(تقانات حياتية)

مقدمة

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

كمال بنيامين ايشو

جامعة الموصل/ كلية الزراعة والغابات

قسم البستنة وهندسة الحدائق

٢٠٢١/٢٠٢٢

بدا الإنسان خلال فترة الستينات والسبعينات من القرن الماضي في استخدام بعض مكونات الخلية في التطبيقات الحيوية مما طور مفهوم التقنية الحيوية Biotechnology إلى التطبيقات المتخصصة جدا ، فبذلك نشأت عدة تباينات في إعطاء تعريف لهذا العلم بين المدارس العلمية المختلفة فبذلك صار لهذا العلم عدة تعريف منها

نجد في المجتمع العلمي **البريطاني** يعطي تعريف لها ((بان التقنية الحيوية هي مجموعة من التطبيقات الحيوية والأنظمة ومراحل الإنتاج التصنيعية))

أما في **اليابان** يقصد بها ((تقنية تستخدم الظواهر الحيوية لنسخ وإنتاج منتجات حيوية مفيدة))

وفي **أمريكا** ((بأنها استخدام منظم للأحياء مثل الكائنات الحية الدقيقة أو المكونات الحيوية لأغراض مفيدة))

وهناك تعريف أخر لهذا العلم في **أوربا** ((فهي الاستخدام المتداخل لعلوم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة والهندسة للوصول إلى تطبيقات صناعية من الأحياء الدقيقة وزراعة الأنسجة النباتية والحيوانية أو أجزاء منها))

فكلمة Biotechnology مكونة من مقطعين الأول Bio- هذه مشتقة من كلمة اللاتينية " Bios " التي تعني الحياة (Life) ، أما المقطع الثاني (Technology) الذي يعني الطريقة المنظمة لعمل الأشياء Systematic methodology

ويقصد بالتقنات الحيوية بصورة عامة بأنها ((أية تطبيقات تكنولوجية تستخدم النظم البايولوجية والكائنات الحية أو مشتقاتها لصنع أو تحوير المنتجات أو العمليات من اجل استخدامات معينة))

ما هي التقانات الحيوية What is biotechnology

إن التقانات الحياتية هي تطبيق معلوماتي الصناعي للتكنولوجيات التي يتم تطويرها أو استخدامها في العلوم البايولوجية وخصوصا تلك التي لها علاقة وطيدة بالهندسة الوراثية Genetic engineering ، وهناك اتفاق تام وشامل بين جميع الخبراء في هذا المجال على ان العالم على حافة ثورة في هذا الحقل . كما تتمتع التطورات في مجال التقانات الحيوية بقدرات هائلة على رفاهية ورخاء الإنسانية ، مثلا من خلال إنتاج لقاحات لأمراض لم يكن لها علاج من قبل ، وكذلك زيادة إنتاج الغذاء ، والوقاية من أمراض أو تشوهات وراثية عديدة في الكائنات الحية . وتحمل ثورة التقنيات الحيوية إلى جانب فوائدها إمكانات هائلة إلى سوء الاستخدام أيضا والتي قد يدمر كرة الأرضية ويقضي على الحياة أيضا .

تتشابه تقانات الهندسة الوراثية مع وسائل تربية النبات والحيوان التقليدية اذ كلا منها يهدف إلى التحسين الوراثي لسلالات النبات والحيوان والكائنات الدقيقة ،لكن **الفرق بين الاثنين يكون في ثلاث محاور وهي :**

مدى التحسين الوراثي

دقة الأداء والمتابعة

عنصر الوقت

- **التحوير الوراثي Genetic Modification**

أن التحوير الوراثي هو أي تغيير يحدث في المادة الوراثية الأصلية أما بصورة طبيعية أو بالتدخل البشري وهذا الأخير يكون أما بصورة وبطرق تقليدية كما في تزاوج أو تهجين أو تضريب سلالات نقية أو أنواع أو أصناف لمزج وخلط الصفات أو استخدام الأشعة أو باستخدام التقانات الحيوية الحديثة ، وتنتقل الصفات الوراثية من جيل الآباء إلى الأبناء من خلال التزاوج الطبيعي ، الذي قد يصاحبه حصول طفرات التي تحدث بشكل طبيعي بسبب الأشعة فوق البنفسجية UV التي تسبب تلفا للمادة الوراثية أو بعض العوامل الكيميائية وغيرها من الأسباب ، يحدث في الكائنات الحية أليات يتم من خلالها استبدال أو انتقال أجزاء من المادة الوراثية من الكروموسوم إلى أخر تسبب وتنتج تحويرا في الكائن الحي ، وهذه العملية تحدث أحيانا بشكل دقيق ومدروس وأحيانا بطريقة عشوائية (أن صح التعبير) ... هذه العملية تسمى باعادة ترتيب أو التوليف وينتج عن ذلك تباينات في الصفات جديدة عن صفات الجيل السابق .

لقد اقتصر التدخل البشري سابقا في عملية التحوير الوراثي بالطرق التقليدية الكلاسيكية التي تكون متمثلة بشكل أساسي في التزواج أو التهجين بين سلالات أو أنواع أو أصناف من النباتات لإنتاج نباتات جديدة ذات توليفة حديثة من الصفات المرغوبة Recombination of modern traits ..أما الطريقة الثانية والأكثر حداثة هي في تعريض النبات إلى موجات من الأشعة لأحداث طفرات بشكل عشوائي وبعد ذلك يتم اختيار Selection (انتخاب) النباتات المحورة ذات الصفات المرغوبة ،أن التحوير الوراثي وعن طريق استخدام التقانات الحياتية الحديثة يعتمد بشكل أساسي على تقنية توليف أو أعادة توليف المادة الوراثية DNA Recombination والتي يمكن تعريفها بأنها نوع من الحياكة الحيوية لربط صفات كائنات بأخرى ..

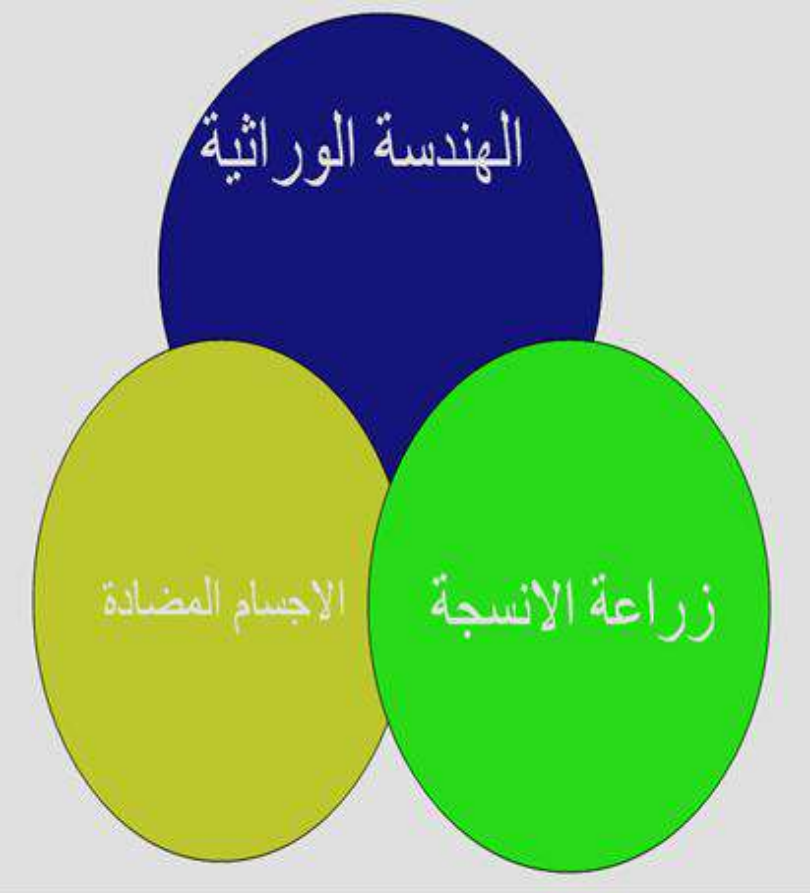
وعند تحوير النبات بالطرق الحديثة تعتمد على الخطوات التالية :

- تحديد الصفات المطلوبة Gene identification
- تحديد الموروثات ومضاعفتها Gene amplification
- عزل الموروثات وتحويرها Gene isolation
- ربطها بحامل وراثي مناسب Gene recombination
- مضاعفة الموروثات وتنقيتها وفحصها Gene purification and testing
- زرع الصفات في الكائن المضيف Gene cloning
- التأكد من وجود الصفة وجودة المنتج (التعبير الجيني) Gene expression
- وأن التحور الجيني باستخدام التقانات الحياتية يتميز بالخصائص التالية :
- التخصص والدقة : يمكن اختيار الصفة المطلوبة وتجنب الصفات الغير المرغوبة بمنتهى الدقة من بين ألاف الصفات التي يمتلكها النبات أو الكائن الحي
- السرعة : يمكن تثبيت الصفة المرغوبة في جيل واحد أما في الطرق التقليدية فيتطلب الامر عدة اجيال وتستغرق العملية عدة سنوات
- كسر الحواجز بين الأنواع: من المعلوم أن الطرق التقليدية تعتمد على التكاثر الجنسي ، أما في تكنولوجيا rDNA فيمكنها نقل جينات من نباتات إلى نباتات أخرى لا تتوافق معها جنسياً ، بل من حشرات أو حيوانات أو فيروسات أو بكتريا إلى نباتات كما حصل في محاصيل المقاومة للحشرات Bt crops حيث يتم نقل جينات البكتريا إلى النباتات .

المدخلات والمخرجات وتطبيقات التقانات الحيوية

- **Input and output application of biotechnologies**

يمكن اعتبار كل تقنية من التقانات الحيوية هي بدورها مجموعة من التقانات لذا يشاع ألان استخدام تعبير التقنيات الحيوية بدلا من التقنية الحيوية وفيما يلي إعطاء توضيح وشرح لأهم التقنيات في التطبيقات الحيوية (الحياتية) والشكل التالي يوضح تداخل هذه التقنيات مع بعضها البعض .



شكل (١) التقنيات المتداخلة في التقانة الحيوية

- **أهم المدخلات وتطبيقات في التقانة الحيوية**

أولا: الأجسام المضادة وحيدة النيوسيلة Monocional Antibodies

تستخدم في هذه التطبيقات خلايا الجهاز المناعي والتي تبنى الأجسام المضادة والتي تتميز بالقدرة التخصصية العالية جدا وبالتالي يمكن تحديد اكتشاف العناصر الحيوية بدقة ولو كانت بكميات ضئيلة جدا ، ومن تطبيقاتها تحديد وكشف الملوثات البيئية وكذلك الكشف على الكائنات الدقيقة الضارة في الغذاء

ثانيا : تقنية زراعة الأنسجة Tissue culture technology

يقصد بـــــها زراعة الخلايا فـــــي أنابيب أو أوعية وتحت الظروف المعقمة ومسيطر عليها In vitro وذلك في معامل خاصة أو مختبرات خاصة بزراعة الأنسجة ومن تطبيقاتها :

١)استخدام خلايا الثديية في الكشف على كفاءة الأدوية بدلا من الحيوانات مما يعكس الأمان والدقة .

٢)العلاج الخلوي

٣)أنتاج عقاقير النباتية من الخلايا مباشرة بدلا من النباتات

٤)إكثار وتضاعف الأنسجة النباتية في المعمل (مختبرات زراعة الأنسجة)

ثالثا : الاستنساخ (الاستنسال) Cloning

يقصد بهذه العملية هو إنتاج أعداد متطابقة وراثيا من الجزيئات والخلايا والحيوانات والنباتات وهذه تكون على ثلاث صور أو حالات وهي :

*الاستنساخ الجزيئي DNA cloning : وهو أساس علم البيولوجيا الجزيئية Molecular biology وهو من أهم تقانات الهندسة الوراثية التي تستهدف التطوير والإنتاج ، كما أن جميع التطبيقات الخاصة بإعادة توليف المادة الوراثية من البحث الأساسي إلى الإنتاج الدوائي تعتمد على هذه التقنية الحديثة .

*الاستنساخ الخلوي Cells cloning : يعد هذا المحور ذات دور مهم ومكمل للمحور السابق خاصة في أبحاث الأجسام المضادة وحيدة النيوسيلة ومن تطبيقاته :

*إكثار النباتات بزراعة الأنسجة المحورة وراثيا والأخرى غير محورة

*أنتاج الأدوية من الخلايا البشرية

*الاستنساخ (استنسال) الحيواني Animal cloning (Reproductive cloning) : هذا محور من أشهر نتاجه النعجة دولي التي أعطت خليقة جيدة لهذا الموضوع مع ان تطبيقاته أكثر تعقيدا وصعوبة

رابعا :التحوير الوراثي Transformation :

كان سابقا التحوير الوراثي ضمن نفس النوع والجنس في الكائن الحي ، وذلك من خلال التزواج والتلقيح ،لكن ألان فان التحوير الوراثي بحدث بنقل الجينات من نوع إلى أخر أو بتحوير نفس النوع **ومن تطبيقاته** :

- أنتاج الأدوية واللقاحات
- علاج بعض الأمراض الجينية
- زيادة الإنتاج الزراعي وتقليل الكلفة في ذلك
- زيادة قيمة المحتوى الغذائي في الطعام
- زيادة من محتوى المواد العطرية والطبية والزيوت التي تستخدم في الطب وصناعة العطور

خامسا: هندسة البروتينات Protein engineering

تعتمد هذه التقانة على مفهوم التحوير الوراثي من أجل إنتاج بروتينات محددة أو بروتينات جديدة لها استخدامات مفيدة مثل الأنزيمات والمحفزات الحيوية Biocatalysts

سادسا: تقانة الهجين Hybrid technology

لقد وجدنا أن التقانات السابقة تعتمد على الكائن الحي فقط ، لكن هذه فتحت أفاقا علمية جديدة من خلال استخدام المادة الوراثية وقدرتها على التعرف والالتصاق بالجزء المكمل أو المشابه لها وذلك من خلال ربطها بالعلوم والمعارف الأخرى **ومن هذه التطبيقات :**

*الكواشف الحيوية Biosensors : من خلال هذه التقنية التي تربط علم الأحياء بالالكترونيات الدقيقة Microelectronics من خلال ربط خلايا أو مضادات حيوية بموصلات ناقلة Transducer وهي تقنية ترصد عوامل بتركيزات دقيقة جدا وتحول الإشارة الحيوية الخاصة بارتباط المادة المطلوبة إلى إشارة رقمية تعكس الكمية الموجودة ومن تطبيقاتها :

*قياس محتوى الغذائي وجودته وسلامته

*مساعدة الأطباء لقياس مكونات محددة في الدم بشكل مباشر

*قياس الملوثات البيئية

*هندسة الأنسجة Tissue engineering : تربط هذه التقنية بين علم الخلية وعلم المواد لإنتاج أنسجة صناعية في المعامل مع دعاماتها Scaffolds ومن الأمثلة الناجحة لهذه التقنية بناء الجلد والغضاريف

رقائق المادة الوراثية DNA chip :

وهي تقنية تزاوج بين صناعة شبة الموصلات Semi conductive والجينات مما يمكن من تحليل عشرات الآلاف من الجينات في رقاقة واحدة لا تتجاوز مساحتها ١ سم مربع ، وتثبت على تلك المواقع تسلسلات لجينات معينة أو نيوكليوتيدات مصنعة ، ففي تقانة التهجين مع الـ DNA الذي يعود الى نسيج معين تظهر أنواع الجينات الفعالة في وقت قصير وتستخدم في تقانة البصمة الوراثية وفحص المطابقة للنباتات الناتجة من زراعة الأنسجة ، **ومن تطبيقاتها :**

١)الكشف على الطفرات في موروثات معينة

٢)قياس نشاط الموروثات

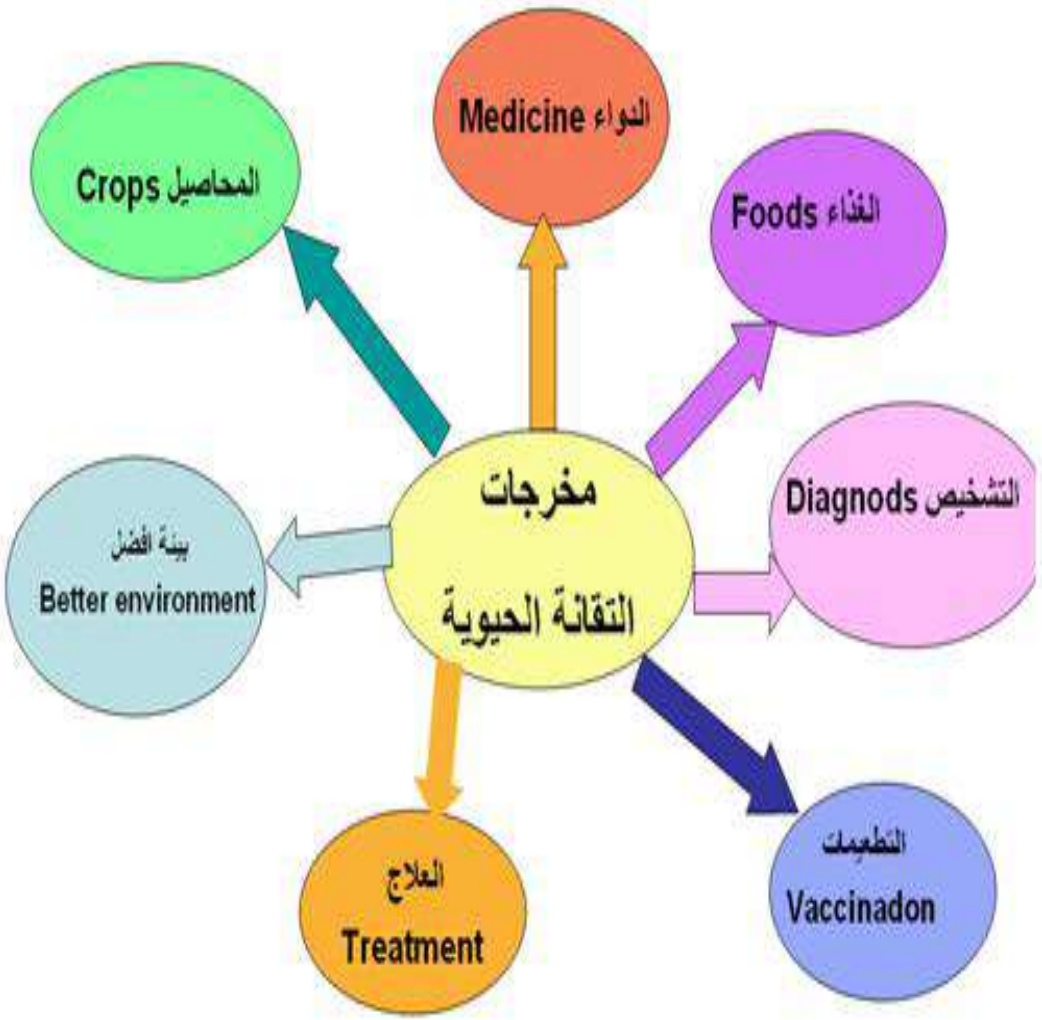
٣)تحديد الجينات الهامة لانتاج المحاصيل

٤)دراسة التسلسل البنائي للمادة الوراثية

المعلومات الحيوية Bioinformatics :

تربط هذه التقنية بين الحاسوب وبرامجه بالمادة الوراثية خاصة التحليل الإحصائي ،الرسم البياني ، المحاكاة وقواعد البيانات التي لها فائدة الكبيرة في تحليل الكم الهائل من المعلومات المستقاة من المادة الوراثية ، **ومن تطبيقاتها :**

- رسم الخرائط الوراثية وتحديد مواقع وعدد الجينات في كل خريطة
- تحديد شكل وبناء البروتينات
- محاكاة طريقة ترابط وعمل البروتينات
- اكتشاف أسباب ومواقع العلل الوراثية وتصميم العلاج المناسب لهذه التشوهات والعلل.



مخرجات التقانة الحيوية Biotechnology outputs

هنا يجب الإشارة إلى أن كثير من الباحثين والعاملين في هذا الحقل يخلطون بين مخرجاتها الحالية الفعلية والمخرجات المتوقعة مستقبلا من خلال التقارير العلمية والنشر العلمي مما جعل هنالك خلطا والتباسا قد أساء إلى هذا العلم في بعض الأحيان ،كما حدث عندما تمت تجربة استنسال النعجة دولي

٢- في مجال الاستخدامات الصناعية Industrial application

* تم أنتاج العديد من الكيمياويات بالاعتماد على التقانة الحيوية مثل الاسيتون وحامض الستريك والخليك ، واعتمدت بعض المنتجات الصناعية في السابق على المشتقات البترولية غير قابلة للتحلل مما أدى إلي تلوث البيئة وزيادة المخلفات الصلبة ، غير أن التقنيات الحيوية يمكن أن تسهم في تأمين بدائل أكثر عناية بالبيئة وذات علاقة بمجال المواد والطاقة ففي هذا المجال الصناعي فقد قدمت التقانة الحيوية الكثير من الخدمات منها

*إنتاج أنزيمات التبيض في صناعة الورق الذي يستخدم في الكتابة بديلا من استخدام الكلور السام

*إنتاج أنزيمات الخبز التي تحافظ عليه في حالة الطازجة لمدة طويلة

*إنتاج أنزيم الكيموسين الذي يستخدم في تصنيع الجبن بديلا عن انزيم الطبيعي الذي كان يؤخذ من معدة العجول الصغيرة

*إنتاج البروتين المضاد للتجميد من خلال الخميرة المعدلة وراثيا بالجين المشفر له والمعزول من نوع من الأسماك التي تعيش في القطب الشمالي واستخدامه في صناعة الايس كريم

*كما استخدمت التقانة الحيوية في صناعة المنظفات التي تحتوي على انزيمات لازالة البقع من الملابس

*استخدام الوقود الحيوي وكبديل أخضر للوقود الحفري وكمصدر للطاقة المتجددة

*إنتاج البلاستيك الحيوي الذي ينتج ميكروبيا والذي يمكن هدمه حيويا.

*ويوجد حاليا أكثر من ٤٥ أنزيما يعمل كمحفز حيوي في **مختلف التطبيقات الصناعية مثل**

@ الكربوهيدرات Carbohydrases

@ الأنزيمات المحللة للبروتينات Proteases

@ الأنزيمات المحللة للببتيدات Peptidases

@ الأنزيمات المحللة للبيدات Lipases

@ أنزيمات الأكسدة والاختزال Oxireductases

@ أنزيمات النقل Transferases

٣- تطبيقات مجال البيئة Environmental application

تستخدم بعض التقانات الحيوية في التخليص البيئة من الملوثات التي تكون عالقة فيها وان الكائنات المحورة التي تستخدم في هذا المجال يمكن أن تعيش بشكل طبيعي في البيئة الخاصة في الأماكن الملوثة وتقوم بدورها دون عناء يذكر أو كلفة اضافية ، ومن الامثلة على ذلك تخليص الكازولين من مادة (Methyl tertiary butyl ether , MTBE) وذلك باستخدام بكتريا خاصة لذلك ، وتستخدم التقانات الحيوية في التخلص من بقايا النفط في الخزانات النفطية في دول الخليج العربي ، وأيضا في تنظيف البحار من تلوث الذي يحصل فيها جراء تسرب النفط من الناقلات لأي سبب كان .

٤- استخدام في مجال الفضاء Space application

في عام ٢٠٠٠ ميلادية وقعت وكالة الفضاء الأمريكية NASA اتفاقية مع منظمة صناعة التقانة الحيوية ومعهد أبحاث السرطان الوطني ، اتفاق لاستخدام التقانة الحيوية في مجال اكتشاف الفضاء الخارجي وكذلك في أبحاث الجاذبية الدقيقة Micro-gravity .

٥- في حقل صحة الحيوان The field of animal health

استخدمت التقانة الحيوية لإنتاج عقاقير و أدوية مناسبة لعلاج الحيوانات خاصة الحيوانات التي تستخدم كموارد غذائية للإنسان

٦- الاستخدامات الأخرى Other application

كما استخدمت التقانة الحيوية في الحقول التالية

* الزراعة المائية Aquaculture
* البصمة الوراثية Finger printing
* الفحوصات الجنائية Crimes detection
* أثبات الأبوة Fatherhood examination
* علم الإنسان Anthropology
*الأسلحة البايولوجية Biological weapones
* في علم الآثار Histology
* في علم الأرض Geology

٦- التطبيقات في مجال الزراعي Agriculture application

يطلق مصطلح Green biotechnology على التقانات التي يتم تطبيقها في حقل الزراعي وتشمل هذه التقانات والتي تعمل على تطوير النبات والحيوان وايضا الاحياء المجهرية الدقيقة التي تستخدم في الاغراض الزراعية ، بسبب توفير الغذاء للانسان عن طريق زيادة الانتاج الزراعي العالمي لكي يتناسب مع الزيادة السكانية وبغية تحقيق هذا الهدف كان لابد من العمل في نفس الوقت على المستوى الافقي والعامودي ، اذا يكون الاتجاه الافقي من خلال زيادة في المساحة التي تزرع في العالم وخاصة الاراضي التي كانت متروكة أي الاراضي الحدية، والتي تركت بسبب الشد المائي الذي تعاني منه من خلال ايجاد أصناف من النباتات التي تقاوم وتتحمل الظروف الشد البيئية منها الملوحة والجفاف والغمر بالماء وايضا الملوثات بالعناصر الثقيلة .

تساهم التقانات الحيوية في مجال الزراعي من خلال الطرق التالية :

- استنباط أصناف من المحاصيل المقاومة لظروف الشد البيئي الاحيائي Biotic stress مثل مختلف الافات الزراعية كالامراض الفطرية والبكتيرية والفايروسية والاصابات الحشرية ، حيث تم إنتاج الكثير من النباتات المعدلة وراثيا منها الذرة وفول الصويا والقطن والتي تقاوم الاصابات الحشرية والفايروسية أو تقاوم مبيدات الحشائش مما يقلل من كمية المبيدات الكيميائية المستخدمة أثناء زراعة المحصول .
- أيجاد أصناف مقاومة لظروف الشد البيئي الاحيائية ،مثل الملوحة والجفاف ودرجات الحرارة المرتفعة والبرودة القاسية والصقيع
- تطوير نباتات ذات انتاجية عالية عن طريق زيادة كفاءة التركيب الضوئي وتقليل معدلات التنفس
- أستنباط أصناف من المحاصيل ذات كفاءة أعلى في أستخدام الاسمدة لتقليل الاسمدة المضافة وبالتالي تقليل كلفة الانتاج وتقليل من مخاطر تلوث البيئة
- أستنباط أصناف من النباتات الطبية ذات تراكيز عالية من المواد الكيميائية الفاعلة لعلاج الأمراض ، وهذا يساهم في تقليل الكثير من الضغوط السياسية التي تمارسها الدول الكبرى على بعض الدول والتدخل في استراتيجيتها الدوائية ، فعلى سبيل المثال انتاج الرز الذهبي الذي هو أحد المحاصيل المعدلة وراثيا والذي يوفر فيتامين A للانسان .

- **ومن أهم التطبيقات للتقانة الحيوية الحديثة في النباتات تقسم إلى**
- تطبيقات تهدف إلى تغيير الصفات والخصائص الأنتاجية للمحصول
- تغيير خصائص المنتجات النباتية
- أنتاج مركبات صيدلانية
- أنتاج فاكسينات نباتية
- فنجد التطبيقات للتقانات الحياتية في الخصائص المحصولية Agronomic traits : هو تحسين الصفات أو الخصائص المحصولية والتي يمكن أن تساعد على زيادة الانتاج بعدة طرق منها :
- زيادة كمية الغذاء التي ينتجها النبات الواحد
- تقليل الفقد في المحصول نتيجة الاصابة بالافات والامراض البكتيرية والفطرية والفايروسية أو الحشائش
- التغلب على الظروف البيئية القاسية لنمو النباتات

- ان التقانات التي أتبعها الباحثون في مجال تربية وتحسين النبات Plant breeding and improvements منذ البداية **ولحد الان يمكن تقسيمها إلى ثلاث مستويات وهي**
- **أولا : تقانات تحسين النبات على مستوى النبات ككل** Plant improvement techniques at whole plant level

عند استخدام التقانات التقليدية في هذا المجال قد تسبب:

فشل حالات التهجين أو التضريب ما بين الأنواع وخاصة الأنواع المتباعدة منها

يتم فيها نقل مجامع من الجينات في كل عملية تهجين والتي لا تكون جميعها مرغوبة بنقلها وقسم منها قد يؤدي إلى ظهور صفات غير جيدة

برامج التربية بهذه الطريقة تأخذ فترة زمنية طويلة وقد تستغرق العملية على الاقل ٧- ٨ أجيال بغية تثبيت صفة معينة وهذه تعد مكلفة وتسبب ضياع في الوقت

- **ثانيا : تقانات تحسين النبات على المستوى الخلوي** Plant improvement techniques at the cellular level

تشمل هذه التقانة أيضا زراعة الاجنة Embryo culture التي يمكن الحصول عن طريقها إلى نباتات من تضريبات أو تهجينات لا تعطي بذورا قابلة للانبات في الطبيعة كالتهجين بين الانواع والاجناس ، ومن اكثر التطبيقات الشائعة وذات أهمية في الوقت الحاضر هو دمج البروتوبلاست (خلية نباتية قد زيل منها الجدار الخلوي) وذلك لانتاج خلية هجينة تمتلك صفات كلا الخليتين الام

ثالثا: تقانات تحسين النبات على مستوى الجزئيي Plant improvement techniques at the molecular level

أن التطور الكبير الذي حصل في علم البايولوجيا الجزئية Molecular biology في السنوات الاخيرة قد وفر للعلماء القدرة على نقل الجينات من أي كان حي مثل نبات ، حيوان ، بكتيريا ، فايروسات ، وإدخالها إلى كائنات أخرى ، وبهذه الطريقة قد تجاوز العلماء حاجز النوع ، والكائن الذي يتم تغيير مادته الوراثية يسمى كائن محور وراثيا Genetically modified organisms (GMOs)، أن التقانة الهندسة الوراثية وفرت نقل جين واحد فقط وهو الجين المعني بالصفة المرغوبة بين النباتات وبالتالي وفرت الوقت وبشكل كبير جدا مما سهل مهمة مربي النبات في جهودهم وفتحت الأفاق الرحبة أمام عصر جديد يتم فيه أنتاج الأصناف المحسنة والمتفوقة لتوفير الغذاء

فوائد التقانات الحيوية Benefits of biotechnology

- لقد أصبح للتقانة الحيوية أهداف عظيمة تحقق بعضها وجاري العمل على وتيرة متصاعدة لتحقيق الباقي ولن تنتهي الطموحات التي فتحها هذا الجقل من العلوم لخدمة البشرية في كافة المجالات والتي نلخصها في التالي :

أولا : في مجال تطوير المحاصيل الزراعية

١- زيادة في إنتاجية النباتات Increasing yields of plants

- في هذا المجال :

*نباتات تقاوم الافات Pest-resistant plants :

*نباتات تتحمل مبيدات الحشائش Herbicide-tolerant plants

*نباتات تتحمل الظروف البيئية القاسية Hardier plants

*في حلة الجفاف والملوحة

*تحسين خواص المنتجات الغذائية Quality traits

- **أ-الرز الذهبي Colden rice**
- **ب- طماطة غنية بالليكوبين واخرى بالبيتاكاروتين**
- **ج- ذرة ومحاصيل زيتية غنية بفيتامين E**
- **د- زيوت صحية من فول الصويا Healthing soybean oil**
- **هـ - فاكهة وخضراوات طازجة دائما Fresher fruit and vegetable**
- **و - خس معدل بجينات العنب للوقاية من أمراض القلب والسرطان GM-Lettuce**
- **ز- نباتات ذات خصائص تغذوية فائقة Nutritious and specific nature of plant**
- **ح- أنتاج نباتات رباعية الكاربون مهندسة وراثيا Engineering C4 plants**

ثانيا :في مجال الانتاج الحيواني Field of animal production

تتمثل أهمية التقانة الحيوية في مجال الانتاج الحيواني بـــ :

- أنتاج حيوانات معدلة وراثيا ذات قدرة على مقاومة الامراض وخاصة الفايروسية مثل الارانب والاسماك والابقار .....
- المعالجة الجينية للحيوانات لزيادة سرعة نموها بتزويدها بالجين الخاص بهرمون النمو السريع وقد تم بالفعل أنتاج أعداد من حيوانات المزرعة سريعة النمو وكذلك زيادة قدرتها على أنتاج اللحم وتحسين خواصه وزيادة القدرة على أدرار اللبن
- أنتاج أغنام ذات صوف عالي الجودة
- تقسيم جنين الماشية والحصول على التوائم ثنائية وثلاثية ورباعية لزيادة الناتج من الثروة الحيوانية

ثالثا: في مجال التصنيع الزراعي Field agriculture industries

تتمثل اهمية التكنولوجيا الحيوية (التقانة) في الأتي :

*أنتاج الأنزيمات المستخدمة في صناعة الالبان

*أنتاج المبيدات الحيوية لمقاومة الكثير من الافات والحشرات الضارة

*أنتاج الهرمونات والانزيمات لتحويل النشا إلى سكر وانتاج عصير الذرة سكري

*أنتاج الصبغات الطبيعية ومكسبات النكهة والطعم والرائحة

*أنتاج لقاحات ضد الامراض التي تصيب الدواجن مثل النيوكاسيل والحمى القلاعية في الحيوان

*أستخدام الحيوانات والنباتات والبكتيريا كمصانع حيوية لتصنيع الدواء والبروتينات والهرمونات والانزيمات

*الاستفادة من مخلفات المزرعة وتحويلها إلى سماد عضوي ومخلفات الغابات من قلف ونشارة الخشب وكذلك من نفايات مصانع السكر وتحويلها إلى مواد تستخدم ثانية وذلك باستخدام بكتيريا المحورة وراثيا إلى بروتين يمكن تصنيعه في صناعات اللحوم وانتاج الغاز الحيوي من مخلفات المزرعة لاستتفاجة من بروتني شرس اللبن .

*أستنباط الطاقة من النفايات باستخدام بكتيريا تحول سليلوز إلى مواد عضوية نتروجينية واخرى تحول الاحماض العضوية إلى ميثان كذلك استخدام بكتيريا مثل *Zymononas mobilis* والتي تحول النشا إلى ايثانول .

رابعا : في مجال العلاج الطبي Field of medical therapy

- تتمثل أهمية التقانة الحيوية أو البايوتكنولوجي أو التقنيات الحيوية في مجال العلاج الطبي إلى :-

*أنتاج لقاحات ضد الامراض في الانسان مثل الملاريا

*نجح العلماء إلى تكوين بكتيريا تحتوي على جينات الانتروفيرونات البشرية Inter ferones وهي عبارة عن بروتينات تعمل على وقف تضاعف الفيروسات مثل المسببة للانفلونزا وشلل الاطفال وهي تنتج داخل جسم الانسان وتنطلق لمهاجمة الفيروس وهي قد تكون مفيدة في علاج الايدز والسرطان

*العلاج الجيني Gene therapy في عام ١٩٩٠ اجريت أول عملية أو تجربة للعلاج الجيني على الطفلة Ashanty dessilavia اذ قام فريق من العلماء الامريكيين بقيادة Frensh andersson ، هذه العملية فتحت أفاق كبير في هذا المجال الجديد في الطب والذي فتح باب الامل أمام مرضى بالعديد من الامراض الوراثية وخصوصا الميئوس منها بالعلاج . اذ كانت الطفلة تعاني من تقص جين أوموروث في أنزيم ADA وهو احد الأنزيمات المهمة لعمل الجهاز المناعي والذي يؤدي غيابه إلى فقد قدرة الجهاز المناعي عن العمل ، فبذلك يصبح الفل بدون جهاز مناعي ويموت قبل أن يبلغ الخامسة من العمر لكن هذا المرض غير معدي بالفيروس ، ويتم هذا العلاج الجيني من خلال أصلاح الجين المعاب من خلال تقنية الهندسة الوراثية واعادة حقنه مرة ثانية في خلايا نخاع العظام الام Stem cells mother بعد أن يحمل على DNA لنوع من الفياروسات غير الضارة وبذلك ينتج الجهاز المناعي ، وهذا الانزيم يعود مرة ثانية للعمل .

خامسا: مقاومة التلوث البيئي Environmental pollution control

تستخدم التقانة الحيوية في مجال مقاومة التلوث البيئي في :

*أنتاج بكتيريا محللة لفضلات مياة المجاري

*أنتاج بكتيريا لبروتينات تغلف المواد الضارة بالبيئة مثل مركب DDT

*أنتاج بكتيريا تقاوم التلوث البحري بالبترول باستخدام بكيتريا تفتت وتلتهم جزيئات البترول

*أنتاج بوليميرات تنتجها بكتريا Utter wfas تنقل إلى E.coil ثم إلى النبات هذا نوع من البلاستيك الحيوي يحتوي على البلاستيك العادي والذي يسهل تحلله فهو يكون أمنا بيئيا ، مكتشف هذا البلاستيك هو العالم Dokllass اذ وجد بكتيريا Utter لها القدرة على إنتاج مادة PHB البلاستيكية ثم جاء بعده العالم Kriss الذي هو عالم النبات في جامعة ميشيغان فقام بنقل جينات PHB ببكتيريا Utter إلى الشريط الوراثي لبعض نباتات العائلة الخردلية وهذه التقنية تعد خطوة هامة في صناعة البوليمرات اذ أمكن لتلك النباتات أنتاج مادة PHB البلاستيكية

*استخدام البكتيريا المحللة لمياه الري ليعاد استخدامها في ري الاشجار الخشبية

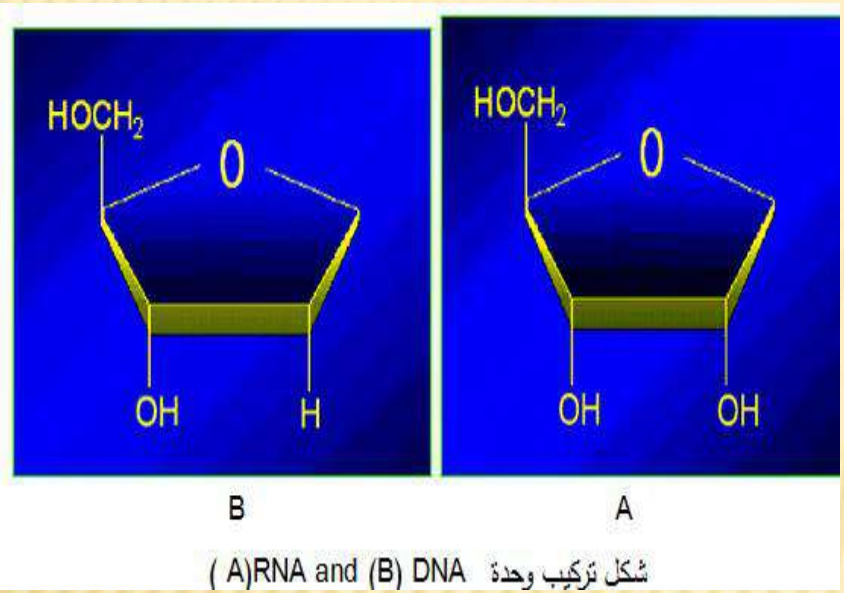
شكرا
لإصغائكم

الأحماض النووية THE NUCLEIC ACID

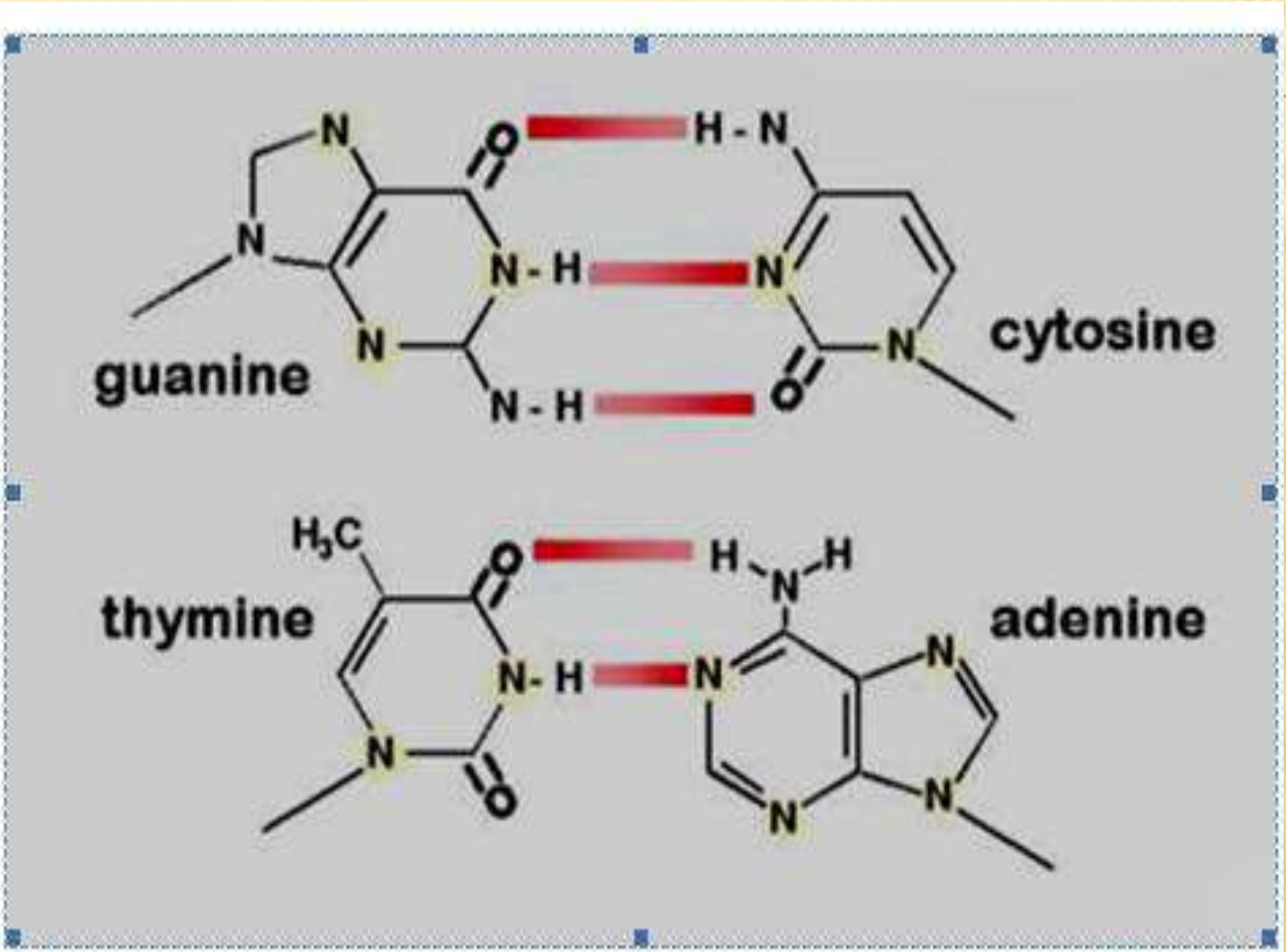
أعداد
أستاذ مساعد دكتور
كمال بنيامين ايشو
جامعة الموصل /كلية الزراعة والغابات
٢٠٢٢

كان الاعتقاد السائد قبل معرفة الحامض النووي DNA كمادة وراثية ، بان البروتينات هي المادة المسوؤلة عن وراثة الكائنات الحية بالرغم من أن هذه الأحماض كانت معروفة بصورة جيدة منذ عام ١٨٧١ ، ويرجع سبب الاهتمام بالبروتينات في ذلك الوقت إلى الخصائص التي كانت تمتلكها هذه البروتينات ، أذن البروتينات لها أهمية كبيرة في جميع الفعاليات الحية النشطة في الكائن الحي وتمتاز بخصائص وتركيب كيميائي خاص ،البروتين في كل الأحياء قاطبة يتكون من عشرين حامض أميني هذه الأبجدية محفوظة في الكائنات الحية منذ حوالي بليوني سنة ، فالبروتين هو عبارة عن جزيئة بوليمرية تتكون من شريط أو أكثر من عدد من الببتيدات ، وكل هذه الأشرطة مؤلفة من وحدات متكررة تدعى بالأحماض الاميينية تربط مع بعضها بأواصر ببتيدية .

- تركيب الأحماض النووية
- الأحماض النووية عبارة عن بوليمرات مؤلفة من وحدات متكررة تسمى النيوكليوتيدات ، وهذه الأحماض نوعان هما DNA الذي هو حامض نووي منقوص الاوكسجين ، والثاني هو RNA الذي هو الحامض النووي الرايبوزي وتتألف الوحدة الأساسية للحامض النووي من
- قاعدة نتروجينية
- سكر خماسي
- مجموعة فوسفات
- هنالك مجموعتان من القواعد النتروجينية هما
- البيرميدينات التي تتكون من حلقة سداسية منفردة وتمثل قواعد Thymine وCytocine و Uracil
- البورينات وهذه تتكون من حلقة سداسية مرتبطة مع حلقة خماسية وتضم هذه المجموعة قواعد Adenine و Guanine
- أما السكر الخماسي الذي يدخل في تركيب النيوكليوتيد فهو نوعان : الأول سكر خماسي منقوص الأوكسجين الموجود في الـ DNAإذ يحتوي على مجموعة واحدة من OH (الهيدروكسيل) مرتبطة مع ذرة كاربون الثالثة ، الثاني سكر خماسي ريبوزي الموجود في الـ RNA الذي يحتوي على مجموعتين من هيدروكسيل مرتبطيتين مع ذرة الكاربون الثانية والثالثة
- كما في الشكل



(A)RNA and (B) DNA شكل تركيب وحدة


guanine
cytosine
thymine
adenine

- **خواص الحامض النووى DNA**
- تمتص القواعد الآزوتية من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول ٢٦٠ نانوميتر (٢٦٠ nm) .
- عند تسخين الحمض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين الحلزونيتين الشكل تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال السلسلتين Melting. وبزيادة درجة الحرارة تزداد درجة الامتصاص النوعي ، وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال(Melting temperature Tm) للحمض النووي ، ولكل نوع من انواع الحمض النووي DNA درجة Tm خاصة به .
- ويمكن فصل سلسلتي الحمض النووي DNA عن بعضهما إذا انخفض رقم pH المحلول عن ٤ او اذا ارتفع عن ١١ . حيث أن الأحماض النووية عبارة عن الكتروليتات عديدة (Polyelectrolytes) مع وجود شحنة سالبة واحدة لكل وحدة نيوكليوتيدية (هذه الشحنة ناتجة عن تاين الفوسفات ثنائي الاستر) في نطاق pH من ٤ الى ١١ .
- عند إعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث إعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية Annealing .

- **الحامض النووي الرايبوزي RNA**
- عبارة عن خيط حلزوني ولا يوجد التحام أو الالتفاف بين خيط وأخر بالأواصر الهيدروجينية ، لكن نجد في بعض الحالات كما في (tRNA) فان القواعد في نفس الجزئ ترتبط بالأواصر الهيدروجينية لذا يبدو كخيط ملتف حول نفسه .
- **وهناك ثلاث أنواع من الحامض RNA وهي**
- ١- الحامض النووي الرايبوزي الناقل Transfer RNA (tRNA) : وهو اصغر الأنواع ويتكون من نيوكليوتيدات توجد على هيئة قاعدة وساق وفرعين أو ثلاثة فروع ينتهي كل منها بدائرة ، وتوجد روابط هيدروجينية تربط بين الأدنين واليوراسيل ، وبين السايتوسين والكوانين في كل من الساق والأفرع فقط ، أما القاعدة والدوائر في نهاية الافرع فلا توجد فيها روابط تربط بالجزء القمي الحامض الاميني عند الترجمة لتكوين البروتين
- ٢- الحامض النووي الرايبوزي الرسول Massenger RNA (mRNA) : وهو عبارة عن خيط كبير نسبيا يتغير وزنه الجزيئي حسب الجين المستنسخ ولا توجد أواصر هيدروجينية بين قواعدة
- ٣-الحامض النووي الرايبوزي الرايبوسومي Ribosomal RNA (rRNA) : هنالك عدة أنواع منه يدخل في تركيب الرايبوسوم ، كما توجد روابط هيدروجينية بين بعض قواعدة

- **وظائف المادة الوراثية**
- بعد أعادة اكتشاف قوانين Mendel في الوراثة في بداية القرن العشرين والتي تشير إلى أن الجينات هي المسؤولة عن نقل المعلومات الوراثية بين الانسال المتعاقبة ، فذلك توفرت المعلومات والبراهين على وجود الجينات وانتظامها على الكروموسومات ، وان قوانين Mendel تتفق كليا مع حركة الكروموسومات خلال أطوار الانقسام الأختزالي Meiosis ومراحل تكوين الكميتات الذكرية والأنثوية في الكائنات الحية ، لكن العلماء اهتموا بصورة كبيرة وزاد اهتمامهم حول طبيعة المادة الوراثية على المستوى الجزيئي وتركيبها الكيميائي ، **لذا يجب أن يكون للمادة الوراثية القدرة على انجاز الوظائف التالية**
- تكرار المادة الوراثية أي الوظيفة الوراثية ،أي على المادة الوراثية لها القدرة على خزن المعلومات الوراثية ونقلها بدقة من جيل إلى أخر
- التعبير الجيني أي وظيفة السيطرة على الشكل المظهري للكائن الحي Phenotype ، اذ تسيطر المادة الوراثية على الأنشطة الحيوية ومراحل تطور هذا الشكل المظهري للكائن الحي وذلك من خلال سيطرتها على توجيه عمليات النمو والتمييز للأنسجة وأعضاء الجسم التي تنشا من خلية الواحدة الخلية المخصبة .
- لها وظيفة التطور بالرغم من أهمية توفر الدقة في تكرار المادة الوراثية بغية الحفاظ على صفات النوع لذا يجب أن يكون هناك درجة محدودة من التغيير في المادة الوراثية (من خلال العبور Cross over و الطفرات Mutations) بحيث توفر حالة التنوع في التراكيب الوراثية Genotypes لمواجهة وتحمل التغيرات البيئية التي تعيش فيها الكائنات بغية تمكنها من التكيف والتأقلم مع هذه الظروف الجديدة .

- لقد تواصلت الدراسات لتحديد أي جزء من الحوامض النووية (DNA or RNA) يمثل المادة الوراثية ، فقد توفرت أدلة غير مباشرة والتي تشير إلى أن الـ DNA هي المادة الوراثية ومن هذه الأدلة :
- غالبية جزيئات الـ DNA الموجودة في الخلية هي على الكروموسومات ، لكن الـ RNA والبروتينات توجد أيضا في سايتوبلازم الخلية
- هنالك علاقة دقيقة بين كمية الـ DNA في الخلية وعدد مجاميع الكروموسومية في الخلية . فالكائنات الحية ثنائية المجموعة الكروموسومية (2n or 2x) تكون كمية الـ DNA في الخلايا الجسمية ضعف كميته في الخلايا التكاثرية (الكميتات المذكرة والمؤنثة) لنفس الكائن الحي
- تركيب الجزيئي للـ DNA يكون واحدا أو متشابها في جميع الخلايا المختلفة للكائن الحي ، لكن يكون تركيب الجزيئي للبروتينات والـ RNA مختلف بشكل كبير من طراز خلوي إلى الآخر مثلا الخلية العضلية تختلف عن خلية العصبية) وهكذا
- جزيئة الـ DNA هي أكثر استقرارا من جزيئات الـ RNA والبروتينات التي يجرى تصنيعها وانحلالها بسرعة في الكائن الحي ، وبما أن المادة الوراثية يجب أن تقوم بوظيفة خزن ونقل المعلومات الوراثية من الآباء إلى الانسال لذا نتوقع أن تكون ثابتة كما في الـ DNA

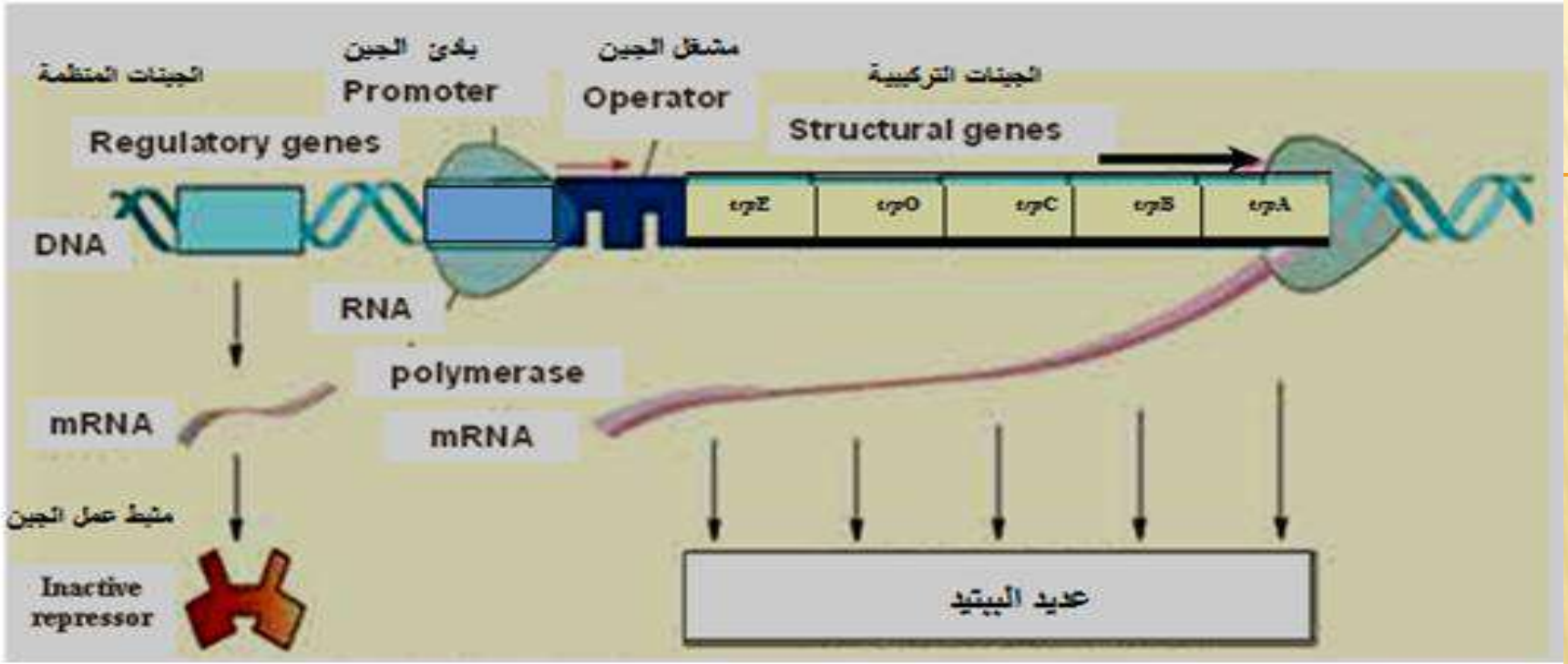
- **ترتيب وتنظيم الحامض النووي الـ DNA في الكائنات حقيقية النواة**
- يترتب الحامض النووي في الكائنات حقيقية النواة بطريقة دقيقة ومكثفة ، حيث يتوزع الـ DNA على مجموعة كاملة من الأجسام الطويلة والتي تسمى الكروموسومات والتي تقع داخل نواة متميزة محاطة بغشاء نووي بحيث يفصلها عن السايتوبلازم بصورة شبة تامة ،كما يمكن رؤية الكروموسومات خلال انقسام الخلية بينما تختفي في طور الراحة من الانقسام ، ويمكن رؤية خيوط الحامض النووي في هذا الطور تحت المجهر الالكتروني ، اذ تظهر بشكل خيوط رفيعة ذات مواقع منتفخة بحيث يشبه الخيط الواحد شكل المسبحة تسمى هذه المواقع بالـ Nucleosomes
- وتسمى الحالة التي توجد فيها الكروموسومات على هذه الهيئة بالكروماتين ، ويحاط الحامض النووي ببروتينات خاصة تسمى بالبروتينات Hesston وهي بروتينات قاعدية ذات شحنة موجبة في الوسط الحامضي المتعادل ، كما هناك نوع أخر من البروتينات تسمى بالبروتنيات الغير الهستونية Non-hesston وهي حامضية وذات شحنة سالبة في الوسط المتعادل ، وتم تمييز خمسة أنواع من الهستونات وهي (H1 , H2a , H2b , H3 , H4) وهي ثابتة في جميع الكائنات الحية تقريبا ، تترتب هذه الهستوانات بطريقة خاصة مع الحامض النووي مكونة مركب تركيبي معقد الذي يمثل الوحدة الاساسية للكروماتين يدعى بالـ Nucleosome كما في الشكل أعلاه . ويعتقد أن ترتيب وتركيب هذه Nucleosomes لها أهمية كبيرة في التعبير الجيني (الوراثي) . تختلف درجة تكثف الحامض النووي على الكروموسوم من منطقة إلى أخرى وتظهر المناطق المكثفة بشكل حزم واضحة غامقة وعند تلوين الكروموسومات فتبدو المناطق ذي الأقل كثافة كحزم فاتحة اللون ، وتدعى المناطق الكثيفة والشديدة الاصطباغ بالكروماتين المتباين Heterochromatin ، وتقع معظم الترددات غير المشفرة في الحامض النووي في هذه المناطق ، بينما تسمى المناطق الأقل كثافة واصطباغا بالكروماتين الحقيقي Euchromatin وتنتشر في هذه المناطق الموروثات التركيبية ذات القدرة على التعبير .

- **الجينات (الموروثات)** The Genes
- اكتشف مندل قوانين الوراثة عام ١٨٦٥ ميلادية ونشر ابحاثه في مجلة علمية في بلادة الام (نمسا) ، لكن كانت مجهولة لمعظم علماء الحياة إلى عام ١٩٠٢ عندما اعاد كل من De-Verse (في هولندا) و Goriness (في المانيا) و Tshermack (في نمسا) اكتشاف قوانين مندل من جديد . وأجرى العالم البريطاني Jryfet تجربة على البكتيريا المسببة لمرض الالتهاب الروي واستنتج أن هناك مادة تنتقل من البكتيريا الممرضة الميتة إلى بكتيريا غير الممرضة الحية وهو ما يعرف بالتحول البكتيري Bacteria transformation . وفي عام ١٩٤٥ استطاع العالم Affray وفريقة من عزل المادة المسببة للتحول إلبكتيري واثبت التحليل الكيميائي ان المادة المعزولة هي الـ DNA وعلية استطاع تفسير التحول البكتيري على اساس أن أحد السلالتين أمتصت الـ DNA الخاصة بالسلالة الاخرى وبالتالي اكتسبت الصفات الوراثية للسلالة المنقول منها الـ DNA ،
- **تركيب وتنظيم الجين** Gene structure and regulation
- قسم الباحثون الجينات من حيث الوظيفة إلى ثلاث أنواع
- Regulator genes : وهي الجينات المنظمة لعمل عديد من الجينات الاخرى والتي يطلق عليها أسم الجينات العاملة أو الفاعلة أو المنظمة .
- Operator genes : وهي نوع من الجينات العاملة التي تقوم بدور (عامل الهاتف) وهي التي تتحكم في فتح وغلق عدد كبير من الجينات الاخرى التي يطلق عليها الجينات التركيبية
- الجينات التركيبية Structural genes وهي الجينات المسؤولة عن التركيب الخاص بالبروتينات أو ببروتين الانزيم .
- ولقد افترض ان تنظيم نشاط الجين يكون عن طريق الجينات المنظمة أو العاملة Regulater genes الذي يتحكم في فتح أو غلق عدد من الجينات التركيبية Structural genes والمسؤولة عن أنتاج أنزيمات معينة تؤدي تفاعلات Biochemistry معينة في سلسلة من التفاعلات ينتج في النهاية ظاهرة فسيولوجية معينة . ويتم ذلك بان يقوم الجين المنظم لعمل عديد من الجينات الأخرى الفاعلة بإفراز مثبط لعمل Operator genes ويطلق على هذا المثبط أسم الكابح أو القامع . ويفترض بان هذا المثبط Repressor عبارة عن بروتينات تقوم بمنع الجين العامل أو المنظم من أتاحه الفرصة لانزيم بلمرة الحامض النووي RNA من العمل وبالتالي سوف لا يؤدي وظيفته .

- واقترح بان هذا يتم عن طريقين :

الاول: هي أن المثبط ينتج دون قدرة على الثبيط الا في وجود منشط Effector وعند وجودة يقوم بالالصاق بمنطقة Operator فيمنع أنزيم بلمرة الحامض RNA من نسخ DNA وبالتالي لا تتم الشفرة أو الرسالة .

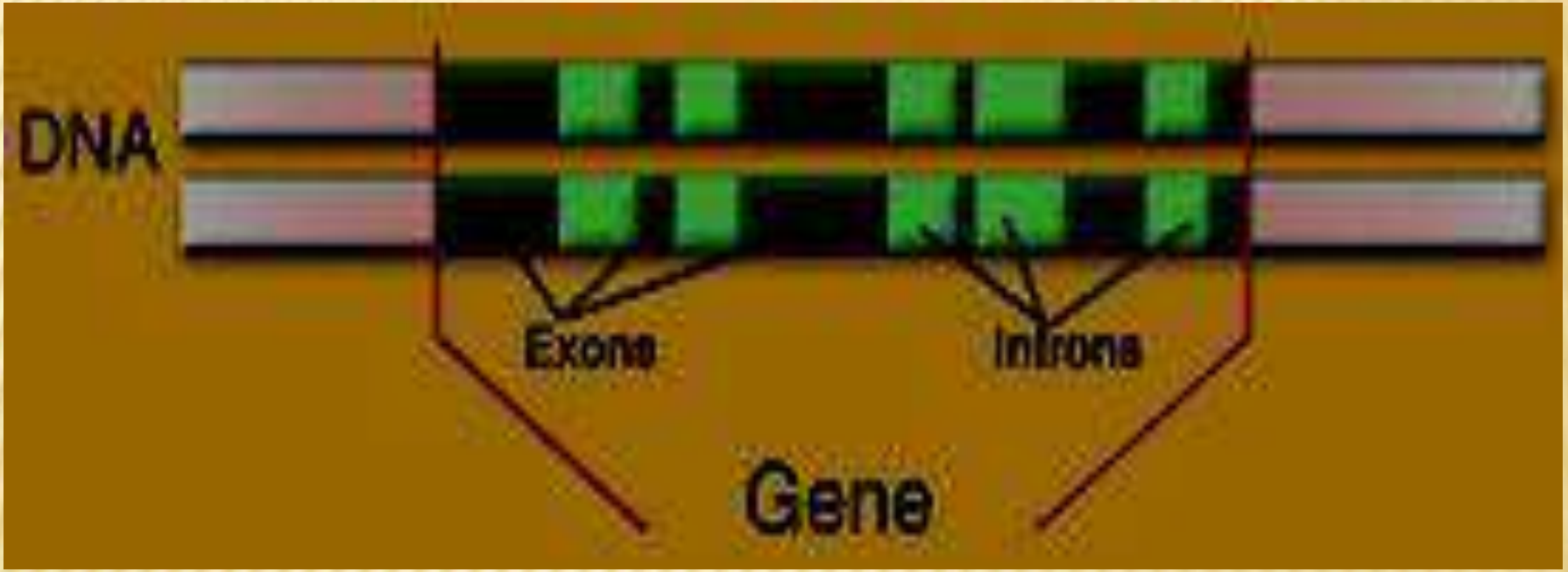
- **الثاني** : هذا الطريق للكابح يتم عن طريق تثبيطه بمادة ذات وزن جزئ منخفض أي عامل منخفض Effector والتي تلغى قدرة الكابح على العمل وبالتالي يصبح Operator genes حر تاركا الجينات التركيبية القادرة على العمل من خلال اصدارها الاوامر الخاصة بتكوين البروتين وهي الحامض النووي mRNA وبالتالي لانتاج أنزيمات متخصصة لاتمام تفاعلات معينة وظهور خصائص فسيولوجية أو صفة أو تميز خلوي أو تكشف خلايا أو أنسجة معينة



شكل تنظيم عمل الجين

أذن الجين Gene هو جزء من الـ DNA وهو بمثابة المسبحة والجينات لها لغة تخاطب بها الخلية حيث تنقل اليها رسائل تقرأها الخلية فتنفذ ما فيها من تعليمات وأوامر بدقة متناهية ، اذن لغة الجينات تتلف من القواعد النتروجينية أو اربع حروف (A, C, T, G) التي تم ذكرها سابقا أما كلماتها فتتالف من ثلاث حروف فقط من تلك الحروف الاربعة ولتلك اللغة شفرات لكي تفهمها الخلية كعلامات ترقيم والفواصل بمعنى(أبدا من هنا ، توقف هنا) هذه تسمى الشفرة الوراثية Code genes كما أن بعض الشفرات تعمل كأقواس بين الجمل ليست لها أهمية تسمى Introns . وبعض أجزاء من الـ DNA تعمل كمنظم لعمل الجين تعرف بالجينات العاملة أو المنظمة كما ذكر سابقا .وهذه هي السمفونية الربانية التي تعزفها الخلية لتقوم بوظيفتها التي حددها الله في صورة التسلسل والتتابع الدقيق للوحدات النيوكليوتيدات التي تعرف بأل DNA .

شكل يمثل تركيب أو تكوين الجين



الشفرة الوراثية GENETIC CODE

عند دراسة البروتين الطافر الناتج من كل من هذه الطافرات ومقارنة تتابع الأحماض الامينية به بتلك الناتجة في بروتين الطراز البري (الوحشي) أمكن التعرف على أماكن الإحلال لمواقع الأحماض الامينية الخاطئة في سبع طافرات وبمقارنة خريطة البروتين بمواقع الطافرات على الخريطة الوراثية لهذا ألجين تبين أن هناك تطابقا بين مواقع الأحماض الامينية الخاطئة والمستبدلة في كل بروتين طافر ومواقع حدوث طفرات الحذف مما يدل على وجود تواز بين تتابع القواعد في جزئ الـ DNA (ألجين) وبين تتابع الأحماض الامينية في البروتين الناتج من هذا ألجين .

يوجد أربع أنواع من القواعد النتروجينية فقط في جزيئة الـ DNA (A, G, C, U) وهي التي تقوم بتخصيص الأحماض الامينية العشرين

. في البروتين فانه من الضروري أن توجد توافق وتبادل بين هذه القواعد الأربعة لكي يتسنى لها أن تفي بالتشفير لتلك الأحماض الامينية وفي الحقيقة فأن بناء البروتين يحتاج إلى أكثر من عشرين شفرة عند الأخذ في الاعتبار أشارات البدء التوقف أو إنهاء يناء سلسلة البروتين .

يسمى تتابع القواعد في الـ mRNA (المرسل) الموازي أو المحدد لحامض أميني معين بالـ كودون Codon لهذا الحامض الاميني ، وتسمى تتابعات أشارات البدء بـ بداية الشفرة Start codons في حين تسمى تتابعات أشارات الإنهاء كودونات الإيقاف بـ Stop codons ويطلق على مجموع هذه الكودونات أسم الشفرة الوراثية Genetic code . وقبل أن يكتشف سر الشفرات الوراثية فقد كان من المفترض أنه إذا كانت جميع الشفرات لا بد أن تحتوي على نفس العدد من القواعد فان كل كودون (شفرة) لا بد أن **يحتوي على ثلاث قواعد نتروجينية على الأقل ويرجع ذلك إلى :**

لو افترضنا شفرة القاعدة الواحدة فان ذلك يعني سيكون لدينا $٤^{١}=٤$ هذا يعني أربع كودونات أحادية الشفرة .

كما أن كودون القاعدتين سيعطينا $٤^{٢}=١٦$ كودون وهذا العدد لا زال قاصرا عن الوفاء بالعدد المطلوب من الشفرات إذ لا بد أن يزيد عن ٢٠ كودون

وعليه فان كودون ثلاثي القاعدة سيكون أكثر ملائمة لإعطاء العدد المطلوب والأكثر إذ نحصل على $٤^{٣}= ٦٤$ كودون وقد تبين بعد ذلك أن الشفرة الوراثية هي ثلاثية الأحرف بالفعل وان جميع الشفرات الأربعة والستون المحتملة تحمل معلومات وراثية بطريقة أو أخرى

GENETIC EVIDENCE FOR TRIPLET CODE الأدلة الوراثية على الشفرة الثلاثية

في البكتيريوفاج T4 الخاص ببكتيريا القولون تبين أنه إذا تمت تنمية هذا الفاج في بيئة تحتوي على المطفر الكيماوي Proflavon الذي يتداخل مع الأسطح المتراصة المفلطحة للقواعد في جزئ الـ DNA فأنه ينتج طفرات حذف أو طفرات إضافة لقاعدة واحدة مما يؤدي إلى طفرات تحريك الإطار Frame shift mutation نظرا لان القواعد النتروجينية تقرا بالتتابع كالاتي

وعليه فان أي من طفرة الإضافة أو الحذف سيؤدي كل منهما إلى تحريك أو تغيير أطار القراءة لوحدات الكودونات الخاصة بالأحماض الامينية الداخلة في بروتين نوعي معين حيث نجد أن كل حامض أميني يلي قاعدة المضافة مثلا سيكون مختلف كما يلي :

تتابع الأحماض الامينية	Ser His Phe Asp Lys Leu
mRNA من الـ DNA الأصلي	5' – AGC CAC UUA GAC AAA CUA –3'
mRNA من DNA المضاف إليه القاعدة	
	5'– AGC ACA CUU AGA CAA ACU A–3'
تتابع الأحماض الامينية	Ser Thr Leu Arg Gin Thr

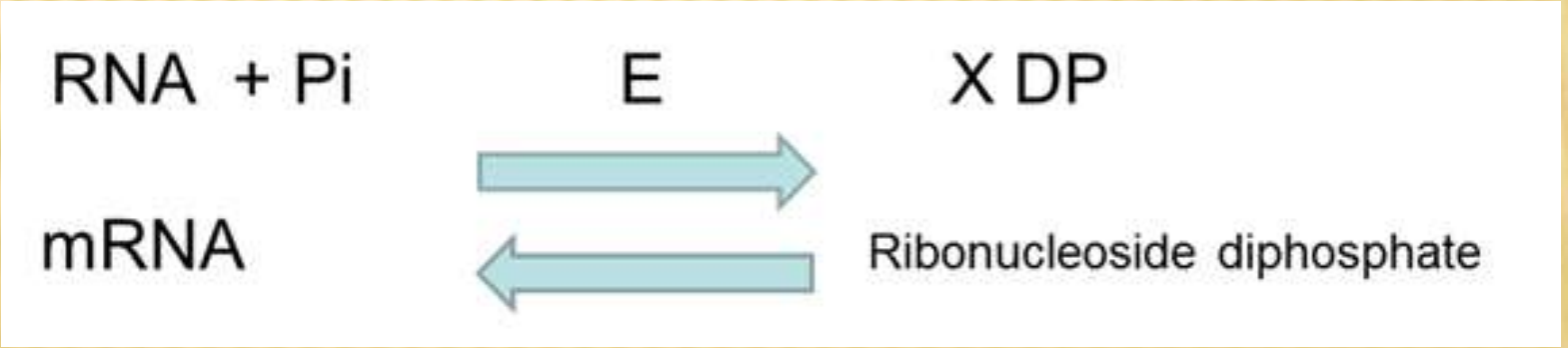
DICEPHRING OF THE GENETIC أستنباط الشفرة الوراثية

لقد اعتمدت التجارب التقانات الحيوية للتعرف على الشفرات الوراثية التي تدل على الأحماض الامينية المختلفة على استخدام نظام بناء بروتين في المعمل In vitro أي خارج الخلية Cell free system حيث وجد Nirenberg (١٩٦١) يمكن استخدام مستخلص من خلايا بكتيريا القولون الذي يحتوي على الريبوسومات و tRNA (الناقل) وأنزيمات Aminoacyl synthetases و mRNA (المرسل) والأحماض الامينية في بناء سلاسل متعددة الببتيد In vitro (أي في المختبر ، المعمل) إلا أن هذا التفاعل يكون لفترة قصيرة عدة دقائق ثم يتوقف إلا اذا أضيف إليه mRNAذي تركيب جديد ، هذا اعتبر اكتشاف مهم حيث أنه عندما يتم استهلاك mRNA الطبيعي فانه يمكن استخدام mRNA تركيبي مخلق أنزيميا في هذا النظام ، كما وجد أن فعالية مثل هذا النوع من mRNA التركيبي تكون ضعيفة إلا أذا تم تغيير الوسط ألايوني وإضافة بعض المكونات الأخرى ، حيث تبدأ الترجمة في أماكن عشوائية بدون الحاجة إلى كودون البدء .

هنالك عدة تقانات بايوكيماوية الرئيسية التي استخدمت في استنباط الشفرة الوراثية ومن هذه التقانات :

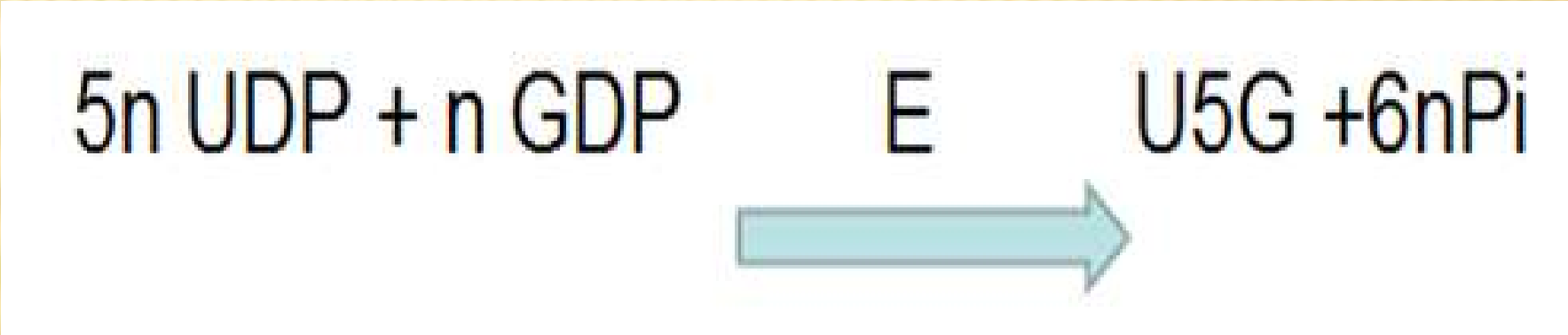
١) تقانة المتعدد النيوكلتيدي المتجانس Homopolymers

في التجارب الأولية استخدم Nirenberg و Mathaie سلسلة من التفاعلات تحتوي كل منها على ٢٠ حامض أميني لكن بشرط وجود حامض أميني واحد في كل أنبوبة هذا الحامض معلم بالإشعاع وبقية الأحماض ١٩ غير معلمة في كل تجربة ، كما تحتوي كل أنبوبة على جميع المكونات الأخرى اللازمة لبناء البروتين في المعمل In vitro فيما عدا mRNA الطبيعي ، ثم أضاف لكل مخلوط تفاعل mRNA تركيبي مكون من تتابعات مترادفة من نفس القاعدة على سبيل المثال Poly U وقد أمكن تخليق هذه النوعيات من mRNA الصناعي باستخدام نشاط أنزيم Polynucleotide phosphorylase الذي يساعد في التفاعل التالي



٢) تقانة البوليميرات المختلطة العشوائية Random co-polymers

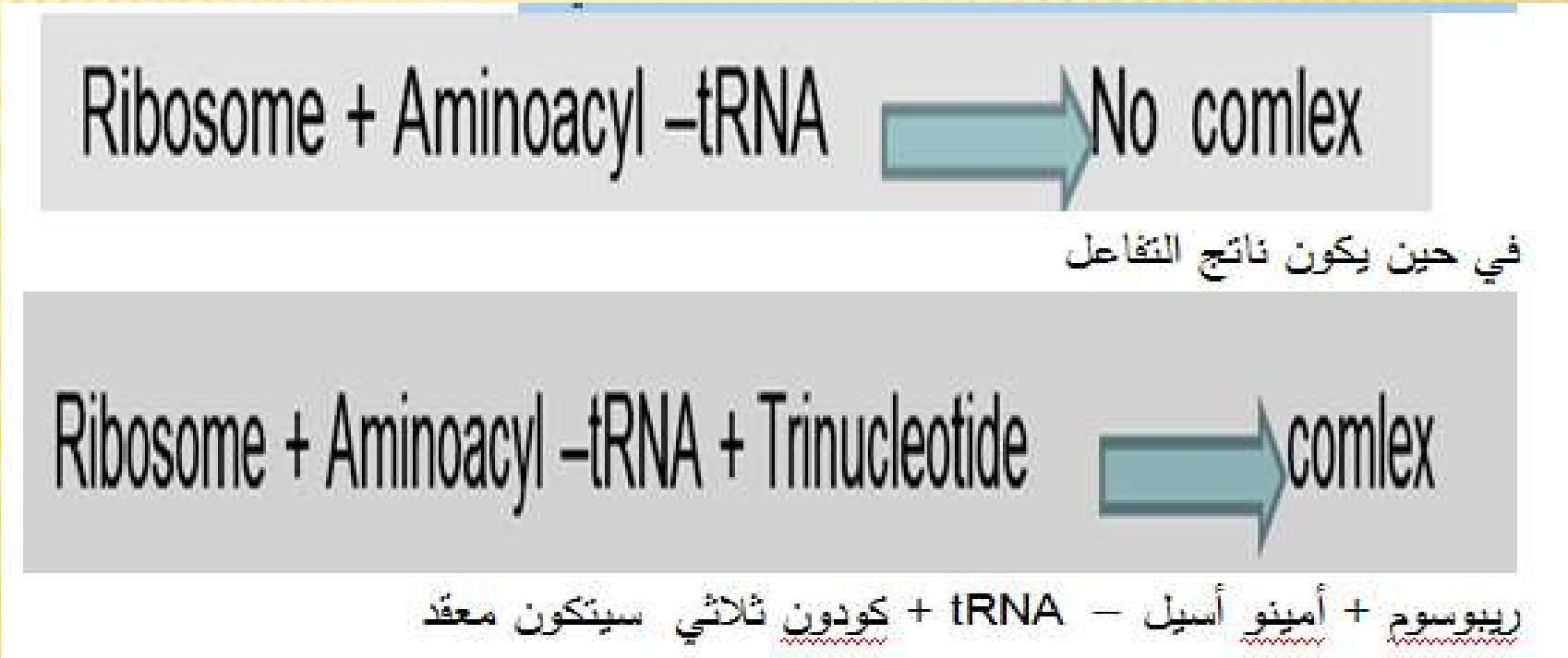
الخطوة التالية كانت هي تخليق بوليميرات من mRNA وتحديد الشفرات الوراثية في تجارب معملية مشابهة لما سبق ذكره واستنادا إلى قانون الاحتمالات لنفترض أننا قمنا بتخليق بوليمر مختلط عشوائي متعدد النيوكليوتيدات باستخدام أنزيم Polynucleotide phosphorylase مع إضافة كلا من UDP , GDP بنسبة ٥ / ١ كما في الشكل



فان احتمال نسبي للحصول على ثلاثي قواعد يحتوي على ثلاث قواعد من نوع U فقط في هذا المتعدد سيكون 5 X 5 X5 = ١٢٥ في حين أن الاحتمال النسبي للحصول على ثلاثي يحتوي على U واحدة واثنان من G سيكون 1X 1 X ٥ = ٥ فإذا كانت الشفرة UUU = U٣ تشفر للفينيل الأنين كما سبق القول + UGG تشفر إلى الحامض الاميني المجهول (X) فانه يمكن أن نتوقع أن تكرار إضافة حامض الفينيل الانين إلى سلسلة متعدد الببتيد الناتجة ستكون مكافئة في القيمة إلى النسب من التكرار الثلاثي U في متعدد النيوكلوتيد في mRNA التركيبي

٣) تقنية الارتباط المباشر لثلاثيات القواعد التركيبية Direct triplet binding

وفي خطوة متقدمة لاستنباط الشفرة الوراثية تم إجراء تجارب على الارتباط المباشر النوعي لثلاثيات من القواعد النوعية المحددة التتابع على الريبوسومات ضمن نظام بناء البروتين في المعمل In vitro بحيث كان التفاعل بصفة عامة كالتالي



٤) تقنية متعدد النيوكليوتيدات المعروفة التتابع Polymers of known sequence

كانت الخطوة الاخيرة في استنباط الشفرة الوراثية هي استخدام سلاسل تركيبية من متعدد النيولكيوتيدات ذات تتابع معروف وقد استخدمت هذه التقانة من قبل Khorana (١٩٦٧) في التعرف على عدد كبير من الكودونات النوعية المحددة لعدد من الأحماض الامينية حيث استخدم بوليميرات مختلطة مكونة من وحدات متكررة ترادفيا من قاعدتين مختلفتين مما يؤدي إلى اضافة حامضين من الأحماض الامينية النوعية يتم تعرضها للاشعاع لكي يتمكن من متابعتها وعند استخدام هذه البوليميرات التركيبية في نظام بناء البروتين في المعمل In vitro فبذلك تدرس مختبريا مدى اضافة أي من الثمانية عشر حامض اميني الباقية الغير المعلمة بالاشعاع وذلك عند استخدام حامض أميني ثالث مشع وسبعة عشر حامض غير مشع إلى مخلوط التفاعل في كل مرة مع احداث التبادلات والتوافقات الممكنة ، وعند استخدام هذه الأحماض الامينية في مخاليط التفاعل .

فاذا كان تتابع القواعد هو **UGU GUG UGU GUG UGU**

يملي تكوين متعدد الببتيد CYS VAL CYS VAL CYS

هذا يعني ان الكودون (الشفرة) UGU يمثل السستين في حين يمثل الكودون(الشفرة) GUG الفالين ، لقد اتجهت دراسات أخرى من قبل الباحثين الاخرين إلى استخدام تتابعات معلومة من ثلاثيات ورباعيات المكتونة بشكل ترادفي بحيث أدى تحليل سلاسل متعدد الببتيد الناتجة إلى التعرف على اضافة أحماض أمينية نوعية بتتابع معين ، كما امكن التعرف في النهاية على حوالي نصف عدد الشفرات الـ ٦٤ بهذه التقنية ، والجدول يلخص هذه النتائج

نتائج تقنية متعدد النيوكليوتيدات المعروفة التتابع

mRNA تركيبي (بوليمر مختلط معروف التتابع	الكودونات (الشفرات) المتعرف عليها	الاحماض الامينية المضافة في سلسلة متعدد البيتيد	الشفرات (الكودونات)
Poly (C–U) n	CUC/UCU/CUC	Leucine Serine	5'CUC3' UCU
Poly (U.G)n	UGU/GUG/UGU	Cysteine Valine	UGU GUG
Poly (AC)n	ACA/CAC/ACA	Threonine Histidine	ACA CAC
Poly (AG)n	AGA/GAG/AGA	Arginine Glutamine	AGA GAG

MAJOR TRAITS OF THE CODE الخواص الرئيسية للشفرة الوراثية

أولا: الشفرة الوراثية تقرا بصورة مستمرة بلا فواصل أو تداخل بين الكودونات

تغيير الحامض الاميني لطفرة باستبدال قاعدة واحدة

تتابع القواعد لكودونات الأحماض الامينية	عند وجود تداخل	عدم وجود تداخل
mRNA الطبيعي AGUACG	a b c d (AGU) (GUA) (UAC) (ACG)	a b (AGU) (ACG)
mRNA الطافر AGCACG	x y z d AGC GCA CAC ACG	x b AGC ACG

ثانيا: الشفرة ترادفية المعنى أو أنحلالية THE CODE IS SYNOHYMS OR DEGENERATE

حيث يوجد لدينا ٦١ كودون تشفر لعشرين حامض أميني في حين الثلاثة كودونات الباقية لإنهاء أو أيقاف بناء البروتين فيما عدا المثيونين والتربتوفان اللذان يوجد كل منهما كودون واحد فمن الواضح أن هناك أكثر من كودون واحد يمكن أن يشفر لنفس الحامض الاميني الواحد أي أن بعض الكودونات مترادفة المعنى عند القراءة فبذلك يطلق على مثل هذه الحالات من الشفرات أنحلالية Degenerate فعلى سبيل المثال نجد ان الليوسين يتم تشفيره بستة كودونات وهي UUA,UUG,CUU,CUC,CUA,CUG .... ويلاحظ أنه في معظم الحالات تختلف الكودونات المترادفة عند موقع القاعدة الثالثة في الكودون في حين تكون القاعدتين الاول والثانية ثابتين بالنسبة لكل حامض أميني نوعي ، مما يوحي بان هاذين الموقعين يعتبران الاكثر أهمية في تحديد الكودون النوعي لكل حامض وكنتيجة لذلك فان أي طفرة تحدث في القاعدة الموجودة في الموقع الثالث للكودون يمكن ان لا يكون غالبا لها تأثير سلبي على عملية الترجمة إلى بروتين لان الحامض الاميني المحدد ستتم اضافته في مكانه من السلسلة بالرغم من حدوث هذه الطفرة وتسمى مثل هذه الطفرات بالطفرة الساكنة أو الصامتة Silent mutation.

ثالثا : التارجح في مضاد الشفرة Wobbe in anticodon

لو فرضنا من البداية أنه يوجد في كل جزئ tRNA مضاد للشفرة لكل كودون هذا يعني انه لا بد أن يكون لدينا على الأقل ٦١ نوع مختلف من tRNAبالإضافة إلى ثلاثة إضافية تختص بإنهاء الترجمة إلا أن الأدلة أكدت على أن هناك عدد اقل من tRNA عما كان متوقعا حسب ذلك الافتراض ، وأن كل tRNA نوعي يمكنه أن يميز عدد من الكودونات المختلفة وهذه ساعدت على اكتشاف قاعدة غير اعتيادية في مضاد الشفرة على tRNA وهي قاعدة Inosine وهذه القاعدة تختلف عن القواعد الأربعة المعروفة ، وتنشا نتيجة لعملية تعديل أنزيمي في قاعدة

رابعا : كودون بدء الترجمة Initiation codon (AUG) ، وكودونات أنهاء الترجمة Termination codons (UAG , UAA , UGA)

من المعلوم أن بناء البروتين يتم من الطرف ٥" إلى الطرف ٣" وأن البناء يتم من النهاية NH_2 فقد تبين أن اشارة البدء لبناء البروتين هي كودون AUG ولقد وجد أن هذا الكودون له وظيفتين متميزتين فعندما يكون AUG في بداية منطقة التشفير Coding region لجزئ mRNA في البكتيريا فانه يشفر لاضافة N – Formyl Methionine (Fmet) في حين أن نفس الكودون AUG في أي مكان أخر بعيد عن منطقة البدء هذه سيشفر للـ Methionine العادي (Met) .

خامسا : اختلاف مقادير tRNA النوعية وتكرار استخدام الكودونات المختلفة في الشفرة

احيانا يحصل أن عدد جزيئات من tRNA التي تم بناؤها قد تحتوي على تتابعات نبوكليوتيدية مختلفة كثيرا لكنها في نفس الوقت تحتوي على نفس مضاد الكودون المختص بكودون نوعي لحامض أميني معين ، وغالبا ما تكون أحدى هذه النوعيات المتشابهة موجودة بمقادير كبيرة بالمقارنة بالنوعيات الاخرى الحاملة لنفس مضاد الكودون هذه قد تصل إلى اكثر من ١١ ضعف ، ففي بكتيريا القولون على سبيل المثال يوجد tRNA رئيسي $tRNA^{tyr}$ ونوع أخر من tRNA ثانوي بالنسبة لنفس الحامض وكلاهما يحتوي على نفس مضاد الكودون (٥" – AUG – ٣") ولقد وجد بصورة عامة ان كلا نوعي من tRNA الرئيسي والثانوي يتم نسخهما من جينين مختلفين وأن الفرق في تكرار وجودهما راجع إلى اختلاف في سرعة أو معدل نسخ كل منهما والتي ترجع إلى الاختلاف في كفاءة منطقة Promoter بينهما وايضا للفروق الاخرى في عملية تجهيز جزئ الـ tRNA الثانوي ، وقد يكون له دور في تنظيم عملية الترجمة نظرا لوجوده بكميات ضيئلة نسبيا كما انه يقوم بدور في كبت فعل الجين Suppression of gene action .

سادسا: الشفرة الوراثية عامة تقريبا The code is nearly universal

لقد وجد أن Poly–U يؤدي إلى اضافة حامض الفينيل الانين في التجارب المختبرية (المعملية) In vitro في مستخلصات خلوية مأخوذة من أنواع مختلفة من الكائنات تتراوح بين البكتيريا والثدييات ، ونفس الحالة تم الحصول عليه عند استخدام Poly– C اذ وجد أنه يحفز أدخال البرولين في تكوين عديد البرولين ، وكذلك الحال في Poly– A الذي يختص بتشفير الليسين في متعدد الليسين . وتم ذلك بصورة عامة بغض النظر عن نوع المستخلص الخلوي أو مصدره ، وقد تأكدت شمولية الشفرة وانطباقها على جميع أنواع الكائنات تقريبا بتجارب حديثة اشتملت على دراسة تتابع القواعد في الـ DNA لجينات محددة تشفر لبروتينات تنتمي إلى أنواع Species مختلفة . وبهذا يبدو أن الشفرة الوراثية قد ثلت ثابتة على مدى فترات تطورية طويلة .

ومن جهة ثانية وجد أيضا أن الشفرة الوراثية في جينوم المايتوكوندريا mtDNA في الانسان وغيره من الثدييات قد شذت عن هذه القاعدة في بعض الخصائص منها :

١) أن الكودون UGA لا يقرا في المايتوكندريا على أنه كودون أنهاء الترجمة ولكنه يشفر لحامض Triptophan

٢) أن Miothhine الداخلي يتم تشفيره بكل من الكودنين AUG و AUA بدلا من الايزوليوسين في حين أن المايثونين في بداية الترجمة يشفر له بالكودونات AUC , AUU , AUA , AUG

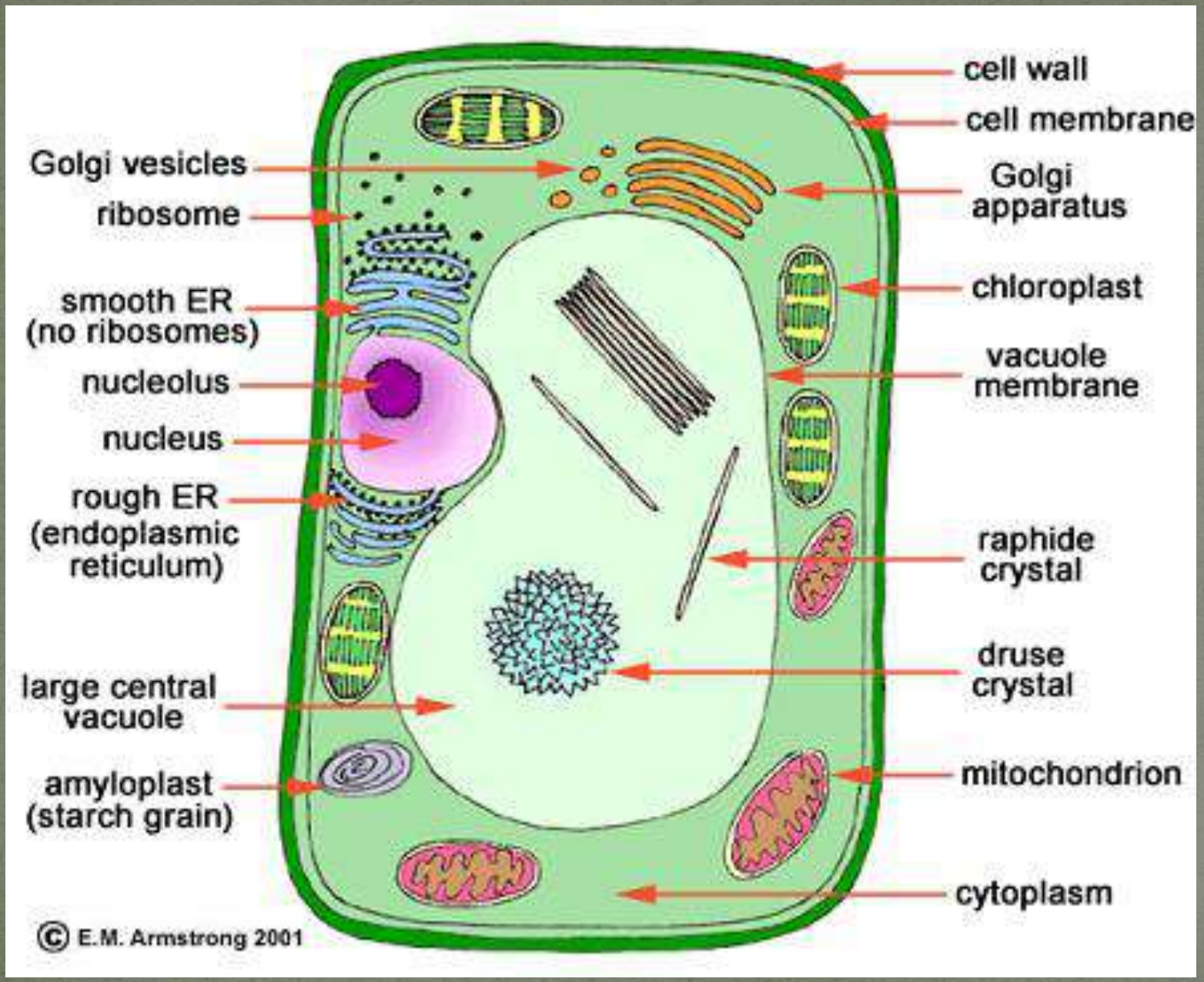
٣) ان الكودونين AGA و AGG ليسا كودونات تشفير للارجينين لكنهما بدلا من ذلك يستخدمان كاشارة لانهاء الترجمة في المايتوكوندريا وبذلك يوجد أربع كودونات لوقف الترجمة في المايتوكوندريا وهي , UAA , UAG AGG , AGA

٤) ن عدد أنواع tRNA في المايتوكوندريا يقل بكثير عما في السايتوبلازم الخلية مميزة النواة ، اذ لا يزيد في الاولى عن ٢٢ نوع فقط ، في حين يصل في الثانية إلى ٣١ نوع

THANK YOU MORE

الخلية النباتية

أعداد
أستاذ مساعد دكتور
كمال بنيامين ايشو
جامعة الموصل /كلية الزراعة والغابات
٢٠٢٢


cell wall
cell membrane
Golgi vesicles
Golgi apparatus
ribosome
chloroplast
smooth ER (no ribosomes)
vacuole membrane
nucleolus
nucleus
rough ER (endoplasmic reticulum)
raphide crystal
druse crystal
large central vacuole
mitochondrion
amyloplast (starch grain)
cytoplasm
© E.M. Armstrong 2001

بالرغم من أن النبات يبدو متجانسا في التركيب نسبيا الا أنه يمثل مجموعة من التراكيب أو الوحدات المجهرية التي تعرف بالخلايا ، وتعمل هذه الوحدات بتناسق تام لاستمرار الحياة في النبات ، أما في الكائنات الوحيدة الخلية كالبكتيريا والطحالب فان الخلية تمثل وحدة مستقلة قادرة على الحياة دون الارتباط بخلايا أخرى .

وعليه فالخلية تمثل الوحدة الأساسية للحياة ، ويقصد بذلك بانها اصغر تركيب في الكون قادر على النمو والتكاثر ، فبذلك لا يمكن اعتبار الفايروسات Viruses وحدات أساسية للحياة ولو أنها أصغر بكثير من الخلايا ، لانه لم يظهر فيروس دون أن يكون مرتبط بخلية حية ومعتمدا اعتمادا كليا في تكاثره عليها ، وعليه فالفايروسات تنقصها القدرة على التضاعف الذاتي

جدول (١) التباينات بين كائنات بدائية النواة وحقيقية النواة

الخاصية	طلائعية النواة Prokayrotic cells	حقيقية النواة Eukaryotic cells
حجم الخلية	بين ٠.٥ –٥ مايكرون	يصل إلى ٤٠ مايكرون
الشكل	وحيدة خلية	وحيدة الخلية أو كثيرة الخلايا
المادة الوراثية DNA	DNA صغير الحجم ، حلقي موزع في السايتوبلازم ، لا توجد نواة حقيقية ولا نوية ولا كروموسومات ، تتضمن نسخة واحدة من DNA وكروموسوم مفرد	DNA كبير الحجم خيطي يشترك مع البروتينات في تكوين الكروموسومات وتوجد داخل النواة ، وتحتوي على نوية ، وتتضمن الخلايا الجسمية نسختين من كل كروموسوم
الرايبوسومات	صغيرة الحجم ، من نموذج ٧٠٥	كبيرة الحجم ، من نموذج ٨٠٥
العضيات الخلوية	قليلة العدد لا توجد عضيات محاطة بغشاء مثل النواة والبلاستيدات والميتاكوندريه	كثيرة ومتنوعة محاطة بغشاء بسيط أو مركب وتخصص كل منها بوظيفة محددة
التنفس	يحدث في طيات داخلية من الغشاء الخلوي	يحدث التنفس الهوائي داخل المايتوكوندريا
الجدار الخلوي	يحتوي على الهيمو سيللوز مع أحماض أمينية المركب الاساسي الذي يقوي الجدار هي مادة الميورين	يحتوي في النباتات الخضراء على الهيموسيللوز ، ويكون البكتين المركب الرئيسي لدى الفطريات
التركيب الضوئي	لا توجد بلاستيدات خضراء ، يتم التركيب الضوئي في حال وجودة فوق الاغشية	يحدث في البلاستيدات الخضراء التي تحتوي على أغشية يتكدس بعضها فوق البعض
الانقسام الخلوي	انقسام مباشر	انقسام خيطي Mitosis
التكاثر الجنسي	التكاثر الجنسي الحقيقي مفقود ، قد يصادف أن يكون هناك أقتران يتم خلاله تبادل DNA بين خليتين	يوجد تكاثر جنسي حقيقي يتضمن حدوث انقسام الاختزالي Meiosis
تثبيت النتروجين	قسم منها له هذه الخاصية	لايملك أي منها هذه الخاصية

هنالك نوعين أساسيين من الخلايا هما الخلايا البدائية أو طلائعية النوى Prokaryotic cells والخلايا حقيقية النواة Eukaryotic cells وهما يختلفان عن بعضهما في كثير من الخصائص

أما أهم الصفات المشتركة بين طلائعية النواة وحقيقية النواة فهي

١)للغشاء البلازمي بنية متشابه يقوم بدور حاجز ذي نفاذية أصطفائية

٢)المعلومات الوراثية المشفرة في DNA تعتمد على الرمز الوراثي نفسه

٣)نسخ وترجمة المعلومات الوراثية وفق أليات متشابه

٤)طرق التمثيل الغذائي مشتركة مثل التحلل السكري ، بالرغم من حدوثها في أماكن متباينة (في الغشاء البلازمي للطلائعيات (بدائية) وفي غشاء المايتوكوندريا لحقيقية النواة)

٥)يتوقف شكل وحجم النبات إلى حد كبير على شكل وعدد وترتيب الخلايا ، اذ توجد هنالك علاقة أو الترابط بين التركيب والوظيفة فمثلا تتكون أنسجة التوصيل في النبات (الخشب واللحاء) من خلايا مهياة من الناحية التركيبية لتنقل وبكفاءة عالية كميات كبيرة من الماء والغذاء ، والخلايا مهما اختلفت في شكلها وحجمها وتركيبها ووظيفتها فانها لا تتعدى **نوعين رئيسين**

أولا: خلايا حية : تحتوي مكونات حية (بروتوبلاست) ومكونات غير حية (جدار الخلية)

ثانيا : خلايا ميتة : خلايا كانت في الاصل حية ثم طرأت عليها تحولات كثيرة أدت إلى موتها وذلك لغرض أداء وظيفة معينة كالاوعية والقصبات والالياف والخلايا الفلينية .

- مكونات الخلية النباتية Plant cell components
- تقسم مكونات الخلية إلى :
- أولا: جدار الخلية Cell wall
- ثانيا: بروتوبلاست : ويشمل على المحتويات التالية :
- المكونات الحية (البروتوبلازم) Living componenets or protoplasm ويشمل على :
- الساتوبلازم Cytoplasm
- الاغشية الخلوية Cellular membranes
- الشبكة الاندوبلازمية Endoplasmic reticulum
- الخيوط السايوبلازمية Plasmodesmata
- الرايبوسومات Ribosomes
- النواة Nucleus
- البلاستيدات Plastids
- المايتوكوندريا Mytochondria
- أجسام كولجي Golgi body
- ١٠-الاجسام الكروية Spherosomes
- ١١-الجسم المركزي Centriol
- ١٢-الاجسام الدقيقة Microbodies
- ب – المكونات الغير الحية Non living components وتشمل على
- الفجوات Vacuoles
- حبيبات النشا Starch grain
- البلورات Crystals

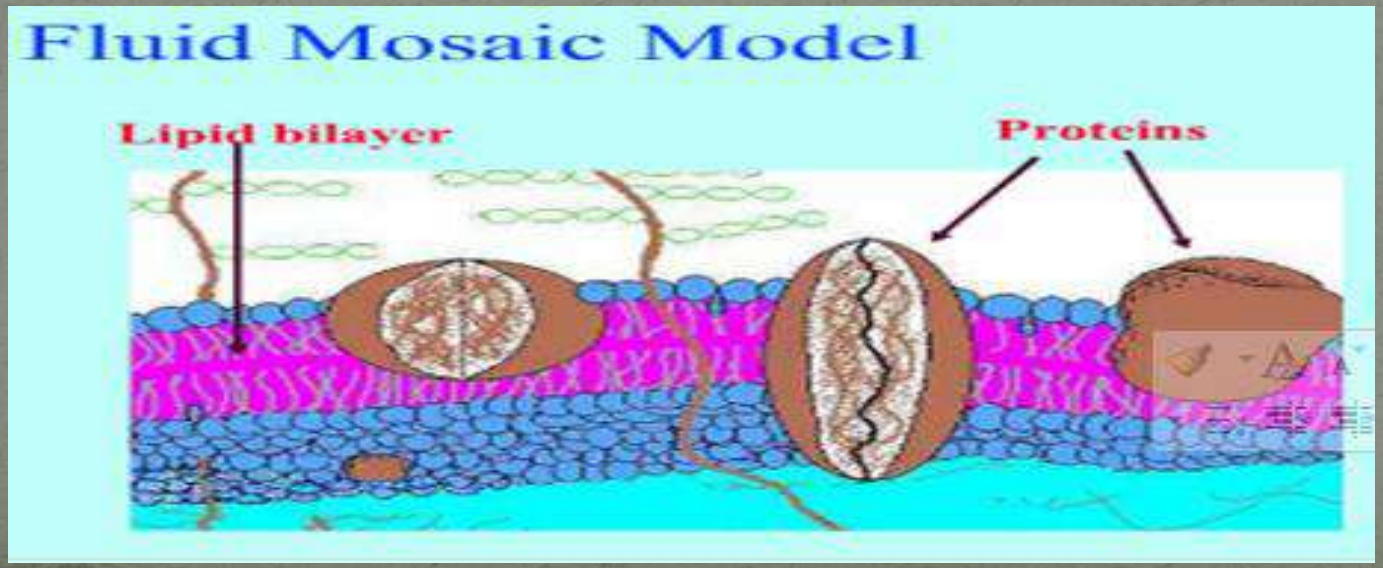
أولا: الجدار الخلوي The cell wall

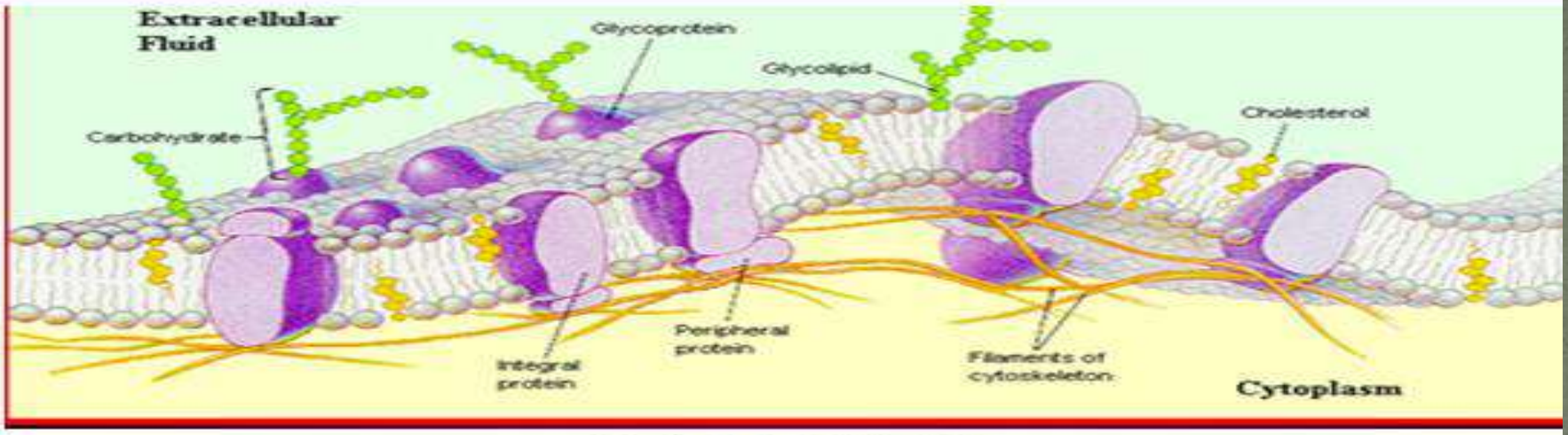
تكوين جدار الخلية Cell wall formation

تكون جدار الخلية ويحدث عند المراحل الاخيرة من انقسام الخلية في عملية الانقسام الغير المباشر ويحدث في الطور الانفصالي منه Anaphase ، حيث يتكون غشاء يفصل بين البروتوبلاستين والذي يعرف بالصفيحة الخلوية Cell plate، اذا تتجمع اقساما من الشبكة الاندوبلازمية في وسط الخلية والتي تتحول إلى جدار بكتيني يعرف بالصفيحة الوسطى Middle lamella التي تتكون اساسا من بكتات الكالسيوم والمغنيسيوم التي تربط الخلايا المتجاورة مع بعضها البعض ، ثم بعد ذلك يحدث ترسب على جانبي الصفيحة الوسطى مكونة الجدار الابتدائي Primary wall ويتكون هذا الجدار بصورة اساسية من السليلوز مختلطا معه مركبات أخرى مثل الهيميسيليلوز والبكتين وغيرها من المواد ، يكون هذا الجدار رقيقا ومرنا وقابل للتمدد تبعا لازدياد حجم الخلية ، فقد تحتوي بعض الخلايا على الجدار الاولي فقط مثل خلايا البارنكيمية ، دون ان تحتوي على الجدار الثانوي Secondary wall الذي يلي الجدار الاولي

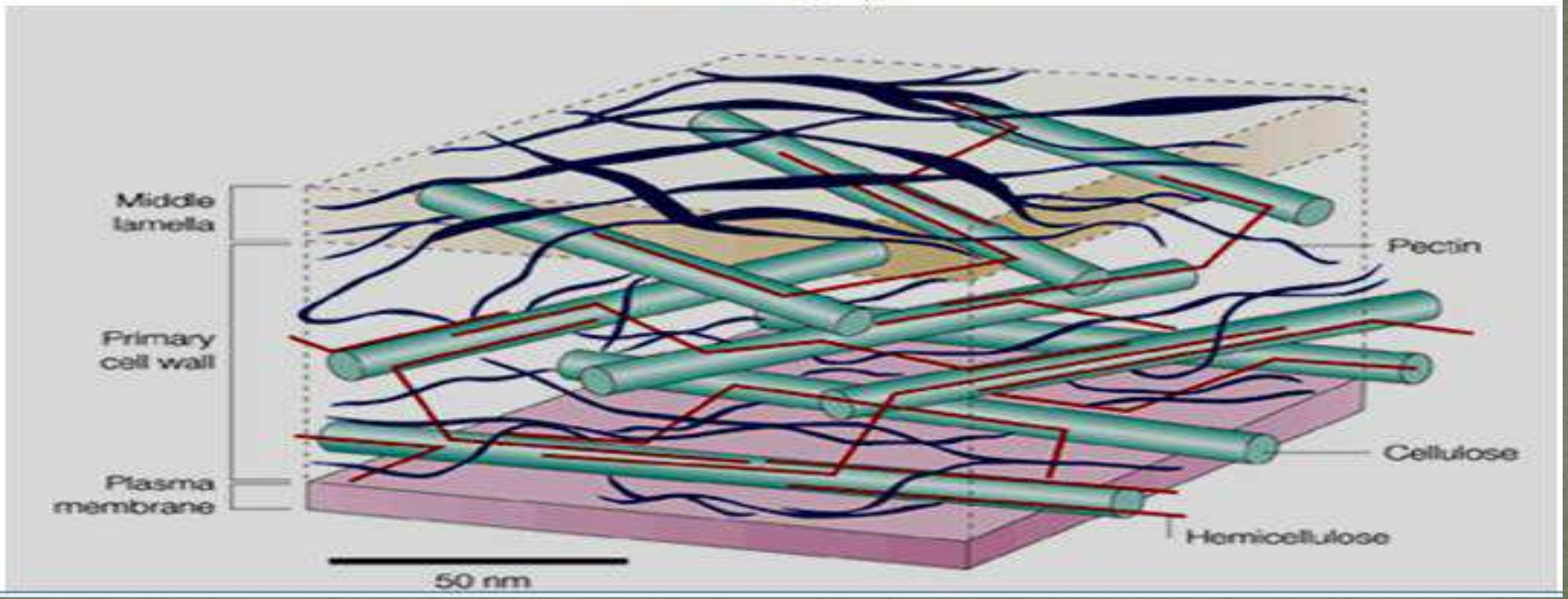
والذي يترسب بعد تمام نمو الخلية في الحجم ، الفروقات بين الجدار الاولي والثانوية

مواد المقارنة	الجدار الاولي	الجدار الثانوي
السليلوز	نسبته منخفظة ١٠%	نسبته عالية ٥٠%
الهيميسيليلوز والبكتين	عالية	منخفضة
مدى تجمع الالياف	نسبة واطئة	نسبة عالية
طول سلاسل السليلوز	حوالي ٠.٥ مايكرون	حوالي ٥ – ١٠ مايكرون
نسيج الليفات	تكون مبعثرة	مرتبطة بطبقات وملتفة مع بعضها
المرونة	عالية	واطئة
نوعية النمو (اضافة مواد أخرى جديدة إلى الجدار)	اضافة النمو في السطح بعملية Aposition أو بعملية التداخل	النمو سطحي Apostition





شكل (٣) غشاء الخلية



المكونات الكيميائية لجدار الخلية Chemical composition of cell wall

يتكون جدار الخلية من هيكل سليلوزي تتداخل معه بعض المركبات الكيمياوية اهمها :

السليلوز Cellulose :

الهيميسليلوز Hemicellulose :

المواد البكتينية Pectic substances :

اللكنين Lignin :

الدهون Fatty substance :

السيليكا Silica :

التانين Tannin و الراتنجات Resins والاصماغ Gums

نمو جدار الخلية Growth of cell wall

لذا وضعت عدة نظريات مختلفة منهما نظريتان قديمتان هما نظرية التداخل والتراكم اللتان عدلتا بعد استعمال المجهر الالكتروني بنظرية النمو الموزايكي والنمو الشبكي المتعدد ونظرية أتساع البروتين :

نظرية التداخل Intussusception theory : هذه تفسر زيادة النمو في مساحة الجدار ،اذا تفترض هذه النظرية أن نمو وأستطالة الخلية يؤدي إلى اتساع المسافات بين الليفات الصغيرة المكونة لجدار الخلية فان ملء هذه الفراغات أو المسافات بلليفات صغيرة جديدة تكون مواد جديدة للجدار الخلية فيمنع تمزقه

نظرية التراكم Aposition : تفسر هذه النظرية الزيادة في سمك الجدار ، اذ تفترض هذه النظرية أن نمو الجدار الخلوي يرجع إلى تكون مواد جديدة تضاف فوق مواد الجدار السابق أي أن النمو يحدث بشكل طبقات بعضها فوق بعض

نظرية النمو الموزايكي Mosaic growth theory : تبنى هذه النظرية على وجود مساحات دقيقة من الجدار الاولي يتخللها السايتوبلازم ويحدث في هذه المساحات تخليق لسايتوبلازم جديد يؤدي إلى زيادة كميته وبالتالي إلى ابتعاد اللويفات الصغيرة عن بعضها وكبر سطح الخلية ، ثم بعد ذلك تكون لويفات صغيرة أخرى تملاء هذه الفراغات الدقيقة

نظرية النمو الشبكي المتعدد Multinet growth theory : تعتقد هذه النظرية أن نمو الجدار الاولي يتم بطريقة التراكم مع تغيير أتجاه الليفات الصغيرة في الطبقات المختلفة أذ تكون الليفات الصغيرة الجديدة القريبة من غشاء البلازما في وضع أفقي أو عامودي على محور الخلية وتتحول تدريجيا تلك الطبقات من الليفات إلى وضع شبكي ثم تصبح طولية أو عمودية أي موازية لمحور الخلية فبذلك يحصل اتساع الخلية وبذلك ينمو جدار الخلية

نظرية اتساع البروتين Extension protein theory : تفترض هذه النظرية أن البروتين الغني بالحامض الاميني Hydroxy proline والموجود في الجدار الخلية يحتوي على أواصر (-S-S-) , Disuide التي تربط السكريات المضاعفة وتصبح هذه الاواصر ضعيفة في حالة الاختزال بعدد من التفاعلات الحيوية التي يعتقد بان الاوكسين يحفزها وبالتالي تزداد خاصية الليونة غير العكسية لجدار الخلية وبفعل الضغط الانتفاخي يحدث نمو في جدار الخلية أو نمو الخلية .

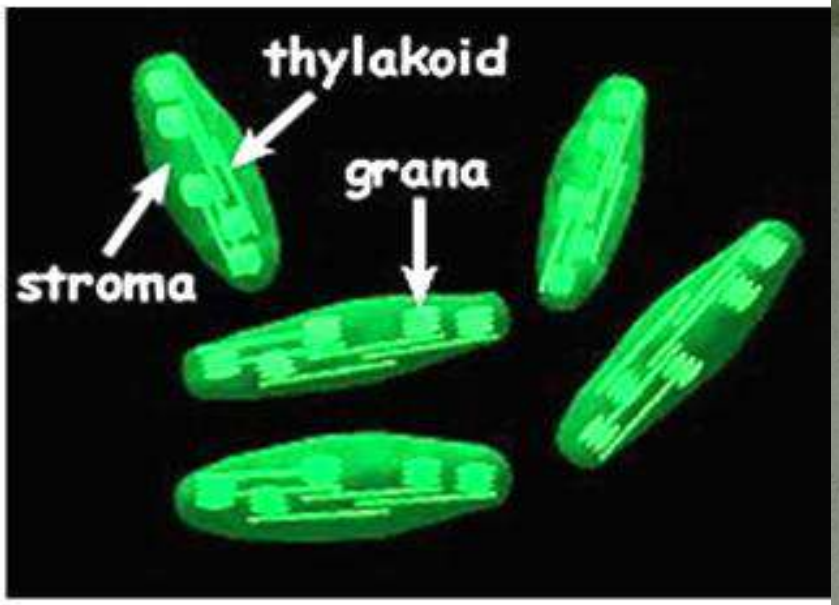
النقر Pits

اثناء تكون الجدار الخلوي لا يتم ترسيب مواد الجدار على الجدار بصورة منتظمة بل تترك مساحات محدودة منخفضة عن باقي سطح الجدار .توجد بها ثقوب دقيقة تمر خلالها في الخلايا الحية شرائط سايتوبلازمية تعرف باسم الخيوط السايتوبلازمية Plasmodesmata تصل سايتوبلازم الخلايا المتجاورة بعضها مع البعض الاخر وهذه النقر تكون على أنواع منها :

حقول النقر الابتدائية Primary pit fields :

النقر البسيطة Simple pits

النقر المضفوفة Bordered pit:



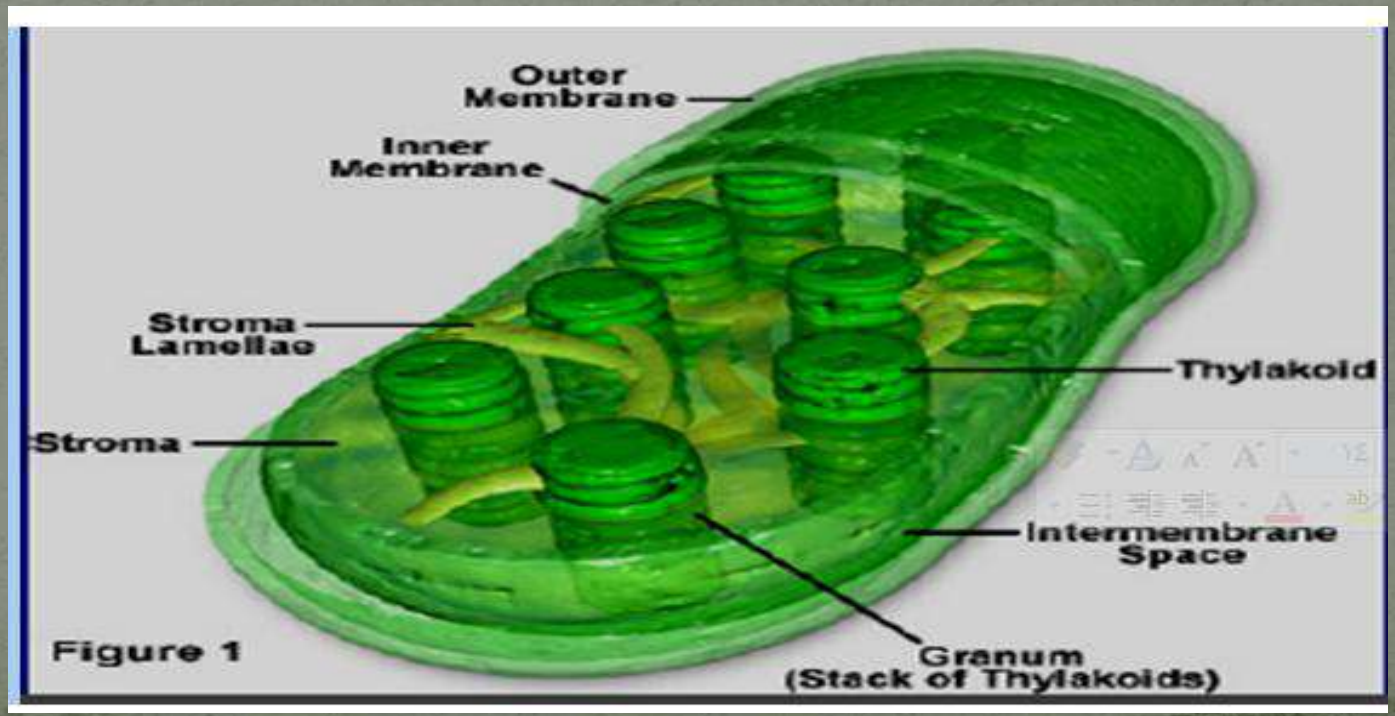
البلاستيدات Plastids : عبارة عن أجسام بروتوبلازمية لها القدرة على النمو والانقسام سواء كانت في خلايا مرستيمية أو بالغة ، قد تحتوي الخلية على بلاستيدة واحدة كما في بعض أنواع الطحالب ، أما في النباتات الراقية فتحتوي خلاياها على العديد منها ، كما تقسم البلاستيدات على اساس غياب أو وجود صبغات معينة إلى :

* بلاستيدات خضراء

*بلاستيدات ملونة

*بلاستيدات عديمة اللون

ويمكن أن تتحول البلاستيدات من صورة إلى أخرى كما في تحول البلاستيدات الخضراء إلى ملونة في الأزهار والثمار ، وتحول البلاستيدات غير الملونة إلى خضراء عند تعرضها للضوء

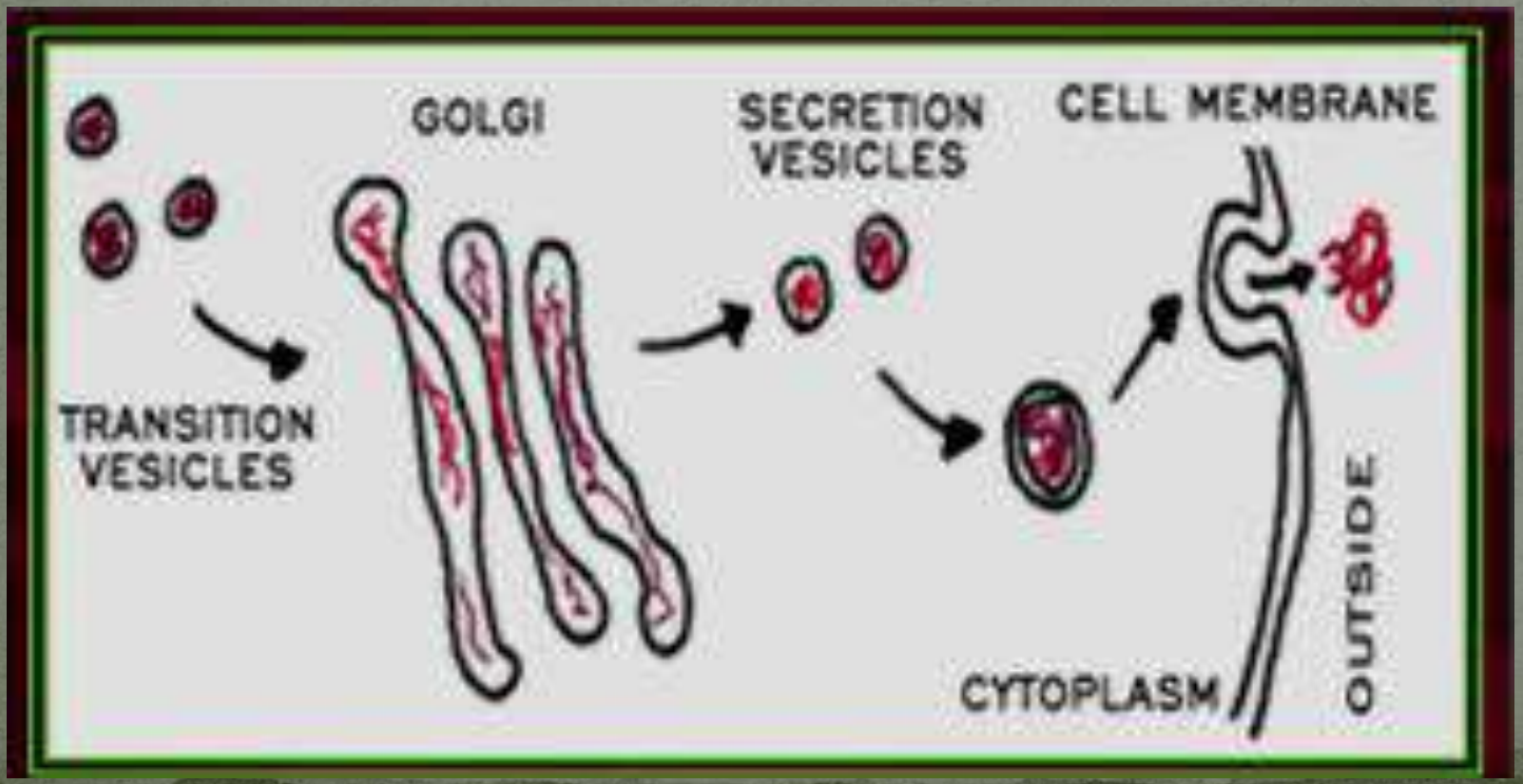


المايتوكوندريا Mitochondria

عبارة عن أجسام بوتوبلازمية حية لها القدرة على النمو والانقسام ، تشاهد مغمورة في السايتوبلازم الخلايا المختلفة وخصوصا الخلايا المرستيمية وتضمحل وتختفي في الانابيب الغربالية .لها اشكال مختلفة اكثرها الشكل العصوي ، تتركب من بروتينات ذائبة تعرف بالحشوة Matrix يوجد فيها الحامض النووي DNA الخاص بها وتحتوي على الرايبوسومات بحجم 70S وتغلف الحشوة بغلاف يتكون من طبقتين تشبه في تركيبها الغشاء البلازمي ، الغشاء الداخلي متعرج وذو نتوءات تمتد للداخل تسمى Cristae ويوجد على هذه الطبقة الالاف من جسيمات تشبه الدبابيس متصلة بالغشاء ، يعتقد أن هذه الجسيمات تحتوي على الأنزيمات اللازمة لتحويل مركب ADP إلى مركب ATP اضافة لاحتوائها على الأنزيمات اللازمة لدورة كربس ، لذا تظهر أهمية المايتوكوندريا بانها تقوم بتفاعلات التنفس لاعطاء الطاقة لمختلف أنشطة الخلية

أجسام كولجي Golgi body

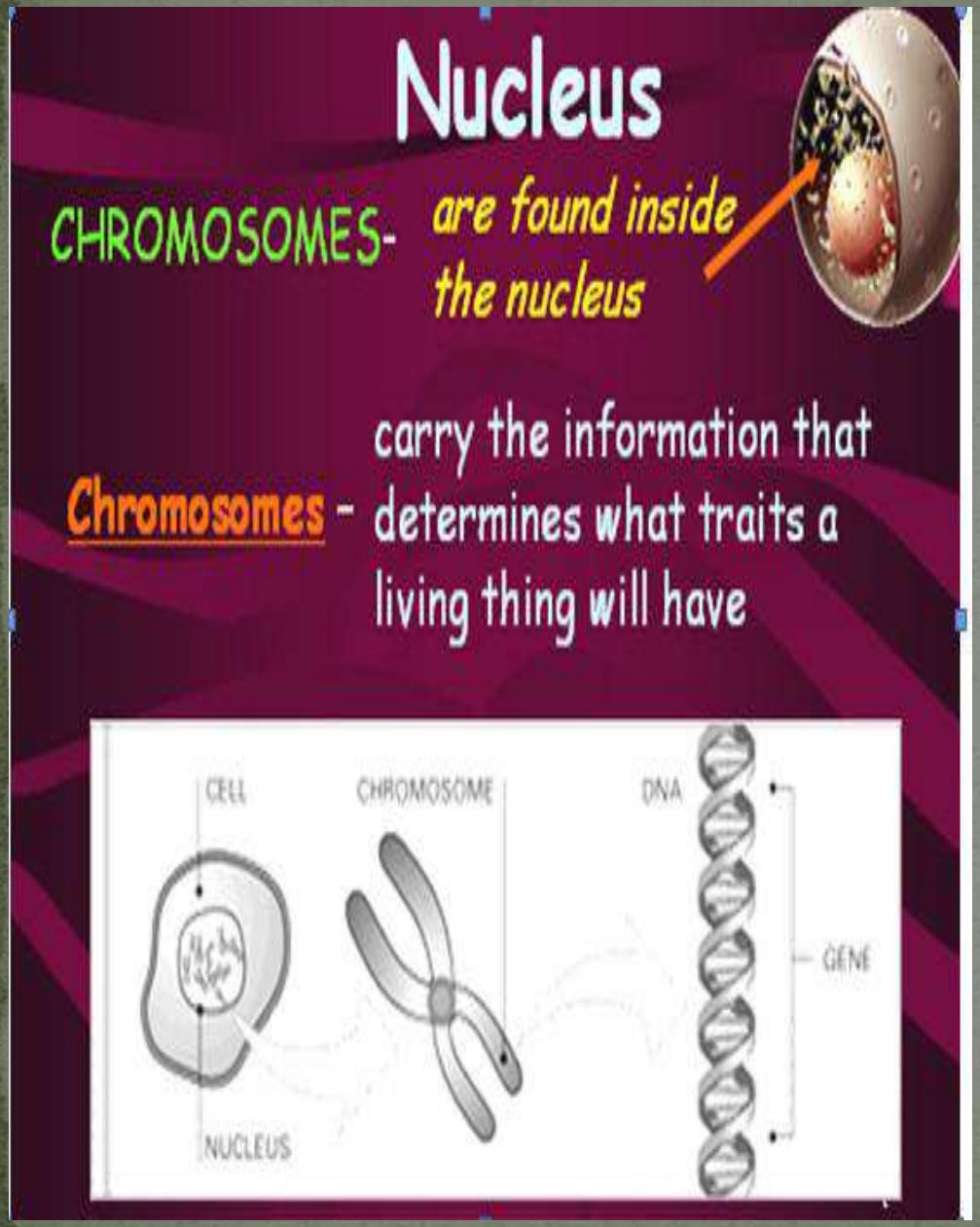
يتكون جهاز كولجي من مجموعة اجسام تسمى Dictysomes ومنتشرة في البلازما الاساس ، تتكون من أقراص جوفاء ذات غشاء مفرد تدعى Cisternae مرتبة بشكل طبقات Stacks يوجد بداخلها مركبات عديدة مثل البروتينات والكاربوهيدرات ، يخرج من أطراف هذه الاقراص انابيب عديدة متفرعة تنتهي عادة بحويصلات ، ويعتقد بان الحويصلات تستعمل في بناء الغشاء البلازمي والجدار الخلوي والفجوة العصارية ، كما ان المواد اللافرازية التي تفرز خارج الخلية فبذلك يزداد عدد وحدات اجسام كولجي في الخلايا النباتية المختصة بالافرازات كما في خلايا القلنسوة للجذر التي تفرز مواد هلامية خارج الخلايا تساعد على سهولة انزلاق الجذر بين حبيبات التربة لذا تعد وظيفتها هي عملية الافراز



النواة Nucleus

عبارة عن جسم كروي أو بيضوي توجد في وسط السايتوبلازم او في احدى اطراف الخلية في الخلايا البالغة وذلك لان السايتوبلازم يصبح منضغطا بجانب جدار الخلية بسبب الفجوة الكبيرة التي تحتل مركز الخلية ،يختلف قطرها باختلاف الخلايا فهي صغيرة نسبيا تتوسط عادة الخلية في الخلايا المرستيمية، تحتوي خلايا النباتات الراقية على نواة واحدة لكن في بعض الحالات كما في الانابيب اللبنية نجد أكثر من نواة ، وان الخلية تموت عند فصل النواة منها ، لكن الانابيب الغربالية الناضجة تستمر حية بالرغم من خلوها من النواة ، تمثل النواة المركز المتحكم في جميع الفعاليات الحيوية في الخلية بسبب كونها تسيطر على عملية بناء الأنزيمات التي تنشط معظم أن لم يكن جميع التفاعلات الايضية في الخلية أي انها تسيطر على فسلجة الخلية . كما انها تحمل الصفات الوراثية في الاجيال المتعاقبة

النواة أكثر لزوجة من السايتوبلازم وهي تحتوي على نسبة أكبر من الاحماض النووية RNA , DNA يتكون كليهما من وحدات تسمى Nucleotides التي تتكون كل واحدة منها من جزئ السكر الرايبوزي منقوص الاوكسيجن في حالة حامض DNA أو سكر رايبوزي في حالة RNA يرتبط مع السكر جزئ فوسفات من جانب ومن جانب الاخر يرتبط بقاعدة نتروجينية وهي (Adenine or Thymine or Guanine or Cytosine) في حامض DNA ، ويستبدل الـ Thymine بالـ Uracil في حالة حامض RNA مع بقاء بقية القواعد الاخرى والقواعد النتروجينية تتكون جزيئاتها حلقية فهي تتكون من حلقة سداسية كما في Cytosine و Thymine أو تكون خماسية كما في الـ Adenine



وتتركب النواة في الخلايا الكائنات الحية من :

- الغشاء النووي Nuclear membrane

:

- البلازما النووية Nucleoplasm
- النوية Nucleolus

تحوي النواة في الطور البيني عند انقسام الخلية على نوية أو كثر ويعتمد عددها على نوع النبات ، فمثلا تحتوي خلية البصل عادة على ٤ نويات ، وتتكون النوية خلال الطور النهائي للانقسام غير المباشر Mitosis نتيجة لنشاط مناطق معينة لكروموسومات معينة والتي تسمى بالكروموسومات النوية Nucleolar chromosomes وتتكون النوية من حامض نووي RNA والبروتين ، بالرغم من أن للنوية القدرة على تخليق الحامض النووي RNA الا أن معظم RNA الموجود فيها ذات منشا كروماتيني كما يختلف فيها البروتين يستخدم في تكوين الرايبوسومات .

شكرا لإصغائكم

النباتات المحورة وراثية
Genetically modified plants

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

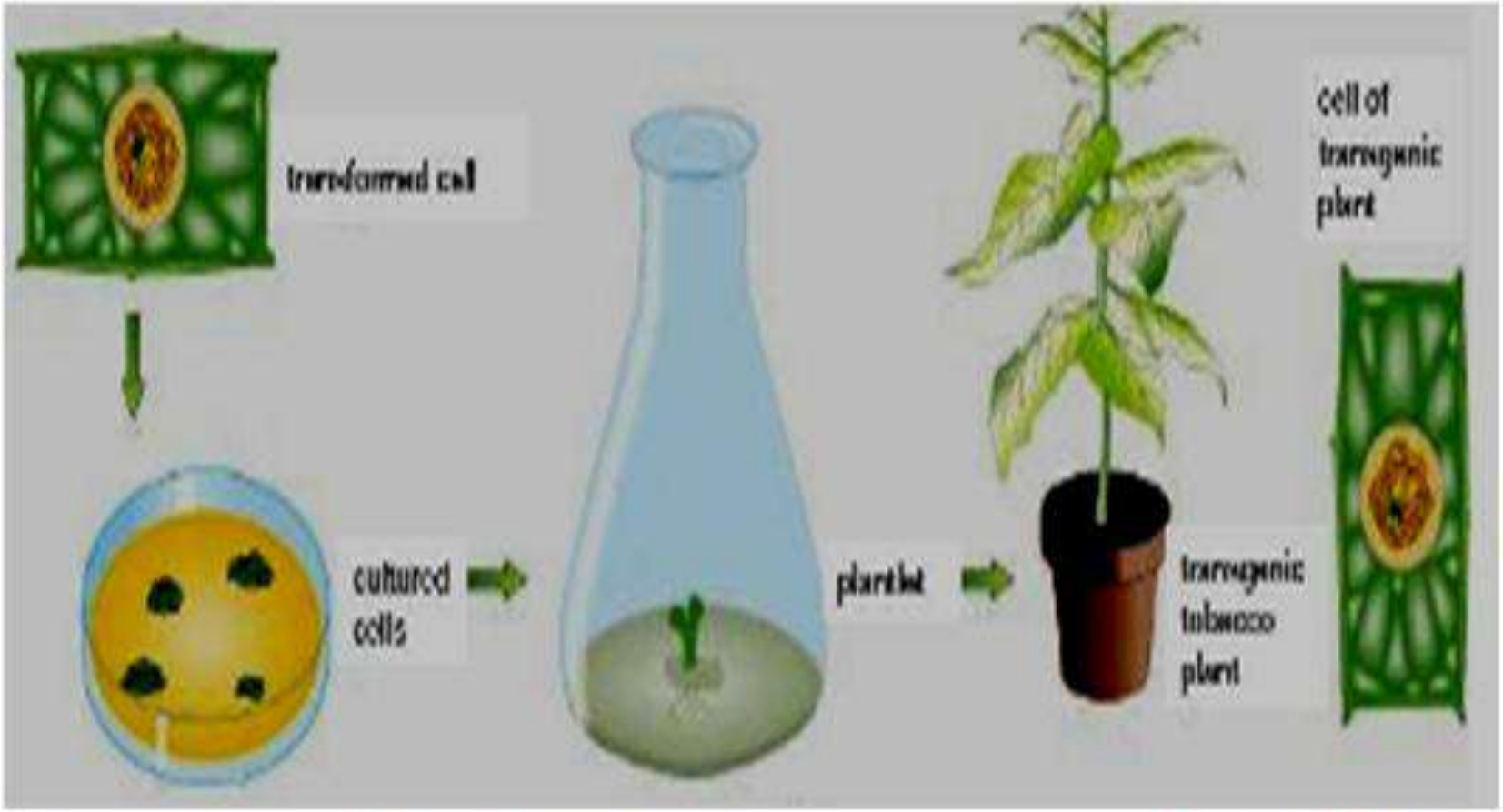
كمال بنيامين ايشو

جامعة الموصل /كلية الزراعة والغابات / قسم البستنة وهندسة الحدائق

٢٠٢٢

أن أساس جميع تطبيقات تقانة الحيوية في النباتات هو مبدأ القدرة على التشكيل totipotency وتعني القدرة على التشكيل أن كل خلية نباتية تحمل جميع المعلومات الوراثية اللازمة لجميع وظائف النبات ولية يجب أن تكون من حيث المبدأ قادرة على النمو لتعطي نبتة كاملة من جديد. يولي علم تقانة الحيوية الزراعية agrobiotechnology الاهتمام بنمو النباتات كمحاصيل ويهدف الى تحسين إنتاجها أو تغيير الصفات التي ترتبط بنوعيتها ، وكذلك أيضا استخدم علم الإحياء الجزيئي molecular biologyفي تحسين صفات النباتات اي في هذا الحقل من التقانات يجرى التعبير عن الجينات بإفراط مما يعطي النباتات صفات محسنة أو صفات جديدة ، فقد طور أول جيل من النباتات المحورة (المعدلة وراثيا) genetically modified (GM) القادر على التعبير بالإفراط عن الجين مما يجعل النباتات قد تكون مقاومة للحشائش الضارة أو للآفات الحشرية أو الأمراض التي تفتك بالنبات ،غلى سبيل المثال من خلال تعديل جينوم النباتات بإدخال الجين الذي بشفر لسم BT (BT-Tixin) وهو بروتين سام قاتل للحشرات يوجد في بكتيريا Bacillus thuringrinsis فبذلك أصبحت هذه النباتات مقاومة للحشرات .

تعد تقانة إدخال أي جين أو مقطع من الـ DNA إلى الخلية النباتية قد تكون مؤقتة Transient إذ لا يتم فيها دمج الـ DNA في جينوم النبات أو قد تكون ثابتة وتسمى بالتحول الثابت Stable transformation وليتم فيها دمج الـ DNA في جينوم النبات ويعرف النبات في هذه الحالة بالنبات المهندس وراثيا أو المحور وراثيا (GM Plant) أو Transgenic plant وفي بعض المصادر يعرف أيضا بالنبات العبر الجيني أو نبات نقل جيني . والنبات المحور وراثيا بهذه التقانة يكون له القدرة على تمرير جين المنقول إلى النسل الناتج منه ـأما ألجين الذي تم نقله إلى الجينوم النبات فيعرف باسم Transgene ويلاحظ بأنه لا يمكن لنا أن ندخل أي جين أو مقطع من الـ DNA إلى كلية خلية في جسم النبات وإنما يكفي إدخال ألجين المرغوب إلى خلية نباتية واحدة فقط ثم نقوم بعد ذلك بإنتاج نبات كامل من هذه التقانة بحيث تصبح كل خلايا النبات الجديد الكامل تحتوي على ألجين المرغوب Trans gene الذي تم إدخاله في الخلية الأولئ



شكل (٨٧) خطوات نقل الجين إلى داخل خلية نبات ((عن ، رفعت و العتيبي ،٢٠٠٨)

وتعرف عملية إنتاج نبات كامل Hall plant من خلية واحدة باسم Regeneration وتتم هذه التقانة باستخدام تقنيات تعتمد على زراعة الخلايا والأنسجة النباتية .

ميكانيكية نقل الجينات Mechanisms of gene transfer

أن القدرة على هندسة تغير وراثي لصفات بعض الكائنات الحية ومنها البكتيريا يعود إلى عام ١٩٢٨ من قبل العالم Fred Griffith عندما لاحظ تباينا في الصفات الظاهرية morpholigal traits (phenotypes) (خشنة وملساء) لمستعمرات بكتيريا *Streptococus pneumonia* وان البكتيريا الملساء هي التي تسبب مرض في الفئران ، وأن الميكانيكية التي يتم بها انتقال الـ DNA أو جزء منه إلى بكتيريا أخرى أو إلى نبات أو حيوان لا يزال يعرف بالتحويل أو التحوير transformation وذلك حسب تجارب غريفيت في هذا المجال حيث تسمى الخلايا التي تلقت بالـ DNA بالخلايا المتحولة transformant cell ،وتتم عملية التحويل الوراثي من خلال انتقال الـ DNA في أجناس عديدة من الكائنات الحية .

آلية لانتقال الـ DNA بين سلالات الكائنات الحية وهي :

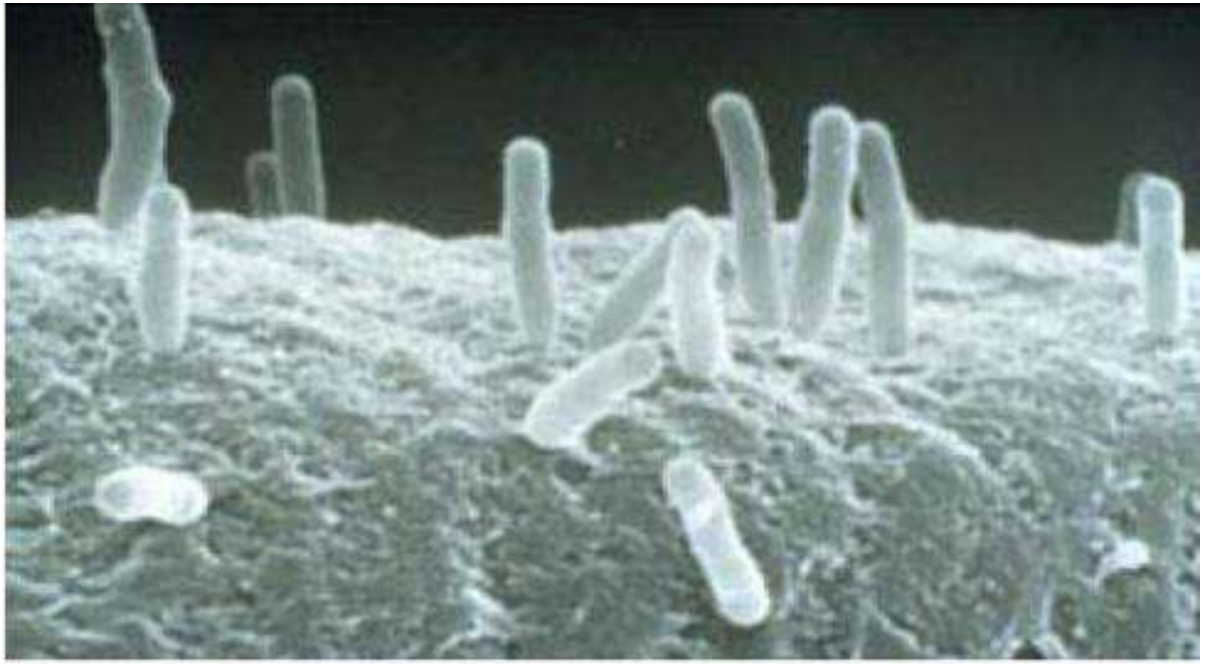
١) أليه النقل أو التحويل بواسطة تقانة transduction :- في هذه التقانة يتم نقل الـ DNA من خلية إلى خلية المستقبلة وان الخلية التي تستقبل الـ DNA والتي تتحول تسمى transductant

٢) إليه الثانية وهي الاقتران conjugation :- هذه التقانة تتم بالاتصال المباشر بين خلية وأخرى وتعتمد هذه على مواد وراثية خارجة عن الكروموسوم تسمى البلازميد plasmids والبلازميد عبارة عن جديلة ثنائية من dsDNA ذي شكل دائري مغلق بروابط تساهمية covalent

لقد برهنت أيضا تقانة الانتقال بين البكتيريا والنبات وذلك من خلال سلالة من بكتيريا agrobacterium tumefaciens التي تحتوي على بلازميد طوله أكثر من 200 kbp الذي يحفز على تكوين ورم ويسمى Ti-plasmid ويمتلك هذا البلازميد القدرة على نقل بعض أجزاءه وبالتحديد T- DNA (طوله من ٢٠- ٣٠ kbp) إلى خلية نباتية حيث تتداخل هذه القطع مع جينوم الخلية النباتية في النواة ، لقد تم تطويع وملائمة بلازميد Ti من بكتيريا agrobacter بهدف إدخال صفات جديدة إلى النباتات (التي تسمى نباتات معدلة وراثيا transgenic plants) .لقد ساهمت تقانة نقل الجين بالأساليب الطبيعية إلى رسم الخرائط الجنينة لأنواع مختلفة من الكائنات الحية . التي تبين ترتيب الجينات المتنوعة وحددت المسافات التقريبية بينها

طريقة الاكروباكتيريم Agrobacterium –base method

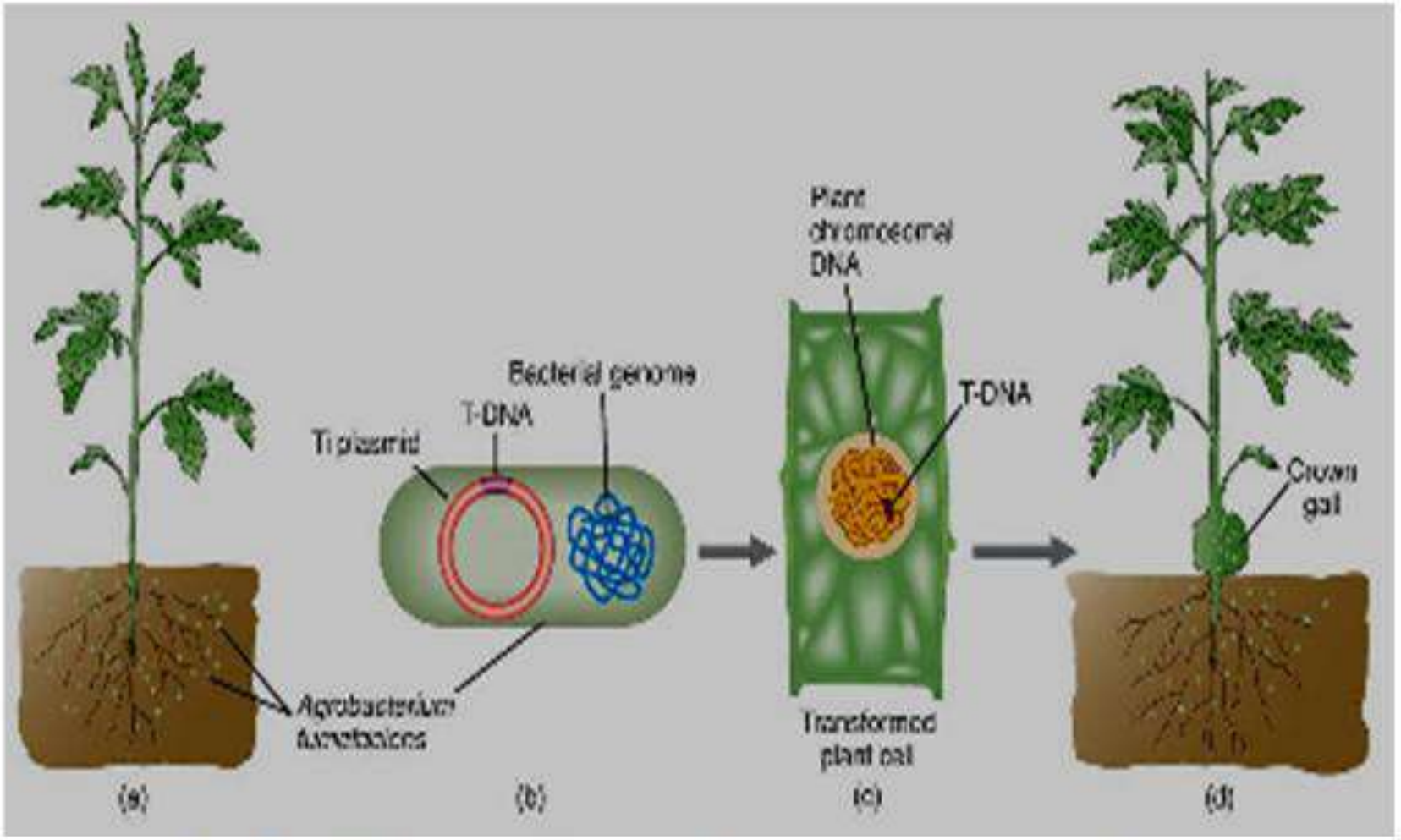
وهي نوع من البكتيريا(*Agrobacterium tumefaiens*) التي تعيش في التربة وتنتج الأورام التاجية Grown gall tumors في منطقة التاج على عدد كبير من النباتات ذوات الفلقتين Dicotelydon وتعتبر النباتات ذات الفلقة الواحدة Monocotyledon مقاومة للإصابة بمثل هذه البكتيريا .



صورة (٨٨) الاكروبكتيريا العصوية وهي نامية على سطح النبات

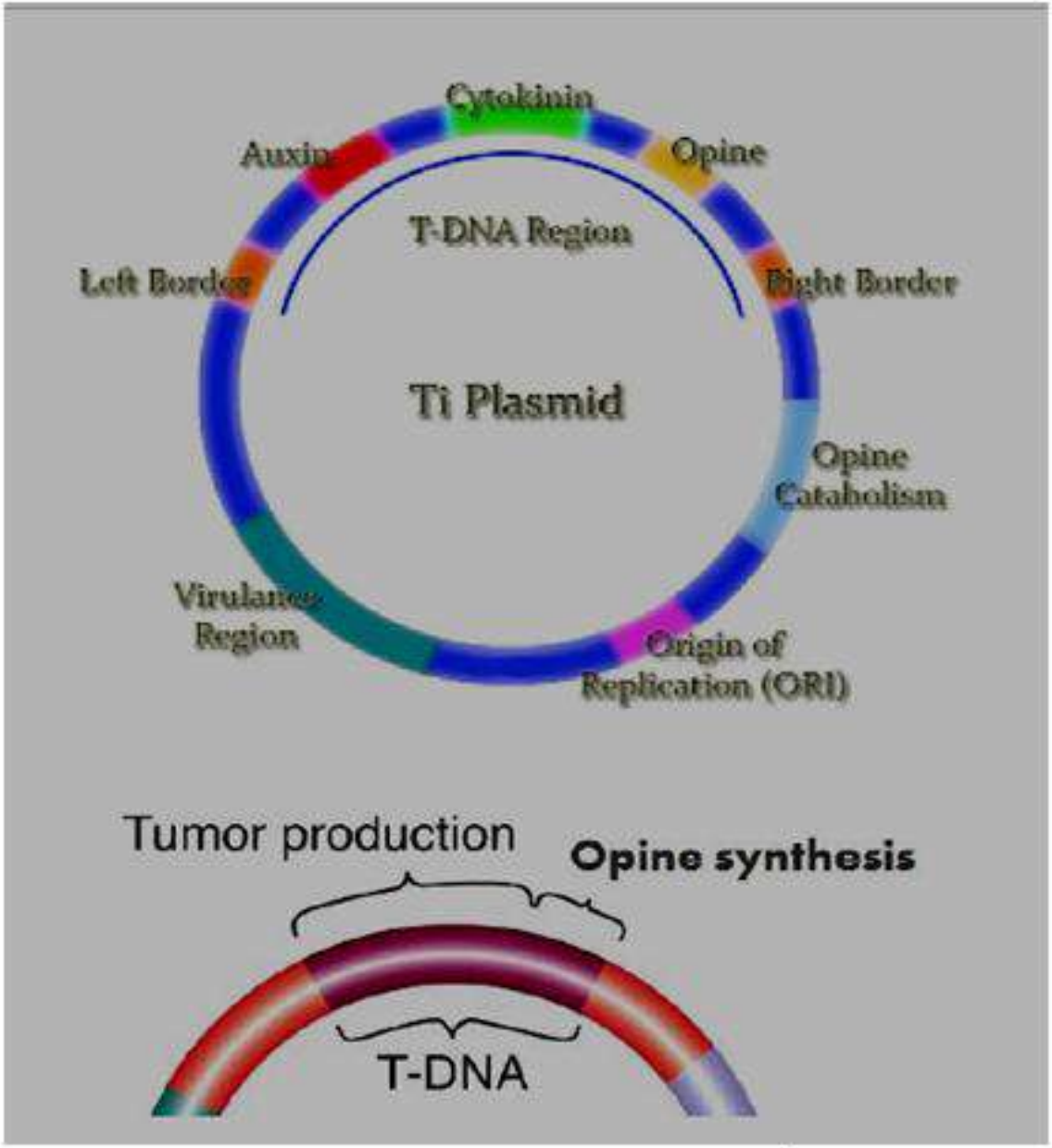
وترجع أهمية هذا النوع من البكتيريا بأنها تقوم بصورة طبيعية بنقل الجينات إلى النبات حيث يوجد داخل خليتها (بالإضافة إلى الكروموسوم الدائري الباكتيري) بلازميد حلقي ثنائي الشريط (حوالي ٢٠٠ KBP، كيلو بير باس) ويعرف هذا البلازميد باسم بلازميد أحداث الأورام (Tumor inducing or Ti-plasmid) والاكروباكتيريم التي تحتوي على هذا البلازميد تكون قادرة على أحداث الأورام التاجية على نباتات ثنائية الفلقة ، لقد اتضح بان الاورام التي تنتج على النبات تكون نتيجة غرس قطعة من الـ DNA من الـ Ti-plasmid في كروموسوم النبات المصاب وتعرف هذه القطعة بالـ T-DNA وتحتوي هذه القطعة على جينات تشفر لتخليق الهرمونات النباتية مثل الاوكسين Auxin و السايتوكانين Cytokinin) وهذه تجعل الخلية النباتية تنقسم بدون أي تحكم Uncontrollably فبذلك تنشأ الأورام (السرطانية) على النبات .

تعيش هذه البكتيريا في التربة (A) وتنتج الأورام التاجية في منطقة التاج على النبات (D) ويتم غرس قطعة تعرف باسم T-DNA من Ti-plasmid (B) إلى كرموسوم النبات المصاب (C)



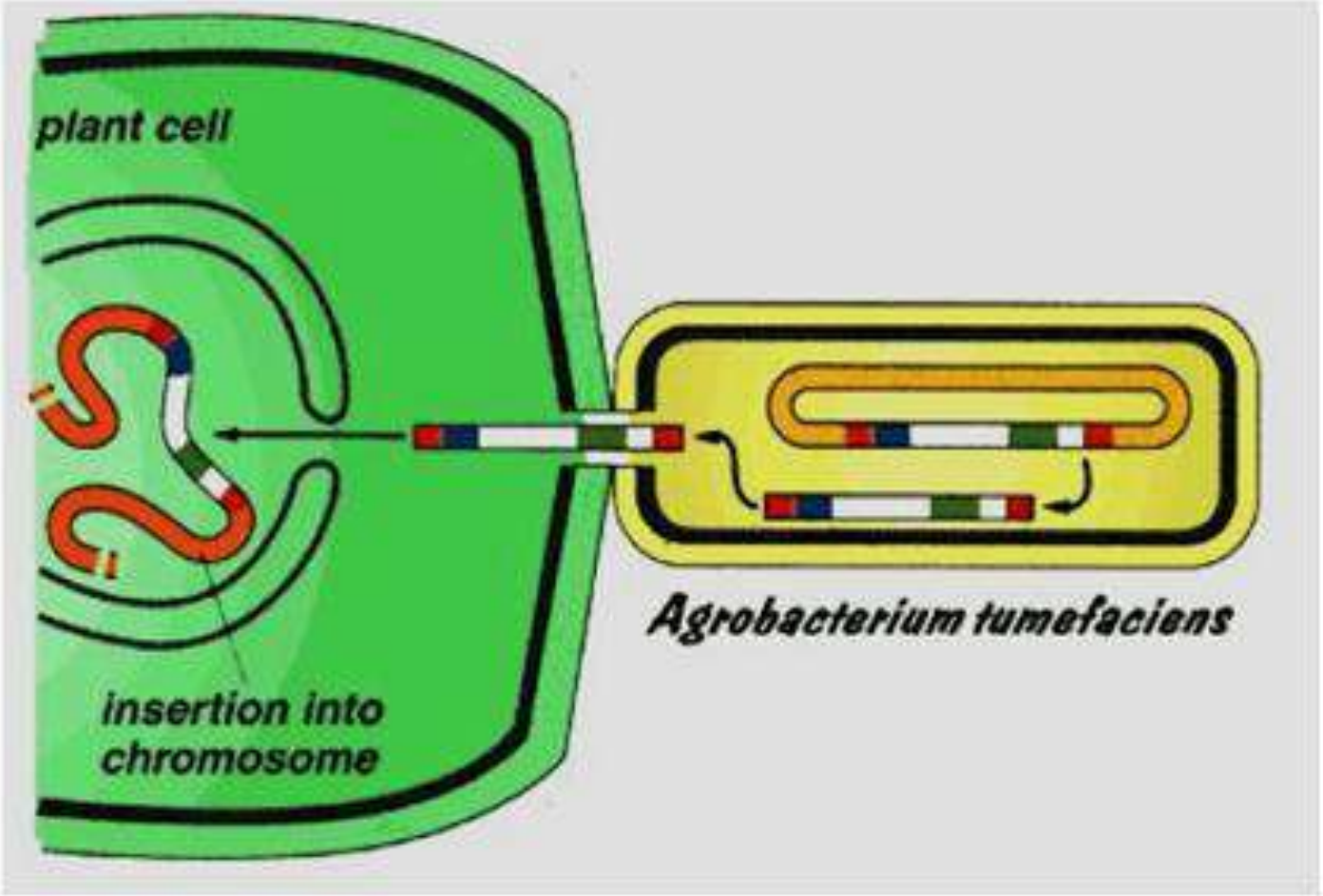
شكل (٨٩) الاكروباكتيريم (A) في التربة ، (B) غرس قطعة من Ti–DNA ، (C) كروموسوم النبات المصاب ، (D) نمو الاورام في منطقة التاج (عن ، رفعت و العتيبي ،٢٠٠٨)

ويتكون الـ Ti- plasmid من منطقة الـ T-DNA التي تمتد من الحد الايسر Left border (24 bp) إلى الجهى اليمنى Right border (24 bp) وتحتوي على جينات تشفر لتخليق الهرمونات النباتية (الاوكسين والسايتوكانين) كما أنها تحتوي على جينات لتخليق بعض الأحماض الامينية الغير عادية (تخليق الاوبين Opine) التي لا يتمكن للنبات من استخدامها لكن الاكروباتيريم تكون قـــــادرة فقط على استخدام هذه الأحمـــاض الامينية الشاذة ، كمـــا توجد الجينات التـــي هي مسؤولة عن هـــدم (استعمال) الاوبين Opine catobolsim خـــــارج منطقة Ti-DNA كما يلاحظ أيضا مكان وجود المنطقة المصابة التـــي تعرف باسم Virulrnce region وتكون هذه المنطقة بها جينـــــات تعرف باسم Vir genes (الجينات المرضية) وإذا غابت المنطقة المرضية مـــن البلازميد لا تنتقل منطقة T-DNA إلى النبات



شكل (٩٠) منطقة احداث الاصابة بالاورام (عن ، رفعت و العتيبي ، ٢٠٠٨)

والجدير بالذكر أن الجينات التي تشفر لتخليق الهرمونات النباتية (الاوكسين والسايتوكانين) والاوبين في منطقة T-DNA لها المحفزات Promoters الخاصة بالكائنات الراقية وليست محفزات الكائنات الأولية النواة وهذا يفسر لماذا لا تعمل هذه الجينات في خلية الاكروباكتيريم وتعمل فقط بعد دخولها في كروموسوم النبات المصاب ، أما الجينات المسؤولة عن استعمال Opine catabolism والتي توجد خارج منطقة T-DNA فلها المحفزات Promoters الخاصة بالكائنات الأولية النواة وهي تعمل في خلية الاكروباكتيريم وهذه لا تنقل إلى النبات



شكل (٩١) دخول الأكروباكتيريم إلى كروموسوم النبات (عن ، رفعت و العتيبي ،٢٠٠٨)

إذن ما هي استفادة هذه البكتيريا من هذا الورم السرطاني ؟

كما تم ذكره سابقا فان منطقة T-DNA التي انتقلت من البكتيريا إلى الكروموسوم النبات تحتوي على جينات تشفر لتخليق الهرمونات النباتية الاوكسين والسايتوكانين ، وجينات لتخليق نوع غير عادي من الأحماض الامينية Opine وبالتالي فان خلايا النبات داخل الورم سوف تصبح بمثابة مصانع لتصنيع هذه الأحماض الامينية الغير العادية لمصلحة الاكروباتيريم حيث أنها فقط القادرة على استخدام هذه الأحماض الامينية الشاذة (تقوم البكتيريا هذه باحتلال طاقة النبات أي احتلال جيني) .

وتبدأ عملية العدوى إذا ما أصيب نبات مجروح بهذا النوع من البكتيريا اذ تنتج خلايا النبات المجروح مواد فينولية تدفع جينات المنطقة المصابة (المرضية) VirA و ViraG إلى العمل لإنتاج بروتينات Vir –protiens التي تؤدي إلى كسر شريط مفرد في منطقة الجهى اليمنى Right border ثم كسر أخر مفرد في منطقة الحد الأيسر Left border وتنتقل منطقة T-DNA إلى كروموسوم النبات (أي في أي موقع على الكروموسوم النبات) . كما يلاحظ أن البكتيريا لا تدخل إلى الخلية النباتية وإنما تنتقل نسخة من منطقة T-DNA من البكتيريا إلى كروموسوم النبات المصاب لتبدأ خلايا النبات بعد ذلك في الانقسام الغير الطبيعي وينشأ بذلك الورم السرطاني .

إذن كيف يمكن أن نستخدم الهندسة الوراثية Gentic engeneering لكي يصبح بلازميد أحداث الاورام Ti-plasmid مفيدا في إدخال الجينات مرغوبة إلى النبات .

تتم هذ بالطرق التالية :

١) إزالة جينات إحداث الورم Tumor production من منطقة T-DNA وهي الجينات التي تشفر لتخليق الهرمونات النباتية (Auxin , Cytokinin) في البلازميد وتسمى هذه التقانة بنزع السلاح Disarming فبذلك لا يتكون الورم السرطاني على النبات .

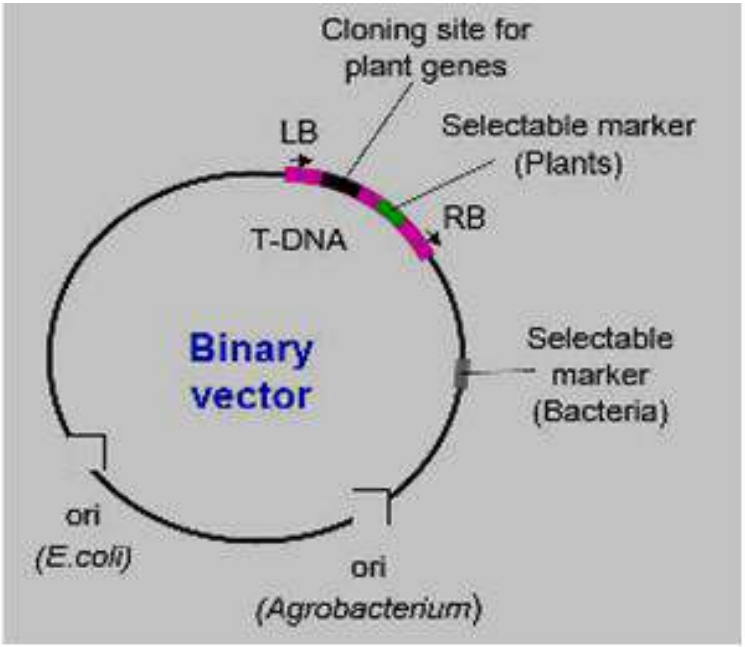
٢) الاحتفاظ فقط بالحد الأيمن Right border والحد الأيسر Left border إذ يحدث فيهما الكسر المفرد الضروري لانتقال منطقة الـ T-DNA إلى النبات .

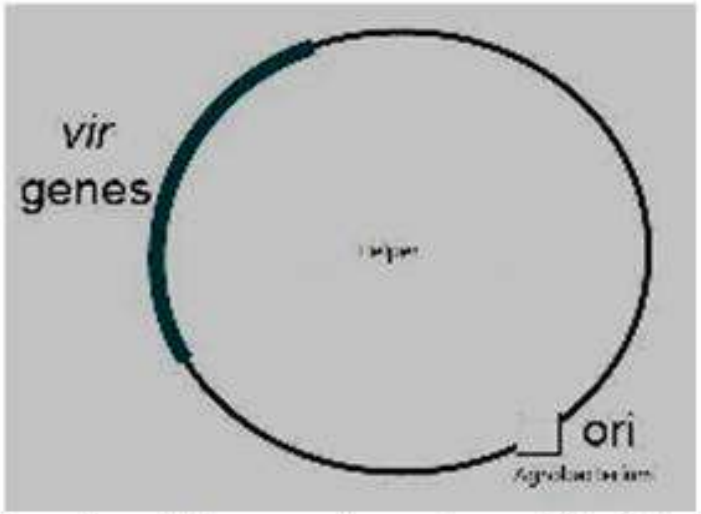
٣) تصغير حجم البلازميد حتى يمكن التعامل معه بسهولة وبالطبع لا بد ان نحتفظ بجينات المنطقة المرضية التي تعرف باسم Virulence region لان هذه الجينات ضرورية لانتقال منطقة T-DNA إلى كروموسوم النبات ولكن من الممكن أن تكون جينات المنطقة المرضية على بلازميد أخر مساعد Helper مختلف عن البلازميد الذي يحمل منطقة T-DNA وتسمى هذه التقانة بنظام النواقل الثنائية كما في الشكل ( ) Binary vector system حيث يتواجد كلا البزميدين معا Co-reside في الاكروباتيريم ولا يندمجا معا . وبصورة عامة يطلق على الناقل الذي يحتوي على الحيدن (Left and Right) أسم الناقل الثنائي أيضا

٤) إدخال ألجين المرغوب نقله بين الحدين (الأيمن والأيسر) في داخل منطقة T-DNA المنزوع منها الجينات أحداث الورم، فبذلك يدخل ألجين المرغوب إلى داخل كروموسوم النبات بدلا من جينات التي تحدث الأورام.

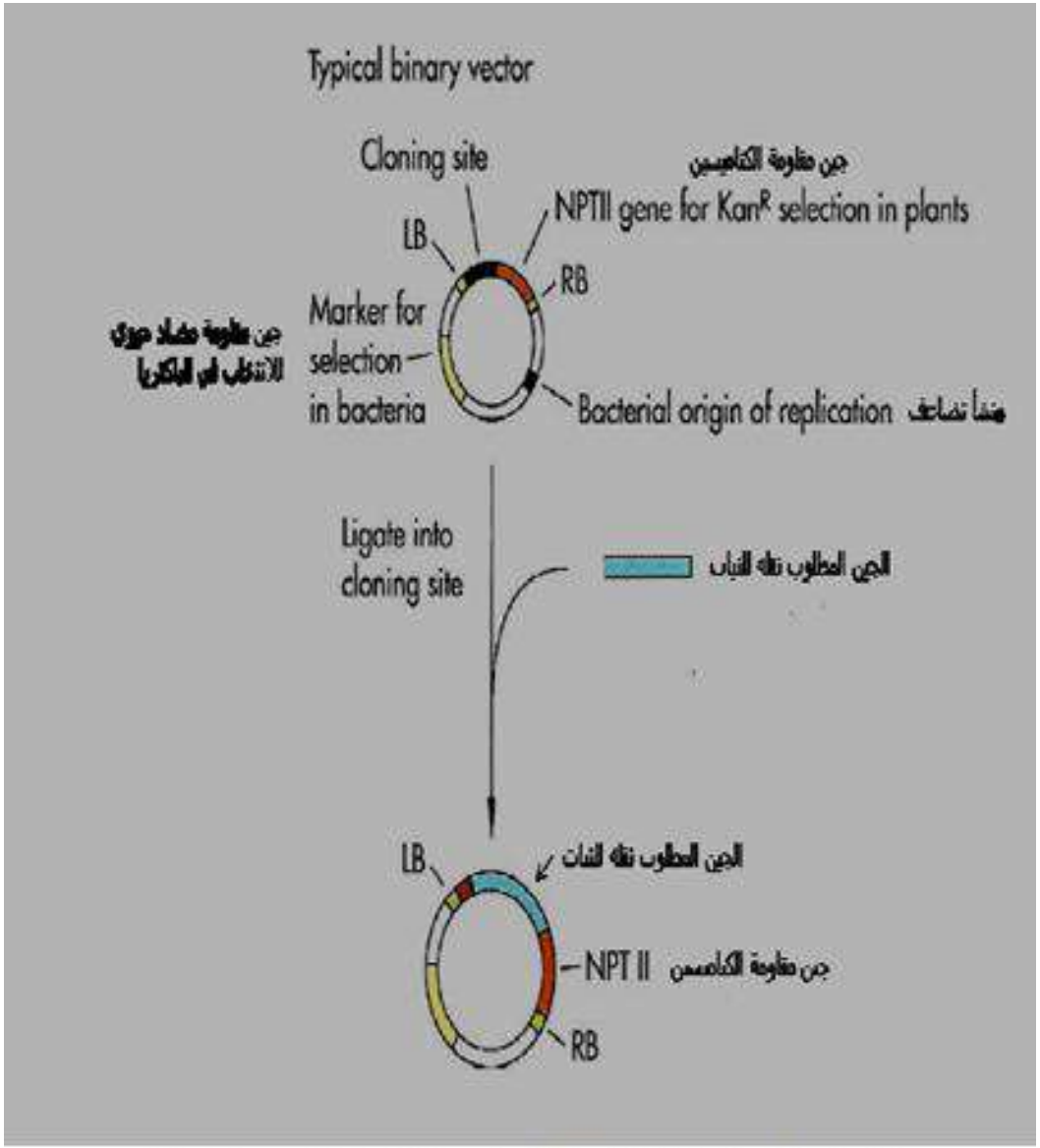
٥) إدخال جين انتخابي بين الحدين الأيمن والأيسر حتى يعمل كعلامة انتخابية في النبات Selectable marker in plant

٦) إدخال جين انتخابي خارج منطقة T-DNA حتى يعمل كعلامة انتخابية في البكتيريا Selectable marker in bacteria





شكل (٩٣) نظام الناقل الثنائي Binary vector system (عن رفعت والحتيبى ، ٢٠٠٨)



شكل (٩٤) مخطط الناقل الثنائي (عن رفعت والعتيبي ، ٢٠٠٨)

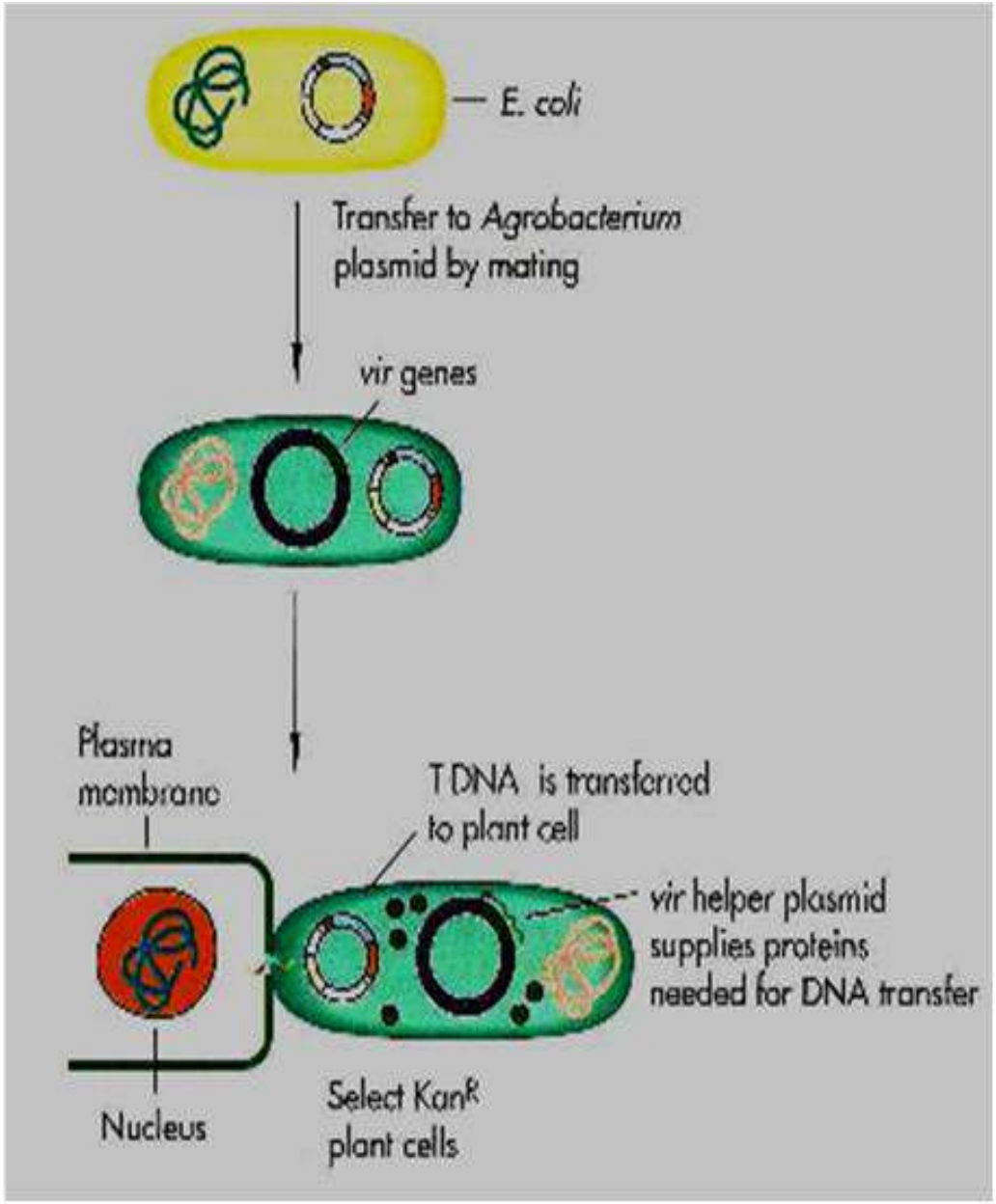
الاكروباكتيريا وأخر يعمل في بكتيريا القولون ، في الشكل أعلاه وفي الاسفل البلازميد المساعد يحتوي على جينات المنطقة المرضية (المصابة) التي تعرف باسم Vir gene ويوجد في الاكروباكتيريم لإنتاج البروتينات الضرورية لانتقال ألجين المرغوب من الناقل الأول إلى النبات ويحتوي هذا البلازميد على منشأ تضاعف يعمل في الاكروباكتيريم ويمكن إن يحتوي على منشأ أخر يعمل في البكتيريا القولون ..

وتتلخص تقانة استخدام الناقل الثنائي Binary vector في :-

أ) إكثار الناقل الثنائي Binary vector أولا في بكتيريا القولون *E. coli*

ب) إدخال ألجين المرغوب في المكان المخصص Cloning site .

نجد في الشكل الأعلى الناقل الثنائي يحتوي فقط على الحد الأيمن Right border والحد الأيسر Left border من منطقة الـ T-DNA (منزوع السلاح Disarmed) وان منطقتي الحد الأيمن والأيسر ضروريان لانتقال ألجين المرغوب إلى النبات ، وتتم تقنية إدخال ألجين المرغوب إلى النبات في منطقة الكلونة Cloning site المبينة في الشكل أعلاه ، كما يلاحظ انه يوجد جين انتخابي بين الحدين RB و LB وهذا ألجين ينقل إلى النبات ويعمل كعلامة انتخابية في النبات ويوجد جين انتخابي أخر خارج الحدين الأيمن والأيسر RB and LB وهذا الجين لا ينتقل إلى النبات ويعمل كعلامة انتخابية في البكتيريا ، يحتوي الناقل الثنائي على منشأ تضاعف يعمل في



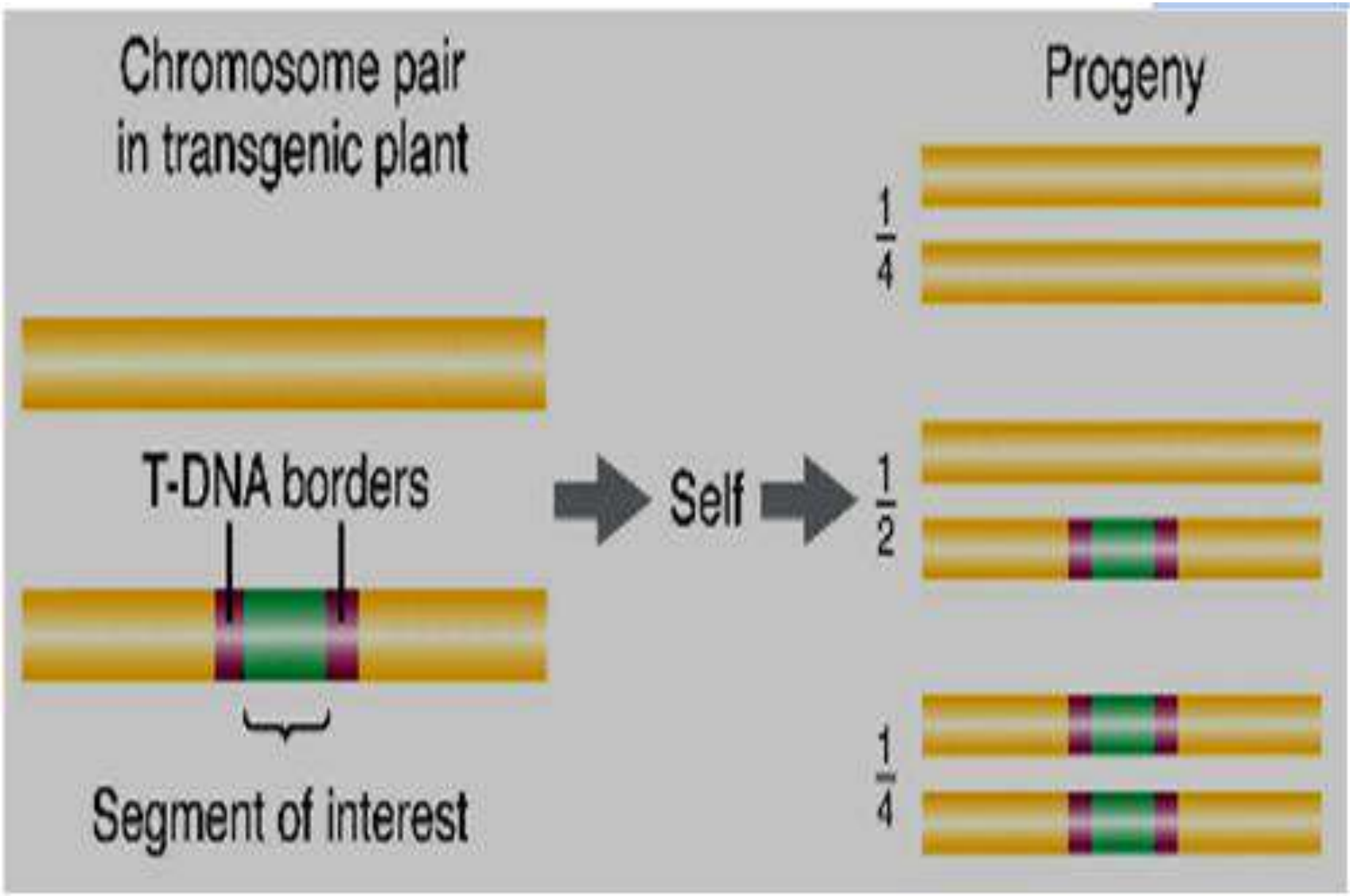
شكل (٩٥) ادخال الناقل الثنائي في الاكروباكتيريم (عن ، رفعت و العتيبي ،٢٠٠٨)

ج) إكثار الناقل الثنائي مرة ثانية إلى بكتيريا القولون E. coli ثم إدخاله في الاكروباكتيريم التي تحتوي على البلازميد المساعد Helper

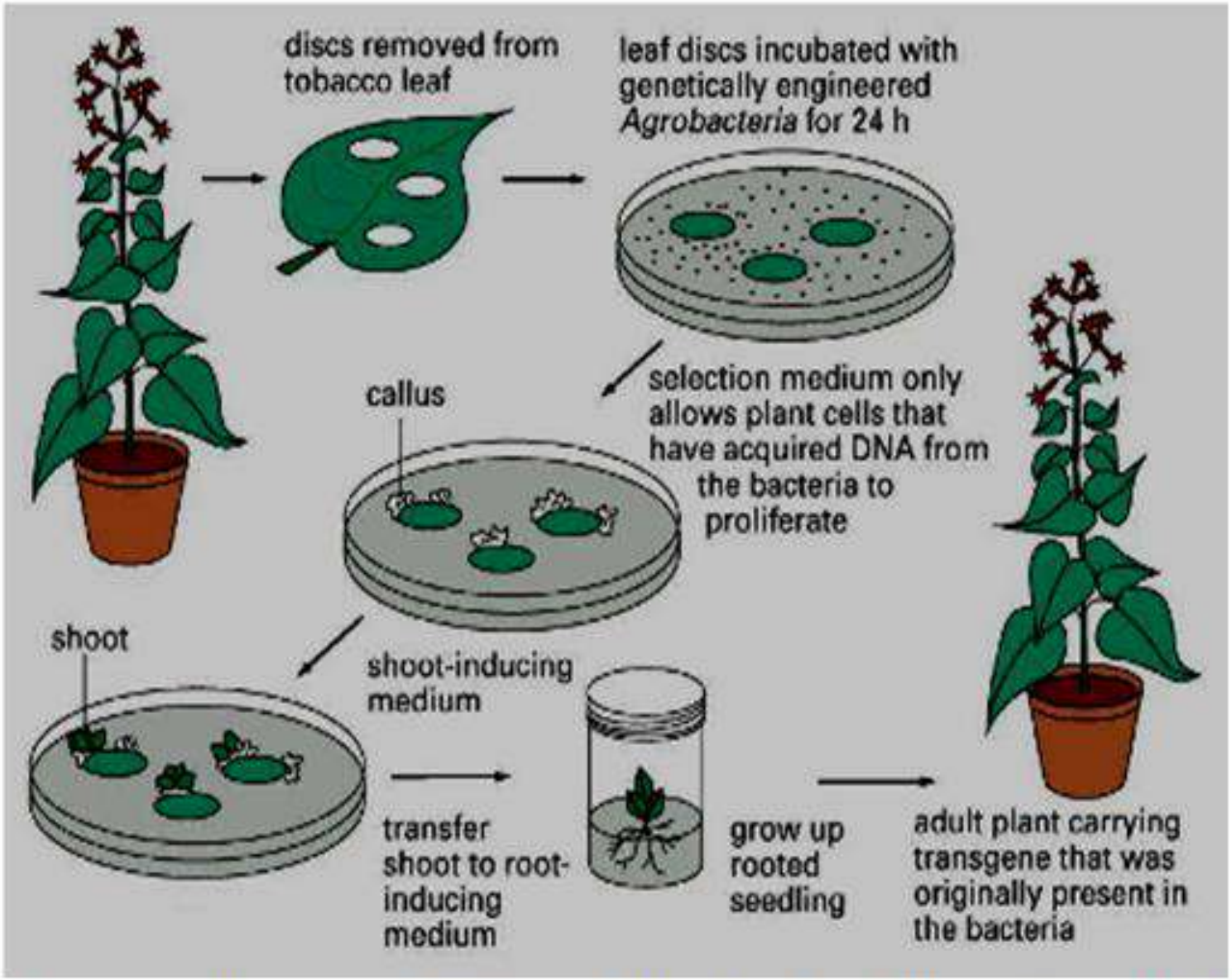
د) تستخدم الاكروباكتيريم لإحداث عدوى لخلايا نباتية منزرعة في المختبر (أقراص الأوراق لأنها تماثل النسيج المجروح) فبذلك تدخل منطقة T-DNA والتي تحتوي على ألجين المرغوب نقله ، من الناقل الثنائي في الاكروباكتيريم إلى إحدى الكروموسومات في الخلية النباتية (فبذلك تحولت هذه الخلية وراثيا Transformed .

هـ) يتم انتخاب الخلية النباتية التي تحورت وراثيا باستعمال ألجين الانتخابي الموجود بين الحدين Left and Right border والذي يعمل كعلامة انتخابية في النبات

و) وأن منطقة T-DNA تغرس في كروموسوم واحد فقط من الكروموسومات المتماثلة فان النبات الناتج يحتوي عل نسخة واحدة من ألجين الجديد One copy of gene (Homizygous) ، ويجب تلقيحه ذاتيا Selfing حتى يكون الموقع الجديد بحالة متماثلة Homozygous



شكل (٩٦) موقع الجديد متماثل Homozygous



شكل (٩٧) زراعة اقراص الاوراق وتكوين نبات كامل محور وراثيا (عن ، رفعت و العتيبي ،٢٠٠٨)

شكرا لكم
أعزائي الطلبة

عزل البروتوبلاست وزارعته وعملية التهجين الجسمي
Isolation the protoplast and culture and somatic hybridization

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

كمال بنيامين ايشو

جامعة الموصل / كلية الزراعة والغابات

٢٠٢٢

التطبيقات العملية والعلمية لعزل البروتوبلاست في مجال النبات

ترتبط خلايا النباتية في الانسجة متعددة الخلايا مع بعضها من خلال Plasmodesmata ، وتشكل مزارع البروتوبلاست النبات نظاما ممتازا للحصول على خلايا مفردة من الكائنات الحية الراقية لدراسة وظائفها تحت ظروف مسيطر عليها ، ويمكن الحصول على ملايين الخلايا من عزل البروتوبلاست مماثلة ومطابقة للنظام الجرثومي وتستخدم لاغراض عديدة منها :-

أ) عزل الظواهر الناشئة تلقائيا أو نتيجة أستخدام المطفرات في مستعمرات الخلايا الناشئة من خلية مفردة

ب) لا يمكن دمج الخلايا الجسمية الا باستعمال البروتوبلاست من أجل الحصول على نباتات هجينة Hybrid plants في الأنواع التي يصعب الحصول منها على أنواع هجينة

ج) إمكانية أجراء التعديلات الوراثية من خلال مادة الـ DNA أو بإدخال أعضاء الخلية Organelles باستعمال البروتوبلاست

د) يمكن الحصول على نباتات كاملة من خلية مفردة كون خلايا النبات قادرة على إعادة التكوين Totipotent

هـ) تعد هذه التقانة نظاما فريدا لدراسة العمليات الأساسية المهمة في تكوين الجدر الخلوية .

و) يعتبر البروتوبلاست مادة جيدة ومفيدة في دراسات الأغشية الخلوية كعمليات النقل والامتصاص وتراكيب الأغشية

ز) يعتبر البروتوبلاست مادة مناسبة جدا لتقانات عزل أعضاء الخلية Organelles والكروموسومات Chromosomes ، وذلك بسبب غياب جدار الخلية السميك العازل بالإضافة عن تضمين المواد الغريبة عنه وإدخالها في السايتوبلازم مثل النواة (الانوية) Nuclies وقطع (شظايا) الـ DNA والبلازميدات Plasmides وغيرها من المواد .

عزل بروتوبلاست خلايا النبات Isolation of cells plant protoplasts

هنالك طريقتين عزل البروتوبلاست وهما الطريقة الميكانيكية والإنزيمية ، وان طريقة العزل الميكانيكية لا تستخدم عمليا حالية وأصبحت شئ يذكر كتطور للتقانات من ناحية التاريخية ، حيث كانت تتضمن خطوات العزل الميكانيكي ب قطع جدر الخلايا المنكمشة (المبلزمة) بشفرة حادة بغية تحرير البروتوبلاست الخلية .

إما خطوات تقانة العزل الإنزيمية للبروتوبلاست من خلايا النباتية :

أولا: عزل من خلايا الأوراق : تجلب الأوراق من النباتات السليمة والنامية في البيت الزجاجي وتعقم بالطرق المذكورة سابقا (مراجعة موضوع تعقيم الجزء النباتي) ثم تزال البشرة السفلي بملقط ثم تقطع إلى أجزاء صغيرة لسهولة تقشير ويجب أعاة استخدام الأوراق الفتية الحديثة النمو ،

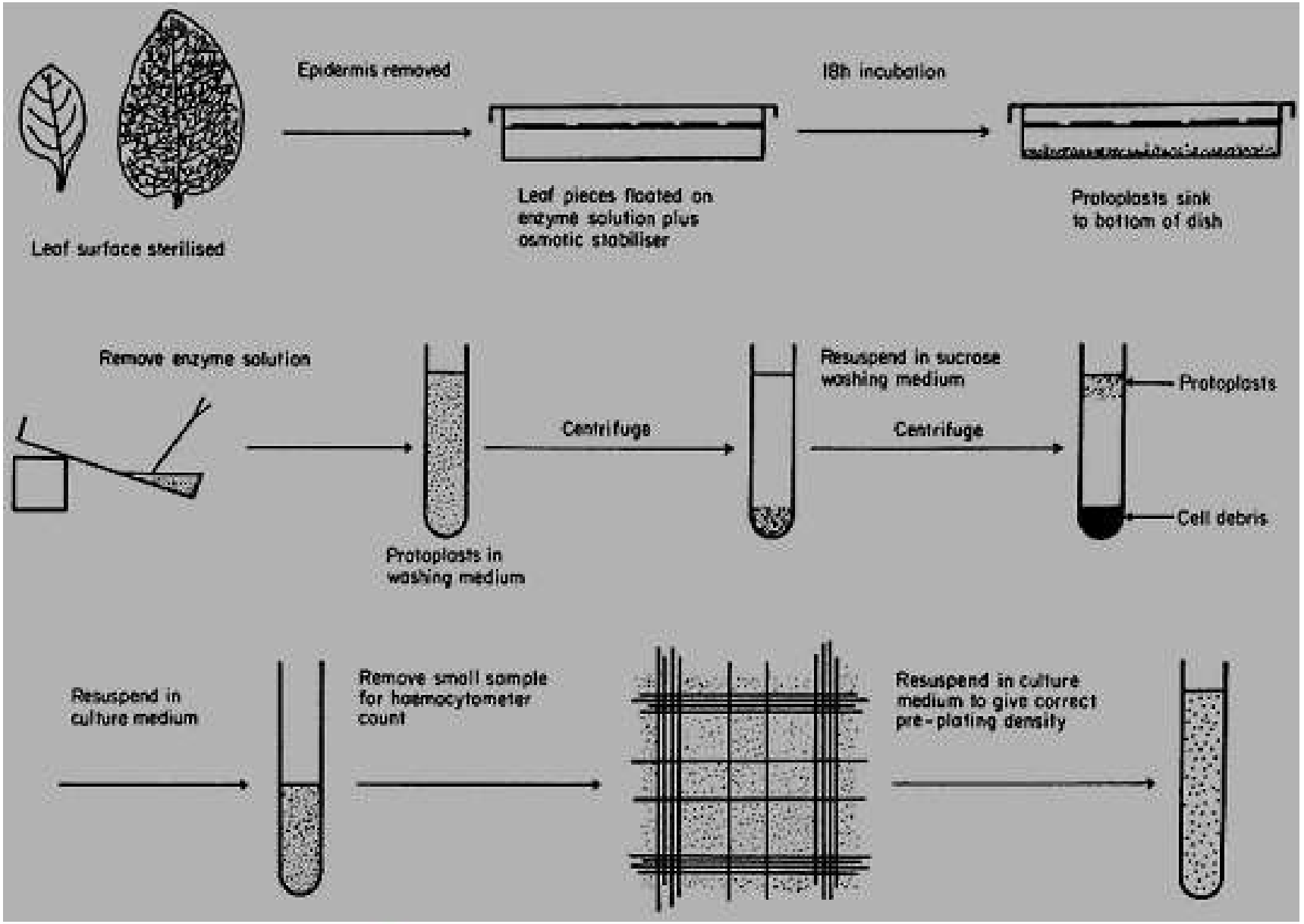
وتتضمن هذه التقانة بالخطوات التالية :

أ) تعقيم الأوراق

ب) تقشير طبقة رقيقة من البشرة السفلى للورقة The lower epidermis

ج) تحضين الورقة في محلول الإنزيم المستخدم لتقانة العزل

د) عزل وتنظيف البروتوبلاست



شكل (٨٦) عزل البروتوبلاست من خلايا الورقة

ثانيا : عزل البروتوبلاست من مزارع الكالس والمعلقات الخلوية :إن الزروعات النامية خارج الجسم الحي In vitro هي عبارة عن مواد نباتية مع قمة وبالتالي يمكن استخدامها مباشرة في عملية عزل البروتوبلاست ، وتعتبر الزروعات النامية خصوصا في مرحلة الطور الآسي Exponential phase كمواد مناسبة لتقانة العزل البروتوبلاست وبصورة عامة يكفي (غرام واحد) من المواد النباتية لعزل البروتوبلاست كما يمكن عن طريق Optimization كعوامل من خلال التجربة تغيير الانزيم أو تركيزه وتغيير تراكيز منظم الازموزي (المبلزم) Osmoticum وأيضا فترات الحضن ونوع النسيج .

كما تتوفر في الأسواق مستحضرات تجارية مختلفة للانزيمات ، والفكرة من ذلك هي جمع إنزيم إذابة الصفيحة الوسطى وأنزيم الهضم لجدار الخلية في توليفية أو تركيبة ملائمة بغية ضمان تحرير أكبر عدد من البروتوبلاست من كمية واحد غرام من المادة النباتية ومن الأنزيمات التي تستعمل في هذه التقانة :-

١) Cellulase R- 10
٢) Cellulase –Onozuka R-10
٣) Himicellulase
٤) Drieselase

زراعة البروتوبلاست Protoplasts culture

عند البدء بتقانة زراعة البروتوبلاست المعزول يجب مراعاة النقاط التالية

١) الجهد التناضحي Osmotic pressure

تحتاج البروتوبلاست المعزولة إلى حماية تناضحية في وسط الزراعة لحين تكون جدار قوي حولها ، كما يجب تنظيم الجهد التناضحي للوسط إلى نفس مستوى جهد المحلول الإنزيم ومحلول الغسل ، علما بان إطالة فترة الزراعة تحت جهد تناضحي عالي قد ينتج عنه اسمرار المزارع وتثبيط نمو الكالس ، يتم خفض جهد تناضحي بصورة تدريجية مع تكون جدار الخلية والانقسامات الخلوية ، لان انخفاض الجهد الحاد قد يسبب انفجار البروتوبلاست والخلايا ، وايضا يؤثر في نمو الخلايا .

٢) المغذيات المطلوبة Nutritional requirements

بصورة عامة تتشابه المكونات الأساسية لوسط زراعة البروتوبلاست مع وسط زراعة الخلية وهي أوساط (MS , B_5) ،وأن إجراء بعض التعديلات في نسب الكاربون والنتروجين والفيتامينات ومنظمات النمو يمكن أن يكون لها تأثيرات نافعة في نجاة البروتوبلاست وتكون مستعمرات الخلايا ، ويبدو ذلك بوضوح في تركيز أيون الامونيوم، لقد وجد أن للامونيوم تأثير سمي في وسط زراعة(Media culture) البروتوبلاست لنبات البطاطا وبعض أشجار الفاكهة وأنواع من نباتات العائلة المركبة ، ومن المحتمل أن ينمو البروتوبلاست بكثافة منخفضة عند أغناء الوسط بالفيتامينات والمركبات العضوية المعقدة ، ويمكن استعمال وسط زراعة الكالس ، لزراعة البروتوبلاست نفس النوع .

٣) منظمات النمو Growth regulators

تحتوي جميع أوساط الزراعة على توليفة مناسبة من الاوكسين والسايتوكاينين لتنشيط نمو وانقسام الخلايا ، ويمكن زراعة بعض أنواع البروتبلاست دون الحاجة إلى منظمات النمو كما في حالة بروتوبلاست نباتات الحمضيات ، وبصورة عامة يمكن استخدام نفس تراكيز وتوليفات منظمات النمو المستخدمة في مزارع الخلية لأوساط زراعة البروتوبلاست .

٤) العوامل البيئية Environment factors

إن شدة الإضاءة العالية تثبط عملية انقسام البروتوبلاست لذلك يجب زراعة تحت الضوء المعتم أو الظلام ، كما يجب أن تزرع على درجات الحرارة تتراوح بين ٤- ٢٦ درجة مئوية ، ولقد وجد أن معاملة حرارية لمدة قصيرة (٥ دقائق) على درجة حرارة ٤٥ درجة مئوية يمكن أن تحسن انقسام البروتوبلاست في نبات الحنطة والرز ، وبشكل مشابه يمكن ان تنشط ذبذبة تيار كهربائي بفولتية واطئة لانقسام البروتوبلاست ، وينمو البروتوبلاست لأغلب الأنواع بصورة جيدة في حموضة (pH = ٥.٥ – ٥.٨) .

٥) كثافة الزراعة Culture density

تعتمد زراعة البروتوبلاست الناجحة بصورة عامة على نسبة (حجم الوسط / الخلية) أي الكثافة ويجب أن تحدد كثافة البروتوبلاست المثالية بالتجربة ، وبصورة عامة تزرع البروتوبلاست بكثافة ٠.٥ – ٢ x ١٠٥ (بروتوبلاست / سم ٣) من وسط الزراعة ، وعمليا يخفف تدريجيا كثافة زراعة الخلايا الناشئة من البروتوبلاست مع خفض متزامن للمادة المبلزمة Osmoticum في وسط الزراعة Media culture

يمكن زراعة البروتوبلاست وتحفيزه على الانقسام في أوساط سائلة وصلبة من Agar ، ويمكن تنميتها في وسط سائل لبعض الوقت على إن تنقل كتل الكالس المتكون الدقيقة إلى وسط صلب لنمو إضافي وأيضا لحصول عملية التكوين التشكيلي Morphogenesis كما يمكن زراعته بطريقة النشر في أطباق بتري أو طلي البروتوبلاست على وسط صلب ، ومن فوائد تقانة الطلي بالبروتوبلاست هي سهولة مشاهدة كل خطوات الانقسام والنمو والتطور إلى نبات كامل من بروتوبلاست فردية ، والطلي عبارة عن تقانة فاعلة لإنتاج مستعمرات ناشئة من خلية مفردة ، وظفت بفاعلية في انتخاب مستعمرات خلايا المفردة ، وانتخاب سلالات من خلية مفردة في العديد من النباتات .

الخطوات الأساسية لعملية نشوء النباتات من زراعة البروتوبلاست :

١) إعادة تكوين الجدار الخلوي

٢) انقسام الخلايا المتكونة منتجة تجمعات خلوية صغيرة تتطور لاحقا إلى مستعمرات خلوية تنمو إلى كتل من الكالس

٣) تكوين الأعضاء Organogenesis والتي يمكن حثها بواسطة نظرية Miller و Skoog

٤) حث الكالس الناتج على تكوين الأجنة الجسمية Embryogenesis

تقانة أنتاج الهجن بدمج البروتوبلاست Protoplast fusion hybrides technology

بصورة عامة وفي الطبيعة تتكون البيضة المخصبة بمجموعة جينات جديدة تنتج من اتحاد الكميتات ـ وان اتحاد الكميتات أحادية الكروموسوم Haploid يعيد تضاعف الكروموسومي الطبيعي Natural diploid ، ويعتبر التلقيح الخلطي احد مصادر التباين الوراثي الرئيسية وان عدم التوافق على مستويات مختلفة قبل وبعد عملية الإخصاب هو العامل الذي يحدد لنجاح عملية التلقيح بين الأنواع المتباعدة في النباتات ومن ثم يتم الحفاظ على صفات النوع المميزة ، كما لا يمكن الحصول على هجن لكل الأنواع النباتية المرغوبة بإتباع برامج التهجين التقليدية .

فبذلك تفتح تقانة دمج البروتوبلاست مسالك جديدة لتجاوز عدم التوافق الجنسي وإنتاج الهجن الجسمية . وتعرف هذه التقانة أي تقانة إنتاج الهجن من دمج خلايا الجسمية (2N) أو التهجين الجسمي Somatic hybridization

خطوات تهجين دمج الخلايا تتضمن:

١) عزل البروتوبلاست

٢) تحفيز دمج الغشاء الخلوي

٣) خلط السايتوبلازم ومكونات الخلية Organelles

٤) تكوين الانوية المؤلفة Synkaryones خلال زراعة خلية الهجين

٥) انتخاب نواتج الدمج

٦) التوصيف الجزيئي والبايوكيميائي للإخلاف الأولية ولنباتات الأجيال اللاحقة

طرق دمج البروتوبلاست Protoplast fusion methods

لقد اقترحت عدة طرق لتحفيز تقانة دمج البوتوبلاست بعد أن تحقق نجاح مبكر لاستخدام الدمج الطبيعي Spontaneous fusion أو باستخدام نترات الصوديوم ، ولانخفاض نسبة النجاح بهذه الطرق .

لذلك استعملت طرق أخرى لكي تحقق الهدف من ذلك ومن هذه الطرق :-

أولا: الدمج بواسطة محاليل القاعدية مع التركيز العالي من ايون الكالسيوم.

تحتوي البروتوبلاست على أغشية تحمل شحنات سالبة على أسطحها فبذلك يتحسن أسلوب حركة وانتقال البروتوبلاست بالهجرة الكهربائية بالايونات ثنائية التكافؤ خصوصا ايونات Ca^{+2} ، وان عملية تكتل التي يتوسطها معادلة شحنة الغشاء البلازمي السالبة بمحلول Ca^{+2} بتركيز 50 mM ويكون مخلوط مع تركيز ٠.٤ M من محلول مانتول عالي ذي الحموضة ١٠.٥ أدت إلى اندماج ساتوبلازمي حقيقي للبروتوبلاست لنبات التبغ وبروتوبلاست نبات البيتونيا Petunia

ثانيا : دمج بروتوبلاست بتقانة Polyethyleneglycol (PEG)

PEG عبارة عن مركب عضوي من نوع البوليمر وهنالك عدة أنواع منه ذات أوزان جزيئية متعددة تستعمل على نطاق واسع لتحفيز اندماج البروتوبلاست الذي تم فصله من النبات والـ PEG فوائد عديدة منها :

* يؤدي استخدامه إلى تجمع اثنين إلى ثلاث بروتوبلاست
* والنسب العاليه للـ Hetrokaryon الناتجة من عملية اندماج ثناي النوى.
* وان البروتوبلاست المفصول من خلية النبات ومعامل بـ PEG يؤدي إلى تكتل بشكل واضح والتصاق فيما بين البروتوبلاست وظهور مناطق واسعة من الأغشية البروتوبلازمية التي تكون ملتصقة مع بعضها البعض .

وبعد إزالة مادة الـ PEG فان البروتوبلاست الملتصق مع بعض يبدأ بالانفصال ،الا أن نسبة عالية منه تبقى في حالة الالتصاق وتتم بعد ذلك عملية الاندماج .

هنالك عوامل عديدة تؤثر على عملية الاندماج باستعمال الـ PEG وهي :-

١) الوزن الجزيئي لمادة الـ PEG

٢) تركيز الـ PEG في الوسط المستعمل

٣) كثافة البروتوبلاست الذي يتم زراعته

٤) درجة الحرارة عند حضانة البروتوبلاست الذي ينمى على وسط الذي يحتوي على مادة الـ PEG

٥) الجهد الكهربائي للوسط المستخدم أي الشحنات الموجبة) .

وبصورة عامة يعامل البروتوبلاست المفصول حديثا بمحلول الـ PEG ثم يضاف إلى الوسط الغذائي بتركيز (٢٥- ٣٣%) وزن/ حجم ، وبالنسبة للوزن الجزيئي فيستخدم عادة وزن جزيئي بحدود ١٠٠٠ دالتون .

وتعد تقانة الدمج باستخدام الطريقين (الـ PEG و محاليل pH العالي وكذلك نسبة عالية من ايونات Ca^{+2}من أفضل الطرق المتبعة لدمج البروتوبلاست وأكثرها كفاءة .

ثالثا: الدمج الكهربائي Electro fusion

بهذه التقانة يندمج البروتوبلاست مع بعضه البعض في حقل كهربائي متناوب غير متجانس بين قطبين كهربائيين ثم يبدأ الاندماج بامرار تيار كهربائي ذي فولتية عالية (٥٠٠ فولت / سم – ٣ kv /سم) لمدة قصيرة (١٠- ١٠٠ micro seconds) .وان عملية دمج الكهربائي هي **بايوفيزيائية بخطوتين :-**

الأولى : تتعرض البروتوبلاست إلى حقل كهربائي متناوب (٠.٥ – ١.٥ MHz) يخلق جزئ ثنائي الاستقطاب عن طريق الهجرة الكهربائية الثنائية ، وفي هذا الحقل الكهربائي الغير المتجانس تتصرف البروتوبلاست كجزيئات ثنائية الاستقطاب فتتحرك باتجاه الحقل التزايد بسبب فعل قوة الحقل وحجم الخلية وحركة الشحنة على سطح البروتوبلاست وفي المحلول المحيط بها ، ونتيجة الهجرة الكهربائية الثنائية المتبادلة في الحقل الكهربائي غير المتجانس وفي الحقل الكهربائي المتجانس تتكتل البروتوبلاست وترتبط مع بعضها لتكون سلاسل من البروتوبلاست .

الثانية : تحرر ذبة قصيرة (١٠- ١٠٠ ms) واحدة أو أكثر من تيار مباشر (DC ، ١-٣ KV /سم) تسبب تحلل عكسي للغشاء وينتج عنه تكون مسامات في الأغشية المتلامسة مع بعضها البعض ، وبهذه الطريقة تندمج الأغشية المتلامسة لتفتح الطريق أمام تكون خلية هجينية .

النواتج المحتملة لعملية الاندماج البروتوبلاست:

تكون نواتج عملية الاندماج المحتلمة بين نوعين من البروتوبلاست إحدى النواتج التالية :-

١) ناتج الاندماج الأول Hybrid(هجين) : يندمج فيه نوعان من البروتوبلاست ويكون ناتج الاندماج بروتوبلازم ويحتوي على السايتوبلازم ومحتوياته في كلا النوعين المندمجين ، إضافة إلى اندماج النواتين في نواة واحدة

٢) ناتج الاندماج الثاني Hetrokaryon : يكون البروتوبلاست الناتج حاويا على نواتين مع اتحاد السايتوبلازم

٣) ناتج الاندماج الثالث Cybrid : يكون البروتوبلاست الناتج حاوي على نواة إحدى البروتوبلاست الأم والنواة الثانية تفقد نتيجة تحللها ويحتوي على سايتوبلازم كليهما .

٤) ناتج الاندماج الرابع Chromosome loss : يكون البروتوبلاست الناتج حاويا على نواة إحدى الأنواع المندمجة كاملة ، أما الثانية فيحصل فيها فقد لبعض الكروموسومات .

فوائد تقانة التهجين السايتوبلازمي Cybridization وإنتاج الـ Cydrids

إن تقانة مزج السايتوبلازم ومحتوياته عن طريق التهجين الجسمي يفيد في :-

أ) نقل صفة العقم الذكري السايتوبلازمي كما عند تهجين بين (نبات التبغ والطماطة) .

ب) الاستفادة من الصفات السايتوبلازمية التي تسيطر عليها الجينات لبعض محتويات الخلية مثل(جينات المايتوكوندريا والكروبلاست) كمؤشرات لانتخاب الهجن الجسمية .

ج) تستعمل في نقل بعض الأعضاء (محتويات الخلية) التي يتم انتخابها .

تطبيقات التهجين الجسمي Somatic hybridization applications

١) إنتاج خطوط وراثية غير متجانسة Heterozygous lines ضمن النوع الواحد والتي تتكاثر فقط بطريقة الخضرية مثل البطاطا والموز وغيرها من النباتات

٢) إجراء تضريبات (تهجينات) بين الأنواع والأجناس النباتية البعيدة عن بعضها البعض والتي لا يمكن إجرائها في الطبيعة اذ تمكن الباحثون من إجراء تهجينات ناجحة وحصلوا على هجدن جسمية ضمن الأجناس العائدة لبعض العوائل النباتية مثل العائلة الصليبية والباذنجانية والخيمية

٣) حصول تهجين السايتوبلازمي وانتاج الـ Cybrid

٤) إنتاج الهجن غير المتماثلة مثل التهجين بين الطماطة والبطاطا أو بين الداتورا والبيلادونا

شكرا

لكم

استحداث ونمو الكالس
INITIATION AND GROWTH OF CALLUS

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

كمال بنيامين ايشو

جامعة الموصل / كلية الزراعة والغابات / قسم البستنة وهندسة الحدائق

٢٠٢٢

يقصد بالكالس بأنه خلايا البرنكيمية السائبة غير المنتظمة الشكل التي تنشا من الخلايا المرستيمية Meristematic cell للأنسجة النباتية ، يعتمد استحداث الكالس بدرجة كبيرة على نوع القطع النباتية explant وغيرها ، وتعد الأنسجة الفتية الأكثر احتمالا لإنتاج الكالس ، ويتم الحصول على هذه الأنسجة من البادرات والأفرع الفتية حديثة التكوين أو البراعم وقمم الجذور والأجنة النامية وأيضا أجزاء الزهرة والدرنات والأبصال ، فضلا على احتواء هذه الأجزاء على الخلايا المرستيمية النشطة إذ تعد غنية بالخلايا البرنكيمية الغير المتميزة (لم يحصل فيها تخصص) ، إذ قد يكون احتواءها العالي من الهرمونات النباتية الطبيعية والتي بتداخلها وتوازنها مع منظمات النمو المضادة خارجيا من الوسط الغذائي ، تحفز الخلايا المتمايزة على أن تفقد تمايزها وتعاود الانقسام بذلك تنتج خلايا وتجمعات غير منتظمة أطلق عليها بالكالس Callus ، كما يعتمد تقنية استحداث الكالس على ظروف خاصة منها درجة الحرارة والضوء والمواد الغذائية ومنظمات النمو .... وغيرها

مراحل استحداث الكالس
THE STAGE OF INITIATION CALLUS

تمر خلايا الجزء النباتي خلال استحداث ونموة الكالس بتغيرات معينة منها التغيير في الحجم والعدد والتركيب اضافة إلى زيادة الكبيرة في بعض العمليات البنائية المهمة ،

تمر عملية استحداث الكالس في ثلاث مراحل وهي :

1)مرحلة التحفيز Induction

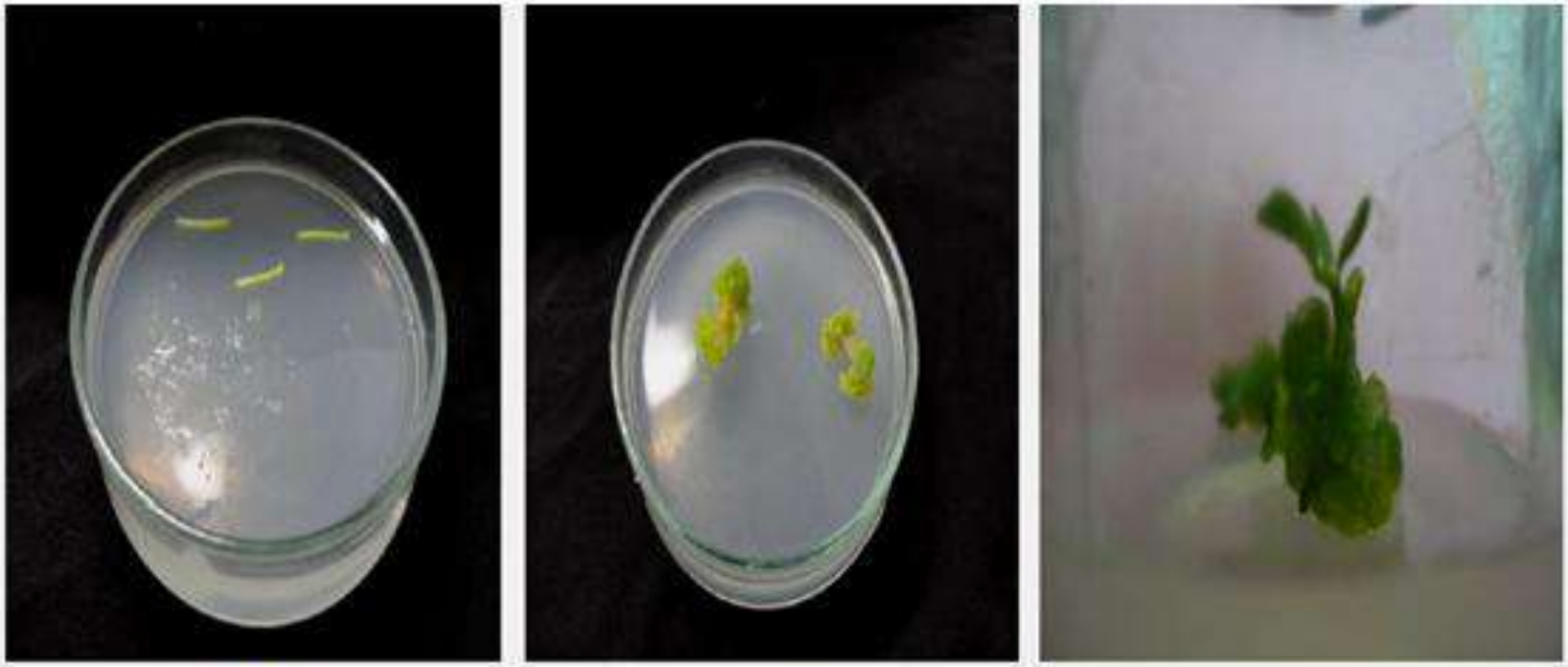
في هذه المرحلة يكون عدد الخلايا وحجمها ثابت ، ويحصل في الخلايا تغيرات أساسية مهمة تهيئها لمرحلة الثانية (الانقسام) مثل حصول زيادة في العمليات البنائية المختلفة منها عملية بناء البروتين Protein synthesis ثم انقسام الحامض النووي DNA ، ويعتمد وقت اللازم لهذه المرحلة على نوع النسيج النباتي والوسط الغذائي والظروف البيئية

٢) مرحلة الانقسام Division

في هذه المرحلة تبدأ الخلايا بالانقسام وتكون كتلة من الخلايا تغطي معظم أجزاء النسيج النباتي تدريجيا ، حيث لا تستجيب الخلايا بصورة متساوية لعملية التحفيز وذلك بسبب وضعها على وسط الغذائي ، فالخلايا الخارجية للنسيج تتحفز وتنقسم فقط فتكون كتلة من الخلايا تحيط بالخلايا الغير المنقسمة وخاصة في مناطق المجروحة ، لذا يتم عمل هذه الجروح على القطع (النسيج) النباتي المزروع بواسطة المشطر قبل البدء بالزراعة ، ثم يعود الانقسام في الخلايا الخارجية الملامسة للوسط الغذائي إلى عدة عوامل متداخلة مع بعضها البعض ومن هذه العوامل .. توفر الأوكسجين بكميات كبيرة لتساعد على حث عملية التنفس بغية توفير الطاقة اللازمة لعملية الانقسام ... وفرة العناصر الغذائية بسبب التماس المباشر مع الوسط لتوفير المادة الأساسية لمعظم الفعاليات الحيوية التي تحتاج إليها عملية الانقسام هذه

٣) مرحلة التمايز (التخصص) Differentiation

بعد المرحلة الثانية (عملية الانقسام) تمر الخلايا بمراحل بناء نشطة تعود أساسا إلى الانقسامات المتكررة للخلايا وفي هذه المرحلة تحدث تغيرات عكسية تتضمن تحول الخلايا المنقسمة إلى خلايا مرستيمية مكونة كتل خلوية غير منتظمة في مناطق انقسام الخلايا فقط ، فتتحول فيما بعد إلى خلايا متمايزة (تكشف) تؤدي في النهاية إلى تكوين النبات الكامل



شكل (٦٩) المراحل الثلاث لاستحداث الكالس في نبات الحلبة (A = قطع من الساق تحت الفلقية على وسط غذائي ، B = استحداث الكالس بعد مرور شهر من الزراعة ، C = تمايز(تكشف) خلايا الكالس وظهور الاوراق الحقيقية

الطرق المستخدمة في تقانة زراعة الكالس
CALLUS INITIATION TECHNIQUES

هنالك عدة طرق في استحداث الكالس ونموه وهذه تعتمد على نوع القطعة النباتية والوسط الغذائي المستخدم للزراعة ومنة هذه الطرق

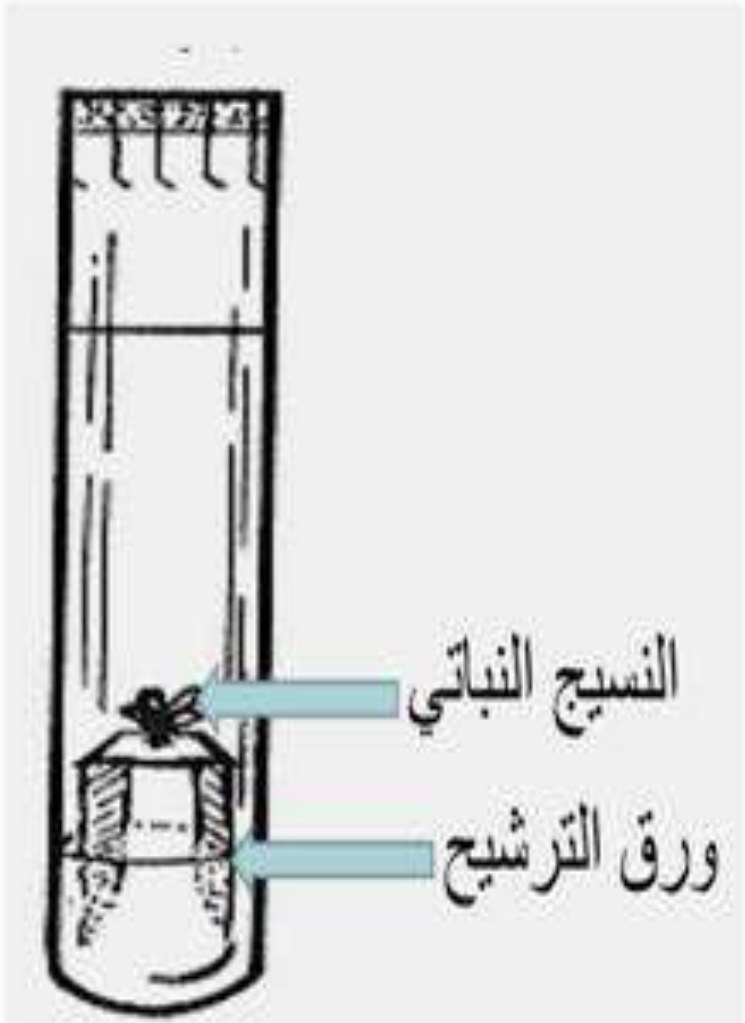
أولا: الزراعة على وسط الغذائي الصلب Culture on solid medium

تعد تقانة الزراعة على وسط الصلب من أولى التقنيات التي استخدمت في عملية استحداث الكالس وذلك لسهولتها وعدم حاجتها إلى أجهزة مختبرية معقدة وأيضا إلى إمكانية استحداث الكالس من القطع النباتية في حيز صغير ومن اكثر المواد المستعملة في عملية الوسط الصلب هو Agar وفي بعض الأحيان تستخدم ماد الجيلاتين .

لكن يعاب على هذه التقنية هو انتقال المواد الغذائية إلى الجزء النباتي بشكل غير متساوي حيث تكون الفرصة أفضل للجزء الملامس للوسط الغذائي للاستفادة من المواد الغذائية مقارنة بالأجزاء البعيدة عن الوسط ،كما قد تتداخل الشوائب التي تحتويها بعض الأنواع الاكار الغير النقية مع مكونات الوسط الغذائي ، كما طمر جزء من القطعة النباتية في الوسط الغذائي قد يؤدي إلى توزيع غير متساوي للتبادل الغازي بين الوسط والكالس المتكون عليه ، إضافة إلى تعرض الكالس بعد اكتماله إلى ظاهرة الاستقطاب Polarization بفعل خاصية الجاذبية الأرضية وأيضا التعرض للضوء ، وتعد صعوبة نقل الكالس دون حدوث بعض الأضرار له من المساؤئ المهمة التي قد تحدث

ثانيا : الزراعة على وسط الغذائي السائل الثابت Culture on stationary liquid medium

في هذه التقنية يتم وضع الأنسجة النباتية فوق قطعة من الورق الترشيح بحيث تكون جسرا بين الوسط الغذائي السائل والجزء النباتي فبذلك تعمل ورقة الترشيح كموصل للمواد الغذائية من الوسط الغذائي إلى الأنسجة النباتية المزروعة مع بقاء جزء النباتي معرض للهواء بصورة مباشرة ..ومن فوائد هذه التقانة عدم وجود الشوائب التي قد تحتويها بعض الأنواع من الـ Agar ، وأيضا تسمح للجزء النباتي بالقيام بعملية التنفس وتبادل المواد الغذائية بسهولة ..كما في الشكل



شكل (٧٠) زراعة على وسط سائل

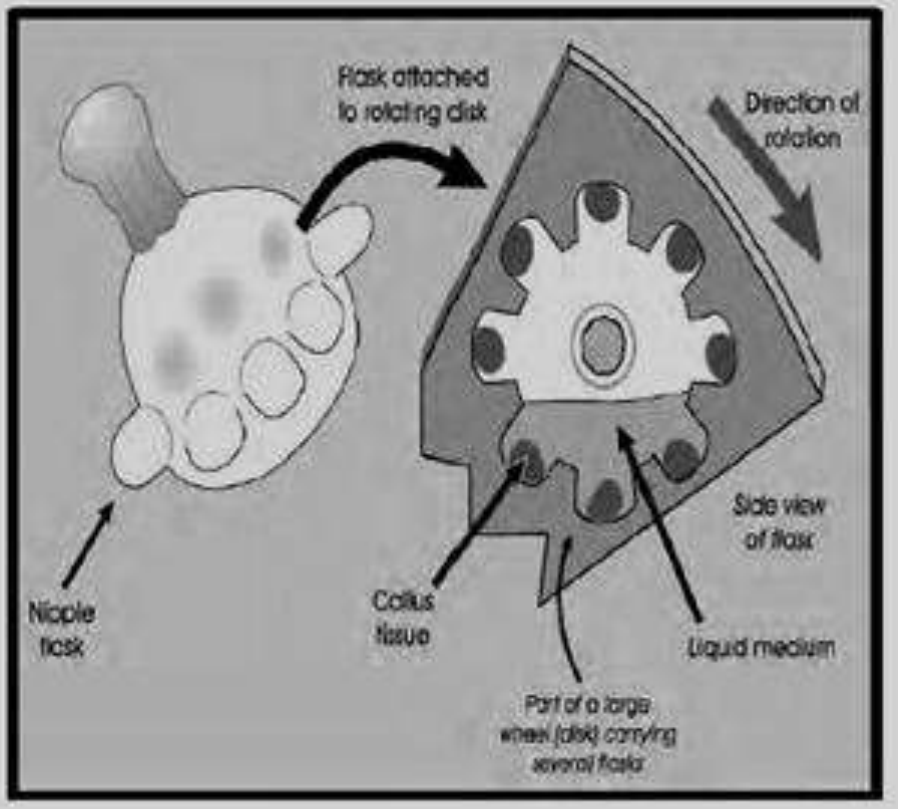
ثالثا: الزراعة في الأوساط الغذائية السائلة المتحركة Agitated liquid culture medium

مكونات الوسط الغذائي في هذه الطريقة مشابهة للفقرة (ثانيا) لكن هذه الأوساط تكون متحركة وتعد هذه الطريقة المثلى لتنمية الكالس بغية التجنب لمساؤئ التي قد تتعرض لها هذه الطريقة الزراعة على الأوساط الصلبة وهنالك :

طرق الزراعة في هذه الأوساط وهي

أ) الغمر المستمر : إذ تغمر الأنسجة النباتية في الوسط الغذائي السائل ويتم تحريكها إليها بحركة دورانية وتحدد مدة الدوران ما بين ٢٠ – ٢٥٠ دورة / دقيقة ، كما يجب أن يراعى في هذه الطريقة هو تحديد حجم الوسط الغذائي السائل بصورة دقيقة من اجل توفير محيط غازي بغية تأمين ظروف التهوية الكافية ، حيث يجب تشغيل الوسط ما بين ١٥ -٢٠% من حجم الوعاء الكلي

ب) الغمر الموقت : تعد من أكثر الطرق ملائمة لزراعة أنسجة الكالس إذ فيها تغمر الأنسجة النباتية في الوسط الغذائي لفترة معينة وتعرض إلى الهواء بين حين وأخرى ، هذه العملية تضمن تهوية كافية وغمر جيد لنسيج المزروع ، تستعمل في هذه الطريقة أنابيب المتقلبة والمثبتة بشكل متوازي على أقراص تدور من الأعلى إلى الأسفل وليس على محورها الطولي وبمعدل دورة واحدة في الدقيقة على محور موضوع بزاوية ١٢ درجة



شكل (٧١) جهاز الدوار واوعية الزراعة والية الدوران

طرق قياس نمو الكالس وأعاد زراعة الكالس

تعتمد عملية استحداث الكالس على عدة عوامل منها

١)نوع القطعة النباتية

٢)نوع النبات

٣)تركيز منظمات النمو في الوسط الغذائي

٤)نوع الوسط الغذائي ... إضافة إلى الأمور الأخرى

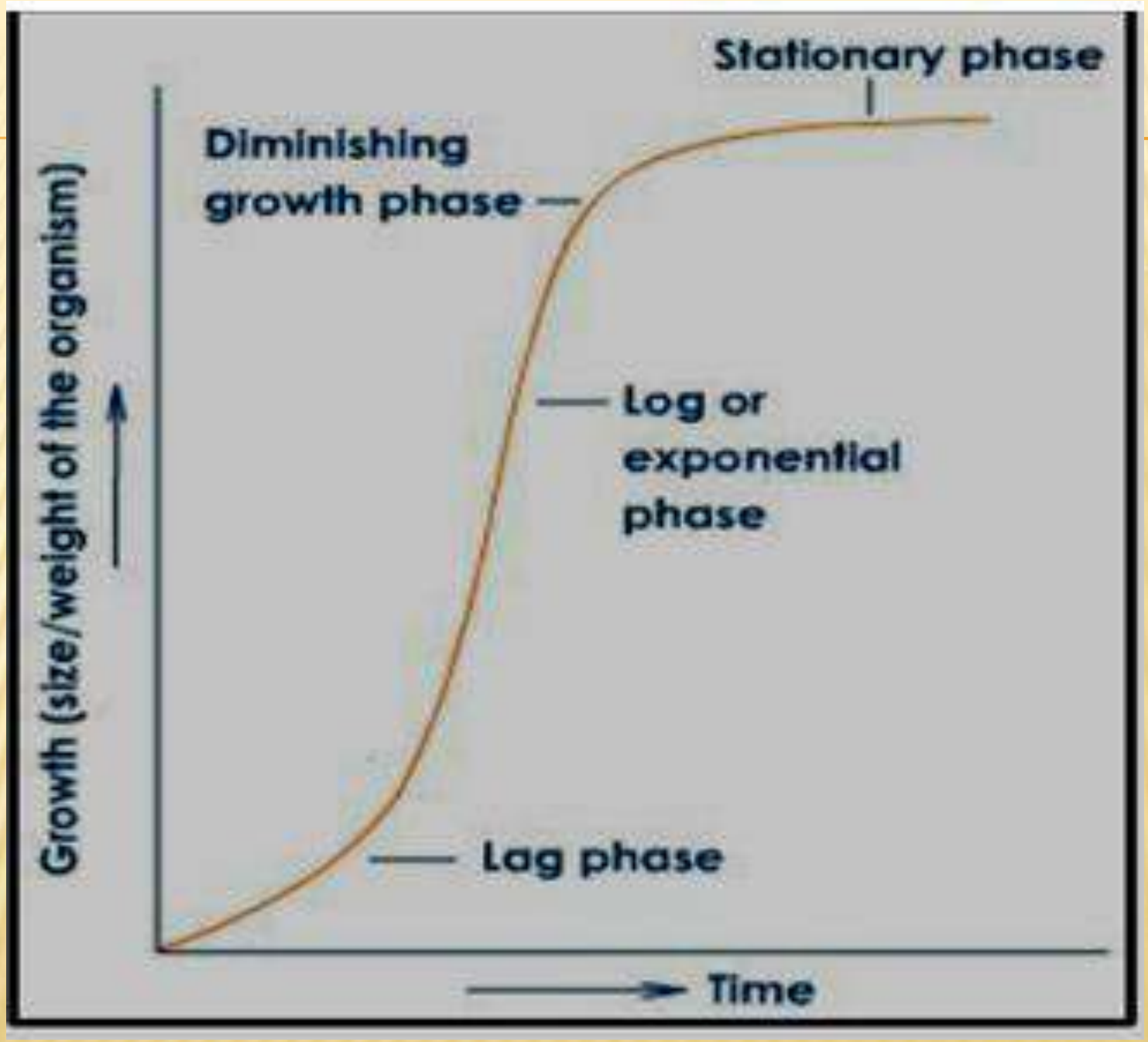
قياس نمو الكالس وبإحدى الطرق القياس التالية :-

١)قياس الوزن الرطب : وذلك بأخذ قطعة منه ووزنها وإعادتها إلى الوسط الغذائي تحت ظروف معقمة لحين ثبات الوزن ، ثم رسم منحنى النمو الذي يحدد موعد إعادة الزراعة

٢) قياس الوزن الجاف ، في هذه الطريقة يمكن ان نحدد وبدقة نمو الكالس على أساس الزيادة بالوزن ولفترة زمنية معينة ، لكن يعاب على هذه الطريقة هو عدم الاستفادة من الكالس مرة ثانية ،لان سوف تموت الخلايا الكالس بعملية التجفيف

٣) قياس محتوى خلايا الكالس من المكونات الخلوية الأساسية كالبروتين والكاربوهيدرات والأحماض النووية ، وتعد هذه من أكثر الطرق المتبعة وأدقها

٤) القياس بطريقة حساب عدد خلايا النسيج المكونة للكالس ، ويعاب عليها بصعوبة عد خلايا لكالس


Stationary phase
Diminishing growth phase
Log or exponential phase
Lag phase
Growth (size/weight of the organism)
Time

المشاكل المرافقة لزراعة الأنسجة النباتية:

١) **ظاهرة الاسمرار(التلون البني)** Browning :

ويعزي معظم الباحثين أسباب حدوث هذه الظاهرة في مزارع الأنسجة النباتية إلى ما يأتي :

*__عوامل تتعلق بالنبات نفسه__ :مثل نوعية الجزء النباتي المستخدم وعمره ودرجة تمايز أنسجته وموعد الزراعة فلقد وجد أن الشماريخ الزهرية للنخيل أقل تعرضاً للاسمرار من القمم النامية وبادئات الأوراق ، ودرس تأثير المرحلة التطورية للشماريخ الزهرية بالاعتماد على أطوالها كمعيار لدرجة التمايز في النسبة المئوية للاسمرار ولاحظوا أن الشماريخ بطول٢-٤ سم كانت الأفضل وأعطت نسبة اسمرار بلغت ١٢.٤٦% في حين أعطت الشماريخ التي بطول ٨- ٦ سم نتائج وسطية ٣٨.٦٧% وكانت الشماريخ بطول ١٢-١٥سم الأكثر تعرضاً للاسمرار وبلغت ٣٨.٧٧ % ، أما موعد أخذ الأجزاء النباتية للزراعة خارج الجسم الحي

*__عوامل تتعلق بالوسط الغذائي__ : من حيث تركيز الهرمونات النباتية ونوعيتها ومحتوى الأملاح المعدنية ونوعية الاكار والتوازن بين الـ NO_3^-و الـNH_4^+ والبوتاسيوم.

*__عوامل تتعلق بالظروف في غرفة النمو:__ مثل درجة الحرارة ، وشدة الإضاءة إذ وجد أن ارتفاع درج الحرارة وزيادة شدة الإضاءة تزيد من ظاهرة الاسمرار ولذلك فقد وجد أن التداخل بين درجة الحرارة الواطئة ١٨مْ وشدة الإضاءة المنخفضة قد أدى إلى انهاء ظاهرة الاسمرار في الوسط الغذائي .

عوامل تتعلق بالتعقيم وطريقة الزراعة :

إذ تزداد ظاهرة الاسمرار عند استخدام تراكيز عالية للمادة المعقمة ولمدة طويلة أثناء عملية التعقيم وهذا يؤدي إلى أضعاف الأجزاء النباتية في الوقت نفسه ويتوجب زراعة الأجزاء النباتية بعد تعقيمها مباشرة لا تركها لمدة قبل زراعتها لان ذلك يزيد من ظهور المركبات الفينولية السامة ويتوجب كذلك عدم تجريح الأجزاء النباتية كثيراً عند عملية النقل إلى وسط جديد لان القطع والتجريح يزيد من ظاهرة الاسمرار، كما تؤدي زيادة تراكيز الأثلين وتراكم الـ CO_2 داخل أوعية الزراعة بتقدم عمر الجزء النباتي أو الكالس أو المعلق الخلوي إلى زيادة حدوث هذه الظاهرة ولذلك يوصى بعدم غلق أوعية الزراعة بأحكام

ولتجنب تأثير الإفرازات الفينولية فان المختصين يصفون أربع طرائق مختلفة هي:

*__محاولة التخلص أو إزالة هذه الإفرازات الفينولية__ : وذلك إما بغسل الأجزاء النباتية ، او الزراعة على أوساط غذائية سائلة ، او النقل على أوساط جديدة وبمدد متقاربة ، او عن طريق استخدام مواد تؤدي الى ادمصاص Adsorption هذه المواد على أسطح هذه المواد ودقائقها مثل الفحم النباتي المنشط Activated Charcoal)

__تغير جهد الأكسدة والاختزال Redox potential للمحلول__ : وذلك إما بمحاولة تقليل تركيز الأوكسجين المذاب للمحلول وبالتالي خفض جهد الأكسدة وتقليل أكسدة الفينولات ، او باستخدام عدد من المواد كعوامل اختزال Reducing factors تعمل على زيادة جهد الاختزال للمحلول، وبالتالي تعمل على منع أكسدة الفينولات عن طريق التخلص بسرعة من مركب الـ Quinone ومنع تراكمه ويتم ذلك باستخدام عدة مواد مثل الـ Glutathione وال Mercaptoethanol ، وكذلك حامض الستريك Citric Acid وحامض الاسكوربيك Ascorbic Acid

*__تثبيط فعالية أنزيمات اكسدة الفينولات__ : وذلك عن طريق استخدام بعض المواد المخلبية مثل (Ethyl diaminetetra acetic acid EDTA) إذ تقوم هذه المواد بتثبيط عمل إنزيمات الأكسدة عن طريق اقتناص العديد من الآيونات الموجبة مثل Cu^{+2} الضرورية لعمل إنزيمات الـ PO والـ PPO.

*__محاولة تقليل فعالية أنزيمات الأكسدة و جاهزية المادة الأساس Substrate__ : وذلك عن طريق خفض الـرقم الهيدروجيني pH للوسط الغذائي ودرجة الحرارة وشدة الإضاءة او تقليل بعض المواد المضافة إلى الوسط الغذائي إذ تعد المواد الكاربوهيدراتية هي المادة الأولية للبناء الحيوي للفينولات.

التطبيقات العملية لتقنية مزارع الكالس Applications of callus cultures technical

تعتبر خلايا الكالس نظاما فريدا لدراسة أيض وتمايز النباتات من الأمور التالية:

١) في مجالات دراسة تغذية النبات

٢) في مجال تمايز الخلايا والأعضاء والتكوين المظهري Morphogenesis

٣) الاختلافات في جسم الخلايا الخضرية Somocional variation واستخداماتها

٤) استخدام هذه التقنية في تنشئة مزارع الخلايا المعلقة وعزل البروتوبلاست (سوف تشرح لاحقا)

٥) التعديل الوراثي وذلك باستخدام تقانة Ballastic particle gun technology

٦) في إنتاج وتنظيم مركبات الايض الثانوي

شكل (٧٣) تنمية خلايا الكالس لانتاج مركبات الايض الثانوية في مجال المواد الطبية

الإخلاف خارج الجسم الحي Regeneration in vitro

لقد استثمرت قابلية الخلية النباتية على توليد نبات كامل وتعرف هذه العملية بـ Totipotency في إنتاج نباتات خارج الجسم الحي In vitro وذلك من خلال زراعة البروتوبلاست والخلايا والأنسجة والأعضاء ، وتكون الأعضاء Organogenesis من هذه الأنسجة المزروعة من خلال خضوعها إلى تغيرات قد تؤدي إلى إنتاج تراكيب أحادية القطب Unpolar تسمى Primordia أي أوليات النموات الخضرية أو الجذرية ، حيث ترتبط أوعيتها الناقلة مع الأوعية الناقلة للنسيج الذي تكونت منه ، وبصورة عامة ما ينتج من هذا النظام في مزارع الكالس كما يمكن ان ينتج مباشرة من الجزء النباتي المزروع ،

ومن هذه الطرق

١) التبرعم الابطي Axillary budding

تتضمن هذه التقانة بتكون الأفرع من مرستيمات موجودة في منطقة العقدة إذ تمتاز الإخلاف التي تتكون بثباتها الوراثي ، وتسمى هذه العملية بالتبرعم الابطي ، وتعد من اكثر الطرق المعمول عليها في الإكثار الدقيق خارج جسم الحي ، وينتج بهذه الطريقة حوالي ٩٠% من الإنتاج الحالي للنباتات المكثرة بطرق الإكثار الدقيق ، وهذه الطريقة تستخدم أيضا في إكثار النباتات التي تمتاز بطول دورة حياتها مثل أشجار الغابات والفاكهة ، وهذه تعد طريقة الأساسية لإكثار النباتات على مستوى النشاط الصناعي الذي يتطلب درجة عالية من التجانس لنباتات الشليك والورد (Ros) والبطاطا والاناناس والموز وغيرها من النباتات .

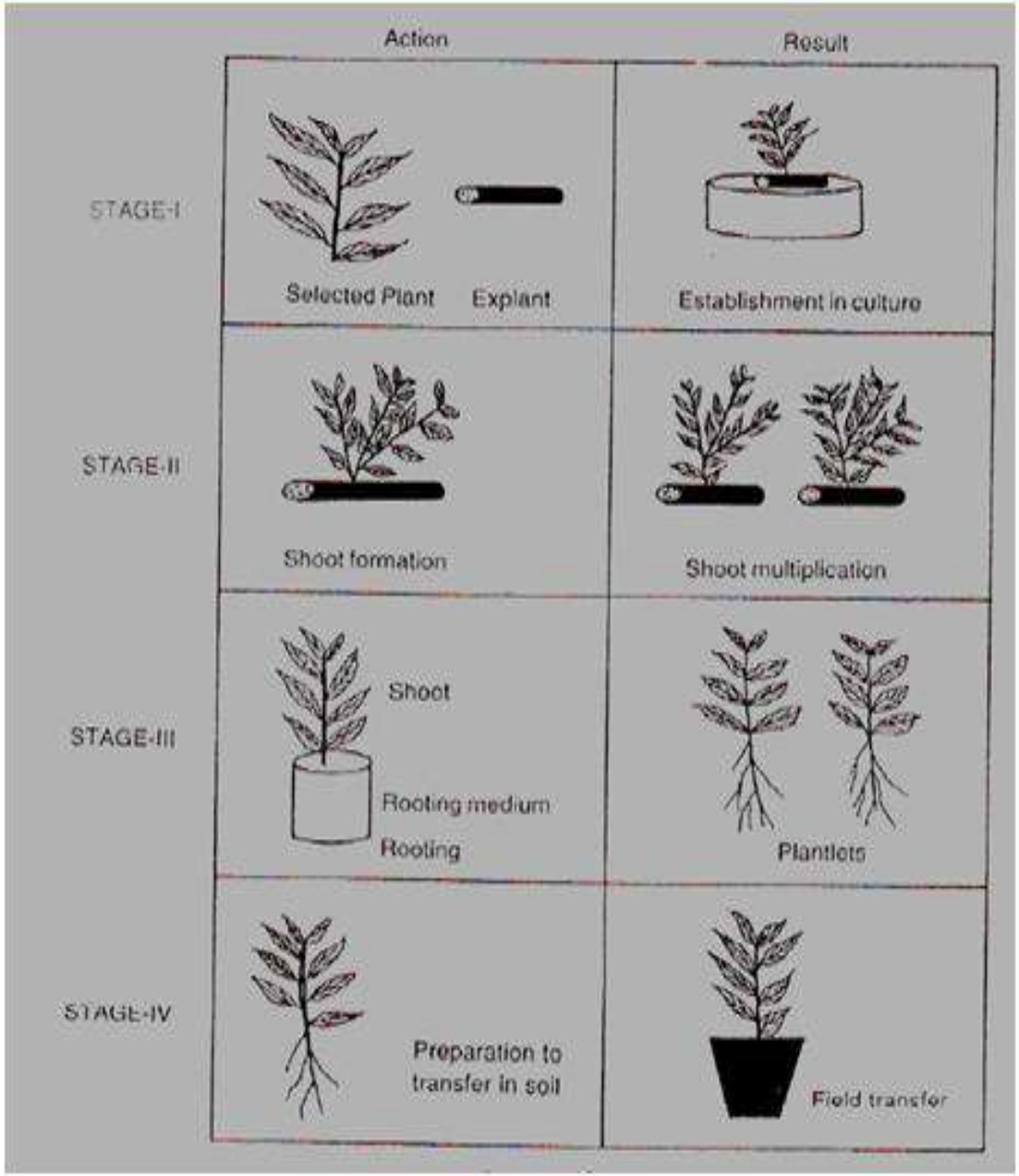
٢) التبرعم العرضي Adventitious budding

قد تتكون براعم عرضية جديدة مباشرة من خلايا الغير المرستيمية على أنسجة الجزء النباتي فيمكن أن تظهر من سويقة الورقة أو قطعة الجذر أو من سلامية الساق ، ويمكن ضمان مستوى المطلوب من الثبات الوراثي للنباتات المكثرة بهذه الطريقة باستثناء النباتات المختلفة التي تظهر نتيجة الكايميرا والتي يطلق عليها النباتات الكايميرية Chimeral plants مثل نبات البيكونيا Begoniaاذ يتكون الفرع أحيانا بصورة غير مباشرة من نسيج الكالس كما في حالة نبات *Ficus lyrat*و *Anthurium andreamum* ، وبما أن أنسجة الكالس هي عبارة عن تراكيب غير منتظمة فان خلاياها معرضة لعدم ثبات الوراثي من خلال انقسامات الخلية السريعة ،لذلك تزداد احتمالات عدم الثبات الوراثي في الحالات التي يتوسط خلالها نسيج الكالس لعملية الاخلاف .

٣) تكون الأجنة الجسمية Somatic embryo development

تتكون الأجنة الجسمية إما مباشرة على الجزء النباتي أو كما يحدث كثيرا إن تتكون بصورة غير مباشرة من نسيج الكالس ، تكون الأجنة الجسمية غير المباشر يحصل من نسيج الكالس أو من مزارع الخلايا ،الأمر الذي يؤدي إلى ظهور تباينات في جسم السلالة الخضرية في مجتمعات النباتات الناتجة ، لذا لا يمكن ضمان للنبات الثبات الوراثي خصوصا المكثرة بهذه الطريقة ،وعليه فان تكون الأجنة الجسمية في مزارع الخلية مفيد جدا في تطور تقانة الإنتاج على نطاق واسع Seale-up وذلك باستخدام المفاعل الحيوي Bioreactor وأيضا في إنتاج البذور الصناعية الأمر الذي يتعذر حصوله مع أي طريقة تقانات الإكثار الأخرى ، فبذلك تستخدم هذه الطريقة عندما لا تكون هناك حاجة إلى مستوى عالي من الثبات الوراثي ، وعليه يمكن تحقيق الإكثار الدقيق عمليا بإدامة أنسجة منتظمة عن طريق تضاعف المرستيمات والبراعم الابطية ،علما بان أساس هذا المفهوم هو إحراز تضاعف سريع دون خلق تباينات غير مرغوبة في جسم السلالة الخضرية Somaclonal variation

مراحل طرائق الإكثار الدقيق
MICRO PROPAGATION METHODS STAGE



شكل (٧٤) مراحل الاكثار الدقيق خارج جسم الحي

المرحلة الأولى : اختيار وإنشاء المزارع المعلقة

المرحلة الثانية : تضاعف الجزء النباتي Propagation of propagule

المرحلة الثالثة : إخلاف النبيتات Plantlets regeneration

المرحلة الرابعة : تحضير النبيتات ونقلها إلى الحقل Preparation and transfer to the field

العوامل التي تؤثر على الإخلاف
FACTORS AFFECTING REGENERATION

أولا : مصدر الجزء النباتي Source of explant : والعوامل التي تؤثر في استجابة الجزء النباتي في الوسط الغذائي هي :

*نوع الجزء النباتي المستعمل كمصدر للنسيج *العمر الفسيولوجي والتطوري للنسيج
*فصل النمو (وقت)الذي اخذ خلاله الجزء النباتي *حجم الجزء النباتي
*نوع وحالة النبات المقطوع منه الجزء النباتي
فبذلك فاختيار المناسب للجزء النباتي يتم من خلال التجربة ومن عدة أجزاء نباتية

ثانيا : الأوساط المغذية ومكوناتها Nutrient media and constituents

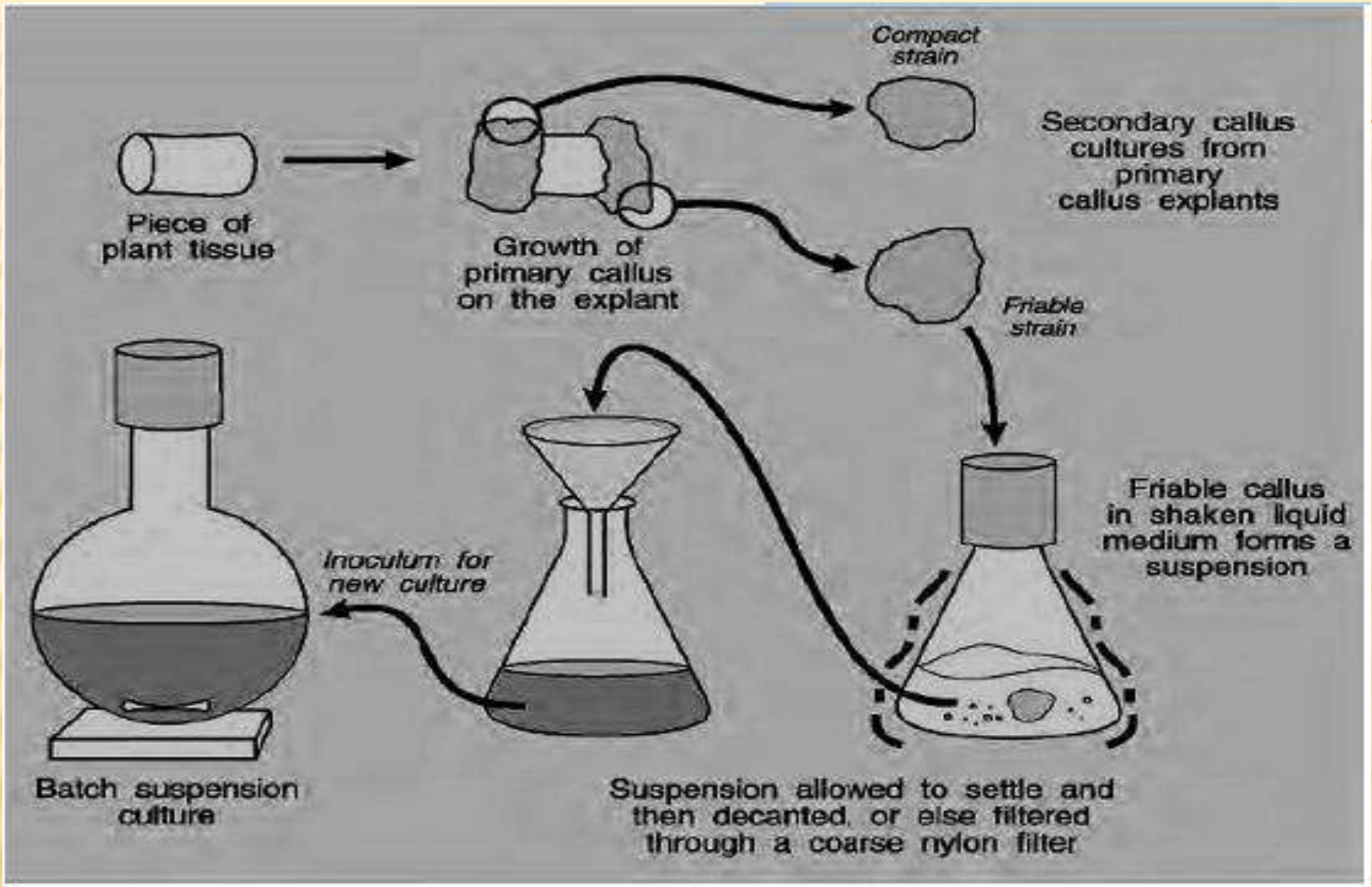
تؤثر مكونات الوسط التالية تأثير كبيرا في عملية إنتاج الإخلاف ومن هذه المكونات :
**المغذيات غير العضوية الكبرى والصغرى ** مصدر الكاربون الذي يستخدم للطاقة
**مصدر النتروجين المختزل ** تراكيز منظمات النمو في الوسط
** الفيتامينات

ثالثا: بيئة المزرعة Culture environment

هنالك العديد من عوامل بيئة الزراعة التي تؤثر في النمو والتطور المنتظم وهذه تتضمن :
١*الصيغة الفيزيائية للوسط (تضمين أو عدم تضمين الاكار) ٢*pH الوسط المغذي
٣*نوعية وكمية الضوء ٤*الرطوبة النسبية
٥*التبادل الغازي ضمن دوراق أو أنابيب الزراعة

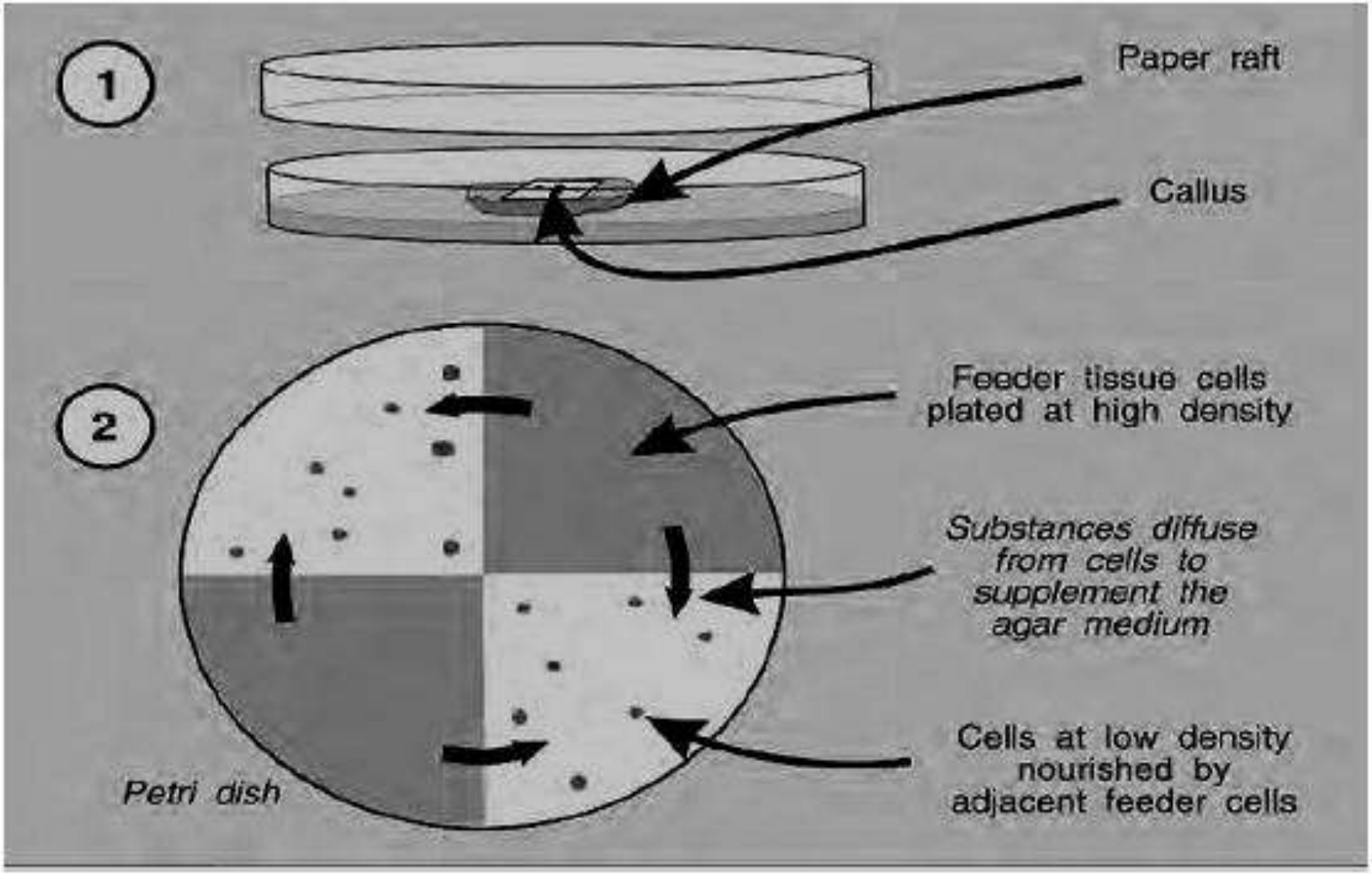
زراعة الخلايا المعلقة
CELL SUSPENSION CULTURES

التقنية المستخدمة في استحداث المعلقات الخلوية تشابه إلى درجة كبيرة التقانات المستخدمة في نمو العديد من الأحياء المجهرية ،حيث يتم استحداث المعلقات الخلوية من خلال نقل قطعة من نسيج الكالس الهش إلى وسط غذائي سائل ،إذ ينغمر الكالس في داخل الوسط السائل لذلك يتوجب تحريك المستمر للوسط بوسائل مختلفة لتوفير الأوكسجين وثم أيضا تفادي حصول الاختناق للخلايا وموتها بالإضافة إلى توزيع الخلايا بشكل منتظم داخل الوسط يستحسن استعمال الكالس الهش في إنشاء المعلقات الخلوية بسبب إن الخلايا المكونة له تكون غير مترابطة مع بعضها البعض وبالتالي إمكانية حصول تفكك لها إلى تجمعات خلوية صغيرة أو حتى خلايا مفردة من خلال التحريك المستمر للوسط الغذائي



شكل (٧٥) مراحل نشوء الكالس والخلايا المعلقة

كما تعد كثافة الخلايا الحرجة Critical cell density من أهم العوامل المؤثرة في عملية زراعة الخلايا المعلقة في الوسط السائل أو على الوسط الصلب الجديد ، وهذه تعرف بأنها اصغر كمية لقاح لكل حجم من الوسط يمكن أن يبدأ منها تنشئة مزرعة جديدة ، كما زراعة المعلقات الخلوية بكثافات منخفضة تحتاج إلى وجود عناصر غذائية ومواد معقدة التركيب بغية تحفيز عملية الانقسام والنمو للخلايا . فبذلك يستخدم الوسط المكيف Conditioned medium وهو الوسط الذي ننمي عليه بعض الأنسجة مثل نسيج الكالس سابقا ، والذي وصلت خلاياه مرحلة إفراز المواد المشجعة للنمو والتي تفرز خارجا إلى الوسط الغذائي وهذه تؤثر بشكل فعال على نمو الخلايا المفردة أو الكتل الخلوية الصغيرة ، ومن النقاط المهمة التي يجب مراعاتها في استخدام الوسط المكيف هو استخدامه في مرحلة بقاء عدد الخلايا ثابتا ، وعدم استعماله في مرحلة بعد التوقف من النمو لتفادي إفرازات الخلايا من المواد الضارة إضافة إلى استنزاف المواد الغذائية



شكل (٧٦) طرقتين لانشاء النمو للخلايا ذات الكثافة المنخفضة

مصادر نشوء (تنشئة) مزارع الخلايا المعلقة Initiation of suspension cultures

تستعمل أنسجة مختلفة من أجل استحداث المزارع الخلوية ومن هذه الأنسجة :-

١) نسيج الكالس Callus tissue

يعد من أفضل المصادر لاستحداث المزارع الخلوية لنموه تحت ظروف معقمة ، ولا تحتاج عملية فصل الخلايا إلى إضافة مواد قد تؤثر على حيوية ونشاط الخلايا ، وينقل بصورة عامة ٢- ٤ غرام من نسيج الكالس الهش غير المتميز إلى أوعية ملائمة تحتوي على ١٠٠ مل من الوسط الغذائي السائل والمجهز للزراعة ، ويتم تحريكها باستمرار باستعمال وسيلة مناسبة ، اذ يؤدي التحريك إلى توفير ضغط معتدل على خلايا الكالس ما يساعد على تفككها إلى كتل خلوية صغيرة وخلايا مفردة ، وتوزيعها بشكل منتظم في الوسط فضلا عن توفير تبادل غازي مناسب بين الخلايا والوسط الغذائي

٢) النسيج المتوسط Mesophyll من الأوراق

هنالك طريقتان لفصل الخلايا من هذه الأنسجة وهما :

١)**الطريقة الأنزيمية** Enzyme method :تستعمل مستحضرات أنزيمية خاصة تعمل على أضعاف الجدران الخلوية وتحطيم الصفيحة الوسطى بين الخلايا النباتية ، ومن مساؤئ هذه الطريقة اقتصار استعمالها على أنواع نباتية معينة ، وان الخلايا المفصولة تحتاج إلى حماية ازموزية دقيقة ،ويؤدي تعرض الخلايا إلى محاليل أنزيمية إلى الضرر قسم من الخلايا مما يؤثر على نشاطها ونموها

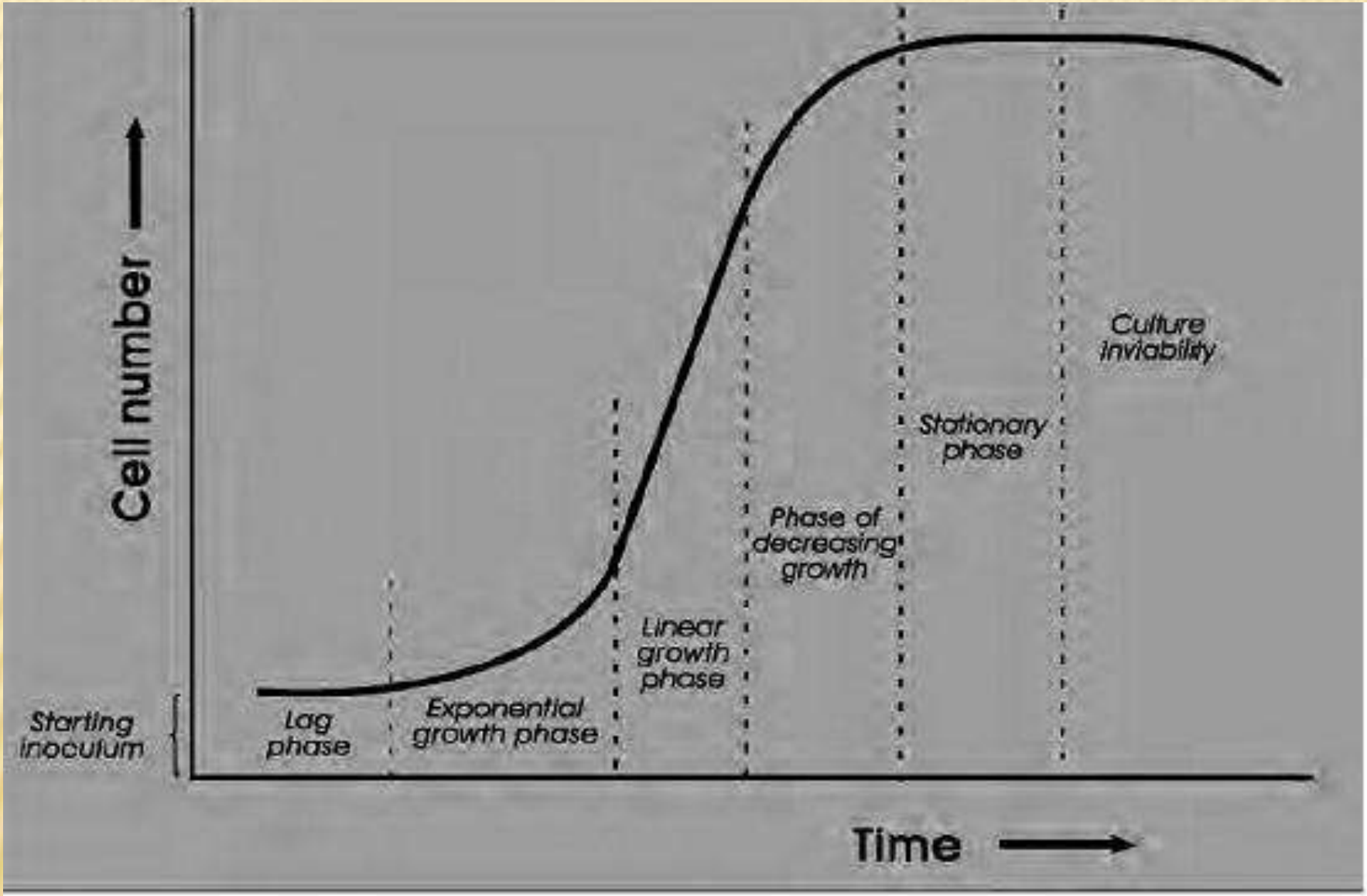
٢) **الطريقة الميكانيكية** Michanical method هذه تستعمل الطرق الميكانيكية لفصل الخلايا وذلك بسلخ طبقة النسيج المتوسط باستعمال مشرط دقيق وتنقل إلى وسط سائل ، كما يمكن فصل الخلايا بسحق قطع الأوراق في محلول يحتوي على كلوريد المغنيسيوم ومحلول منظم من حامض الهيدروليك Tris-HCl buffer وتكون حموضته pH ٧.٨ ، ومن ثم ترشح الخلايا وتغسل مع الوسط الغذائي في جهاز الطرد المركزي وعلى سرعة بطيئة ، من

طرق زراعة الخلايا المعلقة Suspension culture methods

توجد طريقتين رئسيتين لزراعة الخلايا المعلقة وهي :-

الأولى : الزراعة الكثيفة Batch culture : هذه عبارة عن نظام مغلق لتنمية الخلايا المعلقة حيث تنمى الخلايا في حجم ثابت من الوسط الغذائي السائل المتحرك وذلك لضمان التوزيع المنتظم للخلايا الحرة وكتل الخلايا في الوسط ولتحفيز تبادل غازي جيد بين وسط الزارعة والهواء ، تنمى معلقات الخلايا في دوارق سعة ١٠٠- ٢٥٠ سم^{٣} أو أكثر ، كل دورق يحتوي على ٢٠ – ٧٥ سم ^{٣} من الوسط الغذائي السائل ويتم إكثار المزارع بصورة روتينية وذلك بأخذ كمية قليلة من المعلق الخلوي وتنقل إلى الوسط الغذائي الجديد .

يلاحظ بان نمو كتلة الخلايا الحية Biomass في هذه المزارع تأخذ منحنى النمو الثابت الذي يمر بفترات الفتور أو البطء في النمو وذلك لأقلمة الخلايا على بيئة جديدة ، تعتمد هذه المرحلة أساسا على حالة نمو المزرعة الأصل خلال فترة إعادة الزارعة وحجم اللقاح الابتدائي المستخدم

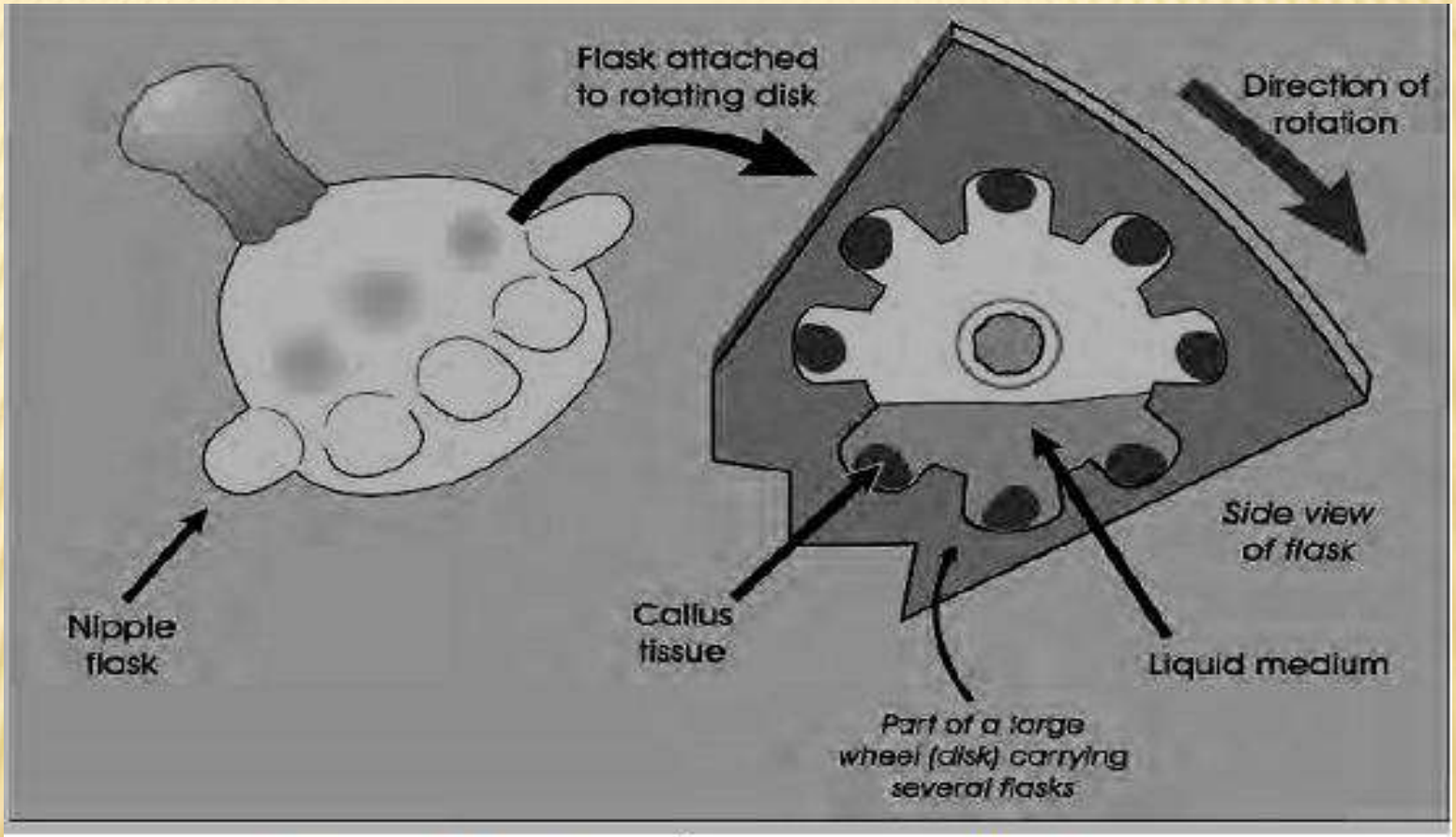


شكل (٧٧) منحنى للاشكال نمو الخلايا المعلقة

تقسم مزارع الزراعة الكمية إلى :

١) المزارع ذات الدوران البطئ Slowly rotating cultures

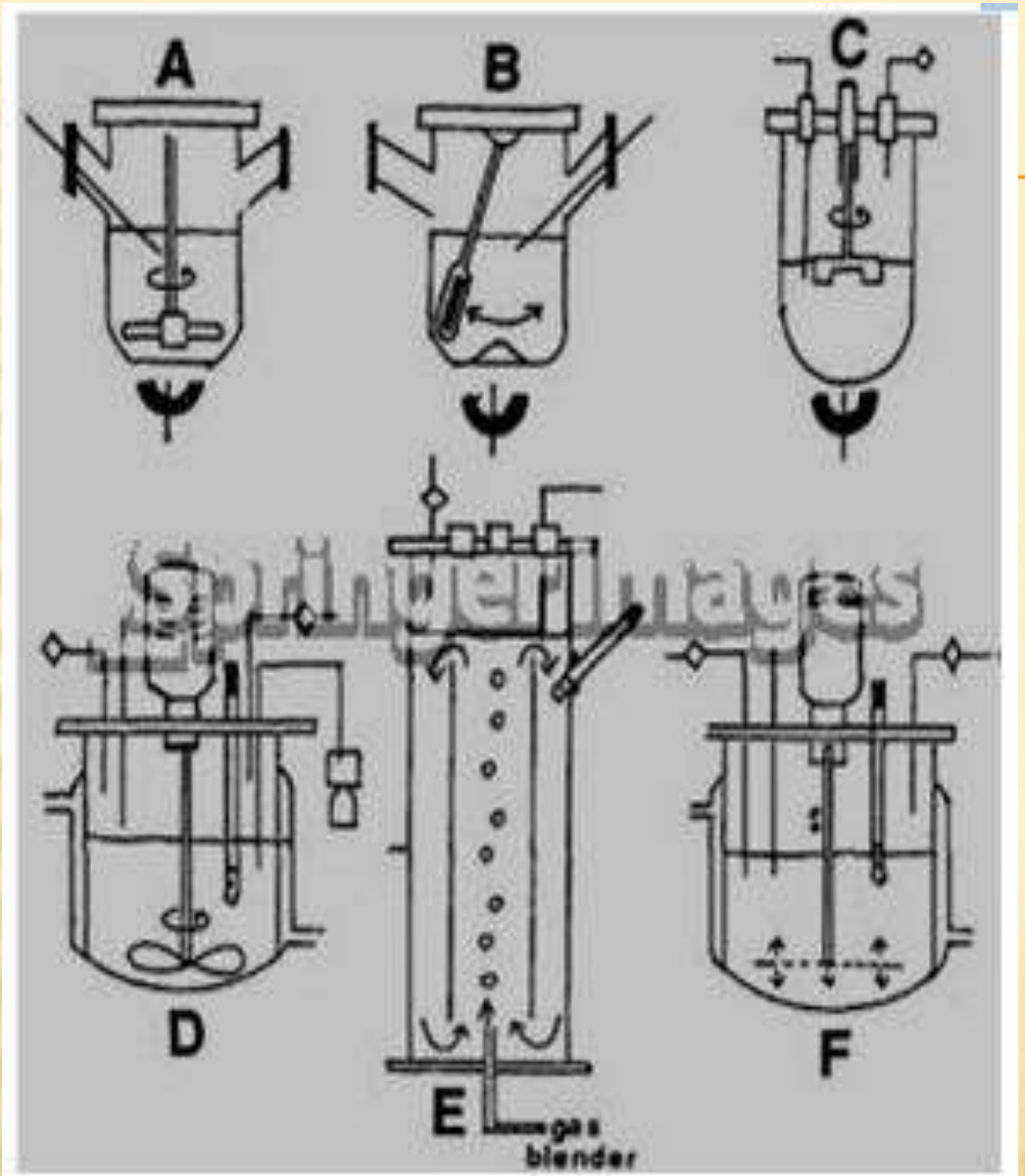
قدم Steward و Shanz (١٩٥٦) تصميم دوارق تستعمل للزراعة الخلايا الحرة والكتل الخلوية الصغيرة ، وتدعى هذه الدوارق بذات الحلم أو الزوائد Nipple flask



صورة (٧٨) دوارق ذات الحلم أو الزوائد Nipple flask

شكل (٧٩) الهزاز Shaker

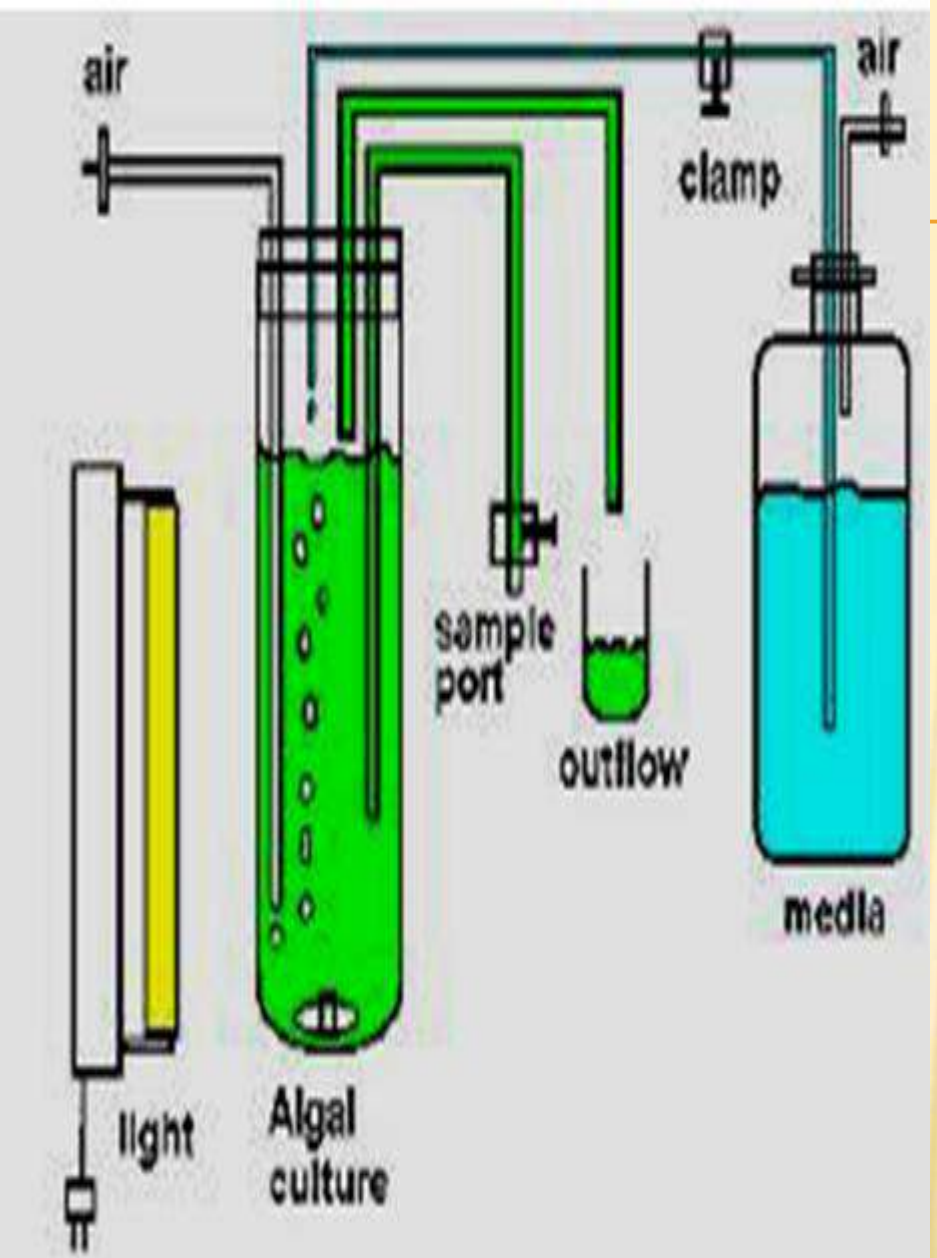
٢) المزارع الاهتزازية Shake cultures :- يعتبر هذا النظام أبسط من النظام السابق لكن بنفس الفعالية حيث توضع الدوارق الحاوية على مزارع المعلقة فـــي دوارق ابرنماير موضوعة على منصة ذات حـــركة دائرية بسرعة دوران تتراوح بين ٤٠ – ١٧٠ دورة / دقيقة



شكل (٨٠) مزرعة متهيجة

٣) المزارع ذات الحركة المغزلية Spining culture : هذه المزارع عبارة عن قنينة كبيرة نسبيا ذات سعة عشرة لترات تحتوي على وسط غذائي سائل مقداره ٣.٥ لتر تثبت هذه القناني على اطار صلب وتوضع بزاوية ٤٥ درجة وتدور بمعدل ٨٠ - ١٠٠ دورة / دقيقة وتغلق فوهة القنينة بالقطن بغية حصول تبادل غازي

٤) المزارع المتهيجة Stirred cutures : تتميز هذه المزارع بثبات الوعاء الحاوي على وسط والخلايا ، ويتم المحافظة على انتشار الخلايا والتبادل الغازي داخل وسط الزراعة بواسطة حقن فقاعات هوائية داخل الوسط الغذائي أو باستعمال قضيب مغناطيسي صغير يدور داخل الوعاء



شكل (٨١) المزرعة المستمرة المفتوح

الثانية : المزارع المستمرة Continuous cultures

تختلف الزراعة المستمرة عن الزراعة الكمية وذلك بتنمية المزارع المعلقة بإعداد كبيرة في حالة ثابتة ولفترات طويلة بإضافة أوساط غذائية جديدة وسحب كميات متساوية من الوسط الغذائي المستعمل ويوجد نوعان من المزارع المستمرة وهما :

أ) **المزارع المستمرة المغلقة** Closed continous cultures : يتم فيها توازن تدفق الوسط الغذائي القديم مع الوسط الجديد أي المضاف فضلا عن ذلك فان الخلايا الموجودة في الوسط الغذائي القديم تعزل وتضاف إلى وسط الزراعة أليا فان الكتلة الحيوية تستمر في الزيادة لاستمرار نمو الخلايا وانقسامها .

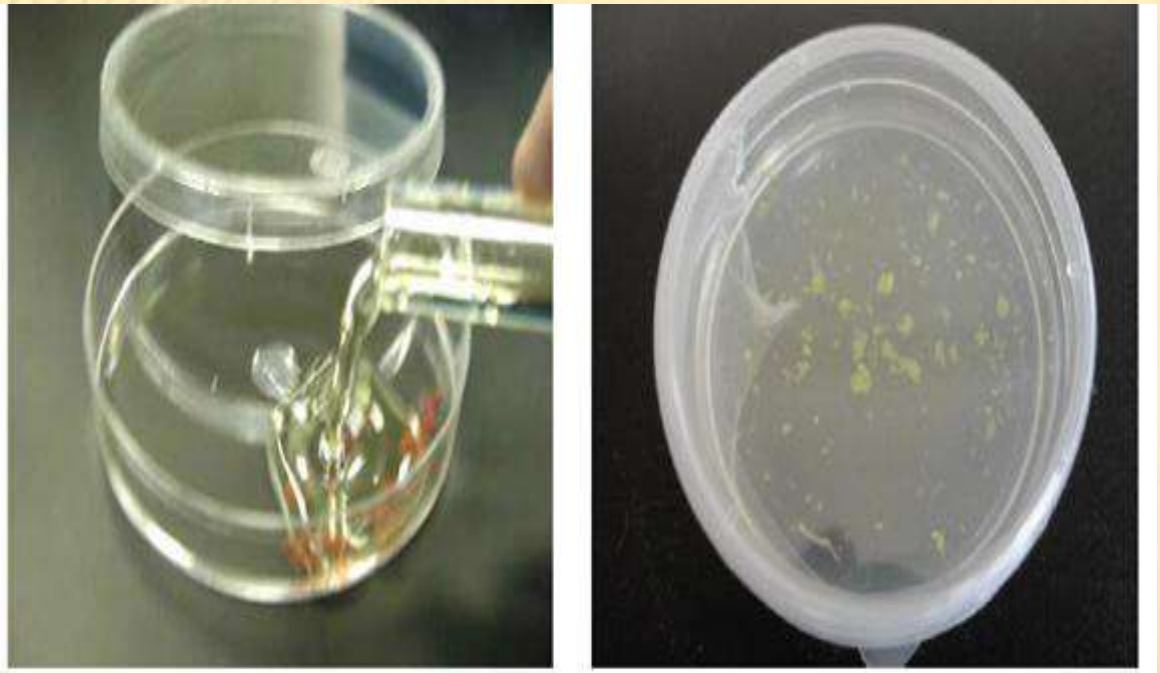
٢) **المزارع المستمرة المفتوحة** Open continous cultures :في هذا النوع يتم انسياب الوسط الغذائي الجديد إلى الداخل بخروج مساوي له من الوسط الغذائي القديم مع الخلايا دون أعادتها ثانيتا إلى الوسط ، ويمكن من خلال تنظيم معدل انسياب الوسط وغلقه بان يسمح بتبادل المعلقات الخلوية في حالة الطور الآسي .

طرق زراعة الخلايا المفردة Single cell culture

توفر زراعة الخلايا المفردة إمكانية جيدة لدراسة العمليات والايضية التي تقوم بها الخلية النباتية وأيضا استجابتها للتأثيرات المختلفة ، وتسمح أيضا بإجراء دراسات حول كيفية انتقال المواد الغذائية واستخدامها في تربية وتحسين النبات لقدرة الخلايا المفردة على إنتاج نباتات كاملة

وتستخدم ثلاث طرق رئيسية في زراعة خلايا المفردة وهي :

١) **زراعة في أطباق البتري** Petri dish planting culture



شكل (٨٢) عملية صب الوسط في طبق بتري دش

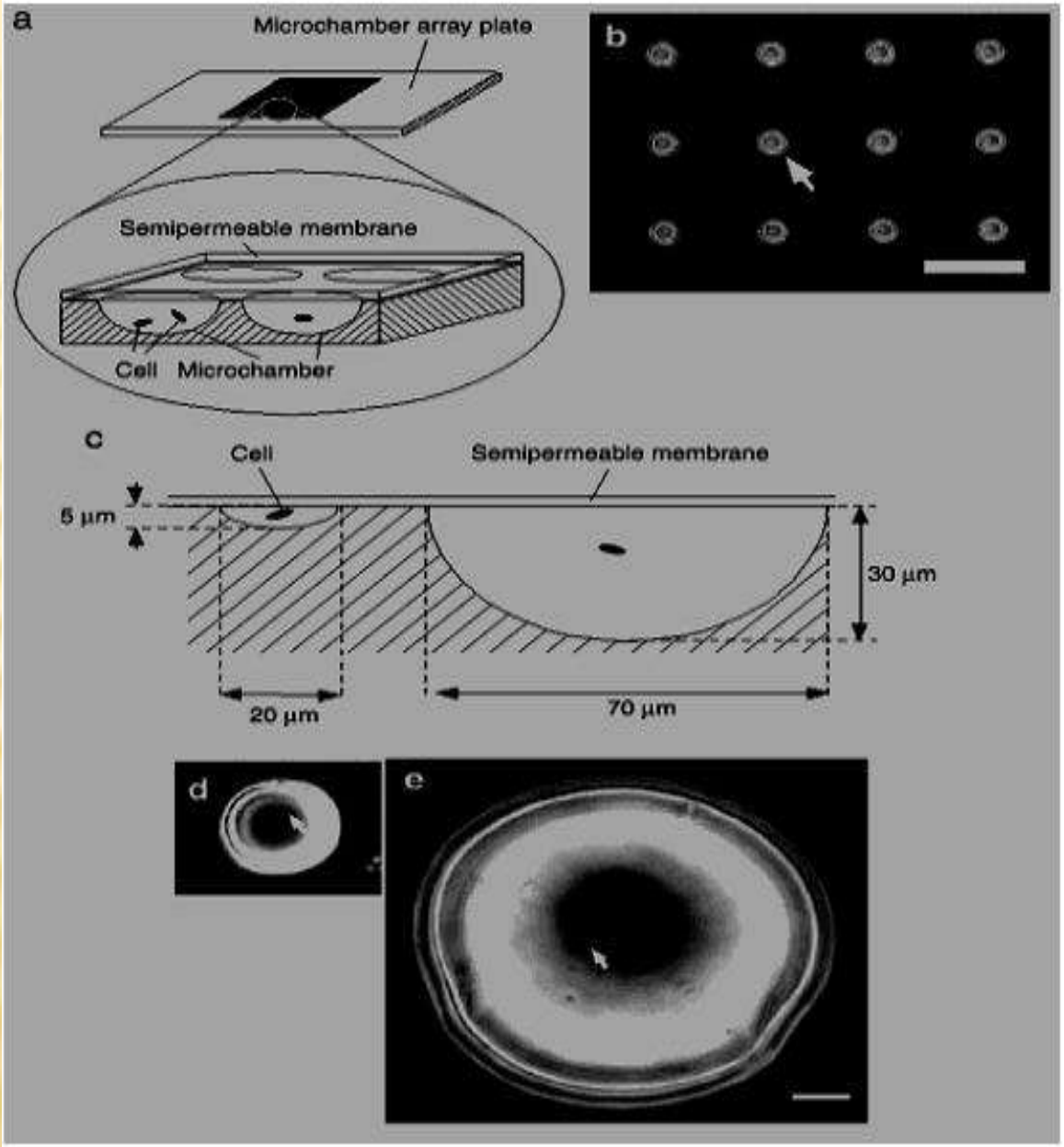
٢) الزراعة بالحاجز الورقي The filter paper raft –nurse culture

تستخدم هذه الطريقة لنمو الخلايا المفردة المفصولة من المعلقات الخلوية أو الكالس الهش وذلك بوضع الخلية المفردة على ورقة ترشيح بابعاد مناسبة ، ثم تنقل هذه الورقة التي تحمل الخليلة إلى كالس لنفس النوع من النبات أو الانواع الاخرى والتي نمت على وسط غذائي صلب حيث يقوم الكالس بتوفير المواد الغذائية الرئيسة من الوسط الغذائي ويوصلها عبر ورقة الترشيح إلى الخلية المفردة ،كذلك المواد المهمة لانقسامها لان الخلية تفشل في النمو عند وضعها مباشرة على وسط غذائي صلب الذي يستعمل لاستحداث الكالس ، ثم بعد نمو الخلية وانقسامها وتموينها للمستعمرة الخلوية يمكن التقاطها وزراعتها على وسط Media غذائي جديد.

صورة (٨٤) الزراعة بالحاجز الورقي

٣) الزراعة بنظام الغرف الدقيقة Microchamber-growth culture

تتضمن هذه الطريقة زراعة خلايا مفردة في حاضنات نمو دقيقة تصنع شريحة مجهرية زجاجية أذ تحاط الخلية المفردة والمعلقة في وسط غذائي سائل مكيف بقطرتين من الزيت المعدني على كل جانب من جوانب القطرة التي تحتوي على الخلية ، بعدها تغطى قطرات الزيت بغطاء الشريحة يتبعها وضع غطاء شريحة أخرى فوق الغطائين السابقين مكونة غرفة دقيقة تغطي الخلية المفردة حيث يمنع الزيت فقدان الماء من الغرفة الدقيقة ويسمح بالتبادل الغازات بصورة



شكل (٨٥) نظام الغرف الدقيقة

طرق قياس معدل نمو الخلايا وفعاليتها الايضية
Methods Growth and metabolic activities of culture cells

إن معدل نمو الخلايا النباتية في النسيج النباتي يعتمد على قابلية خلاياه لبناء مركبات الأساسية لديمومة عمليات الانقسام والنمو، وان عملية النمو تتضمن عدة مراحل وهي

هي مرحلة البناء

مرحلة التوسع

مرحلة الاستطالة

ثم مرحلة الانقسام

ويمكن قياس معدل النمو للخلايا المعلقة والنامية في وسط معين **بالطرق التالية :**

١)قياس عدد الخلايا Cell number

٢) قياس حجم الخلايا Cell volume

٣) قياس الوزن الرطب للخلايا Fresh weight of the cell

٤) قياس الوزن الجاف للخلايا Dry weight of the cell

٥) قياس محتوى البروتين الكلي في الخلايا Protein content of the cells

٦) قياس محتوى الخلايا من الـ DNA DNA content of the cells

شـكرا
لإصغائكم

الكاشفات الوراثية
Genetic markers

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

كمال بنيامين ايشو

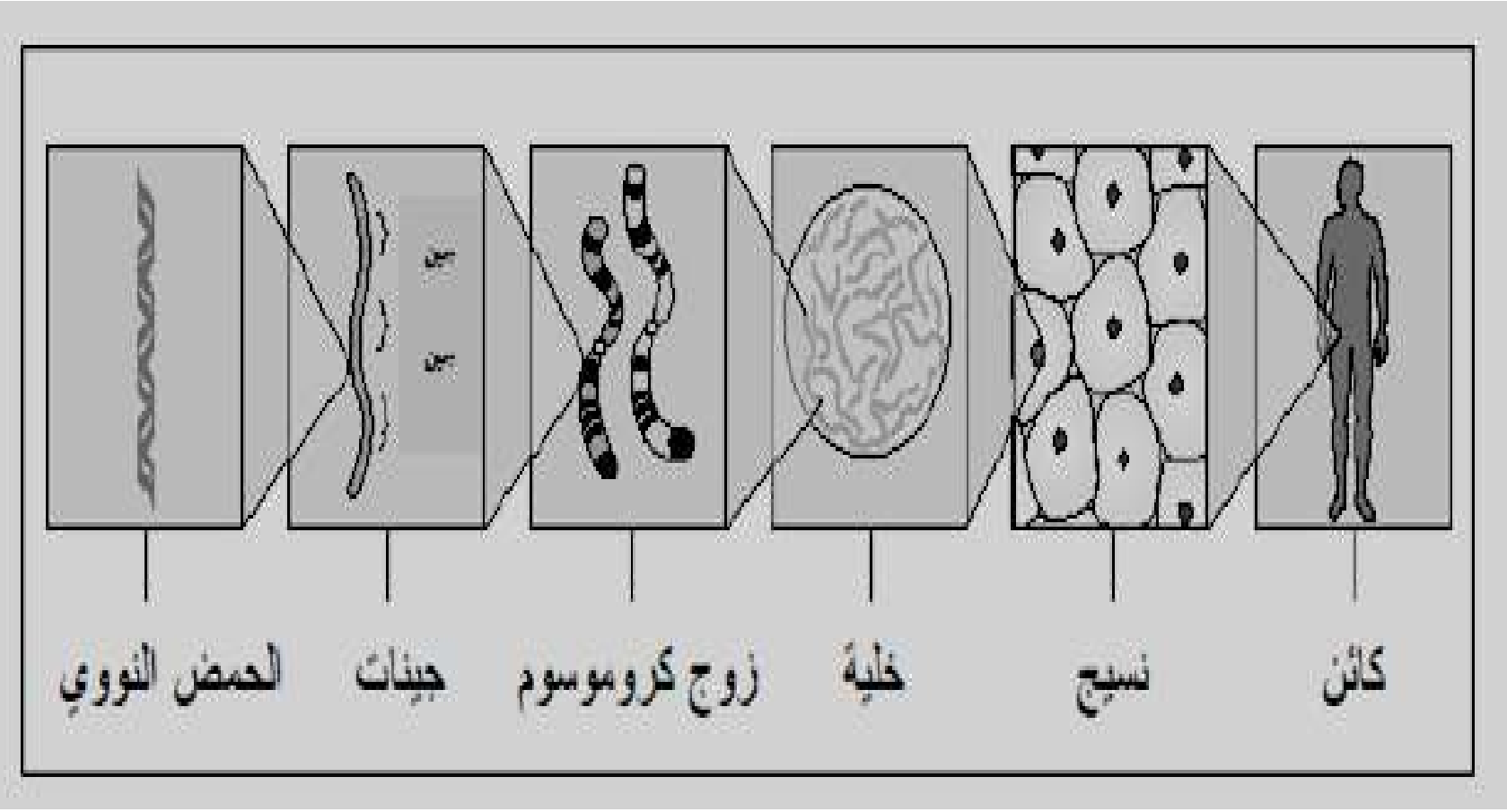
جامعة الموصل /كلية الزراعة والغابات

٢٠٢٢

E-mail: kamalesho@rocketmail.com

kamalesho@uomosul.edu.iq

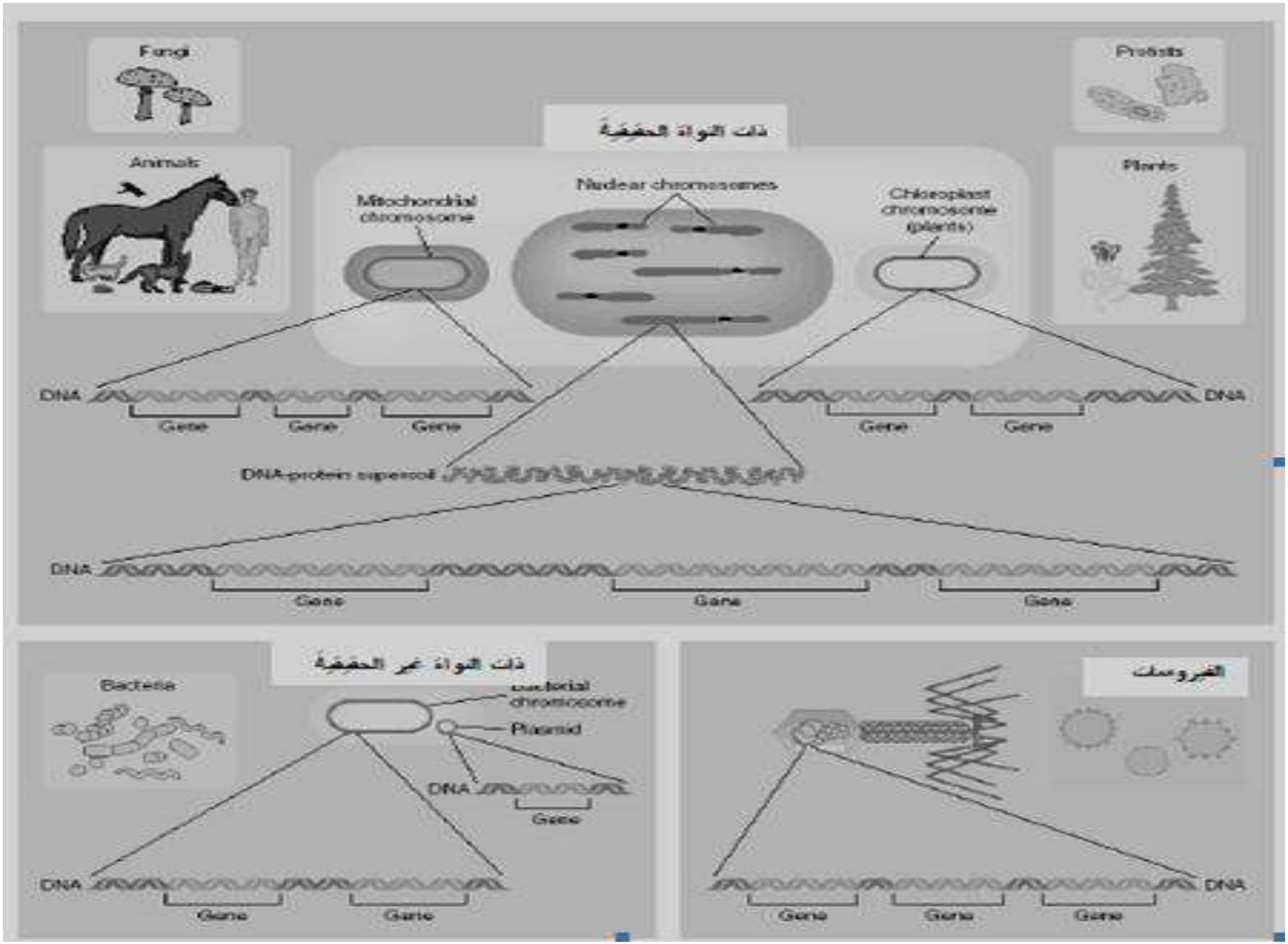
يضم علم الوراثة العديد من العلوم من أهم هذه العلوم هو علم الجينوم Genomic sciences الذي يدرس محتوى الوراثي الكامل الكائن الحي من الحامض النووي ، والجينوم هو وحدة التحكم الاساسية في الخلية وهي وحدة البناء الاساسية للكائنات



وتقسم الكائنات الى مجموعتين رئيسيتين وهي :-

١) الكائنات الحية ذات النواة الحقيقة Eukaryotes: هذه تمتاز بوجود غشاء خاص يحيط بالمادة الوراثية الرئيسية لتكون عضو يسمى النواة ، يوتكون جينوم هذه الكائنات من كروموسومات النواة الخيطية بالاضافة الى كروموسومات المايتوكوندريا الحلقي وكروموسومات البلاستيدات الحلقي الذي ويجد فقط في خلايا النباتات .

٢) الكائنات الحية ذات النواة الغير حقيقية (طلائعيات) Prokaryotes : تمتاز بعدم وجود غشاء الذي يحيط بالمادة الوراثية الرئيسية فبذلك لا تحتوي على نواة ، ويتكون جينوم هذه الكائنات من كروموسوم مفرد بشكل حلقي اضافة الى وجود اللبلازميد Plasmid في اكثر الحالات ويكون الحامض النووي DNA على شكل حلقي وصغير ويضم جينات خاصة بالتضاعف وجينات مقاومة للمضادات الحيوية ،


Fungi
Protists
ذات النواة الحقيقية
Animals
Nuclear chromosomes
Mitochondrial chromosome
Chloroplast chromosome (plants)
Plants
DNA
Gene
Gene
Gene
DNA
Gene
Gene
DNA-protein supercoil
DNA
Gene
Gene
Gene
ذات النواة غير الحقيقية
Bacteria
bacterial chromosome
Plasmid
DNA
Gene
DNA
Gene
Gene
الفيروسات
DNA
Gene
Gene
Gene

المجالات المختلفة لاستخدام الكاشفات الوراثية The field use of DNA markers

تعتبر الكاشفات الوراثية المستخدمة كبصمات وراثية من الادوات الوراثية المهمة ، وتستخدم يوميا في الجامعات والمعاهد والمراكز البحثية العلمية والشركات التي تتهم بحقل التقانة الحيوية والتي تهتم بتداول الكائنات الحية في الحقول العلمية المختلفة وايضا الاخلاقية في التشريعات والاخلاقيات ، واهم هذه الاستخدامات في المجالات التالية :-

١)التربية وتحسين الوراثي
٢)عزل واستنساخ الجينات Cloning
٣)نقل الجينات Gene transformation
٤)تحليل مواقع الصفات الكمية Quantitative characters loci
٥)الخرائط الجينية Genetic maps
٦)علم جينوم المقارن Comparitive genomics
٧)دراسة التباين الوراثي Polymorphism or fingerprinting
٨)دراسة العلاقة التطورية بين وداخل أنواع الكائنت الحية Phylogeny
٩)أستشعار التغيرات البيئية
١٠)الكشف عن الاضافات الغذائية
١١)الفحوصات المرضية
١٢)الطب الشرعي
١٣)القضايا والنزاعات القانونية

تقانة الكاشفات (الواسمات) الـ DNA (DNA markers techniques)

يتم اختيار واسمات الحامض النووي DNA الذي مراد دراسته حسب المواصفات الخاصة لكل كاشف وحسب الهدف من الدراسة المراد اجرائها ، ويجب ايضا الانتباه الى القدرات المتفاوتة لكاشفات الحامض النووي على ضوء درجة التميز على مستوى الصنف أو النوع أو الجنس وبصورة خاصة عند استخدام كاشفات الـ DNA ، لقد تطورت طرق كاشفات الحامض النووي ومن اهم والاكثر شيوعا من هذه الطرق في الاستخدام هي :-

أولا: تقانة التباين المحدود لاطوال القطع

Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

يعتمد في تقانة هذه الواسمات على وجود تباينات بين الطرز الجينية محل الدراسة في المواقع محددة ، وهذه التباينات ناتجة عن طفرة محدودة في الحامض النووي ، اذ يتم الكشف عن هذه الطفرات بتعريض الجينوم الكامل والمعزول الى أنزيمات قطع محددة Restriction enzymes وتكون لها القدرة على القطع من خلال تتابع معين للحامض النووي على سبيل المثال (AAGGAACG) وعليه فان أي تغيير في هذا التتابع سوف يمنع هذه الانزيمات من القطع في هذا الموقع في أحدى طرز الجينية المستخدمة ، فبذلك تكون النتيجة عبارة عن قطع مختلفة الاطوال ومتباينة بين الطرز الجينية المستخدمة وبسبب كثرة عدد هذه القطع يستخدم مسبار معلم Labeled probeللكشف عن بعضها باستخدام تهجين Southren hybridization (Southren ،١٩٧٥) ومن اهم مميزات هذه التقانة :-

١- أمكانية رؤية جميع صور الجين الواحد Alleles في وقت واحد معا.

٢- كون توارث الحامض النووي لهذا الواسم مشترك السيادة co-dominance.

٣- ليست بحاجة الى معرفة مسبقة بتتابع الحامض النووي ولا بالتراكيب الخاصة بصور الجين.

٤- التقانة المستخدمة بسيطة لكنها ذات معالم واضحة وبالتالي سهولة اعادتها بنفس النتائج بين. التجارب والمختبرات المختلفة

لكن لهذه تقانة ايضا عيوب منها:-

١) عدد العينات تكون محدودة في التحاليل (٣٠٠ – ٤٠٠) عينة .

٢) انتاجيتها ضعيفة نوعا ما .

٣) ذات كلفة عالية من حيث المواد المستخدمة والعمالة .

٤) تحتاج الى كميات كبيرة من الحامض النووي وذات نقاوة عالية منه .

٥) تعتمد على هلام الأكاروز فبذلك يصعب استعمال الاجهزة ذاتية العمل .

٦) تحتاج الى نظائر مشعة ولها احتياجات مختبرية معينة .

ثانيا : تقانة التضاعف العشوائي لـ DNA

Random amplified polymorphic DNA (RAPID)

تعتبر هذه الكواشف (الواسمات) واسعة الاستعمال اذ تقوم بانتاج البصمة الوراثية للجينومات وذلك باستخدام مجموعة معينة من البادئات Primers القصيرة العشوائية (١٠ قواعد) وذلك تحت ظروف تسمح لتلك البادئات بالبدء ببناء حتى لو كان تزواج القواعد غير كامل(Williams وأخرون ،١٩٩٠) للحامض النووي المستخلص والمنقى من الاوراق بطريقة الاستخلاص المصى بها الباحث (Dellaporta وأخرون ،١٩٨٣) وتقوم هذه البادئات بالبحث عن تتابعات مكملة لها وترتبط معها على حلزوني الحامض النووي وتتنافس الازواج المرتبطة والاكثر فعالية مع بعضها البعض خلال تفاعل الـ PCR لانتاج البصمة مكونة من بعض نواتج تفاعل السلسلة المتبلمر الى اكثر من ١٠٠ منتج من خلال هذه التقانة PCR ، وتمتاز هذه التقانة بـ :-

١) يمكن استخدامها دون الحاجة لاستخدام نظائر مشعة .

٢) لا تحتاج الى معرفة مسبقة بتتابع الـ DNA ولا بالتركيب الخاص باشكال الجين .

٣) يمكن استخدام البادئات العشوائية في كل الجينومات الكائنات المختلفة .

٤) تحتاج الى كمية قليلة من الجينوم لغرض التحليل .

٥) يمكن الكشف عن التباينات الناتجة عن عدد من البادئات معا في وقت واحد .

٦) الأجهزة المختبرية بسيطة جدا .

٧) تحتاج فقط الى جهاز تتابع الحراري Thermocycler وجهاز الاضاءة لفحص حزم الـ DNA المصبوغ Transilluminator .

من عيوب أو مساؤى هذه التقانة :-

١- مصداقية الواسمات هذه ليست بالمستوى المطلوب اذا لم تتم مراعاة نقاط تقانة معينة. بغية استخدامها في رسم الخرائط يجب الاستعانة بتحاليل أحصائية مناسبة .

٢- يتوارث هذه الواسم (الكاشف) بشكل سيادي ، وبالتالي لايمكن التعرف على الطراز الجيني المختلط Heteroztgous .

٣- نظرا لطبيعة العشوائية في اخذ عينة الجينوم ،فانه لا يمكن استخدام هذا الكاشف للتعرف على طفرة احادية أو أزاحة تقل عن ٠.٠٠١ % من حجم الجينوم .

٤- من خلال الدراسات العديدة اشارت هذه الى ان هذا الكاشف يقلل من المسافات الجينية بين الافراد الاكثر تباعدا .

٥- قد يحصل خلط في تمييز صور الجين الواحد بسبب تكوين حزم متشابهة في الاطوال لكنها مختلفة في التتابعات .

- **ثالثا: تقانة تضاعف الشظايا الطويلة المتعددة الاشكال**
- **Amplified Fragment length polymorphism (AFLP)**

تم تطوير هذه التقانة من قبل Vos وأخرون (١٩٩٥) ،هذه تقانة تعطي كاشفا قويا للحامض النووي حيث يستخدم بكثرة في بناء الخرائط الجينية المكثفة لابحاث الجينوم وايضا الاستنساخ الموضعي للجينات Positional cloning تعتمد هذه التقانة على تمييز ومضاعفة شظايا الحامض النووي DNA اللمقطع بواسطة أنزيمات قطع معينة عن طريق تفاعل الـ PCR ، وتمتاز هذه التقانة في الخصائص التالية : -

- ١) ليست بحاجة الى معرفة مسبقة بتتابع الحامض النووي ولا بالتراكيب الخاصة للجين .
- ٢) يمكن تحليل الواسمات الناتجة من تضاعف الشظايا الطويلة المتعددة الاشكال AFLP وهي ذات سيادة مشتركة فبذلك يمكن التعرف على الطرز الجينية المختلطة Heterozygous .
- ٣) لها المقدرة على تمييز الكاشفات للجينومات مهما كانت خلفياتها الوراثية أو تعقيداتها .
- ٤) لها ميزة في الاستخدام كبصمة للمستنسخات الجينومية Genomic clones التي تستخدم في بناء خرائط الفيزيائية
- ٥) كاشفات هذه التقانة تصلح ككاشفات وراثية وفيزيائية بنفس الوقت فبذلك تستخدم في دمج الخرائط الجينية والفيزيائية
- ومن مساوئ أو عيوب هذه التقانة
- ١) لا يمكن أن تظهر حزم متشابهة الافراد اذا قلت نسبة التشابه بينها عن ٩٠% ، فبذلك لا يمكن استخدامها في دراسات الجينوم المقارن .
- ٢) نظرا لوجود الكثير من الشظايا (قطع الـ DNA)المتباينة في العديد من الجينومات الا أن هذه الطريقة لا تبين استخداماتها الا القليل منها .

رابعا : تقانة منطقة التضاعف ذات التتابع الموصوف

Sequence characterized amplified region (SCAR)

في حالة تطبيق واسمات الـ DNA التي ذكرت سابقا مثل الكاشفات العشوائية التعددي للحامض النووي ،تنتج العديد من الحزم التي تعامل كل واحدة منها على انها كاشف (واسم) Marker مميز للحامض النووي DNAويكون عدد هذه الواسمات اكثر بكثير عن تطبيق تقانة AFLP وبغية تسهيل كواشف محددة من هاتين الطرقتين ، يمكن عزل حزمة الحامض النووي للكاشف المرغوب به وذلك من هلام الاكاوز ومن ثم استنساخه وتحديد تتابعه. فبذلك يمكن الكشف عن الجينات والتتابعات المسؤولة ودراستها باستخدام new primers في تفاعل الـ PCR ويطلق على الكاشف (الواسم) الناتج أسم منطقة التضاعف ذات التتابع الموصوف SCAR

خامسا : تقانة التتابعات المتكررة البسيطة Simple sequence repeats (SSR)

يعتمد هذا النوع من الكاشف على وجود تتابعات متكررة ومنتشرة على طول الجينوم في الكائنات المختلفة ونظرا لتفاوت أعدادها فان أطوالها متفاوتة وذلك لصور الجين الواحد alleles ، فمن التسمية هي بسيطة وليست طويلة احيانا لا يتجاوز طولها عن بضع مئات من القواعد ، ففي البداية يجب التعرف على التتابعات المجاورة لهذه التكرارات بغية تصميم primers يمكن استخدامها لمضاعفة هذه التكرارات مختلفة الاطوال لاستخدامها في تفاعل الـ PCR ولمعرفة هذه التتابعات المجاورة لابد من انشاء مكتبة جينومية ومن ثم البحث في داخلها عن التكرارات المتتابعة بتواليف مختلفة على سبيل المثال AT_n أو CCG_n حيث أن n هي عدد التكرارات . ، تمتاز هذه التقانة بقدرتها على التنقل بين الانواع والاجناس القريبة من بعضها ما جعل هذه المعلمات (الكاشافات أو الواسمات) قوية في استخدامها في المقارنات ،اضافة الى سهولة تفسيرها ، ومن أهم مميزات هذه التقانة :-

١- قوة التمييز العالية لها ،حيث يتفاعل الكاشف هذا مع مواقع ثابتة في الجينوم وقد توجد هذه المواقع في جينوم دون الاخر .

٢- قابلية للتطبيق بكفاءة لمختلف الجينومات بتعقيداتها وأصولها المختلفة .

٣- القدرة على مسح الجينوم بعدد قليل من المسبارات عديدة المواقع .

٤- الثبات في النتائج عند أعادة التحليل من مختبر الى أخر ومن وقت الى أخر .

٥- لا تتطلب أي معلومات مسبقة عن تتابع الحامض النووي للجينوم المراد تحليله .

من مساوئ هذه التقانة :-

١) لا تعطي معلومات كافية عن الصور للجين الواحد من طراز الحزم متعدد المواقع الناتج من التحليل

٢) لا بد من معاملة هذا الكاشف على أن ذات سيادة ومن أجل تحويله الى السيادة المشتركة لا بد من عمليات أستنساخ مضنية .

سادسا : تقانة النيوكليوتيدية المفردة متعدد الاشكال

Single nucleotide polymorphism (SNP)

تعتمد تقانة هذا الكاشف على وجود طفرات وراثية ويمكن له تحديدها بدقة ولو كانت في قاعدة واحدة من الـ DNA وذلك باستعمال بادئات خاصة قد تسمح أو لا تسمح لجزء معين من الحامض النووي بالتضاعف عن طريق PCR .

سابعا : تقانة الكشف عن الـ DNA الرايبوزومي Riposomes DNA (rDNA)

يعتبر الحامض النووي الرابيوزومي من مكونات الجينومات في كل الكائنات ، وانه يتكون من أنواع محددة من التكرارات مختلفة العدد والاطوال والتركيب ، فيمكن استخدامه لمقارنة الاصناف والانواع عن طريق تفاعل الـ PCR فقط أو يكون تابع بالقطع بانزيمات القطع المحددة Restriction enzymes ومن ثم الهجرة الكهربائية أو التقطيع ومن ثم استخدام تهجين Southern .

ثامنا : تقانة تفاعل السلسلة المتبلمر لـ RNA الناقل tRNA- PCR

يعتمد هذا الكاشف على وجود اختلافات بين تتابعات الحامض النووي tRNA الناقل بين الاصناف ، اذ يمكن مضاعفتها عن طريق الـ PCR ومن ثم الهجرة الكهربائية كما في دراسة الاختلافات بين أصناف البكتيريا Azaarcus التي تكون متعايشة مع النباتات المثبتة للنتروجين وبعض أنواع الفطريات .

تاسعا: تقانة تفاعل السلسلة المتبلمر للتكرارات rep-PCR

يعتمد هذا الكاشف على وجود الكثير من التتابعات المتكررة في الجينومات داخل العديد من الجينات أو قريبة منها وتختلف هذه التكرارات عن التتابعات المتكررة البسيطة SSR بانها تكون مختلفة وطويلة وليست بسيطة ، وتصمم بادئات خاصة لهذه التكرارات التي تنتج باستخدام تفاعل الـ PCR وثم التفريد الكهربائي . حيث تنتج العديد من الحزم المميزة للاصناف والانواع يطلق عليها الشفرة الخطية Bar code .

ويعتمد اختيار التقانة المناسبة على عدة عوامل منها :-

١) الهدف من البحث أو الدراسة

٢) الظروف البايولوجية للانواع المختلفة

٣) ماهو متوفر من المصادر

لقد تم اجراء العديد من الدراسات المقارنات باستخدام المعلمات او الواسمات الجزيئية والتي يعتمد عليها قياس مدى التنوع الوراثي بين العديد من الانواع النباتية .

المحاضرات الداخلة في الامتحان الشهري الثاني

١)محاضرة استحداث الكالس

٢) محاضرة الكاشفات الوراثية

٣)محاضرة كلونة الجين

٤)محاضرة عزل البروتوبلاست

٥) محاضرة النباتات المحورة وراثيا

شكرا
لإصغائكم

كلونة ألجين(استنساخ ألجين)
The gene cloning

أعداد

أستاذ مساعد دكتور

كمال بنيامين ايشو

جامعة الموصل / كلية الزراعة والغابات / قسم البستنة وهندسة الحدائق

٢٠٢٢

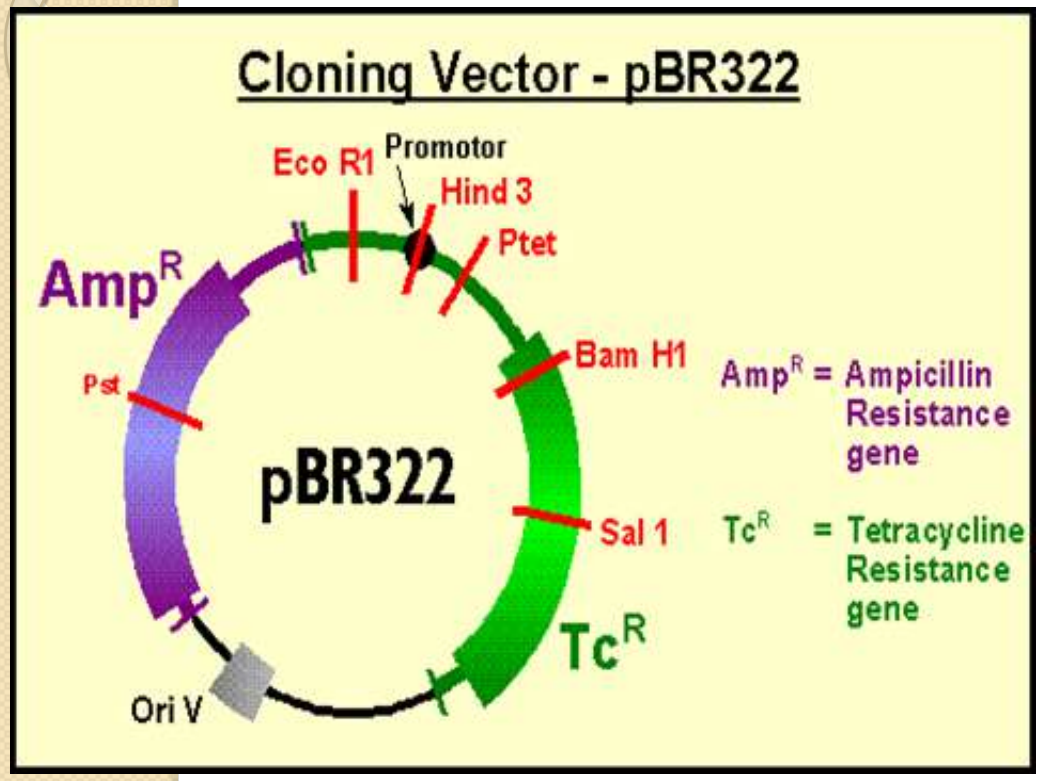
يقصد بكلونة الجين في تقانات الحياتية أو في تقانة الهندسة الوراثية بانها تنقل من خلالها الجينات من كائن إلى أخر ويمكن تعريف gene cloning على أنها عملية تكوين اتحادات وراثية Genetic combination جديدة عن طريق غرس جزيئات الـ DNA والمنتجة خارج الخلايا باي طريقة مناسبة In vitro في بلازميد أو فايروس أو أي ناقل كلونة Cloning vactor مناسب ليتسنى ادخالها إلى كائن حي أخر لا يحتوي اصلا على مثل هذه الجزيئات من DNA بحيث بمكنها التكاثر المستمر في المضيف الجديد

وهذا المعنى يؤكد على :

١) امكانية ادخال قطعة من الـ DNA إلى كائن حي لا يحتويها اصلا ويعني ذلك امكانية تجاوز حاجز النوع بحيث يمكن نقل الجينات من كائن معين إلى أي كائن أخر حتى لو كان ينتمي إلى نوع أخر مختلف تماما .

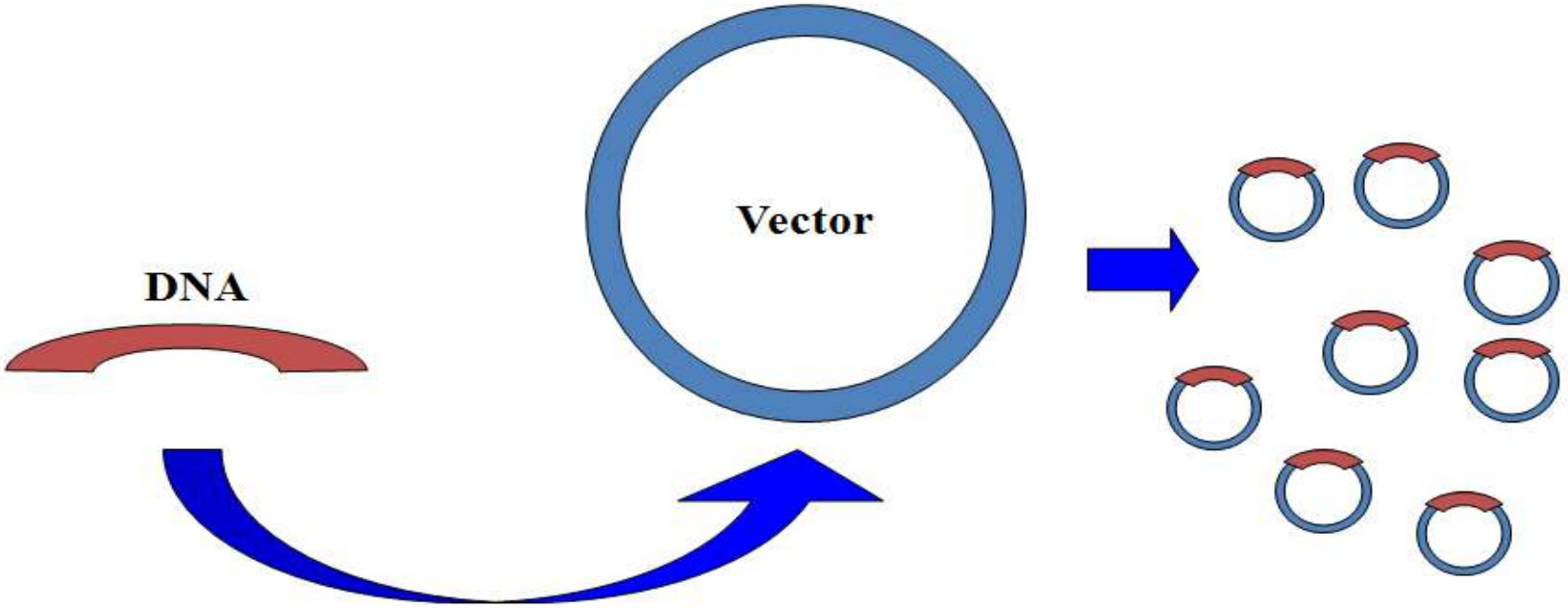
٢) هي امكانية اكثار ألجين المكلون في المضيف الجديد والحصول على ملايين النسخ من هذا ألجين اذ كل خلية من خلايا المضيف يحتوي على نسخة أو أكثر من ألجين المكلون .وتعد استنساخ أو اكثار ألجين لها فائدة كبيرة حيث يمكن من خلالها الحصول على :- * كميات هائلة من ألجين المرغوب بحيث يمكن استخدامها لاغراض عديدة ..

هدف أو الغاية من ذلك

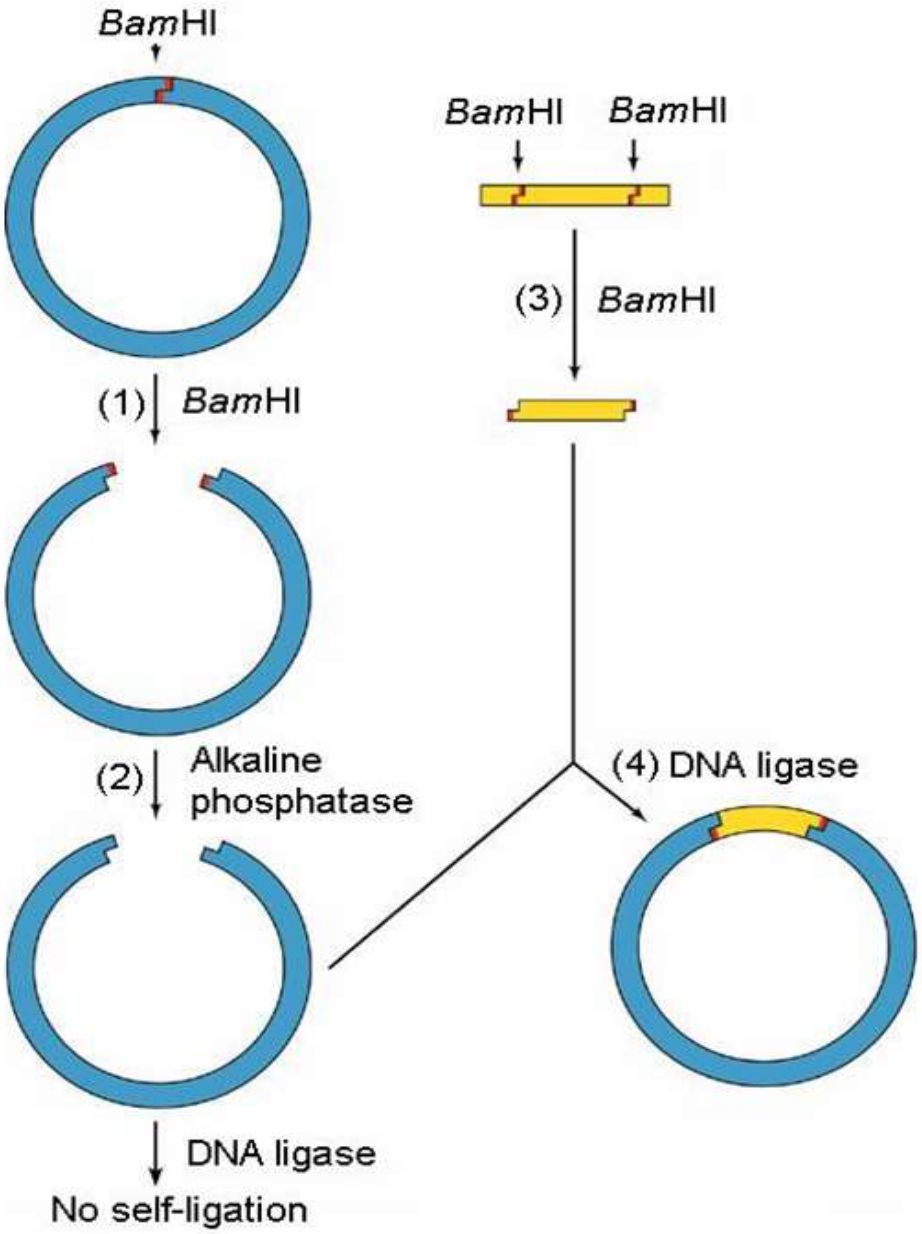


- * تحديد تتابع النيوكليوتيدات ذلك ألجين DNA sequencing ..
- * أو أجراء عمليات التطفير (تكوين طفرات) خارج الخلايا in-vitro mutagensis
- *أو التلاعب في تتابع ألجين للحصول على جين ذي مواصفات أفضل من ألجين الاصلي
- *أو لاغراض أخرى مفيدة في تقانات الهندسة الوراثية Genetic engeneering technological

Cloning Basics



Basic Elements:
DNA fragment (Gene)
Restriction endonucleases
DNA Ligase
Vectors
Host cell
Methods for introducing DNA into a host cell



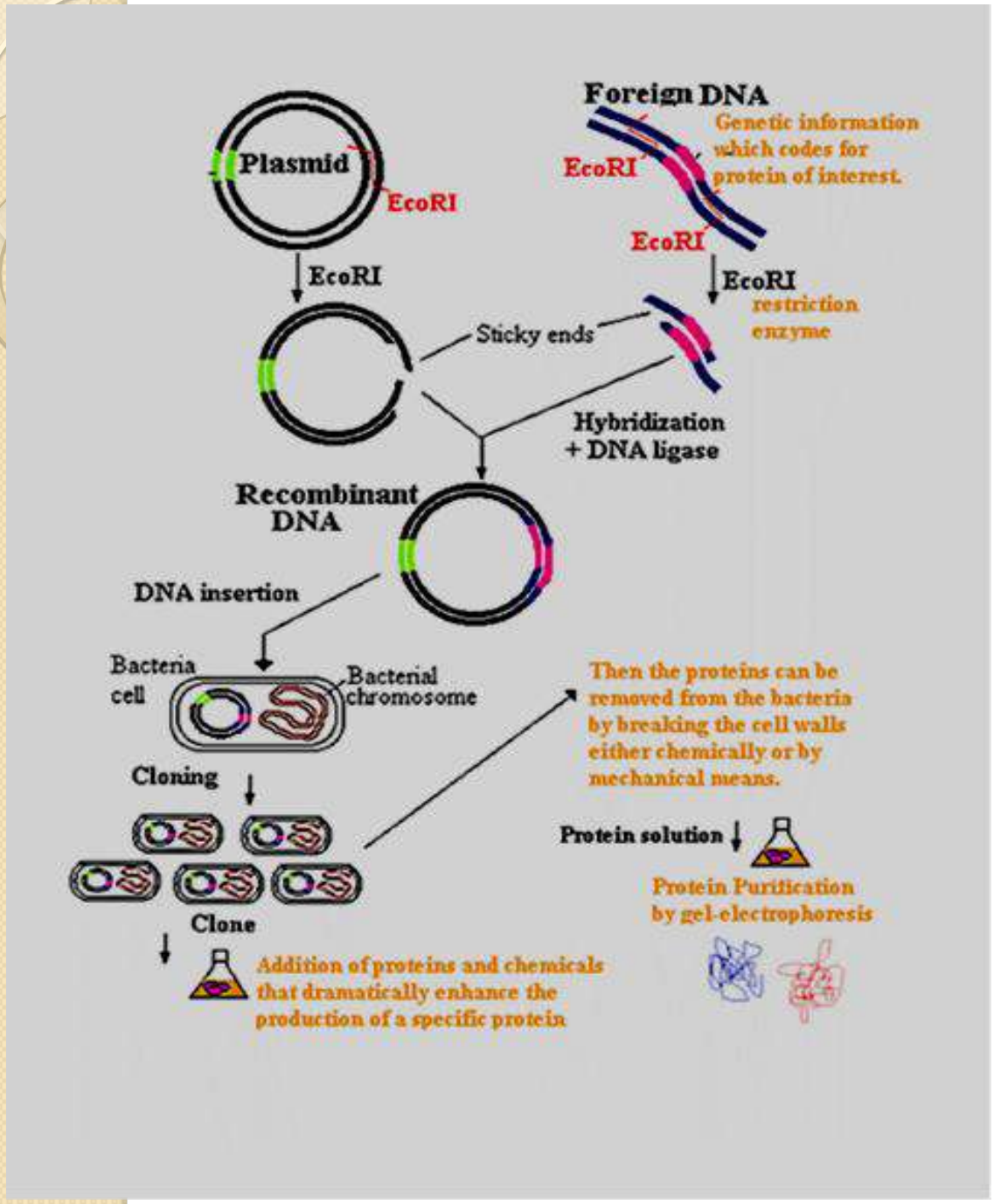
Alkaline phosphatase prevents vector re-ligation.

Step 1: We cut the vector(blue, top left) with *Bam*HI. This produces sticky ends with 5'-phosphates(red).

Step 2 : We remove the phosphates with alkaline phosphatase, making it impossible for the vector to re-ligate with itself.

Step 3: We also cut the insert(yellow, upper right) with *Bam*HI, producing sticky ends with phosphates that we do not remove.

Step 4: Finally, we ligate the vector and insert together. The phosphates on the insert allow two phosphodiester bonds to form(red), but leave two unformed bonds, or nicks, These will be completed once the DNA is in the transformed bacterial cell.



الخطوات الاساسية لكلونة ألجين

بغية أتمام عملية كلونة ألجين يجب توفر طرائق وسبل مختلفة من خلالها يمكن الوصول إلى الهدف المنشود الذي يوضح خطوات لكلونة أحدى الجينات الحيوانية في خلية بكتيريا .

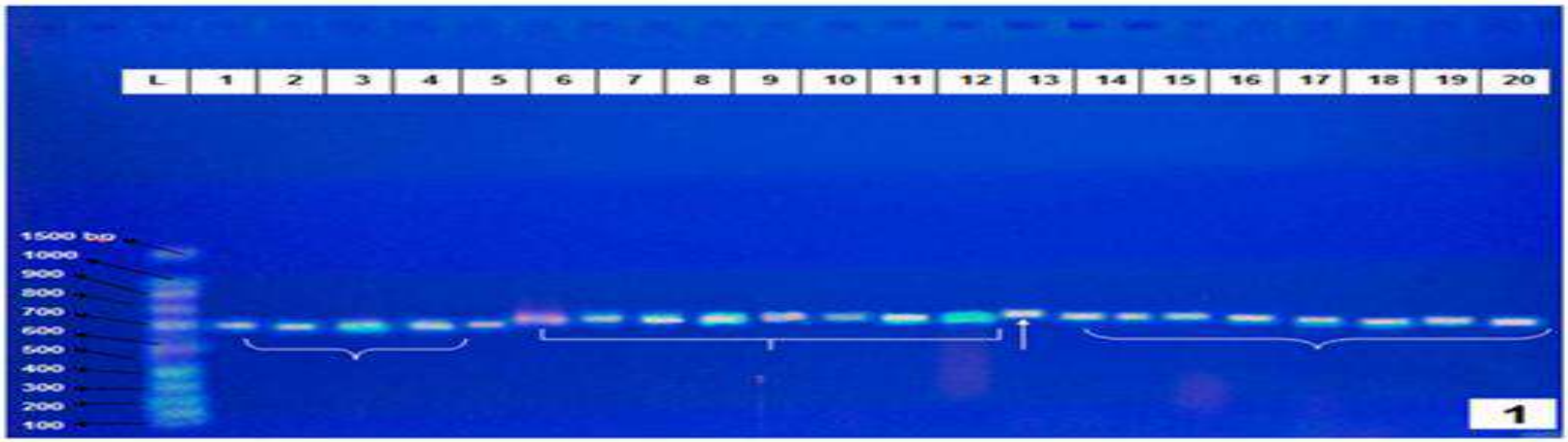
ومن هذا الشكل نجد الوسائل المطلوبة لإجراء تجارب كلونة ومن هذه الوسائل :-

١) عزل وتنقية الـ DNA المرغوب كلونتها (استنساخها) ويطلق على هذا الـ DNA بالـ (الغريبة) Forign DNA أو الـ المسافرة passenger DNA أو الهدف Target DNA ، لقد طورت طرائق عديدة لعزل الـ DNA الكروموسومية من خلايا البكتيريا وخلايا حقيقية النواة (نباتية أو حيوانية) وتعتمد جميع هذه الطرائق على تكسير جدران الخلايا بشكل هادئ بحيث لا يؤثر كثيرا على الكروموسومات ومن ثم فصلها عن باقي مكونات الخلية الأخرى بإتباع طرائق مختلفة بحيث تضمن الحصول على جزيئات الـ DNA بصورة نقية Pure DNA .

٢) توفر ناقل الكلونة مناسب والحصول عليه بصورة نقية ليتم ربط قطعة الـ DNA الغريبة بهذا الناقل ، وحاليا تتوفر نواقل كلونة مختلفة يمكن استخدام المناسب منها وحسب نوع التجربة ومعظم هذه النواقل مشتقة من البلازميدات والفايروسات .كما طرقت طرق عديدة لعزل وتنقية نواقل الكلونة بحيث يمكن من خلالها الحصول على هذه النواقل بشكل نقي ملائم لتجارب الكلونة .

٣) يجب توفر طريقة ملائمة لتقطيع جزيئة الـ DNA الغريبة أو المسافرة أو الهدف بغية الحصول على قطعة DNA صغيرة قابلة للكلونة (استنساخ) تحتوي على ألجين المرغوب ، وأيضا لقطع ناقل الكلونة مرة واحدة لجعله مناسبا لاستقبال قطعة الـ DNA الغريبة ، لقد أصبحت عملية تقطيع جزيئات الـ DNA بشكل مسيطر عليه ممكنة وذلك بعد اكتشاف انزيمات التقييد Restrirction enzymes في خلايا البكتيريا . تتميز هذه الأنزيمات بقابليتها على التعرف على تتابعات معينة من النيوكليوتيدات في جزيئة الـ DNA ومن ثم تقطع الجزيئة داخل أو قرب هذه التتابعات لإنتاج قطع الـ DNA محددة الأطوال ..هذا يعني إمكانية التحكم في عملية تقطيع جزيئات الـ DNA من خلال اختيار أنزيم التقييد الملائم .

٤) يجب توفر وسيلة مناسبة لعملية ربط (لصق) قطع الـ DNA الغريبة مع ناقل الكلونة لتكوين الجزيئة الهجينية (Hybird molecule) Recombinant molecule. وان اكتشاف انزيم DNA ligase الذي يعمل على ربط قطع الـ DNA مع بعضها وذلك عن طريق إعادة بناء الأواصر الفوسفاتية ثنائية الايستر . كما جعل ربط قطع الـ DNA المختلفة ممكنا فبذلك أصبح بالإمكان ربط قطع الـ DNA المشتقة من مصادر مختلفة لتكوين جزيئات هجينة لا توجد أصلا في الطبيعة



شكل يمثل نواتج تضاعف الـ DNA لتفاعل PCR لأصناف البزاليا والمرحلة على هلام الاكاروز بتركيز 1.2 % مع الدليل الحجمي القياسي Ladder باستخدام البادئ ١ =Pea-sP446 ، (١ = انوورد ، ٢ = Joff ، Santi (White = ٦ ، Duna pea (para field) = ٥ ، Green peas = ٤ ، English = ٣ ، G.S.C.22763 = ١٠ ، Wando = ٩ ، Early ownoard = ٨ ، Little marvel = ٧ ، pea) = ١٥ ، Solora = ١٤ ، SL.516 = ١٣ ، P.S.510571 = ١٢ ، P.S.305301572 = ١١ = ١٩ ، Spring = ١٨ ، Thomas laxeton= ١٧ ، Petit proval= ١٦ ، Sel.481 (Local المحلي = ٢٠ ، Mammoth meling

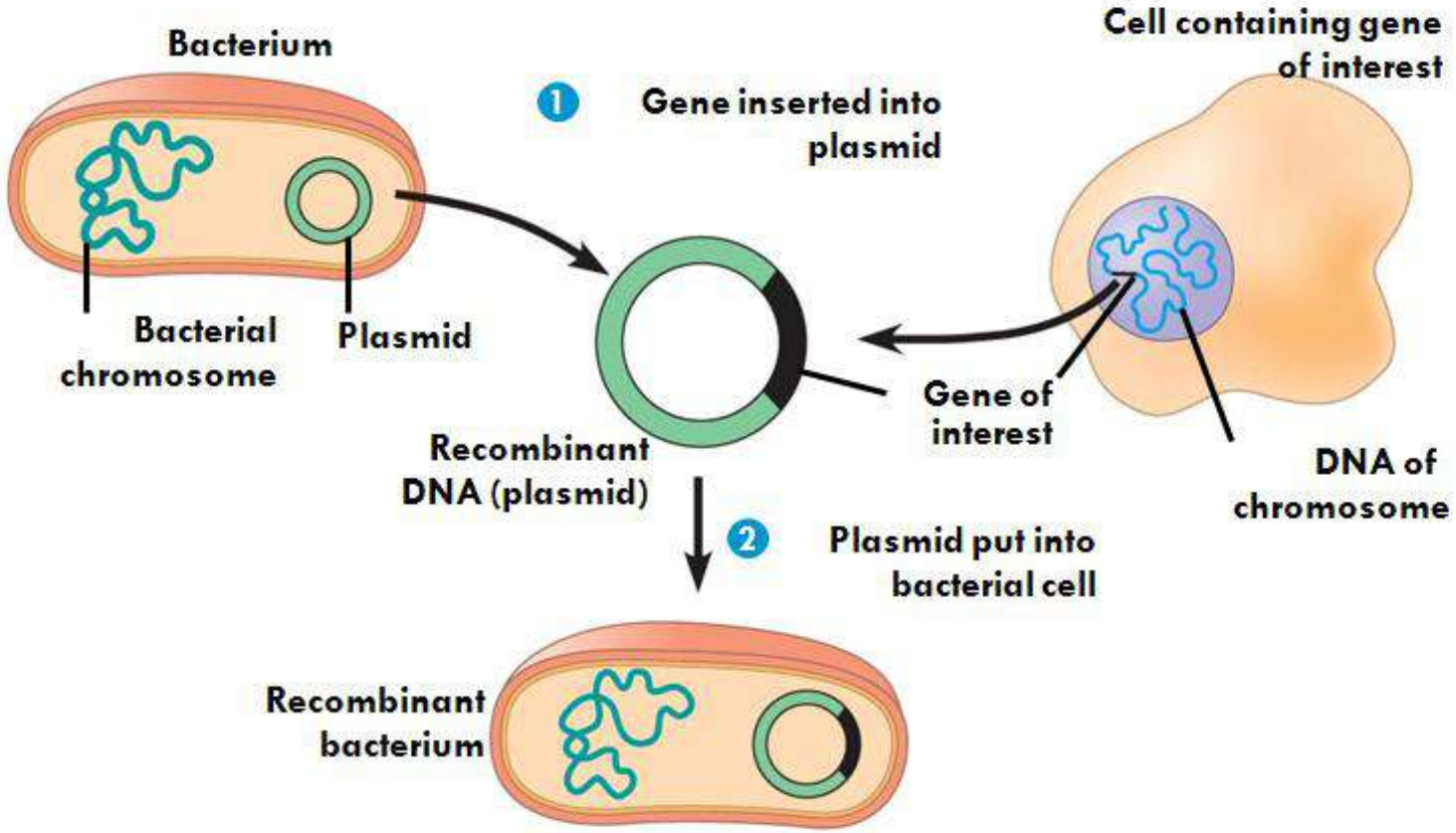
نواتج تضاعف الـ DNA (عن أيشو ، ٢٠١٢)

٥) كما يجب توفر وسائل مناسبة لمراقبة عمليات تقطيع وربط جزيئات الـ DNA وهذا يعد من الضروريات جدا لمعرفة فيما إذا كان أنزيم التقيد المستعمل قادرا على تقطيع جزيئة الـ DNA أم لا قبل الاستمرار في تجربة الكلونة ، كما انه من الضروري معرفة عدد قطع الـ DNA الناتجة عن عملية التقطيع وتقدير حجومها لمعرفة صلاحيتها للكلونة ، وعلاوة على ذلك فان التأكد من حدوث عملية الربط بين قطه الـ DNA الغريبة وناقل الكلونة يعد أمرا مهما قبل البدء بالتجربة (الاسترسال في التجربة) .وبما أن عملية القطع والربط التي تجرى عادة في انبوبة اختبار لا يمكن متابعتها بالعين المجردة (بصريا) لذا يجب استخدام وسائل وطرق أخرى للتاكد من حدوث هذه العمليات ..وتتم المراقبة عمليات القطع والربط حاليا باستخدام الترحيل الكهربائي (الهجرة الكهربايئة) في هلام الاكار أو هلام البولي أكريلامايد Agarose or polyacrylamid gel eletrophoresis حيث تضاف جزيئات الـ DNA إلى طبقة رقيقة من الاكار وبعد إمرار التيار الكهربائي ستتحرك قطع الـ DNA المختلفة إلى مسافات تتناسب مع أوزانها الجزيئية مكونة حزما منفصلة على الاكار يمكن تحديد أعدادها وأحجامها بسهولة .

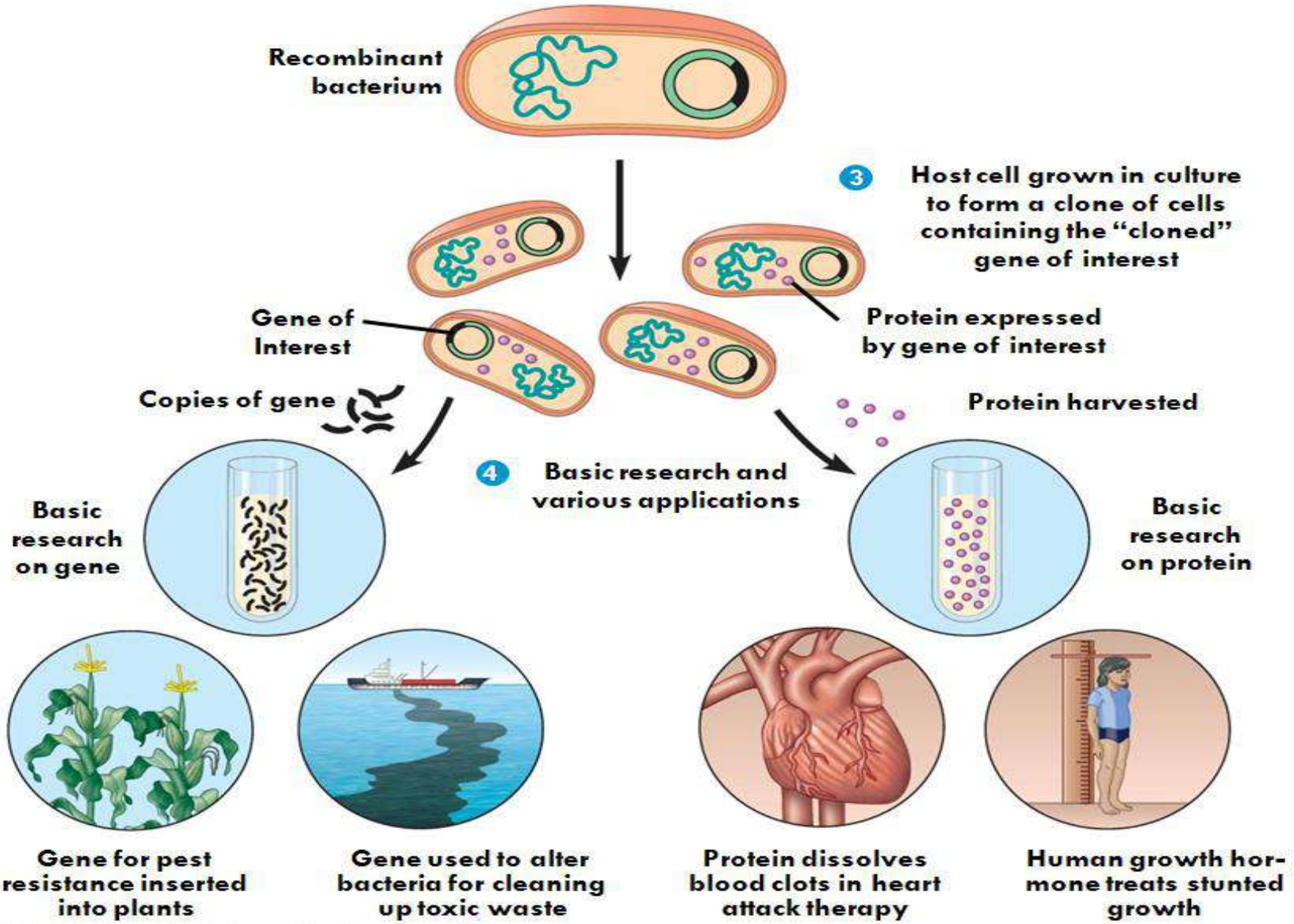
٦) يجب توفر وسيلة يمكن من خلالها إدخال الجزيئات الهجينة الناتجة عن عمليات الربط إلى خلايا الكائن المضيف بحيث يمكن لهذه الجزيئات أن تديم نفسها في المضيف الجديد وتتوارث بثبات بين الأجيال المتعاقبة .

٧) بعد إدخال الجزيئات الهجينة إلى خلايا المضيف يجب توفر طريقة ملائمة لانتقاء الخلايا المستقبلية للجزيئة الهجينة الحاملة للجين المرغوب وتمييزها عن الأعداد الهائلة من الخلايا المستقبلية للجزيئات الهجينة الأخرى ، لقد طورت عدة طرق لانتقاء المباشر وغير المباشر التي يمكن من خلالها انتقاء الخلايا الهجينة المرغوبة بسهولة وبكفاءة عالية .

A preview of gene cloning and some uses of cloned genes



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.



Copyright © 2008 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings.

زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء النباتية
Plant cell and tissues and organs culture

يقصد بتقانة زراعة الأنسجة النباتية Plant tissue culture عملية عزل الخلية أو النسيج أو العضو النباتي وزراعته ونموه وتطوره خارج الجسم الحي في أوساط غذائية اصطناعية معقمة وتحت ظروف محددة من حيث الحرارة والضوء .

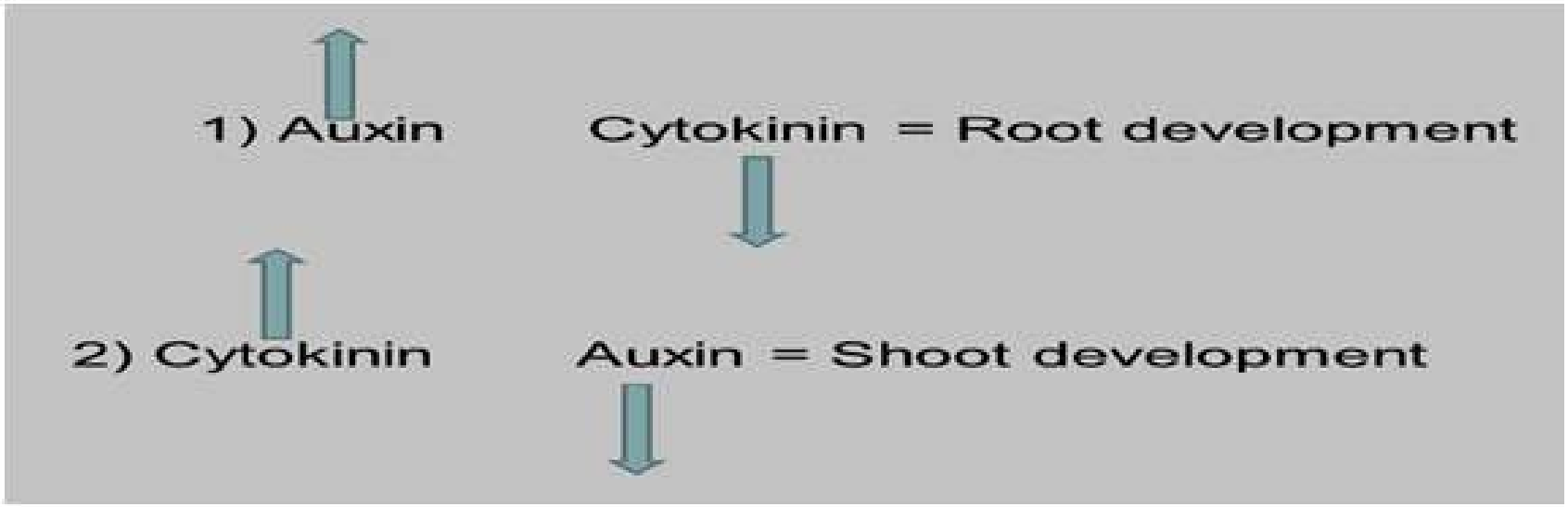
التقدم الكبير الذي حصل في هذه التقانة (تقنية زراعة الأنسجة النباتية) هو اكتشاف وتشخيص أول هرمون نباتي طبيعي وهوAuxin (الاوكسين : اندول حامض الخليك IAA) وذلك من قبل Kogl وآخرون ، إذ أدى هذا الاكتشاف إلى اضافته إلى الوسط الغذائي إلى انقسام الخلايا وتكوين الكالس ، ، وركزت معظم الدراسات على تشخيص هذه المواد الفعالة ، وأطلق Miller وآخرون (١٩٥٥) من فصل أول هرمون الساتوكاينين (Cytokinin) من حيامن سمك الرنكة ، وأطلق Miller وSkoog (١٩٥٧) فرضية التحكم الهرموني بتكوين الأعضاء (الجذور والسيقان Roots and Stems) وذلك عن طريق الموازنة بين الاوكسين والسايتوكانين :

Two hormones affect plant differentation

- Auxin : stimulates root development

-Cytokinin : stimulates shoot development

Generally the ratio of these two hormones can determine plant development as flowing



3) Auxin = Cytokinin = callus development

التطبيقات العملية لتقانة زراعة الأنسجة النباتية

أولا: الإكثار السلالي السريع Rapid clonal propagation

تعد طرق إكثار النباتات خضريا من أهم التطبيقات العملية لزراعة الأنسجة في الوقت الحاضر لما تتمتع به هذه الطريقة من فوائد وخصائص تميزها عن طرق الإكثار التقليدية ومنها :

١) إمكانية إنتاج إعداد كبيرة جدا من النباتات المتجانسة وذلك باستعمال جزء صغير Small part من نبات إلام Mother plant وخلال فترة قصيرة نسبيا

٢) التمكن من إنتاج على مدار السنة بسبب سهولة السيطرة على الظروف البيئية في أماكن الإكثار إضافة إلى الاقتصاد في المساحات المخصصة للإكثار

٣) التمكن من إكثار الخضري للنباتات التي يصعب إكثارها خضريا بالطرق التقليدية

٤) إكثار النباتات الهجينة وإنقاذ الأجناس المهددة بالانقراض

٥) تجنب التدهور الذي قد يصيب النباتات المكثرة بالطرق التقليدية بسبب الإصابات المرضية المختلفة وبالأخص الإصابات الفايروسية

واستنادا إلى تقسيم Murasige فان هناك ثلاث طرق رئيسية للإكثار وهي :-

أ- تكوين البراعم العرضية Adventitious bud formation

يقصد بالبراعم العرضية تلك البراعم التي تنشا في غير أماكنها الطبيعية (البراعم القمية الابطية في آباط الأوراق) التي يمكن تشجيع تكوينها على أنسجة الكالس النامية على

أوساط غذائية محددة لتنمو فيما بعد إلى سيقان يمكن تجذيرها بسهولة ، وتعتمد هذه الطريقة على تنظيم عملية نشوء السيقان والجذور Roots and Shoots بواسطة الاوكسينات والسايتوكانينات كما وصفها Skoog و Miller ، لكن يعاب على هذه الطريقة مرور النباتات الناتجة بمرحلة الكالس وبالتالي احتمالية حصول تضاعف في عدد الكروموسومات وبالأخص بعد عدة مرات من مراحل تقطيع الكالس وإعادة زراعته لفترات طويلة.

ب- تحفيز التفرعات الجانبية Enhancement of axillary branching

أساس الذي بنيت علية هذه الطريقة هو القضاء على السيادة القمية بواسطة السايتوكانين ، اذ تبدا البراعم الابطية بالنمو والتطور إلى سيقان يمكن عزلها وتجذيرها ، وتعد هذه الطريقة من أسرع الطرق و اكثرها استمرارا ، حيث يمكن عزل الأفرع مرة ثانية وثم التغلب على ظاهرة السيادة القمية فيها والحصول على أعداد أخرى من السيقان ، كما إنها اقل خطورة من الطريقة السابقة (أ) لعدم مرورها بمرحلة الكالس ..

ج- استحداث الأجنة الجسمية Induction of somatic embryos

هذه من أسرع الطرق وأكثرها شيوعا بالإضافة عن الإعداد الهائلة من النباتات التي يمكن إنتاجها ،هذه الطريقة تحفز الأجنة من الكالس النامي من أنسجة أي جزء نباتي على أوساط غذائية مجهزة بالاوكسين بتراكيز عالية نسبيا ، وبعد وصول الكالس إلى الحجم المطلوب تتم زراعته بعد تقطيعه على أوساط غذائية لا تحتوي على أي تركيز من Auxin ، ثم بعد تطور الأجنة الجسمية يتم عزلها وزراعتها بغية إنباتها والحصول على نباتات جديدة ، لكن يعاب على هذه الطريقة أنها تمر بمرحلة الكالس واحتمال حصول تباينات وراثية في النباتات الناتجة بهذه الطريقة

ثانيا : تربية النبات وحفظ المصادر الوراثية

Plant breeding and germplasm preservation

من المعلوم أن البحوث الدراسات التي تجرى في مجال تقانة زراعة الأنسجة شانها في ذلك شان معظم التقانات الحيوية تصب في خدمة تربية وتحسين النبات ، إذ من خلالها يمكن استنباط أصناف نباتية بمواصفات خاصة من حيث الإنتاج ومقاومة الإمراض وتاقلهما لظروف بيئية قاسية من الجفاف والملوحة .. وغيرها ، واليوم أصبحت مجالات تقانة زراعة الأنسجة توفر حلولا لكثير من المشاكل التي كان يعاني منها مربي النبات كعامل الوقت وعدم التوافق بين النباتات بغية إجراء التهجينات.

ومن اهم التقانات المستخدمة في هذا المجال : -

١: احداث الطفرات في الخلايا الجسمية Stimulate mutations in somatic cells

٢.: دمج البروتوبلاست Protoplast fusiont

ان تقنية دمج وزراعة البروتوبلاست اوجد حلا لمشكلة عدم التوافق الذاتي بين الاجناس والاصناف ، ومكنت من استحداث هجن لا يمكن الحصول عليها في الطبيعة ،اضافة إلى امكانية نقل مواد وراثية جديدة من خلية إلى أخرى بحيث امكن بواسطة الأنزيمات المحللة لجدار الخلية من عزل البروتوبلاست الذي ينقى ثم يتم تشجيع الاندماج بين بورتوبلاست الاصناف المرغوبة بوجود مواد كيمياوية معينة أو باستعمال تقانة الاندماج الكهربائي Electrofusion

٣ : زراعة حبوب اللقاح والمتوك Microspore and anther culture

وفرت تقانة زراعة حبوب اللقاح حلا لمربي النبات في الحصول على نباتات متجانسة تحوي على نصف العدد الاصلي من الكروموسومات في فترة زمنية قصيرة بالمقارنة بطرق التلقيح التقليدية ، ثم بعدها مضاعفة العدد الكروموسومي بواسطة استخدام مادة Colchicine للحصول على نباتات متجانسة وراثيا وخصبة ، ولصعوبة هذه التقانة لجا الباحثون إلى تقانة زراعة المتوك بصورة كاملة في مراحل تطورية محددة ، لكن يجب فحص جميع النباتات الناتجة من زراعة المتوك تفاديا واستبعادا لنباتات التي تنتج من خلايا جسمية لجدار المتك التي تحتوي على العدد الاصلي من الكروموسومات .

٤: زراعة ألأجنة والبويضات والمبيض Culture of embryos , ovules and ovaries

من اهم الامور التي تحصل بعد التهجين سواء بين الاجناس واحيانا بين اصناف الجنس الواحد ، وحالة اجهاض الاجنة Ambryo abortion فبذلك لا يمكن الحصول على بذور هجينة ما لم يتم عزل الجنين في مراحل مبكرة من زراعته على وسط غذائي لينمو ويتطور إلى بادرة ، وعند حصول ظاهرة الاجهاض في مراحل مبكرة (أي بعد حصول عملية الاخصاب مباشرة) التي لا يمكن فيها عزل ألجين وذلك لصغر حجمة فبذلك يلجأ إلى تقانة عزل البويضة بكاملها وزراعتها على أوساط غذائية ملائمة لحين تطور ألجين ، كما يتم استخدام تقانة زراعة البويضات في القضاء على حالات عدم التوافق Incompatability وخصوصا في الاجناس المتباعدة وراثيا ، اي قد تنضج حبوب اللقاح في أوقات مبكرة قبل ان تكون المياسم مستعدة لعملية التلقيح ، أو قد لا تنمو انبوبة اللقاح على ميسم الزهرة بسبب وجود بعض المواد المثبطة في مياسم الزهرة أو غيرها من العوامل ، فباستخدام تقانة التلقيح والاخصاب خارج جسم الحي يمكن التغلب على هذه المشكلة وذلك عن طريق عزل البويضات وزراعتها ومن ثم تلقيحها بحبوب اللقاح من النبات المرغوب بغية الحصول على اجنة حية تنمو فيما بعد إلى بادرات وثم نبات كامل

ثالثا : إنتاج نباتات سليمة خالية من المسببات المرضية Production of pathogen – free plants

النباتات التي يتم إكثارها بالطرق الخضرية منذ فترة طويلة غالبا ما تحتوي على واحد أو أكثر من المسببات المرضية كالفايروسات (الرواشح) Viruses والبكتيريا ، لقد وفرت طريقة الإكثار باستعمال تقانة زراعة الأنسجة النباتية للحصول على نباتات خالية من المسببات المرضية بالمقارنة بالطرق التقليدية للإكثار الخضري ، وذلك لصغر الجزء المستخدم في الإكثار وبالتالي احتوائه على القليل من المسببات المرضية والتي يمكن القضاء عليها بطرق التعقيم المختلفة وتستخدم ثلاث تقانات رئيسة للحصول على نباتات خالية من المسببات المرضية وهي :

** زراعة قمة الساق Shoot tip culture

يتم بهذه الطريقة استئصال قمة الساق بـ ٠.١ – ٢.٠ ملم ثم زراعتها على وسط غذائي للحصول على نبات واحد One plant ،بسبب ذلك تعد هذه الطريقة بطيئة ، وتعتمد عملية نجاح هذه التقنية بخلوها من المسببات على حجم الجزء المزروع ، فكلما كان كبيرا زادت فرصة النجاح بالمقابل تقليل فرصة الحصول على نباتات غير سليمة .

** زراعة المرستيم القمي للساق Shoot apical meristem culture

تعد هذه من الطرق المضمونة للحصول على نباتات سليمة إذ يستأصل المرستيم القمي للساق بطول ٠.٠٥ -٠.١ ملم فقط بدون أي بادئات للأوراق ، تكون نسب النجاح واطئة وذلك لأنها تحتاج إلى سرعة في عملية عزل القمة النامية ونقلها إلى الوسط قبل جفافها

** تطعيم القمة النامية خارج الجسم الحي Shoot tip grafting in vitro

تستخدم هذه التقنية في الحالات التي يصعب فيها تجذير القمة النامية بسهولة ، وتتم في هذه التقنية عملية استئصال القمة النامية مع ١- ٢ من بادئات الأوراق وتركيبها على بادرة صغيرة الحجم تكون نامية على وسط غذائي

رابعا: إنتاج المواد الثانوية Production of secondary substances

الكثير من المواد الصيدلانية والعقاقير الطبية مثل المركبات الفينولية والستيرويدات والصبغات وغيرها من المواد تنتجها الخلايا النباتية بوصفها نواتج ثانوية أو عرضية للفعاليات الايضية المختلفة ، وفي معظم الأحيان لا يمكن تصنيع هذه المركبات مختبريا بل يجب الحصول عليها من مصادرها الطبيعية ، لذلك استخدمت تقانة زراعة النسيجية لإنتاج هذه المواد بدلا من الاعتماد على نباتات الأم عن طريق عزل أجزاء معينة (التي تعد الأماكن الرئيسة لإنتاج مثل هذه المركبات) من النبات ثم زراعتها على أوساط غذائية لتحفيز نموها وإنتاج تلك المواد .

هذه التقانة توفر العديد من الفوائد التي تقترن بإنتاج هذه المركبات منها :

أ) الحصول على هذه المركبات بدرجة نقاوة عالية تفوق تلك التي تم فصلها من النبات الكامل

ب) إنتاج هذه المواد يكون سريعا ولا يعتمد على موسم النمو

ج) تقليل في المساحات الزراعية اللازمة لزراعة النباتات الطبية بغية استخلاص هذه المواد

د) تمكن السلطات بالسيطرة على إنتاج بعض المركبات المهمة المستخدمة في التخدير كالمورفين والاتروبين فبذلك تحد من سوء استخدام هذه المواد

شكرا
لإصغائكم