جامعة بنها

كلية الزراعة

قسم الوراثة

نموذج اجابة امتحان – الوراثة في مزارع الانسجة– الفرقة الرابعة – شعبة البيوتكنولوجي – وراثة

الفصل الدراسي الاول ٢٠١٤/٢٠١٥

أجابة السؤال الاول:

طرق نقل الجينات

نقل الجينات عن طريق الأجروبكتريم :-

تنتج أمراض تدرن التاج (Grown Gall) والجذر الشعري (Hairy Root) طبيعيا عن الإصابة بالأجروبكتريم تيوميفاسينس (Agrobacterium Tumefaciens) والأجروبكتريمرايزوجينيس (Agrobacterium Tumefaciens) علي التوالي . وهذه البكترياتتبع العائلة الريزوبية (Rhizobiaceae) وتوجد بكثرة في التربة وتصيب خلايا النبات بالقرب من الجروح وعادة عند منطقة التاج عند سطح التربة ويعتبر هذان النوعان من البكتريا ناقلين طبيعيين للجينات (Natural Gene Vectors) فخلال الإصابة بهما ينقل جزء صغير من المادة الوراثية للبكتريا إلي التركيب الوراثي لخلايا النبات المضيف (Host Plant)

تحتوي البكتريا علي بلازميات والبلازميدة عبارة عن جديلة صغيرة من الدنا تتخذ شكل حلقة منفصلة عن الكروموزومات يمكنها أن تتحرك من خلية بكتيرية إلي أخري كما يمكنها التناسخ الذاتي . وتحتوي الأجروبكتريم تيوميفاسينس علي البلازميدة تي آي (Ti) المسببة للتدرن التاجي بينما تحتوي الأجروبكتريم رايزوجينيس علي البلازميدة آر آي (Ri) التي تسبب الدفع لتكوين الجذور في العديد من النباتات . وهذا يحدث نتيجة لنقل قطعة تعرف بالدنا تي من البلازميدة تي آي أو آر آي إلي المادة الوراثية في النباتات الحساسة للأجروبكتريم .

ينقل الدنا تي إلي خلايا النبات عن طريق شفرة موجودة في منطقة فر (Vir) للبلازميدة تي آي الضرورية لهذه العملية . وبمجرد دخول الدنا تي ضمن المادة الوراثية لخلية النبات تظهر تعبيرات الجينات المنقولة في هذه الخلية . فتنتج بروتينات جديدة في الخلايا المحولة وراثيا . ولد نم توصيف بعض هذه البروتينات ووجد أنها إنزيمات تتدخل في عملية تخليف الأوكسين إندول حمض الخليك (Indole-3-Aceticacid) والسيتوكينين (

cytokinin) ريبوزايلزياتين (Ribosylzeatin) والأوبين (Opines) ويعتقد أن الإنتاج الغزير من الأوكسين والسيتوكين هو السبب في تكون التدرنات . ولقد استخدمت هذه الخاصية الطبيعة معمليا في نقل جينات معينة ذات أهمية كبيرة إلي النباتات ذات الفلقتين . فتدرنات التاج التي تسببها الأجروبكتريم تيوميفاسينس تظهر خصائص مورفولوجية متعددة مثل تكون كتل من الخلايا التي تنمو بدون إتظام . وعلي العكس تسبب الأجروبكتريم رايزوجينيس عادة إنتاج جذور شعرية لها القدرة علي النمو دون حدوث إنتحاء أرضي . وتجتمع تدرنات التاج والجذور الشعرية في بعض الخصائص مثل المقدرة علي النمو في مزارع الأنسجة دون الحاجة لإضافة منظمات نمو وكذلك علي انتاج أحماض امينية غير عادية مثل الأوباين . وتنتفع البكتريا بالأوباين كمصدر للكربون والنيتروجين . ويختلف نوع الأوباين المنتج باختلاف نوع البكتريا وأكثر دقة بنوع البلازميدات التي تحتويها أنواع البكتريا المختلفة وليس بنوع النبات المضيف . فتنتج الأجروبكتريم تيوميفاسينس الأكتوبيان (Octopine) والنوبالاين (Nopaline) بينما تنتج الأجروبكتريم رايزوجينيس الأجروباين (Agropine) أو المانوباين (Mannopine)

نقل الجينات عن طريق الفيروسات :-

بالرغم من أن الأجروبكتريم هو أهم الطرقالطبيعية في نقل الجينات فإن استخدام الفيروسات يعتبر طريقة أخري طبيعية لنقل الجينات . ولقد استخدمت الفيروسات ذات الدنا والرنا في إجراء عملية نقل الجنيات . حيث يمكن أن تستبدل الجيناتالغريبة لجزء من التركيب الوراثي للفيروس مما يؤدي إلي نشوء الفيروس معوق (Defective) يستطيع إختراق أنسجة النبات في وجود فيروس مساعد (Helper Virus) ويعمل الفيروس المساعد علي إنتاج مركبات تساعد علي تضاعف (Replicate) وتعبئته (Package) ونفاذ الفيروس المحور إلي أنسجة النبات .

وتوجد عدة مميزات لاستخدام الفيروسات في نقل الجينات حيث يمكنها أنتصبيب مجالا أوسع من العوائل النباتية بما في ذلك نباتات الفلقة الواحدة . وغالبا ما تصيب الفيروسات النباتات جهازيا . مع ذلك فلا يوجد دليل علي استقرار المادة الوراثية المنقولة بهذه الطريقة بصورة دائمة في المادة الوراثية للنبات يمكن توارثها .

نقل الجينات بإستعمال الكيماويات :-

أولي طرق النقل المباشر للجينات هي طريقة الكيماويات . وتعتمد الطريقة الكيماوية لنقل الجينات علي معاملة البروتوبلاست بالبولي إثيلين جلايكول (Polyethyleneglycol) عند رقم هيدروجيني مرتفع في وجود كاتيونات ثانية التكافئ (Divalent Cations) ففي الطبيعية فإن البلازماليما (plasmalemma) تسمح

بقلة بنفاذ الجزئيات العملاقة مثل الدنا وبالتالي يجب العمل علي زيادة هذه القابلية حتي يستطيع الدنا أن يعبر خلال هذه الأغشية . ويمكن تحقيق ذلك عن طريق استخدام الطريقة الكيماوية أو الكهربية . وتتلافي طرق النقل المباشر للجينات نقل الجينات المشفرة لمنظمات النمو وعدم الحاجة إلي التتابعات المحددة (Broder Sequences) والتي تلاصق (Flanking) منطقة الدنا تي للبلازميدة تي واللازمة لحدوث استقرار للدنا الغريب في المادة الوراثية للنبات .

نقل الجينات عن طريق التثقيب الكهربي (electroporation)

وتعتمد هذه الطريقة علي تحوير (Modification) تركيب الأغشية الخلوية ونفاذيتها بالمعاملة بتيار كهربي ذي فولت عالي (high Voltages) فمعاملة معلقات البروتوبلاست بنبضات (Pulses) كهربائية ذات فولت عالي تزيد من نفاذية البلازماليما للدنا . وتتكون خلال معاملة البروتوبلاستات بالنبضات الكهربية المناسبة ثقوب مؤقتة في الأغشية البلازمية . ويؤدي زيادة شدة التيار الكهربي عن الحد الحرج إلي تحطم الأغشية وفقد البروتوبلاستات لحيويتها . وبالتالي يجب عند استخدام هذه الطريقة مراعاة التوازن بين الوضع الذي يزيد من نفاذية الأغشية دون الوضع الذي يؤدي إلي تحطمها .

نقل الجينات عن طريق قاذفة الجينات (microprojectile Bombardment)

تمطر قاذفة الجينات في هذه الطريقة الأنسجة بجسيمات (particles) تنجستن (Tungsten) أو ذهب (Gold) ذات قطر ١ – ٢ ميكروميتر مغطاة بالدنا الغريب المطلوب نقله . وتستطيع هذه الحبيبات المغطاه بالدنا من اختراق الجدار الخلو والبلازماليما ودخول الخلايا . ويذوب عند دخول هذه الحبيبات إلي الخلايا الدنا المحاط حولها . وغالبا ما يستخدم الهواء المضغوط في دفع هذه الحبيبات بقوة كبيرة داخل الحلايا . وتتم العملية تحت تفريغ لذا يجب الحذر من تلف الأنسجة . ويزداد معدل النقل الجيني بواسطة قاذفة الجينات بزيادة سرعة وعدد المقذوفات وتركيز الإسبريدين وكلوريد الكالسيوم (Cacl2) المستخدمان في ربط الدنا للحبيبات .

استخدمت هذه الطريقة لأول مرة سنة ١٩٨٧ بواسطة كلين وآخرين (١٧٣) مع نسيج البشرية في البصل ولكناه أجريت بعد ذلك في الذرة (١٧١) والأرز وفول الصويا والقمح (٣٦٣) والعديد من النباتات والأنسجة المختلفة الأخري .

ومع أن أحد مميزات هذه الطريقة هي امكانية التعامل مع النسيج أو النبات الكامل إلا أن ذلك قد يكن عيبا إذ قد تحدث كايميرا (Chimera) فلا تورث الجينات المنقولة . ومن مميزات هذه الطريقة أيضا أنها تتلافي صعوبة حدوث التخليق التجديدي من البروتوبلاستات .

نقل الجينات عن طريق الحقن الدقيق (Microinjection)

وتستخدم هذه الطريقة مع النباتات الكاملة أو الخلايا أو البروتوبلاستات وتعتمد علي حقن الدنا في الخلايا بواسطة أنبوبة دقيقة وتعتبر أكثر الطرق دقة في نقل الدنا لخلايا معينة .

واستخدمت طريقة الحقن الدقيق بنجاح مع الخلايا والبروتوبلاستات من الدخان والبرسيم الحجازي وغيرهما . ولعل أكثر الأمثلة نجاحا في نقل الجينات بواسطة هذه الطريقة هو حقن الدنا البلازميدي الذي يحمل الجين npt ii إلي الأجنة الجسمية في الشلجم (٢٤٦) وأمكن التأكد من هذه النباتات أظهرت في تركيبها كايميرا أمكن فصلها خلال تكون الأجنة الجسمية لإعطاء نباتات محولة وذات تراكيب متجانسة . ولقد ثبت إمكانية حقن القمة الميريستيمية بهذه الطريقة ثم دفعها للتخليق التجديد لتكوين نباتات محولة .

أجابة السؤال الثانى:

تطبيقات زراعة الانسجة

الإكثار الخضري الدقيق للنباتات Micropropagation :-

تفيد طرق زراعة الأنشجة في الإكثار الخضري السريع لأنواع المحاصيل النباتية . ويتم ذلك بواسطة زراعة المرستيمات أو بإنتاج الأجنة الخضرية من مزارع الكالس أو معلقات الخلايا . وتستخدم في الإكثار اللاجنسي لأنواع عديدة تشمل الكثير من أشجار الفاكهة وأشجار الغابات . وفي بعض المحاصيل مثل نخيل الزيت ونخيل البلح تكون طريقة إنتاج الأجنة الخضرية هي الطريقة الوحيدة للإكثار الدقيق . ويوجد الكثير من الشركات في العالم تستخدم هذا الإكثار للإنتاج الهائل السريع لعديد من نباتات الزينة والفاكهة والخضر والنباتات الطبية والأشجار . وتساعد في إعادة زراعة مناطق شاسعة من الغابات في كثير من أجزاء العالم حيث إن هذا يحتاج بلايين الشتلات التي توفرها هذه الطريقة . سوف يؤدي ذلك إلي تقليل تلوث البيئة ومنع حدوث تعرية التربة وضياع مصادر الطاقة . كما أمكن بهذه الطريقة إنقاذ بعض النباتات النادرة والنباتات البرية من الإندثار . وتساعد هذه التقنية مربي النبات في إكثار الصنف الجديد قبل إطلاقه وتوزيعه علي المزارعين وخصوصا في المحاصيل لأجنسية التكاثر مثل قصب السكر والموز والبطاطس . كما إن زراعة الاندوسبرم بهذه الطريقة تؤدي إلي الحصول علي نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية Triploid وهذه مهمة في إنتاج الثمار عديمة البذور في نباتات الفاكهة .

مراحل الأكثار الدقيق :-

المرحلة الأولي :- انتخاب وتجهيز نباتات الأم التي سوف تؤخذ منها المرستيمات بحيث تكون ممثلة تامام للصنف وبحالة صحية جيدة (ويمكن اختبار واستبعاد الفيروس إذا لزم الأمر)

المرحلة الثانية :- تعقيم المرستيمات المأخوذة من نباتات الأم ووضعها في مزارع خالية من التلوث .

المرحلة الثالثة :- الإكثار Multiplication عدة مرات (إستيلاد السقان وأخذ الفروع أو تقطيع الساق إلي عقد ببراعم وإعادة الزراعة Subculture

المرحلة الرابعة :- تجدير السيقان Rooting وتجهيزها للنقل .

المرحلة الخامسة :- نقل السيقان المجدرة إلي البيئة الطبيعية (التربة) وإجراء الأقلمة Acclimatization أو التقسية بالتدريج .

تكوين الأجنة الجسمية Somatic Embryogenesis :-

وعند استخدام جزء من نسيج نباتي في الإكثار الدقيق يتم الإستيلاد Regeneration من هذا الجزء إما بطريقة مباشرة Organogenesis لسيقان وجذور أو الإستيلاد بطريقة غير مباشرة بعد تكوين اجنة خضرية Somatic Embryogenesis ثم استيلاد السيقان والجذور من هذه الأجنة .

إن عملية تكوين الأجنة الخضرية (الجسمية) هي إنتاج تراكيب مشابهه الأجنة Embryo-like Structures من خلايا جسمية . تبدأ بخلية فردية ثم تجمعات خلوية Cell Aggregares صغيرة ثم تكوين المرحلة الكروية Globular Stageفالمرحلة القلبية Heart Stage والمرحلة التوربيدية Torpedo Stage ومنها تتكون النبيته الصغيرة Plantlet كما في الشكل التالي :-

انتاج النباتات الأحادية Haploid Plants :-

النباتات الأحادية Haploids هي تلك التي تحتوي علي العدد الجاميطي للكروموسومات وهي نافعة في تربية النباتات سواء للإنتاج السريع للسلالات الثنائية الأصلية Homozygous Diploids التالي لعملية مضاعفة الكروموسومات وأيضا لاكتشاف وانتخاب الطفرات المتنحية . وبالرغم من حدوث الأحاديات أحيانا في الطبيعة في بعض المحاصيل نتيج التوالد البكري أو أي سبب آخر . إلا أن نسبة حدوثها قليلة ويمكن باستعمال تقنيات الأنبوبة إنتاج الأحادايات بطريقة روتينية منظمة . وتشمل هذه التقنيات :-

(١)زراعة المتوك أو البويضات Anther / Ovule Culture

(٢)التهجين الجنسي المتبوع باستبعاد كروموسومات الأب وإنقاذ الأجنة الصغيرة

وتكمن الميزة الأساسية لزراعة المتوك أو حبوب اللقاح غير الناضجة عن زراعة البويضات في توفر الآلاف من حبوب اللقاح في كل نبات وإمكانية الحصول عليها ببساطة (فمثلا سنبلة الشعير تحتوي علي أكثر من ١٠٠ ألف حبة لقاح غير ناضجة يمكن زراعتها) . وقد أمكن استيلاد نباتات أحادية في أكثر من ٥٠ نوع ثنائي من خلال زراعة المتوك وأغلبيتها تتبع العائلة النجيلية والباذنجانية والصليبية وتشمل العديد من المحاصيل مثل القمح والشعير والذرة والأرز والراي والتريتيكال والشلجم والبطاطس والطماطم والدخان .

التبانات الجسمية Somaclonal Variation

كان التركيز في تقنيات الإكثار الدقيق وحفظ المادة الوراثية في الأنبوب علي الإبقاء علي حالة الثبات الورائي . ولن عندما تزرع الخلايا النباتية من خلال بعض أشكال مرحلة الكالوس Callus . إما علي بيئات أجار أو في مزارع معلقات الخلايا السائلة , فإن النباتات التي يتم استيلادها بعد ذلك قد تظهر صفات نوعية أو كمية مختلفة عن الطرز الأبوية الأصلية . إن العملية التي يولد بها مثل هذا التباين الناتج من زراعة الأنسجة تسمي التباين الجسمي . وهذه الظاهرة شائعة الحدوث بين الأنواع النباتية بما فيها العديد من المحاصيل الهامة . وقد عرفت أولا في المحاصيل التي تتكاثر خضريا مثل قصب السكر والبطاطس ولكنها سجلت الآن في محاصيل الحبوب مثل القمح والذرة والشوفان والأرز وفي ذوات الفلقتين مثل الدخان والطماطم والجزر والكرفس والبقول ونباتات الزينة مثل البيتونيا والبلارجونيوم .

أسباب التباينات الجسمية :-

غالبا ما تنتج التباينات الجسمية بسبب :-

١. تغيرات في أعداد الكروموزومات سواء تامة (تضاعف Polyploidy) أو ناقصة (Aneuploidy) أو في تركيب الكروموزومات (مثل حدوث نقص أو تكرار) .
٢. طفرات جينية (ولكن أكثرها شيوعا الطفرات المتنحية)
٣. طفرات في الأحماض النووية للأعضاء السيتوبلازمية (في الكلوروبلاست أو الميتوكوندريا)
٤. تباينات شبه وراثية Epigenetic وهي تغيرات في تعبير الجينات أكثر منها تغيرات في محتوي المعلومات للجينات بسبب انتقال العناصر المتنقلة Transposable elements من موقعها أو ميثله الدنا DNA Methylation أو تضخيم الجينات Gene Amplification أثناء النفسية في الأنبوية .
٥. حدوث العبور الميتوزي Mitotic Crossing Over .

التهجينات الجسمية Somatic Hybridization :-

إن إنتاج النباتات الهيجينية عن طريق دمج البروتوبلاستات (الخلايا النباتية التي تم إزالة جدرها) لنوعين أو صنفين نباتيين مختلفين يسمي التهجين الجسمي , وتعرف مثل هذه الهجين بالهجن الجسمية Somatic Hybrids وتشمل تقنية التهجين الجسمي الخطوات الأربعة التالية :-

أ) عزل البروتوبلاستات
ب) دمج بروتوبلاستات الأنواع أو الأصناف المرغوبة .
ت) انتخاب الخلايا الهجينية الجسمية .
ث) زراعة الخلايا الهجينية واستيلاد النباتات الهجينية منها .

عزل البروتوبلاستات :-

يتم عزل البروتوبلاستات بمعاملة الخلايا أو الأنسجة بخليط مناسب من الانزيمات المحللة لجدار الخلية , وهو عادة خليط من البكتينيز والسليوليز والهميسليوليز في محول ذو ضغط اسموزي عالي (بإضافة السوربتيول أو المانيتول) لمنع البروتوبلاست من الانفجار . أمكن عزل البروتوبلاستات في بيئات مناسبة , وبعد ذلك يمكن أن تكون جدرا مرة ثانية ويحدث لها انقسامات ميتوزية وتكون مستعمرات ويمكن أن ينتج منها مناطق مرستيمية . ومع استمرا عملية التشكل المورفولوجي تتكون أجنة جسمية أو أعضاء , وبالطبع استيلاد نباتات كاملة ناتجة من البرتوبلاستات . وبالرغم من إمكانية عزل بروتوبلاستات من كل الأنواع النباتية إلا أن ذلك لا يعني بالضرورة إمكانية استيلاد نباتات من هذه البروتوبلاستات . أن الكثير من محاصيل العائلة الباذنجانية مثل الدخان والطماطم والبطاطس قد أمكن استيلاد نباتات من بروتوبلاستاتها بسهولة . كذلك أنواع مختلفة من العائلة الصليبية والعديد من بقوليات العلف قادرة علي الإستيلاد . ولكن بصفة عامة فإن محاصل الحبوب (ما عدا بعض الانجازات المحدودة في الشعير والذرة والقمح وقصب السكر) وكذلك محاصيل الحبوب البقولية مثل فول الصويا والبسلة والفاصوليا والترمس قد أثبتت حتي الآن صعوبة في الاستيلاد من البروتوبلاستات .

دمج البروتوبلاستات Protoplast Fusion

توجد طريقتين مختلفتين لإنجاز دمج البروتوبلاستات

١. الدمج الكيماوي Chemical Fusion
٢. الدمج الكهربي Electrical Fusion