المحاضرة الأولى : التقانات الأحيائية النباتية المفاهيم الأساسية

مقدمة

تُعد التقانات الأحيائية أحد ميادين العلوم التطبيقية المبنية على الخصائص الفريدة للمادة الحيوية ، فمنذ ستينات وسبعينات القرن العشرين بدأت دول العالم المتقدمة علمياً باستخدام بعض مكونات الخلايا في التطبيقات الحيوية ، وفي عام 1981 تشكلت ملامح بداية طريق لعلم التقانات الأحيائية الذي لا يزال في أوائل خطواته ، والذي تنبأ العلماء بأنه سيشمل جميع المجالات التطبيقية ومنها المجال الزراعي ، ليُسهم في العديد من التحسينات في الجوانب المختلفة كاستخدام البذور المعدلة وراثياً ذات الإنتاجية العالية و عناصر تحسين تغذية النبات وتقنيات تكثيف الإنتاج وتحسين نوعيته ، وتقانات التربة والمياه ، سعياً لتحقيق أنتاج يسد الفجوة بين الإنتاج والاستهلاك العالمي ، ويحافظ على سلامة المنتج الغذائي بما يجعله بنوعية أمنه على صحة المستهلك . إن ذلك الاستخدام طَوَر مفهوم التقانات الأحيائية الى التطبيقات المتخصصة جداً . ومن هنا نشأ تباين كبير في تعريف التقانات الأحيائية Biotechnical فهي تعني بمفهومها الواسع مجمل التقنيات التي تستخدم النظم الحيوية والكائنات الحية أو مكوناتها لإنتاج أو تحوير أو تطوير منتجات أو عمليات لاستخدامات معينة قد تكون ذات قيمة وفائدة للإنسان . أما المجتمع العلمي البريطاني فيُعرف التقانات الأحيائية Biotechnical بأنها " التطبيقات الحيوية والأنظمة ومراحل الإنتاج التصنيعية " ، وتُعرَف في اليابان بأنها " تقنية تستخدم الظواهر الحيوية لنسخ وإنتاج منتجات حيوية مفيدة " بينما ينص التعريف الأمريكي على أنها " استخدام منظم للأحياء مثل الكائنات الحية الدقيقة أو مكوناتها الحيوية لأغراض مفيدة " وتَعرف أوربياً على أنها " الاستخدام المتداخل لعلوم الكيمياء الحياتية والأحياء الدقيقة والهندسة للوصول الى تطبيقات صناعية من الأحياء الدقيقة وزراعة الأنسجة أو أجزاء منها " . يبدو مما ذكرناه أن جميع التعاريف تتفق في مضمونها على أنها استعمال الكائنات الحية وعلى وجه الخصوص الأحياء الدقيقة أو مشتقاتها في عمليات التصنيع الحيوي أو لأداء خدمة مثل تحسين النوع أو التسميد أو معالجة النظام البيئي وما يعتريه . فالمعنى الواسع يشمل الكثير من الأدوات والتقنيات التي أصبحت مألوفة في الإنتاج الزراعي والغذائي . أما بمعناه الضيق فلا يتعدى تقنيات الشفرة الوراثية الجديدة وعلم الحياة الجزيئية وتطبيقات الاكثار التقنية والذي يُعالج الجينات ونقلها وتغيير الشفرة الوراثية واستنساخ النباتات والحيوانات .

وتعرف التقانات الأحيائية الحديثة بأنها تقنية هائلة وذات قدرات خارقة تماماً ، هذه التقانات تمثل فرصاً وأخطاراً فالتقانات الأحيائية في تطويرها واستخدامها تتطلب معارف وعلوم عميقة ، لذلك يُعد بناء القُدرات أساس لإتاحة الفرصة للبلدان كي تستفيد من هذه التقانات الحديثة بالإضافة إلى إدارة مخاطرها.

أما علم التقانات الأحيائية Biotechnology فالمصطلح مكون من مقطعين هما Bio مأخوذ من الكلمة اللاتينية Bios بمعنى الحياة Life و technology بمعنى الطريقة المنظمة systematic methodology لذا يمكن تعريفه : هو علم يستخدم المنهج العلمي في تطبيق واستعمال الأنظمة الحيوية سواء كانت كائنات حية أو أنسجة أو خلايا كاملة على اختلاف أنواعها أو مشتقاتها أو الأنظمة الأنزيمية الكاملة أو الأنزيمات الضرورية لإنتاج وتطوير العديد من المنتجات الحياتية التي يحتاجها الأنسان . من ذلك يتبن لنا إن علم التقانات الأحيائية هو محصلة لمجموعة علوم في علم تشكل ليُنتج العديد من النواتج المؤثرة على البشرية . فتعدد احتياجات الأنسان في حياته ، يعني تعدد الجوانب التي يرتبط بها علم التقانات الأحيائية . فضلاً عن ذلك تعدد العلوم الأخرى التي يعتمد عليها ، والتي من خلال تطبيق وسائلها تُمكنه من إنتاج المواد التي تؤمن تلك الاحتياجات ، والتي تُعد ذات قيمة بعد نجاح استعمالها على المستوى التجريبي و أمكانية إنتاجها على المستوى التجاري . فهناك صناعات تعتمد على كائنات حية وصناعات أخرى تعتمد على أنظمة حيوية وهذا يتطلب تعاون عدد من المؤسسات ذات التخصصات المختلفة ، فقد يشترك عدد من الدول في الحالات التي يصعب فيها أيجاد مؤسسة تمتلك امكانات متطورة في جميع المجالات ولجميع مراحل العملية الحيوية على المستوى الإنتاجي ، فضلاً عن تعقد العملية واعتمادها على أكثر من نوع من الخلايا أو نظام حيوي . وقد يضيف أسلوب العمل المتبع محددات لعملية الإنتاج ونوعية المنتج وحسابات الكلفة الاقتصادية ، مما يوجب اختصار العملية الإنتاجية وذلك من خلال الاعتماد على منتجات لمؤسسات وشركات أخرى تعمل في ذات الاختصاص لاستعمالها كبادئ لعمليتها الإنتاجية . وقد يدخل هذا الإنتاج أيضاً كبادئ في عملية إنتاجية لمؤسسة أخرى أو ربما يدخل المنتج في تصنيع عقار أو منتج غذائي وهكذا. لذلك تُعد التقانات الأحيائية التطبيق المعلوماتي

الصناعي للتقانات التي يتم تطويرها واستخدامها في العلوم الحياتية خصوصاً تلك التي تتصل بالهندسة الوراثية . من جهة ثانية تحمل التقانات الأحيائية الى جانب فوائدها إمكانات هائلة عند إساءة الاستخدام أيضاً ومن تلك النتائج تطوير الأسلحة الحيوية عبر التلاعب بالتركيب الجيني لبعض الأحياء كما في لقاح الجمرة الخبيثة (الأنثراكس) مثل جعلها مقاومة للمضادات الحياتية والجفاف والأشعة فوق البنفسجية .

لقد كرس العلماء العاملون في مجال التقانات الأحيائية جهودهم على الأحياء الدقيقة سواء كانت أحياء بدائية النواة Prokaryotic organisms أو أحياء حقيقية النواة Eukaryotic organisms وذلك لما تمتاز به هذه الأحياء من خصائص تؤهلها للاستخدام في هذا المضمار، ومن تلك الخصائص :

1- سرعة النمو – ويعود ذلك نتيجة لكبر مساحتها السطحية نسبةً الى حجمها مما يوفر لها فرصة أكبر وكفاءة أفضل في الحصول على الاحتياجات من المواد الغذائية على الرغم من أن ذلك سيعرض الخلية بكاملها لظروف البيئة الخارجية التي تتواجد فيها .

2- الأنظمة الوراثية – تكون أقل تعقيداً مما هو عليه في الأحياء الراقية مما يُسهل عمليات التطفير والكلونة (استنساخ).

3- المسارات الأيضية للمادة الواحدة متعددة سواء كانت للبناء (التخليق) منها أو للهدم ، وهذا عكس ما هو عليه في الخلايا الراقية التي يكون فيها تلك المسارات محدودة .

4- معظم الأحياء المجهرية المتمثلة ببدائية النواة لا تُعاني الشيخوخة أو الموت المحتم بعد عدة أجيال ، وإذا حصل ذلك فلا بد أن تُنشئ تلك الأحياء مجموعة من الخلايا لتحافظ على النوع .

5- يمكن لهذه الأحياء التطبع السريع لاستهلاك مواد رخيصة ومتوفرة في الطبيعة .

6- أمكانية زراعتها وإنتاج أعداد هائلة منها تصل الى الملايين بل المليارات وهذه الخاصية غير متاحة في الأحياء الراقية كالنباتات والحيوانات .

أما علم التقانات الأحيائية الزراعية Agricultural biotechnology أو Green biotechnology فتشمل مجالات عدة منها تربية النبات Plant breeding وبرامج التربية التي تُتَبع مع الأحياء الدقيقة Micro-organisms breeding التي يرتبط استخدامها في مجال الزراعة وكذلك تربية الحيوان Animal breeding . وهذا يعني جميع التقانات التي كانت تُتَبع في نظم التربية التقليدية Traditional breeding ، وكذلك التقانات الحديثة التي تَستخدم أدوات الهندسة الوراثية Genetic engineering لأحداث التغيير أو التلاعب بالمحتوى الوراثي للخلية والذي ينتج عن استخدام الوسائل الحديثة لعلم الأحياء الجزيئي Molecular biology .

لقد كانت عمليات تطوير النباتات ذات الأهمية الاقتصادية تتم من خلال عملية الانتخاب الفردي أو التربية الداخلية أو التهجين الخلطي ، التي يحتاج كل منها الى عدد من السنين ليتم تشخيص وتحديد صفات الأفراد الناتجة من تلك البرامج وفقاً للصفات المرغوب بها واستبعاد الأفراد التي تحمل الصفات غير المرغوبة ، مما يعني أن الأفراد أو النباتات التي يتم الحصول عليها تكون هجينة وغير نقية في تركيبها الوراثي الذي يتسبب بانعزال العوامل الوراثية بعد الجيل الأول . وبعد دخول علم الأحياء الجزيئي هذا المجال فقد توفر للباحثين والعاملين في هذا التخصص القدرة على نقل الجينات من كائن حي الى أخر سواء كان نبات أو حيوان أو فطر أو بكتريا وبهذا قد يتم تجاوز النوع Species للكائن الحي . وقد أُطلِق على الكائن الحي المُنتَج مصطلح الكائن المحور وراثياً Genetically modified organism (GMO) ويقصد به الكائن الذي تم تحوير مادته الوراثية على مستوى الحامض النووي Deoxyribonucleic acid (DNA) باستعمال تقانات الهندسة الوراثية . يُعد العامل الاقتصادي ومحاولة كسب السيطرة على الأسواق العالمية السبب الرئيسي وراء تطور علم التقانات الأحيائية فضلاً عن الطبيعة المتعددة لاتجاهات هذا العلم والتي وفرت للباحثين أمكانية العمل من خلال الأوجه التالية :

1- الفعاليات الحيوية تتم تحت ظروف بيئية مسيطر عليها (درجة الحرارة ، الإضاءة ، الضغط ، الدالة الهيدروجينية وغيرها) مما يمكنها من منافسة العديد من الصناعات الكيميائية التي تحتاج الى ظروف خاصة تزيد كلفة الإنتاج .

2- التفاعلات الحياتية متخصصة عالية الكفاءة مما يزيد من نقاوة المنتج والذي لا يحتاج سوى الى عمليات استخلاص وتنقية بسيطتين مقارنةً بالمواد المنتجة بالعمليات الكيميائية التي تنتج مركبات وسطية .

3- وفرة المواد الأولية التي تستعمل في التصنيع الحيوي فضلاً عن كونها ذات مصادر متجددة رخيصة الثمن مما يعني أمكانية تحويل المخلفات والنواتج الثانوية لأفراد المملكة النباتية الى مواد نافعة . ومن جهة ثانية أمكانية الحد من التلوث البيئي والتقليل من المشاكل التي يتسبب بها عالمياً .

مما ذكرناه يتوضح لنا بعض أسباب دخول علم التقانات الأحيائية ميدان الزراعة والتي منها العمل على الحد من المشاكل المؤثرة والتي لا يمكن تجاوزها أو أيجاد الحلول لها ألا من خلال تطبيق ما يختص بتلك المشاكل من علوم التقانات الأحيائية ، أضف الى ذلك الضغوط والتحديات التي تواجه العالم مطلع القرن الجديد ، ومن تلك التحديات :

. ازدياد عدد سكان العالم بمتوالية هندسية إذ يتوقع أن يصل الى ما يزيد عن 8.5 مليار نسمة عام 2030 .

. محدودية مصادر المياه والأراضي الصالحة للزراعة بشكل يحقق أنتاج يكفي لسد احتياجات المجتمع .

. النقص النسبي في زيادة الحاصل للإنتاج الزراعي وبالتالي الاخفاق في توفير الأمن الغذائي العالمي .

. المتطلبات التي تؤدي الى توفير غذاء أرخص ثمناً وأكثر سلامةً وأمناً .

. المحافظة على الأصول الوراثية للتنوع الوراثي الموجود في البيئة .

. تحديات استعمال النباتات المحورة وراثياً في الإنتاج .

. الفارق بين التقدم السريع على كافة الأصعدة في الدول المتقدمة وما يقابله من تخلف في الدول النامية .

. الحاجة الى الحفاظ على المحيط والبيئة بما يحقق سلامة الأنسان ويلبي طموحاته بالحد الأدنى من الأضرار التي تنعكس على المحيط والبيئة

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3 - عبيد ، علي إبراهيم علي و محمود ، أحمد عبد الفتاح . 2012. أساسيات التقنية الحيوية . مكتبة المعارف الحديثة .

المحاضرة الثانية : المقدمة التاريخية وتطبيقات التقانات الاحيائية

نبذة تاريخية

يشير عدد من المصادر التاريخية الى المعرفة التي تسلح بها الأنسان منذ أقدم العصور، إذ دلت الأثار لحضارات الفراعنة والسومريين والبابليين أنهم اعتمدوا خلط الأغذية القديمة مع الأغذية الطازجة من أجل أحداث بعض التحولات المرغوبة في الطعم والقوام ، وذلك بالاعتماد على ترك أوعية الغذاء مفتوحة لإتمام تلك التحولات ، وأستمر ذلك حتى عام 3000 قبل الميلاد حيث تم انتخاب وتربية بعض أصناف البطاطا ، وفي عام 300 قبل الميلاد طور الاغريق تقانة التطعيم لإكثار أنواع معينة من النباتات ، بعدها أستمرت عمليات استحداث وتطوير للأفكار تبعاً لمتطلبات حياة الأقوام المتعاقبة حتى عام 1750 بعد الميلاد إذ شَرَعت عمليات التربية والتحسين للحيوانات والنباتات على أساس الصفات المرغوب فيها عند اختيار الإباء . وفي عام 1864 أثبت العالم لويس باستور وجود الأحياء المجهرية ودورها في عمليات التخمر التي تتم بغياب الأوكسجين . وفي عام 1865 ظهر العالم مندل وقوانينه الخاصة بالوراثة وانتقال وتوريث الصفات ، كما تم في نفس الفترة أنتاج الأجسام الثمرية للفطر الغذائي الأبيض Agaricus على نطاق تجاري . وفي عام 1915 أثبت العالم Morgan وجود الجينات على الكروموسومات ، وفي عام 1918 (فترة الحرب العالمية الأولى) أستعمل الألمان الأستون المنتج من النباتات في صناعة القنابل . وفي عشرينات القرن العشرين صدرت مجلة بريطانية تحت أسم Biotechnology ، وفي المدة من عام 1928 – 1930 تم اكتشاف المضادات الحيوية Antibiotic وأولها البنسلين Penicillin الذي أنتج تجارياً عام 1940. وفي نفس العام تمكن العالِم Avery من عزل الحامض النووي DNA النقي . في عام 1950 (نهاية الحرب العالمية الثانية) أطلق على هذه الفترة أسم مرحلة أنتاج الإيثانول ، كما تم اكتشاف التركيب المزدوج للحامض النووي DNA وتمت معرفة أن هنالك نسبة ثابتة بين القواعد النيتروجينية الداخلة فيه كنسبة الثيامين/ الأدنين . وفي عام 1960 تم عزل الحامض النووي المرسال messenger Ribo Nuclic Acid (mRNA) ، وبوساطة الأحياء المجهرية تم أنتاج بروتين من كائنات وحيدة الخلية Single cell protein فضلاً عن أنتاج عدد من المواد الدوائية من غير المضادات الحياتية مثل الهرمونات والأجسام المضادة Antibodies. وفي عام 1973 اكتشفت الهندسة الوراثية تقنية أعادة توحيد أو تشكيل الحامض النووي DNA (Recombinant DNA technology) ، وأعتُبر هذا التأريخ هو ميلاد التقانة الحياتية الحديثة . وفي عام 1982 تم أنتاج هرمون الأنسولين من خلال بكتريا القولون *Escherichia coli* والذي يُعد أول أنتاج للتقانة الحياتية باستخدام الهندسة الوراثية ، وفي نفس العام تم قبول المصطلح Biotechnology من قبل اتحاد المنظمات الأوربية للتقنية الحيوية The European Federation of Biotechnology (EFB) . وفي عام 1983 تم الحصول على نباتات أمكن تحويرها وراثياً لإنتاج الأنسولين . وفي عام 1986تمت زراعة أول حقل إنتاجي بنباتات متحولة وراثياً لمقاومة الحشرات والبكتريا والفايروس . وفي عام 1990 تم لأول مرة أنتاج غذاء من كائنات محورة وراثياً ، وأُنتجت خميرة الخبز ،كما أُنتج أنزيم لتصنيع الجبن . وفي عام 1996بدء الإنتاج التجاري للمحاصيل المُنتجة بالتقانة الحياتية كالبطاطا والذرة . وفي عام 1997 تم أنتاج أول حيوان بالتقانة الحياتية (ولادة النعجة دولي) . وفي عام 2000 تم رفع القيود عن زراعة تقاوي المحاصيل المتحورة وراثياً كالطماطة والبطاطا وفول الصويا والذرة والقصب السكري والقطن كما سُمح بتداول إنتاجها . في عام 2001 تم أنتاج الرز الذهبي Golden rice الذي يساعد في تقليل حالات العمى والموت المتسبب عن نقص فيتامين A والحديد . ولا تزال الجهود مستمرة لإنتاج لقاحات تؤكل Edible vaccines ضد الأمراض المميتة ، كما في إنتاج بعض الأجسام المضادة للإسهال في الموز لاستعماله في تغذية الأطفال . يمكن تقسيم مراحل تطور علم التقنية الحيوية الى التالي :

المرحلة الأولى :

تضمنت المعرفة التي حصلت بالفطرة أو نتيجة الصدفة واستخدمها الانسان في عهد الفراعنة والسومريين والبابليين في تخمرات الأغذية وكانت تتم عن عدم معرفة علمية ، فمثلاً عندما تخلط الاغذية الطازجة مع أغذية تحوي الأحياء الدقيقة المسؤولة عن إحداث التحولات المطلوبة وتحت الظروف البيئية الملائمة تحصل التحولات في جميع المادة التي تم خلطها . استمرت هذه المرحلة حتى القرن السابع عشر ، عندما أكتشف ليفين هوك الأحياء المجهرية وكذلك اكتشاف أن أجسام الحيوانات والنباتات تتكون من حجرات صغيرة هي الخلايا التي تمثل أصغر وحدة تركيبية ووظيفية للجسم .

المرحلة الثانية :

حصل تطور كبير في هذه المرحلة لعلم التقنية ، ابرزها اكتشاف باستور للمدة (1857- 1879)ميلادي لدور الأحياء المجهرية في عمليات التخمر التي تتم بغياب الأوكسجين ، وقد ادى ذلك الى تطور الصناعات المعتمدة على التخمر مثل انتاج المذيبات العضوية وصناعة مواد كيميائية من خلال تحويل الكاربوهيدرات الثنائية ، كما تم في نفس الفترة انتاج الفطر الغذائي Mushroom على نطاق تجاري .

المرحلة الثالثة :

تمثل هذه المرحلة بداية القرن العشرين وتميزت بأن العديد من عمليات التصنيع الحيوي كانت تتم تحت ظروف مفتوحة وكانت السيطرة على التلوث تتم بواسطة حسن التعامل مع اعداد العملية التصنيعية وكذلك العناية بالظروف البيئية ،مثل انتاج العلف الحيواني وانتاج الكلسيرول من التخمر الكحولي للخمائر ، كما تم انتاج حامض اللبن وحامض الخل وبعض المواد الكيمياوية مثل الاستون والبيوتانول ، وانتجت بعض الانزيمات على نطاق تجاري ، وتم في نفس المرحلة استبدال انتاج حامض الليمون من الاعتماد على الحمضيات الى اعتماد الفطريات في الانتاج .

المرحلة الرابعة :

هذه المرحلة اعتمدت على المعلومات والمشاكل المتراكمة من المرحلة السابقة ، وحصلت تطورات مهمة منها اكتشاف البنسلين سنة 1928بالصدفة لذلك يطلق على هذه المرحلة عهد المضادات الحيوية ، وعندما نشبت الحرب العالمية الثانية وجد البنسلين سوقاً رائجاً لعلاج الجرحى ، وأدت المعرفة لعمليات التعقيم التي استعملت في انتاج البنسلين الى التعرف على التعامل مع المزارع النقية وتعقيم الاوساط الزرعية . إن تطور العمليات الانتاجية المعقمة للمضادات شجعت قيام صناعات أخرى مثل انتاج المضافات الغذائية والاحماض الامينية والنيوكليوتيدات ، واستمر العمل في انتاج المواد المتخمرة بوساطة بكتريا *Clostridium acetibutylicy* مع بعض التطوير

المرحلة الخامسة :

بدأت هذه المرحلة قبل مدة تتراوح بين 40- 60 سنة ، واطلق عليها اسم مرحلة انتاج الايثانول ، حيث استخدمت المعلومات المتوفرة والتقنيات في انتاج الايثانول من السكريات المكوثرة المتوفرة مثل النشأ . كذلك انتاج بروتين الخلية الواحدة Single cell protein إذ وصل انتاجه مئات الالاف من الاطنان سنوياً باستعمال مواد أولية رخيصة مثل الميثانول والألكينات كمصادر للكاربون والتي انحسرت فيما بعد . كما ازدهرت عمليات انتاج مواد النكهة للأغذية مثل حامض الكلوتاميك ، كذلك تم انتاج الحامض الاميني اللايسين لتدعيم الاغذية ، بينما تأخر انتاج الانزيمات لعدم ثباتيتها وصعوبة استخلاصها فضلاً عن صعوبة تزويدها بمساعد(متمم) الانزيم Cofactor لكن هذه المشاكل تم التغلب عليها في الوقت الراهن . وحصلت أكبر قفزة في تطور التقنية الحيوية بظهور تقنية اعادة تشكل الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA Recombinant Technology في مجال الهندسة الوراثية . لقد أدركت مجموعة الدول المتقدمة التطور الهائل الذي تحقق في هذا المجال واستجابت لاحتياجات بناء قدرات تنفيذ مشاريع التقانات الأحيائية فقد تم استثمار ما يزيد عن 150 مليون دولار أمريكي في الخمس سنوات الأخيرة فقط في الدول النامية ، من أجل بناء وتطوير القدرات لتشجيع الانضمام لبروتوكول قرطاج للسلامة الحيوية ، ومئات الملايين صرفت لتعزيز القدرات في مجالات التقانات الأحيائية بشكل عام .

دور وأهمية التقانات الأحيائية في مختلف مجالات الحياة :

أولاً – التقانات الأحيائية الزراعية Agricultural Biotechnology : تختص بالأنشطة المتعلقة بالنبات والحيوان ، فالزراعة هي المصدر الأساسي والأهم في توفير المواد الأولية التي يعتمد علم التقانات الأحيائية استثمارها وتحويلها الى مواد أكثر نفعاً أو تغيير صيغتها التركيبية لتصبح أكثر فائدة وأقل ضرراً ، فمن الخدمات التي تقدمها التقانة الأحيائية للزراعة ما يأتي :

1- الاسهام في تحسين محتوى النباتات من البروتينات أو محتواها من الأحماض الأمينية الأساسية التي تنقصها وذلك من خلال تعديل التركيب الوراثي لتلك النباتات ، كذلك تحسين الإنتاج وإنتاج نباتات خالية من الرواشح Vires .

2- توفير المخصبات وزيادة محتوى التربة منها خاصةً عنصر النتروجين باعتماد الأحياء المثبتة للنتروجين الجوي مثل بكتريا Azotobacter أو Rhizobium أو الطحالب الخضراء المزرقة .

3- العمل على استبدال المبيدات الكيميائية ذات الأثر الضار والملوثة للبيئة بالمبيدات الحيوية التي تعتمد استعمال الفطريات والبكتريا والفايروسات المضادة للأحياء الممرضة .

4- أنتاج وتوفير عدد من هرمونات ومنظمات نمو النباتات والحيوانات .

5- أنتاج وتوفير المواد العلفية المركزة للحيوانات وإنتاج اللقاحات والأدوية البيطرية .

ثانياً- التقانات الأحيائية للطاقة Energy Biotechnology : يعد هذا المجال أحد أهم المجالات التي تشارك التقانة الأحيائية فيها وذلك لارتباطه المباشر بالعامل الاقتصادي المحرك والدافع لتطور عمليات التقانات الأحيائية ، لذلك تعمل التقانات الأحيائية على تحسين أو زيادة قدرة وقابلية النباتات في الاستفادة من الطاقة الشمسية لتثبيت أكبر قدر ممكن من الكاربون في كتلتها الحيوية الناتجة باعتبارها المصدر الأهم للطاقة المتجددة على سطح الأرض . كما تسهم التقانة الحياتية في الكشف عن المناطق التي تتواجد فيها مصادر للطاقة غير المتجددة كالنفط وذلك من خلال استخدام الأحياء الدقيقة المناسبة لهذا الغرض ، وفضلاً عن ذلك استعمال الصموغ ومواد الاستحلاب الحيوية في تحسين عمليات الاستخلاص .

ثالثاً – التقانات الأحيائية المعلوماتية Bioinformatics تختص باستخدام الحاسوب للدراسات الحيوية

رابعاً- التقانات الأحيائية الطبية Medical Biotechnology تشمل جميع انشطة التقانات المتعلقة بصحة الانسان ، يُعد إنتاج المضادات الحياتية بوساطة الأحياء الدقيقة من أبرز مساهمات علاج الأمراض ، وكذلك إنتاج بعض الأدوية بوساطة التحويل الحيوي لمسارات الأيض لبعض خلايا النبات . في حين أقتصر استخدام الخلايا الحيوانية على إنتاج اللقاحات . ويمكن أيجاز ما أسهمت به التقنية الحياتية في مجال الطب بالتالي :

1- إنتاج الأنسولين البشري وهرمونات النمو بوساطة خلايا بكتيرية .

2- إنتاج نوع معين من البروتينات تُدعى إنترفيرونات بوساطة الخلايا الحيوانية المصابة بالفايروس لاستعمال تلك البروتينات في علاج بعض الأورام السرطانية .

3- إنتاج بعض المواد المضادة لتجلط الدم أو المواد التي تعمل على إزالة الجلطات وتخثر الدم من مزارع خلايا سرطانية خاصة .

4- إنتاج الأجسام المضادة Antibodies بتقنية البروتينات وعلاج بعض أنواع السرطان والمواد المساعدة في العمليات التشخيصية بوساطة خلايا لها صفة الخلايا السرطانية في الانقسام المستمر والتي لا تخضع لقانون الشيخوخة.

خامساً- التقانات الأحيائية البيئية Environmental Biotechnology تعمل التقانات الأحيائية على التقليل أو الحد من الأثار الضارة للمتبقيات والفضلات والعمل على تحويلها الى مواد أقل ضرراً وأكثر نفعاً إذ تُستعمل سُلالات من الأحياء الدقيقة تم تعديلها وراثياً لهذا الغرض .فضلاً عن ذلك يتم استخدام الأحياء الدقيقة في إزالة التلوث البيئي الذي يحصل من تسرب النفط ومشتقاته . كما تُسهم التقانة الحياتية في إدخال وتشجيع استعمال الأنظمة الحيوية في عمليات التصنيع الحيوي وذلك للتقليل من التلوث الصناعي المستخدم في تلك العمليات الإنتاجية .

سادساً- التقانات الأحيائية الصناعية Industrial Biotechnology وتختص بأنشطة المجال الصناعي فمما أسهمت به التقانات الأحيائية في هذا المجال يضم أنواع متعددة الاستخدام منها :

1- إنتاج مواد الاستحلاب الحيوية التي تستعمل في تنقية واستخلاص المعادن والنفط .

2- توفير المواد الأولية للصناعات خاصة صناعة المواد البلاستيكية مثل إنتاج مادة β- hydroxybutyrate التي تمثل خزين الدهون في الخلايا . كذلك إنتاج المواد البلاستيكية بشكل منتج صديق للبيئة يتحلل بعد مدة قصيرة من طمرَهُ في باطن الارض (في التربة) يتحول الى أسمدة عضوية .

3- إنتاج العديد من المواد الأولية للصناعات الدوائية مثل الكحول والسترويدات والأحماض الأمينية والعضوية من خلال التصنيع الحيوي لها بدلاً من التصنيع الكيميائي مما يُقلل من مخاطرها على صحة الأنسان والبيئة .

فضلاً عن عمليات التصنيع الغذائي التي تعتمد بشكل مباشر أو غير مباشر على عمليات التقانات الأحيائية ، ومن تلك العمليات التصنيعية :

1-إنتاج أصناف ملائمة للتصنيع مثل زيادة محتواها من المواد الصلبة الذائبة كأصناف الطماطة التي تلائم إنتاج المعجون .

2- تحسين أنتاج مواد الصبغات والنكهة ومضادات الأكسدة عن طريق مزارع الخلايا النباتية .

3- إطالة مدة صلاحية الأغذية للاستهلاك وذلك بإنتاج مواد نكهه جديدة من خلال عمليات تخمر تلك المواد .

4- تعطيل عمل بعض الأنزيمات أو تثبيطها مما يسهم في تأخير عمليات فساد الأغذية .

5- تقليل الأثر السلبي لبعض المواد غير المرغوبة في الأغذية مما يقلل ضررها على الأنسان .

6- تحسين عمليات التعبئة والتغليف للأغذية وتقليل أضرارها البيئية .

7- العمل على الكشف المبكر للتلوث الذي يحصل ، مما يقلل من أضراره التي تنعكس على صحة الأنسان وسلامة والبيئة .

سابعاً – التقانات الأحيائية متناهية الصفر Nano-Biotechnology تختص بالأنشطة على مستوى النانو لجميع المجالات التصنيعية الدوائية والغذائية وغيرها .

ونتيجةً للتقدم العلمي والتقني فقد تفتحت الأبواب بوجه العاملين في مجالات التقانات الأحيائية المختلفة من خلال كشفهم أسرار وخفايا كم كبير من المعلومات التي كانوا يجهلوها حول حياة معظم الكائنات الحية . فتوجه المختصون في علم الوراثة وهندسة الجينات لاستثمار تلك الفرصة في إعادة ترتيب وصياغة التراكيب الوراثية والتي لعبت الدور الأهم في المجال الزراعي ، و لأهمية التقانات الأحيائية الزراعية سنذكر هنا قسم من انواعها والانشطة الأكثر أهمية التي عملت عليها .

التقانات الأحيائية الزراعية

نتيجة التطور العلمي السريع اصبح واضحاً للعيان أن كثير من شعوب دول العالم خاصة النامية في كل من أفريقيا وجنوب شرق آسيا وأمريكا اللاتينية يعانون من سوء التغذية ، نتيجة للزيادة الكبيرة والمستمرة في اعداد السكان وللتغير المناخي السلبي المتمثل بشحة الأمطار وزيادة الجفاف مما تسبب بتقليص مساحات الاراضي الزراعية فضلاً عن انخفاض كمية الانتاج ونوعيته ، وقد سعت الحكومات في تلك الدول للأخذ بحلول عملية للخروج من الأزمة وتمثلت أولى الخطوات باستخدام الطرق والأساليب العلمية في الزراعة مثل استعمال الأسمدة والمبيدات ، واطلق على تلك المحاولات بالثورة الخضراء . غير أن ظهور الثورة الخضراء للفترة من 1960 الى 1990 تسبب بالأخلال بالتوازن الحيوي وفقد الكثير من الاصول الوراثية للمحاصيل التقليدية التي تحمل خصائص المقاومة والتكيف لظروف بيئتها على حساب المحاصيل المحسنة الجديدة ذات الانتاجية العالية .وقد تطور مفهوم التقانات الاحيائية بمرور السنوات وتداخلت مع معظم فروع العلوم المتخصصة الاخرى من اجل انتاج كل ما يخدم الانسان والكائنات الحية على سطح الارض .

أنواع التقانات الأحيائية الزراعية

تُقسم هذه التقانات حسب اختلاف طريقة التعامل مع الخلايا النباتية والحيوانية الى ما يأتي :

1- زراعة الانسجة والخلايا : تستخدم هذه التقانة في الجانب النباتي للإنتاج السريع عالي الجودة الخالي من الامراض وبكلفة منخفضة ، وتتم على مدار السنة تحت البيئة المسيطر عليها .

2- تضاعف المادة الوراثية : تستخدم هذه التقانة لمضاعفة المادة الوراثية (الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA) للحصول على البصمة الوراثية عند دراسة العلاقات التطورية بين بعض الاصناف والسلالات النباتية والحيوانية ، كما يمكن استخدام نفس التقانة في تشخيص المكروبات في الاغذية والاعلاف والتي تتم باستخدام جهاز الدوران الحراري والدوران الضوئي .

3- الدلائل الجزيئية : وهي الحصول على نمط وراثي يميز النبات أو الحيوان . وتستخدم الدلائل الجزيئية في رسم العلاقة التطورية بين الانواع النباتية أو الحيوانية ، كما يمكن استخدامها في الاسراع بعملية الانتخاب وعمليات التربية التقليدية والتحسين الوراثي .

4- إنزيمات القطع وتحديد المورثات المرغوبة : تستخدم هذه الانزيمات المتخصصة لتقطيع المادة الوراثية DNA لتسهيل عزل بعض المورثات المرغوبة من المصادر المتواجدة فيها لاستخدامها في التحوير الوراثي والحصول على تركيب وراثي جديد يحمل تلك المورثات .

5- تطعيم الحامض النووي في الخلية : يقصد به دمج مورثات من مصدرين مختلفين ، ويمكن تطبيق ذلك في النباتات والحيوانات والاسماك لإنتاج كائنات جديدة محورة وراثياً تحمل صفات معينة مثل مقاومة الامراض .

6- الاستنساخ : وهو أنتاج أعداد متطابقة وراثياً من الخلايا والافراد في النباتات أو الحيوانات .

7- التحوير الوراثي : وهي تقانات متعددة الطرق والاساليب للحصول على تراكيب وراثية تحمل صفات المورثات المرغوب فيها .

8- التلقيح الصناعي ونقل الاجنة : يقصد بالتلقيح الصناعي هو نقل العوامل الوراثية الذكرية الى مواقع الاخصاب في العوامل الانثوية بعد تهيئتها وحثها بالهرمونات المحفزة . أما نقل الاجنة فهذه التقانة يتم فيها انتاج الاجنة خارج مواقعه الطبيعية ، بعدها يتم انتخاب لأفضل تلك الاجنة ونقلها للمواقع الطبيعية ليستمر نموها وإنتاجها . هذه التقانة تستخدم للأسراع ببرامج تربية الحيوان والاسماك ، كذلك في برامج إنتاج لقاحات عالية الكفاءة .

9- هندسة البروتينات هذه التقانة تعتمد على التحوير الوراثي لإنتاج بروتينات جديدة من خلال تغيير أو إزالة أو إضافة أحماض أمينية . ولهذه التقنية تطبيقات مفيدة مثل الانزيمات والمحفزات الحيوية Bio-catalysts التي تسهل إتمام التفاعلات الحيوية .

10- تسلسل الترتيب للمادة الوراثية : يقصد بها تقانة قراءة تسلسل نيوكليوتيدات المورثات ، وهي وسيلة للكشف عن حدوث التغايرات الوراثية كالطفرات ، وتشخيص بعض الامراض الوراثية والبيئية .

أهم تطبيقات التقانات الأحيائية الزراعية

تركزت اهداف التقانات الاحيائية الزراعية على تحسين الخصائص العامة للمحاصيل وجعلها مقاومة للعديد من الامراض والآفات والظروف البيئية القاسية من خلال نقل وادخال مورث او اكثر بما يحقق الهدف المنشود ، ومن أهم تلك التطبيقات :

1- أنتاج نباتات غير بقولية مثبتة للنتروجين الجوي .

2- أنتاج نباتات مقاومة للحشرات والامراض ونباتات الادغال .

3- أنتاج نباتات مقاومة للظروف البيئية القاسية .

4- أنتاج نباتات لها القدرة على أنتاج بعض المركبات الاولية للبلاستك والموجودة في نبات Arabidopsis .

5- أنتاج ألياف حيوانية ذات متانة عالية .

6- أنتاج بروتين أحادي الخلية .

7- أنتاج نباتات أخرى ذات خصائص مهمة مثل :

(أ) زيادة الانتاج الكمي والنوعي .

(ب) تحسين الخصائص النوعية والشكلية للثمار .

(ج) تطهير البيئة من المخلفات الكيميائية الضارة .

(د) استخدام النبات أو الحيوان كمفاعل حيوي لإنتاج اللقاحات .

(و) رفع إنتاجية الحيوان من اللحم أو البيض أو الحليب .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3 - خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

4 - عبيد ، علي إبراهيم علي و محمود ، أحمد عبد الفتاح . 2012. أساسيات التقنية الحيوية . مكتبة المعارف الحديثة .

المحاضرة الثالثة : طبيعة المادة الوراثية وتكرارها . Genetic substance and genetic properties transfer

يتكون جسم الكائنات الحية متعددة الخلايا من عدة أعضاء Organs ، وكل عضو يتكون من عدة أنسجة Tissues ، وكل نسيج يتكون من عدة خلايا Cells ، وعلية فإن الخلية هي وحدة البناء التركيبي والوظيفي للكائن الحي . تحوي الخلية على عدد من العضيات Organelles كتراكيب محددة توجد داخل خلية الكائن الحي تقوم بجميع الوظائف الحيوية لذلك الكائن ، وتُعد العضيات التي تحوي المادة الوراثية الأهم في الخلية النباتية والحيوانية وهي النواة Nucleus .ويضم جسم الكائن الحي متعدد الخلايا نوعان منها هما :

1- الخلايا الجسمية (جسدية) Somatic cells وهي تمثل جميع خلايا جسم الكائن الحي عدى الحيامن (الخصيتين) والمبيض في الحيوانات والأسدية والمبايض في النباتات ، وتحوي الخلية الجسدية على العدد الكامل لصبغيات Chromosomes النوع والجنس في صورة زوجية Diploid .

2- الخلايا الجنسية أو التناسلية Germ cells وتمثل وحدات التكاثر في الكائن الحي (الحيوان المنوي والبويضة في الحيوانات وحبة اللقاح والبويضة في النباتات) وتحوي نواة الخلية التناسلية على نصف عدد الصبغيات في صورة فردية Haploid ، وهي وسيلة الحفاظ على النوع عبر الاجيال المتعاقبة .

لذلك تُعد النواة البنك المركزي للمعلومات الوراثية في الخلية ، وهذه المعلومات تتوزع على عدد من التراكيب داخل النواة وهي الصبغيات التي تمثل الوحدات الحاملة للصفات الوراثية في الكائن الحي . ومن الناحية الشكلية يتكون الكروموسوم من كروماتيدين Chromatids يرتبطان عن طريق المريكز Centromere ، أما من الناحية الكيميائية فأن الكروموسوم يتكون من الحامض النووي منقوص الأوكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) وبروتين Protein .

كما أن دراسات أنظمة تصنيف الكائنات الحية في الطبيعة تُستخدم كأسلوب للتفريق بين تلك الكائنات وتسهيل دراستها ، وقد ساعدت هذه الدراسات على ظهور علم جديد أطلق عليه أسم علم فسلجة الخلية Cell physiology . كما إن لعلم الخلية Cytology ايضاً علاقة متينة مع علم التصنيف Taxonomy. فالأبحاث والدراسات الحديثة في تصنيف الكائنات الحية مبنية اساساً على صبغيات الخلية ، إذ يختلف عددها وتركيبها وهيكلها من كائن حي الى آخر بحسب موقع الكائن الحي في سلم التطور . فكلما أصبح الكائن الحي أكثر رقياً زاد تعقيد مادته الوراثية . فقد ذكر ستيبنس Stebbins بوجوب استخدام الصبغيات كأساس يُعتمد عليه في العلاقة بين الخلية والتصنيف كونها حاملة للعوامل الوراثية . ومن الدراسات المهمة في هذا المجال هي المقارنات التفصيلية الكاملة للطرز الصبغية والصفات العددية للجينوم Genomic الذي يعني تحديد توالي القواعد النيتروجينية في الحامض النووي DNA كصفة من خصائص النوع والتي تحدد المعلومات الوراثية لعملية الانقسام الاختزالي وخاصة عند حدوث عملية التهجين .

المادة الوراثية في الكائنات أولية النواة وحقيقية النواة . Genetic substance in Prokaryotes and Eukaryotes

التركيب العام للخلية General structure of the cell

تقسم الكائنات الحية من وجهة نظر علم الخلية إلى قسمين رئيسين هما :

1- الكائنات بدائية النواة Prokaryotes

2- الكائنات حقيقية النواة Eukaryotes

تركيب المادة الوراثية في الكائنات بدائية النواة Genetic substance structure in prokaryotes

تشمل البكتريا Bacteria والطحالب الخضراء المزرقة Blue-green algae حيث تفتقر هذه الكائنات الى الغلاف النووي لمادتها الوراثية كما أن مادتها الوراثية تتكون من صبغي (Chromosome) منفرد Haploid يتكون من جزيئة DNA دائرية التي يكون موقعها في المجال النووي Nucleoid (نيوكليود) . ويُعتقد من الناحية التطورية أن الكائنات بدائية النواة تُعد اسلاف الكائنات حقيقية النواة.

ان المادة الوراثية للخلايا بدائية النواة Prokaryotic cells والمتمثلة بالحامض النووي DNA المسؤول عن خزن المعلومات الوراثية ونقلها، تكون موزعة في بروتوبلازم الخلية المسمى Nucleoplasm وهي غير مفصولة بنظام غشائي عن السايتوبلازم ، وتترتب بدرجة

عالية من الالتفاف Supercoiled الذي يعتمد على نوع البروتين والحامض النووي أو كلاهما ، ويعتقد أشتراك التلافيف الفائقة في عمليات الاتحادات الجديدة Recombination والتعبير الجيني Gene expression وتنظيمه . فمن خلال توسط ملتهمات البكتريا Bacteriophage في الاتحادات الجديدة يمكن الاستعاضة عن حلقات معينة من المادة الوراثية في البكتريا وبذلك يمكن الحصول على التحول البكتيري Transformation والذي يتم خلاله إدخال DNA عاري مثل البلازميد Plasmid ضمن خلية مُحوَلة والمحافظة على ذلك التحول . وتستعمل غشاء البلازما plasma lemma والتراكيب النامية منه لإنجاز معظم الوظائف الحيوية دون تجزئة هذه الوظائف الى عمليات صغرى . فمثلاً العمليات الحيوية المتعلقة بالتنفس و التركيب الضوئي تحدث في الأغشية المتصلة بالغشاء الخلوي (البلازمي).

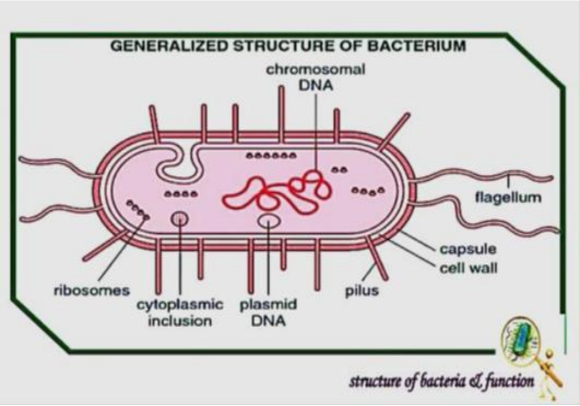
إن حجم خلية البكتريا يقارب (2- 4) مايكرون أي بقدر حجم المايتوكوندريا في الخلايا النباتية والحيوانية، يتميز فيها مناطق نووية خفيفة Nucleoid والمتمثلة بالصبغي وهو جزيئة من الـ DNA الدائرية المفردة وتحتوي على جميع المعلومات الوراثية للبكتيريا. ان المعلومات الوراثية الموجودة في الـ DNA للبكتريا كافية لتشفير وبناء 2000- 3000 نوع من البروتينات. وفضلاً عن وجود الصبغي فان قسماً من البكتريا التي تولد مقاومة للمضادات تحتوي على DNA حلقي (او دائري) صغير يسمى بلازميد Plasmid وهي مادة وراثية بشكل جزيئات من الـ DNA تكون خارج الصبغي الرئيسي ، وباستطاعتها التكرار الذاتي Replicon بصورة مستقلة . وتُعد أغلب البلازميدات غير ضرورية لبقاء الخلية التي تتواجد فيها لكن وجودها ضروري في العديد من الحالات كوجود المضادات الحيوية (بمعنى أخر تُعد صبغيات إضافية صغيرة يمكن عزلها وإعادة دمجها مرة ثانية) . وهناك ثلاثة أشكال من البلازميدات البكتيرية هي:

1- بلازميدات عوامل الخصوبة . 2- بلازميدات مقاومة المضادات الحيوية . 3- بلازميدات الكوليسين والبكتريوسين .

وفضلاً عن ما ذكرناه من عوامل وراثية في البكتريا هناك عناصر وراثية تستطيع التكرار بأحد الطريقتين التاليتين :-

أولاً- بشكلها المتكامل مع الصبغي الرئيسي للبكتيريا .

ثانياً- بشكل عناصر وراثية مستقلة عن الصبغي الرئيسي يطلق على هذه العناصر الوراثية Episomes ومنها عناصر تواليات الأقحام Insertion Sequences Elements (IS elements) وهي تواليات قصيرة من الحامض النووي DNA تتوسط الصبغي الرئيسي للاتحادات الجديدة التي تحصل بين العناصر الوراثية غير المتماثلة . وعناصر Transposon elements منها العناصر المسؤولة عن إحداث الورم Tumor-inducing elements (Ti element) للبكتريا *Agrobactrium tumefaciens* وقد أمكن استخدامها في إدخال جينات جديدة ومن ثم نقلها داخل الخلية النباتية . لذلك فهي عناصر وراثية تشارك في ترتيب جينوم الكائن الحي وتساهم في حذف ودمج المتضاعفات وتستعمل بكثرة في الهندسة الوراثية وبشكل خاص في صفات مقاومة المضادات الحيوية والتي تُعد دليل يمكن الكشف عنه بسهوله ، ويوضح الشكل التالي التركيب العام للخلية البكتيرية .



شكل يوضح التركيب العام للخلية البكتيرية

أما تركيب خلية الطحالب الخضراء المزرَقة Blue – green Algae فتشبه خلية البكتيريا رغم ان لونها ازرق مخضر بسبب احتوائها على صبغة الكلوروفيل A و الكاروتينات والـ Phycocyanin. ان الطحالب قادرة على القيام بالتركيب الضوئي وتصنع غذائها بنفسها. بينما

خلايا المايكوبلازما Mycoplasma او تسمى Pleuro Pneumonia like organism (PPLO) فأنها تفتقر لجدار الخلية ولذلك تقاوم المضادات الحياتية التي تستهدف الجدار الخلوي . تُعد اصغر خلايا الكائنات الحية هي جنس من الجراثيم تتبع فصيلة المفطورات وهي تشبه البكتيريا السالبة لصبغة كرام في قابليتها على النمو في وسط غذائي غير حي. كما انها تشبه الفايروسات بمرورها من خلال المرشحات .
ومهما صغر حجم الخلية يجب ان تمتلك صفات اساسية هي :

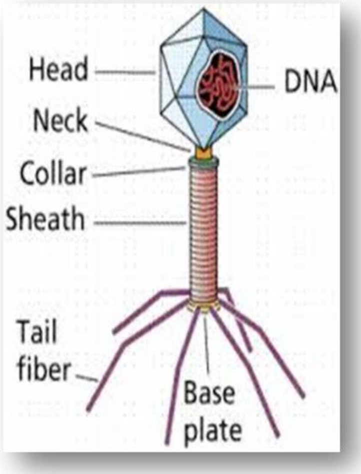
1- ان يكون لها غشاء بلازمي. 2- ان تحوي على مادة وراثية. 3- ان تحوي الية بناء حيوي.

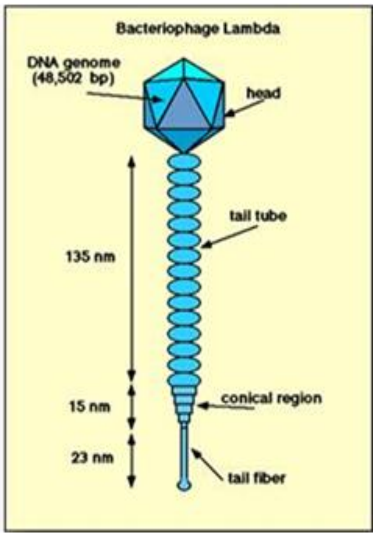
العاثيات (الرواشح) Viruses

تُعد العاثيات (الرواشح) مجموعة مختلفة فهي لا تأتي ضمن الكائنات بدائية النواة ولا حقيقية النواة ، وعلى الرغم من التباين الكبير بين الفايروسات المختلفة إلا أن جميعها تشترك في مميزات اساسية فجميعها طفيليات مجبرة Obligate parasite لا تستطيع التكاثر ما لم تكن موجودة في خلية مضيف خاصة بها ، كأن تكون بكتريا أو خلية حيوانية أو نباتية . فضلاً عن ذلك فأن الفايروسات قد توجد في حالة مختلفة عن ذلك تماماً وهي وجودها خارج حدود الخلية وفي هذه الحالة تكون الفايروسات بصورة جسيمات تسمى Virions . والفايروسات لا تملك نواة أو سايتوبلازم أو غشاء خلوي ، وبدلاً عن ذلك تحتوي على جزئية مفردة من واحد من الحامضين النوويين الـ DNA و RNA وليس كليهما الذي يحتل لب الـ Virion، وان امتلاك الفايروسات نوعاً واحداً فقط من الحوامض النووية ميزها عن جميع الخلايا الحية التي تحتوي على كلا النوعين من الحوامض النووية .

يختلف المظهر الخارجي للفايروسات باختلاف انواعها المختلفة ، فمنها تكون عصوية (شكلاً حلزونياً) مثل الفايروسات التي تصيب الخلايا النباتية ومنها دائرية او قد تكون متعددة السطوح . يبلغ طول أو قطر الفايروس بين (30) الى (300) نانوميتر، وهكذا فان اصغر الخلايا الحية (البكتريا والمايكوبلازم ...الخ) تتعرض للإصابة بالفايروسات. وتدعى تلك التي تهاجم البكتريا ملتهمات البكتريا (Bacteriophages وللاختصار تسمى phages) . والشكل التالي يوضح بعض أنواع الفايروسات

أ - فايروس T4 **ب – فايروس لامدا**





تركيب المادة الوراثية في الكائنات حقيقية النواة Genetic substance structure in eukaryotes

تحتوي الكائنات حقيقية النواة على كتلة صغيرة من المادة الاولية Protoplasm محاطة بغشاء البلازما Plasma membrane وتتكون من السايتوبلازم والنواة والعضيات . تضم هذه الكائنات الحية مجموعة كبيرة من الاحياء مثل الابتدائيات Protozoa والفطريات Fungi والطحالب Algae والحيوانات ومنها الأنسان والنباتات الراقية.

إن المادة الوراثية للكائنات حقيقية النواة تكون ثنائية المجموعة الكروموسومية Diploid بمعنى أن لها مجموعتين كاملتين من الجينات (كل مجموعة تأتي من أحد الأبوين) وهنالك العديد من النباتات الراقية يتضاعف فيها المجاميع الكروموسومية Polyploid وهذا يعني أنها تحمل

عدة نسخ من الجينوم Genome (مصطلح يطلق على المجموعة الكاملة من المادة الوراثية للكائن الحي) . والكروموسوم تركيب أسطواني الشكل يوجد في نواة الخلية . يطلق على كل زوج من الكروموسوم عادة تسمية كروماتيد واعتمد استعمال مصطلح الكروموسوم لوصف الكروماتيدين المتحدين.

كل كروماتيد يترتب بشكل حلزوني ويحمل في طياته على عشرات الألاف من المورثات Genes حيث يحمل كل كروموسوم في طياته ما يقارب 60.000 الى 100.000 مورثة وكل مورثة لها موقع خاص بها على التركيب الحلزوني للكروماتيد مشابه بالضبط لموقع نفس المورثة على الكروماتيد المقابل. كل مورثة بدورها تتألف من سلسلة من النيوكليوتيدات Nucleotides. وأظهر التحليل الكيميائي للكروماتين Chromatin المعزول من نواة خلية في الطور البني Interphase بأنه يحتوي على حامض نووي رايبوزي منقوص الأوكسجين DNA وبروتينات هيكلية وكمية أقل من الحامض النووي الرايبوزي RNA . ترتبط أنواع معينة من البروتينات مع الـ DNA لتكوين الوحدات الثانوية من الكروماتين والتي تسمى Nucleosomes. والبروتينات فئتين هما :

1- بروتينات القاعدة Basic proteins وهي ذات شحنة موجبة عند درجة الحموضة المتعادلة تدعى Histones . توجد في كروماتين جميع الكائنات الراقية حقيقية النواة وبكمية تكافئ الحامض النووي DNA وزن/ وزن .ويلعب هذا النوع من البروتينات دوراً رئيسياً في تكوين الوحدات الثانوية للكروماتين .

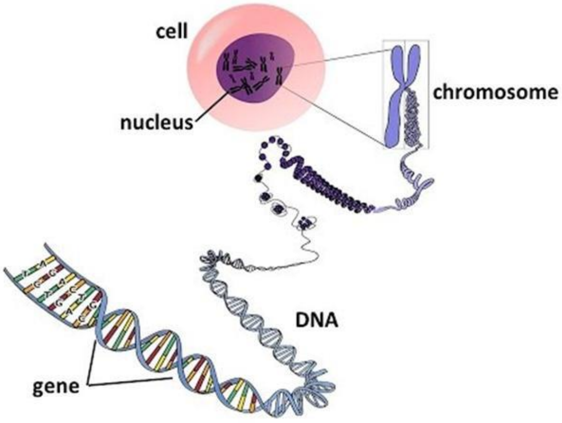
2- بروتينات غير متجانسة Heterogeneous proteins وهي ذات شحنة سالبة وغالباً تكون حامضية في درجة الحموضة المتعادلة يطلق عليها Non-histones .

وأكد فحص المجهر الالكتروني للكروماتين احتواءه على سلسلة من حبات أهليجية ترتبط بخيط دقيق ، وعند هضم الكروماتين باستعمال أنزيمات Nuclease أعطى قطع من الـ DNA يبلغ طولها 146 نيوكليوتايد ، وهذه القطع تكون محمية بطريقة ما من استمرار فعل أنزيمات الهضم . كما أن الهضم الجزئي للكروماتين بهذا النوع من الأنزيمات يعطي قطع من الـ DNA بطول 200 زوج من النيوكليوتيدات Nucleotides من كل نيوكليوسوم Nucleosome تكون متضاعفات كاملة من قطع أصغر حجماً ، وهذا يُدلل على أن الكروماتين تركيب متكرر من وحدات متشابهة .

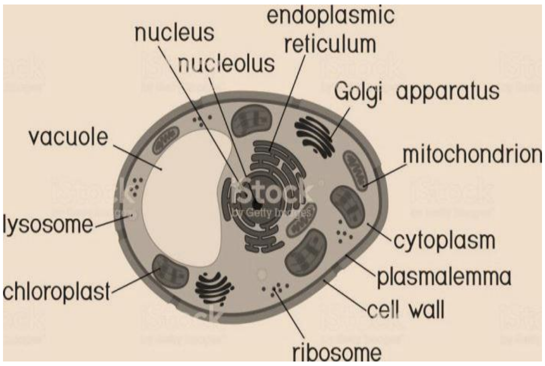
مما سبق يتضح لنا أن الحامض النووي الـ DNA هو المادة المكونة للمورثات والتي تُعد المسؤولة عن وراثة الصفات في الكائنات الحية عدى بعض الحالات النادرة لبعض الكائنات يكون فيها الحامض النووي RNA هو المادة الوراثية كما في بعض الرواشح .

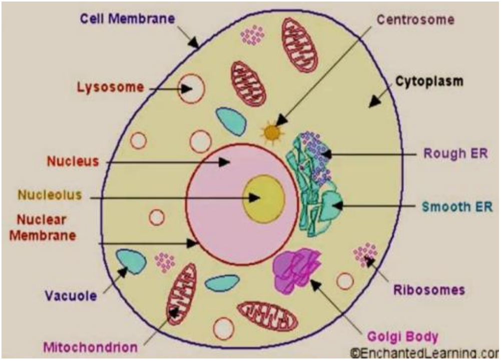
تقسم الخلايا الحقيقية النواة الى ما يأتي:-

1-خلايا حقيقية النواة نباتية Plant cell : في هذه الخلايا تترتب وتنتظم الاجزاء الخلوية بحيث يختص كل جزء ثانوي بوظيفة بايولوجية معينة وتسمى هذه الاجزاء الخلوية الثانوية المحكمة التنظيم بأسم العضيات الخلوية Cell orgenelles. فالتركيب الضوئي Photosynthsis يجري في البلاستيدات الخضراء Chloroplasts والفعالية التنفسية Respiratory والفسفرة التاكسدية Oxidative phosphorylation تحدث في المايتوكوندريا Mitochondria والمادة الوراثية تتركز في النواة كما تحتوي الخلية النباتية على فجوات Vacuoles لخزن المواد المغذية او لإجراء تفاعلات مهدمة degredative reactions للفضلات الخلوية. وبعبارة اخرى فان الوظائف الحيوية المختلفة تحدث في العضيات الخلوية المنفصلة المنتظمة التركيب والمتعاونة مع بقية اجزاء الخلية. والشكل التالي يوضح طبيعة وشكل مكونات المادة الوراثية للخلية النباتية .



2- **خلايا حقيقية النواة حيوانية Animal cells**: الخلية الحيوانية عبارة عن كتلة من البروتوبلازم المحاط بغشاء محدد وبداخله السايتوبلازم Cytoplasm ويحتوي على نواة واحدة او اكثر. يمثل السايتوبلازم الجزء السائل الموجود داخل الخلية ويحتوي على عدة عضيات خلوية Cell organelles اكثر كثافة من السايتوبلازم مثل اجسام كولجي والمايتوكوندريا والنواة وبعض الاجسام الكروية مثل جسيمات البيروكسومات Peroxisomes التي يحدث فيها تحطيم الاحماض الامينية Amino والاحماض الدهنية Fatty acids وكذلك الجسيمات الحالة Lysosomes التي تعمل على تحطيم المواد الغريبة الداخلة الى الخلايا . هذا فضلاً عن احتواء الخلية على بروتينات ليفية fibrous proteins يطلق عليها اسم Cytoskeleton . كما يحتوي السايتوبلازم على تركيب رقيق غشائي يعرف بالشبكة الاندوبلازمية endoplasmic reticulum ومحتويات ناشئة عن فعالية البروتوبلازم تسمى بالمواد البروتوبلازمية المؤقتة مثل المشتملات Inclusions و التي تشمل مواد دهنية وحبيبات مفرزة . وفي بعض الخلايا على نشأ حيواني Glycogen وكذلك حبيبات صبغية وبلورات. كما ان بعض الخلايا المسنة Old cells قد تحتوي على فجوات مختلفة الاحجام. يوضح الجدول التالي الفروق بين الخلية النباتية حقيقية النواة والخلية الحيوانية حقيقية النواة .





ت	الخلية النباتية	الخلية الحيوانية
1	تحتوي على جدار من السليلوز بالرغم من ان بعض الخلايا النباتية لا تمتلك هذا الجدار كما في الكميتات	لا تحتوي على جدار .
2	تحتوي البلاستيدات الخضراء .	لا تحتوي على البلاستيدات .
3	تمتلك فجوة عصارية كبيرة لغرض انتفاخ الخلية .	قد تحتوي على فجوات صغيرة .
4	لها القدرة على تكوين نبات جديد وتدعى هذه الخاصية Totipotency.	لم تثبت فيها هذه الخاصة

ويمكن المقارنة بين الخلايا بدائية النواة Prokaryotic Cells و الخلايا حقيقية النواة Eukaryotic Cells بالتالي :

	الصفة	بدائية النواة Prokaryotic	حقيقية النواة Eukaryotic
1	غلاف حول النواة	لا يوجد	يوجد
2	الـــ DNA	عاري ومفرد الشريط	متلازم مع البروتينات وثنائي الشريط او معقد الجزئيات
3	النوية	لا توجد	توجد غالباً
4	الانقسام	مباشر (بالانشطار مثلاً)	اعتيادي واختزالي
5	الرايبوسومات أ- وحدة ثانوية كبيرة ب- وحدة ثانوية صغيرة	من نوع S70 من نوع S50 من نوع S30	من نوع S80 من نوع S60 من نوع S40
6	الشبكة الاندوبلازمية، المايتوكوندريا، البلاستيدات ...الخ	لا توجد ، بل توجد انزيمات التنفس والتركيب الضوئي على غشاء الخلية	توجد
7	الحركة	بواسطة سوط بسيط التركيب	بواسطة أسواط وأهداب معقدة التركيب
8	النبيبات الدقيقة	لا توجد	توجد
9	التغذية	الامتصاص بالدرجة الاساسية وقليل منها يقوم بعملية البناء الضوئي	الامتصاص – الهضم – البناء الضوئي
10	جسم الكائن الحي	بسيط ومفرد الخلية في الغالب ، كما ان الخلايا لا تكون انسجة. تضم الخيطيات والبكتريا والطحالب الخضراء الزرقاء .	معقد في الغالب، منها بسيط ومفرد الخلية والأخر يتألف من عدد كبير من الخلايا منها تتكون انواع الانسجة. تضم الطحالب متعددة الخلايا والخمائر والفطريات والابتدائيات والنباتات والحيوانات.

ويوضح الجدول التالي مقارنة بين الخلية البكتيرية والخلية الحيوانية والخلية النباتية :

ت	المكونات الخلوية	الخلية البكتيرية	الخلية الحيوانية	الخلية النباتية
1	جدار الخليةCell wall	موجود يتكون من polypeptides	غير موجود	موجود يدخل فيه السليلوز
2	غشاء الخلية Cell membrane	موجود	موجود	موجود
3	الفجوات Vacuoles	غير موجود	غير موجود او صغير	موجود
4	الاسواط Flagella	موجودة بشكل خيط منفرد(ليفة منفردة)	موجودة (كل سوط يحتوي على ليفتين مركزيتين+ 9 ازواج من	غير موجود

			اليفات المحيطية)	
5	النبيبات الدقيقة Microtubules	غير موجودة	موجودة	موجودة
6	الشبكة الاندوبلازمية .E.R	غير موجودة	موجودة	موجودة
7	النواة Nucleus	غير موجودة	موجودة	موجودة
8	الاجسام الحالة Lysosomes	غير موجودة	موجودة	قد تسمى pherosomes
9	اجسام كولجي Golgi complex	غير موجودة	موجودة	موجودة
10	المايتوكوندريا Mitochondria	غير موجودة	موجودة	موجودة
11	البلاستيدات الخضراء Chloroplasts	غير موجودة	غير موجودة	موجودة
12	الكروموسومات Chromosomes	حلقة مفردة من DNA وجرد بروتينات	وحدات مزدوجة من DNA وفيها بروتينات	وحدات مزدوجة من DNA وفيها بروتينات
13	الرايبوسومات Ribosomes	موجودة S70	موجودة S80	موجودة S80
14	المريكز Centriole	غير موجودة	موجودة	موجود

<u>المصادر</u>

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

2- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

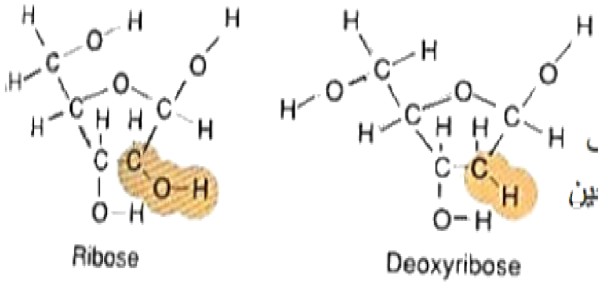
3 - خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الرابعة : التعبير الجيني في النباتات

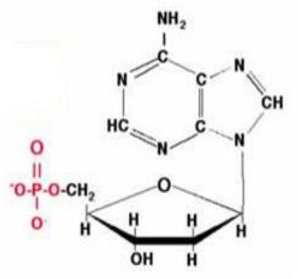
الموروثات وطبيعتها الكيميائية Genes and its chemical structure

منذ عام 1854 وصف العالم Gregor Mendel تشابه النسل مع الاباء وفكر بوجود الموروثات genes لكنه لم يراها ، وعبر عنها بالعامل الطبيعي الذي يعمل على تطور الصفة. بتقدم علم وراثة الخلية تمكن العالم الألماني Strasburger عام 1875 من وصف الصبغيات Chromosomes ، وفي عام 1902 تمكن العالم T. H. Morgan وزملائه من معرفة أن الموروثات جزء من الصبغيات ، وتتواجد بشكل وحدات منفصلة على الصبغيات ، ومع تقدم علوم الكيمياء أمكن عزل الموروثات وتم كشف تركيبها النهائي وخواصها ونشاطها ، من خلال استخدام التقانات المتقدمة في تقطيع الحامض النووي DNA وكلونة الموروثات Gene cloning بتقنية الهجرة الكهربائية Electrophoreses لمعرفة توالي القواعد النيتروجينية في جزيئة الحامض النووي DNA .

إن وحدة بناء الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA هي النيوكليوتيدة Nucleotide التي تتركب من ثلاث مكونات هي سكر خماسي (سكر رايبوز منقوص الأوكسجين Deoxyribose في نيوكليوتيد الـ DNA وهو يختلف عن سكر الرايبوز في نيوكليوتيد الـ RNA بذرة أوكسجين واحدة في ذرة الكاربون رقم 2) ومجموعة من الفوسفات مرتبطة برابطة تساهمية بذرة الكاربون الخامسة للسكر ، كما في الشكل التالي :

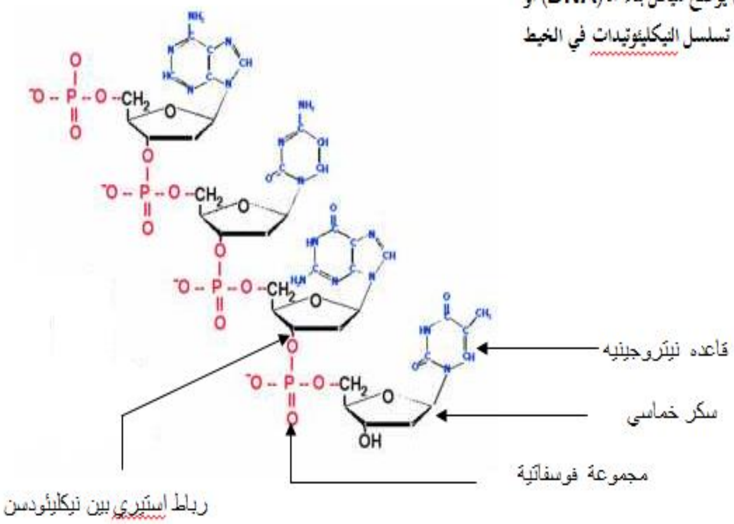


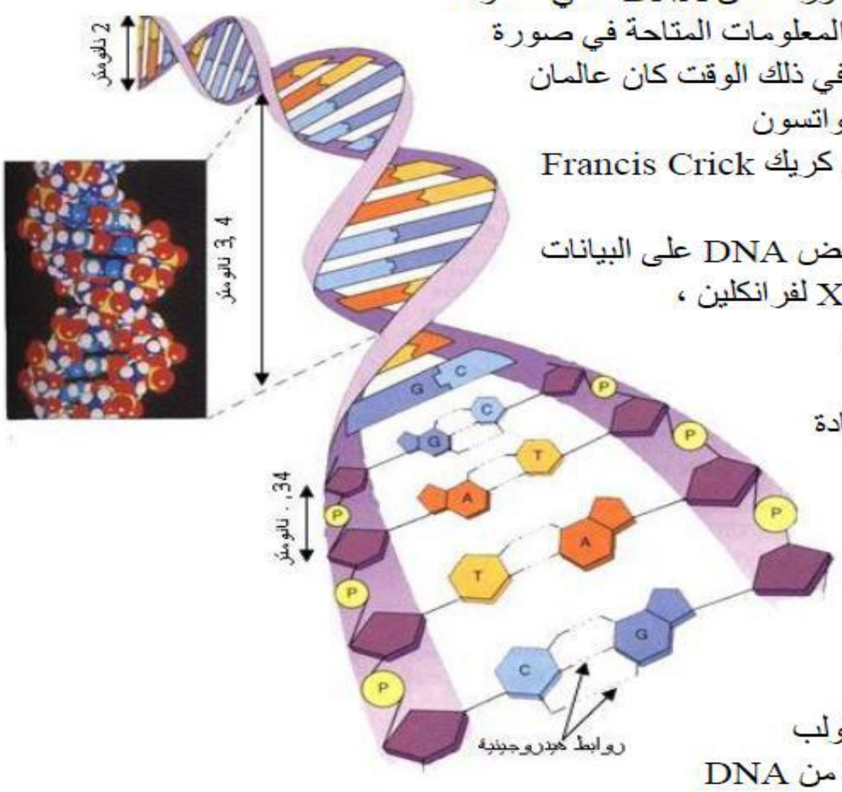
وواحدة من القواعد النيتروجينية الاربعة ترتبط برابطة تساهمية بذرة الكاربون الاولى في السكر الخماسي ،والقاعدة النيتروجينية قد تكون أحد مشتقات البيريميدين Pyrimidine المفردة الحلقة (ثايمين Thymine (T) أو سايتوسين Cytocine (C))، أو أحد مشتقات البيورين Purine زوجي الحلقة (أدنين Adenine (A) أو گوانين Guanine (G) . كل مجموعة من النيوكليوتيدات على امتداد الحامض النووي منقوص الأوكسجين تُكون وحدة مستقلة تُسمى مورث Gene ، وهو اساس تصنيع البروتين في الخلية ، والتي تتم عن طريق حلقة وصل هي الحامض النووي الرايبوزي Ribonucleic acid (RNA) . فعندما ترتبط النيوكليوتيدات بعضها ببعض في شريط الـ DNA فإن مجموعة الفوسفات المتصلة بذرة الكاربون رقم '5 في سكر أحد النيوكليوتيدات ترتبط برابطة تساهمية مع ذرة الكاربون رقم '3 في سكر النيوكليوتيد التالي. والشريك الذي يتبادل فيه السكر مع الفوسفات يطلق عليه هيكل سكر- فوسفات ، وهذا الهيكل غير متماثل (بمعنى أنه يوجد فيه مجموعة فوسفات طليقة غير مرتبطة بذرة الكاربون رقم '5 في السكر الخماسي عند احدى نهاياته، ومجموعة هيدروكسيل OH^- طليقة مرتبطة بذرة الكاربون رقم '3 في السكر الخماسي عند النهاية الأخرى. أما قواعد البيورينات والبيريميدينات فإنها تبرز على جانب واحد من الهيكل سكر- فوسفات. وكما نعلم فقد توصل شار جاف الى أن في كل جزيء من الـ DNA يكون عدد نيوكلتيدات $A \approx T$ وكذلك عدد نيوكلتيدات $G \approx C$ وعُرف ذلك بقانون شار جاف.



شكل (1) يوضح هيكل بناء الـ DNA من حامض الفوسفوريك والسكر والقاعدة النيتروجينية.

شكل (2) يوضح هيكل بناء الـ (DNA) أو الـ(RNA): تسلسل النيكليوتيدات في الخيط





وفي عام 1952م نشرت فرانكلين صور بلورات من DNA عالي النقاوة ، حيث بدأ سباق رهيب بين العلماء لوضع المعلومات المتاحة في صورة نموذج model لتركيب جزئ DNA .وفي ذلك الوقت كان عالمان غير معروفين جيداً هما الأمريكي جيمس واتسون James Watson والإنجليزي فرانسيس كريك Francis Crick قد حلا لغز DNA .

اعتمد واتسون وكريك في أنموذجيهما لحمض DNA على البيانات التي استخلصاها من صورة حيود الأشعة X لفرانكلين ، وفسرا نمط البقع على صورة الأشعة لتدل على أن جزئ DNA ملتف على شكل حلزون أو لولب Helix معتمدين على إعادة جمع واتسون للصورة ، حيث استنتجا أن عرض اللولب 2نانومتر بحيث تكون القواعد متعامدة على طول الخيط ، كما وفرت هذه الصورة دليلاً على أن هيكل سكر- فوسفات يوجد في الجهة الخارجية من اللولب وتوجد القواعد النيتروجينية جهة الداخل ، كما أن قطر اللولب دل على أنه يتكون من سلسلتين من شريط من DNA والذي اصبح معروفاً باللولب المزدوج ، كما تم استنتاج أن اللولب يعمل لفة كاملة 3.4 نانومتر من طوله ، ولأن القواعد النيتروجينية يفصل بينها 0.34 نانومتر، لذلك توجد عشر طبقات من القواعد النيتروجينية ، أو درجات على السلم في كل لفة من اللولب، وقد حدد هذا التركيب وضع القواعد النيتروجينية الأكثر كرهاً للماء داخل الجزيء، وبذلك فهي بعيدة عن الوسط المائي الخارجي.

تضاعف الـ DNA

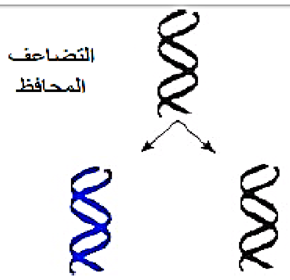
قبل ان تبدء الخلية في انقسامها تتضاعف كمية الـ DNA بها حتى تستقبل كل خلية جديدة نسخة طبق الاصل من المعلومات الوراثية الخاصة بالخلية الام، فقد اشار واتسون وكريك الى أن تركيب الشريط المزدوج ذي القواعد المتزاوجة لجزيء DNA يحتوي على وسيلة يمكن بها مضاعفة المعلومات الوراثية بدقة. فحيث أن الشريطين يحتويان على قواعد متكاملة ، فإن تتابع النيوكليوتيدات في كل شريط يوفر المعلومات اللازمة لإنتاج الشريط المقابل ، فمثلاً إذا كان تتابع القواعد النيتروجينية في جزيء من الشريط (5'A-A-T-C-C-3') فإن قطعة الشريط التي تتكون معها يكون ترتيب قواعدها النيتروجينية (3'T-T-A-G-G-5')، فإذا تم فصل شريط DNA عن بعضها البعض فإن أياً منهما يمكن أن يعمل كقالب لإنتاج شريط يتكامل معه، أي لكل جزيء أبن من DNA سلسة قديمة (القالب) وسلسلة جديدة، وهو ما يعرف بالتضاعف شبه المحافظ وقام العديد من العلماء بإجراء تجارب للتأكد من ذلك.

فقد فرض كل من العالمان ماثيو ميسلسون Mathew Messelson و فرانكلين ستال Franklin Stahl.

أن هناك ثلاثة طرق محتملة لتضاعف DNA :

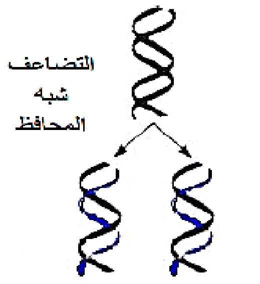
1- التضاعف المحافظ (Conservative model) :

يعمل DNA بعضهما مع بعض كقالب لبناء جزئ DNA جديد مزدوج الشريط حيث يستمر جزيء DNA الأصلي على حاله ويذهب إلى إحدى الخليتين الجديدتين بينما يذهب الجزيء الجديد للخلية الأخرى .



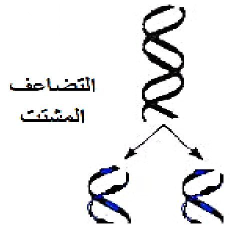
2- التضاعف شبه المحافظ (Semi Conservative model) :

ينفصل شريطا DNA بعضهما عن بعض بكسر الروابط الهيدروجينية التي تربط القواعد النيتروجينية المتزاوجة ويعمل كل شريط من الشريطين كقالب لبناء شريط جديد ثم يتم تكوين روابط بين القواعد المتزاوجة للربط بين شريطين أحدهما جديد والأخر قديم ، وعند انقسام الخلية ترث كل خلية جديدة DNA هجين أي يتكون من شريط قديم وآخر جديد .



3- التضاعف المشتت (Dispersive model) :

يقطع جزئ DNA ككل إلى قطع صغيرة يستخدم كل منها كقالب لبناء لولبين جديدين يرتبط أن بعضهما ببعض بطريقة ما .



وباستخدام سلسلة من التجارب على بكتيريا القولون تمكن ميسلون وستال من إثبات

مدرس المادة

الانزيمات وتضاعف الـ DNA

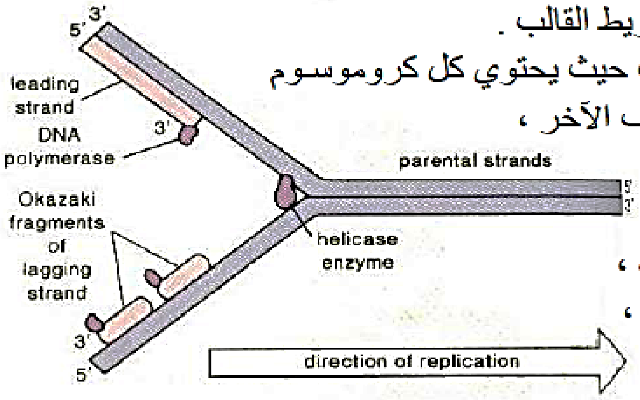
يتطلب نسخ الـ DNA تكامل نشاط عدد من الانزيمات والبروتينات في الخلية ، ولكي يتم النسخ يتعين حدوث ما يلي :

1-ينفك التفاف اللولب المزدوج.

2- ينفصل الشريطان بعضهما عن البعض بكسر الروابط الهيدروجينية الموجودة بين القواعد المتزاوجة في الشريطين.

3- يبتعد الشريطان بعضهما عن البعض لتعريض القواعد لتتمكن من تكوين روابط هيدروجينية مع نيوكليوتيدات جديدة.

ومن المعروف الآن أن إنزيمات اللولب DNA – helicaes تتحرك على امتداد اللولب المزدوج فاصلة الشريطين عن بعضهما البعض ، أما البناء الفعلي لأشرطة DNA الجديدة فتقوم به إنزيمات البلمرة DNA- Polymerases والتي تساعد على إضافة النيوكليوتيدات واحدة بعد الأخرى إلى النهاية '3 لشريط DNA الجديد ، ولكي يتم إضافة النيوكليوتيدة إلى الشريط الجديد لا بد أولاً أن تتزاوج القواعد النيتروجينية في النيوكليوتيدة مع القاعدة النيتروجينية الموجودة على شريط القالب .



ينتظم DNA في حقيقيات النواة في صورة كروموسومات حيث يحتوي كل كروموسوم على جزئ واحد من DNA يمتد من أحد طرفيه إلى الطرف الآخر ، ويبدأ نسخ DNA عند أي نقطة على امتداد الجزئ ، ومن المعروف أن إنزيم البلمرة يعمل في اتجاه واحد فق من الطرف'5 في اتجاه '3 للشريط الجديد الذي يجري بناؤه ، وحيث أن شريطي لولبDNA المزدوج متوازيان عكسياً ، أي أن أحدهما يكون في اتجاه '5 إلى '3 بينما الشريط المتزاوج معه يتوجه في الاتجاه المعاكس أي في اتجاه '3 إلى '5 ، وعلى ذلك فعندما يعمل إنزيم اللولب على فصل شريطي جزئ DNA يتم ذلك في اتجاه النهاية '3 لأحد الشريطين والنهاية '5 للشريط الأخر . وبالنسبة للشريط '3 - '5 ليست هناك مشكلة حيث أن إنزيم البلمرة يتبع إنزيم اللولب مباشرة مضيفاً نيوكليوتيدات جديدة إلى النهاية '3 . إلا أن ذلك لا يحدث بالنسبة للشريط الآخر المعاكس ، وذلك لن إنزيم البلمرة لا يعمل في إتجاه '3 - '5 ولذا فإن هذا الشريط يتم بناؤه على شكل قطع صغيرة (قطع أوكازاكي) في اتجاه '5- '3 ثم ترتبط هذه القطع الصغيرة مع بعضها البعض بواسطة إنزيم الربط DNA- ligase .

أهم الفروقات بين أنواع الرنا RNA

mRNA	rRNA	tRNA
جزئ طويل	جزئ قصير	جزئ قصير جداً
غير مدعوم بالبروتين (عاري)	مدعوم بالبروتين	غير مدعوم بالبروتين (عاري)
يشفر لبناء سلسلة عديد الببتيد (بروتين)	يساهم في تكوين الرايبوسوم وربط الأحماض الأمينية	متخصص في نقل الأحماض الأمينية
يحمل الشفرة الوراثية	----	يحمل الشفرة الضدية
يمثل 5٪ من أنواع الرنا	يمثل 80٪ من أنواع الرنا	يمثل 15٪ من أنواع الرنا

مقارنة بين الحامض النووي DNA و RNA

جزئ الدنا DNA	جزئ الرنا RNA
يتكون من شريط حلزوني مزدوج من النيوكليوتيدات	يتكون من شريط حلزوني مفرد من النيوكليوتيدات
يحتوي على القواعد النيتروجينية A, T, G, C	يحتوي على القواعد النيتروجينية A, U, G, C
يحتوي على سكر خماسي رايبوزي منزوع الأوكسجين	يحتوي على سكر خماسي رايبوزي
يحمل مورثات جميع الكائنات الحية وبعض الفيروسات	يحمل المورثات في بعض الفيروسات فقط بالإضافة إلى بناء البروتينات
يوجد في النواة (الكروموسومات) والبلاستيدات والمايتوكوندريا	يوجد في النواة (النوية) والسايتوبلازم (الرايبوسومات)
طويل جداً مقارنة بالرنا	قصير جداً مقارن بالدنا
يستطيع تكوين الـ RNA	لا يستطيع تكوين الـ DNA

فالمورث Gene هو تتابع النيوكليوتيدات بنظام معين ضمن الكروموسوم والذي سوف يحدد تتابع تكوين الأحماض الأمينية في جزيئة البروتين . ولكي تؤدي المورثات نشاطها وعملها لا بد من نشاط يتم خلاله تحويل المعلومات الوراثية المخزونة في المورث الى بروتين فعال داخل الخلية ، هذه العملية تدعى التعبير الجيني , Gene expression والتي تُنجز خلال مرحلتين أساسيتين هما :

1- الاستنساخ Transcription . 2- الترجمة Translation .

إذ ينتج عنهما تصنيع بروتين يعمل كعامل محدد في عمليات أيض الخلية Metabolism . فالمورثات تعمل على توجيه تكوين الصفات من خلال تخصص بروتين الأنزيمات لذلك نستدل على أن الحامض النووي DNA يحمل معلومات عن :

1- مواصفات النمو Growth characteristics .

2- تمايز الخلية Cell differentiation .

3- فعالية ونشاط خلايا الكائن الحي Cells activity .

فعندما تكون المورثات في حالة تنشيط يتم نقل المعلومات منها بعملية الاستنساخ و بعدها تتم عملية ترجمة لتلك المعلومات من خلال تصنيع بروتينات حسب المعلومات المُترجمة ، وهذه البروتينات ستعمل كعوامل مساعدة في التفاعلات الكيموحيوية المختلفة للكائن الحي ، والتي ينعكس تأثيرها بتصنيع مركبات متنوعة تؤدي الى ظهور صفات مختلفة للكائنات بحسب تسلسل المعلومات التي تم ترجمتها من مورثاتها .
فإذا ما علمنا أن الأنسان يتكون من مليون بليون خلية فالسؤال هو كيف يتم تنشيط مجموعة من الخلايا في الوقت المناسب لتأخذ موقعها في توالي منسق لأحداث الفعل في الجسم ؟

أولاً : الاستنساخ Transcription

تنظيم عملية استنساخmRNA في بدائية النواة

تحدث عملية تنظيم التعبير الجيني في البكتريا من خلال تنظيم عملية بدأ الاستنساخ ومثال على ذلك هو السيطرة الموجبة والسالبة لمشغل نظام اللاكتوز lac-operon في بكتريا E. coli .

تنظيم عملية استنساخ mRNA في حقيقية النواة

تكون عملية تنظيم التعبير الجيني في حقيقية النواة اكثر تعقيدا مما عليه في بدائية النواة وتشمل

1- تنظيم عملية بدأ الاستنساخ بعوامل استنساخ (transcription factors) تساهم في تكوين معقد البدء من خلال ارتباطها بالمثير والذي يسمح بارتباط انزيم بلمرة الـ RNA RNA polymerase II وهناك عوامل استنساخ متخصصه لها القدرة على تحوير في تكوين معقد البدء .

2- المعالجة الاختيارية او البديلة إذ أن نسخة الـ RNA الرسول الاولي primary mRNA في حقيقية النواة تعاني عدد من التحويرات لغرض تكوين شريط mRNA رسول ناضج . احد هذه التحويرات وجود القبعة cap على النهاية 5\ وكذلك وجود تسلسل AAUAAA كمؤشر على عملية الحذف الحاصلة على النهاية 3\ واضافة القاعدة النتروجينية الادنين لتكوين poly adenosine tail. لذلك فأن المعالجة المتغيرة لتلك المؤشرات في تكوين اشرطة mRNA ناضجه يسمح بتكوين اشرطة mRNA مختلفة من نفس الجين المنسوخ ومن ثم ترجمة تلك النسخ الى بروتينات مختلفة

3- تنظيم عملية بدأ الترجمة إن آلية ترجمة المعلومات الوراثية الى بروتين تنظم من خلال السيطرة على عملية بدء الترجمة والمسؤول عنها بروتينات منظمه لها القدرة على الارتباط بتسلسلات معينه على شريط mRNA مثال على ذلك بروتين يدعى IR- binding protein التي ترتبط بتسلسلات IR (5\) الموجودة على Ferretin mRNA وتمنع من تكوين بروتين ferretin ، اما في حالة ارتفاع تركيز الحديد يرتبط الحديد مع IR- binding protein ويغير من هيئته ويصبح غير قادر على الارتباط بتسلسل IR وبذلك يتم ترجمة mRNA الى بروتين Ferretin.

ويحدث التنظيم ايضا من خلال السيطرة على ثبوتية شريط mRNA وعدم تحلله مما يؤدي الى زيادة معدل تصنيع البروتين ، فهناك تسلسلات موجوده بالقرب من النهاية 3' تقلل من ثبوتيته ، وبالمقابل توجد بروتينات تعمل ضد تلك التسلسلات وبالتالي يزداد معدل صنع البروتين .

نوع التنظيم داخل خلية النبات Type of regulation in plant

اتفق علماء فسيولوجيا النبات منذ عام 1903على أن النمو والتكشف يشمل جميع المراحل الفسيولوجية للنبات التي ما هي إلا ناتج سلسلة من التفاعلات الحيوية والتي تتأثر بالعديد من العوامل الداخلية والخارجية ويكون تنظيمها عن طريق تنظيم عمليات التمثيل الحيوي والتي يمكن تلخيصها كما يلي :

(أ)- تنظيم بتأثير العوامل الداخلية وتتضمن :

1 - تنظيم نشاط المورث .   2- تنظيم نشاط الأنزيم .   3- التنظيم بواسطة الهرمونات الداخلية .

(ب)- تنظيم بتأثير العوامل الخارجية وتشمل :

1- درجة الحرارة .   2- الضوء ونظام الفايتوكروم .

ثانياً : الترجمة Translation:

عملية الترجمة هي العملية التي تترجم من خلالها المعلومات الوراثية (المخزونة في متواليات النيوكليوتيدات في جزيئة الحامض النووي المرسال) بعد إملاء الشفرة الوراثية الى المتوالية من الاحماض الامينية في السلسلة البروتينية. ويشترك في عملية الترجمة ثلاث انواع من الـ RNA وجميعها يستنسخ من الـ DNA ومنها :

1-الـmRNA وهي الجزيئة الحاملة للمعلومات الوراثية الخاصة ببناء البروتين ستصبح جاهزة للترجمة بعد اكتمال استنساخها واجراء بعض التحويرات عليها كما هو الحال في الخلايا حقيقية النواة والتي ذكرت سابقاً في مرحلة الاستنساخ.

والتي ذكرت سابقاً في مرحلة الاستنساخ.

2- الـ tRNA وهذه الجزيئات ستتوسط عملية الترجمة عبر التعرف على الشفرة على جزيئة الكودونات الموجودة على الـ mRNA من خلال موقع يقع على الـ tRNA يحتوي على ما يعرف بالشفرة المضادة (inticodon) وتحتوي أي خلية على عدة انواع من الناقل tRNA يتراوح ما بين 40 – 60 نوع .

3- الـ rRNA وهي تراكيب جزيئات كبيرة معقدة وتقع في السايتوبلازم تعمل كمنصة لتصنيع السلسلة البروتينية. وتشمل عملية تخليق البروتين على ثلاثة خطوات هي :

(أ)- بدء عملية الترجمة (قراءة الشفرة وترجمتها لبناء بروتين).

(ب)- استطالة سلسلة عديد الببتيد Elongation of the polypeptide chain (تفاعل بناء البروتين).

(ج)- إنهاء تكوين سلسلة عديد الببتيد Termination of polypeptide (انهاء بناء البروتين).

الخطوة الأولى (أ) : بدء عملية الترجمة ترتبط تحت وحدة رايبوسوم صغير بجزيء mRNA الذي أول كودون به هو AUG ويكون :

1-متجه الى الاعلى . 2- تتزاوج قواعد مضاد الكودون لجزيء tRNA الخاص بالمثيونين مع كودون AUG وبذلك يصبح الحامض الاميني مثيونين أول حامض أميني في سلسلة عديد الببتيد التي يتم بناءها. 3- ترتبط وحدة رايبوسوم كبيرة بالمركب السابق ليكون كودون البدء AUG أو أول جزء tRNA في موقع الببتيديل(p). **ملاحظة :** يوجد على وحدة الرايبوسوم الكبيرة موقعان يمكن ان ترتبط بها جزيئات الـ tRNA - الموقع الاول (P) يطلق عليه موقع الببتيديل peptidyl . الموقع الاخر (A) يطلق عليه أمينو أسل amino-acyl

الخطوة الثانية (ب) : استطالة سلسلة عديد الببتيد أو تفاعل بناء البروتين :

1-يرتبط مضاد كودون tRNA الثاني بالكودون التالي على جزيء mRNA في الموقع A لوحدة الرايبوسوم الكبير وبالتالي يصبح الحامض الاميني الذي يحمله هذا الـ tRNA هو الحامض الاميني التالي في سلسلة عديد الببتيد.

2- يحدث تفاعل نقل الببتيديل peptidyl transferase reaction الذي ينتج عنه تكوين رابطة ببتيدية بين الحامض الاميني الاول والثاني- والانزيم الذي ينشط هذا التفاعل عبارة عن جزء من تحت وحدة الرايبوسوم الكبيرة ، ونتيجة لذلك يتحرر الحامض الاميني الاول ويصبح الـ tRNA الاول فارغاً ويترك الرايبوسوم وقد يلتقط مثيونين أخر ، أما الـ tRNA الثاني فيحمل الحامضين الامينيين معاً.

3- يتحرك الرايبوسوم على امتداد mRNA ، وهذه العملية تأتي بـ tRNA الثاني الى الموقع p على الرايبوسوم ويصبح الموقع A فارغاً ثم تبدأ الدورة مرة أخرى ، حيث يرتبط مضاد كودون ثالث على tRNA مناسب بكودون mRNA جالب الحامض الاميني الثالث الى الموضع المناسب على الموقع، وترتبط سلسلة عديد الببتيد النامية بالحتمض الاميني الجديد القادم على هذا الجزء من tRNA الثالث ، ثم يتكرر التتابع .

الخطوة الثالثة (ج) : إنهاء تكوين سلسلة الببتيد عندما يصل الرايبوسوم الى كودون وقف على mRNA إذ أن عامل الاطلاق Release factor يرتبط بكودون الوقوف مما يجعل الرايبوسوم يترك mRNA حيث تنفصل وحدتا الرايبوسوم عن بعضها البعض وتقف عملية بناء البروتين.

قد يُكون الحامض الاميني أكثر من شفرة. كذلك يوجد شفرة لبدء البروتين ، وهنك شفرة لتوقف بناء البروتين ، ويلاحظ أن الشفرة الوراثية عامة، واحدة بمعنى أن الشفرة التي تدل على الأحماض الامينية في الفيروسات والفطريات والنبات والحيوان.

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

2- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

3 - خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الخامسة : كلونة الجين Gene cloning

مقدمة

توجهت الهندسة الوراثية لتحقيق هدفها في أمكانية زرع مورث مرغوب به ضمن جينوم الكائن الحي ، و سعت الى ذلك من خلال تحديد الانزيمات التي بواسطتها يمكن تقطيع الشريط المزدوج للحامض النووي DNA ، بحيث يتم الحصول على قطع صغيرة سهلة الانقياد ، ولا يكون ذلك ممكناً الا من خلال تحديد الانزيم الذي يعمل ضمن تتابع وحدات بناء الـ DNA إذ يتم قطع الشريط بسلسلة من الانزيمات المختلفة ، التي ينتج عنها خفض طول شريط الـ DNA الى أطوال مكافئة لواحد أو عدة مورثات ، هذه القطع الصغيرة (المورثات) يمكن كلونتها Gene cloning وخزنها وأعدادها للاختبار، بعد ذلك يمكن وضع كل مجموعة من أجزاء الـ DNA لتركيب طراز وراثي genotype واحد ضمن مخزن للمورثات ويُعتمد كمصدر عندما يُراد الحصول على المورث المطلوب.

إذ كلونة المورث Gene cloning تعني إنتاج نسخ متعددة من المورث، وأحياناً يطلق عليها تكبير المورث Gene amplification . كما إن القواعد الاساسية لتقانة نقل وزراعة المورثات هي ذاتها للنبات والحيوان والاحياء الدقيقة ، على الرغم من وجود خصوصية تتطلب التعديل أو التحوير لبعض الحالات الضرورية لأقلمتها مع الانظمة التي تتواجد طبيعياً في تلك الكائنات الحية.

تقنية نقل المورثات Gene transfer technology

بعد الانتهاء من عملية تنقية الـ Purification of DNA وتحديد وفصل المورثات المطلوبة ، تأتي المرحلة اللاحقة الا وهي نقل تلك المورثات وادخالها الى خلايا جديدة ، وتتم هذه العملية بأسلوبين هما :

+ **طريقة غير مباشرة** – إذ يتم نقل المورثات من كائن حي الى أخر باستعمال موجهات Vectors (وهي عبارة عن حوامل Carriers تُستخدم لأمرار مورثات معينة الى عائل جديد) فهي تؤدي دور الوسيط ، وهي تستعمل لإدخال المورث والمحافظة على إظهار تأثيره في الخلية الجديدة ومن الموجهات المستخدمة :

× البلازميدات Plasmids . × الرواشح Viruses . × العناصر الناقلة Transportable elements .

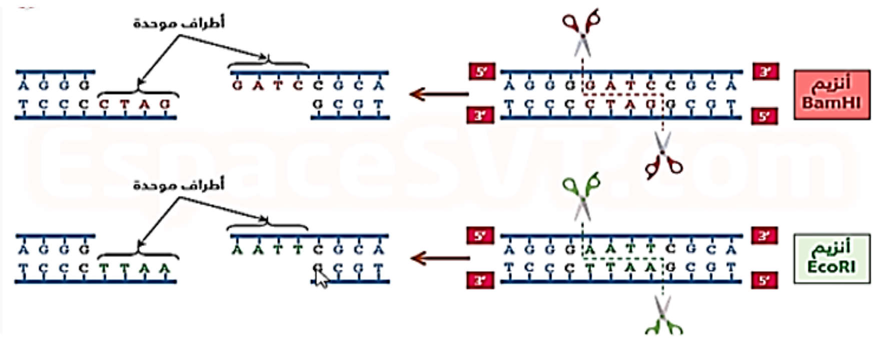
+ **طريقة مباشرة** – وتتم بوسائل مختبرية ومنها :

× معاملات كيميائية وتتضمن النبضات الكهربائية Electrical pulses .

× معاملات فيزيائية وتشمل الحقن بالمحاقن الدقيقة Injection by micro-needles .

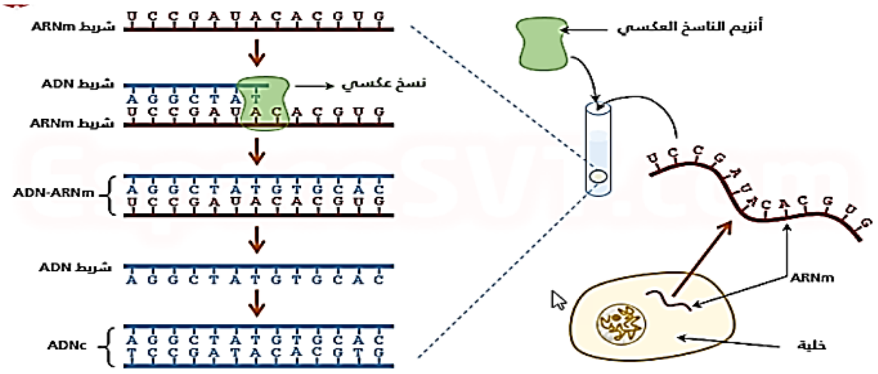
المرحلة الاولى : الحصول على المورثة المرغوب فيها وتتم بأحد الطريقتين التاليتين:

الطريقة 1 : استخلاص المورثة المرغوب فيها بإجراء عملية قطع لـ DNA بواسطة أنزيمات خاصة تسمى أنزيمات الفصل النوعي، التي تم اكتشافها لأول مرة سنة 1912 من قبل Werner Arber . توجد عدة أنزيمات تقطع الـ DNA الى عدة أجزاء تسمى أنزيمات الفصل بينت الدراسات أن أنزيمات الفصل تقطع في مواقع محددة من الـ DNA لذا تسمى أنزيمات الفصل النوعي ، والتي من خلالها يتم عزل المورثات ، وتعمل انزيمات الفصل كما موضح في التالي :



الطريقة 2 : الحصول على المورثة انطلاقا من نسخ الـ mRNA على شكل خيط مكمل أو cDNA باستعمال الأنزيم الناسخ العكسي ،

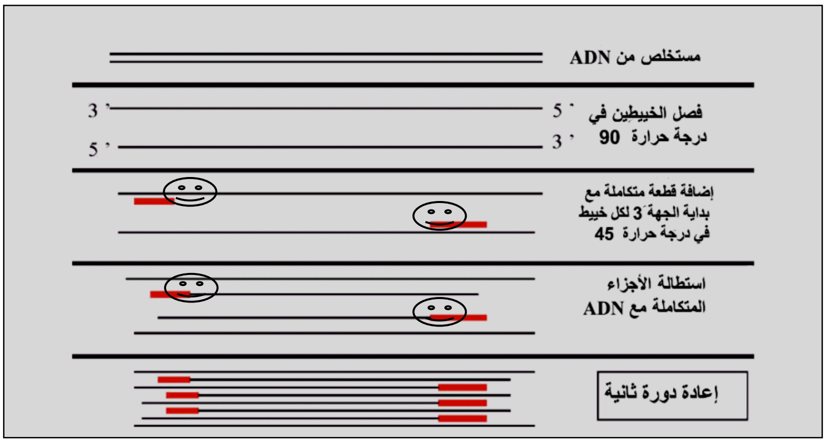
وكما موضح في المرتسم التوضيحي التالي .



كلونة المورثات Genes cloning

تتم مضاعفة المورثة بواسطة **تقنية PCR**

إذ يعتمد نجاح اندماج المورثة مع DNA الناقل على عشوائية التقاء هذين العنصرين . ولضمان ارتفاع نسبة هذا الالتقاء ونجاح الاندماج تستعمل نسخ عديدة من DNA المورثة مع نسخ عديدة من الناقل ، وهو ما يتطلب تحضير نسخ عديدة من المورثة . يتم ذلك من خلال تذبذب الحرارة خلال دورة محددة بين 40 و 90 درجة ، إذ في حرارة 90 درجة تتلاشي الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية المتكاملة فينفصل شريطي المورثة . أما في حرارة 40 درجة فيقوم أنزيم DNA polymérase ببلمرة شريطين جديدين وفق الآلية النصف محافظة ، وبتكرار نفس الدورة عدة مرات يتم الحصول على نسخ عديدة من المورثة . علماً أن جهاز الـ PCR مصمم لتوفير الظروف الملائمة لمضاعفة المورثة .

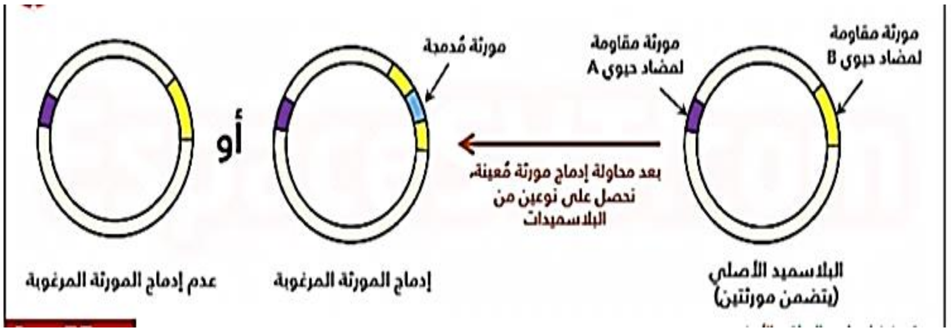


المرحلة الثانية: ادماج المورثة داخل الناقل الذي يمكن أن يكون بلازميد بكتيري أو DNA عاثي .

+ في حالة الناقل بلازميد بكتيري : يقطع الناقل بواسطة نفس أنزيم الفصل ثم تدمج المورثة المعزولة والمقطوعة مع الناقل بواسطة أنزيم الربط بعدها يتم إدماج البلازميد في البكتيريا .

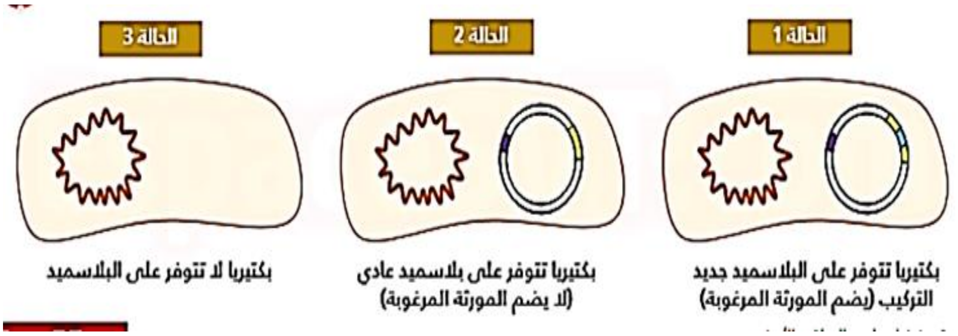
+ في حالة الناقل DNA عاثي (فايروس أو قد تستعمل البكتريا للتكاثر) : يقطع DNA العاثي بواسطة نفس أنزيم الفصل وتدمج المورثة المعزولة والمقطوعة مع DNA العاثي بواسطة أنزيم الربط بعدها يُسلط العاثي المُغير على البكتيريا وهو ما يؤدي الى ادماج المورثة مع DNA البكتيريا .

بعد دمج البلازميدات في البكتريا العائلة ، يتم زرعها في وسط ملائم بحيث تتكاثر مكونة مستعمرات على شكل تجمعات كل تجمع ينتج عن تكاثر بكتريا واحدة . وعند محاولة دمج مورثة مرغوبة على مستوى البلازميد ، نحصل على نوعين من البلازميدات ، بلازميدات أدمجت المورثة المرغوبة ، وبلازميدات لم تُدمج المورثة بفعل ارتباط الأطراف الموحدة قبل إدماجها . ويوضح الشكل التالي للحالتين من البلازميات المُحَصَل عليها بعد إدماج مورثة معينة .

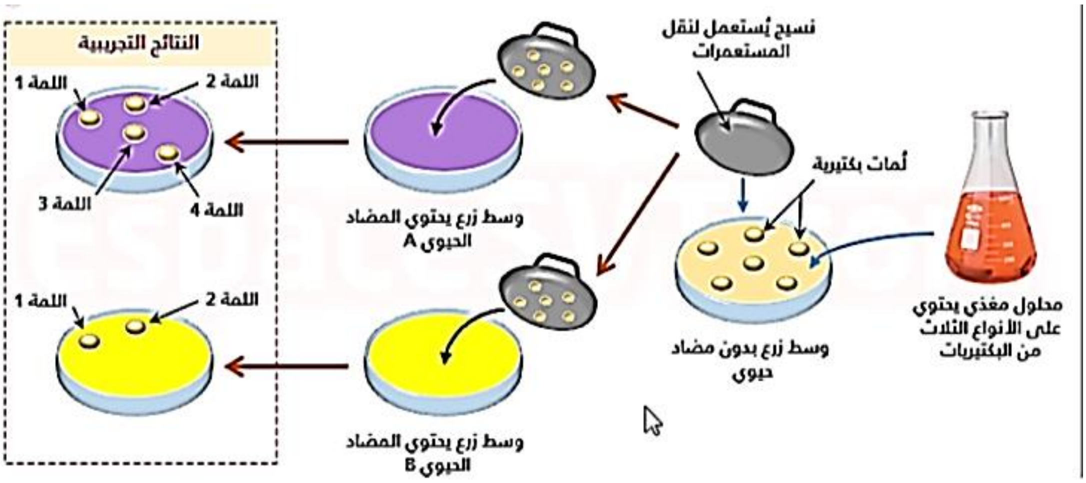


من خلال المعطيات أعلاه يتبين لنا أن البكتريا المُحصل عليها لن تضم كلها المورثة المرغوبة لأننا سنحصل على بكتريا تضم بلازميد عادي (بدون مورثة)، كذلك بكتريا لا تضم أي بلازميد ، بينما فقط البكتريا التي تضم البلازميد جديد التركيب هي التي تضم المورثة المرغوبة مما يجعل من الضروري رصدها .

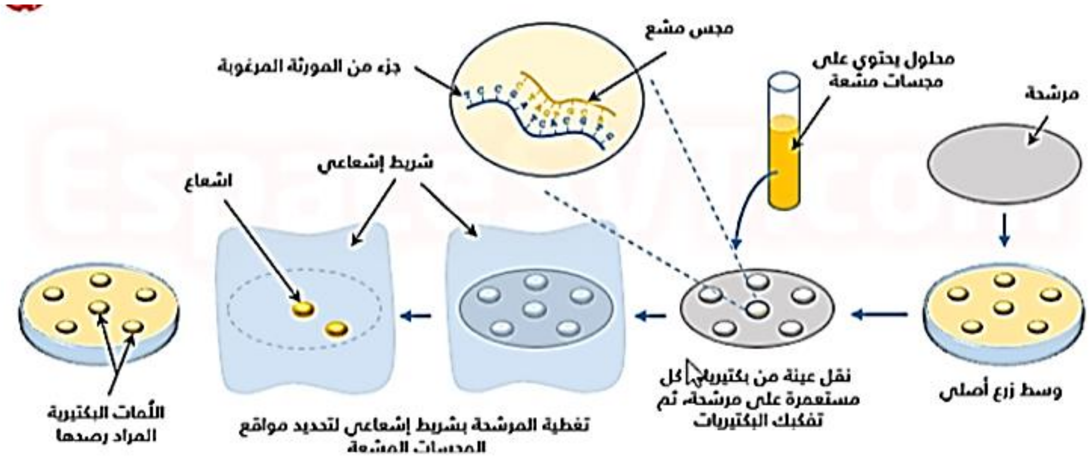
تمثل الوثيقة التالية الأنواع الثلاث للبكتريا المُحصل عليها .



ويُعتمد عدد من التقانات بهدف رصد البكتريا المُغيرة وراثياً ، من بين تلك التقانات الاستفادة من خاصية مقاومة البكتريا للمضادات الحيوية بفعل مورثات تتواجد على مستوى البلازميد .إذ يمكن رصد البكتريا التي حصل فيها تغير وراثي من خلال المقاومة لمُضاد حيوي ، فالبلازميد المستعمل لدمج المورثة المرغوبة يحوي على مورثتين إضافيتين ، أحدهما مسؤولة عن مقاومة مضاد حيوي A والأخرى مسؤولة عن مقاومة مضاد حيوي B .فكل بكتريا تحوي على البلازميد العادي تكون مقاومة للمضادين الحيويين A وB ، ومبدأ تقنية الكشف يتم من خلال زرع البكتريا على أوساط زرعية تضم المضادات الحيوية ، وبعد الحصول النتائج لكل وسط زرعي وتحليلها ، يمكن تحديد المجموعات التي تحوي على الموثة المرغوبة . ويوضح الشكل التالي خطوات عمل ذلك .

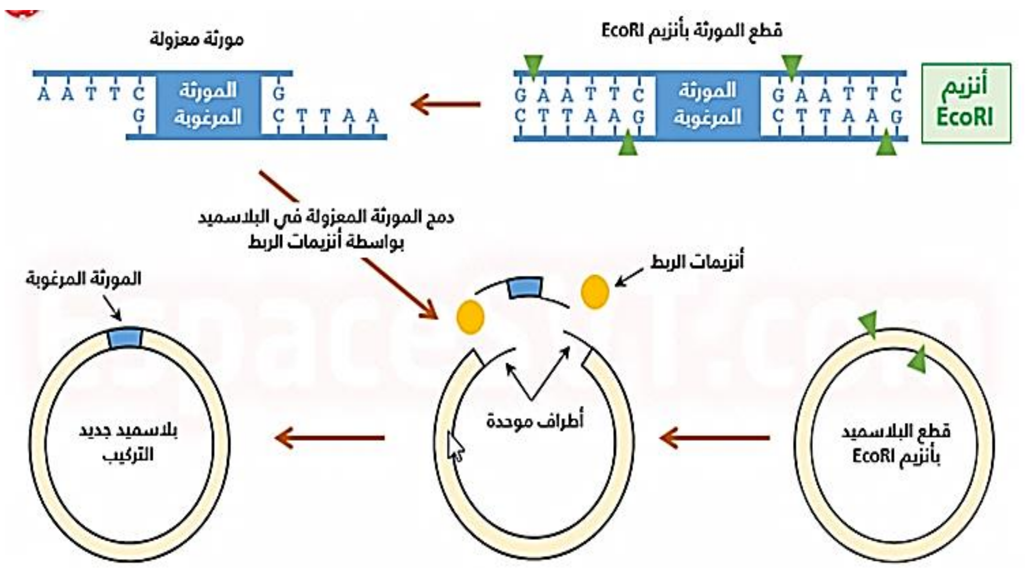


كما يمكن الكشف عن البكتريا المتغيرة وراثياً من خلال تقنية استعمال المجسات المُشعة ، والتي تعتمد على الكشف عن المورثة المرغوبة باستعمال مجسات مشعة ، وهي عبارة عن قطع من حامض نووي DNA أو mRNA مُشعة ومُكمِلة لمُتتالية الـ DNA لجزء مميز من المورثة المستهدفة ، بعد ذلك يتم تحديد موقع الاشعاع باستعمال شريط إشعاعي ، إذ يدل الاشعاع في الشريط على موقع تواجد المجسات المُشعة ، وذلك يعني موقع تواجد البكتريا الحاملة للمورثة المرغوبة . ويوضح الشكل التالي مراحل هذه التقنية .



الحصيلة بعد عزل البكتريا المُغيرة وراثياً والتي تضم المورثة المراد ترجمتها ، يتم زرع هذه البكتريا في مفاعلات حيوية صناعية Bioractore ذات ظروف ملائمة لتتكاثر وتنتج البروتين المرغوب فيه بكميات كبيرة .

والشكل التالي يوضح مراحل دمج المورثة داخل البلازميد .



وكما أسلفنا القول كذلك يمكن نقل المورثة المرغوب بها الى خلايا العائل بوساطة الرواشح (DNA العاثي) كما تُستعمل نواقل ميكانيكية مثل مدفع الجزيئات والحقن المجهري . وهنا لا بد من الاشارة الى ضرورة أجراء تفعيل للمورثة المنقولة بوساطة البلازميد على التعبير داخل البكتريا العائلة ، ويجب العمل على توضيبها ، وذلك من خلال تدخل نظام للمراقبة ، يتمثل في إضافة مورثات في جانبي تلك المورثة المُدمجة .

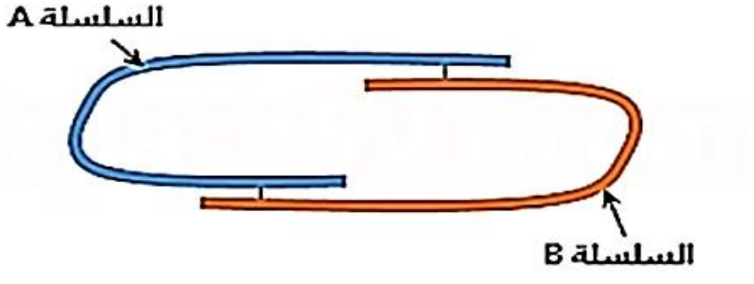
زراعة المورث Gene transplantation

يقصد بها عملية غرز Insertion لل DNA في خلية معينة لتصحيح حالة شاذة فيها . فقد تمكن العلماء من غرز الحامض النووي في خلايا جرمية أو خلايا بيضة مخصبة وخلايا جسمية لحيوانات لبونة ، وأثبتت التجارب أن هذه المورثات أمكنها التعبير عن نفسها في البيئة الجديدة وتكاملت في جينوم ذلك الكائن ، كما أنها انتقلت الى الجيل التالي ، لذلك تم اعتماد هذين الاسلوبين وهما الزرق في الخلايا الجرمية و الإدخال في الخلايا الجسمية لزراعة المورثات .

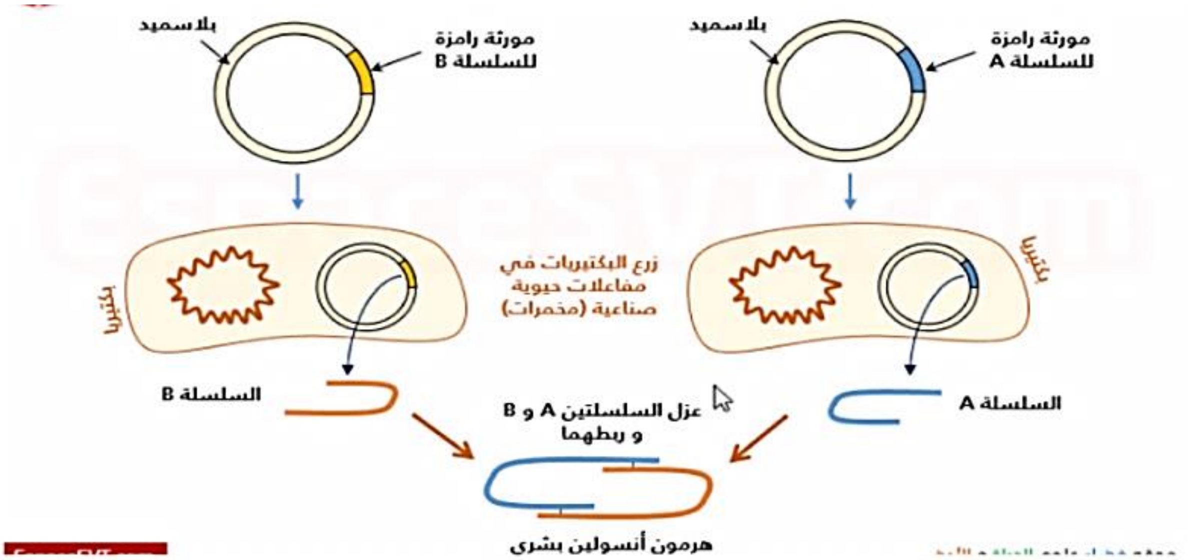
مستقبل زراعة المورثات .

إن أحد فوائد زراعة المورثات في الخلايا الجرمية هو أن جميع الخلايا الكائن الذي تنشئ من البيضة تلك سيحتوي على المورثات المرغوبة ، في حين زراعة المورث في الخلايا الجسمية سيؤدي الى تغيير المادة الوراثية لتلك الخلايا والخلايا التي تنشئ منها فقط . بشكل عام يمكن أن تهدف تجارب زراعة المورث الى إغناء المعرفة عن التعبير الجيني في الكائنات حقيقية النواة والسيطرة على بعض الامراض الوراثية أو الشفاء منها .فضلاً عن ذلك تم إنتاج عدد من احتياجات الانسان ذات المتطلبات التخصصية ومنها :

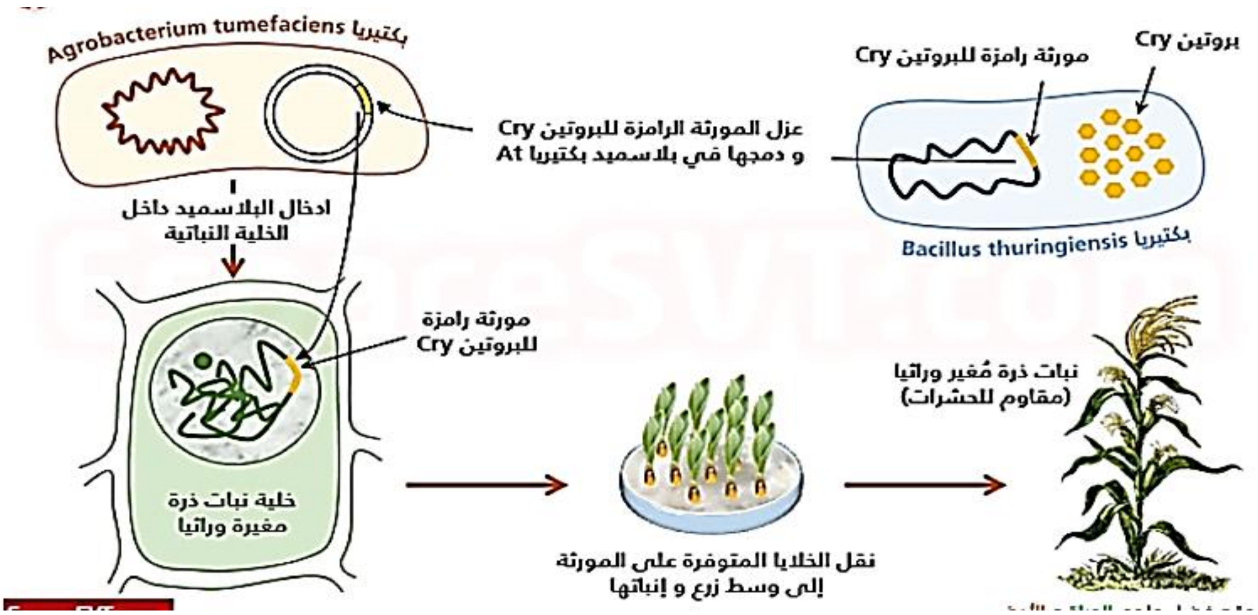
+ الانتاج الصناعي لهرمون الانسولين البشري . فكما هو معروف أن هرمون الانسولين مسؤول عن تخفيض نسبة الكلوكوز في الدم ، وهناك الأشخاص المصابين بمرض السكري يعانون من خلل في إنتاج هرمون الانسولين ، مما يؤدي الى انعدام وظيفته . ولعلاج هذا الخلل ، يمكن حقن المرضى بهرمون أنسولين حيواني . ويوضح الشكل التالي بُنية مُبسطة لهرمون الانسولين .



إلا أن الاستمرار في استعماله يؤدي الى ظهور أثار جانبية عند الانسان . ولتجنب مثل تلك الاثار السلبية لابد من تحديد المورثتين المسؤولتين عن إنتاج السلسلتين المُشكِلتين لهرمون الانسولين البشري باعتماد الهندسة الوراثية لإنتاج الهرمون وكما يظهر في المخطط التالي .



كما تم التغيير الوراثي على بعض النباتات من إجل إنتاج نباتات ذات مقاومة لبعض الحشرات وتم أعتماد الهندسة الوراثية والاستفادة من أحدى المورثات للبكتريا *Bacillus thuringiensis* والتي ترمز لبروتين يقضي على فراشات الحشرة ، ويمثل الشكل التالي الكيفية لأحداث التغيير الوراثي المطلوب .



المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

2- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

3 - خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

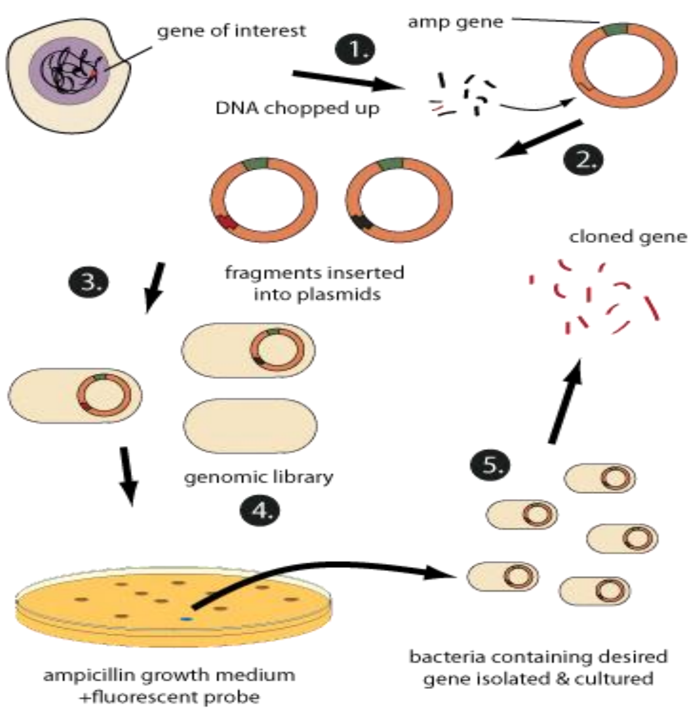
المحاضرة السادسة : نواقل الجينات والتحول الوراثي في النباتات .

Genes conductors and hereditary conversion in plants

مقدمة

البلازميدات قد يطلق عليها نواقل أو موجهات Vectors وذلك لاستخدامها كأداة في نقل المورثات من وإلى الكائنات بعضها البعض، وعليه يمكن للباحثين المختصين

التحكم في تركيب البلازميدات كنواقل لإدخال صفات وراثية (مورثات) مرغوبة، ومن ثم ادخالها إما داخل خلية الخميرة أو إعادة إدخالها للخلية البكتيرية، بغرض الاستفادة من خاصية التكاثر الذاتي لها، لذلك انتاج كميات كبيرة من هذه المورثات تدعى عملية كلونة Cloning بمعنى ادخال مورث معين واندماجه مع البلازميد (الناقل) وقدرته على الاستنساخ . والشكل التالي يوضح مراحل استخدام البلازميدات كنواقل "Vectors"في نقل المورثات من وإلى الكائنات الحية .



وللتشابه ما بين البلازميدات والرواشح (العاثيات) الصغيرة من حيث وجود الحامض النووي والقدرة على نقل الموروثات، فيما عدا عدم احتواء البلازميدات على طبقة خارجية من البروتين، فضلاً عن ذلك فأن البلازميدات لا تسبب ضرر لعائلها، بعكس علاقة العاثي بالعائل وما يسببه من ضرر، فقد أدى ذلك إلى الاعتقاد نظريا أن العاثيات المنتشرة في الأصل ما هي إلا بلازميدات واكتسبت غلاف بروتيني خارجي و أصبحت عاثيات. وتختلف البلازميد عن بعضها البعض من حيث الوزن الجزيئي فمنها الصغير ومنها الكبير، وبالتالي تختلف في حملها للمورثات، فمنها ما لا يحتوي على أي مورث، بينما هناك أنواع كبيرة تحتوي على عدة مورثات.ويمكن لبعض انواع من الخلايا البكتيرية تبادل الـ DNA بنوع من الاقتران أو ما يسمى بالتزاوج الجنسي Conjugation بين خلايا بكتيرية قريبة من بعضها البعض كأن تكون من نفس الجنس أو على صلة قرابة من الناحية التصنيفية ، ويشتمل الاقتران على انتقال الـ DNA المباشر من نوع واحد من خلايا بكتيرية مذكرة (تمتلك بلازميد الخصوبة Sex Plasmid) لتميزه بمورثات لها القدرة على الانتقال والحركة إلى خلية أخرى مؤنثة وبانتقال الـ DNA ، تنتقل الصفات الوراثية من الخلايا المذكرة (الواهبة) إلى المؤنثة (المستقبلة). فإذا كانت الخلايا البكتيرية مقاومة لنوع معين من المضادات الحيوية مثلاً، فمن الممكن أن تُنقل هذه الصفة المميَّزة إلى خلايا بكتيرية غير مقاومة.

لقد أدى ذلك إلى استخدام البلازميدات في تقنيات وأبحاث الهندسة الوراثية والتعامل مع المورثات، من خلال نقل المورثات Gene transfer إلى الخلايا البكتيرية أو إلى خلايا كائنات راقية سواء نباتات أخرى أو حيوانات أو كائنات حية أخرى ، لتحسين مقاومتها للأمراض

أو تحسين معدلات نموها أو تحسين أي صفات أخرى مطلوبة، كذلك العلاج الوراثي. عن طريق إدخال جينات إلى خلايا الإنسان المريض وراثيا لتعديل تركيبه الوراثي إلى التركيب الطبيعي والإنتاج المكثف لبعض الجزيئات الكيميائية الحيوية Biochemical molecules والتي لها أهمية في علاج بعض الأمراض. مثل هرمون الأنسولين وهرمون النمو أو أي جزئيات كيميائية حيوية لها أهمية تجارية أخرى، وذلك ما **يُعرف** بثورة الهندسة الوراثية.

خطوات عمليات كلونة المورثات

تشمل عمليات كلونة المورثات Genes cloning العديد من الاجراءات للحصول على المورثات المرغوبة ضمن قُطع من الـ DNA والتي يمكن تحضيرها بعدة طرق ، بعدها يتم اختيار النواقل ثم عملية ربط للقُطع المُحضرة مع النواقل ، بعدها يتم استعمال خلايا مضيفة لتكثير الناقل المهجن وفي الغالب تستعمل بكتريا القولون *Escherichia coli* وذلك بسبب معرفة خلفيتها الوراثية وسرعة نموها وسهولة التعامل معها ، لتأتي المرحلة اللاحقة والتي فيها يتم إدخال النواقل المحملة بالمورثات المرغوبة الى الخلايا المستهدفة ، وتعد مرحلة الكشف عن الخلايا التي تمكنت من التقاط المورث المطلوب هي المرحلة الأخيرة والتي قد يطلق عليها بمرحلة التعبير المظهري Phenotype expression. لذلك يمكن توضيح الخطوات الرئيسية بشيء من التفصيل وكما يأتي :

الخطوة الأولى- تحضير قُطع من الحامض النووي DNA

تُعد طريقة القطع باستخدام الأنزيمات الأفضل إذ تُستخدم فيها أنزيمات قَطع Restriction enzymes لها القدرة على تمييز توالي معين من النيوكليوتيدات في شريط الحامض النووي DNA فضلاً عن ذلك تشترك أنزيمات أخرى في عمليات الكلونة والتحوير والأنزيمات اللاحمة . ويُشترط في القُطع التي يتم تحضيرها أن تكون ذات نهايات قابلة للارتباط ، فهناك بعض الحالات التي يُنتج فيها قطع من الـ DNA بنهايات ملساء وفي هذه الحالة لابد من إضافة قطع صغيرة من النيوكليوتيدات كمكيفات Adaptors لتعمل على تكامل طرفي قُطعة الـ DNA المنقوصة وتُسهل ارتباطها عند تكامل القطع مع بعضها باعتماد ازدواج القواعد التي يسهل ربطها بالأنزيمات اللاحمة .وقد وضعت خرائط لتحديد المواقع التي يستهدفها كل انزيم . كما وضعت مثل هذه الخرائط لعدد من البلازميدات والعاثيات وجينوم بكتريا القولون *E. coli* وبعض الانواع الاخرى . بعد ذلك يتم فصل القُطع المطلوبة باستخدام الهجرة الكهربائية في الهلام Gel – electrophoresis أو تحويراته مثل Pulse-Field gel electrophoresis ، وهنا يتم الفصل على اساس حجم القُطع ، فالقُطع الصغيرة أسرع حركةً في الهلام . ويؤثر في ذلك الطبيعة الكيميائية للهلام وتركيزه والوصلات العرضية التي يسبب زيادتها فصل قُطع صغيرة من الـ DNA ، ومن ثم يتم تصبيغ صفائح الهلام بمادة Ethidium bromide فتظهر على شكل حُزم مُشعة تحت الاشعة فوق البنفسجية (Ultra violet (U.V. أو يتم تحديدها باستخدام مسابر (متحسسات) خاصة . والتي تسمح بفصل قُطع يصل حجمها الى 100 كيلو قاعدة . ويمكن تضخيم هذه القُطع بتقنية الـ (Polymerase Chain Reaction (PCR لزيادة كمية الـ DNA .

الخطوة الثانية- اختيار النواقل

يُعد اختيار النواقل Vectors الخطوة المهمة في التغيير الوراثي ، وذلك لأن قُطع الـ DNA التي تم تحضيرها وفصلها وتضخيمها سوف تتلاشى إذا لم يتم دمجها مع متضاعف مثل كروموسوم الخلية ، ولإتمام ذلك يجب أن تُنجز العملية من خلال ناقل أو متضاعف مُستقل . لذلك عملية أنتقاء النواقل خطوة مهمة لنجاح عملية التغيير . ومن الاسس التي تؤخذ بالاعتبار عند اختيار النواقل ما يأتي :

1-تكون جزيئة الناقل صغيرة لتسهل عملية تحضيرها وكذلك التعامل معها .

2- تحوي الجزيئة على منطقة تضاعف لتكون قادرة على التضاعف بشكل مستقل في الخلايا المضيفة .

3- تحوي على أكثر من موقع للانغلاق بأنزيمات القطع ، ويفضل أن تكون ضمن مورث أغلاق مثل مقامة المضادات الحيوية .

4- أن يحتوي الناقل على مُمهدات خاصة بصفته .

وتشمل النواقل :

(أولاً)- البلازميدات Plasmids تُعد أهم النواقل المُستعملة ومنها :

بلازميد PBR 322 يحمل مورث مقاومة الامبسيلين والتتراسايكلين ، فضلاً عن كونه يحتوي على عدد من مواقع الاغلاق بعدد من الانزيمات القاطعة .

بلازميد PUC 18 و PUC 19 وهذه مهمة في كلونة المورثات إذ يحتوي مواقع الكلونة لكل منها على 10 مواقع للانغلاق بأنزيمات قطع مختلفة .

(ثانياً)- العاثيات Viruses تُعد نواقل كفوءة تستعمل في تحضير نواقل مهجنة وأنواع أخرى من النواقل منها :

+ نواقل الاقحام Insertion vectors وفيها تم أزالت المواقع غير المهمة واستبدلت بالمواد المراد نقلها .

+ نواقل الاستبدال Replacement vectors وفيها يحتوي الناقل على موقعين للانغلاق بالأنزيمات حول المنطقة غير الضرورية والتي يمكن استبدالها بقطعة من الحامض النووي الـ DNA المراد نقلها .

(ثالثاً)- النواقل المشتقة Derivative vectors تشمل هذه النواقل المجموعة التي تم اشتقاقها من العاثيات والبلازميدات أو التي تم تصنيعها لتلائم أهداف وحالات خاصة ومنها :

(1) الكوزميدات Cosmids وهي نواقل هجينة من البلازميدات والعاثيات ، الاساس فيها البلازميد الذي يحوي على أصل التضاعف وجين المقاومة ، أما تواليات الالتصاق فهي من العاثي لمدا λ .

(2) الفاجميدات Phagmids وهي ايضاً نواقل هجينة من البلازميدات والعاثيات ، تحوي نقطة أصل للتضاعف من عاثي خيطي . تختلف عن الكوزميدات بأن العاثي فيها لا يمكن أن يدخل الخلايا ولا يستطيع أن يتضاعف فيها وذلك لإزالة كمية كبيرة من مادته الوراثية واستبدالها بالمادة المراد نقلها .

(3) نواقل التعبير Expression vectors وهي النواقل التي تحوي على ممهدات قد تكون قوية لإنتاج عدد كبير من نسخ المادة الوراثية أو لإنتاج عدد قليل منها بحسب الغرض الذي من أجله تم تحضير الناقل. ومن الممهدات المستعملة أوبرون اللاكتوز Lac ، أوبرون التربتوفان Trp أو هجين من الاثنين tac .

(4) الفوزميدات Fosmids تشابه الكوزميدات غير أن البلازميد المستخدم فيها هو بلازميد الخصوبة F-plasmid . والفوزميدات تنتج عدد قليل من نُسخ المورث مما يُضفي عليها صفة الثبات مقارنة بالكوزميدات التي تعطي عدد كبير من النُسخ .

نواقل الفطريات والخمائر Fungus and Yeast vectors

بالنظر للأهمية التصنيعية للعديد من هذه الاحياء ، فقد تم تطوير العديد من النواقل الخاصة بها لتحسين مواصفاتها ، فمثلاً تحوي خميرة الخبز على البلازميد 2μm الملائم للعمل كناقل كلونة ويحمل مورث تخليق الحامض الاميني ليوسين. مثل لهذه النواقل Yeast (YEP) Episomal Plasmid و Yeast Replicative plasmid (YRP) و البلازميد البكتيري PBR 322 الذي يستطيع الاندماج مع كوموسوم الخلية لوجود تشابه في موقع التشفير للحامض الاميني ليوسين.

نواقل القطع الكبيرة من الـ DNA

تشمل هذه النواقل مجموعة قادرة على نقل قطع كبيرة من الـ DNA والتي لا تستوعبها النواقل السابقة وهي نواقل صناعية مثل **كروموسومات البكتريا الصناعية** و **كروموسومات الخمائر الصناعية** و **كروموسومات اللبائن الصناعية** .

نواقل الخلايا حقيقية النواة Eukaryotic Cells vectors

هي نواقل تحوي على عناصر تنظيم (ممهدات) يمكن أن تُضاف لها مُحسنات (مُشجعات) Enhancers لزيادة استنساخ الناقل ، كما تحوي على اشارات أنهاء كفوءة وأليات لتحوير النسخ بعد ترجمتها ، مثل عملية إضافة متعدد الادنين Poly-adenineylation .

الخطوة الثالثة- ربط قطع الـ DNA الى النواقل

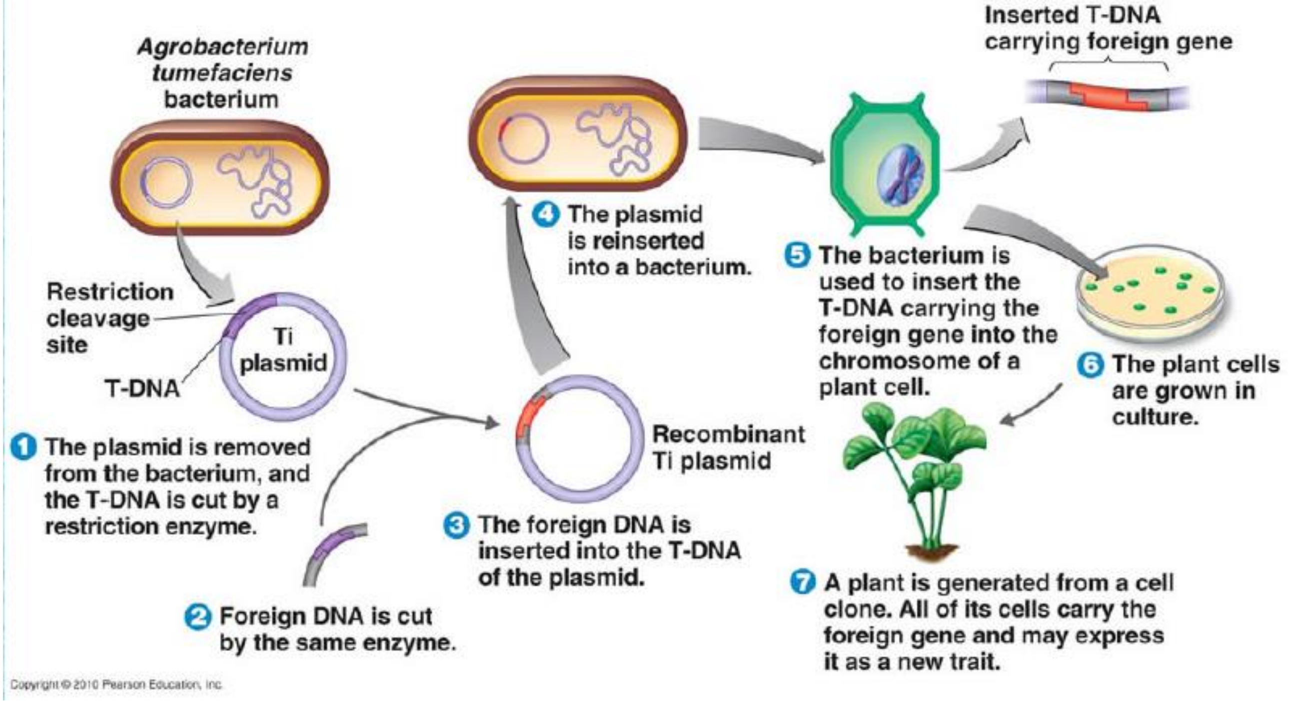
في هذه الخطوة يتم ربط قُطع المادة الوراثية المراد نقلها الى نواقل (متضاعفات) ملائمة لإنتاج الناقل المُهجن Hybrid Vector (ناقل مُطَفر Chimeric Vector) ، ويتم الربط بعد أجراء بعض التحويرات مثل إزالة مجموعة الفوسفات لمنع عودة القُطع للارتباط مع بعضها ،بذلك تُنتج النواقل المُهجنة والتي يتم إدخالها الى الخلايا المُضيفة إما بطريقة التحول أو بطريقة التتبيغ بالعاثي . وفي حالة عدم ملائمتها يمكن استعمال طريقة التثقيب الكهربائي Electroporation وبهذه الطريقة يمكن نقل المورثات الى أحياء مختلفة ، فعند تعريض خليط من الخلايا والمادة النووية الى مجال كهربائي عالي الفولتية لمدة وجيزة جداً يؤدي الى اضطراب الطبقات الخارجية من جدر وأغشية الخلايا مما يفسح المجال أمام قطع المادة الوراثية الـ DNA للدخول داخل تلك الخلايا بعدها تعود تلك الجدر والاغشية الخلوية الى حالتها الطبيعية .
أو تُستعمل طريقة القذف الحيوي Biolistics والتي فيها يتم خلط المواد الوراثية مع جسيمات بقطر أصغر من 1 مايكروميتر وتُقذف بواسطة مدفع الجزيئات Particales gun والتي يمكن تطبيقها مع جميع الخلايا وبعض العُضيات .
وما يعيق استخدام طريقتي التثقيب الكهربائي والقذف الحيوي هو حاجتهما الى جهد ووقت طويل فضلاً الى ظروف مثلى لكل سلالة .

الخطوة الرابعة- أدخال النواقل المحملة بالمورثات المطلوبة الى الخلايا المُستهدفة

بعد أن يتم الحصول على أعداد كبيرة من النواقل المُحملة بالمادة الوراثية المُهجنة (التي تحمل المورثات المرغوبة) يتم ادخالها الى الخلايا المُستهدفة والتي يُراد تحوير مادتها الوراثية ، من الخلايا التي تستعمل كمضيف لاستلام قُطعة المادة الوراثية المُهجنة هي خلايا من الاحياء بدائية النواة خاصة بكتريا القولون *E. coli* . أما من الاحياء حقيقية النواة فتستعمل الخمائر بالرغم من امكانية استعمال الخلايا الحيوانية والنباتية .

الخطوة الخامسة- الكشف عن الخلايا التي التقطت المورث المطلوب.

تُعد الخطوة الاخيرة وفيها تُستخدم عدد من الطرق للكشف عن الخلايا التي التقطت المورث المرغوب . وكما أشرنا سابقاً أن معظم النواقل تحمل صفة مميزة مثل مقاومة المضادات الحياتية أو طفرة العوز الغذائي ، وهذه الصفات يمكن أن تستعمل بشكل مباشر في الكشف . كما يمكن استعمال الصفات الكيموحيوية أو الطرق المناعية . وتُعد طريقة تحليل الحامض النووي الـ DNA المُكَلون من الطرق المهمة في الكشف باستعمال مسابر الحامض النووي DNA probes والتي تستعمل في دراسة تواليات الاحماض الامينية في البروتينات الناتجة بشكل غير مباشر ، وأن استعمال هذه الطريقة يتطلب معرفة بعض الصفات عنها مثل أعطاء الاشارات ونوعية المادة الوراثية الـ DNA التي يتم تحضير لها المسبار وظروف التهجين . وتُفضل المسابر الكبيرة لإعطائها نتائج دقيقة كونها لا تتأثر بتغيير أحد النيوكليوتيدات في الـ DNA المُستهدف .علماً أن استعمال المسابر يرتبط مع تقنية تفاعل أنزيم البوليميريز المتسلسل PCR .
ويمكن تلخيص عملية التحوير الوراثي في النبات بالشكل التالي :
من البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* التي تسبب التورم في قمة النبات يتم إزالة المورثة المسؤولة عن إحداث الورم في النبات من البلازميد Ti لتصبح جاهزة لغرز أي مورثة مرغوبة بديلة ، ومن ثم ادخالها الى النبات المراد تحويره وراثياً وكما مبين في الخطوات التالية :



استغلال الإنسان للبلازميدات في إنتاج غذائه

اهتم الباحثون في بناء البلازميدات اللازمة لعملية التحول الوراثي في القمح السداسي المصري والمحتوية على أحد جينات تَحمُل الإجهاد البيئي وجين المقاومة لأحد مبيدات الأدغال. كما تم إنتاج نباتات من الموز معدلة وراثياً مقاومة لفايروس الـ (BBTV) Banana Bunchy Top Virus والذي يسبب مرض تورد القمة في الموز. وفايروس الموزائيك في الموز (B–CMV) Banana- Cucumber Mosaic Virus والذى يسبب مرض الموزائيك في الموز (BMD) Banana Mosaic Disease . ومقاومة تلك الفيروسات سواء كان باستخدام المبيدات لمقاومة الناقل الحشري أو استخدام تقنية زراعة الأنسجة لإنتاج نباتات خالية من الفايروسات لم تؤدى الى تحقيق النتائج المرجوة، لذا قام الباحثون بإنتاج نباتات موز معدلة وراثيا تحتوى على مورث الغلاف البروتيني للفيروسات السابقة، حيث تم جمع عينات من نباتات موز بها أعراض الاصابة بأمراض تورد القمة والتبرقش (الموزائيك)، ثم التأكد من وجود تلك الفيروسات باستخدام سيرم مضاد متخصص لهما باستخدام تقنية إليزا (ELISA) Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay ، من خلال الخطوات التالية :

+ عزل مورثات الغلاف البروتيني لكلا الفايروسين (BBTV & Banana-CMV) وذلك باستخدام إحدى تقنيات البيولوجيا الجزيئية وهى (PCR) Polymerase Chain Reaction و (RT-PCR) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction .

+ كلونة المورثات موضع الدراسة على حده في إحدى البلازميدات- وإدخالها في بكتريا القولون المعروفة باسم *E. coli* ، ثم عزل الحامض النووى للبلازميدات ودراسة التتابع للنيوكليوتيدات لتلك المورثات .

+ بعد التأكد من التعبير للمورثات في البكتريا، يتم عمل كلونة باستخدام ناقل التعبير النباتي حتى تكون المورثات قادرة على التعبير عن نفسها داخل خلايا نباتات الموز .

و للتأكد من نجاح إنتاج نباتات معدلة وراثيا لا بد من اتباع عدة مراحل وكما يأتي :

- تأسيس نظام التحول الوراثي .
- إدخال المورثات وأقلمتها تحت الظروف المحمية (البيوت الزجاجية أو البلاستيكية).
- الكشف عن المورثات في نباتات الموز المعدلة وراثيا .
- تقييم النباتات المعدلة وراثيا تحت الظروف الحقلية .

من جهة ثانية يُعد محصولي الحمص والعدس من المحاصيل المهمة على مستوى العالم كمصدر غذائي وبخاصة في الدول النامية ، إذ يعود ذلك الى محتواها العالي من البروتينات النباتية . وتشكل نباتات الأدغال الضارة إحدى أهم الإجهادات الإحيائية التي يمكن أن تهدد زراعة هذه

المحاصيل في حال عدم مكافحتها أو إدارتها بشكل جيد . ويعود ذلك الى القدرة التنافسية الضعيفة لكل من الحمص والعدس مع تلك الأدغال ، كما أن هناك عدداً محدوداً من مبيدات الأدغال التي يمكن استخدامها على هذه المحاصيل مع الأخذ بعين الاعتبار التأثيرات السامة لأثرها المتبقي. لذلك دعت الحاجة لإنتاج نباتات بقولية معدلة وراثياً مقاومة لمبيد الأدغال ، إذ لم يتمكن مربي النبات من تحقيق النجاح في تطوير نباتات متحملة لمبيدات الأدغال من خلال التربية التقليدية، لهذا تم تطوير تقنيات مناسبة للتحوير الوراثي لكل من الحمص والعدس بواسطة الخلايا البكتيرية وما تملكه من نوعين من البلازميدات، ومن ثم إنتاج نباتات مقاومة لمبيد الأدغال.

المصادر

1- الاسعد، نور والخياط ، غسان حمادة و خنشور ، أنس والطاهر ، عبد الله وعبد القادر ، أحمد . 2010 .الكشف عن وجود منتجات معدلة وراثياً في الاسواق المحلية . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 26(2): 311- 326 .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

3- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

4- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

5 - خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة السابعة : الهندسة الوراثية في النبات

دور الهندسة الوراثية في المجال الزراعي

Genetic engineering role in the agricultural sector

تعتبر التقانات الحيوية وسيلة ذات إمكانات هائلة للتغلب على بعض العقبات التي تحول دون زيادة الإنتاج الزراعي، وهي تضيف طرائق جديدة للتسريع في تحسين النباتات. برزت التقانات الحيوية تاريخياً كظاهرة علمية وسياسية واقتصادية واجتماعية. فبعد مضي أكثر من عقد من الزمن على التطور التقني الهائل في كل أنحاء العالم حان الوقت للاستفادة من المساهمة الكبيرة للتقانات الحيوية والهندسة الوراثية، من أجل تحسين المحاصيل وسد ثغرات المعرفة العلمية والأجزاء المفقودة من التطور التقني. لذلك يتوجب على الحكومات أن تطور استراتيجيات وسياسات وأطر قانونية تدعم هدف إدخال التقانات الحيوية ضمن أبحاث زراعية قوية ومتطورة.

تُعد الهندسة الوراثية أول من عالج تحسين عملية التربية الوراثية بإدخال مورثات خاصة من المواد الوراثية أو مصادر أخرى إلى النباتات المرغوب تحسينها .ولكن ومن جهة ثانية لابد من الإشارة إلى أن مربي النبات والمزارعين منذ آلاف السنين قد استخدموا تقنيات التربية التقليدية لتعديل النباتات والحيوانات لتحسين الإنتاج الغذائي .فالشكل التقليدي للمعالجة الوراثية هو التربية الانتخابية الذي يجعل بالإمكان نقل الصفات المرغوبة مثل الغلة الأعلى من المحاصيل والحيوانات، ولكن حالياً تُكمل هذه الطرائق قليلة التكنولوجيا بالتعديل الوراثي، لا بل تستبدل بوسائل وطرائق معقدة للتقانات الحيوية الحديثة .فبإمكان الباحثين الآن أن يأخذوا مورثة واحدة من خلية نباتية أو حيوانية وإدخالها إلى صنف آخر لتعطيه الخاصة المرغوبة كالمقاومة للآفات والأمراض الخطرة .والنتيجة هي ما يسمى عموماً بالعضوية المعدلة وراثياً أو الكائن الحي المعدل وراثياً والذي ينتج عن استخدام التقانات الحيوية الحديثة . وعموماً، لم تدرك بعد بالكامل النتائج المفيدة للتقانات الحيوية وهي قد لا يستوعبها خيالنا الآن.

سنحاول أن نوضح بشكل جزئي مسارات الهندسة الوراثية في قطاعات المجال الزراعي الأتية :

أولاً- دور الهندسة الوراثية في المجال النباتي . Genetic engineering role in plant sector

تُعد هندسة النباتات وراثياً المسار المباشر الأكثر استخداماً في تحسين زراعة المحاصيل الذي يتم من خلال تغيير قواعد تركيبها الوراثي لجعلها تمتلك صفات جديدة لم تكن تمتلكها تلك النباتات وعلى وجه التحديد في كفاءة إنتاجها . إذ يبقى هنا الهدف التقليدي لإنتاج المحصول بدون تغيير ، لكن التغيير يحصل على المستوى النوعي والكمي نحو الأفضل والأكثر مع خفض التكاليف . فمن خلال استعمال أدوات التقانات الأحيائية يمكن تسريع العمل ومثال على ذلك عندما يقوم علماء تربية النبات بعملية التهجين التقليدي فأنهم يعملون على دمج التراكيب الوراثية للأبوين مما ينتج عنها عدد لا حصر له من التداخلات و الأنعزالات الوراثية وهذا سيجعلهم مضطرين الى أجراء سلسلة من التزاوج بين أفراد من تلك الأنعزالات تمتد لعدد غير معروف من السنين للحصول على نباتات تمتلك صفات مميزة ناتجة من توافقات وراثية . في حين يمكن للتقانات الحديثة اختصار ذلك عن طريق تحديد الجين المسؤول عن الصفة المرغوبة بدقة عالية ومن ثم أجراء عملية فصل هذا الجين وادخاله الى الخلية النباتية المستهدفة بطريقة الحقن ليتم الحصول على خلية متحولة يمكن تحفيزها على النمو ومن ثم إكثارها نسيجياً للحصول على نبات يحمل الجين المنقول . ويمكن أجراء الفحص للتأكد من قابلية إظهار الفعل الجيني خاصة الكشف عن الأحماض الأمينية الأساسية . إن نجاح العمل يتوقف على قدرة العاملين في هذا المضمار على التوقع في اختيار النبات الذي يمكن هندسته وراثياً وفي ذات الوقت هو من النباتات المهمة اقتصادياً . فقد بدأت الهندسة الوراثية بنقل جينات مقاومة مبيدات الأدغال الى النباتات الاقتصادية وجينات تركيب البروتينات التي تخزنها النباتات وجينات تخزين الزيوت وجينات خزن المواد النشوية وغيرها .فقد حقق الباحثون إنتاج نباتات مقاومة لمبيد الأدغال Glyphosate الذي يباع تحت أسم تجاري Round up كمبيد غير تخصصي يقضي على جميع أنواع النباتات مما يوجب الحذر عند استخدامه في مكافحة الأدغال في الأراضي المزروعة أو استخدامه قبل زراعة المحاصيل الاقتصادية مما يوجب تأخير موعد الزراعة وهذا سيؤدي الى انخفاض في الحاصل ولتجنب مثل تلك الأضرار نجح الباحثون في عزل جين مقاومة مادة ال Glyphosate وتم نقله الى نباتات القطن وفول الصويا والطماطة بوساطة بكتريا *Salmonella typhimurinm* . وفي مجال البروتينات تم عزل جين يعمل على أنتاج بروتين غني بالكبريت (يحوي على الأحماض الأمينية التي تحوي على الكبريت مثل ال Methionine و Cysteine وبمستويات أعلى مما تحتويه

البروتينات في البقوليات وفول الصويا وبعد أن أجريت له عملية كلونة للجين تم نقله الى أشجار الجوز البرازيلي ، ويحاول الباحثون في الوقت الحاضر على نقل هذا الجين الى النباتات البقولية وفول الصويا في محاولة لإنتاج غذاء كامل المحتوى من الأحماض الأمينية الأساسية التي تفتقر لها النباتات البقولية العادية . إذ تمكن العلماء من تصنيع قطعة من الحامض DNA مشابهه لمقطع البروتين تم استخدامها للتعرف على الجين الذي يتكون في أشجار الجوز البرازيلي وأطلق عليها أسم Prob . وقد تم نقل ذلك الجين الى الخميرة Yeast فأصبحت الخلايا الجديدة المحورة وراثياً من الخميرة تنتج بروتين ذا محتوى عالي من الكبريت .أما في مجال التسميد والعمل على التقليل من استخدام الأسمدة الكيميائية والحد من أضرارها الصحية وأثارها على البيئة كما في تملح الترب وتلويث المياه . فقد تمكن العلماء من عزل جينات بعض أنواع البكتريا التي تتواجد على جذور النباتات البقولية والتي تمتلك أنزيمات قادرة على تحويل صورة النتروجين الجزيئي للهواء الجوي الى الصورة الكيميائية في خلاياها بعملية يطلق عليها تثبيت النتروجين Nitrogen fixation وبذلك يتمكن النبات من الاستفادة من النتروجين الجوي دون الحاجة الى التسميد الكيميائي أو التقليل من ذلك الاعتماد . وتجرى الأن محاولات لزيادة كفاءة النباتات في ناتج صافي البناء الضوئي ، أو جعل النباتات بمواصفات تصبح فيه مصدر وقود عالي الطاقة ، أو لزيادة إنتاجه من المطاط وغيرها من الأهداف . ومع ذلك تُعد الهندسة الوراثية النباتية متخلفة إذا ما قورنت بما حصل من تقدم على مستوى الخلايا الحيوانية أو خلايا الكائنات بدائية النواة وذلك للأسباب التالية :-

1- احتواء الخلية النباتية على جدار يحتوي السليلوز الذي يعمل على إعاقة مرور جزيئة الحامض النووي DNA .

2- لا يمكن إنتاج النباتات ألا في بيئتها الطبيعية ، بينما يمكن إنتاج الخلايا الحيوانية وخلايا بدائية النواة تحت ظروف مسيطر عليها مما يمكن معه مضاعفة الإنتاج . من ذلك يُعد العمل في مجال النبات على قدر كبير من الصعوبات والتي من بينها تلك الصعوبات التي تتعلق بالحصول على أنظمة نواقل تعمل على إيصال الحامض النووي المحول Transfer-DNA (T-DNA) الى أنوية خلايا النبات والعمل على إدماجه بصورة صحيحة وليس بمواقع عشوائية مما يتطلب في مثل هذه الحالة معرفة تأثير موقع الاندماج ونمط اندماج قطعة الحامض النووي المُحَول T-DNA، و تأثير الكروماتين والبيئة الكروموسومية التي يمكن أن ترفض الجين الجديد ، و كفاءة عمليات الاستنساخ وتأثير الممهدات والعناصر المشجعة ، فضلاً عن معرفة عمليات أسكات الجينات Gene silencing. ولتحقيق ذلك تستخدم قطع من الحامض النووي DNA يطلق عليها (Matrix Attachment Regions (MARs والتي تحتوي على تواليات من الحامض النووي على شكل قطع من T-DNA يتم فصلها من الكروماتين الملفوف تحوي على الجين المطلوب وقد تحوي هذه القطع على المشجعات . كما توجد طريقة أخرى يمكن من خلالها التخلص من أسكات التعبير عن الجينات وذلك باستعمال عناصر مضادة لعملية الأسكات Anti-silencing إذ أن جينات هذه العناصر توجد في بعض الفايروسات النباتية من نوع RNA أو DNA التي تستخدمها كوسيلة دفاعية عندما تغزو خلايا النباتات .

أما في الحالة التي يتطلب فيها التعبير عن الجينات بشكل مؤقت فيمكن استعمال أنظمة لا تعمل على اندماج الحامض النووي الُمحَول في الجينوم للخلية المستهدفة وإنما فقط تعمل على نقل البروتينات وليس الجينات . أو يتم باستعمال بكتريا Agrobacterium كفؤة في نقل موادها الى نواة خلية العائل دون اتمام عملية الاندماج .

مما سبق ذكره نستنتج أن تقانات نقل الجين هي مفتاح للعديد من تطبيقات التقانات الحياتية وأن العمل الجوهري في الهندسة الوراثية يكمن في القدرة على التعرف على الجينات المتخصصة كدليل داخلي لوجود صفة مرغوبة في كائن حي ما ، ليتم بعد ذلك عزل الجين ودراسة تنظيمه ووظائفه ومن ثم العمل على تحوير ذلك الجين وإعادة إنتاجه في العائل الطبيعي له أو في كائن حي أخر .إن هذه التقانة هي القادرة على فتح أسرار العديد من أسباب الأمراض والمقاومة وتنظيم النمو والتطور أو معالجة فعل التداخل بين الخلايا أو فيما بين الكائنات الحية .

ثانياً- دور الهندسة الوراثية في مجال الإنتاج الحيواني . Genetic engineering role in the animal production sector

تُعد الحيوانات مستهلك نهائي وفي نفس الوقت هي مصدر مباشر للتغذية . ولا يخفى على أحد دورها في التجارب قبل أن يتم تطبيق أو استعمال مادة ما على الأنسان . تتميز الخلايا الحيوانية عن الخلايا النباتية بكونها لا تحوي على الجدار الخلوي وتون وحدة بناء النسيج أو العضو ، وتتأثر بالبيئة التي تعيش فيها .وقد أوجب تطور العلوم الحديثة استعمال الخلايا الحيوانية على شكل معلق خلوي Suspension of cells يمكن الحصول عليه من مصادر متعددة مثل الأنسجة الطلائية ، الأنسجة الرابطة ، الأنسجة العضلية ، الأنسجة العصبية فضلاً عن ذلك أنسجة الدم واللمف .

إن أغلب الخلايا الحيوانية عند تنميتها على الأوساط الغذائية المختبرية تحتاج الى مساند للنمو كما أنها تميل للنمو بشكل طبقة واحدة إذ يحصل لها تثبيط عند تلامسها مع بعضها البعض يؤدي الى توقف انقسام الخلايا كما يكون عمرها الزمني محدود إذ تبدء أعراض الشيخوخة بالظهور عليها ثم تموت . وتُعد الخلايا السرطانية مفضلة وذلك لسرعة نموها خاصة تلك التي تحوي على أربع نسخ من كل كروموسوم Hale cell وهذه الخلايا لا تعاني الشيخوخة مما يجعلها تعيش حياة طويلة ويمكن الحصول على هذا النوع من الخلايا وذلك بمعاملة الخلايا الطبيعية بالمواد التي تحثها للتحول أو أدخال فيروسات معينة الى تلك الخلايا مما يجعلها قادرة على النمو دون الحاجة الى مساند . إن أهمية الخلايا الحيوانية لعلم التقانات الحياتية يأتي من استخدامها في :-

1- إنتاج بعض الهرمونات مثل هرمون الأنسولين وهرمونات النمو المختلفة والهرمونات الجنسية .

2- إنتاج عوامل تخثر الدم وملحقاتها .

3- إنتاج اللمفوكينات والتي من أنواعها ما تعالج نقص المناعة (الأيدز) والسرطان .

4- إنتاج الأجسام المضادة كما في خلايا جلد الضفادع وكذلك إنتاج اللقاحات والتي يُراعى فيها أن تؤخذ الخلايا من حيوانات صحيحة لها عدد زوجي من الكروموسومات .إذ تتصف هذه الخلايا بحاجتها الى مساند لتنمو. وليس لها القدرة على حث الأورام الخبيثة . وذات عمر محدد .

5- لدراسة سمية بعض المواد التي يراد اختبارها بدلاً من استخدام الحيوانات .

6- إنتاج بشرة جلدية صناعية لعمليات الترقيع في حالات الحروق والجروح الكبيرة .

7- إنتاج المبيدات الحيوية للحشرات مما يخلص البيئة من مشاكل التلوث بالكيميائيات .

ويتم فصل الخلايا الحيوانية بعدد من الطرق والتي منها الطرق الأنزيمية التي تستخدم أنزيمات تعمل على تحلل المواد البروتينية الرابطة بين الخلايا ومن تلك الأنزيمات التربسين و البروتيز و الكولاجينيز وغيرها .والطرق الكيميائية والتي تستخدم مواد مثل ليمونات الصوديوم مع EDTA بدلاً من استخدام الأنزيمات .

ثالثاً- دور الهندسة الوراثية في مجال الأحياء الدقيقة . Genetic engineering role in micro-organisms sector

نتيجة لما تمتاز به الأحياء الدقيقة من خصائص شجعت العاملين في مجال الهندسة الوراثية على استغلالها لتلعب دور مهم وأساسي في الهندسة الوراثية . ومن المجالات التي أسهمت فيها الأحياء الدقيقة :

1- الزراعة : استخدمت الأحياء الدقيقة في تحضير المخصبات والمبيدات الحيوية وإنتاج الهرمونات والمواد المنظمة للنمو وتحضير العلف الحيواني .

2- الصناعات الغذائية : يُعد بعض الأحياء الدقيقة غذاء للأنسان مثل الفطريات الغذائية ، أو يدخل بعض منها في تحضير الأغذية كالخمائر ومواد النكهة والمطيبات .

3- الطب و صناعة المواد الصيدلانية : تشترك الأحياء الدقيقة في إنتاج المضادات الحيوية ومختلف الستيرويدات والقلويدات والهرمونات والأنزيمات واللقاحات الوقائية .

4- الصناعات الكيميائية : تستخدم الأحياء الدقيقة في إنتاج الأحماض العضوية والسكريات المكوثرة والكحولات ومواد تصنيع الجلود وصناعة الألياف الصناعية ومساحيق التنظيف .

5- التعدين وصناعة النفط : تستخدم الأحياء الدقيقة لإنتاج المستحلبات الحيوية التي تسهل استخلاص النفط .

6- البيئة : تسهم الأحياء الدقيقة في تحسين البيئة في العديد من أدوارها مثل اكمال دورة عناصر الكاربون والنتروجين وكذلك معاملة الفضلات وتحويلها الى حالة يمكن الاستفادة منها مع التقليل من أضرارها .

أما طرق عزل الأحياء الدقيقة فيختلف بحسب البيئة التي تتواجد فيها مع التأكيد على الاهتمام بعزل الأحياء الدقيقة ذات الأهمية الاقتصادية والإنتاجية ، وتُعد البيئات المتطرفة مثل البحار والصحاري والنباتات والحيوانات مواقع جيدة في الحصول على أحياء دقيقة ذات مواصفات خاصة . بصورة عامة تسلسل مواقع العزل حسب الأهمية وفق التالي :-

1- التربة : إذ تشكل أكبر مخزن للأحياء الدقيقة ومصدر جيد للعزل والتنقية .

2- المياه : تأتي بالمرتبة الثانية .

3- المواد النباتية :

4- المخلفات السائلة والصلبة للمجاري وفضلات الحيوانات .

5- الأغذية والأطعمة التالفة بفعل الأحياء الدقيقة .

استخلاص الحامض النووي من النباتات

طبعاً في علوم التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية ، كل العمل والتحليلات يتم تطبيقها على الحمض النووي DNA ، وهي المادة الموجودة في الخلية الحية والتي تتحكم بعملية نمو وتغيير خصائص الكائنات الحية (نبات أو إنسان أو حيوان أو حتى الكائنات الدقيقة).كما أن الحمض النووي DNA يستخدم أيضاً في الاختبارات التي سيتم من خلالها تحديد المجرمين عند حدوث الجرائم ، كما يمكن استخدامه لتحديد صفة الأبوة أو البنوة أو نفيهما ، وكذلك تحديد هوية الأشخاص ، وأهم من هذا كله ، التلاعب بالأشكال وتغيير الخصائص عن طريق الهندسة الوراثية .

<u>الأحمـــــــــــاض النووية Nucleic Acid</u>

الأحماض النووية هي عبارة عن جزيئات جسيمة توجد في جميع الخلايا الحية في صورة طليقة أو متحدة مع البروتين ، وبدأ علماء (الكيمياء الحيوية) أبحاثهم على الأحماض النووية منذ حوالي مائة عام مضت حين استطاعوا فصلها من انوية الخلايا فالأحماض النووية توجد في كل الخلايا الحية حيث أنها ليست فقط مسؤولة عن حمل وانتقال التعليمات الجينية (الصفات الوراثية) ولكنها تتحكم أيضاً في ترجمة هذه التعليمات عند تكوين البروتينات المختلفة بالخلايا وذلك بتحكمها في ترتيب وتتابع الأحماض الأمينية لكل بروتين يتكون بكل خلية والأحماض النووية لها وزن جزيئي مرتفع وهي عبارة عن عديد نيوكلتيد Poly-nucleotides وحداتها البنائية هي النيوكلتيدات. وقد تم أجراء الدراسات الكيميائية في بادئ الأمر على الأحماض النووية من مصدرين : أحدهما الخميرة، ووجد أنها تحتوي على سكر ريبوز ولذلك سميت بأحماض Ribonucleic Acid (RNA) والثاني من الغدة التيموسية بالعجول ووجد أنها تحتوي على سكر دي – أوكسي – ريبوز ، ولذلك سميت بأحماضDeoxyribonucleic Acid (DNA) مما أدى إلى الاعتقاد لبعض الوقت بأن الحمض الأول خاص بالنباتات والثاني خاص بالحيوانات ، ثم اتضح أن (DNA) موجود بالنواة وأن(RNA) موجود في السيتوبلازم. ونتيجة للدراسات الحديثة بطرق التحليل المحسنة أمكن العثور على كميات صغيرة من (DNA) في المايتوكوندريات و البلاستيدات الخضراء كما أمكن التعرف على (RNA) في النواة متصلاً بالنوية.

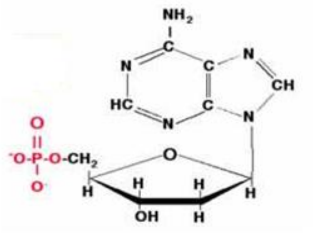
<u>أنواع الأحمـــــاض النووية :</u>

يوجد نوعين من الأحماض النووية كما تقدم هما :

أ. الحامض الرايبونيوكلتيدي Ribonucleic Acid (RNA)

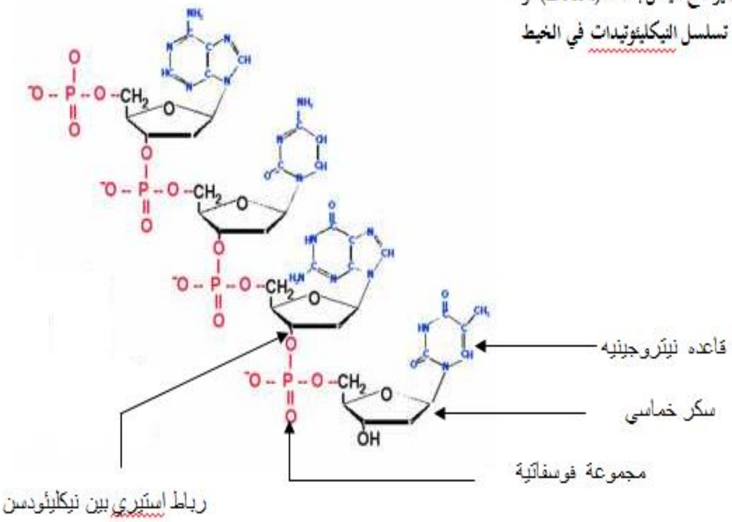
ب. الحامض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي Deoxyribonucleic Acid (DNA)

ويتكون البناء الأساسي لهذه الأحماض من سلاسل بها جزيئات حمض فسفوريك وسكر بالتبادل ويتصل بكل جزيء من جزيئات السكر قاعدة نيتروجينية إما من نوع البيورين أو البيرميدين ، والسكر الموجود بجزيء الحامض الرايبونيوكلتيدي (RNA) هو سكر الرايبوز بينما في جزيء الحامض الديؤكسي رايبونيوكلتيدي (DNA) فهو سكر الديؤكسي رايبوز....شكل (1) و شكل (2)



شكل (1) يوضح هيكل بناء الـ DNA من حامض الفوسفوريك والسكر والقاعدة النيتروجينية .

شكل (2) يوضح هيكل بناء الـ (DNA) أو الـ(RNA): تسلسل النيكليوتيدات في الخيط

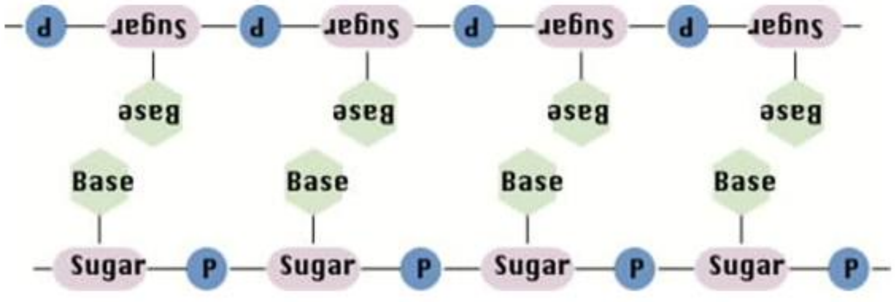


ويتكون الحامض النووي من ثلاثة أنوع من المركبات كما ذكرنا وهي :

× سكر خماسي الكربون وهو سكر الرايبوز أو دي – أوكسي – رايبوز.

× قواعد نيتروجينية تتبع البيورينات أو البيرميدينات .

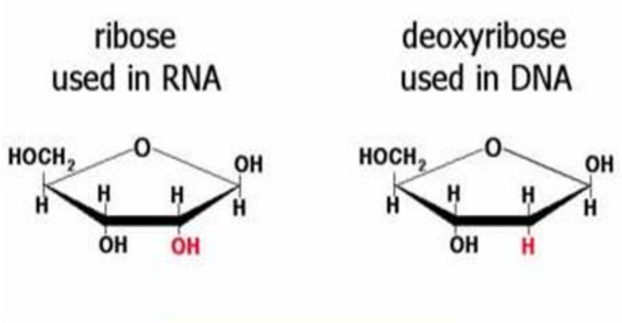
× حامض الفسفوريك . وكما موضح في شكل(3) .



شكل(3) : بناء الأحماض النووية

<u>**السكر الخماسي Pentose Sugar**</u>

تتكون الاحماض النووية من نوعين من السكر الخماسي ، أحدهما هو رايبوز ويوجد في الـ RNA ، والثاني ديؤكسي رايبوز ويوجد في الـ DNA ، شكل (4). ومن الخصائص الهامة للسكر الخماسي هو قدرة المجموعات الهيدروكسيلية (OH) على تكوين خلات مع حامض الفسفوريك .



شكل (4) سكر الديؤكسي رايبوز وسكر الرايبوز

البيورينات والبيرميدينات Pruines & Pyrimidine

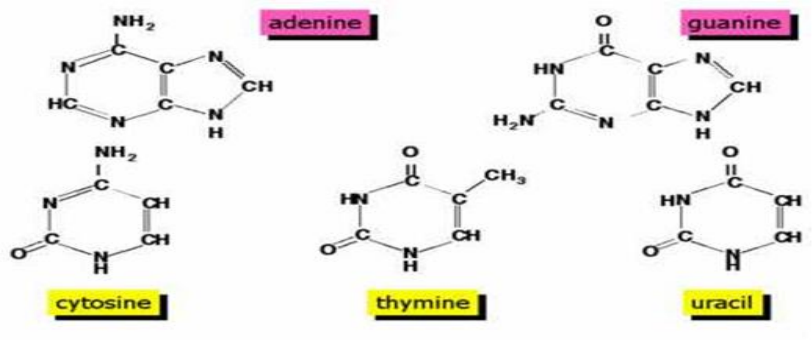
1/ قواعد بيورينية :

(أ) أدينين Adenine . (ب) گوانين Guanine .

2 / قواعد بيرميدينية : وهذه القواعد مشتقة من البيرميدين بإستبدال ذرات الهيدروجين

(أ) سايتوزين Cytosine . (ب) يوراسيل Uracil . (ج) ثايمين Thymine .

ويحتوي كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA على القاعدتين الآزوتيتين من البيورين وهما الأدينين Adenine والجوانين Guanine ونجد أيضاً أن كلاً من الحمضيين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نيتروجينيه من نوع البيرميدين وهي سايتوزين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النيتروجينيه الثانية من نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحمض النووي RNA على القاعدة النيتروجينيه يوراسيل Uracil يحتوي الحمض النووي DNA على القاعدة النيتروجينيه ثايمين Thymine شكل (5).

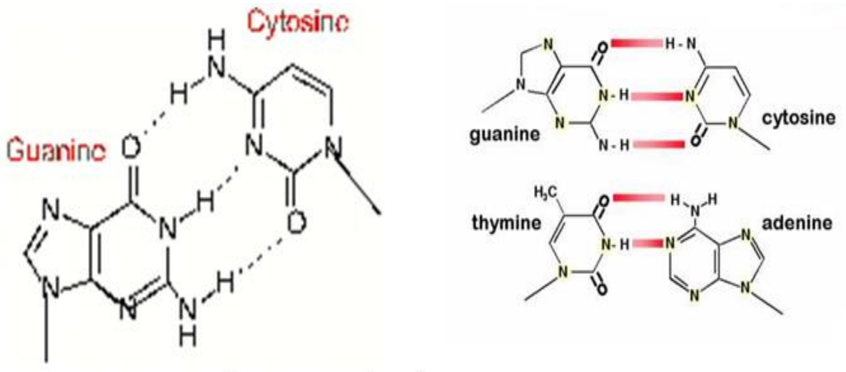


شكل (5): يوضح كل من القواعد النيتروجينية (البيورينية والبيرميدينية)

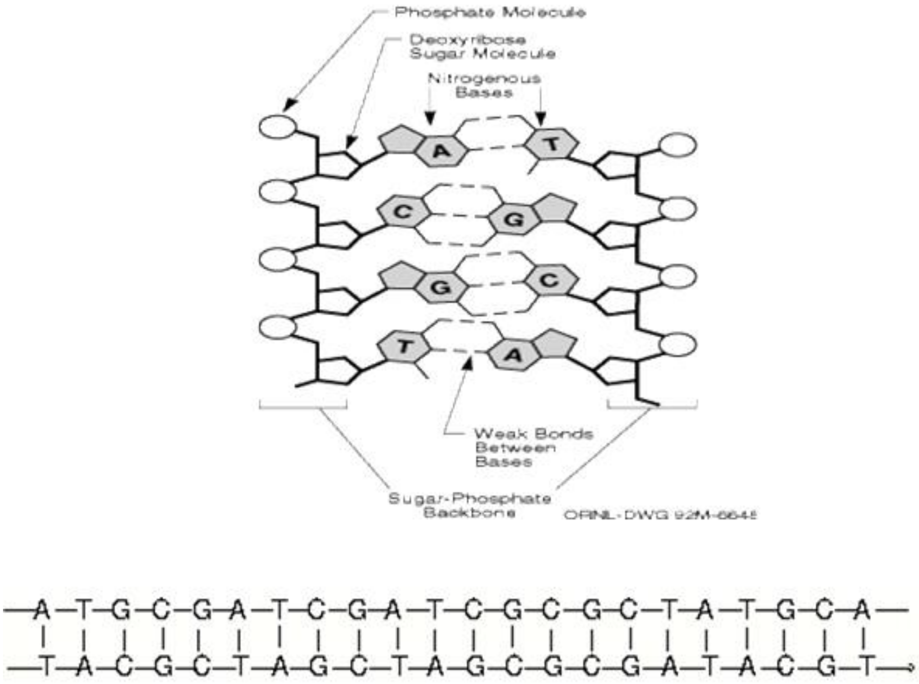
مجموعة الفوسفات Phosphate Group

تربط مجموعة الفوسفات بين مجموعات السكر الخماسية في سلاسل كل من الحامضين (DNA) و (RNA) . ويلاحظ أن السلسلتين المكونتين للشكل الحلزوني في الحامض النووي DNA متوازيتان ولكنهما معكوستان (Antiparallel) والقواعد النيتروجينية بهما مزدوجة (Paired) بنظام A مع T و G مع C وهذا التخصص في الازدواج يعتمد على الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية

فنجد ثلاثة روابط هيدروجينية لكل زوج G - C ورابطتين هيدروجينيتين لكل زوج A – T . انظر شكل (6) وترتيب تسلسل القواعد النيتروجينية شكل (7) .



شكل (6) يوضح الروابط الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية



شكل (7) يوضح الترتيب الذي تسير عليه القواعد النيتروجينية

<u>الحامض النووي RNA:</u>

يكون الـ (RNA) بين 5 - 10% من الوزن الكلي للخلية ، وهناك 3 أنواع رئيسية من هذا الحامض النووي وهي :

+ RNA الرسول (Messenger RNA) يشكل 5% من الحامض النووي الرايبوزي .

+ RNA الرايبوسومي (Ribosomal RNA) يشكل 80% من الحامض النووي الرايبوزي.

+ RNA الناقل (Transfer RNA) يشكل 15% من الحامض النووي الرايبوزي .

ولكل نوع من الأنواع الثلاثة وزن جزيئي وتركيب خاص به من القواعد النيتروجينية. ويحتوي كلاً من الحامضين النوويين DNA و RNA على القاعدتين النيتروجينيتين من البيورين وهما الأدينين Adenine والگوانين Guanine ونجد أيضاً أن كلاً من الحامضين النوويين DNA و RNA يحتوي على قاعدة نيتروجينيه من نوع البيرميدين وهي سايتوزين Cytosine ولكنهما يختلفان في القاعدة النيتروجينيه الثانية من

نوع البيرميدين فبينما يحتوي الحامض النووي RNA على القاعدة النيتروجينية يوراسيل Uracil يحتوي الحامض النووي DNA على القاعدة النيتروجينية ثايمين Thymine.

ونتيجة الدراسات العديدة على أحماض النيوكليك بالأنسجة المختلفة وفي الكائنات الحية المتنوعة اتضح أن كمية DNA الموجودة في نويات الأنسجة المختلفة بأي كائن حي تكون ثابتة ولكنها تختلف من كائن لآخر ، ولم يلاحظ استثناء في هذه القاعدة إلا في الخلايا الجنسية التي تكون فردية الكروموسومات وفي هذه الحالة نجد أن كمية DNA الموجودة بها تكون نصف الكمية الموجودة بالخلايا الجسمية ، وفي الخلايا المتعددة الكروموسومات نجد أن كمية DNA تزداد تبعاً لتضاعف العدد الكروموسومي. وعن طريق التحلل المائي واستخدام طرق الكروموتوغرافيا المختلفة أمكن فصل القواعد النيتروجينية وتقدير كمية كل منهما ، كما استخدمت طرق أخرى، مثل تحليل منحنى الانصهار وكثافة الطفو في تقدير كمية الگوانين والسيتوزين معاً ومن هذه الدراسات أمكن تقدير كمية كل من القواعد النيتروجينية في عدد كبير من أحماض الديؤكسي ريبو نيو كليك الموجودة بالكائنات الحية المختلفة.

تتابع النيوكليتيدات:

تعتبر طرق تقدير أنواع النيوكليتيدات وكمية كل منها في حامض DNA أسهل بكثير من طرق معرفة تتابع النيوكليتيدات أي ترتيبها في جزئ DNA ويحاول كثير من الباحثين التوصل إلى معرفة تتابع النيوكلتيدات في أحماض النيوكليك المختلفة لما لذلك من أهمية فائقة في فهم الكثير من طرق تنظيم العمليات الحيوية وما يؤدي ذلك إلى إمكان التحكم فيها أو تغييرها. وقد أستخدم في ذلك مجموعة من طرق التحلل المائي الحامضي والقاعدي وكذلك التحليل المائي باستخدام أنزيمات مختلفة التخصص ، ومن أهم الطرق المستخدمة في الوقت الحاضر طرق تعتمد على تحليل الجار الملاصق وطرق تعتمد على التهجين مما يوضح البناء الأولي للجزيء.

كيفية استخلاص الحامض النووي

إن الحامض النووي الموجود في الخلية يتواجد بشكل لا يسمح باستخدامه مباشرة ، ولهذا يتطلب **منا** استخلاص الحامض **النووي واستخراجه من الخلية الحية** Isolation، ومن **ثم تنقيته** Purification ثم بعد ذلك خزنه في بيئة مختبرية مناسبة للاستخدام المستقبلي . تجدر الإشارة هنا إلى أن الحامض النووي القديم المستخرج من الخلية قبل مدة طويلة له قدرة وفعالية في الغالب أفضل من ذلك الحامض النووي المستخلص من الخلية الحية حديثاً . في كل الأحوال ، الحامض النووي في الخلية لا يوجد بشكل منفصل ولكنه يوجد داخل نواة الخلية ، وفي بعض الأحيان يوجد الحامض النووي داخل العضيات الموجودة خارج نواة الخلية (في السيتوبلازم)، وعملية استخراج الحامض النووي من الخلية عملية تتطلب استخدام الكثير من المواد الكيميائية لتحليل الأغشية المحيطة بالحامض النووي دون الإضرار بالحامض النووي نفسه. ربما يكون بروتوكول استخلاص الحامض **النووي من الخلايا ككل** ، أمراً مثيراً للاهتمام وممتع في نفس الوقت ، لأن العملية صعبة بعض الشيء وتستلزم على الأقل ساعتين من العمل المتواصل لاستخلاص كمية كبيرة من الحامض النووي. في بعض الأحيان يتطلب استخلاص الحامض **النووي من داخل الخلية ساعات وربما أيام** !! والسبب أننا عندما نريد كمية أكبر من الحامض النووي فلا بد أن نوفر بيئة مناسبة للخلية الحية للتكاثر ، ومن هذا المنطلق نحصل على كمية أعلى من الحامض النووي .

خواص الحامض النووي DNA

- تمتص القواعد النتروجينية (الأزوتية) من نوع البيورين والبيرميدين الموجودة في الأحماض النووية الأشعة الفوق بنفسجية بدرجة كبيرة عند موجة ذات طول 260 نانوميتر (260 nm) .
- عند تسخين الحامض النووي DNA المبلمر بدرجة كبيرة ببطء فان السلسلتين الحلزونيتين الشكل تبتعدان عن بعضهما وتسمى عملية الابتعاد هذه بعملية انفصال السلسلتين Melting. وبزيادة درجة الحرارة تزداد درجة الامتصاص النوعي ، وتسمى درجة الحرارة التي يحدث عندها الزيادة المفاجئة في الامتصاص للأشعة فوق البنفسجية بدرجة حرارة الانفصال(Melting temperature (Tm للحمض النووي ، ولكل نوع من انواع الحمض النووي DNA درجة Tm خاصة به .

- ويمكن فصل سلسلتي الحامض النووي DNA عن بعضهما إذا انخفض رقم pH المحلول عن 4 او اذا ارتفع عن 11 . حيث أن الأحماض النووية عبارة عن الكتروليتات عديدة (Polyelectrolytes) مع وجود شحنة سالبة واحدة لكل وحدة نيوكليوتيدية (هذه الشحنة ناتجة عن تأين الفوسفات ثنائي الاستر) في نطاق pH من 4 الى 11 .
- عند اعادة تبريد المحلول ببطء فانه يحدث اعادة لتكوين الشكل الحلزوني ذو السلستين مع امكانية حدوث تبادل بين السلاسل وتسمى هذه العملية Annealing .

الاهمية الحيوية للأحماض النووية

تمثل الاحماض النووية البنك المركزي الخلوي الذى يحتوى على جميع أسرار الصفات الوراثية وشفرات تكوين البروتين التي يؤدى وجودها الى ظهور الصفات كما يؤدى اختفاءها الى غياب الصفات أو ربما ظهور أمراض .

فصل الأحماض النووية Isolation Of Nucleic Acid

تعد عملية استخلاص الحامض النووي DNA من العمليات الضرورية للحصول عليه واستخدامه في الاختبارات الجزيئية والتحليلات الجنائية أو أي مصدر كان للاستخلاص سواءً كان بكتريا أو خلايا نباتية أو باقي الخلايا حقيقية النواة ، فان عملية الاستخلاص توفر ايضا ازالة الشوائب كالبروتينات والدهون وغيرها من الشوائب الكيميائية. ويمكن تلخيص خطوات الاستخلاص كالاتي :

1- تحليل الخلايا Cell lyses واخراج محتوياتها واذا كانت الخلايا محتوية على جدار كالخلايا النباتية فيجب تحطيم الجدار الخلوي اولا وعادة يتم ذلك بالتبريد الفائق (بواسطة النتروجين السائل بدرجة حرارة تقترب من - 190 م°).

2- تحليل الانوية (Nucli lyses) للخلايا حقيقية النواة.

3- اضافة محلل RNAase الذي يقوم بتحليل الحامض النووي الرايبوزي RNA (والذي يعتبر احد ملوثات الـ DNA والملوث الاخر هو البروتين).ويتم التخلص من البروتينات بواسطة الترسيب وفي هذه الخطوة يتم استخدام مذيبات عضوية ومحاليل منظمة (buffers) عالية التركيز بالأملاح.

4- تنقية الـ DNA من محاليل الخطوة 3 بواسطة الكحول ويستخدم الايثانول المبرد او الايزوبروبانول المبرد لكن الاخير يمتاز بترسيبه للسكريات مع الـ DNA في درجات الحرارة الواطئة.

5- وضع الـ DNA في محلول منظم buffer ملائم للحفاظ عليه ويوضع في درجة - 20 م°.

الانسجة النباتية

تطحن الأنسجة المراد استخلاص الأحماض النووية منها على درجة حرارة منخفضة (أقل من 40 درجة م) وذلك بعد إضافة محلول مائي للفينول المركز وسلفات دوديسيل الصوديوم Sodium dodecyl sulfate (أو أي مادة اخرى مناسبة لتقليل الجذب السطحي) إليها . بعد هذه المعاملة يتغير التركيب الطبيعي للبروتينات الموجودة بالأنسجة وتصبح غير ذائبة في المحلول المائي وتترسب بينما نجد أن الأحماض النووية تبقى ذائبة في المحلول المائي. ويترك المطحون المتجانس الناتج ينفصل إلى طبقتين سائلتين ويمكن الإسراع بفصل الطبقتين بإجراء عملية طرد مركزي على درجة حرارة منخفضة . حيث يتم بعدها فصل الطبقة العليا المائية (التي تحتوي على الأحماض النووية جميعها) عن الطبقة السفلى الأخرى الغنية بالفينول والتي يُستغنى عنها. يتم ترسب الأحماض النووية من الطبقة المائية المفصولة وذلك بإضافة كحول اثيلي اليها بعد ذلك يفصل الراسب المتكون بواسطة الطرد المركزي . وتتم عملية تنقية الأحماض النووية من الراسب بإذابته في الماء ثم إعادة ترسيبه بالكحول كما سبق وفصله بالطرد المركزي على صورة نقية.

يمكن بعد ذلك فصل كل من الحامضين النووين DNA و RNA كل على حدة إما بالمعاملة بإنزيم ريبونيوكليز (Ribonucleasa) وذلك لتكسير الحمض النووي RNA وتحويله إلى جزيئات صغيره ذائبة مع ترك الحمض النووي DNA كما هو بدون تأثر . أو بمعاملة الخليط بإنزيم ديؤكسي ريبونيوكليز (Deoxyribonuclease) حيث تتكسر جزيئات الحامض النووي DNA تاركاً الحامض النووي RNA بدون تأثر . وبعد التخلص من أحد الحامضين النوويين يضاف محلول مائي للفينول وذلك لترسيب وإزالة ما تبقى من بروتين ، ثم تفصل الطبقة

المائية المحتوية على الحامض النووي المراد الحصول عليه بالطرد المركزي . حيث يضاف لها بعد ذلك كحول الاثيل لترسيب الحمض النووي.

أن الحامض النووي DNA على صورته الطبيعية عبارة عن لولب حلزوني طويل لذلك فإن إضافة كحول الاثيل إليه ينتج عنه ترسيب DNA على هيئة راسب طويل ليفي يمكن الحصول عليه من المحلول بلفه حول محرك زجاجي حيث يوضع بعد ذلك في مذيب مناسب مثل الأسيتون لتجفيفه ، ويمكن إزالته جافاً عن المحرك الزجاجي ويحفظ جافاً في زجاجات على درجة حرارة – 20 درجة م .

يمثل الشكل في ادناه صورة الحامض النووي DNA موجوداً على هيئة مادة قطنية وهي الألاف من جزيئات الأحماض النووية نوع DNA ، جاهزة تماماً للخزن لاستخدامها في العديد من التطبيقات الخاصة بالهندسة الحيوية مثل : الأطعمة النباتية المعدلة وراثياً ، إنتاج الأدوية الحيوية ، تسريع نمو النباتات، زيادة مقاومة النباتات للأمراض والكثير من التطبيقات العلمية المفيدة .

المصادر

1- الاسعد، نور والخياط ، غسان حمادة و خنشور ، أنس والطاهر ، عبد الله وعبد القادر ، أحمد . 2010 .الكشف عن وجود منتجات معدلة وراثياً في الاسواق المحلية . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 26(2): 311- 326 .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

3- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

4- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

5- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الثامنة : تطور تقنيات الهندسة الوراثية / التحول الوراثي في النبات وتطبيقاته .

بعد التطور السريع للتقنيات الحديثة لعلم الهندسة الوراثية تغير الكثير من المفاهيم فأصبح من السهل صنع نسخ عديدة من المورث أو مقطع محدد من الحامض النووي DNA ، كما أمكن التعرف على تسلسل الاحماض النووية واستكشاف المورثات الموجودة على الكروموسومات (الصبغيات) ، واستطاعوا تغييرها أو تعديلها بالشكل المطلوب ، فضلاً عن اعادة زراعة المورثات المعدلة في الخلية ضمن الكروموسوم المستهدف .وأمكن أيضاً أنتاج كميات كبيرة من البروتينات كالهرمونات واللقاحات المختلفة والتي كان سابقاً يتم إنتاجها من الجثث الميتة أو يتم استخلاصها من الحيوانات ، وهما مصدران لا يخلوان من مخاطر انتقال ما تحمله تلك المصادر الى الانسان . وقد أطلق على عملية نسخ أو تعديل ونقل المورثات أسم الهندسة الوراثية Genetic Engineering وهو أسم عام لا يحدد فكرة أو تقنية محددة ، لكنه يعني بكل ما يتم القيام به من تغيير أو تعديل للمادة الوراثية . في حين تعني الهندسة الوراثية بمفهومها الضيق نقل المورثات بين الكائنات الحية بحيث يُعبر المورث المنقول عن نفسه في الكائن الجديد ، كما في نقل المورث من البكتريا الى النبات . وتتضمن التقنيات التي تتفرع من هذا العلم الاتي :

1- تقنية قص أو قطع الحامض النووي Cleavage of DNA .

2- تقنية فصل قطع DNA على الهلام بطريقة الترحيل الكهربائي Gel Electrophoresis .

3- تقنية معرفة تسلسل الحامض النووي DNA Sequencing .

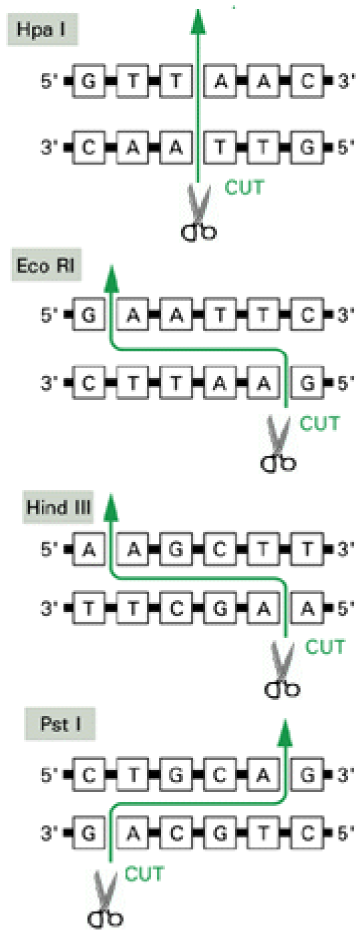
4- تقنية تهجين الحامض النووي Nucleic acid Hybridization .

5- تقنية استنساخ الحامض النووي DNA Cloning .

6- تقنية هندسة أو تعديل الحامض النووي DNA Engineering .

تقنية قص أو قطع الحامض النووي Cleavage of DNA .

تتواجد البروتينات في داخل الخلية على شكل قطع منفصلة عن بعضها البعض وهذا سهل عملية فصلها بطرق فنية مناسبة . غير أن المورثات تتواجد على الصبغيات على شكل وحدات متصلة ببعضها البعض وبشكل متسلسل ، وهذا الترابط بين المورثات جعل عملية فصل واستخلاص مورث محدد من بين مورثات عديدة غاية في الصعوبة ، إلا أن اكتشاف الانزيمات القاطعة Restriction Nucleases بعد عام 1970 ساعد في عملية استخلاص المورثات المحددة وقطع الحامض النووي المختلفة . فقد تم عزل انزيمات من البكتريا *Heamophilus influenz* لها القدرة على تقطيع DNA بطريقة غير عشوائية .



الانزيمات القاطعة Restriction Nucleases

لكل كائن حي طرق دفاعية مختلفة تحميه من الاعداء في البيئة التي يعيش فيها ، والبكتريا أحد هذه الكائنات الحية وأعدائها كثر ، ومن أهم أعدائها العاثيات Viruses المختلفة ، وقد لوحظ أن البكتريا تنتج انزيمات مختلفة مهمتها تدمير العاثيات ومن تلك الانزيمات ما يطلق عليه Restriction Nucleases التي تقوم بقطع الحامض النووي DNA للعاثي وتبطل مفعوله ، وقد تم اكتشاف هذه الانزيمات لأول مرة عام 1962من قبل العالم Arber حيث قام بفصلها وتنقيتها ، بعد ذلك تم استعمالها في تقطيع الـ DNA الى مقاطع ثم أعُيد تجميعها بشكل تتابعات مرغوبة . طبقت هذه الطريقة في قطع واعادة ربط مقاطع كبيرة من مورثات الكائن نفسه أو مورثات لكائنات مختلفة . وفي عام 1974تم استخدام هذا الاسلوب في نقل مورثات من ضفدع الى بكتريا القولون ، واطلق على هذه التقنية أسم استزراع الـ DNA أو الهندسة الوراثية .

إن فهم الالية Mechanism المعقدة التي يُنظم بها تعبير المورث في الكائنات قدمت اساليب عملية وفتحت أفاق تطبيقية على نطاق تجاري واسع ، لإنتاج الهرمونات والبروتينات والامصال بكميات وفيرة وكلف زهيدة، وزادت من امكانيات تداول الخصائص الوراثية للنباتات والحيوانات والاحياء الدقيقة. وكما نعرف أن المادة الوراثية DNA توجد بشكل طبيعي في البكتريا كما هو الحال في العاثيات والكثير من الكائنات الحية ، فلماذا انزيمات القطع لا تشكل خطر على البكتريا نفسها في قص الـ DNA الخاص بها ؟ إن السر في ذلك هو قيام البكتريا بتحوير أجزاء من الـ DNA الخاص بها عن طريق إضافة مجموعة مثيل Methyl الى بعض القواعد النيتروجينية في الحامض النووي من نوع الادنين والسيتوسين Methylation at an Adenine or a Cytosine residue ، فلا يستطيع الانزيم القاطع من قص الحامض النووي الخاص بالبكتريا . فضلاً عن احتواء البكتريا على مورثات تنتج ما يقاوم التقييد ، حيث يُعتقد أن لهذا التقييد والتحوير وظيفة دفاعية تحمي البكتريا من الـ DNA الغريب الذي يدخل الى خلاياها كما هي الحالة عند إصابتها بالعاثيات ، وذلك من خلال فعاليات انزيمات التقييد

لتحطيم الـ DNA الغريب أو تحوير الـ DNA الخاص بها بإضافة مجموعة المثيل . ويوجد حالياً أكثر من 100نوع من هذه الانزيمات ، وتقسم الى نوعين رئيسيين :

الأول : يقص شريط الـ DNA المزدوج بشكل رأسي مستقيم Blunt ends مثل الانزيم الذي يُعرف بـ Hpa I المستخلص من بكتريا *Hemophilus parainfluenzae* . وهو من الانزيمات التي تقطع بشكل رأسي مستقيم .

الثاني : يقص شريط الـ DNA المزدوج بشكل متعرج (Staggered cut) مما يجعل طرفي الـ DNA المقطوع قابل للارتباط بقطعة غريبة من الـ DNA ، مثل الانزيم (Eco R I) المستخلص من بكتريا القولون *Escherichia coli* .

لقد ساعد استعمال الانزيمات القاطعة على إنتاج قطع مهجنة من الحامض النووي Recombinant DNA مكونة من قطعتين مختلفتين من الـ DNA .

وهنا السؤال الذي يُطرح هو : كيف يتعرف الانزيم القاطع على المكان المفترض أن يحدث القطع فيه ؟

إن كل انزيم قاطع يعتبر مقص خاص لقطع الـ DNA في نقطة محددة يتعرف عليها من خلال تسلسل القواعد النتروجينية للقطعة ، إذ كل انزيم قاطع يميز تسلسل محدد . مثلاً الانزيم القاطع HpaI يقطع عندما يجد 6 من الاحماض النووية في التسلسل التالي (GTTAAC) ، بينما الانزيم القاطع Eco RI يقطع عندما يجد 6 من الاحماض النووية في التسلسل (GAATTC) . وفيما يلي بعض مواقع القطع لبعض الانزيمات القاطعة :

المقطع الذي يميز الانزيم	البكتريا مصدر الانزيم	الانزيم القاطع
GGATCC	*Bacillus amyloliquefaciens*	BamHI
GAATTC	*Escherichia coli*	EcoRI
GGCC	*Haemophilus aegyptius*	HaeIII
AAGCTT	*Haemophilus influenzae*	HindIII
GTTAAC	*Haemophilus parainfluenzae*	HpaI
CCGG	*Haemophilus parainfluenzae*	HpaII
GATC	*Moraxella bovis*	MboI
GCGGCCGC	*Nocardia otitidis-caviarum*	NotI
TCGA	*Thermus aquaticus*	TaqI

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة التاسعة : التحوير الوراثي باستخدام بكتريا The genetics convert by *Agrobacterium tumefaciens*

لقد تطورت هذه تقنية بصورة سريعة جداً وذلك نتيجة للتطور السريع في علم الاحياء الجزيئية للنبات فضلاً عما شهده هذا المجال من تطور تقنيات الهندسة الوراثية وعدد كبير من المجالات العلمية في حقل الاختصاص .وكما ذكرنا سابقاً عن ما حققته الهندسة الوراثية في المجال النباتي إذ يُعد العمل في مجال النبات على قدر كبير من الصعوبات ، والتي من بينها تلك الصعوبات التي تتعلق بالحصول على أنظمة نواقل تعمل على إيصال الحامض النووي المحول Transfer-DNA (T-DNA) الى انوية خلايا النبات والعمل على إدماجه بصورة صحيحة وليس بمواقع عشوائية مما يتطلب في مثل هذه الحالة **معرفة تأثير موقع الاندماج ونمط اندماج قطعة الحامض النووي المُحَول T-DNA**، و **تأثير الكروماتين والبيئة الكروموسومية التي يمكن أن ترفض المورث الجديد** ، و **كفاءة عمليات الاستنساخ وتأثير الممهدات والعناصر المشجعة** ، فضلاً عن **معرفة عمليات اسكات المورثات Gene silencing**. ولتحقيق ذلك تستخدم قطع من الحامض النووي DNA يطلق عليها (Matrix Attachment Regions (MARs والتي تحتوي على تواليات من الحامض النووي على شكل قطع من T-DNA يتم فصلها من الكروماتين الملفوف تحوي على المورث المطلوب وقد تحوي هذه القطع على المشجعات . كما توجد طريقة أخرى يمكن من خلالها التخلص من اسكات التعبير عن المورثات وذلك باستعمال عناصر مضادة لعملية الاسكات Anti-silencing إذ أن مورثات هذه العناصر توجد في بعض الفايروسات النباتية من نوع RNA أو DNA التي تستخدمها كوسيلة دفاعية عندما تغزو خلايا النباتات .

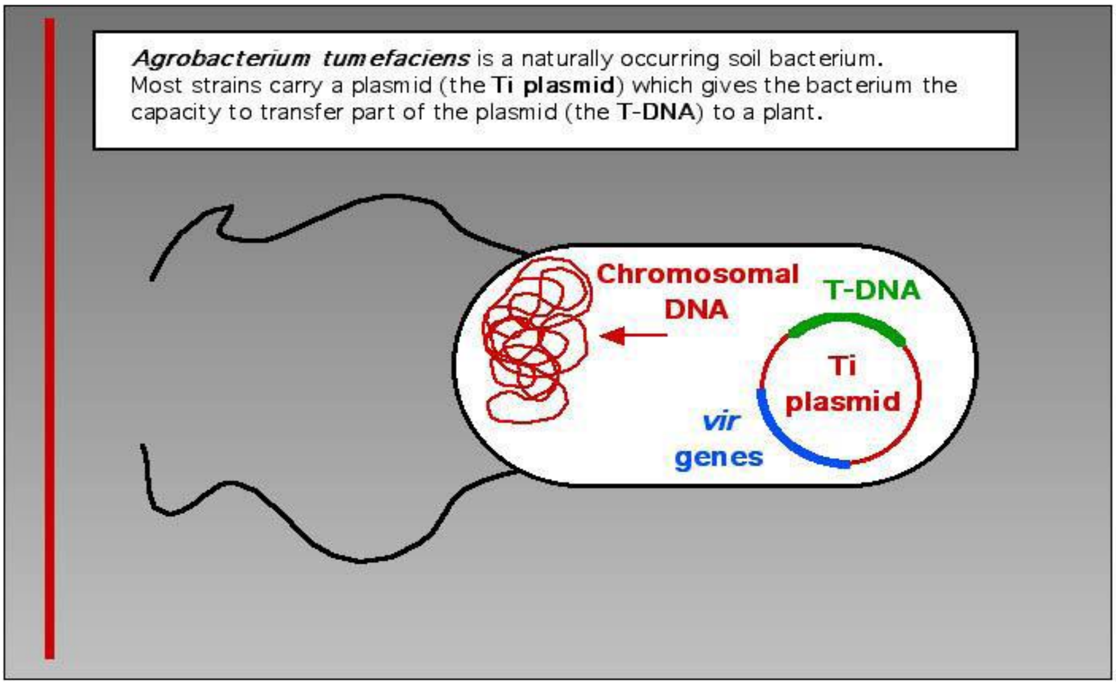
أما في الحالة التي يتطلب فيها التعبير عن المورثات بشكل مؤقت فيمكن استعمال أنظمة لا تعمل على اندماج الحامض النووي الُمحَول في الجينوم للخلية المستهدفة وإنما فقط تعمل على نقل البروتينات وليس المورثات . أو يتم باستعمال بكتريا Agrobacterium كفوْة في نقل موادها الى نواة خلية العائل دون اتمام عملية الاندماج .

مما سبق ذكره نستنتج أن تقنيات نقل المورث هي مفتاح للعديد من تطبيقات التقنيات الحياتية وأن العمل الجوهري في الهندسة الوراثية يكمن في القدرة على التعرف على المورثات المتخصصة كدليل داخلي لوجود صفة مرغوبة في كائن حي ما ، ليتم بعد ذلك عزل المورث ودراسة تنظيمه ووظائفه ومن ثم العمل على تحوير ذلك المورث وإعادة إنتاجه في العائل الطبيعي له أو في كائن حي أخر أو التحكم في مكان تعبير المورثات المنقولة مثل التعبير في الاوراق وليس في الثمار. فهذه التقانة هي القادرة على فتح أسرار العديد من أسباب الأمراض والمقاومة وتنظيم النمو والتطور أو معالجة فعل التداخل بين الخلايا أو فيما بين الكائنات الحية وتسريع برامج التربية في النباتات .

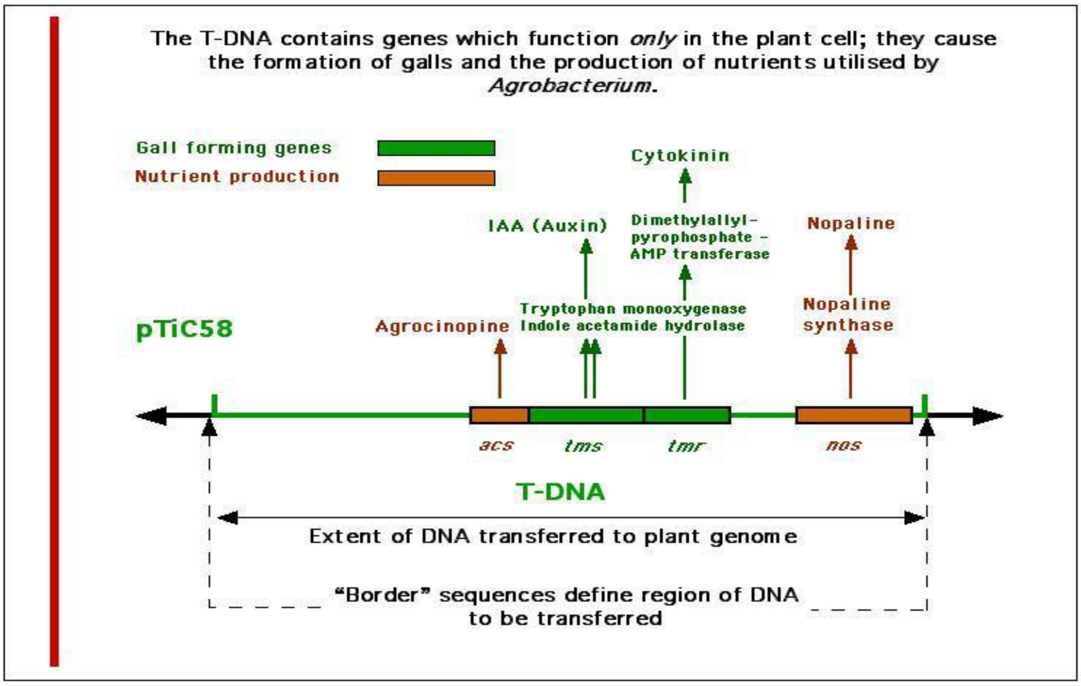
طريقة ادخال المورثات الى النبات باستعمال بكتريا *Agrobacterium tumefaciens*

الـ Agrobacterium نوع من البكتريا التي تعيش في التربة وهي من النوع السالب مع لصبغة گرام .تصيب هذه البكتريا عادة نباتات ذات الفلقتين مسببة اورام فيها تعرف بالتدرن التاجي Crown gall حيث تنتقل قطعة من DNA البكتريا الى DNA النبات وبذلك يقوم النبات بإنتاج الهرمونات ومشتقات الأحماض الامينية اللازمة لتغذية البكتريا مؤدية الى اصابة النبات بالمرض .وقد تمكن علماء الاحياء الجزيئية Molecular-biology في بداية عام 1980من انتاج سلالات من هذه البكتريا مُعدلة وراثياً، يمكن استخدامها كناقل لإدخال المورثة المرغوبة الى نباتات مختلفة . إذ تم التخلص من المورثة المسببة للمرض التي تتواجد على DNA بلازميد البكتريا واستبدلت بمورثة مرغوبة يُراد نقلها الى النبات مع إضافة مورثات اخرى منها ما تساعد في الكشف عن الخلايا المتحولة واخرى تساعد المورثة المنقولة لكي تُعبر عن نفسها في النبات ، فضلاً عن ذلك تم تحوير البكتريا بحيث اصبحت قادرة على اصابة نباتات ذات الفلقة الواحدة التي في الاصل تقاوم الاصابة بهذه البكتريا ، ونجح استخدامها في تحوير نبات الحنطة والرز . إن هذه الطريقة تعتمد على خاصية بكتريا الـ Agrobacterium التي تحوي على مورثتين في كروموسومها ، وتتحسس للمواد الفينولية التي يفرزها النبات من الجروح التي تحدث على جذوره ، فتتجه البكتريا نحو منطقة الجرح وتدخل الى داخل خلايا النبات ، وهذه البكتريا تمتلك بلازميد Ti علاوة على الكروموسوم ، هذا البلازميد يحمل عدة مورثات ، احدها مسؤول عن أحداث الاصابة بالمرض ، كما يحوي على قطعة من الـ T-DNA تحوي مجموعة من المورثات المسؤولة عن إنتاج الهرمونات والاحماض الامينية اللازمة لتغذية البكتريا ولها القابلية على الاندماج مع DNA النواة للنبات (شكل 1)، وبهذه الطريقة تقوم البكتريا بتحوير DNA النبات وتجبره على إنتاج المواد الضرورية لنموها ، وهكذا تحدث الاصابة في الطبيعة. وقد استفاد العلماء من هذه البكتريا عن طريق تحوير البلازميد واستخدامه كناقل للمورثات المطلوبة ، حيث تم ازالة المورث المسبب للمرض ثم التخلص من أغلب

المورثات في قطعة الـ T-DNA (شكل 2) واستبدالها كما ذكرنا بالمورثات المرغوب نقلها الى النبات ومورث الكاشف مثل مورث المقاومة للمضاد الحيوي كانامايسين والمورثات اللازمة لتجعل المورث المنقول قادر على التعبير في النبات المحور .



شكل 1 يبين المحتوى الوراثي لبكتريا الـ Agrobacterium



شكل 2 يبين المورثات المكونة لقطعة الـ T-DNA ضمن البلازميد Ti للبكتريا Agrobacterium

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة العاشرة : طرق نقل المورثات المباشر في النبات

أولاً- التحوير الوراثي للخلية منزوعة الجدار (الجبيلة) Protoplast

(أ)- الطريقة الكيميائية :

جرت اول محاولة لنقل DNA مباشرة الى النبات عام 1984حيث تم عزل DNA من البلازميد وتم ادخاله الى خلية منزوعة الجدار Protoplast لنبات التبغ ونبات البتونيا بوجود الـ Poly – L ornithine أو Polyethylene glycol (PEG) ، وقد تم تحسين زيادة كفاءة هذه الطريقة وتم تحوير العديد من المحاصيل المهمة اقتصادياً ، إذ تعتمد كفاءة الطريقة في الحصول على نبات كامل من خلية منزوعة الجدار على وجود وسط انتخابي عالي الكفاءة يميز الخلايا المتحولة عن غيرها ، وجرت أول المحاولات على الانواع التابعة للعائلة Solanaceae إذ يمكن الحصول على نبات من خلية منزوعة الجدار بسهولة ، واستخدم المورث Neomycin phosphotransferase (npt II) المسؤول عن المقاومة للمضاد الحيوي كانامايسين Kanamycin للكشف عن الخلايا المحورة وراثياً ، ولما كانت اغلب نباتات ذوات الفلقة الواحدة تقاوم المضاد الحيوي ، لذا تطلب الامر ايجاد وسيلة انتخاب اخرى ، فاستخدم المورث hygromycin phosphotransferase (hpt) المسؤول عن مقاومة الهگرومايسين ، والمورث phosphinotricin acetyl transferase (pat) ، التي اثبتت كفاءة عالية في انتخاب الخلايا المحورة وراثياً من نباتات ذوات الفلقة الواحدة والفلقتين ، وقد أمكن الحصول على نبات من خلية منزوعة الجدار لأغلب الانواع النباتية ، وتم تحوير نباتات الرز والذرة الصفراء وغيرها . ولتنفيذ هذه الطرية يجب مراعاة ما يأتي :

1- تركيز أيونات المغنيسيوم والكالسيوم في محلول التحضين .

2 - تركيز الـ PEG ووزنه الجزيئي .

3 – الوضع الفسيولوجي لل DNA فالجزيئة المزدوجة المستقيمة أفضل من الملتوية ، كذلك الجزيئة المفردة والـ RNA يمكن ادخالها مباشرة الى الخلايا .

(ب)- الثقب الكهربائي :

في هذه الحالة تستعمل الصدمات الكهربائية لعمل ثقوب في اغشية الخلايا ، ولتسهيل عملية نفاذ المادة الوراثية الى الخلايا منزوعة الجدار بكفاءة أعلى تتبع الطريقة الكيميائية . ويبين الشكل التالي اندماج لخلايا منزوعة الجدار .

شكل 3 يبين اندماج لخلايا منزوعة الجدار

الطريقتين اعلاه تتميز بالتالي :

1- سهلة التنفيذ وذات كفاءة عالية .

2 - يمكن معاملة عدد كبير من الخلايا منزوعة الجدار في التجربة الواحدة ، ويمكن الحصول على الاف النباتات المحورة .

3 - يمكن تحوير المادة الوراثية قبل عملية النقل .

4 - لا يقتصر العمل بها على نوع واحد من النباتات .

أما المساوئ فتتضمن التالي :

1- قد ترتبط عدة نسخ من المورثة المنقولة .

2 - إعادة ترتيب القواعد النووية فب الـ DNA المضاف .

3 - دخول الـ DNA المنقول في مواقع عشوائية .

ثانياً – التحوير الوراثي للخلايا الكاملة بواسطة الثقب الكهربائي :

نتيجة الصعوبات التي تواجه العاملين في حقل التحوير الوراثي في الحصول على نباتات كاملة من الخلايا منزوعة الجدار Protoplast لأغلب نباتات المحاصيل الاقتصادية دفعتهم في العمل على ادخال المادة الوراثية DNA مباشرة الى الخلية باستخدام الثقب الكهربائي ، وتكللت بالنجاح عام 1986 بعد اجراء بعض التعديلات على الطريقة مثل عمل جروح في النسيج بطريقة ميكانيكية أو تحضين النسيج في محلول انزيمي قبل ادخال الـ DNA الى الخلايا ، ولوحظ أن خلايا بعض الانواع تتقبل ادخال الـ DNA دون الحاجة الى معاملة أولية كما هو الحال للأجنة غير الناضجة لنباتات الحنطة والذرة الصفراء والرز . وتُعد هذه الطريقة من الطرق سهلة التنفيذ والسريعة والرخيصة وتصلح للعديد من الانواع النباتية التي لا يحتاج فيها النسيج للمعاملة الاولية قبل ادخال الـ DNA ، وتحتاج الى مراعاة بعض العوامل لنجاحها منها :

1- قوة التيار الكهربائي المستخدم .

2- نوع وتركيز الايونات في المحلول الذي يحوي الـ DNA .

3- مدة تحضين النسيج المجروح في المحلول الدارئ لمنع عمل الانزيمات .

4- مدة تحضين النسيج المجروح في المحلول الحاوي على الـ DNA المراد ادخاله الى الخلايا .

5- الصدمة الحرارية قبل عمل الثقب .

6- طريقة وضع وترتيب النسيج في غرفة الثقب الكهربائي .

ثالثاً – طريقة مدفع المورث Gene Gun

تذكر هذه الطريقة بعدة تسميات منها : Micro-projectile bombardment ، Biolistic ، Particle bombardment ، Particle acceleration ، وهي طريقة عالية الكفاءة تستخدم لجميع الكائنات وتتميز بإمكانية اجراء التحوير الوراثي على الانسجة المتخصصة مثل استهداف البلاستيدات الخضراء Chloroplasts والبيروكسيسومات Peroxisomes من خلال ربط حامض نووي مرسال mRNA واحد يعمل بالتعاقب وكذلك للمائع السايتوبلازمي Cytosol . تعتمد هذه الطريقة على جهاز يوفر تخلخل في الضغط بموقع يتم فيه تفريغ الهواء لحد معين ومن ثم يدخل غاز الهليوم بضغط عالي مما يساعد على دفع ذرات الذهب أو التنكستن المحملة بالـ DNA الى الخلايا المراد تحويرها . وتبين الصورة جهاز الـ Biolistic

فبعد أن يتم تحضير النماذج النباتية توضع على شكل طبقة قليلة السُمك وسط طبق معقم لضمان وصول الـ DNA المنقول لها ويوضع الطبق في المكان المخصص داخل الجهاز ، اما الـ DNA المراد نقله فيتم مزجه بواسطة رجاج مع ذرات من الذهب أو التنگستن المعقمة ، بعدها يتم توزيعها على المرشح الخاص بالجهاز ويوضع المرشح مع قرص خاص في الحاوية الخاصة وتوضع في غرفة القذف في المكان المخصص الذي يكون فوق الطبق المفتوح الذي يحوي النسيج النباتي المراد تحويره .ومن الجدير بالذكر أن جميع المراحل تنجز تحت ظروف التعقيم .

وهنا لابد من مراعاة العوامل التالية عند استخدام هذه الطريقة :

1- الخصائص الفيزيائية والكيميائية لذرات المعدن المستخدم لحمل الـ DNA المراد ادخاله للكائن الحي . حيت تكون ذات كتلة عالية ليكون لها زخم ملائم لاختراق النسيج ، كما أنها لا تتفاعل مع الـ DNA أو مع مكونات الخلية .

2- طبيعة وتحضير وارتباط الـ DNA بذرات المعدن ، مثل كمية الـ DNA وكذلك إضافة بعض المواد مثل كلوريد الكالسيوم والسبرميدين التي تساعد على التصاق الـ DNA بذرات المعدن .

3- سمك النسيج النباتي المستخدم بحيث يسمح بدخول ذرات المعدن ، وكذلك له القابلية على اخلاف نبات .

4- العوامل البيئية من درجة حرارة وشدة إضاءة ورطوبة والتي لها تأثير مباشر على نجاح العملية .

5- نوع وطبيعة الجزء النباتي المستخدم والظروف البيئية أو الاجهاد كالإصابة بالأمراض التي تعرض لها قبل عملية التحوير وبعدها .

ويمكن ذكر بعض **التطبيقات العملية التي تم انجازها لتحسين نباتات بعض المحاصيل الاقتصادية :**

(أ) في مجال تحسين نوعية الحاصل تم عزل المورثات من البكتريا والعاثي والطماطة المسؤولة عن سمك جدار ثمرة الطماطة وتأخير موعد النضج ونقلها الى الاصناف المختلفة من الطماطة لتحسين نوعيتها ورفع قيمتها الاقتصادية والمحافظة عليها من التلف أثناء عملية التسويق ، كذلك نقل مورثات من البكتريا المسؤولة عن تثبيت النيتروجين الى المحصول الجت لزيادة انتاجيته .

(ب) في مجال استحداث العقم الذكري تم استخدام العقم الذكري في أصناف معينة من الذرة الصفراء بنقل مورثات غير معروفة الاصل لاحتكار الشركات لها حيث أن هذه النباتات المحورة تسهل عملية إنتاج الهجن ذات الانتاجية العالية .

(ج) **في مجال المقاومة لمبيدات الادغال** فقد تم عزل المورث المسؤول عن مقاومة لمبيدات الادغال المعروف گلايفوسيت ونقله الى العديد من نباتات المحاصيل الاقتصادية وحصل ذلك مع محاصيل القطن والذرة وفول الصويا ، وبذلك أصبح من الممكن استعمال هذا المبيد في الحقول المزروعة بتلك المحاصيل دون أن تتأثر المحاصيل الاقتصادية ، وتحتكر الشركات المنتجة تقاوي هذه المحاصيل .

(د) في مجال المقاومة للحشرات تعد من الانجازات المهمة في المجال النباتي نقل المورث المسؤول عن مقاومة الاصابة بحشرة حفار الساق التي تصيب العديد من المحاصيل الاقتصادية ، إذ تم عزل المورث المعروف Bt من البكتريا *Bacillus thuringiensis* وتم إدخاله بطرق

نقل مختلفة الى نباتات محاصيل اقتصادية مثل البطاطا والذرة والرز وأصبحت مقاومة للحشرة دون استعمال المبيدات الحشرية الملوثة للبيئة ، وقد احتكرت الشركات المنتجة ذلك وتحكمت بأسعارها في السوق .

(ذ) **في مجال المقاومة للعواثي (الرواشح)** فقد تم عزل المورثات المسؤولة عن مقاومة العواثي المختلفة من البكتريا والعواثي وإدخالها الى المحتوى الوراثي للقرع ، فأصبحت هذه المحاصيل مقاومة للإصابة بالعواثي .

<u>المصادر</u>

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

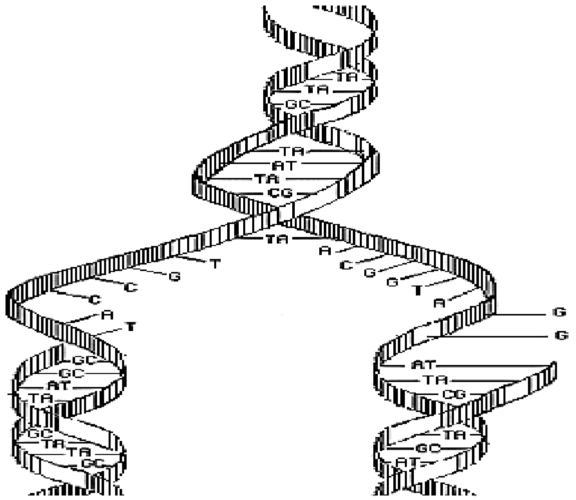
3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الحادية عشر : التفاعل التضاعفي لسلسلة DNA وتطبيقاته

التهجين Hybridization هي عملية خلط أو دمج للأشرطة المفردة من الأحماض النووية المتقاربة مع بعضها البعض لينتج عنها عدد من الأحماض النووية المهجنة يساوي عدد الأحماض النووية الأصلية مزدوجة الأشرطة التي دخلت في عملية التهجين . إذ تُعد عملية تنظيم التعبير الجيني سِمه أساسيه في حفظ التكامل الوظيفي للخلية . وعملية التنظيم هذه تحدث بطرق مختلفة منها تنظيم موجب واخر تنظيم سالب . ففي الأحياء بدائية النواة غالبا ما يحدث التنظيم عند بدء استنساخ الحامض النووي الرايبوزي المرسال mRNA. اما في حقيقية النواة فاستنساخ mRNA يكون اكثر تعقيد او عليه توجد اكثر من ميكانيكيه لعملية التنظيم. وبالرغم من ذلك تنظيم الاستنساخ في حقيقية وبدائية النواة يحدث من خلال ارتباط بروتينات مع تسلسل معين على شريط الحامض النووي DNA ينتج اما زياده او نقصان في معدل الاستنساخ. وهنالك ميكانيكيه خاصه في حقيقية النواة وهو الاستنساخ المتخصص بنوع الخلايا وهذا يتحقق من خلال المعالجة الاختيارية او البديلة (alternative (processing لشريط mRNA الاولي وتكوين اشرطه مختلفة منه وبالتالي ترجمته الى بروتينات مختلفة متعلقة بوظيفة تلك الخلية.

طرق التهجين :

تستفيد هذه الطرق بما هو معروف عن تفكك Denaturation أحماض الـ DNA بالحرارة ، أي فصل الشريط المزدوج لجزيء الـ DNA الى شرائط مفردة ورجوعها الى طبيعتها بالتبريد البطيء. كما تستفيد بما هو معروف من تقابل القواعد النيتروجينية في أزواج محددة حيث يتقابل الأدينين مع الثايمين ، والگوانين مع السيتوسين . والشكل التالي يوضح بداية مرحلة الفصل في جزئ الـ DNA . ومن التقنيات المستخدمة في تهجين الحامض النووي **تقنية التهجين في الموضع** In situ hybridization ، **وتقنية إعادة التطبيع** DNA renaturation سواءً بخفض درجة الحرارة أو بخفض الرقم الهيدروجيني (الـ pH) .



انتاج البروتينات (الزلاليات):

إن الذي يقرر الكيفية التي تترتب فيها الأحماض الأمينية داخل جزيء البروتين وعددها والأنواع التي تشترك في بنائه هو تسلسل وعدد النيوكليوتيدات في الـ DNA . ففي خلايا الحيوان والنبات والإنسان توجد الكروموسومات داخل مبنى محدّد ومحاط بغشاء هو النواة، بينما يتم إنتاج الزلاليات في السيتوبلازم. لا تستطيع الكروموسومات أن تنتقل من النواة إلى السيتوبلازم بسبب كبر حجمها، فكيف إذن تستطيع هذه الكروموسومات أن تسيطر على إنتاج البروتينات الذي يحصل في موقع آخر؟

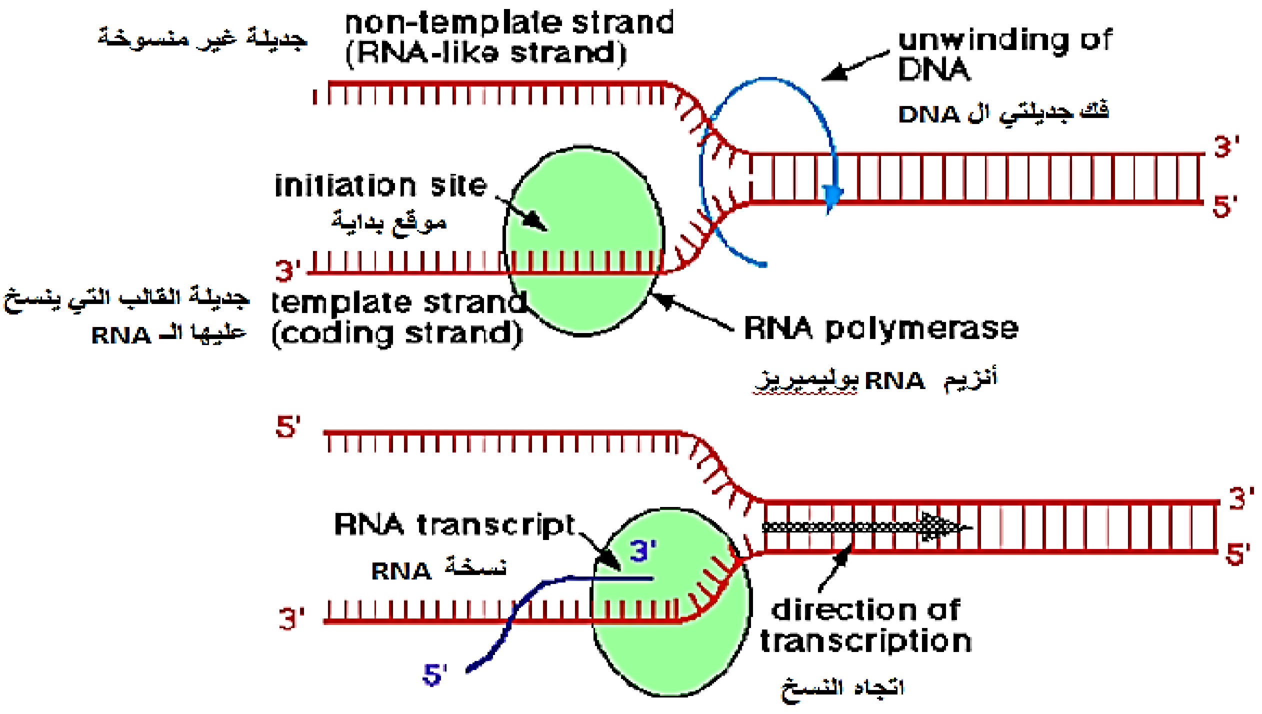
والجواب على ذلك هو أنّ نسخ من المعلومات الوراثية تنتقل من النواة إلى السيتوبلازم على شكل مادة أخرى هي الحامض RNA. فلا يتم نسخ كل الكروموسومات وإنما المورثات الفعالة في كل خلية. المورثاتات هي قطاعات صغيرة نسبياً ولذلك الجزيئات المنسوخة عنها صغيرة هي الأخرى وبإمكانها الانتقال من النواة إلى السيتوبلازم .

ويتم نسخ الـ RNA عن مورث معيّن على النحو التالي :

1- إنزيم DNAase يفتح سلسلتي الـ DNA المؤلفتين للمورث.

2- إنزيم RNA polymerase يقوم بربط نيوكليوتيدات حرة إلى النيوكليوتيدات الموجودة في إحدى السلسلتين ، بحيث أنّ C يتحد مع G وأنّ U يتحد مع A . يقوم هذا الإنزيم بنسخ المورث من بدايته وحتى نهايته مكوناً جزيئات RNA فيها تسلسل من النيوكليوتيدات شبيه بالتسلسل الموجود في المورث مع اختلاف واحد هو أنّ القاعدة النيتروجينية U تأتي بدل القاعدة النيتروجينية T . هذا الاختلاف لا يُغيّر من المعلومات الوراثية لأن أنظمة الخلية تقرأ هذين الرمزين وكأنهما رمز واحد .

3- تنفصل جزيئات الـ RNA عن الـ DNA وتنتقل إلى السيتوبلازم . والشكل التالي يوضح عملية النسخ .



الإنزيم الذي ينسخ المورث يَعرف أين يبدأ واين يُنهي ، فهنالك ثلاثيات من النيوكليوتيدات تشكل للإنزيم **موقع البداية لعملية النسخ (promoter)** وهنالك ثلاثيات تشكل للإنزيم **موقع النهاية لعملية النسخ (stop). وأن عملية النسخ تحصل على إحدى جديلتي الـ DNA فقط .**

التعبير للمورث وتصنيع البروتين . Gene expression and protein synthesis

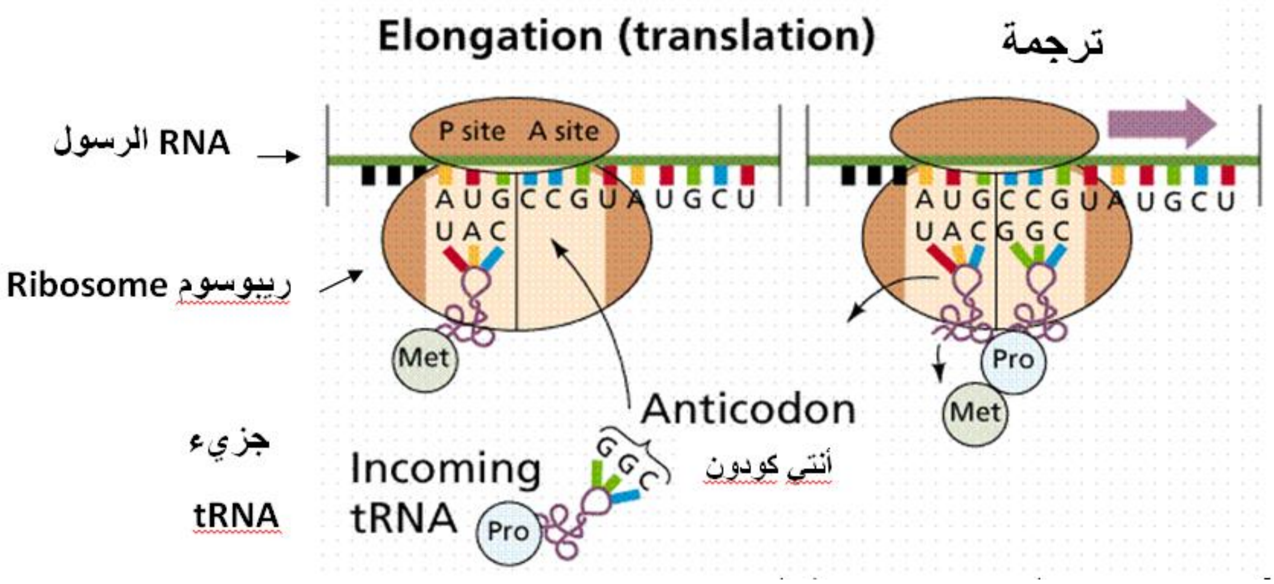
ترجمة الـ RNA إلى سلاسل بروتينات (زلاليات)

اتضح من الأبحاث أن كل ثلاثية متتالية من النيوكليوتيدات في الـ RNA الرسول (mRNA) تترجم إلى حامض أميني مُعيّن. وبما أنّ عدد انواع النيوكليوتيدات هو أربعة (A,U,C,G) فإنّ عدد الثلاثيات المختلفة التي يمكن تكوينها هو 64 . غير أن عدد أنواع الأحماض الأمينية المعروفة لحد الأن هو أكثر من 20 نوعاً ولذلك فمن الواضح أنّ هنالك أحماض أمينية تحددها أكثر من ثلاثية واحدة. كما أنّ هنالك ثلاثيات تشكل إشارة إلى الإنزيم لبدء عملية النسخ وهنالك ثلاثيات تشكل إشارة للإنزيم لإنهاء عملية النسخ . يحصل ترجمة تسلسل النيوكليوتيدات في

الـ mRNA الرسول على جسيمات تدعى الرايبوسومات وهي جسيمات دقيقة توجد في السيتوبلازم. وتشترك في عملية الترجمة جزيئات أخرى من الـ RNA يسمى الـ RNA الناقل (tRNA) لأنه هو الذي يحمل وينقل الأحماض الأمينية إلى مواقع البناء أي إلى الرايبوسومات. إن لكل شفرة وراثية التي تشكل كل ثلاثية رمز (كودون) ووظيفة. فعندما يصل الـ mRNA الرسول الى السيتوبلازم ترتبط به الريبوسومات. وأن الرايبوسوم الذي يرتبط به الـ RNA الرسول يبدأ في قراءته ، وتبعاً لتسلسل القواعد في الـ mRNA الرسول يتم بناء سلسلة من الأحماض الأمينية.

ارتباط الأحماض الأمينية وتكوين السلسلة البروتينية .

لمعرفة الكيفية التي يتم فيها إضافة مزيد من الأحماض الأمينية إلى السلسلة فيمكن النظر الى الشكل التخطيطي التالي لمراحل إضافة الأحماض الأمينية للسلسلة إذ يوجد على عرض الرايبوسوم ما يشبه ثقب (ممر) والذي يلائم جزيئات الـmRNA الرسول، وكذلك يوجد أيضاً موضعان متجاوران ملائمان لجزيئي الـ tRNA ناقل.



(أ)- على عرض الرايبوسوم يلتصق جزيء الحامض النووي الرايبوزي الرسول mRNA واثنان من جزيئات الحامض النووي الرايبوزي الناقلtRNA (كل منهما تحمل حامضاً أمينياً واحداً)، بحيث أنّ الأنتي كودونات (أي الثلاثيات من النيوكليوتيدات المكملة للثلاثيات الموجودة في الـ mRNA الرسول مثلاً UAC هو أنتي كودون للثلاثية AUG) الموجودة في هذه الجزيئات تكون مرتبطة بالكودونات الموجودة في الـ mRNA . وقد أصبح الحامض الأميني Pro مربوطاً الى السلسلة متعددة الببتيدات التي يتم بناؤها. السهم يبين اتجاه قراءة الـ RNA .

(ب)- يرتبط الحامض الأميني Met بمساعدة إنزيم مناسب الى السلسلة متعددة الببتيدات في حين أن الحامض الأميني Pro ينفصل عن الـ RNA الناقل لها.

(ج)- ينفصل الـ RNA الناقل للحامض الأميني Pro عن الرايبوسوم ويكون حراً بحيث يمكنه الارتباط مع جزيء آخر من الحامض الأميني Pro .

(د)- يتحرك الرايبوسوم على الـ mRNA إلى الكودون الذي يليه في عملية تتطلب طاقة، بحيث يفرغ مكاناً لجزيء RNA ناقل جديد ملائم . وهكذا تستمر قراءة التسلسل الموجود في جزيء الـ mRNA وترجمتها إلى تسلسل من الأحماض الأمينية..

إنّ الزمن اللازم لقراءة كودون واحد هو 20/1 من الثانية، وهذا يعني أنّ الزمن اللازم لبناء جزيء بروتين يتألف من 400 حامض أميني يستمر 20 ثانية فقط .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الثانية عشر : استخدام المؤشرات الوراثية الجزيئية في تشخيص هوية النبات

نتيجةً لاستخدام الطرائق الحديثة في انجاز العمليات الزراعية من ري وتسميد ومكافحة ، فضلاً عن التوجه لزراعة الاصناف ذات الانتاجية العالية التي تم الحصول عليها بطرق التربية التقليدية كالانتخاب والتهجين والتشعيع ، فقد أحدث ذلك تقدم كبير على مستوى العالم في إنتاج العديد من المحاصيل الاقتصادية . غير أن تلك الزيادة لم تكن لتكفي ما يقابلها من نمو سكاني سريع في العديد من دول العالم ، وزيادة الطلب على المواد الغذائية سواءً للإنسان أو الحيوان . وقد ساهمت التقنيات الحياتية والتطور الذي حصل في علم الوراثة الخلوية والجزيئية خلال العقدين الاخيرين على توفير وسائل ساعدت على زيادة كفاءة طرق التربية والحصول على العديد من المحاصيل ذات المواصفات الانتاجية المتميزة وبصفات جودة مرغوبة والتي تعذر الحصول عليها في السابق ، فقد برز التطور في مسارين للتقنيات الحياتية هما زراعة الانسجة وطرائق الوراثة الحديثة ، وشمل **الاتجاه الاول** :

(أ) نجاح اخلاف النباتات من الانسجة والخلية منزوعة الجدار .

(ب) إنتاج النباتات المحورة وراثياً من الخلايا التي تحمل مورثات مسؤولة عن الصفات الاقتصادية المُحسنة.

(ج) انتاج الهجن الجسمية باندماج الخلايا منزوعة الجدار واندماج الخلايا منزوعة النواة .

(د) استحداث الاصناف الجديدة عن طريق زراعة الاجزاء الجنسية .

(ذ) استحداث التغييرات الوراثية في الخلايا الجسمية واخلاف نباتات منها .

أما المسار الثاني فقد شمل على :

(أ) وضع خرائط وراثية غنية بمواصفاتها للمحاصيل الاقتصادية .

(ب) عزل وتقطيع المادة الوراثية في النواة و العضيات .

(ت) استخدام المؤشرات الجزيئية في تعليم مورثات الصفات النوعية والكمية .

(ث) استخدام المؤشرات الجزيئية في عملية الانتخاب .

(ج) نقل المورثات من الاصناف البرية الى المحاصيل الاقتصادية .

(ح) التوصيف الجزيئي للمسببات المرضية .

علماً أن الاتجاهين متداخلان ولا يمكن الفصل بينهما ، وأن المؤشرات الجزيئية تثل حلقة الوصل الفعالة بين هذين المسارين وتربية النبات ، ولما كان الهدف الرئيسي لمربي النبات هو تحسين الانتاج النوعي والكمي للمحاصيل الاقتصادية ، لذا لابد من الدخول في هذه التقنية لزيادة الدقة والكفاءة في الانتخاب واختصار الزمن اللازم لإنتاج الاصناف الجديدة المحسنة .

المؤشرات الوراثية

تُعرف بأنها وسيلة لتشخيص وتحديد أي مورث على الصبغيات للنوع . وتقسم الى ثلاثة أنواع هي :

1- المؤشرات المظهرية : وهي أي مورث له تأثير واضح على الشكل المظهري للفرد .

2- المؤشرات الكيميائية : وهي أي مورث يسيطر على تكوين بروتين معين او انزيم يمكن استخلاصه وتشخيصه بطريقة الترحيل الكهربائي أو أي وسيلة اخرى .

3- المؤشرات الجزيئية : وهي قد تكون قطعة صغيرة من الحامض النووي التي يمكن تشخيصها بالتقنيات الحياتية الحديثة ، وتستخدم في وضع الخرائط للمورثات والتي توفر فرصة جديدة في استخداماتها التطبيقية في الوراثة وتربية النبات ، فهذه المؤشرات مستقلة عن بعضها البعض . فسيادتها تكون شبة تامة ، وهي صفات غير مميته ولا تتأثر بالبيئة ولا يوجد تداخل بيئي .

أنواع المؤشرات الوراثية الجزيئية

هناك عدد من انواع المؤشرات الجزيئية ولكل منها فوائد خاصة به ، لذلك يجب اختيار المؤشر الملائم لتحقيق هدف معين . إن ملائمة المؤشر الوراثي لبرنامج معين تنحصر في قدرته على تمييز الفرد الواحد ضمن المجتمع ، وعدد المواقع الجينية التي يمكن الكشف عنها في تفاعل واحد ، وكلفة الطريقة مُقارنةً بالهدف الذي سيحققه . وتشمل تلك الانواع :

1- مؤشرات لا تعتمد على تقنية الـ PCR منها Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)
هذا النوع من المؤشرات الجزيئية مفيد في تحديد الاختلافات في موقع مورث معين في الصنف الواحد ، كذلك وضع الخارطة الوراثية للمورثات لأنها ذات سيادة غير تامة . تعتمد على تقطيع الـ DNA بالإنزيمات القاطعة ثم ترحل القطع المتكونة على الهلام ، فهي طريقة تحتاج الى كمية كبيرة من الـ DNA ووقت طويل ، وايدي عاملة ماهرة ، كما أنها باهضه الثمن ، ويستخدم فيها مواد مشعة .

2 - **مؤشرات تعتمد على تقنية الـ Polymerase Chain Reaction (PCR)** : وهي طرق سريعة وتحتاج الى كمية قليلة جداً من الحامض النووي وذات كلفة واطئة مقارنة بالطريقة السابقة . وقد ظهرت منها عدة طرق يختلف بعضها عن البعض بنوع البادئ ، وهذه الطرق هي :

(أ) Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD) : هذا النوع مؤشر يكشف عن التغاير بكفاءة أعلى من الطريقة السابقة ويحتاج الى كمية قليلة من الحامض النووي ، ومن مساوئه يكون سائد .

(ب) Simple Sequence Repeat (SSR) : مؤشر يتطلب جهد كبير حيث يجب تحديد تلك المواقع أولاً ثم تقطيعها . تعتبر مؤشرات مهمة لأنها ذات سيادة غي تامة وتساعد على الكشف حتى بين الافراد ذات القرابة العالية ، وهي الافضل في دراسة الارتباط الوراثي في النبات ووضع الخرائط الفيزيائية ،ة ودراسة المجتمعات النباتية والكشف عن الاصناف .

(ت) Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) : يساعد هذا المؤشر في الكشف عن التغاير في عدة مواقع في تفاعل واحد، وهي من النوع السائد والعمل فيها أكثر صعوبة من PAPD وSSR .

(ث) Sequence Amplification Polymorphisms Length (SAMPL) :هو عبارة عن دمج للمؤشرين SSR و AFLP وتساعد هذه المؤشرات على الكشف عن مواقع متعددة في تفاعل واحد كما هو في AFLP وتعطي المعلومات التي يمكن الحصول عليها من SSR دون الحاجة الى معرفة تسلسل القواعد النووية في قطعة الحامض النووي .

(ح) Sequence Characterized Amplified Region DNA (SCARD) :هذه المؤشرات قد تكون ذات سيادة تامة أو غير تامة .

(خ) Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) : هذا المؤشر يكشف الفرق بين الاصناف حتى وإن كان نيوكليوتيدة واحدة .

استخدامات المؤشرات الجزيئية :

1- تقدير الاختلافات الوراثية بين وداخل المجتمعات والعينات والمجتمعات النباتية المزروعة واقاربها البرية .
2- تشخيص المتطابقات .
3- تحديد مركز التدجين .
4- دراسة العلاقة التطورية بين الانواع والرتب العليا .
5- ايجاد أفضل الطرائق لحفظ المصادر الوراثية .
6- تحديد الثبات الوراثي للأصناف .
7- تتبع الاحياء المجهرية والنباتات المحورة وراثياً .

وفي الوقت الحاضر يمكن استخدام المؤشرات الجزيئية AFLP و RAPD كوسيلة لتشخيص هوية الأصناف المستخدمة في برامج التربية الحالية ، ومنها يمكن تشخيص التغيرات الوراثية التي استحدثت في هذه الاصناف من طرق التربية المختلفة ، لزيادة دقة وكفاءة برامج التربية واختصار الزمن .كذلك يمكن الكشف عن النباتات المحورة وراثياً الداخلة الى القُطر باستخدام المؤشرات المذكورة أعلاه .وتتضمن هذه التقنية الخطوات التالية :

1- عزل الحامض النووي من النواة والاعضاء وتنقيته .
2- تحديد البادئ الخاص بقطعة الحامض النووي المطلوب تشخيصه .
3- مضاعفة جزء معين من الحامض النووي باستخدام التفاعل المتسلسل PCR .

4- الترحيل الكهربائي للحامض النووي الناتج من التفاعل المتسلسل لتشخيص التغايرات وتحديد هوية الصنف قيد الدراسة .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الثالثة عشر : البصمة الوراثية The DNA Fingerprint

ما هي البصمة الوراثية

كلمة البصمة في اللغة تعني الختم بطرف الاصبع، وبهذا المعنى هي علامة فارقة بين ابناء البشر. وكلمة الوراثية مأخوذة من الارث بمعنى انتقال الشيء من شخص لأخر بعد موته . والوراثة، علم يبحث في انتقال صفات الكائن الحي من جيل الى اخر، وتفسير الظواهر المتعلقة بطريقة هذا الانتقال. **فالبصمة الوراثية أو الطبعة الوراثية أو بصمة الحامض النووي** هي الاثار والعلامات المنتقلة من الاباء الى الابناء او من الاصول الى الفروع عن طريق المورثات والخلايا الخاصة بكل فرد من الكائنات. وهي طريقة اكثر دقة ومباشرة في تحديد شخصية صاحب الاثر الحيوي ، وقد عُرفت بعدة تعريفات منها :

هي البنية الوراثية التفصيلية التي تدل على هوية كل فرد بعينه . أو هي وسيلة تعيين هوية الكائن عن طريق تحليل جزء او اجزاء من الـ DNA المتمركز في نواة اي خلية من خلايا جسمه .أو وسيلة من وسائل التعرف على الشخص من خلال مقارنة مقاطع الـ DNA المستخلص من خلاياه . أو هي محقق الهوية الاخير التي بها يُعرف الكائن نفسه والتي تميزه كصفاته وتكوينه عن سائر الكائنات وعلاقته بالعائلة التي ينتمي لها .وهي من الناحية العملية وسيلة لا تكاد تخطيء في التحقق من الشخصية .

مما سبق يتبين أن البصمة الوراثية هي خريطة المورثات المتواجدة في جزيء الـ DNA والمتمثلة في التتابعات المتكررة للقواعد الكيميائية الاربع الادنين Adenine و الثايمين Thymine والسايتوسين Cytosine والگوانين Guanine والتي تدل على شخصية الفرد وتميزه عن غيره ، إذ لا يمكن ان تتشابه بين اثنين إلا في حالة التوائم المتماثلة (كائنين من بيضة واحدة) . ففي الإنسان يتكون جزيء الـ DNA من نحو ثلاثة بلايين ونصف بليون قاعدة. كل مجموعة ما من هذه القواعد تمثل مورثاً Gene من مائة ألف مورث موجودة في الإنسان، فبعملية حسابية بسيطة نجد أن كل مجموعة مكونة من 2.200 قاعدة تحمل مورثاً معينًا يمثل سمة مميزة لهذا الشخص، هذه السمة قد تكون لون العين، أو لون الشعر، أو الذكاء، أو الطول، وغيرها (وقد تحتاج سمة واحدة إلى مجموعة من المورثات لتمثيلها).

اكتشاف البصمة الوراثية:

لم تُعرَف البصمة الوراثية حتى عام 1984 حينما نشر د. آليك جيفريز Alec Jefferys عالم الوراثة بجامعة ليستر في لندن بحث أوضح فيه، أن المادة الوراثية قد تتكرر عدة مرات، وتعيد نفسها في تتابع عشوائي غير مفهوم. وواصل أبحاثه حتى توصل بعد عام واحد إلى أن هذا التتابع مميَّز لكل فرد، ولا يمكن أن يتشابه بين اثنين إلا في حالات التوائم المتماثلة فقط؛ بل إن احتمال تشابه بصمتين وراثيتين بين شخص وآخر هو واحد لكل ترليون (1 : 1.000.000.000)، مما يجعل التشابه مستحيلاً؛ لأن سكان الأرض لا يتعدون (6) ستة مليارات، وسجل الدكتور آليك براءة اكتشافه عام 1985، وأطلق على هذا التتابع اسم البصمة الوراثية للإنسان The DNA Fingerprint ، وعرفت على أنها وسيلة من وسائل التعرف على الشخص عن طريق مقارنة مقاطع الـ DNA ، وتُسمَّى في بعض الأحيان الطبعة الوراثية DNA typing أو DNA profiling. فالبصمة الوراثية وهي اية من آيات الله في اثبات هوية الانسان لان احتمال ان يحمل شخصان نفس تتابع الاحرف في كل ابجدية الـ DNA تبلغ واحدا في بضع مئات البلايين وقيل ان احتمال التشابه هو واحد لكل ترليون، وهذا في حال تم استخراج البصمة الوراثية من خلال الخطوات الخمس التي وضعها المختصون ولم يكن هناك خطأ بشري يمكن ان يؤثر على النتائج. وشكك المحامون في البدء بادعائهم أنه من الممكن حدوث اخطاء كثيرة في هذا المجال.

أنواع البصمات الوراثية

لقد أحدثت الثورة العلمية تغييراً وتطوراً جوهرياً في الحياة ، كونها تتوالى بسرعة مذهلة . فمن انواع البصمة الوراثية :

1- بصمة البنان (الاصابع) : البنان هو نهاية الاصبع ، فقد تتقارب بصمتان في الشكل تقارباً ملحوظاً ولكنهما لا يتطابقان أبداً ، لذلك هي دليل قاطع ومميز لشخصية الانسان ومعمول به في جميع بلدان العالم .

2- بصمة الشفاه : ويقصد بها العضلات القرمزية ، وتؤخذ بواسطة جهاز يحوي حبر غير مرئي حيث يضغط بالجهاز على شفاه الشخص بعد وضع ورق من النوع الحساس فتنطبع على الورق بصمة الشفاه ، وقد بلغت دقة هذه البصمة بإمكانية الحصول عليها من على عقب السيجارة .

3- بصمة الأذن : عند نمو الأنسان كل ما فيه يتغير إلا بصمة الأذن، فهي الوحيدة التي لا تتغير منذ ولادته وحتى مماته.

تقنية الحصول على البصمة الوراثية

كان د. آليك أول مَن وضع بذلك تقنية جديدة للحصول على البصمة الوراثية وهي تتلخص في عدة نقاط هي :

1- تُستخرَج عينة الـ DNA من نسيج الجسم أو سوائله مثل الشعر، أو الدم ، أو اللعاب .

2- تُقطَع العينة بواسطة إنزيم معين يمكنه قطع شريطي الـ DNA طوليًّا ، فيفصل قواعد الأدينين A و الكوانين G في ناحية، و الثايمين T و السيتوسين C في ناحية أخرى، هذا الإنزيم يسمى إنزيم القطع Restriction enzyme .

3- تُرتَّب هذه المقاطع باستخدام طريقة الترحيل الكهربائي، وبذلك تتكون مقاطع طولية من الجزء المنفصل عن الشريط يتوقف طولها على عدد التتابعات المتكررة من A T C G .

4- في حالة كانت العينة أصغر من المطلوب، فإنها تدخل اختبارًا آخر، وهو تفاعل إنزيم البوليميريز(PCR) ، والذي نستطيع من خلال تطبيقه مضاعفة كمية الـ DNA في أي عينة .

5 - تُعرَّض المقاطع إلى فيلم الأشعة السينية X-ray-film ، وتُطبَع عليه فتظهر على شكل خطوط داكنة اللون ومتوازية.

ورغم أن جزيء الـ DNA صغير إلى درجة فائقة فإن البصمة الوراثية تعتبر كبيرة نسبيًّا وواضحة. فلم تتوقف أبحاث د. آليك على هذه التقنية ، بل قام بدراسة على إحدى العائلات يختبر فيها توريث هذه البصمة، وتبين له أن الأبناء يحملون خطوطًا يجيء نصفها من الأم، والنصف الآخر من الأب، وهي مع بساطتها تختلف من شخص لآخر. يكفي لاختبار البصمة الوراثية نقطة دم صغيرة؛ بل إن شعرة واحدة إذا سقطت من جسم الشخص المُرَاد، أو لعاب سال من فمه، أو أي شيء من لوازمه؛ فإن هذا كفيل بأن يوضح اختبار البصمة بوضوح كما تقول أبحاث د .آليك .فقد تُمسح بصمة الأصابع بسهولة، ولكن بصمة الـ DNA يستحيل مسحها من ورائك، وبمجرد المصافحة قد تنقل الـ DNA الخاصة بك إلى يد مَن تصافحه.

ومما وصلت إليه هذه الأبحاث المتميزة أن البصمة الوراثية لا تتغير من مكان لآخر في جسم الإنسان؛ فهي ثابتة بغض النظر عن نوع النسيج؛ فالبصمة الوراثية التي في العين تجد مثيلاتها في الكبد.. والقلب.. والشعر. وبذلك دخل د. آليك جيوفريز التاريخ ، وكانت أبحاثه من أسرع الاكتشافات تطبيقًا في كثير من المجالات.

يمكننا القول بأن الجينوم هو كامل الحامض النووي منزوع الأكسجين (DNA) في كائن حي معين، بما فيه مورثاته genes . وتحمل تلك المورثات جميع البروتينات اللازمة لجميع الكائنات الحية. وتحدد هذه البروتينات ضمن أشياء أخرى، كيف يبدو شكل الكائن الحي، وكيف يستقلب metabolize جسمه الطعام أو يقاوم العدوى، وأحياناً يحدد حتى الطريقة التي يتصرف بها.

ونظراً لأن جميع الكائنات الحية ترتبط بعلاقات مشتركة من خلال التشابه في بعض متواليات الدنا DNA ، تُمكننا التحاليل التي نحصل عليها من الكائنات الحية غير البشرية من تحقيق المزيد من الفهم والمعرفة لحياة الإنسان.

+ يعد الترتيب المحدد للحروف A و T و C و G في غاية الأهمية، فهذا الترتيب يحدد جميع أوجه التنوع الحيوي، ففي هذا الترتيب تكمن الشفرة الوراثية Genetic code ، فكما أن ترتيب الحروف التي تتكون منها الكلمات هو الذي يجعلها ذات معنى، فإن ترتيب هذه الحروف يحدد كون هذا الكائن الحي إنساناً أو ينتمي إلى نوع حي آخر كالخميرة أو ذبابة الفاكهة مثلاً، والتي يمتلك كل منها الجينوم الخاص بها والتي ركزت عليها أبحاث وراثية خاصة عدة.

+ تمثل كل مجموعة مكونة من ثلاثة من الحروف الأربعة حمضاً أمينياً معيناً، وهناك 20 وحدة بناء مختلفة (حامض أميني) تستخدم في مجموعة هائلة من التوليفات لإنتاج البروتينات ، إذ تكون التوليفات المختلفة بروتينات مختلفة بدورها في أجسام الكائنات الحية .

+ فيما بيننا نحن البشر، يختلف الـ DNA من فرد لآخر بنسبة 5.2% فقط ، أو 1 من كل 50 حرفاً، ويضع ذلك في الاعتبار أن الخلايا البشرية تحتوي كل منها على نسختين من الجينوم.

+ إذا أردنا أن نقرأ الجينوم البشري بسرعة حرف واحد في الثانية لمدة 24 ساعة يومياً، فسيستغرق الأمر قرناً كاملاً للانتهاء من قراءة كتاب الحياة . فالمعلومات التي يحتوي عليها الجينوم البشري تحتاج من الورق ما يبلغ ارتفاعه 61 متراً .فإذا بدأ شخصان مختلفان في قراءة كتاب

الحياة الخاص بكل منهما بسرعة حرف واحد في الثانية، فسيستغرق الأمر نحو ثماني دقائق ونصف الدقيقة قبل أن يصلا إلى أول اختلاف في ترتيب حروف كتابيهما . ويحتاج الطبّاع typist الذي يكتب بسرعة 60 كلمة في الدقيقة ولمدة ثماني ساعات يومياً، إلى نصف قرن للانتهاء من طباعة كتاب الحياة.

+ يتشابه الـ DNA الخاص بالبشر مع مثيله في الشمبانزي بنسبة 98%.

+ يبلغ العدد التقديري للمورثات في كل من البشر والفئران 60.000 – 100.000مورث، أما في الديدان المستديرة فيبلغ العدد 19.000 وفي الخميرة yeast يبلغ عدد المورثات 6.000 تقريباً، بينما يبلغ عدد مورثات الجرثومة المسببة للتدرن 4.000 .

+ تبقى وظيفة الغالبية العظمى (97%) من الـ DNA الموجودة في الجينوم البشري، غير معروفة لدينا حتى الآن.

+ كان أول كروموسوم chromosome بشري تم فك شفرته بالكامل هو الكروموسوم رقم 22، وقد تم ذلك في المملكة المتحدة في ديسمبر 1999، وتحديداً في مركز (سانجر) بمقاطعة كمبردج.

+ يبلغ طول الـ DNA الموجود في كل من خلايانا 1.8 متر، مكدسة في كتلة يبلغ قطرها 0.0001 سنتيمتر (والتي يمكن أن توضع بسهولة في مساحة بحجم رأس الدبوس).

+ إذا تم ربط جميع الـ DNA الموجود في الجسم البشري طرفا لطرف، يمكن للخيط الناتج أن يصل من الأرض إلى الشمس وبالعكس 600 مرة (100 تريليون × 1.8 متر مقسومة على 148.800.000 كيلومتر = 1200).

+ يقوم الباحثون في مشروع الجينوم البشري بفك شفرة 12.000 حرف من الدنا DNA البشري في الثانية الواحدة.

+ إذا تم ربط جميع الحروف (3 بلايين) المكونة للجينوم البشري بحيث يكون كل منها على بعد 1ملم من الآخر، فستمتد لمسافة 3000 كيلومتر.

المورث يحدد معالم الشخصية

كل إنسان يتفرد بشخصية وصفات محددة، فهناك شخص لا مبال، وآخر عصبي المزاج أو قلق، وهناك من يلتمس المخاطر، وهناك الصامت والثرثار، ويعتقد العلماء أن على الكروموسوم الحادي عشر مورث يعمل في الدماغ ويؤثر على الإشارات الكيميائية والكهربائية المختلفة مما يدفع الدماغ للبحث في الخيارات والحوارات واختيار أحدها، ولكن هذا لا يفسر سوى 4% من السلوك، فهناك عناصر أخرى كثيرة في تحديد الشخصية لا تقل عن اثني عشر، وهذا يعني أنه يوجد أكثر من خمسمائة مورث تتنوع في تناغم مع الشخصيات البشرية، وهذا ينفي الحتمية الوراثية والجينية في السلوك والشخصية التي تتكون من مزيج غامض ومعقد من تلك المورثات.

ربما كنا نحن البشر محددين تحديدا مدهشا حسب أوامر مورثاتنا، ولكننا نتحدد أكثر بما نتعلمه في حياتنا، فالجينوم يعالج المعلومات ويستخلص معلومات مفيدة بالانتخاب الطبيعي ويجسد هذه المعلومات في تصميمه. والتعلم يختلف عن الذاكرة، فالغريزة سلوك يتحدث وراثيا، أما التعلم فسلوك تعدله الخبرة.

أما في مجال الزراعة فقد استخدمت مبادئ وطرق متعددة لعلم الوراثة في انتاج نباتات نافعة للبشرية ، فقد استفاد الانسان مما سخره الله عز وجل كما في ظاهرة الاثمار العذري حيث تنتج ثمار بدون بذور .واستفاد العلماء من تقنية تكاثر وقطع (DNA) متباينة الاطوال كطريقة فعالة ومفيدة في دراسة التباين الوراثي للنبات الواحد ،واستخدام البصمة الوراثية كتطبيق لتحديد التباين الوراثي لأنواع التمور واشجار النخيل والزيتون والتين والطماطة والبطاطا والعديد من النباتات المحاصيل الاقتصادية والطبية والبرية .فقد استخدمت مؤشرات الـ RAPD في الكشف عن التغايرات الوراثية التي قد تحصل عند الزراعة خارج الجسم الحي من خلال مقارنة تحليل نتائج البصمة الوراثية للنباتات النسيجية مع نباتات نفس الصنف النامية في الحقل ، أو من النباتات الناتجة من تكوين الأجنة الجسمية غير المباشر خارج الجسم الحي مع نباتات نفس الصنف النامية في الحقل . كذلك استخدام مبادئ علم الوراثة من اجل تحسين الثروة الحيوانية التي تربى من اجل اللحم او الحليب فقد كان الثور الصغير في لندن عام 1710م يزن 168 كغم وفي عام 1795 م بعد الانتخاب كان يزن اكثر من 632 كغم والان يزن الثور الايطالي 1812 كغم مع ازدياد محتوى زبد الحليب في هولندا بحوالي 7% .

الخطوات العملية للحصول على البصمة الوراثية في النباتات :

1- يؤخذ 1غرام من الاوراق الفتية الخضراء وتسحق بسرعة في هاون خزفي مبرد مسبقاً بإضافة النتروجين السائل بكمية مناسبة ويستمر السحق حتى الحصول على مسحوق ابيض ناعم .

2- ينقل المسحوق الى انابيب بلاستيكية سعة 20 مل ويضاف له 3 مل من محلول الاستخلاص ويمزج بصورة جيدة وتحضن العينة على درجة حرارة 60°م لمدة 60 دقيقة .

3- ترفع الانابيب البلاستيكية وتبرد على درجة 37°م ويضاف لكل أنبوبة 3 مل من محلول الكلوروفورم ؟ آيزوأميل مع تحريك الانبوبة لمدة 15دقيقة .

4- توضع الانابيب البلاستيكية التي تحوي المزيج بجهاز النبذ المركزي وبسرعة 10000 دورة في الدقيقة لمدة 10دقائق وبدرجة حرارة 40°م .

5- تنقل الطبقة العليا الى انابيب بلاستيكية جديدة ويضاف 5 مل من الآيزوبروبانول المبرد لكل عينة لترسيب الـ DNA والذي يظهر على شكل خيوط بيضاء وتترك الى اليوم التالي لإتمام عملية الترسيب .

6- ينبذ المزيج بجهاز النبذ المركزي على سرعة 10000دورة بالدقيقة لمدة 15دقيقة .

7- يتم التخلص من الجزء الرائق (الكحول المذاب بالماء) ويغسل الـ DNA بالكحول الاثيلي تركيز 99% ، وتجفف الانابيب في فرن على درجة حرارة 50°م ولمدة 15دقيقة للتخلص من الكحول المتبقي ، ويضاف مل من محلول **TE buffer** لإذابة الـ DNA الملتصق بجدران الانابيب .

8- للتخلص من الـ RNA المترسب مع الـ DNA وذلك بإضافة 4مايكرولتر من انزيم RNase على درجة حرارة 37°م ولمدة 30 دقيقة ، بعدها تبعد عن الحرارة ويضاف لها 90 مايكرولتر من صوديوم استيت لترسيب وتنظيف الـ DNA بعدها يضاف 2 مل من كحول الايثانول 99% البارد جداً لتجميع الـ DNA ويوضع في جهاز النبذ المركزي على 10000 دورة بالدقيقة ولمدة 30 دقيقة ، وتعاد عملية الغسل بكحول الايثانول 75% وتجفف العينات في فرن مع تفريغ Vacuum oven ، بعد ذلك يضاف 100- 150مايكرولتر ماء مقطر .

9- تنقل عينات الـ DNA الذائب الى انابيب بلاستيكية Eppendorf tubes ذات غطاء محكم سعة سم^3 وتحفظ العينات على شكل نموذج DNA اساس (Stock sample) على درجة حرارة - 20°م لحين الاستعمال .

10- يحضر هلام الاكاروز للكشف عن عينات الـ DNA المعزول ، وبعد تصلبه يوزع على الحفر ويغلق جهاز الترحيل ، وبعد ثلاث ساعات من بدء الترحيل يفحص الهلام باستخدام جهاز قياس الكثافة الضوئية UV-spectrophotometer عند طول موجي 260 نانوميتر لرؤية حزم الـ DNA .

11- يتم تحضير تفاعلات الـ RAPD وتختبر البادئات لمعرفة أي منها تعكس تعدداً شكلياً ، وتُقدر الاحجام الجزيئية للقطع المتضاعفة بالاعتماد على مواقع الحزم ذات الاحجام الجزيئية المعروفة والناتجة من قطع DNA الدليل الحجمي القياسي ، يرسم المنحنى القياسي بين الاحجام الجزيئية للدليل الحجمي الممثلة على المحور الصادي وقيم المسافات التي تبعد هذه الحزم عن حفر تحميلها داخل الهلام الممثلة على المحور السيني ، ثم تقاس المسافة التي قطعتها الحزم (القطعة المضاعفة) من حزم العينات المدروسة ،وبإسقاط عمود من تلك المسافة على المنحنى القياسي ومن نقطة التقاطع هذه أسقط عمود أخر على المحور الصادي ليمثل حجم القطعة المضاعفة .

الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً .

التعديل الوراثي عادةً يتم من خلال نقل المورث المانح للصفة المرغوب فيها ، والذي يكون موجود ضمن تركيب البلازميد Construct والذي يتألف من الاجزاء التي تعمل مجتمعة لإعطاء الصفة المرغوب فيها وتشمل :

1- المحفز Promoter لعمل المورث . ويُعد المحفز المأخوذ من فايرس موزائيك القرنابيط (Cauliflower mosaic virus (P- 35s .

2- المُنهي Terminator الذي يوقف عملية نسخ المورث ومن أشهرها Nopaline synthase (T-Nos) .

3- المورث المانح للصفة المرغوب فيها (المنطقة المُشفَرة) وقد استُخدم العديد من المورثات اشهرها المورث المسؤول عن مقاومة المبيدات العشبية في نبات فول الصويا EPSPS gene .

4- المورثات التي تعمل كمؤشرات انتخابية للتمييز بين النباتات المُعدلة وغير المُعدلة خلال عملية التعديل مثل مورث مقاومة المبيدات العشبية Phosphinotricin acetyltransferase (bar gene) .

طرق الكشف عن الكائنات المعدلة وراثياً

توجد العديد من الطرائق المتبعة للكشف عن المواد المعدلة وراثياً ، والتي يمكن من خلالها الكشف عن وجود هذه المواد أو كشف هوية المادة المعدلة وراثياً وتحديدها وتقدير كميتها . وبشكل عام تقسم الى قسمين أساسيين هما :

أولاً- طرق منخفضة التقنية ، وتتضمن **:**

1- التوصيف المظهري . يعطي هذا النوع من الكشوفات تصور عن وجود أو عدم وجود حالة معينة مثل السُمية فيُقال مُقاوم Resistance أو مُتحمل Tolerance ، وعند الحصول على نتائج ايجابية من هذا الاختبار لابد أن تخضع لاختبارات لاحقة تأكيدية .

2- المواد البروتينية ويتضمن :

+ **قياس المناعة** : ويتم من خلال تقدير البروتينات الجديدة التي تم إنتاجها بعد التعديل الوراثي للكائن الحي .

+ **فحص إنزيم المناعة المرتبط** Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) : هذا الفحص يعتمد على التفاعل بين جسم مضاد ومُستضد أو ردة الفعل كمركب مستقر يمكن الكشف عنه بالأجسام المضادة المرتبطة بالانزيم ، وهو تقدير شبه كمي .

+ **التدفق الجانبي للجسيمات** : يعتمد هذا الفحص على استخدام مواد تركيبية لها القدرة على التقاط الاجسام المضادة في موقع التفاعل مما يؤدي الى ظهور لون مميز يدل على ان الفحص ايجابي .

ثانياً – طرق عالية التقنية ، وتشمل **:**

1- تفاعل البلمرة المتسلسل . Polymerase Chain Reaction (PCR) .

2- تقنية الرقائق الصغيرة . Micro Arrays .

3- تقنية الهجرة الكهربائية . Electrophoresis .

المحاذير: سبق وان ذكرنا بأن الهندسة الوراثية تهدف الى التلاعب بالمورثات بطريقة تسمح بظهور صفات جديدة مفضلة في كائن لم يكن يمتلكها ،او ازالة صفة غير مرغوب فيها ، مما يؤيد الانتقائية الطبيعية في شكلها العام والتي تعني البقاء التفاضلي للكيانات ، ويتعرض البشر في هذا العصر دون قصد لمجموعة متنوعة واسعة من مسببات التطفير الفيزيائية والكيميائية الموجودة في بيئاتهم نتيجة انشطة الانسان . فيمكن ان ينتج التخلف العقلي والسلوك العصبي الشاذ في الانسان ،بسبب تغيرات في مجال مفرده ،وبسبب وجود بدائل وراثية شاذة . ولا شك ان العلم اذا وضع في الايدي الخطأ فأنه يسبب اذى لا يحد . ومعلوم ان علم وراثة الانسان يطرح معضلة اكثر مراوغة واكثر عمومية وهي (قضية المعرفة)حيث سيكشف هذا العلم للكثيرين منا قريبا عن الطريقة الارجح لموتهم بل والموعد المتوقع ؟؟ ومن اكبر المآزق ادراكنا لمصيرنا او مصير ابائنا ومعرفتنا بأشياء لا نحب ان نعرفها ،كما لو ظهرت اعراض مرض عند الشيخوخة في شخص معين ،فان ذلك سيوجد الخوف وعدم الاستقرار النفسي عند الشباب، لما يمكن لهم من تصور وراثة المورث المنشئ للمرض ، ومن اهم السلبيات التي تلاحق العمل بالبصمة الوراثية ما يلي :

1. التأثيرات السلبية التي تخلفها الفيروسات التي تستخدم في نقل الجين من شخص لأخر، حيث شاءت الارادة الالهية ان اي خلل(طفرة) يسير في تسلسل القواعد النيتروجينية في المورث المتحكم في البروتين سيؤدي الى مرض خطير ناتج عن غياب كلي لإنتاج البروتين او نقص في انتاجه او زيادة في انتاجه .

2.النتائج المجهولة للمورث الجديد في حالة الخطأ في تحديد المورث المراد استبداله على الشريط الصبغي ،ويتساءل البعض عما يمكن ان يحدث لو ان العلماء توصلوا الى نتائج خاطئة ادت الى تشكيل مخلوق لا يمكن التخلص منه، او ان جرثومة خطرة خرجت من المختبر

وتكاثرت بسرعة وادت الى نشر وباء في العالم يمكن ان يقضي على البشرية كلها وهذا ما حمل عمدة مدينة كمبردج الامريكية في عام 1976 م الى التنديد بالتجارب التي يقوم بها العلماء في جامعة(هارفرد) وقال مهدداً :ان الله وحده يعرف ماذا يمكن ان يزحف علينا من هذه المعامل القريبة منا، اذ قد يخرج منها وباء مدمر لا يستطيع احد ان يجد له علاجا او ربما ينطلق منها يوماً(غول)رهيب .

3. محاولة ايجاد سلالات بشرية جديدة بمواصفات معينة لاستخدامها في مختلف مجالات الحياة من خلال التطبيقات التي يحلم بها بعض العلماء بتغيير طبيعة البشر عن طريق تركيبهم الوراثي، مما قد يفقد الانسان صفاته التي تشكل انسانيته ويلغي حريته وارادته، وقد يتم ذلك من خلال الانتقائية في الاجناس البشرية ، ومحاولة الاستفادة من مورثات العباقرة والقادة والموهوبين دون غيرهم ، واستنساخ نماذج منهم لإيجاد وتكوين الشعوب المنتخبة ، من خلال التهجين البشري ،او استخدام تقنيات الهندسة الوراثية في تحسين النوع البشري فيما يعرف(بالهندسة التعزيزية وقد اثبت لنا التاريخ ان هذا الامر ليس مجرد وهم وانما هو واقع مارسه العلماء في زمن هتلر .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

المحاضرة الرابعة عشر: الأمان الحيوي Biosafety .

الأمان الحيوي Biosafety الخاص بالكائنات المعدلة وراثياً أو الكائنات المعدلة وراثياً أو النباتات المعدلة وراثياً هو شيء مجهول مشكوك فيه ويتطلب تأسيس إطار للسلامة الحيوية ويمكن أن يدمج بشكل فعال في الاستراتيجيات والسياسات الوطنية في الزراعة والغذاء بالقطر.

يشير مفهوم الأمان الحيوي (السلامة الأحيائية) الى الحاجة إلى حماية صحة الانسان والبيئة من التأثيرات السلبية المحتملة لمنتجات التقنيات الحيوية الحديثة، والكائنات الحية المعدلة وراثياً وقد ويكون ذلك من خلال العمل على وضع اسس الهيكلية الوطنية للسلامة الأحيائية.وتتضمن

اسس الامان الحيوي :

1- التشغيل الامن للأجهزة مثل جهاز التعقيم بالحرارة الرطبة Autoclave و أجهزة خلط المواد Mixers وأجهزة الطرد المركزي Centrifuge.

2- الممارسات المعملية وتقنيات العمل بمهنية مثل الاستخدام الامن لماصات سحب المواد الكيميائية السائلة .

3- التأكيد على وسائل الحماية الشخصية .

4- الحرص الشديد على غرفة الامان الحيوي .

5- ضرورة وجود عدد من مستويات الامان الحيوي .

6- توفير أدوات الامان (خط الدفاع الرئيسي) .

أما مواقع الامان الحيوي فتشمل :

أولاً- المواقع التي تتعامل مع المواد المسببة للعدوى ومنها :

1- مختبرات الاحياء الدقيقة . 2- مختبرات الهندسة الوراثية .

3- مختبرات الكيمياء الحياتية . 4- مختبرات زراعة الانسجة .

5- مختبرات فحوص الدم . 6- مختبرات تحليل الانسجة المرضية .

إذ يجب أن يُراعى التعامل مع المواد الاحيائية المجهولة الخطورة أو ذات المعلومات المنقوصة على أنها شديدة الخطورة وتطبق أقصى درجات ممكنة من قواعد الامان الحيوي داخل المختبرات عند التعامل معها أو تداولها .

ثانياً- الانظمة الهندسية : ويقصد بها أنظمة التخطيط والتصميم الهندسي للمنشأة ، وكذلك نظم تصميم المختبرات من حيث الموقع ونظام التهوية ونظام فتح الابواب وتوزيع الاثاث والاجهزة وكذلك المرافق والصرف .

ثالثاً- الانظمة الادارية : تتمثل في القواعد العامة والنظم الادارية التي تحكم العمل في النشأة والمختبر والتي تنظم أدوار الفريق البحثي داخل المختبر وتتولى توزيع الادوار والمسئوليات بدءً بمدير المختبر ومروراً بفريق العمل وصولاً الى الفنيين والعاملين بالمختبر ، فضلاً عن ذلك ضرورة وجود دليل في المختبر Laboratory manual يدون فيه أمكانيات المختبر وأهدافه واجهزة المختبر وشروط العمل الواجب التقيد بها حالياً ومستقبلاً .

رابعاً- ويشمل :

+ **الممارسات والاجراءات :** يقصد بها الممارسات المختبرية التي يتم تفعيلها داخل المختبر ، والاجراءات المتبعة لتنفيذ تلك الممارسات .

+ **وسائل الحماية الشخصية :** وتمثل خط الدفاع الاول وتتمثل في وسائل حماية وتغطية وعزل مسارات العدوى عن العوامل الاحيائية .

قواعد وتعليمات الأمان الحيوي المختبرية Biosafety Guidelines for Laboratories

يطبق في المختبرات كافةً، نظام الممارسات المختبرية الجيدة Good Laboratory Practices (GLP) وتساعد هذه الممارسات على تجنب الأخطار الناجمة عن العمل في مختبرات التقانات الأحيائية بشكل عام .ومن أهم هذه القواعد ما يلي:

1- يجب إعطاء الكادر التقني المختبري كافة التعليمات اللازمة عن الإجراءات المتبعة وطرائق العمل لكل التجارب المجراة في المختبرات.

2-عدم المص المباشر بواسطة الفم للسوائل السامة أو المعدية، بل يجب استعمال الماصة.

3-عدم نفخ السوائل المعدية خارج الممص.

4-عدم خلط مزيج من المواد المعدية بصنع فقاعات بواسطة نفخ الهواء بالماص.

5- تجنب استعمال المحاقن الطبية syringes قدر الإمكان.

6- تعقيم الممص والمحاقن المستعملة في نفس الوعاء الذي استخدمت فيها بعد الاستعمال الأول.

7- يجب فحص أنابيب الطرد المركزي قبل عملية الطرد المركزي خوفاً من وجود شقوق أو كسور فيها.

8- استعمال أنابيب طرد مركزي ذات أغطية محكمة الإغلاق.

9- تجنب صب السائل من أنابيب الطرد المركزي، وإذا كان ذلك ضرورياً، يجب مسح حافة الأنبوب بسائل معقم.

10- تجنب ملء أنابيب الطرد المركزي إلى الحافة، اذ تصبح الحواف ملوثة بمحتويات الأنبوب.

11- تعقيم أسطح العمل باستعمال الصابون والكحول بعد نهاية كل يوم عمل.

12- المحافظة على الأيدي بعيدة عن الأنف، العين والوجه لمنع العدوى الشخصية.

13- وجوب غسل الأيدي عندما يكون هناك شك بالتلوث عند التعامل مع مواد حية وقبل مغادرة المختبر، يجب توفر مغسلة واحدة على الأقل خاصة بالأيدي.

14- تجنب الأكل والشرب ومضغ العلكة وتخزي ن الطعام والتدخين ووضع مستحضرات التجميل في المختبر.

15- القيام بتدابير وقائية خاصة في حال تلوث المجاري الفموية أو التنفسية بمواد معدية.

16- ارتداء المعاطف المختبرية إلزامي، ويجب أن تخلع عند الخروج من المختبر.

17- ارتداء الملابس المختبرية النظيفة فقط في حجرة الطعام والمكتبة والمناطق غير المختبرية.

18- يتوجب تعقيم المهملات بالحرق أو بالتعقيم الحراري(بالأوتوكليف)

19- تجنب التماس مع الأحياء المحورة وراثي اً والعوامل البيولوجية الخارجية ،ويتم إحراق القفازات المستعملة.

20- يجب أن يكون باب المختبر مغلقاً طوال الوقت.

21- يجب أن يتم التعامل مع الكيميائيات المنتجة للأبخرة تحت ساحبة الهواء.

22- تعلق لافتات التحذير ضد الخطورة الحيوية في المختبر وبشكل إلزامي.

23- يتوجب نقل المواد المتوجب حرقها أو تعقيمها بالحرارة داخل حاويات غير نفوذة .

24- يتوجب توفر المعقمات الفعالة من أجل التعقيم الروتيني والاستعمال الآني عند حدوث انسكاب للمواد.

25- تعقيم كل المواد الملوثة قبل التخلص منها.

26- يسمى مسؤول عن أمان كل مختبر لمتابعة تنفيذ إجراءات الممارسات الجودة والتقيد بها.

قواعد وتعليمات هامة للعاملين في مختبرات التقانات الأحيائية :

1- كن صبوراً أثناء العمل ولا تبدأ أي تجربة ما لم تكن متأكداً من كل الخطوات.

2-لا تستعمل أي آلة ما لم تكن متأكداً من كيفية الاستعمال المناسب لها . إذا كنت لا تعرف كيفية الاستعمال، عد إلى دليل نشرة الاستعمال أو اسأل الاخرين.

3-لا تلمس أو تضع أي جهاز بكفوف ملوثة.

4-إذا سكبت أو لوثت بأي مادة سامة أو مسرطنة أو مضاد حيوي، طهر المنطقة الملوثة أو الجهاز الملوث فوراُ . إذا كنت لا تعرف كيف تنظفها أو تطهرها ، أسأل الأخرين أو انظر في صفحة بيانات Material safety Data sheet (MSDS) السلامة الخاصة بالمادة.

5-البس كفوف بلاستيكية ومعطف مختبري أثناء التعامل مع مواد سامة أو مسرطنة (مثل بروميد الايثيديوم ، فينول، كلوريد السيزيوم ... الخ)

6-البس واقي للعين أو للوهج عند استعمال أشعة فوق بنفسجية.

7-إذا تلوث الجسم أو الملابس بالمواد الكيميائية أو المضادات الحيوية أو المسرطنة، مباشرة اخلع الملابس الملوثة واغسل الانسكابات الصغيرة تحت الماء لمدة خمس دقائق على الأقل . الانسكابات على الأرجل يمكن غسلها في المغسلة ، لا تتردد باستعمال الدوش في المختبر عند الانسكاب الكثير . لا تغسل الجلد الملوث بالكحول .

8- بعد استعمال لأي مادة كيميائية أو أنزيم أو مادة مذيبة ... ، يجب اعادتها إلى مكانها.

9- قبل أن تستعمل البقايا الأخيرة من أي مادة، اطلب شراء المادة الضرورية.

10- معظم الأنزيمات غالية الثمن . احفظها في ° 21 - م . احسب الكمية التي تريدها وخذها حسب الحجم المناسب لك من المجمدة.

11-استعمل رأس ماصة جديد لإزالة الكمية الضرورية من الإنزيم.

12-الأجهزة المختبرية غالية الثمن وأحيانا خطرة (مثل جهاز الطرد المركزي) لذلك لا تستعمل أي جهاز لا تعرفه ما لم تسأل الآخرين.

13-ان بروميد الايثيديوم سام جداً ومن المحتمل أن يسبب السرطان، ويجب أن يستخدم بلبس الكفوف البلاستيكية على الدوام . ويجب أن يحصر استعماله في منطقة مخصصة وهو يتبخر عندما يسخن (مثلاً عند صب هلام الاكاروز .)لا يسمح باستعماله في المطبق على الأخص في الميكروويف ولا يسمح باستعماله في مختبر زراعة الأنسجة النباتية ولا في مختبر البيولوجيا الجزيئية خارج ساحبة الغازات السامة.

14-الأشعة فوق البنفسجية ضارة ومؤذية للعيون والجلد – البس نظارات واقية خاصة لذلك على الدوام عند استعمالك مصدر أشعة فوق بنفسجية.

15- يجب غسل الأيدي بعد أي عمل في المختبر وخصوصا قبل أكل الطعام.

16- يجب على كل العاملي ن أن ي عرفوا إجراءات الاستجابة للطوارئ

17-البس نظارات وقفازات واقية والتي تستعمل لمرة واحدة، والبس معطف ذو كم طويل .ومن الأفضل عدم لبس عدسات لاصقة، إنما نظارات.

18- البس نظارات واقية عندما تتعامل مع النتروجين السائل.

19-يجب على كل العاملين والزوار والطلاب أن يعرفوا أماكن النافورة المقلوبة لغسل العين ودوش الطوارئ.

20- لا يسمح بالأكل والشرب أو التدخين في المختبرات، ومخالفة ذلك سوف تعرض المخالف للعقوبة الشديدة والفورية.

21- يجب على النساء الحوامل أن تخبر الشخص المسؤول في حال وجود الحمل . في حالات الطوارئ المستلزمة معالجة طبية، ي جب إتباع التعليمات العامة التالية :-

أ -ابق هادئاً. ب -إجراء الإسعافات الأولية أو الإجراءات المنقذة للحياة إذا لزم الأمر. ج -اطلب الطوارئ أو الإسعاف فوراً د -لا تنقل الشخص المصاب ما لم ي كن هناك ضرورة ملحة جداً من استمرار الضرر. ه -حافظ على الشخص المصاب دافئاً.

22- يتطلب مدى وحجم المادة الخطرة المستعملة في المختبرات التخطيط المسبق لإجراءات الأمان اللازمة الخاصة بالتعرض للمواد الكيميائية.

23- التعرض للمواد البيولوجية خارج حجرة الأمان البيولوجي(جهاز العزل الجرثومي) سوف يولد نوع من الضباب أو ايروسول، والذي يمكن أن ينتشر في كامل جو المختبر.

24- البس قفازات واقية والتي تستعمل لمرة واحدة.

25- بلل منديلاً ورقياً بمادة مطهرة وامسح المنطقة الملوثة.

26- ضع المنديل الورقي الذي مسحت به في الكيس البلاستيكي المخصص للنفايات.

27- نظف المنطقة الملوثة بمنديل نظيف مبلل بمادة مطهرة مرة أخرى، ثم جفف المكان بمنديل أخر .

28- انتبه واعلم أن الكائنات الحية المهندسة وراثياً يجب ألا تتلامس مع البيئة أبداً، ولذلك لا تسكبها في المغسلة قبل التعقيم بالأوتوكليف.

29- بعض القواعد العامة والهامة : + لا تركض في المختبر + افتح الأبواب بهدوء + احمل المواد أو المذيبات الكيميائية العضوي ة في سلة + نظف مكان العمل بعد الانتهاء من عملك . + اتلاف الزجاجيات، سلالات البكتيريا أو المواد الكيميائية يمكن أن يسبب ضرراً ويخرب عمل كل الأشخاص في المختبر لأسابيع طويلة حتى يكشف السبب لذلك :

أ - عندما تزن أي مادة كيميائية، لا تضع أي بقايا في أداة الوزن ثانية في وعائها بل ارمها.

ب - نظف الزجاجي ات المستعملة بشكل جيد بعد الاستعمال.

ج - يجب أن تنظف أجهزة الترحيل الكهربائي، قضبان التحريك المغناطيسية وملعقة الوزن مباشرة بعد الانتهاء منها من قبل الشخص المستخدم، أولاً يجب تنظيفها بمسحوق تنظيف ثم بالماء الجاري ، ثم بالماء المقطر.

تعليمات واحتياطات عامة للعمل في مختبرات البيولوجيا الجزيئية:

1 - يجب أن ي تم تداول كل المواد الكيميائية والكواشف في الظروف المحددة حسب مقاييس الايزو ISO 17025 أو ISO 9001:2000 أو ما يماثلها .

2- تتطلب الإجراءات خبرة في العمل تحت شروط معقمة.

3- تنظيم المختبر، مثل اتجاه انسياب الهواء أثناء تحضير مكونات تفاعلPCR والذي يجب أن يتم حسب الشروط والتعليمات المحددة من قبل الجهات المعنية مثل ايزو(Codex Elimentarius Commission (CEN اللجنة الدولية لمستويات أو مواصفات الغذاء .

4 - يجب أن تخزن مكونات تفاعل PCR ويتم تداولها في غرفة خاصة وتجمد في جهاز لم تستعمل فيه قبل ذلك أي أحماض نووية(باستثناء بادئات PCR أو مجسات)أو أنزيمات محطمة أو مفككة أو معدلة للدنا . تتطلب كل تداولات مكونات PCR أدوات خاصة لذلك، وخاصة الماصات.

5 - يجب أن تعقم كل الأجهزة قبل الاستعمال، يجب إزالة أي بقايا للدنا. كل المواد المستعملة(مثل الأنابيب، الأوعية، رؤوس الماصات وغيرها) يجب أن تكون مناسبة لتطبيقات PCR والبيولوجيا الجزيئية . يجب أن تكون خالية من الأنزيمات المفككة للدنا وخالية من الدنا ومعقمة ويجب ألا تمتص بروتين أو دنا.

6 - لتجنب التلوث، ينبغي استعمال رؤوس ماصات مزودة بفلتر حماية لمنع بخار الايروسول.

7 - استعمل كفوف بلاستيكية خالية من البودرة وتستبدل بشكل متكرر.

8- نظف سطوح طاولات المختبر والأجهزة بشكل دوري بهيبوكلورات الصوديوم تركيز% 11

9 - يجب فحص الماصات دوري اً من حي ث الدقة والمعايرة عند الضرورة.

10- كل خطوات العمل(ما لم يذكر خلاف ذلك)يجب أن تتم بدرجة - 4 °م .

11- لتجنب مرات التذويب والتجميد، يجب تحضير كميات صغيرة موزعة في أنابيب تستعمل لمرة واحدة .

المصادر

1- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

3- خيرالله ، حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية ، كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ج١ النظري ، كلية الزراعة – جامعة بغداد – وزارة التعليم العالي والبحث العلمي ، العراق .

4- الهيكلية الوطنية للسلامة الأحيائية في الجمهورية العربية السورية 2006 www.pdffactory.com

المحاضرة الخامسة عشر: دور التقنيات الحياتية في معالجة بعض مشاكل التلوث البيئي .

محيط الأرض الحيوي .

تشكل الكائنات الحية غطاء حي متجدد على سطح الكرة الارضية يدعى بالغلاف الحيوي ،فيحدد ابتداءً من التربة بما يسمى بقشرة التربة التي تنتج من تحلل الصخور التي تليها ، وفي الغلاف الجوي ترتفع حدود المجال الحيوي الى نهاية طبقة الغلاف الجوي Troposphere، اما حدوده في الغلاف المائي فتصل أعماق سحيقة سوف نأتي فيما بعد الى تحديدها . أما الغلاف اليابس أو سطح القشرة الارضية ، فيستعمل من أجل تثبيت النباتات ونموها ودعمها ودعم حياة الحيوانات ، فضلاً عن أن اكثر الاحياء توجد في الطبقة العليا من القشرة الارضية التي توجد فيها جذور النباتات والديدان والحشرات وتعتبر طبقة غنية بالأحياء ، وقد تمتد لعمق 8 أمتار .أما في الهواء فتتركز معظم الكائنات الحية في طبقة رقيقة تتراوح ما بين 50 – 70 م من سطح الارض . أما الاحياء في الغلاف المائي فأنها تمتد من سطح الماء وحتى أعماق سحيقة في البحار والمحيطات كالبكتريا والاسماك لما يزيد على 10000م ، بينما النباتات الخضراء فلا يتعدى وجودها عمق 200 – 400 م الذي تصل أليه أشعة الشمس .

أهمية المحيط الحيوي

تمثل المادة الحية دور بالغ الأهمية على القشرة الأرضية حيث تشارك الكائنات الحية في تفتيتها وتكوينها ، كما أن بعض المعادن المفيدة تشارك في تشكيل التربة وتغير التضاريس ، بمعنى آخر فأنها عوامل نشطة في ديناميكية الغلاف الحيوي ويمكن أجمال تلك الاهمية بما يلي:

1- تلعب النباتات والحيوانات دور هام في تحليل الصخور وتفتيتها .

2 - نتيجة للنشاط الذي تقوم به الاحياء يحصل تجمع للمعادن من عميات الأكسدة للبكتريا الحديدية .

3 - تؤثر الكائنات الحية(نباتية أو حيوانية) على تشكيل التربة بمشاركة العوامل الجوية المختلفة .

4 - تساعد الكائنات الحية في تشكل التضاريس في المواقع الضحلة نتيجة لتجمع النباتات والكائنات البحرية .

5 – تعتبر النباتات الخضراء محولة للطاقة الشمسية الى طاقة من نوع أخر هي مصدر طاقة تعتمد عليها الحيوانات .

6 – تساعد الكائنات الحية في تنقية المياه من خلال امتصاص بعض الخصائص المعدنية في الماء كما تصبح غنية بالأوكسجين عند نمو الطحالب .

العلاقات الحيوية

تمثل العوامل البيئية أهمية خاصة في توزيع الكائنات الحية من خلال التأثير المتبادل والعلاقات المتبادلة بين الكائنات الحية . وتحدد العوامل البيئية توزيع النباتات والحيوانات والمظهر الخارجي للمجموعة الحيوية . ومن عناصر العوامل البيئية هناك العلاقات النباتية Phytogenic وتمثل العلاقات المتبادلة بين مختلف الأنواع النباتية مثل التطفل Parasitism و التكافل Symbiosis والمنافسة Competition . والعلاقات الحيوية Zoogenic وتمثل العلاقات المتبادلة بين الحيوانات مثل المعايشة Commensalism و التكافل Mutualism و المنافسة Concurrence والتعاون Cooperation و التطفل Parasitism .

النظام الحيوي البيئي Ecosystem

ترتبط الكائنات الحية (حيوان ونبات) مع بعضها من خلال اعتمادها او تبعيتها المباشرة او غير المباشرة لظروف الموقع الجغرافي لتشكل وحدة متكاملة . اما اذا لم يكن هناك علاقات متعددة ومستقرة لفترة معينة بين النباتات والحيوانات فأن ذلك لا يعني أنها تشكل تعايش حيوي يتكون من تعايش نباتي وتعايش حيواني وتعايش الكائنات الحية الدقيقة .أما النظام الحيوي فانه يمثل نظاماً بيئياً تشارك فيه عناصر طبيعية مناخية وتربة وماء وحيوانات ونباتات وكائنات حية دقيقة وتكون هذه العناصر بمنطقة معينة دون غيرها مما يؤدي الى وجود نظام بيئي خاص .

يتميز كل نظام بيئي بوجود سلسلة غذاء تنتقل خلالها المادة كالطاقة من المستوى الادنى(المنتجون الأوائل) كالنباتات الخضراء الى المستوى الاعلى(المستهلكون الدرجة الثالثة) وهي الحيوانات آكلة اللحوم وكل مرحلة تنتقل اليها المادة والطاقة تسمى بالمستوى الغذائي وفي كل نظام بيئي هناك خمسة مستويات تغذية هي :

1- المستوى الغذائي الأول : يتكون من النباتات الخضراء (الغطاء النباتي) .

2 - المستوى الغذائي الثاني : يتكون من المستهلكين من الدرجة الاولى ، أي الحيوانات الصغيرة آكلة الاعشاب كالأرانب.

3 - المستوى الغذائي الثالث : يتكون من المستهلكين من الدرجة الثانية مثل ابن عرس والثعالب.

4 - المستوى الغذائي الرابع : يتكون من المستهلكين من الدرجة الثالثة وتمثلها الحيوانات العليا آكلة اللحم كالصقور.

5 - المستوى الغذائي الخامس : يتكون من المحللين كالبكتريا كالفطريات.

الكتلة الحيوية Biomass

هي مجموع الوزن الكلي للمادة الحية والذي تحصل عليه من الطاقة الشمسية ، بمعنى أخر ان الكائنات الحية في النظام البيئي ترتبط بكمية الطاقة التي يمكن للنباتات الخضراء ان توفرها لها.

التنوع الحيوي :

نعني بالتنوع الحيوي تباين الكائنات العضوية الحية المستمدة من كافة المصادر بما فيها النظم البيئية الارضية والبحرية والاحياء المائية ، لذلك للمحافظة على التنوع الحيوي يجب المحافظة على الموارد الأحيائية والموارد البيئية والاجناس والعناصر الحيوانية والنباتية التي لها قيمة فعلية أو محتملة للبشرية . وقد تعرض التنوع الاحيائي لنقص خطير بفعل الانشطة البشرية التي تؤثر على امكانية حصول البشر في المستقبل على حاجاتهم من الطعام والدواء . وهذا ما يبين أهمية التنوع الحيوي . والذي يجلب انتباهنا ثلاثة متغيرات ناتجة عن تراجع التنوع الحيوي هي :

1- فقدان الوفرة بحيث ينقص عدد افراد النوع الواحد بشكل كبير .

2 - فقداف النوع .

3- اضطراب وعدم انتظام النظام البيئي .

الاضطرابات والمشاكل البيئية .

تواجه العديد من بلدان العديد من التحديات البيئية العالمية أو العابرة للحدود في أوائل القرن 21 مثل تغير المناخ وفقدان التنوع البيولوجي وإدارة الموارد المائية المشتركة وتلوث الهواء ، والتخلص من النفايات. نتيجة لذلك ، فإن هذه البلدان في حاجة متزايدة للعمل سويا لمواجهة هذه التحديات. فمثلاً ورثت بلدان أوروبا الشرقية كمية كبيرة من المشاكل البيئية الخطيرة من أكثر من 40عاما من الحكم الشيوعي. وقد تجاهل اقتصادهم تماما آثار التلوث بالمقارنة مع اقتصادات أوروبا الغربية ونتيجة لذلك ، تعانى العديد من المناطق من التلوث الشديد بالإضافة إلى التدهور البيئي. وقد زاد من حدة المشكلة المرتبطة بإدارة النفايات، الاستيراد والاستخدام الشامل للمواد غير قابلة لإعادة التدوير وخصوصا على المستوى المحلي ، بما في ذلك ارتفاع كبير في الكمية الإجمالية للنفايات البلدية. كما ان وجود الكيماويات الخطرة المهجورة لا يزال قضية رئيسية. ومن المخاوف الناشئة تلك الخاصة بأنواع جديدة من المواد الكيميائية الخطرة "واسواق النفايات الخطرة " غير الرسمية.

من جهة ثانية يُعد التعدين (التنقيب عن النفط) هو النشاط الاقتصادي الرئيسي في المنطقة. والتربة هي المستقبل الرئيسي للتلوث الناتج عن التعدين عن طريق تسرب الملوثات في المياه الصناعية المتبقية ، فضلا عن ترسب الجسيمات من الهواء. هذه المتبقيات تزيد من تركيز المواد الكيميائية شديدة السمية في التربة، وخصوصا في المنطقة القريبة من مصادر التصنيع . لذلك النفايات الخطرة وإدارتها هي مشكلة ثابتة في معظم البلدان ،فمعظم المجتمعات بجوار الانهار تفتقر المواقع المناسبة للقمامة وترى المخلفات ملقاة على ضفاف النهر. وتلوثت المياه الجوفية من المواد العضوية وغيرها من الملوثات الناتجة عن الصناعات الكيميائية في المجتمعات الحضرية الكبيرة ومصادر أخرى مثل الزيت والمياه المالحة. ووجود المواد الكيميائية الخطرة المهجورة لا يزال يمثل قضية رئيسية ، بالاضافة إلى هذا أنواع جديدة من المواد الكيميائية الخطرة. كلا تجد طريقها إلى اسواق النفايات الخطرة. وهناك فئة خاصة من المشاكل تمثلها الحقول البنية والعديد من المواقع التي دمرت من مجموعة متنوعة من مشاكل النفايات ذات الصلة.

وهناك مشكلة هامة وملحة وهى استيراد النفايات الخطرة والمواد الكيميائية السامة غير المشروع أو "شبه غير مشروعة" من بلد إلى آخر. إن وجود مستويات عالية من المعادن الثقيلة السامة مثل الرصاص والكروم والنحاس والنيكل في الهواء يسبب صداع يأتي في خمس دقائق .

لذلك إنشاء نظام فعال لحرق النفايات والنفايات صديقة البيئة تسهم في الحد من تفاقم المشكلة . كما يمكن تقديم خمس خطوات مرتبة "حسب الأولويات" للتعامل مع النفايات على النحو التالي :

1- التخلص من النفايات . 2- إعادة استخدام المنتجات . 3- إعادة تدوير / التسميد .

4 - استعادة الطاقة عن طريق الحرق . 5- التخلص في مواقع الطمر .

ومن الافضل أن يطبق هذا التسلسل بمرونة من جانب الدول ، وان تكون من اهم الأولويات الحد من التخلص من النفايات في مواقع الطمر ، وزيادة إعادة تدوير النفايات.

المجسات الحيوية Biosensors

المجسات الحيوية هي استعمال الخلايا الكاملة أو مشتقات الخلايا أو الانسجة ومنها الانزيمات والاجسام المضادة أو مشتقات الانسجة لتكون عناصر حيوية لتُميز الملوثات ، وتُعد من أهم الوسائل التي قدمتها التقنية الحيوية الى عالم البيئة للكشف عن التلوث البيئي ، و تميل التوجهات الى استعمال الاحياء المجهرية وبشكل خاص البكتريا في تحضير وسائل لكشف التلوث البيئي ، وذلك للأسباب التالية :

(أ) كونها سريعة الاستجابة (ب) انخفاض تكاليف إنتاجها (ج) تعطي نتائج متطابقة عند الاعادة

وقد استعملت تقنيات الهندسة الوراثية تقنية دمج ممهدات بروتينات الصدمة الحرارية مع جينات الاعلان Fusion based sensor في ظاهرة الوميض الحيوي ، وقد طورت هذه المجسات بتحوير الخلايا لتسمح بدخول مواد تساعد الخلايا للقيام بالعمل عليها ككواشف للتلوث .وتكون المجسات الحيوية أكثر كفاءة وفائدة عندما تكون الخلاياها معزولة من البيئة المستهدفة ، إذ تكون المجسات صالحة لمدى معين من التراكيز وهي دون المميتة ، وعند ارتفاع التراكيز تصبح سامة للخلايا وتقل الاستجابة وذلك لوجود الموازنة بين الاستجابة للاجهاد والتأثير السام للمادة الحاثة . وقد تم تصنيع العديد من المجسات الحيوية البكتيرية باستعمال خلايا منهدسة وراثياً لإنتاج اشارات يمكن قياسها عند الاستجابة لعوامل الاجهاد . وتشمل تقنية الهندسة وضع مورثات معينة مطلوبة مع مورث الاعلان مثل بروتين الوميض من البكتريا البحرية ، فقد أمكن تحضير مجسات من بكتريا Acinetobacter للكشف عن التلوث بالفينول وذلك من خلال وضع الممهد الخاص بإنزيم نزع هيدروجين الفينول Phenol3- hydroxyacyl – CoA- dehtdrogenease (hcd) الى يسار مورث الوميض الحيوي luxCDABE وأعطت السلالة وميض عند وجود تراكيز من الفينول تتراوح بين 5- 100جزء بالمليون . ويمكن استعمال مورثات اعلان أخرى مثل مورث انزيم β-galagtosidase الذي يمكن قياس نواتجه لونياً عند التعبير عنه .وأن المجسات المعتمدة على الخلايا الكاملة تسجل الملوثات بمستوى قريب من تلك المسجلة بالطرق التقليدية ، كما أنها كفوءة في تسجيل التلوث بمادة عندما تكون ضمن خليط من المواد . ومن المجسات التي تم تحضيرها من الخلايا الكاملة مجسات لتحديد النفثالين nahG في البكتريا *Psedomonase fluorescens* . وكذلك للكشف عن التولوين وغيرها من المركبات للتلوث بمشتقات النفط . وبذلك تحقق المجسات الحيوية التوجهات التي يطلق عليها Nano-tchnology.

السلامة الحياتية .

بالنسبة للكائنات المعدلة وراثياً، ففي الوقت الراهن، وفيما يخص تطبيقات التقنيات الحيوية على بعض المحاصيل والأغذية، **يوجد اتجاهان:**

الاتجاه الأول يضم أولئك الذين يرون أن التقنيات الحيوية والهندسة الوراثية هي الوسيلة الناجعة التي تشبع الأفواه الجائعة وإنتاج ما يكفي من الغذاء لتلبية حاجات الشعوب المتزايدة باضطراد، وتخفف من سوء التغذية، وتؤكد على السلامة الغذائية المستقبلية في العالم وتعزز ثروة المجتمع .و يدعم أنصار هذه المجموعة أيضاً تطبيقات التقنيات الحيوية التي تقلل الحاجة لاستخدام المبيدات الزراعية، وبالتالي حماية البيئة ومصادرها الطبيعية وخاصة الغابات والتنوع الحيوي .**أما الاتجاه الثاني** فيضم أولئك الذين يعتبرون أن السلامة الغذائية والمعايير الصحية في السلع الزراعية يجب أن تؤخذ بعين الاعتبار .ويرى أنصار هذا الاتجاه أن هذا تعامل خطر مع الطبيعة وسيؤثر على الصحة والبيئة بشكل معاكس ويتعذر اجتنابه، ويتعلق أيضاً بحماية البيئية، والخوف والقلق المنبعثين من أن إطلاق المحاصيل المعدلة وراثياً في القطاع الزراعي ستنجم عن آثار سلبية في البيئة المحلية بسبب المخاطر المحتملة التي تخلقها بعض طرائق التقنيات الحيوية على صحة الإنسان والحيوان

والآثار البيئية بالإضافة إلى الآثار الاقتصادية والاجتماعية، وأشاروا إلى احتمال كبير بأن تقضي على سبل عيش المزارعين الصغر، وبرغم ذلك فالأخطار غير معروفة ولا يمكن التنبؤ بها .وقد قدم أنصار كلا الاتجاهين دلائل مدعومة بالعلم.

من خلال الآراء المتعارضة المذكورة سابقاً، نرى أنه من الواضح أن التقنيات الحيوية هي علم قلَّ من يدركه من الاختصاصيين وصانعي القرار والمنفِّذين والمستهلكين والمزارعين .والشيء الواضح والأكيد هو أن تطبيق التقنيات الحيوية هو من أهم تحديات هذه الألفية الجديدة والتي تتيح بلا شك فرصاُ جديدة لمعالجة المشكلات الزراعية التي عجزت التقنيات التقليدية عن حلها ولكن هذه التقنيات غالبا ما تطورها الشركات الكبرى المتعددة الجنسيات وباستثناء بعض الحالات فإنها لم تعد بعد بالفائدة على صغار المزارعين.

ومن جهة أخرى، يجب إلقاء الضوء على التزايد السريع للأفواه التي هي بحاجة ماسة للغذاء في العالم، وخاصة في الدول النامية حيث سيصل عدد سكان العالم إلى 15.7 بليون نسمة بحلول العام 2025 وفي العراق يبلغ عدد السكان حاليا حَوالي 37 مليون نسمة ومن المتوقع أن يصل هذا العدد إلى 45 مليون نسمة بحلول العام 2025 ، ولا شك أن العلم والتطور التقني سيلعبان دوراً هاماً في مضاعفة إنتاج الغذاء .لذا يحتاج المزارعون والمجتمع إلى الاستفادة من إمكانيات التقنيات الحيوية الجديدة التي تواكب متطلبات إنتاج الغذاء .وعموماً تفتقد معظم الدول النامية القدرات الكافية لاستثمار التقنيات الإحيائية لتوفير متطلباتها الضرورية بزيادة إنتاج الغذاء .ويدعو هذا الأمر إلى الحاجة إلى بناء القدرات لتطبيق أسس إدارة مناسبة للتقنيات الإحيائية، وإدخال إجراءات السلامة الإحيائية اللازمة حيز التنفيذ.

إن للمستهلكين مطلق الحق لمعرفة محتوى الغذاء الذي يتناولونه .وفي آن واحد، نحن نبحث عن حماية التنوع الحيوي المكتشف وغير المكتشف والحدود البيئية .إن الدول النامية معنية بالآثار البيئية للتقنيات الحيوية الجديدة على مستوى المزارعين ذوي الحيازة المحدودة .وهناك إجماع على أن للقرويين الحق بحماية معرفتهم الفطرية، وتعويضهم عن استثمار أراضيهم .وهناك إدراك دائم أن إدخال النباتات والمواد الحيوانية المهندسة وراثياً يمكن أن تستخدم كوسيلة اقتصادية تؤدي إلى خسائر مهددة لحياة المزارعين الصغار.

وعموماً تفتقد معظم الدول النامية القدرات الكافية لاستثمار التقنيات الإحيائية لتوفير متطلباتها الضرورية بزيادة إنتاج الغذاء .ويدعو هذا الأمر إلى الحاجة إلى بناء القدرات لتطبيق أسس إدارة مناسبة للتقنيات الإحيائية، وإدخال إجراءات السلامة الإحيائية اللازمة حيز التنفيذ. وباعتبار أن العراق بلد منتج ومصدر للغذاء والمنتجات الغذائية، ومع الأخذ بعين الاعتبار الاهتمامات الخاصة لكل من المنتج والمستهلك، فقد أخذ العراق هذه القضايا بشكل جدي .ففي الوقت الراهن لا يوجد إنتاج تجاري ولا استيراد محاصيل مهندسة وراثياً .وإننا نشجع أبحاث التقنيات الحيوية لدراسة مدى معرفة باحثينا في هذا المجال ولتطوير التقنيات التي تخدم أهدافنا الاستراتيجية بالاكتفاء الذاتي لإنتاج المنتجات الغذائية والأغذية الكافية والرخيصة للناس .بالإضافة لذلك لابد للحكومة العراقية من تقديم معلومات للمستهلكين والمنتجين وصانعي القرار كجزء من عملية التوعية الشعبية وتعزيز الإدراك الأفضل للتقنيات الحيوية وتطبيقاتها ونتائجها .ويجب أن نضع في أذهاننا أن حقوق المستهلكين هي الأهم والتي ينبغي أن تُحترم .وتوضع موضع التنفيذ الإرشادات والتشريعات المنظمة للسلامة الحيوية والموضوعة من قبل لجنة الأمان الحيوي الوطنية والتي تضم أعضاء ممثلين عن كافة الجهات المعنية في القطر، مع التأكيد على أن نقل الكائنات الحية المعدلة وراثياً عبر الحدود ليس لها آثار سلبية على حماية التنوع الحيوي.

إن للمستهلكين مطلق الحق لمعرفة محتوى الغذاء الذي يتناولونه .وفي آن واحد ، نحن نبحث عن حماية التنوع الحيوي المكتشف وغير المكتشف والحدود البيئية .إن الدول النامية معنية بالآثار البيئية للتقنيات الحيوية الجديدة على مستوى المزارعين ذوي الحيازة المحدودة . وتعويضهم عن استثمار أراضيهم .وهناك إدراك دائم أن إدخال النباتات والمواد الحيوانية المهندسة وراثياً يمكن أن تستخدم كوسيلة اقتصادية تؤدي إلى خسائر مهددة لحياة المزارعين الصغار.ومن المناسب هنا الإشارة إلى أنه لا توجد حالياً أي أنشطة لمنظمات غير حكومية في العراق تعالج قضايا التقنيات والسلامة الحيوية .وأيضاً لا توجد شركات تطبق طرائق التقنيات الحيوية الحديثة أو تُقدم محاصيل معدلة وراثياً . علاوة على ذلك ، لا يوجد هناك شركات مانحة في مجال التقنيات الحيوية في العراق.

وفي ضوء التطورات الحديثة والتقدم في مجال الكائنات المعدلة وراثياً والمنتشرة عالمياً يأتي **مشروع تطوير الهيكلية الوطنية للسلامة الأحيائية في الجمهورية العراقية** ليضع الاطار التنفيذي للهيكلية الوطنية للسلامة الأحيائية في العراق واجراء تقييم للوضع الراهن للتقنيات الحيوية والأمان الحيوي والقرارات والتشريعات والقوانين النافذة ذات العلاقة بالأمان الحيوي ونظام التعامل مع الطلبات والاشعارات حول

استيراد وتصدير الكائنات المعدلة وراثياً، بالإضافة إلى كَيفية ضمان سرية المعلومات ، ناهيك عن تحليل موضوع بناء القدرات في المجالات المختلفة ذات الصلة ومناقشة جميع الجوانب الأخرى ذات العلاقة بالسلامة الاحيائية.

المصادر

1- الاسعد، نور والخياط ، غسان حمادة و خنشور ، أنس والطاهر ، عبد الله وعبد القادر ، أحمد . 2010 .الكشف عن وجود منتجات معدلة وراثياً في الاسواق المحلية . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية 26(2): 311- 326 .

2- الخفاجي ، زهرة محمود . 1990. التقنية الحيوية .

3- الخفاجي ، زهرة محمود . 2008. التقنية الحيوية الميكروبية – توجهات جزيئية .

4- العذاري، عدنان حسن محمد .1999. أساسيات في الوراثة . دار الكتب للطباعة والنشر، جامعة الموصل .

5- الهيكلية الوطنية للسلامة الأحيائية في الجمهورية العربية السورية 2006 www.pdffactory.com

6- خيرالله ،حسام سعد الدين محمد 2015 التقانات الأحيائية النباتية كتاب منهجي لطلبة كليات الزراعة ، الجزء العملي - كلية الزراعة جامعة بعداد ، وزارة التعليم العالي والبحث العلمي – جمهورية العراق .

7- عبيد ، علي إبراهيم علي و محمود ، أحمد عبد الفتاح . 2012. أساسيات التقنية الحيوية . مكتبة المعارف الحديثة .

8- مصادر الطاقة المتجددة والتخفيف من آثار تغير المناخ .التقرير الخاص بشأن مصادر الطاقة المتجددة والتخفيف من آثار تغير المناخ . 2011 . نشر الهيئة الحكومية الدولية المعنية بتغير المناخ .

9- Murphy ,Deins .2007. Plant Breeding Biotechnology .

10- Nandk i shor Jha Production of Haploid Plants (With Diagram). www.biologydiscussion.com/plants/haploid-plants(production of haploid-plants .