جمهورية السودان
جامعة الجزيرة

مبادئ الأحياء الجزيئية والهندسة الوراثية

FUNDAMENTALS OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENETIC ENGINEERING

د. محمد طه يوسف الامين
أستاذ مشارك
المعهد القومي لتنمية الصادرات البستانية
جامعة الجزيرة

مبادئ الأحياء الجزيئية و الهندسة الوراثية

Fundamentals of Molecular Biology and Genetic Engineering

د. محمد طه يوسف الأمين

استاذ مشارك

المعهد القومي لتنمية الصادرات البستانية

جامعة الجزيرة

أغسطس 2008

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ قَالُواْ سُبْحَانَكَ لاَ عِلْمَ لَنَا إِلاَّ مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ ﴾

صدق الله العظيم

(الآية 32 من سورة البقرة)

(كلمة الجامعة)

الحمد لله فاطر السموات والأرض جاعل الملائكة رسلاً أولى أجنحة مثنى وثلاث ورباع والصلاة والسلام على نبي الرحمة والهدى المنزل عليه من ربه.

﴿ولقد نعلم أنهم يقولون إنما يعلمه بشر، لسان الذي يلحدون إليه أعجمي وهذا لسان عربي مبين﴾ النحل (**103**).

وبعد ...

استجابة للتحدي الذي أوجبته ظروف بلادنا في توجهها الحضاري لتأصيل المناهج التعليمية وتعريبها فقد أفسحت جامعة الجزيرة ركناً ركيناً في سياستها نحو الاهتمام بهذه القضية فشحذت همم أساتذتها للتأليف باللغة العربية والترجمة لها ووفرت لهم من الامكانات ما هو شحيح حقاً إلا أن الإيمان من وراء الفكرة كان الدافع المتفرد الذي مهد لمجموعة من المؤلفات أن ترى النور. وكشأن كل خطب جلل يطرق بابه لأول مرة، بدأ هذا العمل متعثراً لكن عزم الرجال وقف سنداً متيناً لنا فجاءت ثمرة جهدنا هذا العمل الكبير الذي بين دفتي هذا الكتاب. وإن الجامعة لتفخر – وهي تغزو هذه الأفاق للمرة الأولى – بأساتذتها الأجلاء الذين مكن لهم علمهم الغزير وخبراتهم الثرة من أن يجتازوا هذه التجربة بنجاح مشهود.

والجامعة إذ تقدم هذا الإنجاز لطلاب العلم في كل مكان ترجو الله أن يمكن لها من ارتياد أفاق أخرى يثرى بها المجتمع الطلابي والقائمون على أمر العلوم ويرفع من مكانة وطننا العزيز. إن الجامعة لتود أن تزجى أسمى آيات الشكر والعرفان لكل من ساهم في مخاض هذه التجربة الرائدة حتى ولد لها ما يدعوه للفخر والاعتزاز فبرز هذا الجهد الفاعل لحيز الوجود دعماً لمسيرة التعريب وتأصيل المناهج وتطبيقاً لما نادت به ثورة التعليم العالي.

نسأل الله الهداية وسواء السبيل.

جامعة الجزيرة،،،،،

إهـــداء

إلى ....

روح والدتي

سائلين الله لها الرحمة والمغفرة ...

الشكر

أتقدم بالشكر لكل من ساهم في مسيرتي العلمية أثناء التحضير لدرجتي الماجستير والدكتوراه مرشدا وموجها ومشجعا، الشكر للبروفسير الصادق خضر عمارة،بروفسير محمد الحاج الكاشف، البروفسير على الأمين الجاك، البروفسير قاسم عبد الله دفع الله والبروفسير يوسف فضل الله محمد. شكر خاص أيضا لاساتذتى مشيل بترات وكاثرين دوجيمو بمعهد INRA والأساتذة برونو قرونتبورن وأحمد خير بور بمعهد CNRS بفرنسا .

الشكر أجزله إلي أسرتي الصابرة وزملائي بالمعهد القومي لتنمية الصادرات البستانية بجامعة الجزيرة لتشجيعهم المتواصل، حتى رأى هذا الجهد المتواضع النور بإذن الله. كما أشكر الأخت عائدة لطباعة محتويات هذا الكتاب . والأخ أحمد ابراهيم لأعداد هذا الكتاب للطباعة.

الفهرست

الباب الأول: كيمياء التوريث..1
الأحماض النووية..1
تركيب الحمض النووي..1
تعريفات مهمة..2
الجين..4
تكوين الطفرة الوظيفية..5
صناعة الحمض النووي DNA..5
إكثار الحمض النووي DNA..6
تنظيم الحمض النووي..7
التعبير الجيني 7
الشفرة الجينية..8
البراهين التي تدعم وجود الشفرة الثلاثية..9
صناعة البروتينات..10
الكودونات المضادة..10
عدد الرايبوسومات المرتبطة بحمض نووي راسل mRNA واحد.....11
عملية نقل حمض الرايبوز وصناعة البروتين..12
هجرة البروتينات لداخل الميتوكوندريا..13
استخدامات تقنية الأحياء الجزيئية 14
تداول الحمض النووي DNA 14
أمثلة لاستخلاص الحمض النووي..15
عزل الحمض النووي من الشمام..15
عزل الحمض النووي من البطيخ..18
حفظ الحمض النووي DNA 20
تقطيع الحمض النووي DNA 20
إكثار الحمض النووي معمليا: تفاعل البوليمريز السلسلي..21
فصل قطع الحمض النووي DNA..24

تشخيص الحمض النووي DNA..........................25
تطوير الحمض النووي DNA..........................26
الباب الثاني: الواسمات الجزيئية Molecular markers 29
الخواص المرغوبة في الواسمات الجزيئية..........................29
التباين الظاهري في البروتينات..........................31
الألوزيمات Allozymes 31
الأيسوزيمات Isozymes 31
الواسمات الجزيئية المعتمدة على الحمض النووي DNA............31
اختبار الاختلاف في طول القطع العشوائية..........................32
الواسمات الجزيئية DNA المعتمدة على تفاعل البوليمريز السلسلي............38
الإكثار العشوائي لقطع الحمض النووي المتباينة RAPD............38
الواسم الجزيئي بصم القطع المباشرة DAF..........................40
الواسم الجزيئي تفاعل البوليمريز باستخدام بادئات تحكمية AP-PCR 41
المواقع المعلمة في التسلسل STS 41
الميكروستلايتات معلّمة التسلسل..........................42
كيفية عزل الميكروستلايتات وتوصيفها..........................44
تطبيقات الميكروستلايتات في الوراثة و تربية النبات..............45
بادئات أحادية مرساة بين تكرار تسلسل بسيط ISSR..............48
المواقع المكاثرة..........................49
المواقع المتكاثرة محددة التسلسل SCARs 49
التباين في طول القطع المكاثرة AFLP..........................50
تقنيات الهجرة الكهربية..........................51
الفصل الكهربي لقطع الحمض النووي الأحادية DGGE 52
الهجرة الكهربية باستخدام التدرج الحراري TGGE 52
التباين الظاهري المطابق للأشرطة الأحادية SSCP..........53
تحليل خليط من أشرطة الحمض النووي المتباينة..........................53
العزل الكمي والنوعي للحمض النووي DNA..........................53
كيفية تحديد نوع الواسم الجزئي المستخدم 55
الباب الثالث: مواقع توريث الصفات الكمية QTLs 59

تعريفات..60
طرق رسم مواقع التوريث الكمي QTLs..........................63

الباب الرابع: توصيف الجينوم Genome characterization.........68
تسلسل الحمض النووي DNA 68
الطريقة التقليدية لتحديد تسلسل الحمض النووي DNA........68
الطريقة الأوتوماتيكية...70
الخرط الجينية...71
بنية الخرطة..75
الباب الخامس: ميكانيكية إعادة تركيب الحمض النووي DNA و الاستراتيجيات المختلفة لمقاومة الأمراض الفيروسية..76
ميكانيكية إعادة التركيب الكروموزومي..........................76
الاستراتيجيات المختلفة لمقاومة الأمراض الفيروسية.............78
الطريقة التقليدية لتربية النبات..................................78
تقنية التطعيم..79
التهجين الجسمي..85
التطفير التجريبي..86
الانتقال...88
الانقلاب..88
التضاعف...88
الإقتضابات...88
استحداث المقاومة للأمراض باستخدام الإشعاع..................90
التطفير الموجه السريع..92
تصميم البادئات...95
البروتوكول وإجراء التفاعل...95
النتائج المتوقعة من التطفير المحكم...............................98

الباب السادس: التحليل الجزيئي لفيروسات الجيمينى كنموذج للتحليل الجزيئي للفيروسات..101
الحمض النووي كوسيط لاستحداث المقاومة.......................102

التشفير لأنزيم الانقسام Replicase الخاص بتكاثر الفيروس...........104
عملية الفسفرة...105
صناعة الأشرطة الأحادية لفيروسات الجيمينى أنموذجا...........105
حركة الفيروس...107
البروتينات الخاصة بحركة الفيروس.............................108
الجزيئات الخاصة بالعلاقة بين بروتينات الحركة و البلاسمدسماتا في الفيروس..108
العلاقة بين بروتينات الحركة و الأشرطة الأحادية للحمض النووي.............108
استحداث المقاومة عن طريق بروتينات الحركة......................111

الباب السابع: الإستراتيجية الجزيئية لمقاومة الأمراض الفيروسية.......113
استراتجيات استحداث المقاومة من الفيروس PDR................114
تقنية الغلاف البروتينى لاستحداث المقاومة.......................114
استحداث المقاومة عن طريق إنزيم الانقسام Replicase...........116
استخدام قطع DNA متناهية الصغر..............................117
استراتيجيات غير شائعة الاستخدام................................118

الباب الثامن: البكتيريا الزراعية *Agrobacterium tumefaciens*
كوسيط لنقل الجينات.......................................122
نقل الجين بواسطة البكتيريا.....................................122
تصنيف البكتريا الزراعية..123
الأوبينات Opines 124
عدائية البكتريا الزراعية..124
المدى العائلي للبكتريا الزراعية...................................125
البلاسميدات البكتيرية..125
أساسيات نقل الجينات بواسطة البكتريا الزراعية..................126
ميكانيكية نقل الجينات...128
ربط الجسم الغريب بالبلاسميد....................................129
البلاسميد Bin19. انموذجا.......................................129
كيفية إدخال الجينات للجينوم النباتي بواسطة البكتريا..........131
عملية التهجين...132

الاستراتيجية الجزيئية للتفاعل بين البكتريا الزراعية وعوائلها 135
تكوين العقد البكتيرية بواسطة البكتريا الزراعية................135
الخواص العامة لتكوين العقد البكتيرية.........................135
ربط البكتريا مع الخلايا النباتية..............................136

الباب التاسع: تجهيز الحوامل المشعة من أشرطة الحمض النووي DNA و RNA....138
عملية الفسفرة Phosphorylation.............................139
عملية الإزاحة Nick translation 139
صناعة واسمات DNA مزدوجة مشعة..............................141
الإزاحة في الحمض النووي DNA..................................141
الطريقة أو البروتوكول البديل لطريقة الإزاحة..................144
تصنيع واسمات DNA موسومة بالإشعاع باستخدام بادئات عشوائية أحادية النيوكليوتيد.146
عملية فصل حوامل الحمض النووي DNA المشعة باستخدام جل الاقاروز.............148
عزل الواسمات الصغيرة باستخدام تقنية الكروماتوغرافي على السيفاروز CL-4B ...149
توسيم النهايات 5ـ و 3ـ في الحمض النووي DNA...............150
توسيم النهاية في الشريط DNA المزدوج باستخدام إنزيم Klenow 1.............150
توسيم النهاية 3/ لشريط DNA المزدوج باستخدام إنزيم Bacteriophage T4 DNA polymerase...151

الباب العاشر: تقنيات الهندسة الوراثية.........................154
الهندسة الوراثية في النبات....................................154
الطرق المختلفة لإدخال الجينات في النبات......................155
استخدام البكتريا الزراعية لنقل الجينات.......................158
استخدامات الهندسة الوراثية...................................160
استخدامات الهندسة الوراثية لتطوير المحاصيل....................161
مقاومة الحشائش..161
مقاومة الحشرات..163
مقاومة الأمراض..163
التعبير الجيني وتكنولوجيا عزل الجينات.........................164
توسيم الجين Gene tagging 164

تخريط جين Gene mapping 165
أسس السلامة الحيوية.. 165
نظم إجازة الأصناف المحورة وراثيا.................................... 166

الباب الحادي عشر: الأغذية المعدلة وراثيا........................ 167
موقف المحاصيل المعدلة وراثيا.. 169
الأشكال العامة للأغذية المعدلة وراثيا.............................. 170
الآثار البيئية للأغذية المعدلة وراثيا............................... 170
حركة الجينات وظاهرة الانجراف الجيني.............................. 171
حدوث مقاومة للمبيدات الحشرية..................................... 171
الأثر على الكائنات غير المستهدفة.................................. 172
حدوث مقاومة لمبيدات الحشائش...................................... 172
سلامة الغذاء... 172
الضوابط المرتبطة بالاتجار بالأغذية المعدلة وراثيا................. 176

المراجع العربية.. 179
المراجع الانجليزية... 180

المقدمة

يمكن تعريف الإحياء الجزيئية بأنها مجموعة العلوم و التطبيقات الخاصة بتداول و تشخيص وتطوير الحمض النووي، تتناول هذه العلوم دراسة الكائنات الحية على مستوى البنية الجزيئية لها. يعتبر هذا العلم كاشتقاق رئيسي من علوم مختلفة كالوراثة و الكيمياء العضوية. يدخل هذا العلم وبصورة رئيسية في تسهيل التعرف على التباين الوراثي بين الأفراد وعلى توسيم وتعريف الجينات المسئولة عن توريث الصفات المختلفة في الكائنات الحية من حيث الموقع والتسلسل النيوكليوتيدي، وعلاقتها بالجينات الأخرى على مستوى الجينوم، وعلى تسهيل حفظ الموارد الوراثية. ساعد هذا العلم أيضا في التعرف على المسببات المرضية الدقيقة وعلى رأسها الفيروسات والدقائق الحية، وعلى التكوين الجيني لها، ومعرفة العلاقة بينها وكيفية نشأتها وتطورها وعلاقتها مع العوائل المختلفة، ومن ثم التعرف على أنجع السبل لمكافحتها، والتعرف على الأمراض غير المعدية وعلى كيفية التعبير الجيني لها وبالتالي إمكانية علاجها عن طريق زرع الجينات.

تعتبر تقنيات الأحياء الجزيئية تقنيات وسيطة في مختلف مجالات العلوم حيث تعمل على تسهيل عملية البحث والإنتاج على حد سواء. نشأ هذا العلم نتاجاً لتطور كمي ونوعي هائل في مجالات الوراثة وعلم الأحياء المجهرية والكيمياء الحيوية وعلوم تربية النبات وفي مختلف علوم الكيمياء. على سبيل المثال أدى اكتشاف الإنزيمات المقيدة Restriction enzymes، نتيجة لبحوث مكثفة في البكتريا إلى أمكانيه فصل قطع الحمض النووي وتحليلها ودمج قطع مختلفة من الحمض النووي من كائنات مختلفة عبر مايعرف بتقنية إعادة التجميع Recombinant DNA technology أو الهندسة الوراثية. حيث تعمل هذه الإنزيمات على تحديد تسلسل محدد من الحمض النووي، ومن ثم تعمل كمقصات جزيئية لقطع هذا التسلسل في مواقع محددة و بالتالي تحريره، كما ساعدت أيضا في التعرف على تقنيات إكثار الحمض النووي DNA amplification، وعلى رسم خرط للجينات في داخل الحمض النووي.

من ناحية أخرى تساعد علوم الهندسة الوراثية في استنباط أصناف ذات صفات مرغوبة مثل مقاومة الأمراض والآفات، زيادة الإنتاجية، وتحسين صفات

الجودة، كما تساعد على تجاوز حدود النوع في تطوير الأصناف. يدخل هذا العلم أيضا في الصناعة و ذلك بإنتاج بعض البروتينات والهرمونات النادرة، عن طريق عزل الجينات الخاصة بإنتاج هذه المكونات و إدخالها بداخل أي من الدقائق الحية المناسبة من البكتريا والخميرة ولفطريات لتعمل كمصانع للإنتاج التجاري .

أدت البحوث المتواصلة في مجال الأحياء الجزيئية و الهندسة الوراثية إلى تحوير النباتات و الحيوانات.كما أدت المقدرة على تحليل الحمض النووي باستخدام الواسمات الجزيئية إلى مايعرف بثورة الجينوم الإنسانى، وإلى التعرف على الأمراض المعقدة الفهم وتشخيصها و الوقاية منها مثل مرض نقص المناعة المكتسبة Acquired immunodeficiency syndrome (الايدز) الذي يسببه فيروس Human immunodeficiency virus، والذي يعرف اختصارا بـ HIV .

يمكن لعلم الإحياء الجزيئية أن يلعب دورا مقدرا في السودان، وذلك بتسهيل دراسة وحفظ التنوع الحيوي الذي حناه الله به في كثير من المحاصيل، كما يمكن أن يلعب دورا مهما أيضا في الاستفادة من هذا التباين، وكذلك بمعرفة المسببات المرضة و تطوير وسائل التشخيص المعملي لها في الإنسان والحيوان والنبات على حد سواء. كما تساعد أيضا في تطوير وسائل البحث العلمي والمساهمات العلمية والتنسيق البحثي بين الجامعات ومراكز البحوث بالداخل والخارج. كما يمكن أن تلعب علوم الأحياء الجزيئية والهندسة الوراثية دورا مهما في التعرف على الكائنات و الأغذية المعدلة وراثيا التي يمكن أن تدخل البلاد.

يأتى هذا الجهد المتواضع بعد تضمين علوم الأحياء الجزيئية والهندسة الوراثية ضمن المقررات التدريسية لطلاب مرحلة البكلاريوس والدراسات العليا في عدد من الجامعات السودانية، لتزويد الطلاب بالنواحي العلمية والعملية في هذه المجالات. برزت الحاجة لمثل هذا الكتاب لقلة المراجع المتخصصة في هذا المجال باللغة العربية.

وبالله التوفيق

الباب الاول

كيميــاء التوريث

Chemical basis of heridity

الباب الاول
كيمياء التوريث
Chemical basis of heridity

الأحماض النووية :

تحتوي كرموزومات الكائنات الراقية على بروتينات نووية Nucleoproteins (أحماض نووية + بروتينات). حيث تحمل الأحماض النووية المعلومات الوراثية من جيل إلى آخر. وخلافا لبعض انواع الفيروسات، يعتبر حمض الديوكسي رايبوس (DNA) الحمض النووي المسئول عن حمل هذه المعلومات ونقلها من كائن حي الى كائن حي آخر. توجد جزيئات الحمض النووي DNA فى النواة فى شكل حلزوني يحتوي على شريطين مكملين يتكون كل منهم من تسلسل من القواعد النيتروجينية وهي القوانين G ، الأدنين A ، السيتوسين C والثايمين T، وترتبط هذه القواعد بسكر خماسي (الديوكس رايبوز) كما ترتبط جزيئات السكرمع بعضها بمجموعة فوسفات. الشكل 1 يوضح تركيب الحمض النووى DNA.كما يمكن ان يوجد الحمض النووي DNA خارج النواة في عضيات السيتوبلازم مثل الينوكولدريا والكلوروبلاست في النباتات.

الشكل 1.1 : تركيب الحمض النووى DNA.

تركيب الحمض النووى:

يتكون الحمض النووي DNA والحمض النووي RNA من وحدات صغيرة

1. سكر خماسي : وهو سكر الديوكس رايبوس Deoxyribose في حالة الحمض النووي DNA وسكر الرايبوز Ribose في حالة الحمض النووي RNA.
2. مجموعة فوسفات Phosphate group.
3. قاعدة نيتروجينية: وتنقسم هذه القواعد إلى:

أ. قواعد بيورين (Purine bases) : وتشمل كل من الأدنين Adenine والقوانين Guanine .

ب. قواعد البايرمدين Pyremidine bases: تشمل كل من السيتوسين Cytosine والثيامين Thymine في حالة الحمض النووي DNA، أما في حالة الحمض النووي RNA فإن اليوراسيل Uracil يدخل بديلاً للثايمين في المركب الجزيئ.

الجدول 1.1: يوضح الاختلافات بين الحمض النووى DNA والحمض النووي RNA.

نوع الاختلاف	DNA	RNA
التكوين	يتكون من شريطين مكملين	يتكون من شريط واحد
القواعد النتروجينية	يحتوي على الأدنين A والقوانين G والسايتوسين C و الثايمين T	يحتوي على الادنين، القوانين، السيتوسين اضافة الى اليوراسيل U بدلاً عن الثايمين T
السكر الخماسي	يحتوى على سكر الديوكس رايبوس	يحتوى على سكر الرايبوس بدلا عن الديوكس رايبوس
الطول	طويل جداً	قصير

تعريفات مهمة :

النيوكليوسيد Nucleoside: هو عبارة عن قاعدة بيورين أو بيرمدين مرتبطة مع جزئي سكر رايبوز أو ديوكس رايبوز. أي أن:

النيوكليوسيد = القاعدة النيتروجينية + جزئي السكر الخماسي.

النيوكليوتيد : هو عبارة عن جزيئ نيوكليوسيد مضافاً اليه مجموعة فوسفات.

النيوكليوتيد = النيوكليوسيد + مجموعة فوسفات = القاعدة النيتروجينية+ جزيئ السكر + مجموعة الفوسفات.

الكودون Codon : وهو عبارة عن مجموعة من ثلاث نيكليوتيدات متجاورة فى الحمض النووي DNA أو في الحمض النووى الراسل mRNA، والتي تحدد الحمض الأميني الذي يجب وضعه في منطقة محددة من تكوين البولي بيبيتيدات أثناء عملية الترجمة Translation.

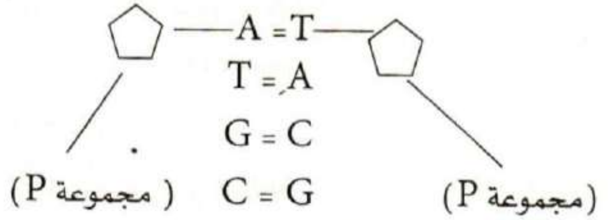
السيسترون Cistron: هي قطعة من جزيئ الحمض النووي DNA التى تحدد تكوين سلسلة البولي بيبتيد.

البيبتيد Peptide: عبارة عن اثنين أو أكثر من الأحماض الأمينية ترتبط بروابط بيبتيدية.

البولى بيبتيد Polypeptide: سلسلة طويلة من الأحماض الأمينية التي ترتبط مع بعضها بروابط بيبتيدية.

البروتين Protein: عبارة عن مركب يتكون من اثنين أو أكثر من سلسلة البولى بيبتيد.

ففي حالة الحمض النووى DNA، : تتجمع النيوكليوتيدات لتكوين جسم حلزوني مزدوج Double helix يتكون من شريطين مكملين يحتوي كل واحد منهما على خلفية تتكون من جزئ سكر خماسى (سكر الديوكس رايبوز) ومجموعة فسفور Sugar phosphate backbone ، كما ذكر سابقا. فعند تكوين الكروموزوم تحمل هذه الأشرطة في إتجاهين مختلفين Anti - parallel إعتمادا على نهايات '5 و '3 للجزيئ. تتزاوج القواعد في شريطي الحمض النووي DNA حيث تتزاوج A فقط مع T و G فقط مع Cبروابط هيدروجينية مزدوجة ضعيفة.



مخطط يوضح كيفية التزاوج بين القواعد النيتروجينية في الحمض النووى DNA

يقصد بتسلسل الحمض النوويDNA (DNA Sequence) ترتيب قواعد النيكلوتيدات على جزيئ شريط من الحمض النووي DNA من النهاية ' 5 إلى النهاية ' 3. يحدد هذا التسلسل الأوامر الجينية الدقيقة التي تحمل بداخله والمختصة بتوريث الصفات المختلفة بداخل الكائنات الحية، والتى يعبر عنها باستخدام شفرة الحروف الأحادية المتكونة من ترتيب محدد من النيكليوتيدات.

الجين:

يعرف الجين بأنه تسلسل من الحمض النووي والذي يشفر لبروتين محدد يعمل على التعبير عن الصفة المعينة. كما يعرف بأنه الوحدة الوراثية وذلك لتميزه بثلاث خواص هي:

أ. هو الوحدة ذات الوظائف الفسيولوجية التى تؤدي إلى حدوث تعبير ظاهري لصفة ما.

ب. هو الوحدة البنائية التي لا يمكن تقسيمها عبر التصالب او التقاطع الكرموزومي Crossing – over .

ج. هو الوحدة التي يمكن تغييرها عبر إحداث الطفرات.

يتم التشفير عن التركيب الداخلي للإنزيمات عبر تسلسل قطعة من الحمض النووي DNA . يعتبر افتراض وجود جيناً واحداً لكل إنزيم صحيحاً لبعض الإنزيمات، ولكن ليس لها جميعا. مثال ذلك إنزيم إنتاج التربتوفان الذي يحتوي على تسلسلين من البروتينات حيث يتم إنتاج التسلسلين عن طريق قطعتين من الحمض النووي DNA مختلفتين ومتجاورتين. ولذلك تم تعديل

افتراض جين واحد لكل إنزيم بجين واحد لكل سلسلة بولي ببتيد. يسمي إنتاج DNA محدد لسلسلة بولي ببتيد بالسسترون . كما أن هنالك مواقع عديدة بداخل السسترون يمكن أن تحدث بها طفرة وظيفية.

تكوين الطفرة الوظيفية :

هي العملية التي يحدث بها تغيير تركيبي في الجين. مثال جزيئ الهيموقلوبين الذي يتكون من 140 حمض أميني في كل من تسلسلات a و β . حيث يتكون التسلسل العادي للهيموقلوبين β من الآتي:

Val – his – leu – Thr – pro – glu – gly – bys ...
1 2 3 4 5 6 7 8

ينتج الهيمقولبين غير العادي *Hbs* فى أفراد لديهم أليل مطفر والذي ينتج عنه أنيميا. يختلف الهيموقلوبين *HbS* عن الهيموقلوبين *HbA* في أن الأول يحمل فالين Valine بدلاً عن حمض القلوتامين عند الموقع السادس في تسلسل β ، لذا فعند حدوث طفرة في أحد كودونات حمض القلوتامين (GAA) يتحول الأدنين الأول (A) إلى يوراسيل(U)، و بالتالي يتحول الحمض الأميني الناتج إلى فالين (GUA) . يعتبر معدل حدوث مثل هذه الطفرة ضعيفا، حيث يتراوح بين 1×10^{-5} إلى 1×10^{-6} . كما يتراوح معدل حدوث طفرة واحدة في كل 100.000 جين بمعدل واحد جاميت لكل مليون . ففي الكائنات الراقية والتي تحتوي على مايزيد عن 10.000 جين ، فإن واحد جاميت في كل 10 جاميتات إلى واحد جاميت في كل مائة يمكن أن يتوقع إحتواؤها على طفرة واحدة على الأقل.

يعرف الموتون Muton بأنه اصغر وحدة من الحمض النووي (نيكليوتيد واحد أو أكثر) والتي إذا حدث تغيير بها ينتج عنه ما يسمي بالطفرة.

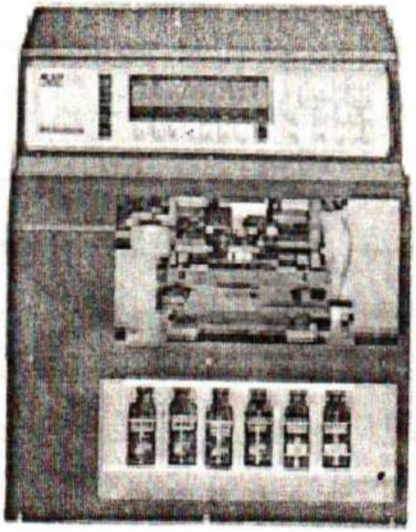
صناعة الحمض النووي DNA:

لصناعة الحمض النووي بداخل الخلايا فإن جزيئ الحمض النووي

DNA يجب أن يفرع أولاً إلى أشرطة أحادية (Denatured) بواسطة العديد من الإنزيمات. ومن ثم فإن إنزيم البوليمريز RNA Polymerase يقوم بصنع القطعة المكملة في الشريط المقابلة ابتداءاً من موقع البدائي Primer. حيث يعمل هذا الإنزيم على إستطالة الشريط المتكون عند النهاية '3 بإضافة نيكليوتيدات مكملة للنيوكلوتيدات الموجودة في الأصل. وبما أن النيكليوتيدات تضاف عند النهاية '3 فإن صناعة الحمض النووي DNA تكون دائماً في الإتجاه '5 إلى '3 . الشكل 2.1 يوضح جهاز تصنيع الحمض النووى معمليا.

إكثار الحمض النووي DNA:

ترتبط القواعد المزدوجة على أشرطة الحمض النووى DNA مع بعضها بروابط هيدروجينية. فعند عملية إكثار الحمض النووي ينفصل الشريطان المكونان للحمض النووي .عند هذه الروابط، ومن ثم فإن كلاً من الشريطين يصبح موقعاً لتكوين شريط آخر مكمل، وذلك عن طريق جذب النيكليوتيدات الحرة بوساطة إنزيم البوليريز لموقع البناء حتى يكتمل تكوين الأشرطة.



الشكل 1. 2: جهاز تصنيع الحمض النووي من شركة بيركن إلمير.(Perkin Elmer)

تستخدم تقنية إكثار الحمض النووي معملياً للفحص المبكر عن الفيروسات عند الأفراد حاملي الفيروس دون إظهار المرض carriers ، مثال لذلك الأفراد حاملى فيروس الأيدز HIV الذين لم تظهر عليهم أعراض المرض ، حيث يتم التعرف أولاً على الفيروس وإكثاره لدورات عديدة حتى يتثنى فحصه. تعتبر هذه الطريقة واسعة الأستخدام و تتميز بدقة عالية.

تنظيم الحمض النووي DNA:

يوجد الحمض النووي عادة مغلقاً في بنية محددة بداخل الخلايا النباتية والحيوانية، وذلك لضمان وقاية الكمية الكبيرة من الحمض النووي الموجودة بداخل الخلية، ولتنظيم التعبير الوراثي الناتج عنها. ففي الكائنات الراقية التي تتمتع بنواة حقيقية Eukaryotes يوجد الحمض النووي مكثفاً مع بعض البروتينات وبعض من جزيئات الحمض النووى RNA في شكل خيطي Thread like structure يسمي بالكرموزومات، بداخل النواة. هنالك كميات قليلة من الحمض النووي DNA توجد بداخل السيتوبلازم cpDNA حيث يوجد بعضها فى الميتوكوندريا mtDNA. أما فى الكائنات ذات النواة غير الحقيقية Prokaryotes، يوجد الحمض النووي DNA مضغوطاً في بنية حلزونية Supercoiled تسمي بالنيكليوتويد، والذي يحتوي أيضاً على بروتينات وبعض جزيئات حمض الرايبوز RNA.

يختلف عدد الكرموزومات في الكائنات ذات النواة الحقيقية باختلاف النوع، وفي بعض الأحيان في داخل النوع الواحد .

التعبير الجيني Gene expression:

يمكن تلخيص نظرية التعبير الجيني في أن الحمض النووي DNA يستنسخ

في صورة ،RNA والذي يترجم إلى أحماض أمينية تتجمع لتكون بروتين. حيث تستنسخ الرسالة المطبوعة في الحمض النووي في صورة رسالة الحمض النووي الراسل mRNA والتي تترجم عن طريق تجميع عدد من جزيئات هذا الحمض في صورة بروتين أو بيبتيد أو بولي بيبتيد، الذي يؤدي بدوره إلى إظهار الصفة.

يمكن اختصار عملية التعبير الجينى في المخطط الآتي:

تسلسل حمض نووي DNA

↓ استنساخ

رسالة في صورة mRNA

↓ ترجمة

بروتين

↓ تجميع

بروتين ثلاثي الأبعاد يؤدي إلى إظهار الصفة المعينة.

عموما يمكن وصف التعبير الجينى في أن الحمض النووي DNA يؤدي إلى تكوين الحمض النووي الراسل mRNA الذى يؤدي بدوره إلى تكوين بروتين.

الشفرة الجينية Genetic code:

تتحكم عدة إنزيمات في التفاعلات البيوكيميائية في داخل نواة الخلية. الشفرة الجينية عبارة عن بروتينات تتكون من وحدات صغيرة Subunits تسمي بالأحماض الأمينية.حيث يسمي عدد النيكليوتيدات التي تشفر إلى حمض أميني بالكودون. كما يتكون كل بروتين من عدد محدد من الأحماض الأمينية التي تنتظم في تسلسل محدد.

هنالك 20 حمضاً أمينياً معروفاً ولكن هنالك فقط أربع نيكليوتيدات. فبافتراض أن كل نيكليوتيد واحد يشفر إلى حمض أميني واحد؛ فذلك يعني وجود عدد أربعة أحماض أمينية. أما في حالة أن كل نيكليوتيدين تشفران لحمض أميني واحد، فإن عدد التراكيب المختلفة تشفر لعدد 16 تركيب حمض أميني

وبإضافة واحد أو اثنين من القواعد يفشل المركب الأصلي في إنتاج بروتينات تحمل نفس الوظيفة، ولكن بإضافة ثلاث قواعد مع بعضها ترجع الكودونات على يمين الإضافة للقراءة العادية و الحصول على نفس الترتيب:

الترتيب الأصل: TCA GGC TAA AGT CGG TCG

TCA (A)GG C(G)T A(C)A AGT CGG TCG

كودونات سليمة الترتيب كودونات غير سليمة الترتيب الأصلي

وبنفس الطريقة في حالة حذف نيكلوتيد واحد أو اثنين من القواعد. أما في حالة حذف ثلاث قواعد يتم تصحيح صناعة البروتين وتتوقف الشفرة الجينية لأن أكثر من كودون توجد لمعظم الأحماض الأمينية. الشفرة الجينية واحدة لكل الأحياء غير أن هنالك ثلاث منها من أصل 64 كودون- وهي عبارة عن مجمل التراكيب الممكنة بين القواعد المكونة للحمض النووي- تفشل في التشفير لأي حمض أميني. وتسمي هذه الكودونات بالكودونات عديمة التأثير None sense triplets.

صناعة البروتينات Protein synthesis:

تترجم المعلومات المشفرة المحمولة على الحمض النووي DNA إلى صورة حمض نووي راسل mRNA باستخدام أحد أشرطة الحمض النووي على نحو ما ذكر سابقاً، ثم ينقل الحمض النووي الراسل من النواة إلى السيتوبلازم ومن ثم تقرأ الرسالة بواسطة واحد أو أكثر من الرايبوسومات، حيث تعمل الرايبوسومات كمواقع ربط عند تفاعل الحمض النووي الراسل مع الحمض النووي الناقل tRNA. يتحكم في عملية الربط هذه إنزيم محدد في عملية تسمي بعملية التنشيط أو الحمل.

الكودونات المضادة Anti codons:

هنالك تسلسل لعدد ثلاث نيكليوتيدات مضادة وهي مكملة لكودون الحمض النووي الراسل mRNA، تحمل هذه الكودونات على جزئيات الحمض النووي الناقل tRNA في أزمان محتلفة. تختلف جزيئات الحمض النووي الراسل عن جزيئات الحمض النووي الموجود بالرايبوسومات rRNA في أن الأول يعتبر أقل

استقراراً (لعدة دقائق)، بينما نجد أن جزيئات الأخير تظل مستقرة لزمن أطول .

عدد الرايبوسومات المرتبطة بحمض نووي راسل mRNA واحد:

ثبت أن هنالك حوالى 7–8 أوما يزيد من الرايبوسومات التي تنظم نفسها في شكل خطي على طول جزيئ الحمض النووي الراسل مكونة جزيئ بولي (أي عديد) الرايبوسوم Polyribosome أو بولى سوم Polysome يختزل جزيئ معقد البولى سوم إلى وحدات صغيرة مستقلة عن بعضها البعض بعد مرور زمن قليل، وذلك لعدم ثبات الحمض النووي الراسل، حيث يعاد تكوين هذه البولي سومات مرة أخرى في صورة مركبات بولي سومات عند ظهور شريط جديد منْ الحمض النووي الراسل .

مثال: في بكتريا القولون *Escherisia coli* فإن ثبات الحمض النووي الراسل ينتهي بعد دقيقتين أو عند ارتباطه بريبوسوم. يُعزى صغر الزمن الذي يستغرقه الحمض النووي الراسل إلى أن هذه الكائنات تنتج أعداداً كبيرة ومتباينة من البروتينات في نفس الخلية، وهي صفة إيجابية. كل من هذه البروتينات أو مجموعة منها تعامل على أساس أن كل حمض أميني يجب أن يُحمل إلى مكانه الصحيح مع بقية الأحماض الأمينية الأخرى في سلسلة البولي بيبتيد الناشئة، حيث ترتبط الأحماض الأمينية ومجموعة الكاربوكسيل الخاصة بالأحماض الأمينية المتجاورة مع بعضها بوساطة رابط بيبتيد.

رسم تخطيطي يوضح ارتباط الأحماض الأمينية المتجاورة مع بعضها البعض:

مجموعة كاربوكسيل (Carboxyl group) ↔ رابط بيبتيد ↔ مجموعة امينية (Amino group)

الحمض الامينى B — رابط بيبتيد — الحمض الامينى A

يتحرر جزيئ حمض نووي ناقل من الحمض الأميني ليكون جزيئ حمض أميني راسل ، ومن ثم يصبح حراً ليعمل على تنشيط حمض أميني آخر من نفس

النوع، حيث تكتمل مرحلة الترجمة الخاصة بشفرة النيكلويتد إلى تسلسل حمض أميني عندما يصل الريبوسوم إلى نهاية الحمض النووى الراسل .

هنالك عمليتان ضروريتان تدخلان في عملية ترجمة الحمض النووي DNA في صورة بروتينات، وهى:

أ) عملية الاستنساخ Transcription process: حيث يتم استنساخ شريط الحمض النووي DNA عبر تفاعلات كيميائية عديدة فى صورة mRNA.

ب) عملية الترجمة Translation process: ففي هذه العملية تتم ترجمة تسلسلْ نيكليوتيدي محدد على جزيً الحمض النووي الراسل في صورة تسلسل حمْض أمينْي محدد بمساعدة الرايبوسومات.

عملية نقل حمض الرايبوز و صناعة البروتينات RNAtransfer and protein thesis:

هنالك خطواتان تتحكمان في عملية تضمين الأحماض الأمينية في صورة بروتينات، وهى:

أ. تنشيط الأحماض الأمينية في المستخلص الخلوي وذلك عن طريق التصاقها بمركب الطاقة ثلاثى الفسفورATP؛ حيث إن لكل من الأحماض الأمينية المختلفة (20حمضاً أمينياً) إنزيماً منشطاً خاصاً به. تعتبر هذه المرحلة ضرورية لإتمام عملية الترجمة.

ب. ارتباط الحمض النووي الناقل tRNA بالأحماض الأمينية ونقلها للرايبوسومات.

تعمل الرايبوسومات وسيطاً لاستقرار ربط النيكليوتيدات الثلاثية بين tRNA و mRNA أثناء عملية تزاوجهما. حيث لا يمكن أن يكون هذا الربط قوياً بما فيه الكفاية بدون وجود الريبوسومات، وذلك لمنع الأحماض الأمينية المحمولة في tRNA على أن ترتبط مع بعضها لتكون مركب ببتيد. تتميز بعض الكودونات بأن لها وظائف مختلفة بناءاً على موقعها على جزيً الحمض النووي الراسل، مثال لذلك الكودون AUG، فعند وجوده في بداية للحمض النووي

الراسل فإنه يعمل على صناعة البروتين، وعندما يكون في الوسط فإنه يشفر إلى التكوين العادي للميثيونين Methionine، أما عندما يوجد على نهاية . الحمض النووي الراسل mRNA فإنه يعمل على نهاية تسلسل الببتيدات.

هجرة البروتينات لداخل الميتوكوندريا:

تمت معرفة عدد كبير من البروتينات الداخلة فى هذه العملية، كما تم التعرف على الدورالذى يلعبه كل منها وذلك عن طريق اختبارات تثبيط الجينات. بخلاف الكائنات الحية الأخرى فقد أظهرت ميتوكوندريا النباتات ظواهر غير عادية، مثل كبر الجينوم وهجرة الحمض النووي الناقل tRNA، مما يثبت التطور الخاص بالنباتات. إضافة إلى ذلك فإن الخلايا النباتية تعتبر أيضا فريدة في احتوائهاعلى اثنين من العضيات الداخلية، هما الميتوكوندريا و الكلوروبلاست.

يشفر جينوم الميتوكوندريا إلى عدد كبير من البروتينات الخاصه بها. هنالك المئات من بروتينات الميتوكوندريا التي تشفر فى النواة وتصنع في السيتوسول cytosol، ثم تهاجر إلى داخل الميتوكوندريا. يمكن تقسيم عملية هجرة البروتينات إلى داخل الميتوكوندريا إلى عدة مراحل وهي:

1. صناعة و حفظ طليعة البروتينات القادمة من النواة.
2. ربط طليعة البروتينات إلى المستقبل receptor على الغشاء الخارجى للميتوكوندريا.
3. نقل طليعة البروتينات إلى داخل الميتوكوندريا عبر غشاء الميتوكوندريا.
4. تكسير أو تحليل طليعة البروتين

استخدامات تقنية الأحياء الجزيئية:

يهدف استخدام تقنيات الأحياء الجزيئية إلى الآتي:

1. تسهيل تداول الحمض النووي، والذي يشمل استخلاصه، تنقيته، إكثاره وحفظه.
2. تشخيص الحمض النووي عن طريق تقنيات الحوامل المصبوغة، عن طريق الطاقة الذرية وذلك باستخدام النظائر المشعة P^{36} ، P^{32} ، وS^{35} كبديل للفسفور الطبيعي في الحمض النووي، أو عن طريق الصبغات الكيمياتية أو عن طريق الصبغة الضوئية، إضافة إلى تقنيات أخرى مثل تقنية تفاعل البوليمريز السلسلي PCR، واستخدامات الواسمات الجزيئية، مثل الواسم الجزيئ RFLP، للتعرف على قطع الحمض النووي المستهدفة وفي تشخيص الأمراض .
3. تطوير الحمض النووي في مايعرف بعلوم الهندسة الوراثية وتكنولوجيا إعادة التركيب الجزيئي.

تداول الحمض النووي DNA:

يمكن تقسيم خطوات تداول الحمض النووى للآتي:

1) استخلاص الحمض النووي DNA:

يُعنى بها استخلاص الحمض النووي من الخلايا النباتية والحيوانية، حيث يفترض أولاً التخلص من الأنسجة غير المرغوبة ومن ثم التخلص من جدران الخلايا او الغشاء الخلوى والسيتوبلازم والغشاء النووي، ثم التخلص من البروتينات وجزيئات RNA الموجودة بداخل النواة باستخدام إنزيم RNase. تستخدم في هذه الخطوة عددٌ من المحاليل المنظمة، كما تستخدم مواد كيميائية هاضمة مثل البولي فينول والأوكتانول والأحماض مثل حمض HCl بتركيزات محددة.

هنالك طرق مختلفة لاستخلاص الحمض النووي من الكائنات المختلفة ولكن تتفق هذه الطرق جميعها في الخطوات العامة أعلاه . يفضل في استخلاص الحمض النووى من النباتات استخدام خلايا أوراق حديثة التكوين، كما يفضل فى الحيوانات استخدام خلايا الدم، ولكن عموما يمكن استخلاص الحمض النووي من أي خلية في الكائن الحي.

يستخلص الحمض النووي DNA في صورة مادة جلاتينية في قاع الأنبوب ويتميز باللون الأبيض للون الأصفر الباهت، يعتمد ذلك على نوع الكائن الحي والطراز الوراثي المستخلص منه هذا الحمض النووي .

أمثلة لاستخلاص الحمض النووي:

مثال : لاستخلاص الحمض النووي DNA من الشمام : يتم استخلاص مادة الحمض النووي من أوراق جنينية cotyledons أو الأوراق الصغيرة حديثة التكوين. تكمن صعوبة استخلاص الحمض النووي من الشمام فى كيفية التخلص من الملوثات الأخرى، مثل السكريات المعقدة. تجفف الأوراق أولاً عتد درجة حرارة 30 ^{0}م لمدة 24-36 ساعة ثم تخزن عند درجة حرارة 20- ^{0}م حتى الاستخدام.

الخطوات:

1. اسحن 1 جم من أوراق جنينية او اوراق حديثة النمو بجهاز سحن كهربي مثل Moulinex 534 للحصول على بدرة ناعمة. تعد هذه الخطوة فى غاية الأهمية لتكسير جدران الخلايا وللحصول على جودة عالية فى الحمض النووي المراد استخلاصه . يمكن تخزين هذه البدرة عند درجة حرارة 20- ^{0}م، حتى الاستخدام.
2. ضع البدرة فى أنبوب اختبار 50 مل. ثم أضف 15 مل من محلول الاستخلاص المنظم عند درجة حرارة 65 ^{0}م. ثم أخلط جيداً محتويات الأنبوب بالتحريك المستمر.

3. حضن الأنبوب في حمام مائي عند درجة حرارة 65 ^{0}م لمدة 20 دقيقة. حرك الأنبوب أيضا باستمرار لضمان خلط محتوياته. ثم برد المحلول عند درجة حرارة الغرفة. يجب ان لاتقل درجة حرارة الخليط عن 16^{0}م، و ذلك لضمان عدم ترسيب مادة CTAB .
4. أضف 15 مل من محلول chloroform: octanol . حرك الأنبوب من أعلى إلى أسفل لعدة مرات (15-25 مرة) لينفصل المحلول بداخل الأنبوب لطبقتين.
5. رسب المحلول لفصل الجزء العلوي و السائل عن بقية محتويات الخلية و ذلك بتحريكه بسرعة 3000 xg لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20^{0}م.
6. حول المحتوى السائل بأعلى الأنبوب supernatant solution لأنبوب آخر.
7. أضف 20 مل من محلول CTAB: NaCl للأنبوب ثم أخلط جيداً. ثم أضف 15 مل من محلول chloroform: octanol، ثم اخلط جيدا للحصول على محلول أبيض إلى الأصفر اللون، ثم قم بفصل الجزء السائل وذلك بالتحريك عن طريق الطرد المركزي بسرعة 3000 xg لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20^{0}م .
8. حول السائل العلوي بعناية لأنبوب آخر يحتوى على 15 مل من المحلول المنظم للترسيب، ثم اخلط المحلول جيدا واتركه عند درجة حرارة الغرفة لمدة ساعة ليتم ترسيب المحلول.
9. حرك المحلول المترسب بسرعة 1500 xg لمدة 10 دقائق عند درجة حرارة الغرفة، ليتم ترسيب الحمض النووي و الحصول على كرية pellet من الحمض النووي بيضاء أو عديمة اللون إلى بيضاء مصفرة ملتصقة على جدار الأنبوب. يزول هذا اللون عند إضافة محلول RNase A. ثم جفف الأنبوب من المحتوى السائل.

10. ذوب الحمض النووي في CTAB مع 2 مل(1.0M) NaCl. وفي حالة عدم ذوبان كرية الحمض النووي يتم تسخين المحلول عند درجة حرارة 65^0م لدقائق حتى تذوب.

11. عند الذوبان الكامل لكرية الحمض النووي يجب إضافة 30 مل من إنزيمRNase A ، يعتمد ذلك على الحجم الكلي للمحلول، وحضن المحلول عند درجة حرارة 37^0م لمدة نصف ساعة إلى ساعة.

12. أضف حجمين من الإيثانول النقى للمحلول، ثم اخلط محتويات الأنبوب حتى ظهور مادة الحمض النووي.

13. باستخدام قضيب معقم يتم أخذ أشرطة الحمض النووي، ثم تغسل في 20 مل محلول ethanol: acetate لمدة 10 دقائق. عند هذه الخطوة يكون لون مستخلص الحمض النووي أبيضاً.

14. ذوّب الحمض النووي في 200 - 400 مل من المحلول المنظم TE.

15. يمكن أن يتم تخزين الحمض النووي عند درجة حرارة 20- ^{0}م لعدة سنوات.

المحاليل المستخدمة:

– المحلول المنظم للاستخلاص : والذي يحتوي على الآتي :

- EDTA 10 mM
- Tris-HCl 50 mM (pH = 8.0)
- NaCl 0.7 mM
- 1 % من محلول acetylammonium bromide (CTAB).
- 1 % (w/v) من محلول β-mercaptoethanol (β- ME)

يضاف محلول β- ME مباشرة قبل الاستخدام.

- Chloroform :octanol نسبة 24:1 (w/v). يحتوى المحلول على الأتي:
  - 10% (w/v) CTAB NaCl
  - NaCl 0.7 M

– المحلول المنظم للتحضير Preparation buffer:

- EDTA 10 mM
- Tris-HCl 50 mM (pH=8.0).

- 1 % CTAB.
- انزيم RN ase A (10mg/ml).
- محلول Ethanol acetate:
- 76 % Ethanol (w/v).
- 0.2 M sodium acetate
- المحلول المنظم TE :
- 1 mM sodium EDTA
- 10 mM Tris-HCl (pH=8.0)

مثال آخر: عزل الحمض النووي DNA من البطيخ (*Citrullus lanatus*)

عند استخدام مادة CTAB لعزل الحمض النووي DNA من أوراق بطيخ، نتج عن ذلك إستخلاص كمية قليلة من الحمض النووي DNA، والتي صاحبها عزل سكريات معقدة لزجة ومتداخلة مع الحمض النووي DNA وبولي فينولات ومركبات ثانوية أخري تعمل على تكسير الحمض النووي عن طريق الأكسدة. وكذلك تكسير جزئي أو كلي للحمض النووي DNA نتيجة لوجود إنزيمات النيوكليز nucleases فى داخل النواة. ولكن مع زيادة تركيز مادة CTAB من 1% إلى 2.5% وإضافة 0.5% من مادة Sarkosyl -N للمحلول المنظم للاستخلاص نتج عنه تكسير جدران الخلايا والغشاء النووي، مما أدي إلى زيادة في تحرير الحمض DNA في المحلول المنظم للعزل. كما ساعد ذلك أيضا في عزل السكريات المعقدة ومنع تداخل البولي فينولات وإنزيمات النيوكليز مع الحمض النووى DNA، مما نتج عنه زيادة كبيرة في إنتاج الحمض النووي DNA وبجوده عالية. تشمل هذه الطريقة الخطوات التالية:

1) يتم تجميع أوراق صغيرة ووضعها مباشرة في ثلاجة عند درجة حرارة منخفضة (4^0م).

2) تسحن 5 جم من الأوراق إلى بودرة ناعمة باستخدام 2 جم رمل (كوارتز أبيض)، واضافة النتروجين السائل ثلاث مرات مع التحريك المستمر.

3) توضع البودرة مباشرة في أنبوب اختبار 50 مل. ويضاف 24 مل من المحلول المنظم للعزل عند درجة حرارة 60 °م . يقفل الأنبوب ويتم تحريكه بقوة للتأكد من مزج المحلول المنظم مع الأنسجة الخلوية. ثم يحضن محتوى الأنبوب لمدة 30 دقيقة عند درجة حرارة 60 °م. أثناء الحضن يتم تحريك الأنبوب كل 10 دقائق لضمان الخلط الجيد لمحتوياته.

4) تضاف 25 مل من مادة الكلوروفورم ويحرك الأنبوب جيداً للتأكد من مزج المركب العضوي مع السائل. ثم يفتح غطاء الأنبوب ليخرج الغاز الناتج عن استخدام الكلوروفورم، ثم يقفل الأنبوب جيداً مرة أخرى.

5) يوضَعْ الأنبوب في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بقوة حركة طرد مركزي نسبية (RCF) تعادل 1200عند درجة حرارة 4°م، يجب أن لا تزيد قوة الحركة عن 1200؛ وذلك لأنه عند استخدام قوة كبيرة فإن الرمل والكلورفورم يمكن أن تحطم جدران الأنبوب.

6) ضع الأنبوب فوق ثلج، وخذ السائل العلوى وحوله الى أنبوب **جديدحجم** 50 مل، ثم أضف 20 مل أيثوبروبانول Isopropanol مثلج. اخلط جيداً، ثم حضن محتويات الأنبوب لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20° -م .

7) حرك محتويات الأنبوب بقوة RCF 2.200 لمدة دقيقة عند درجة حرارة 4°م.

8) تخلص من السائل العلوي واحصل على كرية الحمض النووي، ثم ذوب الكرية فى 2 مل من المحلول المنظم TE بنسبة 10 :1 والذي يحتوي على إنزيم RNaseA (100 mg/ml) . ثم وزع المحلول في أنابيب صغيرة بمعدل 1 مل من المحلول لكل أنبوب، ثم حضن المحلول لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة (37 °م).

9) حرك المحلول بسرعة 12000 rpmلمدة 50 دقيقة لعزل السكريات المعقدة ومتبقيات المحلول المنظم .

11) أضف 500 مل كلوروفورم، اخلط جيداً وذلك بالتحريك بسرعة 12.000 rpm لمدة 5 دقائق.

12) انقل المحلول العلوي لأنبوب مماثل جديد.

13) أضف 5M NaCl بمعدل 1 مل منه لكل 100 مل من المحلول، ثم أضف 400 مل من محلول آيثوبروبانول، حضّن المحلول لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20°م. ثم حرك الأنبوب لمدة 5 دقائق بسرعة 12000 rpm.

14) اغسل كرية الحمض النووي باستخدام 1 مل محلول أيثانول بارد. جفف الأنبوب على منشفة ورقية paper towel لمدة 20 دقيقة. عند هذه المرحلة احذر فقدان الحمض النووي DNA أثناء وضعها عليه. ثم ذوب الحمض النووى في المحلول المنظم بنسبة 10:1 .

15) للتأكد من تنقية الحمض DNA من كافة المتبقيات في الأنبوب حرك الأنبوب بسرعة 12000 rpm لمدة 5 دقائق ثم انقل السائل العلوى لأنبوب جديد.

حفظ الحمض النووي DNA:

يمكن أن يُحفظ الحمض النووي DNA تحت درجة حرارة 80 °-م لآلاف السنين كما يمكن حفظه لعدة شهور تحت الإيثانول عند درجة حرارة °4-م فى محلول TE وفى الثلاجة عند درجة حرارة 4°م لمدة بسيطة تحت الاستخدام.

تقطيع الحمض النووي DNA:

يتم تقطيع الحمض النووي باستخدام ما يعرف بالإنزيمات المقيدة، وهي عبارة عن إنزيمات تعمل على قطع الحمض النووي في مواقع محددة تسمى بالمواقع المقيدة، كما تسمى القطع الناتجة بالقطع المقيدة. حيث يعمل كل إنزيم على قطع الحمض النووي في منطقة محددة.

هنالك أعداد كبيرة من الإنزيمات المقيدة و التى يمكن استخدامها لقطع الحمض النووي DNA في مواقع مختلفة لإنتاج عدد كبير من القطع المقيدة التي تتميز بأطوال وأحجام وأوزان جزيئية مختلفة.

إكثار الحمض النووي معمليا: تفاعل البوليمريز السلسلي (Polymerase chain reaction):

تم إكتشاف هذه التقنية بواسطة العالم Frlich في العام 1989، و ذلك بعد اكتشاف نوع من الإنزيمات التي تعمل على نسخ الحمض النووي DNA باستخدام درجات حرارة مختلفة. تسمى هذه الإنزيمات بإنزيمات البوليمريز Tag polymerase، والتي تم استخلاصها وتنقيتها من بكتريا *Thermus aquatics*. هنالك أنواع مختلفة من إنزيم البولمريز توجد تجاريا مثل انزيمات Tag polyrerase من شركة Promega و انزيمى Ampli taq وBio taq، من شركة Perkin elmer، تختلف هذه الإنزيمات في أسعارها وفي تفضيل الباحثين لها، كما تختلف في نوع أنموذج الحزم الناتجة من نفس الحمض النووي DNA، لذا لا يجب مقارنة الحزم الناتجة عن استخدام إنزيمات مختلفة فى نفس الحمض النووي.

فى هذه التقنية، يتم اولا تقطيع الحمض النووي DNA بواسطة الانزيمات المقيدة ثم تضاف اليه بادئات (Primers) أحادية النيوكليوتيد (تتكون من نيوكليوتيد واحد فقط). ثُم يتم عمل الخطوات التالية باستخدام ماكينة تبادل دورات الحرارة PCR machine:

أ). فصل اشرطة الحمض النووي(Denaturing step) : يتم فصل الشريطين المكونين للحمض النووى إلى شريطين مستقلين عند درجة حرارة عالية و ذلك بالتسخين لمدة دقيقة أو أكثر عند درجة حرارة تتراوح بين 94- 96^0م.

ب). خطوة الإلتصاق (Annealing step) : تلتصق البادئات الأحادية بالجزء المكمل في الشريط المقابل . ويتم ذلك عند درجة حرارة تتراوح بين 50 - 65^0 م.

ج). خطوة الاستطالة(Elongation step): يعمل إنزيم البوليميز على صناعة الشريط المكمل عند منطقة التصاق البادئ. يتم ذلك بالتسخين عند درجة حرارة 72^0م لمدة دقيقة إو أكثر. تتواصل دورة التسخين والتبريد لمرات

عديدة، حيث يصبح الشريط المتكون قالبا لتكاثر جديد.

يتم فصل الحمض النووى DNA الناتج من هذه العملية عن طريق تقنية الهجرة الكهربية ومن ثم تشاهد قطع الحمض النووى المعزولة عن طريق إضافة صبغة بروميد الاثيديم. تتم هذه العملية فى دورات عديدة يمكن وصفها إجمالا فى الآتى:

الدورة الأولى Cycle 1:

ينفصل الحمض النووي DNA ليكون شريطين منفصلين ويرتبط البادئ الاول مع قطعة فى إحد الشريطين، بينما يرتبط البادئ الثانى بقطعة مكملة له فى الشريط المقابل. يجب أن يتم اختيار مواقع الربط بعناية حتى يفسح المجال للزيادة الطولية لإكمال الشريط في المواقع البينية، ومن ثم تستمر صناعة الحمض النووي عبر المنطقة المحددة ولأطوال مختلفة.

الدورة الثانية Cycle 2:

هنالك نوعان من الأشرطة الداخلة في هذه الدورة :

1. أشرطة الحمض النووي DNA الأصلية .
2. أشرطة حديثة التكوين ناتجة عن إكثار القطع الاصلية في دورات تفاعل البوليمريز.

الدورة الثالثة Cycle 3:

بعد دورات قليلة من تفاعل البوليميريز تبدأ القطعة الناتجة عن هذا الإكثار في تهيئة نفسها لتكون قوالب جديدة للتكاثر، لذلك فإن الدورات المتكررة من التفاعل تعمل على زيادة تضاعفية في كمية هذه القطع وفق متوالية هندسية.

مكونات تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى:

1. حمض نووي مستهدف Target DNA .
2. إنزيم بولمريز مستقر حرارياً لإكمال بناء الحمض النووي مثل إنزيم البوليمريز Taq polymerase.

ضوابط لابد من أخذها في الحسبان:

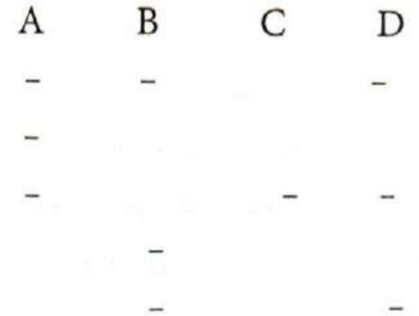
1. يجب ضبط دقيق لتسلسل قوالب الحمض النووي الداخلة فى التفاعل. يفضل استخدام القوالب التي تتراوح أحجامها بين5 ng إلى 500 ng. تظهر مشكلة عدم نقاء الحمض النووي الناتج من التفاعل عند استخدام قوالب كبيرة الحجم فى التفاعل.

2. يجب ضبط تركيز أيونات الماغنزيوم المستخدمة فى التفاعل، وذلك لتأثيرها الكبير على الأنموذج الناتج من حزم الحمض النووي المختلفة.

فصل قطع الحمض النووي DNA:

تفصل قطع الحمض النووي DNA الناتجة من استخدام عدد كبير من الإنزيمات المقيدة باستخدام تقنية الهجرة الكهربية باستخدام تيار كهربي ضعيف. هنالك أنواع عديدة من الجل يتم استخدامها تجارياً أشهرها جل الأقاروز.

يضاف الحمض النووي المقطع بوساطة الإنزيمات المقيدة إلى فتحات بداخل الجل الذي وضع في جهاز الفصل الكهربي وغمر بالمحلول المنظم المناسب. عند إمرار التيار الكهربي تتحرك قطع الحمض النووي إلى مسافات مختلفة على حسب أطوالها وأوزانها الجزيئية.



نموذج لفصل قطع قصيرة من الحمض النووي DNA في أفراد متباينتين وراثياً

يجب استخدام حمض نووي معروف الوزن الجزيئي مرجعاً لتعريف مواقع القطع المختلفة تحت الاختبار في الجل، كما يمكن استخدام هذه الطريقة للاسترشاد على قطعة ما معروفة الأثر الظاهري في الجل واستخدامها واسماً جزئياً للتعرف على وجود هذه القطعة أو الجين في الأفراد المنعزلين لهذه الصفة. تسمي مثل هذه الواسمات بالتباين في طول القطع المقيدة (Restriction fragment length polymorphism) الذى يعرف اختصاراً بـ RFLP، والذى سنتناوله بتوسع فى الباب الثانى من هذا الكتاب. هذه الواسمات واسعة الاستخدام عالمياً حيث يمكن استخدامها ،على سبيل المثال لا الحصر، في المجالات التالية:

أ. التعرف على التباين الظاهري بين الأفراد فى العشيرة المحددة.

ب. في المسائل الجنائية كالتعرف على آباء طفل ما.

ج. التعرف على جين مرغوب فيه ومن ثم عزله والاستفادة منه .

د. تستخدم أيضا لتشخيص أمراض عديدة خصوصاً تلك الأمراض غير المعدية أوغير المنقولة.

تشخيص الحمض النووي DNA:

يتم تشخيص الحمض النووي DNA أو قطعة منه عن طريق :

1. **استخدام الحوامل المصبوغة** Labelled probes: للتعرف مباشرة على وجود القطعة، وذلك بوضع بصمة للأنسجة المختلفة المراد اختبارها في غشاء سيليلوزي. يتم فصل أشرطة الحمض النووي DNA في البصمات المختلفة وتتم بعد ذلك إضافة الحامل المشع للتعرف على القطعة المعنية أو على الحمض النووي الكامل. غالبا ما تستخدم هذه الطريقة للفحص عن الفيروسات.

2. **تقنية تهجين سوزرن**: Southern hybridization

يتم صبغ الجل بمادة بروميد الأثيديم Ethidium bromide التى تمكن من رؤية قطع الحمض النووى عند تعريض الجل للاشعة فوق البنفسجية. تحول

القطع من الجل إلى الغشاء النيتروجيني nitrocellulose membrane، والذي يتميز بفراغات بينية متناهية الصغر يمكنها حمل الحمض النووي DNA بداخلها كنتاج للتجاذب الكيميائى بين سطح الغشاء والحمض النووى. ثم يتم فصل أشرطة القطع كيميائيا عن بعضها البعض. يعامل الغشاء بحامل إشعاعي Radiactive probe لنفس القطعة، وبالتالي يلتصق كل حامل مع القطعة المقابلة وتتم رؤيتها بسهولة. ثم يتم تجهيز فيلم يحمل صورة الجل ، تعرف هذه التقنية بتقنية تهجين سوزرن .

تطوير الحمض النووي DNA:

يقصد به إضافة قطعة من تسلسل حمض أميني غريب إلى الحمض الأمينى لكائن حي آخر أو تعديل التسلسل الموجود في نفس الكائن من أجل التعبير عن الصفة المرغوبة.

عند نقل الجينات من كائن حي لكائن حي آخر، يتم أولاً فصل الجين المحدد المراد نقله ومعرفة تسلسله وإكثاره عن طريق تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى. يفصل الجين إما عن.طريق استخدام إنزيم واحد في حالة القطع الخارجي أو إنزيمين في حالة القطع الداخلي. ثم ينقل الجين المفصول عن طريق وسيط ناقل الى الكائن الحي الآخر المراد نقل الجين له.

يمكن نقل الجينات من كائن حي لكائن حي آخر بإحدي هذه الطرق:

- النقل عن طريق بلازميد البكتريا.
- القذف عن طريق البندقية Gun bombardment.
- أخذ الحمض النووي عن طريق البروتوبلاست المعزول DNA up take by isolated protoplast.
- إدخال الجينات عن طريق استخدام التيار الكهربائي Electroporation of protoplasts or of intact cells.
- استخدام جهاز الثقب الدقيق Treatment of plant tissues with accelerated microprojectile.

أولاً . النقل عن طريق بلاسميد البكتريا:

البلازميد عبارة عن قطعة من الحمض النووي DNA يوجد خارج نواة البكتريا ولا يتكاثر ذاتياً، ولكنه يعتمد في إكثاره على الحمض النووي الموجود في النواة.

عموما، يستخدم لنقل الجينات في المجال الطبي والبيطري بلاسميد بكتريا القولون *Escherichia coli*. أما في النباتات فيستخدم بلاسميد البكتريا الزراعية *Agrobacterium tumefaceines*.

فعند استخدام البكتريا الزراعية لنقل الجينات من نبات إلى نبات آخر، يتم وضع القطعة الجزيئية المراد نقلها في وسط البلاسميد، وذلك عن طريق قطعه بنفس الإنزيم وينقل البلازميد الذي يحتوي على هذه القطعة لداخل البكتريا مرة أخرى. يتم تكاثر البلاسميد والقطعة التى بداخله فى الخلية البكتيرية عند وضعها في وسط مغذٍ، مثل الوسط المغذ YEB و الوسط المغذىMS. تهاجم البكتريا الخلايا النباتية عند منطقة الجرح أو الحقن، وتخترق جدران الخلايا وتضع البلازميد بداخلها. يتحرك البلاسميد إلى داخل النواة، ليتم تضمين القطعة المراد نقلها في داخل الحمض النووي للخلية ومن ثم يُحدث هذا الجين التعبير الخاص به.

ثانيا) النقل عن طريق البندقية Gun bombardment:

تضاف لمحلول جزيئات القطعة المراد نقلها جزيئات عناصر أرضية نادرة كالذهب واليورانيم والتي يمكنها إحداث خدوش في جدران الخلايا حتى يتم نقل قطعة الحمض النووي الى داخل نواة الخلية. يستخدم في ذلك جهاز يعمل بنظام الضغط فعند حقن النبات وتوصيله بالجهاز يتم قذف هذه المحتويات لداخل الخلايا ويتم بعد ذلك تضمين قطع الحمض النووي في الحمض النووي اخلايا النبات .

ثالثا) النقل عن طريق الذبذبات الكهربية :

يتم وضع الجين بعد اكثاره بكميات كبيرة عن طريق تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى في المحلول المنظم ويتم وضع خلايا منزوعة الجدران (المراد نقل الجين لها) فى نفس المحلول. ثم يتم تضمين الجين الى داخل بروتوبلاست هذه الخلايا عن طريق دفعه بالذبذبات الكهربائية، كما يتم الحصول لاحقا على نباتات كاملة تحمل التعديل المراد عن طريق زراعة الأنسجة.

وبمعزل عن الطريقة المستخدمة فى التحوير فإن الجينات المدخلة يتم تضمينها إلى داخل الجينوم النباتى، وتُورث لإفراد الجيل الأول الناتج عن التكاثر الجسمي أو الجنسي على حد سواء.

عمليا: تم استخدام طريقتين للنقل المباشر للجينات فى الأرز، وهي طريقة قذف الجينات و طريقة اختراق الخلية عن طريق استخدام التيار الكهربي intact cell electroporation، وقد أظهرت النتائج عدم وجود فوارق كبيرة فى التعبير الجيني عند استخدام الطريقتين. وهي نفس النتائج التي أحدثها النقل عن طريق بلازميد البكتريا الزراعية *Agrobacterium tumefaciens* في السابق.

الباب الثانى

الواسمـــات الجزيئيـــة

Molecular Markers

الباب الثاني
الواسمات الجزيئية
Molecular Markers

يعرف الواسم الجزيئي بأنه تسلسل محدد من الحمض النووي DNA أو من بروتين، والذي يمكن التعرف على توريثه . لذلك فإن الاختلافات بين الواسمات الجزيئية عادة ما تستخدم للتعرف على الاختلافات الوراثية بين الأفراد من خلال رصد تعدد الأشكال المظهرية للقطع الناتجة عن استخدام الإنزيمات المقيدة المستخدمة لهذا الغرض، حيث يمكن مقارنة الحمض النووي DNA للأفراد في عشيرة منعزلة بطرق عديدة للتعرف على تعدد الأشكال المظهرية الناتجة عنها. وهذا التعدد يمكن التعبير عنه بالاختلاف في تسلسل الحمض النووي DNA للأفراد المختلفين .

يمكن دراسة التباين الظاهري في الحمض النووي DNA الموجود بالنواة وفي السيتوبلازم cpDNA، و الذي يشمل الحمض النووي الموجود في الميتوكوندريا (mtDNA). عموماً تعتبر الجينومات السيتوبلازمية أصغر من الجينومات النووية من حيث عدد القواعد المكونة للحمض النووي.

الخواص المرغوبة في الواسمات الجزيئية:

هنالك خواص يجب أخذها في الاعتبار لاختيار الواسمات الجزيئة المناسبة التي يجب استخدامها لتحليل التباين الظاهري في الحمض النووي بين الافراد في عشيرة ما، تشمل:

- أن تكون متعددة الأشكال المظهرية Polymorphic:

يجب أن يكون الواسم الجزيئي متعدد الأشكال المظهرية للصفة التى يتم الانتخاب لها. يعتمد تعدد الأشكال المظهرية الذي يمكن الحصول عليه من خلال إستخدام الواسمات الجزيئية على الاختلاف فى تسلسل القواعد المكونة للحمض النووي.

- توريث ذو سيادة شراكية Co-dominant:

وهى مقدرة تمييز الواسمات الجزيئية المختلفة في الكائنات ثنائية التركيب الجينومي فى كل من الأفراد الثابتة وراثياً Homozygotes والمتباينة وراثياً Heterozygotes.

- غير محدد الموقع على الكروموزوم:

بخلاف الواسمات ذات الموقع المحدد على الكروموزوم يجب أن يكون الواسم موزعاً عبر كل الجينوم.

- أن يكون سهل الاستخدام وغير مكلف.

- يجب أن يعطي الواسم الجزيئ نفس النتائج فى المعامل المختلفة عند استخدامه لنفس الهدف فى نفس الأفراد من العشيرة المعينة.

عموماً لايوجد واسم جزيئ واحد يمكن أن يحقق كل هذه الاحتياجات منفرداً . إلا إن بعضها ذو سيادة شراكية يمكن أن تستخدم في برامج التربية، كما أن بعضها يمكن أن يستخدم فقط للتعرف على التباين الوراثي بين الأنواع المختلفة. هنالك إستخدامات أخرى واسعة النطاق للواسمات الجزيئية في المجالات الحيوية المختلفة، والتي تشمل بناء الخرط الجينية والغربلة Screening لمقاومة الأمراض وإنتخاب سلالات أو نباتات في برنامج التربية. بعض هذه الواسمات سهلة الإنتاج والإنتقال مقارنة بالواسمات الأخرى.

هنالك عدة طرق لتقدير حجم التنوع الجيني بين الأفراد عند استخدام الواسمات الجزيئية ، تشمل:

1. النظام الإحصائي لـ Nei (1973م).
2. نظام تقسيم العشائر Population sub-division لكلٍ من Wright (1965) و Lynch (1990).
3. تحديد حجم التباين الوراثي Heterozygosity بين الافراد، و تحديد حجم العشائر الذي يجب استخدامه Effective population size و معدل تكرار الأليلات .

4. تقدير درجة التقارب والبعد الجيني وذلك بإستخدام تحليل التجميع Cluster analysis.

تعتمد الطرق التقليدية لحساب التنوع الوراثي اعتماداً كلياً على الصفات المورفولوجية، وبما أن هذه الصفات تتأثر بدرجات متفاوتة بالعوامل البيئية، لذا كان لابد من إيجاد طرق جديدة يمكنها أن تستبعد أثر العامل البيئي على الصفة. تتميز الواسمات الجزيئية والبيوكيميائية باعتمادها المباشر على تأثير الجين وإلغاء عامل البيئة في دراسة التنوع بين الأفراد ، وهي بذلك تعتبر من أهم الطرق لمعرفة التباين الوراثي بين الأفراد.

التباين الظاهري في البروتينات:

الأيسوزيمات Isozymes والألوزيمات Allozymes هي تكوينات جزيئية مختلفة لإنزيم ما وتتشارك في نشاط مساعد Catalyst activity. ويمكن استخدام هذه الانزيمات كواسمات جزيئية .

الألوزيمات Allozymes :

هي تكوينات جزيئية مختلفة لإنزيم ما يتحكم في توريثها عدة أليلات موجودة في موقع جيني واحد.

الأيسوزيمات Isozymes:

هي تكوينات جزيئية مختلفة لإنزيم ما يتحكم في توريثها أكثر من موقع جيني، وغالباً ما يستخدم هذا المصطلح للتعبيرعن النوعين من الإنزيمات.

الواسمات الجزيئية المعتمدة على الحمض النووي DNA : DNA-based markers:

يختلف عدد الكروموزومات في الكائنات الراقية باختلاف النوع، وفي بعض الأحيان في داخل النوع الواحد. وجد ان هنالك أنواع مختلفة من التنظيم في المستوى تحت الكروموزومي للخلية Sub-chromosomal level، يمكن اختصارها في الآتي:

أ. الأقسام الغنية بالجينات Gene – rich sectors:

في الجينومات الكبيرة، توجد الجينات مجتمعة في أقسام غنية بالجينات خصوصاً في المواقع القريبة من التيلوميرات Telomeres . وفي العديد من الحالات فإن تنظيم الجينات في قسم ما يكون موحداً بين الأنواع Gene synteny. توجد الجينات في الأقسام الغنية مبعثرة فى هيئة تسلسلات قصيرة متكررة.

ب. تكرارات مترادفة Tandom repeats:

توجد أعداد كبيرة من قطع الحمض النووي DNA المتكررة Sequence repeats مجتمعة في مناطق عديدة في الكرموزوم و خصوصاً حول السنترومير ات والتيلوميرات والمواقع البينية. تحتوي هذه المواقع على ملايين من الوحدات المتكررة، والتي تختلف في أحجامها وفي عدد التكرارات لكل وحدة، لذلك أصبحت مرغوبة للاستخدام كواسمات جزيئية .

أنواع الواسمات الجزيئية :

1.اختبار الاختلاف في طول القطع العشوائية RFLP – based markers:

أول من استخدم هذه التقنية هو العالم بورتشتاين في رسم الخريطة الوراثية للإنسان عام 1980م، ثم تلى ذلك استخدامها في الكائنات المختلفة. ويعتمد هذا النوع من الواسمات الجزيئية على التباين في تسلسل القواعد المكونة للمادة الوراثية بين السلالات أو الأصناف المختلفة.

ولإظهار هذا التباين يتم عزل المادة الوراثية من الأفراد المختلفين وتنقيها وهضمها بأحد إنزيمات القطع المقيدة. تنقل القطع الناتجة بواسطة الخاصية الشعرية إلى غشاء سليلوزى خاص فيما يعرف بتقنية تهجين سوزرن ، ويتم تحضين هذا الغشاء مع مسبار موسوم بمادة مشعة (مثل الفسفور P^{32}) أو مادة غير مشعة ينبعث منها وميض ضوئي، وذلك عند درجة حرارة مرتفعة ليحدث تزاوج بين المسبار والجزء المكمل له في شريط الحمض النووى DNA المثبت في

الغشاء. وعند تعريض الغشاء لفيلم حساس يظهر التباين في المادة الوراثية على هيئة حزم مختلفة الوزن الجزيئى و الأطوال.

قد يكون مصدر المسبار المستخدم المكتبة الجينومية أو من مكتبة الحمض النووى المكمل cDNA في حالة استخدامه للتعرف على جينات بعينها. تتم مراجعة المسبار من حيث التكوين ومطابقته بالتسلسل الجينى المطلوب. كذلك يمكن تحديد مكان هذا المسبار أو الجين على الكروموزوم الذي يحمله عن طريق استخدام تقنية أخرى تعرف بتقنية التهجين بين المسبار والموقع الجينى على الكروموزوم وبالتالي يمكن استخدام هذه البيانات في رسم خريطة للطاقم الوراثي للكائن الحي المحدد.

اختبار الاختلاف في طول القطع العشوائية، هو عبارة عن تحليل للتباين الظاهرى في طول القطع الناتجة عن استخدام الإنزيمات المقيدة. يعتبر هذا الإختبار من أكثر التقنيات المستخدمة للتعرف على التباين في تسلسل الحمض النووي DNA. يعتمد هذا الاختبار على حجم القطع المقيدة الناتجة عن إستخدام الإنزيمات المقيدة. تتم هذه التقنية في خطوات يمكن إجمالها في الآتي:

أ. عزل الحمض النووي DNA:

يتم استخلاص الكمية الكلية من الحمض النووي DNA من الخلايا النباتية، كما يمكن استخلاصه من الكلوروبلاست والميتوكوندريا اعتمادا على نوع التحليل المطلوب. يجب أن يكون الحمض النووي نقياً وذا وزن جزيئي عالي. هنالك صعوبات تواجه مثل هذا الاختبار تتمثل في الآتي:

- تكسير الحمض النووي DNA بواسطة إنزيمات النيكليويز في داخل خلايا النبات.
- عزل السكريات المعقدة والتي تصعب عزلها عن الحمض النووي DNA عند تنقيته.
- عزل الهاضمات الثانوية، والتي تعمل على تكسير الحمض النووي DNA وتمنع استعمال الإنزيمات المقيدة .

ب. تقطيع الحمض النووي DNA باستخدام الإنزيمات المقيدة:

يتم تقطيع الحمض النووي DNA بواسطة إنزيمات مقيدة محددة جداً ومنتقاه، حيث تعمل على تقطيع الحمض النووي إلى قطع صغيرة. يعمل كل إنزيم مقيد تحت الظروف المناسبة على تحديد وقطع الحمض النووي في مواقع محددة لإنتاج مجموعة من القطع، التي تتميز باختلاف في أطوالها. هنالك أعداد كبيرة من الإنزيمات المقيدة توجد الآن تجارياً و يعمل كل منها على تحديد وقطع تسلسل محدد من الحمض النووي DNA.

ج. عزل قطع الحمض النووي بواسطة تقنية الهجرة الكهربية Gel electrophoresis:

يتم فرز أو فصل عدد كبير من القطع المقيدة التي نتجت في الخطوة السابقة بواسطة تقنية الهجرة الكهربية في جل الأقاروز. كما يتم صبغ الجل بمحلول بروميد الإثيديم لصبغ هذه القطع لتسهيل رؤياتها، ولكن على الرغم من ذلك لايمكن تحديد التباين بين القطع بوضوح مما يتطلب استخدام طريقة التهجين بالمسبار.

د. تحويل قطع الحمض النووى الى الغشاء:

تحول القطع المقيدة إلى الغشاء السيلولوزي حيث يتحول نفس الإنموذج الذي توجد به القطع من الجل إلى الغشاء، تسمى هذه العملية بتهجين سوزرن وسميت كذلك بإسم العالم الذي اخترعها.

هـ. مشاهدة القطع المقيدة باستخدام المسبار المشع:

يتم مشاهدة المواقع المختلفة لواسمات RFLP المرغوبة عن طريق تحضين الغشاء المحتوي على هذه القطع مع المسبار المشع الذي يحتوي على التسلسل المكمل لهذه القطع، ومن ثم مشاهدة وتحديد القطع المهجنة عن طريق قراءة التباين في طول القطع. هنالك طرق أخرى لا يتم فيها استخدام الإشعاع الذري، و تشمل الطريقة الكيميائية و طريقة تحديد التباين في الإنبعاث الضوئي Colorigenic detection بين القطع المختلفة.

و. تحليل النتائج:

يظهر الاختلاف بين قطع الحمض النووي في هذه الطريقة، في شكل حزم في داخل الجل، والتي يمكن أن ترصد لوجود أو غياب حزمة محددة. كما أن الاختلاف بين الطراز الوراثي للأفراد Genotypes يمكن أن يشاهد عادة في شكل اختلاف بين نماذج الحزم المختلفة على الجل.

يمكن تقسيم نوع الحمض النووي المستخدم في تقنية RFLP إلى:

أ) المسابير أو الحوامل ذات الموقع التوريثي الواحد Single locus probes، وهذه يمكن تقسيمها على حسب مصادرها إلى:

1. الحمض النووي DNA الموجود في النواة، مثل هذه المسابير يمكن الحصول عليها من:

i. المكتبات الجينومية Genomic libraries :

يتم هضم الحمض النووي DNA الكلي بواسطة الإنزيمات المقيدة، ومن ثم يتم إدخال Cloning الجزيئات منفردة إلى بكتريا أو فيروس، هنالك مسابير مناسبة يتم اختيارها من هذه المكتبات لتحليل التباين في طول القطع العشوائي .

ii. مكتبات الحمض النووي المكمل Complementary DNA :

يتم عزل الحمض النووي الراسل ومن ثم تحويله إلى حمض نووي DNA مستنسخ باستخدام إنزيم الاستنساخ الراجع Reverse transcriptase . يتم إدخال الحمض النووي المكمل cDNA في وسيط، ومن ثم يستخدم كمكتبة مسبار لتحليل التباين في طول القطع العشوائي RFLP.

2. الحمض النووي الموجود في السيتوبلازم: وهو إما من مكتبات الكوروبلاست أو الميتوكوندريا. يميز مسبار الواسم RFLP من هذه المصادر في أنها محددة الموقع التوريثي و ذات سيادة شراكية كما انها محددة للنوع الذي أخذت منه. و التى تشمل مكتبات الميتوكوندريا والكلوروبلاست.

بصورة عامة تتميز مسابير RFLP ذات الموقع الجينى الواحد من هذه المصادر بالآتي :

- تكون مرتبطة بموقع جيني محدد، تسهل هذه الصفة التعرف على الواسمات الشراكية .

- محددة للنوع.

ب. تحليل الإختلاف في طول القطع RFLP ذات مسابير المواقع الجينية المتعددة Multi-locus probes. و التي تحتوي على:

1. التكرارات المترادفة وهى مفيدة جدا لدراسة الاختلاف في طول القطع، وذلك نتيجة لوجودها في مواقع جينية عديدة، إضافة للتباين الظاهري الكبير بينها. كما ذكر سابقاً فإن التكرارات المترادفة أصبحت مرغوبة للاستخدام كواسمات جزيئية، وذلك لاختلاف حجم القطع الناتجة، وتكرار الوحدة، وعدد التكرارات الموجودة، وللاختلاف في توزيعها عبر الجينوم.

2. تسلسل المينستلايت Minisatellites: والتي تحتوي على تكرارات مترادفة متباينة تستخدم في تحديد بصمة الحمض النووى.

بعد النجاحات التي حققها استخدام تسلسل المينستلايت في دراسة الجينيوم الإنساني، باستخدام 15 إلى 75 زوج من القواعد، والتي أظهرت تبايناً كبيراً بين الأفراد في الإنسان، التفت العلماء لاستخدامها في النبات. و بما أن التباين في الشكل الظاهري يرتبط ارتباطا وثيقا بعدد وحدات التكرارات المستخدمة، أطلق على هذه التكرارات إسماً بديلاً وهو الارقام المتباينة من التكرارات المترادفة (Variable number of tandem repeats) الذى يعرف اختصاراً بـ VNTRS ، حيث وجد أن هنالك إمكانية لتحديد قطع مقيدة تمثل عدداً كبيراً من المواقع الجينية، و ذلك بالاختيار الدقيق للمسابير المستخدمة.

مميزات تحليل الاختلاف في طول القطع العشوائي RPLP:

- يتميز بدقة عالية حيث تعطي نفس النتائج في المعامل المختلفة.

- ذات توريث شراكي، ولذلك فعند استخدامها يمكن تمييز الأفراد الثابتة و الأفراد غير الثابتة وراثياً على حد سواء.

- مقدرتها العالية على التمييز بين الأفراد جعل بالإمكان استخدامها على مستوي النوع أو العشيرة، عند استخدام مسابير ذات موقع توريثي واحد، أو على مستوى الفرد عند استخدام المسابير متعددة المواقع الجينية .

السلبيات:

- يتطلب إجراؤها زمنا كبيرا كما أنها مكلفة.
- في حالة عدم توفر المسابير المناسبة ذات الموقع الواحد، تستغرق هذه العملية زمنا طويلا للتعرف على التكامل بين الواسم والقطع المقيدة من الجينوم أو مكتبات الحمض النووي DNA المكمل .
- للتعرف على التباين الظاهرى بين الافراد، تحتاج هذه التقنية لاستخدام المسابير المشعة Autoradiography .

الخلاصة:

- يتضمن التحليل بطريقة الاختلاف في طول القطع العشوائي RFLP دراسة الاختلافات في طول القطع المقيدة من الحمض النووي DNA كما يظهر بواسطة التهجين مع المسابير المناسبة.
- ينتج الاختلاف بين طرازين وراثيين عن طريق:
- طفرة نقطية Pointed mutations: وهي خلق أو تكسير موقع مقيد، يؤثر على وجود الحزمة أو عدم وجودها.
- إعادة تنظيم الحمض النووي DNA، ويتم ذلك بين موقعين مقيدين مثل الحذف أو الإضافة. وينتج عن ذلك اختلاف في حجم حزمة أو قطعة الحمض النووى.
- دائماً ما تكون النسخة الأحادية الجينومية أو مسابير الحمض النووي المكمل محددة للنوع .

- تعتبر النسخ المتعددة المواقع الجينية أو مسابير النسخ المتعددة المواقع الجينية مفيدة جداً لعملية التبصيم الجزيئي Finger printing في أنواع عديدة من النباتات .

الواسمات الجزيئية المعتمدة على تقنية تفاعل البوليميريز
PCR – based methods

من أمثلتها:

1. الإكثار العشوائي لتباين الحمض النووي Random amplified polymorphic DNA والذى يعرف اختصارا بـRAPD .
2. بصم القطع المكاثرة DNA amplification finger printing والذى يعرف اختصارا بـ DAF.
3. تفاعل البولمريز باستخدام برايمرات بادئات تحكيمية Arbitrary primed polymerase chain reaction (AP – PCR) .
4. المواقع المعلمة في التسلسل Sequence tagged sites.
5. التباين في طول القطع المكاثرة Amplified fragment length polymorphism (AFLP).

1. الإكثار العشوائي لقطع الحمض النووي المتباينة
Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

وهو نوع من الواسمات الجزيئية الذى إكتشف عام 1990 بواسطة العالم ويليام وتعتمد هذه الواسمات على استخدام كمية قليلة جداً من الحمض النووي DNA لإنتاج نسخ عديدة من قطع معينة بواسطة تقنية تفاعل البوليميريز السلسلي. يستخدم في هذه الطريقة قطع مكاثرة من الحمض النووي DNA. تعتبر هذه الطريقة سريعة فى التعرف على التباين الظاهري بين الأفراد و ذات توريث سيادي، ولكنها تظهر تبايناً فى النتائج بين الاختبارات المختلفة لنفس الحمض النووي.

تتميز تقنية RAPD عن تقنية RFLP بأنها تحتاج إلى كمية ضئيلة من المادة الوراثية لإجراؤها كما تستغرق وقتاً أقل بكثير، كما أن لها مقدرة أكبر في إظهار التباين الوراثي بين الأفراد.

تعتمد هذه الطريقة على تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى، وعادة ما تتكون القطع المستخدمة من 8 -10 قاعدة نيتروجينية. يتم إكثار جزء من شريط الحمض النووي وفصله، ومن ثم مشاهدته عن طريق تقنية إمرار التيار الكهربى في الجل.

من المميزات المهمة الأخرى لهذه التقنية:

- عدد القطع: يتم إكثار عدد كبير من القطع باستخدام كل بادئ، لذا تعتبر هذه التقنية سريعة في التعرف على التباين الظاهري.

-.سهولة العمل : تحليل واسمات RAPD لا يتضمن تقنية التهجين المعلمة بالإشعاع الذري autoradiography أو أي تقنيات أخرى غالية الثمن. كما أن تكلفة البادئ المستخدم لكل اختبار رخيصة مما يعتبر ميزة جيدة لهذه التقنية.

- مشاكل التباين في النتائج:

تعتبر تقنية الواسم RAPD ذات حساسية عالية لظروف تفاعل البولمريز السلسلى وبالتالي عادة ما ينتج عنها تغيير في بعض القطع المتكاثرة، ولذلك تتطلب حذراً شديداً في ضبط ظروف تفاعل البولمريز من أجل الحصول على القطع المطلوبة.

عند إستخدام واسمات RAPDs يجب دعم النتائج المشاهدة بتحليل التربية الداخلي Pedigree، فباستخدام هذه الطريقة يمكن الوصول إلى نتائج مهمة ودقيقة. هنالك نقاط لابد أن تؤخذ في الإعتبار عند الحديث عن واسمات RAPDs:

-لا يمكن الفصل بين النباتات المتجانسة الثابتة وراثياً والمنعزلة بهذه الطريقة، وذلك لأن هذه الواسمات سيادية، حيث يشار إلى وجود قطعة الواسم RAPD أو عدم وجودها فقط.

- مشاكل الهجرة الجماعية Comigration :

لا يعد وجود حزمة لها نفس الوزن الجزئي بين الأفراد المختلفين دليلاً على أن هؤلاء الأفراد يحملون نفس قطعة الحمض النووي (Homologous DNA).

- مشكلة الهجرة :

يمكن أن تحتوي حزمة واحدة في الجل على منتجات إكثار مختلفة، وذلك لأن تقنية الإمرار الكهربي تعمل على فصل قطع الحمض النووي كل حسب حجمه، لذا لا يمكن فصل القطع التي لها نفس الحجم نوعياً على حسب التسلسل.

- تجمع هذه التقنية بين كل الاختلافات البسيطة الموجودة بين التقنيات الجزيئية الثلاث الأخرى (P – PCR، DAF، RAPD) . تستخدم كل هذه التقنيات واحداً أو اثنين من البادئات الغنية بالنيوليوتيدات (GC) التي تتميز بتسلسل تحكمي للحمض النووي. ، يعد الواسم RAPD الأوسع استخداماً بين هذه الواسمات.

تتمثل عيوب هذه التقنية فى الاتى:

- واسمات سيادية.
- مشاكل تماثل النتائج بين الاختبارات المختلقة.
- مشاكل في دراسة النتائج والتوقعات.

تتضمن تقنية استخدام الواسمات RAPD إكثار قطع DNA غير معروفة باستخدام واحد أو اثنين من البادئات التحكمية Arbitrary primers ومن ثم تتم مشاهدة منتجات الإكثار عن طريق إمرار التيار الكهربي في جل الاقاروز.

2. الواسم الجزيئي بصم القطع المكاثرة DAF:

يستخدم فى هذه الطريقة بادئات قصيرة و التي عادة ما تتكون من 5–8 نيكيوتيدات و بتركيز عالي. تشمل هذه التقنية دورتان للحرارة، حيث تنتج عادة نماذج معقدة من قطع الحمض النووي.

3. **الواسم الجزيئي AP - PCR (تفاعل البولمريز بإستخدام بادئات تحكيمية)**:

يتم التكاثر في هذه الطريقة فى ثلاث مراحل ولكل منها قوته وتركيز محتوياته. كما تستخدم بادئات مختلفة الأطوال ويستخدم تركيز عالي في الدورات الأولي من تفاعل البوليمريز السلسلى. في حالة AP-PCR .

4. المواقع المعلمة في التسلسل Sequence tagged sites: و التى تشمل كل من:

أ. الميكروستلايتات معلمة التسلسل

Sequence – tagged microsatellites (STMS).

ب .برايمرات أحادية بين تكرار تسلسل بسيط.

Anchored microsatiellite oligonucleotides or inter-simple sequence repeats (ISSR) primers.

ج – مواقع مكاثرة معروفة التسلسل: مثل

- المواقع المكاثرة محددة التسلسل

Sequence characterized amplified regions (SCAR)

- التسلسلات المتباينة المكاثرة المنشطرة

Cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS)

هنالك معلومات غزيرة متوافرة عن تسلسل الحمض النووي DNA من مصادر متنوعة، و التى يمكن وضعها في قاعدة بيانات لتصبح متاحة للاستخدام. تعتبر هذه المعلومات مهمة لبناء إستراتيجية خاصة بالتحليل للاختلافات الوراثية بين الافراد.

يطلق مصطلح المواقع المعلمة في التسلسل على الواسم الذي يتم تعريفه بناءً على تسلسل البادئ الخاص به. إستخدمت هذه التقنية لبناء خرطة الجينيوم الإنساني. سنتناول هنا بالتفصيل أمثلة للمواقع المعلمة التسلسل:

أ. الميكروستلايتات معلمة التسلسل Sequence tagged microsatellites:
تسمى أيضاً بالتباينات في تكرار التسلسلات البسيطة Simple sequence repeats ، التى تعرف اختصارا بـ SSRs.

تعرف القطع المتكررة البسيطة (الميكروستلايتات) بأنها تكرار لتسلسل بسيط من الحمض النووي DNA. و هي عبارة عن وحدات متكررة من تسلسل نيوكليوتيدات ثنائية أو ثلاثية أو رباعية أو خماسية التركيب، مثال لذلك $(GTG)_n$،$(GT)_n$، و$(ACA)_n$ يتراوح حجمها الكلي من 20 - 200 قاعدة منتشرة وموزعة على انحاء الطاقم الوراثي الخاص بالنباتات والحيوانات الراقية، لذا يمكن استخدامها كواسمات جزيئية تعريفية قيمة. يعتبر تكرار هذه الوحدات ذات تباين عال بين الأفراد، كما تتميز بتوريث مندلي. أكثر الميكروستيلاتيات وجوداً في الكائنات الراقية هو الميكروستلايت $(CA)_n$ حيث يوجد في جينوم كل الكائنات الراقية التي تم اختبارها، كما يمثل حوالي 5% من الجينوم الكلي للإنسان. هنالك ما يقارب 50000 تكرار من تسلسل الميكروستيلايت $(CA)_n$ توجد في الجينيوم الإنساني في مساحة تقارب 30 kb من الجينوم.

تنقسم الميكروستلايت عالية الاختلاف إلى ثلاثة أنواع على حسب تسلسل النيوكليوتيدات المكونة لها:

1. تسلسلات نموذجية Perfect repeats: لايوجد تداخل في تسلسل النيكليوتيدات، مثال لذلك $(CA)_n$.
2. تسلسلات غير نموذجية و التى تحتوي واحداً أو أكثر من التسلسلات المتداخلة ، مثال $(CA)_n - CCA - (CA)_m$.
3. تسلسلات مركبة Compound repeats بها تسلسلات متجاورة على طول الجينوم $(CA)_n\,(AGT)_m)_r$.

يمكن استخدام القطع المتكررة البسيطة كواسمات جزيئية تعريفية قيمة. فعندما تستخدم مع تقنية تفاعل البوليميريز السلسلى يمكنها أن توضح الاختلافات في طول القطع المقيدة، وقد حظيت هذه التقنية بإهتمام كبير في

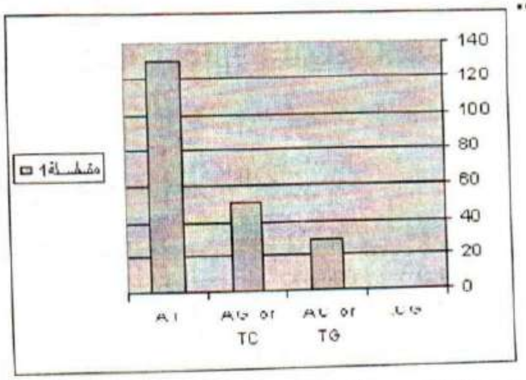
السنوات الماضية نظراً لمقدرتها على الكشف عن العديد من التباين بين الأفراد واظهاره إما بطريقة التزاوج أو بواسطة تخليق قطع حمض نووي DNA مكملة للتتابعات التي تقع على جانبي الميكروستالايت. لذا فإنها تستهدف المناطق ذات الاختلافات الكبيرة بداخل الجينوم. وقد ساعد استخدامها في تطوير الأبحاث في مجال الأحياء الجزيئية في الإنسان و الثديان الأخرى، كما أن لها دوراً مقدرا في دراسة التباين الوراثي في النباتات. تسمى هذه التقنية أيضا بالميكروستلايتات وهى قطع متكررة على امتداد الجينوم تتكون من نيوكليوتيدات أحادية أو ثنائية أو ثلاثية أو رباعية أو خماسية و التي تنتظم عبر جينوم الأنواع الراقية من النباتات و الحيوانات. يمكن تحديد التباين الظاهري بواسطة تقنية الإكثار العددي للقطع باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز السلسلى في جينوم كامل باستخدام اثنين من البادئات و التي تتكون من عدد قليل من النيوكليوتيدات و التي تعمل على تحديد موقع الواسم على الجينوم ، حيث يمكن استخدام منتجات الإكثار العددي الناتج من الأفراد المختلفين وفرزها بداخل الجل باستخدام تقنية إمرار التيار الكهربي لإظهار حجم التباين الظاهري بين الافراد. تتميز الميكروستلايتات بالاتي :

- تتواجد في مواقع جينية متعددة على الجينوم multiallelic nature .
- ذو سيادة شراكية.
- تتميز بسهولة تحديد التباين الظاهري باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز السلسلى.
- تعمل على تغطية كل أجزاء الجينوم.
- الحاجة لكمية بسيطة من الحمض النووي الأصل.
- تعتبر النتائج تأكيدية وثابتة بين المعامل المختلفة كما يمكن تداولها بين المعامل المختلفة كتسلسل بادئات محددة، لذا فإنها تستخدم في رسم الخرائط الجينية . كما ان النتائج تكون متماثلة في المعامل المختلفة.

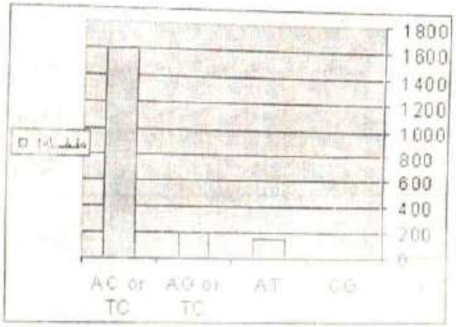
تعتبر الميكروستلايتات أكثر انواع الواسمات الجزيئية استخداما في تحديد الصنف وفي حماية حقوق المربين، كما تستخدم في تحديد نوع التهجين وفي تحليل الاختلاف الوراثي في المستودع الجيني gene pool للمحاصيل المختلفة. من أهم الأسباب التي تكمن وراء استخدام الميكروستلايتات هى مقدرتها على التشخيص باعتبارها واسمات جزيئية لصفات مهمة في برامج التربية. تبنى البادئات في هذه الطريقة بحيث تكون مكملة لتسلسل متفرد وقصير يحمل مواقع لتكرار تسلسل الميكروستلايت. تختلف هذه التسلسلات في الطول بدرجة كبيرة، لذا تعتبر هذه الطريقة فاعلة في تحديد التباين الظاهري بين الافراد.

كيفية عزل الميكروستلايتات وتوصيفها:

تم استخدام الميكروستلايتات فى النباتات للمرة الأولى في أنواع من الأشجار المدارية، حيث قدر تكرار القطع الثنائية البسيطة ACو AG في داخل الجينوم بمقدار $5x10^3$ و$3x10^5$ على التوالي لكل جينوم. قُدِر حجم هذا التسلسل بمسافة جزيئية تساوي 20 bp توجد على بعد جيني يقدر بـ 38 kb في الجينوم النباتي، مقارنا ذلك بـ 6 kb في الثديات. يوجد التسلسل AT سائداً في النباتات ، بينما نجد إن تكرارات التسلسلات AC و TG هى الأكثر وجوداً في الإنسان، لذا يستخدم هذا التباين للتمييز بين الجَينوم النباتى و الحيواني. انظر الشكلين أدناه.



الشكل 1.2. يوضح نوع الميكروستلايتات الثنائية وعددها و توزيعها في الإنسان.



الشكل 2.2. الذي يوضح نوع الميكروستلايتات الثنائية وعددها وتوزيعها في النباتات.

تتضمن تقنية استخدام واسمات الميكروستلايتات الخطوات التالية:

1. تكوين مكتبة جينومية صغيرة.
2. غربلة المكتبة عن طريق التهجين بالحوامل المناسبة.
3. تحديد تسلسل الحمض النووي المطلوب.
4. تصميم البادئ وتحديد الموقع الجيني.
5. تحديد التباين الظاهري.

تطبيقات الميكروستلايتات في الوراثة و تربية النبات :

تكمن أهمية استخدام الميكروستلايتات في عاملين هما:

- قيمة المعلومات التي تحتويها، والتي تظهر من خلال عدد التكرار و نوع الأليلات المكررة.
- سهولة تحديد التركيب الوراثي.

يعتبر تحديد التباين الظاهري بين الإفراد المتقاربين أمرا في غاية الأهمية في عدد من المحاصيل التي تحتوى على قاعدة جينية ضعيفة. حيث أظهرت الميكروستلايتات قدرة أوسع في تحديد هذا التباين مقارنة بالواسمات الأخرى. الجدول 1.2. يوضح مستوى الاختلاف الذي تم تحديده في ستة من المحاصيل الزراعية باستخدام الميكروستلايتات كواسمات جزيئية:

نوع المحصول	عـــدد الواسمات	معدل التنوع
الطماطم	5-1	غير محدد
فول الصويا	26-11	0.95-0.71
الأرز	11-5	0.90-0.64
الشعير	37-3	0.93-0.46
القمح	7-2	0.79-0.29
الذرة الشامى	11-2	0.89-0.40

معدل التنوع The diversity index يساوي $1 - \Sigma P_1^2$، حيث تمثل P تكرار الواسم .

وقد حظيت هذه التقنية بإهتمام كبير في السنوات الماضية نظراً لمقدرتها على الكشف عن العديد من التباين بين الأفراد . ويمكن إظهار هذا التباين أما بطريقة التزاوج أو بواسطة تخليق قطع حمض نووى DNA مكملة للتتابعات التي تقع على جانبي الميكروستالايت. وهى عادة ما تكون ذات تحكم جيني متعدد على موقع جيني واحد وذات سيادة شراكية وذات مقدرة عالية لاظهار نتائج متماثلة عند استخدام نفس قطع الحمض النووى.

تبني البادئات في هذه الطريقة بحيث تكون مكملة لتكرار متفرد وقصير والذي يحمل مواقع لتكرار ميكروستلايت. بما أن التكرارات تختلف في الطول بدرجة كبيرة لذا تعتبر هذه الطريقة فاعلة في تحديد التباين الظاهري بين الافراد. تتمتع هذه الواسمات بخواص عامة تجعلها ذات فائدة كبيرة في دراسة العشائر وهي:

- تحدد دائماً موقع جيني واحد متعدد الأليلات Single multiallelic - locus.
- ذات سيادة شراكية لذا يمكن التميز بين الأفراد الثابتة وراثيا والمنعزلة وراثيا

في العشيرة.

- ذات مقدرة عالية لاعطاء نفس النتائج باستخدام نفس قطع الحمض النووى.

. يمكن دمج تفاعل البوليمريز السلسلي مع بادئات عديدة من STMS في نفس أنبوب التفاعل ويسمى ذلك بالخلط المتعدد، وذلك لاختصار الزمن حيث يمكن ذلك فقط في حال أن المنتجات غير متداخلة في الحجم.

تعتمد تقنية STMS في الأساس على معرفة تسلسل الحمض النووي الذي يحمل نفس التكرار. بعض هذه المعلومات يمكن أن يكون موجوداً في قاعدة البيانات Data bases للأنواع التي درست من قبل. فيما عدا ذلك يصبح من الضروري إنتاج مكتبات جينومية غنية بالميكروستلايت، ومن هذه المكتبات يمكن اختيار المكونات المفيدة ومن ثم يتم تحديد تسلسل الحمض النووى لتحديد البادئات المناسبة. وعلى كلٍ فإن تفضيل هذه التقنية في دراسة توريث العشائر يتأتى من مقدرتها على اعطاء اختلافات كبيرة بين الواسمات.

تتميز الميكروستلايتات البسيطة بالآتي:

- توجد في مواقع جينية متعددة على الجينوم multiallelic nature، حيث تعمل على تغطية كل أجزاء الجينوم.

- ذات سيادة شراكية.

- تتميز بسهولة تحديد التباين الظاهري باستخدام تقنية تفاعل البوليميريز السلسلى.

- الحاجة لكمية قليلة من الحمض النووي الأصل.

- تعتبر النتائج تأكيدية وثابتة بين المعامل المختلفة كما يمكن تداولها بين المعامل المختلفة بوصفها تسلسل بادئات محددة، كما تستخدم في رسم الخرائط الجينية.

ب. بادئات أحادية بين تكرار تسلسل بسيط ISSR :

تتميز بالآتى:

- إكثار قطع جينومية مرتبطة طرفياً بواسطة تكرارات.
- ارتباط محدد الموقع.
- تسلسل تكرارات بسيطة متداخلة
- واسمات سيادية.
- الميكروستلايتات أكثر استخداماً مقارنة بالمينيستلايتات.
- يمكن إستخدام تسلسل أصلى لكل من الميكروستلايت والمينستلايتات..

هنالك انواع مختلفة من تقنية الميكروستلايتات المعلمة التسلسل تم اكتشافها عن طريق استخدام الميكروستيلايتات الأحادية الرأسية كبادئات، والتى تعمل على توجيه إكثار قطع من الجينوم عبر المنطقة المتكررة نفسها. يتم في هذه الطريقة إستخدام نيكليوتيدات أحادية تبنى عند الرأس على تسلسل تكرار فردي (SSR) من النهاية '5 إلى النهاية '3 بواسطة اثنين أو أربع من النيكليوتيدات التي تتمتع بالالتصاق عند موقع محدد في الجينوم. بحيث يبدأ تكاثر تفاعل البولميريز السلسلي لقطع من الجينوم، والتي تحمل بواسطة تكرارات عكسية المنشأ وذات مسافات متقاربة، تحمل بادئات ISSR عند النهاية '3، وتعمل على تكاثر القطع الموجودة بينها. عادة ما تكون الميكروستلايتات سائدة. تعتبر تكرارات الميكروستلايتات أكثر فائدة من المينيستلايت، حيث إن الأخيرة عادة ما تكون طويلة ولا يمكن إكثارها باستخدام تقنية تفاعل البوليمريز السلسلي.

الميكروستلايتات عالية الإختلاف Hypervariable microsatellites:

تعتبر هذه الميكروستلاستات واسمات معرفية هامة في عمل الخرط الوراثية. تم اكتشافها في العام 1989م. وهي عبارة عن وحدات صغيرة متكررة من الحمض النووى DNA Tandem repeats والتي تحتوي على نيوكليوتيدات ثنائية أو ثلاثية أو رباعية مثال لذلك $(CA)_n$، $(CAG)_n$، $(AGAT)_n$. يعتبر تكرار هذه الوحدات ذات تباين كبير بين الأفراد كما تتميز بتوريث مندلي بسيط .

أكثر الميكروستيلاتيات وجوداً هو $(CA)_n$ حيث يتواجد في جينوم كل الكائنات العليا التي تم إختبارها حيث يمثل حوالي 5% من الجينوم الكلي للإنسان.

ج. المواقع المكاثرة :

تشمل كلاً من المواقع المكاثرة محددة التسلسل SCARs، وتباين القطع المنشطرة CAPs .

i: المواقع المكاثرة محددة التسلسل Sequence – characterized amplified regions

وهو واسم محدد الموقع التوريثي يتم التحليل في هذه الطريقة بإستخدام تقنية التباين في طول القطع المقيدة RFLP. هنالك نوع آخر من STS والذي يعتمد على تقنية RAPD والذي يعرف أختصارا بـ SCARs. تنشأ هذه الواسمات عن طريق استنساخ وتحديد تكرار قطع الواسم RAPD المرغوبة. فبمعرفة تكرار التسلسل يمكن تصميم بادئ أطول من البادئ الذي يكمل نهاية قطعة الواسم RAPD الأصلية. باستخدام هذه البادئات في تقنية تفاعل البولمريز السلسلي يتم تحديد موقع واحد يماثل القطعة الأصلية. تسمي هذه المواقع اختصارا بـ SCARS. تتميز هذه التقنية عن تقنية RAPD والتقنيات الأخري التي تستخدم فيها بادئات تحكمية في أن نتائج هذه التقنية ذات مقدرة عالية على التماثل بين الاختبارات المختلفة، وهي عادة ما تكون واسمات ذات سيادة شراكية.

هنالك تقنيات أخرى مثل تقنية CAPS وPCR-RPLP والتى تبنى بادئات تفاعل البوليمريز السلسلي فيها لموقع جيني واحد. حيث يتم هضم الناتج من إكثار تقنية البولمريز بواسطة إنزيم مقيد، ويتم بعد ذلك رؤيتها في جل الأقاروز عن طريق صبغها بمادة بروميد الاثيديم، ومن ثم تتم مشاهدة الاختلافات أو التباين الظاهري بناءً على الاختلاف في حجم القطع المقيدة كما في تقنية RFLP.

5. التباين في طول القطع المكاثرة

Amplified fragment length polymorphism :

هو عبارة عن تجميع لتقنيتى الواسم RFLP و تقنية تفاعل البوليمريز السلسلي. تعتبر المعلومات الناتجة عن هذا الإختبار قيمة عند مشاهدة البصمات ، وهي طريقة محبوبة جداً. و تستخدم في توليد عدد كبير من الواسمات الجزيئية التي تعرف بإسم AFLP تعتمد هذه التقنية على قطع الحمض النووي بإنزيم القطع المتخصص مضافاً اليه نيكلوتيد واحد أو إثنين أو ثلاثة في نهايته ثم إكثار قطع منتخبة منها باستخدام حمض نووي مصنع معملياً عن طريق تفاعل البولمريز السلسلي. ثم فصل المنتجات المكاثرة في الجل ومن ثم مشاهدة القطع الموسمة بالاشعاع autoradiography. وبما أن النيكليوتيدات الموسومة إشعاعيا لا تستخدم في خطوة تفاعل البوليمريز السلسلي، لذا يمكن أيضاً استخدام تقنيتي الإشعاع الضوئي Florescent أو الصبغ بالفضة Silver staining.

تؤدي هذه الطريقة إلى إظهار عدد كبير من التباين الموجود بين الأفراد تحت الدراسة، ولذلك فإنها تستخدم في تحديد البصمة الوراثية لتمييز الأصناف، بالإضافة إلى رسم الخرائط الوراثية. مثال لذلك تحديد البصمة الوراثية في النخيل عن طريق مطابقة التركيب الوراثي للكلونات Clones الناتجة عن زراعة الأنسجة بالأصل الذي أخذ منه النسيج المزروع Explant.

يمكن وصف هذه التقنية في الخطوات الآتية:

1. تقطيع الحمض النووى بواسطة الإنزيمات المقيدة .
2. اجراء تفاعل البولمريز السلسلى بواسطة بادئات منتجة تجارياً.
3. فصل المنتجات المكاثرة في الجل ومن ثم المشاهدة بإستخدام تقنية مشاهدة القطع الموسمة بالاشعاع .

مميزات تقنية الواسم AFLP:

- إختيارية Highly selective.

- تُعطى نتائج ثابتة في الاختبارات المتكررة و في المعامل المختلفة.
- مقبولة على نطاق واسع.
- يمكنها التمييز بين الأفراد المنعزلين وراثياً في حال استخدام ماسح ضوئي للجل Gel scanner.

سلبياتها :

- غالية ومكلفة.
- تحتاج لتقنيات عديدة مصاحبة.
- تستخدم فيها عادة النظائر المشعة للفسفور او الكبريت .
- مشاكل في استنتاج نماذج الحزم قبل الهجرة الجماعية للقطع ، عدم المقدرة على تحديد الحزم المتماثلة Equivalent bands عند المقارنة بين الأفراد.

تقنيات الهجرة الكهربائية Electrophoretic techniques

وتتضمن التقنيات التالية :

1. الفصل الكهربى لقطع الحمض النووى الاحادية . Denaturing gradient gel electrophoresis DGGE
2. التباين - (SSCP). الهجرة الكهربائية باستخدام التدريج الحراري
3. التباين الظاهري المطابق للأشرطة الاحادية .
4. تحليل خليط من أشرطة الحمض النووي المتباينة Heteroduplex analysis.

تستخدم تقنية التبصيم Fingerprinting or DNA Profiling في الهجرة الكهربية بداخل الجل لفصل قطع الحمض النووي إعتماداً على أحجامها، ويعقب ذلك صبغها بالإشعاع لمشاهدة الانموذج الناتج من قطع الحمض النووي في الجل. تستخدم تقنية الهجرة الكهربية في الأقاروز جل على نطاق واسع وذلك لسهولتها، حيث تستخدم لفصل القطع ذات الوزن الجزيئى البسيط بينما تستخدم طريقة الفصل ذي البعد الواحد One dimensional لفصل الحمض النووي DNA

على أساس كمي (حسب أحجامها)، حيث لا يمكنها فصل قطع ذات أحجام متساوية على أساس نوعي (على حسب تركيبها القاعدي). وبالرغم من دقة تحديد تكرار الحمض النووي DNA الا انه يعتبر طريقة غير عملية لتحديد الاختلاف في تكرار الحمض النووي، عند الحاجة لغربلة أعداد كبيرة من الحمض النووي DNA. بناءً على ذلك فإن عدد كبير من طرق الهجرة الكهربية قد تم اكتشافها لحل هذه المشاكل ولكنها تحتاج إلى معدات معقدة.

يمكن إمرار القطع الصغيرة من الحمض النووي ($<1\ Kb$) عند الهجرة الكهربية في البول أكرلامايد جل تحت تحسين في ظروف فصل أشرطة الحمض النووي ، يتم ذلك عادة بزيادة نسبة تركيز الفورمالدهايد/اليوريا حتى يذوب الحمض النووي DNA ويصبح في صورة أحادية. يوجد ضعف في حركة الحمض النووي عند هذه النقطة نتيجة للتغيير في الشكل، ولذلك تتوقف القطع عن الحركة بداخل الجل. تعتمد النقطة التي يذوب فيها الحمض النووي DNA على تسلسل النيكليوتيدات في المنطقة الذائبة، يمكن أن يحدث ذوبان في الحمض النووي DNA في مناطق مختلفة في الجل نتيجة لاختلاف في تسلسل القطع.

تتم الهجرة الكهربية في تقنية DGGE في خطوتين:

أولاً: يتم إمرار العينات في الجل فى نظام الهجرة الكهربية اعتماداً على أحجامها.

ثانياً: إمرار العينة تحت ظروف DGGE.

لفصل القطع على حسب نقطة الذوبان Melting point عند خلط العينتين، فإن الحزم الثنائية الأشرطة توضح الاختلاف في تسلسل الحزم التي لها نفس الحجم.

2. الهجرة الكهربائية باستخدام التدريج الحراري TGGE :

تشابه تقنية DGGE إلا أن في هذه التقنية تفصل أشرطة الحمض النووي

DNA فيها باستخدام درجات حرارة متفاوتة أو متدرجة Temperature gradient . تستخدم هذه التقنية أيضاً في تحليل الأشرطة الأحادية للحمض النووي DNA وفي تحليل البروتينات .

3. التباين الظاهري المطابق للأشرطة الأحادية SSCP :

تعتمد هذه التقنية على طريقة الفصل باختلاف حركة الأشرطة الفردية على البولي أكرلامايد جل.

4. تحليل خليط من أشرطة الحمض النووي المتباينة Heteroduplex analysis:

يتم خلط منتجين من تفاعل البولمريز بكميات متساوية، ومن ثم تُفصل أشرطة الحمض النووي عند درجة حرارة 95^{0}م وتترك لتبرد . تتجمع أشرطة DNA المختلفة نتيجة لتفاعل البوليمريز السلسلى لتكوين مركب خليط متباين من أشريطة الحمض النووي المزدوجة .

العزل الكمي والنوعي للحمض النووى DNA:

يتم العزل الكمي لقطع الحمض النووى باستخدام أحد أنواع الجل المعروفة مثل جل الأقاروز وجل البولي أكرلامايد. بناءاً على التسلسل النيوكليوتيدى لقطع الحمض النووي، وهي طريقة تحتاج إلى معدات معقدة.

عند إختيار التقنية المناسبة هنالك نقاط يجب أخذها في الإعتبار، تتمثل فى الاتى:

1. من المهم إختيار التقنية المناسبة للحصول على المعلومة الصحيحة . مثال لذلك الحصول على معلومة عن تاريخ العشائر أو العلاقات الجينية بين الافراد، لذا يجب الحصول على معلومات عن التسلسل والمواقع المقيدة.
2. يجب إختيار التقنية على حسب نوع المعلومة المراد الحصول عليها عند اى من مستويات التقسيم العام Taxonomic level مثل قياس الإختلاف الوراثي عند مستوي العشيرة ، النوع أو بين الأجناس.
3. هل المعلومة المراد الحصول عليها تقع في مواقع جينية قليلة أو كثيرة

DNA فيها باستخدام درجات حرارة متفاوتة أو متدرجة Temperature gradient . تستخدم هذه التقنية أيضاً في تحليل الأشرطة الأحادية للحمض النووي DNA وفي تحليل البروتينات .

3. التباين الظاهري المطابق للأشرطة الأحادية SSCP :

تعتمد هذه التقنية على طريقة الفصل باختلاف حركة الأشرطة الفردية على البولي أكرلامايد جل.

4. تحليل خليط من أشرطة الحمض النووي المتباينة Heteroduplex analysis:

يتم خلط منتجين من تفاعل البولمريز بكميات متساوية، ومن ثم تُفصل أشرطة الحمض النووي عند درجة حرارة 95^0م وتترك لتبرد . تتجمع أشرطة DNA المختلفة نتيجة لتفاعل البوليمريز السلسلى لتكوين مركب خليط متباين من أشريطة الحمض النووي المزدوجة .

العزل الكمي والنوعي للحمض النووى DNA:

يتم العزل الكمي لقطع الحمض النووى باستخدام أحد أنواع الجل المعروفة مثل جل الأقاروز وجل البولي أكرلامايد. بناءاً على التسلسل النيوكليوتيدى لقطع الحمض النووي، وهي طريقة تحتاج إلى معدات معقدة.

عند إختيار التقنية المناسبة هنالك نقاط يجب أخذها في الإعتبار، تتمثل فى الاتى:

1. من المهم إختيار التقنية المناسبة للحصول على المعلومة الصحيحة . مثال لذلك الحصول على معلومة عن تاريخ العشائر أو العلاقات الجينية بين الافراد، لذا يجب الحصول على معلومات عن التسلسل والمواقع المقيدة.
2. يجب إختيار التقنية على حسب نوع المعلومة المراد الحصول عليها عند اى من مستويات التقسيم العام Taxonomic level مثل قياس الإختلاف الوراثي عند مستوي العشيرة ، النوع أو بين الأجناس.
3. هل المعلومة المراد الحصول عليها تقع في مواقع جينية قليلة أو كثيرة

(Loci) ، مثال لذلك عند استخدام البروتينات الموجودة في البذور يتم الحصول على معلومات عن عدد قليل من المواقع الجينية ، كما أن الواسمات تعتبر محدودة . بينما نجد أن واسمات RFLP و RAPD تنتج معلومات عن مواقع جينية عديدة.

4. التكلفة: تعتبر الألوزيمات الأقل تكلفة ، كما تعتبر تقنيتي الواسم RAPD و RFLP متوسط التكلفة اما تقنية AFLP فانها تعتبر هي الأعلى تكلفة بين هذه التقنيات.

5. تعطي التقنيات المعتمدة على تقنية تفاعل البوليمريز نتائج أسرع عند إستخدام البادئات بينما تعتبر التقنيات التي تعتمد على التهجين أقل سرعة ، فيما تعتبر الطرق التقليدية المعتمدة على تسلسل الحمض النووى DNA قليلة السرعة بخلاف التقنيات التى تستخدم فيها طرق أوتوماتيكية و التى عادة ما تكون سريعة.

6. التقنيات التي تتضمن تقنية التهجين وإستخدام الرسم الإشعاعي الذاتي هي تقنيات معقدة .

7. تحتاج معظم الطرق المعتمدة على تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى إلى كمية بسيطة من الحمض النووي DNA بينما تحتاج تقنية الواسم RFLP الى كميات أكبر . بينما تحتاج تقنية تسلسل الحمض النووي إلى كميات كبيرة جداً مقارنة بهذه التقنيات.

8. من الضروري تحديد الأفراد الثابتة وراثياً،و الأفراد المنعزلين حيث نجد ان الواسمات RFLPs ذات الموقع التورثي الواحد ، والألوزيمات والميكروستلاتيات ذات سيادة شراكية بينما نجد أن كل من RAPD و AFLP واسمات ذات سيادة كاملة.

9. يجب إستخدام فقط التقنيات المعتمدة على الموقع التوريثي الواحد وتقنية تكرارات التسلسل وذلك عند الحوجة الى إختلافات كبيرة.

كيفية تحديد نوع الواسم الجزيئي المستخدم :

عند تحديد نوع الواسم الجزيئي الذي يعتمد عليه لدراسة الاختلافات الجينية بين الافراد ، يجب اخذ النقاط التالية فى الاعتبار:

1. يجب أن تأخذ التقنيات الجزيئية المعتمدة على تقنية تفاعل البوليمريز الأولية مقارنة مع التقنيات المعتمدة على التهجين. حيث تفتح تقنية تفاعل البولمريز المجال للإستفادة منها في المجالات التطبيقية الأخري.
2. تعتبر تقنية الواسم RAPD من أفضل التقنيات التي يجب إعطاءها الأولوية. لدراسة التباين الظاهري بين الأفراد وهي تقنية جاذبة من الناحية العملية وذلك لسهولة الحصول على البادئات.
3. يمكن إدخال تقنية SSR المعتمدة على تقنية تفاعل البوليمريز السلسلى والميكروستلاتيات المعتمدة أيضاً على تفاعل البوليمريز السلسلى وذلك عند الإلمام جيداً بتقنية الواسم RAPD.
4. أصبحت تقنية الواسم AFLP من أحب التقنيات، يعتبر الإلمام بتقنية RAPD مع زيادة المعامل العاملة في مجال AFLP أفضل طريقة لإدخال إستخدام الواسم AFLP والعمل بها.

يمكن استخدام الواسمات الجزيئية للمساعدة في إدارة بنوك الموارد الوراثية في المجالات الآتية :

- لتحديد حجم التباين الوراثى بين السلالات المختلفة.
- لتحديد السلالة التى يجب استخدامها بواسطة المربين، كما تستخدم فى رسم الخرط الفيزيائية للأنواع النباتية و الحيوانية المختلفة .
- الصيانة الدورية للموارد الوراثية ولتحديد التضاعف الكروموزومى.
- يمكن أن تساعد الواسمات الجزيئية في اختبار المادة الوراثية الأصل بواسطة تأكيد العدد الأقصي من الأليلات المتكررة الموجودة في موقع توريثي غني بالأليلات. وعلى نفس النسق يمكن استخدام المعلومات الجزيئية لوضع إستراتيجيات لجمع الموارد الوراثية وحفظها في الحقل أو المعمل.

مثال لذلك؛ :

يتميز الخط الوراثى PI161375 في الشمام بخصائص عديدة متمثلة في مقاومة بعض الأمراض الفيروسية الشائعة فى الشمام عالمياً، مثل مرض تقذم أوراق البطيخ الفيروسى Watermelon chlorotic stunt virus ومرض إصفرار الأوراق المنقول بواسطة حشرة المن Cucurbit aphid-borne yellows virus، إضافة إلى مقاومة بعض الحشرات المهمة مثل حشرة الذبابة البيضاء *Bemisia tabacci*. فعند تحليل 170 موقع جيني في الأجيال المنحدرة من تهجين هذه السلالة مع الصنف التجاري (PI161375 x Piel de Sapo) كانت النتيجة كالآتي:

- 70 موقعاً جينياً كانت RFLPs.
- 50 موقعاً جينياً كانت RAPDs.
- 5 مواقع جينية كانت Inter SSRs .
- 45 موقعاً جينياً كانت AFLPs.

وكانت الإنعزالات في معظم المواقع التي تمت دراستها على النحو التالي:

إنعزالات بنسبة 1:2:1 منها 94% كانت للواسم الجزيئ RFLPs وانعزال بنسبة 1:3 (100% RAPDs و 89% AFLPs و 89% SSPs). كما أن هنالك فقط أقل من 8% من المواقع (3 AFLPs و 4 RAPDs و 4 RFLPs) قد أظهرت إنعزالات مختلفة عن هذه النسب وبالتالي فإنها تقع في مجموعات ترابط مختلفة. تميزت كل أنواع الواسمات الجزيئية بتوزيع عشوائي بدون وجود أي نماذج توزيعية أو تجمعية خاصة، كما وُجد أن بعض مجموعات الترابط لا تحتوي على واسمات RAPD أو Inter – SSR، إلا أن كل المجموعات قد أحتوت على واسمات RFLPs وهي الواسمات الشراكية الوحيدة ضمن هذه المجموعة.

الجدول 2.2: يوضح عدد الواسمات الجزيئية في 12 مجموعة ترابط في الأجيال المنحدرة من الهجين Piel de sapo x P1161375 التابعة للنوع *Cucumis melo* L

مجموعة الترابط Linkage group	واسم AFLP	واسم RAPD	واسم AFLP	واسم Inter- SSR	المجموع	المسافة الكلية لارتباط الواسمات Recombination (distance (CM
1	5	2	1	2	10	61
2	7	3	1	0	11	110
3	9	3	5	0	17	90
4	4	4	3	0	11	77
5	6	2	0	0	8	61
6	3	3	6	2	14	71
7	3	0	0	0	3	6
8	7	7	2	0	16	88
9	6	3	3	0	12	74
10	3	0	3	0	6	31
11	7	3	6	1	17	143
12	6	6	6	0	18	110
المجموع	66	36	36	5	143	922
واسمات غير مرتبطة	4	14	9	-	27	-

وفرت التقنيات البيولوجية الجزيئية أنواعاً مختلفة من الواسمات الجزيئية التى تعتمد على التباين في تسلسل القواعد المكونة للمادة الوراثية DNA بين الأصناف أو السلالات المختلفة، والتى يمكن استخدامها للدراسة الجزيئية للطاقم الوراثي في النخيل. تختلف هذه الواسمات الجزيئية من حيث طبيعة التقنية وملاءمتها للدراسات الوراثية التى تستخدم فيها (د. باسل، 2003).

يمكن استخدام هذه الواسمات فى النخيل فى المجالات الآتية:

- تحديد البصمة الوراثية.
- دراسة التباين الوراثي.
- تقدير درجة القرابة.
- توضيح العلاقات التطويرية.
- التأكد من انتقال الصفات المندلية.
- الاستعانة بالواسمات الوراثية في عملية الانتخاب.
- رسم الخرائط الوراثية.

تعتبر تقنيات SSRs، RAPD، RFLP و AFLP أنسب التقنيات التي يمكن استخدامها في مجال تحديد التباين الوراثي في النخيل.

الباب الثالث

مواقع توريث الصفات الكمية

Quantitative triat loci

الباب الثالث

Quantitative triat loci

مع بداية القرن العشرين، تم فك التناقض بين نظرية مندل للتوريث المحدود والملاحظة في أن بعض الصفات في الطبيعة تتميز باختلافات غير محدودة Continuous variation ، وذلك من منظور أن الصفات الكمية ناتجة من انعزال عدد كبير من الجينات ذات العمل المشترك Multiple genes، إضافة إلى تأثير عوامل البيئة والتفاعل بين هذه الجينات والبيئة. سهل استخدام الواسم الجزيئ RFLP إمكانية هذا الاختبار. فباستخدام هذه التقنية في التهجين الرجعي في الطماطم أمكن رسم ستة من مواقع التوريث الكمية QTLs التي تتحكم في وزن الثمرة، وأربعة من مواقع التوريث الكمى التي تتحكم في تركيز المواد الصلبة الذائبة، وخمس منها تتحكم في الرقم الهيدروجيني للثمرة pH. يمكن استخدام هذه الطريقة على نطاق واسع في دراسة التوريث الكمي للصفات الفسيولوجية، المورفولوجية والسلوكية في النباتات والحيوانات الراقية. كما تم استخدام بادئات متحكمة في ECORI بالألوان الأصفر والأخضر والأحمر عن طريق استخدام صبغات ضوئية والبادئ غير المعلّم *MSeI*، مع إضافة ثلاث من النيكليوتيدات لصبغ قطع من الحمض النووى DNA. أُضيفت هذه القطع المصبوغة إلى نظام الهجرة الكهربية في الجل وعلى جهاز معرفة تسلسل الحمض النووي(310) Abi ABI Prism. مكّن هذا النظام من تحليل ثلاث بادئات ملونة مجتمعة، إضافة إلى تحديد حجم قياسى معلّم باللون الأحمر.

لتحليل الترابط بين الواسمات المختلفة يمكن استخدام أنظمة تحليلية مختلفة مثل نظام المسح الجينىV.Z.O Gene scan analysis software، ونظام رسم الخرط Map marker (V.3.O) . ففى حالة الارتباط يجب أن يكون معدل الارتباط (LOD score)يساوي 3 على أقل تقدير وان تكون

distance) تساوي30 > سنتمورقانcM في نظام وحدات كوسامبى Kosambi units. تم استخدام نفس هذه المعايير لتحليل QTL في الطماطم، كما تم استخدامها أيضا بصورة كبيرة في تحليل الترابط بين الجينات المختلفة في الإنسان، وذلك لتحديد المسافات بين مواقع التوريث المختلفة لرسم هذه الجينات على الخرطة الوراثية للإنسان.

تعريفات :

معدل الارتباط LOD score : يعرف بأنه لوغريثم (Log_{10}) النسبة الشاذة Odd ratio ، حيث يوضح مدى امكانية الواسم للتعرف على وجود مواقع التوريث الكمي (Andrew *et al.*، 1988).

النسبة الشاذة Odd ratio : هي نسبة حدوث الأثر الجيني نتيجة لوجود تأثير ترابط QTL الى حدوث الأثر الجيني بدون وجود هذا الترابط ، حيث يمكن حساب التأثير الكلي الظاهري الناتج عن مواقع التوريث الكمي على أي موقع جيني، والذي يؤثر على صفة ما في الجينوم.

تتضمن الطريقة القديمة لرسم مواقع التوريث الكمي QTLs حساب الارتباط الخطي القياسى Standard linear regression والذي يحسب تأثير مواقع التوريث الكمى الموجودة عند المواقع الجينية للواسمات فقط، كما يقلل من تأثير المواقع الجينية الأخري. يتناقص احتمال وجود الخرط البينية Interval mapping لصالح الإرتباط الخطي Linear regression لتوزيع الجينات في الحالات الخاصة التي تقع فيها مواقع التوريث الكمى على مواقع الواسمات الجزيئية لهذه الجينات.

أمكن رسم خرط ترابط جينى باستخدام واسمات RFLP والتي جعلت من السهولة تحديد المواقع الجينية الخاصة بتوريث الصفات الكمية حيث يُمكن عن طريقها اختبار كل مواقع الجينوم ومن ثم حساب التباين الكلي بصورة دقيقة وتحديد المواقع الجينية المختلفة.

تختلف الخواص الكمية عن الخواص النوعية في أن الفرد الناتج عن تهجين سابق لا يمكن تصنيفه في مجموعة تباين ظاهري محددة. حيث تتميز الخواص الكمية بتباين غير محدد يجعل من الصعوبة إستخدام القوانين المندلية المباشرة لدراسة توريث هذه الصفات. إلا أنه قد أمكن التغلب على هذه الصعوبة عن طريق استخدام الواسمات الجزيئية.

تكمن فكرة تحديد موقع التوريث الكمى في النظر إلى علاقة الارتباط Correlation بين قيمة الصفة الكمية والطراز الوراثي للأفراد الناتجة عنه عند كل واسم جزيئي. حيث يُمكن تعريف أثر مواقع التوريث الكمى بالأثر التجميعي (*a*) Additive effect، وهو نسبة الاختلاف في الصفة أو درجة تأثير الواسم الجزيئ على الصفة وطريقة عمله (تجميعيا Additive أو سائدا Dominant).

يتطلب التعرف على مواقع التوريث الكمي إجراء بحوث لمعرفة علاقة الارتباط بين قيمة الصفة ظاهرياً والتباين الظاهري في المواقع الجينية باستخدام الواسمات الجزيئية . بحيث تتحد كلٌ من النواحي الوصفية والوظيفية معاً لتحديد وتقييم الجينات تحت الاختبار Candidate genes.

ركزت معظم الدراسات الخاصة بمواقع التوريث الكمي في الطماطم في الماضي على الصفات الإنتاجية إلا أن بعض هذه الدراسات التى اجريت بواسطة العلماء Paterson *et al*. فى العام 1988قد إختصت بدراسة الصفات المرتبطة بالجوانب الفسيولوجية، مثل دراسة الرقم الهيدروجينى pH ودراسة كمية الكربوهيدريتات. كما قام بعض العلماء بدارسة بعض الصفات الكيميوحيوية Biochemical traits مثل نشاط الإنزيمات، وهي صفات مرتبطة مباشرة بالتعبير الجيني أكثر منها بدراسة الصفات . يعتمد النشاط الإنزيمي على عاملين هما النشاط الخاص بالبروتين وكمية الإنزيم ، كما تعتمد كمية البروتين على تعبير الجين المحدد الذى يتحكم فى انتاجه بينما يعتمد النشاط الإنزيمي على خواص البروتين إضافة لعوامل تحكم أخرى. تمت دراسة بعض المواقع الجينية المسئولة

عن توريث بعض صفات الإنتاجية والجودة في الطماطم وكانت النتائج كالآتي :

- توجد العوامل التي تتحكم في وزن الثمار على ستة كروموزومات مختلفة هي 1.4.6.7.9.11 .
- توجد العوامل التي تتحكم في تركيز المواد الصلبة الذائبة على أربعة كروموزومات مختلفة هي 3.4.6.7 .
- توجد العوامل التي تتحكم في الرقم الهيدروجيني للثمرة pH في خمسة كروموزومات هي 3.6.7.8.10 .

وقد وجد أن مواقع التوريث الكمى الخاصة بوزن الثمرة، المواد الصلبة والرقم الهيدروجيني تؤثر بنسبة 58% ، 44% ، و 48% على التباين الكلي في التهجين الرجعي الأول، بينما تؤثر البيئة بنسبة 11% ، 9%، 13%، على التوالي.

تعتمد عملية تحديد مواقع التوريث الكمي على عدة عوامل واجب توفرها أولاً، تشمل:

1. وجود عشائر نباتية منعزلة لرسم خرط عشائرية تظهرالاختلافات الوراثية للصفة تحت الدراسة.
2. إنشاء مجموعات ترابط وراثية genetic linkage groups بهذه العشيرة، عن طريق تحليل نسب إعادة التجميع recombination ratios ومعدلات التباين الجيني بين الواسمات الجزيئية الكمية.
3. مقدرة رصد وقياس الصفة تحت الدراسة لكل الأفراد في العشيرة.

يعتمد تحديد مواقع التوريث الكمي على تحليل الاختلاف بين الواسمات للتعبير عن الصفة تحت الدراسة حيث إن لكل واسم جزيئ متوسطات للتعبير الظاهري عن الصفة، تتم مقارنتها مع التركيب الوراثي للمجموعات المختلفة. حيث إن الاختلاف المعنوي يعني أن الواسم مرتبط مع مواقع التوريث الكمى و يتميز بوجود انعزالات لهذه المواقع، كما أن له تأثير على الصفة المعنية ، نستخدم في هذه الطريقة الواسمات الجزيئية مثل RFLP و RAPD و AFLP والميكروستلايت.

الجدول 1.3. يوضح بيانات عن نباتات فى عشيرة إستخدم فيها نظام تحليل الاختلاف المباشر One –way ANOVA لتحديد الواسمات المرتبطة مع مواقع التوريث الكمي في الجيل الثاني الناتج عن تهجين أباء مختلفين في الصفة المرادة باستخدام واسمين متباينين مظهرياً من حيث الصفة، حيث أظهر الأول اختلافا ظاهريا فى الصفة.

الجدول 1.3. مثال لتحديد الواسمات المرتبطة مع مواقع التوريث الكمى في الجيل الثاني بإستخدام واسمين متباينين مظهرياً من حيث الصفة.

نوع الواسم Marker	الطراز الوراثي Genotype	القيمة المتوسطة Mean value	قيمة F F Value
الواسم 1	BB	عالية	اختلاف معنوي
	Bb	متوسطة	
	bb	ضعيفة	
الواسم 2	CC	متوسطة	إختلاف غير معنوي
	Cc	متوسطة	
	cc	متوسطة	

طرق رسم مواقع التوريث الكمى QTL:

يمكن استخدام واسمات أحادية منعزلة للبحث عن مواقع التوريث الكمى المرتبطة بها والوصول لخرطة جينية مستقرة تمكن من فحص الجينوم بأكمله لوجود هذه المواقع ذات التأثير المعنوي. هنالك برامج كمبيوتر مجهزة لتقدير معدل إعادة التركيب Recombination rates (r) بين المواقع الجينية للواسمات المختلفة Marker loci على الخرطة الجينية. أهم هذه البرامج وأكثرها استخداماً في علم الوراثة في النبات هو برنامج MAP MAKER وبرنامج Join MAP. يمكن لهذه البرامج إنتاج خريطة تركيبية Composite map لهجين أو أكثر لجمع واسمات مشتركة في اثنين أو أكثر من العشائر. اتضح في معظم أنواع الجينيوم، أن وجود حوالى 100 – 150موقع جيني لواسم

جزيئي تعتبر كافية لتغطية كل الجينوم. في الخرط الجينية التي بها أي نقطة على الجينوم مرتبطة وراثياً لواسم واحد على الأقل؛ حيث يكون هنالك عدد من الارتباطات يساوي عدد الكروموزومات. مثال، ففي نبات *Arabidopsis* وبأخذ طول جيني كلي Genetic length يساوي 360 *cM* ينتج عنه كثافة واسمات تساوي 5 *cM* تقريباً ، أما في القمح فإن 3500 *cM* ينتج عن هذا العدد كثافة واسمات تساوي تقريبا 25-30 *cM*. عموماً ،في تحديد مواقع التوريث الكمي فإن زيادة عدد الواسمات المستخدمة لا يعني بالضرورة زيادة قوة الإختبار أو دقته . فقد أوضح العلماء Darvasi *et al* (1993) أنه عند الوصول إلى كثافة 20 *cM* فإن زيادة عدد الأفراد في الجيل يعتبر أفضل من زيادة عدد الواسمات المستخدمة.

هنالك طريقتان لتحديد مواقع التوريث الكمي، وهي:

أ. طريقة تحليل إختلاف واسم الى واسم Marker by marker ANOVA.

ب. طريقة الواسمات المتعددة Multiple marker method .

أ. طريقة تحليل اختلاف واسم إلى واسم Marker by marker ANOVA:

تستخدم هذه الطريقة لاختبار معنوية الاختلافات في المتوسطات الظاهرية الكلية Phenotypic means الناتجة عن التركيبات الوراثية المختلفة Genotypic classes،عند موقع واسم جيني محدد.

مثال: إذا كان الأباء I ،II للجيل المعني تحمل التركيبات الوراثية AI ،AIIAII AI، على التوالي، عند موقع جيني محدد فإن التركيبات الوراثية الناتجة عنها في الاجيال اللاحقة تكون على النحو التالي:

- عند الجيل الثاني: AIIAII ،AIAII ، AIAI

- عند الخطوط الوراثية المنحدرة عن طريق التحدر من بذرة واحدة في برامج التربية (Recombinant inbred lines) والتى تعرف اختصاراً بـRILs أو عن طريق العشائر احادية الصبغيات المدبلة الثابتة وراثيا Homozygous doubled haploids DH: فان التركيبات الوراثية الناتجة هي: $A_{II}A_{II}$ ، A_IA_I

- عند التهجين الرجعي الاول: AIAI و. AIIAI

تعني معنوية قيمة F أن هنالك على الأقل موقعاً جينياً واحداً يعمل على التعبير عن الصفة في موقع توريث كمي مرتبط مع الواسم. يمكن حساب القيمة الكلية لمواقع التوريث الكمى QTL في عشيرة F_2 مكونة من ثمانية نباتات وعدد واسم واحد بجينين على كروموزوم واحد بإعتباره محددا بالفرق بين المجموعات الثابتة وراثياً، ولكن يجب ملاحظة إن ذلك يقلل من التأثير الحقيقي في حالة حدوث إعادة تهجين Recombination بين موقع الواسم الجيني وموقع التوريث الكمي. الطريقة الأخرى للحساب هو حساب الجزء من الاختلاف الذي يحدثه موقع التوريث الكمي في الجيل المحدد (R^2 تمثل نسبة تجميع مربعات تأثير الواسم الى تجميع المربعات الكلية).

$$R^2 = \frac{\text{مجموع مربعات تأثير الواسم}}{\text{مجموع المربعات الكلية}}$$

تمثل R^2 نسبة تجميع مربعات تأثير الواسم إلى تجميع المربعات الكلية.

هنالك مشكلة عند إستخدام هذه الطريقة تتمثل في صعوبة التمييز بين أثر أحد مواقع التوريث الكمي قوي التأثير والذي يقع بعيداً عن الواسم وبين موقع التاثير الكمي ضعيف التأثير والذي يقع على القرب من الواسم. يمكن حل هذه المشكلة بإحدي هذه الطرق:

أ. إما بإضافة واسمات أخرى إضافية للمنطقة المطلوبة .

ب. أو عن طريق إستخدام طريقة الواسمات المتعددة Multiple marker method: وتنقسم هذه الطريقة الى:

i. رسم الخرط المتبادلة Interval mapping :

التي توضح موقع التوريث الكمّي المتوقع. يظهر نظام برمجيات الكمبيوتر رسومات بيانية توضح كلاً من معدل الاختلاف LOD Score والتبادل الجينى على كل الكروموزوم وبذلك يمكن مشاهدة موقع التوريث الكمي بوضوح.

ii. تحليل ارتباط موقع التوريث الكمي بالواسم (QTL-Marker regression).

تبين هذه الطريقة درجة اعتماد التعبير الكلي الظاهرى على التركيب الوراثي بالنسبة للواسمات المختلفة. هنالك طرق أخرى، منها على سبيل المثال طريقة رسم الخرط التبادلية المعقدة (Composite interval mapping).

مثال، استخدم العالم Edwards وآخرون فى العام 1987 عشائر كبيرة من نباتات الجيل الثانى من الذرة الشامي لتحديد مواقع التوريث الكمى المرتبطة بعدد كبير من الصفات الكمية. وقد أوضحت الدراسة أن هنالك ارتباطات معنوية بين الطراز الوراثي للموقع الجيني الواسم (marker-locus genotype) والتعبير الكمي للصفة، مما يعني أن مواقع هذه الواسمات مرتبطة مع مواقع التوريث الكمي التى تؤثر على التعبير عن هذه الصفات. كما تم تقييم نوع وحجم الأثر الجيني المشفر له بواسطة هذه المواقع. تم الحصول على نباتات الجيل الثاني من الهجين CO159 x TX303 و الهجين T232 x CM 37، حيث تم استخدام عدد 1776 و 1930 نبات فى كل من الهجينين على التوالي.

كما تم اختيار الاباء على اساس الحصول على أكبر عدد من مواقع الواسمات المنعزلة لإنزيمات الأيسوزايم isozymes، إضافة إلى الإنعزال للصفات الانتاجية و المورفولوجية في عشائر الجيل الثاني. أثبتت عشائر الجيل الثاني من هذه الهجن انعزالات في 15 و 18 أيسوزيم ، على التوالى، مع وجود موقعين منعزلين لصفات مورفولوجية. تتوزع هذه الايسوزيمات و مواقع الواسمات المورفولوجية على تسع كروموزومات من أصل العدد الكلي لكروموزومات الذرة الشامي البالغ عددها 10 كروموزومات . تقع هذه الواسمات على الكروموزومات

على مسافة متوسطة بينها تساوي 20 cM فى 40-45% من الجينوم. خلصت هذه الدراسة إلى تحديد عدد 17 موقع واسم جزيئي على ثمانية كروموزومات باستخدام الجيل الثانى من الهجين CO159 x TX 303 و 20 موقع واسم على 8 كروموزومات باستخدام الجيل الثاني الهجين CM37 x T232 .

الباب الرابع

توصيف الجينوم

Genome characterization

الباب الرابع

توصيف الجينوم

Genome characterization

يمكن أن يتم تقديم وصف تفصيلي لأى قطعة جينومية من الكائنات الدنيا prokaryotes أو الكائنات العليا Eukaryotes وتداولها دون اعتبار لمقدرتها التشفيرية، يتم ذلك عن طريق رسم خرط جينية و فيزيائية للجينات المختلفة المحمولة على الجينوم، وتحليل تسلسل الحمض النووي لمعرفة النيكليوتيدات المكونة له وترتيبها.

اولا: تسلسل الحمض النووي :DNA sequencing

تعتبر تقنية التعرف على تسلسل الحمض النووي DNA الطريقة المباشرة لدراسة التباين الظاهري في الحمض النووي DNA، حيث تعطي معلومات دقيقة عن تسلسل النيكليوتيدات عند مواقع معينة. كما تعتبر الطريقة الأكثر استخداماً في دراسة درجة التقارب الوراثي بين الأفراد Phylogenetic relationship، وذلك عندما يكون الهدف موقعاً محدداً على الجينوم مثال لذلك الجين *rbc L* في الكلورويلاست. هذه التقنية غالية ومكلفة وتتضمن استخدام النظائر الفسفورية المشعة في حال تحديد القطع، ولكنها تعطى نتائج ذات مقدرة معرفية عالية ودقيقة. مما يميز هذه التقنية هو استخدام تقنية تفاعل البولمريز، والتي تعمل على إكثار القطع ومعرفة تسلسلها أوتوماتيكياً. سهل استخدام تقنية التصبيغ الضوئي للنيكليوتيدات من الحصول على معلومات روتينية عن تسلسل الحمض النووي.

الطريقة التقليدية لتحديد تسلسل الحمض النووى :Conrentinal DNA sequencing

من مميزاتها:

- التوقيف الإختياري لصناعة الحمض النووي DNA .
- تتضمن أربع تفاعلات .
- تفصل القطع بواسطة تقنية التحريف عن طريق الهجرة الكهربية PAGE Denaturing.

- يتم مشاهدة القطع عن طريق التهجين بالنظائر المشعة Auto radiography.

تسمي هذه الطريقة أيضاً بطريقة سانجر Sanger method، باسم العالم الذي اكتشفها أو طريقة نهاية التسلسل Chain termination method. تتضمن هذه الطريقة إكثار الحمض النووي DNA لإنتاج قطع مختلفة الأطوال، ثم فصل هذه القطع عن طريق الهجرة الكهربية ومن ثم استنتاج ترتيب نيوكليوتيدات الحمض النووي DNA من نتائج هذا الأنموذج، تعتمد هذه التقنية على نتائج استخدام نيكليوتيدات الديديوكس ثلاثية الفسفور(Dideoxynucleotide triphosphates (didNTP في صنع الحمض النووي DNA، حيث يدخل في تحديد نهاية السلسلة النامية Growing chain . ففي تفاعل البوليمير السلسلي في وجود did ATP بالإضافة لوجود نيكليوتيدات الديديوكس الأربع ($dNTP_S$) يتم إنتاج مجموعة من قطع الحمض النووى مختلفة الأطوال،تنتهي كل قطعة منها بـ did ATP عند النهاية 3-. ولذلك عندما تتم عملية الفصل مع وجود نيوكليوتيدات الديديوكسى الاربع didNTP في أربع أنابيب منفصلة مع استخدام نفس الشريط والبادئ؛ يتم الحصول على قطع مختلفة من الحمض النووي في كل انبوب، تنتهى بنهاية نيوكليوتيدات الديديوكسى . يمكن فصل هذه القطع بواسطة التحريف Denaturing عن طريق الهجرة الكهربية باستخدام جل البولي اكرامايد أو جل الأقاروز. تتم مشاهدة القطع بعد ذلك عن طريق تقنية الرسم الإشعاعي الذاتي وذلك باستخدام نيكليوتيدات معلمة إشعاعياً، حيث يُكوّن الإشعاع بقعاً سوداء توضح مواقع النيكوليوتيدات المؤشرة. وكما ذكر سابقا تستخدم فى هذه الطريقة النظائر المشعة مثل P^{32}، P^{36}، وS^{35} التى تُضمن فى النيكليوتيدات المختلفة. ثم يتم تحضير فيلم لصورة الجل وقراءة التسلسل بعد ذلك من الأسفل للأعلى (انظر الرسم أدناه).

يقرأ تسلسل الحمض النووي من أسفل إلى أعلى في داخل صورة الجل، إذاً فإن التسلسل هنا هو TCATCGACTG

الطريقة الاوتوماتيكية:

وهي تقنية مباشرة لتحديد تسلسل الحمض النووي، وذلك بعد إضافة كل محتويات التفاعل في أنبوب واحد دون الحاجة لإضافة نيوكليوتيدات الديديوكسى did NTPs المختلفة كل على حده في أربعة أنابيب مختلفة. يستخدم فى هذه الطريقة صبغة ضوئية لصبغ النيوكليوتيدات بديلا للنظائر المشعة المستخدمة في الطريقة التقليدية. حيث تعتبر الأشعة الضوئية غير مضرة بالبيئة ولايتطلب استخدامها الكثير من الحذر، كما لايتطلب التخلص منها الجهد المطلوب في حال استخدام النظائر المشعة. يتم استخدام الليزر في هذه الطريقة، وذلك لتهيئة الصبغة الضوئية بدلاً من استخدام اشعة X. ثم يتم بعد ذلك تجميع الاشعة الضوئية على جهاز Charge coupled device والذي له المقدرة على تحديد طول الموجة. تم تصميم جهاز لتحديد تسلسل الحمض النووي له المقدرة على

تمييز طول الموجات التى تحدثها النيوكليوتيدات المختلفة، مثل الجهاز المنتج بواسطة شركة Perkin-Elmer Applied Biosystems (الشكل 4.1). سهل ذلك الحصول على تسلسل الحمض النووي مباشرة باستخدام ممر واحد فى الجل، بدلاً من استخدام أربعة ممرات للنيوكليوتيدات المختلفة كما في الطريقة الأولى.

الخرط الجينية:

يتم توصيف الجينوم عن طريق رسم الخرط الجينية حيث ان هنالك هدفان للرسم الجيني هما:

1. تحديد الترتيب الخطي الذى تنتظم فيه الوحدات الجينية (النيوكليوتيدات) على الحمض النووي DNA.
2. تحديد المسافة النسبية relative distance بين هذه الوحدات، والتى تسمى بالمسافة الجينية genetic distance. تحدد وحدة المسافة الجينية التى لها المقدرة على تحديد أثر تزاوج محدد بين جينين باحتمال حدوث تصالب بين هذين الجينين؛ لذا فإن وحدة المسافة على الخريطة (والتى تسمى بالسنتمورقان) و التى يرمز لها بالرمز cM تكافئ إحتمالية نسبة حدوث 1% تصالب crossing-over بين أشرطة الحمض النووي المتجاورة.

تختلف معدلات وجود التصالب في القطع المختلفة على الكروموزوم، ولكن يتوقع وجودها بين أي موقعين جينين، لذا فإن البعد الفيزيائي الحقيقي بين الجينات المرتبطة ببعضها ليس له علاقة بالمسافة على الخريطة التى حُسبت على اساس نسبة وجود التصالب، على الرغم من وجود نفس الترتيب الخطي لهذه الجينات. ساعدت الدراسات في مجال تحديد التصالب بين الجينات المختلفة و تحديد معدلات إعادة التركيب recombination rates فى رسم خرط التصالب linkage maps للأنواع المختلفة. كما ساعد التراكم الكمي لهذه المعلومات على بناء خرط جينية ثابتة لكل نوع من الكائنات الحية. تعمل الخرط

الجينية على تسهيل دراسة تركيب الجينوم وتطويره، وتحديد الصفات النوعية التي يتحكم فيها عدد بسيط من الجينات أو المكونات المندلية لتوريث للصفات الكمية. تعمل الواسمات الجزيئية على البحث عن الجينات في الكروموزومات المختلفة. ومن ثم في كل الجينوم. ففي مختلف الأنواع النباتية، فإن وجود 100 إلى 150 موقع واسم جزيئي يمكنها أن تؤدي الي توزيع منتظم على الجينوم وهي الخرطة الجينية التي بها كل موقع جينى على الجينوم مرتبطاً لواسم واحد على الأقل. لذا فإن عدد مجموعات الترابط linkage groups يساوي عدد الكروموزومات في هذه الحالة.

ففى نبات arabidopsis الذي يساوي طوله الجيني 360 *cM*، فإن زيادة عدد الواسمات الجينية ليس ذا أهمية في زيادة فعالية الاختبار. وبزيادة كثافة الواسمات إلى 20 cM فإن زيادة عدد الأفراد يعد أهم من زيادة عدد الواسمات المستخدمة.

مثال آخر: تم تقييم 228 من واسمات RAPD و الميكروستلايت وAFLP لتحديد درجة الإرتباط الجيني بين بعض الصفات فى محصول الشمام، استخدام الصنف MR-1 المقاوم لمرض الذبول الفيوزيرى والبياض الدقيقى، والصنف أناناس وهو صنف تجارى شديد الحساسية للإصابة بالمرضين لرسم خرطه جينية تفصيلية . إحتوت العشائر التي استخدمت في الرسم الجيني على 66 فرداً في التهجين الرجعي الأول من الهجين بين الصنفين. وُجد أن واسمات AFLP أكثر فعالية في رسم الخراطة مقارنة مع واسمات RAPD وواسمات الميكروستلايت. كما احتوت الخراطة على 197 من واسماتAFLP و6 من واسمات RAPD وواحد فقط من واسمات الميكروستلايت ترمز لعدد 14 مجموعة ارتباط رئيسية وست مجموعات ارتباط ثانوية. غطت هذه الواسمات مسافة 1942 *cM* مع بعد متوسط بين الواسمات المتقاربة يساوى 10 *cM* تقريباً، وبلغت أعلى مسافة بين الواسمات 27.5 *cM*. استخدمت هذه الخرطة لتحديد واسمات جزيئية مرتبطة مع جينات المقاومة للأمراض لتستخدم كواسمات مساعدة فى الانتخاب

Markers assisted selection في برامج التربية المختلفة. تستخدم الخرط الجينية التي تتميز بكثافة نسبية عالية للواسمات الجزيئية لعدة إغراض منها على سبيل المثال لا الحصر:

1. تستخدم لتحديد موقع جيني محدد، أو لتوسيم tagging جين معين لتسهيل عملية الانتخاب في برامج التربية.
2. تسهيل عملية نقل الجينات عن طريق استخدام الخرط الجينية.
3. تستخدم أيضا لتسهيل الفهم البيولوجي للصفات و الظواهر المختلفة.
4. تم تحديد 90 موقعاً جينياً على الخرطة الجينية للشمام حتى العام 1994. عمل العالم الفرنسى بترات Pitrat فى العام 1991 على تحليل 28 واسماً ظاهرياً في عشيرة الجيل الثاني للهجين PI124112 xvédrantais، وقد وجد أن 23 واسماً منها يقع فى ثماني مجموعات ترابط. مّكن استخدام الواسمات المعتمدة على الحمض النووي DNA على تسهيل عملية الرسم الجيني، حيث أمكن عن طريقها تحديد خريطة إستراتيجية للشمام باستخدام واسمين RAPD وRFLP، والتي نتج عن طريقها تحديد 77 واسم DNA فى الاثنتي عشرة مجموعة ترابط التي يتميز بها الشمام مع وجود 2-12 واسماً في كل مجموعة. الجدول 5.1 يوضح توزيع الواسمات المختلفة على مجموعات الترابط المختلفة فى الشمام (*Cucumis melo L*)

الجدول 4.1: توزيع الواسمات الجزيئية على مجموعة الترابط المختلفة في الشمام.

عدد الواسمات غير المرسومة	عدد الواسمات المرسومة	المسافة المتوسطة (*cM*)	طول الواسم (*cM*)	رقم الواسم	مجموعة التصالب
3	4	13.2	317.0	28	I
4	5	12.9	207.0	21	II
0	2	11.0	175.5	17	III
0	0	7.8	164.2	22	IV
1	4	15.1	150.8	12	V

1	2	10.6	138.5	15	VI
0	0	9.1	127.6	15	VII
1	0	13.8	111.0	10	VIII
0	3	10.5	115.6	12	IX
0	2	12.3	86.5	8	X
0	3	8.5	59.3	8	XI
1	0	8.6	51.4	8	XII
0	0	10.6	63.7	7	XIII
0	0	10.4	41.5	5	XIV
0	3	NA	132.7	16	Others
11	28	11.0	1942.0	204	المجموع

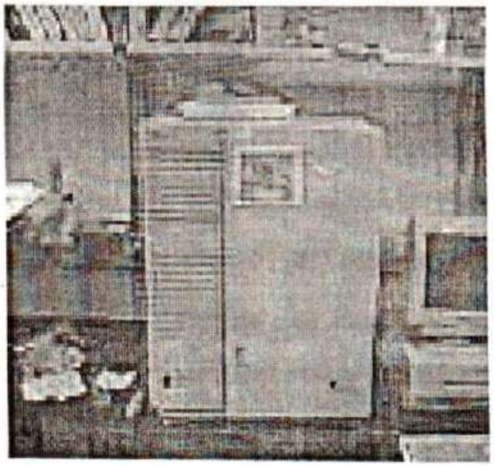
❖ اعتمدت هذه التقديرات على قيمة احتمالية $\rho = 0.05$.

الجدول 4.2: يوضح عدد الواسمات ذات التباين الظاهري التي استخدمت في الرسم الجيني، و التي تم تحديدها باستخدام مجموعة من البادئات مكوّنة من اثنين أو ثلاث من النيكليوتيدات .

متوسط عدد الحزم المتباينة	متوسط العدد الكلي للحزم	العدد الكلي لأزواج البادئات	عدد أزواج البادئات
99	2059	32	3/3
33	341	6	3/2
89	1277	18	2/3
22	3677	57	المجموع

❖ متوسط عدد الواسمات التي رسمت في الحالة +3/+3 او (EcoRI+3/Mse+3) هو 3.1 ، مقارنة بـ 5.5 بالنسبة الى+2/+3 او 4.9 بالنسبة لأزواج البادئات .+3/+2

يرجع السبب فى عدم ظهور بعض الواسمات على الخرطة الجينية لعدم إكثارها بالصورة المطلوبة، أو لأنها باهتة لدرجة لايمكن احصاؤها.



الشكل 5.1 : جهاز تحديد تسلسل الحمض النووي DNA من شركة بيركن إلمير .(Perkin Elmer)

بنية الخرطة:

من جملة الواسمات التى تم تحليلها (228 واسم) هنالك عدد 204 واسم تم وضعها فى 20 مجموعة ترابط باستخدام أقل قيمة LOD تساوى 4 (والذى يوازى مستوى دقة crosponding confidence تساوى 99.5%). منها 188 دليل وزعت على 14 مجموعة رئيسية و 16 منها رسمت على ستة مجموعات فرعية. تتزاوج المجموعات الرئيسية فى طول جيني يتراوح بين 317 *cM* الى 41.5 *cM* ويحمل كل منها 5 – 28 واسم بمتوسط قدره 13 واسم فى كل. بينما تحتوى المجموعات الستة الفرعية على 16 واسم بمتوسط مسافة جينية يتراوح بين cM19 الى 38.8 *cM* . هنالك 24 واسم كلها من AFLP لم تظهر ترابطا لأى مجموعة.

الباب الخامس

ميكانيكية إعادة تركيب الحمض النووي DNA والاستراتيجيات المختلفة لمقاومة الأمراض الفيروسية

الباب الخامس

ميكانيكية إعادة تركيب الحمض النووي DNA والاستراتيجيات المختلفة لمقاومة الأمراض الفيروسية

يحدث التباين الوراثي بين الأفراد في عشيرة محددة إما عن طريق التكاثر الجنسي بين الأفراد المتباينة وراثيا للصفات، أوعن طريق التصالب، أوالتضاعف الكرموزومى، أو عن طريق التطفير الجيني التجريبي والتطفير الجزيئي. نهدف في هذا الباب لإعطاء نبذة تعريفية بسيطة عن الأشكال المختلفة التي يحدث بها التباين الوراثي بين الأفراد في عشيرة ما، تقديماً للأبواب اللاحقة التي تختص باستحداث المقاومة للفيروسات بإتباع أسس الأحياء الجزيئية.

أولا: ميكانيكية إعادة التركيب الكروموزومي Recombination mechanism:

أدت المعلومات المتزايدة في تجارب الوراثة الكلاسيكية في الفطريات، ودراسة الوسائط لإعادة التركيب الكروموزومي في داخل الخلايا، وكذلك الإنزيمات المنتجة بواسطة الجينات الداخلة في عملية التركيب في بكتيريا القولون *E. coli* إلى الخروج بأنموذج ثابت لميكانيكية إعادة التركيب الكروموزومي. أحد هذه النماذج هو ما يسمى بوسيط إعادة التركيب الكروموزومي بواسطة العالم هوليدي في العام 1964م. حيث يكون أنموذج إعادة التجميع مقبولا فقط إذا أمكن استخدامه في دراسة إعادة التجميع في الكائنات العليا. استوفي موديل هوليدي هذا الشرط وهو الظرف الذي يُحمل فيه كروموزومين متجمعين مع بعضهما عند موقع محدد عبر ارتباط التصالب المتكون بواسطة تبادل اثنين من الأشرطة الأربع المكونةً لجزيئين من الحمض النووي DNA. كما دلت الدراسات اللاحقة وجود ميكانيكية التفاعلات الكيميائية، ودخول بعض الإنزيمات في هذه العملية.

يستخدم موديل هوليدي للكائنات الدقيقة نظرية وسيط إعادة التركيب الكروموزومى، حيث يصطف اثنان من الكرموزومات المزدوجة، ثم يتم فصل

الأشرطة الموجبة أو السالبة لتفتح عند موقع محدد. ثم بعد ذلك ترتبط النهايات المفتوحة في الشريطين مع بعضها تاركة الرابطة الهيدروجينية التي تربطها مع الأشرطة المكملة لها لترتبط مع الشريط المكمل المماثل في الشريط المزدوج الآخر في عملية تسمي بتبادل الأشرطة.

يبدأ رابط فيزيائي مؤقت بين جزيئي الحمض النووي في الشريطين. يستقر هذا الرابط فيما بعد عبر عملية تسمي صيانة الحمض النووي (DNA repair) بتكوين روابط فسفورية إسهاميه Phosphodiester bonds بواسطة إنزيم يسمي إنزيم الربط لايقيز Ligase. يمكن حدوث تبادل مستمر بين تسلسلي البولي بيبتيد الداخلة في عملية التصالب و المرتبطة بحركة الأذرع الأربعة حول المحور، مما يجعل منطقة الارتباط سهلة الحركة يميناً أو يساراً. تؤدي ديناميكية تركيب هوليدي Holliday structure لنشوء مواقع أثناء عملية إعادة التركيب الكروموزومى، مما يؤدي إلى تكوين مواقع تتميز بتباين وراثي على الشريط المزدوج.

خلُصت الدراسات الخاصة بمعدل حدوث التصالب إلى أن هذا المعدل عالٍ لخلق مواقع تتميز بتكوين هجين DNA تحت ظروف فسيولوجية محددة. يعتبر هذا الموديل مناسباً جداً لتحليل معدلات إعادة التركيب الكروموزومي في الكائنات الراقية. ففي دراسة الفطريات التي تحدث فيها أربعة تكوينات من عملية إعادة التركيب الكروموزومي عند حدوث انقسام فتيلي واحد، أعتمد نموزج هوليدي على الدراسات التي تمت في الكائنات العليا، ولكنه وجد الدعم البيوكيميائي من الدراسات التي أجريت على الجزيئات الصغيرة من الحمض النووي DNA في أنظمة الكائنات الدنيا، وتحديداً تلك التجارب التي تضمنت عزل نتائج إعادة التركيب المتكونة تحت تأثير نظام إعادة التركيب في بكتريا القولون.

ثانيا: الاستراتيجيات المختلفة لمقاومة الأمراض الفيروسية:

بلغ الفاقد في قلة المحاصيل الزراعية بسبب الأمراض النباتية لعام 1981م مايقرب من 540 مليون طن، وهو ما يعادل 50 بليون دولار أمريكي وقد وقعت هذه الخسائر بالرغم من استخدام المبيدات الكيميائية في مكافحة العديد من الأمراض، وبتكلفة بلغت بليون دولار امريكي. كما يمكن أن يحدث فقدان كلى للمحصول في بعض السنوات وفى محاصيل معينة كما حدث بسبب اللفحة المتأخرة في البطاطا عام 1845م، وصدأ القهوة الذي أدى إلى تلف الإنتاج عام 1880م في سري لانكا، ومرض لفحة الأوراق في الذرة الصفراء عام 1972 م. لاتستخدم المبيدات الكيميائية في مكافحة بعض الأمراض النباتية لكونها إما غير اقتصادية أو غير فاعلة. لذا سنتناول في هذا الباب تعريفات مبسطة للسبل المختلفة لمكافحة الأمراض الفيروسية، مثل الطرق الخاصة بتربية النبات التقليدية والتهجين الجسمي، بالتركيز على التطفير التجريبي لأهميته ولعلاقته بالطرق الجزيئية لمقاومة الأمراض الفيروسية، و التي سنتطرق لها في الباب القادم بمشيئة الله.

1. الطريقة التقليدية لتربية النبات Conventional plant breeding:

تهدف تربية النبات لتطوير نوعية و كمية الإنتاج، إضافة إلى إنتاج أصناف مقاومة للأمراض ومتأقلمة مع البيئة. تتميز تربية النباتات لمقاومة الأمراض، بأن المقاومة المستحدثة بها اختيارية selective ولاتحدث تأثيرا ضاراً بالبيئة. تعد التكلفة الأولية لتربية النباتات لمقاومة الأمراض كبيرة، ولكنها اقتصادية إذا كان هنالك ثبات للمقاومة لفترة طويلة.

تلعب الموارد الوراثية النباتية plant genetic resources دوراً مهماً في توفير مصادر التنوع النباتي المستخدمة في برامج التربية المختلفة، حيث تعمل جميع دول العالم على تأسيس بنوك لحفظ هذه الموارد. يعد المورد الأساسي للموارد الوراثية هو مواطن النشأة centers of origin ومناطق التنوع centers of diversification للسلالات المختلفة. ففي حالة استخدام الطرق التقليدية

لتربية النبات هنالك العديد من الخطوات الواجب إتباعها، والتي تشمل:

1. تجميع السلالات البرية الواعدة .
2. غربلتها للمقاومة screening for resistance .
3. تحديد مصدر المقاومة .
4. دراسة توريث المقاومة.
5. تحديد طرق التربية المناسبة، ومن ثم تصميم برامج تربية لإنتاج أصناف مقاومة.

إضافة إلى طرق التربية التقليدية، هنالك طرق أخرى لاستنباط أصناف مقاومة للأمراض مثل التهجين الجسمي، إحداث الطفرات وتحوير النباتات باستخدام الهندسة الوراثية.

2. تقنية التطعيم Cross protection:

تكمن صعوبة تخفيض الأثر الاقتصادي للإصابة بالأمراض الفيروسية في الأسباب الآتية:

1. جهازية الإصابة، وعدم المقدرة على الشفاء من الإصابة الفيروسية بالحقل.
2. عدم وجود أصناف تجارية مقاومة أصلاً لهذه الأمراض وتتمتع بجودة عالية.
3. تنوع الفيروسات وناقلاتها الطبيعية.

تعتبر طريقة التطعيم (CP) Cross protection ضمن الطرق التي طبقت لمكافحة الأمراض الفيروسية، تكمن أهمية هذه الطريقة في استغلالها للفيروسات نفسها للتقليل من أثر الإصابة الفيروسية. تم اكتشاف هذه الطريقة بواسطة العالم McKinney في العام (1929). عندما لاحظ في نباتات التبغ المصابة بمرض تبرقش التبغ الفيروسي TMV، أن النباتات التي تمت معاملتها بسلالات ضعيفة من هذا المرض والتي أعطت أعراض تبرقش واصفرار

في الأوراق في الحقل، مقاومة للإصابة بالفيروس المعني. طبقت هذه الطريقة في جميع الفيروسات إلا ان بعض الفيروسات قد اظهرت عدم استجابة من بينها فيروسات الجيميني. تم استخدام هذه الطريقة بصورة كبيرة لدراسة العلاقة بين سلالات الفيروس الواحد بالإضافة لاستخدامها في إيجاد مقاومة للأمراض الفيروسية بالحقل.

هذه الطريقة ليست محصورة الاستخدام في الفيروسات، فقد أثبتت جدواها أيضا في الفيرويدات Viriods و الستلايتات الفيروسية Plant virus satellites.

تسمى سلالة الفيروس المستخدم لإيجاد المقاومة بالسلالة الواقية Protecting strain. بينما تسمى السلالة المراد مقاومتها بالسلالة المعدية Challenging strain. يمكن العدوى بالسلالة المعدية الأصلية ميكانيكياً، أو بواسطة التعقيل، أو عن طريق استخدام الناقل الطبيعي، وذلك يعد العدوى بالسلالة المستخدمة لإحداث المقاومة. كما اتضح من خلال التجارب أن الفيروس الأصل يمكن أن يتكاثر في داخل هذه النباتات ولكنه يفشل في إحداث الأعراض الأصلية للإصابة.

السلالة الضعيفة Mild strain:

عبارة عن سلالة من المرض تحدث أعراض خفيفة، ولكنها لا تؤثر على الإنتاج التجاري للمحصول، تسمى أيضاً بالسلالة الضعيفة Mild strain. أو السلالة الهزيلة Attenuated strain أو السلالة تحت مستوى العدائية Hypo-virulent strain. أو السلالة غير المعدية A virulent strain.

تم استخدام هذه الطريقة لمكافحة الإصابة بالأمراض الفيروسية في نباتات الخضر والفاكهة.

يفترض أن تتوفر في السلالة الضعيفة المستخدمة لإحداث المقاومة الصفات التالية:

1. يجب أن تحدث أعراض إصابة أقل مقارنة بالإصابة بالفيروس الطبيعي، وأن لا تؤثر على الإنتاج التجاري في المحصول ولا على جودته، كما يجب أن تحدث إصابة طفيفة في كل العوائل الأخرى للفيروس .
2. يجب أن تكون ذات إصابة جهازيه كاملة، وأن تهاجم كل أنسجة العائل. وذلك "لأن الاستخدام الفاعل لهذه الطريقة يتطلب أن تصيب السلالة الضعيفة كل الأنسجة النباتية.
3. يجب أن تكون السلالة الضعيفة مستقرة حتى لا تتحول لسلالات خطيرة يمكن أن تحدث مشاكل على مر الزمن.
4. يجب أن لا تكون سهلة الانتقال بواسطة الناقل الطبيعي ، وذلك لضمان عدم انتشارها ونقلها للمحاصيل الحقلية الأخرى.
5. يجب أن تكون ذات مقدرة عالية لتوفير المكافحة للسلالات المختلفة من الفيروس الأصل.
6. سهولة إنتاج المصل وسهولة اختبار درجة النقاء، وأن يكون المصل سهل التخزين والتبادل بواسطة المزارعين، كما يجب أن تكون الطريقة المستخدمة في العدوى بسيطة وغير معقدة، وأن لا تحتاج إلى معدات غالية الثمن أو تدريب خاص.

طريقة انتخاب السلالة الضعيفة :

هنالك طرق عديدة للحصول على السلالة الضعيفة. الجدول 5.1 يوضح بعض الفيروسات التي تمت مكافحتها عن طريق استخدام الغلاف البروتيني

الجدول 5.1 : استخدام تقنية التطعيم في أنواع نباتية مختلفة لمكافحة الأمراض الفيروسية.

المجموعة الفيروسية و الفيروس	مصدر السلالة الضعيفة	المحصول على مستوى الاختبار (E) أو على مستوى الإنتاج التجاري (C)
Badnavirus - *Coca swollen shoot virus*	عزل حقلي	الكوكا(E)
Closterovirus - *Citrus tristeza virus*	عزل حقلي	الموالح (C)
Nepovirus - *Arabis mosaic virus*	عزل حقلي	العنب (E)
Potyvirus		الباباي (C)
- *Papaya ring spot virus*	التطفير	الخيار (C)،
- *Zucchini yellow mosaic virus*	اختلافات داخل البيوت المحمية	الكوسة (C)،
- *Soybean mosaic virus*	المعاملة بالبرودة	فول الصويا (E)
Tobamovirus - *Tomato mosaic virus*	التطفير، أو المعاملة الحرارية، أو العزل الحقلي	الطماطم (C)

يمكن انتحاب سلالات ضعيفة في الحقل من نباتات أظهرت أعراض طفيفة مقارنة بالنباتات الأخرى من نفس الصنف، والتي أظهرت أعراض إصابة عالية. ثم يتم عزل هذه السلالة الضعيفة واستزراعها. يمكن عزل سلالات ضعيفة في المعمل من نباتات مصابة إصابة عالية ، من أنسجة أو مواقع ذات إصابة طفيفة بالنبات، أو من أفرع طرفية تظهر إصابة طفيفة بالمرض. كما يمكن الحصول على السلالات الضعيفة عن طريق المعاملة بالحرارة أو البرودة. يمكن الحصول على السلالات الضعيفة أيضا من خلال العزل من مواقع ذات إصابة طفيفة، وذلك بعد إحداث الطفرة. في هذه المرحلة يجب التأكد من أن السلالة المعزولة

غير ملوثة بالسلالة الأصلية أو أي فيروس آخر. يتم تنقية السلالة الضعيفة عن طريق إحداث عدوى متكررة، وذلك للتأكد من نقاء السلالة الضعيفة وبالتالي ضمان صحة هذه الطريقة.

تتضمن الإجراءات الاحترازية التي تستخدم في هذا الإطار اختبارات سيرولوجية واختبارات الميكروسكوب الإلكتروني. بعد عزل السلالة الضعيفة هنالك خطوات مختلفة واجبة الإتباع للتأكد من فاعلية هذه السلالة في التطبيق المعملي، وتشمل:

أولاً: هنالك اختبارات أولية يجب أن تتم على مستوى المعمل أو على مستوى بيئات مغلقة، لتقييم أثر الإصابة بالسلالة الضعيفة على إظهار أعراض المرض في المعمل، وعلى مستوى الإنتاج التجاري، كما يجب إجراء هذا الاختبار على السلالات المختلفة من الفيروس في مواقع جغرافية عديدة باستخدام الطرق المختلفة لإحداث العدوى إما طبيعياً، عن طريق الناقل، أو عن طريق الحقن اليدوي.

ثانياً: يجب إجراء اختبارات على مستوى الحقل في المواقع التي تحدث فيها إصابة طبيعية بالسلالات القوية من الفيروس.

ثالثاً: إتباع الإجراءات المحلية للوقاية من الإصابة الفيروسية.

رابعاً: يجب إجراء اختبار في مساحة واسعة لتحديد فعالية هذه التقنية وجدواها الاقتصادية.

يمكن أن تحدث آثار سالبة بالنبات عند استخدام هذه التقنية – مثل الحساسية عند الاصابة بفيروسات ليس لها علاقة بالفيروس الأصل، وقابلية الفيروس على انتاج سلالات يمكن أن تحدث إصابة أكثر حدة من سلالة الفيروس الأصل.

إنتاج السلالة الضعيفة والتطبيق العملي:

يجب إكثار هذه السلالة تحت ظروف محكمة، وذلك لمنع المخاطر التي قد

تحدث من جراء التلوث بالفيروسات غير المرغوب فيها والبكتريا والفطريات. تشمل هذه الظروف استخدام بذور مسجلة وتربة ومعدات معقمة ومعاملة البيوت الخضراء ضد الحشرات. كما يجب إجراء اختبارات سيرولوجية عشوائية للتأكد من عدم تلوث هذه السلالة الضعيفة. كما يجب أن تقوم بإكثار هذه السلالة جهات رسمية أو تجارية مختصة، مثل محطات البحوث، الجامعات والشركات التجارية. كما يجب تزويد المزارعين بطريقة سهلة وفعالة للعدوى بالسلالة الضعيفة.

هنالك طرق عديدة تم اختبارها للعدوى مثل العدوى الميكانيكية عن طريق استخدام فرشة الشعر. تتطلب هذه الطرق عمالة ووقت، كما يمكن أن تنقل بعض الأمراض الأخرى مع السلالة المستخدمة. أثبت التعقيل فاعلية ممتازة في العدوى بالسلالة الضعيفة في النباتات الخشبية. كما أن هنالك طرقاً بديلة أخرى يمكن استخدامها مثل الرش عن طريق البندقية التي تعمل عن طريق الضغط الهوائي.

ميكانيكية المقاومة:

على الرغم من استخدام هذه التقنية عملياً في العديد من المحاصيل وفي دراسة العلاقة بين النبات العائل والفيروس، ولكن هنالك معرفة ضئيلة بالميكانيكية التي تعمل بها هذه التقنية؛ إلا أن هنالك نظرية تنص على وجود مستقبلات في السلالة الضعيفة تمنع الإصابة بالفيروس الأصل، كما أن هنالك نظرية أخري تنص على صناعة مثبطات للفيروسات ذات العلاقة عند استخدام هذه التقنية، كما أن هنالك فرضيتان تم اقتراحهما حديثاً، هما:

الأولى: يتأثر الحمض النووي للسلالة الأصل بالغلاف البروتيني للسلالة الضعيفة، مما يمنع عملية الترجمة والإكثار في الحمض النووي RNA في السلالة الأصل.

الثانية: حدوث عملية تهجين بين شريطيين RNA (+) و(-) في كل من السلالة الضعيفة والسلالة الأصل، تمنع تكاثر وترجمة السلالة الأصلية.

إضافة إلى ذلك يتوقع وجود ميكانيكيات مختلفة في العلاقة بين الفيروسات والعوائل المختلفة.

المخاطر المحتملة:

على خلاف طرق الحماية الأخرى، فإن تقنية التطعيم لها محددات عديدة، كما يمكن حدوث مخاطر عند استخدامها. تتمثل هذه المحددات والمخاطر في الآتي:

1. يمكن حدوث وقاية غير مكتملة. هنالك تقارير حول تدهور الوقاية الناتجة بهذه الطريقة خصوصاً في النباتات التي وصلت الشيخوخة.
2. يمكن أن تنتقل السلالة الضعيفة لعوائل أخرى وتحدث فيها أضراراً كبيرة.
3. يمكن أن تنتشر أعراض الحساسية الناتجة عن طريق التفاعل مع الفيروسات الأخرى بسرعة في كل المحصول المراد حمايته بطريقة التطعيم .
4. يمكن أن تهيئ الإصابة بفيروس آخر الظروف لنقل الفيروس الأصل، وذلك عن طريق تأثيرها على خواصه أو فعاليته في إحداث الإصابة، وذلك بحدوث تكامل جيني بين السلالة الضعيفة وجينات الفيروسات الأخرى.
6. يمكن حدوث طفرة في السلالة الضعيفة مما يتسبب في مرض مدمر للمحصول.

على الرغم من كل هذه الصعوبات إلا أن هذه الطريقة قد تم تطبيقها على عدد كبير من الفيروسات في المحاصيل المختلفة، نتيجة لهذه الصعوبات تطبق هذه الطريقة في حال عدم وجود طرق أخري للوقاية وفي الفيروسات التي تعتبر مهددات رئيسية للإنتاج.

3. التهجين الجسمي Somatic hybridization:

يتم بواسطة دمج البروتبلاست، وهى طريقة مهمة لإنتاج هجن بين نباتات قريبة وراثيا، أو غير قريبة وراثيا عن طريق تلامس الأغشيه البلازميه للبروتبلاست مع بعضها في وجود المحفزات المناسبة، مثل بولي إيثيلين جلايكول PEG، كما يمكن دمجها أيضا ميكانيكيا أو باستخدام التيار الكهربي.

4. التطفير التجريبي:

يعد التطفير التجريبي من الوسائل المهمة المكملة للطرق التقليدية في مجال تربية النبات، حيث يهدف للحصول على أكبر نسبة من التباين الوراثي لإعطاء فرصة أكبر لانتخاب أفضل الصفات الزراعية المهمة. تشير الإحصاءات الصادرة من الوكالة الذرية في فيّنا إلى أن عدد الأصناف الزراعية التي جرى تحسينها بالتطفير التجريبي قد تعدي 1550 صنفاً حتى نهاية العام 1991م، تمتاز هذه الأصناف بصفاتها الكمية والنوعية المرغوبة.

عرف العالم الهولندي ديفرايس 1901 م الطفرة بأنها عبارة عن تغيير فجائي ومتوارث في الكائن الحي ، وما زالت أسس هذه النظرية قائمة إلى الآن، والتي يمكن إيجازها فيما يلي:

i. تظهر الطفرة فجأة دون مقدمات.

ii. يمكن تمييز الحالات الجديدة في النباتات المطفرة.

iii. الطفرات هي تغييرات نوعية بخلاف التغييرات غير الوراثية.

iv. تحدث الطفرات باتجاهات مختلفة قد تكون مفيدة وقد تكون ضارة.

v. يعتمد عزل الطفرة على حجم العشيرة المختبرة.

vi. يمكن أن تظهر الطفرة ذاتها أكثر من مرة.

تحدث الطفرات الوراثية عادة نتيجة تغيير في ترتيب قواعد الحمض النووي، مما يجعلها تختلف عن الأساس الذي كانت عليه. كما وجد أن الإشعاع وبعض المطفرات الكيميائية، مثل أثيل ميثان سلفونيت (EMS)، ومثيل سلفيت الثنائ (dMS)، و أثيل سلفيت الثنائ (dES)، وأثيلين أمين (EA)، والكولستين وازايد الصوديوم (NaN_3)، والخرول، والجليسيرول، والأمينوبيورين، وحامض النتروز، وغيرها ذات تأثير كبير على زيادة معدل حدوث هذه الطفرات، وعليه فمن الضروري التعرف على الإشعاعات وأنواعها وتأثيراتها الوراثية والبيولوجية على النبات. توجد أربعة عوامل ضرورية تؤخذ في الاعتبار لمعرفة تأثيرات الإشعاع

i. مصدر وطبيعة الإشعاع: يعتمد ذلك على درجة اختراق الأشعة، وكثافة التأين الذي تحدثه، وعلى الخواص الفيزيائية للأشعة المؤينة، كطول الموجة والدقائق المختلفة وسرعتها وشحنتها.

ii. ظروف التعرض: تتوقف درجة التلف البيولوجي الناتج عن التعرض للإشعاع على ظروف البيئية المحيطة كوجود الأكسجين وثاني أكسيد الكربون ودرجة الحرارة وغيرها، حيث إن التأثيرات البيولوجية ونسبة ظهور الطفرات تقل بانخفاض نسبة الأكسجين.

iii. طبيعة المادة المعرضة للإشعاع: حيث تتباين الكائنات الحية تبايناً واضحاً في مدى تحملها للإشعاع، وكذلك تختلف حساسية خلايا النسيج الواحد للإشعاع باختلاف أنواع الخلايا.

iv. التغيير المطلوب قياسه: يعتمد على نوع التغيير سواءاً كان ذلك مباشراً أم غير مباشر.

تحدث الطفرات الجينية عندما يحدث تغيير في تعاقب نيوكليوتيدات الحمض النووي DNA المكون للجين، نتيجة لإحلال أو استبدال أو حذف لزوج أو أكثر من القواعد النيتروجينية، تسمي مثل هذه الطفرات بالطفرة الجينية أو النقطية Point mutation، ويمكن أن يحدث الارتداد Reversion في هذا النوع من الطفرات فتعود الطفرة الى حالتها الأصلية أو يتم تبديل زوج قاعدي واحد بزوج آخر فتسمى الطفرة النقطية عندئذ بالطفرة التعويضيةBase pair substitution. أما الطفرة التي تحدث نتيجة لإضافة أو حذف أعداد قليلة من أزواج القواعد فتسمى بطفرة الإزاحة Frame shift mutation، حيث يتم استبدال القطع بالانتقال أو التحول. يتحقق الانتقال من خلال إحلال نيوكليوتيدات بيورين محل نيوكليوتيدات بيورين أخرى أو نيوكليوتيدات بيرمدين محل نيوكليوتيدات بيرمدين أخرى، أما التحول فيمكن أن يتم بواسطة إحلال البورين بالبيرمدين أو العكس.

... كما يلي:

أ. التأثيرات الوظيفية.

ب. حدوث الطفرات.

ج. التأثيرات الكروموزومية: عن طريق توليد تغيرات جديدة في تركيب الكرموزومات بأي من الأساليب التالية :

i. **الانتقال** Translocation: يحدث الانتقال عندما يتكسر كرموزومان مختلفان، ثم يحدث بعدها تبادل في القطع الكروموزومية المحطمة. ويتم التكسير والتبادل في القطع الكروموزومية بتأثير الإشعاع أو عوامل أخرى، كما يمكن أن يحدث تلقائياً. يمكن أن يحدث الانتقال أيضاً في الكرموزوم نفسه وذلك بعد أن تنكسر قطعة من ذراع كرموزوم معين، ثم تلتحم بوضعية معاكسة. يسمي هذا النوع من الانتقالات بالانتقال الداخلي Intra-chromosomal translocations، أما إذا حدث الانتقال بين أكثر من كرموزوم فيطلق عليه الانتقال بين الكرموزومات Inter-chromosomal translocations.

ii. **الانقلاب** Inversion: تحدث الانقلابات عندما تنكسر قطعة وسيطة من كرموزوم معين، ثم يعاد التحامها بشكل معكوس. ويمكن تمييز الانقلابات خلال مرحلة اقتران الكرموزومات، حيث يكوّن الكرموزوم الذي حدث فيه الانقلاب حلقة مع الكرموزوم المماثل لتحقيق الاقتران.

iii. **التضاعف** Duplication: ويقصد بالتضاعف الحالة التي يزداد فيها عدد جينات معينة في الكرموزوم نفسه. يمكن أن يحدث التضاعف من خلال انتقال قطعة كرموزومية بين كرموزومات متماثلة أو غير متماثلة على السواء.

iv. **الاقتضابات** Deficiencies: وتحدث عند كسر جزء من ذراع كرموزوم، فإذا لم يحتوى الجزء المقتضب الجسم المركزي، فإنه سوف يسلك سلوكا طبيعيا في تلك المرحلة من الانقسام الخلوي. ويكون الاقتضاب إما طرفيا أو بينيا، وقد يؤدى فقدان احد القطع المكسورة نتيجة الاقتضاب إلى موت الكائن الحي، أو قد لايؤدي إلى ذلك حسب أهمية الجينات المحمولة على تلك القطعة و يمكن أن يتم تمييز الاقتضابات بالفحص المجهري للخلايا.

تحدث التغيرات في عدد الكرموزومات بإحدى طريقتين:

أ. تغيرات تحدث عند إضافة أعداد كرموزومية غير مكتملة العدد الأصل وتسمى في هذه الحالة بالتعدد المجموعي غير المكتمل Aneuploidy.

ب. تغيرات تحدث عند مضاعفة العدد الأساسي للكرموزومات في النبات . Euploidy

يهدف مربو النبات من خلال استخدام طريقة التطفير التجريبي إلى الحصول على أكبر نسبة من التباين الوراثي لإعطاء الفرصة لانتخاب أفضل الصفات المهمة للأصناف الزراعية. يمكن أن يكون الانتخاب موجها أو غير موجه.

تم تقسيم استخدامات الطفرات في المحاصيل التي تتكاثر بالبذور إلى ثلاث مجموعات كبيرة وهي:

أ. استعمال الطفرات الجينية أو الموضعية في:

- الأنواع ذاتية التلقيح حيث تستخدم في النواحي التالية :

i. تربية الطفرات، و الاستعمال المباشر لها.

ii. التربية بالتهجين مع الطفرات

iii. جمع أو اتحاد الطفرات من السلالة أو الصنف نفسه.

iV. تهجين الطفرات مع أصناف وأنواع أخرى.

v. استخدام الطفرات في العشائر الهجينية population hybrids بوصفها مصدرا إضافيا للتباين الوراثي.

- الأنواع غير ذاتية التلقيح.

- تربية الأصناف الهجينية (تربية قوة الهجين لأنواع ذاتية التلقيح).

ب. استعمال الطفرات الكروموزومية:

i. استعمال حالات الانتقال في نقل الصفات بين الأنواع و الأجناس.

ج. استعمال عوامل التطفير كوسيلة لأغراض أخرى منها:

i. إنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموزومية.

ii. زيادة نقصان العبور الكرموزومي.

iii. استحداث نشاط جنسي مؤقت في نباتات عذرية التكاثر.

iV. التغلب على ظاهرة عدم التوافق في التهجين المتباعد بين الافراد البعيدين وراثياً.

بعض النجاحات المتحققة في تحسين مقاومة النباتات للملوحة والجفاف باستخدام الإشعاع:

i. استخدام التطفير لاستحداث تغيرات وراثية مقاومة للملوحة فى نبات الأرز وقد اتضح أن 29%من نباتات الجيل الأول مقاومة للملوحة، وقد استخدمت في هذه التجارب منظومة الزراعة المائية.

ii. برنامج تربية متكامل في أصول الحمضيات، يهدف للحصول على تراكيب وراثية مقاومة للملوحة، وذات صفات زراعية مرغوبة.

iii. برنامج لتربية و تحسين نبات الحنطة لمقاومة الملوحة.

iV. مقاومة الشعير لملوحة التربة.

V. استحداث طفرات مقاومة للجفاف، وذات صفات زراعية جيدة باستخدام الإشعاع في كل من الصين، الجزائر، و فنلندا.

استحداث المقاومة للأمراض باستخدام الأشعاع:

ينظر لها من خلال توريث جينات في النبات المراد تحسين مقاومته، وتوريث جينات في المسبب المرضى Pathogen، مع الأخذ بعين الاعتبار بمفهوم نظرية الجينات المتناظرة (gene for gene concept) التي تشير إلى أن كل جين يسيطر على المقاومة في النبات العائل، يقابله جين يسيطر على القدرة المرضية في المسبب المرضي. يكون التفاعل الذي يحمى النبات من المرض في حالات عديدة على هيئة صفات مورثة في النبات العائل، وقد تم تأكيد ذلك مباشرة بعد اكتشاف قوانين مندل، ومعرفة إمكانية حصول التغير الوراثي في كل من النبات

والمسبب المرضى، والتفاعل بين جينات كل منهما، والذي يؤدي إلى التكامل أو التوافق بين جينات كلا الكائنين لخلق نظام يسمح للتفاعل المحدد بالظهور. بلغ عدد الأصناف المستنبطة عن طريق الإشعاع لمقاومة الأمراض أكثر من 1500 صنف في منتصف العام 1991م، وان 20% من هذه الأصناف مقاومة لمسببات الأمراض المختلفة، وتزرع في مساحات واسعة. فعلى سبيل المثال بلغت المساحة المزروعة بأصناف مستنبطة باستخدام الإشعاع في كل من الحنطة، الأرز، القطن، فول الصويا، والذرة الصفراء في العام 1985 م في الصين وحدها 9 مليون هكتار، وقدرت الأرباح المتحققة نتيجة إدخال هذه الأصناف في التطبيق بأكثر من بليون دولار سنويا، تتميز هذه الأصناف بمقاومتها العالية للإصابة بالمسببات المرضية التي يصعب مكافحتها بالمبيدات الكيميائية.

تحقق أول نجاح في تطفير النباتات لمقاومة المسببات المرضية عند عزل طفرة مقاومة لثلاث سلالات من الفطر المسبب لمرض البياض الدقيقي في الشعير. وقد أثبتت الدراسات اللاحقة أن هذه الطفرة كانت أُحادية الجين monogenic و متنحية recessive. يمكن أن يرافق صفة المقاومة المستحدثة تحسين أو فقدان لصفات أخرى. لذا غالبا مايستخدم التطفير لمقاومة الأمراض في النوع النباتي الذي لا يوجد مصدر المقاومة في أصله البري، كما هو الحال في مرض التبرقع السبتوري في الحنطة.

معدل التطفير: يقصد به نسبة النباتات الطافرة ضمن أفراد العشيرة النامية من أصول معاملة بإحدى المطفرات الفيزيائية أو الكيميائية في أجيال سابقة. يمكن أن تكون الإصول على هيئة بذور أو درنات أو أبصال أو براعم أو عقل أو حبوب لقاح. تتوقف معدلات التطفير على نوع وتركيز وطريقة استعمال المطفر. يعد النماء الوراثي للمادة الأولية من أهم المستلزمات الأساسية لمربي الطفرات المقاومة للمسببات المرضية. يمكن أيضا استخدام التطفير لمقاومة المسببات المرضية التي تورث عن طريق السيتوبلازم. من الأفاق المستقبلية لاستخدام

المطفرات في تحسين مقاومة المحاصيل الزراعية للمسببات المرضية زيادة تركيز السموم النباتية التي تعيق تطور المسببات المرضية في النبات المضيف.

خطوات تربية الطفرات المقاومة للأمراض النباتية:

توجد ثلاث مراحل أساسية في تربية الطفرات المقاومة للأمراض هي:

i. استحداث التغيرات الوراثية في المحاصيل الزراعية.

ii. انتخاب التراكيب الوراثية المقاومة في ظروف التلويث الاصطناعي.

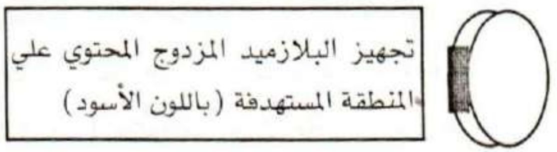
iii. مقارنة الطفرات المقاومة مع أصولها، من حيث الصفات الكمية و النوعية في ظروف تجريبية و بيئية مختلفة.

5. **التطفير الموجه المعملي** Quick Change™ mutagenesis :

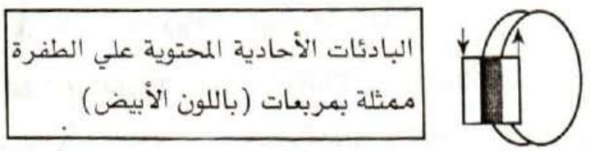
تعتبر تقنية التطفير الموجه المعملي In-vitro site directed mutagenesis مهمة لدراسة علاقة البنية والوظيفة للبروتينات المختلفة، ولتحديد المواقع الجينية المختلفة في داخل جزيئ الحمض النووي، كما تعمل على تحديد التعبير الجيني. تتميز هذه التقنية عن التقنيات الأخرى في أنها تعمل على أشرطة الحمض النووي المزدوجة dsDNA بخلاف التقنيات الأخرى التي تعمل على أشرطة فردية للحمض النووي ssDNA، كما تتميز بسهولتها، وبعدم حاجتها لناقل محدد أو مواقع مقيدة محددة أو طريقة تحوير محددة، لذا توصف بأنها سَريعة حيث تتم في أربع خطوات رئيسية تعمل مباشرة لإنتاج الطفرة بكفاءة أكثر من 80% عادة ما يستخدم في هذه التقنية حمض نووي ناقل مستخلص بدقة ومنقاء عن طريق استخدام كلوريد السيزيوم. يمكن استخدام هذه التقنية لعمل طفرة نقطية أو للتحكم في الأحماض النووية أو حذف أو إضافة حمض أميني واحد أو أكثر. يستخدم في هذه التقنية إنزيم البوليمريز pfu DNA polymerase الذي يعمل على إكثار أشرطة البلاسميد بدون حذف النيكليوتيدات الأحادية لبادئ الطفرة. تتضمن هذه الطريقة، استخدام ناقل مزدوج dsDNA يحتوى على القطعة أو المنطقة المستهدفة target site، واثنان من البادئات الأحادية

المحتوية على الطفرة المطلوبة، حيث تشمل الخطوات الموضحة في المخطط أدناه.

الخطوة الأولى: تجهيز البلاسميد المزدوج الذي يحتوى على القطعة المستهدفة.



الخطوة الثانية: تهيئة أشرطة البلاسميد وربط البادئات الأحادية التي تحتوى على الطفرة المطلوبة.



الخطوة الثالثة: استخدام إنزيم البوليمريز لعمل أشرطة حمض نووي تحتوي على البادئات المطفرة. الأسهم في المخطط أعلاه تشير إلى اتجاه بناء أشرطة الحمض النووي المكملة للأشرطة الأصل.

الخطوة الرابعة: هضم أشرطة الحمض النووي للبلاسميد غير المطفرة باستخدام إنزيم Dpn1 endonuclease.

الخطوة الخامسة: إدخال الشريط الدائري المزدوج إلى داخل الخلايا الزرقاء XL1 blue super-competent cells، ثم تتم صيانة مواقع الانتقال في البلاسميد المطفر.

تعتبر البادئات المستخدمة مكملة لبعضها في الأشرطة المتقابلة للناقل. تمتد هذه البادئات في دورات الحرارة عن طريق إنزيم البوليمريز pfu DNA polymerase. تتكون الطفرات عند تضمين هذه البادئات في الحمض النووي الناشئ. يستخدم إنزيم Dpn1 endonuclease لهضم الأشرطة الأصلية، ولانتخاب الأشرطة الناشئة المحتوية على الطفرة. لمعرفة فعالية صنع الطفرات بهذه الطريقة تم استخدام البلاسميد pWhitescriptTM control plasmid يحتوى هذا البلاسميد على كودون موقف (TAA)، الموازي للحمض

الأميني التاسع في البروتين في البلاسميد pBluescriptRIISK(-)، عند موقع ظهور كودون القلوتامين (CAA) في الجين β-galactosidase. تظهر خلايا البكتيريا المحورة الزرقاء عن طريق البلاسميد pWhitescriptTM بيضاء على سطح الأقار LB-ampicilllin-methicillin agar plates المحتوى على IPTG و x-gal، وذلك لأن نشاط الإنزيم B-galactosidase، قد تم إجباره على إظهار هذه الصفة الظاهرية، حيث تعمل البادئات المتحكمة الأحادية على تكوين طفرة نقطية تعمل على تحويل النيوكليوتيد T في الكودون الموقف TAA في الجين المختص بإنتاج الإنزيم المشفر على الشريط pWhitescript الى النيوكليوتيد C لإنتاج كودون القلوتامين CAA. و بمتابعة التحوير يمكن غربلة المستعمرات المختلفة لصفة اللون الأزرق الخاصة بالإنزيم β-galactosidase

الجدول 5.2: يوضح المواد المستخدمة في عملية التطفير الموجه وكمياتها.

الكمية	المواد المستخدمة
30 reactions	Pfu DNA polymerase (2.5 U/µl)
1 ml	10 x reaction buffer
300 U	Dpn1 restriction enzyme (10U/ µl)
	Oligonucleotide control primer (34-mer (100ng/ µl))
750 ng	5/ CCA TGA TTA CGC CAA GCG CGC AAT TAA CCC TCA C3/
	Oligonucleotide control primer (34-mer (100ng/ µl))
750 ng	5/GTG AGG GTT AAT TGC GCG CTT GGC GTA ATC ATG G3/
50 ng	pWhitescriptTM 5.7kb control plasmid (5ng/ µl)
8.0 µl	10mM dNTP mixC(2.5 mM of each nucleotide triphosphate (dNTP))
8x 200 µl	Epicurian Coli XL1-Blue supercompetent cells
10 µl	PUC18 control plasmid (0.1ng/ µl in TE buffer)

مواد إضافية مطلوبة:

1.FalconR 2059 polypropylene tubes (15 ml).
2.5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl-β-D-galactopyranoside (x-gal).
3.Isopropyl-1-Thio-β-D-galactopyranoside (IPTG).

تصميم البادئات Primers design :

تعمل البادئات على إدخال طفرات اختبارية محددة. يجب تصميم البادئات الأحادية المطفرة المستخدمة في هذا البروتوكول على حسب نوع الطفرة المطلوبة. هنالك نقاط يجب وضعها في الاعتبار عند تصميم موقع التطفير واختيار البادئات المناسبة:

i. يجب أن يحتوي زوج البادئات المطفرة على الطفرة المطلوبة، وأن تكون لها المقدرة على الالتصاق لنفس التسلسل فى الأشرطة المتعاكسة في البلاسميد.

ii. يجب أن يتراوح طول البادئ بين 25 – 45 نيوكليوتيد، وأن تكون درجة حرارة ذوبان البلاسميد زائدة بعشر درجات مئوية بالتقريب فوق درجة حرارة التمديد (extension temperature). تستخدم المعادلة التالية لحساب درجة حرارة الذوبان Tm للبادئات:

$$Tm = 81.5 + 16.6 (\log 10 (Na^{+})) + 0.41 (\%G + C) - 675/N - (\%) (mis\text{-}match)$$

حيث إن N هي طول البادئ مأخوذا بعدد أزواج القواعد المكونة له.

iii. يجب أن تكون الطفرة المطلوبة (حذف أو إضافة) وسط البادئ على بعد 10 – 15 قواعد تقريبا من كلا الطرفين.

iv. يجب أن يحتوى البادئ على 40 % من تركيبه على النيوكليوتيدين GC كحد أدنى وأن ينتهي في واحد أو أكثر من أطرافه بقاعدة C أو G.

v. يجب أن ينقى البادئ، وذلك عن طريق تقنية الكروماتغرافى Fast polynucleotide liquid chromatography، أو عن طريق الهجرة الكهربية في جل البولى أكرلامايد. حيث تقل فعالية التطفير في حالة عدم تنقية البادئات.

vi. يجب إضافة كمية كبيرة من البادئات في التفاعل.

البروتوكول و إجراء التفاعل:

يتم وفقا للخطوات التالية:

تصميم البادئات Primers design :

تعمل البادئات على إدخال طفرات اختبارية محددة. يجب تصميم البادئات الأحادية المطفرة المستخدمة في هذا البروتوكول على حسب نوع الطفرة المطلوبة. هنالك نقاط يجب وضعها في الاعتبار عند تصميم موقع التطفير واختيار البادئات المناسبة:

i. يجب أن يحتوي زوج البادئات المطفرة على الطفرة المطلوبة، وأن تكون لها المقدرة على الالتصاق لنفس التسلسل فى الأشرطة المتعاكسة في البلاسميد.

ii. يجب أن يتراوح طول البادئ بين 25 – 45 نيوكليوتيد، وأن تكون درجة حرارة ذوبان البلاسميد زائدة بعشر درجات مئوية بالتقريب فوق درجة حرارة التمديد (extension temperature). تستخدم المعادلة التالية لحساب درجة حرارة الذوبان Tm للبادئات:

$$Tm = 81.5 + 16.6 (\log 10 (Na^{+})) + 0.41 (\%G + C) - 675/N - (\%) (mis\text{-}match)$$

حيث إن N هي طول البادئ مأخوذا بعدد أزواج القواعد المكونة له.

iii. يجب أن تكون الطفرة المطلوبة (حذف أو إضافة) وسط البادئ على بعد 10 – 15 قواعد تقريبا من كلا الطرفين.

iv. يجب أن يحتوى البادئ على 40 % من تركيبه على النيوكليوتيدين GC كحد أدنى وأن ينتهي في واحد أو أكثر من أطرافه بقاعدة C أو G.

v. يجب أن ينقى البادئ، وذلك عن طريق تقنية الكروماتغرافى Fast polynucleotide liquid chromatography، أو عن طريق الهجرة الكهربية في جل البولى أكرلامايد. حيث تقل فعالية التطفير في حالة عدم تنقية البادئات.

vi. يجب إضافة كمية كبيره من البادئات في التفاعل.

البروتوكول و إجراء التفاعل:

يتم وفقا للخطوات التالية:

i. تصنيع البادئات الأحادية المكملة لبعضها، التي تحتوي على الطفرة المطلوبة

محمولة على تسلسل نيوكليوتيدي غير محور. يتم تنقية هذه البادئات قبل استخدامها على حسب ما ذكر سابقا.

ii. يجهز التفاعل المحكم the control reaction من المكونات الآتية :

5 µl of 10x reaction buffer

2 µl (10 ng . 0.003 nM) of pWhitescriptTM 5.7 kb control plasmid (5ng/ µl).

1.25 µl (125 ng. 22 nM) of oligonucleotide control primer1 (34-mer(100ng/ µl).

1.25 µl (125 ng. 22 nM) of oligonucleotide control primer2 (34-mer(100ng/ µl).

1 µl of 10mM dNTP mix (2.5mM each dNTP).

Double distilled water ddH2O to afinal volume of 50 µl.

ثم أضف:

1 µl of pfu DNA polymerase (205U/ µl).

iii . يجهز تفاعل العينة sample reaction من الآتي :

5 µl of 10x reaction buffer.

X µl (5-50 ng) of dsDNA template.

X µl (125 ng) of oligonucleotide primer1.

X µl (125 ng) of oligonucleotide primer2.

1 µl of 10mM dNTP mix (2.5 mM each dNTP).

Dd H_2O to a final volume of 50 µl.

ثم أضف انزيم البوليمريز

iv. أضف 30 µl زيت معدني لكل تفاعل على السطح.

الجدول :5.3 يوضح الدورات الداخلة في عملية التطفير الموجه المعملي:

القطعة	عدد الدورات	درجة الحرارة ◦ م	الزمن (ثانية)
1	1	95	30
2	18 - 12	95	30
		55	60
		68	kb/120 second of plasmid length

دورات التفاعل:

i. دورة كل تفاعل على حسب ما ذكر في الجدول أعلاه. بالنسبة لتفاعل التحكم نستخدم زمن تمديد 12 دقيقة، لعمل 12 دورة.

ii.يتم ضبط القطعة الثانية في الجدول أعلاه على حسب نوع الطفرة المطلوبة.

الجدول 5.4 الذي يوضح نوع الطفرة المطلوبة وعدد دورات التفاعل.

نوع الطفرة المطلوبة	عدد الدورات
طفرة نقطية	12
تغيير حمض أميني واحد	16
إضافة أو حذف عدد كبير من الأحماض الأمينية	18

iii . بعد إكتمال دورات الحرارة، ضع التفاعل على ثلج لمدة دقيقتين لتخفيض درجة حرارته إلى أقل من 37 ^{0}م .

هضم المنتجات Digesting the products:

i. أضف 1 µl من محلول الانزيم المقيد *Dpn1* restriction enzyme مباشرة لكل تفاعل إكثار تحت طبقة الزيت المعدني باستخدام ماصة.

ii. اخلط محلول التفاعل عن طريق الشفط لأعلى و التفريغ لعدة مرات باستخدام الماصة. حرك الخليط عن طريق الطرد المركزي لمدة دقيقة، ثم حضّن التفاعل مباشرة عند درجة حرارة 37 ^{0}م لمدة ساعة لهضم الحمض النووي الأصل غير المُطفر.

عملية التحوير في الخلايا المنافسة:

Transforming into *Epicurian coli* XL1-Blue super-competent cells

i. ضع الخلايا في انبوب على الثلج وأضف 50 µl من محلول الخلايا المنافسة لكل تفاعل تحكم و عينة مطلوب تحويره.

ii. انقل 1 µl من الحمض النووي المعامل بالإنزيم من التفاعلات المختلفة. لفصل الجزء السائل من محلول الخلايا المنافسة حضن التفاعل على ثلج لمدة 30 دقيقة. ويمكن اختبار فعالية تحوير هذه الخلايا بإضافة 1 µl من البلاسميد (0.1ng) PUC 18. إلى 50 µl من المحلول السائل للخلايا المنافسة. ثُم حضن المحلول، كما ذكر سابقا.

iii. سخنْ تفاعلات التحوير لمدة 45 ثانية عند درجة حرارة 42 ^{0}م، ثمّ ضع التفاعل على ثلج لمدة دقيقتين.

iv. قم بإضافة µlo.5 من NZY + Broth المسخن عند درجة حرارة 42 ^{0}م، ثم حضّن التفاعل لمدة ساعة مع التحريك باستخدام الطرد المركزي بسرعة 225-250 rpm .

v. ثم حول مباشرة تفاعلات التحوير للخطوات ادناه:

- اضف 250 µl من تفاعل التحوير المحكم و 5 µl فقط من تفاعل تحوير البلازميد PUC18 إلى الإقار المحتوى على المضاد الحيوي(LB-ampicillin –methicillin agar plates) ، الذي أُضيفت له من قبل 20 µl من 10% x gal (w/v) و 20 µl من محلول 100 mM IPTG.
- أضف عينة من محلول التحوير على سطح الأقار الذي يحتوي على المضاد الحيوي المُحدِد للبلاسميد الناقل المحور.

vi . حضن الأقار عند درجة حرارة 37 ^{0}م لمدة تزيد على 16 ساعة.

النتائج المتوقعة من التحوير المحكم:

يتراوح عدد المستعمرات المتوقع بين 50 إلى 800 مستعمرة، كما يتوقع أن ... 90% ... من هذه المستعمرات على الطفرة المطلوبة. تظهر

المستعمرات زرقاء على سطح الأقار المحتوى على xgal وIPTG. تُحسب فعالية التطفير (ME) Mutagenesis efficiency وفقا للمعادلة التالية:

(ME) = عدد المستعمرات الزرقاء المتكونة *(cfu)* X 100% .
العدد الكلى للمستعمرات المتكونة *(cfu)*

ملحوظة: عند استخدام البلاسميد PUC18 فإن فعالية التحوير يجب أن تكون أكثر من 250 مستعمرة ($>10^8$ cfu) مع وجود أكثر من 80 % منها تحمل الصفة الظاهرية للون الأزرق.

تجهيز المحاليل المستخدمة في التفاعلات المختلفة:

i. الأقار LB لكل لتر: أضف المحتويات الآتية :

20 جم اقار + 5 جم مستخلص خميرة + 10 جم تربتون +10جم NaCl.

- أضف ماء مقطر ليكتمل الحجم إلى واحد لتر.
- أضبط الرقم الهيدروجيني للمحلول إلى 7.0 باستخدام محلول 5N NaOH.
- حضّن المحلول، ثم صُب المحلول في أطباق بيتري (petri dishes) .

ii . الأقار LB-Ampicillin-Methicillin Agar لكل لتر:

يستخدم لتقليل تكوين المستعمرات satellite colony formation:

- أضف واحد لتر من الأقار LB.
- حضّن المحلول، ثم برده عند درجة حرارة 55^{0}م.
- أضف 20 ملجم من الأمبسلسين .(filter-sterilized ampicillin)
- أضف 80 ملجم من الميثسيلين .(filter-sterilized methicillin)
- ثم صُب المحلول في أطباق بيتري.

iii. NZY + Broth:

- 10 جم NZamine.
- 5 جم من مستخلص الخميرة yeast extract .
- 5 جم NaCl.

... المحلول، ثم أضف الاتى:

- 12.5 مل $1M\ MgCl_2$ و 12.5 مل $1M\ Mg\ SO_4$.
- 10 مل جلكوز 2M filter-sterilized glucose او 20 مل من محلول 20% glucose (w/v).

iv. المحلول المنظم (10x Reaction buffer) :

- 100 mM KCl
- 60 mM $(NH_4)_2SO_4$
- 200 mM Tris-HCl (pH=8.0).
- 20 mM $MgCl_2$
- 100 μg/ml من محلول nuclease-free bovine serum albumin (BSA).

v. المحلول المنظم TE

- 10 mM Tris-HCl
- 1 mM EDTA

الباب السادس

التحليل الجزيئي لفيروسات الجيمني Geminiviruses كأنموذج للتحليل الجزيئي للفيروسات

الباب السادس

التحليل الجزيئي لفيروسات الجيمني Geminiviruses كأنموذج للتحليل الجزيئي للفيروسات

تنتمي الفيروسات النباتية لعدد كبير من المجموعات التقسيمية ذات الجينوم الواحد أو الثنائي من DNA أو RNA. تحتوي الفيروسات النباتية عادة على 1 – 12 قطعة جينية في جينوم يحتوى على 2700 إلى 20000 نيكليوتيد. معظم الفيروسات النباتية بسيطة التركيب ولا تحتوي على غشاء خارجي أو جلايكوبروتين Glycoproteins ; عدد محدود منها ينقل بواسطة البذور، حيث يصيب الأجنة أو غشاء البذرة ليتم نقلها الى الأجيال اللاحقة، كما أن بعضها ينقل ميكانيكياً بينما ينتشر معظمها بواسطة الحشرات والفطريات والنيماتودا كناقل طبيعي لها.تصيب مجموعة فيروسات الجيميني أو مجموعة فيروسات العائلة Geminiviridae عدد كبير من المحاصيل المهمة في العالم. تنتقل هذه الفيروسات عن طريق الحشرات لعدد كبير من المحاصيل ذات الفلقة الواحدة وذات الفلقتين. تتكاثر هذه الفيروسات في داخل نواه النبات عن طريق ميكانيكية تسمي بميكانيكية وسيط الشريط المزدوج Double stranded intermediate والتي تتجمع بداخل النيكليوسومات nucleosomes.

تنقسم فيروسات هذه المجموعة الى ثلاث مجموعات فرعية اعتمادا على عدد الجينومات التي يتكون منها الفيروس، نوع الناقل الحشري ونوع العائل النباتي. تحتوي فيروسات تحت المجموعة 1 (Sub group 1)على جينوم أحادي مثل فيروس تقزم القمح Wheat dwarf virus (WDV) ، الذي ينقل عن طريق حشرة النطاط Leaf hopper. تنقل الفيروسات التى تنتمى إلى تحت المجموعة 3عن طريق الذبابة البيضاء للنباتات ذات الفلقتين وعادة ما تحتوي على جينومين منفصلين، مثال لذلك فيروس Watermelon chlorotic stunt virus (WCSV)المسبب لمرض التقزم والاصفرار في

... اكتشافه في السودان

في العام 1992، يتسبب هذا المرض في ضياع محصولي كبير في هذه المحاصيل. تعتبر حالة فيروس إصفرار وتجعد أوراق الطماطم TYLCV خاصة وذلك لاحتوائه على جينيوم واحد. تشمل تحت المجموعة 2 عدداً من الفيروسات الوسيطة التي تقع بين تحت المجموعتين 1 و 3.

تحتوي فيروسات الجيميني على عدد قليل من الجينات المتداخلة التي يتراوح عددها من 4 إلى 7جينات والتي تنتظم في تجمعين يفصل بينها منطقة وسيطة Intergenic region (IR) ، تتكون من 300 نيكليوتيد. تحتوي هذه المنطقة الوسيطة على تسلسل غني بتتابع النيوكليوتيدات GC، والتي لها المقدرة على تكوين مركب قائم Stem –loop structure. كما تُحمل التسلسلات الأخرى في الإتجاه المعاكس على 1– 6 قاعدة نيتروجينية غنية بالتتابع AT، والتي تحتوي على التسلسل TAATATTAC الذي يوجد في كل الفيروسات التي تنتمي إلى مجموعة الجيميني.

الحمض النووي كوسيط لاستحداث المقاومة Nucleic acid -mediated resistance:

هنالك عدد كبير من إستراتيجيات اشتقاق المقاومة من جزيئ الحمض النووي للفيروس نفسه Pathogen derived resistance والتي تعرف اختصارا بـ PDR. يعتبر بروتين الجين ALI او بروتين الجينC1 مسئولا عن تكاثر الحمض النووي DNA في الفيروسات، كما يعتبر من البروتينات ذات الوظائف العديدة حيث يقوم بالنشاطات التالية:

1. يعمل على تحديد موقع تكاثر الحمض النووي، وذلك بارتباطه على يسار الموقع البيني Intergenic region في الفيروس.
2. انقسام تسلسل الحمض النووي DNA لبداية الإكثار في الموقع TAATATTAC الذي يوجد في كل من فيروسات الجيميني .
3. نشاط طاقة ATPase، والذي يعمل على توفير الطاقة الحيوية لإكمال عملية التكاثر.

كل هذه الوظائف للبروتين الانقسامي Rep جعلت منه الهدف للتحوير

الوراثي لمقاومة الأمراض الفيروسية عن طريق تثبيط التعبير عنه. على سبيل المثال تم اختبار الحمض النووي الراسل mRNA الخاص بهذا البروتين (C1 gene) في فيروس تجعد وإصفرار أوراق الطماطم TYLCV كهدف لإحداث المقاومة.

أكثر الأشكال المعروفة في تقنية المقاومة المستحدثة عن طريق الحمض النووي هي تقنية تثبيط الحمض النووي RNA، والتي تؤدى إلى تدهور في عملية الترجمة عقب استنساخ الحمض النووي RNA. تتضمن ميكانيكية استحداث المقاومة بهذه الطريقة وجود جينات مشفرة للحمض النووي RNA في الاتجاه الموجب (+)، ولكنها لا تعمل على تجميع بروتينات. أثبتت الدراسات علاقة كبيرة بين المقاومة عن طريق استخدام الحمض النووي RNA، وإدخال نسخ جينية مركبة، وتنظيم قطع الحمض النووي DNA في موقع جيني واحد أو أكثر.

يعتمد تكاثر فيروسات الجيميني على إنزيمات تكاثر خاصة بالعائل، لذا تعتبر فيروسات الجيميني أنموذجاً ممتازاً لدراسة تكاثر الحمض النووي DNA في داخل نواة الخلية النباتية. يمكن تقسيم تكاثر الحمض النووي DNA في داخل نواه الخلية النباتية إلى مرحلتين:

i. مرحلة تحويل الشريط المنفرد إلى شريط مزدوج، والذي يستخدم لإجراء عملية الاستنساخ لجينات الفيروس.

ii. إنتاج أشرطة فردية من الوسيط المزدوج Double stranded intermediate.

أثبتت التجارب أن وسيط الشريط المزدوج يعمل شريطاً للتكاثر الدائريRolling circle replication في فيروسات الجيميني. تتضمن هذه العملية بروتيناً فيروسياً مهماً وهو البروتين الانقسامي Rep، والذي يسمى أيضاً بـ AC1 ،أو *CI. CI-N/ CI-C*، أو*ORF III/IV* . أما في حالة الجيميني التي تصيب النباتات ذات الفلقتين فإن البروتين الانقسامي هو 41*KDa* والدي يشفر له عن طريق جين واحد في داخل الفيروس وهو الجين *AC1* أو *CI*. وفي حالة الجيميني، التي تنتمي إلى تحت المجموعة 1، فإن البروتين الانقسامي

يتحكم فيه اثنان من الجينات المتداخلة بداخل الفيروس $CI - N$ و $CI - C$، أو $ORFIII$ و IV. لا يشابه البروتين الانقسامي أياً من إنزيمات البوليمريز المعروفة يحتوي الإنزيم الانقسامي على موقع مُحدِد للانقسام، كما يعمل مع أشرطة DNA الأحادية على بداية عملية الانقسام.

التشفير للبروتين الانقسامي Rep الخاص بتكاثر الفيروسات:

أثبتت الدراسات في فيروسات الجيميني ثنائية الجينوم أن كل الجينات الخاصة بالتكاثر توجد في الجينوم A.

باستخدام أنظمة التحوير الجزيئ و التطفير تم التعرف على أن الجين المسئول عن تكاثر الفيروس هو الجين ACI ، أو CI في فيروسات الجيميني أحادية وثنائية الجينوم. يعتبر بروتين الجين AC_3 مؤثراً على مستوي تجميع الأشرطة الأحادية للحمض النووي DNA، إلا أنه لايعتبر ضرورياً لإتمام عملية التكاثر. على الرغم من أن هنالك وظائف مشتركة بين البروتينات الخاصة بتكاثر الجيميني، ولكن وجد أن كل من هذه البروتينات يعمل فقط على تحديد الجينوم الخاص بالفيروس المعني. يعد التفاعل الخاص بين بروتينات Rep والموقع الوسيط في الفيروس ضرورياً لتحديد موقع الجين المسئول عن تحديد الحمض النووي.

يبدأ تكاثر الفيروس من موقع التسلسل TAATATT/AC، والذي يعمل كموقع للتكاثر. كما أوضحت الدراسات أهمية الموقع الغنى بالتتابع النيوكليوتيدي GC في تكوين المركب القائم Stem loop structure المهم لتكاثر الفيروس.

أوضحت التجارب البيوكيمائية أن البروتين الانقسامي لفيروسات TYLCV و WDV يحتوي على موقع نشاط انقسام يقع بين النيوكليوتيد 7 و 8 من التسلسل 1TAATATT/AC، مما يؤكد أن دورة التكاثر Rolling cycle تبدأ بين النيكلوتيدين 7+ و 8+ من هذا التسلسل.

نشاط الإنزيم ATPase:

يرتبط نقص أو زيادة النشاط الانزيمى ATPase للبروتين الانقسامي بنقص أو وقف تكاثر الحمض النووي.

عملية الفسفرة Phosphorylation:

هي عملية تغيير رئيسية تحدث بعد عملية الترجمة، وتعمل منظماً للتحكم في نشاط البروتينات في الكائنات الراقية Eukaryotes. بخلاف ذلك فقد وجد انه عند دخول البروتين الانقسامي إلى داخل بكتريا القولون *E coli* لا يحدث عملية فسفرة على الرغم من نشاطه الوظيفي داخلها، والخاص بعمليتي الانشقاق و الربط ونشاطه الإنزيمي ATPase الخاص بإنتاج الطاقة اللازمة لإتمام عملية الانقسام.

صناعة الأشرطة الأحادية لفيروسات الجيميني أنموذجا:

تعتمد صناعة أشرطة الحمض النووي الفيروسية على نشاط البروتين الانقسامي Rep، كما تحتاج هذه العملية إضافة لذلك لنشاط إنزيم البوليمريز من العائل (خلايا النبات)، بالإضافة لإنزيمات أخرى والتي تنشط فقط أثناء مرحلة تركيب الحمض النووي (S- phase) في دورة حياة الخلية. يلعب البروتين الانقسامي الدور الأساسي في بداية عملية التكاثر. يحتوي البروتين الانقسامي نشاط ربط بين ATP/GTP، ونشاط تحلل hydrolysed activity الذي يتوقع أن يعمل على تنظيم دورة حياة الخلية. تم التعرف على تكاثر بروتين أنتجين في النواة (PCNA) المرتبط بمرحلة تركيب الحمض النووي من دورة الخلية في فيروس مرض التبرقش الذهبي في الطماطم (TGMV)، مما يرجح تغييراً في دورة حياة الخلية بواسطة فيروسات الجيميني عند الإصابة. إضافة لذلك فقد وُجد أن للبروتين الانقسامي في فيروس تقذم القمح WDV المقدرة على تكوين مركب مستقر في الإنسان مع مجموعة بروتينات تسمى الرتينوبلاستا Human retinoblastoma (Rb). ولكن لم يتم التعرف على بروتينات

مشابهة لها في النباتات، أما في الحيوانات فتعمل هذه البروتينات Rb على منع تحول الخلية من مرحلة انقسام الخلية G1 phase إلى طور تركيب الحمض النووي S-phase، لذا يعتبر من البروتينات المهمة التي تدخل في تغيير تنظيم الخلية.

يعمل البروتين الانقسامي على تهيئة الخلية النباتية لبداية عملية تكاثر الفيروس. ففي الخطوة الأولى يرتبط البروتين الانقسامي مع تسلسل مشابه للتسلسل الأصل إما عن طريق التعرف على المواقع ذات المقدرة العالية للربط، أو عن طريق مساعدة البروتين الفيروسي. يتراوح موقع ربط البروتين الانقسامي لمختلف فيروسات الجيمني بين 23-82 *bp*، مما يرجح حركة هذا البروتين على طول الحمض النوويDNA حتى وصوله إلى التسلسل الذي يحدث عنده بداية الانشقاق Nonamer sequence، ويحدث انشقاقه. يمكن أن تحتاج هذه الحركة إلى نشاط طاقة انشقاق ATP hydrolysis. تعمل عوامل في العائل على ثني الحمض النووي DNA بطريقة تجعله قريباً للارتباط مع البروتين Rep. أظهرت نتائج البحوث إنشاء الموقع الوسط في الفيروس WDV دون التوصل الى حقائقها البيولوجية التي تجعل الفيروسات ثنائية الشريط DNA ذات مقدرة على التكاثر والانشقاق بواسطة بروتين Rep.

تربط الروابط الإسهامية الفسفورية Phosphodiester bond بين النيوكليوتيدة السابعة و الثامنة بواسطة مجموعة الهيدروكسيل للبروتين الانقسامي، والذي ينتج عنه نهاية $3^\prime\ OH^-$ بعد النيكليوتيدة السابعة، والذي يستخدم بادئاً لصناعة شريط الفيروس. وبذلك يرتبط البروتين الانقسامي عند النهاية $5^\prime$ phosphate للنيكليوتيدة الثامنة عبر الحمض الأمينى Tyrosine (103 UAU)، ويظل مرتبطاً بعد دورة واحدة من صناعة الشريط الجديد ليعمل على انشقاقه من جديد، وتنتقل النهاية$5^\prime$ من التيروسين Tyrosine 103 إلى النهاية$3^\prime$ OH المنتجة من الانشقاق الثاني ليتحرر جزيئ أحادي دائرى من شريط الحمض النوويDNA .

تتطلب عملية الإكثار المستمرة لجزيئات الفيروس كمية محدودة من

البروتين الانقسامى، وذلك لأن إنتاجه سيستمر خلال عملية الإكثار عند النهاية terminus '5 للشريط الجديد. في بداية التكاثر فإن الأشرطة الجديدة تنسخ في صورة أشرطة مزدوجة مما يؤدي إلى تجميع أشرطة للتعبير عن جينات الفيروس بما فيها البروتين الانقسامي نفسه.

حركة الفيروس:

لإحداث الإصابة يجب على الفيروسات الحركة من خلية لأخرى عبر الجدار الخلوي، حيث يعتبر الجدار الخلوي مانعاً لدخول الفيروسات المتكاثرة من وإلى داخل الخلية. ففي الخلايا الحيوانية يتم ذلك بإحدى طريقتين:

أ. الالتحام السطحي Surface fusion.

ب. وجود مستقبلات Receptors.

أما في الفيروسات النباتية فإن هنالك ميكانيكية محددة تعمل على تسهيل حركة الفيروسات بين الخلايا. بخلاف عدد قليل من الفيروسات فإن جزيئات الفيروسات تدخل إلى داخل خلايا النباتات عن طريق جرح أو عبر ناقل وسيط Vector، وبعد دخول هذه الفيروسات وتكاثرها تكون الإصابة محدودة إذا لم تتمكن الفيروسات من الحركة للخلايا السليمة وبذلك يصبح النبات العائل مقاوماً، أما إذا تمكنت الفيروسات من الحركة بين الخلايا فتكون هنالك إصابة واضحة. عليه تمثل حركة الفيروس بداخل النبات عاملاً مهماً في تحديد درجة العدائية والمقدرة على إحداث الإصابة.

يمكن تقسيم حركة الفيروس بداخل العائل إلى مرحلتين:

1. الحركة لمسافة قريبة من خلية إلى خلية.
2. الحركة لمسافات بعيدة من نسيج مصاب إلى أنسجة أخري عبر الأوعية الناقلة في النبات.

بعد خروج الفيروسات من الأوعية الناقلة تبدأ في الحركة لمسافات قريبة بين الخلايا، ففي بعض أنواع الفيروسات تنحصر الإصابة فقط في الحركة لمسافات قريبة في الأوراق أو الأوعية أو الأنسجة المرتبطة بالأوعية. يدخل الفيروس عبر

جدار الخلية من خلية لأخرى عبر البلاسمدسماتا Phasmodesmata، والتي تعتبر حلقة وصل في الحيوانات للربط بين الخلايا، كما توفر تواصلاً سيتوبلازمياً مستمراً بين الخلايا المجاورة. يلعب هذا الربط دوراً مهماً في الإتصال بين الخلايا، وفي انتقال الماء والعناصر المغذية عبر النبات. تحتوي معظم الفيروسات النباتية على بروتينات خاصة لنقل الفيروسات من خلية لأخرى.

البروتينات الخاصة بحركة الفيروس Virus – encoded movement proteins:

تم الآن تحديد البروتينات الخاصة بالحركة في عدد كبير من الفيروسات المعروفة حتى الآن. أثبتت الدراسات اختلاف فيروس Tobacco mosaic virus (TMV) وفيروس (CPMV) Cowpea mosaic viruses في ميكانيكية حركة الفيروسات المتكاثرة من خلية لأخرى. تعتبر بروتينات الحركة ضرورية لحركة الفيروس من خلية لأخرى. كما أن بروتينات الغلاف الخارجي للفيروس Coat proteins تعتبر ضرورية لحركة الفيروس من خلية لأخرى.

الجزيئات الخاصة بالعلاقة بين بروتينات الحركة والبلاسمودسماتا في الفيروس:

أظهرت نباتات التبغ مقاومة عند وجود بروتين الحركة الحساس للحرارة. فقد اتضح وجود اثنين أو أكثر من الجزيئات Domain فى الفيروس التي تعمل على تغيير أو تطوير البلاسمدسماتا عن طريق بروتين الحركة. يفشل بروتين الحركة الحساس للحرارة في تطوير أو تغيير البلاسمديسماتا. هنالك بعض الأدلة على دخول عملية الفسفرة في التحكم في العلاقة بين البروتين والبلاسمديسماتا.

العلاقة بين بروتينات الحركة و الأشرطة الأحادية للحمض النووي:

أظهرت نتائج البحوث أن بروتين الحركة في الفيروس TMV، وبروتين الحركة في الفيروسCaMV والتي تم إنتاجها وتنقيتها بداخل البكتريا تتمتع بوجود منطقة ربط على الشريط الأحادي. وقد وجد أن بروتين الحركة في الفيروس CaMV يعمل على تطوير البلاسمودسماتا في داخل الأنسجة المصابة.

يؤدي الفهم العميق لبروتينات الحركة في الفيروسات النباتية والميكانيكية

التي تعمل بها إلى استنباط نباتات مقاومة للفيروس. كما يؤدي التطفير في بروتينات الحركة إلى فقل في وظيفة البروتين العادي المنتج أثناء عملية الإصابة. هنالك أنواع كثيرة من المقاومة الطبيعة التي تحدث نتيجة لعدم اكتمال التفاعل بين بروتين الحركة والبلاسمدسماتا في العائل.

تعرف البلاسمدسماتا بأنها أشرطة ضيقة من السيتوبلازم والتي تخترق جدران الخلايا المجاورة للدخول إلى الخلايا النباتية، لذا توفر تواصل من البروتوبلاست في الخلايا المختلفة يطلق عليه اسم السمبلاسم Symplasm. يتم إمداد الخلايا والأنسجة البعيدة بالمواد الكربوهيدريتية والأحماض الأمينية و الأيونات عبر البلاسماديسماتا، كما توفر الإشارات الكهربية والهرمونية التي تدخل في تنظيم نشاط الأجزاء المختلفة من السمبلاسم.

تستخدم تقنيات الإدخال الدقيق Microinjection للصبغة الضوئية غير النفاذة وغير السامة في دراسة التفاعل بين الفيروس و النبات، ولدراسة الملتقيات الفراغية في عدة أنسجة نباتية. حيث تم تصميم حامل الببتيد معروف الكتلة الجزيئية ونصف القطر للتعرف على الممرات أو الملتقيات الفراغية، ولمعرفة مدى النفاذية للأنسجة النباتية. وجد أن هنالك بعض أنواع الفيروسات النباتية تنتشر في كل العائل عبر البلاسمدسماتا، كما في فيروسات الموازايك و قد تمت معرفة ذلك عن طريق استخدام الميكروسكوب الإلكتروني. يمكن لدراسة التعبير الجيني في الفيروسات أن توفر أنظمة لدراسة البلاسمدسماتا. ففي فيروس تبرقش التبغ Tobacco mosaic viruses فإن بروتين الحركة 30 KDيدخل في حركة الفيروس من خلية لأخرى (Deom *et al*.. 1992). لمتابعة حركة الفيروس بين خلايا الميزوفيل والخلايا الموجودة على السطح السفلي من ورقة التبغ تم حقن خلايا الميزوفيل بمادة (F-)Fluorescein isothiolyanate dextrans. وضعت الورقة مقلوبة على سطحها السفلي على شريحة، وربطت على الشريحة بشريط شفاف، وتمت إزالة طبقة الأيبديرمس Epidermis للسطح السفلي [illegible] مادة طينية Clay على الجزء المنزوع

الأبديرمس وملئت بماء مقطر.

تم بعد ذلك، إدخال حوامل ذات كتل جزئية مختلفة إلى داخل خلايا الميزوفيل في الورقة في الخطين الوراثيين 306 و 277 وتمت متابعتها بواسطة ميكروسكوب ضوئيFluorescence microscopy. فقد لوحظ تحرك الجزيئات ذات الحجم 749< دالتون بنفس الكفاءة في خلايا الخطين الوراثيين 277 و306، كما هو موضح في الجدول أدناه. فإنه لا يمكن الحجم 3900 F- Dextran أن تتحرك من خلية مصابة لأخرى في الخط الوراثي 306 حتى بعد 20 دقيقة، أما في خلايا الخط الوراثي 277 فقد لوحظ أن هذه الجزيئات قد تحركت من الخلايا المصابة إلى السليمة في كل النباتات. فبعد 30 -60 ثانية بعد الحقن بمادة F-dextrans وجدت هذه الجزيئات على بعد 4 - 5 خلية من الخلية التي تم حقنها، وهي مسافة تساوي تقريباً 150 -299 *Mm*. لم يتم بعد تحديد ما إذا كان هنالك تكسير للجزيئات F-dextran الكبيرة في نباتات الخط الوراثي 277، مما يساعد على مشاهدة الأنموذج الضوئي الناتج عنها.

أثبتت الدراسات التي أجريت في حركة الفيروس من خلية إلى أخرى محدودية البلازمدسماتا في إمرار الجزيئات في الخط الوراثي 306، أما في نباتات الخط الوراثي 277، الذي يعبر عن بروتين الحركة للفيروس TMV- MP فيسمح بمرور الجزيئات ذات الكتلة الكبيرة نسبياً. مما يؤكد أن بروتين الحركة في الفيروس TMV يعمل على تغيير وظيفة البلاسمدسماتا بما يتيح مرور مثل هذه الكتلة الكبيرة. إلا أنه لم يتم بعد تحديد الميكانيكية التي يعمل بها بروتين الحركة TMV-MP، والبروتينات المشابهة لتطوير البلاسموسماتا في الفيروسات الأخرى. عموماً، أثبتت الدراسات أن الفيروسات وأحماضها النووية يمكنها الحركة عبر البلاسمدسماتا. تتضمن الحركة بين خلية وأخري بروتين حركة والذي يتوقع أن يكون بروتين الحركة MP في حالة فيروس تبرقش الطماطم (TMV)، والذي يعمل على فتح الخلايا السليمة مما يسهل حركة الفيروس اليها. لذا يتوقع أن تكون للبلاسمدسماتا بوابات، يجب تطويرها

بواسطة بروتين الحركة بغرض فعالية حركة هذه الفيروسات.

أثبتت الدراسات الميكروسكوبية باستخدام المجهر الإلكتروني في نباتات الخطين الوراثيين 277 و 306 معاً عدم وجود أي فرق معنوي بين البلاسمدسماتا في كليهما.

الجدول 6.1 يوضح إمكانية حركة الحامل الضوئي عبر ممرات السيمبلاسم في خلايا الميسوفيل لنباتات التبغ. البيانات المعروضة عبارة عن نسبة الإدخال التي توضح حركة الحامل المحدد بعد دقيقتين من الإدخال.

الحامل Probe	الكتلة الجزيئية Molecular mass (Daltons)	نباتات الخط الوراثي المحور Transgenic plant line	نوع بروتين الحركة في الطراز الوراثي المحدد MP genotype	نسبة الحقن الذي يعبر عن حركة الفيروس
LYCH	457	277	MP^+	100
		306	MP^-	100
F – Gly 6	749	277	MP^+	100
		306	MP^-	50
F – Dextran	3.900	277	MP^+	100
		306	MP^-	14
F – Dextran	9.400	277	MP^+	93
		306	MP^-	0
F - Dextran	17.200	277	MP^+	0
		306	MP^-	0

استحداث المقاومة عن طريق بروتينات الحركة-Movement protein-mediated resistance:

تدخل بروتينات الحركة من الفيروس لداخل خلايا العائل، وتعمل على انتشار الإصابة بين الخلايا المجاورة، ومن ثم حدوث الإصابة الجهازية في كل أجزاء النبات، يتم انتشار جزيئات الفيروس بين الخلايا عبر البلاسمدسماتا، والتي تعمل قناة وصل بين جدران الخلايا المختلفة، وبالتالي فإنها توفر التواصل بين الخلايا والأنسجة المختلفة. يتجمع عدد كبير من بروتينات الحركة MPs في

داخل البلاسمدسماتا مما جعل بالإمكان استخدام بروتينات الحركة لاستحداث المقاومة MP-MR لدراسة هذه البروتينات، إضافة إلى استخدامها لدراسة طبيعة وتركيب البلاسمدسماتا نفسها. يتم إكثار الحمض النووي DNA لفيروسات الجيميني في داخل أنويه الخلايا ثم تنقل الأشرطة الأحادية من النواة إلى داخل السيتوبلازم عن طريق مساعدة نوع من البروتين الفيروسي، بينما يعمل نوع آخر من البروتينات لنقل جزئيات الفيروس للخلايا المجاورة. على النقيض من ذلك، فإن فيروسات الحمض النووي DNA يمكن أن تتكاثر بداخل السيتوبلازم. تمت تنقية عدد كبير من بروتينات الحركة من بكتيريا القولون *Escherichia coli*، و التى يمكن أن ترتبط مع الشريط المفرد للحمضي النووي معملياً In- vitro في مواقع غير محددة. أثبتت الدراسات المجهرية الضوئية تجمع بروتين الحركة MP في المواقع بين الخلوية المختلفة، مثل الأنابيب الدقيقة Microtubules والبلاسمدسماتا Plasmodesmata، كما يرتبط هذا البروتين مع الغشاء الإندوبلازميEndoplasmic reticulum، حيث يلعب دوراً مهماً في كل هذه المواقع لتسهيل حركة الفيروس بداخلها. تطبيقيا، يمكن عمل طفرات في بروتين حركة الفيروس TMV، والتي تمكن جزيئات الفيروس من أن تتحرك للخلايا المجاورة. كما أن هنالك بعض الطفرات المانعة لحركة الفيروس، والتي تعطل بروتين الحركة مما يضعف إمكانية الإصابة بالمرض، وتمنع الإصابة بالفيروسات الأخرى، تحديداً تلك التي تتبع للمجموعة الفيروسية Tobamoviruses.

الباب السابع

الإستراتيجيات الجزيئية

لمقاومة الأمراض الفيروسية

الباب السابع

الإستراتيجيات الجزيئية لمقاومة الأمراض الفيروسية

تستخدم تقنيات تربية النبات التقليدية في مجال مقاومة الأمراض، من أهمها الأمراض الفيروسية، وذلك عن طريق نقل الجينات من المصادر الوراثية (السلالات البرية المقاومة) الى الأصناف التجارية. هنالك صعوبات عديدة تواجه استخدام علوم تربية النبات لاستنباط أصناف مقاومة للأمراض، والتي من أهمها عدم وجود مصادر وراثية طبيعية للمقاومة لبعض الأمراض، عدم المقدرة على التهجين بين بعض السلالات البرية و الأصناف التجارية وطول الزمن اللازم لإكمال برنامج التربية. للتغلب على هذه الصعوبات هنالك طرق واستراتيجيات عديدة أخرى بخلاف الطرق التقليدية لإدخال عوامل المقاومة أو التحمل للإصابة بالأمراض الفيروسية في النبات، والتي تم تناولها في الأبواب السابقة. إلا أننا سنتناول في هذا الباب الطرق المختلفة لاستخدام تقنيات الأحياء الجزيئية والهندسة الوراثية لاستحداث المقاومة للأمراض الفيروسية.

تنقسم الإستراتيجيات التي يمكن عن طريقها استحداث المقاومة في النبات عن طريق اشتقاقها من التركيب الجزيئي للفيروس نفسه Pathogen–derived resistance (PDR) إلى:

أ. تقنيات تعتمد على إنتاج بروتين، مثل:

1. استخدام بروتينات الغشاء الخارجي Coat proteins.
2. استخدام الإنزيمات الخاصة بتكاثر الفيروس Replicase.
3. استخدام البروتينات الخاصة بحركة الفيروس Movement proteins.

ب. تقنيات تعتمد فقط على تجمع تسلسلات من الحمض النووي للفيروس، مثل:

1. تداخل خاطئ بين حمض الديوكسي والديديوكسي Defective interfering RNAs and DNAs.
2. جزيئات الحمض النووي RNA غير المترجمة Non translated RNAs.

عموماً فإن المجموعة الأولي من الإستراتيجيات توفر مقاومة لعدد كبير من سلالات الفيروس المعني، بينما توفر المجموعة الثانية مستوى عالياً جداً من المقاومة لسلالة محددة من الفيروس.

بالإضافة الى فائدتها في استحداث المقاومة، أدت هذه الطرق أيضاً إلى زيادة الفهم عن عدائية الفيروس والمرض.

بدأت الاختبارات في هذا الجانب منذ العام 1986، بتقليل الإصابة بالمرض باستخدام الغشاء البروتيني للفيروس كوسيط للمقاومة Coat protein mediated resistance (CPMR). مما أفسح المجال لاستخدام هذه التقنية في أعداد كبيرة من المحاصيل، ومحاولة الوصول الى إستراتيجيات جديدة في هذا الإتجاه. كان أول تسويق تجاري لنباتات محورة لمقاومة الفيروسات في الولايات المتحدة الأمريكية في العام 1995م، وهو صنف من الكوسة مقاوم لمرض الزوكيني من شركة Asgrow. إن التحدي المستقبلي في هذا الإتجاه حينها هو الوصول إلى إستراتيجيات تعمل على زيادة درجة المقاومة. يمكن الوصول لذلك عبر تجريب طرق ميكانيكية المقاومة الجزيئية واستخدام المعلومات لإنتاج أجيال من جينات المقاومة ذات الفعالية الفائقة.

تم التوسع في التحوير الوراثي و استخداماته بعد الدراسات التي أدت إلى فهم الأسس البيوكيميائية والتوريثية لتكاثر عدد كبير من الفيروسات، ومعرفة وظيفة إنزيم الربلكيز والإنزيمات الأخرى ذات العلاقة بهذا الإنزيم، ووظائف بروتينات حركة الفيروس التي تسهل الانتقال الموضعي والجهازي للإصابة في داخل النبات، ونشاطات الإنزيمات الانقسامية Proteinases، وتجميع جزيئات الفيروسات في الغشاء، والبروتينات التي تساعد على أخذ الفيروسات بواسطة الحشرات ونقلها إلى نبات آخر.

إستراتيجيات استحداث المقاومة من الفيروس PDR:

1. **تقنية الغلاف البروتيني لاستحداث المقاومة** Coat protein – mediated resistance:

يمكن أن توفر هذه الإستراتيجية مقاومة واسعة ضد السلالات المختلفة من المرض أو لسلالة محددة . مثال لذلك فإن الغلاف البروتيني لفيروس تبرقش التبغ TMV يوفر مستوى فاعلاً من المقاومة للسلالات المختلفة من نفس الفيروس، بينما يعمل على نقص المقاومة إلى الفيروسات التى تنتمي إلى مجموعة Tobamoviruses التي تبعد كثيراً من حيث تسلسل الغلاف البروتينى عن هذا الفيروس. كما وجد أن الغلاف البروتيني لفيروس تبرقش فول الصويا Soybean mosaic virus الذي لا يصيب التبغ، يوفر مقاومة في نباتات التبغ ضد مرضين فيروسيين لا علاقة لهما بمرض التبرقش الفيروسي، وهما Potato virus Y (PVY) و Tobacco etch virus (TEV). تم تجميع الجينات المشفرة للبروتين النووي من السلالات الثلاثة من مرض Tomato spotted wilt virus في بنية جينية واحدة بغرض إحداث مقاومة واسعة لهذه السلالات مجتمعة.

أمكن الحصول على نباتات مقاومة لمرض تبرقش التبغ الفيروسي TMV في التبغ بإدخال الغلاف البروتيني للفيروس إلى هذه النبات (Powell-Abel *et al.*,1986). كما أمكن الحصول على مقاومة بنفس هذه الطريقة لكلٍ من مرض تبرقش البرسيم AMV، مرض تبرقش الخيار CMV، مرض تخطيط التبغ JSV، المرض الذي يسببه فيروس البطاطس أكس PVX، وفيروس البطاطس وأي PVY، ومرض تجعد أوراق البطاطس PLRV (Beachy *et al* ; 1990).

لم يتم التعرف بعد على الطريقة أو الميكانيكية التي تحدث بها المقاومة عن طريق إدخال الغلاف البروتيني للفيروس المسبب للمرض في داخل النبات، حيث إن العلاقة بين التعبير الجيني للغلاف البروتيني ودرجة المقاومة ليست كبيرة في كل الأحوال. ولكن هنالك دلائل تشير إلى أن أصل المقاومة المكتسبة بهذه الطريقة قد يتأتى عبر تأخير ظهور الأعراض وبطء تطور المرض. وجد أن هنالك علاقة مباشرة بين كمية الغلاف البروتينى بداخل النبات ومستوى المقاومة، كما وجد أن الغلاف البروتينى لفيروس تبرقش التبغ المركب معملياً

على حسب البنية الجزيئية للفيروس يمكنه إحداث مستوي مقاومة أكبر مقارنة مع الغلاف البروتينى للسلالات البرية من هذا الفيّروس. مقارنة بذلك فقد أظهرت دراسة أجريت في الغلاف البروتينى ضد الفيروس المسبب لمرض تبرقش البرسيم ALMV ، عدم مقدرة الطفرة المستحدثة في الغلاف البروتيني على تنشيط تكاثر الفيروس؛ مما تسبب في إحداث مقاومة لهذا المرض. وقد توقع العلماء أن تكون المقاومة ناتجة عن ربط الغلاف البروتينى ببعض العوامل في داخل العائل، كما يتوقع أن تكون المقاومة قد نتجت أيضاً من تفاعل بين الغلاف البروتينى والفيروس، مما ينتج عنه مقاومة للمرض، كما في حالة الغلاف البروتينى لفيروس تبرقش التبغ.

2. استحداث المقاومة عن طريق الإنزيم الانقسامي :Replicase – mediated resistance (Rep – MR)

يتم حدوث المقاومة بهذه الطريقة عن طريق تحوير النباتات باستخدام تسلسل DNA مختص بانقسام خلايا الفيروس. مثال لذلك المقاومة المستحدثة لمرض تبرقش التبغ الفيروسي باستخدام التسلسل Replicase SK – Kda.

وجد أن الجينات التي تشفر كليا أو جزئياً لبروتينات إنزيم الربلكيز Replicase يمكنها إحداث مقاومة أقرب للمناعة من المرض، والتي غالباً ما تكون محصورة على إحداث مقاومة للفيروس الذي نُقل منه تسلسل الجين المعني. تحتوي النباتات التي حورت عن طريق Rep – MR لمقاومة تبرقش التبغ الفيروسي TMV على تسلسل يحتوي قطعة من إنزيم الربلكيز. على الرغم من الاعتقاد بأن المقاومة المستحدثة بهذه الطريقة تعتبر مقاومة مستحدثة بواسطة الحمض النووي RNA – mediate أكثر من كونها مستحدثة من بروتين Protein – mediated، إلا أن بعض الأمثلة في هذا الإتجاه تتطلب وجود جين محدد وبالتالي إنتاج بروتينات. وجد أن طفرة من إنزيم الربلكيز Replicase مشتقة من فيروس تبرقش الخيار CMV، الذى ينتمي إلى فيروسات تحت المجموعة الأولي I، قد أحدث مقاومة عالية في نباتات التبغ لكل سلالات هذا

الفيروس المنتمية لهذه المجموعة، ولكنها لم تحدث مقاومة لسلالات فيروسات تحت المجموعة الثانية II وللفيروسات الأخرى. أمكن التوصل إلى مقاومة عن طريق هذه الإستراتيجية لفيروسات PVY و ALMV عن طريق إحداث طفرات وليس عن طريق استحداث المقاومة عن طريق هذا الإنزيم المستخلص من سلالات برية من الفيروس، كما أمكن التوصل لمقاومة بنفس هذه الطريقة لمرض تجعد الأوراق الفيروسي TYLCV في الطماطم.

لم يتم التعرف تحديداً على ميكانيكية المقاومة المستحدثة عن طريق الإنزيم الانقسامي Rep - MR، ولكن تم التعرف على أن هذه الطريقة تعمل على تقليل تكاثر الفيروس في الحقل. تم افتراض أن البروتين المنتج في النباتات المحورة يتداخل مع وظائف إنزيم الربلكيز المنتج في الفيروس، حيث يحتمل أن يتم ذلك عن طريق ربطه بعوامل في العائل أو ببروتينات فيروسية تعمل على تنظيم التكاثر والتعبير الجيني في الفيروس. ففي حالة استحداث المقاومة بهذه الطريقة ضد فيروس تبرقش الخيار CMV يتم منع تجميع جزيئات الفيروس ومنع الإصابة الجهازية. أدى وجود إنزيم الربلكيز لفيروس TMV مع تسلسل قطعة من بلاسميد البكتريا الزراعية أدخلت معه في النبات أثناء عملية التحوير إلى إحداث مقاومة عالية في نباتات التبغ لعدد كبير من الفيروسات التي تتبع لفيروسات المجموعة Tobomoviruses ، ولكنه لم يحدث مقاومة للفيروسات الأخرى.

3. **استخدام قطع RNA متناهية الصغر Satellite RNAs:**

وهى عبارة عن تسلسلات صغيرة Satellites من الحمض النووي RNA تتبع الإصابة الفيروسية، وتسمي بالتابع . يعمل هذا التسلسل على تسهيل عملية الانقسام الخلوي للفيروس، كما يؤثر على الأعراض الناتجة عن الإصابة. يمكن أن يكون التحكم في أعراض الإصابة مفيداً أو ضاراً، ويعتمد ذلك على نوع التسلسل المستخدم. عموماً يمكن استخدام مثل هذه التسلسلات في تحوير

النبات من أجل مقاومة الأمراض، وذلك لتحكمها في ظهور أعراض الإصابة. تم استخدام هذه الطريقة في كل من التبغ والطماطم.

4. **إستراتيجيات غير شائعة الاستخدام:**

و تشمل كلاً من:

1.4. **تسلسلات مضادة المعنى** Antisense RNA sequences:

تستخدم تقنية الحمض النووي RNA مضاد المعنى في إحداث المقاومة بهذه الطريقة. يتم منع تكاثر الفيروس بهذه الطريقة عن طريق تحوير النباتات بواسطة تسلسل مضاد المعنى. تعتبر المقاومة المستحدثة بهذه الطريقة ضيقة نسبياً حيث تعمل على إحداث مقاومة فقط للفيروسات التي أخذ منها التسلسل، ولا يمكنها إحداث مقاومة للسلالات التي تتميز بوجود مواقع ذات اختلافات معنوية في التسلسل. ولكنها تعتبر فاعلة ضد الإصابة بفيروسات الجيميني. أوضحت مقاومة بعض السلالات المحورة للإصابة الفيروسية أن النباتات المحورة توفر مستوى كافياً من الحمض النووي RNA لتقليل تكاثر الفيروس. وقد حققت هذه الطريقة نجاحات متتالية في هذا المجال باستخدام جينات الغلاف البروتيني ذات النشأة مضادة المعنى، مثال لذلك الجين AL1 مضاد المعنى لفيروس التبرقش الذهبي للطماطم TGMV .

لجزئيات الحمض النووي RNA المقدرة على التهجين مع بعض جزيئات الحمض النووي الناقلة للرسالة الجينية mRNAs، وهي بذلك تعتبر وسيلة للتحكم الطبيعي والصناعي في الجينات، وذلك بوقف تعبير الجين المعني. وصف بندرهام وبرونو (1997م) تطبيق جزيئات الحمض النووي RNAs المضادة التي تتداخل مع mRNA الخاص ببروتين التكاثر Rep protein المشفر له في الجين C1 في فيروس TYLCV المسبب لمرض التجعد الفيروسي في الطماطم. حيث تم إدخال جزيئات الحمض النووي RNA مضاد المعنى إلى البلاسميد PGASst ومن ثم أدخل إلى البكتريا الزراعية السلالة LBA 4404 واستخدم بعد ذلك

لإنتاج نباتات محورة وراثياً عن طريق تحوير أقراص من أوراق الطماطم، وزراعة هذه الأنسجة للحصول على نباتات كاملة ثم انتخاب النباتات المحورة وراثيا.

2.4. إنزيمات الرايبوز Ribozymes:

وهي جزئيات RNA مساعدة تعمل على حدوث انقسام محدد في الحمض النووي RNA في صورة ترانس (trans). لذا فعند وجودها في النباتات المحورة وراثياً؛ فإن لها القابلية على تعطيل الحمض النووي RNA للفيروس في هذه المواقع. تعمل هذه الجزيئات على إكمال تسلسل RNA الفيروس في مواقع محددة في عملية تهجين بينها وبين تسلسل الحمض النووي RNA في الفيروس، كما تعمل على انقسامه. اشتقت إنزيمات الرايبو الأكثر استخداماً الآن في النباتات من تسلسل الفيروس Tobacco ring spot virus.

3.4. استحساس إنتاج أجسام مضادة في النبات:

هنالك تجارب تجرى على هذا النوع من المقاومة، وذلك بغرض تعطيل عمل الفيروس، وذلك عن طريق إنتاج أجسام مضادة في النبات (Hiatt *et al.*, 1989).

4.4. تداخل RNA خاطئ Defective interfering RNAs:

تشمل تداخل تسلسلات خاطئة من الحمض النووي RNA و DNA على حدٍ سواء. وهو عبارة عن جينوم فيروسي تم حذف تسلسل داخلي منه. تنتج هذه الجزيئات أثناء تكاثر فيروسات معينة بحذف تسلسلات محددة من الفيروس و استبدالها بتسلسلات أخرى تعمل على تأخير تكاثر الفيروس. تعمل هذه الجزيئات على تغيير اتجاه التكاثر من الجينوم الفيروسي إلى هذه الجزيئات، وبالتالي تقلل كثيراً من كمية الفيروسات المسببة للإصابة ومن أعراض المرض. أظهرت النباتات المحورة عن طريق DI-RNAs أوDI- DNAs أو ميكروستلايت RNAs مقاومةً للتكاثر، و تقليلاً في أعراض المرض. استخدمت هذه التقنية في كل من مجموعة فيروسات Tobomoviruses وفيروسات Carmoviruses. كما استخدمت في مقاومة مرض ذبول الطماطم الفيروسي

Tomata spotted wilt virus وفيروس Brome mosaic virus،
وذلك عن طريق حذف جزء من الحمض النووي RNA للفيروس.

لجزيئات الحمض النووي RNA المقدرة على التهجين مع mRNA محدد، ولذلك فإنها تعتبر إحدى الطرق الطبيعية والصناعية للتنظيم الجيني وذلك بوقف التعبير عن الجين المحدد. يعتبر وقف نشاط الجينات المستهدفة عن طريق وقف عملية الترجمة من الأدوات المستخدمة في التقنية الجينية ضد الأمراض الفيروسية. هنالك إستراتيجية جديدة أخرى في هذا الاتجاه تحت الاختبار، تتمثل في إدخال جينات أخرى للفيروس الذي تم حذف جزء من تسلسله الداخلي لأجل التأثير على عملية التكاثر أو تشجيع إنتاج مواد سامة لقتل الخلايا حديثة الإصابة.

5.4. البروتينات المانعة للإصابة بالفيروس Virus inhibiting proteins:

وذلك بتحوير النباتات عن طريق بروتينات ذات خواص تأثير مانعة للإصابة بالفيروس، مثال لذلك البروتينات المستخلصة من الدمج *Phytolacca americana*، والذي عُرف بتأثيره المانع للإصابة الفيروسية لنبات آخر غير الذي استخلص منه، حيث تعمل على منع إنتاج البروتينات في النبات.

تم عزل اثنين من جينات الغلاف البروتيني من سلالة من فيروس تبرقش الكوسة من نباتات مصابة من الشمام، ثم إكثارها بواسطة تقنية تفاعل البوليميريز السلسلي، ثم أدخلت في نفس الاتجاه في البلازميد PUC 18 *cpexp*. قطعت البلاسميدات الناتجة من دمج البلاسميدان PUC 18 *cpexp* و 42 KDa cp – جزئياً بواسطة إنزيم Hind III- ثم نقل البلاسميد المركب Binary vector إلى البلاسميد PGA 482 G. وأدخل الناقل المركب بعد ذلك إلى بلاسميد السلالة C58 من البكتريا الزراعية *Agrobacterium tumefactiens*. تم استخدام هذه الطريقة لإنتاج صنف تجاري من الكوسة معدلة وراثياً يحتوي على الغلاف البروتيني للسلالة الفيروسية التي استخلصت من الشمام.

ونتيجة لعدم وجود مصادر طبيعية لمقاومة هذا المرض في القرعيات فإن استخدام تقنية المقاومة المشتقة من الفيروس تمثل البديل لاستنباط أصناف مقاومة لهذا المرض وللأمراض المسببة بواسطة الفيروسات الأخرى التي تنتمي إلى هذه المجموعة Comoviruses.

الباب الثامن

البكتريا الزراعية بوصفها وسيطاً لنقل الجينات

Agrobacterium *tumefaciens* mediated gene transfer

هي بكتريا أرضية تصيب الأجزاء المجروحة في عدد كبير من الأنواع النباتية وتشجع تكوين الغدد التاجية و الجذور الشعرية في النباتات، وذلك عن طريق إدخال قطعة من الحمض النووي DNA موجودة خارج نواة الخلية تسمى بالبلاسميد، والذي ينقل من البكتريا لداخل خلايا النبات (Zupan *et al*., 2000). يدخل الحمض النووي المنقول من البكتيريا (T-DNA) ويضمن بداخل جينوم نواه الخلية النباتية، من ثم يحدث التعبير الخاص به. يشفر الحمض النووي المنقول لإنزيمات خاصة بتمثيل الفيتوهرمونات و للبروتينات التي تؤثر على حساسية الخلية النباتية للفيتوهرمونات. ينتج عن التعبير عن هذه الجينات تكوين العقد البكترية أو الجذور الشعرية. يحتوي الحمض النووى المنقول T-DNA أيضاً على التشفير لإنزيمات محددة، تدخل في تكوين وإفراز ما يسمى بالأوبينات Opines، وهي مشتقات من الأحماض الأمينية والتي تستغلها البكتريا مصدراً للغذاء.

نقل الجين بواسطة البكتريا الزراعية:

تكمن أهمية البكتريا الزراعية في تطبيقات الهندسة الوراثية في مقدرتها الطبيعية على نقل قطعة من الحمض النووي DNA إلى داخل خلايا النبات. لاستخدام البكتريا الزراعية في تحوير النباتات هنالك اختبارات عددية يجب إجراؤها في كل من البكتريا والنبات (Kerr and Bisbane, 1983)، و التي تتضمن الخطوات الآتية:

1. تحديد السلالة من البكتريا التي يمكنها إصابة الطراز الوراثي المحدد Genotype، ويشمل ذلك دراسة وتطوير الحمض النووي المنقول T-DNA؛ وذلك لتسهيل التعبير عن الجينات التى يحملها في داخل خلايا النبات.
2. نقل الحمض النووي المنقول T-DNA لداخل السلالة البكترية، حيث يجب أن يكون

الباب الثامن

البكتريا الزراعية بوصفها وسيطاً لنقل الجينات

Agrobacterium *tumefaciens* mediated gene transfer

3. سهولة انتخاب الخلايا المحورة واستزراعها عن طريق زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات كاملة. لذا فإن البكتريا الزراعية يمكنها أن تلعب دوراً مهماً في تربية النبات وتطوير الأصناف؛ وذلك عن طريق تضمين الجينات المراد نقلها لداخل بلاسميد البكتريا، ومن ثم نقلها لخلايا النباتات.

تصنيف البكتريا الزراعية:

قسم العلماء Kerr and Brisbane في العام 1983 سلالات البكتريا الزراعية إلى ثلاثة أنواع بيولوجية Biotypes، والتي يمكن أن تعتبر أنواعاً منفصلة:

1. *A. tumefaciens*
2. *A. rubi*
3. *A. rhizogenes*

تحدد خواص البكتريا الزراعية التي تمكنها من تكوين العقد البكتيرية و الشعيرات الجذرية بواسطة محتوى البلاسميد Ti أو البلاسميد Ri، على التوالي، للسلالة البكترية المحددة. لا يمكن اعتبار كل السلالات التي تكوّن عقداً ساقية تابعة للنوع *A. tumefaciens*، كما لا يمكن اعتبار كل السلالات التي تكون جذوراً شعرية تابعة للنوع *A. rhizogenes*. يمكن أن يحدث إنتخاب بعض السلالات البكترية التي تحتوي على البلاسميد الآخر الذي لا يتميز به النوع الذي تتبع له. لذا يفضل تحديد سلالة البكتريا الزراعية اعتماداً على البلاسميد. عموما، تسمى البلاسميدات على حسب السلالة البكترية الأم التي عزلت منها. يبلغ طول الحمض النووي المنقول من الخلية البكتيرية إلى خلايا النبات بين 14- 24 *kb* إلى 42 *kb*، والذي يوجد وسط تسلسل من القواعد يبلغ طوله 25 *bp*، حيث إن أي تسلسل يقع بين هذه القطع يمكن تضمينه إلى داخل DNA الخلية النباتية.

هنالك موقعان آخران على البلاسميد، الأول هو موقع العدوى أو إحداث الإصابة؛ والذي يتضمن الجينات المسئولة عن مهاجمة الخلية النباتية ونقل الحمض النووي المنقول بواسطة بلاسميد البكتيريا، ومن ثم تضمينه في جينوم

الخلايا النباتية. أما الموقع الآخر فيحتوي على جينات مسئولة عن صناعة وتمثيل الأوبينات، لذا فإنه يسهل على البكتريا استخدام هذه الأوبينات للغذاء في داخل العقد البكتيرية والجذور الشعرية.

الأوبينات Opines:

تفرز الأوبينات من خلايا النبات المحورة في المواقع بين الخلوية التى تعيش فيها بكتريا العقد أو الجذور الشعرية. لا يمكن تمثيل هذه المكونات بواسطة خلايا النبات، ولكنها تكون مصدراً لتوفير الكربون والنيتروجين للبكتريا (Petit and Tempe. 1985).

هنالك جينات تحمل في البلاسميد تختص بصناعة الأوبينات، و تعمل على تحديد نوع الأوبين المنتج بواسطة خلايا العقد البكتيرية أو خلايا الجذور الشعرية. عموما، فإن السلالة البكتيرية التي تحمل الجينات المحددة لصناعة أوبينات معينة، تحمل أيضاً الجينات الخاصة بتمثيل هذه الأوبينات في البلاسميد. لذا فإن سلالات البكتريا الزراعية تصنف على أساس نوع الأوبين الذي تُشفر له في داخل البلاسميد .

عدائية البكتريا الزراعية Pathogenicity of Agrobacterium:

يستمر نمو العقد البكترية والجذور الشعرية حيث يحدث ذلك نتيجةً للتعبير عن الجينات المضمنة بداخل الحمض النووي المنقول T-DNA، و بدون إضافة هرمونات خارجية. يمكن أن تكون هذه الجينات مسئولة عن إنتاج الفيتوهرمونات ،الجين *Onc*، في حالة البلاسميد Ti أو زيادة الحساسية للأكسينات، الجين*Rol* ، في حالة البلاسميد Ri . يستمر نسيج العقد البكترية في النمو بوصفه نسيجاً غير متخصص Callus، بينما تستمر الجذور الشعرية في النمو في شكل جذور شديدة التفرع (Tepfer. 1989).

يعمل جين إنتاج العقد البكتيرية على تشجيع تكوين هذه العقد في عدد كبير من المحاصيل، كما يعمل على حفظ ، نمو وانقسام الخلايا الجسمية في

صورة غير متخصصة. أما الحمض النووي المنقول T-DNA في البلاسميد Ri، فيتميز بوجود أربعة جينات وهي *rolA*، *.rol B*. *rol C* , *rol D* يؤدي نقل هذه الجينات لداخل خلايا النبات والتعبير عنها إلى تكوين الجذور الشعرية .(Meyer *et al*.. 1995)

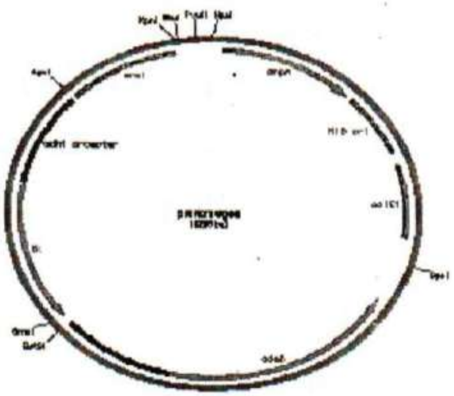
المدى العائل للبكتريا الزراعية Host range of *Agrobacterium*:

هنالك مدى واسع من النباتات ذات الحساسية و الاستجابة لتكوين العقد والجذور الشعرية نتيجة للإصابة بالبكتريا الزراعية. غالباً ما تكون العوائل للبكتريا الزراعية هي النباتات ذات الفلقتين و النباتات غير المزهرة gymnosperms ، ولكن تتضمن العوائل البكتيرية أيضا بعض النباتات ذات الفلقة الواحدة. لذا يجب دراسة خصوصية العلاقة بين الطراز الوراثي للنبات وبين السلالات المختلفة من البكتريا الزراعية.

البلاسميدات البكتيرية The plasmid:

يتكون البلاسميد البكتيري من شريطين مزدوجين دائريين مغلقين من جزيئ الحمض النووي DNA، ويتراوح طوله من 1 *kb* إلى أكثر من 200 *kb*. توجد البلاسميدات في عدد كبير من الأنواع البكترية بوصفها وحدة جينية مساعدة، حيث تتكاثر بمعزل عن الكرموزوم الأساسي للبكتريا. الشكل8.1 يوضح تركيب البلاسميد PNR 21 Ogck 8288 tp. تعتمد بلاسميدات البكتريا على إنزيمات وبروتينات مشفرة بواسطة خلايا النبات العائل بغرض تكاثرها واستنساخها. تحتوي البلاسميدات على جينات مشفرة لإنتاج إنزيمات مفيدة للعائل تحت ظروف محددة. عموما، فإن البلاسميدات المختلفة تستخدم مجموعة من الإنزيمات المختلفة الخاصة بكل بلاسميد، وتتكاثر لمستويات مختلفة في داخل العائل، حيث نجد إن بعض البلاسميدات تتكاثر إلى ما يفوق 700 جزيئ بلاسميد في الخلية الواحدة بينما نجد أن بعضها تحتفظ بعدد واحد جزيئ بلاسميد في خلية العائل. يتحكم في عدد البلاسميدات المتكاثرة بداخل

الخلية النباتية جين يوجد في داخل البلاسميد نفسه. تحتوى البلاسميدات البكتيرية على موقع واحد للتكاثر مع وجود قطعة متحكمة في التكاثر ومرتبطة مع هذا الجين. تسمى الوحدة الكاملة للتكاثر بالربلكون Replicon. تحتوى البلاسميدات عادة على وحدة واحدة للتكاثر. أما في حالة البلاسميدات التركيبية التي تنتج عن طريق إلتحام البلاسميدات مع بعضها؛ فإنها تحتوي على أكثر من ربلكون واحد، ولكن يعمل أيضا ربلكون واحد فقط في هذه الحالة على إكمال عملية التكاثر. وبصورة عامة فإن البلاسميدات التي تحتوي على نفس النظام التكاثري لا يمكن أن توجد مع بعضها في صورة مستقرة.



الشكل :9.1 تركيب البلاسميد (PNR 21 Ogck (8288 tp

أساسيات نقل الجينات بواسطة البكتريا الزراعية Principles of gene transfer by *Agrobacterium*:

تتمثل الخطوة الأولي في نقل الجينات بواسطة البكتريا الزراعية في التصاق البكتريا بالخلايا النباتية عند مناطق مجروحة. طبيعة استجابة الخلايا النباتية لإلتصاق البكتريا غير محددة حتى الآن، غير أن وجود مستقبلات للبكتريا بالخلايا النباتية يعتبر من أهم العوامل التي تحدد مدى العائل البكتريا الزراعية. هنالك اعتقاد بأن للخلية النباتية دوراً سالباً في هذه العملية. بجانب النشاط المركب للبروتينات التي تنتجها جينات العدوى في البلاسميد. أثبتت التجارب

التي أجريت حديثاً مشاركة فاعلة للكرموزوم البكتيري الذي يوجد بداخل النواة في هذه العملية. كما تلعب الجينات المعدية(*Chv A* ، *chv B. Pst A and att*) دورا فاعلا، حيث تؤثر على تصنيع وإفراز سكريات معقدة مثل *Beta -1*، glucan-2 و Succinoglycan؛ حيث إن أي طفرة في هذه الجينات يمكن أن تؤدي إلى تعطيل مقدرة البكتيريا للالتصاق بالخلايا النباتية وبالتالي عدم إكمال العدوى.

تتكون العقد البكترية في النباتات عن طريق تأثير بعض الجينات التي تحتويها قطعة الحمض النووي المنقول T-DNA، والتي تنتقل من البكتريا للنبات. لذا يمكن للحمض النووي المنقول T-DNA نقل أي قطعة من الحمض النووي DNA وضعت بين نهايتيه، والتي تحدد بتسلسل مكوّن من 25 bp عند نهايتي الحمض النووي المنقول، مما مكّن من استخدام البكتريا الزراعية في التحوير الوراثي في النباتات.

عند استخدام البكتريا لتحوير النبات، يجب أولا دراسة العلاقة بين النبات والسلالة البكترية؛ حيث يجب اختبار عدد كبير من سلالات البكتريا الزراعية في عدد كبير جداً من الأطرزة الوراثية للمحصول. مثال لذلك: للحصول على نبات فول صويا محوّر وراثيا، قام العالم Hinchee و آخرون في العام 1988 بتجريب مائة سلالة، لمعرفة مدى استجابتها للتحوير عن طريق البكتريا الزراعية *A. tumefaciens*، ومن ثم قاموا باختيار ثلاث منها فقط. هنالك عوامل أخرى تتحكم في العلاقة بين العائل والسلالة البكتيرية، تشمل عمر النبات و نوع النسيج النباتي المستخدم والحالة الفسيولوجية للنبات قبل إحداث العدوى. هنالك عدة نظريات لتوضيح عدم مقدرة البكتريا الزراعية لتكوين عقد بكترية وجذور شعرية في معظم الأنواع النباتية ذات الفلقة الواحدة، وعدد آخر من النباتات غير الحساسة للإصابة بالبكتريا الزراعية، تشمل:

1. عدم مقدرة البكتريا الالتصاق بجدران الخلايا النباتية.
2. عدم نشاط الجينات المهيئة بالبلاسميد و جينات العدوى.

3. غياب التوازن بين هرمون الأكسين والسيتوكاينين في داخل خلايا النباتات ذات الفلقة الواحدة.

4. وجود استجابة كبيرة في الأنسجة النباتية المجروحة يعد من أهم العوامل لإنجاح عملية التحوير الوراثي (Potrykus, 1990).

الخطوة الأخيرة في عملية نقل الحمض النووي T-DNA هي تضمين الشريط الأُحادي (ssDNA) واستقراره في داخل الكرموزوم النباتي. ميكانيكية عملية التضمين هذه غير معروفة حتى الآن. غير أنه بعد الدخول إلى النواة يتحول شريط الحمض النووي الناقل T-DNA إلى صيغة شريط مزدوج بواسطة نشاط جينات العدوى في داخل الحمض النووي الناقل.

ميكانيكية نقل الجينات Gene cloning:

وهي عملية بسيطة، تشمل قطع الحمض النووي DNA للبلاسميد بواسطة إنزيم مقيد وربطه معمليا بالحمض النووي الغريب المراد نقله. ومن ثم يستخدم البلاسميد الناتج Recombinant plasmid لتحوير البكتريا. عملياً يجب اختيار البلاسميد الناقل جيدا، وذلك لتقليل الجهد المبذول لعزل وتحديد البلاسميد المحتوي على الحمض النووي الغريب (Sambrook *et al*., 1990).

يعتبر استخدام البلاسميدات الآن الطريقة الفاعلة في عملية النقل الجزيئي للجينات، وذلك لمقدرتها العالية على نقل أى قطعة حمض نووي DNA توضع بداخل الجزء المنقول من البلاسميد للنبات وسهولة التعامل معها. تعمل البلاسميدات أفضل من أي وسيط آخر لنقل الجينات، خصوصا عندما يكون التركيب البنيوي للحمض النووي DNA المراد نقله بسيطا، أي أقل من 10 Kb.

تكمن الصعوبة الرئيسية في نقل الجينات في كيفية التمييز بين البلاسميدات التي تحتوي على الجسم الغريب والأخرى التي تتكاثر بدون دخول الجسم الغريب فيها.

ربط الحمض النووي الغريب للبلاسميد:

تتضمن عملية ربط قطعة الحمض النووي DNA الغريب لنهايتي البلاسميد خطيا تكوين روابط جديدة بين مجموعة الفسفور عند النهاية '5 للحمض الأميني المزدوج، ومجموعة الهيدروكسيل عند النهاية '3 المجاورة. فعندما يحمل الشريطان المكونان للبلاسميد نهايات مجموعة فسفور '5 يتم تكوين أربع روابط Diester bonds بين نهايات البلاسميد ونهايات الحمض النووي الغريب، لتكوين هجين البلاسميد والجسم الغريب، ثم يتم إدخال الهجين الناتج إلى داخل الخلية البكترية المناسبة.

هنالك جينات انتخابية (Selectable markers) تعمل على عزل الخلايا المحورة، توجد هذه الجينات في داخل البلاسميد وهي عبارة عن جينات تعمل على مقاومة المضادات الحيوية مثل الأمبسلين (Ampicillin)، تتراسايكلين (Tetracycline)، الكنامايسين (Kanamycin)،النيومايسين (Neomycin)،والكلوروفينكول (Chlorophenicol). معظم البلاسميدات الأكثر استخداماً الآن هي البلاسميدات المشتقة من البلاسميد pMB_1 والذي تم عزله من عينة إكلنيكية.

البلاسميد Bin 19

باكتشاف البلاسميد Bin 19 كبلاسميد مركب (Binary vector) الذي يعمل كوسيط لنقل الجينات وتحوير النباتات عبر البكتريا الزراعية، أمكن لعدد كبير من العلماء دراسة التعبير الجيني في النبات، ونقل الجينات التي تتحكم في خواص مهمة لداخل المحاصيل النباتية. كمثال للبلاسميدات المستخدمة لنقل الجينات سنتناول بالتحليل تركيب البلاسميد Bin 19.

يحتوي البلاسميد Bin 19 على تسلسل يبلغ طوله حوالي11777 bp . من أجل المقدرة على التكاثر في كلٍ من بكتيريا القولون والبكتيريا الزراعية، تم استخدام المنطقة الخاصة بالتكاثر في البلاسميد pRK2 في صنع البلاسميد

Bin 19، وهي منطقة ذات مقدرة على التكاثر في عدد كبير من العوائل (Frisch *et al*.. 1995).

يتم إدخال الحمض النووي المنقول إلى داخل البلاسميد بالتدريج في معظم الحالات من اليمين للشمال (Wang *et al*.، 1984) لذا لا يمكن ضمان دخول القطع الكبيرة من الحمض النووي المنقولة كاملة. يحتوي البلاسميد Bin 19 على الجين *npt II*، الذي يحتوي على طفرة تؤثر في نقص مقاومة النباتات المحولة وراثياً للمضادات الحيوية مثل الكنامايسين و G418 بمقدار أربع مرات (Yanofsky *et al*.، 1990). كما يحتوي البلاسميد على تسلسل يقع بين زوجي القواعد 9406 – 9399 يساعد على زيادة مقدرة نقل الحمض النووي للخلايا النباتية.

تلعب القطع الموجودة خارج الجزء المنقول T-DNA في البلاسميد أيضاً وظائف حيوية، حيث تحتوي على قطعة بطول *bp* 616 مشابهة للموقع PRK_2 الخاص بالتكاثر، كما تحتوي على الجين *nptIII*، الذي يحتوي على دليل انتخابي خاص بعزل خلايا بكتيريا القولون و البكتيريا الزراعية التي تحتوي على البلاسميد، إضافة لتسلسل *bp* 1482 المحتوي على الموقع *trfA* المشفر لبروتينين يختصان بتسهيل عملية تكاثر البلاسميد. كما يحتوى أيضا على قطعة بطول *bp* 379 التي تحتوى على التسلسلين *ori* و *ini*، إلا أنه لايعتقد بأن لها وظيفية وذلك لعدم احتوائها على التسلسل الذي يدخل في صنع البادئ RNA، وهو مركب مهم جداً لبداية تكاثر البلاسميد. يحتوي الموقع خارج الحمض النووي المنقول أيضاً على الجين *KLa*، وهو جزء من موقع قاتل للخلية العائل إذا لم يتم ضبطه (Frisch *et al*.، 1995).

تتضمن المقترحات الإضافية المرغوبة لتطوير البلاسميد Bin 19 تعديل الطفرة الطرفية في الجين *npt II* لزيادة المقاومة للكنامايسين، وتضمين تسلسلات مثل الاكتوبين تعمل على تسهيل نقل أكبر كمية من الجين المطلوب نقله الى الخلايا النباتية.

كيفية إدخال الجينات للجينوم النباتي بواسطة البكتريا الزراعية Agroinoculation:

في تجربة أجريت بمعهد CNRS بجمهورية فرنسا تم استخدام السلالة LA 4404 من البكتريا الزراعية *A tumefaciens* لنقل جزيئ الحمض النووي لفيروس مرض التقذم الفيروسي في البطيخ Watermelon chlorotic stunt virus معمليا، وهو مرض فيروسي تم اكتشافه حديثا يصيب كل المحاصيل التي تنتمي للعائلة القرعية متسببا في خسارة محصولية كبيرة. يتكون هذا الفيروس من جزيئين من الحمض النووي (DNA-A و DNA-B)، تم إدخالهما كلٍ على حدة في بلاسميد البكتيريا وحفظهما، و من ثم تم استغلالهما بغرض الانتخاب ضمن برامج التربية لمقاومة هذا المرض، حيث يجب أن يتم إدخالهما سويا للنبات لإحداث العدوى. تم في كل دورة انتخابية تحضير 800 مل من المحلول المغذى Yeb media الذي يحتوى على 100 mg/ لتر كانامايسين، وبعد تجهيز المحلول قُسم المحلول في دورقين سعة كل منهما250 مل، وأضيفت البكتريا المحتوية على الجينومين DNA ،DNA –B - A – كلٍ على حدة لدورق وغطي الدورقين ووضعا على جهاز هزاز بسرعة 200 *rpm*، ثم تركت البكتريا بداخلهما لتنمو عند درجة حرارة 28 ^{o}م لمدة 48 ساعة. وبعد تجهيز الجينومين كل على حده، تم تحويل المحلول في الدورقين إلى أنبوبين محكما القفل وذلك لتجنب تسرب المحلول عند الدوران بسرعة عالية. ترك الأنبوبتين للدوران بسرعة 9000 *rpm* لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20 ^{o}م حتى تترسب البكتيريا إلى أسفل في الأنبوبين. تلي ذلك التخلص من المحلول العلوي في الأنبوبين وتذويب الحمض النووي البكتيري في كل أنبوب بإضافة 20مل من الماء المقطر، ومن ثم خلط المحلولين واستخدم المحلول الناتج مصدر عدوى لحقن النباتات بغرض الانتخاب.

حقنت النباتات في مرحلة الورقة الرابعة أي بعد 3 – 4أسابيع من الزراعة، حيث تم أولاً إزالة الأوراق الكبيرة في النبات، ومن ثم حقنت البادرات بمحلول البكتريا الخليط في داخل ساق النبات أو عروق الأوراق (1 مل لكل نبات)،

كما هو موضح في الشكل 8.2 تركت بعد ذلك النباتات لتنمو عند درجة حرارة 26–30°م ورطوبة نسبية 60.0 % بطول نهاري 12 ساعة في اليوم في غرفة نمو مغلقة. ظهرت أعراض الإصابة بالمرض بعد 10– 12يوم من عملية الحقن في السلالات الحساسة للمرض. وتمت عملية الغربلة screeningبعد 21–30يوم من الحقن عن طريق مشاهدة الأعراض الظاهرية للمرض. ثم أخذت قطعة من الأوراق النامية من النباتات المختلفة وضغطت على غشاء سيلولوزي، ثم هجنت بالمسابير أو المشعة (P^{32}-labeled probe)، على نحو ما سيرد لاحقاً، لانتخاب النباتات المقاومة التي لا تحتوي على الحمض النووي للفيروس. يتغير لون البصمات التي تحتوي على الحمض النووي للفيروس للون الأزرق. كما يمكن قزاءة كمية الحمض النووي في كل بصمة باستخدام نظام التقدير الفسفوري للإصابة (Phospho-imager assessment) .

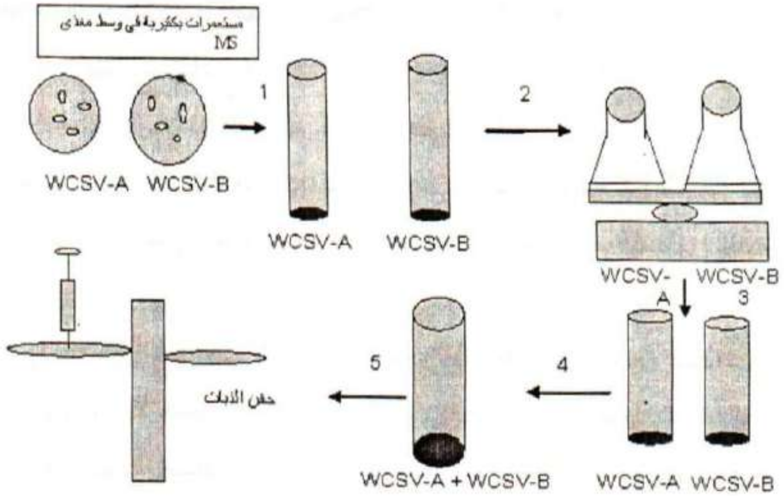
عملية التهجين Hybirdization:

أولاً: تجهيز محلول المسبار المشع Radioactive probe:

في نفس هذه التجربة . أخذت 50 *ng* من قطعة DNA من جينوم فيروس WCSV-SD-A الذي جُمع في السودان طولها 2.8 *Kb* واستخدامها كشريط لبداية عملية الإكثار. وضعت هذه القطعة في 10 مل من الماء المقطر وخلطت مع بادئ عشوائي Random primer. تم تسخين الخليط عند درجة حرارة 95 °م لمدة خمسة دقائق قبل إضافة 3 مل من محاليل dNTP كل على حدة و500 جم من خليط dCTP – alpha P^{32} ، على التوالي . ثم أضيف 1 مل من إنزيم كلنو (Klenow long fragment)، وحفظ المحلول عند درجة حرارة 37 °م لمدة 30 دقيقة. بعد تجهيز الحامل المشع تم اختبار كل الأجهزة والمعدات للتأكد من خلوها من الإشعاع .

ملحوظة : سوف يتم تقديم وصف تفصيلى لتجهيز المسابير المشعة في الباب القادم.

الشكل 8.2 : يوضح عملية إدخال فيروس Wcsv في البكتريا الزراعية واستخدامها في عملية الغربلة بغرض إنتخاب النباتات المقاومة .



الخطوات:

الخطوة الأولي: يتم تحضير 800 مل من المحلول المغذي Yeb media الذي يحتوي على 100 mg/ لتر كانامايسين، ثم يقسم المحلول في زورقين سعة كل منهما 250 مل، و تضاف البكتريا المحتوية على الجينومين ، DNA-A DNA -B كل على حدة لزورق منفصل .

الخطوة الثانية: يصب الوسط المغذي المحتوي على البكتيريا في زورق مخروطي، وتترك البكتريا لتنمو عند درجة حرارة 28 ^{o}م لمدة 48 ساعة بسرعة 200 *rpm* .

الخطوة الرابعة: تترك الأنبوبتين للدوران بسرعة 9000 rpm دورة للدقيقة لمدة 20 دقيقة عند درجة حرارة 20 ^{o}م ليتم ترسيب البكتيريا.

الخطوة الثالثة: يتم أخذ كريه البكتيريا (pellet) من كل أنبوب و إذابتها في 20 مل من الماء المقطر كل على حدة.

الخطوة الرابعة: يدمج محلول البكتيريا في الأنبوبين.

الخطوة الخامسة: تحقن النباتات ثم توضع في غرفه النمو لتتم غربلة النباتات للمقاومة اعتمادا على الأعراض الظاهرية بعد 21-30 يوم من الحقن.

ثانيا: تجهيز الحمض النووي المضمن Incorporated DNA:

تم إضافة 100 مل من قطعة Salmon DNA و 15 مل من محلول mM NaCl (5M) للخليط السابق ثم أضيف الإيثانول بمقدار ثلاث أحجام للخليط. حُرك الخليط بعد ذلك لمدة 10 دقائق بسرعة $10X13^{3}$ *rpm* . تم بعدها التخلص من المحلول وأضيفت 4000 مل من الماء المقطر لقطعة الحمض النووي.

تم فصل شريطي الحمض النووي DNA بالتسخين عند درجة حرارة 95 °م لمدة 15 دقيقة، ثم وضع الأنبوب مباشرة فوق ثلج لتجنب إعادة تزاوج الأشرطة. تمت إضافة هذا المحلول بعد ذلك مباشرة للغشاء الموجود بداخل الأنبوب المحتوي على المحلول المنظم للتهجين، كما وصف سابقاً. وترك المحلول ليتحرك لمدة 12 ساعة. عند هذه الخطوة تم أخذ 1مل من المحلول المحتوي على الغشاء و1 مل من محلول الحمض النووي، وأضيفتا فوق قطعة صغيرة من الغشاء النيتروجيني لقراءة معدل تضمين الحمض النووي (Incorporation rate). غسل الغشاء لعدة مرات بواسطة الماء المقطر وغطي من أعلى وأسفل بنسيج خاص (Intercalating tissue)، ثم وضع الغشاء في داخل أنبوب أسطواني وترك ليدور لمدة ساعة عند درجة حرارة 65 °م في محلول قبل التهجين Prehybridization solution، قبل إجراء عملية التهجين بين الحمض النووي في الغشاء و المسبار المشع .

بعد إتمام عملية التهجين، حسب ما ذكر أعلاه، تم غسيل الغشاء بمحلول 0.1% SDS لمدة ساعة عند درجة حرارة 65 ^{0}م لمدة 15 دقيقة، وبعدها غسل الغشاء بالماء المقطر واستخدم في عملية تصنيع الفيلم و التحليل الكمي لجزيئات الفيروس في كل عينة.

لإنتاج نباتات محورة وراثياً عن طريق تحوير أقراص من أوراق الطماطم، وزراعة هذه الأنسجة للحصول على نباتات كاملة ثم انتخاب النباتات المحورة وراثيا.

2.4. إنزيمات الرايبوز Ribozymes:

وهي جزئيات RNA مساعدة تعمل على حدوث انقسام محدد في الحمض النووي RNA في صورة ترانس (trans). لذا فعند وجودها في النباتات المحورة وراثياً فإن لها القابلية على تعطيل الحمض النووي RNA للفيروس في هذه المواقع. تعمل هذه الجزيئات على إكمال تسلسل RNA الفيروس في مواقع محددة في عملية تهجين بينها وبين تسلسل الحمض النووي RNA في الفيروس، كما تعمل على انقسامه. اشتقت إنزيمات الرايبو الأكثر استخداماً الآن في النباتات من تسلسل الفيروس Tobacco ring spot virus.

3.4. استحساس إنتاج أجسام مضادة في النبات:

هنالك تجارب تجرى على هذا النوع من المقاومة، وذلك بغرض تعطيل عمل الفيروس، وذلك عن طريق إنتاج أجسام مضادة في النبات (Hiatt *et al.*, 1989).

4.4. تداخل RNA خاطئ Defective interfering RNAs:

تشمل تداخل تسلسلات خاطئة من الحمض النووي RNA و DNA على حدٍ سواء. وهو عبارة عن جينوم فيروسي تم حذف تسلسل داخلي منه. تنتج هذه الجزيئات أثناء تكاثر فيروسات معينة بحذف تسلسلات محددة من الفيروس و استبدالها بتسلسلات أخرى تعمل على تأخير تكاثر الفيروس. تعمل هذه الجزيئات على تغيير اتجاه التكاثر من الجينوم الفيروسي إلى هذه الجزيئات، وبالتالي تقلل كثيراً من كمية الفيروسات المسببة للإصابة ومن أعراض المرض. أظهرت النباتات المحورة عن طريق DI-RNAs أوDI- DNAs أو ميكروستلايت RNAs مقاومةً للتكاثر، و تقليلاً في أعراض المرض. استخدمت هذه التقنية في كل من مجموعة فيروسات Tobomoviruses وفيروسات ... مقاومة مرض ذبول الطماطم الفيروسي

الإستراتيجية الجزيئية للتفاعل بين البكتريا الزراعية وعوائلها:

تكوين العقد البكتيرية بواسطة البكتريا الزراعية:

تحدث البكتريا الزراعية العقد الجذرية في النباتات بإدخال قطعة من الحمض النووي الخاص بها إلى داخل خلايا النبات. تعمل هذه البكتريا على إنتاج نوعين من المركبات، وهي المركبات الفينولية وعدد كبير من أنواع السكر النباتي. تتفاعل هذه الجزيئات مع بروتين العدوى Vir A، الذي ينشط بدوره بروتين العدوى Vir G، الذي ينشط استنساخ كل جينات العدوى الأُخرى بعد ربطها بمواقعها المهيأة. تنتمي بروتينات العدوى Vir A و Vir G إلى نظامين للتحكم في عملية الفسفرة ونقل الفسفور. يشفر الموقع الجيني $Vir\ D_2$ لموقع قطع داخلى يقطع عند النهايتين اليمني واليسري في الحمض النووي المنقول T-DNA. يتفاعل بروتين العدوى $Vir\ C_1$ مع بروتينات $Vir\ D_1$ و Vir D_2ويرتبط معها لزيادة فعالية نقل الحمض النووي. وقد وُجد أن البروتينات الناتجة عن الجين Vir E ذات علاقة بالغشاء السيتوبلازمي. يعتقد أن مكونات هذه البروتينات تحدث الثقب الذي من خلاله يخرج الحمض النووي المنقول T-DNA من الخلية البكترية.

الخواص العامة لتكوين العقد البكتيرية:

تحدث البكتريا الزراعية مرض العقد البكترية في عدد كبير من النباتات ذات الفلقة الواحدة، وذلك عن طريق نقل قطعة صغيرة من البلاسميد التي تشجع عمل العقد إلى داخل الخلية النباتية. يعمل الحمض النووي المنقول والمضمن الى داخل خلايا النبات (T-DNA) على صنع اثنين من منظمات النمو (الأكسينات ومجموعة من الأحماض الأمينية تسمى بالأوبينات). يؤدي التعبير عن الجينات المختصة بإنتاج الفيتوهرمونات إلى تكوين العقد البكترية. يحتاج نقل الحمض النووي من البكتريا لخلايا النبات لعدد من الجينات الموجودة على البلاسميد المنقول Ti، والتي يطلق عليها أسم جينات العدوى. لا يمكن لهذه الجينات إحداث

التعبير الخاص بها عندما تكون البكتريا خارج الخلية النباتية، حيث تعمل الخلية النباتية على تنشيط عمل هذه الجينات بواسطة هاضمات تُصنّع عند منطقة الجروح في النبات. يعد التفاعل بين البكتريا الزراعية والنبات فريدا من نوعه، حيث أنه في النهاية يتم نقل وتضمين لقطعة من الحمض النووي البكتيري في داخل الكرموزوم النباتي. يمكن اعتبار التفاعل بين البكتريا الزراعية والنبات نظاماً قياسياً لعدد كبير من التفاعلات بين النباتات والأنواع الأخرى من البكتريا، حيث يتضمن ظواهر عديدة مشتركة تشمل التصاق البكتريا بالخلية العائل، تنشيط الجينات المطلوبة لإحداث العدوى بواسطة النبات وإنتاج فيتوهرمونات وأكسينات وسيتوكينين تؤدي بدورها إلى ظهور أعراض الإصابة بالمرض (أعراض تكوين العقد)، كما مبيّن في الشكل 8.3. تعد كل هذه الظواهر مشتركة في تفاعل الأنواع الأخرى من البكتريا مع النباتات.

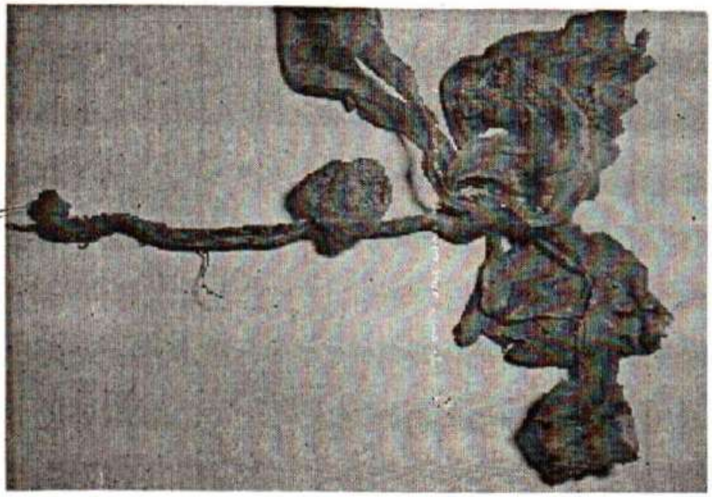
ربط البكتريا مع الخلايا النباتية:

هنالك دلائل كثيرة تشير إلى أهمية ربط البكتريا الزراعية مع الخلايا النباتية لتكوين العقد التاجية. تم التعرف على عدد من الطفرات في البكتريا الزراعية، والتي تشير الى ثلاثة مواقع جينية تعمل على ربط البكتيريا بجدران الخلايا وتسمى *chr*، حيث أظهرت هذه الطفرات عدم مقدرتها على الارتباط بالخلايا النباتية، وبالتالي فهي غير معدية للنبات. كما أن كل هذه الطفرات تدخل في صناعة ونقل جزيئات ذات وزن جزيئي بسيط تسمي بالسكريات المعقدة Polysaccharide و الجلوكان B-2. 2-glucan

تكون جينات العدوى حوالي 35 *Kb* من الحمض النووي DNA للبلاسميد وهي ضرورية لتكوين العقد الجذرية على الرغم من أنها لا تنقل لداخل النبات. يمكن تقسيم جينات العدوى إلى ست وحدات استنساخ أو ما يسمى بالأوبريونات (Operons)، وهي *Vir A Vir B Vir C Vir D Vir E VirG* . هنالك نوعان إضافيان من الأوبيرونات قد تم تحديدها في موقع العدوى في الأكتوبين

Octopine (*Vir H* و*Vir F*)، لكن لم يتم بعد دراستهما بصورة دقيقة.

عموما، يمكن تمييز جينات العدوى باعتبارها جينات مسئولة عن تكوين العقد البكتيرية، حيث تحتوي السلالات المختلفة من البكتريا الزراعية على جينات عدوى مختلفة. مثال لذلك: تحتوي سلالات البكتريا الزراعية التي تشجع تكوين عقد تصنيع الأكتبينات Octopine على الموقع *Vir H*، أما السلالات التي تشجع تكوين النوبالين Nopaline فإنها لا تحتوي على هذا الموقع الجيني. حيث وجد أن السلالات التي تشجع صنع النوبالين تحتوي على جين معدي في نفس موقع الجين *Vir H* يشفر لصنع هذه المادة.



الشكل 8.3 : يوضح تكوين عقد جذرية في نبات المولِيتة (*Sonchus cornutus*)ناتجة عن الإصابة بالبكتريا الزراعية *Agrobacterium tumefaciens*)، جُمعت فى جزيرة توتى-ولاية الخرطوم (في العام 2007 بجامعة الجزيرة).

الباب التاسع

تجهيز المسابير المشعة من أشرطة

الحمض النووي DNA و RNA

Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes

الباب التاسع

تجهيز المسابير المشعة من أشرطة الحمض النووي DNA وRNA
Preparation of radiolabeled DNA and RNA probes

تعد تقنية تهجين الحمض النووي باستخدام أشرطة موسومة ونيوكليوتيدات مشعة أداة أساسية للتعرف على التركيب الجزيئي للكائنات الحية، كما أن له استخدامات عديدة تشمل توصيف الحمض النووي وتحليل الجينات ودراسة التعبير الجيني، ومن استخداماتها العملية أيضا:

1. يتم تحديد تسلسل محدد من أشرطة الحمض النووي المكمل Complementary DNA أو المكتبات الجينومية DNA بواسطة التهجين عن طريق نيكليوتيدات مشعة.
2. لمعرفة تنظيم موقع محدد على الجينوم يستخدم تقنية تهجين سوزرن Southern باستخدام قطعة من الحمض النووي DNA بوصفها مسباراً مشعاً.
3. يعتمد تحليل الاستنساخ الجيني وعملية إنتاج RNA بالكامل على التجارب التي يستخدم فيها إنزيم Nuclease أو انزيم RNAase لهضم هجائن RNA أو DNA المشعة المنتجة من الأحماض النووية الأصل.

تاريخياً وحتى العام 1970،يتم إدخال الإشعاع وتنظيمه في داخل الأحماض النووية بطريقة واحدة، وهي طريقة التوسيم الهضمي Metabolic labeling؛ حيث يتم إدخال طلائع الإشعاع Radioactive precursors (عادة ما تكون نظير الفسفور P^{32}) إلى داخل الخلايا التي تعمل على تصنيع الحمض النووي المرغوب. تتطلب هذه الطريقة استخدام كمية كبيرة من الإشعاع P^{32}، وتقنية عالية لعزل الحمض النووي المرغوب، والذي أدخل فيه الإشعاع، كما تعتبر هذه الطريقة محدودة الاستخدام في عدد قليل من للفيروسات، كما أنها تنتج مسابير ذات نشاط خاص Specific activity ضعيف نسبيا ($1x10^6$- $2x10^6$ cpm/H_2O) . ومنذ السبعينات من القرن المنصرم تم اكتشاف

[illegible] وهما:

1. عملية الفسفرة Phosphorylation: عن طريق إنزيم الكاينيز Bacteriophage T4 polynucleotide kinase؛ حيث يتم انتقال الفسفور من جزيء الطاقة d-ATP إلى النهاية OH /5 في الحمض النووي DNA أو RNA.
2. عملية الإزاحة Nick translation: يستخدم في هذه الطريقة إنزيم البوليميريز DNA polymerase 1 لبكتريا القولون لاستبدال النيكليوتيدات الخالية من الإشعاع في الشريط المزدوج DNA بنيوكليوتيدات موسومة بالإشعاع Labeled nucleotides-p^{32}.

تعتبر هذه التقنيات ذات فاعلية كبيرة وذات استخدام واسع. كما إنها تحتاج لكمية أقل آلاف المرات من الإشعاع مقارنة بالطريقة الأولى، كما تتميز بإنتاج مسابير ذات نشاط خاص كبير مقارنة مع تقنية التوسيم الهضمي. على الرغم من النجاحات التي حققتها الطريقتان إلا أن لهما محددات يمكن اختصارها في الآتي:

1. يمكن لعملية الفسفرة توسيم ذرة فسفور مشعة واحدة كحد أعلى لكل جزيئ من الحمض النووي عند النهاية /5، لذا فإنها تحدد الفعالة الخاصة بالواسم.
2. على الرغم من أن عملية الإزاحة يمكنها إدخال الفسفور المشع عند مواقع مختلفة على طول جزيئ الحمض النووي إلا أنها تنتج قطعاً من الواسم تحتوي على تسلسل من شريطي الحمض النووي المكملين معا، لذلك ففي بعض الأحيان يتم إعادة إتحاد بين شريطي الواسم، مما يعمل على منافسة عملية تهجين الواسم المشع مع شريط DNA المستهدف. لتجنب حدوث ذلك يتم تصنيع واسمات أحادية الشريط مكملة لتسلسل الحمض النووي DNA، ومدخلة في فيج البكتريا Bacterophage M13، أو فيجمد ناقل Phagemid vector، تتم صناعة الواسمات من نواقل أشرطة أحادية وفقا للخطوات التالية:

Bacteriophage [illegible] داخل الفيج البكتيري

M13 أو ناقل فيجميد Phagemid vector.

ثانيا: عزل شريط DNA الأحادي الذي يحمل التسلسل المستهدف.

ثالثا: يتم تصنيع DNA مشع باستخدام بادئ عام مكمل للقطع المطلوبة وإنزيم البوليمريز إضافة إلى ثلاثة d NTPs غير معلمة، و رابعة معلمة بنظير الفسفور المشع P^{32}.

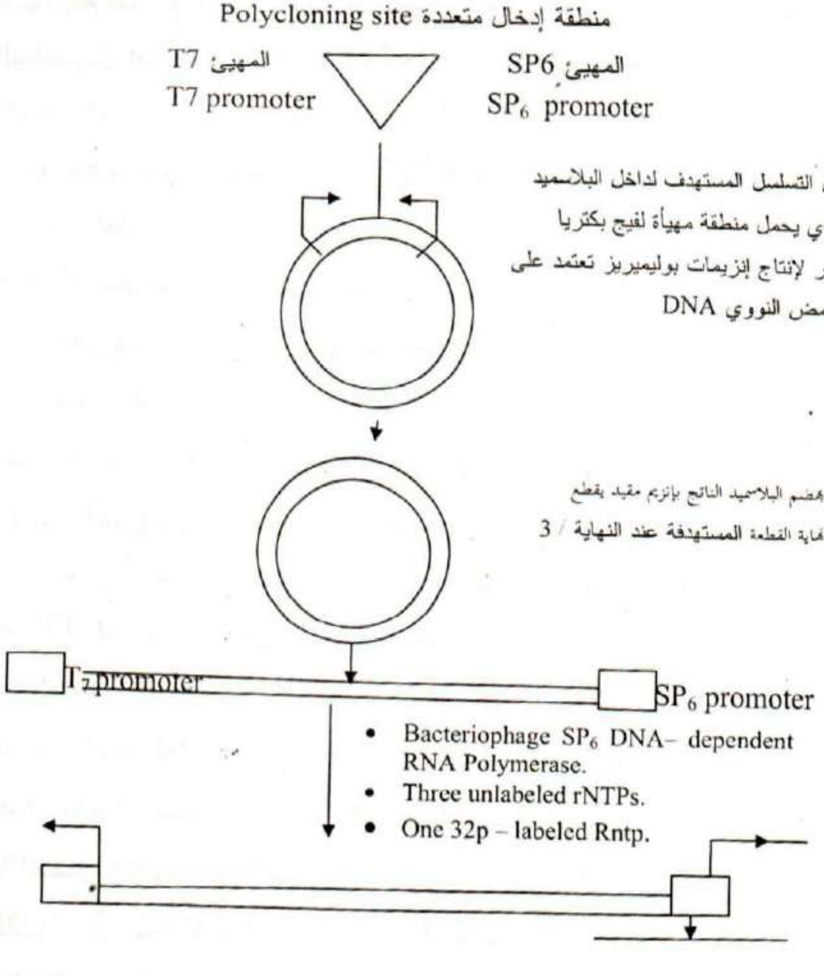
رابعاً: يتم هضم الحمض النووي DNA باستخدام إنزيم مقيد يقطع عند نهاية القطعة المطلوبة.

خامساً: يتم فصل الواسم المشع من الأشرطة غير المعلمة بواسطة التحريف الكهربائي في الجل المناسب مثل جل البولي أكرالمايد .

على الرغم من أن هذه الطريقة تعمل على إنتاج واسمات أحادية ذات أطوال محددة ونشاط خاص عالٍ، إلا أنها تحتاج لجهد كبير لفصل الواسمات جديدة الصنع من الأشرطة غير المعلمة.

حديثاً، تم اكتشاف طريقة بسيطة وفاعلة لاستنساخ قطع الحمض النووي DNA المدخلة في داخل الوسيط الحيوي معمليا بوصفها أشرطة أحادية مشعة من الحمض النووي RNA ، تعتبر الواسمات المصنعة بهذه الطريقة هي الأوسع انتشارا اليوم للاستخدام لأغراض عديدة وذلك لسهولة تصنيعها ولإمكانية فصل هذه الواسمات من شريط الحمض النووي بدون استخدام تقنية العزل أو الفصل الكهربي في الجل. إضافة إلى أن لواسمات الحمض النووي RNA المقدرة على عمل هجائن مع كل من الحمض النووي DNA والحمض النووي RNA، و التي تعتبر أكثر استقرارا مقارنة بالهجين DNA : DNA . كما أن كلاً من الهجين RNA : DNA والهجين RNA : RNA يعتبر مقاوماً للهضم بواسطة إنزيم RNAase، مما يمكن من استخدام هذا الإنزيم لإزالة أي واسم غير محدد بالحمض النووي بدون التأثير على الهجائن RNA : DNA أو RNA : RNA .

الشكل 9.1 : صناعة واسمات RNA معملياً عن طريق الاستنساخ بداخل الخلايا الحية (في داخل النظام الحيوي).



^{32}P – Labeled RNA حمض نووي RNA موسوم بنظير الفسفور P^{32}

صناعة واسمات DNA مزدوجة مشعة:

أولا: الإزاحة في الحمض النووي DNA

يعمل إنزيم البوليمريز E. coli DNA polymerase I على إضافة ... عند النهاية 3' OH، وذلك عند حدوث إزاحة في احد أشرطة جزيئ

الحمض النووي DNA المزدوج. كما أن نشاط إنزيم النيوكليز الذى يقطع الحمض النووي خارجيا يمكنه إزالة نيوكليوتيدات من النهاية /5 وإضافتها إلى النهاية /3، مما يؤدي إلى حركة منطقة الإزاحة على طول الحمض النووي DNA. لذا يمكن تجهيز الواسمات المشعة P^{32}، وذلك بإزالة النيوكليوتيدات الأصلية وإضافة نيوكليوتيدات مشعة تتمتع بنشاط خاص.

المحاليل التي تستخدم في هذه الطريقة:

1. **المحلول المنظم للإزاحة 10 X Nick – translation**

- 0.5 M Tris – Cl (pH 7.5)
- 0.1 M $MgSO_4$
- mM dithiothreitol
- 500 µg/ml bovine serum albumine (Fraction V: sigma)

يقسم هذا المحلول إلى أجزاء صغيرة ويخزن في درجة حرارة 20 – ْم.

2. المحلول المنظم للربط 10 X Ligation

- 0.5 M Tris – Cl (pH 7.6)
- 100 mM $MgCl_2$.
- 100 mM dithiothreitol
- 500 gm/ml bovine serum albumine (Fraction V: sigma) optional

يقسم المحلول ويخزن عند درجة حرارة 20 °م.

3 : انزيم Pancreatic DNAase I

يجهز المحلول المحتوى على الإنزيم Pancreatic DNAase I فى M 0.15 NaCl و %50 جلسرول، ثم يقسم المحلول إلى وحدات صغيرة ويخزن في درجة حرارة 20 °م.

4/ نيوكليوتيدات الديوكسي ثلاثية الفسفور .

يجهز محلول من النيوكليوتيدات المختلفة في صورة ديوكسي dNTP (20mM)

5/إنزيم البوليمريز .

عادة ما يجهز الإنزيم في محلول منظم بحيث يحتوي 1 ul من المحلول على خمس وحدات من الإنزيم .

بروتوكول الإزاحة Protocol for nick translation:

1. اخلط جيدا المحتويات التالية:

التركيز	المادة
ul 2.5	المحلول المنظم للازاحة
µg 0.5	الحمض النووى DNA
n 20 مول	نيوكليودات غير معلمة
p16 مول	نيوكليوتيدات معلمة بالاشعاع
ul 21.5	H_2O

برد المحلول عند درجة حرارة الصفر المئوي .

لتجهيز محلول النيوكليوتيدات غير المعلمة dNTPs، يتم إضافة1 ul من المحلول للنيوكليوتيدات المختلفة. عادة ما يتم خلط 20 n مول لثلاثة dNTPs لإضافته للمحلول مثال لذلك إضافة dATP، dTTP،dGTP، ففي هذه الحالة يتم إضافة محلول النيوكليوتيد الرابع في صورة مشعة (α-P32 dCTP).

2. يتم تحضير محلول مخفف 105 مرة من محلول انزيم Pancrcatic DNAase ملجم/مل في المحلول المنظم المبرد، الذى يحتوي على جلسرول50% ويحفظ عند درجة حرارة 20 -°م، يكون هذا الإنزيم مستقراً في المحلول المنظم عند هذه الدرجة (20 -°م).

3. أضف2.5 مل من محلول DNAase I المخفف (10 ng/ml) للتفاعل ثم اخلط المحلول بالتحريك.

4. أضف 2.5 وحدة من الإنزيم *E.Coli* DNA Polymerase I واخلط جيداً.

5. حضن المجلول لمدة 60 دقيقة عند درجة حرارة 16 ° م.

على الرغم من أن إنزيم البوليميريز يعمل عند تركيز قليل من نيوكليوتيدات الديوكسي dNTPs يصل إلى 2 mM، إلا أن هذا الإنزيم يعمل

بفعالية على صناعة الحمض النووي DNA، وتزداد فعاليته عند إضافة تركيز كبير من هذه النيوكليوتيدات. لتقليل التكلفة عادة ما يتم استخدام أقل كمية ممكنة من النيوكليوتيدات المشعة (mM 5–0.5)، وكمية كبيرة من النيوكليوتيدات غير المشعة (mM 1). لذا فإن الكمية الكلية لمحلول التفاعل 25 مل يجب أن تحتوي على 20 n مول من كل من النيوكليوتيدات غير المشعة و5-16 n مول من النيوكليوتيد المشع. يعتمد النشاط الخاص للواسم المنتج على النشاط الخاص للنيوكليوتيد المشع المستخدم في التفاعل. وبتخفيف النيوكليوتيد المشع بإضافة نيوكليوتيدات غير مشعة مشابهة يمكن تجهيز DNA مؤشراً بالإشعاع و ذي أنشطة خاصة.

كل النيوكليوتيدات المستخدمة الآن تجارياً تباع جاهزة التخفيف للاستخدام المباشر وتتراوح أنشطتها الخاصة بين 400 >- 3000 CI/m mole. عند استخدام α-P32- dNTPs في وجود الإيثانول والماء يجب التخلص أولاً من كليهما.

6. إيقاف التفاعل بإضافة 1 مل من محلول EDTA 0.5 M (pH 8.0).
7. يستخدم اختبار الربط DE -81 binding لتحديد نسبة النيوكليوتيدات المشعة (α-P32 dNTPs التي ضمنت في الحمض النووي DNA.
8. فصل الحمض النووي DNA المحتوي على الإشعاع من النيوكليوتيد المشع المتبقي غير المضمن في الحمض النووي، عن طريق:
   أ. استخدام تقنية الرسم الكروماتوغرافي في عمود سيفادكس Sephadex G-50.
   ب. ترسيب الحمض النووي DNA المزاح عن طريق إضافة الإيثانول.

الطريقة أو البروتوكول البديل لطريقة الإزاحة :

تختلف فعالية عملية الإزاحة باختلاف نوع شريط الحمض النووي المستخدم

... كمية قليلة من الحمض النووى للبلاسميد وفيج البكتريا ملوثات تمنع عملية تضمين النيوكليوتيدات المؤشرة، فعند حدوث تفاعل الإنزيمين DNApolymerase I *E. coli*، RNAase في وقت واحد يبدأ

حدوث فاصل زمني قبل عملية التضمين، يؤدى حدوث هذا الفاصل الزمني لزيادة الزمن المطلوب للإنزيم DNAase I لكي يحدث الإزاحة على الشريط. لتجنب ذلك إضافة RNAase I و *E- coli polymerase* I، على التوالي وليس مع بعضها، في البروتوكول أدناه يتم هضم شريط الحمض النووي DNA أولاً بواسطة إنزيم RNAase عند درجة حرارة 37 °م، ثم يخفف التفاعل، ثم يتم التصنيع عن طريق إنزيم البوليمرييز ، بعد ذلك ، عند درجة حرارة 16 °م. يقل نشاط إنزيم RNAase I بمعدل 20 مرة عند التخفيف وبمعدل حوالي 8 مرات بنقص درجة الحرارة، لذا يمنع تكسير الحمض النووي DNA أثناء تفاعل البلمرة . لذا يمكن تمديد فترة التصنيع مما ينتج عنه تضمين 90 % من النيوكليوتيدات المشعة ، وتصنيع واسمات ذات نشاط خاص يفوق 910 cpm/mg.

الخطوات :

1. اخلط، في أنبوب دقيق، 0.5 ملجم من شريط الحمض النووي المزدوج (في حجم 1 مل) مع 1 مل أخرى من المحلول المنظم و 0.5 ng من إنزيم DNAase I (في حجم يساوي 1 مل). حضن المحلول لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 37 °م.

2. ضع الأنبوب فوق الثلج ثم أضف:

المحلول المنظم للإزاحة	1 مل
نيكليوتيدات الديوكسي غير المشعة بتركيز 5 mM لكل نيوكليوتيد	1 مل
النيوكليوتيد المشع (a-P32) dNTP (sp. Act.>3000 Ci/m mole	5مل

ابدأ عملية التصنيع بإضافة 1 مل من إنزيم البوليمريز (5 وحدات من انزيم E- *coli* polymerase I). اخلط المحلول جيداً عن طريق ضرب الجزء الخارجي من الأنبوب. حرك الأنبوب لمدة 1-2 ثانية. تستمر عملية تضمين الإشعاع في الحمض النووي DNA لعدة ساعات. وللحصول على واسمات ذات نشاط خاص

كبير يحضن التفاعل عند درجة حرارة 16 °م لعدة ساعات حتى يتم تضمين كل النيوكليوتيدات المشعة بالكامل في شريط الحمض النووي المتكون، للتحكم في ذلك يجب قياس نسبة النيوكليوتيدات المشعة التي تم تضمينها.

3. أضف 20 مل من المحلول المنظم A، ويتم تخزين الواسم عند درجة حرارة 20 ° مل حتى يتم استخدامه.

تركيب المحلول المنظم A:

- 50 mM Tris – Cl (pH 7.5)
- 50 mM NaCl
- 5 mM EDTA (pH 8.0)
- 0.5 % SDS

تصنيع واسمات DNA موسومة بالإشعاع باستخدام بادئات عشوائية أحادية النيوكليوتيد:

Synthesis of uniformly labeled DNA probes using random oligonucleotide primers:

يمكن للنيوكليوتيدات الأحادية أن تعمل كبادئات لتصنيع الحمض النووي DNA على شريط أحادي من الحمض النووي بواسطة إنزيم البوليمريز . فعند استخدام نيكليوتيدات أحادية متباينة التسلسل يتم تكوين هجائن عند مواقع عديدة، حيث ينسخ كل نيكليوتيد على الشريط بنفس الفعالية في المنتج النهائي. وباستخدام هذه النيوكليوتيدات المشعة يمكن صنع واسمات DNA مشعة ذات نشاط خاصٍ عالٍ بنفس هذه الطريقة.

يمكن الحصول على بادئات عشوائية بثلاثة طرق هي:

1. عن طريق هضم الحمض النووي لغدد العجول Calf thymus DNA و لسمك السالمون Salmon sperm DNA بواسطة إنزيم DNAase I للحصول على كمية كبيرة من قطع الحمض النووي DNA الأحادية التي يتراوح طولها بين (6–12 نيوكليوتيد) .

2. عن طريق جلب نيكليوتيدات أحادية عشوائية من الحمض النووي لغدد العجول Calf thymus DNA من مصادر تجارية.
3. عن طريق التصنيع باستخدام جهاز تصنيع الحمض النووي DNA أوتوماتيكيا لإنتاج عشرة من الأكتاميرات Octamers والتي تحتوي على القواعد الأربع في كل موقع. كما يمكن شراؤها جاهزة من معامل التكنولوجيا البيولوجية العالمية، ونتيجة لأطوالها المنتظمة وعدم وجود اختلاف في تسلسلها فإن النيوكليوتيدات الأحادية المصنعة تعتبر البادئات المفضلة لصناعة نسخ مشعة من أشرطة الحمض النووي DNA الأحادية.

يعتمد نوع إنزيم البوليمريز DNA المستخدم على طبيعة الشريط. مثال فإن إنزيم البوليمرير DNA المعتمد على الحمض النووي RNA Reverse transcriptase المستنسخ عكسيا يستخدم لنسخ أشرطة الحمض النووي RNA الأحادية، بينما تستخدم قطع كلنو Klenow fragment الخاصة بإنزيم البوليمريز *E. coli* DNA polymerase I لنسخ أشرطة الحمض النووي DNA الأحادية. وفي الحالتين فإن صناعة الحمض النووي DNA تتم باستخدام نيوكليوتيد ديوكسي مشع واحد وثلاث نيوكليوتيدات غير مشعة لإنتاج واسمات ذات نشاط خاص، يتراوح بين 108^{5} x الى 109^{4} x cpm/mg.

تستخدم هذه الطريقة لإنتاج واسمات دائرية مكتملة من الحمض النووي DNA ومقسمة لشريطين أو واسمات خطية منفصلة من الحمض النووي DNA (قطع مفيدة منقاة بواسطة تقنية الفصل الكهربي). يخلط الحمض النووي DNA النقي مع البادئات، ثم يُفصل الحمض النووي إلى شريطين عن طريق الغليان، ثم يتم تصنيع الواسمات المشعة باستخدام إنزيم البوليمريز Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase. يتميز هذا الإنزيم بعدم مقدرته على القطع الخارجي، لذا فإن المنتج المشع يصنع عن طريق تمديد البادئ وليس عن طريق الإزاحة كما في الطرق السابقة. يتم التفاعل عند الرقم الهيدروجيني 6.6؛ حيث تقل مقدرة القطع الخارجي للإنزيم بصورة

كبيرة جداً. هذه الظروف تشجع البداية العشوائية للتصنيع؛ حيث لا يمكن تكسير البادئات الأحادية عن طريق الإنزيمات بعد ارتباطها بشريط الحمض النووي.

عملية فصل واسمات الحمض النووي DNA المشعة باستخدام جل الأقاروز:

تستخدم الطرق التي ذكرت سابقاً لصبغ الحمض النووي DNA بالإشعاع، ثم يتم فصل هذه الواسمات في شريحة من جل الأقاروز ذي درجة الذوبان المنخفضة باستخدام المحلول المنتظم. يتم اتباع الخطوات التالية:

1. بعد عملية الفصل عن طريق الإمرار الكهربي في المحلول المنظم يصبغ الجل بمادة بروميد الإثيديم Ethiduim bromide بتركيز 0.5 ملجم/مل. ثم تحدد قطع الحمض النووي المطلوبة.

❖ تحذير: مادة بروميد الاثيديم مادة سامة، لذا يجب الحذر عند التعامل معها. كما يجب أن يزال أثرها عند نهاية التجربة.

2. ضع قطعة الحمض النووي المطلوبة على أنبوب دقيق معلوم الوزن واحسب وزنها. ثم أضف 3 مل من الماء لكل جرام من بودرة جل الأقاروز.
3. ضع الأنبوب في ماء يغلي في حوض لمدة سبع دقائق ليذوب الجل، ثم افصل قطع الحمض النووي عن بعضها. إذا أمكن إضافة المادة المشعة مباشرة ضع الأنبوب في درجة حرارة الغرفة، بخلاف ذلك فيخزن الحمض النووي عند درجة حرارة 20 °م. وبعد كل حاجة للاستخدام تسخن المادة المخزنة في درجة 100 °م لمدة 3 – 5 دقائق ثم توضع في درجة حرارة الغرفة حتى تتم استخدامها لإضافة الإشعاع.
4. أضف المواد أدناه لأنبوب آخر بالترتيب :

5 x المحلول المنظم لتوسيم النيوكليوتيدات الاحادية	10 مل
- bovine serum albumin (fraction V, sigma) (10 mg/ml)	2 مل
- الحمض النووي فى حجم لا يزيد عن 32 مل	*ng* 50-20
- (α - P^{32}) dCTP (sp. act.) 3000 Ci/ m mol; 10m Ci/ml)	5 مل
- قطعة كلنو (5 وحدات)	1 مل
- H_2O	50 مل

حضن التفاعل في درجة حرارة الغرفة لمدة 3–12 ساعة، اعتمادا على كمية الأشرطة المستخدمة.

5. أضف 200 مل من المحلول المنظم A للتفاعل، ثم يخزن الواسم المشع في 20 °م حتى يتم استخدامه:

المحلول المنظم A يتكون من:

(m M Tris – Cl (pH 7.5 50
50 mM NaCl
5 mM EDTA (pH 8.0)
0.5% SDS

عزل الواسمات الصغيرة (<150 نيكليوتيدات) باستخدام تقنية الكروماتوغرافي على السيفاروس CL - 4B:

يمكن عزل الواسمات التي تتكون من أقل من 150 نيكليوتيد عن طريق تقنية الكروماتوغرافي عبر عمود السيفاروز Cl – 4B القاعدي (akaline column of sepharose CL – 4 B)، وفقاً للخطوات التالية:

1. جهز عمود سيفاروز في المحاليل:
0.001 M EDTA (pH 8.0) 0.1 N NaOH، 0.3 M NaCl .
2. أضف مادة للعينة أعلاه ليصبح التركيز 10mM.
3. أضف حجم IN NaOH 0.1 للعينة. ثم حضن المحلول لمدة خمس دقائق عند درجة حرارة الغرفة.
4. حمّل العينة في الغمود، ثم تابع تحرك المادة المشعة باستخدام مرشد يدوي صغير A hand – held minimonitor .
5. ابدأ بجمع العينات عندما يبدأ الإشعاع بالخروج من العمود، كل الواسم المشع يجب أن يخرج في حجم يساوي تقريباً 0.8 مل.
6. عادل المحلول بإضافته نصف الحجم من 2 M Tris. Cl (pH= 8.0) و حجم كامل من 0.1M HCl.

.7اختبر حجم الواسم باستخدام تقنية الفصل الكهربي باستخدام جل البولي أكرلامايد 5%.

توسيم النهايات /5 و/3 في الحمض النووي DNA

:Labeling the 5 and 3 termini of DNA

يمكن توسيم نهايات جزيئات الحمض النووي DNA باستخدام الإشعاع عن طريق الإنزيمات لإنتاج جزيئات يمكن استخدامها في رسم الحمض النووي RNA باستخدام إنزيم نيكليويز S1 كما يمكن استخدامها كبادئات مشعة في تفاعلات إنتاج الحمض النووي أثناء مرحلة التطويل، وكما يمكن استخدامها أيضا كواسمات ذات حجم معلوم في الجل، وذلك لتمييز قطع الحمض النووي على حسب أحجامها.

توسيم النهاية في شريط DNA مزدوج باستخدام إنزيم Klenow l

يستخدم في هذا التفاعل نيوكليوتيد مشع واحد، يعتمد نوع النيوكليوتيد المشع على تسلسل الحمض النووي DNA عند النهاية /5.، مثال لذلك النهايات التي تم تحديدها عن طريق انقسام الحمض النووي DNA باستخدام ECORI، والتي يمكن تعلىمها بالإشعاع a - P32 dATP كالآتي:

$$\begin{array}{l} \ldots p^{C}p^{T}p^{T}p^{A}p^{A}p^{5/} \\ p^{G}OH3/ \end{array} \xrightarrow{(\alpha\ P^{32})\ dATP} \begin{array}{l} \ldots p^{C}p^{T}p^{T}p^{A}p^{A}p^{5/} \\ P^{G}p^{*A}\ p^{*A}OH3 \end{array}$$

كما يمكن توسيم نهايات الـحمض النووي DNA الذي انقسم بـاستخدام الإنزيم BamH1 و النيوكليوتيد المشع $(\alpha$ - $P^{32})$ dGTP

$$\begin{array}{l} \ldots.{}^{C}p^{C}p^{T}p^{G}p^{5/} \\ \ldots\ G_{OH}3/ \end{array} \xrightarrow{(\alpha - P^{32})\ dGTP} \begin{array}{l} \ldots{}^{C}p^{C}p^{T}p^{A}p^{G}p^{5/} \\ {}^{G*}p^{G}{}_{OH3/} \end{array}$$

يمكن تعليم النهايات غير الحادة Blunt–ends لقطع الحمض النووي DNA عـن طريـق إزاحة النيكليوتيد الموجود عند النهاية hydroxyl – $3'$.

$$\begin{array}{l} \ldots\ldots.{}^{T}p^{C}p^{5/} \\ A\,p\,G_{OH}3' \end{array} \xrightarrow{(\alpha - P^{32})\ dGTP} \begin{array}{l} {}^{T}p^{C}p^{5/} \\ {}^{A*}p\,{}^{G}{}_{OH}3' \end{array}$$

تضاف النيوكليوتيدات الأخرى غير الموسومة بالإشعاع للتفاعل لسببين:

- تمنع إمكانية حدوث قطع خارجي للنيكليوتيدات الموجود في شريط الحمض النووي عند النهاية 3/ DNA .
- تجعل النيوكليوتيد dNTP المؤشر بالإشعاع؛ ليضاف الثاني أو الثالث أو الرابع عند هذه النهاية.

يمكن حدوث هذا التفاعل مباشرة بعد انقسام الحمض النووي DNA بدون إزالة الإنزيم المقيد أو تغيير المحلول الجهازي.

الخطوات :

1. يتم هضم 1ملجم من الحمض النووي DNA بالإنزيم المقيد المطلوب في 25 مل من المحلول المنظم للإنزيمات المقيدة المناسبة.
2. ثم أضف(m Ci lsp. Act. 400 Ci/m mole 10-2)من النيوكليوتيد المشع.

1. أضف وحدة واحدة (1 unit) من إنزيمKlenow fragment of *E. coli* DNA Polymerase I، ثم حضّن التفاعل لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة الغرفة.
2. أوقف التفاعل بالتسخين لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة 70 م °.
3. أفصل الحمض النووي DNA الموسوم من النيوكليوتيدات غير المضمنة عن طريق:

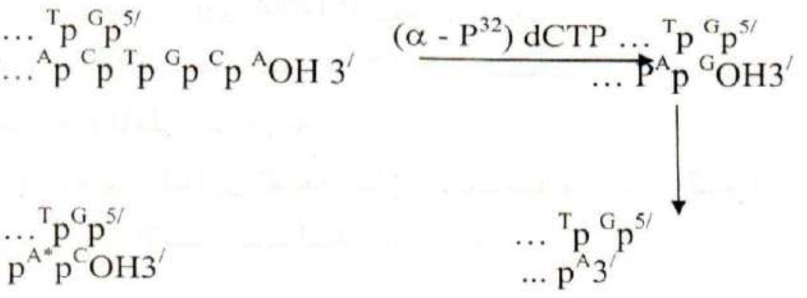
أ. الكروماتوغرافي أو التحريك عبر عمود صغير من السيفادوكس.50 – G

ب. دورتين من الترسيب عن طريق الإيثانول.

توسيم النهاية 3/ لشريط DNA مزدوج باستخدام إنزيم Bacteriophage T4 DNA polymerase:

يمكن استخدام هذا الإنزيم لتوسيم النهاية /3. يتميز هذا الإنزيم بقوة نشاط قطع خارجي 5/ – 3/، مقارنة بإنزيم klenow؛ لذا يمكن اعتباره الإنزيم

المفضل لتعلىم جزيئات الحمض النووي DNA الناشئ Protruding DNA:



الخطوات:

1. اخلط:

DNA 0.1 – 2 mg

10 x bacteriophage T4 DNA polymerase buffer 2 ml

H2O to 1 g ml

10 x Bacterophage T2 DNA polymerase buffer:

0.33 M Tris – acetate (pH 8.0)

0.66 M Polassium acetate

0.1 M Magnesium acetate

5 mM dethiothreitol

1 mg/ml booine serum albumine (Fraction V: sigma)

يخزن هذا المحلول عند درجة حرارة – 20°C .

2. أضف الإنزيم المقيد المفضل وحضن لمدة مناسبة.

3. أضف 2مل من محلول يحتوي ثلاث نيوكليوتيدات غير معلمة، بتركيز 2 mM لكل.

4. أضف لمحلول dNTP الرابع المعلم بالإشعاع.

5. أضف (2.5 وحدة) من إنزيم Bactero phage T4 DNA .polymerase

6. حضن التفاعل لمدة 5 دقائق عند درجة حرارة °37م

7. أضف 1مل من محلول 2 mM من النيوكليوتيد الرابع غير المشع، ثم حضن المحلول لمدة 10 دقائق أخرى.

8. أوقف التفاعل عن طريق التسخين عند درجة حرارة °70م لمدة خمس دقائق.
9. أفصل الحمض النووي DNA الموسوم من النيوكليوتيدات غير المضمنة كما ذكر في التقنية السابقة باستخدام الإيثانول، والسيفادوكس، والكروماتوغرافي. ثم يخزن هذا المحلول عند درجة حرارة ° — 20 م.

بعد تجهيز المسابير المشعة يمكن استخدامها في تهجين قطع الحمض النووي المكملة في الاستخدامات التطبيقية المختلفة.

الباب العاشر

تقنيات الهندسة الوراثية

Genetic engineering

الباب العاشر
تقنيات الهندسة الوراثية
Genetic engineering

تسمى أيضا بتكنولوجيا إعادة التركيب الجزيئي Recombinant DNA technology. هنالك مجهودات متسارعة في مجال علم الأحياء لاكتشاف أنظمة متقدمة ذات كفاءة عالية لنقل الجينات إلى داخل الخلايا والأنسجة النباتية، و من ثم إعادة إنتاج نباتات كاملة من هذه الخلايا تتمتع بالخصوبة اللازمة التي تمكنها من إكمال دورة حياتها. فقد أتاحت الهندسة الوراثية مجالاً واسعاً لتطوير أصناف المحاصيل الزراعية، إضافة إلى تطبيقات أخرى في مجالات الكيمياء الزراعية، التصنيع الغذائي، والتصنيع الكيميائي والصيدلاني لإنتاج منتجات جديدة. يعتمد مدى قبول هذه المنتجات على جوانب قانونية واجتماعية يمكن إجمالها في الآتي:

1. إجازة منتجات الهندسة الوراثية من قبل المؤسسات القانونية و المدنية العاملة في هذا المجال.
2. مدى مطابقتها للمعاير المستخدمة لحماية المستهلك.
3. القبول الجماهيري لها.

الهندسة الوراثية في النبات:

تعمل الهندسة الوراثية على زيادة التنوع الحيوي في الكائنات الحية، كما تعمل على تقليل الزمن اللازم لإنتاج صنف تجارى أو هجين. تعد تجربة إنتاج نباتات من التبغ محورة وراثياً أول تجربة لتطبيق الهندسة الوراثية في النبات، وذلك باستخدام البكتريا الزراعية كوسيط لنقل الجينات. فقد تم إثبات نجاح هذا التحوير الوراثي بوجود تسلسل الحمض النووي الغريب في النباتات التي حورت وفي نباتات الجيل الأول الناتج عنها وذلك باستخدام ظاهرة مقاومة المضاد الحيوي النيومايسين neomycin، والذي يتحكم فيه جين يسمي جين

مقاومة النيومايسين، والذي يعمل على إبطال مفعول هذا المضاد الحيوي بإضافة مجموعة فسفور له في النباتات التي تحتوى على هذا الجين. أما النباتات التي لا تحتوي على جين المضاد الحيوي فإنها تموت في الحال. اعتمدت التجارب الأولي في مجال الهندسة الوراثية على تقنية استخدام البروتوبلاست كخلايا مستقبلة. ولكن التطور اللاحق في مجال علوم زراعة الأنسجة، والتي يمكن عن طريقها الحصول على نبات كامل من خلية واحدة أو نسيج أدى الى تسهيل عملية التحوير الوراثي، وجعله روتينياً في مختلف الأنواع النباتية و خصوصا في النباتات ذات الفلقتين. هنالك طرق كثيرة أخرى تم اكتشافها لنقل الجينات إلى النباتات ذات الفلقة الواحدة مثل نباتات الذرة الشامي، القمح والأرز، والتي تشمل:

1. الحقن الدقيق بالجينات Microinjection.
2. الثقب عن طريق تيار كهربي ضعيف Electroporation.
3. قذف الجينات عن طريق البندقية Particle gun technology.

جعلت هذه التقنيات بالإمكان تحوير الأنواع النباتية ذات الفلقة وذات الفلقتين على حدٍ سواء.

الطرق المختلفة لإدخال الجينات في النبات :

1. استخدام البكتريا الزراعية لنقل الجينات :

Agrobacterium tumefactiens-mediated gene transfer

يعتبر نقل الجينات عن طريق البكتريا الزراعية من أهم الطرق المستخدمة في الهندسة الوراثية لنقل الجينات من كائنٍ حي لكائن حي آخر، حيث تتمتع بفعالية كبيرة في هذا المجال. معظم النباتات التي حورت وراثياً حتى الآن تم نقل الجينات اليها عن طريق استخدام البكتريا الزراعية. تعتبر البكتريا الزراعية عاملاً مسبباً لمرض تكوين العقد البكترية في النباتات المصابة. تم التعرف على مقدرة هذه البكتريا على نقل الجينات باكتشاف أن مقدرة البكتريا على تكوين العقد البكترية ينتج أساساً من نقل وتضمين لجينات من البكتريا في داخل جينوم

كبيرة تعمل على التشفير لتكوين العقد البكتيرية. تحتوي هذه البلاسميدات على مجموعتين من تسلسل الحمض النووي تعملان على نقل الجينات إلى داخل النبات. يحتوي تسلسل المجموعة الأولى على موقع واحد أو أكثر من الحمض النووي المنقول (T-DNA regions) من البكتيريا لداخل الخلايا النباتية، والذي يعمل على تضمين أي تسلسل غريب بداخله إلى داخل الحمض النووي للنبات، حيث يتحدد الحمض النووي المنقول بتسلسلين عند نهايتيه تعملان على تعريف الموقع الذي يجب نقله لداخل خلايا النبات المصاب. أما تسلسل المجموعة الثانية فيحتوي على الجينات المعدية Virulence genes (Vir)، والتي لا تنقل أثناء عملية الإصابة إلى داخل النبات و لكنها تعمل على إحداث عدائية البكتريا لخلايا النبات.

تعتمد الأنظمة المتطورة في مجال تحوير النباتات عن طريق استخدام البكتريا الزراعية على إزالة جين إنتاج الفيتوهرمون من موقع الحمض النووي المنقول لداخل الخلية النباتية، وذلك لمنع البكتريا من تشجيع ما يسمى بالانحراف في تكاثر خلايا النبات Aberrant cell proliferation ومن ثمَّ تكوين العقد التاجية أو الشعيرات الجزرية. يمكن للبلاسميدات المستخدمة حالياً التكاثر أيضا في داخل بكتريا القولون كما يحدث في البكتريا الزراعية؛ مما يشجع على استخدام هذه البلاسميدات بفعالية واسعة.

ففي بعض الحالات يحمل البلاسميد موقعاً جينياً خاصاً بتكاثر البلاسميد في داخل البكتريا الزراعية، وموقع لتكاثره لأعداد الكبيرة في بكتريا القولون (Ori – *E. coli*)؛ مما يسهل عملية إنتاج واختبار البلاسميد في داخل بكتريا القولون قبل انتقالها إلى البكتريا الزراعية لنقلها إلى داخل النبات. ينقل الجزء PTV الموجود في داخل بكتريا القولون الى البكتريا الزراعية المعدلة وراثيا بواسطة عملية تسمي التزاوج الثلاثي Tri-parental mating procedure. تحتوي البكتريا الزراعية المهندسة أو المعدلة على البلاسميد Disarmed Ti plasmid (D-TI) والذي نزع عنه الجين المسئول عن الإصابة. الوظائف العدائية في البلاسميد D – Ti تتفاعل في صورة ترانس Trans مع التسلسل الجانبي على PTV؛ لتعمل على تحريك الموقع الموجود بين هذه الجوانب إلى داخل الخلية النباتية، وإدخالها في أحد الكرموزومات

النباتية الموجودة بداخل النواة؛ بينما تستخدم صفة مقاومة المضادات الحيوية لانتخاب خلايا النباتات المحورة أثناء عملية تكوين النباتات الكاملة.

هنالك جينات لمقاومة المضادات الحيوية تحمل عادة على البلاسميد الأول، وذلك للانتخاب بداخل البكتريا، مثل جين مقاومة الأسبكتينومايسين، والجين الآخر يعبر عنه في داخل النبات مثل جين مقاومة للكنامايسين، كما أن هنالك موقعاً لإضافة جين مدخل واحد أو أكثر إضافة إلى تسلسل إضافي طرفي مرشد للبلاسميد، والذي يحدد بواسطته الجزء الذي يفترض نقله لداخل خلايا النبات.

أدى التطور في علوم الهندسة الوراثية إلى تطور في العائل الوسيط (البكتريا الزراعية) نفسه، وذلك بالمقدرة على ترتيب الجينات والمواقع المقيدة المختلفة في البلاسميد مما يساعد على إنتاج عوائل ذات مقدرة عالية على التحوير الوراثي للنباتات.

تحتوي البكتريا الزراعية على نظام متميز لنقل الجينات لداخل الخلايا النباتية للأسباب الآتية:

- يمكن إدخال الحمض النووي المنقول إلى داخل نسيج نباتي كامل دون اللجوء إلى عزل البروتوبلاست.
- تعد عملية تضمين الحمض النووي المنقول عملية دقيقة نسبياً مقارنة مع الطرق الأخرى.

أظهرت اختبارات تسلسل الموقع المضمن وجود تضاعف قليل وتغيرات قليلة أخرى على موقع الحمل أثناء عملية تضمين الحمض النووي المنقول. ولكن على الرغم من ذلك يعد التعبير الجيني لمعظم الجينات المنقولة بواسطة البكتريا الزراعية بداخل النبات ممتازاً ودقيقاً. كما أظهرت الدراسات أن الخريطة الجينية للحمض النووي المنقول تظل ثابتة وبنسبة انعزال ثابتة. ففي نباتات الطماطم المحورة وراثيا، أظهرت الصفات المدخلة ثباتاً لفترة لاتقل عن خمس

الجدول 10.1 يبيّن بعض الأنواع النباتية التي تم تحوير وراثي فيها:

طريقة التحوير الوراثي التي استخدمت	النوع النباتي Plant species
نباتات عشبية ذات الفلقتين Herbaceous dicots	
At	نبات البتونيا Petunia
At	الطماطم
At	البطاطس
At, FP, PG	التبغ
At	الاردوبسس Arabidopsis
At	الخس Lettuce
At	زهرة الشمس
At, MI	اللفت الزيتي
At	الكتان Flax
At	القطن
At	بنجر السكر
At	الكرفس Celery
At	فول الصويا
At	البرسيم
FP	نبات اللونس Lonus
Ar	نوع من اللوبيا *Vigna aconitifolia*
Ar	الخيار
Ar	الجذر
Ar	القرنبيط Cauliflower
Ar	شوع او بان Horseradish
نباتات خشبية ذات الفلقتين Woody dicots	
At	شجر الحور Poplar
At	الجوز Walnut
At	التفاح

ذات الفلقة الواحدة **Monocots**	
At	الاسبرجلس Asparagus
FP	الارز
FP	الذرة الشامي
FP	عشب علفي Orchard grass (*Dactylis glomerata*)
IR*	الجودار Rye

إختصارات :

At ≡ البكتريا الزراعية .

Ar ≡ بكتريا الرايزوجين Agrobacterium rhizogenes.

Fp ≡ النقل الحر للجينات لداخل البروتوبلاست.

PG ≡ القذف عن طريق البندقية.

MI ≡ الحقن الدقيق Microinjection.

IR ≡ حقن أعضاء تكاثر.Injection of reproductive organs

تتميز البكتريا الزراعية بسهولتها ودقتها في إكمال عملية التحوير. تعتبر بعض النباتات ذات الفلقة الواحدة عوائل طبيعية للبكتريا الزراعية . إلا أننا نجد أن بعض الحبوب مثل الأرز والذرة الشامي والقمح لم تتم عملية التحوير فيها بنجاح، على الرغم من أن هنالك بعض الدلائل تشير إلى وجود بعض جزيئات الحمض النووي المنقول من البكتريا في خلايا النباتات في حالة الذرة الشامي، لذا اتجهت الأنظار إلى إيجاد تقنيات بديلة لنقل الجينات، أول هذه البدائل هو استخدام طرق فيزيائية كالتي تستخدم في تحوير الخلايا الحيوانية المستزرعة. حيث تم تحوير بروتوبلاست النباتات عبر تسهيل عملية إدخال الحمض النووي عن طريق ترسيب فوسفات الكالسيوم والمعاملة بجيلثول البولي إثيلين Polyethylene glycol ، وعن طريق الثقب الكهربي Electroparation، و عبر استخدام أكثر من طريقة من هذه الطرق مع بعضها. وقد ثبت نجاح هذه الطرق، وذلك باختبار التعبير الجيني في النبات المحور. يعد استخدام هذه

الطرق للحصول على نباتات محورة محدوداً ببعض الصعوبات المصاحبة لإنتاج نباتات عبر استزراع الكلوروبلاست على الرغم من النجاح الذي تم المتمثل في الحصول على نباتات أرز كاملة من الكلوروبلاست. يعد هذا النجاح محدوداً في الذرة الشامي على الرغم من نجاح بعض الباحثين في الحصول على نباتات كامل من الكلوروبلاست، كما تم الحصول على نباتات محورة منه. عموماً يعد نجاح الاستزراع في الأرز والذرة الشامي محدوداً على عدد قليل من الأصناف.

بالتزامن مع تحوير البروتوبلاست بذلت بعض المجهودات للحصول على طرق أخرى لإدخال الحمض النووي لخلايا النباتات أو الأنسجة باستزراع خلايا محاصيل الحبوب من أجنة غير ناضجة أو من خلايا عادية. إحدى هذه النجاحات هو اكتشاف إدخال الجينات عبر قذف الجينات عن طريق البندقية أو عن طريق تقنية الحقن High – velocity micro projectile، حيث يتم في هذه الأنظمة حمل الحمض النووي عبر جدار الخلية وفي داخل السيتوبلازم على سطح جزيئات معدنية متناهية الصغر (0.5 - 5 mM)، والتي تتحرك بسرعة واحدة إلى مئات الأمتار في الثانية الواحدة. لهذه الجزيئات المقدرة على اختراق عدة طبقات في الخلية وإحداث التحوير الوراثي. تم الحصول على نباتات محوره [illegible] في الذرة الشامي والقمح وفول الصويا باستخدام تقنية القذف عن طريق البندقية.

هنالك طرق أخري للحصول على نباتات حبوب محورة وراثيا، مثل نقل الجينات عن طريق حبوب اللقاح، النقل المباشر لأعضاء التكاثر والنقل الدقيق بالحقن في داخل خلايا الأجنة غير الناضجة .

استخدامات الهندسة الوراثية:

تستخدم الهندسة الوراثية في المجالات التالية:

1. زيادة مقاومة بعض المحاصيل للأمراض والآفات .

الطرق للحصول على نباتات محورة محدوداً ببعض الصعوبات المصاحبة لإنتاج نباتات عبر استزراع الكلوروبلاست على الرغم من النجاح الذي تم المتمثل في الحصول على نباتات أرز كاملة من الكلوروبلاست. يعد هذا النجاح محدوداً في الذرة الشامي على الرغم من نجاح بعض الباحثين في الحصول على نباتات كامل من الكلوروبلاست، كما تم الحصول على نباتات محورة منه. عموماً يعد نجاح الاستزراع في الأرز والذرة الشامي محدوداً على عدد قليل من الأصناف.

بالتزامن مع تحوير البروتوبلاست بذلت بعض المجهودات للحصول على طرق أخرى لإدخال الحمض النووي لخلايا النباتات أو الأنسجة باستزراع خلايا محاصيل الحبوب من أجنة غير ناضجة أو من خلايا عادية. إحدى هذه النجاحات هو اكتشاف إدخال الجينات عبر قذف الجينات عن طريق البندقية أو عن طريق تقنية الحقن High – velocity micro projectile، حيث يتم في هذه الأنظمة حمل الحمض النووي عبر جدار الخلية وفي داخل السيتوبلازم على سطح جزيئات معدنية متناهية الصغر (0.5 - 5 mM)، والتي تتحرك بسرعة واحدة إلى مئات الأمتار في الثانية الواحدة. لهذه الجزيئات المقدرة على اختراق عدة طبقات في الخلية وإحداث التحوير الوراثي. تم الحصول على نباتات محورة وراثياً من الذرة الشامي والتبغ وفول الصويا باستخدام تقنية القذف عن طريق البندقية.

هنالك طرق أخري للحصول على نباتات حبوب محورة وراثيا، مثل نقل الجينات عن طريق حبوب اللقاح، النقل المباشر لأعضاء التكاثر والنقل الدقيق بالحقن في داخل خلايا الأجنة غير الناضجة .

استخدامات الهندسة الوراثية:

تستخدم الهندسة الوراثية في المجالات التالية:

1. زيادة مقاومة بعض المحاصيل للأمراض والآفات .

2. استنباط أصناف تتحمل الرش بمبيدات الأدغال او الحشائش دون أن تتأثر بينما يتم القضاء على الأدغال.
3. تحسين القيمة الغذائية لبعض المحاصيل الزيتية من خلال تغيير محتواها من الأحماض الدهنية المشبعة.
4. زيادة صلابة الفواكه لتتحمل التحضير و الترحيل. حيث تمكن العلماء بإستخدام تقنيات الهندسة الوراثية من إنتاج طماطم ذات قوام أكثر صلابة، ويمكن تخزينها لفترة طويلة دون أن تتلف، وذلك بإبطال عمل المورث الذي ينتج إنزيماً متعدداً مثل إنزيم البولي جلاكتورونيز Polygalacturonase.
5. التعديل الوراثي في الأحياء المجهرية مثل خميرة الخبز: حيث تتمكن هذه الخميرة من إنتاج CO_2 بشكل أسرع مقارنة بالخميرة التقليدية: مما يؤدي إلى ارتفاع أو زيادة حجم العجين في زمن أقل.
6. لجأ العلماء لتأمين الطلب المتزايد من الجبن عالمياً، والذي يتطلب ذبحاً متزايداً لأعداد كبيرة من العجول الصغيرة للحصول عليه، وذلك بإنتاجه عن طريق تحوير بعض الأحياء المجهرية، مثل الخميرة وفطر الأسبرجلس Aspergillus وبكتريا القولون بالجين المختص بإنتاج هذا الإنزيم من العجول. تباع الأجبان المنتجة عن طريق إنزيمات منتجة من قبل هذه الأحياء المجهرية تحت اسم أجبان نباتية Vegetarian cheeses.

استخدام الهندسة الوراثية لتطوير المحاصيل:

سنتناول في هذا الإطار بشي من التفصيل بعض أنواع التحوير الوراثي في المحاصيل المختلفة.

مقاومة الحشائش Weed control:

يعد تحوير النباتات لتحمل المبيدات ومقاومتها تقنية جديدة و فاعلة في المجال الزراعي. فعند التحوير الوراثي، يتم التركيز على المبيدات التي تتمتع بخواص محددة مثل فعالية الوحدة high unit activity. السمية المنخفضة،

بطء حركة المبيد في الأرض، والتخلص السريع من المبيدات والنشاط الواسع ضد حشائش عديدة. يعتبر استنباط نباتات متحملة للمبيدات الحشائشية عن طريق الهندسة الوراثية فاعلا، كما تتميز بقلة التكلفة.

هنالك اتجاهان لتحوير النباتات لتحمل المبيدات الحشائشية:

1. تغيير مستوي حساسية الإنزيم المحدود للمبيد المحدد.
2. تضمين جين يعمل على إزالة سمية Detoxify المبيد، مثال لذلك الجيلايفوسفيت Glyphosate، المادة الفاعلة في مبيد الراوند أب Round up، والذي يعمل على تثبيط مفعول الإنزيم 5-enolpyrvuylshikimate-3-Phosphate syntheses (EPSPS).

تعتبر مادة الجلايفوسيت Glyphosate مادة فاعلة ضد الحشائش الموسمية والمعمرة والنجيليان، لهذه المادة سمية منخفضة للحيوانات، كما تتحلل بسرعة في داخل التربة. تم تحوير نباتات لتحمل هذه المادة في محاصيل عديدة بإدخال تركيب جيني لإنتاج إنزيم EPSPS، أو بإنتاج إنزيمات EPSPS أخري تعمل على تحمل مادة الجلايفوسيت. مثال آخر هو مقاومة مركب Sulfonyl urea، وهو المادة الفاعلة في مبيد الحشائش Glean، وOust تم إنتاج هذه المقاومة بإدخال جين الطفرة Acetolactate synthase (ALS) في النباتات.

تم الوصول لمقاومة مبيدات Glyphosinate و Bronoxynil عن طريق إدخال الجينات البكترية التي تُشفر لإنزيمات تعمل على تثبيط مبيدات الحشائش عن طريق إضافة حامض الخليك Acetylation وتحليل النيترايل Nitryl hydrolysis، على التوالي.

تشمل المحاصيل التي تم التحوير الوراثي فيها لمقاومة مبيدات الحشائش كلاً من فول الصويا، القطن، الذرة الشامي، الحبوب الزيتية وبنجر السكر. هنالك عوامل يجب أخذها في الاعتبار قبل الاستغلال التجاري للأصناف المحورة وراثيا لمقاومة مبيدات الحشائش، تشمل:

1. كفاءة مبيد الحشائش.
2. تكلفة تسجيل المحصول و المبيد.
3. التلقيح الخارجي بين النباتات المحورة و الحشائش.

مقاومة الحشرات (Insect resistance):

تعد أحد أهم أهداف التحوير الوراثي في النباتات. يتم تحوير النباتات لمقاومة الحشرات عن طريق استخدام جين بروتين مقاومة الحشرات (Bt) الخاص ببكتريا الباسلس *Bacillus thuringiensis* . تعتبر هذه البكتريا قاتلة للحشرات، وذلك عن طريق إنتاج بروتين مقاوم للحشرات والذي يعتبر قاتلا لبعض الآفات الحشرية. تعتبر معظم سلالات هذه البكتريا سامة ليرقات الحشرات التي تنتمي إلى رتبة الفراشات حرشفية الأجنحة Lepidoptera، وتشمل الفراشة Butter fly وأبو الدقيق Moth. كما أن بعضها ساما ليرقات رتبة الخنافس Coleoptera(Beetles)، ورتبة ذات الجناحين Diptera fly. لا يعتبر هذا البروتين ساماً للحشرات المفيدة والحيوانات والإنسان. يعمل هذا البروتين على إدخال خلل في مرور الأيونات عبر أغشية الحشرات الحساسة لهذا البروتين، مثال لذلك نباتات الطماطم والتبغ والقطن، التي تم تحويرها باستخدام الجين Bt لتحمل اليرقات حرشفية الأجنحة Caterpillar تحت ظروف المعمل. أدى استخدام هذه الطريقة للإنتاج التجاري للكثير من المحاصيل المحورة بهذا الجين، مثل محاصيل الخضر الورقية، القطن والذرة الشامي لمقاومة اليرقات حرشفية الأجنحة، كما استخدم في البطاطس والقطن ضد الخنافس .

مقاومة الأمراض Disease resistance:

تم استحداث مقاومة ضد مرض تبرقش التبغ TMV، وذلك بالتعبير عن جين الغلاف البروتيني للفيروس في النباتات المحورة وراثيا. استخدمت هذه التقنية بنجاح في كل من الطماطم، التبغ والبطاطس ضد عدد كبير من الفيروسات، مثل فيروس تبرقش البرسيم AMV، فيروس تبرقش الخيار

CMV، و فيروس البطاطس X وفيروس البطاطس Y.

التعبير الجيني وتكنولوجيا عزل الجينات :

أمكن الآن فهم كيفية تغيير التعبير الجيني بداخل النبات والتقنيات الخاصة بتحديد الجين المرغوب فيه وعزله، حيث أمكن ذلك عن طريق وجود أنظمة فاعلة لنقل الجينات.

اعتمد التحوير الجيني للمحاصيل المختلفة على استخدام جينات تقود أو ترشد لخواص يتحكم فيها جين واحد سائد. مستقبليا يمكن العمل على إدخال وتغيير المسارات التصنيعية الداخلية في النبات. كما أن المقدرة على نقص التعبير عن الجين في النباتات المجورة يساعد على دراسة تعبير جينات النبات ووظائف الجين. هنالك نجاحات تمت في الجينات التي تتحكم في إنتاج حمض رايبوز مضاد Antisense RNAs كالإنزيم polygalactoronase في ثمار الطماطم، والإنزيم Chalcone synthase في نباتات البتونيا والتبغ. ففي هذه الدراسة، تم نقص حوالي 90% في مستوي ترجمة الحمض النووي الراسل mRNA، نقص مستوى البروتينات المنتجة الخاصة بالتعبير عن هذه الجينات. يساعد مثل هذا النوع من الطفرات على إجراء دراسات بيوكيميائية وفسيولوجية، حديثاً تم استخدام مواقع إنزيمية مشتقة من الجزيئات الناتجة عن التركيب العقدي للحمض النووي RNA (Self -splicing RNA) لتصميم إنزيمات لها المقدرة على تكسير الحمض النووي RNA، فقد أثبتت الدراسات المعملية أهمية هذه الطريقة. كما أظهرت التجارب الأولية لإدخال الحمض النووي DNA في كرموزومات النباتات بواسطة إعادة التركيب الجيني، إمكانية استخدام هذه الطريقة للتوقيف الاختياري للجينات .

يسمى بالتوسيم الجيني gene tagging.

رسم الجين Gene mapping:

هنالك مجهودات بذلت من أجل بناء خرط جينية معتمدة على الواسم الجزيئي RFLP لعدد كبير من الأنواع النباتية مما يمكن من عزلها. ففي الطماطم دلت الخرطة الجينية على معرفة مواقع توريث عديدة متحكمة في صفات كمية. كما تعتبر الخرطة الجينية المعتمدة على هذا الواسم الجزيئي مهمة ومفيدة كما في نباتات *Arabidopsis*. التي سهل صغر حجم الجينيوم فيها وعدم وجود تكرار في التسلسل من استخدامها في الدراسات المعملية المختصة بالتحوير الوراثي.

أسس السلامة الحيوية Biosafety regulatory mechanism:

يعد بروتوكول قرطاجنة Cartagena protocol الأداة العالمية الوحيدة التي تحكم حركة الكائنات المحورة وراثياً عبر الحدود الجمركية للدول المختلفة، والتي تسمى أيضاً بالأحياء المعدلة وراثيا (LMOs). يجب أن تلعب الدول أيضا دوراً كبيراً في اعداد الترتيبات والنظم التي تؤدي الى تطبيق هذا البروتوكول. يهدف هذا البروتوكول للتأكد من وجود حماية للكائنات الحية و الأحياء المعدلة وراثيا، عبر الحدود الجمركية للدول، والبيئة حال نقل، مع وضع المعايير اللازمة لتداول واستخدام الكائنات المعدلة وراثياً. مع الأخذ في الاعتبار المخاطر المحتملة على صحة الإنسان و الحيوان. والتأكد من تزويد الدول المختلفة بالمعلومات الضرورية التي تساعدها في اتخاذ القرارات قبل الاتفاق على استيراد هذه الكائنات إلى داخل حدودها. وضع هذا البروتوكول أيضاً جوانب احترازية نصت عليها الفقرة (15) من البروتوكول، والذي وضح الحد الحرج Threshold level من وجود المهددات من الآثار السالبة التي لا يمكن علاجها، وذلك لتبرير الخطوات الوقائية في هذه الدول التي يجب إتباعها حال عدم وجود الإلمام العلمي الكافي بمسائل التعديل الوراثي والسلامة الحيوية، حيث أعطى هذا البروتوكول الدول

الحق في وضع لوائح داخلية تضمن سلامة البيئة والإنسان والحيوان من المخاطر المحتملة من دخول الكائنات المعدلة وراثياً.

نظم إجازة الأصناف المحورة وراثيا:

على سبيل المثال، تقع هذه المسئولية في الولايات المتحدة الأمريكية في ثلاث وكالات Agencies وهي:

- وزارة الزراعة (USDA).
- إدارة الأغذية و السميات (FDA) .
- وكالة حماية البيئة (EPA) .

تبنى الاختبارات التي تجرى على المنتجات المحورة وراثيا على تقدير المخاطر، والأثر البيئي وتقدير الأخطار غير المباشرة على صحة الإنسان والحيوان. كما أن هنالك جهات متخصصة في إجازة منتجات التكنولوجيا الجديدة مثل:

- المجلس العالمي للتكنولوجية الحيوية في مجال الأغذية
The international Food Biotechnology Council (IFBC)
- اتحاد العلماء الأمريكيين للأحياء التجريبية
The Federation of American Scientist for Experimental Biology (FASEB).

تعتمد أسس تنظيم استخدام النباتات المحورة على أساسين:

1. أن تستوفي رغبة المواطنين لضمان أغذية سليمة بأسعار معقولة.
2. أن تستوفي أقل قدر من المخاطر الناتجة عن نقل الجينات . وأن توفر عائداً مجزي للمنتج والمصنّع والمستهلك.

الباب الحادي عشر

الكائنات المعدلة وراثياً

Genetically modified organisms

الباب الحادي عشر
الكائنات المعدلة وراثياً
Genetically modified organisms

هنالك طرق عديدة لتحسين إنتاجية الأغذية وجودتها ، إذ تتحكم عوامل داخلية بالنبات في إنتاج الأغذية المختلفة. تسمى هذه العوامل بالجينات والتي تحمل على الكرموزومات المختلفة في النبات. مع بداية علوم التربية لتحسين الأصناف المحصولية ارتبطت البحوث الخاصة بعلم الوراثة و علم تربية النبات مع بعضهما البعض، حتى أصبح من الصعب الفصل بينهما. تكمن أهمية التحسين في إنتاج الغذاء في عدة محاور:

أولا: المحور الاقتصادي – الاجتماعي بغرض زيادة الإنتاجية لإطعام الشعوب ودرء الكوارث.

ثانياً: تحسين الجودة، وذلك للتحكم في المنافسة على الأسواق المختلفة.

ثالثاً: وقاية النبات من الآفات والأمراض

رابعاً: التأقلم على الظروف البيئة غير المناسبة.

ومع بزوق ثورة فافلوف (1940)، التي هدفت إلى استغلال الموارد الوراثية المحلية والعالمية والسيطرة عليها وحمايتها وجمعها، والاستفادة منها في برامج التربية والتحسين المستمر للأصناف النباتية، أصبح التحسين عبر طرق التربية التقليدية فعالاً ومنتجاً، كما أصبحت صناعة إنتاج البذور من الصناعات المتقدمة في العالم؛ حتى أن شركات البذور في كثير من الدول المتقدمة أصبحت من كبريات الشركات، ومع بدايات عهد استقلال الشعوب من الاستعمار القديم، أصبح مفهوم الاكتفاء الذاتي هو المحرك للكثير من اقتصاديات الدول النامية، وذلك عبر:

1. انتخاب أصناف عالية الإنتاجية و الجودة.
2. زيادة حجم المخزون الإستراتيجي من القوت الأساسي وزيادة السعة التخزينية.
3. خلق آلية للتحكم في الأسعار داخليا.

إلا أن هذا الخط الاقتصادي– الاجتماعي في هذه الدول قد تعرض للكثير من الهنات، وذلك لجملة من الأسباب، منها:

أولاً: اختلاف درجة التطور الاقتصادي و التكنولوجي بين هذه الدول و الدول المتقدمة.

ثانياً: التسريع البحثي والإنتاجي في الدول المتقدمة؛ مما أثر على اضعف القدرة التنافسية للمنتجات المحلية .

ثالثا: تخلي هذه الدول عن برنامج الاكتفاء الذاتي عن طريق الضغط السياسي العالمي، عبر آليات البنك الدولي وصندوق النقد الدولي عبر القروض.

رابعاً: غياب الاستقرار السياسي و الاقتصادي في هذه الدول.

خامساً: تزايد عوامل الهجرة والنزوح.

سادساً: ضعف السيطرة على العملية الإنتاجية، الأمر الذي جعل كثيراً من الدول بعد مرور نصف قرن تعتمد اعتمادا كاملاً على الغذاء المستورد من الدول المتقدمة، كما تعتمد في اقتصادها على الموارد الأخرى كالبترول والمعادن الصناعية. ومع الزيادة الكبيرة في السكان في العالم برزت الحاجة لآليات أكثر تطوراً في مجال استنباط الأصناف المحسنة، مما حتم ضرورة التطور في علوم الوراثة والأحياء الجزيئية وعلوم الهندسة الوراثية، والتي ارتقت من التحسين في الكائنات الأولية إلى الكائنات الراقية بما فيها النبات، مما مهد الطريق أمام منجزات علمية هائلة أفسحت المجال لإنتاج نباتات محسنة وراثياً عبر آليات الهندسة الوراثية. ولذلك فإننا نجد أن التحسين عبر الهندسة الوراثية لإنتاج الأغذية نتج لجملة من الأسباب يمكن إجمالها في الآتي:

1. التطور التقني والعلمي الهائل في مجال الوراثة وتربية النبات و العلوم المختلفة.
2. الحاجة العالمية لإنتاج الغذاء المتمثلة في الزيادة السكانية، الحروب، والكوارث.
3. التسابق المحموم بين الشركات العالمية على إنتاج البذور المحسنة.

تعمل الهندسة الوراثية على تغيير خواص الكائنات الحية عن طريق نقل الجينات من أحد الكائنات عبر حواجز النوع إلى كائن حي آخر؛ لذا فإن الهندسة الوراثية تعمل على نقل الجينات بين الكائنات الحية والتي لا يمكن نقلها بواسطة

الطرق التقليدية لتربية النبات. فعلى سبيل المثال، تم نقل جين من الإنسان إلى بكتريا القولون لإنتاج هرمون الأنسولين البشري. كما تم نقل جين من سمك The winter flounder للطماطم مما مكنها من تحمل البرودة، كذلك تم نقل جين من بكتريا الباسلس (Bt) إلى القطن وفول الصويا والذرة الشامي لمقاومة الحشرات التي تعيش على هذه المحاصيل.

موقف المحاصيل المعدلة وراثيا:

تمت أول موافقة على البيع والتجارة بالبذور المعدلة وراثياً في الولايات المتحدة في العام 1994م. توسعت هذه التجارة معنوياً في الفترة ما بين 1996-2001 م. تزرع هذه المحاصيل الآن في العديد من الدول المتقدمة و بعض الدول النامية، كما تبلغ جملة المساحة المزروعة بالمحاصيل المعدلة وراثياً في العالم حوالي 52.6 مليون هكتار في العام 2006 م. الصفات التي تدخل عادة في المحاصيل المعدلة وراثياً هي مقاومة الحشرات، ومقاومة مبيدات الحشائش، وتسهيل مكافحة الآفات الحشرية، ومكافحة الحشائش. أهم هذه المحاصيل هو الذرة الشامي، فول الصويا، القطن، اللفت وبعض المحاصيل البستانية. هنالك سبعة أصناف من الذرة الشامي تم تحويرها باستخدام جين البكتيريا Bt مجازة للاستخدام التجاري في أمريكا، منها خمسة أصناف تمت إجازتها في أوربا، ولكن لم تتم زراعتها تجارياً إلا في أسبانيا. يتم إنتاج هذه الأصناف بواسطة شركات عالمية كبيرة، مثل شركة Ciba–Geigy و شركة Asgrow. معظم الأراضي التي تزرع بواسطة المحاصيل المعدلة وراثياً توجد في الولايات المتحدة (68%)، الأرجنتين (22%)، كندا (6%) والصين (3%).

تزرع في جمهورية جنوب أفريقيا وحدها أكثر من 350.000 هكتار بواسطة المحاصيل المعدلة وراثياً. كما تمت الموافقة على إجراء تجارب في التعديل الوراثي في القطن، الذرة الشامي، فول الصويا، التفاح، اللفت، العنب، القمح، البطاطس، وقصب السكر. و الموافقة على إنتاج أنواع من الذرة الشامي الأبيض في العام

2003/2002م.

تتباين المواقف في الحكم على المحاصيل المعدلة وراثيا، غير أن من أهم إيجابياتها زيادة الإنتاجية، سلامة الغذاء، نقص المشاكل التي يتعرض لها المزارعون، و تقليل استخدام المبيدات. كما أن هنالك شكوكاً واسعة حول سلامة هذه المحاصيل والأغذية المنتجة منها على صحة الإنسان والحيوان و البيئة .

الأشكال العامة للأغذية المعدلة وراثيا:

توجد الأغذية المعدلة وراثياً في السوق بعدة أشكال، فقد تكون في شكل منتجات طازجة (فواكه وخضروات) والتي تكون فيها مادة الحمض النووي DNA المحور موجودة بهيئة جزيئية كاملة. أو قد تكون على شكل منتجات مصنعة مثل اللحوم، الفواكه، الخضروات ومعجون الطماطم والتي يكون فيها الحمض النووي مسموخاً. كما أن هنالك بعض المنتجات التي تصنع باستعمال عوامل مساعدة محورة الا ان الناتج غير محور ، مثل إنتاج إنزيم الرنين لتصنيع الجبن .

الآثار البيئية للأغذية المعدلة وراثيا Environmental implications :

تشمل الجوانب الإيجابية للمنتجات المعدلة وراثياً والمنتجة تجارياً على البيئة تقليل استخدام المبيدات الحشرية والخطر الناتج عنها ونقص الضرر على الأنواع غير المستهدفة، **مما يساعد على حفظ التنوع الحيوي.**

تشمل المخاطر المحتملة حدوث مقاومة في الحشرات المستهدفة وأثار ضارة على الحشرات غير المستهدفة في حالة استخدام الجين (Bt)، إضافة لحدوث مقاومة لمبيدات الأدغال في الحشائش، نتيجة لحركة الجينات من النباتات المعدلة وراثياً لأنواع الحشائش ذات الصلة بهذه النباتات. تشمل المخاطر أيضا احتمال حدوث الانجراف الجيني Genetic erosion ونقص التنوع الحيوي في المحاصيل التقليدية نتيجة للتلوث الجيني عند حدوث تهجين مفتوح بين النباتات المختلفة .

أ. حركة الجينات وظاهرة الانجراف الجيني Gene flow and genetic erosion:

يلقح الذرة الشامي عن طريق الرياح، وقليلاً ما يلقح عن طريق النحل وحشرات أخرى. يمكن حدوث تهجين بين نباتين من الذرة الشامي على مسافة أكثر من 200 متر، كما يمكن أن تهاجر حبوب اللقاح لمسافات كبيرة عند توفر الظروف الجوية المناسبة. يعتبر الذرة الشامي متوسطاً الى عالي الخطورة بالنسبة لهجرة الجينات عن طريق حبوب اللقاح من نبات لآخر، ولكنه يعتبر قليل الخطورة لنقل الجينات للأنواع البرية الأخرى. يتخوف العلماء في أوربا وجنوب أفريقا من أضرار تلوث الأصناف المحلية حال زراعة الأصناف المحورة وراثيا. وقد أوضح الباحثون في جامعة كاليفورنيا مخاطر التلوث الجيني في العام 2001؛ حيث ذكر العالم Berkeley أن سلالات محلية من الذرة الشامي المزروعة على مساحة بعيدة قد تم تلوثها بالذرة الشامي المحورة وراثياً ، مما يهدد هذه السلالات.

ب. حدوث مقاومة للمبيدات الحشرية Development of insecticide resistance:

يعمل الجين Bt من الذرة الشامي والقطن والمحاصيل الآخرى على إنتاج بروتين قاتل للحشرات ذات اليرقات حرشفية الأجنحة (Lepidopetra) التي تصيب هذه المحاصيل. وقد أثبتت التجارب أن هذا الجين ليس له أضرار على النباتات والإنسان .

تستخدم بكتريا الباسلس ، وهى بكتريا توجد في التربة وتعمل على إنتاج سموم وتستخدم في المزارع العضوية، وترش هذه البكتريا على المحاصيل لأكثر من 50 سنة مضت في صورة سليمة باعتبارها مكافحة بيولوجية للآفات، ولكن على النقيض من استخدام هذه البكتريا ففي النباتات المحورة وراثياً يتم إنتاج هذا السم في كل عمر النبات، مما يعرض الحشرات إلى هذا السم طوال فترة النمو، لذا فإنه تحت ضغط آفة ثابت فإن هذه الحشرات تعمل على إنشاء مقاومة، يحدث ذلك لأن الحشرات المفردة والتي لم تموت بواسطة تأثير الجين Bt يمكنها أن تعيش وتتكاثر. ويتم تزايد الحشرات المقاومة عبر الأجيال مما يجعل هذه النباتات المحورة غير مقاومة كما يجعل الرش بالمبيدات المستخدمة غير فاعل.

ج. الأثر على الكائنات غير المستهدفة Effect on Non-target organisms:

تعمل بعض الإنزيمات الموجودة في إمعاء بعض الحشرات على تثبيط السميات المنتجة طبيعياً في ال بكتريا . غير أن السم يوجد في صورة نشيطة في عدد كبير من المحاصيل المحورة وراثياً عن طريق التحوير بالجين Bt، لذا يسبب أضرارا كبيرة لعدد أكبر من الحشرات، والتي تشمل بعض الحشرات النافعة أيضاً. أثبتت دراسات حديثة أجريت في سويسرا أن حشرة أسد المن Lace wings تتضرر كثيراً ويحدث خلل في نموها، كما أوضحت زيادة في عدد الوفيات وسط أفراد هذه الحشرة عند إطعامها من الذرة الشامي المحور وراثياً بجين Bt. أثبتت دراسات أخرى حدوث أضرار على حشرات مفيدة مثل النحل وخنفساء أبو العيد Lady bird، كما تؤثر أيضاً على المكافحة الحيوية لبعض الحشرات عن طريق أثرها الضار على المفترسات Predators والطفيليات Parasitoids.

د. حدوث مقاومة لمبيدات الحشائش Development of herbicide tolerance weeds:

تم تحوير معظم المحاصيل المحورة لمكافحة الحشائش حالياً بنقل جين المقاومة لمبيدات الحشائش الجلايفوسيت Glyphosate والجلوفوسنيت Glufosinate من النباتات المقاومة للنباتات المراد إحداث المقاومة فيها للمبيد المعنى. هنالك أدلة علمية على حركة الجينات عبر حبوب اللقاح من حقل لآخر ومن النباتات المحورة وراثياً للحشائش ذات الصلة. كما أن هنالك دراسات أخرى تؤكد وجود تحمل وسط الحشائش، مما يسبب مشكلة في مكافحة هذه الحشائش مستقبلا.

سلامة الغذاء Food safety:

تشمل الجوانب الرئيسية في سلامة الغذاء الآتي:

1. السمية: من المعلوم أن النباتات تنتج عوامل مضادة للتغذية مثل مثبطات البروتيزات، مواد محللة للدم، قلويدات، والتي غالباً ما تحمي النبات من الحشرات والأمراض. كذلك تحتوي نباتات الطماطم على مادة طبيعية

تسمى توماتين (Tomatine) منتشرة في جميع أجزاء النبات، لكنها تتركز في الأوراق والأزهار المتفتحة، يعتمد تركيز مادة التوماتين في الطماطم على درجة نضج الثمار، ويقل بتقدم مرحلة النضج وتحول لون الثمار إلى اللون الأحمر. وبشكل عام يجب ألا يزيد محتوى النباتات المعدلة وراثياً من هذه المواد عما هو موجود في النباتات الطبيعية. لذا يجب التأكد من عدم تأثير التحوير الوراثي على زيادة تركيز هذه المواد في الثمار عند النضج.

2. الحساسية: وهي حالات ظهور مواد جديدة مسببة للحساسية في المنتجات المعدلة وراثياً، هنالك قلق متزايد من أن استعمال تقنية الهندسة الوراثية قد تؤدي إلى إدخال مادة وراثية من أي مصدر كان (نبات، حيوان، ميكروب) إلى الغذاء، لتعبر عن نفسها في إنتاج بروتينات تؤدي بدورها إلى حدوث حساسية لدي المستهلك.

3. مقاومة المضادات الحيوية Antibiotic resistance: يستعمل المختصون في الهندسة الوراثية ما يسمى بالمورثات الواسمة التي تساعد على انتخاب النباتات التي دخل في تركيبها الوراثي المورث المرغوب. أكثر هذه المورثات الواسمة استعمالا هو المورث المختص بمقاومة المضاد الحيوي الكانامايسين، الذي يعمل على إنتاج الإنزيم Kanamycin phospho-transferase والذي يعمل على إزالة سمية الكانامايسين بإضافة مجموعة فوسفات له. تموت خلايا النباتات عادة عند النمو في وجود المضادات الحيوية، إلا أن خلايا النباتات المعدلة التي أدخل في تركيبها الوراثي المورث الخاص بإنتاج هذا الإنزيم فإنها تستطيع النمو في أوساط تحتوي على المضاد الحيوي. إن تناول نباتات أو أغذية من هذا النوع تدعو للسؤال فيما إذا كان ذلك سوف يبطل فعالية المضادات الحيوية التي يأخذها المستهلك للعلاج عن طريق الفم أو أن المورث الموجود في النبات أو الغذاء يمكن أن ينتقل إلى الميكروبات الممرضة في القناة الهضمية للمستهلك أو في التربة ما يجعل هذه الميكروبات مقاومة للعلاج بالمضادات الحيوية.

أوضحت الوكالات الخاصة بتنظيم تجارة و استهلاك الكائنات المحورة وراثياً في أمريكا وأروبا أن كل أصناف الذرة الشامي المحورة وراثياً والتي أجيزت للاستخدام التجاري سليمة لاستهلاك الإنسان دون التطرق لآثارها المحتملة على المدى الطويل. من الاختبارات التي أجريت هي احتمالية حدوث سمية وسط الثدييات، وتحديد نوع الحساسية. عادة ما تتم اختبارات السمية على فئران التجارب باستخدام بروتين نقى بكمية كبيرة أكبر من الكمية التي توجد في المنتجات المعدلة وراثيا. كما يتم تقدير الحساسية بالغربلة لوجود تركيبات بروتين مشابهة للبروتينات المسببة للحساسية.

يتم استخدام الأغذية المحورة حالياً في أمريكا مع مراعاة أنها تستهلك في صور تصنيعية أو موادٍ مضافة وبكميات بسيطة. يعتمد تقدير المخاطر على مفهوم مقارنة الغذاء المعدل وراثيا مع نظيره المنتج طبيعيا ورصد الاختلاف بينهما، والذي يصبح بعد ذلك دليلا لتقدير السلامة الحيوية .هنالك احتمال أن بعض الجينات Novel genes المدخلة في الغذاء تسبب أضراراً للإنسان. يجب إجراء تجارب على تغذية الحيوانات في المدى القصير والبعيد لتقدير سلامة هذه الأغذية. فيما أوضحت الجمعية الإرشادية للأغذية المعدلة وراثيا و التصنيع في الولايات المتحدة الأمريكية والتي تعرف اختصارا بـ ACNFP، أن تصنيع حبوب من ذرة شامي معدل وراثيا لمقاومة الحشرات سوف يؤدى بدوره إلى مسخ المادة الوراثية و المنتجات الجينية الأخرى؛ بحيث لاتسبب أضرارا للإنسان. ولكن على الرغم من ذلك وجدت قطع من الحمض النووي في الغذاء المصنع، مما يلفت الانتباه إلى ضرورة اخذ المحاذير الكافية لسلامة الإنسان، مثل خلو الغذاء من المواد السامة والمواد المسببة للحساسية، حال استخدام أغذية معدلة وراثيا. مما يضاعف أهمية اخذ مثل هذه المحاذير هو أنه في بعض الدول يستهلك الذرة الشامي مباشرة ودون أي تصنيع.

يدافع بعض العلماء عن التعديل الوراثي لمقاومة الحشرات عن طريق التحوير الوراثى بالجين Bt بالمبررات الآتية :

1. المبيدات الناتجة عن البكتريا عبارة عن بروتينات.
2. توجد البروتينات عادة في الأغذية ، بخلاف بعض الحالات، فإنها لاتتسبب في مخاطر على الثدييات .
3. لغالبية بروتينات Bt فإن البكتريا نفسها مسجلة للاستخدام كمبيد حيوي في محاصيل الغذاء وبدون أي محددات .
4. تعمل بروتينات إحداث السمية في الحشرات وفق ميكانيكية خاصة لاتضر بالإنسان أو الحيوان أو البيئة. وكما هو معروف فإن أمعاء الثدييات ليس لديها مستقبلات يمكن أن ترتبط مع سميات الجين Bt الفاعلة؛ لذا فإن هذه السميات لا تحدث ضرر على صحة الإنسان.

وجدت هذه الاقتراحات نقداً شديداً، حيث إنه ليس من الضروري صحة افتراض أن بروتينات Bt المعبر عنها في الذرة الشامي المحتوي على الجين Bt هي نفس بروتينات Bt من المصدر (البكتريا) . كما أن سميات الجين Bt الميكروبية عبارة عن سميات أولية، والتي تهضم جزئياً في داخل أمعاء الحشرة لإنتاج سميات فاعلة، بينما نجد أن بعض النباتات التي تحتوي على الجين Bt تعمل على إنتاج سميات فاعلة. وكما هو معروف فإن سمية البروتين ليست محدودة في إحداث أثر أو آثار محددة. كما أن التفاعل مع البروتينات المسببة للحساسية ليس ذا استجابة محددة. أضف إلى ذلك تفتقد السمية الحرجة إلى أعراض وسيطة، ولذلك فعند تناول غذاء معدل باستمرار ولزمن طويل نسبيا يمكن أن يؤدي إلى ألم في العضلات، احمرار في الجلد وأعراض ضعف أخرى.

تحتوي كل الأغذية المحورة وراثياً المستخدمة تجارياً على جينات واسم المقاومة للمضادات الحيوية ARM. هنالك تخوف من إمكانية نقل هذه الجينات لأمعاء الإنسان وللكائنات الدقيقة الموجودة بداخلها. أدى التخوف من مقاومة المضادات الحيوية بالرابطة الراديكالية البريطانية في مايو 1999 إلى أن تقرر أن استخدام جينات الأدلة المقاومة للمضادات الحيوية ARM يعتبر مخاطرة كاملة غير محتملة.

الضوابط المرتبطة بالاتجار بالأغذية المعدلة وراثيا:

تشمل هذه الضوابط الجوانب التالية:

أولا: يجب توفير المعلومة المتكاملة عن نوع التعديل الوراثي الذي تم في الغذاء أو المحصول، في حال الرغبة في دخوله للحواجز الجمركية للدول التي تعاني من ضعف في القدرات في مجال الأحياء الجزيئية و الهندسة الوراثية والتعديل الوراثي على وجه الخصوص.

ثانيا: يجب وضع ديباجات لتوضيح أن هذا المنتج معدل وراثيا، كما هو معمول به في أوروبا و أمريكيا. وحسب اتفاقية قرطاجنة للسلامة الحيوية.

ثالثا: في حالة دخول بعض الأغذية المعدلة وراثيا في صورة بذور يجب التعامل معها وفق الاتفاقات العالمية، وفي حالة الموافقة على دخولها يجب سحنها أولا حتى لا تلوث الموارد الوراثية المحلية والأصناف التجارية بالجين المحدد في حالة زارعتها مع هذه الموارد الوراثية في نفس الحقل، فعند سحن الحبوب هنالك أشياء لابد من فعلها والتي تشمل تحديد نوع الجينات في الذرة الشامي المعدل. لضمان عدم وجود جينات غير مسموح بها لغذاء الإنسان، مثل جين Star link (R)، وجينات مقاومة المضادات الحيوية. يعرف الجين Star link (R) على أنه الجين المحور الموجود في الذرة الشامي المسموح به غذاءً للحيوانات وليس لاستهلاك الإنسان، وذلك لاحتوائها على بروتين يسمي Crygc. حيث يعتبر الجين مسبباً للحساسية في بعض الناس، لذا يمنع وضعه في سلسلة غذاء الإنسان.

يعد إدخال برنامج الغذاء العالمي WFP للذرة الشامي المعدل وراثياً لزامبيا مخالفاً للنظم العالمية الخاصة بحركة الكائنات المعدلة وراثيا، حيث يجب إخطار الدول المستقبلة عن طبيعة المواد المستوردة قبل وقت كافي. يعد هذا الحدث ضد روح الاتفاقات العالمية التي تحكم حركة الأغذية المعدلة وراثيا، مثل إعلان رايو Rio declaration. واتفاقيات الحفاظ على التنوع الحيوى The convention on biological diversity، وبروتوكول قرطاجنة للسلامة الحيوية The Cartagena protocol on biosafety. أدت الظرف الطبيعية

غير المساعدة في الأعوام 2001-2002 إلى نقص الغذاء في دولة زامبيا. حيث تم إدخال ذرة شامي معدل وراثيا بواسطة برنامج الغذاء العالمي لتفادي هذه الأزمة. حيث أدى دخول الذرة الشامي المحور وراثياً إلى تساؤلات عن مدى سلامته للبيئة وصحة الإنسان باعتبار الأضرار المحتملة من التعديل الوراثي مثل السمية العالية، والحساسية، ومقاومة المضادات الحيوية. أكد فريق البحث الذي شُكل من علماء من زامبيا لدراسة أثر دخول الذرة الشامي المعدل وراثيا على الجوانب المهمة التالية:

1. أكد الفريق على أهمية الأخذ في الاعتبار تأثير الأغذية المعدلة وراثيا على التنوع الوراثي لدى المزارعين المحليين في محصول الذرة الشامي نتيجة لاحتمال حدوث التلوث الجيني.
2. على الرغم من أن الذرة الشامي المحور يستهلك عند ملايين من الأمريكيين إلا أنه يؤكل في أشكال تصنيعية عالية، كما أنه ليس الغذاء الأوحد في أمريكا. أما في زامبيا فيعتبر الغذاء الأوحد، كما يعتبر المصدر الوحيد تقريبا للمواد الكربوهيدريتية لغالبية السكان.
3. كل الدول التي زارها هذا الفريق لديها إطار وطني للسلامة الحيوية، كما أن في الولايات المتحدة توجد لوائح تعمل على تنظيم إنتاج واستهلاك الأغذية المعدلة وراثيا.
4. ادخال ذرة شامي معدل وراثيا زامبيا يمكنه أن يوقف مسألة تصدير الذرة الشامي المنتج عضوياً وغير عضوي من زامبيا للأسواق العالمية.

يمكن النظر لكل هذه النقاط ووضعها في الاعتبار في حالة دخول أي نوع من الأغذية والمحاصيل المعدلة وراثيا للدول المختلفة.

كما توصل هذا الفريق للتوصيات الآتية :

1. يجب على دولة زامبيا تأسيس سياسة في مجالات التقنية الحيوية والسلامة الحيوية، وتطبيق الأسس المنظمة فى هذه المجالات، وبأسرع فرصة ممكنة،

لأن ذلك بإمكانه تسهيل إنشاء ما يسمى بالآليات المنظمة الضرورية للتعامل مع المحاصيل المعدلة وراثيا.

2. يجب على الدولة التوقيع على بروتوكول قرطاجنة والبروتوكولات الأخرى ذات الصلة، وذلك لتسهيل تعامل دولة زامبيا مع الأقطار الأخرى في مجالات التقنية الحيوية والسلامة الحيوية وحركة الكائنات المعدلة وراثيا عبر حدودها الجغرافية.

3. يجب على الدولة طلب المساعدات الممكنة في مجال بناء القدرات الوطنية من الدول والمنظمات العاملة في هذا المجال، مثل أمريكا، بريطانيا، جمهورية جنوب أفريقيا، النرويج وجمهورية هولندا.

4. يجب على الدولة جمع الذرة الشامي المعدل وراثيا الموجود بالقطر الآن لمعرفة ما إذا كان يحتوي على أدلة جينية لجين Star link أو مقاومة المضادات الحيوية.

ولأهمية هذه التوصيات فقد قامت سكرتارية الاتحاد الأفريقي في العام 2005م بتقديم كتيب متكامل عن تجربة زامبيا في هذا المجال، وتوزيعه على نطاق واسع بين السياسيين و الأكاديميين و المهتمين في كل الدول الأفريقية حتى تعم الفائدة، المتمثلة في كيفية التعامل مع الأغذية المعدلة وراثيا، في كل دول الإتحاد الأفريقي.

وبالله التوفيق ،،،

المراجع باللغة العربية

- ❖ الذرة و التنمية. دور الطاقة الذرية في تنمية المجتمع العربي: استخدام التطفير التجريبي في بعض المحاصيل للحصول على طفرات مقاومة للأمراض. نشرة علمية إعلامية تصدرها الهيئة العربية للطاقة الذرية. العدد الرابع، المجلد السادس، نيسان/ ابريل 1994 .
- ❖ الذرة و التنمية. دور الطاقة الذرية في تنمية المجتمع العربي: استخدام الإشعاع في بعض المحاصيل للحصول على طفرات مقاومة للملوحة و الجفاف. نشرة علمية إعلامية تصدرها الهيئة العربية للطاقة الذرية. العدد السادس، المجلد السادس، حزيران/يونيو 1994.
- ❖ الذرة و التنمية. دور الطاقة الذرية في تنمية المجتمع العربي: استخدام التظفير التجريبي في تربية و تحسين النبات. نشرة علمية إعلامية تصدرها الهيئة العربية للطاقة الذرية. العدد السابع، المجلد السادس، تموز/ يوليو 1994 .
- ❖ عبد الله عوض سيد احمد، محمد طه يوسف، عباس آدم محمد. 2003. إنتاج الخضر في السودان: أساسيات و تطبيقات. دار جامعة الجزيرة للطباعة و النشر.
- ❖ أ. د. باس كامل دلالي، أ. د. ماجد بشير الأسود.2003 . المستهلك والأغذية المعدلة وراثياً. الزراعة و التنمية ص: 17- .20.
- ❖ الدكتور إسكندر فرنسيس إبراهيم. مقال. مركز البحوث الزراعية و البيولوجية. منظمة الطاقة الذرية العراقية-بغداد.
- ❖ محاضرة الدكتور إبراهيم شعبان السعداوي في الحلقة الدراسية حول التشعيع في تطوير أجيال زراعية محسنة التي عقدتها الهيئة العربية للطاقة الذرية في بغداد 18 إلى 20 ديسمبر1993 .
- ❖ محمد طه يوسف. 2005. البحث العلمي الزراعي وتحديات الواقع العربي. الزراعة والتنمية، المنظمة العربية للتنمية الزراعية، صـ 42 – 45.

مقال أعده الدكتور ممدوح عبد الغفور حسن. هيئة المواد النووية. القاهرة- جمهورية مصر العربية.

المراجع باللغة الانجليزية

- Alexandra Gruss and Dusko Ehrlich. S. 1989. The family highly interrelated single-stranded Deoxyribonucleic acid plasmids. Microbiological Reviews. 231-3410.

- Amine O. Noueiry. William J. Lucas. Robert L. Gilbertson. 1997. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmata transport. Cell Vol. 75: 925-932.

- Andrew H. Paterson. Eric S. Lander. John D. Hewitt. Susan Peterson. Stephen E. Lincoln and Steven D. Tanksley. 1993. Resolution of quantitative triats into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphism. Nature Vol. 335: 721-726.

- Arian Dijkuizen. 1999. QTL conditioning yield and fruit quality triats in melon (*Cucumis melo* L.). Cucurbit Genetics Cooperative Report 22: 8-10.

- Ariel Arencibia. Eugenio Gentinetta. Elena Cuzzoni. Stefano Castiglione. Aiay Kohli. Philippe Vain. Mark Leech. Paul Christou. Francesco Sala. 1998. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation. Molecular Breeding 4: 99-109.

- Ariel Cuzzani. Stefanocastig-Lione. Aiay Kahli. Phillippe Vain. Mark Leech. Paul Christou. Francesco Sala. 1998. Molecular analysis of the genome of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants produced via particle bombardment or intact cell electroporation.. Molecular breeding 4. 99-109

- Baudracco-Arnas L. 1995. Simple and inexpensive method for DNA extraction from *Cucumis melo* L.. Cucurbit Genetics Cooperative Reports 18: 50-51.

- Beaud. G. 1995. Vaccinia virus DNA replication: A short review. Biochimie 77: 774 – 779

- Bournoville R. Simon. J.-C.. Badenhausser. I.. Girousse. C.. Guilloux. Andre. S. 2000. Clones of pea aphid. Acyrthosphon pisum (Homiptera: Aphididae) distinguished using genetic markers. differ in their damaging effect on a resistant alfalfa cultivar. Bulletin of Entomological Research 90: 33-39.

- Charles. S. Gasser and Robert T. Fraley. Genetically Engineering Plant for Crop Improvement.. Science Vol. 244. 1293 – 1299.

- Danin- Poleg Y.. Tzuri. G.. Katzir. N. 1998. Application of Inter-SSR markers in melon (*Cucumis melo* L.). Cucurbit Genetics Cooperative Report 21: 25-28.

- David W. Wolff and Jianling Zhou. 1996. Potential utility of RAPD markers linked to Fom2 gene in melon (*Cucumis melo* L.). Cucurbit Genetics Cooperative Report 19: 61-62.

- Dermot P. Coyne. 1995. Classical and molecular approaches to breeding horticultural plants for disease resistance: Introduction to the colloquium. HortScience. Vol. 30(3): 448-449.

- Desbiez C.. Wipf-Scheibel. C.. Lecoq. H. 1999. Biological. serological and molecular variability of a potyvirus zucchini yellow mosaic virus. Symposium INRA/COA on Scientific Cooperation in Agriculture. Toulouse. April 19-20.

- Doem C.M.. Lapidot. M.. Beachy. R.N.. 1992. Plant virus movement proteins. Cell 69: 221-224.

- Donna M. Shattuck-Eidens. Russell N. Bell. Susan L. Neuhausen. Tim Helentjaris. 2000. DNA sequence variation within maize and melon: Observation from polymerase chain reaction amplification and direct sequencing. DNA sequence variation in plants. 126:206-217.

- Doyle. J. J.. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA. Isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue plytochem. Bull 19: 11 – 15.

- Dressler and Huntington Potter. 1982. Molecular mechanisms in genetic recombination. David Annual Review of Biochemistry51: 727-761.

- Edwards. M.D.. Stuber. C.W.. Wendel. J.F. 1987. Molecular markers- facilitated investigations of quantitative triat loci in maize. Numbers. distribution. and type of gene action. Genetics 116: 113-125.

- Elizabeth. P.B. Fontes. Verne A. Luckow. Linda Hanley-Bowdoin. 1992. A Geminivirus replication protein is a sequence-specific DNA binding protein. The Plant Cell Vol. 4: 597-608.

- Fredrick A. Bliss. 1993. Biotechnology and plant breeding. Acta Horticulturae 336:23-31.
- Frisch. D.A.. Harris-Haller. L.W.. Yokubaitis. N.T.. Thomas. T.L.. Hardin. S.H.. Hall.T.C.1995. Complete sequence of the binary vector Bin19. Plant Molecular Biology 27: 405-409.

- Gheysen. G.. Villarroel. R.. Van Montagu. M. 1991. Illegimate recombination in plants: A model for T-DNA integration. Genes Dev. 5: 287-297.

- Ha. J.S.. Pang. S.Z.. Nagpala. P.G.. Siemieniak. D.R.. Slightom. J.L. Goasalves. D. 1993. The coat protein genes of squash mosaic virus cloning sequence analysis and expression in tobacco protoplasts. Arch Virol. 130: 17-31.

- Hauke Hennecke and Desh Pal S. Verma. 1990. Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions Vol. 1. Kluer Academic Publishers. Dordrecht. Boston. London.

- Heberle- Bors E.. Charvat. B.. Thompson. D.. Schernchaner. J.P.. Barta. A.. Matzke. A.J.M. 1988. Genetic analysis of T-DNA insertions into tobacco genome. Plant Cell Report 7:571- 574.

- Hernalsteens. J.-P.. Thia-Toong. L.. Schell. J.. Van Montagu. M. 1984. An Agrobacterium-transformed cell culture from. monocot *Asparagus officinalis*. EMBO 3: 3039-3041.

- Hinchee. M.A.W.. Conner-Ward. D.V.. Newell. C.A.. Donnell. M.. Horsch. R.T.. Sato. S.J.. Gasser. C.S.. Fischhoff. D.A.. Re. D.B.. Fraley. R.T.. Horsch. R.B. 1988. Production of transgenetic soybean plants using *Agrobacterium* – mediated DNA transfer. Bio/Technology 6: 915-922.

- International Plant Genetic Institute. 1996. Measuring genetic variation using molecular markers. Version 1and 2. http:www.cgiar.org.ipgri

- Jaagrati Jain and More. T.A.. 1996. Identification and selection of genetic marker donor lines for incorporation of disease resistance in cultivars of Cucumis *melo L.* Cucurbit Genetics Cooperative Report 19: 53-56.

- Jain. J.. and More.T.A. Preliminary screening of indigenous cultivars and a few known lines of *Cucumis melo* for Fusarium wilt and CGMMV resistance . Cucurbit Genetics Cooperative Report 17: 69-71.

- Jain J.. and More. T.A. 1996. Selection and characterization of known genetic marker accessions for hybridization with commercial varieties of *Cucumis melo L.* Cucurbits Genetics Cooperative Report 19: 49-52.

- James Whelan and Elzbieta Glaser.1997. Protein imported into plant mitochondria. Plant Molecular Biology 33: 771-789.

- Jan de Jong. Wim Rademaker and Kazushi Ohishi.1995. Agrobacterium-mediated transformation of Chrysanthemum. Plant Tissue Culture and Biotechnology. Volume 1 No.1:39-42.

- Kerr. A. and Brisbane. P.G. 1983. Agrobacterium. In: Faley. P.C.. and Persley. G.J. (eds.). Bacterial diseases: Adiagnostic guide. Academic Press. Sydeny. pp: 27-43.

- Kheyr –Pour A.. Bananej. Dafalla. K.. G.A.. Caciagli. P.. Noris. E.. Ahoonmench. A.. Lecoq. H.. Gronenborn. B.2000. Watermelon chlorotic stunt virus from Sudan and Iran: Sequence comparisons and identification of a Whitefly-transmission determinant. Virology No.6: 629-635.

- Krens F. A.. Molendijk. L.. Wallem G.J.. Schilperoort. R.A. 1982.. In vitro transformation of plant protoplasts with Ti-plasmid DNA.. Nature Vol. 296: 72-75.

- Laufs J.. Jupin. I.. David. C.. Schumacher. S.. Heyraud-Nitschke. F.. Grorenborn. B. 1995. Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein lantion. a review . Biochimie 77: 765 – 773.

- Loren H. Rieseberg. Stuart J. E. Baird and Keith A. Gardner. 2000. Hybridization: introgression and linkage evolution. Plant Molecular Biology 42: 205-224.

- Meyer. A.D.. Ichikawa. T.. Meins. F.J. 1995. Horizontal gene transfer: Regulated expression of a Tobacco Homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rol C gene*. Mol. Gen. Genet. 249: 265-273.

- Miklos Fari. Istvan Nagy. Marta Csanyi. Judit Mityka. Andras Andrasfalvy. 1995. Agrobacterium mediated genetic transformation and plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis from cotyledon leaves in eggplant (*Solanum melongena* L. cv. Keskemeti Lila. Plant Cell Reports 15: 82-86..

- Milgroom M.G. 1997.Genetic variation and the application of genetic markers for studying plant pathogen populations. Journal of plant pathology 78 (1): 1-13.

- Mohamed Bendahmane and Bruno Gronenborn. 1997. Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antigense RNA. Plant Molecular Biology 33: 351 – 357.

- Mohamed T. Yousif. Ali A. El Jack. Gasim A. Dafalla. Ahmed Kheyr-Pour. Bruno Gronenborn. Michel Pitrat and Cathrine Dogimont. 2005. Genetics and stability of resistance to watermelon chlorotic stunt virus in melon (Cucumis *melo L.*). Gezira Journal of Agricultural Sciences 3(1): 54-64.

- Pan-Chi Liou. You-Ming Chang. Ying-HueyCheng. Wha-Shin Hsu. Chi-Hsiung Hsiao. 1999. Construction of a genetic linkage map in *Cucumis melo* and biotechnological studies at Tari. Symposium INRA/COA on Scientific Cooperation in Agriculture. Toulouse (France). April 19-20.

- Patrick Wechter W.. Michael P. Whitehead. Claude E. Thomas. Ralph A. Dean. 1995. Identification of a random amplified polymorphic DNA marker linked to the Fom 2 Fusarium wilt resistance gene in muskmelon MR-1. Molecular Plant Pathology Vol. 85 No. 10: 1245-1248.

- Paula P. Chee. Krystal. A.. Fober. Jerry. L. Slightom. 1989. Transformation of soybean (*Glycine max*) by infecting germinating seeds with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Physiology 91: 1212-1218.
- Petit. A..and Tempe. J. 1985. The function of T-DNA in nature. In: Molecular Form and Function of the Plant genome (Van Vloten-Doting. L.. Grooting. G.. Hall. T.). eds.; Plenum Press. New York. pp.:625-636.

- Petra Hofer. Ian D. Bedford. Peter G. Markham. Holger Jeske. Thomas Frischmuth.1997. Coat protein gene replacement results in whitefly transmission of an insect nontransmissible geminivirus isolate Virology 236: 288-295.

- Pitrat. M. 1991. Linkage groups in *Cucumis melo* L. Journal of Heridity. 82: 406-41.
- Potrykus. I. 1990. Gene transfer to cereals: An assessment. Bio/Technology. 8:535-541.
- Quick ChangeTM Site-Directed Mutagenesis. Instruction manual. Catalog# 200518. Revision#076002.
- Rigden J.E.. Dry. I.B... Krake. L.R. Rezaian. M.A. 1996. Plant virus DNA replication processes in *Agrobacterium*: Insight into the origins of geminiviruses Proc. Nalt. Acad. Sci.USA 93: 10280-10284.
- Rogers. S.O. and Bendich. A. J. 1985. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh. herbarium and mummified plant tissue. Plant Molecular Biology Vol. 5 : 69 – 76.
- Saghai–Maroof. M. A.. Soliman. K. M.. Jorgensen. R. A.. Allard. R. W. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance. chromosomal location and population dynamics. Proc. Natln Aoad. Sci. USA 81: 8014 – 8018.
- Sambrook J. Fritsch. E.F.. Maniatis.T. 1990. Molecular cloning: A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Printed in the United State of America.
- Shahid Mansoor. Rob W. Briddon. Yusuf Zafar and J...

- Shenwei Qin. Brian M. Ward. Sondra G. Lazarowitz. 1998. The bipartite geminivirus coat protein aids BR1 fuction in viral movement by affecting the accumulation of viral single-stranded DNA. Journal of Virology Vol. 72 No.11: 9247-9256.

- Shmuel Wolf. Carl M. Deam. Roger N. Beachy. William J. Lucas. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science Vol 246: 377 – 379.

- Sondra G. Lazarowitz. 1992. Geminiviruses:Genome structure and gene function. Critical Reviews in Plant Sciences 11(4): 327-329.

- Stratagene. Quick ChangeTM Site –Directed Mutagenesis Kit. Instruction Manual. Catalog #200518. Revision# 076002.

- Tefer. D. 1989. Ri T-DNA from Agrobacterium rhizogenes: A source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development. ecology. and evolution. In: Plant-microbe interactions: Molecular and Genetic perspectives. (Kosuge T.. and Nester. E.W.). eds.; McGrow-Hill. New York. 3: 294-342.

- Tohn H. Wilson. 1982. Genetic Recombination. Ann. Res. Biochem 51: 727 – 761.

- Wang H.. Thomas. C.E.. Dean. R.A. 1997. Genetic map of melon (*Cucumis melo* L.)based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Applied Genetics 95: 791-798.

- Wang H.L. Gonsalves. D.. Provvidenti. R.. Lecoq. H. 1991. Effectiveness of cross protection by a mild strain of zucchini yellow mosaic virus in cucumber. melon and squash. Plant Disease 203-207.

- Wang. K.. Herrera-Estrella. L.. Van Montagu. M.. Zambryski. P. 1984. Right 25bp terminus sequence of the nopaline T-DNA is essential for and determines direction of DNA transfer from *Agrobacterium* to plant genome. Cell 38: 455-462.

- Wayne Powell. Gordon C. Machray. Jim Provan. 1997. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Science Vol. 7: 215-220.

- Yanofsky. R.L.. Fine. M.. Pellow. J.W. 1990. A mutant neomycin phosphotransferase II gene reduces the resistance of transformants to antibiotic selection pressure. Porc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 3435-3439.

- Zupan. J.. Muth. T.R.. Draper. O.. Zambryski. P. 2000. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. The Plant Journal 23: 11-28.