

كلية الزراعة

قسم المعاصب الحقيقة

د. زياد عبد الجبار عبد العبيدي



Dr. زيد عبد الجبار عبد العبيدي
محاضرات تربية النبات

Plant Breeding

المحاضرة الخامسة عشر

Dr. Zeyad

التقانات الحيوية وتربيه النبات

مفهوم التقانات الاحيائية : وتعني الاستخدام التقني الموجه للكائنات الحية على المستويين الخلوي والجزيئي لأنماط وتطوير مواد مفيدة للأنسان .

ويقصد أياً بالتقانات الحيوية Biotechnology مجموع التطبيقات العلمية الحديثة التي تعتمد على استخدام بعض الكائنات الحية الدقيقة Microorganisms والخلايا الحيوانية والنباتية ومنتجاتها ، مثل الانزيمات والهرمونات وغيرها لاستغادة منها في تركيب منتجات جديدة، أو تحسين الإنتاج .

ويصنف علم التقانة الحيوية بشكل رئيس الى مايلي : زراعة الانسجة ، علم الاحياء الجزيئي (الهندسة الوراثية والمؤشرات الجزيئية) والتطبيقات المختبرية لتحسين المحاصيل .

أولاً : زراعة الانسجة **Tissue Culture**

يقصد بزراعة الانسجة استخدام جزء من النبات قد يكون البذرة أو جزءاً من الجذر أو جزء من الساق أو جزءاً من الاوراق أو المتك أو حبوب اللقاح على بيئة غذائية عادةً ما تحتوي على العناصر الكبرى والصغرى ومصدر للسكريات ، واغلب ما يستخدم السكروز بيئة غذائية وأحياناً تضاف بعض من منضادات النمو مثل الاوكسينات لتشجيع تكوين الجذور ونموها والسايتوكوينينات لتشجيع نمو الساق والهرمونات التي توجه النبات لتكوين كالوس Callus وهو عبارة عن مجموعة من خلايا منتظمة أو غير منتظمة ، وتعني بكلمة منتظمة أي انها خلايا متشابهة لا يمكن تمييز خلايا خاصة بالجذر أو الساق أو الاوراق ، وزراعة تلك الخلايا المفككة على بيئة غذائية يمكن الحصول على افراد تشبه النبات الام الاصلي في تركيبها الوراثي بكميات كبيرة في اوقات قصيرة ، وتنتم هذه الطريقة في ظروف تعقيميه حيث إن البيئات المستخدمة تكون موطنًا خصباً للكائنات الدقيقة .

أصبحت تقانة زراعة الانسجة النباتية Plant tissue culture من الطرائق الحديثة والمهمة لمربى النبات . وقد خرجت هذه التقانة من دائرة الابحاث الى دائرة التطبيق العملي ، ومن الحيز الضيق الى إلى الأفق الأوسع وهو المجال التجاري .

تستخدم هذه التقنية اساساً في الإكثار السريع وذلك للحصول على أكبر عدد ممكن من النباتات في أقل حيز وفي أقل وقت من السنة . كما استخدمت هذه التقانة لإنتاج النباتات الخالية من الأمراض وخاصة الفيروسية منها من خلال زراعة القمة المرستيمية واستخدام الحرارة أو الكيميائيات لهذا الغرض .

وقد قام علماء تربية النبات بأسنطباط سلالات عالية الانتاج ومقاومة للأمراض واخرى تحمل الملوحة والحرارة العالية والجفاف باستخدام تقانة زراعة الكالس .

وتعد مزارع الانسجة والخلايا والبروتوبلاست المرحلة الاولى والضرورية لتطبيق تقنية نقل الجينات المرغوبة إلى المحاصيل الاقتصادية المهمة ، أو مايعرف باسم الهندسة الوراثية .

ثانياً : أهداف زراعة الانسجة كوسيلة سريعة للتکاثر

- 1- استخدام زراعة الانسجة كوسيلة سريعة للتکاثر
- 2- الحصول على سلالات خالية من الامراض وخاصة الفايروسية منها .
- 3- تربية النباتات المرغوبة فيها والحصول على طفرات أو هجن جديدة وجيدة الصفات
- 4- إنتاج المستحضرات العطرية والطبية والمواد الطبيعية بطريقة اقتصادية .
- 5- استخدام الهندسة الوراثية بصورة أكثر سهولة بإدخال أو نقل صفات جيدة مرغوبة كمادة النواة خلية الام .
- 6- التغلب على مشكلة عدم التوافق الذاتي .
- 7- حفظ التراكيب الوراثية ، يعد عظيماً بالنسبة لعلماء التربية حيث يمكن حفظ انواع معينة في انابيب تحفظ في ثلاجات لإيقاف نموها حتى يُحتاج إليها في عمليات التربية والتهجين المختلفة ، وذلك بدلاً من زراعتها بالحقل مباشرةً والمحافظة عليها في الحقل مما يتطلب كثيراً من الوقت والجهد فضلاً عن امكانية فقدانها في أي لحظة بسبب الظروف البيئية والحيوية في الحقل ولا يقتصر أهمية علم زراعة الانسجة النباتية على هذا فقط بل تمتد إلى أنها تعدّ الوسيلة الفريدة التي لم تكن في متناول العلماء من قبل لدراسة فسيولوجيا النباتات والتطوير البيولوجي للكائن النباتي الحي من صور بسيطة إلى صور متراكبة معقدة البناء ولكنها متوافقة الوظائف .

أوجه الاستفادة من مزارع الانسجة في تربية النبات

أصبحت مزارع الانسجة بأنواعها المختلفة من الادوات المهمة التي يستفيد منها مربى النبات في تحقيق أهداف برامج التربية . ويعد كل من علم زراعة الانسجة والهندسة الوراثية من أحدث العلوم التي يعتمد عليها علم تربية النبات . وسنذكر هنا بعض الجوانب التطبيقية لعلم زراعة الانسجة .

مجالات زراعة الانسجة

1- زراعة الخلايا Cell culture

اول خطوة في عمل مزارع الخلايا هي عزل الخلايا المفردة ، وتم عزل الخلايا المفردة اما بالوسيلة الميكانيكية واما انزيمياً من الاعضاء النباتية واما ان تأخذ من نسيج كالس نامي . يلي هذه الخطوة زراعة الخلايا المفردة على البيئة المناسبة ، وتعد طريقة برجمان من أكثر الطرق شيوعاً في زراعة الخلايا المفردة ، ويراعى في هذه الطريقة ان يكون تركيز الخلايا المفردة في البيئة السائلة ضعف التركيز النهائي المطلوب عند الزراعة ، وتتوقف طبيعة النمو في مزارع الخلايا على تركيز الهرمونات في بيئه النمو حيث انه قد يكون النمو مميزاً اي يتكون نموات خضرية او جذرية او كليهما او قد يكون النمو غير متميزاً اي تتكون كتلة من الخلايا تسمى كالس Callus . وينتاج الكالس من اي نسيج نباتي يتميز برضوخ الجزء النباتي الذي تؤخذ منه الخلايا في بيئه تحتوي على تركيز مرتفع من الاوكسين وتركيز منخفض من السايتوكانيين حيث يتكون الكالس عند ذلك ويمكن ان يستمر بالنمو اما بصورة كتل متعددة الخلايا في البيئات الصلبة او على شكل تجمعات صغيرة من الخلايا في البيئات السائلة ومع استعمال تركيز مرتفع من السايتوكانيين ومنخفض من الاوكسين فإنه يمكن أن تتكون الجذور والسيقان والاوراق .

2- زراعة المتك Anther culture

تفيد مزارع المتك من انتاج نباتات احادية Haploid من حبوب اللقاح ، اما من خلايا تكوين أجنة او من خلال تكوين الكالس . ويفيد ذلك

أ- تستخدم النباتات الاحادية لمجموعة الكروموسومية (n₁) في الحصول على نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية (n₂) أصلية (سلالة) من المحاصيل خلطية التلقيح وذلك بمعاملتها بالكولشيسين ، وذلك يوفر من 6 – 8 أجيال للتربية الذاتية .

ب- تفيد النباتات الاحادية في الحصول على مختلف حالات التعدد الكروموسومي غير التام كما تفيد مزارع المتك بالتعرف على الطفرات المنتخبة بسهولة ، وانتاج اصناف محسنة لبعض المحاصيل في وقت قياسي مثل الحنطة والرز والشعير . وانتاج اصناف من نبات الهليون جميع نباتاتها مذكورة .

3- زرارة البروتوبلاست Protoplast culture

تعرف مزارع البروتوبلاست على انها زراعة الخلايا دون جدرها الخلوية تفيد مزارع البروتوبلازم في عملية دمج البروتوبلازم Protoplasm Fusion عند الرغبة في اجراء تهجينات نوعية بعيدة ، وكذلك عملية ادخال اجزاء غريبة من DNA او بكتيريا او فيروسات معينة في الهندسة الوراثية حيث يتم عزل البروتوبلازم عن الجدار الخلوي ، ويزرع في بيئه مناسبة ، ويتم

هذا بانزيم السيليلوز الذي يحضر من مزارع الفطر . تعد الاوراق الحديثة التكوين أفضل مصادر الخلايا لمزارع البروتوبلازم حيث يعمق النسيج النباتي المستعمل سطحياً ثم تسخن بشرة الورقة أو يقطع الجزء النباتي الى اجزاء صغيرة ، ويوضع في محلول الانزيمات ، ويفضل ان تكون المعاملة بالانزيمات الهاضمة تحت التفريغ لاسراع عملية تخلل الانزيمات بين الخلايا وتستمر المعاملة بالانزيمات نصف ساعة الى ساعة . ثم تزرع في البيئة الملائمة ، ويفضل ان تكون سائلة وتظهر الجدر السيليلوزية حول البروتوبلاست بعد 2 - 14 يوم وقد نجحت هذه الطريقة في العائلة البازنجانية والبطاطا.

دمج البروتوبلاست Protoplast Fusion

تشمل برامج تربية النبات محاولة جمع العديد من الصفات المرغوبة التي يمكن نقلها باستخدام الطرائق التقليدية المستخدمة في تربية النبات . الا ان ظهور اسلوب جديد لنقل هذه الصفات ودمجها بعيداً عن دورة الحياة الجنسية ، والخاصة في النباتات الراقية ، له أهمية كبيرة في علم تربية النبات . هذه الطريقة غير تقليدية تأتي عن طريق دمج بروتوبلاست الخلايا (خلايا منزوعة الجدار الخلوي) داخل المختبر ، ويكون الخليط الناتج عن الدمج والمحتوى على أنوية غير متشابهة ، مما يعرف بالهجين الجسدي Somatic hybrid .

ثانياً : علم الأحياء الجزيئي Molecular Biology

1- الهندسة الوراثية في النبات Plant Genetic Engineering

تعرف الهندسة الوراثية بأنها التلاعب بالمحتوى الوراثي للكائن معين من أجل تغيير صفاته الوراثية . ويشمل التعريف العام كل الطرق التي من شأنها تغيير البنى الوراثية للكائن الحي سواء كان ذلك على مستوى النبات ككل مثل طرق التربية التقليدية كالإدخال أو التهجين أو استخدام الطفرات أو على المستوى الخلوي كالاندماج البروتوبلاستي أو التطفيير خارج الجسم الحي أو على المستوى الجزيئي مثل الطرق المختلفة لклونة الجينات وانتاج الا Recombinant DNA المركب DNA . كل هذه الطرق تعتبر هندسة وراثية ولكن بما ان ظهور مصطلح الهندسة الوراثية كان متزاماً مع تطور التقانات الحديثة في هذا المجال والتي محورها كلونة الجين Gene cloning (التأسبيب أو التنسيل) (لذلك يستخدم هذا المصطلح للإشارة الى هذه التقانات الحديثة فقط .

يعد حقل الهندسة الوراثية واحداً من أحدث الحقول العلمية أذ كانت بدايته الحقيقة مع بداية عقد السبعينيات من القرن الماضي أذ جرت العديد من المحاولات لتكوين تراكيب وراثية جديدة عن طريق اضافة أو حذف معلومات وراثية من المحتوى الوراثي للكائنات المختلفة بغية إنتاج أحياء

ذات مواصفات جديدة تختلف عن مواصفاتها الطبيعية وتكون كفؤة ومفيدة في إنتاج العديد من المواد الطبية والصناعية المهمة إضافة إلى تحسين السلالات وجعلها أكثر مقاومة للأمراض والظروف المناخية القاسية .

أن الفكرة العلمية لتقانات الهندسة الوراثية قد تم تطبيقها من قرون عديدة في عمليات التربية التحسين في النباتات والحيوانات إذ تم اختيار الآباء بالصفات المرغوبة ثم البحث في الأفراد الناتجة بالصفات المطلوبة . فالمقاومة ضد مرض معين أو إنتاج الحليب واللحم أو حجم البذور كلها صفات وراثية تم انتخابها باستخدام طرق التربية التقليدية وبينما تم إثبات نجاح تلك الطرق في استنباط أصناف جديدة إلا أن هناك بعض السلبيات كونها بطيئة وغير كفؤة أحياناً للأسباب التالية خلال التكاثر الجنسي الطبيعي تندمج الصفات الوراثية للأبوين في عملية عشوائية ويطلب الحصول على التوافق المطلوب للصفات المظهرية البحث فيآلاف الأفراد الناتجة من التزاوج . Progeny

- 1- قد يعتمد ظهور بعض الصفات المرغوبة على حدوث التغيرات العشوائية في تتبع الـ DNA (الطفرات العشوائية) ولكن نسبة حدوثها قليلة جداً (واحد بـ المليون لكل نسخة من الجين) وهذا يتطلب البحث في ملايين الأفراد الناتجة عن الصفة المرغوبة .
- 2- يقف حاجز النوع عائقاً صعباً إن لم يكن مستحيلاً لإجراء التهجين بين الأنواع المختلفة من الاحياء .

مؤشرات الـ DNA المفهوم والتطبيقات

المؤشر الوراثي Genetic Marker هو صفة مميزة تستخدم للأستدلال على وجود موقع معين (locus) على الكروموسوم أو الجينوم ، وأن معرفة هذا الموقع يساعد على دراسة توارث صفة معينة أو جين معين فالجينات القريبية جداً من المؤشر تتوارث معه .

وحتى يكون المؤشر الوراثي فعالاً ودقيقاً في التمييز بين الأصناف يجب أن تتوفر فيه الشروط التالية :

- 1- سهل التطبيق وغير مكلف .
- 2- سهل التمييز بين الأصناف المختلفة .
- 3- قابل للتطبيق في أي مرحلة من المراحل العمرية للنبات .
- 4- قادر على الكشف عن التغيرات غير الثابتة Epigenetic variation .
- 5- قادر على التنبؤ بنسبة النباتات النغایرة للصنف Plant – off – type .

وعلى الرغم من صعوبة توفر جميع هذه الشروط في مؤشر بحد ذاته فإن الكثير من الباحثين قاموا ومنذ عدة سنوات بإيجاد العديد من المؤشرات التي تختلف عن بعضها في دقتها وحساسيتها ودرجة تعقيدتها وسهولة استخدامها فضلاً عن المرحلة العمرية التي تطبق فيها .

ومن أنواع المؤشرات :

اولاً – المؤشرات المظهرية Morphological Markers

أن استخدام المؤشرات المظهرية هي الطريقة الأسهل والأقل تعقيداً للتمييز بين الأفراد وتعد اول واقدم طريقة لدراسة التنوع الوراثي ولا يمكن الاستغناء عنها إذ تعتمد على إيجاد التباينات بين الأفراد بالاستناد إلى الصفات المظهرية مثل لون الازهار وطبيعة النمو الخضري أو كمية الحاصل ، الباحثون أشاروا إلى صعوبة تمييز الأصناف أو الانواع عن طريق صفاتها المظهرية وبدون وجود ثمار كون صفات النمو الخضري تتأثر بالبيئة المحيطة وعمليات الخدمة ، إن تأثر هذا النوع من المؤشرات بالظروف البيئية يكون كبيراً إذ يختلف المظهر الخارجي لنفس النبات بأختلاف ظروف النمو الخارجية ، كما ان أعداد تلك المؤشرات قليلة أي انها تمثل عدداً قليلاً من الواقع loci في الجين Genome فضلاً عن ان بعض الصفات المظهرية يتحكم بها اكثر من جين .

ثانياً – المؤشرات الخلوية Cytological Markers

أما الدراسات الخلوية فتتم من خلال دراسة عدد الكروموسومات واحجامها وأشكالها ومقارنة الأفراد على هذا الأساس إذ ان من المعروف ان العدد الكروموسومي لكل نوع نباتي يكون ثابتاً ولكن وجد ان من الصعوبة الاعتماد على العدد الكروموسومي في تشخيص النباتات المغابرة للصنف وذلك لأفتقار هذه الطريقة للدقة المطلوبة في الكشف عن التغيرات والطفرات التي تحدث على مستوى المادة الوراثية الا DNA للنبات .

ثالثاً – المؤشرات الجزيئية Molecular Markers

أ – المؤشرات الانزيمية Isozyme and Allozyme Markers

يمكن تعريف الا Isozyme بأنه الشكل الآخر لإنزيم معين يشبه ذلك الإنزيم بالوظيفة لكنه يختلف عنه في تسلسل الأحماض الأمينية فيه وبذلك يمكن فصلها عن بعض باستخدام المиграة الكهربائية .

أما الا Allozyme فيعرف بأنه الأشكال الانزيمية الناتجة من الأليلات المتعددة للموقع Locus الواحد . ويتميز أفراد النوع الواحد بثبات عدد تلك الإنزيمات الخاصة به لذلك باستخدام التحليل (المigration الكهربائية) يمكن تمييزها عن بعض ويمكن ترحيل هذه الإنزيمات المتظاهرة على هلام الا Polyacrylamide أو النشا.

ب - مؤشرات الا DNA Markers DNA

ان التطور السريع الذي حصل في علم الاحياء الجزيئية Molecular Biology والنجاحات المستمرة التي حققتها الهندسة الوراثية Genetic Engineering وخاصة في عقد الثمانينات والتسعينات من القرن المنصرم قد وفرت الادوات المناسبة للتحليل الجزيئي للمادة الوراثية DNA التي تحكم في صفات الكائنات الحية .

وتعرف مؤشرات الا DNA بانها تتابعات من الا DNA يمكن الاستدلال بها على موقع معين على الكروموسوم او الجينوم تستخدم لدراسة العلاقات الوراثية بين الافراد وإيجاد البصمة الوراثية لكونها تعكس الاختلافات في المعلومات الوراثية المخزونة فيهم ، وهذه الاختلافات اما تكون ناتجة عن الحذف Deletion او الأدخال Insertion او اعادة الترتيب Rearrangement للنيوكليوتيدات في جينوم الافراد المدرسة لأي سبب كان كالطفرات الوراثية لذلك اعتمدت في دراسات التصنيف الجزيئي Molecular taxonomy والدراسات التطورية وفي بناء الخرائط الوراثية كما اصبحت من الادوات المهمة لدراسة التنوع الوراثي Genetic Diversity اذ تعد الاختيار الذي لا بديل له في تطوير الخطط الملائمة لحفظ الانواع ، وبما ان هذه المؤشرات تعكس الاختلافات مباشرة على مستوى القواعد المكونة الا DNA ونظرًا لأن جينوم الكائنات الحية الراقية يحتوي على الملايين من هذه القواعد لذلك فان اعداد هذه المؤشرات كبيرة جداً ، وبالتالي فان لها القدرة على الكشف عن مئات المواقع Loci ولعدة أليلات للموقع الواحد .

تمتاز هذه المؤشرات مقارنة بالمؤشرات الاخرى بانها تظهر التغيرات الذي يحدث على مستوى الا DNA مباشرةً وكما هو معروف فان الا DNA هو المادة الوراثية المستقرة التي لا تتأثر بالبيئة لذا امتازت هذه المؤشرات بالاستقرارية Stability بعكس المؤشرات الوراثية المعتمدة على الصفات المظهرية التي تتأثر بشكل كبير بالظروف البيئية . وكذلك امتازت هذه المؤشرات بكونها تعتمد على مادة الا DNA الموجودة في جميع خلايا الكائن وبشكل متساوٍ لذا فان تحليل أي جزء من ذلك الكائن وفي أي مرحلة عمرية سوف يعكس بالنتيجة حالة الكائن الوراثية وعلى نحو دقيق مما منح هذا النوع من المؤشرات الشمولية وجعلها تتتفوق على المؤشرات المعتمدة تحليل المحتوى البروتيني لذلك الكائن او حتى على ماتمثله هذه البروتينات من متطلبات إنزيمية . ومن المميزات الاخرى لمؤشرات الا DNA هي قدرتها على كشف اعداد كبيرة من التباينات مما جعلها قادرة على ايجاد أي اختلاف مهما كان طفيفاً وبين اقرب الافراد فضلاً عن قدرتها على تتبع التغيرات الوراثية عبر الاجيال كونها تستند الى قوانين مندل في التوارث كما تبرز أهمية مؤشرات الا DNA من خلال تطبيقاتها الواسعة وفي شتى المجالات ومن أهمها ايجاد البصمة الوراثية DNA والتمييز والتشخيص المبكر لاصناف السلالات وتحديد القرابة بينهما DNA Fingerprinting

والتمييز المبكر للجنس في النباتات ومساعدة مربى النبات في تسهيل مهمة التصريب والتهجين أو تطوير اصناف جديدة من خلال تحديد مستوى التغيرات وكذلك فحص النقاوة للبذور وحفظ حقوق مربى النبات لتمييز الاصناف المقاومة للأمراض والكشف المبكر عن الاصابات المرضية .

المؤشرات الجزيئية Molecular Markers

هناك العديد من الصفات المهمة زراعياً كحاصل الحبوب ونوعيتها ، وبعض اشكال مقاومة الأمراض ، ومقاومة الإجهادات اللاحيائية ، يتحكم بها العديد من الجينات ، وتعرف على انها الصفات الكمية (الجينات المتعددة ، أو العوامل المتعددة ، أو الصفات المتعددة) . وتسمى تلك المناطق في الجينوم النباتي التي تحتوي الجينات المرتبطة بصفة كمية معينة بموقع الصفات الكمية Quantitative trait loci (QTLs) . وما يجب فهمه أنه من المستحيل التعرف على موقع الصفات الكمية بالاعتماد على التقييم الشكلي التقليدي . وقد ساعد التوصيف الجزيئي للصفات الكمية بالاعتماد على مؤشرات الحامض النووي الريبي منقوص الاوكسجين DNA (DNA markers) منذ عام 1980 بإعطاء الفرصة العظيمة للإنتخاب غير المباشر لنتائج الصفات المهمة .

تشير المؤشرات الجزيئية أساساً إلى الاختلافات الوراثية التي يمكن تعينها باستخدام تقانة التر Higgins الكهربائي الهلامي ، والتصبيغ الكيميائي (اثيديوم بروماديد أو الفضة) أو الكشف عنها بالمؤشرات المشعة ، أو المسبار Probes الملونة .

وتكون المؤشرات مفيدة إذا أظهرت تباينات بين أفراد النوع الواحد ، أو الأفراد التابعة لأنواع مختلفة . ويطلق عليها اسم المؤشرات المتباينة Polymorphic markers وتشير المؤشرات التي لا تميز بين الطرز الوراثية بالمؤشرات المتماثلة Monomorphic markers .

ويمكن توصيف المؤشرات المتباينة على أنها سائدة Dominant أو خليطة Codominant . ويعتمد هذا الوصف على أساس التمييز مابين الطرز الوراثية المتماثلة Homozygotes والغير تماثلة Heterozygotes .

الصفات المرغوبة بالمؤشرات الجزيئية

- 1- ان تكون متباينة Polymorphic وخصوصاً في دراسات التباعد (التنوع) الوراثي
- 2- أن تكون موزعة بالتساوي ، ويتتابع على الجينوم .
- 3- ان تكون رخيصة الثمن ، وسريعة الكشف .
- 4- أن تكون قابلة لإعادة الإنتاج .