاعف** وبالتالي زيادة الجرعة الجينية - **تحتوى على موقع قطع مقيد واحد**



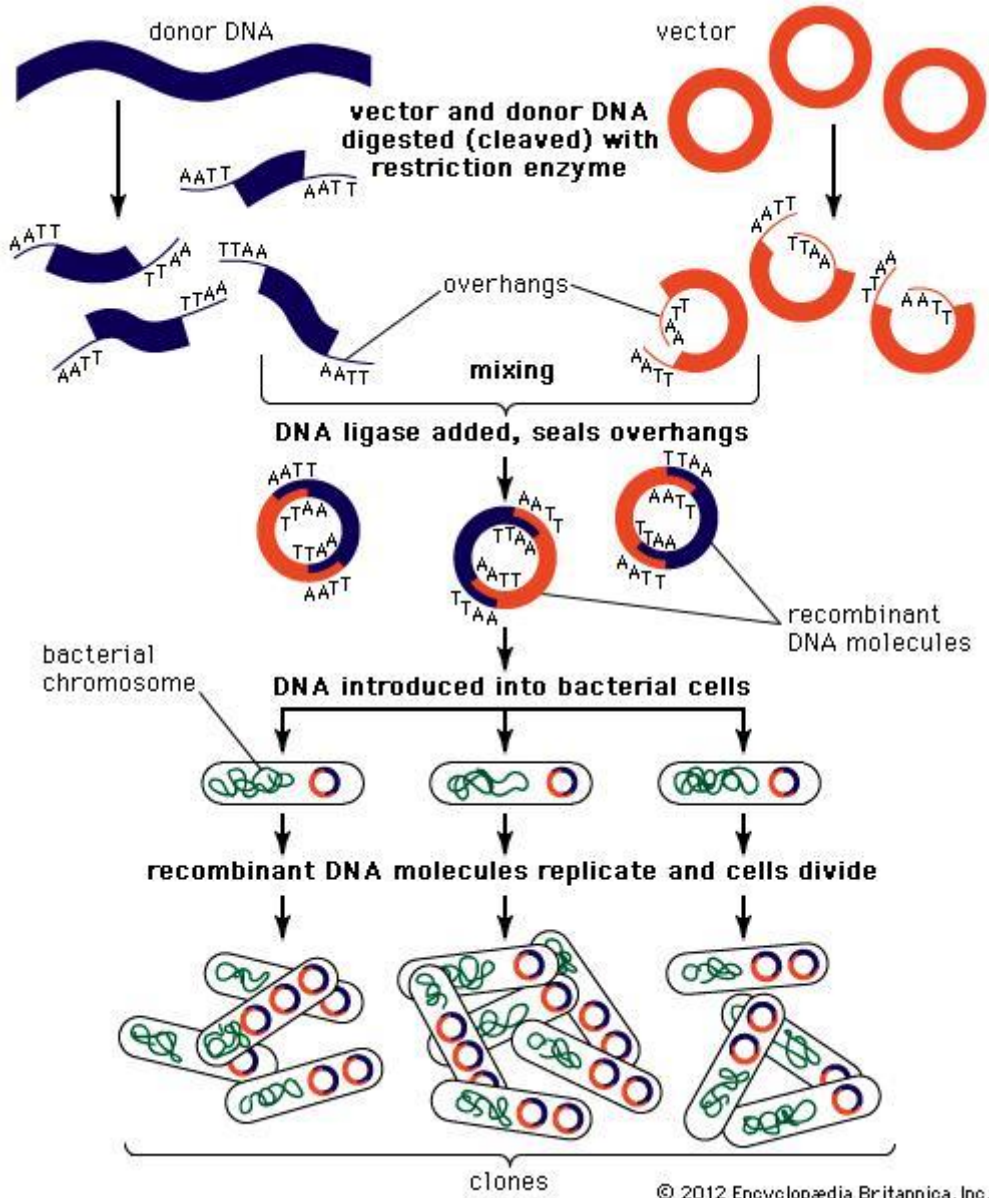
سادساً : ربط جزيئات الـ DNA لانتاج DNA معاد توليفة DNA recombinant

يستخدم فى عملية الربط انزيمات الـ DNA-ligase ويطلق عليها انزيمات الربط ligation او اللحام حيث تقوم بإنشاء رابطة فوسفاتية ثنائية الاستر بين الطرف 5 لشريط مفرد والطرف 3 لشريط مفرد اخر فتؤدى لربط الطرفين وتكوين شريط اطول من الـ DNA وحتى يحدث الربط بنجاح لابد من استخدام نفس إنزيم القطع المقيد وذلك لقطع الجين المرغوب وكذلك قطع البلازميد وذلك حتى تكون القواعد النيتروجينية فى اماكن القطع المقيد

للجين والبلازميد مكملتها لبعضها ، وبالتالي يصبح هناك على جانبي منطقة الالتحام ثغرتين يتم لصقهما بإنزيم DNA ligase لتكوين جزئ ds DNA اجتمعت فيه قطعتين مختلفتين اى DNA recombinant

سابعاً : ادخال الـ DNA المعاد توليفة r DNA الى خلية مناسبة (التحول الوراثي)

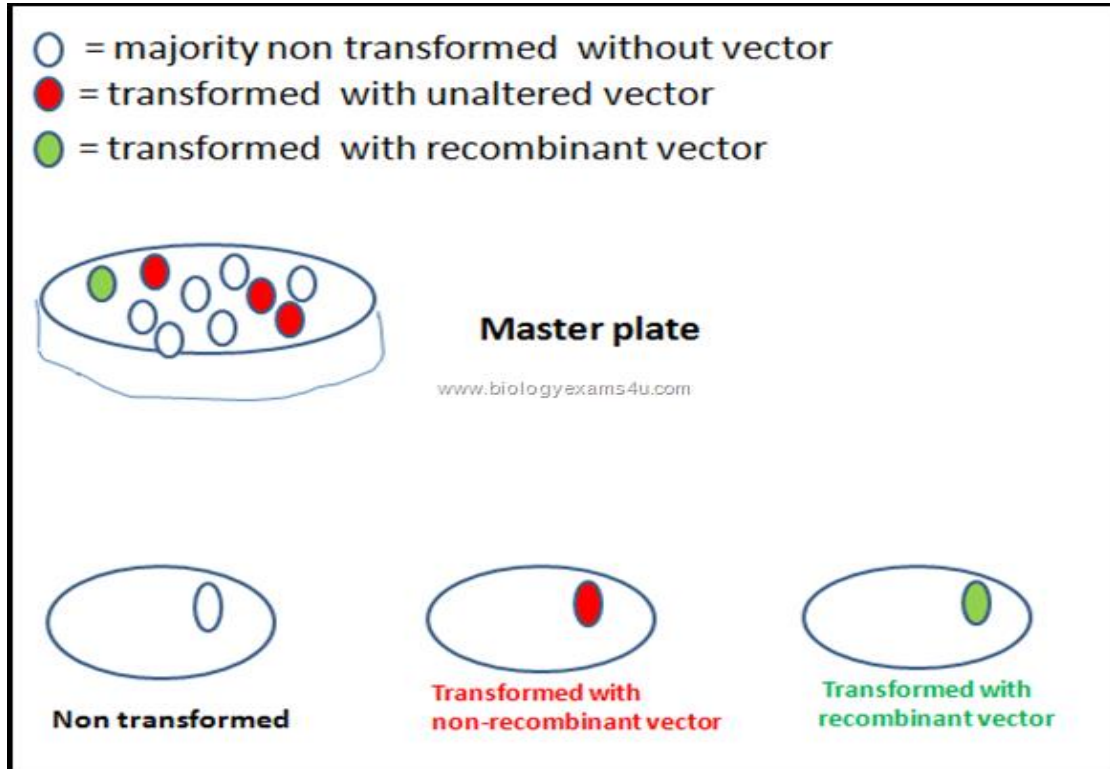
تعتبر البكتريا *E. coli* الكائن المفضل للاكثار الجيني ولابد من معاملة الخلايا بأيونات الكالسيوم في درجة حرارة منخفضة حتى تكتسب الـ r DNA من البيئة المحيطة بها وفيما يلي خطوات ربط جزئين DNA مختلفين لانتاج الـ r DNA وادخاله في خلية بكتيرية لانتاج خلايا محولة transformant cells يتم انتخابها على بيئة انتخابية مناسبة



ثامناً : انتخاب الخلايا التي اكتسبت البلازميد المعاد توليفة

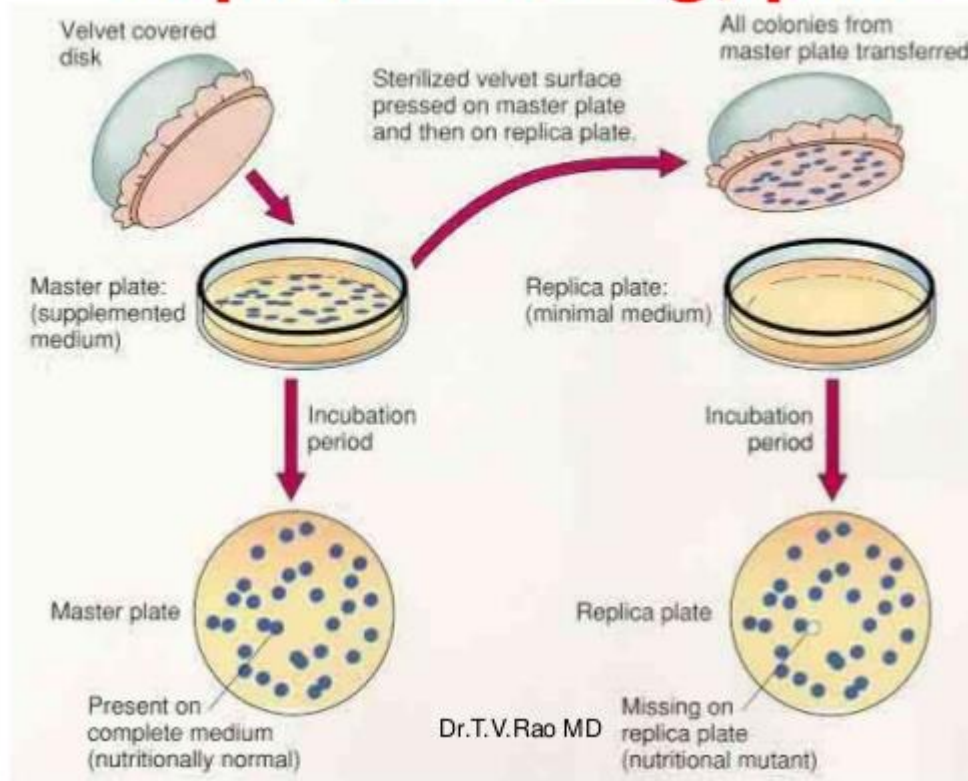
يتم انتخاب الخلايا التي اكتسبت البلازميد المعاد توليفة بعدة طرق منها مايلي :-

- 1- استخدام بلازميد به جينان يتحكمان في صفتان مظهريتان او فسيولوجيتان يسهل التعرف عليهما ويحتوى احدهما على موقع قطع مقيد يمكن ادخال الجين المرغوب فيه وتفقد الصفة التي يتحكم فيها هذا الموقع الجيني ، كما في البلازميد المحتوى على جينين لمقاومة المضادات الحيوية احدهما لمقاومة الامبسلين والآخر لمقاومة التتراسيكلين والذي يحتوى على موقع قطع مقيد لإنزيم Bam HI وعند ادخال جين ما في موقع القطع المقيد بالبلازميد في جين مقاومة التتراسيكلين مما يؤدي لفقد الخلية البكتيرية صفة المقاومة للتتراسيكلين ويصبح مقاوماً للامبسلين فقط ، وعند تعريض الخلايا البكتيرية للمضادين الحيويين يصبح هناك ثلاث انواع من الخلايا هي كالاتي :
 - خلايا حساسة للمضادين الحيويين وهي لم تكتسب اى DNA ولاحتوى على اى بلازميد
 - خلايا مقاومة للمضادين الحيويين وهي اكتسبت DNA غير معاد توليفة
 - خلايا حساسة للتتراسيكلين ومقاومة للامبسلين وهي التي اكتسبت ال DNA المعاد توليفة



والخلايا التي اكتسبت الـ DNA المعاد توليفة وهي غير مقاومة للتتراسيكلين وقد يكون معها خلايا بها بلازميد غير معاد توليفة مثل البلازميد الاصلى وهي مقاومة للتتراسيكلين ولا بد من الحصول على خلايا تحتوى على البلازميد المعاد توليفة فقط والغير مقاومة للتتراسيكلين والمقاومة للامبسيلين ولذلك تجرى طريقة طبع الاطباق حيث يتم طبع نسخة مطابقة للمستعمرات النامية على بيئة الامبسيلين على طبق بة بيئة محتوية على التتراسيكلين باستخدام قطعة قطيفة معقمة والخلايا التي ستنمو لابد من احتوائها على جين المقاومة للتتراسيكلين كاملاً بدون ادخال الجين المرغوب فيه وهذه الخلايا تستبعد من الطبق الاصلى وتؤخذ الخلايا التي لم تنمو على بيئة التتراسيكلين حيث انها تحتوى فقط على البلازميد المحتوى على الجين المرغوب

Replica Plating, pt. 2



2- استخدام بلازميد بة صفة واحدة وموقع تضاعف وموقع قيد مقيد لسهولة تتبع البلازميد من خلال هذه الصفة

إدخال الجين المرغوب الى الخلية النباتية

هناك عدة طرق لإدخال الجين المرغوب وبعض هذه الطرق لا يعتمد على استعمال حامل للجينات والبعض الآخر يعتمد على حوامل الجينات كما يلي :-

أولاً: الطرق التي لا تعتمد على حوامل جينية:

1- طريقة Polyethylene glycol (PEG)

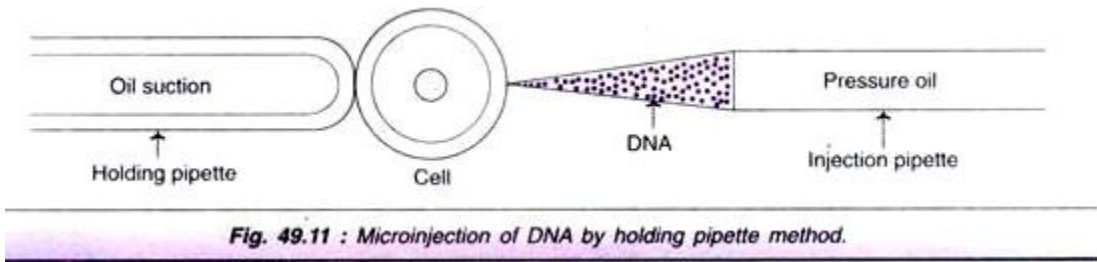
وهي من أسهل الطرق لإدخال الـ DNA للخلايا بعد نزع جدارها وتحويلها الى بروتوبلاست حيث يحضن خليط البروتوبلاست مع الجين المرغوب على درجة حرارة الغرفة / 10 ق ثم يضاف الى الخليط تركيزات من PEG وايونات الكالسيوم لتجميع البروتوبلاست وزيادة نفاذية غشائها البلازمي للـ DNA ودخوله اليها وتحويلها وراثياً

2- طريقة الادمصاص على دقائق راسب فوسفات الكالسيوم

من أسهل وأرخص الطرق حيث يتم ادمصاص قطع الـ DNA على سطح دقائق راسب فوسفات الكالسيوم بإضافة كلوريد الكالسيوم الى الـ DNA الموجود في منظم فوسفاتي فتتفاعل ايونات الكالسيوم والفوسفات ويتكون راسب فوسفات الكالسيوم يدمص على سطح دقائق قطع الـ DNA ثم تضاف هذه الدقائق الى بروتوبلاست الخلايا فتلتصق بها الا ان هذه الطريقة لاتصلح للخلايا اليمفاوية

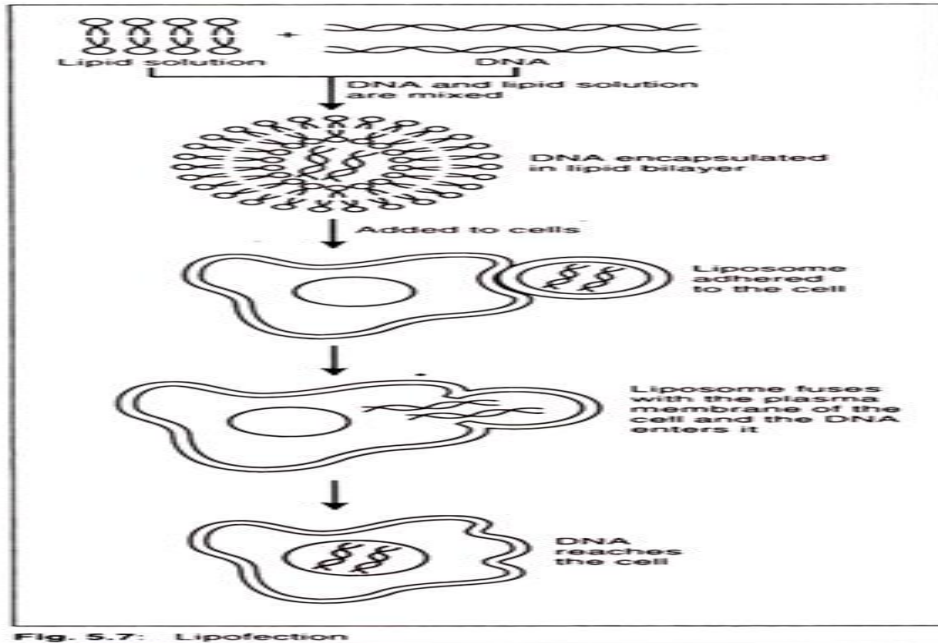
3- طريقة الحقن الدقيق Microinjection

وتستعمل فيها اجهزة التداول الدقيقة لحقن الـ DNA داخل نواة الخلية باستخدام انبوبة زجاجية دقيقة كما بالشكل



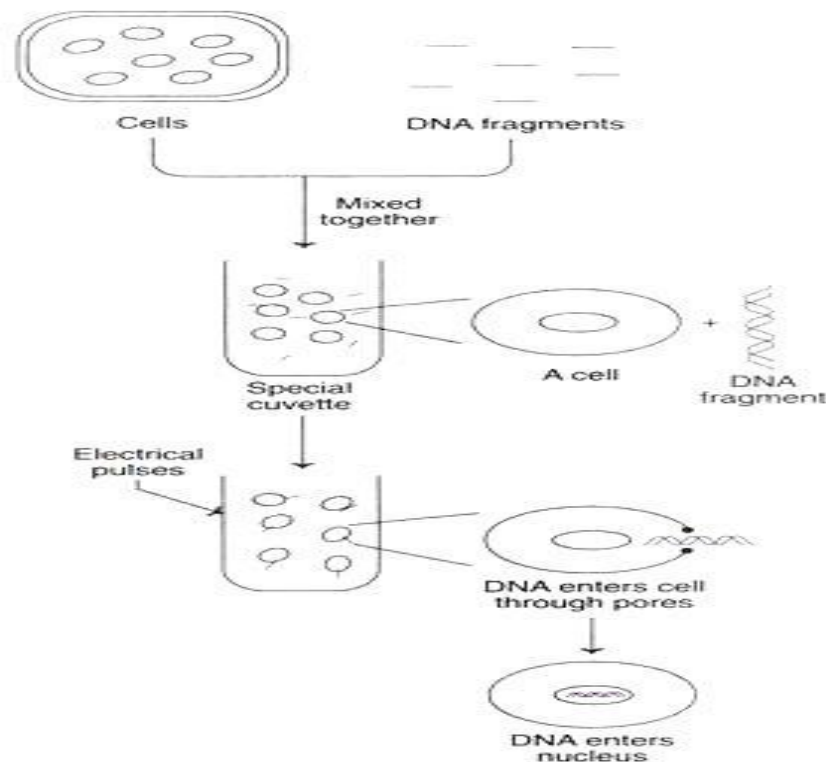
4- طريقة التعبئة داخل حويصلات دهنية Liposomes

يتم تعبئة قطع الـ DNA داخل حويصلات دهنية ثم تخطط الحويصلات مع الخلايا المراد تحويلها فيندمج غشائها الدهني مع الغشاء البلازمي وتفرغ الـ DNA داخل السيتوبلازم بالخلية مباشرة كما بالشكل التالي



5- طريقة التثقيب الكهربائي Electroporation

يتم خلط قطع الـ DNA مع الخلايا المراد تحويلها ثم تعرض الخلايا الى نبضات كهربائية لفترات قصيرة حيث تقوم النبضات بإحداث ثغوب في الأغشية البلازمية وتدخل قطع الـ DNA الى السيتوبلازم مباشرة كما بالشكل الاتي



6- طريقة مدفع اطلاق الدقائق

يتم قذف الخلايا المراد تحويلها بدقائق من الذهب او التنجستين مدمص على سطحها قطع الـ DNA حيث يوضع معلق الخلايا او النسيج النباتي امام الفتحة الدقيقة للماسورة الامامية للمدفع كما بالشكل الاتي :

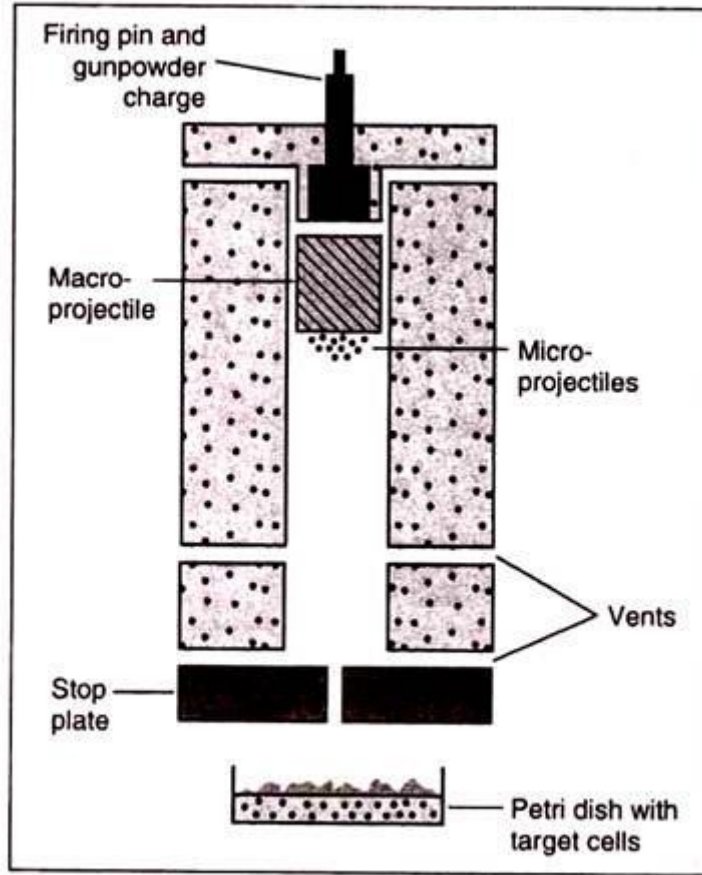


Fig. 5.9: Biolistic particle delivery system

ثانياً: الطرق التي تعتمد على حامل بيولوجي

قد يكون هذا الحامل الجيني البيولوجي فيروس مثل فيروس موزايك القنبيط او بلازميد مثل Ti-plasmid الموجود ببكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وهي تتبع عائلة Rhizobiaceae ويتبعها ايضاً الجنس *Rhizobium* المسبب لتكوين العقد الجذرية في النباتات البقولية وتعيش البكتريا *A. tumefaciens* في التربة وتحتوى على كروموسوم دائري بكتيري كبير الحجم وكروموسوم اخر مستقيم كما تحتوى على كروموسوم دائري صغير يمثل بلازميد غير معروف الوظيفة كما يوجد ايضاً كروموسوم دائري صغير جداً يعرف بالبلازميد Ti-plasmid وهو الكروموسوم الاهم من الاربعة كروموسومات حيث يحمل منطقة الـ T-

DNA المسؤولة عن حدوث السرطان في النبات ، والبكتريا التي تحتوى على البلازميد تكون قادرة على احداث اورام سرطانية Tumour-inducing plasmid اى ان البلازميد هو المسبب للورم Ti-plasmid

العلاقة المرضية بين البكتريا وظهور المرض في النبات

ثبت ان بكتريا *A.tumefaciens* طفيل جرحى اى انه يستلزم وجود جرح حديث حتى تستطيع احداث المرض وتظهر الخلايا فى مكان الجرح خلال يومين والخلايا المجروحة للنباتات القابلة للإصابة تقوم بافراز مركبات فينولية خاصة الا أن الخلايا المجروحة فى النباتات احادية الفلقة لاتفرز هذه المركبات فهى تكون مقاومة للإصابة بالبكتريا ، وغالباً ما تحدث الإصابة فى منطقة التاج عند اتصال الجذر بالساق فتدخل البكتريا وتلتصق بالجدار الخلوى لاحد الخلايا وتنتقل نسخة من منطقة T-DNA المحمولة على ال Ti-plasmid من الخلية البكتيرية الى احد الخلايا وتمر نسخة ال T-DNA الى السيتوبلازم لتدخل النواة وتستقر فيها وتندمج مع DNA احد كروموسومات الخلية وتحولة الى خلية سرطانية فيما يعرف بعملية التحول الوراثى ثم تزداد الخلية فى الحجم ومعدل الانقسام ويتكون النسيج السرطانى وهو يختلف عن النسيج النباتى السليم فى عدد من الصفات الفسيولوجية والبيوكيميائية منها مايلي:

- 1- تتحول انسجة الورم الى مصنع لتخليق الهرمونات النباتية مثل اندول حامض الخليك والسيوتوكينين ويمكن زراعة هذه الانسجة دون اضافة هرمونات نمو اليها
- 2- نظراً لقدرتها على تصنيع الهرمونات النباتية فيمكن تطعيمها على نسيج نباتى سليم فتدفعه للنمو
- 3- تصبح خلايا الورم قادرة على تخليق احماض امينية شاذة مثل الاوكتوبين والنوبالين
- 4- عند تنمية هذه الانسجة على بيئة زراعة الانسجة فانها تورث الصفات السابقة للنموات التى تنشأ منها

خطوات استخدام ال Ti-plasmid لانتاج نباتات محولة وراثياً transgenic plants

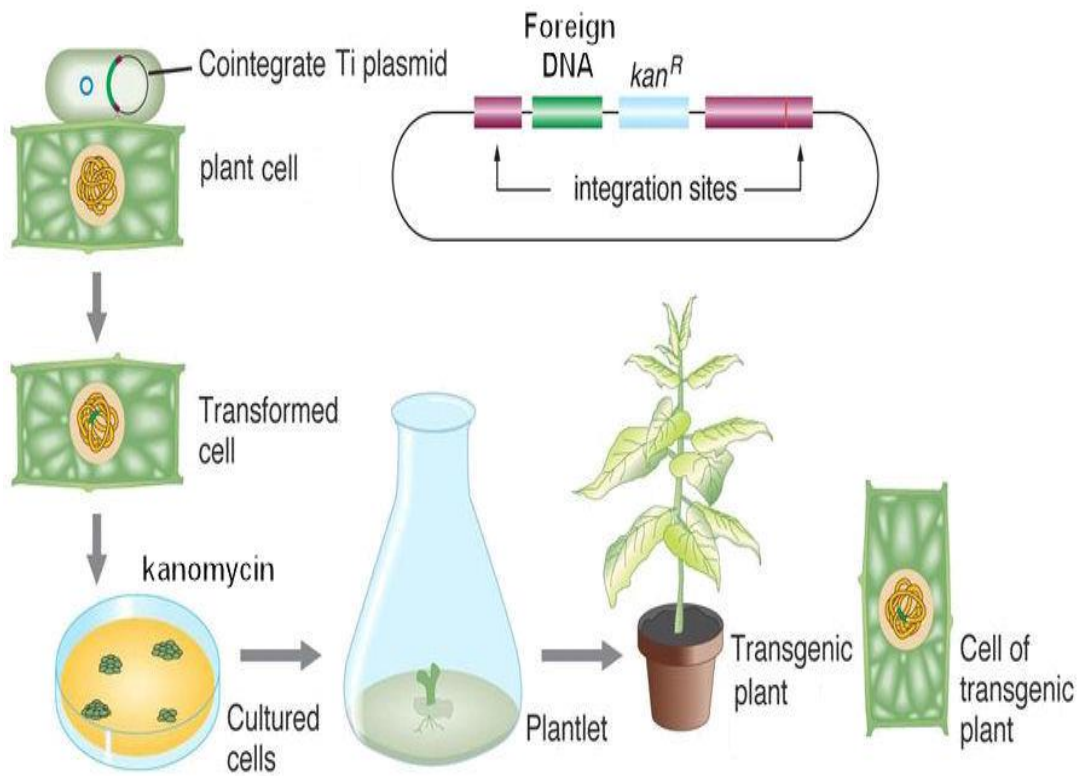
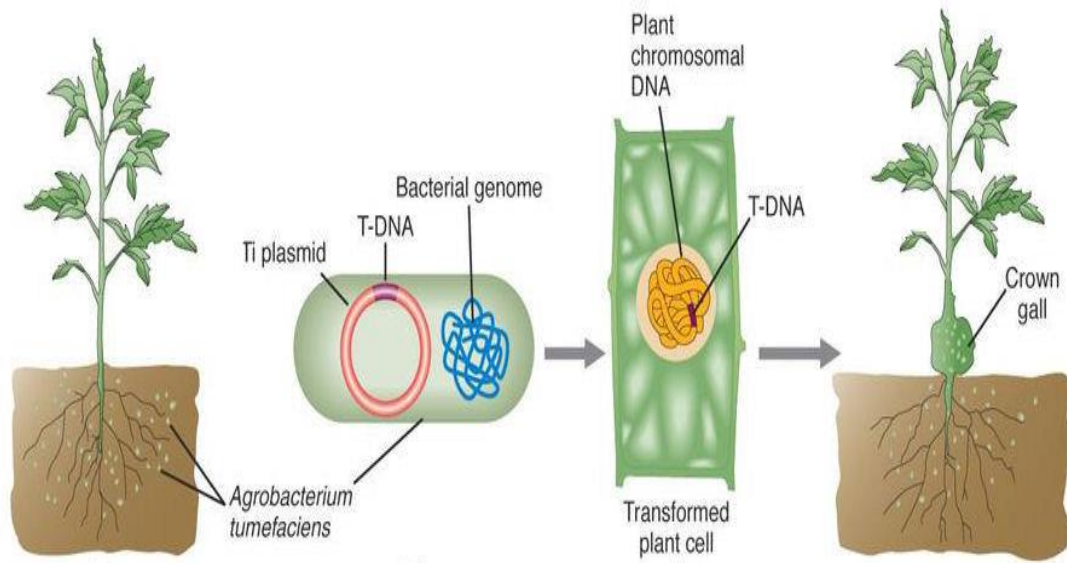
- 1- عزل الجين المرغوب من مصدرة وعزل ال Ti-plasmid من بكتريا *A.tumefaciens*
- 2- نزع منطقة T-DNA المحتوية على جينات احداث الورم والتى تقوم بتخليق الهرمونات النباتية فينتج بلازميد غير قادر على احداث الورم

3- ادخال الجين المرغوب في منطقة ال T-DNA الموجودة على ال Ti-plasmid والحصول على ال recombinant Ti-plasmid معاد توليفة ومنزوع ال T-DNA

4- ادخال ال Ti-plasmid المعاد توليفة والحامل للجين المرغوب الى البكتيريا *A. tumefaciens* لانتاج سلالة تحمل الجين وغير قادرة على احداث الورم ثم تجرى عدوى بهذه البكتريا للنبات المراد تحويله وراثياً حتى ينتقل الية ال T-DNA بما يحمله من جين مرغوب من البكتريا الى الخلايا المراد تحويلها

للتأكد من ان البلازميد يعمل في الخلايا النباتية التى دخلها يتم ربط الجين المرغوب بجين اخر مسئول عن صفة المقاومة لمرض ما يعرف الجين الدليل بحيث يمكن الكشف عن هذا الجين فيما بعد فى النبات الكامل الذى تم تعديله وراثياً وذلك بإجراء عدوى صناعية بالمرض المسئول عن مقاومة الجين الدليل فإذا كان النبات مقاوماً للمرض دل ذلك على ان حدوث التعبير الجينى للجين المرغوب والجين الدليل بنجاح .

والشكل التالى يوضح خطوات استخدام ال Ti-plasmid لانتاج نباتات محولة وراثياً



المراجع

- 1- البحر ، محمد كمال وآخرون – التكنولوجيا الحيوية النباتية 1999 – الشركة العربية للنشر والتوزيع
- 2- البرقوقي ، محمود هاشم – زراعة الخلايا والأنسجة والأعضاء 1994 – دار عثمان للكمبيوتر وطباعة الأوفست
- 3- الجمل ، عبد الباسط - الجينوم والهندسة الوراثية 2001 – دار الفكر العربي
- 4- حسن ، احمد عبد المنعم – التكنولوجيا الحيوية وتربية النبات 2004 – دار الوفاء لدنيا الطباعة والنشر
- 5- حسن ، عبد المنعم صادق - تكنولوجيا الجينات 2004 – مكتبة أوزوريس
- 6- الرفاعي ، عبد الرحيم توفيق – زراعة الأنسجة والاكثار الدقيق 2007 – المكتبة المصرية للطباعة والنشر والتوزيع
- 7- عبد العال ، زيدان السيد – التكنولوجيا الحيوية وآفاق القرن الحادي والعشرين 1997 – منشأة المعارف بالإسكندرية
- 8- العبيدي ، احمد – الاكثار الدقيق وزراعة الأنسجة النباتية 2002 – دار الفكر العربي
- 9- فهمي ، جلال محمد فكرى – زراعة الأنسجة النباتية 2003 – دار الكتب العلمية للنشر والتوزيع
- 10- كيت ، ليديان – نباتات من أنابيب الاختبار 2000 – دار الفكر للطباعة والنشر والتوزيع
- 11- مصطفى ، يحيى عبد السميع وآخرون – التقنية الحيوية 2009 – مكتبة بستان المعرفة