الباب الرابع

الفصل الاول

- تطبيقات علي التكنولوجيا الحيوية
- في أمراض النبات

الاهداف :

- ١-تعريف التكنولوجيا الحيوية
- ٢-التعريف بزراعة النسج والهندسة الو راثية .
- ٣- إلقاء الضوء على الطرق المستخدمة فى زراعة النسيج
- أولا-مزارع الإكثار الدقيق ثانيا- تنمية أو زراعة
- البروتوبلاستس ومعاملته بالطرق التالية
-
- أ- حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيرس :
- ب- حقن البروتوبلاست بمواد وراثية عن طريق نواقل مهندسة وراثيا :
- ج - اختيار النباتات المشتقة من **البروتوبلاست** المقاومة للإصابة المرضية
- والمقاومة
- لتوكسينات الكائن الممرض والمولد السامة الأخرى
- د- تقييم المركبات المضادة للفيرس عن طريق معاملة البروتوبلاست المصاب بالفيرس:
- ه- اندماج البروتوبلاست لنقل جين المقاومة إلي العوائل غير المتوافقة جنسيا
- ثالثا: مزارع المتوك في إنتاج نباتات أحادية
- ٤- **بعض النتائج المتحصل عليها فى بعض البلدان(استخدام تكنولوجيا زراعه**
- **الانسجه فى قاره اسيا)**

تابع

- ٥- تعريف الهندسة الو راثية وأهميتها في أمراض النبات
- تكاثر الجين Gene Cloning، ناقلات الكلونة أنزيمات القطع وأنزيمات الالتحام
- ٦ -تكاثر DNA متمم عن mRNA
- ٧- تكاثر الجينات من المجموعة الوراثية DNA
- ٨- الفيروسات النباتية كعوامل ناقلة والفيرويدات والعناصر المتنقلة

- مقدمة
- التكنولوجيا الحيوية هى المعالجة بالوسائل الميكانيكية والتحورات الوراثية ومضاعفة جينلت الكائنات الحية من خلال طرق حديثة مثل مزارع النسج والهندسة الوراثية .فزراعة الانسجة هى زراعة خلايا او أنسجة أو أعضاء نباتية فى بيئات صناعية ذات عناصر غذائية معينة بغرض الحصول على نبات كامل وأهم هذه الطرق هى مزارع الاكثار الدقيق حيث تؤخذ أنسجة حية من النبات مثل القمم الجذور أو قصاصات الورق وتعامل معاملات خاصة أو قد يستخدم زراعة البروتوبلاست وذلك بزراعة الخلايا بعد أن يزال الجدار الخلوى بطرق معينة ثم يؤخذ هذا البروتوبلاست لاستغلاله فى أمراض النبات
- فمثلا قد يحقن البروتوبلاست بالفيروسات لدراستها أو قد يحقن بمواد وراثية مثل البلازميد او الفاج او الكوزميد وهى نواقل مهندسة وراثيا كما يمكن استغلال البروتوبلاست لدمجه لنقل جين المقاومة
- كذلك تعتبر مزارع المتوك التى تستخدم لإنتاج نباتات أحادية يمكن مضاعفتها للحصول على نباتات ثنائية متماثلة أصيلة للعوامل الوراثية وبذلك يمكن تقليل عدد سنوات التربية للحصول على نباتات متماثلة أصيلة فى مدة قليلة بدلا من استعمال طرق التربية العادية

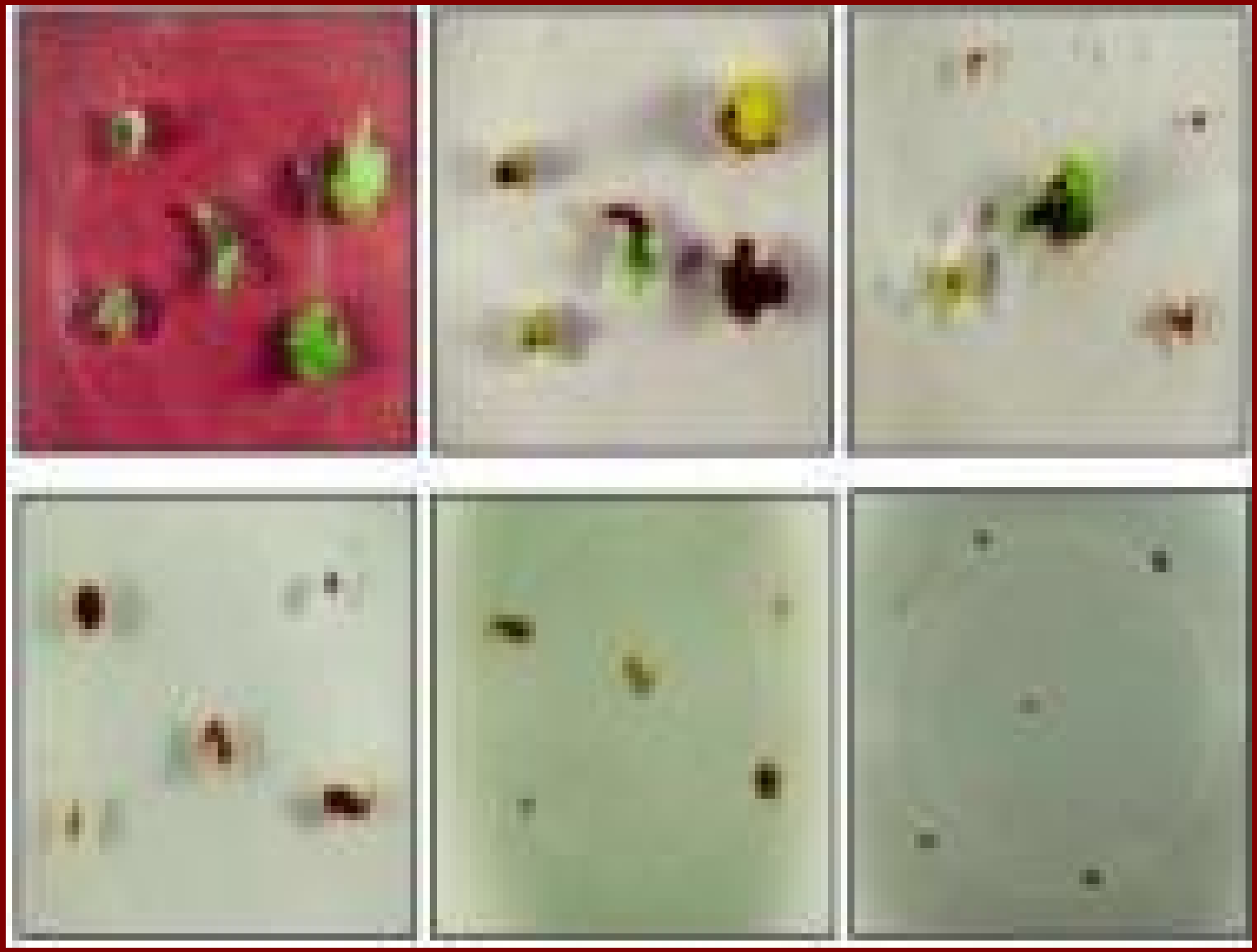
- تابع
- أما الهندسة الو راثية فتهتم بفصل الجينات من خلايا الكائنات الراقية ونقلها إلى خلايا الكائنات الدقيقة بغرض إنتاج منتجاتها الروتينية وكذلك نقل الجينات إلى النبات لتحسين صفاتها الاقتصادية والمقاومة
- ويستلزم عملية النقل هذه تكاثر للجين DNAcloning حيث يمكن مضاعفة قطعة DNA من كائن حى عدة ملايين من المرات داخل البكتريا ويستخدم فى عملية نقل الجين ناقلات الكلونة مثل البلازميد ،الفاج والكوزميد علاوة على أنزيمات لقطع ال DNA من كائن وأنزيمات للحم قطعة ال DNA فى كائن أخر
- ومن اشهر البلازميدات بلازميد TIالموجود فى بكتريا Agrobacterium tumefaciens اما الفيروسات فمنها فيروس موزيك القرنبيط وفيروس الجوزاء
- وفى بعض الحالات فى مرحلة معينة من نمو الخلية يكون الجين نشط جدا ففى هذه الحالة يستخلص mRNA
- ويتم تكاثر الDNA لتكوين cDNA

- تعرف التكنولوجيا الحيوية في الاصطلاحات الحديثة بأنها المعالجة بالوسائل الميكانيكية والتحورات الو راثية ومضاعفة الكا ئنات الحية خلال طرق حديثة مثل مزارع النسج والهندسة الو راثية مؤدية إلي إنتاج كائنات جديدة أو محسنة أو منتجات يمكن استعمالها بطرق مختلفة
- تبنى التكنولوجيا الحيوية في النبات علي الفهم الكامل للجزئ الحيوي في النبات وعلي استعمال الطرق المختلفة في مزارع نسج النبات وعلي مقدرتنا في عزل وتعريف الجينات المتخصصة من أي نوع من أنواع النبات (الكائن الحي) وتنقل إلي كائن حي آخر .
- إن التكنولوجيا الحيوية في النبات تجعل من الممكن إسراع تكاثر طرز النبات فهي تسرع فيفك قيود تربية النبات وتجعل من الامكان إنتاج المنتجات النباتية المتخصصة صناعيا تحت ظروف مزارع الأنسجة .

- تتصل التكنولوجيا الحيوية في النبات اتصالا وثيقا مع أمراض النبات بعدة طرق وإن أكثر الطرق وضوحا كما يلي :
- ١- إن زيادة إنتاج النباتات عن طريق سرعة تكاثر الطرز النباتية Clonal من المحتمل أن يؤدي إلي الحاجة الكبيرة للحصول علي نباتات أم خالية من الكائن الممرض وما يتبع ذلك من وقاية النباتات الحية (الأبناء) من الكائنات الممرضة .
- وإن وقاية الخلفة هذه ستكون ضرورية بسبب زيادة كثافة هذه النباتات في الأطوار الأولى من زراعة مزارع النسج .
- إن زيادة التماثل الو راثي في النباتات والمدة الطويلة التي يتعرض فيها النبات التي يكون محكوما بتغذية محسوبة وظروف بيئية معينة قبل وبعد زراعتها خارجيا في الحقول من المحتمل أن يجعل النبات أكثر قابلية لانتشار إصابة شديدة مفاجأة من الكائن الممرض .

- ٢- إن الأصناف النباتية الجديدة التي أضيف لها الجينات عن طريق الهندسة الوراثية من المحتمل أن يظهر عليها عدم ثبات كبير أو عدم ثبات غير متوقع جهة بعض المجموعات من الظروف البيئية غير المتوقع التنبوء بها ومن ناحية المكروفلورا في الأماكن التي هي ساكنة فيها .
- ٣- تكون أداة النقل الرئيسية لانتقال الجينات من النباتات المعطية أو الكائنات الأخرى إلي النباتات المستقبلة هي كائنات ممرضة نباتيا وبشكل خاص بكتريا التدرن التاجي Agrobacterium turnefaciens وفيرس موزايك القرنبيط بينما فيروسات أخرى كثيرة قد ظهرت كنواقل .
- ٤-عن طريق الهندسة الوراثية يمكن دراسة جينات النبات ومقاومتها للمرض ودراسة جينات الكائنات الممرضة لمعرفة شدتها في الكائنات الممرضة من المتوقع أن يحدث له تقدم كبير في المستقبل .
- ٥- إن مقاومة كثير من أمراض النبات من المحتمل أن تغير اتجاهها وتصبح إما عن طريق زراعة جينات مقاومة في النبات بواسطة طرق الهندسة الوراثية أو عن طريق هندسة وراثة الكائنات الحية الدقيقة والتي بها يمكن الوصول إلي كائنات دقيقة تضاد أو تنافس الكائن الممرض المعين .

- معرفة طبيعة السلوك الوراثي لجينات العائل لمقاومة المرض بجانب دراسة جينات الشدة في الكائنات الممرضة فإن عندها يكون من المحتمل إنتاج نسبة كبيرة من النباتات المقاومة للمرض بواسطة للتكنولوجيا الحيوية لمقاومة أمراض النبات ومن الصعوبة التخيل إلي أي مدى سوف يقودنا هذا المجال ولكن التوقعات كبيرة والامل أكبر فىالحصول على نباتات مقاومة لنسبة كبيرة من الامراض . ولذا سنلقى الضوء على كل من زراعة النسج والهندسة الو راثية .
- **ما هى زراعه الانسجه ؟**
- زراعه الانسجه هى زراعه خلايا او انسجه او اعضاء نباتية فى بيئات صناعيه ذات عناصر غذائيه معينه بغرض الحصول على نبات كامل
- و زراعه الانسجه النباتيه هى تقنيه تطبق منذ حوالى ثلاثون عاما. فهى تعتبر تكنولوجيا هامه للبلاد الناميه لانتاج نباتات خاليه من الامراض
- وعاليه الجوده ، كما تتميز بالانتاج السريع لنباتات متماثله تماما.
-
-
-



أهمية طريقة زراعة النسج في أمراض النبات

- جميع طرق زراعة النسج ذات أهمية لأمراض النبات ، فمثلا بعض هذه الطرق مثل الطريقة الدقيقة لإكثار النبات Plant micro - propagation تحمل في ثناياها خطر انتشار الكائنات الممرضة أو علي العكس فإن هذه الطريقة تستعمل لإنتاج نباتات خالية من الكائن الممرض والأكثر أهمية فإن كثيرا من هذه الطرق يمكن أن تستعمل لدراسة مواقع وإمكانية عزل جينات المقاومة لبعض الكائنات الممرضة وطرق أخرى تستعمل لتطوير ونقل مثل هذه الجينات إلي النباتات القابلة للإصابة .
- إن أكثر طرق زراعة النسج أهمية ودورها في أمراض النبات مشروحة باختصار فيما يلي : -

أولا: مزارع الإكثار الدقيق

- تؤخذ أنسجة حية من النبات من النموات الحديثة مثل قمم الجذور، عقد الأفرع الصغيرة البادرات النامية وفي بعض النباتات تؤخذ قصاصات من الأوراق ، تغسل عدة مرات وتعقم سطحيا ثم تغسل عدة مرات بماء معقم مقطر ثم بعد ذلك توضع في أنابيب اختبار محتوية علي بيئة غذائية مناسبة إما صلبة ، أو في كثير من الحالات تكون نصف صلبة (يضاف كمية قليلة من الآجار)
- تنمو الأنسجة الحية هذه وتعطي عديدا من النموات الفرعية أو من الجذور أو كليهما معتمدة في ذلك علي أنواع ونسبة منظمات النمو الموجودة في بيئة المزرعة ،
- يجرى لهذه الأنسجة الحية عادة عدة نقلات متتابعة في مزارع جديدة علي فترات متتابعة وذلك عن طريق تقسيم المزرعة المفردة الأم إلي عدة مزارع (أبناء)،
- أخيرا تؤخذ النباتات الكاملة وتزرع في الصوبات الزجاجية أو في الحقل .
-

ثانيا: تنمية أو زراعة البروتوبلاستس : Protoplast culture

- إن تنمية أو زراعة البروتوبلاستس تكون بزراعة خلايا قد أزيل منها الجدار الخلوى عن طريق هضمه بواسطة أنزيم تحطيم الجدار الخلوى
- ، يحصل علي البروتوبلاستس في كثير من الحالات من الأوراق التي أزيلت منها البشرة السفلية
- ، ولكن يمكن الحصول عليه أيضا من شرائح رفيعة من الأوراق السليمة
- النموات الفضةوالجذور ، الكالوس ومن مزارع الخلايا المفردة ،
- تؤخذ الشرائح التي سوف يحصل منها علي البروتوبلاستس من العضو النباتي وتوضع في محلول محتويا علي ٠.٥% بكتينيز ، ٢% سليوليز ، ٨ – ١٢% مؤانيتول . إن لكل من هذه المواد عمله ، فانزيم البكتينيز يحطم الصفيحة المتوسطة وبكتين جدار الخلية مؤديا إلي إنطلاق وتحرر خلايا مفردة إلا أن جدار الخلية (أو جدر الخلية) لا تزال متماسكة وفي نفس الوقت فإن أنزيم السليوليز يحطم سليلوز جدار الخلية حتى في النهاية لا يبقي أي سليلوز ويتحرر الغشاء العاري الذي يضم البروتوبلاست و بإضافة ٨ – ١٣% مانيتول هو سكر لا تستطيع تلك الخلايا أن تمثله إلي حد كبير ولكنه يحتفظ بالضغط الاسموزي للسائل في مستوى منوازن كما هو في محتويات الخلية وبالتالي يثبت حجم وحيوية البروتوبلاستس
- بعد أن يتحرر البروتوبلاستس من الخلايا أو الأنسجة فإنه يغسل عدة مرات بمانيتول مناسب أومحلول محلول مغذى أو كليهما وذلك لإزالة الأنزيمات وبقايا السليلوز ويكون جاهزا للاستعمالات المختلفة اللاحقة ، إن أكثر الاستعمالات شيوعا البروتوبلاستس وحبوب اللقاح في أمراض النبات هي الآتي :-

١ - حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيرس :

- لقد أصبح من الممكن حقن البروتوبلاستس لكثير من النباتات بواحد أو أكثر من الفيروسات التي تصيب النبات تتضمن عملية الحقن خلط البروتوبلاستس مع كمية قليلة من الفيرس النقي الذي أضيف إليه عامل مشجع علي الاندماج يسمى فيوزاجين (Fusagen) مثل poly L-ornithine أو مادة Polyethlene glycol ، يحضن خليط (الفيرس + فيوزاجين + بروتوبلاست) مع قليل من المنشط علي حرارة الغرفة العادية لمدة ١٠ – ٢٠ دقيقة بعدئذ يغسل البروتوبلاست بالمانيتول أو بمحلول مغذى أو بكليهما لإزالة الفيوزاجين والفيرس الزائد في زمن معين يختلف باختلاف علاقة الفيرس مع العائل ولكن يمكن أن يكون مرتفعا لغاية ٧٠ – ٩٥% إن تكاثر الفيرس في البروتوبلاستس عادة ما تكتمل خلال ٢٤ – ٣٦ ساعة من الحقن ، يمكن مراقبة سرعة تكاثر الفيرس باستعمال جزء من البروتوبلاستس المحقن وفحصه بالميكروسكوب الالكتروني أو بالاختبارات الحيوية علي عائل يظهر أعراض البقع الموضعية ، أو باستعمال الاختبارات السيرولوجية

٢- حقن البروتوبلاستؤ بمواد وراثية عن طريق نواقل مهندسة وراثيا :

- أنواع من العوامل الناقلة استعملت لإنجاح إدخال مواد وراثية غريبة في خلايا النبات هما :
- أ-البلازميد مثل بلازمد – Ti ، فى البكتريا Agrobacterium umefaciens
- ب-الفاج ومنه الذى يصيب الخلية البكتيرية وكذلك حمض DNA الفيروسي ثنائي الخيط لفيرس موزايك القرنبيط ، هناك فيروسات أخرى ذات الخيط الواحد من DNA مثل فيروسات الجوزاء ، الفيروسات متعددة الأجزاء ، الفيروسات المرافقة ، الفيرويدات العناصر المتحولة كلها استعملت في هذا المجال .
- ج-الكوزميد وهو يجمع فى خواصه بين البلازميد والفاج

تابع

- بلازميد منقول من البكتريا E. coli كعوامل ناقلة لمواد وراثية غريبة إلي بروتوبلاستس النبات ، إن المادة الورائية (النواة ، البلازمد أو DNA الفيروسي أو RNA) يمكن أيضا إدخالها في البروتوبلاستس إما بواسطة تحضينها مع البروتوبلاستس في وجود الفيوزاجين أو بواسطة تغليف المادة الو راثية بحويصلات من الدهون الصناعية تسمى Liposomes لايموسومز ، هذه الأخيرة عند التحضين مع البروتوبلاستس تسحب إلي الداخل بواسطة البروتوبلاستس وبالتالي تأخذ معها المادة الوراثية التي تحتويها .
- يبدو حاليا أن البروتوبلاست المحقون بالمادة الو راثية من الممكن أن يكون أكثر الطرق احتمالا لإدخال جينات منظمة لمقاومة المرض في نباتات المحاصيل الحقلية الهامة إذا ما حدث وأن عزلت وعرفت هذه الجينات .

٣- اختيار النباتات المشنقة من البروتوبلاست المقاومة للإصابة المرضية والمقاومة لتوكسينات الكائن الممرض والمولد السامة الأخرى :

- إن واحدا من أكثر الاكتشافات المدهشة في زراعات نسج النباتات بطريقة إعادة تخليقها من الكالوس خلايا مفردة أو من البروتوبلاست المأخوذ من نبات مفرد هو أنه في حالات كثيرة وجد أن تلك النباتات تظهر واحدا أو أكثر من تلك الصفات تختلف عن تلك التي تظهرها نباتات أخرى (أفراد من نفس المجموعة) أو نباتات الآباء ، هذه الظاهرة تسمى تنوع سوماكلونال Somaclonal Variation إن كثيرا من مثل هذه النباتات تختلف عن الاباء وتختلف عن بعضها البعض في درجة المقاومة التي تظهرها ضد كائن ممرض معين
- إذا ما حدث بأن حصل علي البروتوبلاستس فإنه يمكن حقنها بالكائن الممرض مثل فيروسات أو يمكن وضعها في بيئة غذائية التي أضيف إليها تركيزات مختلفة من توكسين الكائن الممرض أو من المضادات الحيوية أو مبيد فطرى أو مبيد فيروسي
- ، إن البروتوبلاستس والنباتات المشتقة من البروتوبلاست التي تبقي الكائن الممرض حيا أو أي واحدة من المعاملات الأخرى تكون مقاومة بوضوح للكائن الممرض المعين ، التوكسين أو الكيماويات فهي بالتالي تختار لعمليات تكاثر أخرى ، مثلا ، تدرس وتدمج في برامج التربية .

٤- تقييم المركبات المضادة للفيرس عن طريق معاملة البروتوبلاست المصاب بالفيرس:

- يمكن اختيار المركبات المضادة للفيروسات بسرعة إذا ما أضيف تركيزات مختلفة من تلك المركبات المعنية إلي البيئة التي وضع فيها البروتوبلاستس فورا بعد حقنه بالفيرس ، إن المادة المضادة الفيروسية التي تستطيع أن تثبط أو تقلل بشكل كبير تكاثر الفيرس في البروتوبلاست المحقون (تحدد بواسطة الاختبارات الحيوية بدون أن تؤثر علي بقاء البروتوبلاستس حيا ولا تؤثر علي إمكانية إعادة تخليقه ، فإنها تستحق وبوضوح زيادة في الاختبارات المكلفة والاختبارات الشاملة ، بينما المركبات غير الفعالة أو عالية السمية يمكن استبعادها من الاختبارات الأخرى والاختبارات المكلفة .

٥- اندماج البروتوبلاست لنقل جين المقاومة إلي العوائل غير المتوافقة جنسيا

- عندما يخلط البروتوبلاست المتحصل عليه حديثا حتي المأخوذ من أنواع نباتية غير ذات قرابة في وجود المادة الكيماوية فيوزاجين أو ذبذبات قصيرة من تيار كهربائي مباشر فإن كثيرا من هذه البروتوبلاست تندمج مع البروتوبلاستس أخرى من نفس النوع أو أنواع أخرى ، هذا ما يسمى التهجين الجسماني Somatic hybridization إن الهجن الجسمانية كثيرا ما تظهر أو تكشف اختلافا واسعا لاتحادات المجموعات الوراثية شاملة النواة و DNA السيتوبلازمي (خصوصا DNA الميتوكوندريا) من كلا الأبوين مع أنه لبعض الأسباب فإن نوعا واحدا فقط من DNA الكلوروبلاست يبدو أنه يبقي في مثل هذا الهجن من المحتمل أن تكون الهجن الجسمانية أكثر قابلية للحياة وإعادة التخليق إلي نباتات خصبة عندما تنتج من أنواع ضمن نفس الجنس أو بين أجناس متقاربة كثيرا ، إن كثيرا من الهجن الجسمانية لا تنمو أو تكون عقيمة وكثيرا منها يصبح غير ثابت يستمر في فقد DNA أكثر فأكثر من واحد أو كلا الأبوين هناك عديدا من الهجن الجسمانية تبقي حية وتتكشف طبيعيا محتوية علي المجموعة الوراثية كاملة من أحد الأبوين بالإضافة إلي أجزاء من المجموعة الو راثية من الأب الآخر ، إن الهجن الجسمانية التي تكون فيها المجموعة الو راثية الإضافية تحتوى جينات فعالة للمقاومة ضد واحدا أو أكثر من الكائنات الممرضة مثل هذه الهجن تكون ذات أهمية كبيرة في أمراض النبات

ثالثا: مزارع المتوك في إنتاج نباتات أحادية :

- يمكن إنتاج أنواعا عديدة من النباتات أحادية المجموعة الصبغية إما من خلال تكوين الاجنة ما من خلال تكوين الكالس وذلك عن طريق وضع متوك الأزهار وهي في مراحل تكشف معينة قبل تفتح الزهرة علي بيئة غذائية خاصة فإن الجراثيم الدقية(لحبوب اللقاح) في المتك تعطي في البداية كالوس أحادى المجموعة الصبغية التي ينمو فيها بعد ويمكن أن يعطي نباتات كاملة أحادية المجموعة الصبغية
- ، في بعض الأنواع فإن النباتات أحادية المجموعة الصبغية يمكن الحصول عن طريق الزراعة المباشرة للجراثيم الدقيقة لحبوب اللقاح
- ، ونظرا لأن الجراثيم الدقيقة هى نواتج الانقسام الميوزي (الاختزالي) فإن المادة الوراثية المكونة لكل جرثومة دقيقة تكون متباينه ولكل كالوس مشتق منها هونبات أحادى المجموعة الصبغية تكون مختلفة عن المادة الوراثية المكونة لجراثيم دقيقة أخرى أو كالوس أحادي المجموعة الصبغية ونباتات أحادية المجموعة الصبغية أيضا نظر لتباين ناتج الانقسام الميوزى

طرق الهندسة الوراثية وأهميتها في أمراض النبات :

- يهتم علم الهندسة الوراثية بفصل الجينات من خلايا الكائنات الراقية ونقلها إلى خلايا الكائنات الدقيقة Microorganisms بغرض إنتاج منتجاتها البروتينية بصورة إقتصادية وكذلك نقل الجينات إلى النباتات والحيوانات لتحسين صفاتها الإقتصادية علاوة على إستخدام الطرق الحديثة لهذا العلم في تشخيص الأمراض الوراثية للإنسان ومحاولة علاجها٠
- فى السنوات العشر الماضية حدث تطور هائل في تطبيقات الهندسة الوراثية والتي أمكن بواسطتها إنتاج الإنسولين البشرى ، هرمونات النمو واللقاحات المضادة للفيروسات Vaccines بواسطة بكتريا الأمعاء *Escherichia coli* وخلايا الخميرة٠

تابع

- هذا التطور الغير متوقع أدى إلى نشأة فرع علمي جديد يسمى بالوراثة الجزئية Molecular genetics أو الهندسة الو راثية والذي أدت إستخداماته إلى تأسيس قطاع جديد من التكنولوجيا الصناعية يطلق عليه تكنولوجيا الجينات Gene technology والذى سوف يتشابه حجمه الصناعى فى بداية القرن القادم مع الصناعات الإلكترونية الدقيقة Microelectronic والتكنولوجيا الذرية.
- من المحتمل أن معظم إن لم يكن جميع الطرق العملية المستعملة في الجزئي الحيوي في النبات بشكل خاص تستعمل في الهندسة الو راثية في النباتات أو الكائنات الممرضة للنباتات وعلاقتها في تكشف ومقاومة وبعض أكثر الطرق أهمية في الهندسة الوراثية وثيقة الصلة بأمراض النبات .

الجزئي الحيوي في النبات

- ذكر سابقا في الباب الأول

الجزئي الحيوي في الكائنات الممرضة النباتية :

- الكائنات الممرضة النباتية إما أن تكون محددة النواة مثل (الفطريات ، النيماتودا ، النباتات الراقية المتطفلة والبروتوزا الهدبية) أو تكون غير محددة النواة مثل (البكتريا ، والكائنات الدقيقة الشبيهة بالميكوبلازما) أو فيروسات شاملة الفيرويد .
هناك بعض التشابه موجود بين النظم الو راثية في جميع الكائنات الممرضة النباتية . وكذلك أيضا يوجد اختلافات كبيرة بينها
فمثلا النظم الو راثية في بعض الكائنات الممرضة محددة النواة مثل (الفطريات والنباتات الراقية المتطفلة) متشابهة لتلك الموجودة في النباتات ومشابهة لغير الموجودة في النباتات مثل تلك الموجودة في النيماتودا ووحيدة الخلية الهدبية مشابهة لما هو موجود في الحيوانات .
- إن لنظم الوراثية في البكتريا الممرضة النباتية والميكوبلازما مشابهة لما هو موجود في كل البكتريا ، والنظم الوراثية في الفيروسات الممرضة للنبات طبعا ، تختلف عن كل من محددة النواة وغير محددة النواة ولكن تعتمد بشكل مطلق علي التفاعل بين DNA الفيروسي أو RNA مع الوحدات الو راثية في عوائلها.

تابع

- . إن الجزئ الحيوي في كثير من الكائنات الممرضة النباتية قد حصل حديثا علي اهتمامات كبيرة جدا وبدأ الاهتمام به في السنوات الأخيرة أو ما يقارب ذلك وتزداد بسرعة بمرور كل سنة.
- تكون زيادة الاهتمام راجعة إلي إدراك أن النظم الوراثية علي الأقل في بعض الكائنات الممرضة مثل البكتريا الممرضة Agrobacterium tumefaciens وفيرس موزايك القرنبيط يمكن استعمالها كعوامل ناقلة لمادة وراثية غريبة إلي المجموعات الوراثية وبالتالي لإحداث تحويرا وراثيا في النباتات
- . يزداد الاهتمام أكثر حتى بزيادة التأكد من أن النظم الوراثية للكائنات الممرضة نفسها والكائنات المضادة لها يمكن تحويرها بطرق معينة بحيث يمكن استعمالها في المقاومة الحيوية للكائنات الممرضة النباتية .
-

تطور علم الهندسة الوراثية:

- توالت إعتقادات العلماء أن الحامض النووى DNA هو الحامل للمادة الوراثية حتى أثبت ذلك Avery ١٩٤٤ بواسطة تجارب التحول Transformation على بكتيريا *Streptococcus pneumoniae* بأن الـ DNA وليس البروتينات هو الذى يحمل العوامل الوراثية فى خلايا الكائنات الحية٠ وقد عزز هذا الإعتقاد ظاهرة الإستقطاع Transduction فى الفيروسات Bacteriophages فى عام ١٩٥٢ ٠ وقد صمم Watson and Crick سنة ١٩٥٣ نموذجاً للتركيب الفراغى والكيماوى لجزىء الـ DNA وأيضا إكتشف العالم Arber فى ١٩٦٢ بالصدفة أن الإنزيمات المحددة Restriction endonucleases تقطع سلاسل الـ DNA فى أماكن محددة أو بمعنى أوضح فإن كل إنزيم يتعرف على تتابع محدد من ٤ أو ٦ نيوكليوتيدات حيث يقطع الـ DNA عند هذا التتابع فنجد أن إنزيم EcoRI وهو أحد هذه الإنزيمات المحددة يقوم بقطع سلاسل جزىء الـ DNA فقط عند المواقع التى تحتوى على تتابع من ٦ نيوكليوتيدات والموضحة فيما يلى:-

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

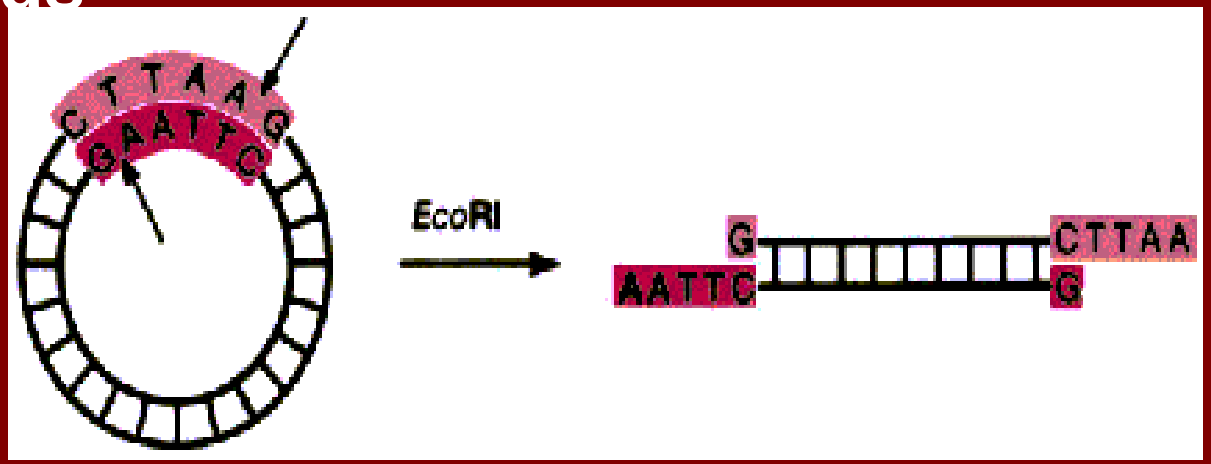
إنزيم EcoRI

5' GAATTC 3'

3' CTTAAG 5'

Restriction Enzymes

- **cut DNA at very specific sequences**
- **blunt cuts produce blunt ends**
- **staggered cuts produce sticky, cohesive ends**



- فى الفترة من عام ١٩٧١ – ١٩٧٣ تمكن Chang and Cohen من تطوير طريقة لمضاعفة قطعة DNA من بكتريا Staphylococcus داخل خلايا *E. coli* وتتلخص خطوات هذه الطريقة فيما يلى:-
- ١- قطع DNA البلازميدى بواسطة أحد الإنزيمات القاطعة٠
- ٢- قطع الـ DNA الكروموسومى لبكتريا Staphylococcus بواسطة نفس الإنزيم القاطع وفصل قطعة الـ DNA المراد نقلها ومضاعفتها داخل *E. coli* 0
- ٣- لحم أو ربط قطعة الـ DNA المفصولة من Staphylococcus مع البلازميد بواسطة الإنزيم اللاحم DNA ligase وبالتالى يتكون بلازميد هجين Recombinant plasmid0
- ٤- يتم إدخال هذا البلازميد الهجين داخل بكتريا *E. coli* بواسطة طريقة التحول Transformation0
- ٥- تترك الخلايا البكتيرية المتحولة والمحتواه على البلازميد الهجين تتكاثر داخل بيئة غذائية٠
- ٦- فصل البلازميد الهجين من هذه الخلايا الناتجة
- بهذه الطريقة والمسماه DNA cloning يمكن مضاعفة قطعة DNA من كائن حى عدة ملايين من المرات داخل البكتريا
- وفيما يلى رسم تخطيطى يبين هذه الطريقة

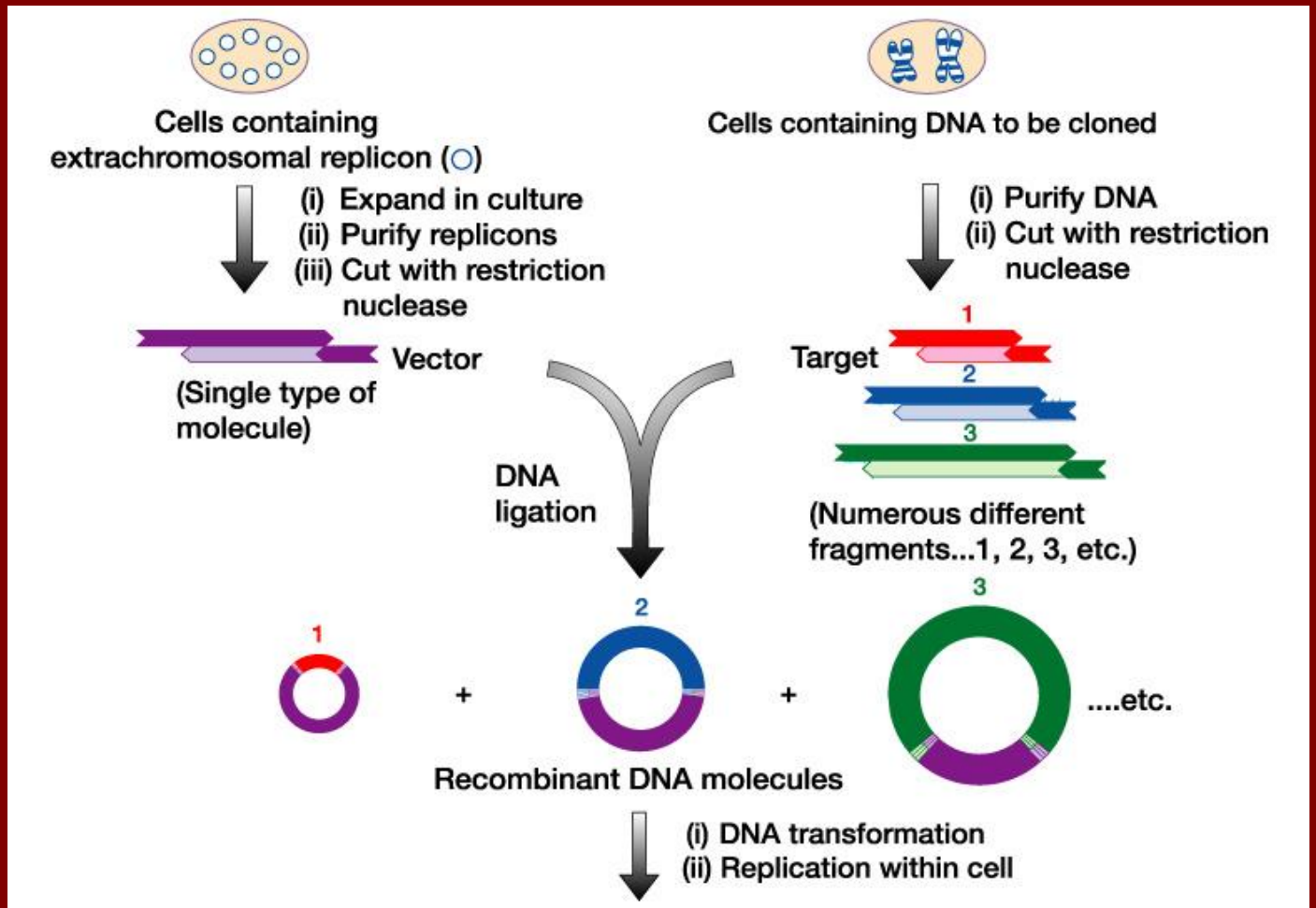
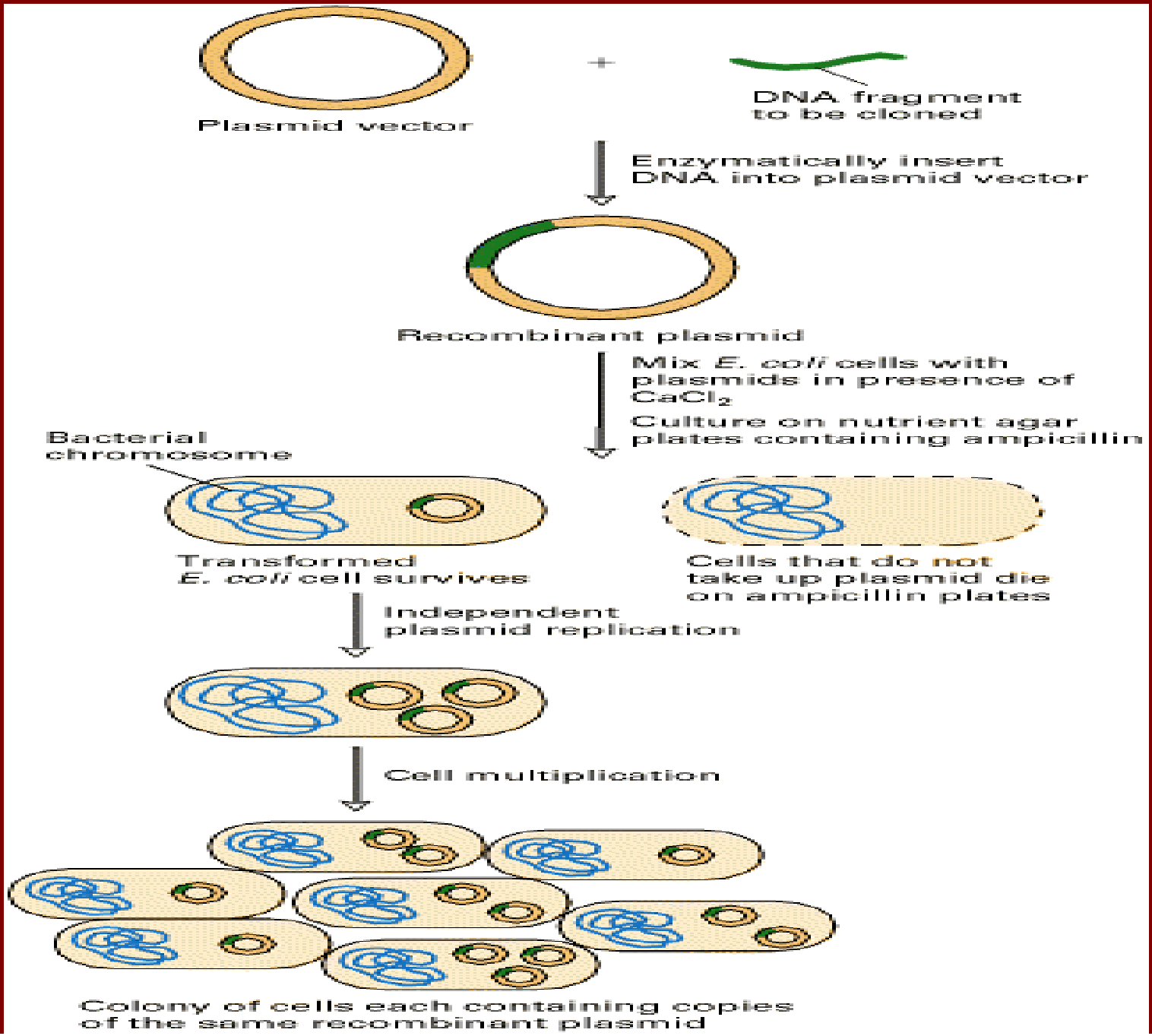
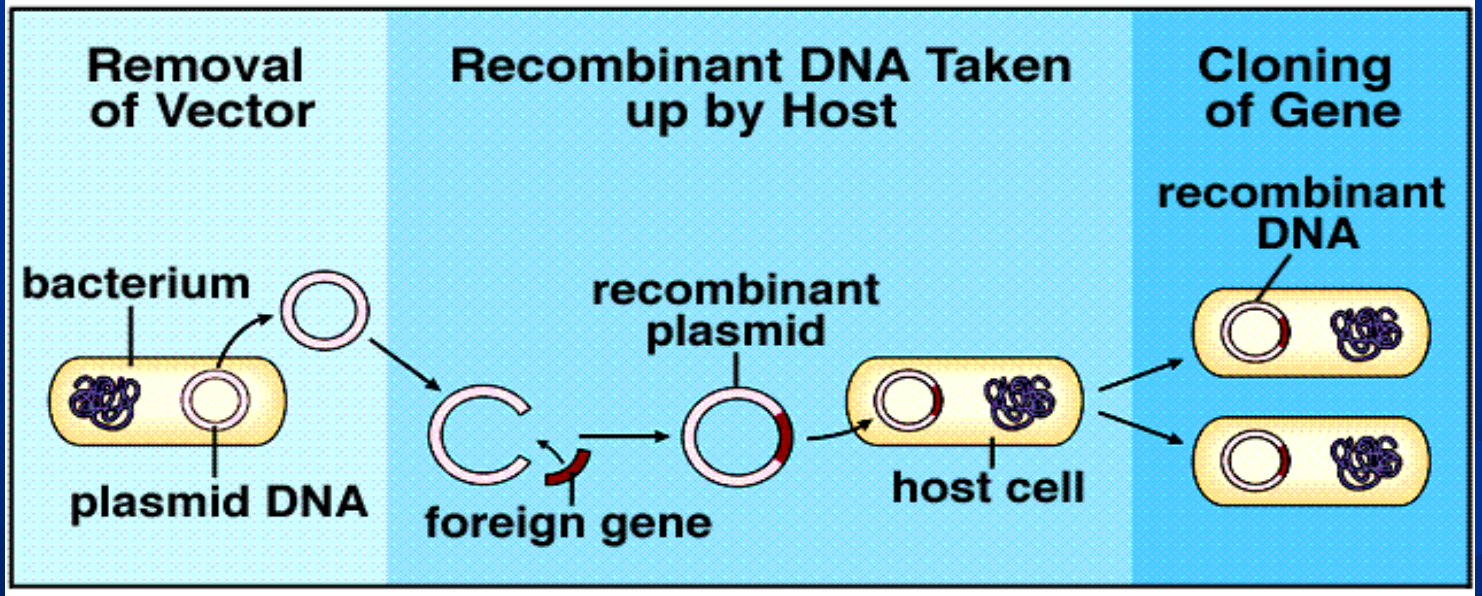


Figure 5-7 part 1 of 2 Human Molecular Genetics, 3/e. (© Garland Science 2004)


Plasmid vector
DNA fragment to be cloned
Enzymatically insert DNA into plasmid vector
Recombinant plasmid
Mix E. coli cells with plasmids in presence of $CaCl_2$
Culture on nutrient agar plates containing ampicillin
Bacterial chromosome
Transformed E. coli cell survives
Cells that do not take up plasmid die on ampicillin plates
Independent plasmid replication
Cell multiplication
Colony of cells each containing copies of the same recombinant plasmid

Sylvia S Mader, Biology, 6th edition. © 1998 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.

Genomic Library (1)



ناقلات الكلونة

- ناقلات الكلونة
- النواقل هي كائنات حية أو عوامل والتي تستطيع نقل المادة الوراثية من كائن حي يسمى المعطى إلي كائن حي آخر يسمي المستقبل ، بطريقة والتي بها سوف تستمر المادة الوراثية حية وتستطيع إظهار تأثيرها الو راثي في الخلية المستقبلية
- ، فمثلا البلازمدز ، الفيروسات (مثل البكتيريوفاج للبكتيريا تستعمل كناقلات للمادة الوراثية في البكتيريا ، الخمائر و بلازمدز البكتيريا الممرضة النباتية Agrobacterium tumefaciens
- وفيروس موازيك القرنبيط الذي يصيب النباتات وهو ذو خيط مزدوج من الـ DNAتستعمل كعوامل ناقلة للمادة الوراثية في النباتات
- بالإضافة إلي فيرس الجوزاء وحيد الخيط من الـ DNA
- فيرس موازيك الدخان وحيد الخيط من الـ RNA وبعض النظم الفيروسية الأخرى ، هي عناصر ناقلة قد حدث لها تطورا كناقلات لجينات النبات ، للمقاومة من نبات إلي آخر وأحيانا بين نباتات غير ذات قرابة دون احتمال أي من الجينات غير المرغوبة أو فقد جيينات مرغوبة وبدون الحاجة إلي وقت ضائع في التهجين والتهجين الرجعي بين النباتات

أنواع ناقلات الكلونة

- -البلازميدات
- تكون البلازميدات عادة مكونه من جزئ صغير حلقى مزدوج من دن أ والذى تكون هى وظيفته الطبيعية هى إكساب الخلية المضيفة صفة المقاومة ضد بعض الأمراض وللبلازميد عدة خواص تجعلها مفيدة جدا كناقلات الكلونة
- اذ أنها توجد كنسخة وحيدة أو عدة نسخ فى البكتريا .وتتناسخ مستقلة عن د ن أ البكتيرى كما أن تتابع القواعد فى جزئ د ن أ البلازميد معروف بالكامل مما يتيح معرفة المكان المضبوط لنشاط القطع للانزيم والذى يتم فيه إدخال د ن أ المراد إضافته ي
- كون البلازميد أصغر بكثير من كر وموسوم الخلية المضيفة مما يسهل عزله
- ومن أشهر البلازميدات المستخدمة فى مجال الهندسه الوراثيه بلازميد لبكتريا Agrobacterium umefaciens أو ما هو متحور عنها وما يسمى بلازمد – Ti

نقل الجينـــات إلى النباتـات
Transgenic plant

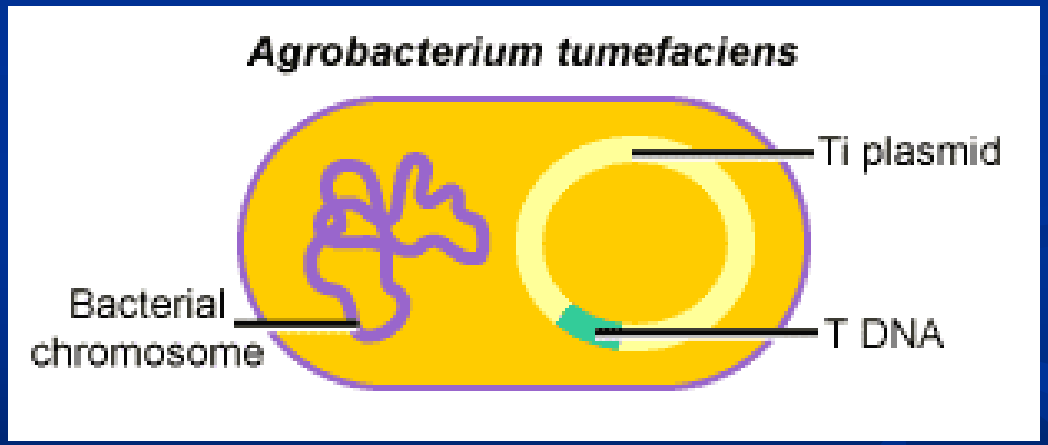
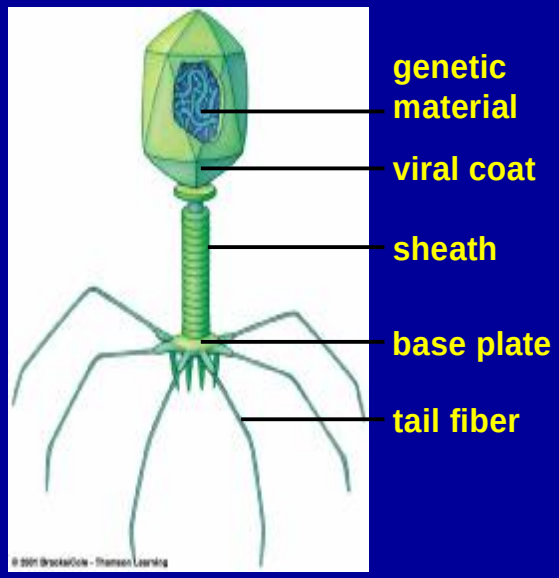


Figure 3. Transfer DNA on a plasmid in *Agrobacterium*

- ٢-الفاج
- يتكون دن أ الفاج من جزئ خطى من دن أ الذى يمكن فيه إدخال القطع المرغوبة من دن أ الجديد فى عدة مواقع للقطع الانزيمى المحدد يجمع دن أ الهجينى بعد أن يستكمل الفاج دورة التحلل للبكتريا Ly tic cycle وينتج وحدات فاج ناضجة معدية ٠
- ويتميز هذا الناقل بى استيعاب شظايا دن أ الاجنبى بطول من ١٠-٢٠ كيلو قاعدة فى حين يستوعب البلازميد شظايا بطول ٦-١٠ كيلو قاعدة
- ومن أمثلة الفيروسات فيروس موازيك القرنبيط



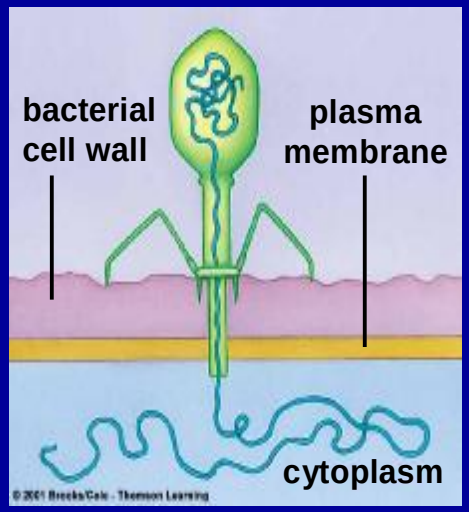
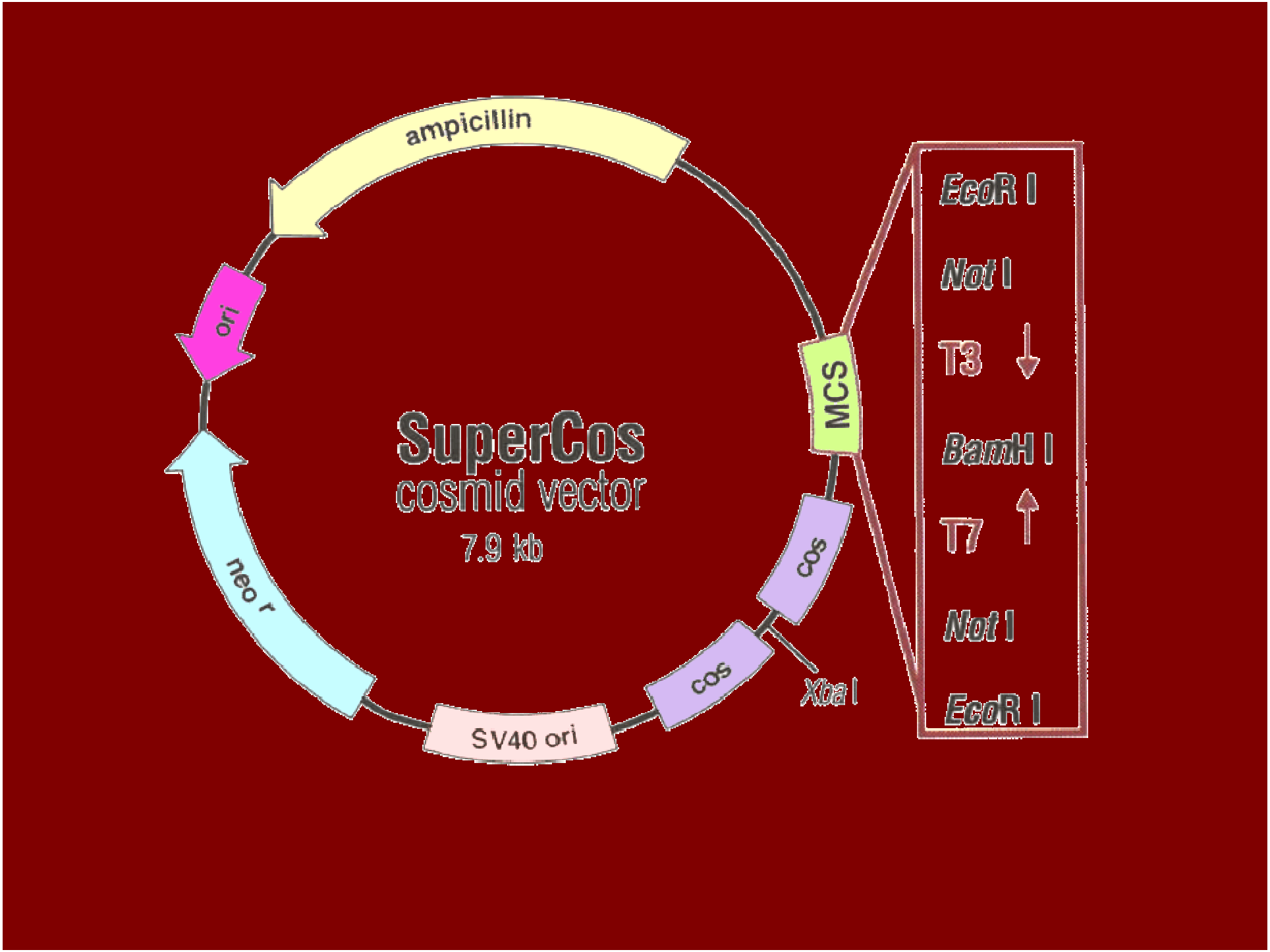


Figure 13.4a,b
Page 218-219

Slide ۳

- ٣--الكوزميد Cosmid
- وهى ناقلات تستقبل شظايا بطول ٢٥-٥٠ كيلو قاعدة وهى تجمع بين مميزات البلازميد والفاج
- وهو عياره عن بلازميد يحتوى على تتابع الموقع المسمى Cos (Cos sites)المطلوبة لتعبئة دن أ لامبدا فى حبيبة الفاج وتنمو هذه الناقلات فى صورة بلازميد فى البكتريا وحيث أن دن أ اللامبدا قد يتم استبعاده فانه يمكن ادخال قطع اكبر من دن أ الكيميرى فى راس الحبيبة الفيرسية
- ومن أمثلتها super Cos cosmid vector كما هو موضح بالرسم


ampicillin
ori
neo r
SV40 ori
cos
cos
Xba I
MCS
SuperCos
cosmid vector
7.9 kb
EcoR I
Not I
T3
BamH I
T7
Not I
EcoR I

الفيروسات النباتية كعوامل ناقلة

- إن بعضا من أكثر العوامل الناقلة فعالية هي نقل المادة الوراثية في البكتيريا وفي الحيوانات هي الفيروسات إلىالآن فإن أفضل العوامل الناقلة (إن لم يكن هو الناقل الوحيد) لجينات النبات هو بلازمد - Ti مع الدراسات السريعة والمتسارعة علي فيروسات النبات كقوة ناقلة لجين النبات فإنه من المعتمد أن واحدا أو أكثر من نظم النقل الفيروسي سوف لا تلبث أن تصبح متوفرة للنقل الفعال للجينات بين النباتات .
- يجب الإشارة هنا إلي أن العوامل الناقلة الفيروسية النباتية ليس من المحتمل أن تكون عوامل ناقلة من النوع المندمج مثل بلازمد - Ti ، وعلي الأصح فأنها من المحتمل أن تعطي جين إلي خلية النبات حيث هناك يمكن أن يتضاعف إلي ملايين الأضعاف مع الفيرس ويمكن أيضا أن ينتشر الجين جهازيا خلال النبات
- . إن إدخال جينات مرغوبة بواسطة الفيروسات إلي النباتات الحولية أو المعمرة والتي تتكاثر خضريا أو إلي النباتات التي فيها ينتقل الفيرس بسرعة خلال البذور ، يمكن أن يعادل الوجود الدائم للجين في النبات أو أن الجين يمكن أن يدخل إلي النباتات الحولية بالحقن الميكانيكي ، أو بشكل خاص في النباتات المعمرة التي تبقي حية (مثل الأشجار) بالتطعيم
- . في هذه الحالات يمكن للجين أن يستعمل لتزيد الوقاية بالتضاد أو بعض أنواع المقاومة الجهازية ضد كائن ممرض والذي أصبح حديثا مهما ومخيفا علي المحصول .

فيروسات موازيك القرنبيط

- إن فيروسات موازيك القرنبيط هي فيروسات تحتوى علي حمض نووي DNA ثنائي الخيط دائري يتكون من ٨٠٠٠ زوج من القواعد. كل خيط من خيوط DNA له انقطاع أو انقطاعين يتكون هذا الانقطاع من ٦ – ١٨ زوج قاعدي تتداخل أو تتشابك في مواقع معينة
-
- إن أكثر فيروسات القرنبيط والذي درس كناقل للجين هو فيرس موازيك القرنبيط (CaMV) ينقل الفيرس بواسطة الحقن الميكانيكي للأوراق وبحشرات المن إلي نباتات من العائلة الصليبية
- إن كل من الفيرس والحمض النووي DNA المعزول منه معدية ، تسبب إصابات جهازية للعائل وتنتج حوالي نصف مليون من جزيئات الفيرس في كل خلية . مع أن DNA الفيروسي ينسخ في نواة النبات فإن النسخة الناتجة تكون (mRNA) والتي تنقل إلي الستوبلازم هنا إما أن mRNA يخضع لنسخ عكسي بواسطة أنزيم النسخ العكسى وينتج الخيط السالب (-) من (DNA) والذي عنه ينتج الخيط الموجب (+) DNA
- وكذلك الخيط المزدوج من DNA ، أو أنه يترجم إلي عديد من البروتينات) شاملة غطاء الفيرس البروتيني يبدو أن DNA الفيروسي لا يندمج مع المجموعة الوراثية للنبات ولا حتى ينتقل خلال البذرة .

فيروسات الجوزاء Geminiviruses

- يحتوى كل زوج فيروسي من فيروسات الجوزاء(فيروسات مزدوجة)علي دائرة مفردة من الـ DNA مفرد الخيط حوالي ٢٥٠٠ قاعدة ولكن عديدا من فيروسات الجوزاء لها مجموعة وراثية منقسمة تتألف من جزئين من الـ DNA ذات حجم متماثل أن كل فيرس من فيروسات الجوزاء يتكون من تجمعين من الجزيئات المزدوجة والتي لها أغطية بروتينية متطابقة ولكن الأحماض النووية التي فيها يعني (DNAs) تتركب من سلاسل نيوكايتيدية مختلفة التركيب تدخل فيروسات الجوزاء في نواة النبات وتتكاثر هناك في الطبيعة تنتقل هذه الفيروسات بواسطة نطاطات الأوراق أو الذباب الأبيض وهي فيروسات عابرة وبصعوبة (إذا حدث) أن تنتقل ميكانيكيا .

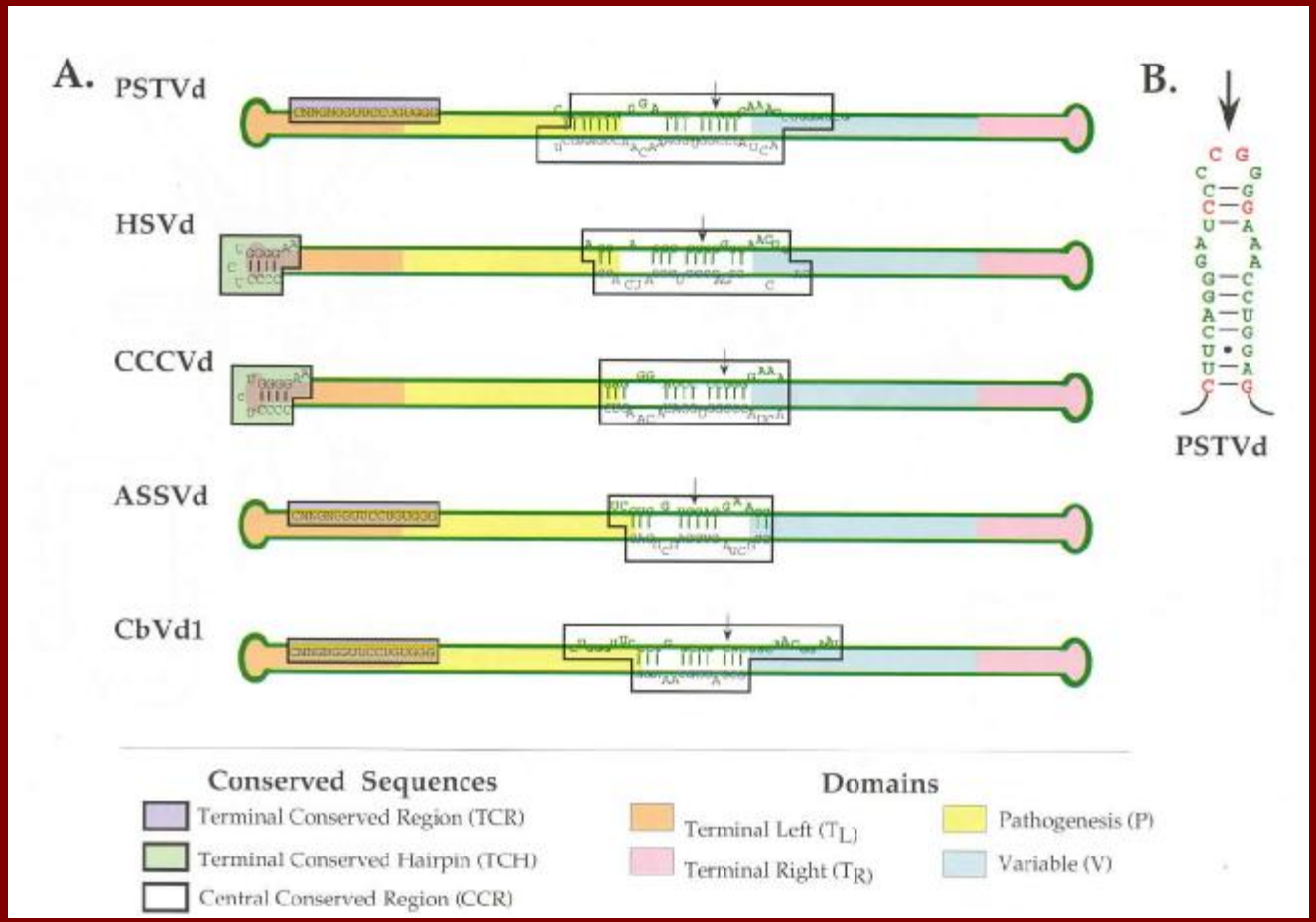
فيروسات RNA

- إن فيروسات RNA يمكن أن تصبح مهمة بشكل خاص الفيروسات مضاعفة التركيب والفيروسات التابعة والأحماض النووية RNAs في بعض الفيروسات المتضاعفة مثل فيروس موازيك brome فان أصغر الثلاثة مكونات تحتوى RNA مغلف بغلاف بروتيني والذي يمكن أن يستبدل بمادة وراثية غريبة (cDNA أو RNA) بدون أن يؤثر علي مقدرة الفيرس علي الإصابة ، أما في الفيروسات التابعة والـ RNAs والتي حجمها يترواح من ٢٧ – ١٥٠٠ زوج قاعد فان الفيروسات ليست بحاجة إلي الـ RNAs وبالتالي يمكن أن تستبدل كلية في جزء منها بمادة وراثية غريبة (RNA أو cDNA) والتي بالامكان فرضا إدخالها في النبات عندما تصاب بالفيرس ، إن بناءها واستعمالها كعوامل منظمة للشفرة الجين النباتي.

الفيرويدات Viroids

- الفيروسات صغيرة دائرية مفردة الخيط فيها RNAs عارية طولها ٢٠٠ – ٤٠٠ قاعدة وهي قابلة للنقل ميكانيكيا وتضاعف نفسها في نواة العائل وتصيب النبات جهازيا ، إن بعضا من هذه الصفات تجعلها مرشحة وجذابة كعوامل ناقلة للمادة الوراثية في النبات ولكن إلى الآن لم يذكر أي منها كعامل ناقل .

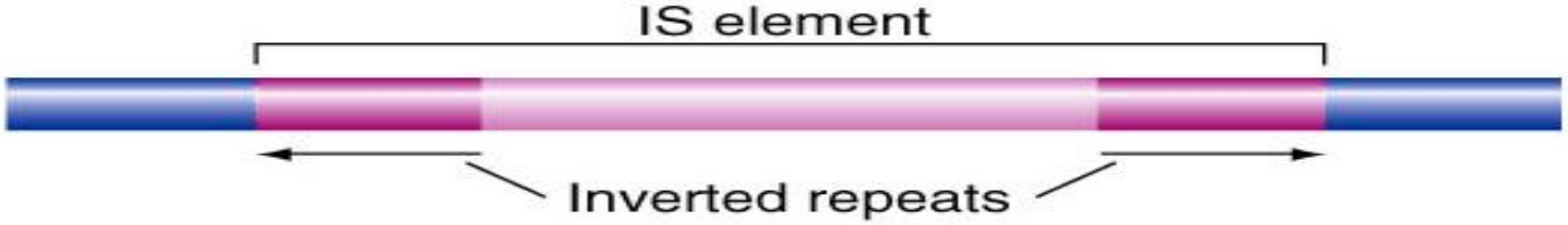
Viroids الفيرويدات



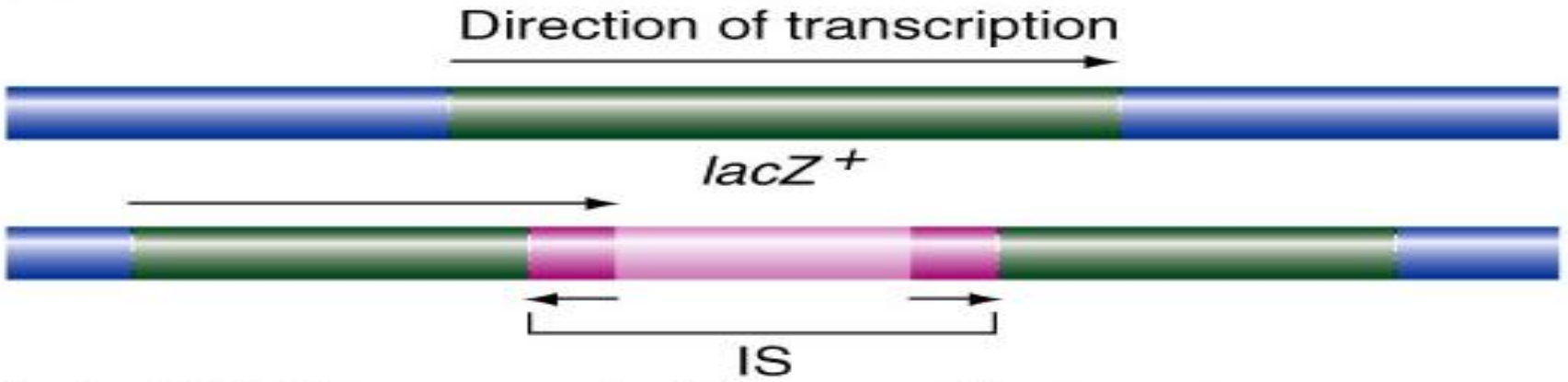
العناصر (Transposable) القادرة علي النقل

- إن هذه العناصر هي قطعا من الـ DNA من المحتمل أن تكون موجودة في المجموعة الوراثية في كل أنواع الكائنات ، لها صفات متنوعة ولكنها كلها تشترك في صفة ، أنه بالرغم من أنها تقضي معظم حياتها مندمجة في المجموعة الوراثية الا أنها يمكن أن تتحرك دائريا (يعني أنها قادرة علي التنقل) في الوحدة الوراثية وتندمج في مواقع مختلفة . إذا كانت مثل هذه العناصر تنتقل في جين معين وتعطل اظهار مفعوله الوراثي فانها تؤدي إلي الطفرة . إن العناصر القادرة علي التنقل تحتلف في حجمها من ٤٠٠ – ٢٠٠٠٠ زوج قاعد ، ويبدو أنها جميعا تمتلك أطرافا متكررة الانعكاس من حوالى ١١ زوج قاعدة ومن المعتقد أنه بعد أن يعزل العنصر القادر علي التنقل يمكن أن يزرع في جين نباتي غريب وأن العنصر القادر علي التنقل المهجن يمكن أن يدخل في خلايا النبات أو البروتوبلاستس حيث تستطيع أن تصبح مندمجة في المجموعة الوراثية في الخلية .

(a) IS element structure

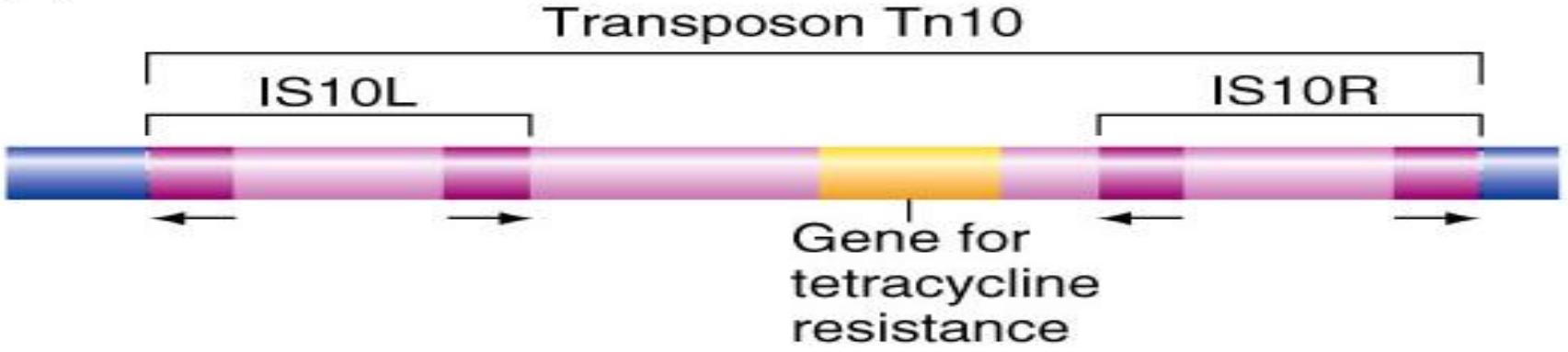


(b) IS insertion into *lacZ* gene

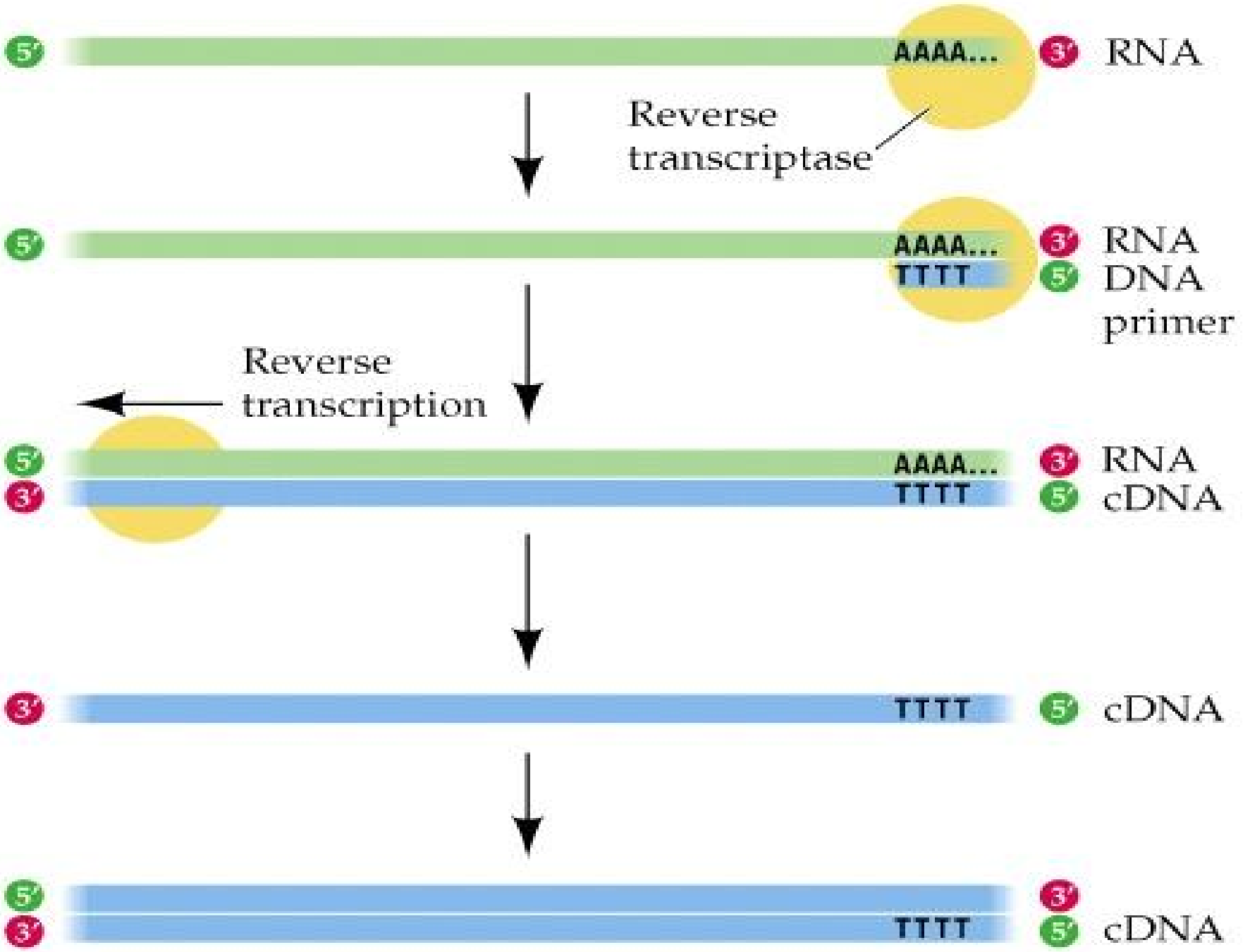


In *lacZ* − IS interrupts *lacZ* gene and prevents transcription of the entire gene.

(c) Tn10 structure

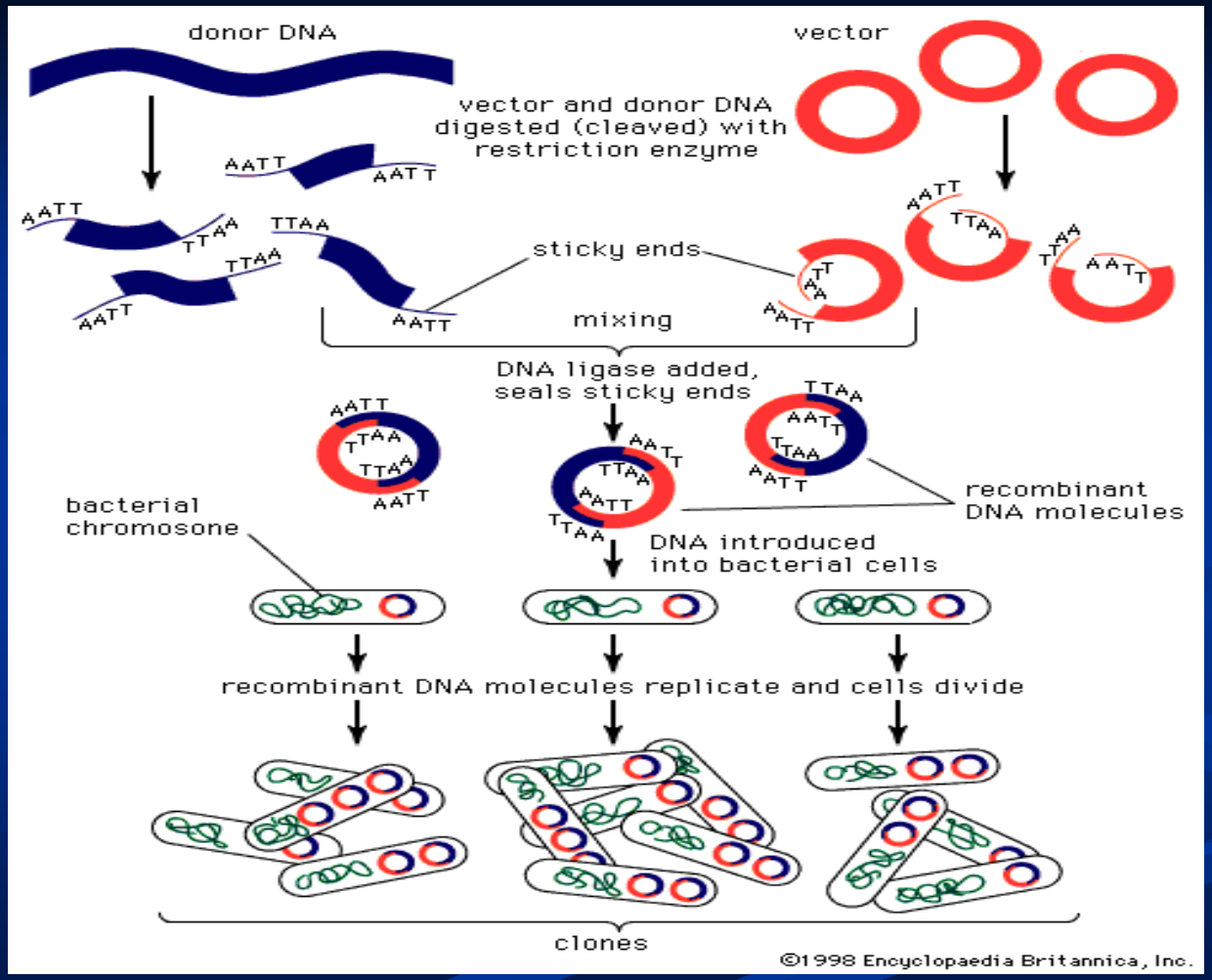


- تكاثر DNA متمم عن mRNA



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

تكاثر الجينات من المجموعة الوراثية DNA



الخلاصة :

- تعرف التكنولوجيا الحيوية في الاصطلاحات الحديثة بأنها المعالجة بالوسائل الميكانيكية والتحورات الوراثية ومضاعفة الكائنات الحية خلال طرق حديثة مثل مزارع النسج والهندسة الو راثية مؤدية إلي إنتاج كائنات جديدة أو محسنة أو منتجات يمكن استعمالها بطرق مختلفة
- الطرق المستخدمة فى زراعة النسيج وهى أولا-مزارع الإكثار الدقيق
- ثانيا- تنمية أو زراعة البروتوبلاستس ثم يعامل اليروتوبلاست بالطرق الاتية
- أ- حقن البروتوبلاست بالفيروسات ودراسة تكاثر وفسيولوجية الفيرس :
- ب- حقن البروتوبلاست بمواد وراثية عن طريق نواقل مهندسة وراثيا :
- ج - اختيار النباتات المشنقة من البروتوبلاست المقاومة للإصابة المرضية والمقاومة
- لتوكسينات الكائن الممرض والمولد السامة الأخرى
- د- تقييم المركبات المضادة للفيرس عن طريق معاملة البروتوبلاست المصاب بالفيرس:
- ه- اندماج البروتوبلاست لنقل جين المقاومة إلي العوائل غير المتوافقة جنسيا
- ثالثا: مزارع المتوك في إنتاج نباتات أحادية لأن خلايا الأنسجة أحادية المجموعة الكروموسومية كثيرا ما تتضاعف ذاتيا أو يمكن أن تستحث علي أن تتضاعف وذلك بمعاملتها بالكولشيسين والكيماويات الأخرى فيمكن السهل الحصول علي أنسجة متضاعفة الوحدة الكروموسومية والحصول علي نباتات متماثلة ثنائي الوحدة الكروموسومية لجميع الجينات وتكون هذه االنبات الثنايه مفيدا لدراسة تفاعل مثل هذه النباتات لبعض الكائنات الممرضة
- فى السنوات العشر الماضية حدث تطور هائل في تطبيقات الهندسة الوراثية والتي أمكن بواسطتها إنتاج ، هرمونات النمو واللقاحات المضادة للفيروسات Vaccines بواسطة بكتريا الأمعاء *Escherichia coli* وخلايا الخميرة٠حيث تستخدم عوامل لنقل اجين المرغوب من كائن الى اخر بواسطة البلازميد ،والفاج والكوزميدوالفيرودات والعناصر المتنقلة مستخدمة أنزيمات القطع والالتحام

- انتهى الباب الرابع