جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة النهرين

تطبيقات في التقانات الأحيائية النباتية

تأليف

ألاستاذ الدكتور كاظم محمد ابراهيم الصميدعي

أستاذ التقانات الأحيائية النباتية

كلية العلوم – جامعة النهرين

بغداد – 2015 ميلادي الموافق 1436هجري

حقوق الطبع محفوظة للمؤلف

جميع حقوق الملكية العلمية محفوظة للمؤلف ولا يُسمح بإعادة طبع أو ترجمة أو إستنساخ الكتاب كاملاً أو فصولاً كاملة منه إلا بموافقة المؤلف خطياً.

Copyright ® All rights reserved

الطبعة الاولى

1436هجري الموافق 2015 ميلادي

المحتويات

العنوان	رقم الصفحة
الفصل الأول: تطبيقات زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات	1
البدايات الاولى	1
النجاحات المتلاحقة	2
ألتطورالمُتسارع لتطبيقات المزارع النسيجية	3
اولاً: إنتاج نباتات مُطابقة لامهاتها	11
ثانياً: إنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	13
ثالثاً: زيادة التغاير الوراثي	13
رابعاً: زراعة البروتوبلاست	14
خامساً: إنتاج نباتات خالية من الفيروسات	15
سادساً: التركيب الدقيق للأفرع الطرفية	17
سابعاً: الإكثار بالأجنة الجسمية	18
ثامناً: إنتاج البذور الصناعية	19
تاسعاً: المُحافظة على المصادر الوراثية	20
عاشراً: إنتاج نباتات مُتحملة للظروف البيئية	21
الحادي عشر: زراعة وإنقاذ الجنين	23
الثاني عشر: إنتاج نباتات مُحورة وراثيا	23
الثالث عشر: إنتاج مُركبات الايض الثانوية	24
الرابع عشر: إنتاج نباتات متغايرة مظهريا	26
الخامس عشر: إنتاج نباتات الكايميرا	26
السادس عشر: إنتاج البروتينات العلاجية واللقاحات	27
السابع عشر: النباتات كمعامل للمطاط ومواد جديدة	28
الثامن عشر: التلقيح بالمايكورايزا	30
الفصل الثاني: الإكثار الدقيق للنبات	31
مقدمة	31
مُختبر الإكثار الدقيق	32
مُستلزمات معمل الإكثار الدقيق	34
فوائد الإكثار الدقيق	36

مراحل الإكثار الدقيق	37
العوامل المؤثرة في الإكثار الدقيق	49
تطبيقات الإكثار الدقيق	54
طرائق التخلص من الفيروسات	56
مكننة الإكثار الدقيق	58
المشاكل المرافقة للإكثار الدقيق	59
إستعمال نظام مزارع الغمر المؤقت في الإكثار الدقيق	60
توظيف المفاعلات الحيوية في الإكثار الدقيق	62
الإكثار الدقيق لنخيل التمر	66
التركيب الدقيق كوسيلة في الإكثار	70
عيوب الإكثار الدقيق	71
التلوث	74
الإسمرار التأكسدي	75
الفصل الثالث: زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات	77
مقدمة	77
فوائد زراعة أنسجة النبات	77
تطبيقات زراعة أنسجة النبات	77
أنواع مزارع أنسجة النبات	79
أساسيات تقانة زراعة أنسجة النبات	80
مزارع الكالس	81
تحفيز نشوء الكالس	82
أساسيات زراعة الكالس	85
العوامل المؤثرة في مزارع الكالس	86
تطبيقات مزارع أنسجة الكالس	89
طرائق زراعة الخلايا المُفردة	95
الأوساط الغذائية	98
الأوساط الصناعية والطبيعية	100
مكونات الأوساط	101
نسبة الاوكسينات الى السايتوكاينينات	107
تحضير الأوساط الغذائية	109

المشاكل المُرافقة لزراعة الكالس والمُعلق الخلوي	111
التخلص من ظاهرة الإسمرار في المزارع النسيجية	114
الفصل الرابع: مركبات الأيض الثانوي للنبات	117
الخلايا النباتية كمصدر لمَركبات الايض الثانوي	117
وظائف مُركبات الايض الثانوي	118
الفوائد المتوخاة من إنتاج المُركبات الثانوية من مزارع النبات النسيجية	119
إستعمالات مُنتجات الايض الثانوي	121
إنتاج مُركبات الايض الثانوي في مزارع النبات النسيجية	124
أمثلة على إنتاجية المزارع النسيجية من مُركبات الايض الثانوية	126
عزل الخلايا المنتجة للمُركبات الثانوية عن غير المنتجة	127
المُفاعلات الحيوية وتقييد الخلايا النباتية	131
تأثير مُكونات الوسط في إنتاج مُركبات الايض الثانوية	135
تأثير مُنظِمات النمو النباتية	139
تأثير البادئات	141
ألمُظهرات وأثرها في زيادة إنتاج مركبات الايض الثانوي	142
طرائق إضافة المُظهرات	146
تأثير العوامل الفيزيائية في إنتاجية مُركبات الايض الثانوي	150
المُعاملة بالإشعاعات وزيادة تراكم مُركبات الايض الثانوية	151
تعريض الزروعات الى الأشعة فوق البنفسجية (UV)	152
زيادة تراكم المَركبات الثانوية بوساطة UV-B	153
زيادة المَركبات الفينولية	155
إعتبارات في تجارب التعريض لأشعة UV	157
إستعمال الموجات فوق الصوتية	159
التحول الحيوي بإستعمال الخلايا النباتية	160
تحرير وتحليل المُركبات الثانوية	160
إنتاج مركبات الايض الثانوي في مزارع نبات الروجة	163
هندسة مُركبات الايض الثانوية	166
الفصل الخامس: زراعة الاجنة والمتوك والبيوض	171
مقدمة	171
الإخصاب خارج الجسم الحي	174

عزل وزراعة الأجنة	179
تقانة إنقاذ الجنين	180
نشوء الأجنة والسويداء	183
زراعة نسيج الجويزاء	186
زراعة نسيج السويداء	187
إنتاج النباتات أحادية المجموعة الكروموسومية (1n)	191
إنتاج نباتات أحادية المجموعة الكروموسومية نسيجياً	198
طرائق زراعة حبوب اللقاح المفصولة	207
زراعة البيضة المُخصبة	208
زراعة البيضة غير المُخصبة	210
زراعة المبايض خارج الجسم الحي	211
زراعة الازهار	214
الحذف الكروموسومي في التهجينات المُتباعدة	215
العقبات التي تواجه زراعة وإنتاج النباتات أحادية المجموعة الكروموسومية	217
النباتات الأحادية المُضاعفة	218
الكشف عن النباتات الأحادية	221
إستعمال تداخل الرنا في العُقم الذكري	222
حفظ حبوب اللقاح	222
أسباب فقدان حبوب اللقاح لحيويتها	224
حفظ حبوب اللقاح بالتجميد الفائق	226
إنبات حبوب اللقاح خارج الجسم الحي	228
الفصل السادس: عزل وتنقية ودمج البروتوبلاست	231
مقدمة	231
تطبيقات تكنولوجيا البروتوبلاست في المجال النباتي	233
عزل البروتوبلاست من خلايا النسيج الوسطي للأوراق	234
طرائق عزل البروتوبلاست	235
تنقية البروتوبلاستات المعزولة	239
تحديد كثافة النشر الطبقي للبروتوبلاستات	240
تحديد حيوية البروتوبلاستات	240

خواص البروتوبلاستات المعزولة	241
العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاستات	242
زراعة البروتوبلاستات لأغراض الهندسة الوراثية	242
زراعة البروتوبلاستات	243
مُعاملة وأقلمة النُبيتات المتوالدة	244
التهجين الجسمي	245
تحفيز الإندماج كهربائياً	247
الدمج بالوسائل الكيميائية	250
إنتخاب البروتوبلاستات المُدمجة	255
الهُجن الجسمية المبنية على سلوك النواة	257
الحالة الكروموسومية للهُجن الجسمية	258
الهُجن السايتوبلازمية	260
إنتاج الهُجن السايتوبلازمية	261
تطبيقات عزل وزراعة البروتوبلاستات	262
التطبيقات العملية للتهجين الجسمي	265
محددات التهجين الجسمي	270
مُنتجات التهجين الجسمي	271
الفصل السابع: الأجنة الجسمية وإنتاج البذور الصناعية	275
مُقدمة	275
الأجنة الجنسية والجسمية	277
مصدر الأجنة غير الجنسية	278
نمو الأجنة خارج وداخل الجسم الحي	281
مراحل تكوين الأجنة الجسمية	282
مقارنة نشوء الأجنة الجسمية بين نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين	285
نشوء الأجنة الجسمية	286
التعبير الجيني أثناء عملية تكوين الأجنة في مغطاة البذور	287
توالد النباتات من الأجنة الجسمية	288
مُنظمات النمو وتحفيز الأجنة الجسمية	289
المُركبات المُرافقة لتكوين الأجنة الجسمية	295
التعبير الجيني أثناء تكوين الأجنة الجسمية	295

أهمية عملية تكوين الأجنة الجسمية	297
إنضاج الأجنة الجسمية وإنباتها	299
السُكون والسُبات والإنبات	300
فصل الأجنة الجسمية عن بعضها	302
البذور الصناعية أو التركيبية	303
تغليف الاجنة الجسمية	304
البذور الصناعية المُغلفة بالجيلاتين الرطب	304
البذور التركيبية قليلة الرطوبة غير المُغلفة	309
البذور التركيبية الرطبة غير المُغلفة	310
البذور التركيبية المجففة والمُغلفة	311
عيوب البذور الصناعية	312
ألإنتاج الواسع من البذور الصناعية	312
الفصل الثامن : التغاير الجسمي وإنتاج الكايمرا	313
التغاير الجسمي	313
مصدر وأسباب التغاير الجسمي	314
إنتخاب التغايرات الجسمية المفيدة	317
عزل وتقويم الطوافر الجسمية	318
المشاكل المرتبطة بالتغاير الجسمي	320
تطبيقات التغاير الجسمي	322
الكايميرا	325
الكايميرا المحيطية	328
الكايميرا الطولية أو الطبقية	331
الكايميرا القطاعية	332
الكايميرا المُتحركة	334
كايميرا التركيب	335
كايميرا مُحفزة بالكولشسين x4 في طبقةL111	335
الكايميرا الكروموسومية أو الموزائيك	335
كايميرا جين النواة	337
كايميرا جين البلاستيدة	337
تمييز أنماط الكايميرات	337

إنتاج كايميرا البرتقال بالتركيب الدقيق	341
فصل الكايميرات في الزراعة النسيجية	344
الفصل التاسع: حفظ المصادر الوراثية	345
مُقدمة	345
الحاجة المُلحة للمحافظة على المصادر الوراثية	346
خزن البذور	347
الخزن المُبرد	348
الخزنتحت الضغط الواطئ (LPS)	348
الخزن تحت ظروف مُستويات أوكسجين مُنخفض (LOS)	348
الخزن بتبطئ النمو	349
تحوير الوسط الغذائي وتقليل النمو	350
تطبيقات خزن المصادر الوراثية	351
خطوات التجميد الفائق	359
خزن الخلايا والأنسجة والأعضاء المُجمدة	361
خطوات خزن مزارع الكالس	361
الخزن وفق مبدأ التزجج	362
توثيق المادة الوراثية	365
الإذابة	365
قياس حيوية الخلايا بعد الإذابة	365
زراعة المواد الوراثية بعد إذابتها	366
إخلاف النبات	366
تقانات رؤية تكوين البلورات الثلجية	367
التحليل الحراري	367
مُستقبل هندسة الإنجماد	368
الفصل العاشر: الأستصلاح الحيوي النباتي	369
مقدمة	369
الطرائق التقليدية في الإستصلاح الحيوي	370
النجاحات المُتحققة	378
ألتلوث والسُمية بالزرنيخ	379
الغذاء والتلوث بالزرنيخ	380

381	آلية إمتصاص وإزالة سُمية As من قبل النبات والأحياء المجهرية
383	الإستصلاح الحيوي النباتي لمُلوث بالزرنيخ
385	إمتصاص المحاصيل الغذائية لعنصر الزرنيخ
386	الزئبق: التلوث والسُمية
387	التخلص من سُمية الزئبق في النبات والبكتريا
388	إنجازات التقانات الأحيائية في الإستصلاح الحيوي لمُركبات الزئبق
390	الايض الحيوي للسلنيوم Selenium (Se) في النبات
392	التقانات الأحيائية وايض السلنيوم في النبات
393	إستصلاح السلنيوم حيوياً – دراسة حقلية
393	المُلوثات العضوية
394	المُذيبات
399	إستصلاح المواقع المُلوثة بالمتفجرات
401	الإستصلاح الحيوي للمُلوثات النفطية
405	مُبيدات الآفات
408	قاعدة معلومات الإستصلاح الحيوي بالنباتات
417	**الفصل الحادي عشر: التقانات الأحيائية وتحمل اللإجهادات**
417	المقدمة
419	ألإجهادات الاأحيائية
427	الجفاف
430	تطوير محاصيل مُتحملة للجفاف
430	آليات تحمُل الجفاف
431	إستجابات النبات لتحمُل الإجهاد
432	الهندسة الوراثية وتحمُل الجفاف في النبات
434	ألتقانات الأحيائية وتحمُل الملوحة
435	نظام دفاع ضد الاكسدة عند التعرض للإجهاد
446	العلاقة بين الإجهاد وتكوين أنواع الاوكسجين التفاعلية ومُضادات الأكسدة
447	زيادة تحمُل المحاصيل للملوحة بالطرائق التقليدية
448	آليات تحمُل الإجهاد الملحي
451	تقانات انتخاب نباتات مُتحملة للملوحة خارج الجسم الحي
452	هندسة النباتات وراثياً لتحمُل الإجهادات

تحليل الطفرات الوراثية	456
الآفاق المُستقبلية في زيادة تحمُل المحاصيل للملوحة	458
الفصل الثاني عشر: إنتاج الوقود الحيوي من مصادر نباتية	459
مقدمة	459
المصادر النباتية للوقود الحيوي	460
قصب السكر كنموذج لإنتاج الإيثانول الحيوي	462
إنتاج السيليليز من البكتريا	465
إنتخاب وتحسين الأداء الانزيمي	467
الطاقة الخضراء او الوقود الحيوي	469
إنتاج وقود الديزل الحيوي	469
التحول الكيميائي	472
التحول الكيموحراري	475
التحول الغازي	476
الطحالب: المصدر الواعد للوقود الحيوي	476
طرائق تنمية الطحالب صناعيا	477
طرائق إستخلاص الزيت من الطحالب	480
الإستخلاص بالموجات الصوتية	481
الإستخلاص بالمذيبات العضوية	482
مُستقبل الوقود الحيوي	482
الفصل الثالث عشر: تطبيقات هندسة النبات وراثياً	483
مقدمة	483
التحول الوراثي	483
طرائق هندسة النبات وراثياً	484
تطبيقات الهندسة الوراثية في مُقاومة الحشرات	486
جينات مُقاومة الحشرات معزولة من أحياء مجهرية	488
آلية عمل بروتينات كراي	489
إستعمال سموم Bt كمبيدات حيوية	490
التحوير الوراثي في جينات كراي	490
تحوير جين Cry1A	491
مزايا وعيوب النباتات المحورة وراثياً بجينات Bt	492

492	التأثيرات البيئية لمحاصيل Bt
493	النباتات الراقية كمصدر لجينات المقاومة
493	مثبطات إنزيم البروتيز
494	فوائد ومحددات مثبطات البروتيز
495	اللكتينات
495	جينات المقاومة المعزولة من الحيوانات
496	المقاومة للفايروسات
497	طريقة الأغلفة البروتينية للفيروسات
497	محددات بروتينات اغلفة الفيروسات
498	مقاومة الامراض الفطرية والبكتيرية
499	إنزيم الكايتنيس
500	إنزيم الكلوكانيس
503	مقاومة النيماتودا
503	اكتشاف تداخل الرنا
504	آلية عمل تداخل الرنا
504	توظيف تقانة تداخل الرنا في مقاومة المسببات المرضية
505	تداخل الرنا في تحسين المحاصيل
505	تداخل الرنا وجينومات النبات الوظيفية
506	هندسة المسالك الحيوية لمركبات الايض الثانوي بتداخل الرنا
506	واقع حال التقانات الأحيائية الزراعية
506	واقح حال القطن المحور بجينات كراي
508	واقع حال الذرة الصفراءالمحورة بجينات Bt
508	سلامة المحاصيل المنتجة بالتقانات الأحيائية
508	الفوائد الصحية للمحاصيل المنتجة بالتقانات الأحيائية
509	هندسة ايض الكربوهيدرات
511	هندسة ايض الدهون
512	هندسة ايض البروتينات
513	الافاق المستقبلية لتداخل الرنا
513	المقاومة ضد الإجهادات اللاأحيائية
514	مقاومة مبيدات الادغال

الأثر البيئي للمحاصيل المقاومة لمبيدات الادغال	518
المقاومة ضد البكتريا المسببة للبلورات الثلجية	519
تحسين المحاصيل كماً ونوعاً	520
توظيف الهندسة الوراثية في إطالة العَمر المخزني للثمار	521
التلاعب الوراثي في نضج ثمار الطماطم	522
آلية عمل الرنا غير المشفر لجين PG	524
النجاح والإخفاق في الطماطم Flavr Savr المحورة وراثياً	524
التلاعب الوراثي في تصنيع الاثيلين	524
هندسة النبات وراثياً في المحافظة على تلوين الثمار	526
هندسة النبات وراثياً في المحافظة على تلوين الازهار	525
هندسة النبات وراثياً لأغراض العقم الذكري	527
نباتات معدلة وراثياً ومحسنة تغذوياً	527
إنتاج كلايسنين غني باللايسين في الرز	528
هندسة النبات وراثياً لتحسين مطيبات الأغذية	529
الاغذية الوظيفية والتقانات الأحيائية	529
تعزيز المحتوى البروتيني	531
معالجة نقص فيتامين A	532
محاصيل غنية بعنصر الحديد لمعالجة مرض فقر الدم	532
زيادة مستويات حامض الفوليك في الطماطم	534
تحديات تبني المحاصيل المعززة تغذوياً	534
زيادة مستويات مضادات الأكسدة	535
زيادة مستويات الأحماض الدهنية الأساسية	536
الذرة الصفراء ذات المحتوى العالي من اللايسين	536
معالجة نقص حامض الفوليك	537
تحسين قابلية هضم النباتات	539
الثورة الخضراء	540
الفرص المتاحة والتحديات	520
هندسة حشائش النجيل وراثياً لتحمًل الإجهادات	541
هندسة التركيب الضوئي	541
هندسة تثبيت النيتروجين الجوي وراثياً	545

الزراعة الجزيئية	548
تطبيقات المؤشرات الجزيئية في هندسة النبات وراثياً	548
التوجسات من النباتات المحورة وراثياً	550
دور المنظمات العالمية في الاغذية المحورة وراثيا	551
الفصل الرابع عشر: الزراعة الجزيئية وإنتاج اللقاحات المأكولة	555
مقدمة	555
التحوير الوراثي على مستوى النواة	555
التحول الوراثي للبلاستيدات الخضراء	558
هندسة البلاستيدات الخضراء	560
التعبير الوقتي بوساطة الاكروبكتريوم	561
التحوير الوراثي العابر بوساطة النواقل الفيروسية	561
النباتات: معامل للأدوية واللقاحات	564
طريقة تحضير اللقاح المأكول	566
البروتينات العلاجية	569
العقارات المصنعة من قبل النبات	570
الجيل الثاني من اللّقاحات المأكولة	573
إنتاج مُضادات الأجسام في النباتات	574
إنتاج المواد الصيدلانية بالطرائق الجزيئية	576
البروتينات العلاجية من هندسة الكلوروبلاست وراثياً	578
إختيار نوع النبات لإنتاج المواد الصيدلانية	579
الفوائد المتوخاة	580
التحديات التي تُواجه إنتاج اللّقاحات المأكولة	581
الإعتبارات الواجب الإلتزام بها عند تطوير لقاح مأكول	582
المخاطر والمحاذير في إنتاج PDPs	584
الفصل الخامس عشر: إتفاقية التنوع الحيوي، السلامة الأحيائية والأمان	585
التواصل في مجال التقانات الأحيائية الزراعية	585
خصوصيات التواصل	587
التقانات الأحيائية الزراعية: الحل لتقليل الفقر والجوع	587
التجربة الرائدة لدولة جنوب افريقيا	588
الإتفاقية المتعلقة بالتنوع البايولوجي	590

مقدمة المؤلف

بسم الله الرحمن الرحيم والصلاة والسلام على سيد الخلق وعلى آل بيته الطيبين الطاهرين وبعد... فقد توسعت المعارف عموماً بشكلٍ مُتسارع ومُنقطع النظير خلال العقود الثلاثة الأخيرة على وجه العموم ومنها التقانات الأحيائية بفروعها المختلفة على وجه الخصوص. وبالنظر لتماس مجال التقانات الأحيائية النباتية في غذاء وصحة وبيئة الإنسان، حتمت علينا الضرورة تأليف هذا الكتاب ليكون مرجعاً شاملاً لتطبيقات التقانات الأحيائية في المجال النباتي ليوفر معيناً ومصدراً وافياً لطلبة كليات التقانات الأحيائية والعلوم والزراعة والتربية وعوناً للباحثين في القطاعين الزراعي والصناعي بعد إن أصبح تصنيع الزراعة واقع حال في وقت تزداد منافسة البشر على وحدة المساحة.

إرتأينا أن يتبوب الكتاب في خمسة عشر فصلاً لِيُغطي كلٍ منها محوراً هاماً من تطبيقات التقانات الأحيائية في المجال النباتي. وحرصت أن أُغني الكتاب بالأشكال والمُخططات بعيداً عن التعقيد ليكون منهجاً ومصدراً لا يُستغني عنه لطلبة الدراسات الأولية والعليا على حدٍ سواء. شملت فصول الكتاب كل ما يتعلق بالإكثار الدقيق، زراعة خلايا، أنسجة أعضاء النبات والتهجين الجسمي بعد عزل وتنقية ودمج البروتوبلاست. إشتمل الكتاب ايضاً على الإتجاهات الحديثة في مجال التقانات الأحيائية من إنتاج الوقود الحيوي من مصادر نباتية وطحالب، وعلى توظيف النباتات ومزارعها النسيجية في إنتاج مركبات الايض الثانوي والبروتينات العلاجية واللقاحات وتم تفصيل تطبيقات الهندسة الوراثية في مجال تحسين النبات. ونال موضوع إستعمال النباتات في الإستصلاح الحيوي نصيبه في فصل منفصل بالنظر لزيادة عوامل التلوث في بيئة الإنسان وتأثر مساحات واسعة من الاراضي بعوامل الإجهاد المختلفة. وكان لموضوع خزن المصادر الوراثية من الأجزاء النباتية وحفظها، نصيباً متواضعاً لما يوفر ذلك من سهولة تبادل المادة الوراثية بين علماء العالم والمحافظة على التنوع الحيوي وخاصة الأنواع المهددة بالإنقراض. ولسهولة إيصال معاني المصطلحات المتراكمة في هذا الإختصاص، تم إلحاق الفصول الخمسة عشر بالمصطلحات المُتداولة في التخصص لِتُسهل على القارئ فهم المعلومة بدقة. كما أضيف في نهاية الكتاب مجموعة من الجداول التي تُمثل إنجازات حققتها ثورة التقانات الأحيائية الخضراء في المجال النباتي واصبحت في متناول المستهلك.

لا يسعني إلا وأن أتقدم بالشكر والتقدير الى وزارة التعليم العالي والبحث العلمي لتشجيعها وتبنيها التأليف والترجمة واشكر كافة منتسبي كلية العلوم في جامعة النهرين وكلية التقنيات الحيوية التطبيقية في جامعة النهرين وملاكات قسم التقانة الأحيائية. شكري وتقديري الى استاذي الفاضل أ. د. مؤيد احمد اليونس لمراجعته الكتاب ودعمه المعنوي اللامحدود اطال الله في عمره أود أن أشكر طلبتي الذين أشرفت على رسائلهم وأطاريحهم حيث إنتقيتُ منها المعلومة المناسبة وعززت بها الكتاب. شكري وإمتناني الى الست إستبرق سامي العطار لمساعدتها في طبع بعض فصول الكتاب. أسأل الله العلي القدير أن أكون قد وفقتُ في عملي هذا وأفدتُ طلبتي والأساتذة الأفاضل والباحثين ويكون هذا العمل في ميزان حسناتي والله ولي التوفيق.

المؤلف

الفصل الأول: تطبيقات زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات

Applications of Plant Cells, Tissues and Organs Culture

البدايات الاولى The first beginnings

أُشتق المُصطلح *In vitro* أساساً من الكلمة اللاتينية *Vitirium* والتي تعني الزُجاج وقد تُرجمت الى العربية بمُسميات عديدة أهمها الزراعة خارج الجسم الحي والزراعة داخل الزجاج. أُعتمدت فكرة زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات على فكرة أُقتُرحت أساساً من قِبل شولدن وشوان عام 1839 أسماها Totipotency اذ اقترحا بأن كل خلية حية مفصولة من كائن حي مُتعدد الخلايا لها قابلية الإنقسام والتطور بمعزل عن الكائن الحي المفصولة منه فيما إذا توفرت لها ظروف الإنقسام والتطور والنمو. تبنى الفكرة لاحقاً العالم الالماني فوكتنج عام 1878م مقترحاً ما أسماه بنظرية الخلية (Cell theory) مُعتبراً بأن الخلية هي وحدة الشكل والوظيفة في الكائن الحي. أخذ هذا العالم عُقلاً (Cuttings) من نبات صفصاف (Willow) وقطعها الى قِطعاً صغيرة مُفترضاً بأن قطع ساق الصفصاف بإمكانها ان تَنتج براعماً وأوراقاً بغض النظر عن حجمها. وتكلم ايضاً عن ظاهرة القُطبية (Polarity) أي أن الجزء العلوي من الساق (Distal) يُعطي براعماً واوراقاً والجزء السفلي (Proximal) يُعطي جذوراً تبعاً لوظيفة الخلايا وموقعها النسبي من مكان القطع.

وفي عام 1902 أفترض العالم النباتي هيبرلاندت (Gottib Haberlandt) بأن الخلايا النباتية لها القُدرة على الإنقسام وتكوين نبات كامل (Totipotent) مُستنداً ولاول مرة على أساس زراعة أنسجة النبات ومحاولاً إثبات قدرة أعضاء او أنسجة وحتى الخلايا المُفردة في إنتاج نباتات كاملة فيما لو زُرعت تحت ظروف مُناسبة. ولكي يُحقق فرضيتهُ فقد حاول زراعة خلايا ميزوفيل مفصولة من اوراق نباتات مُختلفة على وسطٍ حاو على مُغذيات وتحت ظروف حضن مُختبرية. لذا عُد هيبرلاندت المؤسس الاول لِعلم زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات. بَنى هذا العالم إختباره لخلايا مِيزوفيل ألورقة على أساس إحتوائها على الكلوروفيل مما يجعلها تُصنع غِذائها بنفسها حسب تصوره كي تنتج أخيراً نباتات كاملة. وللأسف لم تَفلح مُحاولاته لسببين اولهما أن أنسجة الميزوفيل خالية من الفعالية المرستيمية والسبب الثاني، النقص المعرفي في إحتياج ألنسيج ألنباتي من المُغذيات وقد يكون هناك سبباً آخر هو عدم الدراية الكافية بالأُسس العلمية وكيفية الإعتناء بألأنسجة المفصولة. كانت تلك المُحاولات سبباً لبداية عِلم جديد بدأ اولى إطلالاته في عام 1934 على يَد ألعالم ألنباتي ألامريكي وايت (Phlilip White) حينما نجح في زراعة أطراف جذور

نبات الطماطم على وسطٍ غذائي عززهُ بِمُستخلصات ألاعفان وفيتامينات مُعقد B. وبعدَ خمس سنوات وبعمل مُنفصل عن ألذي أجراه وايت تَمكن ألباحثان ألفرنسيان نوبكورت وكوثرت (Nobecourt & Gauthert) إضافة الى ألامريكي وايت من تَنشئة مَزارع نَسيجية نباتية ناجحة بعد ان أضافوا إندول حامض الخليك (IAA) ومجموعة فيتامينات B الى الاوساط الغذائية.

النجاحات المُتلاحقة Successive successes

شهدت الفترة الزمنية من عام 1941 تطوراً سريعا إشتملت على إكتشاف أغلب التقانات التي تُطبق حالياً في هذا ألإختصاص. ولا مجال للخوض في تفاصيلها في هذا الكتاب وسيتم التركيز على أهم ما حققهُ عُلماء ألنبات في هذا المضمار الحيوي. ففي عام 1942 بدء لارو (Larue) اولى محاولاته بزراعة مبايض حصل فيها على نمو محدود مصحوباً بظهور جذور لعدد من الأنواع ألنباتية. نَجح سكوك (Skoog) في إنشاء اول مزرعة نسيجية لنبات ألتبغ دَرس من خلالها تكوين ألنُموات ألعرضية على ألأجزاء ألنباتية ألمزروعة في عام 1944. وكان لتعاون الاخير مع تسو (Tisui) قد أثمر عن تحفيز أنسجة اللب (Pith) غير المرستيمية كي تَتحول الى مرستيمية وتكوينها أفرع بوجود ألأنسجة ألوعائية وذلك بعد إضافتهما الادنين وتراكيز عالية من الفوسفات الى الوسط الغذائي وكان ذلك عام 1948. حققَ لارو (Larue) عام 1949 نجاحاً آخر بِحصوله على مزارع نسيجية نامية بشكل جيد نَتجت من زراعة نسيج السويداء (Endosperm) ومن ألمعلوم ان الأخير يحتوي على ثلاث مجاميع كروموسومية (Triploid) مما فتح آفاقاً جديدة في مجال ألتضاعف ألكروموسومي (Polyploidy). وحققَ ألعالم بول (Ball) عام 1950 نجاحاً مُتميزاً عندما حصل على أنسجة كالس من أجزاء نباتية مفصولة لأشجار الصنوبر الأحمر (*Sequoia semipervirens*) وحُفز الكالس على تكوين براعم. وتمكن كل من مورال ومارتن (Moral and Martin) عام 1952 من الحصول على نباتات داليا (*Dalia spp.*) خالية من الفيروسات من نباتات مُصابة أصلاً بها بعد زراعتهما ألقمم ألطرفية للنبات مما أسس لاحقاً في ظهور حقلا معرفيا جديداً هو إنتاج نباتات خالية من الفيروسات.

وبعد عام واحد لاحظ توليكي (Tuleke) ولأول مرة بأن حبوب لُقاح نبات (*Ginkgo biloba*) لها القابلية على الإنقسام والتطور عند زراعتها خارج ألجسم ألحي مُكونة نباتاً كاملاً أُحادي ألمجموعة ألكروموسومية. وكان لِلانجاز الذي حققه مور (Muir) وفريقهِ ألبحثي عام 1954 نقطة تحول مهمة في هذا ألتخصص عند زراعتهم خلايا نباتية مُفردة بطريقة تُعرف حالياً بالزراعة الحاضنة (Nurse culture) والتي أصبحت ذات تطبيقات جوهرية خاصة عند إكثار خلية مُفردة مُهندسة وراثياً وإنتاج نبات كامل منها

مُهندس وراثيا. وفي عام 1955 حصلت نقطة تحول مهمة في مجال زراعة ألخلايا والأنسجة النباتية اذ إكتشف ملر (Miller) وزملائِه ولاول مرة الكاينيتين من دنا (DNA) حيامن سمكة ألرنكة إذ كان هذا ألسايتوكايينين ألحلقة المفقودة او ألناقصة في تطور علم زراعة ألخلايا وألأنسجة ألنباتية لأَن سبق وان أُكتشفت ألاوكسينات في عشرينات القرن العشرين.

وفي عام 1957، حصلت نقلة نوعية في هذا ألمجال الحيوي عندما نجح الباحثان سكوك وملر (Skoog & Miller) في إنجاز عملية تَوالد الأعضاء (النُموات الخُضرية والجذرية) من خلال تجريبهما توليفات مُختلفة من ألاوكسينات والسايتوكاينينات وخرجا بِفرضيتهما المعروفة بأن ألتحكم في نشوءِ الكالس وتوالد الأعضاء يتم من خلال التحكم في نسبة ألاوكسين الى السايتوكاينين إذ تؤدي زيادة نسبة السايتوكاينينات الى توالد ألنُموات الخُضرية في الوقت الذي تُنشئ فيه أنسجة ألكالس جذوراً عند زيادة نسبة الاوكسينات. لذا يُضاف كِلا المُنظمين وبنسب مُختلفة حسب نوع النبات وألجزء النباتي ألمفصول عنه.

التطورالمُتسارع لتطبيقات المزارع ألنسيجية Accelerated development of tissue culture applications

إستمرت ألنجاحات وعلى مُختلف المستويات من زراعة الخلايا وألأنسجة والأعضاء والأجنة وغيرها وكَلَّلَها ألعالم كوثرت (1959) عندما نشر اول كتاب تفصيلي عن زراعة ألأنسجة ألنباتية وفي حينها لم تكن تقانة عزل وتنقية ألبروتوبلاست قد أُكتشفت بعد. وبعد مُدة قصيرة إستطاع كارلسون (Carlson) وزملاؤه عام 1970 من إنتاج اول هجين جسمي ناتج من دمج ألبروتوبلاستات. وفي ألعام نفسه، تمكن باور (Power) وزملاؤه أيضاً من إنتاج هجين جسمي من دمج ألبروتوبلاست وكذلك عُزل اول طافر (Mutant) خارج الجسم ألحي. تَبع ذلك إنجازات كثيرة حققها ألعالم ألنباتي المعروف كوكنج (Cooking) في هذا ألمجال. تطور هذا العلم سريعاً وخاصة في عام 1974 ومابعدها وذلك بعد أن ثَبُتَ وجد ألسايتوكاينين في العديد من أنواع ألأنسجة ألنباتية ومن ضمنها ماء جوز الهند (Coconut water) ألغني بالسايتوكاينين من قبل ألعالم ألنباتي ليثام (Letham)، كما إستثمر ألعالم موراشيك (Murashige) ألتقدم ألحاصل وأنتج ألعديد من النباتات ألنسيجية من خلال زراعة نهايات الافرع وخاصة نباتات الزينة. جَرت اول عملية تحول وراثي (Transformation) من قبل راينهارد (Reinhard) مُستثمرا فيها النجاحات ألمُتحققة في مجال زراعة ألأنسجة ألنباتية في الوقت الذي تَمكن زينر (Zaener) وزملاؤه ولاربيك (Larebeke) ومساعديه من إكتشاف ألبلازميد ألمسؤول عن إستحثات ألاورام ألنباتية (Ti plasmid) ألتي تُسببها بكتريا

ألاكروبكتريوم. وهكذا توالت ألإكتشافات سريعا، ففي عام 1976 تمكن سيبرت (Seibert) من توالد الفروع من قِمم نُموات نبات ألقُرنفل ألمُنتج في مزارع نسيجية سبق وإن عُرضت للتجميد الفائق (Cryopreserved).

حَصلَ ملكورز (Melchors) وزملاؤه عام 1978 على هجين جسمي من دمج بروتوبلاست معزول من نبات الطماطم وآخر معزول من نبات البطاطا والذي سُمي Pomato. أُدخل مُصطلح ألتغاير ألجسمي (Somaclonal variation) عام 1981 من قبل لاركن وسكوكروفت (Larkin & Scowcroft) بعد مُلاحظات عديدة سُجلت من قبل ألعديد من ألباحثين والتي بينت حصول تغايرات مورفورلوجية وفوق وراثية (Epigenetic) ووراثية في ألنباتات الناتجة من الزراعة ألنسيجية مُقارنة بالنباتات ألام ألمفصولة منها تلك ألأجزاء ألنباتية. وذكر كونجر (Conger) بنفس العام إمكانية إكثار كل الأنواع النباتية بتقانة زراعة ألأنسجة ألنباتية. ويُعد كارثا (Kartha) عام 1981 الاول من طبَق تقانة مُعاملة ألافرع الخُضرية حرارياً (Thermotherapy) والمُعاملة بالمواد ألكيميائية (Chemotherapy) لغرض ألتخلص من ألفيروسات، وكان رائداً ايضاً في توظيف تقانة التجميد ألفائق (Cryopreservation) للأجزاء ألنباتية وإعادة توالد نباتات منها (Regeneration). وفي ألعام التالي (1982)، تمكن زمرمان (Zimmerman) من دمج بروتوبلاستات بإستعمال مُحفزات كهربائية (Electrofusion) في الوقت ألذي أكتشف كرينز(Krens) وزملاؤه ألتحول ألوراثي (Transformation) من خلال إدخال دنا (DNA) معزول من خلايا الى بروتوبلاست معزول من خلايا اخرى. تَحققت في عام 1983 ألكثير من ألإنجازات في هذا المجال منها ما قام به بهجواني ورزدان (Bhajwani & Razdan) إذ زرعا خلية مُفردة على وسط صلب بِسُمك 1ملم وأنتجا مُستعمرات من تلك ألخلية المفردة. كذلك تمكن بيلتير (Pelltier) من دمج سايتوبلازمي نباتي الفجل (Radish) والسلجم (Rape) وبهذا كان أول هجين جسمي بين نوعين مُختلفين من النباتات.

كما وظف هيوز (Hughes) الزراعة النسيجية من خلال حصوله على نباتات ذات صفات مرغوبة من نبات تبغ مقاوم لمبيدات الأعشاب. وفي العام التالي (1984) تمكن زنكتيلر (Zenkteler) من توظيف التقانة في مجالي التلقيح والإخصاب خارج الجسم الحي (*In vitro* fertilization) على مياسم وأنسجة مشيمية او للبويضة وبهذا أُنتجت العديد من الهُجن بين نباتات النوع الواحد وبين أنواع مُختلفة وبهذا يُعد اولَ من تغلب على ظاهرة عدم التوافق الجنسي بين النباتات وأُنتجت نباتات أُحادية العدد الكروموسومي (Haploids) أي 1n. وفي الوقت نفسه طوَر كولنس وكروسر (Collins & Grosser) تقانة إنقاذ الجنين (Embryo rescue) وأنتجا هُجن بين نباتات النوع الواحد وبين أنواع نباتية مُختلفة. سُجلت في العام نفسه

اول حالة تحول وراثي ثابتة (Stable transformation) بإستثمار بكتريا الاكروبكتريم كناقل (Victor) من قبل ديبلوك (Deblock) وزملاؤه. تطورت تلك التقانات سريعاً لتُغطي العديد من الإتجاهات، ففي عام 1985 تمكن هرش (Hursh) وزملاؤه من إصابة وتحول أقراص مفصولة من اوراق نباتية وراثياً بواسطة بكتريا (*Agrobaterium tumefaciens*) واعادة تكوين نباتات محورة وراثياً من زراعة هذه ألأنسجة. كما عمل ناكل (Nagl) وزملاؤه دراسات معمقة وتفصيلية عن التغيرات السايتولوجية التي تحصل في نوى خلايا مزروعة نسيجياً مما عزز من مفهوم التغاير الجسمي وإكتشاف العديد من أسبابه.

كما دُرس في هذا العام إنتاجية العديد من النباتات المُهمة اقتصادياً وطبياً من حيث إنتاجيتها من مواد الايض الاولي والثانوي المتراكمة في مزارعها المعلقة (Cell suspention cultures) . وتمكن هيومان (Humann) من زراعة خلايا نباتية لها المقدرة على البناء الضوئي ذاتياً وبهذا تؤمن مصدرها من الكربون دون إضافة مصدر كربون الى الوسط الغذائي (Phototrophic). أقترح لاركن (Larkin) وزملاؤه في نفس العام فرضية مفادها ان التغاير الجسمي في النباتات الناتجة من المزارع النسيجية قد يعود الى حصول تغايرات وراثية او الى ما يُسمى بفوق الوراثية. وتمكن بوتريكس (Potrykus) وزملاؤه ايضاً من إجراء تحويرات وراثية في الخلايا النباتية من خلال النقل المُباشر للدنا (DNA Direct transfer) بعد توسيع ثقوب الغشاء النووي والسايتوبلازمي كهربائياً (Electroporation).

ولم يمضي إلا عام آخر (1986) ليكون موضوع خزن المصادر الوراثية النباتية نقطة تحول كبيرة عندما تمكنَ العالم وذرس (Withers) من خزن مزارع المعلق الخلوي وقمم الافرع والاجنة الجسمية وحتى النبيتات الصغيرة لمُدد زمنية مُختلفة بعد مُعاملتها بمواد تحميها من أضرار الإنجماد (Cryoprotectants) بتجميدها وخزنها في النتروجين السائل (-196 مئوية) ومن ثم إعادة زراعتها بعد ذوبانها (Thawing) لتنتج نباتات بعد فترات خزن مُختلفة. وبهذا فتح باباً واسعاً في إمكانية خزن المصادر الوراثية وحفظها من الإنقراض تحت ظروف مُسيطر عليها.

درسَ براون وثورب (Brown & Thorpe) بإسهاب العوامل الفسيولوجية والكيموحيوية المؤثرة في تكوين الأعضاء النباتية عام 1986. كما سجلَ سان وكلبرت (San & Gelebart) زراعة البويضات غير المُخصبة (Gynogenesis) في 15 نوعاً نباتياً حصل منها على نباتات احادية نقية وراثياً (Homozygous). وكان للدراسات الرائدة التي أجراها شيدر وكوهن (Shieder & Kohn) عام 1986 دوراً مهماً في فهم آلية تكوين الهُجن الجسمية الناتجة بعد دمج البروتوبلاستات بالطرائق الكيميائية والفيزيائية

وكانت لهما دراسات مُعمقة في إمكانية إنتاج نبات كامل من خلية مُفردة مُحورة وراثياً. وفي عام 1987 مَهد شيل (Shell) للأُسس الرئيسة لدراسات التداخل بين خلايا نباتية ومكروبية بهدف تحسين النبات. كما سَجل جاكوب (Jacob) وزملاؤه العديد من الطوافر الناتجة من المزارع النسيجية. وفي المجال نفسه تمكن كلن (Klein) وزملاؤه من تسجيل اول حالة تحوير وراثي بطريقة مباشرة لنقل الدنا عن طريق القذائف متناهية الصغر (Microprojectile bombardment) او ما يسمى بالمقذوفات البايولوجية (Biolistics) والتي سَهلت فيما بعد من عمليات التحوير الوراثي واختصرت الزمن والجهد وذللت العديد من الصعوبات التي تواجه عدم التوافق بين النباتات المُختلفة.

وفي مجال إنتاج مُركبات الايض الثانوي، حاول ودولم (Widholm) زراعة الخلايا النباتية على نطاق واسع وتجاري بعد ان حصل على خطوط خلوية طافرة لها المقدرة على إنتاج كميات غزيرة من المُركبات الثانوية المرغوبة. وكان ذلك بمثابة نقلة نوعية في إمكانية إنتاج مواد صيدلانية ذات قيمة علاجية عالية. بذل يومَن (Yeoman) جهوداً متواضعة في زيادة إنتاجية الخلايا النباتية من مُركبات الايض الثانوي بعد إدخاله تقانة تقييد الخلايا (Cell Immobilization) داخل مُفاعلات حيوية (Bioreactors) لتوظيفها صناعياً على نطاق واسع في معامل صناعة الادوية. وتزامن ذلك مع جهود فاولر(Fowler) الذي أنتج العديد من المواد البيولوجية الفعالة على نطاق تجاري بإستعماله مُفاعلات حيوية تعمل بنظام الخزانات الهزازة (Stirred tanks) واستعماله أيضاً مُفاعلات حيوية مدفوعة الهواء وبعمليات إنتاج ذات مرحلتين. واثمرت جهود العالم وينك (Wink) عام 1987 من تطوير أنظمة عديدة لمزارع خلوية ساهمت في زيادة إنتاجيتها من المُركبات الثانوية. وطبق في نفس العام دوكال (Dougall) تقانة الإنتخاب المُتكرر (Repeated selection) لخطوط خلوية عالية الإنتاجية أُشتقت اصلاً من مزارع نسيجية غير متجانسة مما أسهم كثيراً في رفع إنتاجية الخلايا النباتية من مُركبات الايض الثانوي. وكان العمل في هذا المجال قد جلب إنتباه الباحثين من مُختلف دول العالم خاصة الصناعية منها وبتمويل من مصانع الادوية المشهورة مما دفع العديد من المختصين في التحري عن وسائل جديدة لزيادة إنتاجية المُركبات الصيدلانية.

إستعمل كمب وموركان (Kamp & Morgan) تقانة الإلايزا (ELISA) وإختبارات المناعة الراديوية (Radioimmunoassay) في زيادة هذه المُركبات. كما حذا الامر بالباحث اليرت (Eilert) في التحري عن إمكانية زيادة هذه المُركبات من خلال تعريض الخلايا النباتية المزروعة الى عوامل إجهاد فيزيائية (Abiotic stress factors) كالتعريض للحرارة او البرودة او العناصر الثقيلة او الأشعة فوق البنفسجية كما حفز الخلايا على زيادة إنتاجيتها بعد إضافة بعض المحفزات الحيوية (Biotic elicitors) الى الوسط

الغذائي كإضافة مُستخلصات فطرية اوبكتيرية وكان للعالم كيرس (Kurz) عام 1987 دوراً مهما في هذا المجال الحيوي الذي يُعد حالياً أحد أهم تطبيقات زراعة خلايا وأنسجة النبات. دُرِسَ موضوع تعريض المزارع النسيجية للمؤثرات الحيوية والبيولوجية بإسهاب مما زاد في إنتاجيتها، وكان للباحثان كونستبل وفيسل (Constable & Vasil) عام 1988 دوراً ريادياً في فهم العوامل الكيموحيوية التي تحصل داخل الخلايا النباتية والتي تؤدي الى زيادة مقدرتها على إنتاج مُركبات ألايض الثانوي.

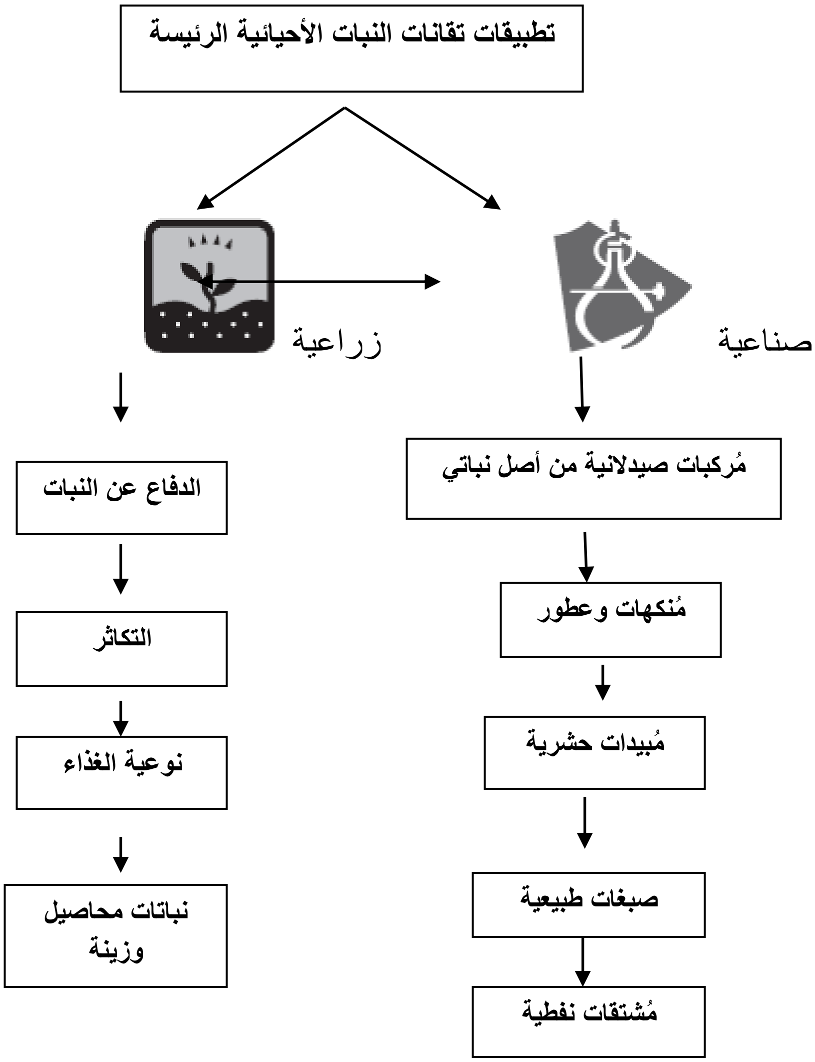
ونتيجة لهذه التراكمات المعرفية تشعبت فروع زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات وزاد من مدارك المُختصين في كافة أنحاء العالم لأهمية هذا العلم وفروعه في مجال التقانات الأحيائية. لذا فقد توسعت تطبيقاتها (لاحظ الشكلين1 .1، 2. 1) خلال عقد التسعينات من القرن الماضي والعقد الاول من هذا القرن وكانت هناك إضافات جديدة تُسجل يومياً مما جذب العديد من الباحثين للعمل في هذا المجال. وحديثاً اقترنت زراعة خلايا وأنسجة النبات بمواضيع تقانة الدنا التأشبي او التوليفي المسمى Recombinant DNA technology. وساهمت في إمداد الثوره الزراعية الخضراء بمحاصيل تمتاز بوفرة الحاصل وجودة النوعية وخلوها من المُسببات المرضية وفي إنتاج المُركبات المُهمة صيدلانياً. ونتيجة للإزدياد المضطرد لتطبيقات الزراعة النسيجية مع التقدم المعرفي في هذا المجال، يُمكن تلخيص تطبيقاتها الحالية وكما يلي:

1- الإكثار السريع والواسع للأنواع النباتية عامة والنادرة والمُهددة بالإنقراض وذات الصفات عالية الجودة خاصةً بمُدة قصيرة وتحت ظروف مُسيطر عليها.

2- إنتاج الهُجن الجسمية (Somatic hybrids) والسايتوبلازمية (Cybrids) ذات التطبيقات المُهمة في تحسين النبات.

3- إنتاج نباتات خالية من المُسببات المرضية وخاصة الفيروسية منها مما يُساهم في زيادة الإنتاج الزراعي في وحدة المساحة.

4- إنتاج نباتات من الأنواع ذات البذور صعبة الانبات (Recalcitrant) ومن تلك التي لاتكوّن بذوراً او تكوّن بذوراً مجهضة (Aborted seeds). ساهم ذلك في التوسع بزراعة تلك النباتات وتقليل كُلف إنتاجها.



شكل 1.1. التطبيقات العامة لتقانات النبات الأحيائية في المجالين الزراعي والصناعي.

5- تحفيز وزيادة التغاير الوراثي (Genetic variation).

6- زراعة وإكثار الكائنات إجبارية التغذية (Obligate biotrophs) على اوساط صناعية.

7- التركيب الدقيق (Micrografting) للأنواع عالية الجودة على إصول مُنتخبة.

8- التجميد الفائق وخزن المصادر الوراثية النباتية لفترات زمنية مُختلفة من خلال تاسيس بنوك الجينات في أماكن مُحددة وتحت ظروف مُسيطر عليها ومن ثم إعادة إخلافها.

9- سُهولة التبادل العالمي للمواد الوراثية النباتية لسهولة نقلها وقلة إجراءات الحجر الزراعي.

10- إنتاج نباتات مُحورة وراثياً من خلال تقانات هندسة الخلية، النسيج او العضو وراثياً.

11- إنتاج البذور الصناعية من الأجنة الجسمية بما يُحقق زيادة الإنتاج وتحسين نوعيته.

12- إنتاج نباتات مُقاومة للأمراض المُختلفة والآفات بما فيها الحشرية والأدغال وكذلك للإجهادات البيئية المُختلفة من جفاف وملوحة ومُلوثات مُختلفة ودرجات الحرارة المُرتفعة والمُنخفضة.

13- السيطرة البيولوجية كتحفيز نشوء الأعضاء النباتية المرغوبة والتزهير المُبكر.

14- حفظ الأجنة وحبوب اللقاح لفترات زمنية طويلة مما يُساهم في زيادة التنوع الأحيائي.

15- ألتغلب على ظاهرة عدم التوافق في التهجينات غير المُتوافقة.

16- إمكانية إجراء التهجينات الجسمية الواسعة من خلال دمج بروتوبلاستات من أنواع نباتية مُختلفة.

17- توفر المزارع النسيجية فُرصة لإنتاج مُركبات الايض المُختلفة تحت ظروف مُسيطر عليها وبكميات وفيرة وبإستعمال مُفاعلات حيوية وعلى مدار السنة.

18- إمكانية إنتاج سلالات بكتيرية جديدة مُثبتة للنتروجين الجوي إضافة الى زيادة مقدرة السلالات الحالية في تثبيتها للنتروجين الجوي مع فرصة لزيادة العوائل التي تصيبها. وبالتاكيد سيوفر ذلك فُرصة كبيرة لتقليل الأسمدة الكيميائية المُضافة وتقليل تلوث التربة والماء.

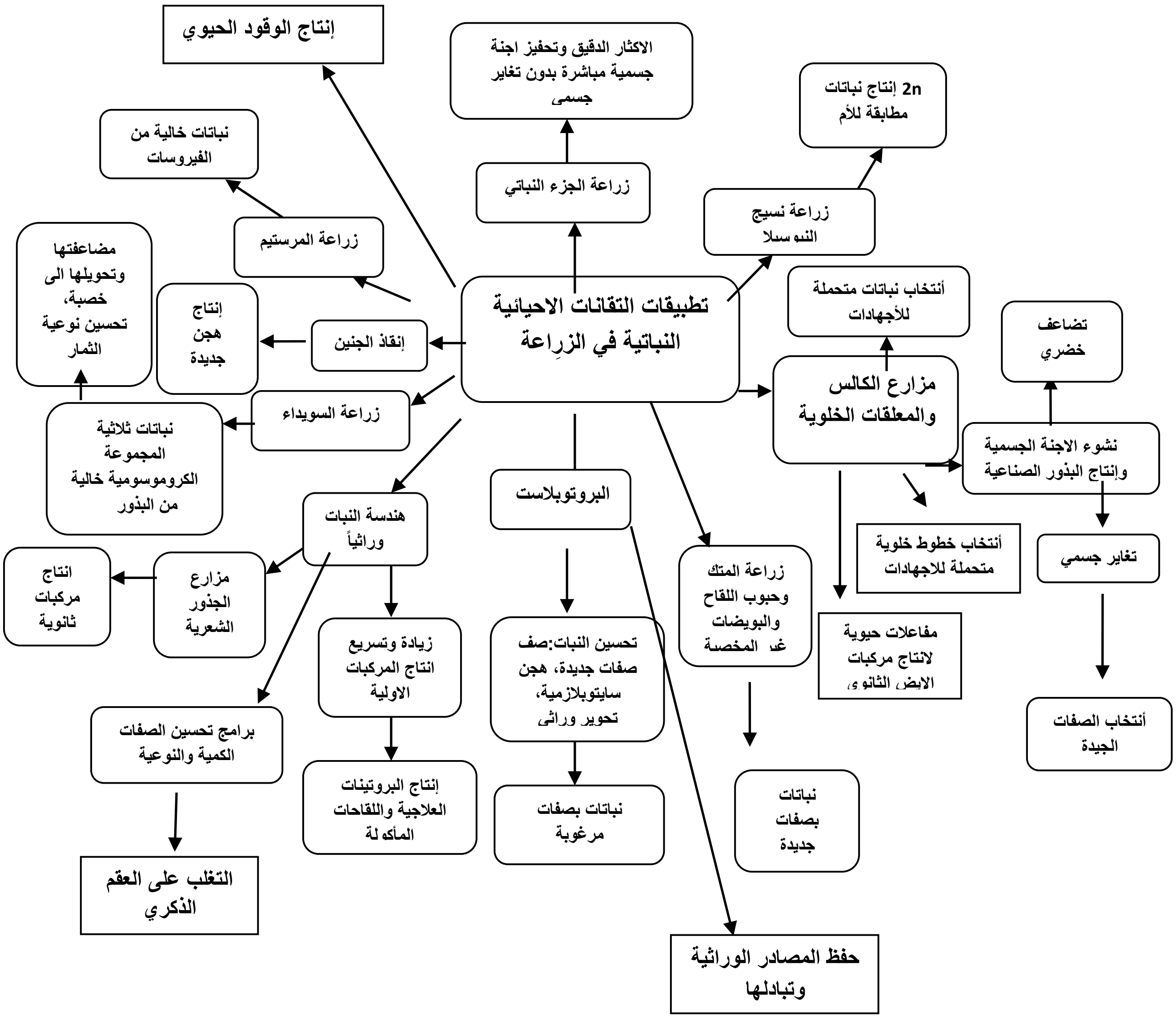
19- توفر التقانات النباتية الحديثة في إنتاج شتلات داخل مُغلفات خاصة وإطلاقها من طائرات مُخصصة لهذا الغرض على المناطق الصحراوية والوعرة بما يضمن زيادة الغطاء النباتي وإنخفاض كُلف التشجير وزيادة التنوع الأحيائي.

20- إنقاذ الأجنة المُهددة بالإجهاض مما يُتيح فُرصة لإنتاج أنواع نباتية جديدة.

21- إنتاج نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية من زراعة حبوب اللقاح والبويضات غير المُخصبة تكون نقية وراثياً (Homozygous) وذلك يُقصر من برامج تربية وتحسين النبات لحد كبير.

22- إنتاج نباتات مُتعددة المجموعة الكروموسومية والتي غالباً ماتكون أزهارها وثمارها ذات حجم كبير ونوعية جيدة وذات قيمة تسويقية عالية.

23- زيادة عملية التركيب الضوئي بعد التوصل الى تقانات نقل البلاستيدات وهندستها وراثياً.



شكل 2. 1. التطبيقات المُختلفة لزراعة خلايا وأنسجة النبات في مجالات التقانات الأحيائية النباتية.

اولاً: إنتاج نباتات مُطابقة لأُمهاتها (Production of true to type plants)

يَتميز إكثار النبات نسيجياً بتنمية خلايا نباتية او أنسجة او أعضاء على وسط غذائي مُحضر صناعيا وقد يكون هذا الوسط صلباً او سائلاً وتحت ظروف مُعقمة. وغالباً ما يُطلق مُصطلح الإكثارالدقيق (Micropropagation) عند فصل أحد أعضاء النبات او أنسجته كالمرستيم القمي (شكل 1.3)، البراعم الابطية، أنسجة الورقة، أجزاء الجذور، وغيرها بهدف إنتاج نباتات تحت ظروف مُسيطر عليها. يُعتبرالإكثار الدقيق أحد الطرائق الخُضرية لإنتاج أعداد كبيرة من النباتات تحت تلك الظروف ولهذا تُعد وسيلة نظيفة وسريعة للإكثار وكما سيرد لاحقاً في الفصول القادمة.

شكل 3. 1. مرستيم قمي تم فصله من برعم أبطي لنبات البطاطا والذي يكون خالياً من الفيروسات ومصدراً مهماً لإنتاج أعداد كبيرة من نباتات خالية من الفيروسات. يلاحظ مبادئ الأوراق في مراحل نشوؤها الاولى. المقياس يمثل 50 µM.

كما وُضِعت برامج لإخلاف النباتات من زراعة نباتات أُحادية العدد الكروموسومي (Haploids)، نباتات خشبية مُعمرة، زراعة المتوك، زراعة البويضات غير المُخصبة، زراعة الكالس وزراعة الأعضاء وغيرها. يُمكن إكثار النباتات البستنية من خلال إنتاج الأجنة الجسمية (Somatic embryogenesis) خاصة لأنواع الأشجار ذات الجذور الوتدية كون النبات الناتج أصله جنين وبهذا يَكون مجموعهُ الجذري وتدياً. كما ان الإكثار الدقيق لخطوط الآباء يُعد ضروريا في حالة الرغبة في إنتاج بذور هُجن الجيل الاول.

قد يُلجأ أحيانا الى إنتاج نباتات متغايرة وراثياً خاصة في المحاصيل البستنية ومنها نباتات الزينة من خلال توالد نباتات من مزارع الكالس، المُعلقات الخلوية ومزارع البروتوبلاست. تُستعمل أي قطعة من النبات (Explant) وكما مر آنفاً كقطعة من ساق، جذر، ورقة، برعم وحتى خلية مُفردة. ويُمكن تلخيص فوائد الإكثار الدقيق بما يلي:

1- يُعد وسيلة سريعة للإكثار السلالي اذ يُقلل من المدة الزمنية اللازمة لإنتاج النباتات بالطرائق التقليدية.

2- يُمكن إنتاج ما يزيد عن مليون نبات من قطع صغيرة أثناء سنة واحدة في الوقت الذي لا يُمكن إنتاج هكذا عدد بالطرائق الكلاسيكية. ويزداد العدد الى أضعاف فيما إذا أُستعملت المُفاعلات الحيوية لهذا الغرض (شكل 1.4).

3- إمكانية الإستمرار في إنتاج الشتلات على مدار السنة بغض النظر عن موسم الاكثار.

4- يُعد طريقة عملية وإقتصادية تحتاج الى مساحة صغيرة.

شكل 4. 1. المُفاعلات الحيوية وسيلة حديثة وظِفت في الإكثار التجاري للنباتات. (A) إختيار ألأجزاء النباتية وتعقيمها سطحياً. (B) زراعتها بأطباق للإكثار بالطريقة التقليدية او داخل مُفاعلات حيوية. (C) للإكثار الواسع تهيئة الزروعات ووضعها داخل المُفاعل. (D) تقسيم الأفرع الناتجة من مرحلة التضاعف بعد إخراجها من المُفاعل. (F) إستطالة الافرع وتهيئتها للتجذير.

5- يَسمح الإكثارالدقيق بالمُحافظة على خزين إحتياطي من أجزاء النبات او نباتات مُعقمة وخالية من المُلوثات وخصوصاً إذا كانت النباتات المطلوبة من الهُجن.

6- تُعد طريقة فعالة في المُحافظة على المادة النباتية المُعرضة لخطر الإنقراض. وبالرغم من تبني العديد من الدول إنتاج نباتات على نطاق تجاري الا انها لاتزال تواجه بعض المُحددات في الدول غير المُتقدمة كالبُنية التحتية، رأس المال والايدي العاملة المُتدربة.

قد يقتصر الإكثارالدقيق على الأنواع النباتية التي يصعب إكثارها بطرائق الإكثار الخُضرية الاخرى مع الأخذ بنظر الإعتبار ان اشجار الغابات يُمكن إكثارها بسهولة عن طريق زراعة البذور.

ثانياً: إنتاج نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية Production of haploid plants

تُعرف نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية (Haploids) بأنها أبواغ دقيقة تحتوي على نصف العدد من الأمشاج (1n). يتكون الشكل المظهري في هذا النبات من تعبير المعلومات الوراثية من خلال نسخة واحدة من الجينات المحمولة على نصف العدد من الكروموسومات وقد تكون سائدة او مُتنحية ولها القابلية على التعبير عن طفرات مظهرية مُتنحية ناتجة من نباتات أُحادية. ويُمكن إنتاج الأخيرة بطريقة تشجيع تكوين ألاجنة المُباشر (Direct embryogenesis) اذ تتصرف حبة اللقاح وكأنها بويضة مُخصبة تمر في سلسلة من الإنقسامات تتطور بعدها الى أشباه أجنة (Embryoids) لِتُعطي أخيراً نُبيتات أُحادية (شكل 1.5). وقد تُنتج النباتات الأُحادية بطريقة غير مباشرة (Indirect) اذ تُزرع حبة اللقاح وبعد إنقسامات مُتكررة تتطور الى أنسجة كالس تتمايز فيما بعد الى نُبيتات أُحادية.

تكون النباتات الأُحادية عقيمة (Sterile) ولتحويلها الى خصبة تتم مُضاعفة عددها الكروموسومي والذي غالباً مايكون بالمُعاملة بمادة الكولشسين. ومع هذا يجب التأكد من أعداد الكروموسومات بعد الإخلاف (Regeneration) من خلال عد الكروموسومات او تقدير كمية الدنا. يُعد تحفيز حبة اللقاح كي تدخل مرحلة تكوين الأجنة أحد أهم المُعضلات اذ لا يوجد عامل واحد بمُفرده يؤثر في ذلك.

ثالثاً: زيادة التغاير الوراثي Increasing genetic variation

تُعامل ألنبيتات أُحادية المجموعة الكروموسومية بمادة الكولشسين لإنتاج خطوط خصبة نقية وراثياً (Fertile homozygous lines) تُدعى بالخطوط النقية الثنائية (Double haploid lines) والتي تُنتج من توالد مُباشر لأنواع وراثية نقية تم فيها زيادة عدد الكروموسومات الى الضعف. وبالإمكان تهجين تلك

التراكيب الوراثية وإنتاج هُجن منها. تُكاثر الهُجن النقية بطرائق الإكثار النسيجي المُباشر اي دون المرور بمرحلة الكالس او المُعلقات الخلوية خاصة من زراعة المرستيمات القمية.

شكل 1.5. تكوين الأجنة الجسمية أُحادية المجموعة من الكروموسومات من زراعة متوك مفصولة من نبات الباذنجان بعد تحفيزها في إنتاج الكالس.

تحصل في الغالب تغايرات جسمية (Somaclonal variations) ناتجة عن زراعة الخلايا الجسمية عموماً ويُطلق مُصطلح Mericlonal variations في التغايرات الحاصلة من زراعة المرستيمات. كما يُطلق مصطلح Protoclonal variations في التغايرات التي تظهر بعد زراعة البروتوبلاست ويُشير مصطلح Gametoclonal variations الى التغايرات الناتجة بعد زراعة حبوب اللقاح.

رابعاً: زراعة البروتوبلاست Protoplast culture

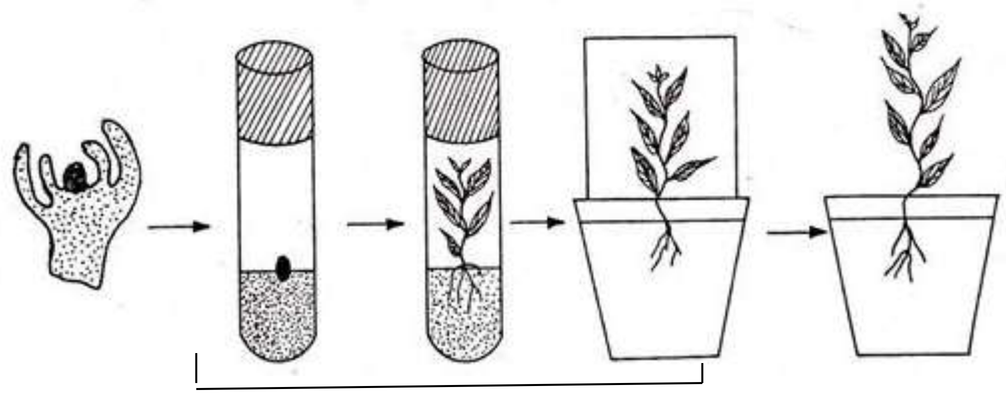
تُعد البروتوبلاستات أصغر وحدات بنائية نباتية لها القابلية على توالد نبات جديد وعليه بالإمكان إعتبارها مصدراً مُهماً لتحفيز التغاير الوراثي خاصة الجسمي. ومن المعلوم أن زوج من البروتوبلاستات المُعزولة له القابلية على الإندماج لإنتاج الهُجن السايتوبلازمية (Cybrids) او قد تنتج نباتات جديدة غير موجودة في الطبيعة (Novel). تسمح تقانة دمج البروتوبلاستات بتخطي الحواجز بين الأنواع والاجناس النباتية اذ يُمكن للبروتوبلاستات منزوعة الجدر الخلوية قبول أجسام خارجية داخلها دون أن ترفضها كإدخال النوى، العضيات السايتوبلازمية، اللايبوسومات والمادة الوراثية. تتجسد أهمية التقانة في إنتاج هُجن تركيبية بالنظر لكون طرائق التهجين الكلاسيكية غالباً ما تواجه بظاهرة عدم التوافق (Incompatibility). ولهذا تُعد تقانة

عزل وزراعة ودمج البروتوبلاستات أحد الحقول المُدهشة علمياً وكمادة جديرة بالبحث العلمي إذ فتح الموضوع آفاقاً رحبة في مجال تحسين المحاصيل من خلال التهجين الجسمي وتحوير الخلايا.

والجدير بالذكر أن البروتوبلاست قبل او بعد الدمج له القابلية على تكوين نبات كامل. ومن المُؤكد أن هذه التقانة سيكون لها دوراً مُستقبلياً كبيراً كأدوات بحثية للعاملين في مجال زراعة النبات نسيجياً والباحثين في مجال فسلجة وأمراض النبات والبيولوجيا الجزيئية والوراثة الخلوية وللباحثين في مجال التقانات الأحيائية. وكان لإكتشاف الإنزيمات التي تفصل الخلايا عن بعضها وتُزيل جُدرها أهمية كبيرة إذ ما وُفرت الظروف اللازمة لعزل البروتوبلاستات وإستثمارها في مجال هندسة الخلية وراثياً.

خامساً: إنتاج نباتات خالية من الفيروسات Production of virus free plants

يُعد أحد المجالات المُهمة التي إستثمرها مُختصو التقانات الأحيائية النباتية ومختصو الأمراض النباتية في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات. ويرجع الموضوع الى بداية خمسينيات القرن الماضي عندما نجح مورل ومارتن (Morel & Martin, 1952) في توالد نبات داليا خالٍ من الفيروسات بعد فصل القمم المرستيمية من أُمهات كانت مصابة اصلاً بالفيروسات (شكل 1.6). وبعد فترة قليلة تمكن المُختصون من التخلص من فايروسي A وY اللذين يُصيبان نبات البطاطا. ولتحقيق هذا الهدف، تُفصل المرستيمات القمية بطول 0.2 -0.5 ملم لِتزرع على اوساط غذائية معلومة المُكونات تحت ظروف مُسيطرٌ عليها. ومن المعلوم ان ألأجزاء النباتية الأصغر من ذلك لاتعيش والأكبر من ذلك قد تكون مُصابة بالفيروسات. وطوِرت تقانات أُخرى في هذا المجال والتي تُعد كأساليب وقائية لتجنب الفيروسات كالمعاملة الحرارية (Thermotherapy) للنباتات الأُم المُراد إكثارها نسيجياً بعد تعريضها الى درجات حرارة بحدود 40 °م او رشها بمواد كيميائية مثل فايروزول (Virazole) وكما موضح في جدول 1.1 لتزيد من سرعة نموها الخضري اذ يُعتقد ان سرعة نمو الأفرع الخُضرية في هذه الحالات يكون أسرع من حركة الفيروس. تُقطع المرستيمات القمية تحت المجهر بطول لايزيد عن 0.5 ملم وتُعقم وتُزرع على الوسط المُناسب لإستطالتها وتضاعفها ومن ثم فصل النُموات الخُضرية وتجذيرها لِتؤقلم النُبيتات وتُفحص النباتات الناتجة من وجود او خلوها من الفيروسات بتقانة الإلايزا (ELISA) المعروفة.



شكل 1.6. زراعة المرستيم القمي كوسيلة لإنتاج نباتات خالية من الفيروسات.

جدول 1.1. تأثير المعالجة الحرارية والمعاملة بالفارازول في فيروس ALV السابت داخل قلب نبات الخرشوف (*Cynara scolymus* L.). أُجريت المعاملة الحرارية لمدة 31 يوماً متتالية وبمعدل 10 ساعات إضاءة في اليوم وبدرجة حرارة 42 ^{o}م في أثناء النهار و 10 ^{o}م في الليل.

المعاملة	فارازول (جزء بالمليون)	المعالجة الحرارية	نباتات خالية من الفيروسات بعد 5 أسابيع (%)
1	0	+	40
2	0	+	55
3	10	+	71
4	20	+	100
5	0	+	57
6	0	+	40
7	10	+	100
8	20	+	100

سادساً: التركيب الدقيق للأفرع الطرفية Micrografting of terminal shoots

فَتحت تقانة التركيب الدقيق (*In vitro* Grafting) إمكانية إجراء عملية التركيب بالأنواع والاصناف الجيدة من المحاصيل خاصة الفاكهة والخضروات إذ تُطعم على شتلات بذرية او مُنتجة نسيجياً داخل أنابيب إختبار وتجري عملية التركيب تحت ظروف مُعقمة والتي غالباً ما تُتبع طريقة التركيب السوطي الدقيق (Whip micrografting) وكما موضح في شكل 6. تؤقلم الشتلات الناجحة وتوزع على المزارعين او تُصدر الى الأسواق. ومن المعلوم ان التركيب خارج الجسم الحي يُعد وسيلة مهمة للتخلص من الفيروسات لكون الإصول المُستعملة مقاومة لها وتنقل الأخيرة صفة المُقاومة الى الطعوم. اذ تم التخلص من أمراض فيروسية تُصيب بساتين الحمضيات والخوخ بهذه الطريقة بعد إستعمال إصول حمضيات وخوخ تحمل صفة المُقاومة للفيروسات. أُستثمرت هذه التقانة من قبل معامل الزراعة النسيجية في إنتاج اشجار فاكهة مُطعمة على اصول جيدة وطعوم ذات صفات ثمرية او زهرية او ورقية مرغوبة للإستهلاك المحلي او يتم تصديرها الى الأسواق العالمية.

شكل 1.6. شتلات بذرية من نباتات الخيار تُستعمل كاصول لمقاومتها لبعض أمراض الجذور (أعلى).

وشتلة خيار بعد تطعيمها بصنف عالي الإنتاجية (أسفل).

سابعاً: الإكثار بالأجنة الجسمية Propagation using somatic embryos

تُوفر تقانة تحفيز الأجنة الجسمية (Somatic embryogenesis) فرصة مهمة لإنتاج نباتات بأعداد كبيرة ذات ثباتية وراثية (Genetically stable) عالية داخل دوارق (شكل 1.7) مع إمكانية تحفيز هذه الأجنة الى النشوء داخل مُفاعلات حيوية بهدف الإنتاج الواسع لشتلات مُتجانسة (Uniform). أُستثمرت التقانة الأخيرة في إنتاج نباتات مُنماة في اوساط سائلة وعلى مدار السنة مما ساهم في زيادة الرقعة الزراعية وخاصة النخيل (شكل 1.8). والجدير بالذكر حصول إنخفاض في قابلية ألأجزاء النباتية على تكوين الأجنة مع مرور الزمن وقد سُجلت هذه المُلاحظة في عدد من الأنواع النباتية مما يستوجب الامر البدء بمادة نباتية مُنتجة حديثاً.

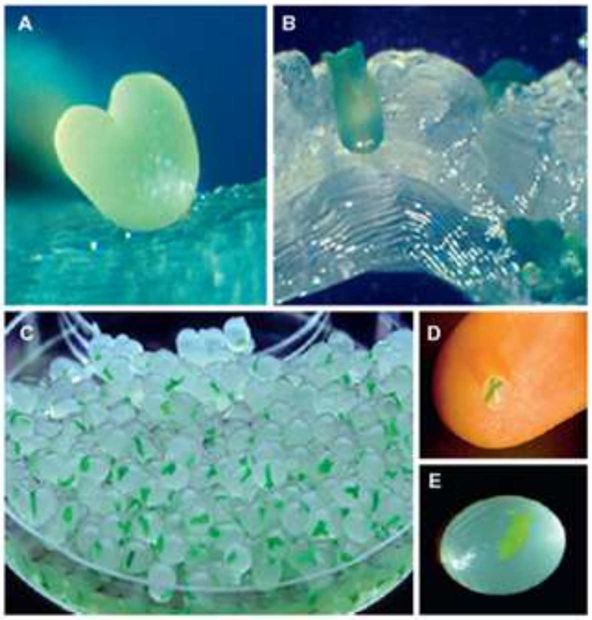
جنين جسمي مع فلقتين تكوين الفلق شكل الطوربيد شكل القلب الشكل الكروي

شكل 1.7. الأجنة الجسمية في نباتات ذوات الفلقتين ومراحل تطورها. من اليسار الى اليمين، الطور الكروي، طور شكل القلب، الطور الطوربيدي، جنين جسمي في طور تكوين الفلق، جنين جسمي في طور الفلق.

شكل 1.8. نُموات خضرية جاهزة للتجذير نتجت من أجنة جسمية لمزارع نخيل التمر النسيجية.

ثامناً: إنتاج البذور الصناعية Production of artificial seeds

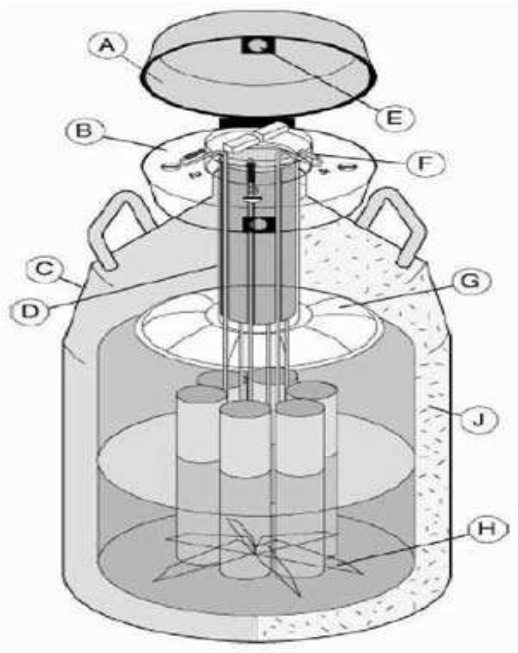
ظهرت تقانة إنتاج البذور الصناعية (Synthetic or artificial seeds) وتسمى أحياناً (Encapsulated seeds) في العقدين الأخيرين من القرن الماضي. تُغلف الأجنة الجسمية بأغلفة رطبة تُسمى بالهيدروجيل (Hydrogel) وقد تكون من مواد معينة والتي غالباً ما تكون مادة ألجنيت الصوديوم (Sodium alignate) بالرغم من إختبار العديد من المواد الاخرى وثَبت نجاحها بدرجات متفاوتة. أُنتجت أجنة جسمية مُفردة وغُلفت بهذه المواد التي أحتوت على مُكونات مُماثلة لتلك الموجودة في سويداء الجنين الجنسي لتكون مصدراً لغذاء الجنين قبل واثناء الانبات (لاحظ شكل 1.9). أدت التقانة هذه الى إنخفاض هائل في تكاليف إنتاج العديد من الشتلات كالجزر والكرفس مع المُحافظة على ثباتيتها الوراثية على عكس زراعة البذور الناتجة من التلقيح والاخصاب والتي تنتج نباتات متغايرة وراثياً خاصة في الأنواع النباتية خلطية التلقيح.



شكل 1.9. الإستفادة من تقانة إنتاج ألأجنة الجسمية في إنتاج بذور صناعية للعديد من محاصيل الخضر تحمل صفات عالية الجودة. (A) أجنة جسمية في مرحلة الشكل القلبي تم إستحثاثها من هايبوكوتل محصول السلجم (*Brassica napus*). (B) أجنة جسمية ثانوية تكونت من السويق تحت الفلق (Hypocotyl). (C، D، E) بذور صناعية تم تحضيرها بعد ان غُمرت ألأجنة الجسمية داخل اللجنات الكالسيوم.

تاسعاً: المُحافظة على المصادر الوراثية Maintenance of genetic resources

وفرت الزراعة النسيجية وسائل حديثة للحفاظ على المادة الوراثية (Germplasm conservation) او ما يُسمى ببنوك الجينات (Gene banks) اذ يُمكن خزن ألأجزاء النباتية المُختلفة وخاصة تلك المُهددة بالإنقراض لِمُدد زمنية طويلة. تَبنى الباحثون عدة إستراتجيات لخزن المادة النباتية اولهما تُبطيء نمو الخلية او النسيج او العضو النباتي (Slow growth) وثانيهما التجميد الفائق (Cryopreservation). طُبقت التقانة بنجاح في خزن العديد من الأنواع النباتية. وأثبتت بأنها تقانات بسيطة يُمكن من خلالها تجميد وتغليف المرستيمات القمية داخل كُرات صغيرة جافة ونجحت هذه التقانة في المُحافظة على أنواع من الكُمثرى والفراولة واليوكالبتوس والبطاطا بعد خزنها لفترات زمنية مُختلفة. ومن المُهم في هذا الصدد بأن العديد من بنوك الجينات العالمية قد وظفت تلك التقانة في خزن الأصناف المُتداولة حالياً والقديمة والمُهددة بالإنقراض مما فتح آفاقاً في تداول وتبادل المادة الوراثية بين العلماء والباحثين في مُختلف البلدان وفي إعادة توالدها على فترات زمنية مُختلفة وإدخالها في برامج تربية وتحسين النبات. تُستعمل عبوات خاصة لحفظ وتداول المواد الوراثية (شكل 1.10) ويمكن للقارئ مراجعة الفصل التاسع والكتب المتخصصة في هذا الموضوع للإطلاع على وسائل خزن المصادر الوراثية وشروط تداولها.



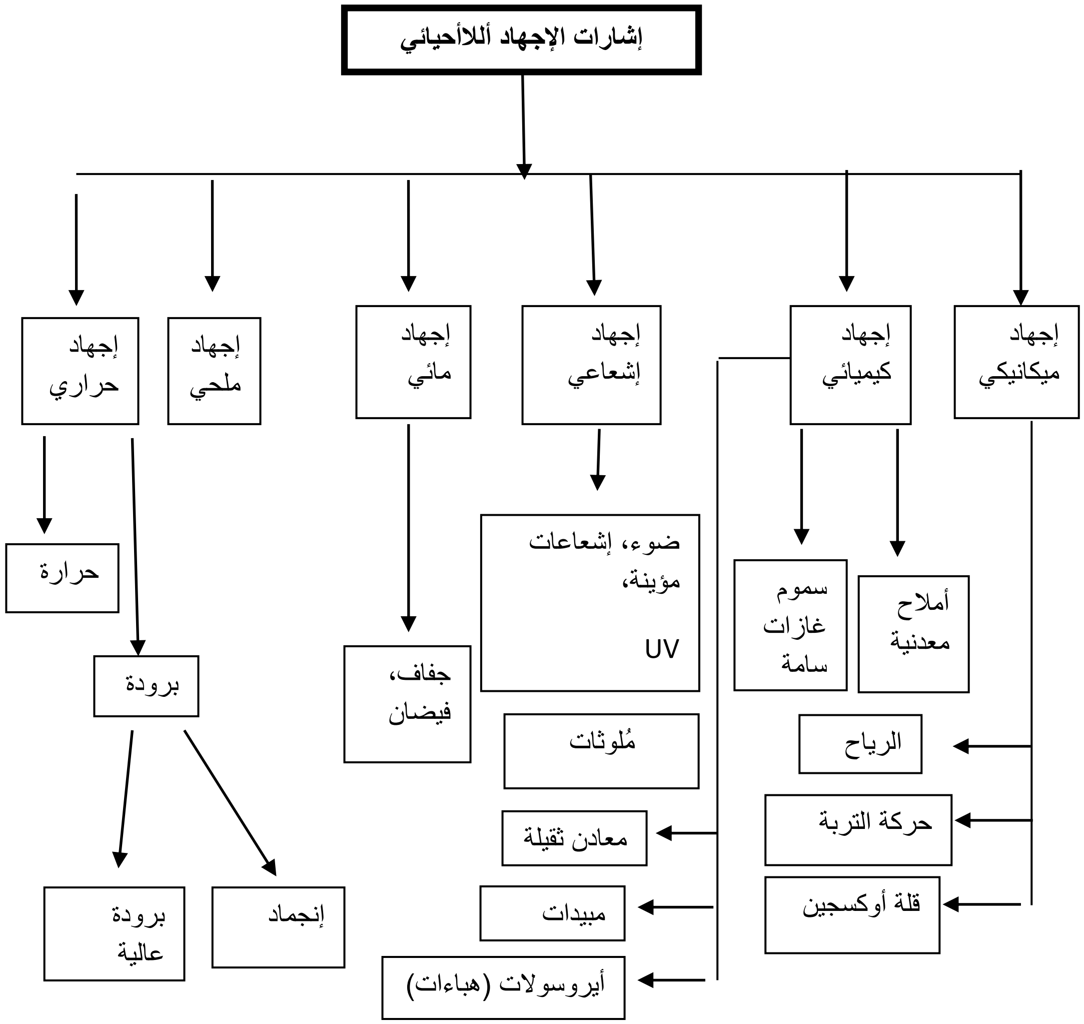
شكل 1.10. عبوات خاصة لحفظ وتداول المصادر الوراثية.

(A) غطاء مُحكم ضد الصدمات. (B) غطاء ثاني لزيادة الإحكام. (C) معدن صلد خفيف الوزن مصنوع من الالمنيوم. (D) عنق العبوة طويل وصلد لتقليل الفقد في النتروجين السائل. (E) صنبور غلق. (F) رقم العبوة التعريفي. (G) نظام مُحافظة كيميائي مُصمم لأغراض تفريغ الهواء عالي الكفاءة. (H) تصميم عنكبوتي يُسهل من رفع وإدخال العبوات الحاوية للمادة الوراثية. (J) غلاف يوفر درجة عالية من العزل الحراري.

عاشراً: إنتاج نباتات مُتحملة للظروف البيئية Production of plants tolerant to environmental conditions

وفرت تقانة الزراعة النسيجية فرصة إنتاج نباتات مُقاومة او مُتحملة للظروف البيئية المُختلفة كالشد الملحي والرطوبي وإنتاج نباتات مُتحملة لإرتفاع وانخفاض درجات الحرارة وكذلك مُتحملة لمُلوثات التربة كالعناصر الثقيلة والمُركبات الهيدروكربونية (شكل 1.11). يعتمد ذلك على تحفيز ألأجزاء النباتية على تكوين الكالس والمُعلقات الخلوية وتعريضهما الى العوامل أعلاه وإنتخاب الخلايا المُتحملة او المُقاومة منها. وُظفت مزارع الكالس والمعلقات الخلوية لحد كبير في هذا الصدد بدون معاملة إعتماداً على التغاير الجسمي (Somaclonal variation) الذي يحصل في الغالب نتيجةً لتعاقب تقطيع الكالس وزراعته على وسط جديد حيث تزداد نسبة التغاير الجسمي طردياً مع عدد مرات التقطيع والزراعة. يمكن الإستفادة من التغاير في إنتخاب خطوط خلوية ذات صفات مرغوبة على ان يكون حجم قطعة الكالس مناسباً فالقطع الصغيرة جداً لا يُمكنها من الإنقسام والتكاثر اما القطع الكبيرة فقد تتهرب من عامل الإجهاد (Selective agent) وبالتالي تكون فرصة الحصول على طوافر (Mutants) قليلة. قد تُضاف عوامل الإجهاد المطلوب الإنتخاب لتلك الصفة الى الوسط الزرعي بتراكيز تحت القاتلة ومن ثم يجري إنتخاب الخلايا الناجية وإكثارها وبالتالي توالد نباتات منها قد تكون مُتحملة للإجهادات. يمكن أيضاً إضافة لُقاحات معلومة العدد من الخلايا الى اوساط قبل تصلبها ومزج الخلايا بعد غربلتها وتركها لتتصلب اي طمرها (Embedding) لتكون الخلايا مُحاطة تماماً بالوسط الغذائي الحاوي على عامل الإجهاد ومن ثم إلتقاط الخلايا الناجية لتكون فرصتها في تحمل الإجهادات كبيرة كونها مُحاطة بعامل الإنتخاب من كافة الجهات. تُستثمر المُعلقات الخلوية هي الاخرى بعد ان تُحدد كثافة اللقاح (Inoculum density) لتنشر على وسط صلب او نصف صلب حاو على عامل الإجهاد لِتُنشر الخلايا المُفردة او كتل طبقية صغيرة من الخلايا (Cell plating). يتم إنتخاب خطوط الخلايا المُتحملة او المُقاومة وإكثارها وإعادة توالدها الى نباتات. كما يُمكن إنتخاب خطوط خلايا ايضاً بعد إضافة عامل الإجهاد

مُباشرة الى مزارع المُعلقات الخلوية. أُنتجت نباتات مُتحملة للملوحة والجفاف وباقي الإجهادات اللاأحيائية (جدول 1.1) وايضاً في إنتاج نباتات مُقاومة للأمراض النباتية بعد إضافة مُستخلصات المُسببات المرضية او سُمومها الى الاوساط الغذائية المُنماة عليها الخلايا النباتية وعزل الخلايا المُقاومة وإعادة توالدها الى نباتات. تُستثمر التقانة ايضاً في الحصول على نباتات مُتحملة للمُلوثات عموماً إضافة الى إمكانية عمل مزارع ثنائية (Dual cultures) من خلال زراعة النسيج النباتي مع المُسبب المرضي في مزرعة واحدة وإجبار الطُفيلي على التغذية من الوسط المُنمى عليه الجزء النباتي. أدى ذلك الى زيادة فهم آلية العلاقة بين النبات والمُسبب المرضي وتسهيل إنتخاب نباتات مقاومة للأمراض.



شكل 1.11. الإشارات المُختلفة للإجهادات اللاأحيائية والتي تُسبب الإجهاد في النبات.

الحادي عشر: زراعة وإنقاذ الجنين Embryo culture and rescue

يُستفاد من زراعة الجنين (Embryo culture) وإنقاذه (Embryo rescue) في إزالة الحواجز التي تُعيق التضريبات بين الأجناس والأنواع النباتية المطلوبة في برامج تحسين النبات وكذلك في إنتاج نباتات خالية من المُسببات المرضية وذلك بالإستفادة من الأجنة الجاهضة وغير الحيوية. اذ يُمكن التغلب على سكون البذور، تقصير برنامج تربية وتحسين النبات، التغلب على عقم البذور، إختبارات حيوية البذور السريعة، الحصول على هُجن جديدة ونادرة، إكثار النباتات النادرة، إنتاج نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية إضافة الى تطبيقات أُخرى لامجال لذكرها هنا. وُظفت زراعة الأجنة وبنجاح في الحصول على هُجن العديد من النباتات المُهمة اقتصادياً مثل فستق الحقل، القطن ، الكتان، الرز، الطماطم وكذلك الشعير. وُظفت التقانة ايضاً في إنقاذ نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية من الشعير الناتج من زراعة البويضة غير المُخصبة (Gynogenic haploid) حيث ان التهجين بين نوعي الشعير *Hordum vulgare* و *H. bulbosum* يَنتج عنه أجنة أُحادية المجموعة الكروموسومية داخل البويضة المُخصبة بعد حذف 1n من كروموسومات النوع *H. bulbosum* أثناء مراحل نشوء الجنين الاولى. يُستفاد من الهُجن الناتجة من زراعة الأجنة خارج الجسم الحي في برامج تربية وتحسين النبات، وعلى وجه التحديد عند نقل صفات حقلية مرغوبة من الأنواع البرية الى المحاصيل المُستزرعة مع إنتاج محاصيل تركيبية مثل محصول تريتيكيل (Triticale) ومن ثم إنتاج نباتات ذات تضاعف كرموسومي (Amphidiploids) من الهُجن الناتجة.

الثاني عشر: إنتاج نباتات مُحورة وراثياً Production of genetically modified plants

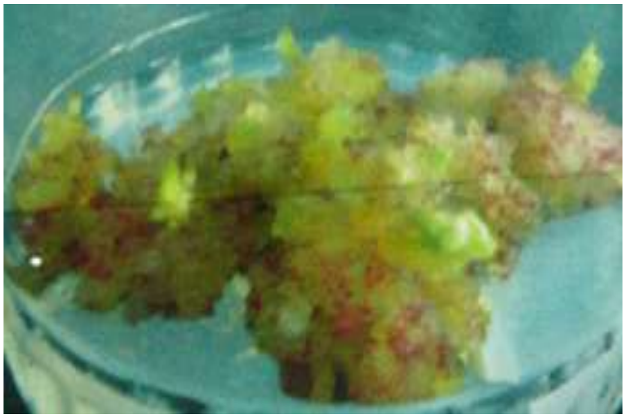
أُنتجت نباتات محورة وراثياً (Transgenics) في العديد من المحاصيل الحقلية والبستنية. أُطلقت هذه المحاصيل للزراعة على نطاق تجاري وهي تحمل صفات مُضافة مرغوبة أو صفات محذوفة غير مرغوبة كتحمل مُبيدات الأعشاب والحشرات والمُقاومة للأمراض والحشرات. كما هُندست العديد من النباتات وراثياً بهدف زيادة قيمتها الغذائية كماً ونوعاً وإطالة فترة خزنها مابعد الجني. فعلى سبيل المثال أُنتجت طماطم محورة وراثياً (Flaver saver) تمتاز بإحتوائها على جينات تُؤخر من نضج الثمار وزرعت على نطاق واسع في الولايات المتحدة الامريكية ودول اخرى إمتازت بطول فترة خزنها ومدة عرضها في الأسواق. ومن أهم المحاصيل التي عُدلت وراثياً فول الصويا، القطن، الذرة الصفراء، السلجم والبطاطا إذ إمتازت المحاصيل المذكورة أعلاه بإنتاجيتها العالية وإحتوائها على صفات مرغوبة أُخرى. ومن الأمثلة على ذلك إنتاج الرز الذهبي (Golden rice) الحاوي على جين كاروتين B والذي يُنتج حالياً ويُوزع على دول شرق

آسيا حيث يعتمد غالبية السكان على الرز كمصدر للكربوهيدرات. من المعلوم ان الرز المُزالة قشرتهُ يكون خالياً من فيتامين A ولهذا فأن إضافة هذا الجين الى الرز ساهم في الوقاية من مرض العمى (Blindness) الذي يُسببه نقص فيتامين A فيما يزيد على 2 مليون طفل. كذلك محصول الموز المُعدل وراثياً الحاوي على لُقاح ضد التهاب الكبد الفيروسي B. وسيتم التطرق الى هذه المواضيع في التفصيل في الفصول القادمة. وكمثال آخر، يمكن عمل التحول الوراثي وإنتاج الشعيرات الجذرية كمصدر جيد لإنتاج مُركبات الايض الثانوي بحقن أجزاء النبات المُختلفة ببكتريا *Agrobacterium rhizogenes* (شكل 1.12).

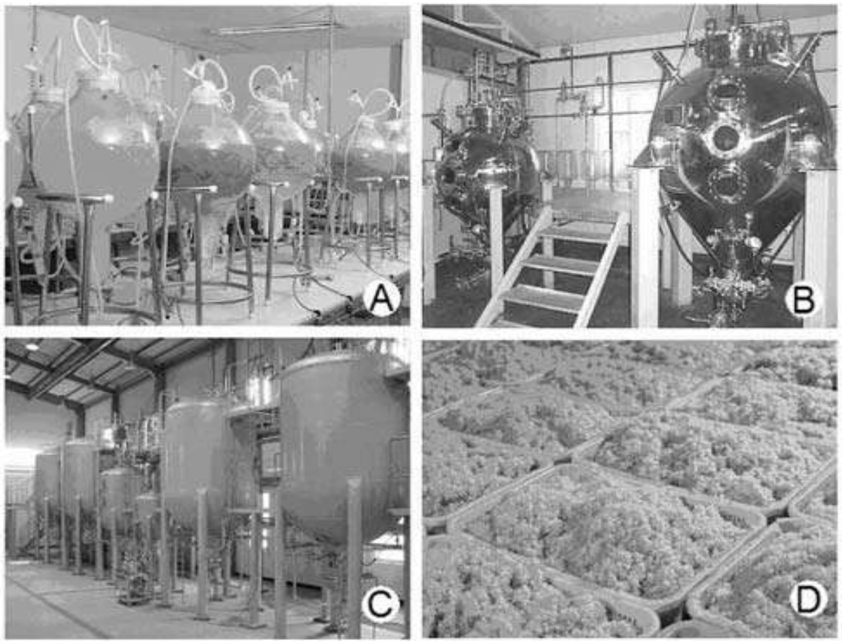
شكل 1.12. تحفيز نشوء الشعيرات الجذرية على أجزاء النبات بعد حصول التحول الوراثي.

الثالث عشر: إنتاج مُركبات الايض الثانوية Production of secondary metabolites

تَنتج النباتات مُركبات كيميائية مُختلفة وتحت تسميات مُتنوعة تحت مظلة كيميائيات النبات (Pytochemicals). تشمل على مُركبات ذات قيمة صيدلانية، مُنكهات، عطور، مواد تجميل، مُضافات غذائية، أعلاف، مواد مُضادة للميكروبات والتي تكون أسعارها عموماً مرتفعة على العكس من مُركبات الايض الاولية رخيصة الثمن لكون النبات ينتج الأخيرة بكميات كبيرة. يُطلق على أغلب تلك المُركبات بمواد الايض الثانوي (Secondary metabolites) والتي لاتدخل في البناء الحيوي مُباشرة ولكن ذات وظائف فسيولوجية أهمها في زيادة تحمل الاجهادات البيئية. وُظِفت تقانة زراعة أنسجة النبات وكما ذُكر آنفاً في إنتاج مُركبات الايض الثانوي وانتقلت من المراحل المُختبرية (شكل 1.13) والتجريبية الى مرحلة الإنتاج الواسع بإستعمال مُفاعلات حيوية ذات سعات تزيد على آلاف الألتار (شكل 1.14). إستثمرت الصناعات الدوائية الإنجازات التي حققتها مزارع النبات النسيجية وشرعت بإنتاج مئات التحضيرات الدوائية والتجميلية بإستعمال مزارع المُعلقات الخلوية داخل المفاعلات الحيوية، ولكون الخلايا النباتية تزيد من إنتاجها عندما تكون في حالة مُستقرة وليست مُتحركة، لذلك وُظِفَت تقانات تقييد وحصر الخلايا كمنظومة توضع داخل المُفاعلات الحيوية.



شكل 1.13. إنتاج مُركبات الايض الثانوي مُختبرياً. الشكل يمثل مزارع الكالس لنبات الروجة (*Hypericum triquetrifolium*) ويظهر فيها تراكم مادة الهايبرسين ذات اللون الاحمر.



شكل 1.14. إنتاج المواد الصيدلانية على نطاق تجاري. (A) مُفاعلات حيوية بيضوية الشكل، (B) مقطع يوضح مكونات المُفاعل من الداخل، (C) مُفاعلات اسطوانية الشكل، (D) مواد صيدلانية مُنتجة على نطاق تجاري.

الرابع عشر: إنتاج نباتات مُتغايرة مظهريا Production of phenotypically variable plants

تنتج في بعض الحالات ونتيجة للتغاير الجسمي نباتات فاقدة لكل الصبغات النباتية او بعض منها (شكل 1.15). ويهتم المُختصون في مجال نباتات الزينة في إنتاج نباتات بالوان غير مألوفة.

شكل 1.15. إخلاف نباتات فاقدة للصبغات نتيجة التغاير الجسمي الذي يحصل في المزارع النسيجية وغالباً ما يكون ذات قيمة تسويقية لمُربي ومُنتجي نباتات الزينة.

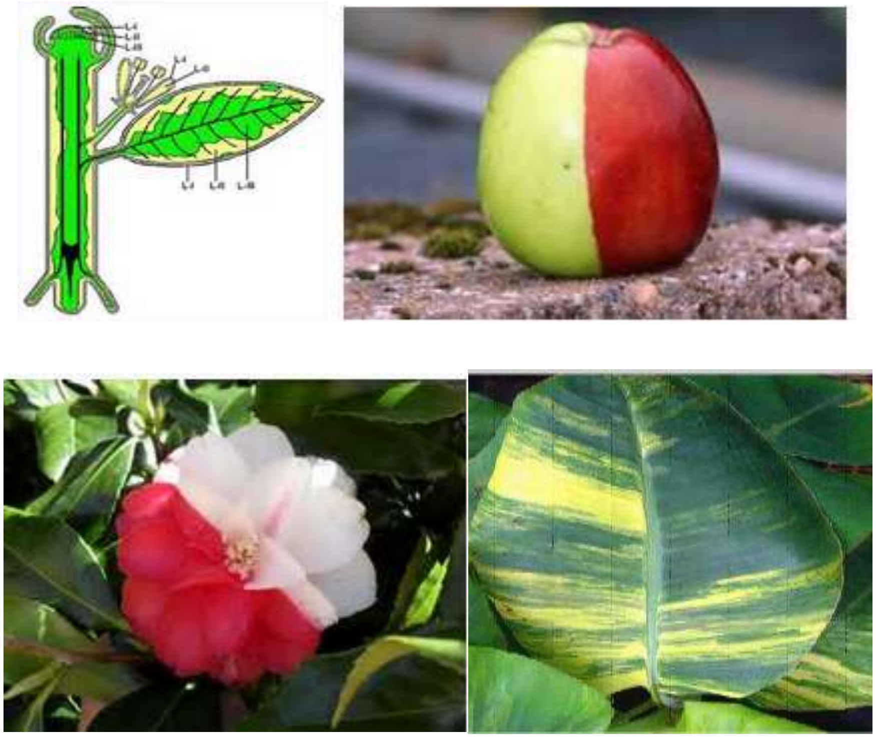
الخامس عشر: إنتاج نباتات الكايميرا Production of chimeric plants

تتكون الكايميرا من نوعين أو أكثر من الأنسجة المُختلفة وراثياً تنمو مُنفصلة عن بعضها ولكن مُتجاورة في نفس النبات. تنتظم تلك الأنسجة على شكل طبقات أو مقاطع وتعتمد درجة ثباتيتها الوراثية على تركيبها وعلى الهيئة الوراثية للنبات. لها أهمية كبيرة من الناحية البستنية وذلك لإنتاج نباتات أو ثمار بألوان غير مألوفة حيث تكون أنسجتها مُبرقشة أو مُقلمة باللوان مُختلفة (شكل 1.16).

تأخذ الكايميرا عدة أشكال أهمها المُحيطية (Periclinal) وتحصل عندما يُحيط نسيج بآخر تماماً بحيث تظهر ورقة النبات بلونٍ آخر كما هو الحال في نباتات جلد النمر؛ والقطاعية (Sectorial) والذي تظهر فيه ورقة النبات مقسومة الى قسمين او أكثر كل ذات لون مُختلف عن الآخر؛ وطولية (Mericlinal) حيث تظهر ورقة النبات ذات بُقع مُلونة او مُبرقشة ويمكن مراجعة الفصل الثامن للإطلاع على التفاصيل.

5- التغاير الجسمي (Somaclonal variation) والذي قد ينتج من مرور الزروعات في مرحلة الكالس أو المُعلق الخلوي او إعادة إخلاف مزارع البروتوبلاست علماً ان نسبة التغاير الجسمي تزداد طردياً مع عدد مرات تقطيع الزروعات (Subculture) وعمر الكالس. يمكن تمييز التغاير الجسمي في كافة الاحوال

مظهرياً او بإستعمال الطرائق الجزيئية المعروفة. بالرغم من مساوئ التغاير الجسمي في إحتمالية ظهور نباتات شاذة، الا أن له العديد من الفوائد لعل أهمها نشوء أصناف جديدة.



شكل 1.16. نمو نسيجين أو أكثر مُختلفين وراثيين لتكوين الكايميرا ذات الأهمية من الناحية البستنية.

السادس عشر: إنتاج البروتينات العلاجية واللقاحات Production of Therapeutic proteins and vaccines

أصبحت النباتات نظام منافس قوي لأنظمة إنتاج البروتينات العلاجية واللقاحات من مصادرها الاخرى. بينت العديد من الدراسات بأن البروتينات التي تم التعبير عنها داخل أنسجة النبات توفر المناعة ضد العديد من الأمراض مما يجعل من النباتات لقاحات تؤكل طازجة وفق جرع محسوبة. أُنتجت مضادات الأجسام في العديد من النباتات (راجع الفصل الرابع عشر وملاحق الكتاب) وخاصة في نباتي التبغ والرز والخس وغيرها حيث انتجت جزيئات IgG وبواقع 1.3% من محتوى بروتين الورقة الكلي. فتحت هندسة النبات وراثياً الآفاق في إنتاج البروتينات المؤشبة وبمستويات عالية (جدول 1.2). استثمرت في إنتاج البروتينات

العلاجية وإنتاج اللقاحات المأكولة كلاً من جينومي النواة والبلاستيدة الخضراء مع أفضلية الأخيرة لأسباب تم ذكرها في فصل 14.

جدول 1.2. بروتينات مناعية وعلاجية تم تصنيعها في نباتات محورة وراثياً

النبات	البروتين المؤشب	مستوى إنتاج البروتين
التبغ	sIgA Anti-S. mutans	g/µg 500 -200
التبغ	HBsAg	0.01% بروتين ذائب كلي
البطاطا	Norwalk capsid protein	0.23% بروتين ذائب كلي
البطاطا	Norwalk capsid protein	µg/g 20-10
البطاطا	Cholera toxin CT-B	µg/g 30
البطاطا	Mouse GAD67	µg/g 150

السابع عشر: النباتات كمعامل للمطاط ومواد جديدة Plants as factories for bioplastics and other novel biomaterials

تنتج أجزاء النبات المختلفة مركبات هايدروكي الكانوويت المتعددة المستعملة في الصناعات المطاطية وصناعات اخرى مختلفة في نباتات تم تحويرها وراثياً لهذا الغرض (جدول 1.3). شجع ذلك دول العالم وخاصة المتقدمة في تبني زراعة محاصيل جديدة في دول فقيرة قد يُحسن من إقتصادها المحلي وبإتجاه تصنيع الزراعة وتوفير فرص عمل جديدة.

توفر النباتات عموماً بيئة مناسبة تجعل منه كمفاعل حيوي لإنتاج مضادات الأجسام وبأنواع مختلفة وبأسعار منخفضة بعد ان دخلت بروتينات التحصين والتمنيع المنتجة داخل النظم النباتية في الصيدليات. لعل مضاد الجسم الأكثر إنتشاراً IgA في النظام المناعي للأنسجة الطلائية خير مثالٍ على إنتاجه بكميات وفيرة داخل النبات.

جدول 1.3. إنتاج مركبات Polyhydroxyalkanoates (PHA) في نباتات محورة وراثياً

النوع النباتي	**موقع التراكم**	**النسيج**	**نوع PHA المنتج**	**إنتاج PHA (% من المادة الجافة)**
الأربدوبسس (*Arabidopsis thaliana*)	البلاستيدات	نموات خضرية	P(3HB)	40-14
الأربدوبسس	البلاستيدات	نموات خضرية	P(3HB-3HV)	1.6
الأربدوبسس	السايتوبلازم	نموات خضرية	P(3HB)	0.1
الأربدوبسس	السايتوبلازم	النبات كامل	P(3HB-co-3HV)	0.6
الأربدوبسس	البيروكسيسوم	النبات كامل	mcIPHA	0.4
الأربدوبسس	البيروكسيسوم	النبات كامل	scI-mcIPHA	0.04
الأربدوبسس	بيروكسيسوم	البادرات الكاملة	P(3HB)	1.8
الجت (Alfalfa)	البلاستيدة	النموات الخضرية	P(3HB)	0.2
الذرة الصفراء	البلاستيدة	النموات الخضرية	P(3HB)	6.0
الذرة الصفراء	بيروكسيسوم	المعلق الخلوي	P(3HB)	2.0
القطن	السايتوبلازم	الحزم الوعائية	P(3HB)	0.3
القطن	البلاستيدة	الحزم الوعائية	P(3HB)	0.05
البطاطا	البلاستيدة	النموات الخضرية	P(3HB)	0.02
البطاطا	السايتوبلازم	خطوط خلوية	mcIPHA	1.0
البطاطا	البلاستيدة	النموات الخضرية	mcIPHA	0.03
السلجم	السايتوبلازم	النموات الخضرية	P(3HB)	0.1

الثامن عشر: التلقيح بالمايكورايزا Micorrhizae inoculation

تحصل المايكورايزا غذائها من الاشجار والتي بدورها تحسن من نمو النبات بتسهيل سحب المغذيات اليه. ومن الضروري إنتخاب وزراعة السلالة المناسبة من المايكورايزا في خليط تربة الزراعة والرمل من أجل تكاثرها وتحسين نمو النبات خاصة للنباتات المكثرة نسيجياً. تُستعمل حالياً سلالات كفوءة في المشاتل التجارية لزيادة إنتاجية النباتات فتزرع حشائش كوانا (Guinea grass) أو اي نوع من الحشائش المناسبة في خليط التربة والرمل بعد حقن سطح التربة بلقاح حي يحتوي على سلالة المايكورايزا وقطعة من جذر وتربة وعند وصول النباتات بعمر 2-3 أشهر، يُعصر المجموع الجذري مع التربة والرمل للحصول على اللقاح. تُسوق العديد من الشركات حالياً لُقاح المايكورايزا تحت تسمية VAM-fungi إختصاراً الى Vasicular-arbuscular mycorrhizal fungus. تمت زراعة وإدامة المايكورايزا Glomus aggregatum بنجاح في وسط تركيبي بإستعمال طرائق الزراعة النسيجية. فتح هذا النجاح آفاقاً واسعة وكسر حواجز المعوقات التي كانت تواجه البحوث المتعلقة بالمايكورايزا ذات الأهمية البالغة في إنتاج أشجار الغابات.

الفصل الثاني: الإكثار الدقيق

Micropropagation

مقدمة Introduction

يشتمل الإكثار الدقيق إتباع طرائق غير جنسية في إكثار النبات نسيجياً بهدف إنتاج أعداد كبيرة من النباتات وتحسين نوعيتها. يُعرّف الإكثار السلالي بانه تضاعف الأفراد ذات الخواص الوراثية المُتشابهة تماماً بالطرائق اللاجنسية، ليشمل التعريف تقانات الإكثار من خلية مُفردة والبروتوبلاست لتنتج آلاف النباتات المتوالدة من خلية مُفردة بمدة قصيرة نسبياً. وترجع أهمية الإكثار الدقيق مقارنةً بالإكثار التقليدي في إنتاج نباتات بأعداد كبيرة وبمدة زمنية قصيرة ومن نبات واحد أو حتى من جزء نباتي مُفرد. اذ يُمكن الحصول على ما يُقارب من عشرة نموات خضرية من زراعة برعم جانبي أو طرفي واحد في مُدة شهر واحد. واذا ما حُسب العدد أثناء مُدة شهر واحد فقد يصل الى مايُقارب من المليون نمو خضري تُنتج من جزء نباتي واحد.

تُحل الكثير من المشاكل التي يواجهها الإكثار بالطرائق التقليدية بإستعمال الإكثار الدقيق. بعد الحصول على أعداد مُناسبة من النُبيتات، تُنقل الى البيت الزجاجي أو أي مُنشأة إكثار لغرض الأقلمة. يُمكن مقارنة إكثار النباتات بالعُقل مع طريقة الإكثار الدقيق (جدول 2.1)، مع الإفتراض بأن نقطة الشروع 50 عُقلة من نبات يحتاج الى فترة برودة لكسر طور سكونه أو موعد أخذ العُقل غير مُناسب ويستوجب الأمر خزنها لكسر طور الراحة في البراعم وزراعتها في الوقت المناسب ولربما لتشجيع نشوء الكالس في نهايات العُقل وخاصة العُقل المفصولة من أشجار، وكما مُبين في الجدول بأن تُخزن العُقل المُجذرة لحين موعد زراعتها كشتلات أو تصديرها، عندئذٍ تستغرق عملية إنتاج 50 شتلة من مجموع 50 عُقلة ما يُقارب من 320 يوماً. بالمقابل ولذات المُدة الزمنية، إذا ما إبتدأ صاحب المشتل في مشروعه بجزء نباتي واحد وليكن طرف الفرع، يبلغ إنتاجه التقريبي ولنفس المُدة الزمنية 15625 شتلة وإذا إبتدأ مشروع الإكثار الدقيق بعدد 50 جزء نباتي، فيكون عدد الشتلات المُنتجة 15625× 50. إذا أُستعملت عقل طرفية من نباتات لاتحتاج الى تبريد عندئذٍ لاتحسب فترة التبريد. يتضح من ذلك ان الزراعة النسيجية ساهمت وسوف تُساهم في إنعاش سوق المشاتل وخاصةً في إكثار الأنواع الهجينة والطفرات الوراثية الجديدة. يلاحظ وأثناء سنة واحدة يُمكن الوصول الى إنتاج حوالي 25000 شتلة واذا كانت البداية مع 50 عُقلة دقيقة فيكون عدد الشتلات المُنتجة يُقارب من 12 مليون ونصف. تُحسب كفاءة الإكثار الدقيق حسب المعادلة: **K= N-n/n** حيث تمثل K كفاءة الإكثار الدقيق، N تمثل العدد النهائي من النموات، n تمثل العدد الأولي من النموات المستعملة.

جدول 2.1. مقارنة بين إكثار النبات بالطريقة التقليدية (العُقل) والإكثار الدقيق من حيث عدد النباتات المُنتجة وأثناء مُدة مُحددة

الإكثار بالعُقل	اليوم	الإكثار الدقيق
تحضير وزراعة 50 عُقلة	1	زراعة قمة فرع واحدة
بداية ظهور الجذور على العُقل	40	إنتاج 5 نُبيتات
عقل بمجموع جذري جيد	80	25 نُبيتة
خزن مُبرد	120	125 نُبيتة
خزن مُبرد	160	625 نُبيتة
خزن مُبرد	200	3125 نُبيتة
خزن مُبرد	240	15625 نُبيتة
زراعة 50 شتلة في منشآت الإكثار	280	زراعة 15625 نُبيتة في منشآت الإكثار
زراعة 50 شتلة في الحقل	320	زراعة 15625 شتلة في الحقل

مُختبر الإكثار الدقيق Micropropagation laboratory

يحتاج توفر شروط خاصة في مُختبر زراعة الأنسجة عموماً ومعمل الإكثار الدقيق خصوصاً، وأدناه أهم المُتطلبات الواجب توافرها في المعمل:

1- مكان عمل.

2- مكان للغسيل وتصريف المياه، تأسيسات ماء حار، أفران، غسالات لغسل الزجاجيات.

3- دواليب ورفوف لحفظ الزجاجيات والكيميائيات.

4- غرف زراعة لنقل الزروعات وزراعتها وان تتوفر فيها شروط التعقيم.

5- مكان مُخصص للتعقيم يتوفر فيها معقام أو أكثر، أفران.

6- غرفة حضن الزروعات ذات بيئة مُسيطر عليها من حيث درجة الحرارة، الضوء، التلوث، الرطوبة وغيرها.

7- مكان للخدمات من غاز، كهرباء، تفريغ، هواء مضغوط .....الخ.

8- توفر مصادر مُستمرة للماء المقطر والماء الخالي من الآيونات.

9- عُدد وأجهزة مُختلفة.

10- المحافظة على شروط عدم التلوث ومُراعاة السلامة العامة.

إعتماداً على المساحة المُتاحة، يُقسم المُختبر الى أماكن مُنفصلة بموجب تصميم مُعد مُسبقاً من قبل مختص (شكل 2.1). يجب ان تكون غرفة الزراعة مُزودة بمدخل ذو بابين بحيث يُحافظ عليها من دخول الأتربة ومُسيطر على ظروفها البيئية لحد لا يُسمح بالدخول إلا الى المُخولين وأن يتخذوا الإحتياطات كاملةً لمنع التلوث. يُحافظ على درجة حرارة 25±2 °م و 16: 8 ساعة ضوء/ظلام إذ تتم السيطرة عليها من موقت زمني. تُجهز الإضاءة من مصابيح نوع Gro-Lux أو من فلورسنات نوع Cool-white daylight بطول 4 قدم وبشدة ضوء 40 واط وتبعد 8 إنجات عن رف الزروعات والمسافة بين شمعة واخرى 12 إنج. يُقاس الضوء بعدد من الوحدات أكثرها تداولاً قدم- شمعة وبجهاز Photometer، تُرتب الإضاءة بحيث تستلم الزروعات 40-200 قدم- شمعة حسب حاجة النوع النباتي. يتم ترتيب رفوف الزراعة بخطوط بحيث تتم الإستفادة القصوى من بيئة غرفة حضن الزروعات في إستثمار كل الحيز المُتوفر. وعند الحاجة لتنمية الزروعات في الظلام، يُفصل جزء من الحاضنة بستائر سوداء. يُمكن تخصيص قسم من الرفوف بعد عزلها لأغراض الأقلمة وزراعتها بسنادين صغيرة وبالإمكان تخصيص إحدى زوايا غرفة حضن الزروعات للهزاز الدوار (Rotary shaker) ذو سُرع مُختلفة تتراوح من 80 الى 220 rpm ويستوعب دوارق ارلنماير سعة 250 مل. يتم تنظيم الرطوبة النسبية في الغالب لتكون 60%.

منطقة الأقلمة: يُخصص مكان لأقلمة النُبيتات الناتجة من الإكثار الدقيق بعد نقلها من وسط التجذير الى سنادين تحتوي على أوساط زراعية وتُجهز بإضاءة أعلى مما كانت عليه سابقاً مع زيادة نسبة الرطوبة

النسبية لحوالي 90%. يُخصص مكان للإدارة ومكتبة وغرفة إجتماعات، يعتمد ذلك على المساحة المُتوفرة وتوفر رأس المال. يُفضل الحد الأدنى من العاملين كشخص مؤهل لإدارة وحدة الإكثار الدقيق، تقني جيد وعدد من العاملين المهرة وإستشاري. يُمكنإنتاج ملايين النباتات سنوياً في وحدة الإكثارإذا ما أُستثمرت بشكلٍ مُناسب.

مُستلزمات معمل الإكثار الدقيق

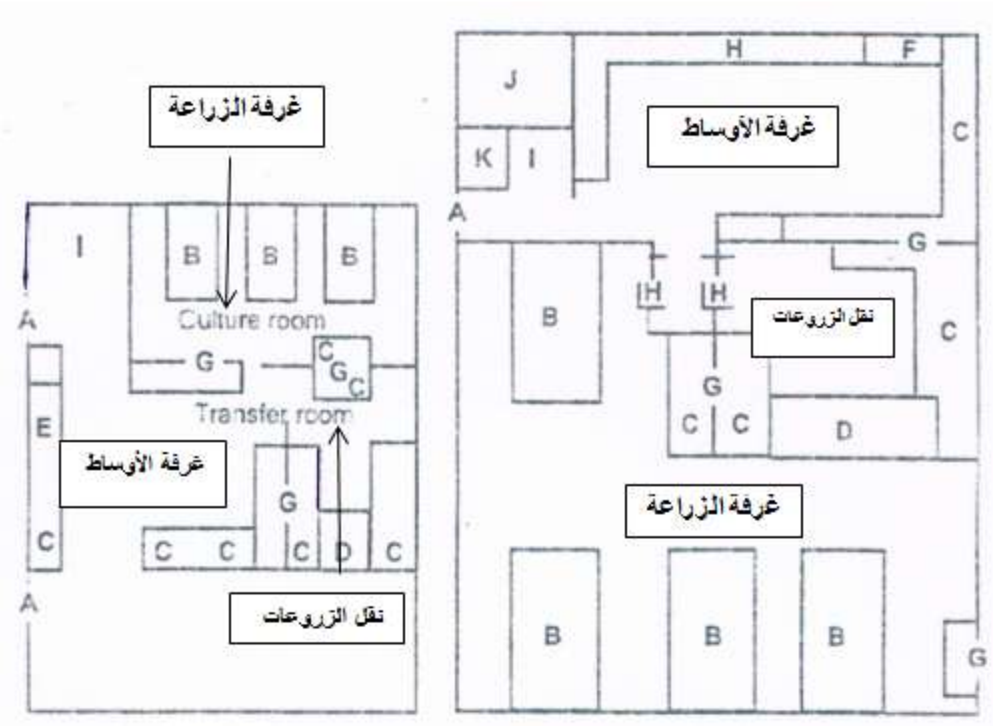
يجب توفر الأجهزة والعُدد التالية عند الرغبة في إنشاء معمل للإكثار الدقيق؛ مِنضدة سريان الهواء الطبقي (Laminar air flow cabinet)، غرفة لحضن الزروعات (Growth chamber) بمواصفات قياسية، حاضنات مُختبرية (Lab. Incubators)، مقياس لقياس الأُس الهيدروجيني والتوصيل الكهربائي (pH, EC meter)، موازين حساسة (Sensitive balances)، مجاهر (Microscopes)، أفران (Ovens)، معقام (Autoclave)، مُرشحات تعقيم (Millipores)، هزازات من النوع دوراني الحركة (Rotary shakers)، جهاز نبذ مركزي ويُفضل أن يكون بطئ السرعة (Low speed centrifuge)، مصابيح أشعة فوق البنفسجية (UV germicidal lamps)، مُرطب (Humidifier)، هزازات مُزودة بإضاءة (Illuminated shakers)، مُوزع أوساط (Media dispenser) عُدة تجميد الزروعات (Cryogenic equipment)، مقياس شدة الضوء (Light meter)، مِجهر لقطع الزروعات (Dissecting microscope)، عُدد جراحية (Surgical sets)، مصابيح لهب (Burners)، زجاجيات مُتنوعة (Glassware)، ماصات بأحجام مُختلفة (Pipettes)، ومواد أُخرى مُتفرقة. طَورت الشركات المُتخصصة جهاز يعمل على قطع المرستيم القمي بالليزر (شكل 2.2) يُمكن وضعه داخل منضدة الهواء الطبقي تحت ظروف تعقيم كاملة ويُقطع المرستيم بعد تكبيره بمجهر حيث لايتجاوز طول المرستيم القمي عن 0.5 ملم (شكل 2.3) والذي يصعب السيطرة على قطعه في العين المُجردة. كما زودت معظم المعامل بمُفاعلات حيوية (Bioreactors) لتنمية الزروعات بأوساط سائلة وبأعداد هائلة وأصبحت الآن من المُستلزمات الأساسية في معامل الإكثار أو في مُختبرات الزراعة النسيجية البحثية.

فوائد الإكثار الدقيق Advantages of micropropagation

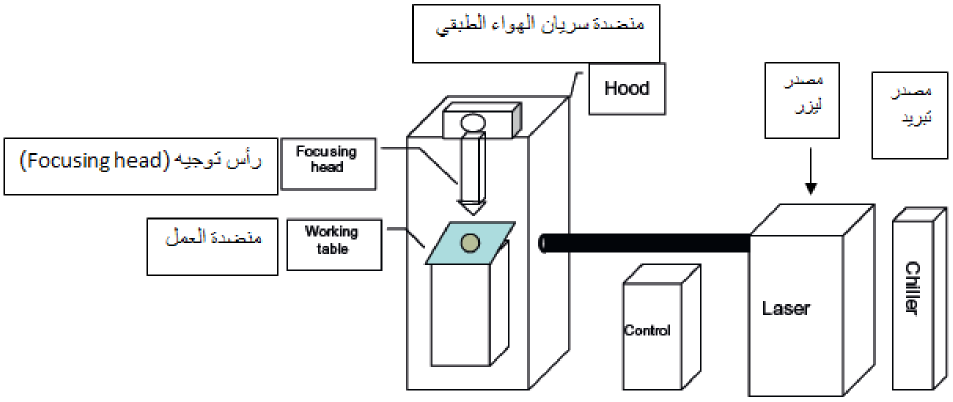
يُمكن تلخيص مزايا الإكثار الدقيق عن الإكثار بالطرائق التقليدية بالنقاط السبع التالية:

1- الإكثار الدقيق طريقة سريعة ويُقلل من فترة إنتاج الشتلات ويُعد إكثارا خضريا.

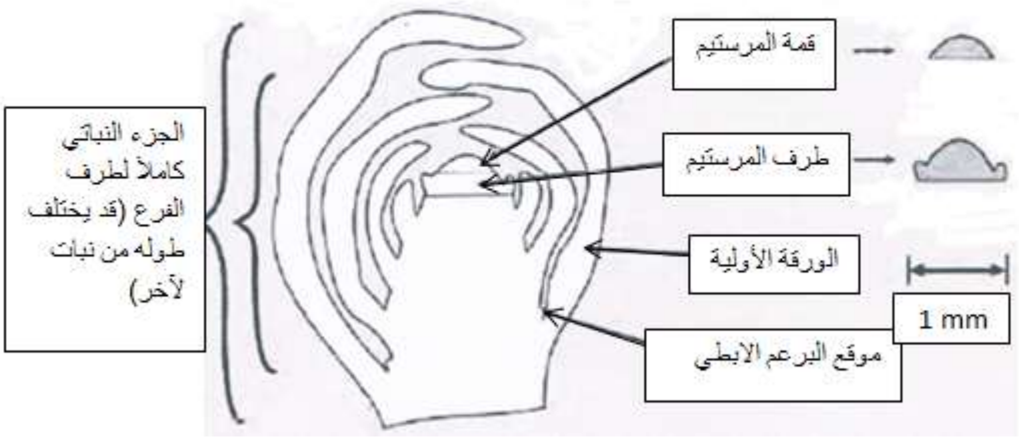
2- إنتاجأ عداد كبيرة من الشتلات قد تصل الى مليون نبات من فرع نباتي واحد بعد تقطيعه الى أجزاء نباتية صغيرة جداً وأثناء فترة زمنية قصيرة.



شكل 2.1. مُختبر للإكثار الدقيق متوسط الحجم بمساحة 12x 9 متر (يمين) وصغير الحجم بمساحة 9 x 7.5 متر (يسار). (A) مدخل، (B) رفوف، (C) مناضد، (D) مناضد هواء طبقي، (E) مكان غسل، (F) موقع تجهيز غاز الإحتراق. (G) شباك. (H) ثلاجة ومجمدة. (I) مخزن. (J) غرفة إجتماعات. (K) مكتبة.



شكل 2.2. مُخطط يوضح القاطعة الليزرية المُتخصصة في قطع المرستيمات القمية.



شكل 2.3. مُخطط لمُكونات طرف الفرع الخضري والأطوال التقريبية لها حسب المقياس المُثبت على المُخطط. لاحظ طول قمة المرستيم والتي غالباً ما تُستعمل في إنتاج نباتات خالية من الفيروسات.

3- إمكانية الإستمرار في الإكثار على مدار السنة بغض النظر عن موعد فصل العُقل بالطرائق التقليدية أي إكثار دائمي لايرتبط بفصل مُعين من السنة.

4- طريقة إقتصادية ولاتحتاج الى مكان واسع.

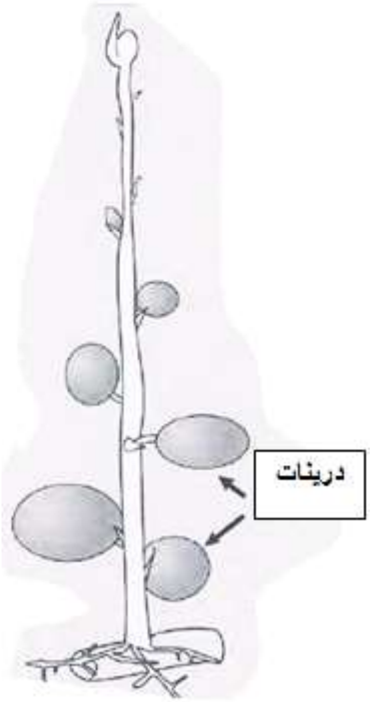
5- يُساعد الإكثار الدقيق في المُحافظة على سُلالات هجينة وخالية من المُسببات المرضية.

6- يوفر برنامج الإكثار الدقيق سرعة واختصار للوقت وبذلك يسمح بتقليل الفترة الزمنية بين إنتخاب صنف جديد وإطلاقه الى السوق.

7- يُعد الإكثار الدقيق وسيلة فعالة في إكثارالأنواع المُهددة بالإنقراض وخزنها لسنوات عديدة.

8- إنتاج الأبصال والكورمات والدرنات (شكل 2.4) وغيرها من أعضاء الخزن التي تتكاثر منا العديد من النباتات خضرياً.

9- ظهور تغايرات جسمية وكايميرات نتيجة طفرات وراثية مما يستوجب ملاحظته مُبكراً والتخلص منها أو الإستفادة منها اذا كانت تحمل صفات مرغوبة. يمر الإكثار الدقيق بمراحل مُختلفة. إبتداءاً من إنتخاب النبات الام وإنتهاءاً بنهاية أقلمة النُبيتات الناتجة.



شكل 2.4. تكوين الدرنات الدقيقة على فرع خضري مُكثر نسيجياً كوسيلة إقتصادية لإكثار وإنتاج تقاوي الرتب العليا من البطاطا.

مراحل الإكثار الدقيق Stages of micropropagation

قُسمت مراحل الإكثار الدقيق الى خمس مراحل بالرغم من تقسيمها الى ثلاث مراحل من قبل العالم موراشيج صاحب الفضل الكبير في تطور هذا التخصص والتي يُمكن تلخيصها كما يلي:

مرحلة الصفر Stage 0: إختيار وتحضير المادة النباتية الأُم

تشتمل الإختيار الصحيح للمادة النباتية المطلوب إكثارها بأن تكون مُطابقة للنوع أو الصنف النباتي المرغوب وخالية من الأعراض المرضية ولا تعاني من نُقص التغذية وأن تكون في مرحلة الحداثة (Juvenility phase). يُفضل زراعة نباتات أُمهات قريبة من وحدة الإكثار وتحت ظروف نمو مُناسبة وتوفير خدمة مُميزة لها وقد تتطلب بعض المُعاملات قبل فصل الأجزاء النباتية منها مثل التسميد الجيد، مكافحة الآفات. وقد يتطلب الأمر بعض المُعاملات مثل تعريضها الى درجات حرارة أعلى من الطبيعي (Thermotherapy) لمدة مُحددة وخاصة عند الرغبة في الحصول على نباتات أُمهات خالية من

الفيروسات. تحتاج مجموعة من الأنواع النباتية المُعاملة بمادة كيميائية أو أكثر (Chemotherapy) للتخلص من المُسببات المرضية أو لتسريع نمو الأفرع. لابُد من الإشارة الى إحتمالية إصابة النبات بمُسببات مرضية مُختلفة داخل أنسجته (Systematic infection) وخاصة الفيروسية منها مما يستدعي إجراء إختبارات الكشف عنها مثل كشف ELIZA وقد تكون أنسجة النبات مُصابة ببكتريا أو فطر. يُفضل إستبعاد المادة النباتية المُصابة ظاهرياً بالرغم من كونها ستخضع لعملية تعقيم سطحي وكذلك إستبعاد المادة النباتية اذا ثبُت إصابتها بمُسبب مرضي داخلي لكون التعقيم السطحي لن يكن مؤثراً في هذه الحالة إلا إذا كانت نادرة جداً وعندئذٍ تُضاف مُضادات حيوية الى وسط نشوء الزروعات بالرغم من وجود محاذير من إضافتها. تُلخص مراحل الإكثار الدقيق كما موضح في جدول (2.2).

جدول 2.2. المراحل المُختلفة للإكثار الدقيق

المرحلة	طريقة العمل
مرحلة 0	إنتخاب النبات الام ورعايته
مرحلة 1	تنشئة ونمو المزرعة
مرحلة 11	تضاعف الأفرع أو تكوين الأجنة الجسمية
مرحلة 111	تجذير الأفرع أو إنبات الأجنة الجسمية
مرحلة 1V	نقل النُبيتات الى بيئة الأقلمة

يُقسم مجموعة من المُختصين مراحل الإكثار الدقيق الى 3 مراحل فقط والمُبينة أدناه.

مرحلة I Stage: إنشاء المزرعة المُعقمة

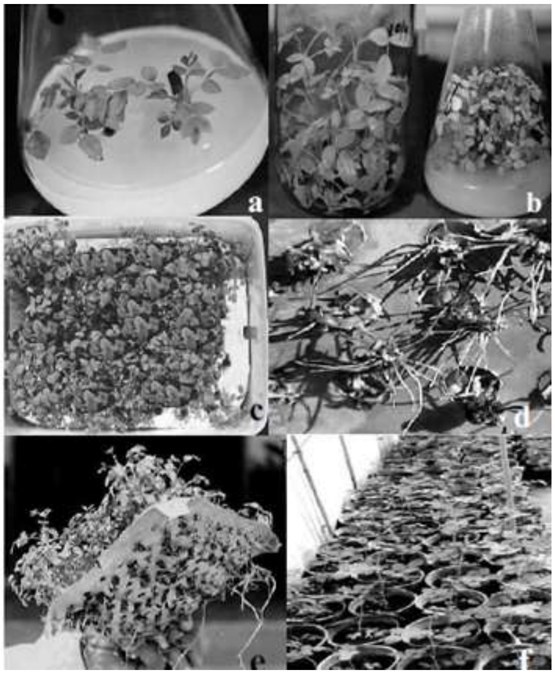
يستوجب في المرحلة الاولى من مراحل الإكثار الدقيق توفير مزرعة مُعقمة إبتداءاً من تعقيم الجزء النباتي بإستعمال مُطهرات مُختلفة (جدول 2.3) وتحضير الأوساط الغذائية وتعقيمها وتعقيم مُستلزمات العمل كما سيرد لاحقاً.

جدول 2.3. فعالية بعض المُطهرات في التعقيم السطحي للأجزاء النباتية

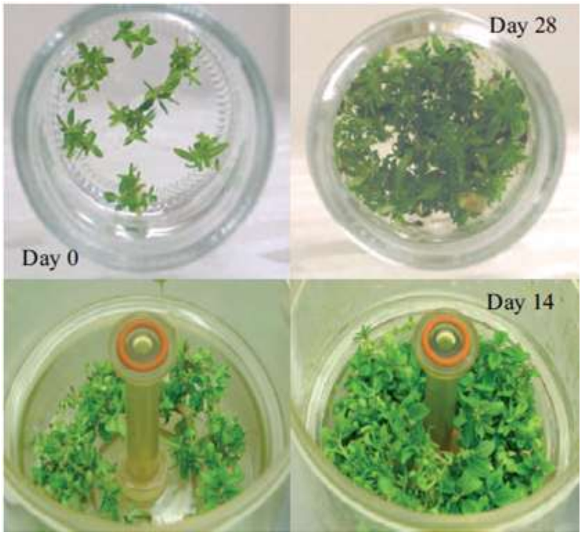
المادة المُطهرة	التركيز المُستعمل (%)	الفترة الزمنية (دقيقة)	قوة التأثير
هايبوكلورات الكالسيوم	10-9	30-5	جيد جداً
بيروكسيد الهيدروجين	12-10	15-5	جيد
ماء البرومين	2-1	10-2	جيد جداً
نترات الفضة	1	30-5	جيد
كلوريد الزئبق	1.0-0.1	10-2	متوسط
المُضادات الحيوية	4-50 ملغم/لتر	60-30	جيد نوعاً ما

يُفضل زراعة دفعة واحدة والإنتظار لمُدة من الحضانة فإذا ما ثبُت بانها مُصابة فيجب إتلافها بالمؤصدة وحسب ما مُتعارف عليه مع الأخذ بنظر الإعتبار مُدة ظهور الإصابة، سواء كانت فطرية، بكتيرية، فيروسية أو غيرها.

المرحلة II: نشوء الزروعات وتضاعفها وتجذيرها Culture initiation, multiplication and rooting؛ يتحفز الجزء النباتي في هذه المرحلة في النمو ويستطيل ويُكون الفرع الجديد براعم جانبية (Axillary buds) وعقد بفعل إضافة الاوكسين في الغالب وتتحفز تلك البراعم الى أفرع جانبية (Axillary shoots) بفعل إضافة السايتوكاينين لتحتوي إنبوبة الإختبار على فرع رئيس حاملاً مجموعة من الأفرع الجانبية. قد تظهر فروع عرضية (Adventitious shoots) إضافية من منطقة القطع ليكون الجزء النباتي قد دخل في التضاعف (Multiplication) وتُقطع الأفرع مرة أُخرى وتزرع وتستمر العملية لحين الوصول الى الخطة الإنتاجية الموضوعة (شكل 2.5). هناك العديد من الأنواع النباتية سريعة الإستجابة وخاصة إذا ما أُستعملت التقانة المُناسبة في إنتاجها (شكل 2.6).



شكل 2.5. الإكثار الدقيق للورد *Rosa domascena)*). (a) نمو البراعم الجانبية. (b) تكاثر الأفرع الخضرية في وسط سائل أو صلب. (c) مجاميع من الأفرع الخضرية داخل صندوق من البولي بروبلين ويلاحظ تماس قواعدها للوسط الغذائي. (d) وعاء بفتحات مقلوبة لمشاهدة التجذير الجيد للأفرع الدقيقة. (e) أفرع دقيقة تم تجذيرها بعد 42 يوماً من حضانتها في أوعية التجذير. (f) نُبيتات مؤقلمة جاهزة للنقل الى الحقل.

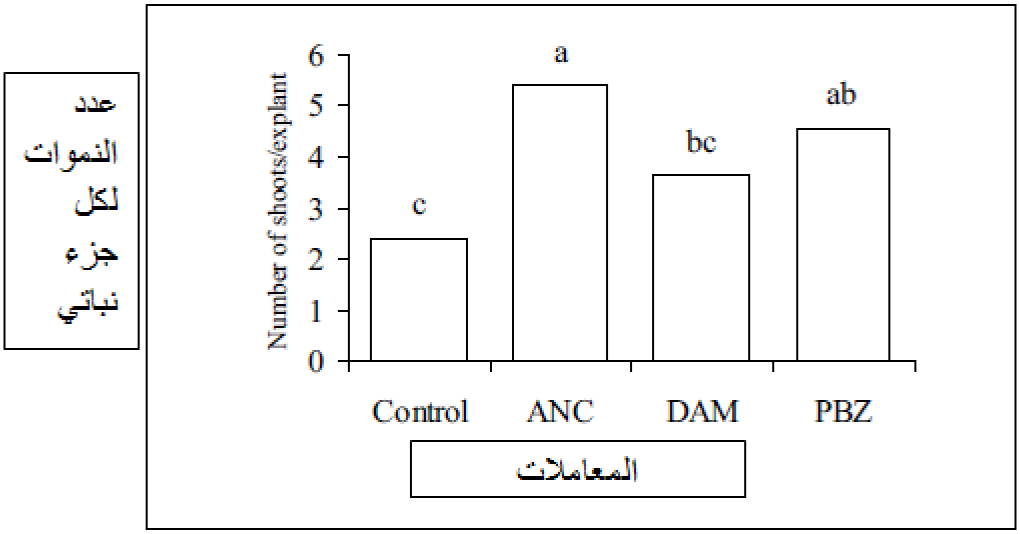


شكل 2.6. أوعية زراعة مُخصصة للإكثار الدقيق مُنتجة من شركة ريتا (RITA™). عند البدء بزراعة 8 أفرع، تتضاعف بشكل سريع بعد 28 يوم لتصل الى العشرات ، لتصل الى مئات فيما إذا كانت البداية بعدد أكبر مما يُتيح للمُنتجين الوصول الى أعداد كبيرة أثناء مُدة قصيرة.

إستعمال أنظمة مزارع الغمر المؤقت في تضاعف الأفرعTemporary immersion culture systems (TIS): تُوفر مزارع الغمر المؤقت العديد من الفوائد مُقارنةً مع إستعمال وسط صلب في تضاعف الأفرع وتُستعمل في نطاق تجاري حالياً في إنتاج شتلات الموز داخل أوعية زراعة كبيرة. تُنقل فيها الأفرع المطلوب تضاعفها الى وسط سائل داخل أوعية زراعة كبيرة الحجم وسجلت التقانة زيادة كبيرة في سرعة التضاعف وتحسين نوعية النُبيتات المُنتجة بعد تنمية الزروعات داخل أوعية حجم 10 لتر ولكن تبين حصول

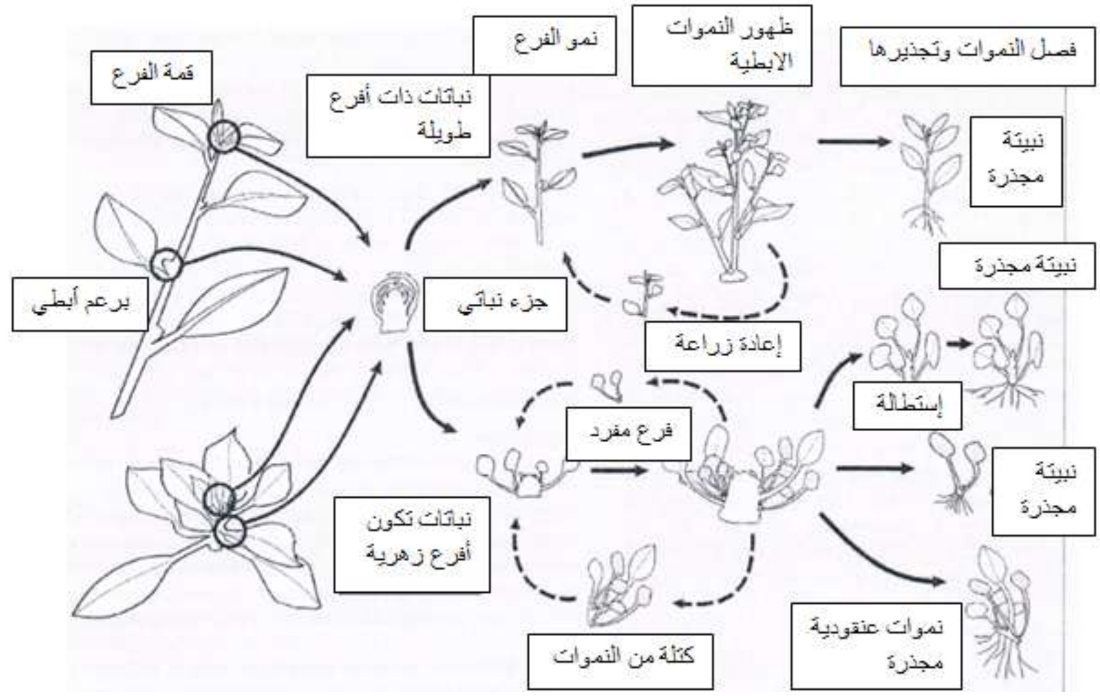
نمو مُفرط في النموات الخضرية (الأوراق والسوق الكاذبة) لنُبيتات الموز مما يُقلل من العدد النهائي للأفرع المُتضاعفة بالرغم من سرعة تكوينها.

ومن المؤكد أن يُصاحب ذلك صعوبة في تقسيم وإعادة زراعة للنموات الكبيرة وإستيعابها حيزاً كبيراً في أوعية الزراعة. تم تجاوز النمو المُفرط في النموات الخضرية بعد تضمين الوسط السائل بمعوقات نمو (Growth retardants) مثل الأنسيمايدول (ANC)، باكلوبيوترازول (PBZ) ودايمينوزايد (DAM) من إجل تقليل حجم النموات وإستثمار أكبر حيز داخل أوعية الزراعة عند تطبيق تقانة TIS. أدت إضافة ANC و PBZ مُنفردة وبالتراكيز المُضافة (شكل 2.7) الى تحفيز تكوين عناقيد من الأفرع المُتضاعفة صغيرة الحجم ومضغوطة. تَبينَ من نتائج إضافة ANC أو PBZ بتركيز 2.5 ملغم /لتر وبعد خمس مرات من إعادة الزراعة، أخذت الأفرع شكلها المورفولوجي الطبيعي بعد نقلها الى وسط جديد خالٍ من معوقات النمو.



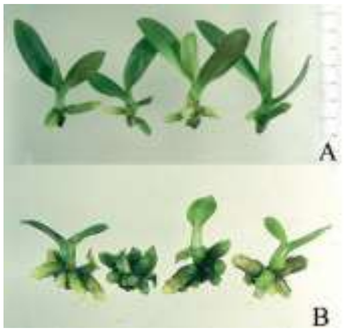
شكل 2.7. تأثير إضافة ثلاثة معوقات نمو في تضاعف النموات الخضرية في مزارع سائلة تحت الرج بتطبيق تقانة مزارع الغمر المؤقت.

يلاحظ زيادة عدد الأفرع المتكونة على الجزء النباتي بعد تضمينها للوسط.تفصل تلك الفروع سواء جانبية، عرضية، قمة الفرع، أجنة جسمية وأعضاء خزن صغيرة (شكل 2.8) وتزرع في وسط جديد حاوٍ في الغالب على أوكسين فقط لتعطي تلك الأفرع جذوراً وبذلك تنشأ الى نُبيتات (Plantlets).



شكل 8.2. الأجزاء النباتية التي يُمكن إستعمالها في الإكثار الدقيق وإنتاج الشتلات منها.

يُمكن إستثمار النموات الخضرية في دورات إكثار جديدة بعد قطعها وزراعتها على أوساط حاوية على الاوكسين وبذلك يُمكن زيادة أعداد النُبيتات الناتجة وفق مُتوالية عددية وحسب ما تم توضيحه في جدول 2.1. ويجب مراعاة إختيار مُنظم النمو المُناسب لتجذير الأفرع والذي في الغالب يكون IBA. سُجلت تشوهات في الجذور الناتجة بعد المُعاملة بمُنظم نمو غير مُناسب وبتركيز غير مُناسب (شكل 2.9).

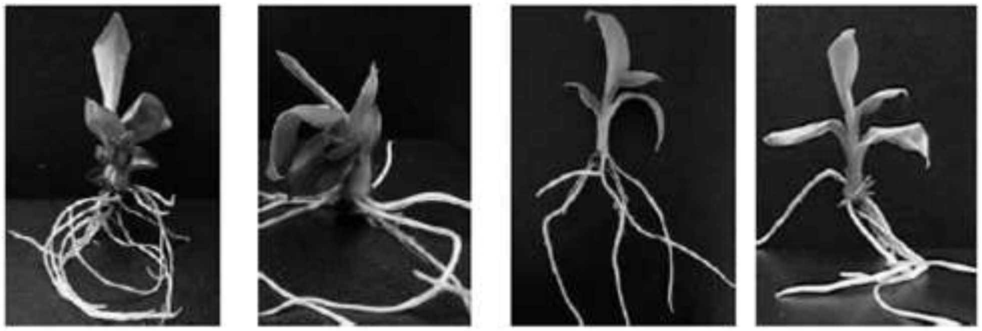


شكل 2.9. تأثير إضافة 0.5 ملغم/لتر من IAA (A)؛ 1.0 ملغم/لتر من NAA (B) في تجذير أفرع نبات *Phalaenopsis*. لاحظ تثخن الجذور وتثبيط إستطالة الأفرع بسبب تضمين وسط التجذير NAA.

المرحلة III الأقلمة Acclimation

تكون الأفرع أو النُبيتات الناتجة من المرحلة السابقة صغيرة وغير قادرة على إسناد نموها في أوساط الإكثار وفي الغالب تكون قصيرة وتحتاج الى مُعاملات إضافية كمُعاملتها بمُنظمات نمو مثل GA3 لغرض إستطالتها. علماً بأن بعض النباتات تُعطي فروعاً طويلة بطبيعتها إذ تُفصل الأفرع (إذا كانت غير مُجذرة) أو النُبيتات عن بعضها وتزرع في أوساط غذائية سائلة بنُصف قوة تراكيز أملاحها أو أقل أو في أوساط إكثار مُعقمة بعد ان يتم التخلص من بقايا الاكار بغسلها بتيار ماء ومُعاملتها بمُبيد فطري. تهدف العملية الى تقسية النُبيتات بشكل تدريجي لكي تواجه البيئة الخارجية وتحويلها من الإعتماد على مُكونات الوسط الغذائي (Hetrotrophic) الى الإعتماد على ذاتها (Autotrophic). يؤقلم بعض أصحاب المُختبرات التجارية النُبيتات تحت ظروف تعقيم كاملة وعندئذٍ تُنقل الى البيئة الطبيعية.

يُعد تجذير الأفرع الخضرية جوهرياً في الإكثار الدقيق والقليل من الأنواع النباتية سهلة التجذير (شكل 2.10) تُكون جذوراً عرضية في المرحلة 111 من الإكثار الدقيق. لذلك يُفضل تبني طريقة مُنفصلة للتجذير تُنقل خلالها الأفرع الى وسط خاص أو تحفيز الجذور للتكوين في هذه المرحلة.



شكل 2.10. نُبيتات موز أنتجت جذوراً جيدة في أوساط سائلة خالية من مُنظمات النمو.

المرحلة IV نقل النُبيتات الى البيئة الطبيعية Transfer to the natural environment

تُنقل في هذه المرحلة النُبيتات بعد ان كانت داخل أنابيب الإختبار (*in vitro*) الى البيئة الخارجية الطبيعية (*ex vitro*) والتي تُعد من المراحل الحرجة حيث من الصعب الوصول الى نسبة نجاة تفوق 90% ما لم تؤخذ الإحتياطات الآزمة. يرجع ذلك لعدد من الأسباب لعل أهمها كون النُبيتات الناتجة كانت قد نمت تحت ظروف رطوبة نسبية عالية داخل أوعية الإكثار وتحت شدة إضاءة مُنخفضة. ينتج من ذلك طبقة بشرة ذات مُحتوى مُنخفض من الكيوتكل الشمعي أو شمع ذات تركيب كيميائي مُختلف عما هو عليه في النباتات

النامية تحت ظروف البيت الزجاجي أو الحقل أو البيئة الخارجية عموماً. لاتتمكن بعض الأنواع النباتية الناتجة من الزراعة النسيجية من إكمال غلق ثغورها تحت ظروف رطوبة نسبية مُنخفضة وبذلك تفقد مُحتواها الرطوبي بسرعة عندما تُنقل الى البيئة الطبيعية. ولعل السبب الآخر في إرتفاع نسب الهلاكات، عدم تمكنها من الإعتماد في ذاتها بشكل كامل في تغذيتها من خلال عملية التصنيع الغذائي بعد إن كانت مُعتمدة تماماً على مصدر الكربون الكربوهيدراتي المُضاف الى الوسط. ويبدو بأن مُحفزاً معيناً كان مفقوداً في الزراعة النسيجية والذي يُشجع تلك النُبيتات لتصنيع مصدرها المطلوب من الكربون والنتروجين المختزل قبل ان تصبح مُعتمدة لذاتها تماماً وهذا لا يتم الا من خلال تحملها لظروف البيئة الخارجية بعد عدة أيام من نقلها.

عملياً، تُزال النُبيتات في مرحلة III من أوعية الإكثار وتُغسل الجذور جيداً للتخلص من بقايا الاكار وترش نمواتها الخضرية بمواد مُضادة للنتح (Anti-transpirants) بالرغم من قلة تطبيق الحالة الأخيرة. تُنقل بعدها النُبيتات على وسط إكثار يُشجعها على تكوين مجموع جذري جيد مثل خليط الرمل والبيتموس (شكل 2.11) ويُحافظ عليها لعدة أيام تحت ظروف رطوبة نسبية عالية وإضاءة مُنخفضة. تُستعمل المعامل النسيجية التجارية أنظمة توليد الضباب (Fog water vapour systems) إذ أن بخار الماء فعالاً جداً في مُحافظة الشتلات من الذبول. كما يُمكن نصب أجهزة تعمل بموقتات توفر الرش الرذاذي المتقطع (Intermittent water misting)، لاحظ شكل 2.12.

شكل 2.11. نقل النُبيتات المُكثرة نسيجياً لأغراض الأقلمة الى أوساط إكثار مُناسبة ووضعها تحت ظروف رطوبة نسبية عالية.

شكل 2.12. جهاز الرش الرذاذي المستعمل في توفير رطوبة نسبية عالية داخل منشآت أقلمة النبيتات الناتجة من الإكثار الدقيق.

يَستعمل بعض المُنتجين مُغلفات بلاستيكية يتم رشها يدوياً. تستطيع الأفرع المُنتجة بالإكثار الدقيق لبعض الأنواع النباتية من التجذير بنسب عالية في أوساط الإكثار داخل البيوت المحمية ولاحاجة للمرور بمرحلة III (شكل 2.13).

شكل 2.13. طرائق بديلة لتجذير الأفرع المُكثرة نسيجياً.

تحتاج النباتات الناتجة من الأقلمة الى عناية كاملة من ري وتسميد ومكافحة الآفات وإستبعاد النباتات الشاذة لكي تدخل سوق المُنافسة مع المُنتجين الآخرين (شكل 2.14).

شكل 2.14. نبات بعد الأقلمة وبصحة جيدة وجاهز للتسويق.

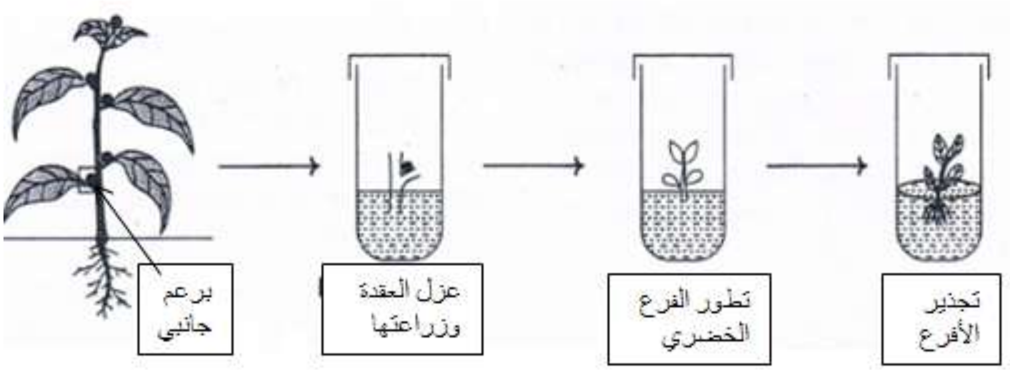
يوضح جدول 2.4 الطرائق المعمول فيها في الإكثار الدقيق وإختصاراً لمراحلها من أجل تبسيطها للقارئ.

جدول 2.4. مراحل الإكثار الدقيق وطرائق الإكثار

طريقة الإكثار الدقيق	1. مرحلة نشوء الزروعات، زراعة النسيج أو العضو المعقم سطحياً خارج الجسم الحي.	11. زيادة الأعداد، تحفيز الزروعات لإنتاج أكبر عدد من النموات الخضرية أو الأجنة الجسمية.	111. التحضير للنقل الى التربة. فصل وتحضير النموات الخضرية أو النُبيتات من أجل تحقيق أعلى نسب نجاة.
مزارع النموات الخضرية	نقل أطراف النموات أو البراعم الجانبية الخالية من المُسببات المرضية الى وسط صلب أو سائل، بدء النمو لحد طول 10 ملم.	تحفيز البراعم الابطية على الظهور ولإرتفاع مناسب لفصلها.	إستطالة الأفرع الى طول مناسب وتجذيرها في الغالب خارج أوعية الزراعة.
نموات خضرية من مرستيمات زهرية	فصل القمم من مرستيمات زهرية مركبة تحت ظروف تعقيم.	تحفيز المرستيمات على تكوين أفرع خضرية كما في حال زراعة قمة الفرع.	ذات طريقة زراعة قمة الفرع الخضري.
	إنبات البذور المعقمة سطحياً تحت ظروف تعقيم وعلى وسط ذات محتوى عالي من السايتوكاينين.	تحفيز تضاعف الأفرع وفصلها وتكرار زراعتها.	ذات طريقة زراعة قمة الفرع الخضري.
زراعة المرستيم	نقل أجزاء صغيرة	تنمية المرستيم لطول	ذات طريقة زراعة

	جداً بطول 0.2-0.5 ملم لتكون خالية من المُسببات المرضية.	حوالي 10 ملم ويُمكن تضاعفها أو نقلها الى المرحلة اللاحقة.	قمة الفرع الخضري.
زراعة العقد	مشابهة لزراعة طرف الفرع	تحفيز البراعم الابطية على الظهور من موقع كل عقدة لتُعطي أفرعاً ويكرر تقطيعها وزراعتها.	نفس طريقة زراعة قمة الفرع الخضري.
الإخلاف المباشر من الجزء النباتي	إختيار الجزء النباتي وزراعته تحت ظروف تعقيم تامة.	تحفيز ظهور النموات الخضرية مباشرةً على الجزء النباتي دون إنتاج كالس. تستعمل أجزاء الأفرع الجديدة كأجزاء نباتية أو تزرع أطرافها.	ذات طريقة زراعة قمة الفرع الخضري.
تكوين الأجنة المُباشر	إلبدء بنسيج جنيني أو أجنة جسمية متكونة سابقاً.	التحفيز المباشر للأجنة الجسمية على الجزء النباتي دون تحفيز الكالس على النشوء.	تنمية الأجنة الى نُبيتاتيُمكن نقلها الى البيئة الخارجية.
توالد الأفرع من الكالس	نشوء الكالس وحثه على تكوين أجنة وعزل الكالس الجنيني ونقله الى المرحلة التالية.	تكرار زراعة قطع صغيرة من الكالس ونقلها الى وسط التوالد لحين وصول الأفرع الى طول 10 ملم.	تُنمى الأفرع وتُجذر.
تكوين الأجنة غير المباشر من الكالس الجنيني أو المعلق الخلوي.	نشوء الكالس وعزل أجزائه ذات القابلية على تكوين أجنة أو الحصول على معلق خلوي جنيني من كالس جنيني.	تكرار زراعة الكالس أو المعلق الخلوي الجنيني وإكثاره ونقله الى وسط تطور الأجنة.	تنمية الأجنة الجسمية الى شتلات.
تنشئة وتكوين أعضاء الخزن	عزل وزراعة النسيج أو العضو القادر على تكوين أعضاء خازنة.	تحفيز وتكوين أعضاء الخزن وأحياناً تقسيمها لبدء مرحلة 11 من جديد.	تنمية الأفرع أو النُبيتات التي تم الحصول عليها من أعضاء الخزن ونقلها الى التربة أو تنمية أعضاء الخزن لحجم يسمح بزراعته في التربة.

زراعة البراعم الجانبية: تمتلك البراعم مرستيمات إما سابتة (Quiescent) أو نشطة (Active) إعتماداً على حالتها الفسيولوجية. تُزرع البراعم إما مفصولة عن الساق كالأُبطية (Axillary) أو مع جزء الساق المقابل للبرعم (Single node) والمتواجدة في آباط الأوراق لأغراض الإكثار الدقيق (شكل 2.15) ويفضل أن تكون غير مُتفتحة لتقليل فرصة التلوث.غالباً لاتحتاج زراعة العُقدة المُفردة الى إضافة مُنظمات نمو الى الوسط الغذائي.



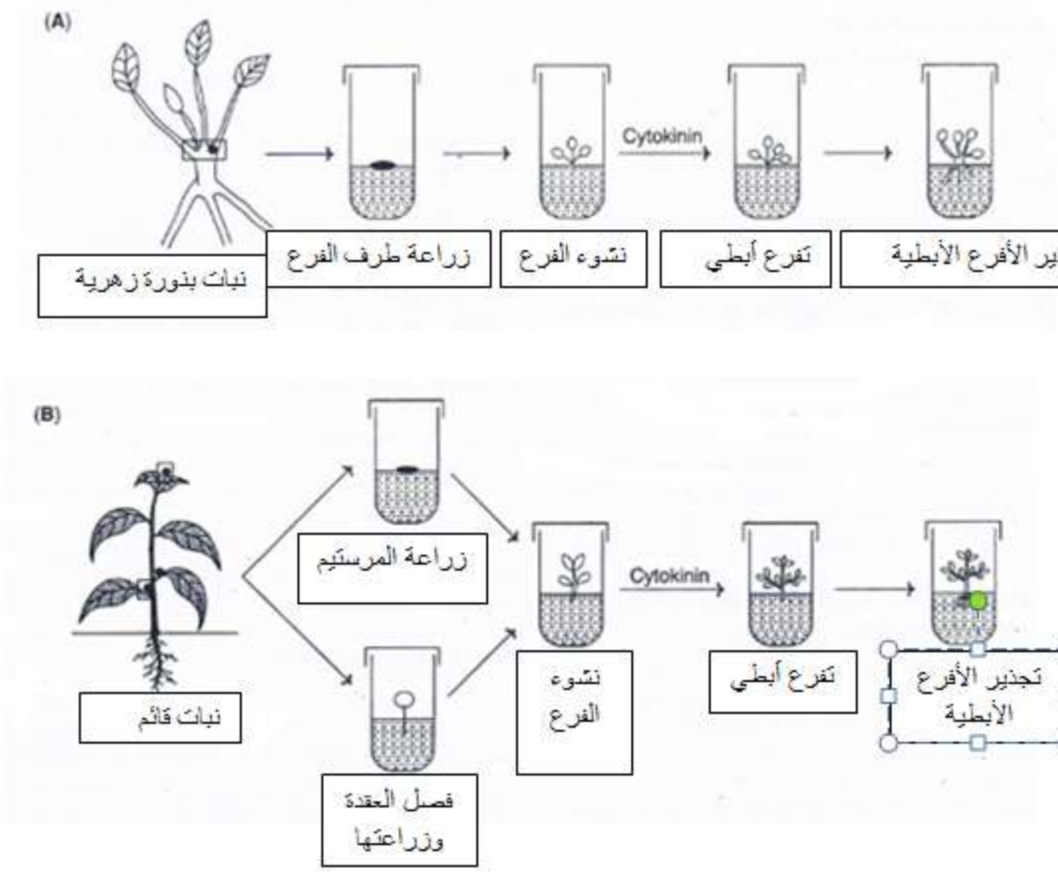
شكل 2.15. الإكثار الدقيق بتقانة زراعة العقدة المُفردة.

زراعة البرعم الأُبطي: تُفصل قمة الفرع مع جزء يحتوي على برعم جانبي ويزرع على وسط مُضافاً له تراكيز عالية من السايتوكاينين ونتيجةً لتأثير الأخير، تتوقف السيادة القمية للبرعم الطرفي ويتطور البرعم الجانبي (شكل 2.16). ولتحقيق نسب نجاح عالية من زراعة البرعم الأُبطي، تكون نسبة السايتوكاينين الى الأُوكسين 10الى 1 وهي نسبة مُتغيرة إعتماداً لطبيعة النوع النباتي والمرحلة التطورية للجزء النباتي المُستعمل. عموماً، تُفضل الأجزاء النباتية في مرحلة الحداثة وتكون عندئذٍ إحتياجاتها من السايتوكاينين أقل من الناضجة. أحياناً يتعارض وجود القمة المرستيمية مع نشوء البرعم الأُبطي لإحتواء الأول على الأوكسين ويجب إزالة المرستيم القمي وزراعة البرعم الأُبطي فقط.

التضاعف من النموات العرضية Multiplication by adventitious shoots

تتكون تراكيب الساق والأوراق طبيعياً من أنسجة نباتية تقع في مناطق غير آباط الأوراق وبذلك تعتبر نموات جانبية والتي تشمل السوق، الأبصال، الدرنات والرايزومات. تُعد النموات الجانبية مصدراً مهماً في إكثار

النبات بالطرائق التقليدية وخارج الجسم الحي. تُحفز المناطق المرستيمية للنموات العرضية في وسط مُناسب لإخلاف نباتات كاملة منها.



شكل 2.16. شكل توضيحي لإكثار النباتات بالبراعم الأُبطية (أو قمة الفرع). (A) نبات ذو نورة زهرية (Rosette plant)، (B) نبات عادي ذو ساق قائم.

العوامل المؤثرة في الإكثار الدقيق Factors affecting micropropagation

من أجل نجاح الإكثار السلالي الدقيق، يجب أمثلة (Optimization) العديد من العوامل التي يحتاجها الجزء النباتي لحين إخلاف نباتات منه، وفيما يلي مُختصراً لأهم تلك العوامل:

1- الهيئة الوراثية للنبات (Plant genotype): من الضروري غربلة (Screening) النباتات وإختيار الأنواع ذات الصفات عالية الجودة. يتم إختيار النباتات ذات الإنبات النشط وقابلية تفرع عالية مع حملها للصفات الجيدة الأُخرى لإدخالها في برنامج الإكثار.

2- الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي Physiological status of the explant

تُنتخب المادة النباتية حديثة التكوين وتجنب الأفرع القديمة. يُفترض توفر معلومات عن النبات الواهب (Donor plant) من حيث طبيعة إكثاره بالطرائق التقليدية ومراحل نموه والتاثيرات الفصلية فيه مع مراعاة ندرة الأنسجة المرستيمية في بعض الأنواع النباتية مثل نخيل التمر لذلك فالخيارات ليست كثيرة وقد يستوجب الأمر التضحية بنبات كامل (فسيلة) من أجل عزل القمة النامية وزراعتها (شكل 2.17) اما الأجزاء الأُخرى من الشجرة فتكون إستجابتها مُتغيرة (جدول 2.5) .

شكل 2.17. فصل القمة النامية من فسيلة نخيل تحت ظروف مُعقمة تمهيداً لإكثاره نسيجياً.

جدول 2.5. إستجابة الأجزاء النباتية لنخلة التمر للزراعة النسيجية

الجزء النباتي	وفرة الجزء النباتي	القابلية على الاستجابة	ملاحظات
القمم الطرفية	جزء/ نبات	عالي جدا	تضحية بالنبات الكامل
النورات الزهرية	غزير	غير الناضجة عالي	تعتمد على موعد التزهير
البراعم الجانبية	متعدد	مختلف، الحديثة عالي، القديمة واطئ	تضحية بالنبات للحصول على الاجزاء النباتية
الجنين الجيني	غزير	مختلف، غير الناضجة عالي، الناضج واطئ	ظهور تغاير وراثي
الورقة	غزير	تنشأ مزارع لكن بدون جذور	إكثار خضري لكنه صعب
الساق	غزير	تفشل	إكثار خضري لكنه صعب
الجذر	غزير	لا تتكون نموات خضرية	لم يُسجل إخلاف كامل لحد الان

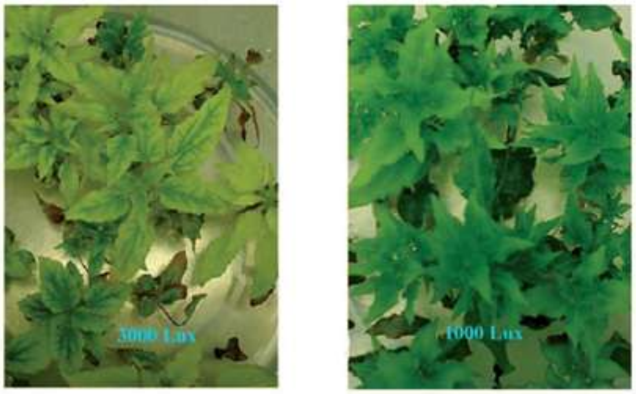
3- الأوساط الغذائية Culture media

تُناسب الأوساط القياسية المُستعملة في زراعة أنسجة النبات الإكثار الدقيق أثناء المرحلتين I و II من مراحل الإكثار الدقيق. يحتاج الوسط الى تحويرات معينة في المرحلة III مثل إضافة الاوكسينات والسايتوكاينينات وعمل تغييرات في محتوى الوسط من المعادن ويعتمد ذلك على نوع الجزء النباتي المزروع.

4- السيطرة على ظروف بيئية المزرعة Control of culture environment

يُمكن اختيار أجزاء نباتية من نباتات وعائية سواء كانت عارية او مُغطاة البذور وتزرع نسيجياً في وسط معلوم المُكونات لتحفيزها لتكوين نموات خضرية من براعمها العرضية او من أجنة جسمية بعد تحفيز الأخيرة للتكوين. تتأثر الزروعات ولحد كبير بالتقلبات (Fluctuations) بالعوامل البيئية.

الضوء: تمتص الصبغات (الموجودة في الأنسجة المزروعة والتي تساهم في عملية التصنيع الغذائي) الضوء وتؤثر في الإكثار الدقيق ولذلك فشدة الضوء وطول الفترة الضوئية يؤثران بشكل مُباشر في برنامج الإكثار. لوحظت أعراض نقص الحديد مثلاً على أفرع نبات القوغ المعرضة الى شدة إضاءة 3000 لوكس (شكل 2.18) بينما نمت بشكل جيد تحت شدة إضاءة 1000 لوكس.

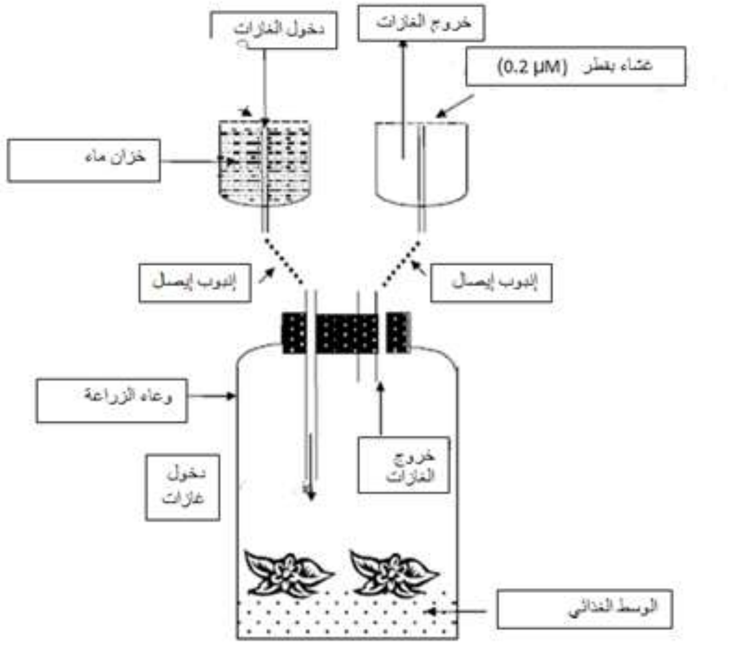


شكل 2.18. أفرع نبات القوغ (*Populus*) نامية خارج الجسم الحي وتظهر عليها أعراض نقص الحديد في شدة إضاءة 3000 لوكس (45 µmol $m^{-2}s^{-1}$) مُقارنة مع الأفرع النامية تحت شدة إضاءة 1000 لوكس (15 µmol $m^{-2}s^{-1}$).

تؤثر نوعية الضوء ايضاً في نمو الأفرع فالضوء الأزرق يُحفز في تشجيع الأجزاء النباتية المفصولة لتكوين أفرع بمُعدلات عالية. يُناسب في الأغلب التعاقب الضوئي 16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام توالد الأفرع ولأغلب النباتات.

درجة الحرارة: تتطلب أغلب الزروعات النسيجية 25 °م كدرجة حرارة مثالية لنموها مع بعض الإستثناءات برفع درجة الحرارة قليلاً عند إكثار النباتات الإستوائية (Tropical) أي نباتات المناطق الحارة وتقليلها قليلاً عند إكثار نباتات المناطق الباردة (Temperate zone plants). لوحظ بأن أنسجة هجين *Begonia x Cheimantha* تتطلب درجة حرارة 18 °م لتحقيق أفضل نمو في زروعاتها.

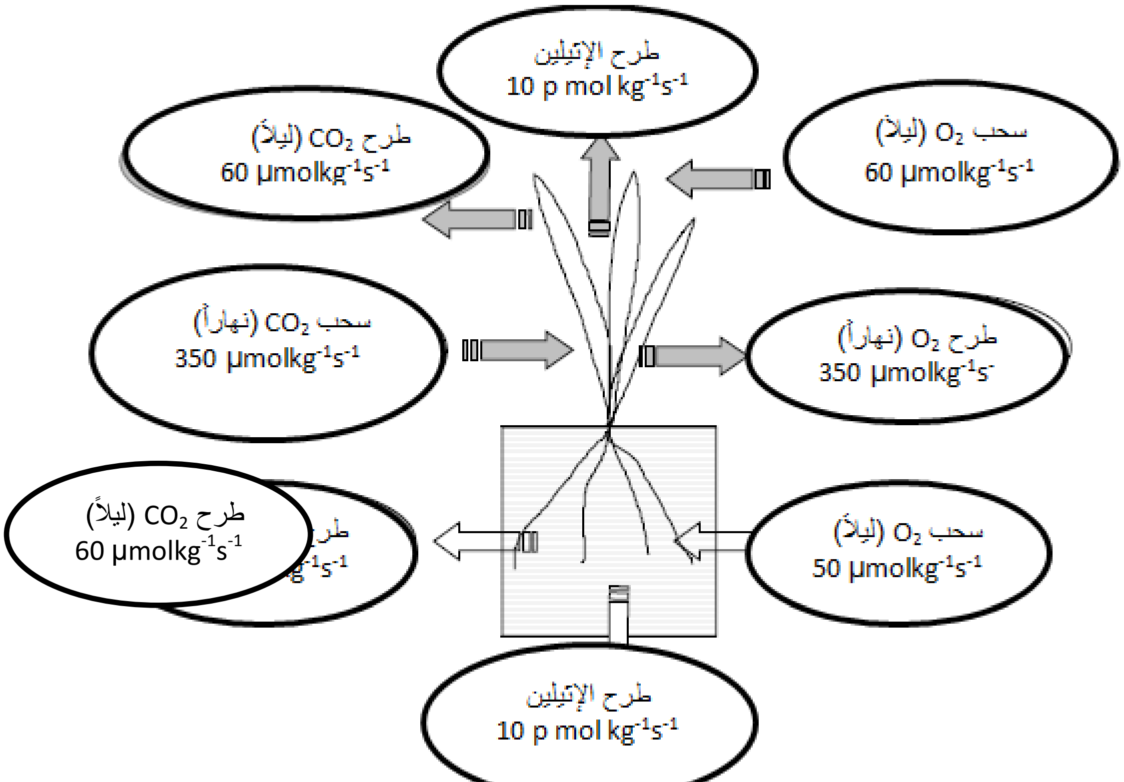
بيئة إنبوبة الزراعة: يتعرض النبات الكامل في بيئته الطبيعية الى مؤثرات غازية تؤثر في نموه (شكل 2.19). لوحظ ايضاً حصول نمو غير منتظم في خلايا النبات نتيجة تراكم الأثيلين، O_2، CO_2، إيثانول والأستلديهايد في أنابيب الزراعة. أمكن تجاوز مشكلة تراكم تلك المواد في بيئة إنبوبة الإختبار بالتحول الى إكثار النبات في مفاعلات حيوية تتم السيطرة التامة على بيئة المفاعل الحيوي وكما سيأتي لاحقاً أو إستعمال أوعية إكثار خاصة تسمح بالتبادل الغازي بين بيئة الزروعات والجو الخارجي.



شكل 2.19. وعاء مُخصص للإكثار الدقيق للنباتات النادرة والإحتياجات الخاصة يسمح بدخول الغازات التي تحتاجها الزروعات والتخلص من الغازات الضارة بها.

العوامل المؤثرة في تجذير الأفرع: تُفضل الأفرع المفصولة من مرحلة التضاعف ولغرض تجذيرهاتراكيز واطئة من تراكيز الأملاح (خفضها الى النصف أو الربع من التركيز الأصلي كامل القوة). تُحفز الأفرع على التجذير بإضافة اوكسين مُناسب مثل NAA أو IBA. ومن الضروري فهم آلية التبادل الغازي بين النبات وبيئته داخل أنابيب الزراعة نهاراً وليلاً (شكل 2.20). فالنُبيتة تطرح في كافة الأحوال الأثيلين ويستمر ذلك على مدار الساعة ومن المعلوم بأنه هرمون غازي مُثبط للنمو وتسحب CO_2 وتطرح O_2 نهاراً بكميات معلومة وتحصل عملية معاكسة في الليل. ولابُد من التخلص من تراكم الغازات الثلاثة لأن زيادتها تؤثر سلباً في نمو النبيتة داخل أنبوبة الإختبار.

تكوين الأعضاء Organogenesis: هي عملية التَشَكُل (Morphogenesis) التي تشمل تكوين الأعضاء مثل النموات الخضرية، الجذور، الأزهار والبراعم من أنسجة الأجزاء النباتية المزروعة. تأخذ عملية تكوين الأعضاء شكلين، إما مباشر أو غير مباشر.



شكل 2.20. مُخطط توضيحي لأنماط طرح الغازات وسحبها من قبل النبات الكامل تحت ظروف نمو ونشوء طبيعية.

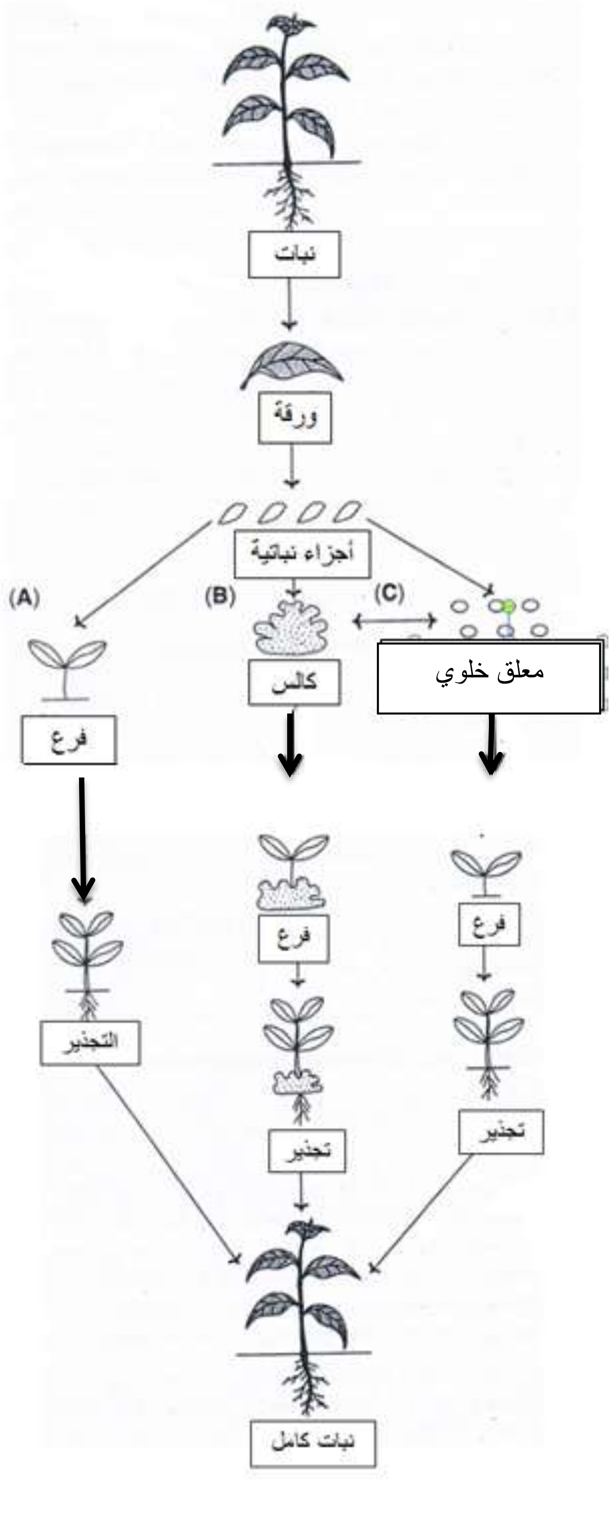
تكوين الأعضاء المُباشر Direct organogenesis: يُمكن زراعة أنسجة الأوراق، السوق، الجذور والشماريخ الزهرية لِتَنتج أعضاء دون المرور في مرحلة الكالس أو المُعلق الخلوي. تُستعمل وعلى نطاق واسع طريقة تحفيز تكوين الأفرع العرضية (Adventitious) مُباشرةً من أجزاء الجذور، الأوراق، وباقي أعضاء النبات وهذه مفيدة جداً مع الأنواع النباتية العشبية (Herbaceous). ولغرض إستثمار خاصية تكوين الأعضاء بالطريقة المُباشرة، يُجهز الوسط الزرعي بتوليفة مُناسبة من الاوكسين والسايتوكاينين ويعتمد تركيزهما على عمر وطبيعة الجزء النباتي وظروف نموه.

تكوين الأعضاء غير المُباشر: عندما تظهر الأعضاء من كتلة خلايا الكالس أو من خلايا المُعلقات الخلوية، عندئذٍ تُسمى الظاهرة بتكوين الأعضاء غير المُباشر (شكل 2.21). بالإمكان تنشئة الكالس من أجزاء نباتية مُختلفة كالأوراق، الجذور، الفلق، السوق، الأزهار التويجية وغيرها حيث تُستحث تلك الأجزاء لتكوين الأعضاء. من الضروري أن يمتلك الجزء النباتي المُرشح للتَشَكُل (تكوين الأعضاء) أنسجة فتية ذات فعالية للإنقسام الخلوي عالية وكقاعدة عامة، كلما كبُرَ الجزء النباتي، كلما كانت فرصته أفضل في نشوء الكالس والمُعلق الخلوي. من المُفيد جداً إختيار أنسجة مرستيمية مثل طرف الفرع (Shoot tip)، الورقة حديثة التكوين وحامل الورقة (Petiole) لغرض إستحثاث الكالس ومن ثم تحفيز نشوء الأعضاء من الكالس بالنظر لما تتمتع به تلك الأجزاء النباتية من مُعدلات نمو عالية وتُحقق نسب مرتفعة في نجاة الأعضاء المُتكونة. بالإمكان تنمية الزروعات لغرض التَشَكُل المُباشر في أوساط سائلة أو صلبة وبإستعمال أنواع مُختلفة من الأوساط مثل MS، B_5، White وغيرها. يتم عادةً تجريب تراكيز مُختلفة من الاوكسينات والسايتوكاينينات وإختيار التوليفة الأفضل في نشوء الأعضاء.

تطبيقات الإكثار الدقيق Applications of micropropagation

أصبح الإكثار الدقيق بديلاً أو مُكملاً لإكثار النبات بالطرائق التقليدية وفيما يلي إستعراضاً موجزاً لأهم تطبيقاته والتي تُعد مُكملاً لما سبق من فوائد:

1- يُمكن من خلال الإكثار الدقيق إنتاجأعداد كبيرة من النباتات من قطعة صغيرة من النسيج النباتي وعلى مدار السنة ويُعد بديلاً لإكثار النباتات التي لايُمكن إكثارها أو صعبة التجذير بالطرائق التقليدية. يُمكن ايضاً حفظ الأجزاء المُكثرة نسيجياً بسهولة ولسنوات عديدة في بنك الجينات وتبادلها عبر الحدود وبين المُختصين تحت إجراءات حجر زراعي مُبسطة لكونها خالية من المُسببات المرضية ولا تشغل حيزاً واسعاً عند النقل.



شكل 2.21. الإكثار الدقيق للنبات بطريقة تكوين الأعضاء. (A) تكوين الأعضاء المُباشر. (B) تكوين الأعضاء غير المُباشر من أنسجة الكالس. (C) تكوين الأعضاء غير المُباشر من مزرعة مُعلق خلوي.

2- إنتاج نباتات خالية من الأمراض: تُتيح التقانة إنتاج نباتات خالية من المُسببات المرضية بعد زراعة المرستيم القمي (شكل 2.22) وخاصة الفيروسية منها.

شكل 2.22. مُخطط توضيحي لقمة فرع خضري وموقع المرستيم القمي المُستعمل في إنتاج نباتات خالية من المُسببات المرضية.

تكون المرستيمات القمية في النباتات المُصابة بالأمراض إما خالية من الفيروسات أو تركيز الفيروسات يكون فيها قليلاً للأسباب التالية:

1- غياب الأنسجة الوعائية في المرستيمات والتي تتحرك الفيروسات فيها.

2- سرعة إنقسام الخلايا المرستيمية وفعاليتها الايضية العالية لا تسمح للفيروسات بالتضاعف.

3- تُثبط التراكيز العالية من الاوكسين الداخلي في قمم الأفرع من تضاعف الفيروسات.

طرائق التخلص من الفيروسات Virus elimination

وُظفت مجموعة من التقانات للتخلص من الفيروسات التي تصيب النباتات وفيما يلي شرحاً موجزاً لها:

1- المُعاملة الحرارية للنبات الام Heat treatment of plant أو ما يُسمى Thermotherapy: أُستعملت الطريقة في التخلص من الفيروسات التي يحملها النبات الكامل قبل إكتشاف طريقة زراعة المرستيم القمي.

تتلخص الطريقة بالإستفادة من خاصية تحجيم فعالية الفيروسات جزئياً أو بشكل كامل في درجات الحرارة العالية مع الحد الأدنى من التلف للنبات المُعامل. تُعرض النباتات الى درجات حرارة تتراوح بين 35 الى 40 °م بإستعمال الماء أو الهواء الحار للتخلص من الفيروسات في الأفرع النامية والبراعم ولكن هناك مُحددان لهذه التقانة. أولهما؛ أن أغلب الفيروسات غير حساسة للمُعاملة الحرارية وثانيهما، يهلك العديد من الأنواع النباتية بعد المُعالجة الحرارية ولذلك لم تُعد الطريقة شائعة في الوقت الحاضر.

زراعة المرستيم القمي: يكون حجم المرستيم المطلوب زراعته حرجاً جداً عند الرغبة في التخلص من الفيروسات لكون أغلبها تتواجد بشكل متدرج (Gradient) داخل النسيج النباتي. لذلك فإخلاف نباتات خالية من الفيروسات يتناسب عكسياً مع حجم المرستيم المزروع مما يستوجب أن يقطع المرستيم تحت مجهر خاص يُدعى بالمجهر المُجسم (Stereoscopic). تؤثر في زراعة المرستيم القمي العوامل أدناه:

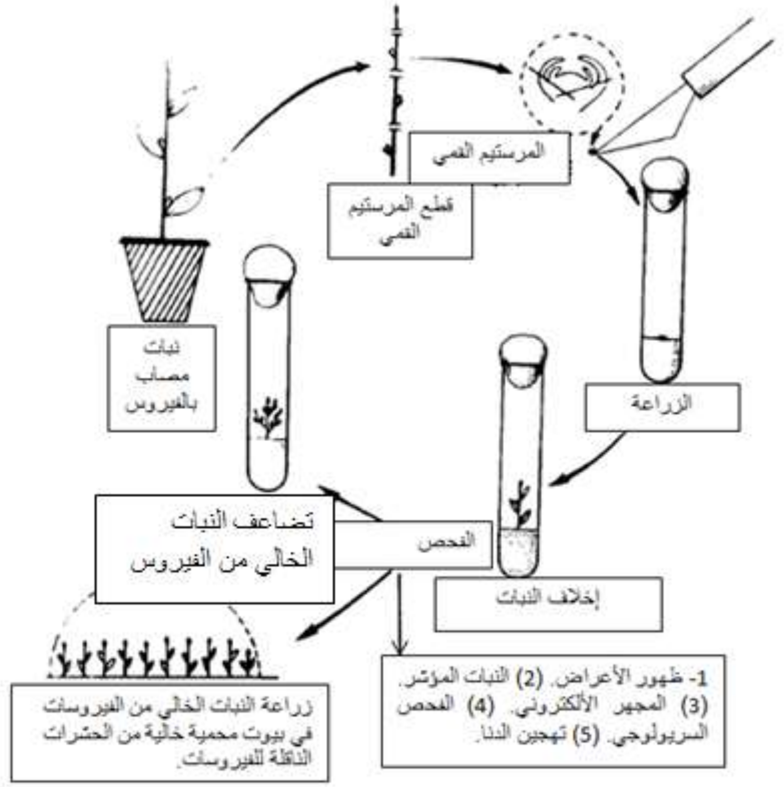
1- الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي وتُفضل البراعم النشطة.

2- المُعالجة الحرارية للنبات قبل عزل المرستيم وزراعته لبعض الأنواع النباتية.

3- وِجِد بأن وسط MS مُنخفض التراكيز من الاوكسينات والسايتوكاينينات مُناسباً لهذا الغرض.

التخلص من المُسببات المرضية غير الفيروسية: إضافةً الى التخلص من الفيروسات، تُفيد زراعة المرستيم القمي ومزارع الكالس في التخلص من البكتريا، الفطريات والمايكوبلازما، وفيما يلي مثالين على ذلك؛ تم التخلص تماماً من الفطر *Fusarium roseum* الذي يُصيب نبات القرنفل بزراعة المرستيم القمي، تم الحصول على نباتات قرنفل خالية من بكتريا *Pseudomonas carophylli* و بكتريا *Pectobacterium parthenii* بطريقة زراعة المرستيم القمي ايضاً.

ميزات وعيوب إنتاج نباتات خالية من الأمراض: بالرغم من فعالية تقانة زراعة المرستيم القمي في التخلص من المُسببات المرضية إلا أن ذلك يحتاج الى مهارة ومعرفة جيدة بأمراض النبات وزراعة الأنسجة على حدٍ سواء. أظهرت النباتات التي تم التخلص من الفيروسات التي تصيبها حساسية أكبر عند إعادة إصابتها بنفس الفيروس الذي تم التخلص منه ولذلك يجب المحافظة على النباتات المُنتجة والسيطرة على الأمراض والحشرات الناقلة داخل البيت الزجاجي والحقول المكشوفة على قدر المُستطاع (شكل 2.23).



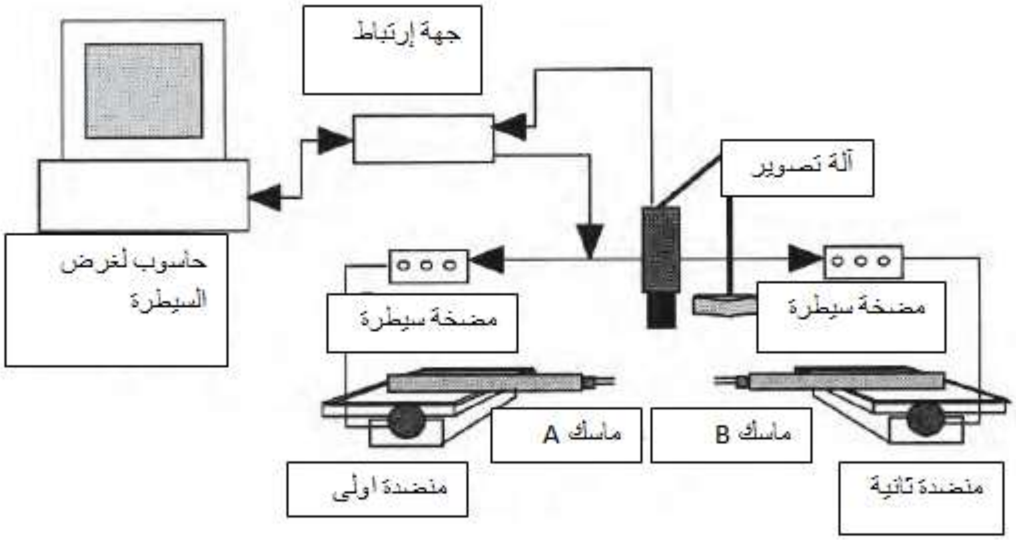
شكل 2.23. إنتاج نباتات خالية من الفيروسات بزراعة المرستيم القمي والفحوصات التي تُجرى عليه للتأكد من خلوه منها.

ومن أهم المزايا التي توفرها النباتات الخالية من الفيروسات زيادة في النمو ونشاط وحاصل أعلى (كالبطاطا) وزيادة في حجم الأزهار (مثل الداوودي) وتحسين تجذير العُقل (مثل الجيرانيوم). يتم فحص النبات الناتج بالطرائق الخمس المعروفة والموضحة في شكل 23.2 للتأكد من خلوه من الإصابة قبل مرحلة تضاعف النبات وتجذيره واقلمته ومن ثم زراعته داخل بيوت الزراعة المحمية مثل البيوت الزجاجية، البلاستيكية أو الأنفاق البلاستيكية.

مكننة الإكثار الدقيق Automation of micropropagation

أصبح من المُمكن حالياً مكننة الإكثار الدقيق وبمراحله المُختلفة حيث وُظِفت المفاعلات الحيوية في تضاعف أعداد هائلة من النموات الخضرية والأبصال. تستعمل بعض وحدات الإكثار الدقيق التجارية الإنسان الآلي (Robot) لتقليل كلفة الأيدي العاملة وبالتالي تقليل كُلف الإنتاج.تُستعمل حالياً ولو على نطاقٍ محدود القاطعات الليزرية التي تم توضيحها في الشكل 2.2 ونوع آخر من القاطعات التخصصية للمرستيمات القمية

المُعتمدة على نقل صورة المرستيم الى شاشة بكاميرا رقمية تُربط بدائرة الكترونية (شكل 2.24). وظِفت التقانة الأخيرة في فصل المرستيمات القمية لنبات قصب السكر المهم إقتصادياً ومن جوانب مُختلفة مثل إنتاج نباتات خالية من الفيروسات، الإكثار الواسع للنبات نسيجياً وفي إنتخاب الأنواع عالية المُحتوى من السكر بعد برامج تحسين النبات مما وفر الكثير من الأيدي العاملة والجهد والوقت.



شكل 2.24. مُخطط توضيحي لطريقة فصل أطراف الأفرع والقمم المرستيمية من نبات قصب السكر بإستعمال تقانات حديثة.

تحفيز الإخلاف بإستعمال الموجات فوق الصوتية (Sonication): تُحفز المُعاملة لمُدة قصيرة بالموجات فوق الصوتية للأجزاء النباتية أو الكالس لإخلاف أفرع. أُستعملت التقانة على سبيل المثال في إخلاف أفرع من أجزاء نباتية صعبة الإستجابة مفصولة من نبات القرع نوع كوسة (*Cucurbita pepo*) وخاصة من أجزاء الفلق. بالرغم من المُعاملات المُختلفة لتلك الأجزاء لكنها لن تستجب للإخلاف إلا بعد تعريضعا الى موجات صوتية لمُدة 30-120 ثانية وأنتجت أفرعاً متعددة زادت عن خمس مرات ما تنتجه الفلق غير المُعاملة وأكثر طولاً.

المشاكل المرافقة للإكثار الدقيق Problems associated with micropropagation

بالرغم مما حققه الإكثار الدقيق من فوائد عديدة وكما سبق ذكره، لاتخلو التقانة من بعض السلبيات التي ترافق عملية إنتاج الشتلات في مراحلها المُختلفة ومنها:

1- تلوث الزروعات: تُرافق مراحل الإكثار الدقيق أحياناً مُلوثات من الأحياء المجهرية بطيئة النمو مثل بكتريا *Erwinia sp.* و *Bacillus sp.* وتُسبب في تلف الزروعات والأوساط الغذائية بسبب إستهلاكها للمُغذيات وتلف النسيج النباتي وإفراز مُركبات ضارة الى بيئة الزروعات. يُمكن السيطرة على هذا النوع من التلوث بإضافة المُضادات الحيوية أو المُبيدات الفطرية الى الوسط بالرغم من التأثير السلبي لتلك الإضافات على الزروعات.

2- ظهور الإسمرار (Browning) في الوسط الغذائي والزروعات وكما ذُكر سابقاً، ترتبط الحالة في الغالب مع النباتات الخشبية والمُعمرة نتيجة تراكم مُثبطات النمو في الوسط يتحول تدريجياً الى اللون الأسود. تتراكم المُركبات الفينولية التي يفرزها الجزء النباتي وهي سامة ومُثبطة للنمو بعد تأكسدها. تضيف غالبية المُختبرات مُضادات الأكسدة الى الوسط وفي شطف ونقع الأجزاء النباتية مثل حامضي الستريك والأسكوربيك ومادة Polyvinyl pyrrolidone (PVP) والعديد من الوسائل التي تم ذكرها سابقاً.

3- التغاير الوراثي (Genetic variability): سُجلت العديد من التغايرات الوراثية في النباتات المُكثرة نسيجياً وعموماً تكون أدناها عند إستعمال أطراف الأفرع وأكثرها عند إستعمال النموات العرضية.

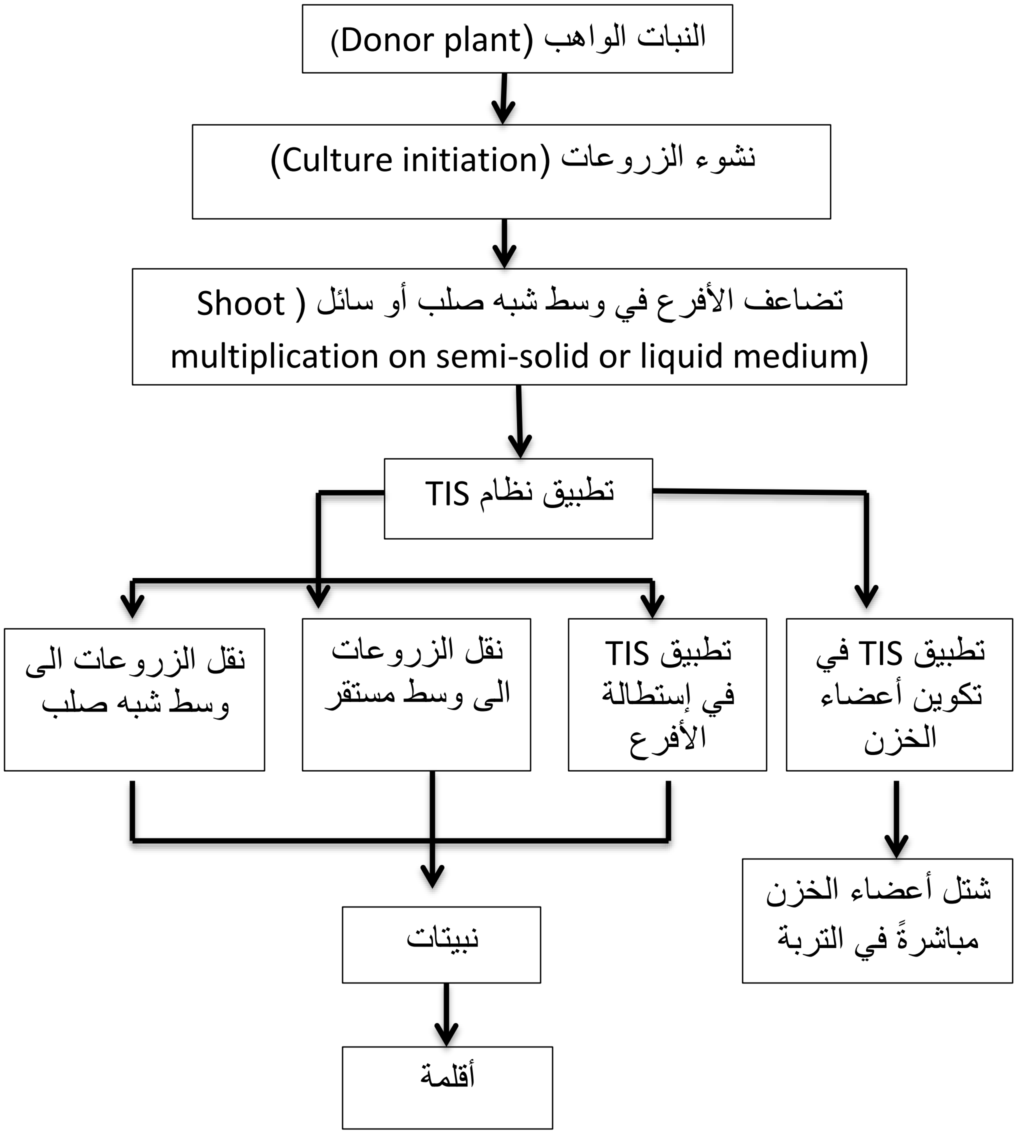
4- التزجج (Vitrification) أو (Glasseness): نتيجةً لتكرار تضاعف الزروعات خارج الجسم الحي، تبدو مع تكرار الزراعة بأنها مُشبعة بالماء والأوراق شفافة تموت بعدها. يتم تقليل الظاهرة هذه أو منعها من الحدوث بزيادة تركيز الأكار في الوسط من 0.6 الى 1% بالرغم من التأثير السلبي لتلك الزيادة في نمو الزروعات.

5- إرتفاع الكُلفة الأولية لمشروع الإكثار الدقيق (Cost effectiveness) يحتاج المشروع الى توفر رأس مال يتناسب مع الخطة الإنتاجية المُقترحة.

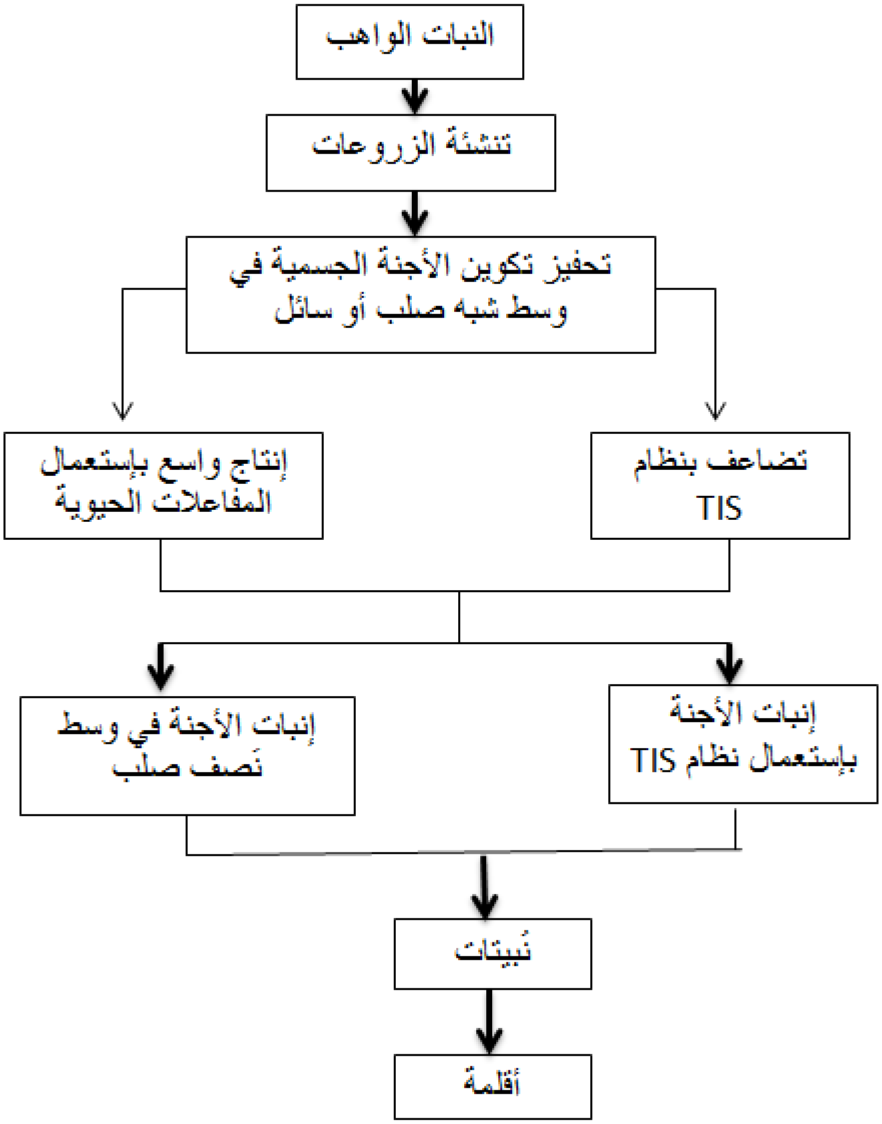
إستعمال نظام مزارع الغمر المؤقت في الإكثار الدقيق Temporary immersion system

وُظِفَت تقانة الغمر المؤقت في الإكثار (TIS) التجاري للعديد من النباتات المُهمة إقصادياً (شكل 2.25)، حيث تُفصل الأجزاء النباتية من النبات الواهب ذات الخصائص الجيدة وتُنشأ الزروعات وتُنقل الى وسط شبه صلب أو سائل ومن ثم إدخال نظام الغمر المؤقت (TIS) في مرحلة تضاعف الزروعات. نجحت التقانة حتى إنتاج النباتات التي تتكاثر خضرياً بوساطة أعضائها الخازنة مثل إنتاج الدرنات الدقيقة من الرُتب العليا للبطاطا، إنتاج أبصال وكورمات نباتات الزينة وغيرها. كما تم توظيف تقانة TIS في إنتاج الأجنة الجسمية

من نباتات مُختلفة (شكل 2.26). تُحفز الأجنة الجسمية على النشوء في وسط شبه صلب أو سائل اولاً وتُنقل بعدها إما الى مفاعل حيوي بهدف زيادة أعدادها أو تستمر العملية التقليدية بمُضاعفات أعدادها والإستمرار في البرنامج لحين إنتاجالنُبيتات وأقلمتها.



شكل 2.25. إدخال نظام الغمر المؤقت (TIS) في برنامج الإكثار الدقيق ولإنتاج أعضاء خزن للنباتات التي تتكاثر بأعضاء الخزن.

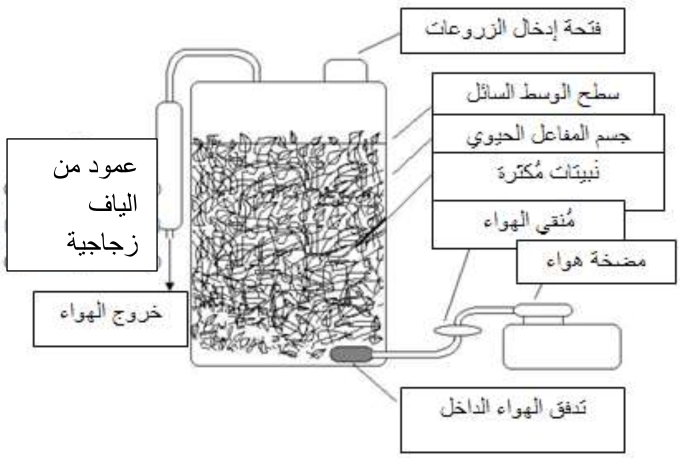


شكل 2.26. مُخطط توضيحي لإستثمار نظام الغمر المؤقت (TIS) في الإكثار عن طريق الأجنة الجسمية.

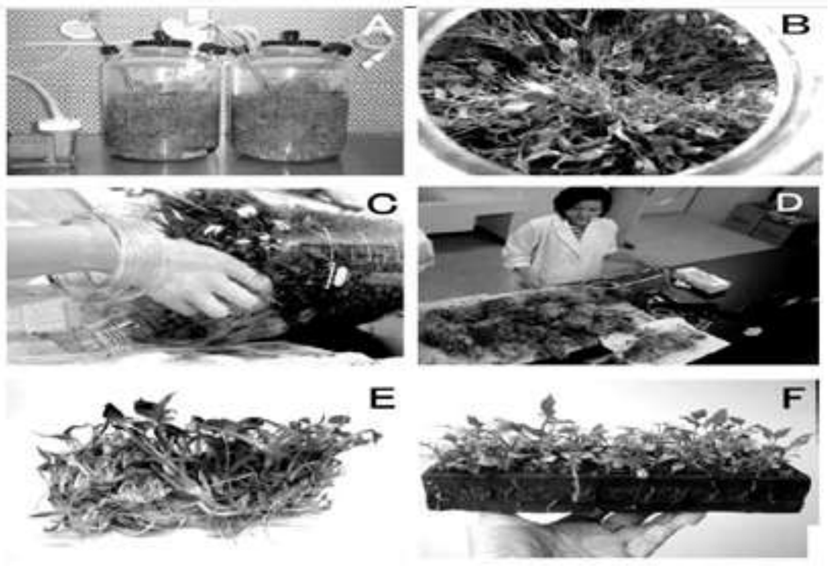
توظيف المفاعلات الحيوية **Exploitation of Bioreactors**

أدى تطوير المفاعلات الحيوية مع إختلاف أنواعها الى حصول نقلة نوعية في مجال تطبيقات الزراعة النسيجية عموماً والإكثار الدقيق خصوصاً. طورت اولاً لأغراض إنتاج المضادات الحيوية من الأحياء المجهرية وأُستثمرت في المجال النباتي لإنتاج المُركبات الصيدلانية ودخلت أنظمة المُفاعلات الحيوية في الإنتاج الواسع للنباتات بالإكثار الدقيق وأصبحت تُنتج في أوساط سائلة مُهواة (شكل 2.27). تنوعت معامل

الإكثار الدقيق للنبات وتم تصنيع مفاعلات حيوية بسيطة التصميم وبنظام تهوية يمر عبر مُرشحات رخيصة الثمن (شكل 2.28).



شكل 27.2. مُخطط لمفاعل حيوي مُبسط ومُهوى مُخصص للإكثار الدقيق.



شكل 2.28. إكثار نبات *Spathiphyllum* بإستعمال المُفاعلات الحيوية ذات نظام تهوية بسيطة. (A) نُبيتات سباثيفايلم داخل المفاعل الحيوي. (B) صورة مُقربة للنُبيتات داخل المفاعل. (C و D) حصاد النُبيتات. (E) نُبيتات خارج المفاعل الحيوي. (F) نُبيتات نامية في وسط زراعي بعد تغطيتها بالنايلون الشفاف وتوفير الإضاءة المُناسبة.

تستعمل الشركات الصناعية وخاصة في الصناعات الغذائية والدوائية مُفاعلات حيوية سعة 5 لتر لإكثار النباتات المُهمة صيدلانياً ومن ثم إستخلاص المواد الفعالة منها مما يُتيح لها الإنتاج على مدار السنة (شكل 2.29). وأُستثمرت ايضاً في إنتاج الأجنة الجسمية تمهيداً لإنباتها وإكثار النبات.

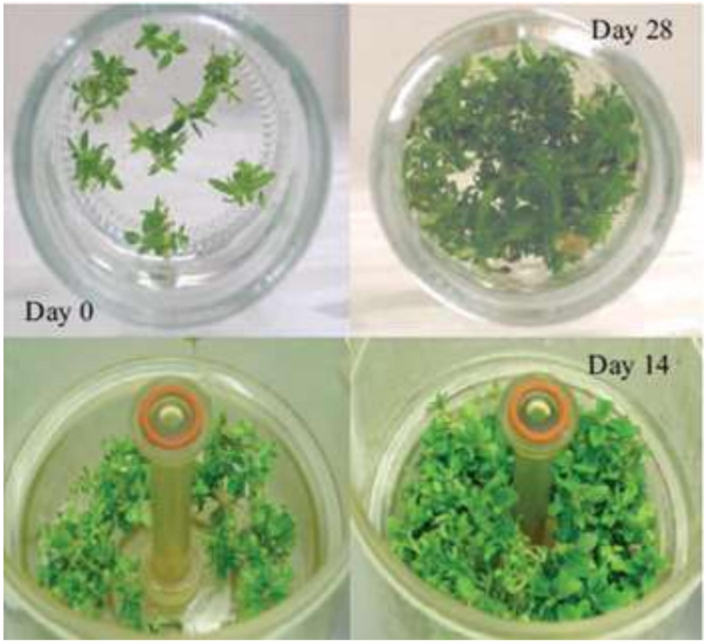
شكل 2.29. (a) مُفاعلات حيوية سعة 5 لتر مُخصصة لزراعة وإكثار الجذور العرضية لنبات الجنسنك (*Panax ginseng*). (b) الإكثار الدقيق والواسع لنبات الجنسنك من الأجنة الجسمية في مُفاعلات حيوية سعة 5 لتر. (c) مفاعل حيوي سعة 500 لتر لإكثار جذور نبات الجنسنك. (d) مفاعل حيوي سعة 1000 لتر من نوع العمود (Column). (e) حصاد الجذور الجانبية لنبات الجنسنك تم إنتاجها داخل مُفاعلات سعة 500 لتر بعد 8 أسابيع من زراعتها. (f) حصاد الأجنة الجسمية من مُفاعلات سعة 500 لتر بعد 30 يوماً من زراعة الخلايا.

تُستعمل حالياً مُفاعلات حيوية في الإكثار الدقيق بأوعية زجاجية مُزدوجة وتُصمم بحجوم مُختلفة تسمح بسحب الوسط الغذائي القديم وإستبداله بجديد خاصة عند تراكم المُركبات الفينولية مع توفر نظام تهوية جيد (شكل 2.30).

شكل 2.30. (A) مُفاعل حيوي مُزدوج الأوعية الزجاجية سعة 5 لتر تم وضع 20 غرام من النموات الخضرية لنبات *Phalaenopsis* وحصول الإسمرار في الوسط نتيجة تراكم الفينولات. (B) تضاعف الأفرع بعد 12 إسبوع في نظام المُفاعلات الحيوية ذات العبوات المُزدوجة مما يُتيح الإكثار الدقيق الواسع للنبات. يُستعمل ايضاً نظام مُفاعل حيوي سعة لتر واحد من النوع العمودي (Column-type) لإكثار نبات *Phalaenopsis* والتي تُعد طريقة بسيطة وغير مُكلفة بالإمكان توظيفها في مشاتل إكثار النبات (شكل 2.31).

شكل 2.31. (a) الإكثار الدقيق لنبات *Phalaenopsis* في مُفاعل سعة لتر واحد من النوع العمودي. (b) تضاعف النموات الخضرية وإنتاجالنُبيتات بعد 5 أسابيع. (c) نُبيتات مؤقلمة.

شاع إستعمال نوع من العبوات الزجاجية أو البلاستيكية المُسماة ريتا (RITA™) وبسعات مُختلفة وعادةً تستعمل أوساط نُصف صلبة (لاحظ شكل 2.32 للتفاصيل). توفر عبوات ريتا مُعدلات تضاعف عالية وبفترات زمنية قصيرة.



شكل 2.32. إستعمال عبوات RITA™ الحاوية على وسط نُصف صلب في الإكثار الدقيق حيث تُزرع 8 نموات خضرية لتصل الى العشرات بعد 28 يوماً وإذا ما زرع 50 فرعاً خضرياً في الريتا الواحد فتصل أعداد الأفرع المُتضاعفة الى المئات في غضون 14 يوماً.

الإكثار الدقيق لنخيل التمر Micropropagation of date palm

بالنظر لأهمية نخيل التمر (*Phoenix dactylifera*) وضرورة إكثار تلك الشجرة المُباركة نسيجياً، نوضح خطوات إنتاجها بطريقتين، تتضمن الاولى الإنتاج الواسع منها بطريقة زراعة البرعم الطرفي المُسمى بالجمارة (شكل 2.33) حيث يكون البدئ بفسيلة جيدة ومن صنف معروف. يُزال السعف والكرب لحين ظهور البرعم الطرفي حيث يُفصل ويُقطع وتُزرع الأجزاء النباتية من الجمارة على أوساط غذائية معلومة المُكونات حاوية على مُنظمات نمو تُحفز نشوء الأجنة الجسمية على الكالس الأولي (شكل 2.34). تُفصل الأجنة ويتم إنباتها لِتُنتج نُبيتات يتم أقلمتها لتكون جاهزة للزراعة في الحقل المُستديم. لا تقتصر عملية الإكثار في النخيل في إستعمال البرعم الطرفي بل يُكثر ايضاً من أنسجة الورقة (شكل 2.35) حيث تُحفز الأجنة الجسمية للتكوين. وُظِفت التقانة ايضاً في إكثار النخيل بتحفيز تكوين الأجنة الخضرية المُباشر من

أجزاء صغيرة من السعف أو بالطريقة غير المُباشرة بتحفيز نشوء الكالس اولاً ومن ثم تحفيز الأخير لنشوء الأجنة الجسمية. تُفصل تلك الأجنة وتُنضج ويتم إنباتها لتكون نُبيتات نخيل تُزرع في المكان المُستديم بعد أقلمتها.أصبح بالإمكان إنتاج اشجار نخيل من زراعة أجزاء مُختلفة من الشمارخ الزهرية الإنثوية غير الناضجة بطول 0.5 سم من طلعات بطول 8-10 سم (شكل 2.36، 2.37). تستجيب تلك القطع مُباشرةً لتكوين البراعم من الأجزاء الزهرية المزروعة في وسط MS المُجهز بالسايتوكاينين BA بمقدار 10 مايكرومول إذ بلغت نسبة الإستجابة 70% للصنف مكتوم و 60% للصنف برحي.

شكل 2.33. مراحل تحضير الفسيلة للإكثار الدقيق.

شكل 2.34. زراعة أجزاء الجمارة وتكوين الكالس الأولي منها ويتم تحفيزه لتكوين الأجنة الخضرية التي يتم إنباتها وأقلمة النُبيتات لتصبح بعد فترة جاهزة للزراعة في المكان المُستديم.

شكل 2.35. تحفيز الاجنة الجسمية واخلاف النبات من أجزاء ورقة النخيل صنف دجلة نور.

a- كالس جنيني ضمن تراكيب كروية قبل نشوء الأجنة مزروعة على وسط MS يحتوي على 1 ملغم/لتر 2,4-D وبعمر ستة أشهر.

b- النشوء المُباشر للأجنة على الجزء الخلفي لورقة في طور الحداثة مزروعة على وسط MS مضافاً له 1 ملغم/لتر من 2,4-D وبعمر ستة أشهر.

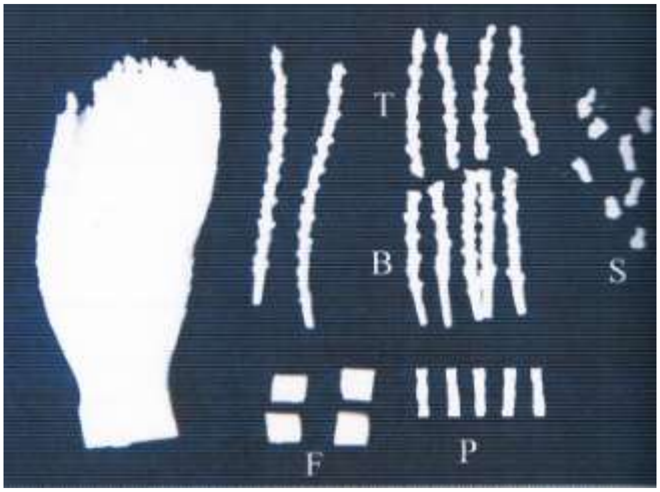
c- نشوء وتمايز الكالس الجنيني بعد شهر من نقله الى وسط MS مُجهز 1 ملغم/لتر 2,4-D.

d- أجنة جسمية ناضجة تم الحصول عليها بعد عشرة اسابيع من نقل كالس جنيني متاميز الى وسط MS خالٍ من 2,4-D.

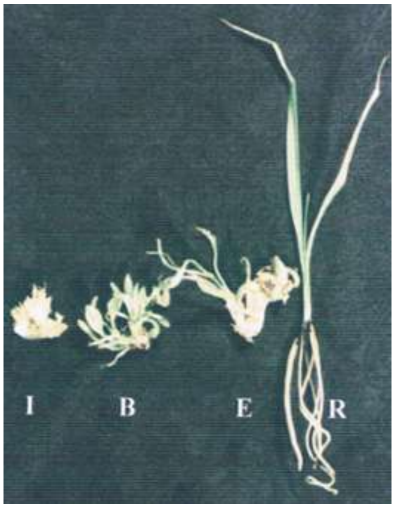
e- نُبيتات مؤقلمة ويظهر فيها الجذير كاملاً والنموات الخضرية بعد ثلاثة أسابيع من نقلها الى وسط MS السائل بنصف القوة مجهز بمقدار 1 ملغم/لتر من IBA.

f- نباتات نخيل في اصص بعد ثلاثة أشهر من نقلها الى البيت الزجاجي.

g- فسائل نخيل بعمر سنتين.



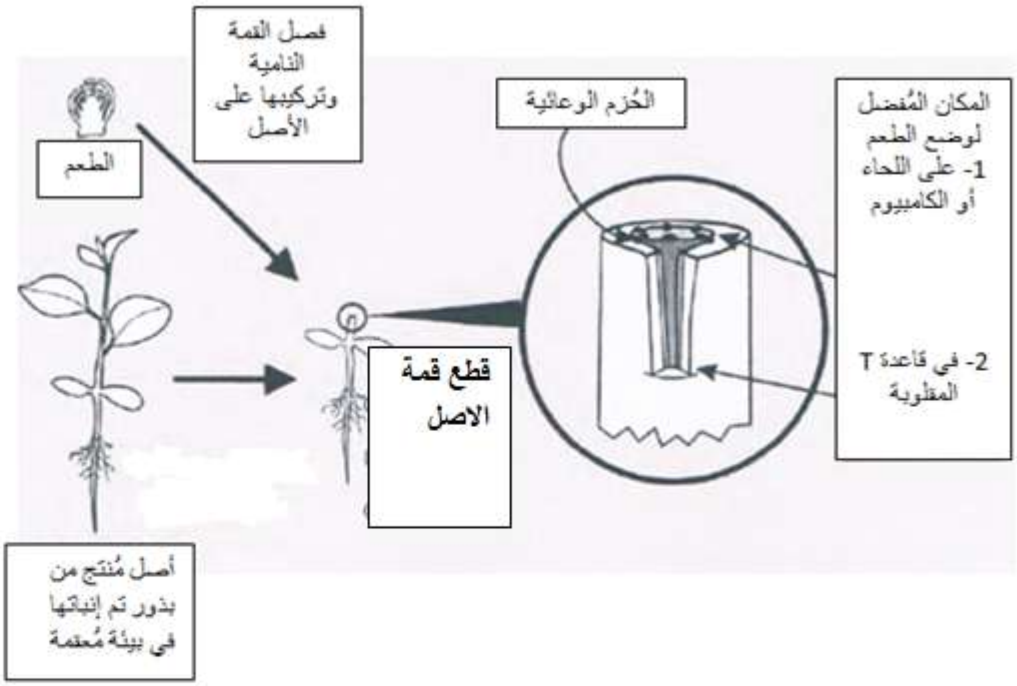
شكل 2.36. الأجزاء الزهرية المستعملة كأجزاء نباتية. (B) النُصف القاعدي من الشمراخ. (F) قطع الحامل الزهري. (P) قطع الشماريخ بدون أزهار وبطول 1 سم. (T) النصف العلوي للشمراخ الزهري. (S) قطع الشماريخ الزهرية بدون أزهار وبطول 1 سم (حسام سعد الدين محمد، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، 2007).



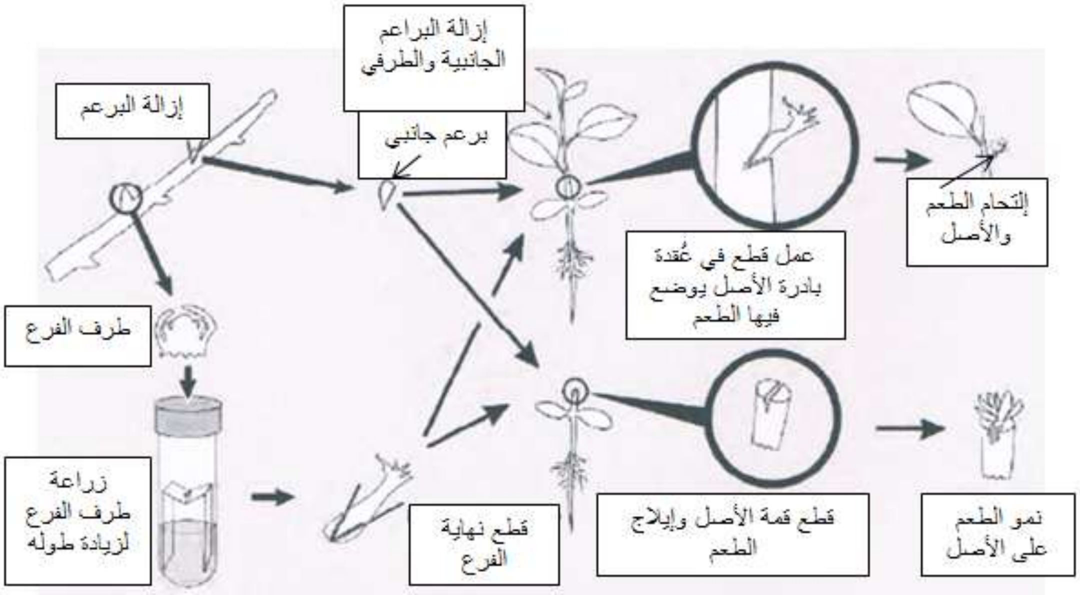
شكل 2.37. مراحل الإكثار الدقيق للصنف مكتوم من الأجزاء الزهرية. (I) نشوء البراعم العرضية. (B) التضاعف الخضري. (E) إستطالة الأفرع. (R) تجذير النموات الخضرية. (حسام سعد الدين محمد، اطروحة دكتوراه، كلية الزراعة، جامعة بغداد، 2007).

التركيب الدقيق كوسيلة في الإكثار ***In vitro* grafting**

أُستثمرت تقانة التطعيم والتركيب خارج الجسم الحي (*In vitro* budding and grafting) في إكثار النباتات التي تُظهر إصولها تغايراً وراثياً (Heterozygosity) عند إكثارها بالبذور مما يستوجب الأمر زراعة الإصول اولاً إما بالبذور أو العُقل الدقيقة ومن ثم تطعيمها بالأصناف الجيدة. تُستعمل التقانة حالياً وعلى نطاق تجاري في إنتاج شتلات حمضيات (*Citrus spp.*) والعديد من النباتات العائدة لجنس اللوزيات *Prunus* ونباتات زينة وغيرها. تُتبع الطرائق نفسها المعروفة في التطعيم والتركيب الا إنها والحالة هذه يتم تنفيذها تحت ظروف مُعقمة وإستعمال عُدة جراحية خاصة. يُنمى كل من الأصل والطعم تحت ظروف المزارع النسيجية وتُنتج بكميات كبيرة منها كلٌ حسب البروتوكول المُناسب له وتقوم أيدي عاملة ماهرة بإجراء عملية التطعيم أو التركيب داخل منضدة الهواء الطبقي. تُناسب طريقة التركيب على شكل حرف T المقلوب على سبيل المثال تركيب أنواع الحمضيات (شكل 2.38) بينما تزداد نسب نجاح أنواع أُخرى بطرائق أُخرى (شكل 2.39) مثل طريقة التركيب الشقي (Cleft grafting) وكذلك التركيب السوطي (Whip grafting) وقسمٌ آخر يُحقق نسب نجاح عالية بطريقة التركيب باللصق (Approach grafting). كذلك توجد إمكانية لإجراء التطعيم الدقيق بنقل برعم من الطعم (Scion) الى الأصل (Rootstock).



شكل 2.38. التركيب الدقيق للحمضيات والمواقع المُناسبة لوضع قمة طرف الطعم على الأصل.



شكل 2.39. طريقتان بديلتان لما سبق للتركيب الدقيق بإستعمال طعوم كبيرة.

عيوب الإكثار الدقيق Disadvantages of micropropagation

من المؤكد ان الإكثار الدقيق يحتاج الى وحدة زراعة نسيجية مُتكاملة وقد تكون كُلفة إنشائها الاولية عالية وتحتاج الى أيادي عاملة مُدربة وماهرة مع مراعاة ظروف تعقيم كاملة. ويُمكن تلخيص عيوب الإكثار الدقيق بالنقاط التالية:

1- يحتاج الى رأسمال عالي عند البدئ بالمشروع حيث وجوب توفر مختبر إكثار بكافة مُستلزماته وظروف بيئية مُسيطر عليها.

2- لا تتساوى كافة الأنواع النباتية في إحتياجاتها لذلك يُفترض في المُنتج مُراعاة التخصص أو العموميات في الإنتاج وفي الحالة الأخيرة عليه أن يوفر مُستلزمات أكثر ويعمل خطة دقيقة وجدولة للإنتاج مع دراسة مُتطلبات السوق.

3- يحتاج الى أيدي عاملة ماهرة فالخطأ في تحضير الأوساط ومُضافاتها أو التعرض للتلوث يُسبب في خسارة كبيرة.

4- الحاجة الى مُنشئات إضافية كالبيوت الزجاجية والبلاستيكية مع توفير الظروف البيئية المُناسبة خاصةً فيما يتعلق بتوفير نظام الري بالرش أو الرذاذ مع السيطرة على درجة الحرارة والإضاءة والرطوبة وأوساط الإكثار وغيرها. ترتبط وحدات الأقلمة الحديثة بحاسبات مُرتبطة بحساسات لتنظيم العملية بدقة مُتناهية.

5- يمثل التلوث العبئ الاكبر للمُنتجين وهو المسبب الرئيسي لتلف الكثير من الزروعات لذلك يجب توفر شروط التعقيم في كافة مراحل الإنتاج إبتداءاً من التعقيم السطحي، وتقطيع الزروعات، وإعادة زراعتها داخل منضدة الهواء الطبقي لحين الإنتهاء من جو المُختبر وغرفة النمو ونقل الزروعات الى مرحلة الأقلمة حيث يُمكن تعريض الزروعات تدريجياً الى ظروف الحقل.

6- حصول ظاهرة التزجج (Vitrification أو Glassiness أو Hyperhydration أو Glauciness أو Translucency أو Vitresence): تُشير كافة المُصطلحات السابقة الى التشوهات التكوينية نتيجة تصلب السوائل داخل الزروعات دون حصول بلورات وبتركيب جزيئي عشوائي ولكنها ذات خواص فيزيائية وميكانيكية تشبه الأجسام الصلبة. وتُعرف الظاهرة ايضاً بانه عدم التنظيم في الخصائص المورفولوجية والفسلجية والايضية والتي تؤثر سلباً في النباتات المزروعة نسيجياً. تحصل الظاهرة فقط في مرحلة تضاعف الأفرع ولا تحصل إطلاقاً في مرحلة التجذير. بالإضافة الى التشوهات التركيبية والوظيفية التي تبدو على الأفرع والنُبيتات النامية داخل أنابيب الإختبار، فهي ذات سلاميات سميكة، زجاجية المظهر ومليئة بالماء لكنها تبدو صلبة وتتأثر الأوراق مُباشرةً بتلك التشوهات. تُظهر النموات المُزججة نمواً ضعيفاً وذات بُقع وتموت اخيراً. تتحول النموات التي يظهر عليها التزجج الى كالس بعد مرتين أو ثلاث مرات من تقطيعها وزراعتها في وسط صلب. إضافة الى صعوبة تجذير تلك الأفرع سواء داخل أنابيب الإختبار أو في أوساط زراعية خارج الأنابيب. لوحظ ايضاً إنخفاض نسبة النُبيتات الناتجة من الأفرع المُزججة التي تنجو خلال الأقلمة. تُستبعد الأفرع المُزججة خلال عملية التضاعف ولكن لوحظ في بعض أنواع الصنوبريات مُعدلات تضاعف عالية في الأفرع المُزججة. وفي هذا الخصوص، سُجلت زروعات لأجزاء نباتية مفصولة من أشجار التنوب (*Picea abies*) المُزججة مُعدلات تضاعف أكثر بمُقدار عشرة أضعاف الأفرع غير المُزججة مما يستوجب الأمر دراسة الحالة وإمكانية نقلها الى الأنواع الاخرى.

أسباب التزجج: تُعد الطبيعة الفيزيائية والكيميائية للوسط الزرعي والبيئة المُحيطة بالزروعات مسؤولة عن تلك الظاهرة. يُسبب الوسط السائل في حدوث الظاهرة أكثر بكثير من الوسط الصلب، وتتأثر درجة التزجج في الحالة الأخيرة في تركيز ونوع العامل المُصلب إذ تقل الظاهرة مع زيادة تركيز المادة المُصلبة. تظهر

الحالة بشكل أكبر عند إستبدال الأكار بالجيلرايت أو الفايتجيل حيث تزداد ظاهرة التزجج عند تصليب الوسط الزرعي بالمُصلبين الاخيرين. تتعرض الزروعات الى ظاهرة التزجج بشكل أوسع عندما يكون الوسط غنياً بالأملاح المعدنية مثل وسط MS. تزداد لجننة (Lignification) ويقل التزجج عند تقليل آيونات الامونيوم في الوسط الغذائي وهذا ما تم ملاحظته في زروعات الصفصاف، الإجاص، ورد البوري وأنواع الصبيريات. تؤدي الإضافة التدريجية لآيونات الكالسيوم في تقليل التزجج في زروعات النباتات العشبية والخشبية. وِجِد في حالات مُعينة بأن التراكيز العالية من السايتوكاينين تُشجع على حصول ظاهرة التزجج. فعلى سبيل المثال، تزداد الظاهرة عند نقل نُبيتات التفاح من وسط صلب الى سائل يحتوي على BAP وعند حذف هذا السايتوكاينين من الوسط السائل ترجع النموات المُزججة الى نموات إعتيادية. طُبقت الحالة الأخيرة ايضاً على زروعات من الصنوبريات والقرنفل وتم تقليل التزجج لحد كبير من خلال تقليل مُستويات السايتوكاينين، علماً بأن الكاينتين أقل تاثيراً في ظهور ظاهرة التزجج من BAP. يؤثر حجم أوعية الزراعة ونوع الغطاء والظروف المناخية لغرفة حضن الزروعات في حصول ظاهرة التزجج وخاصة زيادة مُعدلات الرطوبة النسبية في أوعية الزراعة أو داخل غرفة الحضن. يُفضل تغطية عبوات الزراعة بالقطن والذي يسمح بالتهوية الجيدة للزروعات وليس الأغطية البلاستيكية مُحكمة الغلق التي لا تسمح بالتبادل الغازي ما لم تُستبدل بأنواع تسمح بالتهوية مصنوعة من أغشية لا تسمح بدخول المُسببات المرضية. تُتبع طريقة رخيصة في بعض المُختبرات الإنتاجية حيث تُثقب الأغطية البلاستيكية وتُغلق الفتحة بالقطن.

التدابير الوقائية لمنع التزجج: يتم تقليل الرطوبة النسبية حول الزروعات داخل أوعية الزراعة من خلال إتباع الإجراءات التالية: (1) زيادة تركيز مادة الأكار أو أي مادة مُصلبة تُضاف الى الوسط. (2) تحسين تهوية الزروعات. (3) تبطين سطح الوسط بمادة البارافلم. (4) إستعمال مواد ماصة للرطوبة مثل $CaSO_4$ أو هلام السليكا (Silica gel). (5) تبريد قواعد أوعية الزروعات. (6) تقليل تركيز السايتوكاينينات في الوسط. (7) تقليل مُستويات NH_4^+. (8) تخفيف وسط MS أو إحلاله بوسط Heller's. (9) إضافة بعض المواد مثل Phlorizin أو Phloroglucinol أو $CoCl_2$ الى الوسط الغذائي.

ظهور نباتات شاذة (Off-type): يُعد من المُحددات المعروفة لتقانة الإكثار الدقيق. تتحفز التشوهات (Abnormalities) في الزراعة النسيجية نتيجة الإختيار غير الصحيح للجزء النباتي، مُكونات الوسط وخاصةً نوع وتركيز مُنظمات النمو النباتية، مُدة بقاء الزروعات داخل أوعية الزراعة، درجة تمايز النسيج النباتي عند زراعته، والهيئة الوراثية للمادة النباتية المُستعملة. عموماً، الإكثار الذي يتضمن المرور بمرحلة الكالس يُحفز على حصول التشوهات ولذلك يتم تجنب هذه المرحلة جهد الإمكان وإذا كان لابُد من المرور

فيها فعندئذٍ تُقلل الى الحد الأدنى. قد تحصل التشوهات عند التمايز المُباشر من البراعم العرضية أو الأجنة الجسمية خاصة إذا كان مصدر الأجزاء النباتية نباتات كايميرية. تظهر حالات من التشوهات مصدرها أجنة من البراعم الابطية والتي تحصل بسبب تطور نموات عرضية منها. يُسبب نوع مُنظمات النمو المُضافة وتركيزها وخاصة عند إكثار نباتات عشبية تمتلك صفة الحداثة. سُجلت بعض الأنواع النباتية نسب مُرتفعة من التشوهات مثل نخيل الزيت (Oil palm) وخصوصاً حصول ظاهرة الإستئناث (Feminization). تحصل الظاهرة الأخيرة عند تطور الأسدية في مراحل نموها الاولى (Staminoides) في النباتات الإنثوية الى غطاء من الكرابل حول الثمار مما يُسبب في تكوين ثمار مُشوهة أو عقم كلي أو جزئي إعتماداً على مدى التشوه الذي يحصل. تحصل وفي حالات اخرى، أن تتطور أسدية الأزهار الذكرية الى كرابل كاذبة. تحصل تلك الحالات في الغالب عند إكثار النبات من الأجنة الجسمية، ويؤثر عمر الكالس وطبيعته في درجة حصول التشوهات.

ظهرت حالات من التشوهات الشديدة عند الإخلاف من أنسجة كالس سريعة النمو بينما كانت مُنخفضة في النباتات التي أُخلفت من كالس بطئ النمو. يُعد نبات الموز مثالاً آخر في ظهور نباتات مُشوهة تراوحت نسبتها من 3 الى 25% عند الإكثار الدقيق وخاصة ظهور أنواع قزمية ذات ثمار قصيرة غير مرغوبة. لذلك يُفترض في مُنتجي النباتات بالإكثار الدقيق لأغراض تجارية التأكد بأن النباتات الناتجة مطابقة وراثياً للنباتات الام وبوقت مبكر إذ تستغرق الأشجار عموماً سنوات لملاحظة نوع إثمارها فيما إذا أُعتمدت الصفات المظهرية في الكشف عن التشوهات. لابُد والحالة هذه من إجراء إختبارات على النباتات التي يتم إكثارها نسيجياً مثل الإختبارات السايتولوجية والجزيئية في مراحل مُبكرة من عمر الشتلات وقبل تسويقها أو زراعتها في المكان المُستديم.

التلوث Contamination

يُعد التلوث من أكثر المشاكل خطورةً في الإكثار الدقيق التجاري حيث يُسبب في كوارث للمُنتجين وخاصة عند ظهوره في مراحل مُتأخرة من مراحل الإنتاج. يُعتقد من النادر جداً وجود مزارع نسيجية خالية تماماً من المُسببات المرضية. يحصل التلوث في الزروعات بسبب واحد أو أكثر من العوامل التالية؛ (1) بقاء أنواع من البكتريا بطيئة النمو مُرافقة للجزء النباتي لتنمو ببطأ مع مرور الوقت. (2) وجود الأبواغ الفطرية وبغزارة في الهواء وقد تُنتقل الى الزروعات من العاملين أو من نواقل لها مثل الحلم والثربس. لذا يجب توفير ظروف قياسية من النظافة والتعقيم في منطقة تعقيم ونقل الزروعات. يتم التخلص من أبواغ

الفطريات في جو المُختبر بالتبخير بمادة الفورمالديهايد (حذرت قسم من الدول من أستعمالها) أو المُبيدات الفطرية مثل Thiobendazole. يُمكن السيطرة على ثربس كاليفورنيا بالمُعاملة يومياً أو مرتين باليوم بمُبيد Baygon™ أو بمُبيد Dichloorvos تركيز 10% بفترات زمنية كل خمسة أيام.

الإسمرار التأكسدي Oxidative browning

تظهر حالة الإسمرار التاكسدي غالباً عند زراعة أنسجة ناضجة من الأنواع الخشبية وينتقل الإسمرار أو الإسوداد من الجزء النباتي الى الوسط الغذائي. تتسرب المُركبات الفينولية عند قطع الجزء النباتي من الأنسجة المجروحة لتتأكسد وتنتج الكوينينات (Quinones) المُسببة في تغيير لون النسيج النباتي والوسط. تُسمم نواتج أكسدة الفينولات الأنسجة النباتية ومُسببةً نخر الأنسجة (Necrosis) وأخيراً موت الجزء النباتي أو الكالس. تُستعمل العديد من الوسائل لتجاوز المشكلة منها؛ (1) نقل الزروعات الى وسط جديد حال ظهور الإسمرار وقد يستوجب الأمر أكثر من نقلة وبفترات زمنية قصيرة حيث تكون قد فقدت الأجزاء النباتية فينولاتها وتُعد هذه الوسيلة ناجحة وبسيطة في إجراءاتها في التخلص من الإسمرار. (2) حضن الزروعات في الظلام حيث تقليل فعالية الإنزيمات المؤكسدة للفينولات. (3) إضافة مُضادات الأكسدة الى الوسط الغذائي مثل Cysteine.HCl بمقدار 100 ملغم/لتر، حامض الأسكوربك بمقدار 50-100 ملغم/لتر أو حامض الستريك بمقدار 150 ملغم/لتر. يُمكن كذلك غمر الأجزاء النباتية لمدة 24 ساعة في محلول مُضادات الأكسدة قبل زراعتها. (4) إضافة الفحم المُنشط (Activated charcoal) الى الوسط الغذائي والذي يُساهم في إمدصاص (Adsorption) نواتج الأكسدة وكذلك من الكار المُتعدد (Polycar, AT) أو الفينيل بايروليدون المُتعدد (Polyvinylpyrrolidon, PVP) ذاتا التأثير المُشابه للفحم المُنشط. ويُمكن مراجعة فصل زراعة أنسجة النبات للإطلاع على ذلك بالتفصيل.

عدم إستجابة الأجزاء النباتية المفصولة من الأشجار الناضجة للإكثار الدقيق: يُطلق على هذه الظاهرة Recalcitrance of adult-trees. طُورت أثناء السنوات الأخيرة العديد من الوسائل للإكثار السلالي ولأنواع أشجار مُتعددة وعلى نطاق تجاري. يشمل ذلك أشجار الزينة مثل نبات الوردية (الرودودندرن) والكرز، ولأشجار فاكهة مثل التفاح والكمثرى وأشجار تُزرع في مساحات كبيرة مثل نخيل الزيت ونخيل التمر، أشجار تُزرع لأجل أخشابها الصلبة مثل القوغ، الصفصاف، اليوكالبتوس، وغيرها من أشجار الغابات. أُستعمل الإكثار الدقيق بإستعمال الأجنة الجسمية في العديد من الأنواع الخشبية ولكن في الغالب تستجيب تلك الأشجار للإكثار الدقيق من الأجنة الجسمية ومن الأجزاء النباتية المفصولة من البادرات.

والعديد من الأشجار لا تستجب للإكثار الدقيق من البراعم الابطية ما لم تكن مفصولة من أشجار فتية لا تزال في طور الحداثة ومن الصعوبة تقييم الصفات المرغوبة فيها لأنها تستغرق وقت طويل وتكون قد دخلت مرحلة النضج التام أو الشيخوخة ولا تستجب أجزائها النباتية للإكثار الدقيق. ولتجاوز تلك المشكلة، تُتبع الوسائل التالية؛ (1) إختيار الأنسجة الأكثر حداثةً مثل نموات الموسم الحالي والتفرعات من قاعدة الساق (Basal sprouts). (2) إعادة حداثة (Rejuvenation) أجزاء من الشجرة وفصل الأجزاء النباتية منها وزراعتها من خلال مُعاملات خاصة كالرش بالسايتوكاينينات أو تظليم (Etiolation) أي حجب الضوء عن أفرع مُحددة قبل فصل الأجزاء النباتية الطرفية منها.

الكلفة المرتفعة للإكثار الدقيق: بالرغم من الإنتاج الواسع وفي نطاق تجاري للكثير من الأنواع النباتية خاصة النباتات البستنية، إلا إنها تُعد أكثر كُلفةً من وسائل الإكثار المعروفة الاخرى كالعُقل والبذور. الإحتياج الى أيدي عاملة مُدربة هو السبب الآخر في رفع سعر النباتات المُكثرة نسيجياً. تُشكل كلفة إجور العمل ما نسبته 60-70% من كُلفة الإنتاج في الدول المُتقدمة ولذلك تلجأ الشركات الى مكننة الإنتاج وإستعمال المفاعلات الحيوية ومُحاولة دمج أكثر من مرحلة إكثار بمرحلة واحدة. يُشكل الإكثار الدقيق بالأجنة الجسمية أكثر الأنظمة إستجابةً للمكننة بعد تغليفها وإستعمالها كبذور تركيبية. سعت الدول المُتقدمة الى تقليل سعر الشتلة الواحدة المُنتجة نسيجياً من خلال إستثمار الايدي العاملة الرخيصة في الدول الفقيرة وإنشاء شركات برؤوس أموال من الدول المُتقدمة في تلك البلدان مما قلل من الكُلفة الكلية للشتلات المُنتجة. شجع ذلك الدول الفقيرة في إستثمار التقانات الحديثة وظهور مُستثمرين من تلك الدول أصبحوا مُنافسين للدول المُتقدمة في أسعار الشتلات المطروحة للبيع في الأسواق المحلية والعالمية وخاصة في الهند.

الفصل: الثالث: زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات

Plant Cell, Tissue and Organs Culture

مقدمة Introduction

يُشير مصطلح زراعة أنسجة النبات عموماً الى زراعة النباتات، البذور، أجزاء النبات المُختلفة من أعضاء، أنسجة، أجنة، خلايا مُفردة وبروتوبلاستات خارج الجسم الحي في أوساط غذائية وتحت ظروف خالية من الملوثات وليس في البيئة الطبيعية لها. تتميز خلايا النبات مقارنةً بخلايا الحيوان بقابليتها على الإحتفاظ بالمعلومات الوراثية في المُستوى الخلوي لتتمكن من إعادة إخلافها الى نبات كامل عند توفر الظروف المُناسبة وهذا ما يُطلق عليه بالقدرة الكامنة للخلايا لتنظيم تلك العملية المُعقدة (Totipotency). وبذلك فالخلية النباتية لها الإمكانية بأن تتحول من الحالة المرستيمية الى التخصصية وبالتالي إخلاف نبات كامل في الغالب مُطابقاً للنبات الام.

فوائد زراعة أنسجة النبات Advantages of plant tissue culture

سوف نطلق هنا مصطلح زراعة أنسجة النبات مجازاً ليشتمل زراعة أي جزء من النبات إبتداءاً من الخلية المُفردة والبروتوبلاست مروراً بأنسجة الكالس والمُعلق الخلوي وإنتهاءاً بأعضاء النبات والأجنة وحتى البذور إذا مازرعت داخل أوعية الزراعة المُعقمة، لكي يكون القاريء على بينة بأن المقصود ليس زراعة نسيج نباتي حصراً. أجمع مُختصو التقانة الأحيائية بأن مجال زراعة الأنسجة النباتية هو الأكثر سرعةً في التطور مقارنةً مع مجالات التقانات الأحيائية الأُخرى بالنظر لكثرة نتاجاته التي يتداولها الناس حالياً وصنع ثورة خضراء بعد تحسين النبات كماً ونوعاً. وسعت المعارف التي جناها مُختصو التقانة الاحيائية من زراعة أنسجة النبات مداركهم في مجالات شتى منها الايض، النمو، التمايز والتشكل في الخلايا النباتية. إضافةً الى إنتاج نباتات خالية من المُسببات المرضية وإستثمار التقانة في إنتاج أو تصنيع مئات المركبات المُهمة بايولوجياً. جذب ذلك وبلاشك الصناعيين وخاصة في مجال الصناعة الدوائية والمهتمين في تحسين النبات والأحياء الجزيئي.

تطبيقات زراعة أنسجة النبات Applications of plant tissue culture

أصبح لزراعة أنسجة النبات تطبيقات واسعة في حياة الإنسان أهمها:

1- الاكثار السلالي الواسع للنباتات تحت ظروف مُسيطر عليها وبأعداد محسوبة لحد ما وفي حيز صغير.

2- إنتاج المواد الصيدلانية والصناعية المُهمة طبياً وصناعياً.

3- دراسة ايض النبات من تركيب ضوئي وتنفس وغيرها.

4- تقويم وظيفة الأعضاء في النبات.

5- دراسة أمراض النبات والحد منها.

6- عزل الخلايا المُفردة وإستثمارها في هندسة الخلية وراثياً، ودراستها مورفولوجيا ووراثياً وعلاقتها بالأمراض النباتية.

7- إستعمال الأجنة خاصةً الناتجة من إستعمال المُفاعلات الحيوية في الإكثار السلالي الواسع.

8- حفظ المصادر الوراثية وخاصة المُهددة بالإنقراض منها.

9- تشجيع وإستثمار التغايرات الوراثية وإنتخاب المُفيد منها.

10- إنتاج نباتات نقية وراثياً والإستفادة منها في برامج تحسين النبات.

11- سهولة تحفيز التطفير وإنتخاب الطوافر المُفيدة.

12- إنتاج الهُجن وخاصة في التضريبات التي يحصل فيها عدم توافق.

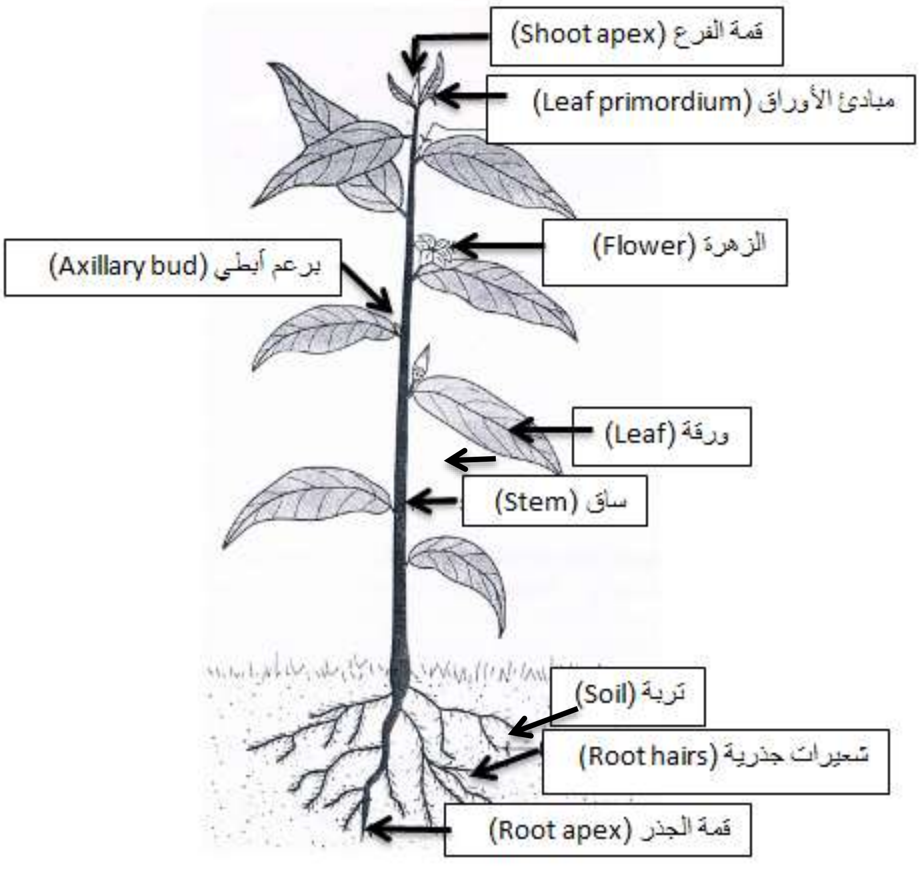
يتكون النبات أساساً من ساق وجذر وكلاهما له تفرعاته (شكل 3.1) ومناطق طرفية للنمو مُكونةً من خلايا مرستيمية تكون مصدراً لكافة أنواع الخلايا الأُخرى. يحصل نمو ونشوء النبات بطريقتين، الاولى نمو محدود (Determinate growth) حيث يتوقف نمو النبات عند وصول أجزاء النبات لحجم وشكل معينين مثل الأوراق، الأزهار، الثمار. الثانية، نمو غير محدود (Indeterminate growth) والذي يشير الى إستمرارية نمو الساق والجذر تحت ظروف النمو المُناسبة لوجود الخلايا المرستيمية بشكل دائم مما يجعل النبات يستمر في الإنقسام. ولابُد من الإشارة هنا الى ضرورة قراءة وفهم المصطلحات المُتداولة في موضوع زراعة أنسجة النبات الواردة في نهاية الكتاب.

أنواع مزارع أنسجة النبات Types of plant tissue cultures

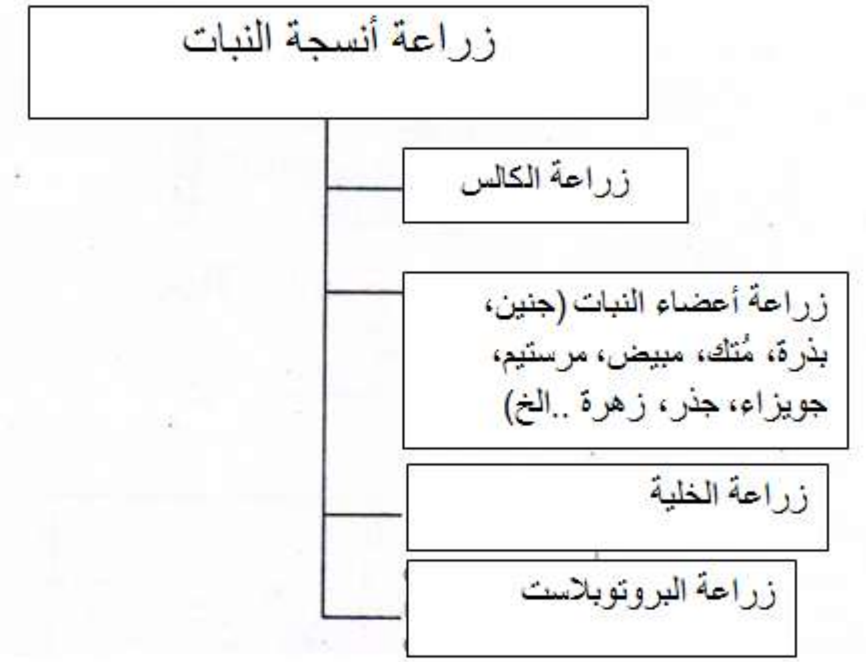
توجد تقانات مُختلفة لزراعة النبات نسيجياً (شكل 3.2) مبنية أساساً على الجزء النباتي الذي سيزرع وكما يلي:

مزارع الكالس (Callus culture): ويشتمل زراعة نسيج مُتخصص (مُتمايز Differentiated) لجزء نباتي (Explant) والذي يفقد تمايزه (Dedifferentiated) خارج الجسم الحي (*In vitro*) ليكون كتلة من الخلايا تُسمى الكالس.

زراعة العضو غير المُتخصص (Unorganized organ culture): ويشتمل عزل خلايا أو أنسجة أو جزء من عضو وزراعتها خارج الجسم الحي لتكون كالس. بعد تفريق الأخير الى كتل صغيرة من الخلايا أو الى خلايا مُفردة داخل وسط سائل، ليتحول الى مُعلق خلوي (Cell suspension).



شكل 3.1. رسم توضيحي لأجزاء النبات.



شكل 3.2. التقانات المُختلفة لزراعة أنسجة وأعضاء النبات.

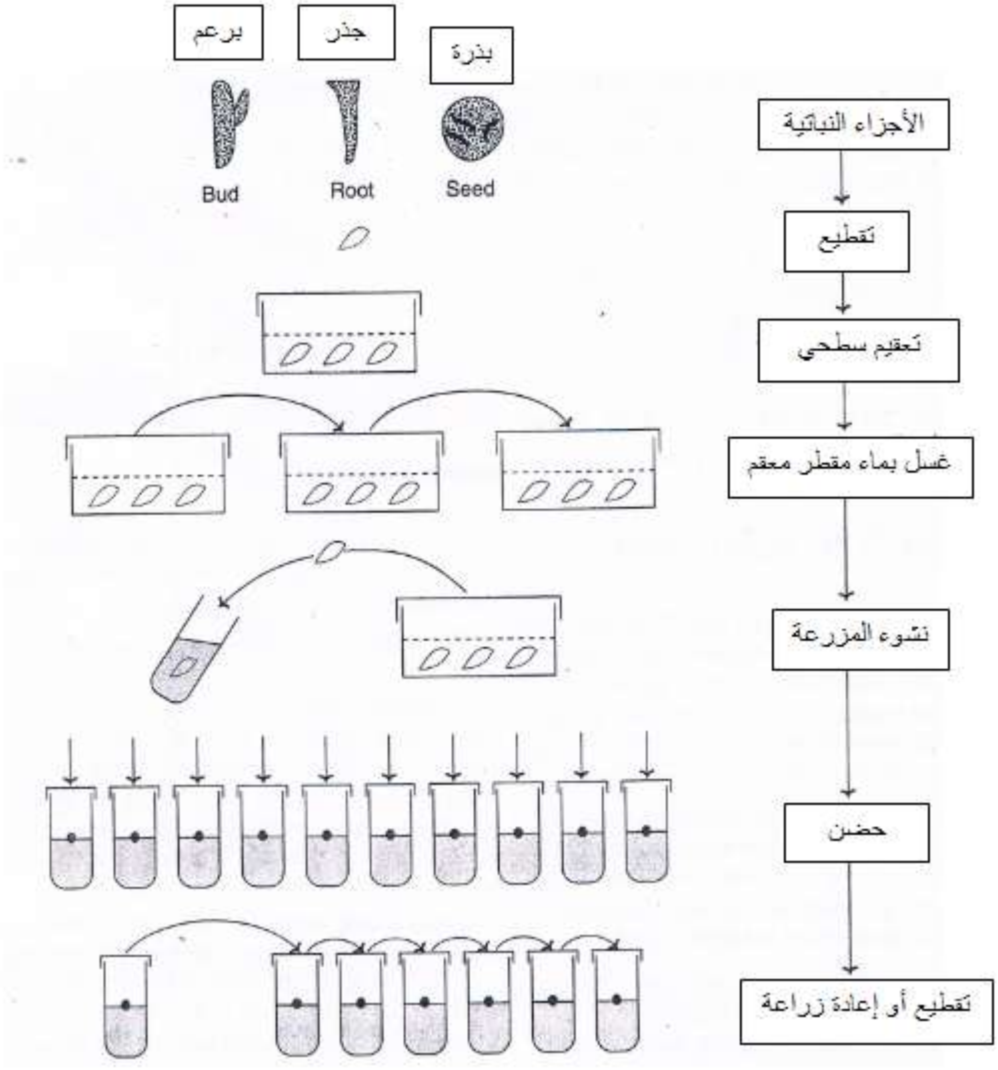
زراعة الخلية (Cell culture): ويشتمل على زراعة خلايا مُفردة يتم الحصول عليها من نسيج جزء نباتي أو كالس والتي غالباً ما تُنتج في مزارع المُعلقات الخلوية وتزرع في حالات أُخرى بطريقة المزرعة الحاضنة (Nurse culture) كما سيرد لاحقاً.

زراعة البروتوبلاست (Protoplast culture): بروتوبلاست النبات عبارة عن خلية عارية من الجدار الخلوي (راجع الفصل المتعلق بالبروتوبلاست).

أساسيات تقانة زراعة أنسجة النبات Principles of plant tissue culture techniques

يُوضح شكل 3.3 الطريقة العامة لفصل وزراعة الأنسجة النباتية حيث يُفصل الجزء النباتي ويخضع الى التعقيم السطحي بأحد المُطهرات المعروفة ويُشطف بماء مقطر ومعقم عدة مرات. تُزرع الأجزاء الأجزاء على وسط غذائي مُناسب سواء مُصلب بالآجار، نصف صلب أو سائل وتحضن تحت ظروف مُناسبة. يُقسم الكالس الأولي بعد نشوءه في منطقة القطع الى أجزاء أصغر (Subculture) أو ينقل بالكامل على وسط جديد (Reculture) بهدف إكثاره. تُستثمر المزارع النسيجية لأغراض مُختلفة كما سيرد لاحقاً. الموضوع الأهم في زراعة أنسجة النبات ان تتم العمليات تحت ظروف تعقيم تامة حيث تُشكل البكتريا والفطريات

النسبة الأعلى في التلوث وبمعدلات نمو سريعة وتقتل الجزء النباتي وتتلف مُكونات الوسط خاصةً عند إفرازها لمواد سامة.



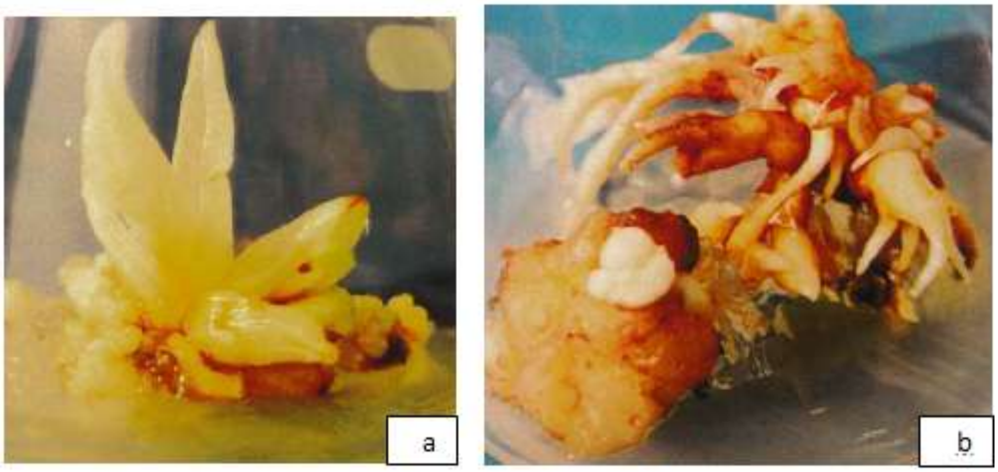
شكل 3.3. مُخطط للطريقة العامة في إكثار النبات نسيجياً.

مزارع الكالس Callus cultures

الكالس كتلة من الخلايا غير المُتخصصة وغير المُنتظمة وتلك الكتلة أساساً عبارة عن نسيج ورمي (Tumor) يتكون على جروح الأنسجة والأعضاء المُتمايزة. خلايا الكالس برنكيمية في طبيعتها وليست مُتجانسة تماماً إذ يلاحظ عند الفحص المجهري وجود كمية قليلة من الأنسجة المُتمايزة بجوار الحجم الكبير

من الأنسجة غير المُتمايزة. يُمكن مُلاحظة أنسجة كالس وقد تكونت على أنسجة نباتات غير مزروعة نسيجياً وخاصة عند قطع وزراعة عُقل النبات في التربة حيث ينشأ الكالس أولاً من مناطق قطع العقلة أو الجذر.

الأجزاء المُستعملة في نشوء مزارع الكالس: تكون مادة الشروع (الأجزاء النباتية) في نشوء مزارع الكالس مكونة من أنسجة مُتمايزة مفصولة من أي جزء من النبات (جذر، ساق، ورقة، ورقة حرشفية كما موضح في شكل 3.4، متك، زهرة وغيرها). يحتوي الجزء النباتي في الغالب على أنسجة بمراحل مُختلفة من الإنقسام الخلوي والتهيئة للتخصص لأعضاء ذات وظائف مُتنوعة فإذا ما إحتوى الجزء النباتي على خلايا مرستيمية، عندئذٍ تكون مُعدلات إنقسام الخلايا وتضاعفها سريعة. لذلك يمكن إختيار القمة النامية كمصدر لنشوء الكالس والإستفادة منه لأغراض مُختلفة أو إكثار النبات خضرياً بالطريقة غير المُباشرة أي إخلاف الكالس الى أفرع ونبيتات (شكل3.5).

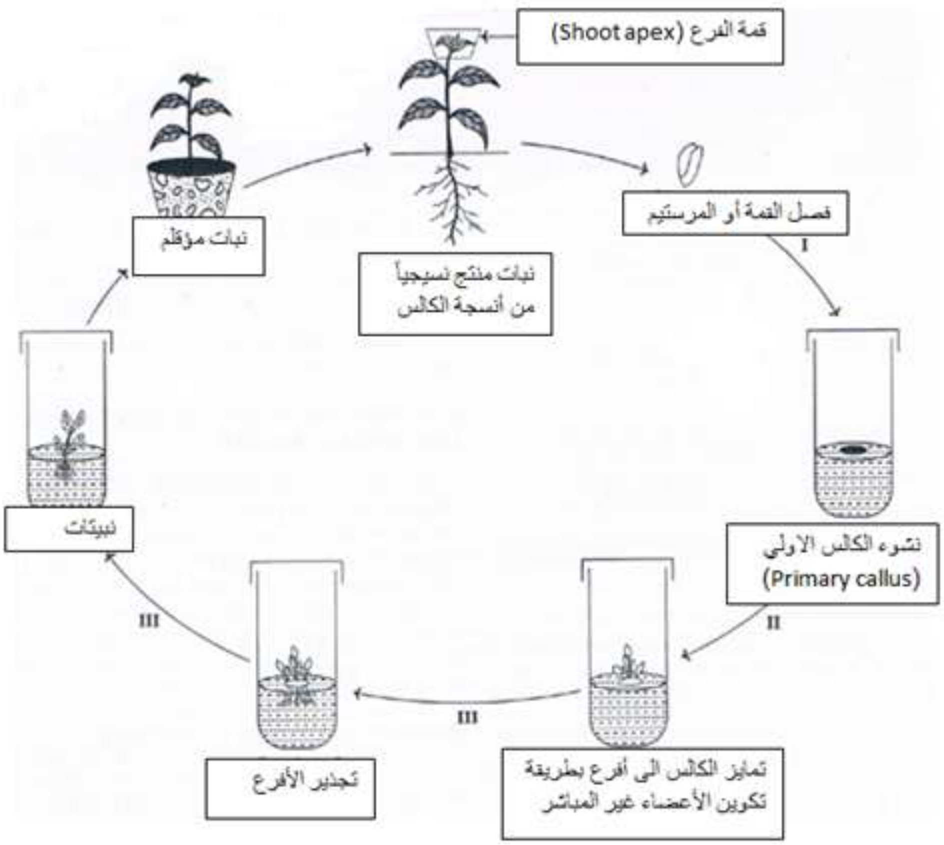


شكل 3.4.(a) نشوء الكالس وتمايز الجذور من كالس ناشئ من حُرشفة بصلة مفصولة من نبات الزعفران (*Crocus sativus*)؛ (b) ظهور براعم ونموات مُتعددة من الأوراق الحُرشفية المزروعة.

تحفيز نشوء الكالس Callus induction

من المُعتاد في أغلب التجارب أن تكون الخطوة الاولى هي إستحثات الكالس للنشوء من الجزء النباتي الذي سبق وان تم إختياره أو من بادرات بذور قد عُقمت وزُرعت في الوسط الغذائي المُناسب. ويجب الأخذ بنظر الإعتبار ليست كل خلايا النبات مؤهلة (Competent) لأن تكون كالساً بل غالباً ما تكون الخلايا المرستيمية بإستطاعتها تكوين تراكيب مُنتظمة ومن ثم نبات كامل. بينما الخلايا الأُخرى غير المؤهلة ولا تُعبر عن وجود طاقتها الكامنة (Totipotency) فتفشل في الإخلاف وتكوين نبات كامل. يُمكن فحص

وإنتخاب الخلايا تحت مجهر القطع (Visual selection under dissecting microscope) مرة كل إسبوع وتُسجل الملاحظات. ينشأ الكالس من مناطق مُختلفة على الجزء النباتي مثل أنسجة كامبيوم الجذور وقد تظهر العديد من الأجنة الجسمية مُباشرة مُحيطة بالبذرة عند زراعتها كجزء نباتي. تحصل العديد من النشاطات غير المرئية بالعين المُجردة أثناء نشوء الكالس ولاتظهر الا بعد حوالي ستة أسابيع ككُتلة من نسيج الكالس ويُمكن تحديد أنواع الخلايا تحت المجهر الضوئي.

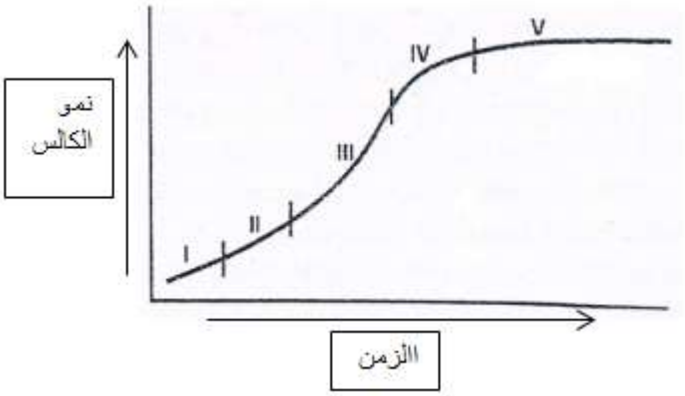


شكل 3.5. إنتاج نباتات بطريقة تكوين الأعضاء غير المُباشرة من أطراف الأفرع مروراً بالكالس.

تُحفز مزارع الكالس في النشوء من خلايا المُعلق الخلوي خاصةً في الدراسات المُتعلقة بالأجنة الجسمية، مُنحنيات نمو الكالس، تجارب الإنتخاب مثل تحمل الإجهادات، عزل الخطوط الخلوية النقية ذات الصبغات وغيرها. تحتوي مزارع الكالس خليط من الخلايا غير المُتجانسة في الحجم، الشكل، العمليات الايضية، العدد الكروموسومي وغير ذلك. يظهر قسم من الخلايا حاملاً صبغات بالوان مُختلفة مما يُسهل من عزلها وإنتقاء خطوط خلايا ذات لون واحد. تحتوي احياناً تلك الخطوط على مواد ايض ثانوية مُفيدة. تؤثر مستويات

الهرمونات الداخلية (Endogenous hormones) وخاصية النقل القطبي للهرمون داخل الجزء النباتي في تحفيز نشوء الكالس على ذلك الجزء. لعل من أهم العوامل المؤثرة في نشوء الكالس والتي دُرِست بشكل مُستفيض، تراكيز مُنظمات النمو المُجهزة الى الوسط والتي تختلف بإختلاف النوع النباتي ونوع الجزء النباتي. الظروف البيئية والتغذوية هي الأُخرى لها دوراً مهماً في نشوء الكالس في الزروعات النسيجية.

مُنحنى نمو الكالس: تُشابه أنسجة الكالس في نموها الكائنات المجهرية أُحادية الخلية. يتخذ مُنحنى نمو الكالس شكل حرف S أو ما يُسمى بالمُنحنى السيني Sigmoid (شكل 3.6) ويمر نمو الكالس بخمس مراحل (لاحظ مراحل نمو المُعلقات الخلوية للتفاصيل).



شكل 3.6. مُنحنى نمو الكالس بمراحله الخمس. Lag phase(I)، Log phase (II)، Linear phase (III)، (IV Decelerating phase)، Stationary phase (V).

تختلف سلوكية تركيب وبايوكيميائية خلايا الكالس عند مرورها في مراحل النمو الخمسة إذ هناك خلايا مُتباينة في ملامحها المظهرية والفسلجية في كل مرحلة. تؤثر مُكونات الوسط في مدة بقاء الكالس في مرحلةٍ ما لذلك من الضروري التعامل مع مزارع كالس بمرحلة تطورية مُحددة. بينت الدراسات المُتعلقة بفحص الهيئة الكروموسومية (Karyotyping) لخلايا الكالس دخول أغلب الخلايا في الطور الإستوائي خلال المرحلة الأُسية من نمو الخلايا حيث سرعة الإنقساملا وزيادة كمية الكالس. تُنقل خلايا الكالس الى وسط جديد في نهاية المرحلة الخطية وقبل دخولها في مرحلة التناقص (Decelerating) مع ملاحظة نقل الكالس الذي يبدو بصحة جيدة وإستبعاد الكتل التي يظهر عليها الأسمرار. تُفضل مزارع الكالس بطيئة النمو ذات اللون الأبيض غير الشفاف لأغراض الإخلاف وإستبعاد كتل الكالس الخضراء والسريعة النمو لكونها لاتتمايز الى أعضاء. يجب تحديد مرحلة نمو الكالس التي تُعطي أكبر كمية من مُركبات الايض الثانوي أو

المُركب المطلوب والتي غالباً ما تكون مرحلة توقف النمو نتيجة إستنفاذ مُغذيات الوسط، تصلب الاكار، تراكم مركبات وسطية سامة وإستنفاد CO_2 من داخل كتل الكالس. يستوجب تحديد مُنحنى نمو الكالس، التضحية بمُكررات من المزارع وعلى فترات زمنية مُنتظمة وتسجيل أوزان الكالس الرطب والجاف بعد إزالة بقايا الآجار. يُمكن عد الخلايا بعد معاملتها باوكسيد الكروميوم الثلاثي (Chromium trioxide) تركيز 4% على درجة حرارة 70 °م لفترة 2-15 دقيقة بعد خلط المزيج وحساب عدد الخلايا بإستعمال شريحة قياس عدد خلايا الدم الهيموسايتوميتر. بينما يُحدد مُنحنى نمو المُعلق الخلوي بسحب 5-10 مل وتوضع في أنابيب إختبار مُدرجة ليتم طردها مركزياً وتسجيل حجم الخلايا المضغوط وكما سيرد لاحقاً.

أساسيات زراعة الكالس Principles of callus culture

من أجل نجاح تحفيز الكالس على النشوء وبنجاح من الضروري مراعاة مايلي؛ تحضير جزء نباتي مُعقماً سطحياً وجاهزاً للزراعة، إنتخاب الوسط المُناسب والتوليفة المُناسبة من مُنظمات النمو، حضن الزروعات تحت ظرووف مُسيطر عليها من ضوء وحرارة ورطوبة وغيرها. تُفضل الأجزاء النباتية وهي في طور الحداثة وتلك المفصولة من البادرات والنموات الخضرية الحديثة والبراعم. تستجيب أنواع أُخرى مُختلفة من الأجزاء النباتية لنشوء الكالس مثل أطراف الجذور، نسيج اللحاء، الأجنة المتطورة، أجزاء الزهرة والورقة، الثمار، الدرنات، الأبصال وغيرها مع مُراعاة إستبعاد الخلايا المُلكننة (Lignified). تدخل خلايا الكالس في ثلاث مراحل تطورية؛ (أ) الإستحثاث (Induction)، (ب) إنقسام الخلايا (Cell division)، (ج) بدء التمايز (Differentiation).

تتحفز وتزداد عمليات الايض داخل الخلايا في المرحلة التطورية الاولى والتي يعتمد طولها على الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي، المُتطلبات التغذوية، المُحتوي الهرموني الداخلي وعلى النقل القطبي لمنظمات النمو، إضافةً للعوامل البيئية. ونتيجةً لزيادة معدلات ايض الخلية، يزداد تراكم الخلية من العوامل المشجعة على الإنقسام لتكون كتلة خلوية بأعداد كبيرة من الخلايا. تكون الخلايا السفلية في تماس مع الوسط والأعلى منها تتغذى من إنتشار المُغذيات من الخلايا الواقعة أسفلها. يبدأ تمايز الخلايا في المرحلة الثالثة عندما تبدأ مسالك حيوية معينة بالتعبير حيث بداية تراكم مواد الايض الثانوي. يظهر احياناً الكالس بالوان مُختلفة (أصفر، أخضر، أبيض) في هذه المرحلة مع عدم إستقرارية وراثية (Genetic instability) ينتج عنها تغايرات مظهرية قد تُعزى الى عوامل تطورية فوق وراثية (Epigenetic) أو وراثية. يُقسم الكالس (Subculture) بعد وصوله لحجم مُناسب لفترة قد تصل 21-28 يوماً وإذا كانت الكتلة صغيرة، يُعاد نقلها

الى وسط جديد (Reculture) لإتاحة الفرصة لها بالوصول الى حجم مُناسب. يُعاد زراعة الكالس عموماً على وسط جديد بفترة تتراوح من 3 الى 4 أسابيع بتقسيم قطع الكالس الى أوزان 250-500 ملغم.تحصل حالة من التطبع (Habituation) كنتيجة لإستمرار نمو الكالس في وسط الإدامة بوجود مُنظمات النمو حيث تتمكن قطع الكالس وبمرور الزمن من النمو في وسط خالٍ من المُنظمات وهذا ما يُطلق عليه بالتطبع الهرموني (Hormone habituation). ومن الصعب التمييز بين نوعي الكالس العادي والمُتطبع للنمو دون هرمونات عدا عدم قابلية الأخير للنمو من دونها. يُفيد ذلك بتقليل أو حذف كُلف مُنظمات النمو وتقليل خطوات العمل والتخلص من إحتمالية الخطأ في تحضير تراكيز المُنظمات وغيرها من الفوائد.

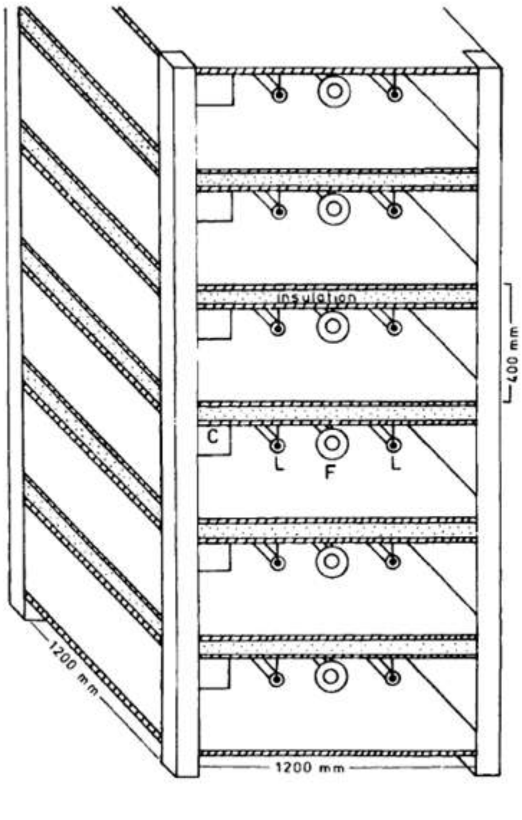
العوامل المؤثرة في مزارع الكالس Factors affecting callus cultures

تؤثر العديد من العوامل في نشوء الكالس عند زراعة الجزء النباتي نسيجياً تشمل مصدر الجزء النباتي، تركيبه الوراثي، مُكونات الوسط الغذائي، عوامل فيزيائية، عوامل النمو، إضافةً الى عمر النبات الأم، موقع الجزء المفصول على النبات الأُم، فسلجة وظروف نمو النبات وغيرها.

العوامل الفيزيائية: يتراوح مدى درجات الحرارة الملائمة لنشوء الكالس من 22-28°م ولذلك تُضبط أغلب مُختبرات الزراعة النسيجية درجة حرارة غرفة حضن الزروعات في 25°م. يفترض الإستفادة الكاملة من الظروف الجوية التي توفرها غرفة الحضن ولذلك صُممت المُختبرات التجارية رفوف توضع عليه الزروعات تصل الى حد السقف (شكل3.7).

يعتمد تأثير الضوء في نشوء الكالس وإدامته بدرجة كبيرة على النوع النباتي، فقسم يحتاج الى الضوء بشدة إضاءة (Light intensity) عالية تتعدى 3000 لوكس والقسم الآخر يُفضل الظلام. عموماً تُضبط غرف النمو على شدة الإضاءة أعلاه ولفترة إضاءة (Light period) لمدة 16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام. تُستعمل أنواع مُختلفة لمصادر الضوء في غرف النمو او الحاضنات أهمها فلورسنات تُعطي نفس الأطوال الموجية لضوء النهار (Day light fluorescents) وتُرتب بشكل يضمن توزيع الضوء على وحدة المساحة التي تكون مُستغلة بالزروعات (شكل 3.8).

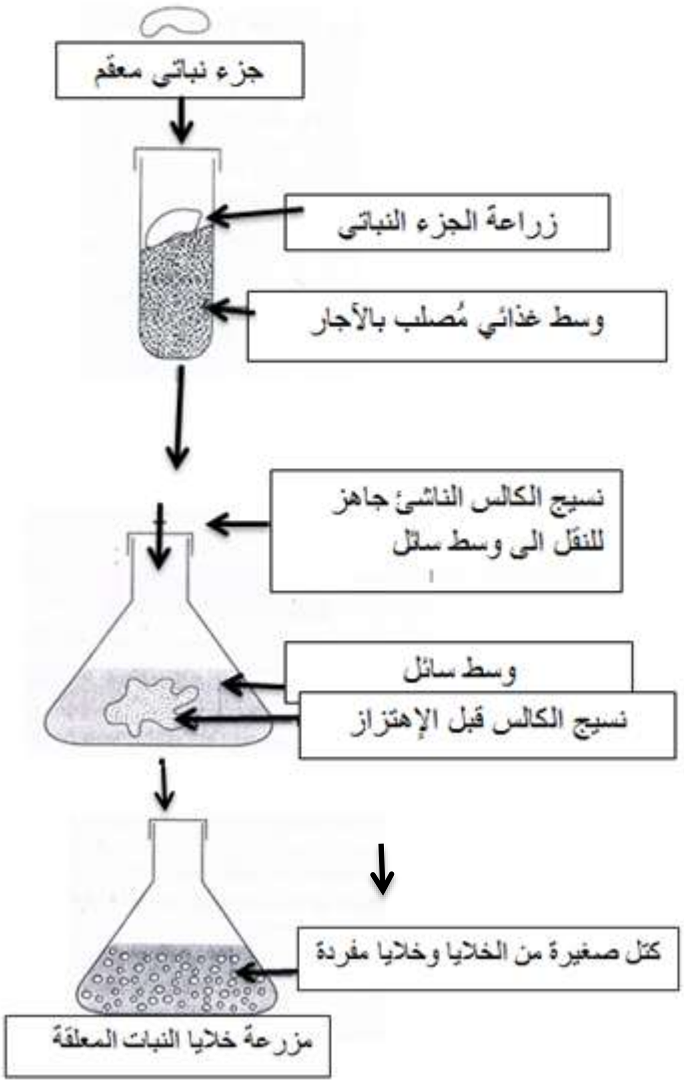
شكل 3.7. غرفة نمو أو حضن الزروعات ويلاحظ إستعمال نظام رفوف نحيفة ومُمتدة الى السقف الداخلي مما يضمن كفاءة عالية في إستخدام المكان وتوفير في كلفة الإنتاج.



شكل 3.8. نظام الإضاءة داخل حاضنات النمو ويُلاحظ بأن المسافة بين خط إضاءة وآخر تكون 40 سم وبطول 120 سم مع إستعمال عوازل في الرف الواحد وإستعمال مُفرغات (F) بمُنتصف مصادر الإضاءة (L) مع مفتاح سيطرة (C).

مُنظمات النمو: تؤثر ولحد كبير إضافة مُنظمات النمو الى الوسط الغذائي في إستحثات الكالس على النشوء. وإعتماداً على طبيعة الجزء النباتي وهيئته الوراثية ومُحتواه الداخلي من الهرمونات، يتطلب إحتياجه من مُنظمات النمو الى ثلاثة مجاميع؛ إما أوكسينات فقط، أو سايتوكاينينات فقط أو توليفة من الإثنان.

نشوء المُعلقات الخلوية من الكالس: تنشأ مزارع المُعلقات الخلوية بعد نقل كتل من الكالس الهش ذات القوام غير المتماسك (Friable callus) الى وسط غذائي سائل (شكل 3.9).



شكل 3.9. مخطط توضيحي يوضح زراعة الكالس ونشوء مزارع خلايا النبات المُعلقة.

تغطس قطع الكالس في الوسط السائل مما يخلق ظروف لاهوائية وقد تموت خلايا الكالس ما لم يتم خلطها غالباً بهزازات دائرية (Rotary shakers). تتفرق الخلايا وتتعرض الى ظروف تهوية جيدة نتيجة الإهتزاز.

تطبيقات مزارع أنسجة الكالس Applications of callus cultures

تكون مزارع الكالس بطيئة النمو في وسط مستقر (Static) مما يسمح بإجراء العديد من الدراسات المُتعلقة بالنمو، التمايز والايض وغيرها وكما مُبين أدناه:

1- دراسة الإحتياجات الغذائية للنبات من خلال دراستها على المُستوى الخلوي اولاً.

2- دراسة تمايز الخلايا والأعضاء والعمليات الفسيولجية والجزيئية المُرافقة لها.

3- نشوء مزارع المُعلقات الخلوية والبروتوبلاست والحصول على خلايا مُفردة.

4- التحري والإستفادة من التغايرات الجسمية الناتجة من الإخلاف غير المُباشر من الكالس.

5- سهلت خلايا الكالس كثيراً في إجراء التحولات الوراثية (Genetic transformation) لسهولة عزل الخلايا المُفردة منها وهندستها وراثياً.

6- وظِفَت مزارع الكالس في دراسة وإنتاج مركبات الايض الاولي والثانوي وتنظيمهما.

زراعة الخلية المُفردة Culture of a single cell

أصبح بالإمكان إنتاج نبات كامل من خلية نبات مُفردة بغض النظر عن مصدر الجزء النباتي الواهب للخلية، بمعنى آخر للخلية النباتية المُفردة القابلية على إنتاج نبات كامل (Totipotent) ومن المفترض ان يكون النبات الناتج مُشابهاً في مواصفاته للنبات الأُم لكونه إكثار سلالي. يُمكن إختصار تطبيقات زراعة الخلية المُفردة بالنقاط التالية:

1- التقصي عن المسالك الحيوية للايض الثانوي على المستوى الخلوي.

2- بالإمكان أن تكون الخلية المُفردة هدفاً سهلاً وجيداً للتطفير وإنتخاب الطوافر المُفيدة.

3- إنتاج مُركبات الايض الثانوي على المُستوى التجاري عند إستعمال المُفاعلات الحيوية.

4- إمكانية كبيرة على تحسين النبات من خلال الإنتخاب على المُستوى الخلوي وهندسة الخلية المُفردة وراثياً.

تقانات زراعة الخلية المُفردة: وتشتمل المجالات التالية:

1- عزل الخلايا المُفردة: يتم الحصول على خلايا مُفردة من زراعة أعضاء النبات أو من أنسجته المزروعة. (أ) زراعة أعضاء النبات: تُمثل أوراق النبات مصدراً جيداً لمزارع الخلايا. تُفصل الخلايا المُفردة من الأوراق إما بطريقة ميكانيكية أو إنزيمية (لاحظ فصل عزل وزراعة البروتوبلاست). يُمكن الحصول على خلايا مُفردة ايضاً من مزارع الكالس إذ ان تكرار تقطيع الكالس وزراعته على وسط جديد يُحسن من هشاشة الكالس وبالتالي يكون مُناسباً في إنتاج المُعلقات الخلوية الجيدة. تزيد هشاشة الكالس من فرصة الحصول على خلايا مُفردة بدل من كتل خلوية صغيرة عندما يكون الكالس صلداً (Copact callus).

2- تنشئة مزارع المُعلقات الخلوية: تُنمى الخلايا المعزولة على شكل مُعلقات خلوية ويتم إدامتها بسحب لقاح منها وزراعته في وسط جديد مع مُلاحظة نقل الخلايا وهي في مرحلة التوقف عن النمو المُبكرة (Early stationary phase). تبدأ الخلايا بالإنقسام بعد حضنها تحت ظروف مُناسبة وتعتمد فترة الحضن على (أ) الكثافة الإبتدائية للخلايا (Initial cell density). (ب) طول مرحلة الفترة الأُسية (Duration of lag phase). (ج) سرعة نمو الخلايا داخل المُعلق الخلوي (Growth rate of cells). تُعد كثافة الخلايا (عدد الخلايا في السنتيمتر المكعب الواحد) معياراً حرجاً حيث لا تنمو الخلايا عندما تكون كثافتها قليلة حيث تستغرق الخلايا وقتاً طويلاً لبدء الإنقسام في مرحلتي التلكؤ (Lag phase) والأُسية (Log phase) ولذلك لابُد من إجراء تجربة لمعرفة حجم اللقاح المُناسب لنشوء مزرعة المُعلق الخلوي. عند شروع خلايا المُعلق الخلوي بالإنقسام، لابد من قياس كثافة الخلايا في وحدة حجم الوسط الغذائي لتحديد مقدار الزيادة في أعداد أو كثافة الخلايا في وحدة الحجم على أُسس يومية أو كل ثلاثة أيام على الأقل. تحتاج مزارع المُعلقات الخلوية في الغالب فترة حضن تتراوح بين 21-28 يوما للوصول الى مرحلة التوقف (Stationary).

3- أنواع مزارع المُعلقات الخلوية: (أ) تنمية المُعلقات الخلوية في حجم ثابت من الوسط الغذائي (Batch culture) اي زراعة الوجبة، إذ يتزامن إنقسام الخلايا ونموها مع زيادة في الكتلة الحيوية لحين حصول أحد المُحددات في بيئة الزراعة مثل نقص التغذية، قلة تجهيز O_2، تراكم الأثيلين، نفاذ مُنظمات النمو المُضافة، تغييرات في العوامل الفيزيائية والكيميائية وغيرها. تمر خلايا المُعلق الخلوي بالمراحل الخمسة

التالية من النمو حينها يُرسم مُنحنى نمو المُعلق الخلوي من خلال العلاقة بين عدد الخلايا وطول فترة الحضن (شكل 3.10).

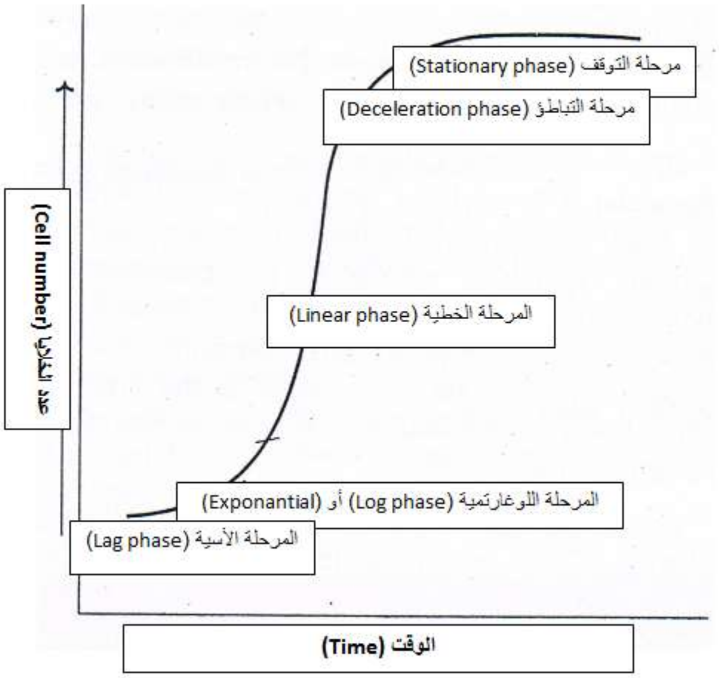
1- المرحلة الأُسية (Lag phase) حيث تتهيأ الخلايا للإنقسام.

2- المرحلة اللوغارتمية (Log phase) أو تُسمى Exponential phase حيث يزداد عدد الخلايا بشكل مُتسارع وعالي.

3- المرحلة الخطية (Linear phase) التي تتميز في بداية تباطؤ إنقسام الخلايا يصاحبه زيادة في توسع حجم الخلايا.

4- مرحلة التباطؤ (Deceleration phase) وتتميز في إنخفاض معدلات إنقسام الخلايا مع زيادة مستمرة في توسعها.

5- مرحلة التوقف (Stationary phase) حيث ثبوت عدد الخلايا وحجمها.



شكل 3.10. مُنحنى نمو خلايا المُعلق الخلوي وتظهر فيه المراحل الخمس.

يمكن إدامة هذا النوع من المزارع بإستمرار بنقل كميات قليلة (لقاح) من المُعلق الخلوي الحاوي على الخلايا الى وسط جديد. يتخلل تلك المزارع تغييرات في نمط نمو الخلايا وايضها ولذلك تكون الخلايا في هذا النوع من المزارع مُناسباً لدراسة سلوك الخلايا على المُستوى الخلوي.

(ب) المزارع المُستمرة (Continuous cultures): وفيها يتم عمل إضافات مُنتظمة من وسط غذائي جديد وسحب للوسط المُستعمل وبذلك يبقى حجم الوسط ثابتاً. يُجرى هذا النوع من المزارع داخل مُفاعلات حيوية مُصممة خصيصاً لهذا الغرض. تُنفذ مزارع خلايا النبات تحت ظروف مُحددة مُسيطر عليها من حيث السيطرة على كثافة الخلايا، المُغذيات، O2، CO_2، الأثيلين، pH وغيرها. غالباً ماتكون الخلايا في هذه المرحلة بالطور الأُسي (Log phase) من النمو. تكون المزارع المُستمرة في نوعين، مفتوحة ومُغلقة. (أ) المزارع المُستمرة المفتوحة (Open continuous) و يكون السريان الداخل (Inflow) من الوسط الجديد مُتوازن مع حجم السريان الخارج (Outflow) للوسط الذي يتم التخلص منه وبالتأكيد يكون ذلك مصحوباً مع الخلايا. تُضبط تماماً سرعتي إضافة الوسط الجديد وحجم الوسط الخارج بحيث تحافظ الخلايا على معدل نمو واحد وحجم الخلايا التي يتم حصادها مُساوياً لعدد الخلايا المُتكونة. يُعد نظام المزارع المُستمرة المفتوحة من النوع المستقر كيميائياً (Chemostat) عندما يكون معدل نمو الخلايا وكثافتها ثابتاً من خلال السيطرة على كمية المُغذيات المُضافة الى الوسط (الكلوكوز، النتروجين، الفسفور). تبقى في هذا النوع من المزارع المُغذيات الأُخرى على نفس تراكيزها عدا ما ذُكر أعلاه وأيةَ زيادة أو نُقصان في المُركبات المُحددة للنمو ينتج عنه زيادة أو نُقصان في معدل نمو الخلايا. أما النوع الثاني من المزارع المُستمرة المفتوحة فهو المزارع ثابتة الكثافة (Turbidostat) وفيها تكون إضافة وسط جديد عند زيادة كثافة مزرعة المُعلق الخلوي بحيث تكون كثافة المُعلق الخلوي ثابتة. يتم إعتماد كثافة الوسط على أساس كثافة الكتلة الحيوية في المزرعة والتي يتم السيطرة عليها بالإضافة المُتقطعة من الوسط وبسحب الخلايا عند زيادة كثافتها. (ب) المزارع المستمرة المغلقة (Closed continuous cultures): تبقى الخلايا في هذا النوع من المزارع داخل المفاعل الحيوي ويُضاف حجم مُعين من الوسط الجديد يقابله سحب نفس الحجم من الوسط القديم الحاوي على الخلايا لحين حصول حالة توازن بين الوسط الجديد الداخل (Inflow) والوسط القديم الخارج (Outflow). تُفصل الخلايا من الوسط القديم ميكانيكياً ويتم إسترجاعها ثانية الى المفاعل الحيوي وبذلك تكون هناك زيادة مُستمرة في الكتلة الحيوية في نظام المزارع المُستمرة المُغلقة وذلك مُناسباً لإنتاج مُركبات مُحددة مثل السكريات المُتعددة والكومارينات، إضافةً الى فائدته في دراسة التمايز الخلوي.

4- مزارع المُعلقات الخلوية المُتزامنة (Synchronization of suspension cultures)

تختلف الخلايا بدرجة كبيرة فيما بينها من حيث الحجم، الشكل، دورة حياة الخلية وغير ذلك تحت الظروف الطبيعية ولذلك فهي غير مُتناسقة أو غير مُتزامنة (Asynchronous). ينتج عن ذلك التغاير بين الخلايا، إختلافات في إنتاجيتها من مُركبات الايض الثانوي وتكون غير مُناسبة في الدراسات الوراثية ، الفسيولوجية والكيموحيوية مما يستوجب الأمر تنسيق وتزامن تلك المزارع الخلوية (Synchronization) بحيث تكون الخلايا مُتشابهة في مراحل نموها وحجمها وإنتاجيتها. يُشير مصطلح Synchronization بمفهومه العام الى توفر تنظيم في أغلبية الخلايا داخل المُعلق الخلوي بحيث تتزامن تلك الخلايا بنفس دورة الخلية وفي ذات الوقت. تُتبع مجموعة من الطرائق لجعل خلايا المُعلقات الخلوية متزامنة وتقسم بشكل عام الى طرائق كيميائية وأُخرى فيزيائية.

الطرائق الفيزيائية: تتم السيطرة على العوامل الفيزيائية المؤثرة في نمو الزروعات مثل الضوء، ودرجة الحرارة والصفات الفيزيائية للخلايا مثل حجم الخلايا والذي يُمكن السيطرة عليه لدرجة تُحقق التزامن في الخلايا. يمكن تنفيذ ذلك من خلال بعض المعاملات أهمها؛ المعاملة بالبرودة (Cold treatment) فعند تعريض المُعلقات الخلوية الى درجة حرارة مُنخفضة (حوالي 4 °م)، تحصل صدمة توافقية أو تزامنية (Synchronization) وعندما يُرافقها تجويع تغذوي (Starvation) فالنتائج تكون أفضل. تُتبع طريقة ثانية مبنية إساساً على مُحتوى حجم مُعين من وسط المُعلق الخلوي من حجوم الكتل الخلوية أي الإنتخاب على أساس حجوم كتل الخلايا (Selection by volume) وبذلك تُعتمد اللقاحات المُتجانسة وتُستبعد غير المُتجانسة.

الطرائق الكيميائية: تشتمل الطرائق الكيميائية لتحقيق تزامن خلايا المُعلقات الخلوية على إستعمال المثبطات الكيميائية وحرمان الخلايا من عوامل النمو الأساسية كالمُغذيات. يُمكن من خلال ذلك توقيف دورة الخلية في مرحلة بذاتها ومن ثم إزالة العوامل المانعة أعلاه لتبدأ الخلايا سويةً بالإنقسام وبالتالي يتحقق التزامن. عند التثبيط الكيميائي (Chemical inhibition)، تُضاف مُثبطات تصنيع الدنا مثل مركبات 5-aminouracil, hydroxyurea, 5-fluorodeoxypurine مما يجعل الخلايا تدخل في مرحلة G1 ويحصل التزامن في إنقسام الخلايا عند إزالة المُثبط. تُعد المعاملة بمادة الكولشسين (Chochicine) طريقة ثالثة لتحقيق التزامن فهي مادة مُثبطة قوية توقف إنقسام الخلايا النامية في مرحلة الطور الإستوائي (Metaphase) حيث تمنع تكوين المغزل (Spindle) في ذلك الطور من الإنقسام الخلوي. تكون فترة معاملة الخلايا بالكولشسين قصيرة وعندما تكون الخلايا قد دخلت في مرحلة النمو الأُسي (Exponential growth phase)، علماً بأن التعريض للكولشسين لفترات طويلة قد يؤدي الى الإنقسام الخيطي. يُعتبر التجويع (Starvation) طريقة

رابعة من طرائق الحصول على تزامن الخلايا فعند حرمان الخلايا من المُغذيات الأساسية أو المُركبات المُشجعة على النمو، يدفع ذلك الخلايا الى الوصول الى مرحلة التوقف (Stationary phase) لكي تبدأ الخلايا بالإنقسام من جديد حال إضافة تلك المواد وبالتالي يتحقق التزامن. ذكر بعض الباحثين بأن حرمان الخلايا من مُنظمات النمو لمدة ومن ثم إضافتها قد يُشجع على تزامن الخلايا.

5- قياس نمو المزارع الخلوية

من الضروري تقويم نمو الخلايا في مزارع المُعلقات الخلوية. تشمل تلك القياسات عدد الخلايا في وحدة الحجم من الوسط، حجم الخلايا المضغوط والزيادة في وزن الخلايا.

حساب عدد الخلايا (Cell counting): بالرغم من مقبولية دقة طريقة حساب عدد الخلايا في حجم معين من المُعلق الخلوي، إلا إنها طريقة مُضنية وتحتاج الى وقت. يعود ذلك الى تجمع خلايا المُعلق كمُستعمرات خلوية بحجوم مُختلفة، لذلك يُفترض تفريق تلك المُستعمرات قبل سحب عينات من المُعلق. تُعامل بموجب ذلك كتل الخلايا بإنزيم البكتنيس المحلل للبكتين أو حامض الكروميك لفصل الخلايا ثم عدها بإستعمال مقياس عدد خلايا الدم (Haemocytometer).

حجم الخلايا المضغوط (Packed cell volume, PCV): يُعبر عن حجم الخلايا المضغوط بالسنتيميتر المكعب (مل) من كتلة الخلايا أو الكبسولة (Pellet) لكل مل من المزرعة. لحساب PCV، يُسحب حجم معلوم من المُعلق الخلوي ويُنبذ مركزياً (عادةً على 200xg لمدة 5 دقائق) ويُسجل حجم الكبسولة أي PCV. يُستبعد الراشح (Supernatant) وتُغسل كبسولة الخلايا وتُجفف لمدة 12 ساعة وتوزن ويُسجل وزن الخلايا الجافة.

وزن الخلايا الطري (Cell fresh weight): تُجمع الخلايا الرطبة على مُرشح من ألياف مصنوعة من النايلون (Nylon fabric filter) مُستندة على قمع وتُغسل لإزالة بقايا الوسط وتُزال الرطوبة السطحية الزائدة بالتفريغ وتوزن. يُمثل ذلك الوزن الطري للخلايا بالرغم من الحاجة الى عينات كبيرة من الخلايا من أجل الحصول على أوزان أكثر دقةً.

6- قياس حيوية الخلايا المزروعة (Measurement of viability of cultured cells)

تُمثل حيوية الخلايا أكثر العوامل أهمية للتمييز بين الخلايا الحية والميتة. تقاس حيوية الخلايا تحت المجهر بعد تصبيغها. تُشخص الخلايا الحية بعد التأكد من وجود أنوية حية ويتم ذلك بإستعمال مجهر تعاكس الطور

(Phase contrast). تُستعمل صبغة إيفانز الزرقاء (Evans's blue) كمحلول مُخفف بنسبة 0.025% (وزن/حجم) لتصبيغ الخلايا الميتة والتالفة بينما لا تتصبغ الخلايا الحية. تُستعمل ايضاً طريقة Fluorescein diacetate حيث تُحضن خلايا المُعلق الخلوي مع المُركب الذي يُختصر FDA بتركيز نهائي 0.01% حيث يُمسك بالمركب من قبل إنزيم الإستيريس (Esterase) الموجود في الخلايا الحية. ونتيجةً لذلك، فالجزء القطبي من الفلورسين والذي يشع فلورسين بلون أخضر عند تعريضه للأشعة فوق البنفسجية (UV)، سوف يتحرر. تُشخص الخلايا الحية من خلال مشاهدة اللصف حيث انه يتراكم في الخلايا الحية فقط.

طرائق زراعة الخلايا المُفردة Culture of isolated single cells

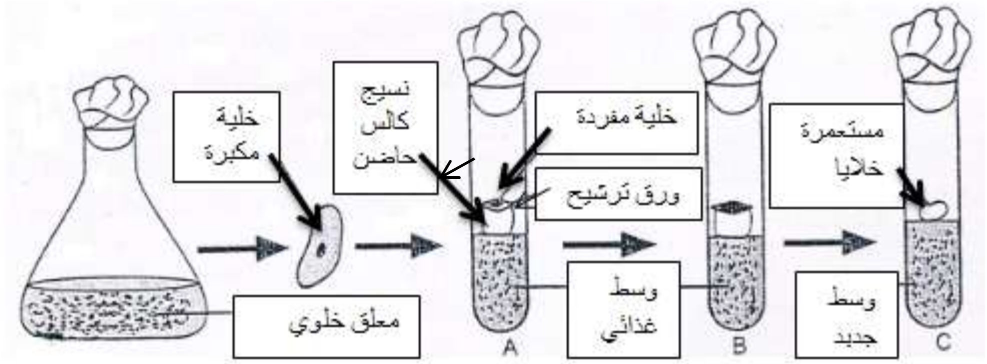
السلالة (Clone) عبارة عن كتلة من الخلايا أُشتقت جميع خلاياها من خلية مُفردة بعد إستمرارية الإنقسام الخيطي. يُفترض أن تكون خلايا السلالة الواحدة مُتشابهة تماماً من حيث الهيئة الوراثية والكروموسومية (Genotype & Karyotype) ولكن قد تحصل تغييرات في ذلك عند إكثارها. تُزرع الخلايا المُفردة بالطرائق التالية:

1- تقانات النسيج الحاضن وورق الترشيح Filter paper raft-nurse tissue technique

توضع قطع صغيرة مُعقمة من ورق ترشيح فوق كتلة مُناسبة من نسيج الكالس قبل عدة أيام من زراعة الخلية المُفردة (لاحظ شكل 3.11 أ، ب). توضع الخلية المُفردة فوق ورق الترشيح حيث يترطب بالمواد التي تترشح من الكالس بخاصية الإنتشار مُجهزةً الخلية المُفردة بالمُغذيات. تنقسم الخلية لتكون مُستعمرة على ورق الترشيح، تُنقل بعدها ويتم إكثارها وإخلاف نباتات منها.

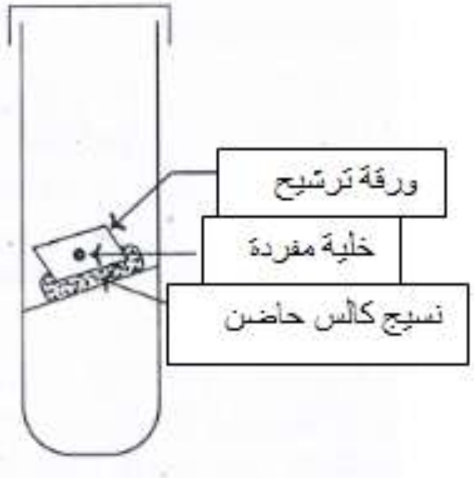
2- تقانة الحجرة الصغيرة Microchamber technique

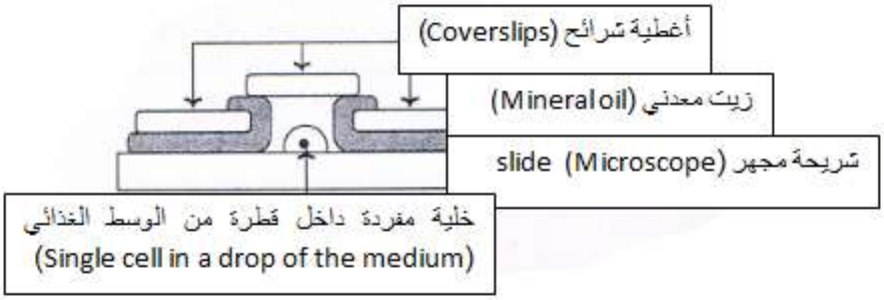
تُستعمل شريحة زجاجية صغيرة أو غطاء شريحة (Slide or coverslip) في عمل حجرة صغيرة جداً (Microchamber) وأحياناً تُستعمل مُباشرة شريحة زجاجية ذات فجوة صغيرة تُسمى Cavity slide. توضع قطرة من الوسط الغذائي من المُعلق الخلوي تحتوي على خلية واحدة داخل الحجرة الصغيرة وتوضع ايضاً قطرة من زيت معدني في جانبي القطرة الحاوية على الوسط والخلية المُفردة وتُغطي بغطاء الشريحة (شكل 3.12). تنشأ مُستعمرة أو أكثر من الخلايا بعد حضنها لفترة من الزمن (لاحظ شكل 3.13 للإطلاع على تفاصيل التقانة).



شكل 3.11 أ. زراعة الخلية المُفردة بتقانة النسيج الحاضن وورق الترشيح. (A) خلية مُفردة تم وضعها على ورق ترشيح بتماس مع الكالس الحاضن. (B) إنقسام الخلية المُفردة وتحولها الى مُستعمرة. (C) عند وصول المُستعمرة لحجم مُناسب تُنقل الى وسط جديد يحتوي على الاجار لِتُكون سلالة من خلية مُفردة.

شكل 3.11 ب. موضع الخلية المفردة على ورق الترشيح وتحته نسيج الكالس الحاضن.

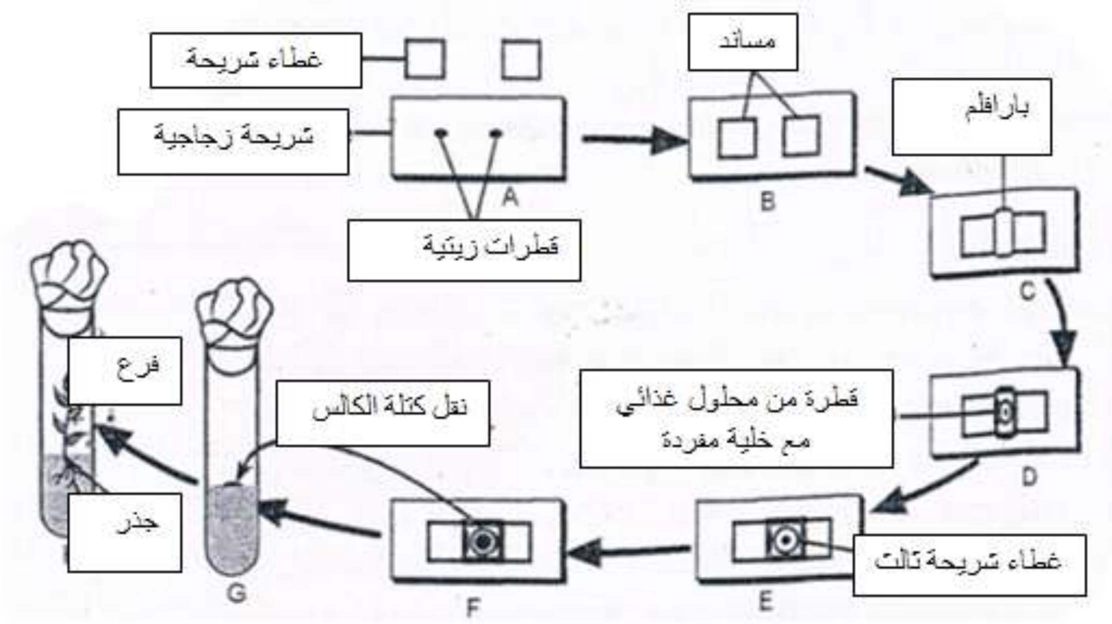




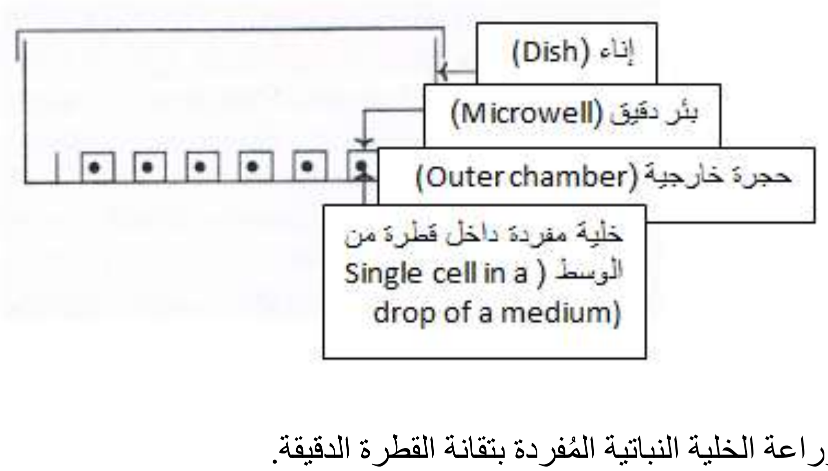
شكل 3.12. زراعة الخلية النباتية المُفردة بإستعمال تقانة الحجرة الدقيقة.

3- تقانة القطرة الدقيقة (Microdrop method)

يُستعمل في هذه الطريقة إناء خاص يحتوي على حجرتين صغيرتين يوضع فيهما ماء مقطر ومُعقم وعلى حجرة داخلية كبيرة تحتوي على مجموعة من الحفر الدقيقة أو الآبار الدقيقة (Microwells) وكما موضح في شكل 3.14. تُضبط كثافة الوسط بحيث كل قطرة تحتوي على خلية مُفردة واحدة. يتم إلتقاط مُستعمرات الخلايا بعد إن تصبح بحجم مُناسب وتكاثر بالطريقة المعروفة وتزرع على وسط الإخلاف.



شكل 3.13. تقانة الحجرة الصغيرة لزراعة الخلية المُفردة وإنتاج نبات كامل.



شكل 3.14. زراعة الخلية النباتية المُفردة بتقانة القطرة الدقيقة.

4- تقانة Bergmann' s في نشر الخلايا Bergmann' s plating technique

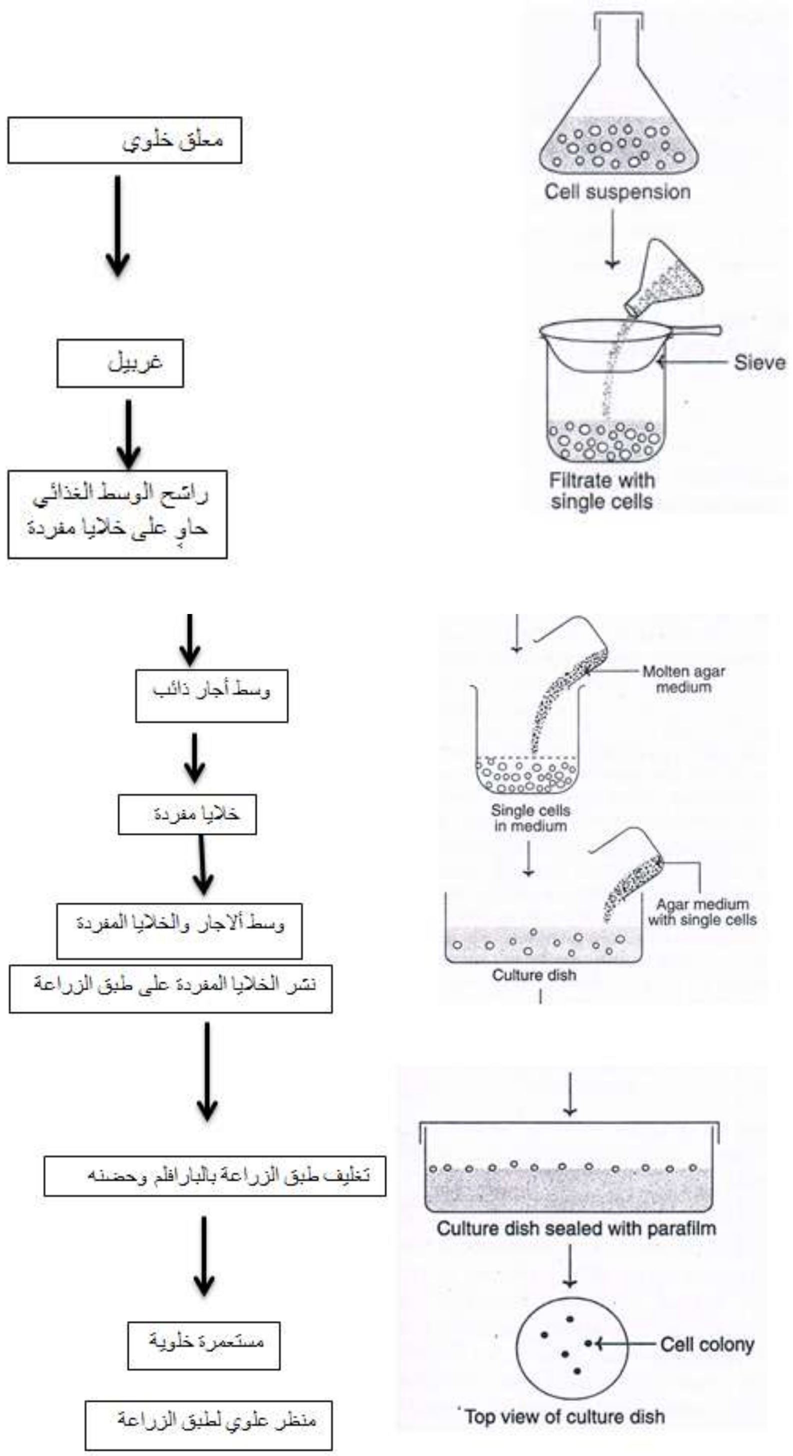
طور برجمان تقانة لتكاثر الخلية المُفردة وهي حالياً الأكثر إنتشاراً وإستعمالاً (شكل 3.15). تتم غربلة المُعلق الخلوي من خلال غرابيل صغيرة الفتحات بحيث تسمح للخلايا المُفردة بالعبور من خلالها. توضع الخلايا المُفردة مرة أُخرى في وسط جديد سائل وبكثافة ضعف الكثافة المطلوبة لغرض النشر. يُخلط حجمان مُتساويان من الوسط الحاوي على الخلايا والأكار الذائب (30-35 °م). يُسكب ويُنشر الوسط الحاوي على الأكار والخلايا في أطباق بتري بحيث تكون الخلايا موزعة بالتساوي على سطح الوسط بعد تصلبه كطبقة خفيفة، تُحكم أغطية أطباق البتري بالبارافلم وتُحضن على درجة 25 °م في الظلام أو حسب حاجة النوع النباتي. تبدأ الخلايا المُفردة بالإنقسام وتكون مُستعمرات التي تُعد سلالات. تقاس حيوية الخلايا بنفس الطرائق التي وصفت في موضوع المُعلقات الخلوية. وبالنظر للحاجة الكبيرة للخلايا المُفردة خاصةً تلك التي تم تحويرها وراثياً بعد جهدٍ كبير، فقد طُوِرت تقانة Bergmann's وسميت بإسمه.

الأوساط الغذائية Culture media

يرجع نمو وتطور الخلايا وأنسجة واعضاء النبات الى مُحتوى الأوساط الغذائية من المُغذيات ولذلك فإختيار الوسط الغذائي المُناسب قد يكون مفتاح النجاح في تقانات زراعة أنسجة النبات. يتضمن الوسط الغذائي عموماً العناصر التي يحتاجها النبات الكامل في نموه والتي يُصنع منها إحتياجاته وإحتياجات أغلب الكائنات الحية الأُخرى منها مع ملاحظة بأن الأجزاء النباتية النامية خارج الجسم الحي تكون مُعتمدة في غذائها على مُكونات الوسط (Heterotrophic) ولا تستطيع تصنيع غذائها كما يفعل النبات النامي في الحقل.

يعتمد مُحتوى الوسط من المُغذيات على عاملين رئيسيين؛ أولهما النوع النباتي وثانيهما نوع المادة النباتية المزروعة سواء كانت خلية، نسيج، عضو أو بروتوبلاست. الأوساط على نوعين إما صلبة (Solid) أو سائلة (Liquid) في طبيعتها وإختيار أيٍ منهما يعتمد على مقدار إستجابة ذلك النوع النباتي والجزء النباتي المفصول منه للنجاح في مزارعه النسيجية. يوضح جدول 3.1 مُكونات أكثر الاوساط الغذائية إستعمالاً في مزارع النبات النسيجية والتي يُمكن إختصارها وكما يلي:

وسط وايت (White' s medium): أُستعمل منذ فترة طويلة وكان قد طُوِرَ اساساً لمزارع الجذور وتم تحويره إما بزيادة أو تقليل كميات العناصر الداخلة في تركيب الوسط وقد تكون إضافة أو حذف لبعض منها.



شكل 3.15. مُخطط لطريقة Bergmann's لنشر وزراعة خلايا النبات المُفردة.

وسط موراشيك وسكوك (Murashige and Skoog, MS): تم عمل التوليفة الغذائية لهذا الوسط اساساً لتحفيز تكوين الأعضاء وإخلاف النبات من الأنسجة المزروعة. يُعد من أكثر الأوساط إستعمالاً وتم تحويره بتوليفات مُختلفة ليناسب أغلب النباتات المزروعة نسيجياً.

وسط كامبورك (Gamborg, B5): صُممت توليفة الوسط اساساً لمزارع أنسجة الكالس والمُعلقات الخلوية. حُورَ هو الآخر وأصبح يُستعمل في زراعة البروتوبلاست.

وسط N6: عمل توليفته العالم Chu ليكون مناسب لزراعة متوك محاصيل الحبوب اساساً ويُستعمل حالياً في أنواع أُخرى من المزارع.

وسط نيش (Nitch, s medium): يُستعمل في الغالب في مزارع المتوك وحبوب اللقاح.

الأوساط الصناعية والطبيعية Synthetic and natural media

عندما يتكون الوسط الغذائي من مُكونات كيميائية معلومة ومُحددة (Defined)، يُسمى بالوسط الغذائي الصناعي أو التركيبي وإذا إحتوى على مركبات كيميائية غير مُحددة أو غير معلومة المُكونات بدقة (Undefined) مثل عصير الفاكهة ومُستخلصات الخضروات، فيُسمى بالوسط الطبيعي. عموماً يسود إستعمال الأوساط التركيبية في مزارع أنسجة النبات عدا بعض الإستثناءات ولأجزاء نباتية مُحددة.

تراكيز المُكونات في الأوساط: يُعبر عن تراكيز مُكونات الوسط من مُركبات عضوية ولاعضوية بالوحدات ملغم/لتر أو جزء بالمليون، ولكن وحسب ما ورد في توصية الجمعية العالمية لفسلجة النبات (International Association of Plant Physiology)، أصبحت وحدات $mmol.l^{-1}$ للمُغذيات الكبرى (Macronutrients) هي المُفضلة ووحدات $\mu mol.l^{-1}$ للمُغذيات الصُغرى (Micronutrients).

مُكونات الأوساط Constituents of media

يحتاج النبات في تغذيته ووظائفه الفسلجية الى العديد من العناصر والتي يجب تجهيزها الى الوسط الزرعي للمزارع النسيجية ولكل عنصر وظيفته التي يُساهم فيها (جدول 1.3). يحتوي الوسط الغذائي على المُكونات التالية والتي تختلف مقاديرها حسب الوسط وكما مبين في جدول 3.2:

1- المغذيات غير العضوية (Inorganic nutrients)

2- مصادر الكربون والطاقة (Carbon and energy sources)

3- الإضافات العضوية (Organic supplements)

4- مُنظمات النمو (Growth regulators)

5- مُصلبات الوسط (Solidifying agents)

6- تعديل الأُس الهيدروجيني (pH of the medium)

المُغذيات غير العضوية: تتألف من المُغذيات الكبرى (بتراكيز أكثر من $0.5\ mmol.^{-1}$) والصُغرى (بتراكيز أقل من $0.5\ mmol.^{-1}$). تُجهز تلك المُغذيات الكبرى والصُغرى من مدى واسع من الأملاح المعدنية (العناصر). تتفرق وتتأين الأملاح المعدنية عند إذابتها بالماء وعليه قد يُشارك عنصر واحد قادم من أكثر من مُركب فعلى سبيل المثال، تأتي آيونات البوتاسيوم (K^+) في وسط MS من مساهمة ملحي KNO_3 و KH_2PO_4 بينما يأتي NO_3^- من KNO_3 و NH_4NO_3.

المُغذيات الكبرى (Macronutrients): تشتمل على العناصر الستة الرئيسة التي تدخل في أوساط مزارع النبات وهي؛ النتروجين، الفسفور، البوتاسيوم، الكالسيوم، المغنيسيوم والكبريت. يتراوح التركيز المثالي لأغلب الزروعات من النتروجين والبوتاسيوم حوالي $25\ mmol.l^{-1}$ بينما تتراوح تراكيز الكالسيوم، الفسفور، الكبريت والمغنيسيوم ضمن المدى $1\text{-}3.mmol.l^{-1}$ تكون أملاح النايتريت والأمونيوم مع بعضها مصدراً للنتروجين.

تشتمل على الحديد، المنغنيز، الزنك، البورون، النحاس والمولبدنم. من بين العناصر الصُغرى، تكون الحاجة الى الحديد حرجة جداً، لذلك تُضاف أشكال من الحديد والنحاس المخلبية (Chelated) الى الأوساط.

مصادر الكربون والطاقة: تعتمد الخلايا النباتية والأنسجة المزروعة على مُكونات الوسط في غذائها (Heterotrophic)، لذلك تستهلك الكربون المُضاف الى الوسط كمصدر للطاقة. يُفضل السكروز مصدراً للطاقة وخلال عملية تعقيم الأوساط بالمؤصدة، يتحلل السكروز الى كلوكوز وفركتوز. تستهلك الخلايا النباتية المزروعة الكلوكوز اولاً ومن ثم الفركتوز وتكون كفاءة الكلوكوز مثل كفاءة السكروز بينما الفركتوز أقل كفاءة ويمكن تجهيز الوسط بالكلوكوز والفركتوز مُباشرة بدلاً من السكروز.

جدول 3.1. قائمة مُنتخبة من العناصر ووظائفها للنبات

العنصر	الوظيفة
النتروجين	يدخل في تركيب البروتينات والأحماض النووية وبعض المُرافقات الإنزيمية.
الكالسيوم	مُكون مهم لجدار الخلية، يدخل في وظائف الأغشية وإعطاء الإشارة الخلوية.
المغنيسيوم	أحد مُكونات الكلوروفيل، عامل مُساعد لبعض الإنزيمات.
البوتاسيوم	آيون موجب غير عضوي رئيسي يُنظم الجهد الازموزي.
الفسفور	مُكون مهم يدخل في تركيب الأحماض النووية والمُركبات الوسطية لعمليتي التنفس والتركيب الضوئي، يدخل في نقل الطاقة.
الكبريت	يدخل في تكوين أحماض أمينية مُحددة (مثيونين، سيستين، سيستاين) وبعض العوامل المُساعدة.
المنغنيز	عامل مُساعد لإنزيمات مُحددة.
الحديد	يدخل في تركيب السايتوكرومات، يُساهم في آلية نقل الألكترونات.
الكلور	يشترك في عملية التركيب الضوئي.
النحاس	يشترك في تفاعلات آلية النقل الألكتروني، عامل مُساعد لبعض الإنزيمات.
الكوبلت	يدخل في تكوين فيتامين B_{12}.
المولبدنوم	أحد مُكونات بعض الإنزيمات مثل (Nitrate reductase)، عامل مُساعد لبعض الإنزيمات.
الزنك	يحتاجه النبات في تصنيع الكلوروفيل، عامل مُساعد لبعض الإنزيمات.

المُغذيات الصُغرى (Micronutrients): بالرغم من إضافتها الى الأوساط بتراكيز قليلة جداً، الا إنها ضرورية جداً لنمو الخلايا والأنسجة النباتية.

جدول 3.2. أنواع الأوساط الغذائية الأكثر شيوعاً ومُكوناتها (ملغم/لتر)

	White's	Murashige and Skoog (MS)	Gamborg (B5)	Chu (N6)	Nitsch's
Macronutrients					
$MgSO_4.7H_2O$	750	370	250	185	185
KH_2PO_4	-	170	-	400	68
$NaH_2PO_4.H_2O$	19	-	150	-	-
KNO_3	80	1900	2500	2830	950
NH_4NO_3	-	1650	-	-	720
$CaCl_2.2H_2O$	-	440	150	166	-
$(NH_4)_2.SO_4$	-	-	134	463	-
Micronutrients					
H_3BO_3	1.5	6.2	3	1.6	-
$MnSO_4.4H_2O$	5	22.3	-	4.4	25
$MnSO_4. H_2O$	-	-	10	3.3	-
$ZnSO_4.7H_2O$	3	8.6	2	1.5	10
$Na_2MO_4.2H_2O$	-	0.25	0.25	-	0.25
$CuSO_4.5H_2O$	0.01	0.025	0.025	-	0.025
$CoCl_2.6H_2O$	-	0.025	0.025	-	0.025
KI	0.75	0.83	0.75	0.8	-
$FeSO_4.7H_2O$	-	27.8	-	27.8	27.8
$Na_2EDTA.2H_2O$	-	37.3	-	37.3	37.3
Sucrose (g)	20	30	20	50	20
Organics s					
Vitamins					
Thiamine	0.01	0.5	10	1.0	0.5
Pyridoxine	0.01	0.5	1	0.5	0.5
Nicotinic acid	0.05	0.5	1	0.5	5.0
Myoinositol	-	100	100	-	100
Others					
Glycine	3	2	-	-	2.0
Folic acid	-	-	-	-	0.5
Biotin	-	-	-	-	0.05
pH	5.8	5.8	5.5	5.8	5.8

سُجلت مُلاحظة مهمة بأن الزروعات تنمو بشكل أفضل في وسط تم تعقيم السكروز فيه بالمؤصدة (المعقام البخاري) من الوسط الذي يتم تعقيم السكروز بالفلترة. يُشير ذلك بأن نواتج تحلل السكروز (خاصة الكلوكوز) تكون كفوءة كمصدر للطاقة بينما إضافة الكلوكوز الذي سبق وإن عُقم الى الوسط مُباشرة يكون مُحدداً لنمو الزروعات. أُستعملت إضافةً الى السكروز والكلوكوز، أنواع كربوهيدراتية أُخرى مثل اللاكتوز، مالتوز، كالاكتوز، رافينوز، تريهالوز وسيلوبايوز وحققت نجاحاً محدوداً.

المضافات العضوية (Organic supplements): وتشتمل على الفيتامينات، الحوامض الأمينية، الحوامض العضوية، المُستخلصات العضوية، الفحم المُنشَط والمُضادات الحيوية.

الفيتامينات: تتمكن خلايا وأنسجة النبات المزروعة (كما هو الحال في النبات الكامل) من تصنيع الفيتامينات ولكن بكميات أقل من إحتياجاتها ولا تُعزز من نموها بالكامل. لذلك يستوجب الأمر إضافتها الى الوسط الغذائي لتحقيق نمو جيد للخلايا. تشتمل تلك على الثايمين، رايبوفلافين، نايسين، بيريدوكسين، حامضي الفولك وبانتوثنك، بايوتين، حامض الأسكوربك، مايوإنيسيتول، حامض بارا أمينو بنزويك وفيتامين E.

الأحماض الأمينية: بالرغم من قابلية الخلايا المزروعة على تصنيع الأحماض الأمينية لحد ما، وِجِدَ بأن إضافتها الى الوسط الغذائي يُحفز نمو الخلايا وتكاثرها. تستهلك الخلايا النباتية الأحماض الأمينية مثل الكلوتامين، أسباراجين، آرجنين والسيستين بإعتبارها مصادر للنتروجين العضوي أسهل بكثير من النتروجين اللاعضوي.

الحوامض العضوية: تُساهم الأحماض العضوية مثل السيتريت، ماليت، ساكسينيت أو الفورميت كمُركبات وسطية في دورة كربس وبذلك تُشجع من نمو الخلايا المزروعة. وِجِدَ بأن ألبايروفيت يزيد من سرعة نمو الخلايا.

المستخلصات العضوية: يضيف الكثير من الباحثين المُستخلصات العضوية الى أوساط الزراعة مثل مُستخلص الخميرة، مُتحلل الكازائين، ماء جوز الهند، عصير البرتقال، عصير الطماطم ومُستخلص البطاطا. الواقع يُحبذ تجنب إضافة المُستخلصات العضوية بسبب التغاير العالي في كمية ونوعية عوامل تشجيع النمو المُتوفرة فيها ولتداخلاتها المُعقدة مع مُكونات الوسط الأُخرى. إتجه العديد من الباحثين حديثاً على إحلال بعض المُركبات العضوية بدلاً منها مثل إحلال الأسبارجين بدلاً من مُستخلص الخميرة وإحلال الكلوتامين محل مُستخلصات الفاكهة.

الفحم المُنَشَط (Activated charcoal): يُحفز إضافة الفحم المُنَشَط الى الوسط من نمو وتمايز أنواع مُحددة من الخلايا مثل الجزر، الطماطم والاوركيدات. يُزيل أو يُقلل من بعض المُركبات السامة أو المُثبطة التي يفرزها النسيج النباتي الى الوسط مثل المُركبات الفينولية من خلال إدمصاصه (Adsorption) لها. بالمُقابل، لوحظ تثبيط الفحم المُنَشَط لزروعات مُعينة مثل أنسجة التبغ وفول الصويا غالباً ما يرجع السبب الى إدمصاص الفحم المُنَشَط لمُنظمات النمو.

المُضادات الحيوية (Antibiotics): من الضروري احياناً إضافة مُضادات حيوية وخاصةً الستربتومايسين أو الكانامايسين الى الوسط لمنع نمو الكائنات المجهرية وبتراكيز مُنخفضة. يُفضل تجنب إضافتها قدر المُستطاع بسبب تأثيرها المُثبط لنمو الخلايا.

منظمات النمو: عبارة عن مُركبات عضوية طبيعية تشجع على نمو الخلايا النباتية ونشوئها وتمايزها الى نباتات. تُقسم مُنظمات النمو التي تُضاف الى الأوساط الغذائية الى أربعة أنواع عامة، تشمل الاوكسينات، السايتوكاينينات، الجبريلينات وحامض الإنفصال (ABA). أثبتت تلك المُركبات أهميتها التي لايُستغنى عنها في تشجيع نمو وتمايز وتكوين الأعضاء في مزارع أنسجة النبات.

الاوكسينات: تُحفز الاوكسينات على إنقسام الخلايا، إستطالتها ونشوء الكالس على الأجزاء النباتية في التراكيز العالية وكذلك تُحفز على تكوين الجذور في التراكيز الواطئة (جدول 3.3). يُعد الاوكسين 2,4-D أكثرها تأثيراً والأكثر إستعمالاً في مزارع أنسجة النبات.

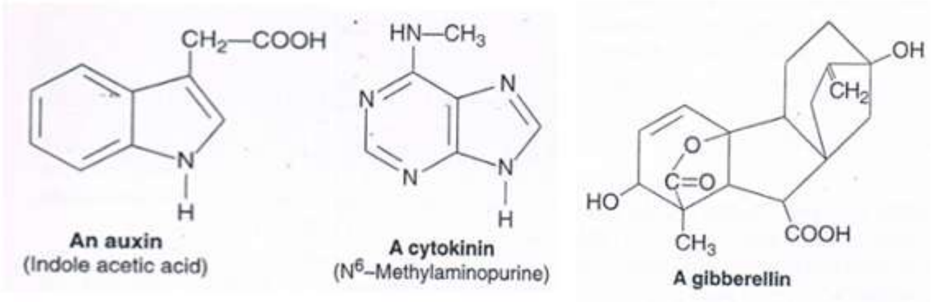
السايتوكاينينات: كيميائياً، السايتوكاينينات مُشتقة من البيورين وتحديداً من الأدنين وتُحفز على إنقسام الخلايا، التمايز الى أفرع وتكوين الأجنة الجسمية. تُحفز السايتوكاينينات تصنيع الرنا وبذلك فهي تُحفز من نشاط البروتينات عموماً والإنزيمات خصوصاً في الأنسجة المزروعة (لاحظ جدول 3.4). يُعد الكاينيتين و BAP الأكثر إستعمالاً ويوضح الشكل 3.16 تراكيب لمنظمات نمو مختارة وشائعة الإستعمال في مزارع النبات النسيجية.

جدول 3.3. قائمة بأهم الاوكسينات المُستعملة في زراعة أنسجة النبات

المختصر	الاوكسين
IAA	Indole 3 acetic acid
IBA	Indole 3 butyric acid
NAA	1-Naphthyl acetic acid
2,4-D	2,4-Dichlorophenoxy acetic acid
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorophenoxy acetic acid
4-CPA	4-chlorophenoxy acetic acid
NOA	2-Naphthyloxy acetic acid
MCPA	2-Methyl 4-chlorophenoxy acetic acid
Dicamba	2-Methoxy 3, 6-dichlorobenzoic acid
Picloram	4-Amino 2,5,6-trichloropicolinic acid

جدول 3.4. قائمة بأهم السايتوكاينينات المُستعملة في زراعة أنسجة النبات

الاسم المختصر	السايتوكاينين
BAP	6-Benzyl aminopurine
BA	Benzyl adenine
2 iP (IPA)	N^6-(2-isopentyl) adenine
DPU	Diphenyl urea
Kinetin	6-Furfuryl aminopurine
Zeatin	4-Hydroxy 3-methyltrans, 2-butenyl aminopurine
Thidiazuron	1-Phenyl 3-(1,2,3-thiadiazol-5 yl) urea



شكل 3.16. ثلاثة أنواع لمُنظمات نمو نباتية.

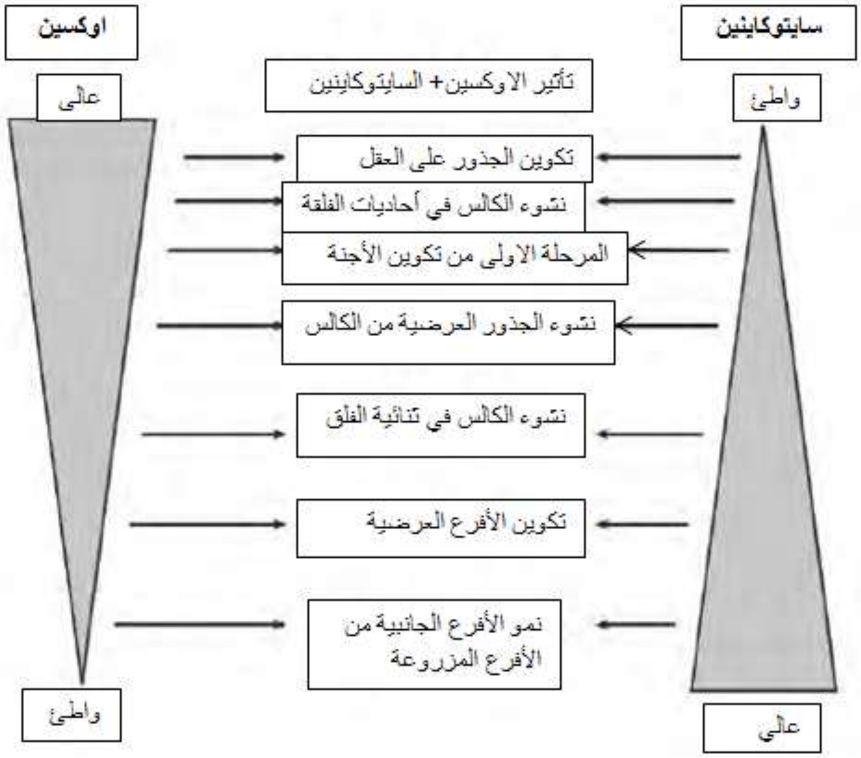
نسبة الاوكسينات الى السايتوكاينينات Ratio of auxins to cytokinins

تُعد التراكيز النسبية للاوكسينات والسايتوكاينينات المضافة الى الوسط الغذائي مهمة جداً في نشوء الزروعات (شكل 3.17). عندما تكون نسبة الاوكسينات الى السايتوكاينينات مرتفعة، يحصل نشوء لأنسجة الكالس ونشوء لمبادئ الجذور ومن جانب آخر يحتاج تفتح وإستطالة البراعم الأُبطية الى ان تكون النسبة مُنخفضة. يحتاج نشوء الكالس وإدامته من الناحية العملية كلاً من الاوكسين والسايتوكاينين في الوسط بينما يُضاف الاوكسين بمُفرده لنشوء الجذور والسايتوكاينين بمُفرده لتشجيع النموات الخضرية وتضاعفها. يعتمد تركيز مُنظم النمو المُضاف على نوع نسيج الجزء النباتي وعلى النوع النباتي المطلوب زراعته.

الجبرلينات: شُخِصَت العشرات من الجبرلينات كمُنظمات نمو ومن بينها GA_3 الأكثر إستعمالاً. يُشجع GA_3 نمو الخلايا المزروعة ويُسرع من نمو الكالس ويُحفز النبيتات القصيرة على الإستطالة. بإستطاعة الجبرلينات تشجيع أو تثبيط المزارع النسيجية إعتماداً على النوع النباتي وغالباً ما تُثبط ظهور الجذور العرضية والنموات الخضرية.

حامض الإنفصال (ABA): يُمكن تحفيز أو تثبيط نمو الكالس بإضافة IBA الى الوسط إذ يعتمد ذلك بشكل كبير على طبيعة النوع النباتي. تبرز أهمية ABA في تحفيزه نشوء الأجنة الجسمية.

عوامل التصليب: يتطلب عند تحضير أوساط صلبة وفي حالات اخرى نُصف صلبة إضافة مواد مُصلبة (Solidifying agents) وتُسمى احياناً Gelling agents. في واقع الحال تمسك عوامل التصليب الجزء النباتي وتجعله مُستقراً ومن أهم هذه المصلبات:



شكل 3.17. التراكيز النسبية للاوكسين والسايتوكاينين المُضافة الى الوسط الغذائي لتحقيق الغرض المؤشر.

الأكار: مُركب مُتعدد السكريات يتم الحصول عليه من أدغال تنمو في البحار (Seaweeds) وهو الأكثر شيوعاً كمُصلب للوسط لكونه لايتفاعل مع مُكونات الوسط اولاً ولا تهضمه الإنزيمات النباتية ثانياً وثابت تحت في درجة حرارة حضن الزروعات ثالثاً. يُضاف الى الوسط بتركيز 0.5 الى 1% ليصبح الوسط هلامياً.

الجيلاتين: يُضاف الى الوسط بتراكيز عالية تصل الى 10% مع نسبة نجاح محدودة بسبب ذوبانه في درجات الحرارة المُنخفضة (25°م) وبذلك يفقد خواصه كمُصلب للوسط.

مُصلبات أُخرى: تُستعمل مُصلبات متنوعة أُخرى على نطاق ضيق مثل الأكاروز النقي، Biogel (Polyacrylamide)، Phytagel والجيلرايت (Gelrite). من المُفيد إستعمال مُصلبات صناعية وتكوينها هلام بتراكيز مُنخفضة نسبياً (1.0 الى 2.5 غم.لتر$^{-1}$).

pH الوسط: يكون pH الوسط المُناسب لأغلب المزارع النسيجية ضمن المدى 5 الى 6. ينخفض عموماً بعد التعقيم البخاري بحوالي 0.3 الى 0.5 وحدة. يُضبط pH الوسط عند تحضيره وقبل التعقيم الى القيمة

المُناسبة وليس هناك ضرورة لإضافة دوارئ (Buffers) للمُحافظة على قيمته. تتوقف الخلايا النباتية عن النمو في قيم pH تزيد عن 7 وتقل عن 4.5 ويُستبدل الوسط في حالة إنخفاض قيمتها ويصبح الوسط أكثر صلابةً عند وصولها الى 6 وصعوداً ولا يتصلب الوسط إذا إنخفضت الى أقل من 5.

تحضير الأوساط الغذائية Preparation of nutrient media

الطريقة المُتعارف عليها في تحضير الأوساط تقتضي تحضير محاليل خزينة مركزة من 10 الى 100 مرة وتُستعمل مواد كيميائية عالية النقاوة وماء مقطر في إذابتها. تُخزن المحاليل الخزينة في عبوات زجاجية او بلاستيكية تحت ظروف التجميد وتُستعمل حين الحاجة. أنتجت الشركات المُتخصصة أوساط مُختلفة على شكل مسحوق جاهزة للإستعمال بعد إذابتها مما وفر الوقت والجهد وإستبعاد إحتمالية الخطأ الذي قد يحصل نتيجة تحضير الأوساط.

إختيار الوسط المُناسب: من المُعتاد البدئ مع وسط MS ووسط B5 من أجل إنتخاب وسط مُناسب للجزء والنوع النباتي المطلوب زراعته نسيجياً وإذا لم يكونا كفوئين فيتم إستبدالهما بوسط آخر. يتم عادةً إختبار 3-5 تراكيز من مُنظمات النمو وبتوليفات مُختلفة وإنتخاب التوليفة الأفضل عند حصول إستجابة. ولابُد من التأكيد على ضرورة إستعمال الكيميائيات عالية النقاوة وضبط التراكيز المُستعملة إذ أن أي خطأ يُسبب في خسارة كبيرة علماً بأن أغلب مُنظمات النمو لا تذوب في الماء المُقطر ويجب إذابتها في الكحول أو NaOH. يتم عمل محاليل خزينة من مُكونات الوسط (Stock solutions) عند الرغبة في تحضير الوسط داخل المختبر (جدول 3.5).

ملاحظة مهمة: لتحضير لتر واحد من الوسط، يُسحب 50 مل من المحلول الخزين رقم I و 5 مل من رقم II و 5 مل من رقم III و 5 مل من محلول رقم IV. (b) يجب إذابة $FeSO_4.7H_2O$ و $Na_2EDTA.2H_2O$ على إنفراد بحجم 450 مل ماء مقطر مع التسخين والرج المُستمر، بعد الإذابة التامة، يُخلطان ويُضبط pH المحلول الى 5.5 ويُكمل الحجم الى لتر بإضافة ماء مقطر.

أوساط المساحيق الجافة: بالنظر لكثرة المشاكل المتوقع حصولها عند تحضير المحاليل الخزينة من كُلف عالية وإيدي عاملة وإحتمالات الخطأ عند تحضيرها وغير ذلك، توفرت حالياً وعلى نطاق تجاري أوساط غذائية خاصة لمزارع أنسجة النبات على شكل مساحيق. تُذاب الكمية المطلوبة وحسب تعليمات المُنتج في ماء مقطر وتُضاف لها المُكملات من سكر، مواد عضوية وأكار وتُضبط pH الوسط ويُكمل الحجم الى لتر أو حسب الحاجة.

جدول 3.5. مُكونات وكميات المُركبات الكيميائية لوسط MS اللازمة لتحضير المحاليل الخزينة

مكونات المحاليل الخزينة	الكمية (ملغم/لتر)
Stock solution I	
NH_4NO_3	33000
KNO_3	38000
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	8800
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	7400
KH_2PO_4	3400
Stock solution II	
KI	166
H_3BO_3	1240
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	4460
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	1720
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	50
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	5
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	5
Stock solution III[b]	
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5560
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	7460
Stock solution IV	
Inositol	20000
Nicotinic acid	100
Pyridoxine·HCl	100
Thiamine·HCl	20
Glycine	400

تعقيم الأوساط: تُعقم الأوساط الغذائية بعد إكمال تحضيرها في مؤصدة (Autoclave) على درجة حرارة 121 °م وضغط 15 باسكال (psi) لمدة 20 دقيقة بالرغم من إحتمالية رفع درجة الحرارة والضغط والوقت حسب حجوم الأوساط الداخلة الى التعقيم كما مُبين في جدول 3.6. تحتاج الحجوم الأكبر الى مدة أطول في تعقيمها فتحتاج العبوات ذات حجم 200 مل الى 40 دقيقة لإكمال التعقيم في الوقت الذي يستغرق وقت تعقيم العبوات الصغيرة من 20 الى 50 مل 15 دقيقة فقط. تُعقم مُنظمات النمو والمواد العضوية الحساسة للحرارة العالية (Thermobile organics) بالفلترة بوحدة المليبور (Millipore unit) ذات الأقطار 0.45 أو 0.22 مايكروميتر ومن ثم تُضاف الى الوسط بعد تعقيمه وقبل تصلبه ويُخلط جيداً ويُترك لحين إكمال التصلب في درجة حرارة المختبر.

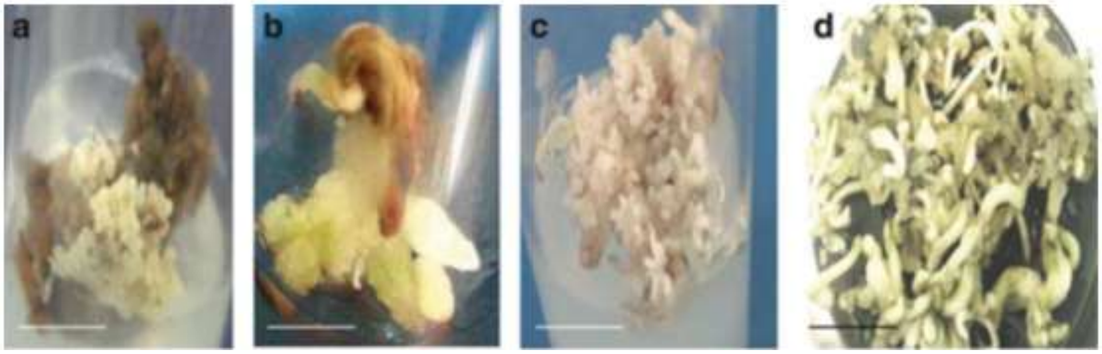
جدول 3.6. الوقت الأدنى الضروري لتعقيم الأوساط الغذائية بالبخار في درجة حرارة 121 °م بإستعمال المؤصدة

حجم العبوة (مل)	المدة الأصغرية (دقيقة)
50-20	15
75	20
500-250	25
1000	30
1500	35
2000	40

المشاكل المرافقة لزراعة الكالس والمُعلق الخلوي Problems associated with callus and cell suspension cultures

الإسمرار Browning: يتحول لون الوسط والزروعات الى لون قهوائي مائل الى السواد. يرجع ذلك الى مجموعة أسباب لعل أهمها تسرب فينولات (تُسمى ايضاً بالفينولات المُتعددة) من الجزء النباتي المقطوع والمزروع على الوسط الغذائي مما يُسبب في تغيير لونه وينتشر كذلك في الجزء النباتي وخلايا الكالس المُستحثة. الفينولات عبارة عن مركبات كيميائية لها حلقة آروماتية وفيها واحدة أو أكثر من مجموعة الهيدروكسيل. تميل الفينولات للذوبان بالماء وتتحد عموماً مع السكر مكونةً كلايكوسيدات وتتمركز في الغالب في فجوات الخلية. الفينولات مُركبات عديدة أهمها Doparnine، Chlorogenic acid، Cinnamic acid، Hydroxylbenzoic، Resorcinol، Pyrogallic acid، Salicylic acid، Coumurin وغيرها. تتسبب تلك المركبات الفينولية بشكل رئيسس عن تفاعلات الإسمرار وتسبب في هلاك الزروعات. ينتج عن أكسدة الفينولات مركبات الكوينينات (Quinins) الضارة بالنسيج النباتي. يُعالج الإسمرار الناتج من أكسدة الفينولات نتيجة نشاط إنزيمات Polyphenolases بالمعاملة بمواد مضادة للأكسدة مثل حامضي الستريك والأسكوربك وبتراكيز 100-150 ملغم/لتر بعد تنقيع الأجزاء النباتية في محاليلها لعدة دقائق. وَجِد بأن خليط محلول مكون من 1 غم من سترات البوتاسيوم و 0.25 غم من

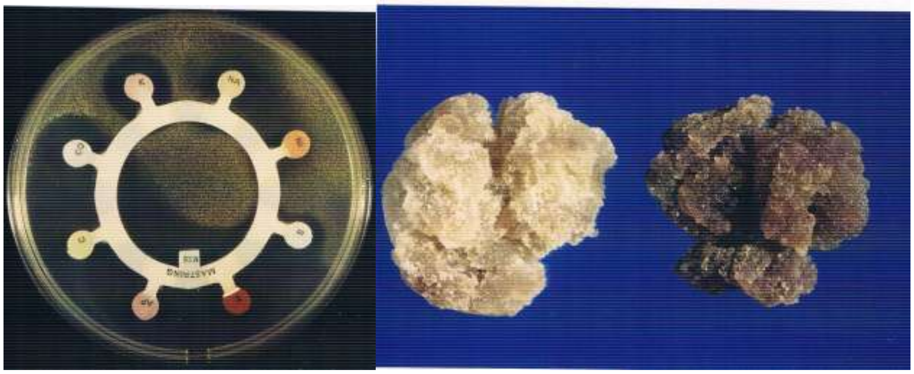
السترات بعد إذابتهما في 10 مل من الماء المقطر المعقم وتخفيف التركيز ليكون المحلول الخزين بتركيز 0.125%، ذات فعالية مضادة للأكسدة والتخلص من الإسمرار عند تنقيع الأجزاء النباتية لعدة دقائق وبمدى من التراكيز تراوح من 0.1-0.5 ملغم/مل. يلجأ الكثير من العاملين الى شطف الأجزاء النباتية في ماء حنفية جاري للتقليل من محتواها الفينولي والقسم الآخر يُنقع الأجزاء النباتية لفترات قد تصل الى 24 ساعة قبل تعقيمها سطحياً وزراعتها وخاصة للأنواع النباتية ذات المحتوى العالي من المركبات الفينولية مثل أنسجة النخيل (شكل 3.18).



شكل 3.18. الإسمرار في المزارع النسيجية لنخيل التمر (*Phoenix dactylifera*). (a) كالس جنيني ويظهر الإسمرار في الأنسجة القديمة. (b) تقليل التلوث بعد نقل الكالس الجنيني الى وسط جديد. (c) التخلص من الإسمرار بإستعمال مضادات الأكسدة. (d) أجنة جسمية جاهزة للتطور الى نبيتات بعد التخلص من الإسمرار.

المُسببات المرضية: ترجع مصادر التلوث في الزروعات الى عدة أسباب، فعدم أخذ الإحتياطات اللآزمة في أثناء التعقيم السطحي للأجزاء النباتية، إصابة الأجزاء النباتية بمُسببات مرضية غير مرئية داخل أنسجتها (Endogenous contamination) لا تؤثر فيها المطهرات السطحية، وإستعمال أدوات لم تُعقم جيداً، عدم تعقيم منضدة سريان الهواء الطبقي قبل البدء بالعمل ولربما تلف مرشحات Heapa filters. احياناً لا تصل درجة حرارة المعقام الى درجة الحرارة والضغط المطلوبين عند تعقيم الأدوات والأوساط الغذائية، التلوث بسبب إهمال العاملين وعدم مراعاتهم شروط التعقيم التام من تلوث الأيدي وعدم لبس القفازات وغطاء الرأس. يتعدى الأمر أحياناً الى تلوث جو المختبر ككل بسبب تيارات الهواء أو دخول أشخاص غير مخولين وغير ذلك من الأسباب. يكون مصدر التلوث في الغالب إما بكتيري أو فطري حيث يمكن الكشف عن الأول بغضون 2-3 يوم بالنظر لسرعة إنقسام خلايا البكتريا أو تستغرق عدة أيام في حالة التلوث الفطري. تنتج

أغلب شركات البذور مُنتجات غير مُخصصة للزراعة النسيجية فتكون البذور مصدراً للتلوث عندما تكون أنسجتها الداخلية مصابة (شكل 3.19).



شكل 3.19. (يمين) إسمرار أنسجة كالس نبات السجاد (*Coleus blumei*) نتيجة تلوث داخل البذور ينتقل الى البادرات ومن ثم الى الأجزاء النباتية المطلوب زراعتها نسيجياً تُسببه بكتريا نوع *Coryneform* لايؤثر فيها التعقيم السطحي والتخلص منه بعد إضافة أحد المُضادات الحيوية المناسبة الى الوسط الغذائي حيث يتم تثبيط نمو البكتريا داخل أنسجة الكالس (الكالس الذهبي). تظهر الإصابة عند فصل أجزاء نباتية من البادرات النابتة من البذور حيث تنتشر الى أنسجة الكالس المُستحثة والى الوسط الغذائي. (يسار) إستعمال قرص الحساسية من المُضادات الحيوية (Sensitivity disc) لتحديد المُضاد الحيوي الأكثر تثبيطاً لنمو البكتريا وعلى اساس التركيز المثبت على ذراع القرص يتم حساب كمية المضاد الحيوي اللازمة لقتل البكتريا.

التخلص من ظاهرة الإسمرار في المزارع النسيجية Elimination of browning in tissue cultures

من المؤكد إذا كان السبب تلوث بالأحياء المجهرية، فعندئذٍ تكون الوقاية خيرٌ من العلاج من خلال البحث عن نباتات أُمهات ذات نمو نشط وخالية نظرياً من المُسببات المرضية والحشرية وغيرها. وبخلافه يتم البحث عن مُضاد حيوي او فطري يكون فعالاً في التخلص من المُسبب. تُتبع مجموعة إستراتيجيات للتخلص من الإسمرار المُتسبب من تسرب الفينولات من الجزء النباتي مع مراعاة النوع النباتي في إختيار طريقة مُعالجة الإسمرار، يُمكن تلخيصها كما يلي:

1- الغسل والتنقيع للأجزاء النباتية بالماء لحين تسرب أكبر كمية مُمكنة من المُركبات الفينولية. 2- تجنب إضافة النتروجين والكلوريد الى الوسط لأن الإجهاد الذي تُسببه يُحفز إنتاج الفينولات وبذلك تكون ألمعاملة بمُضادات الأكسدة قليلة التأثير في منع الإسمرار.

3- إستعمال أجزاء نباتية في مرحلة الحداثة (Juvenile) وتجنب القديمة.

4- النقل المُتكرر للجزء النباتي أو الكالس مع بداية ظهور الإسمرار الى وسط جديد.

5- تغطية مواقع قطع الجزء النباتي بالسليكون التجاري لمنع تسرب الفينولات الى الوسط.

6- إضافة مادة Polyvinylpyrrolidone (PVC) الى الوسط الغذائي. وقسمٌ يضيف نترات الفضة كمُثبط لتصنيع الأثيلين الى الوسط الغذائي وبتركيز 1-50 مايكرومول/لتر. وَوجِدَ بأن خليط من نترات الفضة وثايوسلفات الفضة مُفيداً في التخلص من الإسمرار. يُضاف 20 مل من 0.1 مولار من نترات الفضة الى 80 مل من 0.1 مولار من ثايوسلفات الصوديوم وخليط الثايوسلفات المعقد الناتج ذو تأثير تثبيطي قوي يوقف من تصنيع الأثيلين ويقلل من الإسمرار وتدهور الأنسجة.

7- إضافة 0.3% من الفحم المنشط الى الوسط.

8- الشطف بمُضادات الأكسدة وإضافتها الى الوسط بمقدار 100 -150 ملغم/لتر من حامضي الستريك والأسكوربيك ولمدة 5 دقائق. أشارت بعض البحوث الى رفع تركيز حامض الأسكوربيك الى 500 ملغم/لتر. يعمل مضاد الأكسدة كواهب للالكترونات يقوم بتثبيط عمل المواد المُتحللة بالحرارة عند تعقيم الوسط الغذائي.

9- تجنب إستعمال الآت قطع حارة في قطع الأجزاء النباتية.

10- إستعمال أوساط غذائية سائلة بدل الصلبة وبسرع إهتزاز واطئة (حوالي 100 rpm) بحيث تُحافظ على كيان الكالس داخل الوسط السائل.

11- تجنب تجريح الجزء النباتي أكثر من المطلوب.

12- نشوء الزروعات في الظلام لتجنب كافة تفاعلات الأكسدة الضوئية (Photooxidation). وخاصة في السبعة أيام الاولى ويُفضل في ذات الوقت حضنها على درجة حرارة مُنخفضة (حوالي 4 °م).

13- تعزيز الوسط بنترات البوتاسيوم (KNO_3) بدل نترات الأمونيوم وتقليل التركيز بشكل تدريجي.

14- عدم غلق أنابيب الزراعة غلقاً مُحكماً والسماح للزروعات بالتبادل الغازي إذ يُقلل ذلك من تراكم الأثيلين و CO_2.

عموماً، لكل مختبر بروتوكولاته في الحد من الإسمرار حسب النوع النباتي والجزء المُستعمل في الزراعة.

الفصل الرابع: مُركبات الايض الثانوي للنبات

Plant Secondary Metabolites

الخلايا النباتية كمصدر لمُركبات الايض الثانوي

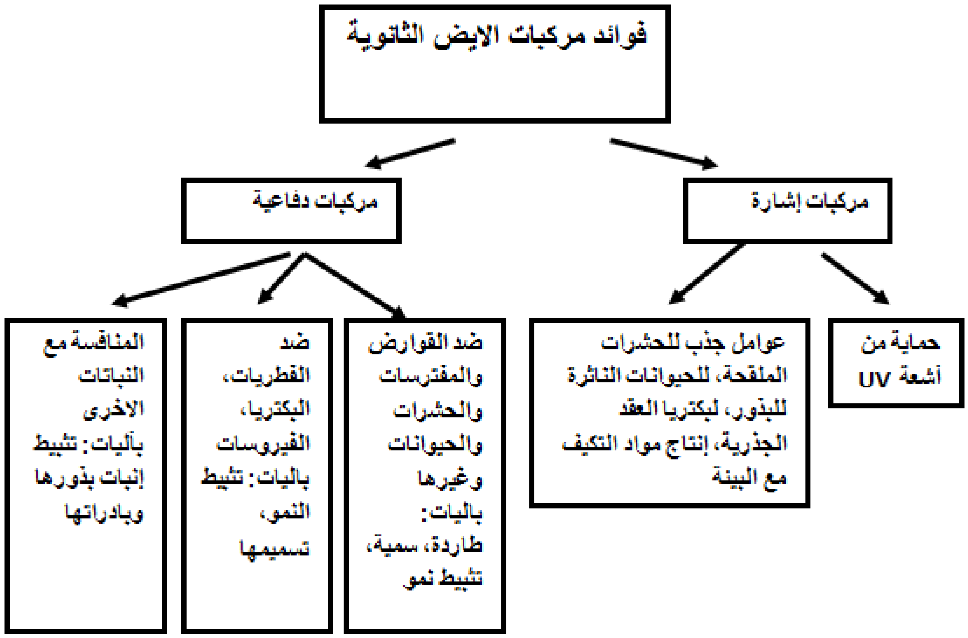
يُصنع النبات أعداداً كبيرة من المُركبات الكيميائية ذات أدوار فسيولوجية مُتنوعة. يَستفاد النبات من مصادر طبيعية رخيصة ومتوفرة في محيطه من هواء وماء وعناصر معدنية وطاقة شمسية. يُطلق على المُنتجات النباتية عموماً بالمُركبات الكيميائية نباتية الأصل (Phytochemicals) ويهتم مختصو التقانات الأحيائية بالإنتاج الواسع للمُركبات المُهمة إقتصادياً. تُقسم المُركبات التي ينتجها النبات بشكل عام الى مجموعتين تُدعى الأولى بمُركبات الايض الأولية (Primary metabolites) ومُركبات اخرى تدعى بمركبات الايض الثانوي (Secondary metabolites) ولكلٍ منها خصائصها (جدول 4.1).

جدول 4.1. خصائص مُركبات الايض الأولي والثانوي

التسلسل	مُركبات الايض الأولي	مُركبات الايض الثانوي
1	ضرورية للنمو والنشوء	لايحتاجها النبات في النمو والنشوء
2	لاعلاقة لها في التنافس بين النباتات	تستفاد منها النباتات في التنافس بينها وضرورية لبقاء المجتمع النباتي
3	تتشابه في خصائصها	تختلف في خصائصها
4	تحافظ على خصائصها وثابتة	مُختلفة ومتكيفة حسب ظروف النمو
5	ذات تغاير وراثي محدود	ذات تغاير وراثي واسع المدى
6	تُنتج بكميات كبيرة ورخيصة الثمن	تُنتج بكميات قليلة وغالية الثمن
8	تراكيبها ابسط نسبياً ويُمكن تصنيعها مختبرياً	تراكيبها معقدة ومن الصعب تصنيعها مختبرياً

تُسمى مُركبات الايض الثانوي أيضا بالمُنتجات الطبيعية (Natural products) ويُعتقد بان أكثر من مائة ألف مُركب ثانوي وبتراكيب مُختلفة تصنعها الكائنات الحية وبإنتاج سنوي يُقدر بحوالي 10^9مليون طن سنوياً. علماً بان ما يقارب من 80% منها وجِدت في النباتات واستعملت كمواد صيدلانية، أغذية، تغذوية وصحية معاً، منكهات، الوان، توابل، عطور، مواد جاذبة للملقحات، مواد تطلقها النباتات لمنافسة غيرها أو طردها، مواد تطلقها لأغراض التعايش مع غيرها من الكائنات، مُركبات إستجابة لعوامل الإجهاد ولربما لوظائف أُخرى والمشار لها في شكل 4.1. ويُعتقد بان المُركبات الثانوية تُزيل سُمية المواد التي تتراكم في

مواد الايض الأولي وقد تنتج إشارات كيميائية لتنسيق عمليات الايض عموماً في النباتات. ومن الجدير بالذكر ان لمُركبات الايض الثانوي وظائف بيئية وفسلجية يُمكن تلخيصها باختصار وكالاتي:



شكل 4.1. الوظائف البيئية والفسلجية لمُركبات الايض الثانوية.

وظائف مُركبات الايض الثانوية

1- كمُركبات ينتجها النبات للدفاع عن نفسه عند التعرض للاجهادات الحيوية واللاحيوية.

- ضد القوارض (الحشرات، العناكب، الفقريات) مسببةً في طرد، ردع، سمية، تثبيط النمو.

- ضد الجراثيم (بكتريا، فيروسات، فطريات وغيرها) مسببةً في تثبيط نموها، سميتها.

- منافسة النباتات (تثبيط انبات البذور، تثبيط نمو البادرات).

2- حماية الكائنات الحية من تاثير الأشعة فوق البنفسجية.

3- مراكز خزن للنتروجين.

4- جذب الحشرات مما يُساهم في زيادة فرص تلقيح أزهارها وفي زيادة فرصة إنتشار بذورها.

5- تشجيع بكتريا العقد الجذرية على التكاثر مما يُساهم في زيادة تثبيت النتروجين الجوي.

ولابد من الإشارة هنا الى ان العديد من التحولات الاجتماعية والسياسية والإقتصادية التي حصلت في حياة الجنس البشري كان سببها الرغبة في الحصول أو إستثمار نباتات مهمة إقتصادياً كالتوابل، المطاط، القهوة، الشاي، التبغ، الكاكاو، المُخدرات وغيرها. التنوع الكيميائي في النباتات ليس محظ الصُدفة بل يكون من خلال مسالك تصنيعية مُسيطر عليها ومُرتبطة بعمليات الايض داخل خلايا النبات ويجب فهمها جيداً قبل الشروع بوضع خطة لزيادة الإنتاج. إضافة الى إنها نتاجاً للتعبير الوراثي لمجين النبات يخضع تحت السيطرة التطورية له. تُصنع أغلبها نتيجة مسالك بايولوجية وراثية وفسلجية منتجةً واحد أو أكثر من مُركبات الايض المفتاحية (Key metabolites) ومن خلال الأخيرة تشتق العديد منها بتحولات إنزيمية. يحصل التصنيع الحيوي لهذه المُركبات في الغالب في عضوٍ أو نسيج نباتي بطريقة مُحددة وقد تُنتج تحديداً في وقت محدد من المرحلة التطورية للنبات وقد يرافق ذلك إنتقال بطريقة معلومة الى أعضاء الخزن. ينتج التنوع الهائل في مُركبات الايض الثانوي في الطبيعة بثلاثة ملامح رئيسة أولها حُرية ودرجة عالية لتشكيل مُركبات كيميائية وثانيهما وجود مسالك حيوية مُحددة واخيراً حصول أمْثَلة إنزيمية (Enzyme optimization). يزداد الطلب على مُركبات الايض الثانوي وبشكل مضطرد وقد يُواجه الطلب المتزايد بندرة توفرها لأسباب عدة منها عدم توفر النباتات المُنتجة، لظروف مناخية قاسية، إنتشار الآفات، عدم الاستقرار السياسي في مناطق زراعة النباتات المُنتجة، سوء الاستعمال والاستثمار المفرط لها مما يُقلل من أعدادها.

وهناك العديد من النباتات المُهمة طبياً مُهددة بالإنقراض في مواقع نشوئها (Natural habitats) على سبيل المثال لا الحصر *Lithospermum erythrorhizon*، *Hydrastis canadensis*، *Cephaelis ipecacuanha*، *Rauwolfia serpentine*، *Podophyllum peltatum*، *Artemisia genipi*، *Taxus spp.* وغيرها.

الفوائد المتوخاة من إنتاج المُركبات الثانوية من مزارع النبات النسيجية

1- إمكانية إنتاجها تحت ظروف مُسيطر عليها وتسويقها في الوقت المُناسب عند وجود طلب من السوق المحلية أو العالمية عليها.

2- لا تتأثر أنظمة الزراعة الحديثة المتبعة في إنتاجها كالمزارع النسيجية بالعوامل البيئية كالتغايرات الفصلية من موسم لآخر، إنتشار الآفات الحشرية والمرضية والادغال، إضافة الى عدم تأثر طرائق إنتاجها بالعوائق الجغرافية والسياسية.

3- إمكانية السيطرة على نمو الخلايا لتسهيل تكوين المُنتج وزيادته أو التسريع في إنتاجه بإستعمال العديد من وسائل التقانات الأحيائية وكما سياتي لاحقاً.

4- المُحافظة على نوعية المُنتج خاصة عند إستعمال خطوط خلوية مُحددة مما يرفع من قيمته التسويقية وبإنسيابية مستقرة.

5- تُعد المزراع النسيجية مصدراً مُهماً لمُركبات الايض الثانوي خاصة في النباتات صعبة النمو حقلياً وكُلفة إنتاجها عالية. أنتجت مزارع كالس نبات حصى البان (*Rosmarinus officinalis*) ذات الأهمية الطبية مادة الثايمول وبمقدار ستة أضعاف ما ينتجه نفس الوزن من النبات الكامل النامي حقلياً.

6- تراكم مُركب الابجينين في مزارع المُعلقات الخلوية لنبات حصى البان بمقدار سبعة اضعاف مقارنة بالنبات الكامل.

7- تضاعف إنتاج مُركب الكويسترين في مزارع كالس نبات حصى البان بعد تجهيز الوسط الغذائي 100 مليمولر من ملح كلوريد الصوديوم.

8- إمكانية إنتاج وتطوير خطوط خلوية طافرة ذات إنتاجية لمُركبات جديدة ذات أهمية صيدلانية وتسويقية قد لا تتوفر في مزارع نسيجية أُخرى.

9- إمكانية الاستفادة من تفاعلات التحول الحيوي (Biotransformation reactions) أي تحول أوساط معلومة (Substrates) الى مُركبات ذات قيمة دوائية عالية لخطوط خلايا مُحددة.

10- تستغرق أقل وقتاً واقل جهداً وايدي عاملة عند إنتاجها.

وعند الاخذ بالفوائد اعلاه فأن ما يقارب حالياً 25-30% من الادوية المُخصصة لعلاج الانسان والعديد من المُنتجات الكيميائية التي تحتاجها الصناعة قد أُنتجت من مزارع النبات النسيجية. وعموماً فان إنتاج المُركبات الثانوية بهذه الطرائق أقل كُلفة مقارنة بالمُنتجة صناعياً منها. وهذا لا يعني عدم وجود بعض المُحددات المتعلقة بالمزارع النسيجية منها:

1- قد تنتج المزارع النسيجية للنبات مُركبات ثانوية أقل مقارنة بالنبات الكامل.

2- تتكون المُركبات الثانوية وفي أنواع نباتية عديدة في الأنسجة المُتخصصة أو في أعضاء النبات وليس في أنسجة الكالس والمُعلقات الخلوية وقد تكون إنتاجية الأخيرة قليلة.

3- تحتاج المزارع النسيجية الى رج مستمر لمنع تكتل الخلايا مما قد يؤدي الى تلفها وإنخفاض إنتاجيتها حيت تميل الخلايا الى الإنتاج في الوضع المستقر.

4- وجوب المُحافظة التامة على ظروف تعقيم، اي تلوث يصيب المزارع النسيجية يؤدي الى تلف المنتوج وخسارة إقتصادية.

وعلى ضوء ما توفر من أدلة فيما يخص مواقع إنتاج المُركبات الثانوية، يبدو ان مواقع إنتاجها مُرتبطة بالتمايز الشكلي (Morphological differentiation) لتلك الاعضاء فعلى سبيل المثال تتراكم مُركبات Cariac glycosides في أوراق نبات الديجيتالس بينما يراكم قلف (Bark) نبات السنكونا (Cinchona) مُركبات الكوينين والكوينيدين في الوقت الذي يراكم نبات الاتروبا (*Atropa*) مُركبات أتروبينية (كالاتروبين) في جذوره.

إستعمالات مُنتجات الايض الثانوي

إعتمد الانسان ومنذ القدم على المُنتجات النباتية كغذاء ودواء. وتشمل مُنتجات النبات مُركبات ايض ثانوي استعملها الانسان ولايزال كمصدراً للمُركبات الصيدلانية، منكهات، عطور، كيميائيات زراعية ومواد خام للاغراض الصناعية. ومن الناحية الكيميائية، فالمُنتجات الثانوية قد تكون قلويدات، تربينات، كلايكوسيدات (ستيرويدات، مواد فينولية) وغيرها. وعند توفر مُنتجات النبات الطبيعية فانها تُعد مصدراً مفضلاً على المستحضرات الصيدلانية المحضرة صناعياً. وحسب تقارير مُنظمة الصحة العالمية (WHO)، ما يقارب من 70-80% من سكان العالم يعتمد على الطب البديل من نباتات الاعشاب. ومن المعلوم ان العديد من المُركبات الكيميائية المعقدة والتي يصعب إنتاجها صناعياً، يُمكن ان تنتجها النباتات. إضافة الى ان المُنتجات الكيميائية النباتية المُتخصصة ذات قيمة صناعية وتسويقية تقدر ببلايين الدولارات سنوياً. واذا ما تم إستثمار الفرص التي توفرها زراعة أنسجة وخلايا النبات في هذا المجال، فسيشهد العالم إنخفاضا كبيرا في اسعار الادوية بالنظر لإمكانية إنتاجها داخل مُفاعلات حيوية بسعات تصل الى الاف الالتار. إذا ما قورن توظيف التقانات الحديثة المتمثلة بزراعة خلايا وأنسجة واعضاء النبات إذا ما قورنت مع الطرائق الاخرى وكما موضح في أدناه.

الزراعة الحقلية أو في مشتل: المزايا؛ 1- تساعد في المُحافظة على التنوع الأحيائي. **2-** إحتياجات قليلة من درجات الحرارة المنخفضة لكسر طور السكون في البذور. **3-** كُلفة إنتاج مُنخفضة.

العيوب: موسم نمو النباتات قصير. 2- مشاكل يتعرض لها النبات بسبب الأمراض والحشرات والقوارض. 3- لاتوجد سيطرة على الظروف المناخية.

الزراعة المحمية: المزايا؛ 1- قد تحتاج الى إضاءة إضافية والسيطرة على الظروف الجوية. 2- تصاب بالأمراض والحشرات وغيرها. 3- تساهم في تقليل التنوع الأحيائي.

العيوب: 1- إحتياجات أكثر من الطاقة. 2- كُلفة عمل أعلى مما عليه عند الزراعة في الحقول المكشوفة. 3- كُلف إنشاء وصيانة عالية للمنشآت المحمية.

زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات: المزايا؛ 1- إمكانية التحوير الوراثي لزيادة تصنيع المُركبات الثانوية. 2- إمكانية الإكثار الدقيق والحصول على نباتات خالية من المُسببات المرضية وغيرها. 3- إمكانية إضافة البوادئ والمُظهرات الى مزارع النبات النسيجية وبالتالي زيادة الإنتاج. 4- ألإنتاج الواسع بإستعمال المُفاعلات الحيوية. 5- السيطرة التامة على الظروف البيئية مما يصب في زيادة الإنتاج ونقأوة المنتج. 6- إمكانية ألإستفادة القصوى من التكنولوجيا في مكننة الإنتاج.

العيوب: 1- تحتاج الى جهد عمل عالي وخبرة. 2- الكُلف الأولية لإنشاء المشروع عالية. 3- كلف إستمرارية العمل عالية بالنظر للحاجة المُستمرة للأوساط الغذائية والتعقيم. 4- عدم إستقرارية إنتاجية الخطوط الخلوية مما يستدعي التخلص المُستمر للخطوط واطئة الإنتاج وإكثار العالية منها. 5- تكون إنتاجية الخلايا أو الأنسجة أو ألأعضاء مُنخفضة داخل المُفاعلات الحيوية.

وبالرغم من تسجيل المئات من المُركبات الثانوية سنويا من مصادر نباتية، الا أن أغلبها ليست ذات أهمية تجارية بالنظر لتوافرها بكميات قليلة جداً في النبات الكامل ولقلة الطلب عليها صناعياً ودوائياً. تتجه الانظار ثانية صوب الزراعة النسيجية والتي أصبحت وسيلة لا يُستغنى عنها في إنتاج تلك المُركبات ذات التطبيقات المُختلفة (جدول 4.2). ومما تجدر الإشارة اليه بان قسماً من المُركبات الثانوية تكون باهضة الثمن لقلة توافرها داخل أنسجة النبات والكُلفة العالية لإستخلاصها وتنقيتها ولربما بسبب الإحتكار الصناعي للمعرفة (Knowhow) فسعر الكيلوغرام الواحد من الفنكريستين والفنبلاستين يصل الى ثلاثة ملايين ونصف مليون دولار أمريكي على التوالي. وبالنظر للتزايد المُتسارع في الإكتشافات نتيجة تطور طرائق التقانات الأحيائية، فقد حان الوقت لتوفير تلك المُنتجات وخاصة ما يتعلق بغذاء وصحة الانسان والحيوان والبيئة.

جدول 4.2. مُركبات ايض ثانوي مع إستعمالاتها والتي أُنتجت بتقانة زراعة أنسجة النبات.

المُنتج	النوع النباتي	الاستعمال
شيكونين	*Lithospermum erythrorhizon*	صبغات، مُستحضر صيدلاني
كودين، مورفين	*Papaver somniferum*	مُسكن للألم
كنين	*Cinchona officinalis*	ضد الملاريا
أتروبين	*Atropa belladonna*	إسترخاء العضلات
دجوكسين	*Digitalis lanata*	معالجة تشوهات عضلات القلب
ريسربين	*Rauwolfia serpentine*	تقليل التوتر العصبي
دايوسجنين	*Dioscorea deltoidea*	لمنع الخصوبة
فانلين	*Vanilla sp*	إنتاج الفانيلا
ياسمين	*Jasmium sp*	عطور
فنبلاستين، فنكريستين	*Catharanthus roseus*	مضاد لمرض السرطان
تاكسول	*Taxus brevifolia*	مضاد لمرض السرطان
باكارين	*Baccharis megapotanica*	مضاد لمرض السرطان
سيسلاين	*Caesalpinia gillisesii*	مضاد لمرض السرطان
فكارونين	*Fagara zanthoxyloides*	مضاد لمرض السرطان
ميتانسين	*Maytenus bucchananii*	مضاد لمرض السرطان
هيرانجتونين	*Cephalotaxus harringtonia*	مضاد لمرض السرطان
ثاليكاربين	*Thalictrum dasycarpum*	مضاد لمرض السرطان
إلبتسين، 3- دي أوكسي كولشسين	*Ochrosia moorei*	مضاد لمرض السرطان

بريثرين	*Tagetes, Chrysanthemum*	مضاد حشري
روتينودس	*Derris elliptica, Tephrosia sp*	مضاد حشري
نيكوتين	*N. tabacum,N.rustica*	مضاد حشري
سافرون	*Crocus sativus,*	لون ونكهة
ستيفيوسايد	*Stevia rabaudiana*	مُحلي
ثوماتين	*Thaumatococcus damielli*	مُحلي
كابساسين	*Capsicum frutesus*	حرافة المذاق
حامض الروزمارنيك	*Coleus blumei*	توابل ومضاد اكسدة
انثركوينين	*Morinda citrifolia*	مُلَينْ
بريبيرين	*Coptis japonica*	مُضاد بكتيري
سركوبلازمين (هيوسين)	*Datura stramonium*	مُعالجة الغثيان
زيوت أساسية	*Rosmarinus officinalis*	مضاد للأحياء المجهرية

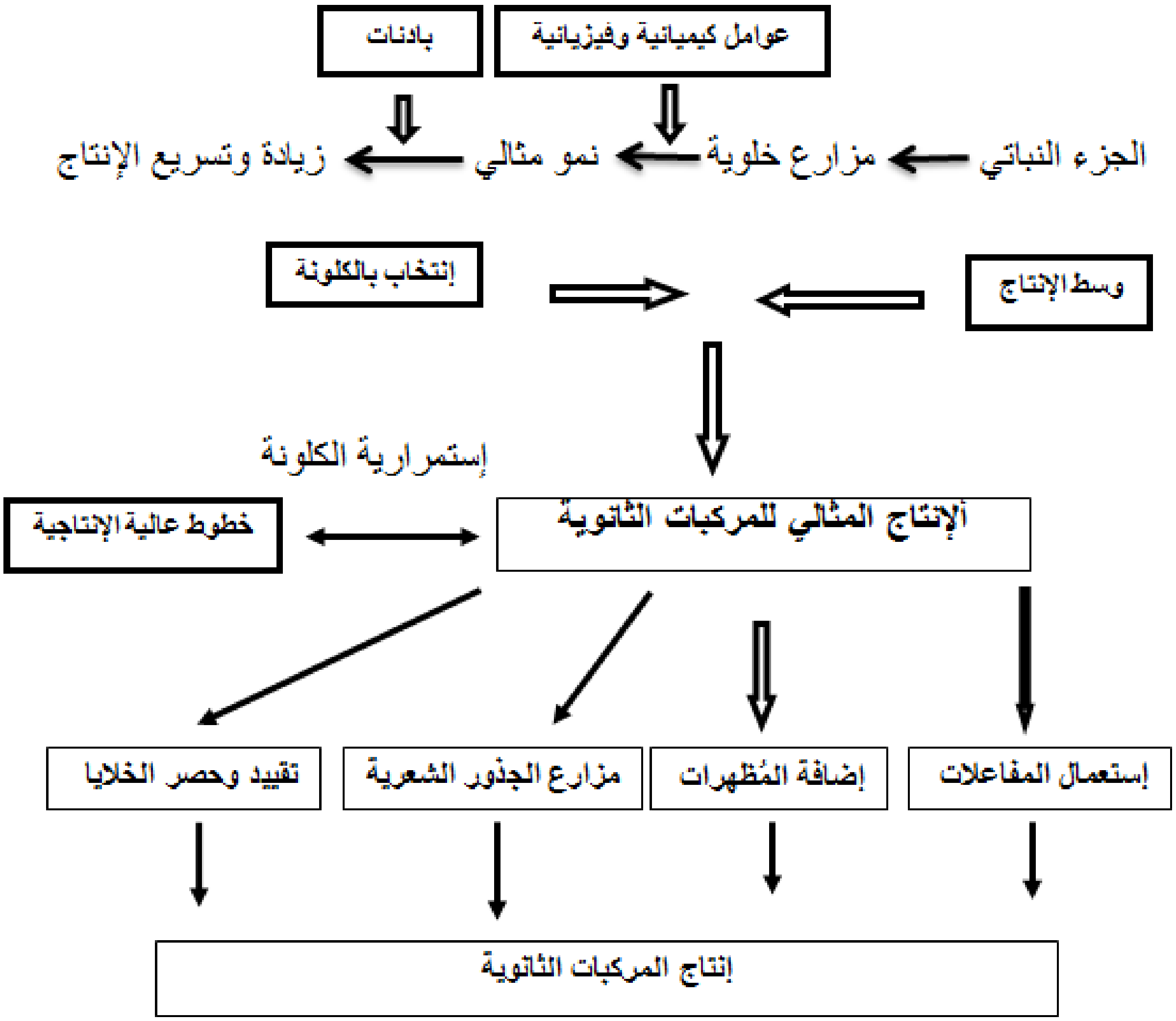
إنتاج مُركبات الايض الثانوي في مزارع النبات النسيجية

تشتمل تقنيات إنتاج مُركبات الايض الثانوي من مزارع النبات النسيجية على نطاق تجاري مجموعة من الخطوات (لاحظ شكل 4.2) والتي لابد من توافرها وكالاتي:

1- - إنتخاب الخطوط الخلوية عالية الإنتاجية.

2- تنمية أعداد كبيرة من الخلايا داخل مُفاعلات حيوية خاصة بالخلايا النباتية وكما سيرد لاحقاً. 3- تنمية الخلايا في وسط غذائي وهرموني يُحقق أعلى معدلات نمو للخلايا. 4- إضافة مُحفزات (Elicitors) الى الوسط الغذائي بما يزيد من إنتاجية الخلايا النباتية. 5- السيطرة الكاملة على الظروف البيئية التي يتطلبها الإنتاج المثالي للخلايا. 6- إتباع أنظمة التحول البيولوجي (Biotransformation) بإستعمال الخلايا

النباتية. 7 - جمع المنتوج وتحليله وتنقيته بعد معرفة فيما اذا يُنتج داخل الخلايا أو يطلق الى الوسط الغذائي أو قد يتراكم بين الخلايا.



شكل 4.2. الإستراتيجيات المُختلفة التي يُمكن من خلالها زيادة أو تسريع إنتاج مُركبات الايض الثانوي والمقترحة من قبل Ramawat (2008).

توظف المزارع النسيجية لإنتاج كميات كبيرة من مُنتجات الايض الثانوي بالرغم من ان مزارع الكالس والمُعلقات الخلوية في كثير من الاحيان لاتنتج مُستويات أعلى من النبات الكامل. يُعزي الباحثون ذلك الى نقص التمايز الكامل لذلك النوع من الخلايا. لذلك وظفت بعض التقانات لغرض زيادة إنتاج المزارع النسيجية من خلال إنتخاب خطوط خلوية عالية الإنتاجية من المُركبات المرغوبة (شكل 4.3). يحصل ذلك بعد فصل

الخطوط عالية الإنتاجية عن نظيراتها مُنخفضة الإنتاجية واستبعاد الأخيرة والذي يتم عادة بطرائق مرئية (Visual) أو بعد إجراء تحليلات كيميائية لمحتويات الكتل الخلوية. تُجرى عملية فصل الخلايا المنتجة عن غيرها بتقانة إكثار الخلايا (Cell cloning) وهي طريقة بسيطة تُنمى فيها خلايا مُفردة تُسحب في الغالب من المُعلقات الخلوية على وسط غذائي مُناسب.

وبعد تكوين الخلايا المُفردة لمُجتمعات خلوية (كتل خلوية)، عندئذٍ تُغربل كل كتلة خلوية على إنفراد وتُحدد أنواع وكميات المُركبات الثانوية التي تحتويها. وبذلك تُعزل الخطوط عالية الإنتاجية ويُعاد زراعتها ويُحافظ على إدامتها وكما مُوضح في الشكل 4.2. تبدأ العملية بإنتخاب نبات عالي الإنتاجية بالمُركب أو المُركبات المرغوبة وبإتباع الطرائق الصحيحة في زراعة أنسجة وأعضاء النبات إبتداءاً من إختيار الجزء النباتي وتعقيمه وزراعته على وسط نشوء الكالس. يُمكن عند هذه المرحلة تشخيص قطع الكالس المُنتجة ونقلها الى وسط سائل حيث تُنشأ مزارع المُعلقات الخلوية لِيُنقل منها لُقاحات (Inoculums) مُناسبة ونشرها (Plating) على وسط صلب. وعندما يكون حجم اللقاح مُناسباً، تنقسم الخلايا مُكونةً مستعمرات خلوية غالباً تكون قد أُشتقت من خلايا مُفردة خاصة إذا تم غربلة اللقاح بغرابيل خاصة بذلك. تقسم كل كتلة خلوية الى قسمين حيث يتم التحري عن نوع وكمية المُركبات الثانوية في القسم الأول بينما يُزرع القسم الثاني لغرض إكثاره. تُعزل الخطوط الخلوية عالية الإنتاجية وتُنمى داخل دوارق إذا كان الهدف تجريبي بينما تُنقل الى مُفاعلات حيوية إذا كان الهدف الإنتاج التجاري.

أمثلة على إنتاجية المزارع النسيجية من مُركبات الايض الثانوي

تمت دراسة تراكم الجلايكوسيدات الصابونية الاستيرويدية في كالس نبات الحلبة وقورنت محتويات الكالس مع محتوى النبات النامي في الحقل والنباتات التي اعيد توالدها من الكالس (جدول 4.3). انخفضت كمية مُركب الياموجنين على سبيل المثال بشكل معنوي في مزارع الكالس مقارنة مع النبات الكامل والنباتات المتوالدة من الكالس في الوقت الذي زاد تراكم الديوسجنين في مزارع كالس نبات الحلبة حوالي خمسة أضعاف عما هو عليه في النبات النامي في الحقل. عموماً لاتوجد قاعدة ثابتة يُمكن الإستناد عليها وليس بالضرورة ان تعطِ المزارع النسيجية كميات عالية من مُركبات الايض الثانوية.

جدول 4.3. مقارنة تراكم ثلاثة مُركبات من الكلايكوسيدات الصابونينية الاستيرويدية (ملغم/غم مادة جافة) لعينات من نبات حقلي، نبات متوالد نسيجياً ومزارع كالس نبات الحلبة.

الكلايكوسيدات	نباتات نامية في الحقل	نباتات مُنتجة نسيجياً	مزارع الكالس
ياموجنين	0.1035	0.2396	0.0451
دايوسجنين	0.1037	0.2184	1.009
تايجوجنين	0.0920	0.3842	0.4179

عزل الخلايا المنتجة للمُركبات الثانوية عن غير المنتجة

يُمكن تشخيص الخلايا المُنتجة للمُركبات الثانوية ذات الالوان كالصبغات مثل بيتا كاروتين والشكونين بصرياً وبهذا يتم إنتخاب الخلايا عالية الإنتاجية (شكل 4.3). تتميز الطريقة البصرية بسهولتها وغير مُحطمة للخلايا الا انه لايُمكن الإعتماد عليها في حالة التحري عن خطوط الخلايا ذات المُركبات الثانوية غير المُلونة. مع العلم ان بعض المُركبات الثانوية تشع الفلورسين (اللصف) عند تعريضها الى الأشعة فوق البنفسجية وبهذا يُمكن تشخيصها.

وعند تعذر الكشف عن الخطوط ذات الإنتاجية العالية بالطريقة البصرية، يُمكن عندئذٍ إستعمال طريقة بسيطة وحساسة ورخيصة تقدر فيها كمية المُركب المرغوب كمياً فيتم التحليل الكيميائي لبعض المُستعمرات الخلوية الناتجة من خلايا مُفردة. تُستعمل غالبا الطريقة المناعية الراديوية (Radioimmunoassay) كطريقة تحليلية وقد تُستعمل تقانة المقياس الطيفي الدقيق (Microspectrophotometry) وتقنيات مضادات الاجسام الفلوروسينية. يتم أحياناً إنتخاب خلايا مُعينة تمتاز بمقأومتها لمُركبات سامة وينتج منها خلايا طافرة بعد تعريضها للمُركب السام. وقد تنتج تلك الطوافر مُركبات ايض أولي بكميات عالية لِتنتج بدورها مُركبات ايض ثانوي بكميات كبيرة.

إنتخاب نبات عالي الإنتاجية يحتوي على المُركب الثانوي المرغوب

زراعة الجزء النباتي

نشوء مزارع الكالس

إنتخاب كتل الكالس عالية الإنتاجية

النقل الى المُعلقات الخلوية

غربلة الخلايا ونشرها على وسط صلب

تقسيم الكتلة الى قسمين، يخضع الأول للتحليل الكمي والثاني تُعاد زراعته على وسط الإدامة

يُنقل الجزء المُنتج الى دوارق لغرض إكثاره كمُعلقات خلوية

يُنقل الى مُفاعلات حيوية بهدف الإنتاج التجاري

شكل 4.3. خطوات إنتاج خطوط خلوية نباتية عالية الإنتاجية من المُركبات الثانوية.

وُظفت التقانة الأخيرة في زيادة إنتاج الحامض الأميني التربتوفان بعد تعريض خلايا نباتية الى مُركب 5-مثيل التربتوفان (النظير للتربتوفان) السام للخلايا. مما أنتج خطوط خلايا طافرة ذات إنتاجية عالية من التربتوفان وبالتالي زيادة في إنتاج إندول حامض الخليك (IAA) الذي يُشتق من المسار الحيوي للتربتوفان.

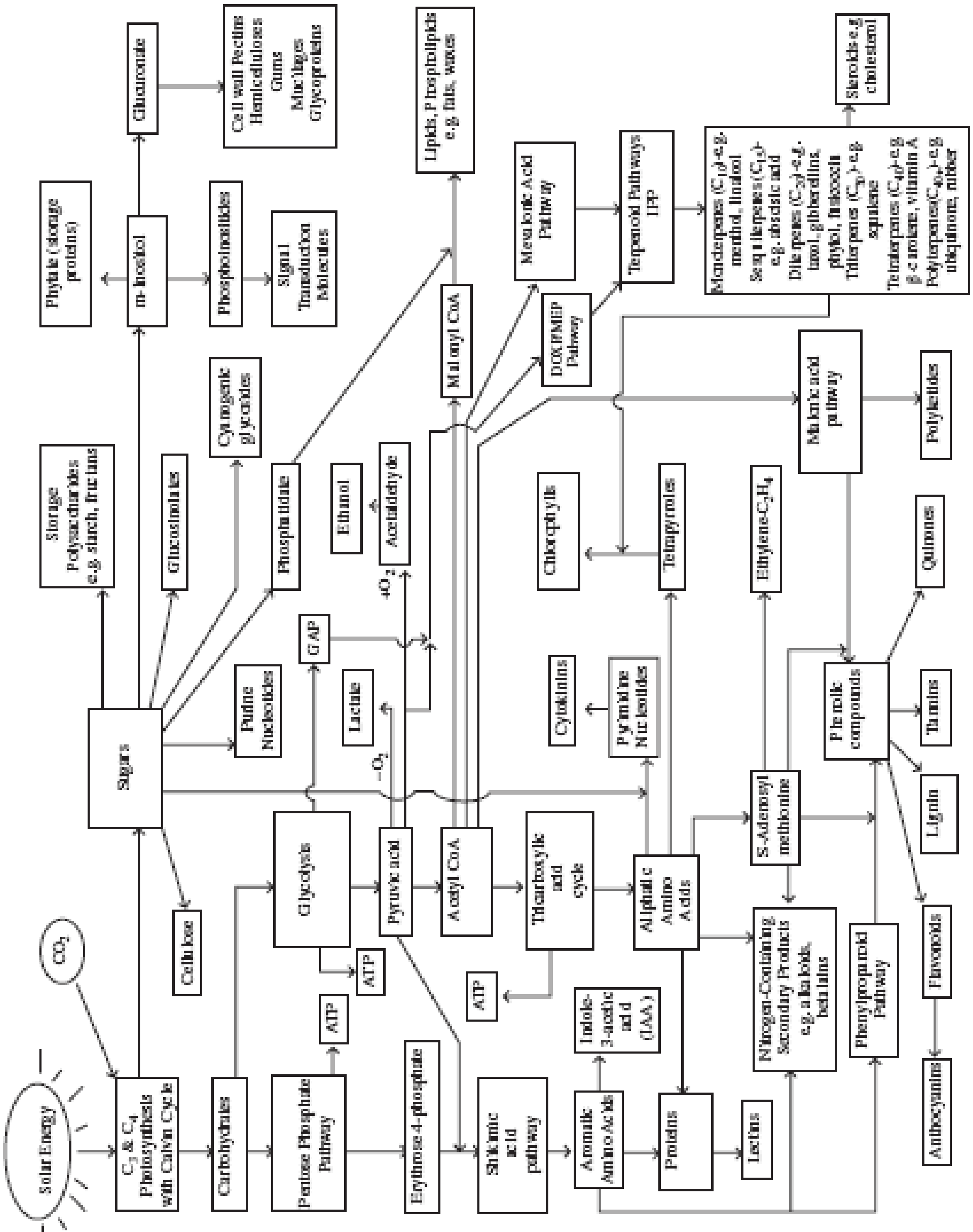
لابد للمختص في ايض مُركبات النبات الأولية والثانوية ان يدرك المسالك الحيوية لتلك المُركبات إبتداءاً من نواتج التركيب الضوئي وإنتهاءاً بالمُركبات الثانوية (شكل 4.4) متبعاً تلك المسارات لكي يُمكنه التداخل في المسلك الحيوي المطلوب دراسته وزيادة إنتاجيته. تبدأ السلسلة من أشعة الشمس مصدر الطاقة التي تسقط على الأجزاء الخضراء من النبات وبوجود غاز CO_2 بغزارة في مُحيطنا الجوي والماء الذي يُشكل حوالي أكثر من 80% من وزن النبات. تقوم البلاستيدات المنتشرة داخل الخلايا بقنص الضوء من خلال صبغة اليخضور (الكلوروفيل) وبوجود CO_2 والماء لتصنع المُركبات الأولية التي تحتاجها المخلوقات كغذاء بعد سلسلة من التفاعلات التي تجري بهدوء وبوسط مُتعادل الحموضة ومائي ولا يُسبب هذا المعمل الضخم اي ضجيج ولا دخان وصديق للبيئة لحد كبير. السكريات هي المحطة الأولى التي تنطلق منها المسالك الحيوية لينتج في النهاية ما هو غذاء ودواء ومُركبات أُخرى تفيد كافة المخلوقات.

يَستوجب إنتاج كميات كبيرة من مُركبات الايض الثانوي، زراعة أحجام كبيرة من الخلايا النباتية. فالأخيرة أكبر من خلايا البكتريا والفطريات بمقدار 10-100 مرة. وتُظهر خلايا النبات المزروعة تغيراً في شكلها وحجمها إضافة الى بطئ سرعة إنقسامها ونموها وعدم إستقرارها وراثياً مما يستوجب ذلك الاخذ بنظر الاعتبار ما سبق عند زراعة الخلايا النباتية.

ثانياً: نظام تقييد مزارع الخلايا (Immobilized cell cultures)

بالإمكان تقييد حركة خلايا النبات وتوظيفها في إنتاج المُركبات الثانوية اي انها من الناحية الفيزيائية تكون داخل مصيدة (Entrapment) لتقليل حركتها. ويُمكن حصر خلايا مُنفردة أو مجاميع من الخلايا وحتى قِطع من الكالس وأكثر ما يُناسب هذا النظام من الزراعة هي المُعلقات الخلوية المُتجانسة. هناك ثلاث طرائق على الاقل لحصر الخلايا يُمكن وصفها بإختصار كما يلي:

أ- حصر الخلايا بوساطة الهُلام (Entrapment of cells in gel): يُمكن حصر خلايا البروتوبلاستات بأنواع عديدة من الهُلام مثل؛ الالجنيت، الاكار، الاكاروز، الكاراجينين.



شكل 4.4. **المسالك الحيوية في تصنيع المُركبات الثانوية من الأولية من خلال مُركبات:** acetyl-CoA, shikimic acid, mevalonic acid and amino acids.

وقد يستعمل هلام منفرد أو أكثر لغرض حصر الخلايا. وعموماً تتشابهه تقانة تقييد الخلايا النباتية مع تلك المُستعملة في تقييد خلايا الكائنات الدقيقة من حيث المبدأ.

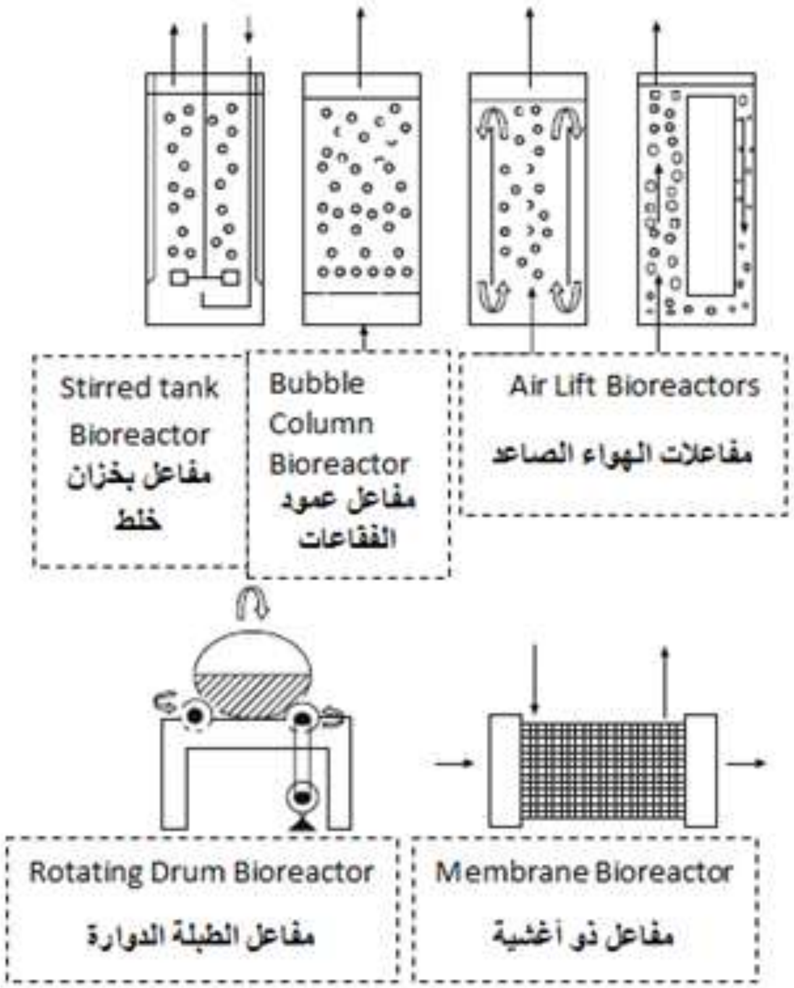
ب- حصر الخلايا في شبكات أو رغوات (Entrapment of cells in nets or foams): تُستعمل رغوات من مادة متُعدد اليوريثين (Polyurethane foams) أو شبكات بأقطار مُختلفة. إذ يُمكن تقييد خلايا النبات سريعة الانقسام خاصة النامية في المُعلقات الخلوية على تلك الرغوات حيث تنقسم الخلايا وتشكل كتل خلوية ضمن المساحات البينية للرغوة.

ج- حصر الخلايا في أغشية من الألياف المجوفة (Entrapment in hollow fiber membranes): تُستعمل ألياف إنبوبية مُجوفة مُكونة من أسيتيت السيليلوز وكاربونات السيليكون المُتعددة حيث يتم تنظيمها على شكل حزم مُتوازية لهذا الغرض. وبالرغم من أن الحصر بالأغشية يوفر إستقرارية ميكانيكية للخلايا أكثر من طريقتي التقييد بالهُلام والرغوة الا انها أكثر كُلفة منهما.

إقترح الباحثون في هذا المجال إستراتيجية في إنتاج مُركبات ايض النبات الثانوي للإنتاج التجاري وكما موضحة في شكل 4.4. تبدأ الاستراتيجية بإنتخاب الصنف أو النوع الأكثر إنتاجيةً والافضل نوعيةً ويكثر داخل البيوت الزجاجية أو الحقل ويُمكن إدخاله في أنظمة الزراعة النيسجية أو هندسته وراثياً بهدف زيادة إنتاجه من مُركبات الايض الثانوي. إضافة الى إمكانية توظيف المُفاعلات الحيوية لهذا الغرض وكما سبقت الإشارة اليه.

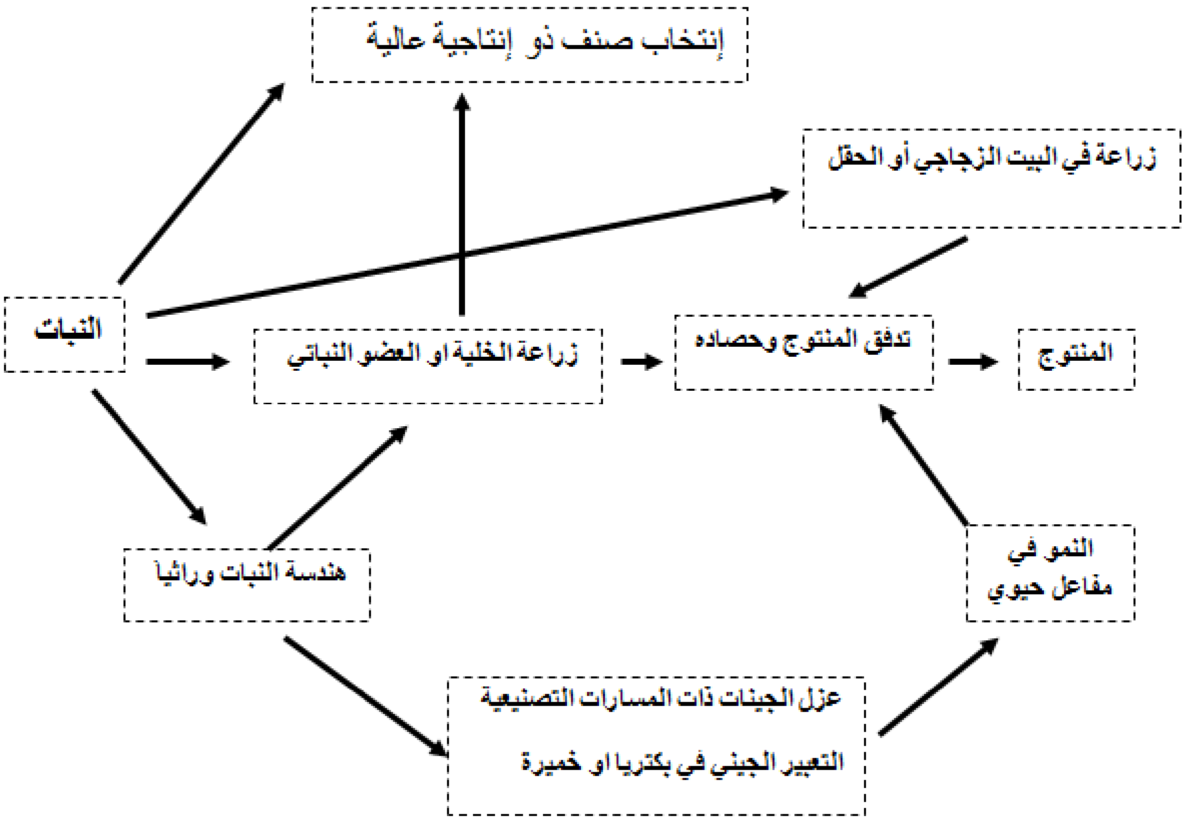
المُفاعلات الحيوية وتقييد الخلايا النباتية Bioreactors and pant cell immobilization

طُورت مُفاعلات حيوية متخصصة للخلايا النباتية (شكل 4.5) بناءاً على متطلبات الأخيرة إذ تميز خلايا النبات بكبر حجمها وحساسيتها لقوى القص (Shear stress) مما يجعلها حساسة لتركيز الأوكسجين. يزداد حاصل الخلايا النباتية عندما تكون في حالة مستقرة وان تكون متكتلة مع بعضها ولذلك تُستعمل تقانات التقييد في الخلايا النباتية والتي غالباً غير متبعة في أنظمة الأحياء المجهرية. تعطي الخلايا النباتية أعلى إنتاجية لها عندما تكون تحت الاجهاد ولهذا السبب تُحصد في مرحلة توقف النمو (Stationary phase) من منحنى نمو الكالس أو المعلق الخلوي لأن الوسط الزرعي يكون قد إستنزف أغلب المغذيات (Nutrient depletion) واصبحت الخلايا تحت إجهاد نقص التغذية.



شكل 4.5. مجموعة من المُفاعلات الحيوية المُستعملة في تنمية الخلايا النباتية وإنتاج مُركبات الايض الثانوية.

تُستعمل مُفاعلات حيوية ذات مهاد من الموائع (Fluidized beds) أو يستعمل نوع من المهاد الثابتة (Fixed beds) لغرض تقييد الخلايا وإنتاجها بكميات كبيرة. تُرج الخلايا النباتية في النوع الأول من خلال سريان الهواء فوقها أو بعد ضخ الهواء الى الوسط. بينما في المهاد الثابتة، تُمسك الخلايا لتكون مُستقرة أي غير متحركة وتُرش بوسط غذائي مهوى وبمُعدلات بطيئة. أُنتجت العديد من المُركبات بعد تقييد الخلايا ومن نباتات مُختلفة (جدول 4.4). توضع عادةً إستراتيجية متُعددة المراحل (شكل 4.6) إبتداءاً من إنتخاب النبات المرغوب ووضع برنامج مُتكامل لإكثاره نسيجياً مع إمكانية هندسته وراثياً لكي يحقق أعلى إنتاجية من مُركبات الايض الثانوية.



شكل 4.6. بعض إستراتيجيات إنتاج مُركبات الايض الثانوي.

ثالثاً: الزراعة بإستعمال نظام ثنائي الطور (Two-phase system culture) تُزرع الخلايا في هذه الطريقة بنظام السائل ذو الطورين عند إنتاج مُركبات الايض الثانوي التي تفرزها الخلايا الى الوسط. عند إستعمال هذه التقانة، تُفصل الخلايا المُنتِجة عن المنتوج داخل المفاعل الحيوي مما يُوفر فائدة كبيرة وذلك لإمكانية حصاد المنتوج بإستمرار بمعزل عن الخلايا. أُستعملت أنواع مُحددة من البوليمرات لفصل الطورين اي الخلايا عن المنتوج مثل الدكستران، الكلايكول متُعدد الاثيلين ونجحت التقانة في فصل المُركبات الفينولية عن الخلايا التي أنتجتها.

رابعاً: مزارع الجذور الشعرية (Hairy root cultures)

تُنشأ مزارع الجذور الشعرية لغرض إنتاج المُركبات الثانوية التي تتراكم في الجذور وما يُميز مزارع الجذور الشعرية، معدلات نموها العالية وثباتيتها الوراثية. ولإنتاج تلك المزارع، يُحقن الجزء النباتي

المفصول من النبات كالأوراق مثلاً وتعقم سطحياً وتُلقح بالبكتريا الممرضة *Agrobacterium rhizogenes* بعد زراعتها على وسط النمو المُناسب.

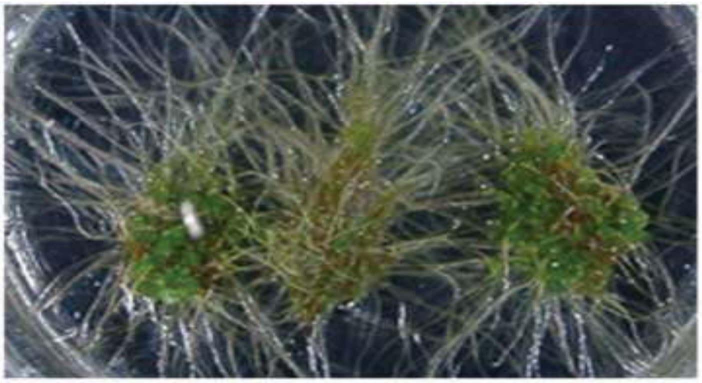
جدول 4.4. مجموعة مُنتخبة من النباتات وظفت مزارعها النسيجية في إنتاج المُركبات الثانوية بعد إستعمال تقانات التقييد.

النوع النباتي	طريقة التقييد	الوسط (Substrate)	المنتوج
Catharanthus roseus	**أكاروز**	**كاثين أماين**	**أجمالسين**
Digitalis lanata	**ألجنيت**	**ديجيتوكسن**	**ديجوكسن**
Capsicum frutescens	**رغوة بولي يوريثين**	**سكروز**	**كابساسين**
Catharanthus roseus	**الجنيت، أكاروز، كاراجينين**	**سكروز**	**أجمالسين**
Petunia hybrid	**ألياف مجوفة**	**سكروز**	**فينولات**
Morinda citrifolia	**ألجنيت**	**سكروز**	**أنثراكوينون**
Solanum aviculare	**المسك بكرات من الفينيلين المتُعدد**	**سكروز**	**كلايكوسيدات ستيرويدية**
Glycine max	**ألياف مجوفة**	**سكروز**	**فينولات**

تحمل البكتريا بلازميد تحفيز تكوين الجذور (Root inducing plasmid) وإختصاراً Ri المُسبب للتحول الوراثي داخل أنسجة النبات وينتج عنه تكوين شعيرات جذرية بكثافة عالية (شكل 4.7). تُحصد الجذور الشعرية وتكون حاوية على مُركبات ثانوية مشابهه لتلك المتوافرة في الجذور الاعتيادية.

B- إخلاف نباتات من مزارع الشُعيرات الجذرية والتي تُعد مصدر معقم يوفر مادة نباتية على مدار السنة لإنتاج مُركبات الايض الثانوي. تُعد تقانة مزارع الجذور الشعرية مُناسبة للعديد من الأنواع النباتية (جدول 4.5) وسهلة نسبياً لانها تعتبر مزارع أعضاء (Organ cultures) ودخلت الإنتاج التجاري في عدد من مصانع الادوية.

(A)



(B)

شكل 4.7. مزارع الشُعيرات الجذرية كمصدر لمواد الايض الثانوي. A- أجزاء نباتية مفصولة من الأوراق حُفِزت على تكوين الشُعيرات الجذرية بعد إصابتها ببكتريا *A. rhizogenes*. B- إخلاف النبات المُحور وراثياً.

تأثير مُكونات الوسط في إنتاج مُركبات الايض الثانوي

يحصل نمو الخلايا في المزارع النسيجية عند توفر مستلزمات الانقسام والنمو لها من مغذيات ومُنظِمات نمو وأية إضافات أُخرى والتي تؤثر جميعاً على فعاليات الايض داخل الخلايا. ولتحقيق إنتاجية مُثلى من مُركبات الايض الثانوي، يفضل إنتاج الخلايا النباتية في وسط يكون الأمثل في زيادة الكتلة الحيوية (Biomass growth medium) بعدها تُنقل الخلايا الى وسط الإنتاج الذي يُحقق أعلى إنتاجية من المُركب المرغوب (Production medium). علماً بانه ليس بالضرورة أن يكون وسط تحفيز الكالس أو وسط

الإدامة مثاليان لإنتاج المُركبات الثانوية وبذلك يتم تجريب العديد من مُنظِمات النمو والمُضافات الأُخرى من إجل الحصول على وسط الإنتاج.

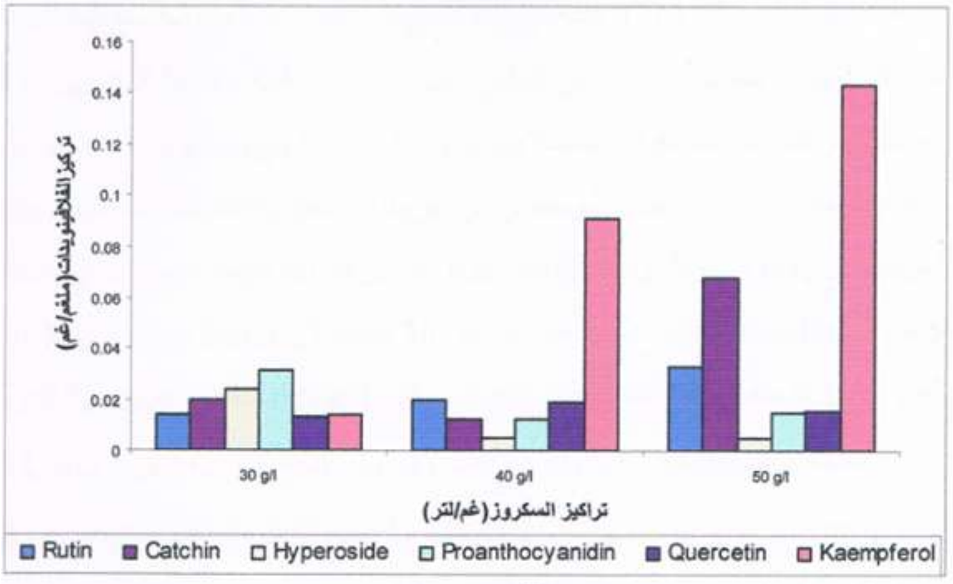
جدول 4.5. أنواع نباتية مُنتخبة وُظِفت لإنتاج مُركبات الايض الثانوي من مزارع الجذور الشعرية

النوع النباتي المُستعمل كمصدر للجزء النباتي	مواد الايض الثانوي المُنتجة
Nicotiana tabacum	نيكوتين، أناتابين
Atropa belladonna	أتروبين
Datura stramonium	هيوسيامين
Lithospermum erythrorhizon	شيكونين
Catharanthus roseus	أجمالسين، سربنتين
Cinchona ledgeriana	قلويدات الكينين
Mentha vulgaris	تربينات احادية
Solanum laciniatum	قلويدات ستيرويدية

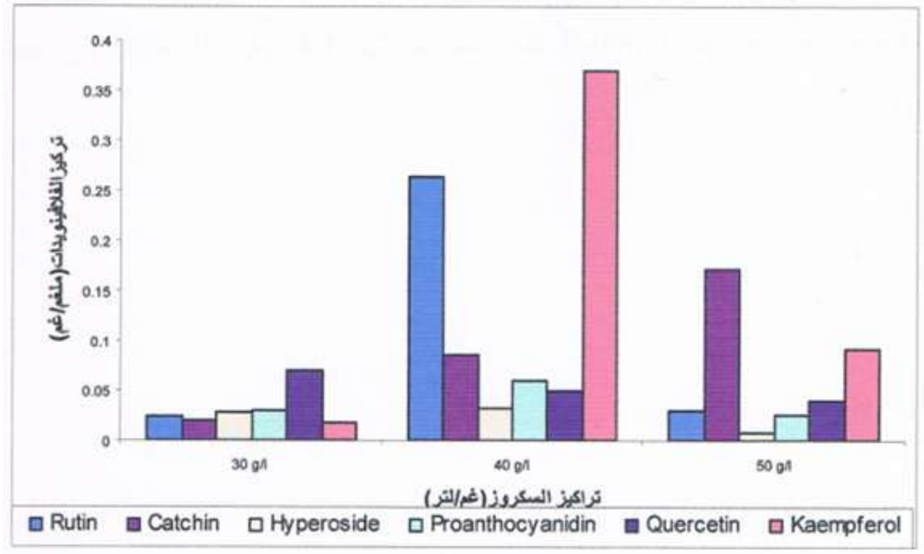
تؤثر مُكونات الوسط عموماً كمصدر الكربون والنتروجين، الفوسفات، مُنظِمات النمو، البادئات، المُحفزات، الفيتامينات والمُضافات وغيرها في تذبذب إنتاج المُركبات الثانوية.

تأثير مصدر الكربون (Carbon source): يؤثر مصدر الكربون عموماً في إنتاج المُركبات الثانوية، فعلى سبيل المثال فان زيادة السكروز في وسط الإنتاج الى 4-10% أدى الى زيادة في إنتاج القلويدات في المزارع النسيجية لنبات *Catharanthus roseus*. ووِجِدَ أيضاً بان إضافة السكروز كمصدر كربوني كان أفضل من الفركتوز والكالكتوز عند إنتاج الدايوسجنين من المزارع النسيجية لنباتي *Dioscorea deltoidea* و *Dalanites aegyptiaca*. كما سُجلت زيادة في مُركب 10- Ubiquinone من المزارع النسيجية للتبغ عند إضافة مُستويات مُنخفضة من السكروز الى الوسط الغذائي المنماة فيه. درس تاثير

إضافة تراكيز مُختلفة من السكروز في تركيز الفلافينودات (شكل 4.8) بوجود أو عدم وجود الضوء في المزارع النسيجية لنبات الروجة (*Hypericum perforatum*) وتبين حصول زيادة معنوية في مُركب بروانثوسيانيدين في الظلام وبوجود 40 غم/لتر من السكروز بينما تراكم مُركب كامبفيرول في الزروعات المُعرضة للضوء المُستمر وبكميات عالية جداً بعد إضافة 50 غم/لتر من السكروز.



A



B

شكل 4.8. تأثير تراكيز مُختلفة من السكروز في تركيز الفلافينويدات بوجود الضوء (A) وبإنعدام الضوء (B).

تأثير مصدر النتروجين: من المعتاد إضافة خليط من الامونيا والنايتريت للوسط الغذائي كمصدر النتروجين. وتتحمل غالبية الخلايا النباتية المُستويات العالية من الامونيا حيث تستثمر الخلايا النتروجين في تصنيع الأحماض الأمينية والبروتينات ومنها الإنزيمات والأحماض النووية. ومن المعلوم بان النتروجين يحتوي على مُركبات أولية تؤثر مُباشرة في تكوين مُركبات ثانوية. وعلى العموم فان التراكيز العالية من الامونيا تثبط تصنيع المُركبات الثانوية وتقليلها يزيد من إنتاجية الخلايا. وقد سُجِلَ تثبيط في إنتاج الانثوسيانين بنسبة 90% والقلويدات بنسبة 80% عند تجهيز الوسط الغذائي بنترات البوتاسيوم ونترات الامونيوم.

تاثير الفوسفات: تُعد الفوسفات غير العضوية أساسية في عمليتي البناء الضوئي والتنفس. وتُنتج العديد من المُركبات الثانوية من خلال مُركبات وسطية مفسفرة (Phosphorylated intermediates) والتي بدورها تُحرر الفوسفات. فتتحرر على سبيل المثال مُركبات الفينيل بروبانويد، التربينات والتربينويدات. والملاحظ بشكل عام بان المُستويات العالية من الفوسفات تشجع الخلايا على الانقسام والنمو وتصنيع المُركبات الأولية في الوقت نفسه فان المُستويات المُنخفضة من الفوسفات مُفيدة جداً في إنتاج المُركبات الثانوية ولو أن الحالة لايُمكن تعميمها. وسجل العديد من الباحثين نتائج مُتناقضة بخصوص مُستويات التراكيز المُضافة من الفوسفات الى الوسط الغذائي فقد تُزيد أو تُقلل أو قد لاتؤثر في إنتاج مُركبات الايض الثانوي وادناه ثلاثة أمثلة على ذلك:

أ- إزداد إنتاج القلويدات عند زيادة تركيز الفوسفات في المزارع النسيجية لنبات عين البزون *Catharanthus. roseus* وكذلك حصلت زيادة من مُركب انثراكوينون في المزارع النسيجية لنبات *Morinda citrifolia* وكذلك مُركب الدايوسجنين في مزارع *Dioscorea deltoidea*.

ب- إزدادت صبغة الانثوسيانين والفينولات في المزارع النسيجية لنبات *C. roseus* عند تقليل مُستوى الفوسفات في الوسط إضافة الى حصول إرتفاع في إنتاجية مزارع نبات الحرمل (*Peganum harmala*) من القلويدات ومُركب السولاسودين في المزارع النسيجية لنبات *Solanum lanciatum*.

ج- لم تؤثر زيادة أو تقليل مُستويات الفوسفات في إنتاجية قلويد البروتوبربرين في المزارع النسيجية لنبات البربريس *Berberis sp.* ولكن سُجلت حالات في تاثير الفوسفات والفسفور العضوي وغير العضوي في إنتاجية العديد من المُركبات الثانوية.

تأثير مُنظِمات النمو النباتية

تؤثر مُنظِمات النمو النباتية من أوكسينات وسايتوكاينينات في إنقسام الخلايا وفي عمليات الايض المُختلفة وفي إخلاف النبات من مزارعه النسيجية. ذكرت العديد من البحوث العلمية بان لنوع مُنظم النمو وتركيزه تأثيراً في إنتاجية المزارع النسيجية من مُركبات الايض الثانوي (جدول 4.6)، فعلى سبيل المثال لا الحصر ندرج التقارير التالية:

1- سَرّعت إضافة الأوكسينات إندول حامض الخليك، اندول حامض البايروفيك ونفثالين حامض الخليك الى الوسط الغذائي للمزارع النسيجية لنبات بلح الصحراء (*Balanites aegyptiaca*) من إنتاج مُركب الدايوسجنين.

2- ثبطت إضافة الأوكسينات في بعض الحالات من إنتاج بعض مُركبات الايض الثانوي كتثبيط تصنيع الانثوسيانين في مزارع الجزر بعد تضمين الوسط بنفثالين حامض الخليك واندول حامض الخليك.

3- ثبطت إضافة الأوكسين 2, 4-D إنتاج القلويدات في المزارع النسيجية للتبغ وكذلك إنتاجية الشيكونين في مزارع نبات بذر الصخر (*Lithospermum erythrorshizon*) النسيجية.

4- شجعت إضافة السايتوكاينيات من إنتاج الاجمالسين (Ajmalcine) في مزارع *C. roseus* ومادتي سكوبولن (Scopolin) وسكوبولتين (Scopoletin) في مزارع التبغ النسيجية، إضافة الى مادة الكاروتين في المزارع النسيجية لنبات الخروع (*Ricinus sp.*).

5- ثبطت السايتوكاينينات من تكوين مُركبات الايض الثانوي في بعض المزارع النسيجية، أمثلة الانثروكوينينات في مزارع *Morinda citrifolia*، النيكوتين في مزارع التبغ والشيكونين في مزارع نبات *L. erythrorshizon*.

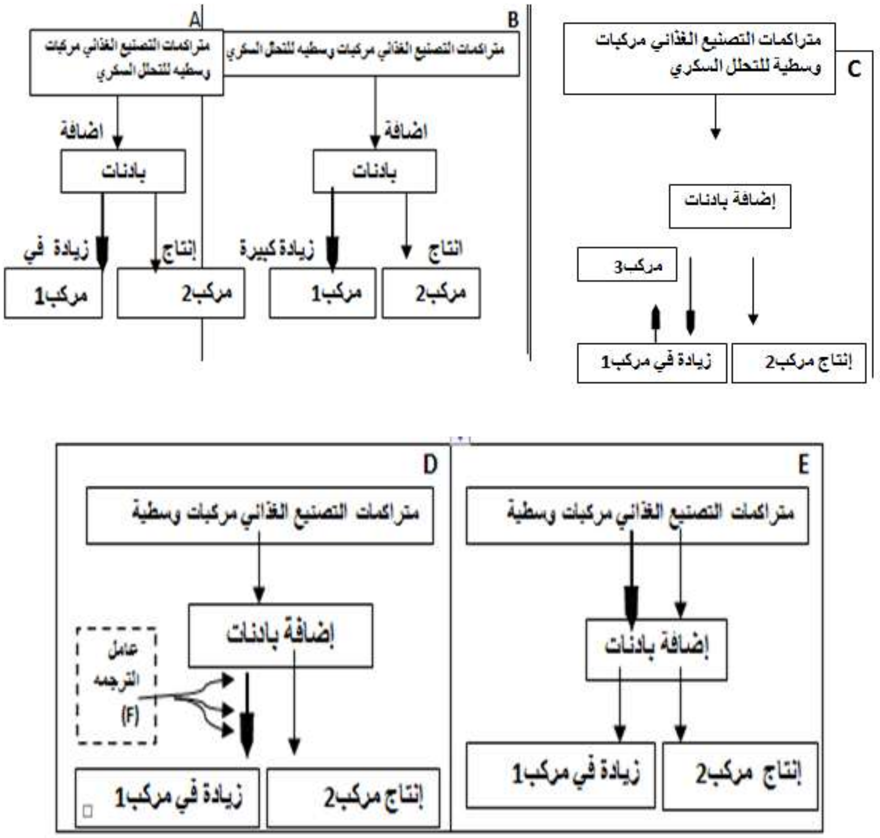
ويلاحظ من الامثلة أعلاه بان التأثير المدروس للأوكسينات والسايتوكاينينات كان مقتصراً على إضافة أحدهما دون الاخر، ولكن في واقع الحال يضاف الاثنان الى الوسط الغذائي كتوليفة وبذلك فقد يكون الامر مختلفاً. وعموماً شجعت التوليفات المُختلفة منهما في زيادة المُركبات الثانوية. ومن الواضح وجود تنوع واسع في مُنظِمات النمو النباتية وتكتشف بين مدة واخرى أنواع جديدة منها تحتاج الى الدراسة والتقصي من حيث تاثيرها على إنتاج المُركبات الأولية والثانوية.

جدول 4.6. زيادة إنتاجية المُركبات الثانوية لمجموعة من الأنواع النباتية بإضافة توليفات مُختلفة من مُنظِمات النمو النباتية

المزارع النسيجية لنباتات	الوسط وتوليفة منظمات النمو	المركب الثانوي
Psoralea cordifolia	MS+TDZ+BA	Isoflavones
Vitis vinifera	MS+IAA+GA3+UV	Resveratrol
Azadirachta indica	MS+2,4-D	Azadirachtin
Catharanthus roseus	MS+2,4-D+UV-B	Catharathine
Rauwolfia serpentina	MS+BAP+IAA	Serpentine
Rauwolfia serpentina	MS+IAA+Cu^{+2}	Reserpine
Stevia rebaudiana	MS+BA+NAA	Stevioside
Capsicum annum	MS+2,4-D+Kin	Capsaicin
Zataria multiflora	MS+IAA+Kinetin	Rosmarininc acid
Vitis vinifera	MS+BAP+NAA	Anthocyanin
Gymnema sylvestre	MS+2,4-D+IAA	Gymnemic acid
Gymnema sylvestre	MS+IAA+BA	Gymnemic acid
Catharanthus roseus	MS+2,4-D+GA3	Vincristine
Hydrocotyle bonariensis	2,4-D+Kinetin	Flavonoids
Daucus carota	IAA+Kinetin	Anthocyanin
Fabiana imbricate	MS+NAA+2,4-D	Rutin
Cichorinm intybus	NAA+Kinetin	Esculin, Esculetin
Capsicum annum	MS+2,4-D+GA3	Capsaicin
Cassia acutifolia	MS+2,4-D+Kinetin	Anthraquinones
Phytolacca americana	MS+2,4-D	Betacyanin
Taxus spp	B5+2,4-D+BA	Taxol
Catharanthus roseus	MS+IAA	Indole alkaloids
Gynostemma pentaphyllum	MS+2,4-D+BA	Saponin
Coscinium fenustratum	LS+NAA+2,4-D+BA	Berberin
Beta vulgaris	MS+IAA	Betalain
Anisodus luridus	MS+2,4-D+BA	Tropane alkaloids
Capsicum annuum	MS+2,4-D+Kn	Capsaicin
Catharanthus trichophyllus	MS+IAA+GA3	Indole alkaloids
Catharanthus roseus	MS+2,4-D+GA3+Vanadium	Indole alkaloids
Mucuna pruriens	MS+IAA	L-Dopa

تأثير البادئات (Precursors)

يُطلق على الجزيئات الأساس (Substrate molecules) والتي يُمكن تضمينها (Incorporated) الى مُركبات الايض الثانوي من خلال الوسط الغذائي وتزيد أو تُسرع (أو كليهما) في إنتاج المُركبات المرغوبة بالبادئات. تؤدي إضافة البادئات عموماً الى تسريع إنتاج مُركبات الايض الثانوي بالرغم من تثبيطها نمو الزروعات في حالات عدة (شكل 4.9).



شكل 4.9. إستراتيجيات زيادة وتسريع تكون المُركبات الثانوية المرغوبة من خلال التحوير الوراثي. يكون عموماً المسلك الحيوي منتظم لدرجة كبيرة (A). زيادة التعبير الإنزيمي في الخطوات المُحددة لسرعة التفاعلات مع عدم الحساسية في تنظيم مدخلات التفاعلات مما يزيد من إنتاجية المُركب المرغوب (B). ينتج عن إدخال فرع جديد في المسلك الحيوي مُركبات جديدة لاينتجها النبات في الحالات الاعتيادية (C). تعبير عامل الإستنساخ (TF) المسيطر على كامل المسلك الحيوي قد يزيد من تراكم المُركب (D). زيادة التجهيز بالبادئ للمُركب الأولي يكون ضرورياً في إنتاج المُركبات الثانوية المرغوبة (E).

فعلى سبيل المثال ازداد تصنيع القلويدات في مزارع الداتورا النسيجية ولكن قابل ذلك تثبيط في نمو الزروعات بعد إضافة الأورنثين، فينيل اللنين ، التايروسين أو فينيل بايروفيت الصوديوم. وازداد إنتاج الاجمالسين في مزارع *C. roseus* بعد تعزيز الوسط الغذائي بالبادئين تربتامين أوسيكولوجينين. حصلت زيادة كبيرة في تراكم حامض الروزمارينك في مزارع كالس نبات السجاد (*Coleus blumei*) عند تضمين وسط إدامة الكالس بمقدار 50 غم/لتر من السكروز مقارنة بالتراكيز الاقل من ذلك. تراكم حامض الروزمارينك ايضاً بكميات عالية في أجزاء من سوق نبات السجاد عند تضمين وسط MS السائل بمقدار 10 و 20 ملغم/لتر من البرولين.

ألمُظهرات وأثرها في زيادة إنتاج مُركبات الايض الثانوي (Elicitors)

المُظهرات عبارة عن مُركبات إما من أصل بيولوجي (Biotic elicitors) أو غير بيولوجي أي مُظهرات غير حيوية (Abiotic elicitors). وقد تُستعمل مُظهرات حيوية تنتجها النباتات داخلها (Endogenous) كالبكتين، وحامض البكتين، السيليلوز، إضافة الى السكريات المُتُعددة الاخرى. وفي حالة إنتاج المُظهرات من قبل الأحياء المجهرية فتسمى عندئذٍ بالمُظهرات الخارجية (Exogenous) أمثلة الكايتين، الكايتوسان والكلوكان. أما المُظهرات غير الحيوية فتشمل مُظهرات فيزيائية (Physical) كتعريض الزروعات الى البرودة، الحرارة، الأشعة فوق البنفسجية، الضغط الازموزي (الجدولين 4.8، 4.7).

أو تكون المُظهرات غير حيوية لتشمل عوامل كيميائية (Chemical agents) كالمُعاملة بالاثيلين، المبيدات الفطرية، المضادات الحيوية، أملاح المعادن الثقيلة. أُستعمل ملح كلوريد الصوديوم في العديد من المزارع النسيجية كعامل لاأحيائي رخيص الثمن (جدول 4.9) وزاد من إنتاجية المُركبات الثانوية التي أُضيف الى مزارعها النسيجية. أُضيفت بعض المُظهرات الى الوسط الغذائي لمزارع كالس نبات الوردية (جدول 4.10) بهدف زيادة إنتاج المُركبات الفينولية والتربينات وتحققت زيادات في أغلب تلك المُركبات. تنتج النباتات الكاملة أو مزارعها النسيجية كميات من المُركبات الثانوية لاتكاد تُلبي الحاجة لها بالنظر لكثرة إستعمالاتها. لذلك جرت محأولات كثيرة من قبل الباحثين وفي مختلف دول العالم لفهم آلية تكوين المُركب المطلوب على المُستوى الجزيئي وإستثماره في زيادة الإنتاج. ومن المعلوم بان تصنيع تلك المُركبات يشتمل تفاعلات ذات خطوات مُتُعددة يدخل فيها العديد من الإنزيمات ومن المؤكد ان تحفيز أية خطوة في هذه التفاعلات سينصب في زيادة الإنتاج.

جدول 4.7. تأثير إضافة المُظهرات اللاأحيائية في زيادة إنتاجية المزارع النسيجية من مُركبات الايض الثانوية

النوع النباتي	العامل اللاأحيائي	المركب الثانوي
Ocimum basilicum	Methyl jasmonate	Rosmarinic acid, Caffeic acid
Beta vulgaris	Calcium, magnesium, Zinc, Copper, Iron and Cobalt	Betalaine
Dioscorea bulbifera	CuSO4	Diosgenin
Beta vulgaris	Metal ions	Betalaines
Beta vulgaris	Polyamines	Betalaine
Taxus chinensis	Lanthanum	Taxol
Beta vulgaris and Tagetes patula	Micro algal extracts	Betalaine
Vitis vinifera suspension cultures	Jasmonic acid and light irradiation	Anthocyanin
Beta vulgaris	Spermidine, Putrescine and Cu^{+2} polyamines	Betalaine
Beta vulgaris	Polyamines	Betalaine
Brugsmansia candida	Salicylic acid	Scopolamine, Hyposcyamine
Lepidium sativum	Zn^{+2}	Lepidine
Cichorium intybus	Polyamines	Coumarins
Capsicum	Nitrate and phosphate	Capsaicinoids
Capsicum	Cinnamic acid, coumaric acid, caffeic acid and ferulic acid	Capsaicin production
Vanilla planifolia	Blue light	Vanillin
Amaranthus caudatus	Cu^{+2}	Betacyanins
Vitis vinifera	Sucrose osmotic stress	Anthocyanins

جدول 4.8. زيادة مُركبات الايض الثانوية في العديد من الأنواع النباتية بعد تعريض النباتات الى الإجهاد الجفافي

المركب الثانوي المُنتج	النوع النباتي
Glycosides	*Scrophularia ningpoensis*
Morphine alkaloids	*Papaver somniferum*
Trigonelline	*Glycine max*
Glucosinolates	*Brassica napus*
Chinolizidin alkaloids	*Lupinus angustifolius*
Epicatechins	*Camellia sinensis*
Betulinic acid	*Hypericum brasiliense*
Rutine	*Hypericum brasiliense*
Flavonoids	*Prisms sativum*
Anthocyanins	*Prisms sativum*
Chlorogenic acid	*Helianthus annuum*
Rosmarinic acid	*Salvia miltiorrhiz*

جدول 4.9. زيادة مُركبات الايض الثانوية في مجموعة من الأنواع النباتية بعد إضافة ملح كلوريد الصوديوم الى أوساط مزارعها النسيجية

النبات	المركب الثانوي المُنتج
Lycopersicon esculentum	Sorbitol
Sesamum indicum L.	GABA
Hordeum vulgare	Flavonoids
Lycopersicon esculentum	Jasmonic acid
Cakile maritime	Polyphenol
Datura innoxia	Tropane alkaloids
Grevillea sp.	Anthocyanins
Glycine max	Trigonelline
Trifolium repens	Glycinebetaine
Oryza sativa	Polyamines
Triticum aestivum	Glycine betaine
Cenchrus pennisetiformis	Sucrose and starch

جدول 4.10. تأثير إضافة بعض المُظهرات الأحيائية والاأحيائية في تراكم بعض المُركبات الفينولية والتربينية في مزارع نبات إكليل الجبل (الروزمري) النسيجية

تركيز المُركب (µg/ml)	محتوى الورقة	محتوى الكالس غير المعامل	0.4غم/لتر من $CaCl_2$	راشح 1مل/لتر *P. aeruginosa*	راشح 2مل/لتر *F. oxysporum*
حامض روزمارينك	3.3	3.7	4.3	3.9	4.5
حامض الكيفك	0.4	0.5	0.3	2.3	2.7
حامض كارنوسك	2.8	2.6	2.3	3.1	3.3
كارنوسول	1.7	1.9	0.6	2.4	2.8
روزمانول	4.3	4.2	4.6	0.8	0.9

ألفايتوألكسينات (Phytoalexins): تُحاول النباتات الدفاع عن نفسها عند مهاجمتها من قبل الأحياء المجهرية الممرضة من خلال إنتاجها مُركبات مضادة للجراثيم (Antimicrobial) يُطلق عليها بالفايتوألكسينات. والأخيرة تُعد بمثابة أسلحة كيميائية ضد المُسببات المرضية والعديد منها محفزاً لإنتاج المُركبات الثانوية لكونها تدخل من ضمن المُظهرات. وهناك مواد كيميائية تعمل كمُحفزات مثل الاكتينومايسين د (Actinomycin D)، أملاح الصوديوم، رايبونيوكلييس أ (Ribonuclease-A) كايتوسان، بولي لايسين (Poly-L-lysine)، ناجيران (Nigeran).

تداخلات تكوين المُظهرات: تتضمن المُظهرات، مُركبات تتداخل بين النبات والأحياء المجهرية وتحصل ثلاثة أنواع من التداخلات تؤدي الى تكوينها وهي:

1- إطلاق المُظهر مُباشرة من قبل الأحياء الدقيقة.

2- قد تعمل الإنزيمات الميكروبية كمُحفزات مثل إنزيم Endopolygalacturonic acid lyase الذي تُنتجه بكتريا *Erwinia carotovora*.

3- تحرير ألألكسينات بفعل الإنزيمات النباتية على الجدر الخلوية للاحياء المجهرية والتي بدورها تحفز تكوين المُظهرات من جدر الخلايا النباتية كتحرير الكايتوسان من جدر بكتريا *Fusarium* وتحرير إنزيم -α1, 3-endoglucanase من جدر بكتريا *Phytophthora*.

سُجلت زيادة كبيرة في تراكم القلويدات بعد إضافة تراكيز مُختلفة من حامض الساليسلك الى مزارع كالس نبات الحلبة (جدول 4.11) وصلت أقصاها عند تضمين الوسط 150 ملغم/لتر من حامض الساليسيلك. في الوقت الذي تفاوت تراكم المُركبات الاخرى بين حصول زيادة وإنخفاض مما يشير الى ان تأثر إنتاجية المُركبات بظروف التجربة وخاصة مُكونات الوسط الغذائي ونوع المُركب مما يُبرز الحاجة الى إستعمال الوسائل التي تم التطرق اليها مثل إختيار المُظهرات والبادئات المُناسبة والبحث عن الجينات التي تزيد من التعبير الوراثي للإنزيمات التي تدخل في المسلك الحيوي للمُركب المطلوب زيادته.

طرائق إضافة المُظهرات Methods for elicitors adddition

إختيار الكائن الدقيق: أُجريت العديد من التجارب التي وظف فيها مدى واسع من الأحياء المجهرية غير الممرضة من الفيروسات، البكتريا، الطحالب والفطريات كمُظهرات بعد تضمينها في الوسط الغذائي المُنماة فيه الزروعات بهدف تحفيز تكوين المُركبات الثانوية. وبحسب الإستجابة المتحققة، يتم إنتخاب الكائن الدقيق

المثالي غير الممرض وتضمينه الى الوسط الغذائي مع مُراعاة تحديد حجم اللقاح الميكروبي (Microbial inoculum) المُناسب لتكوين المُظهر.

جدول 4.11. زيادة تراكم المُركبات القلويدية في مزارع كالس نبات الحلبة (Fenugreek) بعد تجهيز الوسط الغذائي بحامض الساليسيلك

حامض الساليسيلك (ملغم/لتر)	سكوبليتين	كولين	ترايكونيلين	كارباين	جنتيانين
بدون مُعاملة	0.0390	0.0400	0.4832	0.2488	0.1082
50	0.1156	0.1265	0.8644	0.7362	0.2938
100	0.1379	0.1736	1.0317	0.6646	0.8038
150	0.1992	0.6650	1.4223	0.8473	0.9901
200	0.1495	0.7558	1.0734	0.6389	0.2780

الزراعة المرافقة (Co-culture): تُلقح المزارع النسيجية للنبات والتي غالباً ما تكون على هيئة مُعلقات خلوية بحجم لقاح مُناسب من كائن دقيق معروف بكونه مُظهراً لإنتاج المُركبات الثانوية. يُفضل نقل الزروعات على وسط غذائي جديد قبل تلقيحه إذ يُساعد ذلك زيادة الإنتاج. ويجب الإنتباه بان الأحياء المجهرية قد يكون لها تاثيراً تثبيطياً في نمو المزارع النسيجية للنبات، عندئذٍ يستوجب الامر عمل تحضيرات من المُظهرات بعد زارعة الكائن المجهري على وسط زرعي مُناسب لنمو ومن ثم حصاده وتعقيمه بجهاز المِعقام البُخاري إذ تُضاف المادة الجافة الى الوسط الغذائي لتعمل كمُظهر للمُركبات الثانوية. وفي حالة تأثر المُظهر بدرجات الحرارة العالية (Heat labile) فالحالة تستوجب عمل مُرشح من المزرعة الميكروبية (Culture filtrate) وتعقيمه بالفلترة (Filter sterilization) بدلاً عن تعقيمه بالبخار. وفي حالة الرغبة في منع الخلايا النباتية من الاحتكاك بالأحياء المجهرية في أنظمة الزراعة المرافقة، فعادةً ما يتم تقييد (Immobilization) أو حجز (Entrapment) أحدهما إذ يتم إنتقال المُركبات المُظهرة بالإنتشار (Diffusion) في الوسط الغذائي.

آلية عمل المُظهرات: أثبتت الأبحاث العلمية بان المُظهرات تُنشط جينات وتزيد من تصنيع الحوامض النووية الرايبوسومية المراسلة (mRNA) المُشفّرة للإنزيمات المسؤولة عن تصنيع المُركبات الثانوية. وتقترح بعض البحوث الحديثة حصول أنظمة نقل إشارة أساسها توسط الكالسيوم مع المُظهر(Elicitor mediated) Ca-based signal transduction systems والذي يُحفز على تكوين المُنتج. وإستدل الباحثون على صحة فرضيتهم هذه بعد ان عاملوا الخلايا النباتية بالكالسيوم المخلبي (Calcium chelate EDTA) قبل إضافة المُظهر الى الوسط الغذائي مما أدى الى تحييد دور الكالسيوم وبالتالي إنخفاض في إنتاجية المُركبات الثانوية. أُنتجت العديد من مُركبات الايض الثانوي (جدول 4.12) بعد إضافة المُظهرات الى الأوساط الغذائية المُنماة عليها أنواع نباتية مُختلفة ولتُنتج طيف واسع من المُركبات .

جدول 4.12. إنتاج مُركبات الايض الثانوي بعد تضمين وسط نمو الخلايا النباتية بالمُظهرات.

الكائن المجهري المُظهر	المزارع النسيجية للأنواع النباتية	المُركبات الثانوية المُنتجة
Aspergillus niger	*Cinchona ledgeriana, Rubia tinctoria*	Anthraquinones
Pythium aphanidermatum	*Catharanthus roseus*	Ajmalcine, Strictosidine, Catharanthine
Botrytis sp.	*Papaver somniferum*	Sanguinarine
Phytophthora megasperma	*Glycine max*	Isoflavonoides, Gluceollin
Dendryphion sp.	*Papver somniferum*	Sanguinarine
Alternaria sp.	*Phaseolus vulgaris*	Phaseollin
Fusarium sp.	*Apium graveolens*	Furanocoumarins
Phythium aphanidermatum	*Daucus carota*	Anthocyanins
Penicillium exansum	*Sanguinaria canadensis*	Benzophenanthridine, Alkaloids

ووُظفت المُعلقات الخلوية بعد إضافة المُظهرات الى الأوساط السائلة في إنتاج مُركبات ذات قيمة صيدلانية (جدول 4.13) أُستثمرت فيها العديد من النباتات الطبية بعد زراعتها نسيجياً وتحفيز مزارعها النسيجية في زيادة الإنتاج سواء كانت داخل دوارق أو مُفاعلات حيوية. أنتجت تلك المزارع السائلة مواد ثانوية ذات قيمة صيدلانية عالية في معالجة الكثير من الامراض البشرية والحيوانية وأُضيفت لأوساط الإنتاج مُظهرات أحيائية من مصادر مُختلفة والتي غالباً ماتكون مستخلصة من الأحياء المجهرية.

جدول 4.13. بعض ألأمثلة على إنتاج مُركبات صيدلانية بالزراعة النسيجية بعد إضافة مُظهرات مُختلفة لمزارع المُعلقات الخلوية.

النبات	المُظهر المضاف	المُركب المُنتج
Catharanthus roseus	متجانس من أنواع البوترايتس والفطريات	كاثارنثين، تربنويد، قلويد إندولي
Eschscholtzia californica	خميرة	سانكيونارين
Hyoscyamus albus	فايتوفثيرا	لوبيمين
Lithospermum erythrorhizon	كالكترونيدات متُعددة	أكينوفيورين المائي الثنائي
Morinda citrifolia	سكريات متُعددة	أنثركوينينات
Papaver bracteatum	فطر الفرتيسلم	سانكيونارين
Papaver somniferum	متجانس فطري، متجانس من أنواع فطريات البوترايتس، فطريات البثيم	سانكيونارين
Sanguinaria canadensis	فطر الفرتيسلم	سانكيونارين
Thalictrum rugosum	كربوهيدرات من مصدر خمائر	بيريبيرين
Tripterygium wilfordii	أنواع من البوترايتس، ترايكوديرما، سكلروتينيا	تربينات ثلاثية من أوليانين

تأثير العوامل الفيزيائية في إنتاجية مُركبات الايض الثانوي (Physical elicitors)

تؤثر العوامل الفيزيائية بشكل مباشر أو غير مباشر في إنتاجية الخلايا النباتية من المُركبات الثانوية كالضوء، درجة حرارة الحضن، pH الوسط الغذائي، تهوية الزروعات وغيرها.

تأثير الضوء Effect of light: يؤثر الضوء بشكل مُباشر لكونه مصدر تثبيت الكربون بعملية التركيب الضوئي في النباتات المزروعة في الحقل. وبالنظر لإنتفاء الحاجة الى تثبيت الكربون.

وان الحاجة اليه تكون محدودة في مزارع النبات النسيجية لتجهيزه ضمن مُكونات الوسط، لذلك فليس للضوء دوراً في إنتاجية الخلايا النباتية من المُركبات الأولية. والامر يكون مختلفاً من حيث تاثيره في إنتاجية الخلايا من المُركبات الثانوية ويؤثر بشكل مباشر في تحريرها لكونه الوسيط في التفاعلات الإنزيمية. سُجلت مجموعة من الحالات عن إستجابة المزارع النسيجية في تراكم المُركبات الثانوية بتأثير نوعية الضوء (Light quality)، وادناه أمثلة على ذلك:

1- شجع تعريض الزروعات الى اللون الازرق على إنتاجية صبغة الانثوسيانين في مزارع المُعلقات الخلوية لنبات *Haplopappus gracilis*.

2- أدى تعريض مزارع *C. roseus*، *Daucus carota*، *Helianthus tuberosus* النسيجية الى تراكم الانثوسيانين بعد تعريضها الى الضوء الابيض.

3- أدى تعريض مزارع كالس نبات بذر الصخر *Lithospermum erythrorhizon* الى الضوء الابيض أو الازرق الى تثبيط التصنيع الحيوي لمُركب Naphthoquinone.

4- أدى تعريض مزارع كالس نبات إكليل الجبل (*Rosmarinus officinalis*) الى 16 ساعة ضوء و 8 ساعة ظلام الى زيادة معنوية في محتواها من الزيوت الأساسية مقارنة مع تلك المنماة في ظلام مستمر.

تأثير درجة حرارة حضن الزروعات: يزداد نمو الخلايا المزروعة مع زيادة درجة حرارة حضنها لحين الوصول الى الدرجة المثالية (25-30^{o} م) ولكن تحتاج الزروعات عموماً عند الرغبة في إنتاج المُركبات الثانوية الى خفض درجات الحرارة. فعلى سبيل المثال، زاد تراكم قلويدات الاندول الى الضعف عند حضن زروعات *C. roseus* على درجة حرارة 16^{o} م بدلاً من 27^{o} م. وسُجِل إنخفاضاً في إنتاج الكافائين في مزارع القهوة النسيجية، وكذلك مادة النيكوتين في مزارع أنسجة التبغ.

تأثير pH الوسط الغذائي: من المتعارف عليه بان pH الوسط المُناسبة لنمو الخلايا النباتية تكون ضمن المدى 5-6. ولكن يختلف الامر عند إنتاج المُركبات الثانوية، فعلى سبيل المثال لا الحصر، مزارع الجزر النسيجية كميات أقل من الانثوسيانين عندما كانت pH الوسط 5.5 بينما زادت عند خفضها الى 4.5. وقد يُعزى ذلك الى زيادة تلف صبغات الانثوسيانين مع زيادة pH الوسط.

تهوية الزروعات: تحتاج الخلايا النباتية الى مُستويات مُنخفضة من الأوكسجين مقارنة بالمزارع البكتيرية بالنظر لمعدلات التنفس المُنخفضة للخلايا النباتية. فاذا ما كانت الأخيرة تتنفس بمعدل 0.2 مليمولر/غم/ساعة فيجب تنميتها داخل وسط سائل بمقدار 10غم/لتر مع مراعاة عم السماح للأوكسجين المُذاب من الهبوط الى اقل من 20%. وللاغراض التجريبية عند استعمال دوارق لتنمية المُعلقات الخلوية، فيشترط ان يشغل الوسط مع الخلايا المعلقة حجماً لايزيد عن ثلث حجم الدورق للسماح بالتبادل الغازي وبما يضمن مُستويات مُناسبة من الأوكسجين. وتُجهز المُفاعلات الحيوية المخصصة لإنتاج المُركبات الثانوية بمجسات تتحسس مُستوى الأوكسجين المُذاب وبذلك تتم السيطرة على التهوية وسرعة إهتزاز الوسط الغذائي وبذلك يُمكن المُحافظة على مُستويات ثابتة من الأوكسجين المُذاب. كما ويجب الإنتباه الى ان الخلايا النباتية حساسة لإجهاد القص (Shear stress) اي القوة المُسلطة بإتجاه موازي لأسطح الخلايا لأن الخلايا النباتية تُراكم مواد ايض ثانوي في مرحلة الإستقرار ولذلك تُتَبع تقانات التقييد أو المسك لغرض تقليل حركتها داخل المُفاعلات الحيوية.

المُعاملة بالإشعاعات وزيادة تراكم مُركبات الايض الثانوي (Irradiation)

أُستثمرت وعلى نطاق واسع مصادر طاقة اشعاعية في إنتاج الطفرات الوراثية وفي تحفيز الأنسجة النباتية على إنتاج مُركبات ثانوية امثال X، β, γ، نيوترونات وبروتونات. عُرفت أشعة كاما ومنذ زمن بكونها الأشعة المؤينة الأكثرإستعمالاً في إنتاج الطفرات من النباتات وتبين قابليتها في زيادة إنتاج المُركبات التجارية. تتداخل أشعة كاما عند مُعاملة النسيج النباتي مع الذرات والجزيئات لتكوين جذور حرة داخل الخلايا النباتية ينتج عنها تحوير في مُكونات الخلية المُهمة. بينت الدراسات بأن الجذور الحرة تؤثر في الشكل المظهري، التشريحي، البايوكيميائي والفسيولوجي للنبات إعتماداً على جُرع الإشعاع. وأُستثمرت المُعاملة بأشعة كاما في زيادة المُركبات الفينولية (بإعتبارها مُضادات أكسدة) في العديد من الأنواع النباتية ضمن مدى من الجُرع ترأوح من 50 الى 150 كري لذلك تُعد الإشعاعات من الإجهادات اللاأحيائية (Abiotic) المُهمة في تحفيز الأنسجة النباتية على زيادة إنتاجيتها من المُركبات الثانوية. في احدى الدراسات التي تمت تحت

إشراف المؤلف، شععت المزارع النسيجية لنبات الروجة (*Hypericum triquetrifolium*) بأربع جُرع من أشعة كاما (10، 20، 30، أو 40 كري) من مصدر كوبلت 60 وبمعدل 0.5 كري/دقيقة للجُرعة الواحدة. سُجلت زيادة معنوية في حامضي البنزويك والتانك في مزارع الكالس الناتج من الأوراق بعد تعريضها الى 40 كري بينما راكمت مزارع الكالس الناتج من الجذور والمُعاملة بالجُرعة 10 كري مُستويات عالية من حامض الكلوروجنك. تراكم مُركب الكاتيكين هو الآخر وبمُستويات عالية في مزارع الكالس الناشئ من السوق بعد المُعاملة بجُرعة 10 كري، في الوقت الذي حقق مُركب روتين أعلى تركيز في الكالس الناشئ من الأوراق بعد تعريضه الى 30 كري وبزيادة مقدارها 6.1 ضعفاً عن مُعاملة المقارنة. بينت الدراسة أيضاً حصول زيادة كبيرة في مُركبي الهايبرسين والبسيودوهايبرسين عند الجُرعة 10 كري في الكالس الناتج من الأوراق إضافة الى تحفيز كافة الجُرعات على زيادة الهايبرسين الكلي في مزارع الكالس المُشتقة من الأوراق والجذور.

تعريض الزروعات الى الأشعة فوق البنفسجية (UV)

تقسم الأشعة فوق البنفسجية الى ثلاثة أنواع لتشمل UV-C ذات طاقة عالية بطول موجي 200- 280 نانوميتر والتي يتم إمتصاصها كلياً من قبل غازات الغلاف الجوي، UV-B (280-320 نانوميتر) والتي تُمتص جزئياً من قبل طبقة الأوزون والتي زاد تلفها في السنوات الأخيرة نتيجة المُلوثات المُختلفة وخاصة مُركبات الكلوروفلوروكربون مما ادى الى زيادة مُستويات UV-B القادمة من الشمس الى سطح الكرة الارضية وقد تؤدي الى تلف كبير في النظام البيولوجي على كوكب الارض. واخيراً UV-A (315-400 نانوميتر) والتي من الصعب إمتصاصها من قبل طبقة الأوزون. وبالرغم مما تُسببه UV-B في تثبيط نمو النبات وتقليل كتلته الحيوية والعديد من التأثيرات البيئية، الا انه سُجلت زيادة في تراكم مُركبات الايض الثانوية عند إمتصاصها لهذا النوع من الأشعة وهذا ما اردنا التطرق اليه. تمتلك النباتات عموماً آليات حماية تركيبية (Constitutive) ومستحثة (Induced) أو قد تنشط بعض الإستجابات التي تُسمى التصحيحية (Repair responses) لكي تقاوم إجهادات الأشعة فوق البنفسجية نوع B. ولعل أحد تلك الإستجابات هي قيام النبات بتراكم مواد ايض ثانوي لإمتصاص الإشعاع ضمن هذا الطول الموجي. والامثلة كثيرة فقد سُجلت زيادة في تراكم مركبات الانثوسيانينات، الفلافونولات والفلافونات والتي بإمكانها كسح الجذور الحرة (Scavenge free radicals) وخاصة ROS. النباتات بوسعها أيضاً إنتاج إنزيمات مضادات الاكسدة أمثلة إنزيمات Catalases، Peroxidases و Superoxide dismutases من أجل كسح تلك الجذور الحرة

وحماية الكيان الخلوي. يتبين مما سبق الحاجة الى دراسات مستفيضة تتظافر فيها جهود المختصين ومن مختلف الاختصاصات.

زيادة تراكم المُركبات الثانوية بوساطة UV-B (Application of UV-B ray)

تؤدي زيادة تعريض الزروعات الى الأشعة فوق البنفسجية الى زيادة إنتاج ROS، زيادة في نشاط إنزيمات مضادات الاكسدة، إضافة الى زيادة في المسالك الحيوية لمُركبات الايض الثانوية (جدول 4.14). يعتمد تاثير الأشعة عند الرغبة في زيادة إنتاجية النسيج النباتي من مُركب ما أو مجموعة مُركبات على عوامل عدة منها النوع النباتي، ونوع النسيج المعرض للأشعة وعلى المُركب أو مجموعة المُركبات المطلوب زيادتها وعلى شدة الأشعة ومدة تعريض النسيج النباتي لها وبالتاكيد على اسباب اخرى فسلجية كالمحتوى الرطوبي للنسيج النباتي. تؤثرالأشعة في حالة أو أكثر من الحالات التالية:

3- إشارات الجروح/الدفاعية Wound/defense signaling

يُحفز التعريض لأشعة UV-B التعبير لجينات مُختلفة ذات علاقة بالإستجابات الدفاعية أولها محدودية تغلغل أشعة UV-B داخل الأنسجة النباتية نتيجة تراكم الصبغات وتكوين المُركبات الماصة للأشعة مثل الانثوسيانينات، الفلافينويدات واسترات حامض السينابيك والتي تخفف تاثير الأشعة المتغلغلة الى الأنسجة. تتراكم تلك المُركبات الفينولية نتيجة زيادة الفعاليات الإنزيمية للمسلك الحيوي للفينيل بروبانويد مما ينتج عنه بروتينات دفاعية. أشارت الدراسات الى ان حامض الساليسيليك هو مفتاح الإشارة الذي يُحفز المنظومة الدفاعية النباتية كتحفيزه للجينات المُرتبطة بالإمراضية. يمثل حامض الجاسمونيك الإشارة الثانية للإستجابة الدفاعية لأشعة UV-B إذ تُحفز الجينات المُرتبطة بالإستجابة للتجريح والإصابة المرضية عند تعرضها للأشعة. شُخص الاثيلين (الهرمون النباتي الغازي) كمُركب للإشارة في حالة تعرض النبات الى التجريح والدفاع عن نفسه حيث سُجلت حالات عديدة عن زيادة مُستويات هذا المُركب عند تعرض النبات للأشعة وتم تصنيع الجينات المُرتبطة بالإمراضية.

ا- الإشارات المُسببة في إتلاف الدنا (DNA damage signaling)

يَتسبب دمج الدنا من عوامل كيميائية كثيرة مثل بروموبوراسيل، حامض النايترس، والسورالينات (Psoralens) ولكلٍ منها آليته في إحداث التلف.

جدول 4.14. تراكم مُركبات الايض الثانوي في النباتات المُعاملة بالأشعة UV-B

النوع النباتي	العضو أو النسيج	المُركب الثانوي المُحَفز	شدة UV-B	مدة التعريض لأشعة UV-B	عدد مرات الزيادة
Acorus calamus	النبات الكامل	Caryophyllene oxides	$kJ.m^{-2}$ 1.8	3 ساعة/يوم لِمُدة 80 يوم	1.7
Arabidopsis thaliana	الأوراق	Flavonoids	pmol 3 sec^{-1}	8 ساعات	10-7.5
Camptotheca acuminate	الكالس	Camptothecin	µmol 5 $m^{-2}s^{-1}$	3 ايام	11
Cucumis sativus	الترايكومات والفلق	Polyphenols&Lignin	W m^{-2} 0.57	15-0 يوم	1.5
Fagopyrum tataricum	الأوراق	Rutin	1.26 W m^{-2}	30 دقيقة	1.2 مرة
Glycyrrhiza uralensis	الجذور	Glycyrrhizin	0.4 &1.13 W m^{-2}	3أو15 يوم على التوالي	1.5 مرة لكليهما
Lactuca sativa	الأوراق	Cyanidin&delphinidin	W m^{-2} 5.5	5 دقائق نبضات لِمُدة 10 ايام	تحفيز إنزيم الجالكون
Mentha spicata	الأوراق	Essential oil	--------	حوالي 4 اشهر	1.5 مرة
Mentha piperita	الأوراق	Terpenes&phenolics	K m^{-2}J 7.1	ساعة واحدة	مُختلفة
Ocimum basilicum	الأوراق	Eugenol&linalool	UV12 فلورسنت	14 يوم	4 مرات
Pyrus malus	جلد الثمرة	Cyanidin3-galactoside	W m^{-2} 1.3	5 ايام	8 مرات
Pisum sativum	الأوراق	Nicotinamide	W m^{-2} 1.4	12 ساعة	3.5 مرة
Psychotria brachyceras	الأوراق	Brachycerine	kJ 10.5 cm^{-2}	16ساعة/يوم لستة ايام	2 مرة
Rosmarinus officinalis	الأوراق	Carnosic&rasmarinic	kJ 31& 5.4 m^{-2}day	14 يوم	1.1 و 1.8
Vitis vinifera	حبات العنب	Catechin&quercetin	No UV-B	15 يوم	1.8 مرة
Zea mays	الأوراق	Maysin	UV-B	21 يوم	28 مرة
C. roseus	خلايا مزروعة	Catharanthine	مسافة 2.5سم	5 دقيقة	3 مرات

يُسبب الإشعاع هو الآخر تلفاً للدنا وخاصة UV-B الذي يُعد مُطفراً بعد إمتصاص دنا الخلايا النباتية لفوتونات هذا النوع من الإشعاع مما ينتج عنها تكوين مُركبات من دايمرات البرميدين حلقية البيوتين ولربما

مُركبات أُخرى من نواتج التصنيع الغذائي (Photoproducts). تسبب التحويرات الحاصلة في الدنا تاثيرات جوهرية في الايض الخلوي لعدم إمكانية إنزيمي DNA & RNA polymerase للعمل في ظروف وجود دايمرات غيرمصححة وبذلك لاتحصل عمليتا الإستنساخ والترجمة.

2- إشارات أنواع الأوكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species signaling)

تُنتج أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) من قبل النباتات باستمرار وبشكل اساسي في الكلوروبلاست والمايتوكوندريا كعضيات ذات فعالية ايضية عالية في الوقت الذي تستمر آليات كسح (Scavenging) من خلال الانظمة الإنزيمية وغير الإنزيمية والتي تؤكسد الكميات المتزايدة من ROS وتخفف من عمليات الاجهاد على النظام الخلوي. وهنا يدخل دور أشعة UV-B في تسريع نشاط الإنزيمات المضادة للاكسدة مثل Catalase، Superoxide dismutase، Ascorbate peroxidases ذات الاهمية الدفاعية في التخلص من الجذور الحرة.

اثبتت التجارب العلمية على وجود نوعين من الإشارات التي تُسببها أشعة UV-B، أولهما إشارات غير مُحددة (Non-specific UV-B signaling). والمُهم هنا التأكيد على إمكانية تكوين مُركبات ثانوية بعد تعريض أنسجة النبات الى الأشعة فوق البنفسجية حيث يزداد إنتاج صبغات الآيزوفلانويد والكومسترول بعد تعريض أوراق نبات الفاصولياء الى أشعة UV. والحالة الثانية حصول اشارات من إشعاعات UV-B مُحددة (Specific UV-B signaling) وبمسالك حيوية تؤدي الى حصول إستجابات مورفولوجية ضوئية (Photomorphogenic responses) تختلف في تأثيرها عن الإستجابة التي تحصل نتيجة الإجهادات المعروفة.

زيادة المُركبات الفينولية

تلعب المُركبات الفينولية دوراً مُهماً في العديد من الوظائف داخل النبات فهي دعامات ميكانيكية لأنسجة النبات كما هو الحال في اللكنين وكذلك اهميتها في حماية النبات من المُسببات المرضية والحشرات القارضة والحماية من الأشعة فوق البنفسجية. لوحظ بان العديد من الإنزيمات المُرتبطة بتصنيع الفينولات تنشط بعد تعريض أنسجة النبات الى UV-B امثلة إنزيم Alanine ammonia lyase (PAL) وإنزيم Chalcone synthase (CHS) وكذلك الإنزيمات الداخلة في الخطوات الأولى في تصنيع الفلافينويدات. يزداد نشاط الكومارينات وخاصة التي تدخل حلقات الفيوران في تركيبها عند تعرض الأنسجة النباتية الى إشعاعات من UV-A مما يؤدي الى حصول تفاعلات ضوئية سامة.

الفلافونونات والفلافونات: الفلافونيدات من المُركبات التي يُمكن تنظيم عملها بوساطة UV- B داخل النبات وتلعب تلك المُركبات دوراً اساسياً في حماية النبات من تلك الإشعاعات. تمتص الفلافونيدات الأطوال الموجية التي تترأوح بين 280- 350 نانوميتر ولهذه المُركبات حلقتان مضغوطتان وثالثة مُرتبطة بذرة الكربون الثانية. تصنف الفينولات حسب درجة تاكسدها لتشمل الانثوسيانينات، الفلافونات، الفلافونولات، والآيزوفلافونات. وبالنظر لتنوعها الكيميائي، حجمها، شكلها الثلاثي الأبعاد، وصفاتها الكيميائية والفيزيائية، مما يسمح لها بالتداخل مع مُركبات عديدة وبمواقع مُختلفة داخل العضيات بما يُمكنها من التأثير في الفعالية البيولوجية داخل النبات والحيوان وحتى الكائنات المجهرية. تعمل الفلافونات والفلافونولات في حماية الخلايا من الأشعة فوق البنفسجية بالنظر لتراكمها في طبقات خلايا بشرة الأوراق والساق مما يجعلها كمُرشحات تمتص الإشعاعات ضمن طيف UV. يؤدي تعريض النباتات الى إشعاعات UV-B الى زيادة فعالية إنزيمات تصنيع الفلافونيدات ليس في خلايا البشرة فحسب بل الطبقة الشمعية والشُعيرات المتواجدة على اسطح الأوراق والسوق.

الانثوسيانينات: يُحفز التعريض الواطئ من أشعة UV-B إستجابات مميزة في النسيج النباتي مثل تراكم الصبغات الماصة لأشعة UV ومن ضمنها الانثوسيانين إذ لُوحظ تراكم تلك الصبغات في الذرة الصفراء، الرز، ثمار التفاح، ازهار التفاح والورد الشجيري. يكون تاثير الأشعة من خلال زيادة تعبير الجينات المشفرة للإنزيمات الداخلة في المسالك التصنيعية للانثوسيانينات. سُجل تراكماً للاخيرة في ثمار العنب، نبات الأربدوبسس، الباذنجان وخلايا الجزر بعد تعريضها لأشعة UV-A نتيجة حصول زيادة في التعبير الجيني المشفر لمجموعة من الإنزيمات منها P450، PAL، F3H وإنزيم تصنيع الانثوسيانين (ANS) وإنزيم GST وغيرها. يُساهم إنتاج الانثوسيانين في حماية الأنسجة النباتية من التلف الذي يُسببه التعريض الى أشعة UV حيث لن يكون مُستوى تاثير أشعة UV-A في التعبير الجيني بنفس مُستوى التأثير الذي تسببه أشعة UV-B إذ تؤثر الأخيرة حتى في الجُرع الواطئة.

القلويدات : من المعلوم بان القلويدات عبارة عن مُركبات حأوية على النتروجين ذات اهمية في دفاع النبات عن نفسه ضد الحشرات القارضة. بينت بعض الدراسات اهمية قلويدات الاندول والبيورين في الحماية من أشعة UV-A بعد ان يتعرض النسيج النباتي لاشعتي UV-B و UV-C. سجل تراكم في القلويدات وصل الى أكثر من عشرة اضعاف عند تعريض بعض الأنواع النباتية لأشعة UV-B. استثمرت تلك الخاصية في المزارع النسيجية لنبات عين البزون (*Catharanthus roseus*) إذ سجلت زيادة معنوية في محتوى

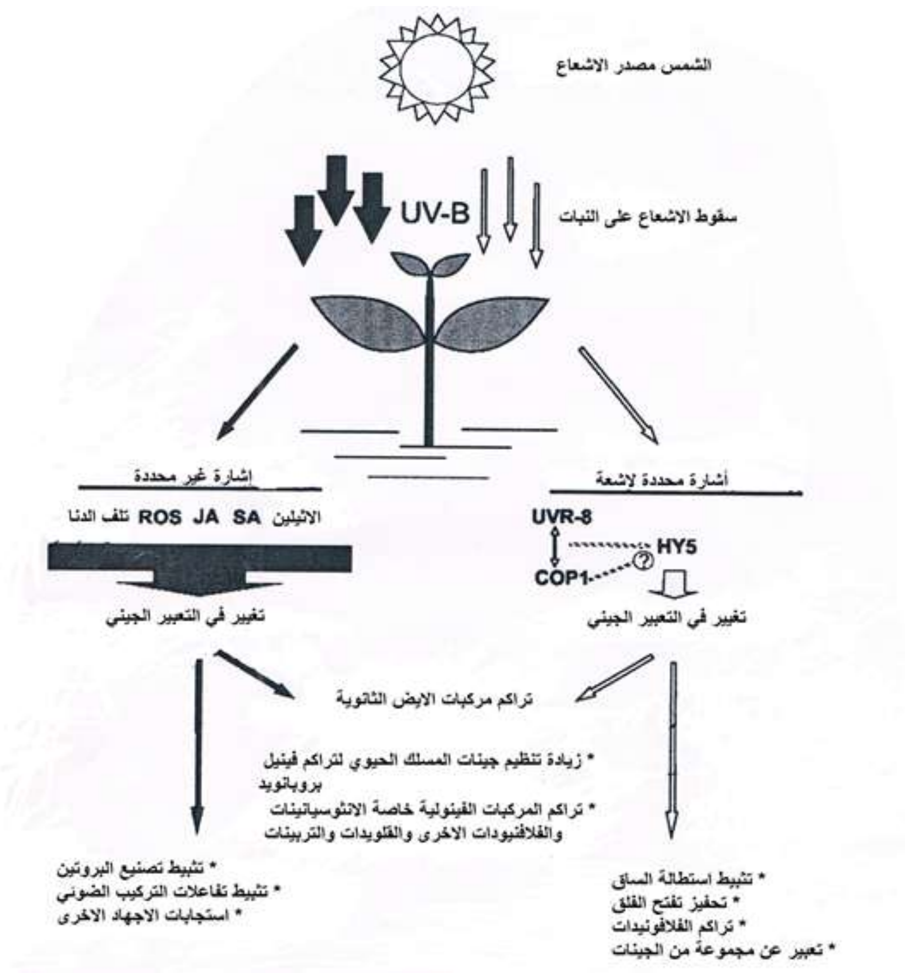
الافرع في مرحلة التضاعف وكذلك المُعلقات الخلوية من مُركبي الفنبلاستين والفنكرستين بعد تعريض الزروعات لأشعة UV-B.

التربينات: تُشكل التربينات أكبر مجموعة من المُركبات الثانوية لتشمل الزيوت الأساسية، التربينات الثلاثية والستيرويدات والمعروفة بدورها الدفاعي ضد الحشرات التي تتغذى على النبات. بالرغم من أن تعريض النبات لأشعة UV-B لايؤدي حتماً الى زيادة مُحتواه من التربينات، لكن سُجلت حالات عديدة عن حصول تراكم بتلك المُركبات بعد التعريض لذلك النوع من الأشعة. يُعتقد بأن أشعة UV-B تُحفز التعبير الجيني في جينات نبات النعناع مما يؤدي الى زيادة في تصنيع وتراكم الزيوت الأساسية، كما حفّزت على زيادة تراكم مُركب Paclitaxel ومُركبات التاكسان ذات العلاقة بهذا المُركب بعد تعريض أوراق نبات *Taxus cuspidate* لهذا النوع من الأشعة. المُلاحظ بان تلك التأثيرات يُمكن إصلاحها بالمُعاملة بمُستويات مُعينة من حامض الجاسمونك.

إعتبارات في تجارب التعريض لأشعة UV

يتم تعريض المادة النباتية للأشعة إما داخل غرف النمو، البيوت الزجاجية، حقلياً، بعد حصاد النبات وقد يتم تعريض مزارع النبات النسيجة. ومن المؤكد ان لكل بيئة مما ذكر أعلاه الظروف الخاصة بها. تُنفذ التجارب الداخلية (Indoor experiments) عادة داخل غرف النمو (Growth chambers) أو داخل البيوت الزجاجية، وفي كلتي الحالتين فان UV-B تُعد الأكثر شدة في تاثيرها على النباتات. تُعد دراسة تحفيز تكوين المُركبات الثانوية تحت هذه الظروف جوهرياً في زيادة وتسريع إنتاجية الكثير من المُركبات الصيدلانية وخاصة تحت ظروف جُرع عالية نسبياً من UV-B. وظف العديد من الباحثين تقانات تخفيف أو تضعيف (Attenuation) جُرع UV-B أو تعزيزها (Enhancement) وحصلوا على نتائج جيدة ومنطقية عند تقييم تاثيراتها في الأحياء وخاصة النباتات حقلياً (شكل 4.10).

ساعدت طرائق التضعيف في فهم الإستجابات التي تحصل تحت ظروف مُستويات مُنخفضة من UV-B بإستعمال مُرشحات تمتص أو تُمرر مُعظم هذا النوع من الإشعاع مما يجعلها تقانة رخيصة الثمن وبسيطة ولاتحتاج الى مصدر كهرباء. وهناك طريقة أكثرُ تعقيداً يتم من خلالها تقليل تاثير أشعة UV-B تشتمل وضع أغطية بداخلها أوزون فوق النبات لتكون بمثابة ما يحصل من تغيير في أشعة UV-B نتيجة إستنفاد الأوزون وبذلك تقترب من واقع حال ما يحصل في الطبيعة بالرغم من عدم دقتها في حساب كمية الأوزون المُستنفد.



شكل 4.10. مخطط توضيحي للمسالك الرئيسة لإنتقال إشارة UV-B في النبات. الاسهم الخفيفة تشير الى سقوط إشعاعات قليلة من UV-B على النبات والتي قد تؤدي الى مسالك حيوية مُحددة والتي تختلف عن إستجابات الإجهاد العامة المُعبر عنها بالأسهم الغامقة والتي تحصل تحت ظروف إشعاع عالية. عند تغيير تلك المسالك الحيوية فالتعبير الجيني ولمدى واسع من الجينات لها تأثيراتها النوعية مع حصول إستجابات مُتداخلة. تشير الخطوط المتقطعة الى إرتباطات غير مفهومة تماماً. تبين المعلومات المتوافرة. يعتمد تداخل البلمرة الاحادية لأشعة UVR 8 و UVR8-COP1 على UV-B مؤدية الى إستنساخ جين HY5. ينظم الناتج البروتيني لهذا الجين الجينات بإتجاه الهدف والمُتعلقة بالإستجابات المورفولوجية المُعتمدة على الضوء لأشعة UV-B من ضمنها جينات الحماية كالإنزيمات المشفرة للمسلك الحيوي للفلافونويد. ROS=أنواع الأوكسجين التفاعلية. JA=حامض الجاسمونيك. SA=حامض الساليسيليك. UVR8= موقع 8 المقأوم لأشعة UV. COP1=إستجابة مورفولوجية معتمدة على الضوء 1. HY5=إستطالة السويقة تحت الفلق 5.

اما طرائق التعزيز فتشتمل توفير مصابيح فلوروسنتية كمصدر لأشعة UV-B لتكون أداة مُناسبة لتقليد ما سوف يحصل في المُستقبل نتيجة إستنفاد الأوزون حيث توفر الأشعة في شكل جُرعات ثابتة لِمُدة ساعات فترة الظهيرة وفي سماء صافية لضمان الحصول على أعلى تعريض من الأشعة.

على العكس من الإعتبارات السابقة التي تُحاول تقليد الطبيعة من حيث مصدر الأشعة والفترة الزمنية للتعريض وظروف نمو النبات، فتجارب المُعاملة بأشعة UV قبل وبعد الحصاد وبهدف زيادة تراكم مواد الايض الثانوي تكون أكثر سهولة اذ يتم تعريض النبات لفترات زمنية قصيرة مع المُعاملة أيضاً بأشعة -UV C بما يضمن إستجابات سريعة مع الإقتصاد في أجهزة السيطرة وخاصة مصادر الضوء. إضافة لما سبق فان طريقة ما بعد الحصاد (الأجزاء النباتية الطازجة المُفصولة من النبات الام)، تُستثمر التسهيلات المُتوافرة مُختبرياً دون الحاجة لتوفير ظروف بيئية ومصادر طاقة منقولة الى موقع العمل كما هو الحال في الطرائق السابقة. خُلاصة لما سبق، فإستجابة النبات لزيادة المُركبات الثانوية كماً ونوعاً بعد تعريضه لأشعة UV يعتمد على العديد من العوامل لتشمل مصدر الضوء، شدة الإضاءة، طول زمن المُعاملة، المُركب المُستهدف زيادته، المرحلة التطورية للعضو النباتي أو النبات الكامل وحالته الفسيولوجية. يستوجب الامر وبناءاً على ما سبق، إجراء تجارب مُستفيضة لإيجاد الظروف المُثلى من العوامل السابقة قبل إعتمادها صناعياً في مجال إنتاج الأدوية أو اية تطبيقات أُخرى لمُركبات الايض الثانوية.

إستعمال الموجات فوق الصوتية Ultrasound use

تُعد طريقة إستعمال الموجات فوق الصوتية فريدة من بين الطرائق المُتبعة لكونها بسيطة، رخيصة، ومُتعددة الوظائف إذ انها نموذجية عند إستعمالها في المزارع النسيجية حيث لا تُلمس فيزيائياً. تسمح على سبيل المثال المعاملة بالموجات فوق الصوتية في الإذابة العكسية للأغشية الخلوية المختلفة مما يجعل من الطريقة مفيدة جداً في مجال التقانة الأحيائية. تحتاج التقانة الى تعاون مشترك بين مختصي الزراعة النسيجية والمهندسين والفيزيائيين من أجل الحصول على محاليل مناسبة. تتم الإستفادة من أنظمة مبنية على أساس التخمر مع إستعمال موصلات تُنتج ترددات مختلفة وطاقة لفصل الجزيئات وغربلة وإطلاق للمركبات الثانوية. من المؤكد ستفتح تقانة توظيف الموجات فوق الصوتية مجالات واسعة في مستقبل إنتاج مركبات الايض الثانوية وخاصة للقطاع الصناعي في مجال الصناعات الدوائية والتجميلية، علماً ان الأجهزة متوفرة في أغلب مختبرات التقانة الأحيائية.

التحول الحيوي بإستعمال الخلايا النباتية (Biotransformation using plant cell cultures)

يُطلق على تحول (Bioconversion) مادة كيميائية الى أُخرى مثل مادة أساس (Substrate) الى منتوج نهائي بإستعمال نظام بايولوجي (كالمُعلقات الخلوية) كعوامل مُساعدة (Biocatalysts) بالتحول الحيوي (Biotransformation) وهي مرادفة لكلمة Bioconversion. وقد يكون العامل المُساعد حراً أو مُقيداً ولربما تشتمل عملية التحول إنزيم واحد أو أكثر. تتبع تقانة التحول أيضاً بإستعمال الخلايا الحيوانية والأحياء المجهرية لإنتاج مُركبات صيدلانية ويُمكن للقارئ مُراجعة المصادر المُتخصصة في الموضوع. ومن تطبيقات التقانات الأحيائية النباتية في مجال تفاعلات التحول الحيوي ليشمل تحول مُركبات كيميائية أقل أهمية الى أُخرى أكثر أهميةً ذات قيمة طبية أو تجارية عالية. ومن المُهم هنا بمكان إنتخاب خطوط خلايا نباتية تحتوي على الإنزيمات المطلوبة للدخول في تفاعلات التحول الحيوي وبالتالي إنتاج المُركب الهدف. وتتضمن تفاعلات التحول الحيوي العديد من التفاعلات من أهمها تحرير مُركبات ذات مجموعة هيدروكسيل OH (Hydroxylation)، إختزال (Reduction) ومُركبات ثنائية الكلوكوز (Glycosylation). وخير مثالٍ على إستثمار تفاعلات التحول الحيوي في مجال إنتاج العقاقير المُهمة طبياً بإستعمال مزارع الخلايا النباتية على نطاق واسع في معامل الادوية، هو إنتاج الدجوكسين (Digoxin) ذات الأهمية الطبية في علاج أمراض إلتهاب العضلات القلبية (Cardiovascular) مثل الديجيتوكسين (Digitoxin) من مزارع نبات زهرة الكشتبان البيضاء (*Digitalis lanata*) النسيجية. يُنتج الدجوكسين بعد تقييد خلايا نبات الديجتالس داخل مُفاعلات حيوية مُهواة بطريقة الهواء المدفوع الى الأعلى والأسفل (Airlift bioreactors) وكما مبين في الشكل 4.11.

وكمثال آخر على تطبيقات التحول الحيوي في مجال التقانات الأحيائية النباتية، توظيف المزارع النسيجية لنبات زهرة الكشتبان الوردية (*Digitalis purpurea*) أو نبات ستيفيا (*Stevia rebaudiana*) في تحول مُركب Steviol الى مُركبي Steviobiocide و Steviocide اللتان يفوق مذاقهما الحلو 100 مرة أكثر من حلاوة سكر المائدة المُتعارف عليه. ويبين جدول 4.15 نماذج مُنتخبة من تفاعلات التحول الحيوي مُستثمرة الخلايا النباتية لهذا الغرض.

تحرير وتحليل المُركبات الثانوية

تُستعمل الطرائق ذاتها المُستعملة في النبات الكامل في فصل وتنقية المُركبات الثانوية من مزارع النبات النسيجية. ويجب الإنتباه الى ان بعض الأنواع النباتية تتكون المُركبات الثانوية داخل الخلايا ومن ثم تتحرر

الى الوسط الغذائي مما يُسهل من عملية عزل وتحليل المُركبات. وفي حالة خزن الخلايا لمُركباتها الثانوية داخل الفجوات، فتستوجب الحالة تمزيق غشاء البلازما (Plasma membrane) وكذلك غشاء الفجوة (Tonoplast) من أجل تحرير المُركبات. تُستعمل بعض المُركبات لهذا الغرض أهمها الداي مثيل سلفوأوكسايد (DMSO) الذي يزيد من نفاذية الخلايا لإطلاق المُركبات (Permeabilizing agent). وعموماً تكون كُلفة فصل وتنقية المُركبات عالية مما حدى بالمُختصين بالبحث عن وسائل أقل كُلفة. ولتحقيق ذلك، درس الباحثون إمكانية إنتاج كميات كبيرة من مواد الايض الثانوي في وحدة الحجم بما يعزز من تقليل كُلفة فصل وتنقية تلك المُركبات مع إمكانية إطلاقها الى الوسط الغذائي بعد إستعمال مواد تساعد على نفاذية جدر الخلايا والأغشية وكما مر ذكره. إضافة الى تبني فكرة تقليل إنتاج المُركبات الفرعية والتي تتداخل مع عملية فصل وتنقية المُركب المطلوب.

شكل 4.11. مفاعل حيوي يعمل على أساس صعود ونزول الهواء (Airlift bioreactor) يُمكن إستعماله على نطاق تجريبي لدراسة تراكم مواد الايض الثانوي في مزارع النبات النسيجية.

جدول 4.15. أمثلة منتخبة على إستثمار مزارع النبات النسيجية في التحول الحيوي وإنتاج مُركبات ذات قيمة تجارية عالية

المنتوج	الوسط الحامل (Substrate)	مزارع الخلايا النباتية
Digoxin	Digitoxin	*Digitalis lanata*
Codeine	Codeinone	*Papaver somniferum*
Cavaxone	Carvoxine	*Nicotiana tobacum*
Periplogenin	Digitoxigenin	*Daucus carota*
L- Dihydroxy phenylalanine (L-DOPA)	L-Tyrosine	*Mucuna pruriens*
(+)-Neomenthol	(-)-Menthone	*Mentha sp.*
Vanillin-D-glucoside	Vanillin	*Coffea Arabica*
Hydroxylated derivatives	Solavetivone	*Solanum tuberosum*
Anthraquinones	2-Succinyl benzoate	*Galium mollugo*
Arbutin	Hydroquinone	*Datura sp.*
Nootkatone	Valencene	*Citrus sp.*
5-Formyl-ellipticine	Ellipticine	*Choisya ternata*
Steviocide, Steviobiocide	Steviol	*Digitalis purpurea/Stevia rebaudiana*

إنتاج مُركبات الايض الثانوي من مزارع نبات الروجة (*Hypericum triquetrifolium*)

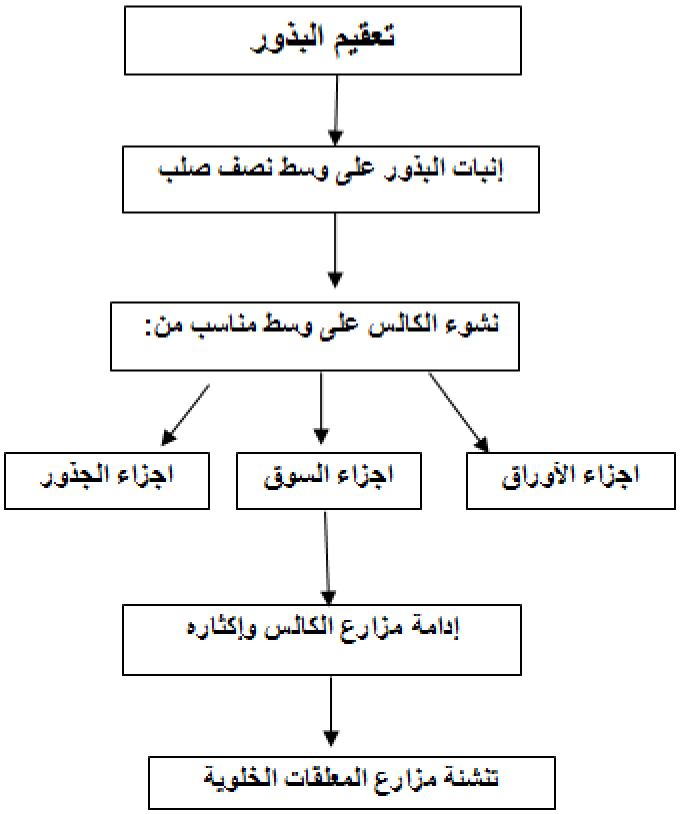
أُجريت دراسة تفصيلية من قبل مجموعة من طلبة الدراسات العليا أُستعملت فيها مؤشرات مُختلفة والتي من المُحتمل ان تؤدي الى زيادة إنتاج مزارع النبات النسيجية من مُركبات الايض الثانوي في نبات الروجة الذي جُمعت عينات منه من أحد حقول نبات الحنطة بعد حصاده في مُحافظة السليمانية شمال العراق (شكل 4.12).

شكل 4.12. نبات الروجة (*Hypericum triquetrifolium* Turra) نامٍ برياً في أحد حقول الحنطة بعد حصادها في محافظة السليمانية شمال العراق وتظهر فيه أزهاره الصفراء وأوراقه الغنية بمادة الهايبرسين ذات الفعالية العالية ضد أمراض الكآبة والسرطان وخاصة اللوكيميا ومُضادة للأمراض الفيروسية.

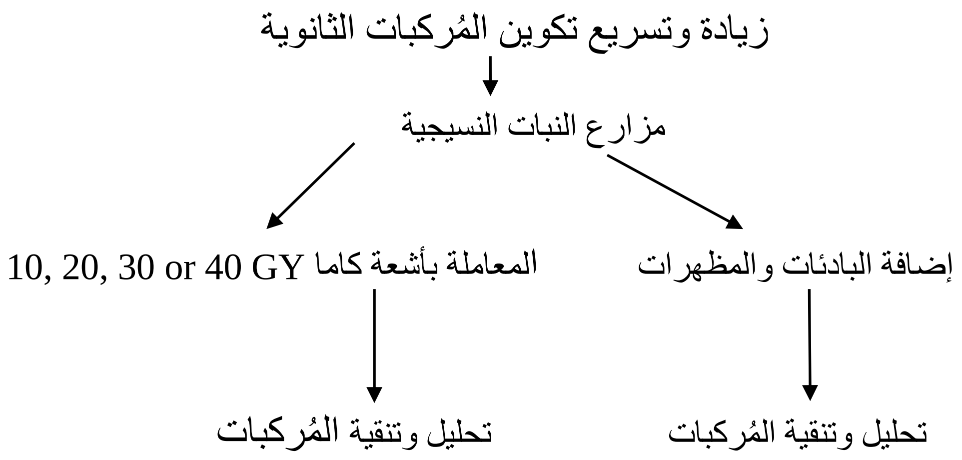
يُمكن رؤية الغُدد الحأوية على مادة الهايبرسين مُنتشرة على الأوراق والسوق والازهار والتي يُمكن رؤيتها بالعين المُجردة (شكل 4.13).

شكل 4.13. نبات الروجة وتظهر فيه الغدد الحاوية على مادة الهايبرسين في أوراقه.

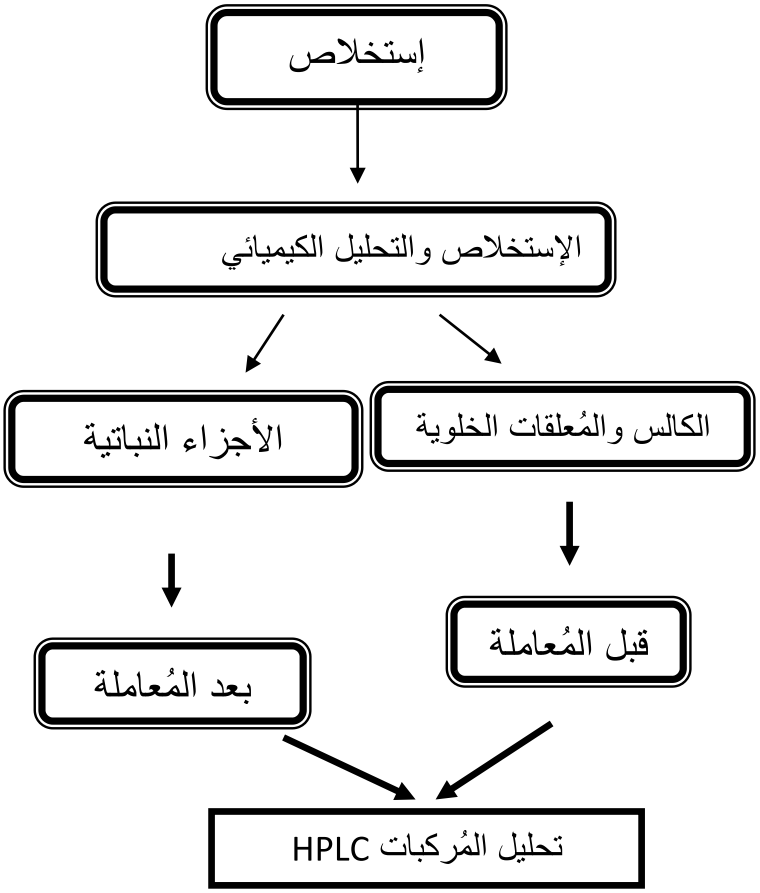
جُمعت بذور النبات وعُقمت سطحياً وتم إنباتها على وسط حاوٍ على وسط شُبه سائل وحُفزالكالس على النشوء من البادرات (شكل 4.14).



شكل4.14. مُخطط يوضح الطريقة المُستعملة في نشوء المُعلقات الخلوية من نبات الروجة إبتداءاً من تعقيم البذور ومروراً بتحفيز نشوء الكالس من الأجزاء المفصولة من الأوراق والسوق والجذور وإدامته وأخيراً تنشئة المُعلقات الخلوية. ولغرض التسريع أو زيادة إنتاج مواد الايض الثانوي في مزارع نبات الروجة المُهم طبياً، أُتبعت مجموعة إستراتيجيات يُمكن تلخيصها بالشكلين 4.15، 4.16. إذ تتضمن إضافة البادئات والمُظهرات ومن ضمنها التعريض لِجُرع مُختلفة من أشعة كاما ومن ثم إجراء التحليلات بجهاز HPLC. أُستعملت بادئات ومُظهرات مُختلفة وبتراكيز مُختلفة من أجل إنتقاء الأفضل منها وبالتركيز المثالي إضافة الى تحفيز نشوء الجذور الشعرية. ويُلاحظ من الشكل الأوجه المُختلفة والتي يُمكن للباحث إستثمارها في التحري عن المُركبات الثانوية في المزارع النسيجية لأي نبات طبي ووضع خطة لزيادتها أو التسريع في إنتاجها بعد دراسة مُستفيضة للمسالك الحيوية التي تُنتج من خلالها المُركبات المرغوبة.



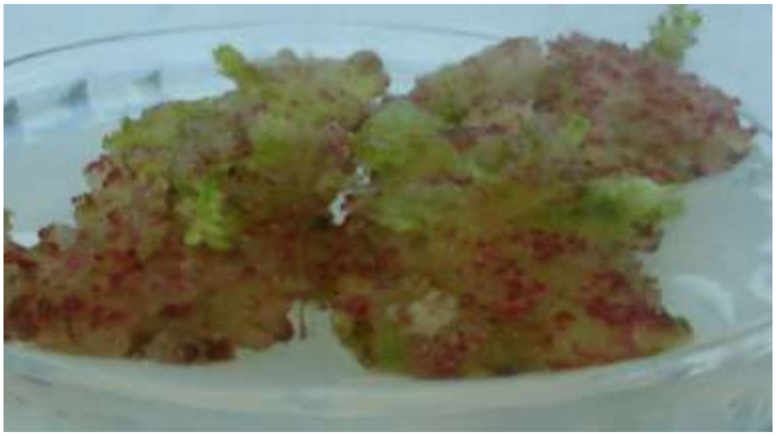
شكل 4.15. الإستراتيجيات المُتبعة في تحفيز تراكم مُركبات الايض الثانوي في المزارع النسيجية لنبات الروجة.



شكل 4.16. مُخطط يبين إستراتيجية إستخلاص وتحليل المُركبات الفعالة من المزارع النسيجية لنبات الروجة بإستعمال جهاز HPLC قبل وبعد إجراء المُعاملات المُختلفة.

أُستخلصت المواد الفعالة وحللت المُركبات المُتراكمة في مزارع الكالس والمُعلقات الخلوية التي أُنشئت من أجزاء النبات المُختلفة وقورنت النتائج قبل وبعد المُعاملة مع مُقارنتها بالمُكونات الفعالة التي يحتويها النبات الكامل النامي حقلياً لإعطاء صورة مُتكاملة عن أهمية مزارع النبات النسيجية في تراكم مواد الايض الثانوي بعد إجراء التحليلات الكيميائية وبالطرائق المُعتمدة.

أظهرت النتائج تراكم المواد المُختلفة في مزارع نبات الروجة النسيجية وخاصة في مزارع الكالس (شكل 4.17). حيث تباين تعبير مُركبات الهايبرسين الموجودة على أجزاء النبات الكامل من أوراق وسوق في مزارعه النسيجية مما يُشجع على توظيف المُفاعلات الحيوية لهذا الغرض.

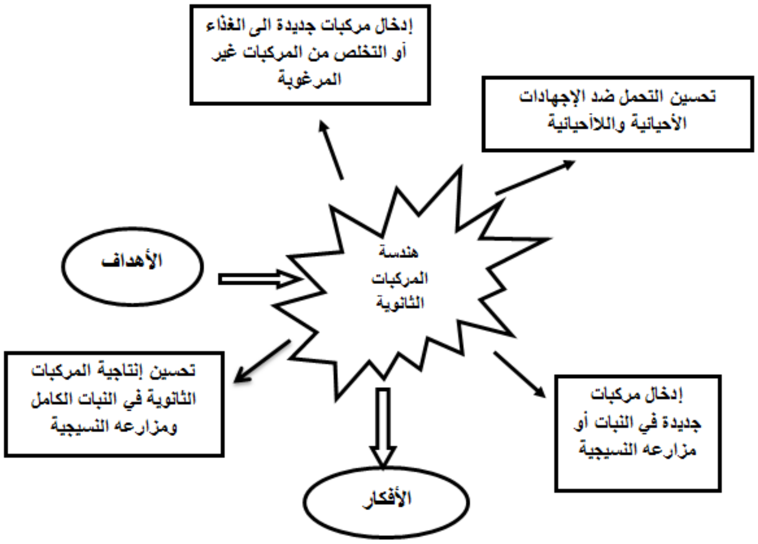


شكل 4.17. تراكم مُركب الهايبرسين كبقع حمراء في المزارع النسيجية لنبات الروجة.

هندسة مُركبات الايض الثانوية (Metabolic engineering)

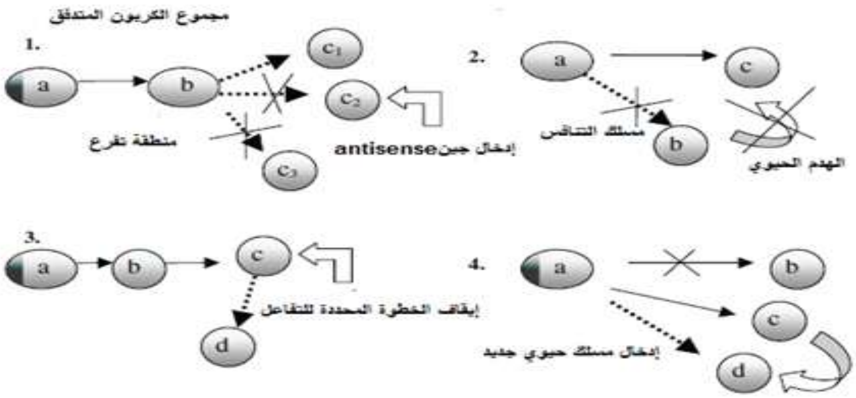
عند التفكير في تصميم برنامج لهندسة مُركبات الايض الثانوية، لابد من وضوح الرؤيا بوضع أولويات (شكل 4.18) من خلال التفكير بالأهداف الموضوعية كالحاجة المُلحة للمنتوج وسعره في السوق العالمية والمحلية والأخذ بنظر الإعتبار الجوانب الإنسانية وغيرها.

تتولد الأفكار بحيث تكون واقعية وذات مُستلزمات مُتوفرة محلياً وان لم تكن كذلك فيُمكن الإستعانة بالشركات المُتخصصة أو المُستثمرين مع تصور واضح عن مُخرجات المُركبات المُهندسة وراثياً سواء كانت لتحسين تحمل النبات نفسه للإجهادات، إضافة مواد مُفيدة للمُنتجات الحالية والتخلص من تلك غير المرغوب فيها، الحصول على مُركبات جديدة ذات فائدة وغيرها.



شكل 4.18. الأهداف والأفكار في هندسة مُركبات الأيض الثانوي.

يُنصح عادةً بمُراجعة المصادر بدقة لإستلهام الأفكار والأهداف وتُكتب وتُرسم على ورق. تشتمل الخطوة الأولى (لاحظ شكل 4.19) بالإستفادة القُصوى من مصدر الكربون المُتدفق الى الزروعات والذي ينتج في الغالب مجموعة من مُركبات تحتاج الى طاقة لإنتاجها حيث توجه تلك الطاقة في إنتاج المُركب المرغوب C1 في الوقت الذي يُحجب تكوين المُركبين C2، C3.



شكل 4.19. الأهداف والأفكار في هندسة مُركبات الأيض الثانوي: (1) زيادة تدفق الكربون في نقطة التفرع، أو إنخفاض في التدفق من خلال المسالك الحيوية المنافسة، أو إدخال جين antisense للإنزيم المُنافس. (2) تنظيم إنتاج المُركب المرغوب إما بالمسلك الحيوي المُنافس أو بحجب الهدم الحيوي. (3) تحديد وإيقاف الخطوات المُحددة للتفاعلات. (4) إدخال مسلك حيوي جديد أو جين يُسيطر على إنزيم مُحدد.

تُستثمر ما وفرته التقانات الحديثة في هندسة الخلايا النباتية وخاصة تقانة Antisense في إيلاج الجين المطلوب وإيقاف المسالك الحيوية المنافسة (2b) للمُركب الهدف مع تثبيط الهدم الحيوي المُحتمل حصوله عند إنتاج الأخير. ولابد من توجيه الطاقة وإستثمراها بحيث يتم إيقاف التفاعلات التي قد يدخل فيها المُركب الهدف (C3) مع إمكانية إدخال مسلك جديد للتفاعل بإتجاه المُركب المرغوب والمُخطط لإنتاجه (d4) وإيقاف التفاعلات الفرعية.

حُورت العديد من النباتات وراثياً بنقل جينات اليها من مصادر بشرية وحيوانية ومن كائنات دقيقة (جدول 4.16) بهدف زيادة التعبير الجيني لمُركبات ثانوية مُحددة. أظهرت النباتات المبينة في الجدول زيادة في تراكمها للأمينات المتُعددة وبذلك أصبحت النباتات مصدراً مُهماً للعديد من مُركبات الايض الثانوية بعد تحويرها وراثياً.

جدول 4.16. نباتات حُورت وراثياً بجينات منقولة من مصادر مُختلفة لتعبر عن تراكمها للأمينات المُتُعددة

الجين المنقول	مصدر الجين	النبات المُحور وراثياً
odc	الخميرة، الفأر	مزارع جذور التبغ، تبغ
odc	الفأر	جزر، رز، تبغ
Adc	شوفان	تبغ، رز
samdc	إنسان، بطاطا	بطاطا
Samdc-odc	إنسان، فأر	تبغ
dao	بزاليا	بزاليا

استعملت بكتريا الاكروبكتيريوم على نطاق واسع كناقل في هندسة النبات وراثياً لإنتاج مُركبات الايض الثانوية وبسُلالات مُختلفة (جدول 4.17) لتراكم النباتات المُحورة وراثياً أو في مزارعها النسيجية مُركبات ثانوية ذات فوائد صيدلانية. أصبحت التقانة عملاً روتينياً في العديد من مُختبرات الزراعة النسيجية ومُختبرات البايولوجي الجزيئي وأُنتج من خلالها مُركبات دخلت الإنتاج الواسع في معامل الأدوية.

جدول 4.17. بعض الأمثلة على التحول الوراثي بإستعمال سُلالات مُختلفة من بكتريا الاكروبكتريوم كوسيط لهندسة نباتات طبية وراثياً

النبات	سلالة الاكروبكتريوم	النتيجة
Ammi majus	*A. rhizogenes* A4(20233)	شعيرات جذرية أنتجت كميات عالية من الفسناجين
Artemisia annua	*A. rhizogenes* LBA 9402	كميات أعلى من حامض الآرتمسنك
Artemisia annua	*A. tumefaciens* C58, N273	زيادة قليلة من اللارتمسنين في النموات الخضرية
Atropa belladonna	*A. rhizogenes* A4, TR-105	مُستويات عالية من الاتروبين
Atropa belladonna	*A. tumefaciens* LBA4404	زيادة في السكوبولأماين
Atropa belladonna	*A. rhizogenes* 15834	زيادة في السكوبولأماين
Atropa belladonna	*A. rhizogenes* 15834, *A. tumefaciens rol ABC*	مُستويات عالية من القلويدات
Catharanthus roseus	*A. rhizogenes*	تحرر قلويدات أكثر في pH واطئ
Cinchona ledgeriana	*A. tumefaciens* A6	زيادة خمسة أضعاف من القلويدات
C. ledgeriana	*A. rhizogenes* LBA9402	زيادة الكوينين، سنكونيدين، كوينيدين
Datura candida hybrid	*A. rhizogenes*	زيادة سكوبالامين، هايوسيامين
Datura innoxia	*A. rhizogenes* LBA9402	زيادة سكوبالامين
Datura stramonium	*A. rhizogenes* LBA9402	زيادة سكوبالامين
Datura innoxia	*A. rhizogenes* A4, 15834,	زيادة هايوسيامين

	A4-24	
زيادة سكوبالامين، هايوسيامين	***A. rhizogenes*** **LBA9402, A41027, R1601**	***Datura innoxia***
زيادة القلويدات المُتسربة الى الوسط	***A. rhizogenes***	***Datura innoxia***
التعرِيض لصدمة حرارية أعطت مُستويات عالية من الهايوسيامين	***A. rhizogenes*** **TR-105**	***Datura stramonium***
إنتاج أكثر من السابونين، جنسنوسايد	***A. rhizogenes***	***Panax ginseng***
إنتاج عالي من الكلايكوسايدات	***A. rhizogene*** **A4, 15834**	***Panax ginseng***
زيادة في سرعة نمو الكالس وزيادة في إنتاج الجنسنوسايد	***A. rhizogene*** **A4**	***Panax ginseng***

يلاحظ من الجدول عدم إقتصار البكتريا الناقلة (Vector) على البكتريا المُسببة لِمرض التعقد التاجي (Crown gall) بل اُستعملت السُلالة التي تُصيب الجذور (*A.rhizogenes*) لتحفيز الجذور الشعرية على تكوين كتلة كبيرة من الشُعيرات الجذرية الغنية بالمُركبات الثانوية. ولاتزال الكثير من النباتات بحاجة الى غربلة ولايزال تعريض الزروعات الى الإجهادات بهدف زيادة الإنتاج بحاجة الى مزيد من التحري.

الفصل الخامس: زراعة الأجنة والمُتوك والبيوض

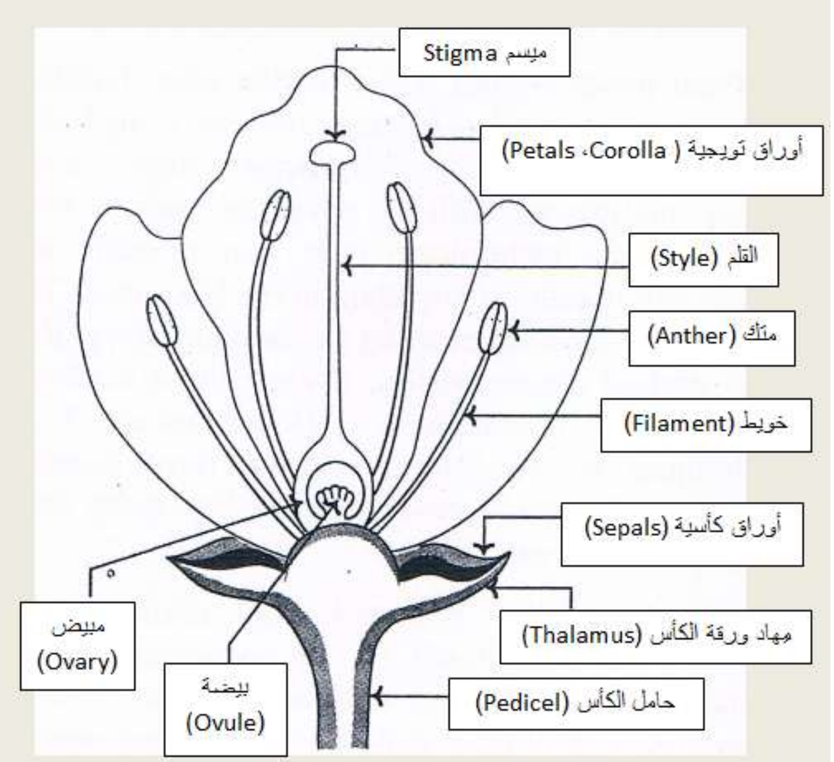
Embryo, Anther and Ovule Culture

مُقدمة Introduction

طُورِت حديثاً برامج لعزل بروتوبلاستات من حبوب اللقاح والخلايا المُولدة (Generative) والنُطف (Sperms) في مجموعة من الأنواع النباتية. كما تم تطوير طرائق لعزل خلايا الأجنة الجنينية والبيضة في عدد غير قليل من الأنواع النباتية. يُعد توفر خلايا نُطف ذات حيوية عالية مُهماً للغاية في تجارب التهجين خارج الجسم الحي والتي يتم عزلها من حبوب لقاح هي الأُخرى يجب ان تكون ذات حيوية عالية وان تُجمع من مُتوك جيدة وفي مرحلة عُمرية مُناسبة وان تُزرع مُباشرة علماً انه يُمكن خزن حبوب اللقاح تحت ظروف معلومة ولمجموعة من الأنواع النباتية وكما سيرد لاحقاً في هذا الفصل. تختلف لحد ما طريقة عزل الخلايا أعلاه من نبات للآخر، فعلى سبيل المثال، تُعزل خلايا نُطف الذرة الصفراء من حبات لقاح ثلاثية الخلايا (Tricellular) بعد صدمة أزموزية بينما تُعزل خلايا النُطف من حبة لقاح ثُنائية النواة (Binucleate) والتي يتم عزلها من إنبوب اللقاح المُنمى مُختبرياً (*In vitro*) بصدمة وإنفجار ازموزي (Osmoticbursting) أو بسحقها (Grinding) اوبهرسها (Squashing).

تُعزل الأجنة الجنينية ذات الحيوية الجيدة ومن ضمنها خلايا البيضة أساساً بالطرائق الإنزيمية المُحطمة لجدر الخلايا. حديثاً، أمكن الحصول على خلايا البيضة الحية من الحنطة والشعير بطريقة ميكانيكية بدون مُعاملة إنزيمية وقد تكون هذه الطريقة مُفيدة في دراسة التلاصق (Adhesion)، التمييز وإندماج الأمشاج المعزولة. تُعامل أكياس الأجنة الحاوية على أنسجة المبيض في الذرة الصفراء بخليط إنزيمي مُكون من 0.75% إنزيم البكتنيز، 0.25% بكتوليس Y23، 0.5% هميسيليليز، 0.5% سيليليز لمُدة 30 دقيقة على درجة حرارة 24°م مع الأخذ بنظر الإعتبار زمن تعريض أنسجة المبيض للمحلول الإنزيمي لكونه مُهماً في منع الدمج غير المطلوب لخلايا الكيس الجنيني. يجب أيضا تحديد تركيز المحلول الإنزيمي ومُدة الحضن. تُستعمل ابر دقيقة جداً لقطع الأنسجة يدوياً فعلى سبيل المثال، يُمكن عزل 5 من خلايا البيضة بصورة جيدة من مجموع 20 قطعة مبيض في الذرة الصفراء. يتمكن المُتمرس عند العمل الروتيني من عزل حوالي 40 خلية بيضة بمُدة تتراوح بين 2 الى 3 ساعات والمُهم بالموضوع ، عزل أكبر عدد مُمكن من خلايا البيضة لإجراء الإخصاب خارج الجسم الحي بالدمج الجماعي (Mass fusion). ويُمكن إستعمال تقانات الخلية المُفردة وكما سيرد لاحقاً. لابُد من الإشارة في بداية هذا الموضوع المُهم أحيائياً الى ضرورة معرفة القارئ

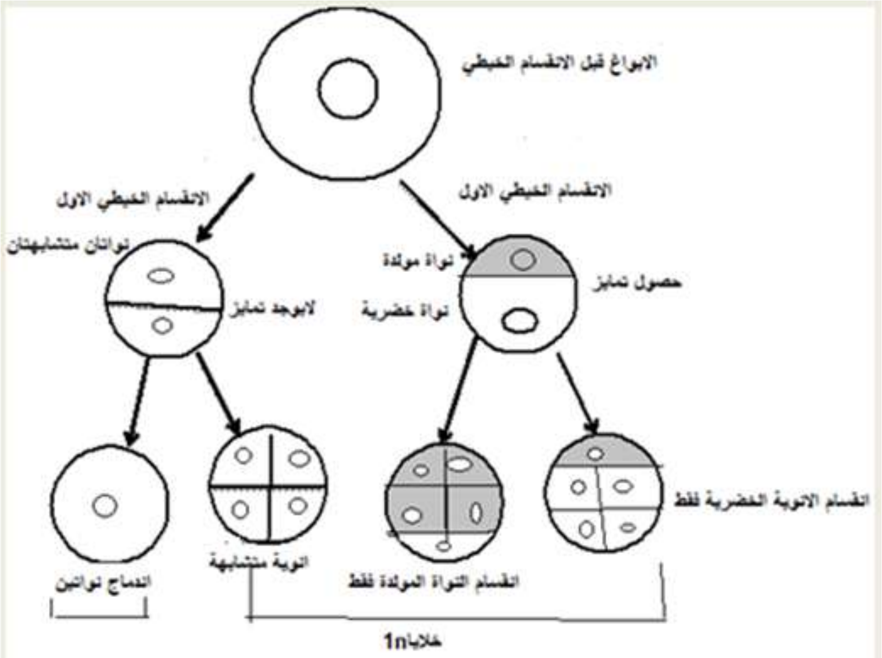
بأجزاء الزهرة الموضحة في شكل 5.1. تعيش نُطف نباتات مُغطاة البذور (Angiosperms) لفترة قصيرة عموماً ويُطلق على النُطف الذكرية (Male gametophytes) بحبوب اللقاح وكذلك بالأبواغ الدقيقة (Microspores). لكون الأخيرة تحتوي على مجموعة كروموسومية واحدة (1n)، فالجين يكون بنُسخة مُفردة وبذلك إذا ما تم إنبات تلك السبورات الدقيقة (النُطف Sporophytes) ونشأت الى نبات كامل ليكون النبات الناتج نقي وراثياً وهذا مايُطلق عليه Androgenesis.



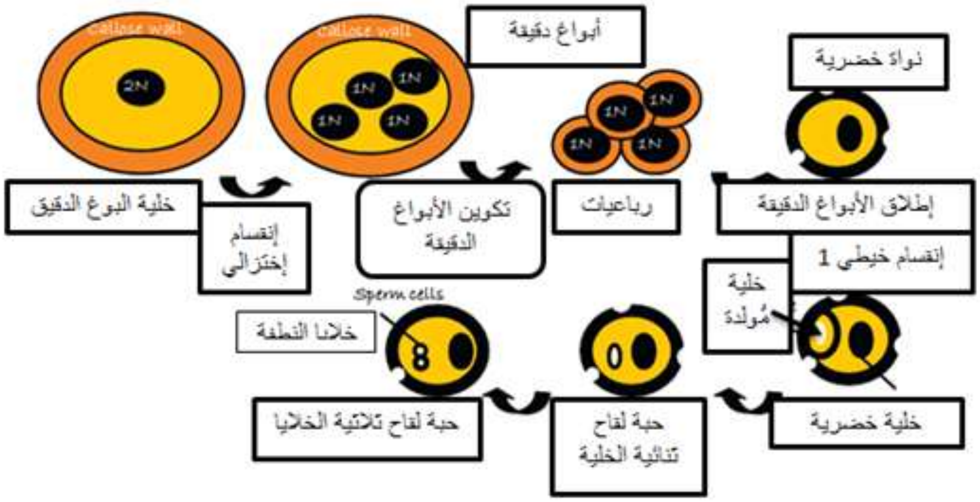
شكل 5.1. أجزاء الزهرة الرئيسة.

تنقسم الأبواغ إنقساماً خيطياً اولاً لتدخل في مسارين، ينتج عن المسار الأول تكوين خلية تحتوي على نواتين مولدة وخضرية وخلية ثانية بنواتين مُتشابهتين (شكل 5.2). تنقسم الأنوية الخضرية والمُولدة لتُنتج خلايا 1n بينما تستمر النواتات المُتشابهتان في إنتاج أنوية مُتشابهة أو قد تندمج نويتان مع بعضهما. يحصل الإنقسام الإختزالي في خلايا السبورات الدقيقة (Microsporocytes) لتبدأ عملية تكوين سبورات أُحادية العدد الكروموسومي (شكل 5.3) تُسمى رباعية (Tetrad) وتتحرر السبورات الدقيقة لتدخل في مرحلة الإنقسام الخيطي الأولمُكونةً خلية مولدة ونواة خضرية داخل حبة اللقاح الثُنائية لتنقسم الخلايا المُولدة مُكونةً حبوب لقاح ثلاثية بداخلها أبواغ دقيقة وتُحاط حبوب اللقاح هذه بغلاف المُتك. تتخذ حبوب اللقاح أشكالاً مُختلفة

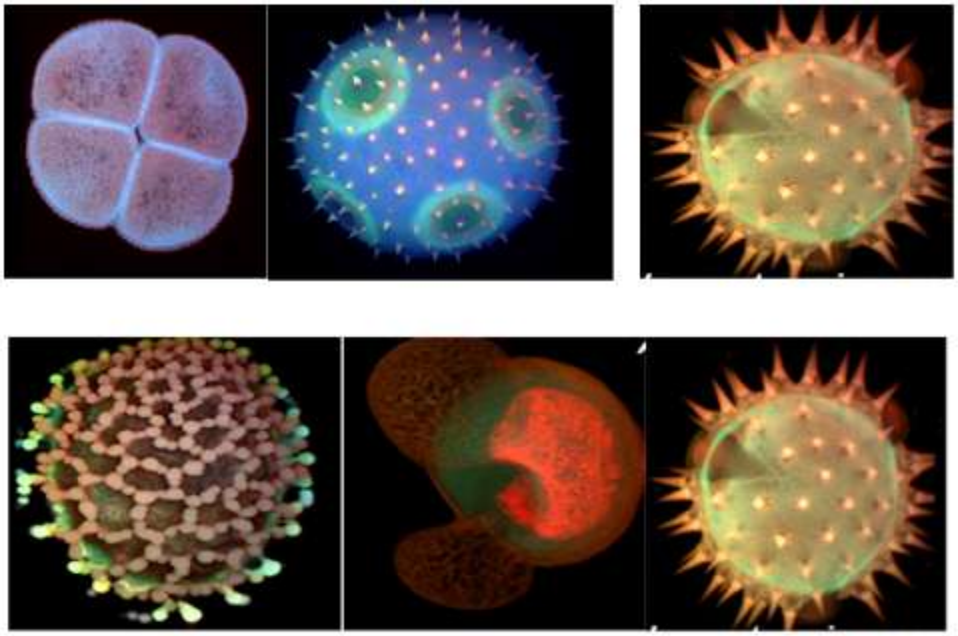
(شكل 5.4) بإختلاف النوع النباتي والعائلة وحسب ما مُتعارف عليه تصنيفياً. تتحفز عملية تكوين الأبواغ الدقيقة بمجموعة من العوامل التي تم دراستها بتعمق داخل ظروف مُختبرية مُسيطر عليها وكذلك بناءاً على الملاحظات الحقلية.



شكل 5.2. مسارارات الإنقسام الخيطي الأول للأبواغ الدقيقة.



شكل 5.3. تكوين الأبواغ الدقيقة من الإنقسام الإختزالي ونشوء الخلية المُولدة والنواة الخضرية بعد الإنقسام الخيطي الأول لتنتج حبة لقاح ثلاثية بعد إنقسام الخلية المُولدة.



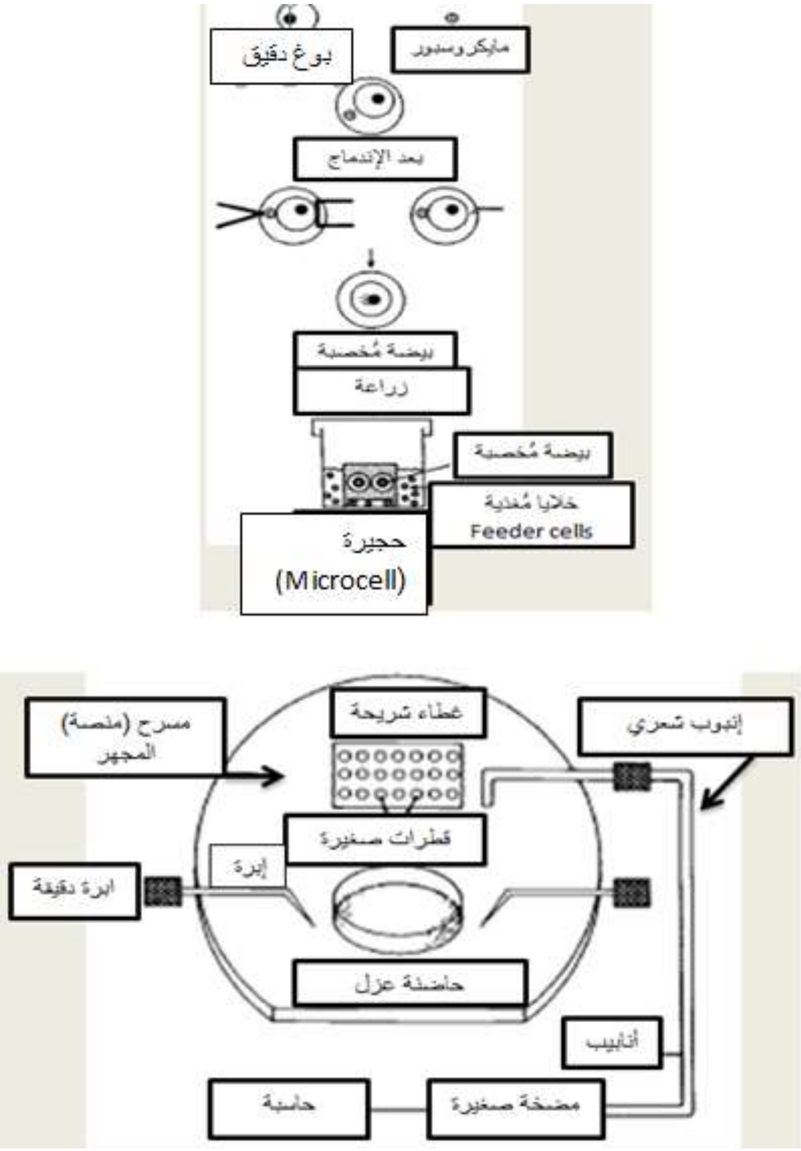
شكل 5.4. التنوع الواسع وجمالية حبوب اللقاح كما تبدو تحت المجهر الماسح الليزري.

لعل من أهم تلك العوامل هو عامل الإجهاد الذي يتعرض له النبات وأُعتمدت فرضيتان لتأثير الإجهاد في تكوين الأبواغ الدقيقة. يؤمن أصحاب الفرضية الأولى بان الإجهاد يُسبب في حصول خلل في المراحل التطورية من خلال زيادة التعبير او الإستقرارية للجين المسؤول عن الإنقسام في الوقت الذي يعتقد مؤيدو الفرضية الثانية بكبح الجينات المسؤولة تحت مُستوى العتبة (Below a threshold level). تختلف الإجهادات من نوع نباتي لآخر لتشمل التعريض لدرجات حرارة مُرتفعة، التشعيع بأشعة كاما، المُعاملة بالكولشسين، خفض مُستوى السكر والكلوتامين في الوسط الغذائي قبل نقلها الى وسط حاوٍ على مُستويات مُرتفعة من الكلوكوز. تبين بأن الإجهاد يكون السبب في ظهور بروتينات الصدمة الحرارية الصغيرة (smHSP) والتي تُحفز في عملية نشوء الأبواغ الدقيقة.

الإخصاب خارج الجسم الحي *In vitro* fertilization

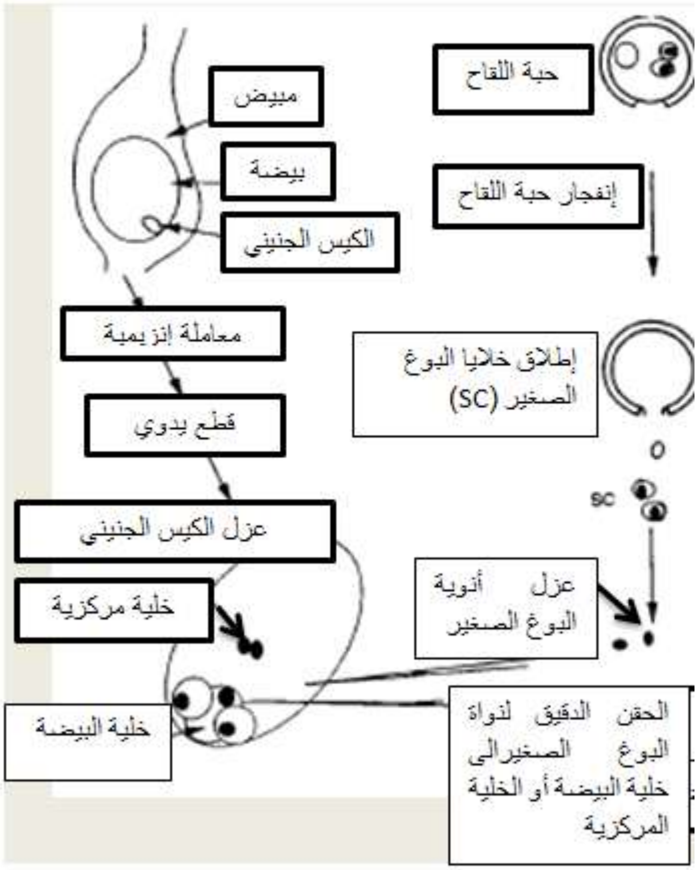
يحصل الإخصاب في مُغطاة البذور مرتين يتم في الإخصاب الأول إندماج نُطفة (Sperm) مع البيضة (Egg) لتنتج بيضة مُخصبة (Zygote) تتطور فيما بعد الى جنين (Embryo). تندمج النُطفة الثانية القادمة من حبة اللقاح مع النواة الثانوية (Secondary nucleus) في الخلية المركزية لينتج عنها خلية السويداء الأولية (Primary endosperm cell) والتي تتطور الى السويداء. تُتيح التقانات الحالية إجراء حالتي

الإخصاب أعلاه خارج الجسم الحي وطُبقت بشكل خاص في الذرة الصفراء. سمحت تقانة زراعة الخلية المُفردة بزراعة بيضة مُخصبة مُفردة للنشوء الى جنين ومن ثم الى نبات كامل وبالمثل تسمح تقانة إخصاب الخلايا المركزية بأن تنشأ الى سويداء. والمُلاحظ وتحت ظروف زراعة الخلايا المُفردة، بان البيضة المُخصبة بدون السويداء وحتى خلية السويداء الأولية وبدون جنين، ان تنشأ بطريقة مُماثلة لتلك التي تحصل تحت ظروف الحقل إذ بإمكانهما تنظيم ذاتيهما دون الحاجة الى نسيج الأم. وبناءاً على ما سبق، أتاحت تقانات الإخصاب خارج الجسم الحي، فُرصة ثمينة لدراسة نشوء الأجنة من البيضة المُخصبة وغير المُخصبة وكذلك تطور السويداء (لاحظ الشكلين 5.5، 5.6).



شكل 5.5. مُخطط لطريقة الإخصاب خارج الجسم الحي بأمشاج معزولة ومُفردة.

تُعزل وتُنقل بروتوبلاستات خليتي النُطفة والبيضة الى قطرة الدمج (Fusion droplet) حيث تدمج أزواج من الأُمشاج إما بوخزة كهربائية أو داخل وسط إندماج. تُنقل نواتج الإندماج الى حجيرة (Millicell) مُحاطة بخلايا التغذية (Feeder cells) لضمان نمو البيضة المُخصبة.

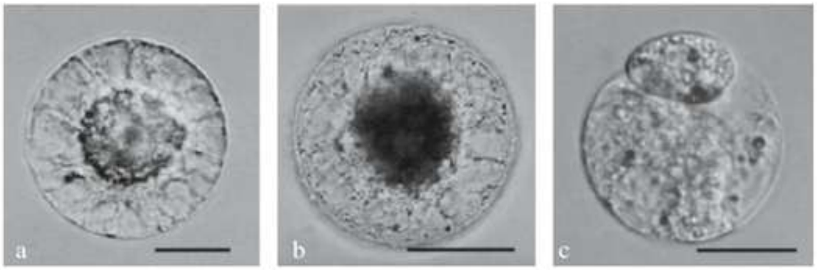


شكل 5.6. مُخطط توضيحي لعملية الحقن الدقيق لنواة نطفة داخل خلية بيضة معزولة من مبيض نبات الذرة الصفراء لغرض إخصابها.

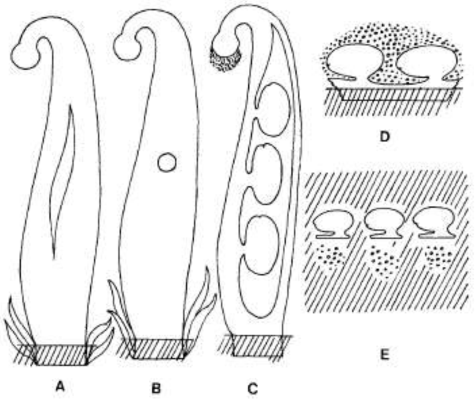
تتوفر حالياً الكثير من المعلومات الخلوية (Cytological) والتراكيب الدقيقة (Ultrastructural) حول الإخصاب المُزدوج (Double fertilization) تحت الظروف الحقلية وخاصة في نبات الذرة الصفراء، ولكن لايزال هناك نُقص في المعلومات الجزيئية عن التداخل بين النُطف ولاتزال هناك نُدرة فيما يحصل في المُستوى الجزيئي عند تحفيز الإخصاب وبعد تكوين البيضة المُخصبة. لذلك تُستثمر حالياً مكتبات الدنا التكميلي (cDNA libraries) لخلية البيضة قبل وبعد الإخصاب للتحري عن التعبير الجيني بعد الإخصاب.

إستنتجت تلك التحليلات على ان التعبير الجيني للعديد من الجينات إما يزداد او يقل بعد الإخصاب ووُظفت فيها تقانات Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

النطف المعزولة عبارة عن بروتوبلاستات وبذلك يُمكن دمجها بنفس طرائق دمج البروتوبلاستات الجسمية (شكل 5.7). تُدمج بطريقة الدمج الكهربائي (Electrofusion) المُتبعة في دمج البروتوبلاستات الجسمية ويُستعمل فيها كلايكول مُتعدد الاثيلين او الكالسيوم لتحفيز الإندماج. يتم التلقيح خارج الجسم الحي (*In vitro* pollination) بوسائل مختلفة (شكل 5.8) مما يُسهل من وصول اللقاح الى داخل العضو التكاثري. وظفت التقانة في دمج النُطفة الذكرية وخلية البيضة في نبات الذرة الصفراء والحنطة.



شكل 5.7. خلايا مشيجية إنثوية معزولة وأجنة ذرة صفراء نشأت من بيضةمُخصبة خارج الجسم الحي. (a) خلية بيضة؛ (b) خلية مركزية؛ (c) جنين من خليتين. بعد 43 ساعة من التلقيح.



شكل 5.8. رسم تخطيطي لأنواع من التلقيح المستعملة خارج الجسم الحي. (A,B) تلقيح داخل المبايض من خلال عمل حز أو فتحة في جدار المبيض. (C) تلقيح الميسم. (D) تلقيح المشيمة. (E) تلقيح البيضة.

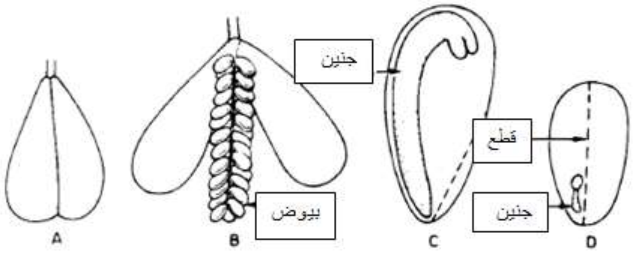
وأُستعملت نفس التقانة في إخصاب الخلية المركزية في الذرة الصفراء بزمن لايتجاوز ثانية واحدة حيث يُسهل الفرق بين حجمي الخليتين على الإندماج السريع. غالباً ما يُستعمل وسط نيش (Nitsch’s medium) والمُبينة مُكوناته في جدول 5.1 لزراعة البيوض بعد تلقيحها داخل أنابيب الإختبار.

جدول 5.1. مُكونات وسط نيش (Nitsch’s medium) لزراعة البيوض المُلقحة خارج الجسم الحي

المُكونات	الكمية (ملغم/لتر)
$CaNO_3.4H_2O$	500
KNO_3	125
KH_2PO_4	125
$MgSO_4.7H_2O$	125
$CuSO_4.5H_2O$	0.025
Na_2MoO_4	0.025
$ZnSO_4.7H_2O$	0.5
$MnSO_4.4H_2O$	3.0
H_3BO_3	0.5
$FeC_6O_5H7.5H_2O$	10.0
Glycine	7.5
Ca-Pantothenate	0.25
Pyridoxine.HCl	0.25
Thiamine	0.25
Niacin	1.25
Sucrose	5000
Agar	7000

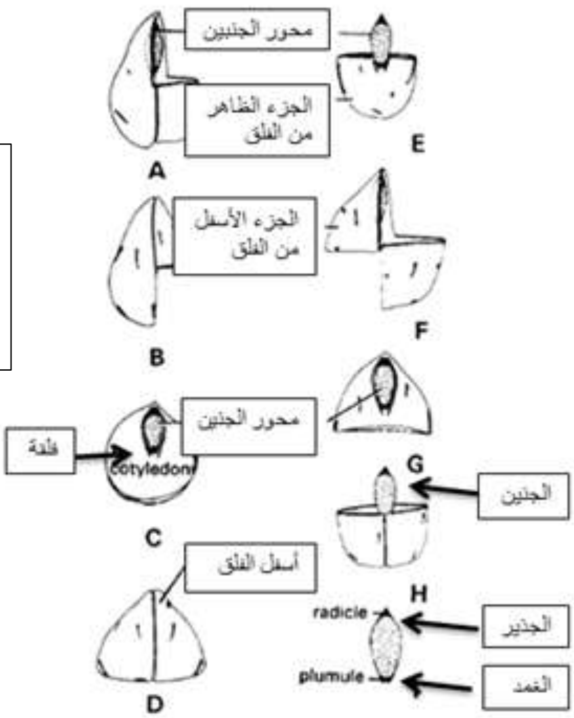
عزل وزراعة الأجنة Embryo isolation and culture

يتم أثناؤها عزل الأجنة المُعقمة سواء كانت ناضجة او غير ناضجة وتحت ظروف مُعقمة. تعتمد طريقة فصل الجنين حسب النوع النباتي إذ تختلف المبايض في تركيبها من نوع نباتي لآخر. يجب معرفة موضع الجنين داخل المبيض لتلافي الإضرار فيه عند قطع جدار المبيض (شكل 5.9) أو قطع الفلقة في نبات *Cassytha* (شكل 5.10).



شكل 5.9. عزل أجنة نبات كيس الراعي (*Capsella bursa-pastoris*). (A) العلبة (Capsule). (B) فتح العلبة لمُشاهدة البيض. (C) البيضة وفي داخلها الجنين، لاحظ الخط المتقطع والذي يُمثل مكان قطع البيضة المُخصبة من أجل عزل الجنين. (D) بيضة ذات جنين كروي، والذي يتم عزله بعمل قطع طولي في جدار البيضة.

شكل 5.10 .أنماط قطع الفلقة في أجنة نبات *Cassytha*.



بعد فصل الأجنة، تزرع داخل أوعية الزراعة في وسط معلوم المُكونات بهدف الحصول على نبات كامل حي. يُطلق عادةً مُصطلح الجنين على الجنين الناتج من البيضة المُخصبة والذي يُسمى بالجنين الجنسي والذي يختلف عن الجنين الجسمي الذي تم الكلام عنه سابقاً. الأجنة في نوعين فاما ان تكون مفصولة من بذور ناضجة فسيولوجياً ويُسمى هذا النوع بالأجنة الناضجة (Mature embryos) أو تكون مفصولة من بذور غير ناضجة أو في مراحل النشوء الأولى بعد حصول الإخصاب وتسمى بالأجنة غير الناضجة (Immature embryos) والتي يستوجب الأمر عند زراعتها إتباع تقانة إنقاذ الجنين (Embryo rescue) كما سيأتي شرحه لاحقاً.

زراعة الأجنة الناضجة: تُفصل من البذور الناضجة بعد تعقيمها سطحياً بأحد المُطهرات المعروفة وزراعتها في وسط معلوم المُكونات لتحقيق غرض أو أكثر مما يلي:

1- عند بقاء الأجنة ساكنة لمُدة طويلة داخل البذور أو الثمار ولكن هناك رغبة في تسريع إنباتها.

2- عندما تكون فُرصة نجاحها قليلة في تكوين بادرات جيدة عند زراعتها في الحقل.

3- تجنب تثبيط الإنبات عند زراعة البذرة او الثمرة كاملة بسبب عوامل فسلجية داخلية أو خارجية ناتجة عن مُثبطات كيميائية وخاصة مايتعلق بوجود مُثبطات الإنبات في أغلفة البذور وكذلك لأسباب فيزيائية مثل صلابة أغلفة البذوروعدم توفر ظروف الإنبات المُناسبة حقلياً.

4- في حالات كون البذور عقيمة بسبب إحتوائها على نُصف العدد من الكروموسومات مما يستوجب الأُمر زراعتها خارج الجسم الحي ومن ثم مُعاملة البادرات العقيمة بمادة الكولشسين لكي تتضاعف أعداد كروموسوماتها وتصبح بادرات ينتج عنها نباتات خصبة ونقية وراثياً. تُزرع الأجنة الناضجة في الغالب بسهولة طالما انها تنمو في وسط غذائي يحتوي على مُكونات غير عضوية إضافة الى مصدر الطاقة والذي غالباً ما يكون السكروز.

تقانة إنقاذ الجنين Embryo rescue

هناك العديد من الحواجز التي تجعل من عملية التلقيح والإخصاب ونشوء الجنين بين الأنواع النباتية مُستحيلة والتي يُمكن تلخيص الأكثر أهميةً منها وكما يلي:

1- حواجز ما قبل الإخصاب وتشمل:

أ- في سطح الميسم وقبل دخول حبة اللقاح في إنبوب اللقاح.

ب- داخل نسيج الميسم والمدقة.

ت- داخل المبيض والكيس الجنيني.

2- حواجز ما بعد الإخصاب وتشمل:

أ- فقدان حيوية الأجنة الهُجن.

ب- فشل الهُجن في الإزهار.

ت- عقم الهجين.

ث- نقص في التكامل (Complementation).

ج- إنهيار الهجين في الجيل الثاني أو الأجيال اللاحقة.

ولابد من الوقوف عند هذا الموضوع وإطلاع القارئ على الآليات الفسلجية والوراثية المُسببة في تثبيط إنبات حبوب اللقاح والخطوات اللاحقة (شكل 5.11). يحصل من مُجمل عوائق التلقيح والإخصاب ان تسقط حبوب اللقاح على الميسم وبسبب عدم التوافق في الصفات المورفولوجية لحبوب اللقاح مع سطح الميسم، ينتج عنه ضمور في حبوب اللقاح وبالتالي موتها قبل دخولها في إنبوب اللقاح. قلة المحتوى الرطوبي لحبوب اللقاح هو الآخر قد يكون مُحدداً لإنباتها وخاصة إذا ما رافقه جفاف في الميسم. يحصل وفي حالات عديدة نُقص بالمواد المُشجعة في إستمرارية تغلغل النُطف داخل إنبوب اللقاح بعد إنباتها وتكوين إنبوب اللقاح داخل القلم ولربما لايُوفر الأخير كافة المُتطلبات التغذوية الازمة لإستمرارية نمو الإنبوب اللقاحي. يحصل في حالات أُخرى وبعد وصول إنبوب اللقاح الى البويب نُقصاً في بعض العوامل الكيميائية.

وحال دخول إنبوب اللقاح الى البيضة والكيس الجنيني، قد يكون هناك نُقصاً في مُستلزمات الإندماج الثنائي لتكوين البيضة المُخصبة او الثلاثي لتكوين السويداء. ولابُد والحالة هذه من اللجوء الى وسيلة يُمكن بوساطتها إنقاذ الجنين فيما لو حصل الإخصاب. تشمل التقانة على زراعة الأجنة غير الناضجة لغرض إنقاذها كونها لم تصل مرحلة النضوج بعد أو لكونها تفشل لاحقاً في تكوين بذور خاصةً عندما تكون هناك رغبة في إنتاج أصناف هجينة ذات صفات عالية الجودة. ينطبق الكلام على وجه الخصوص في حالة الجنين المُتكون عندما يكون مُهدداً بالإجهاض خاصةً عندما تنتج السويداء سموماً أو مُثبطات تقتل الجنين، وبوساطة

تقانة إنقاذ الجنين عندئذٍ يُمكن إنتاج نباتات كاملة ذات حيوية وخصوبة مُناسبة وقد تنتج نباتات جديدة (Novel) غير موجودة في الطبيعة سابقاً بالنظر لإجهاضها في الحالات الطبيعية. وما يحصل في الطبيعة في واقع الحال بان السويداء تُجهز الجنين بالغذاء لحين نُضجه وبالتالي تكوين بذور خصبة. والغالبية من حالات إجهاض الجنين ترجع الى فشل أنسجة السويداء في النشوء وبالتالي لا يُجهز الجنين بالغذاء. توفر عندئذٍ تقانة إنقاذ الجنين فُرصة للجنين الهجين للعيش والنجاة قبل إجهاضه.

حالات ما بعد التلقيح — السبب المُحتمل لعدم الملائمة

التلقيح

↓ ← **نُقص في التكامل المورفولوجي**

إلتصاق حبة اللقاح

↓ ← **إختلاف في الجهد الازموزي بين حبة اللقاح والميسم**

رطوبة حبة اللقاح

↓ ← **(1) جفاف غير مُسيطر عليه لحبة اللقاح**

← **(2) عدم إنبات حبة اللقاح لاسباب تتعلق بالميسم**

إنبات حبة اللقاح

↓ ← **غياب منشطات مطلوبة كبوادئ لتشجيع حبوب اللقاح للإنبات**

اختراق الميسم وتكوين انبوب اللقاح

↓ ← **عدم إمكانية أنابيب اللقاح للاستفادة من المغذيات التي يوفرها القلم**

← **إختلاف في طول القلم بين الابوين**

نمو انبوب اللقاح خلال المدقة

↓ ← **غياب العوامل الكيميائية الساندة داخل البويب**

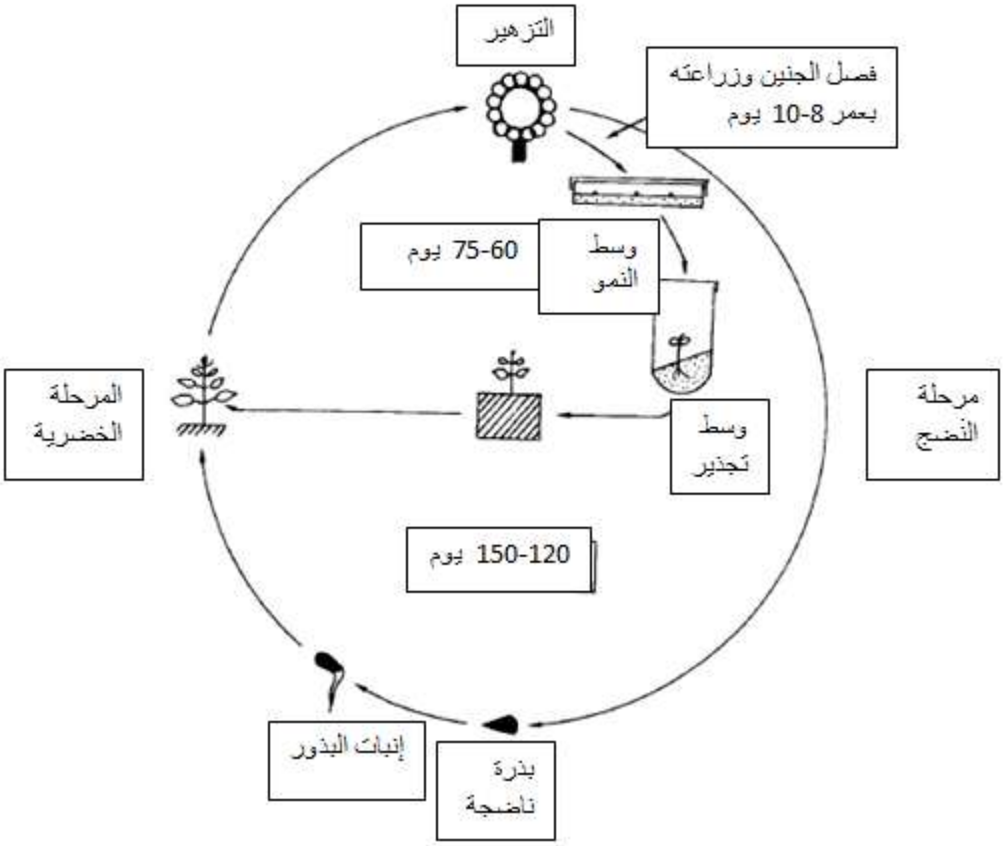
دخول انبوب اللقاح الى البيضة والكيس الجنيني

↓ ← **نقص في عوامل الإندماج الثنائي او الثلاثي**

الإخصاب المزدوج

شكل 5.11. المواقع المُحتملة لتثبيط إنبات ونمو حبوب اللقاح والآليات المُحتمل حصولها.

يوضح الشكل 5.12 مراحل إنقاذ الجنين إبتداءاً من التزهير وإنتهاءاً في الحصول على نبات كامل، ويلاحظ بأن العمر المُناسب لفصل الجنين غير الناضج وزراعته بهدف إنقاذه يكون بحدود 8-10 يوم مالم يجهض قبل هذه الفترة عندئذٍ يجب إنقاذه قبل أن يجهض وتُفيد التقانة في تقصير دورة حياة النبات الى النصف تقريباً.



شكل 5.12. مُخطط مُختصر لزراعة جنين غير ناضج (8-10 أيام بعد التلقيح) من أجل تقليل دورة حياة نبات زهرة الشمس من 120-150 يوماً الى 60-75 يوماً.

نشوء الأجنة والسويداء Embryo and endosperm development

لعل نبات الذرة الصفراء من أكثر المحاصيل التي دُرست في هذا الخصوص حيث سُجل تطور خلية بيضة معزولة مُفردة الى بيضة ثم جنين واخيراً الى نبات هجين خصب وكذلك من تطور خلية مركزية معزولة الى سويداء بعد التهجين خارج الجسم الحي. ينشأ كل من الجنين والسويداء على إنفراد عند زراعتهما على وسط غذائي مُناسب دون الحاجة الى نسيج الأُم. تبين من خلال البحث والتقصي ضرورة الاستفادة مما يُسمى بالمزارع الساندة (Co-cultivation) لغرض ضمان إستمرارية نمو البيضة المُخصبة خارج الجسم

الحي والبيضة غير المُخصبة وذلك بزراعة كلاً منهما مُنفردة مع خلايا مُغذية (Feeder cells) لتحقيق نمو مثالي لهما. تمر البيضة المعزولة والمزروعة في وسط مُناسب وإسناد الخلايا المُغذية بمراحل مُتعددة لتبدأ من مرحلة الإنتقال الى الجنين حيث تنشأ منطقة خلايا مرستيمية وظهور أنسجة بيضاء اللون مضغوطة أشبه بالقصعة (Scutellum-like compact white tissue) ومن ثم تركيب ورقي (Coleoptile) ليتطور أخيراً الى نبيتة. والجدير بالذكر بان النبات ينشأ دون المرور بفترة نضج على عكس النبات الناتج من جنين البذرة تحت ظروف الحقل. تُعد البذور الناتجة من إخلاف النبات الجديد الناتج من زراعة البيضة بذورالجيل الثاني (F_2 generation). سُجلت العديد من المُلاحظات وكما مر سابقاً عن زراعة البيضة المعزولة من الذرة الصفراء ومنها حيويتها العالية وبداية تكوينها لجدار خلوي أثناء 30 ثانية من إندماجها مع النُطفة الذكرية. يُلاحظ حصول التزاوج (الإندماج) النووي (Karyogamy) بعد الإخصاب خارج الجسم الحي بفترة تتراوح من 35 الى 45 دقيقة لخلية البيضة وحوالي ساعة واحدة للخلايا المركزية. تنتهي العملية بالكامل في كليهما أثناء ساعتين من وقت الإخصاب. يتم تحديد وقت الإندماج النووي بإستعمال نوى معزولة ومصبوغة بصبغة DAPI سواء لخلية البيضة او للخلايا المركزية.هناك نوعان من الإندماج في الخلايا المركزية المُخصبة مُختبرياً، تندمج خلية النُطفة الذكرية (Sperm) مع إحدى الخليتين القُطبيتين أو تندمج مع النواة الثانوية (Secondary nucleus) والتي تتكون قبل التلقيح والإخصاب. سُجلت تلك الحالة في البيضة المُخصبة مُختبرياً المعزولة من الذرة الصفراء والحنطة بعد إنقسامهما تحت ظروفٌ مُسيطر عليها. إعتماداً على ظروف المزرعة، تشرع البيضة المُخصبة المعزولة من الذرة الصفراء بالنشوء بعد 29 ساعة من إخصابها مُختبرياً بينما تستغرق 16 ساعة تحت ظروف الحقل وتتراوح في الحنطة من 42 الى 46 ساعة بعد إخصابها مُختبرياً.

تورث قُطبية البيضة المُخصبة في الغالب من الأم بسبب عدم تساوي كمية السايتوبلازم ضمن البيضة الواحدة. عند المُقارنة لحالة الكيس الجنيني في النبات الكامل، حيث يُحيط جدار الخلية عموماً بالبيضة فقط في منطقة البويب (Micropylar region)، تحتفظ البيضة المعزولة والمزروعة مُختبرياً بقطبيتها بعد تكوينها جدار خلوي جديد بنمط قطبي (Polar fashion). تنقسم بيوض الذرة الصفراء المُدمجة مع خلايا نُطف ذكرية من الشعيربشكل غير مُتناظر (Asymmetrically) بطريقة مُشابه لإنقسام بيضة الذرة الصفراء بعد الإندماج المُتماثل (Homologous fusion). لوحظ ايضاً إنقسام غير مُتناظرلخلية البيضة في الذرة بعد دمجها مع نُطفة معزولة من نبات الحنطة ولكن عند دمج خلية حنطة مع نُطفة من الذرة الصفراء، فسطح البيضة المُخصبة المُنقسم يكون مُتماثل نوعاً ما وبذلك يكون مُشابهاً للحالة السابقة عند دمج خلية البيضة مع

نُطفة معزولة من الحنطة. لايزال البحث مُستمراً في النباتات الراقية حول الجينات المُنظمة لدورة الخلية أثناء دورة الخلية المُخصبة حديثاً بالرغم من الدراسات المُكثفة التي أُجريت في نبات الذرة الصفراء. وِجد ان جينات دورة الخلية (Cyclin genes) في الذرة يتم التعبير عنها بتباين أثناء دورة إنقسام الخلية الجنينية الأول والتي تُنظم من قبل البيضة المُخصبة وليس من قبل نسيج الأُم كما هو الحال في العديد من البيوض الحيوانية المُخصبة. تُعبر خلايا نطف الذرة الصفراء وراثياً من خلال جينات دورة إنقسام الخلية المُتخصصة مثل *cdc2ZmA/B*، the mitotic cyclin Zeama، *CycA1* بينما لم يحصل مثل هذا التعبير الجيني في الأُمشاج الذكرية لجينات إنقسام دورة الخلية في الذرة الصفراء(Mitotic cyclins Zeama) التي تشمل *CycB1* و *CycB2*. يقود ذلك الى التساؤل عن طبيعة مُساهمة خلية النُطفة في إنقسام خلية البيضة مما حدى بالمُختصين الى تجريب دمج خليتين من بيوض الذرة الصفراء وزراعتهما خارج الجسم الحي، وتبين عدم إستجابة البيضة ولا نواتج الدمج للإنقسام مما يُلقي الضوء على دور النُطفة في عملية الإنقسام. ولكن وكما هو الحال عند زراعة خلية جسمية، لوحظ ان إضافة كمية عالية ولفترة قصيرة من 2,4-D، تُحفّز إنقسام كلاً من خلية البيضة المعزولة والخلايا المركزية وسجل نشوء الخلايا المركزية غير المُخصبة الى سويداء في طافر (Mutant) من نبات الأربدوبسس (*Arabidopsis*).

دُرست بِعمق الإشارات المُحفزة لتنشيط البيضة وإخصابها في الحيوانات والنباتات الواطئة ووظفت نتائج تلك الدراسات في النباتات الراقية. لوحظ تمركز آيونات الكالسيوم ومُستقبلات الكالسيوم من بروتين الكالموديولين في فُسح أنوية خلايا البيضة المُخصبة وغير المُخصبة للذرة الصفراء. من المعلوم عن آيونات الكالسيوم دورها الأساسي في تنظيم العمليات الايضية ونقل الإشارة ويبدو ان المُستويات العالية من هذا الآيون مطلوبة في المراحل الأولى من الإخصاب وينتشر تدفقه الى كافة أجزاء غشاء البلازما لخلية البيضة إبتداءاً من الفُسحة التي يحصل فيها إندماج النُطفة مع البيضة.إما بخصوص إخصاب الخلية المركزية، فقد دُرس هو الآخرفي الذرة الصفراء ولم يُسجل اي إنقسام لهذا النوع من الخلايا قبل إخصابها وكما هو حال خلية البيضة التي لا تنقسم في أوساط الزراعة. بالمقابل فالخلايا المركزية المُخصبة تنشأ الى أنسجة مُميزة. تستغرق عملية التحول (Transition) من جبلة مُتعددة النوى (Syncytium) الى مرحلة تكوين الخلايا (Cellularisation) للسويداء خارج الجسم الحي حوالي 3-5 يوم بعد الإخصاب. تتطور سويداء الذرة الصفراء في البداية بسرعة عالية في البويب (Micropylar)عما هو عليه في المنطقة المُتقابلة الأقطاب من كيس الجنين المُخصب وتتميز خلاياها بكثافة سايتوبلازمها وتتمركز في قاعدة الجزء المُعلق (Suspensor) والخلايا واسعة الفجوات وفي حالات أُخر بقرب الجنين. تشتمل السويداء المُنتجة خارج الجسم الحي بشكلها

شبه الدائري الذي يحتوي خلايا صغيرة ذات سايتوبلازم كثيف ويشتمل ايضا على جزء مُستطيل ذات خلايا كبيرة وينشأ الأخير أسرع من الأول في المزارع النسيجية. يُعتقد ان للتشابه في القطبية المظهرية (Morphological polarization) في كلاً من الجنين والسويداء مؤشراً على إنهما يسلكان مراحل نشوئية مُتشابهة ولربما لهما نفس المنشأ وقد تعتبر الخلية المركزية كخلية بيضة مُحورة وكسويداء مُبكرة نشأت من جنين ثاني لينشأ وينتج عنه نوع خاص من عملية تكوين الأجنة. يبدو ان نشوء السويداء يكون مُحدداً إذ لم يحصل إخلاف من السويداء خارج الجسم الحي لحد الان لكن حصل وان تطُورت براعم خضرية من سويداء معزولة ومزروعة نسيجياً في العديد من الأنواع النباتية. سُجل ايضاً إخلافاً من مزارع الكالس التي نشأت من سويداء مفصولة ومزروعة على وسط غذائي مُناسب. أعطى الكالس والمُعلق الخلوي المُشتق من سويداء غير ناضجة إخلافاً في الذرة الصفراء.

زراعة نسيج الجويزاء Nucellus culture

يُبطن نسيج الجويزاء جدار المبيض الداخلي وتتطور أجنة داخل هذا النسيج بعد تلقيح الأزهار في أنواع نباتية محدودة جداً. يشتمل جنس الحمضيات (*Citrus*) على أنواع أُحادية الأجنة (Monoembryonate) وأنواع مُتعددة الأجنة (Polyembryonate) ولغرض زراعة نسيج الجويزاء، يُفصل جُزء من النسيج من الأزهار المُلقَحة حيث تكون الأجنة قد نشأت من خلايا النسيج وتكون محصورة في النُصف المُتواجد فيه البويب (Micropyler) من نسيج الجويزاء. ذكرت التقارير العلمية بأن نسيج الجويزاء المفصول من كرابل بعد تلقيح الأزهار وعندما تكون الأجنة بمرحلة الطوربيد وزراعتها على وسط وايت (White^s medium) المُعزز بمُتحلل الكازين (Casein hydrolysate)، أنتجت كالس والذي أعطى بُصيلات كاذبة (Pseudobulbils) نشأت الى أجنة ومن ثم الى نُبيتات. بينت تقارير أُخرى نشوء أجنة من أنسجة الجويزاء المفصولة من مبايض قبل إخصابها شريطة إضافة مُستخلص من منقوع الشعير (Malt extract) والأدنين وللأسف لن تنبت تلك الأجنة ما لم تُنقل الى وسط مُضافاً له GA3 حينئذٍ تنشأ الأجنة الى نُبيتات.

توسعت بعض الدراسات لتشمل أنواع وأصناف مُحددة من الحمضيات أُحادية الأجنة وتحديداً *C.grandis, C. limon, C. reticulate, C. sinensis* وبالرغم من أن نسيج الجويزاء المفصول بعد إخصاب البيضة يُعطي جنيناً خضرياً واحداً، يكون النبات الناتج خالٍ من الأمراض وبذلك يُمكن توفير فُرصة لِلمُهتمين في إكثار أشجار الحمضيات في إنتاج نباتات خالية من الأمراض تكون مُستقبلاً مصدراً جيداً لفصل الطعوم منها. سُجل فشل نسيج الجويزاء بالنمو عند فصل قطع من نسيج السويداء بعد 100-120 يوماً من

تلقيح الأزهار وزراعتها في وسط وايت مُعزز بمُتحلل الكازين ولكن عند إستبدال الأخير بمنقوع الشعير، تطورت ما نسبته 10-12% من الأنسجة المزروعة الى أجنة. ذكر نفس التقرير السابق تطور الأجنة مُباشرة من خلايا الجويزاء دون المرور بالكالس أو تكوين التراكيب المُشابهة للبُصيلات الكاذبة التي ظهرت عند زراعة أنسجة الجويزاء المفصولة من حمضيات مُتعددة الأجنة. نَمت الأجنة خارج الزجاج (*In vivo*) وتطورت الى نُبيتات بعد 6-7 أسابيع. ومن المعلوم أن ظاهرة تعدد الأجنة ليست محصورة في الحمضيات بل في أجناس نباتية أُخرى مثل العنب (*Vitis vinefera*)، أشجار التفاح (*Malus domestica*)، نبات الحبل السام (*Cynachum vincetoxicum*).

زراعة أنسجة الجويزاء ذات أهمية في المجال البستني، حيث تكون النباتات الناتجة مُطابقة في مواصفاتها للنبات الأُم من حيث نقاوتها الوراثية وليست كالبادرات الناتجة من البذور التي تُظهر تغاير وراثي بين الأفراد. سجلت التقارير العلمية ايضاً أفضلية النباتات الناتجة من زراعة الجويزاء مُقارنةً مع تلك المُنتجة بالعُقل بالرغم من أن كليهما إكثاراً خضرياً للأسباب التالية:

1- إحتواء النباتات الناتجة من الجويزاء على جذر وتدي (Tap root) وبذلك ينشأ مجموع جذري قوي مُقارنةً بالمجموع الجذري الجانبي المُنتشر وغير المُتعمق الذي تُكونه العُقل.

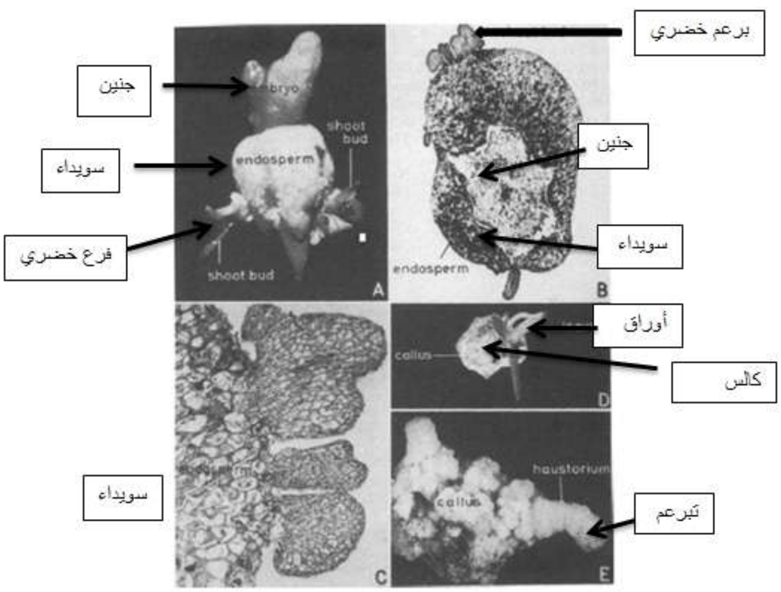
2- تحتفظ النباتات المُكثرة من أنسجة الجويزاء بنشاطها (Restore vigour) بينما تفقد النباتات الناتجة من العُقل تلك الصفة عند الزراعة المُتكررة بالعُقل.

3- الأجنة والنُبيتات الناتجة من أنسجة الجويزاء خالية من الأمراض وبذلك تم إنتاج نباتات أُمهات خالية من الأُمراض وخاصةً الفيروسية من نباتات حمضيات مُتعددة الأجنة.

زراعة السويداء Endosperm culture

يمتلك نسيج السويداء خصائص فريدة من نوعها لكونه يحتوي ثلاثة أطقم من الكروموسومات (3x). ينشأ نسيج السويداء في ما يُقارب من 81% من العوائل النباتية المزهرة من إندماج 3 أنوية 1n، أحدهما من المشيج الذكري وإثنان من المشيج الإنثوي وبذلك ينشأ نسيج السويداء ثلاثي المجموعة الكروموسومية (Triploid). ونسيج السويداء المصدر الأساس لغذاء الجنين ويعُد المركز الحركي (Dynamic center) لنشوء الجنين وإيقاف وظيفة نسيج السويداء إو عدم وجوده (أو إزالته) يسبب في إجهاض الجنين. قد يُستهلك نسيج السويداء من قبل الجنين وبذلك لا تحتوي البذور الناضجة على السويداء (Non-endospermous)

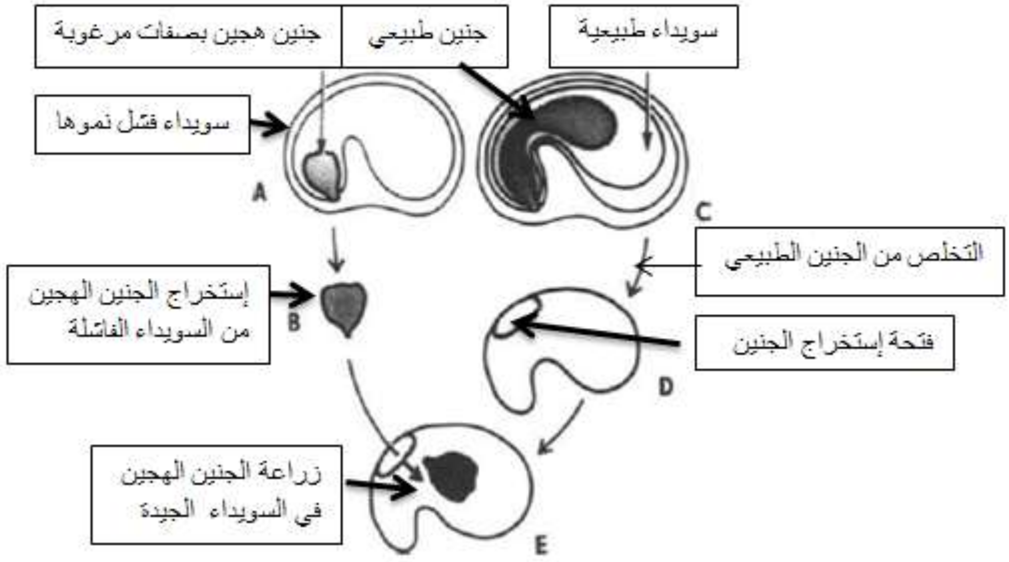
مثل البقوليات والقرعيات أو تبقى السويداء وتحتفظ بخزين غذائي عالي في البذرة الناضجة مثل بذور الحبوب، الخروع، جوز الهند، القهوة وغيرها. تُستهلك المواد المخزونة ويستفاد منها الجنين النامي الى أن يصبح بادرة تعتمد على نفسها. تُمثل أنسجة السويداء نظام راقي في الدراسات المورفولوجية، فإضافةً كونها ثلاثية العدد الكروموسومي، فهي كتلة مُتجانسة من الأنسجة البرنكيمية ينقصها تخصص الأوعية الناقلة. تتمكن كافة الأنسجة المبيضية في تكوين أجنة في الطبيعة ولكن لاتوجد حالة مؤكدة تبرهن تكوين أجنة من السويداء طبيعياً. ظهرت في السنوات الأخيرة الأُمكانيات الكبيرة التي توفرها خلايا السويداء من حيث نموها اللامحدود وتخصصها الى أعضاء خارج الجسم الحي (شكل 5.13).



شكل 5.13. (A) بذرة نبات *Scurrula pulverulenta* بعد 16 يوماً من زراعتها في وسط White مُزود بالزياتين (10^{-5} M)، لاحظ التمايز الى براعم من السويداء. (B) مقطع من البذرة المزروعة مُبينةً البراعم الظاهرة من مُحيط السويداء. (C) جزء من B يوضح موقع ظهور البراعم من الطبقة السطحية للسويداء. (D، E) براعم مفصولة من السويداء تم فصلها وزراعتها في وسط مُزود بالاوكسين IAA، كاينيتين و متحلل الكازائين. نتج من البراعم التي أعطت كالساً فروعاً خضرية. وكذلك إنتاجها نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية مع إمكانية إستثمارها كبديل عن تضريب نباتات رباعية العدد الكروموسومي مع ثنائية لإنتاج الثلاثية (4X x 2X = 3X) وبذلك إختصار لبرامج تحسين النبات.

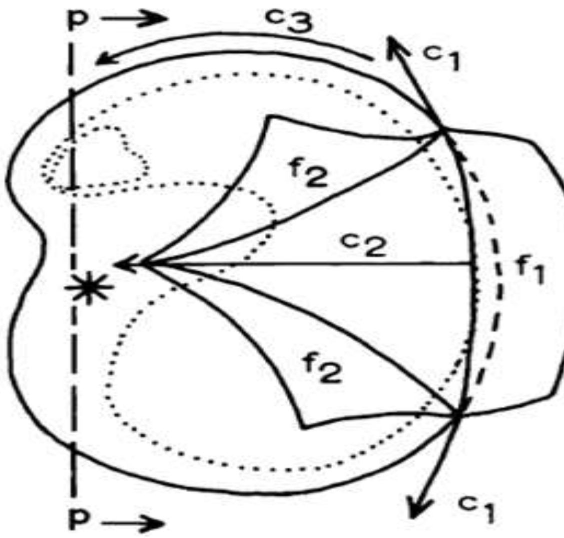
يخزن نسيج السويداء كميات كبيرة من الغذاء في شكل نشاء، بروتينات، دهون والتي تتحلل أثناء إنبات البذور وتطور الأجنة وبهذا توفر فرصة كبيرة لدراسة ايض هذه المواد ونواتجها.

إنقاذ الأجنة الهجينة: وظِفت السويداء الطبيعية والتي لا تسبب في إجهاض الأجنة بإستبدال أجنتها بأنواع هجينة ذات صفات مرغوبة ولكن تجهض أجنتها بعد التلقيح بفترة قصيرة بسبب فشل السويداء بتوفير الظروف المناسبة لنمو الجنين الهجين لأسباب عدم التوافق كوجود مثبطات او نقص في المغذيات (شكل 5.14). وبذلك يتم إنقاذ الجنين (Embryo rescue) بزراعته داخل السويداء الجيدة ليعتمد عليها في نموه وتطوره وبذلك يتم الحصول على هجن جديدة ذات صفات عالية الجودة.



شكل 5.14. نقل الأجنة الهجينة من بيوض ذات سويداء تفشل في نموها الى أُخرى طبيعية في نموها . (A، B) إزالة الجنين الهجين من البيضة المخصبة والتي فشل فيها نمو السويداء. (C) فصل بيضة نامية طبيعياً ناتجة من تلقيح نوعين نباتيين عندما تكون في المرحلة الحاوية على سويداء تُغلف جنين بمرحلة شكل القلب أو شكل الطوربيد. (D) يتم التخلص من الجنين الطبيعي تاركاً فتحة في السويداء. (E) إدخال الجنين الهجين الى داخل السويداء الطبيعية من خلال الفتحة.

تحتاج تقانة فصل الجنين وزراعته داخل السويداء الجديدة الى تقني ماهر ذو معرفة جيدة في الصفات التشريحية والتصنيفية للنباتات بحيث يُقلل التلف في الأنسجة المقطوعة وعلى دراية بعدد الأيام بعد التلقيح التي يُجهض فيها الجنين الهجين وإنقاذه في الوقت المناسب. عموماً تُتبع طريقة القطع الموضحة في شكل 5.15 والموضحة تفاصيلها أسفل الشكل.



شكل 5.15. طريقة نجحت في فصل بيوض من نباتات *Trifolium*، *Lotus*، *Ornithopus* بطول 1.0-1.5 ملم. C1، C2، C3 تمثل أجزاء من سلسلة مُتعاقبة من مواقع القطع بإبرة جراحية. تمثل f1 و f2 طيات غلاف جدار البيضة تم تقشيرها بعد القطع لمشاهدة محتويات الكيس الجنيني. P---p تمثل إمتداد الخط الذي يجري الضغط عليه (من اليسار الى اليمين) بجانب إبرة الجراحة لإستخراج الجنين والسويداء من الكيس الجنيني. * موقع إدخال الإبرة الى داخل الأنسجة التركيبية لمسك البيضة مُستقرة دون تلف الكيس الجنيني.

أُستثمرت الزراعة النسيجية في إنتاج نباتات من نسيج السويداء الذي يتميز بالخصائص التالية:

1- بسبب وظيفة السويداء كمُجهز بالمغذيات للجنين.

2- لِكون السويداء ثلاثية المجموعة الكروموسومية (Triploid) في تركيبتها الكروموسومية وبذلك فالنباتات الناتجة من زراعة السويداء تُكون ثماراً عديمة البذور (Seedless fruits) كما هو الحال في التفاح، الموز، الرقي ...الخ.

3- تُفيد كثيراً في الدراسات السايتولوجية لوجود 3 طقوم (3 sets) من الكروموسومات وعليه تكون خلايا النباتات الناتجة Trisomics. ومن المعلوم بأن الإنتاج الروتيني للنباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية يتم بعد تضاعف أعداد نباتات 2n الى رباعية (Tetraploids) بالكولشسين ومن ثم تهجين الأخيرة مع ثُنائية (Diploids) أي 4X x 2X ويتم إنقاذ الجنين ثلاثي المجموعة الكروموسومية (Triploid). وبالنظر لتوقع حصول فشل في التلقيحات هذه لسببٍ أو آخر، لذلك يُفضل زراعة السويداء بدلاً من إجراء التهجينات. تشتمل تقانة زراعة السويداء الخطوات التالية:

1- تُقطع البذور غير الناضجة تحت ظروف تعقيم وتُفصل السويداء مع الجنين.

2- تُزرع السويداء مع الجنين في وسط مُناسب وتُزال الأجنة بعد شروعها بالنمو.

3- عند نشوء الكالس من أنسجة السويداء، يُمكن حثها على تكوين أجنة جسمية أو قد تتكون الأعضاء (التمايز الى براعم خضرية) مُباشرةً.

4- يُستفاد من الأفرع الخضرية والجذور الناتجة في الإكثار الدقيق والدراسات الكروموسومية. وإدناه أمثلة (جدول 5.2) لأنواع نباتية وعوائلها التي كونت أفرع خضرية وأخلفت نباتات من زراعة نسيج السويداء.

النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية (1n) Haploids

وتُعرف بانها بوغيات (Sporophytes) أُحادية المجموعة الكروموسومية (1n)، وبذلك يكون التعبير المظهري للنباتات الأُحادية ناتج من معلومات نُسخة واحدة من الجينات إما تكون سائدة او مُتنحية بل ويتعداه الأمر في التعبير عن الطفرات المُتنحية مظهرياً.

الأجنة الجسمية المُباشر (Direct somatic embryogenesis) والتي تتصرف حبوب اللقاح فيها أشبه ما يكون بالبيضة المُخصبة بعد ان تمر في سلسلة من الإنقسامات لتنشأ الى ما يشبه الأجنة (Embryoids) لينتج عنها أخيرا نُبيتات أُحادية المجموعة الكروموسومية. وبالإمكان إنتاج الأخيرة بطريقة غير مُباشرة اذ تمر حبوب اللقاح بإنقسامات مُتتالية مُكونة كتلة من نسيج الكالس ليتمايز الى نُبيتات أُحادية المجموعة الكروموسومية. ومن المعلوم فأن النباتات الناتجة تكون غير خصبة اي عقيمة (Sterile) ويُمكن مُضاعفة عدد كروموسوماتها بواحدة او أكثر من التقانات وتُعد مُعاملة النُبيتات بمادة الكولشسين تُعد الطريقة الأكثر شيوعا.

إكتشف Tulecke عام 1953 بأن الأنسجة الحاوية على نُصف عدد الكروموسومات (1n) يُمكن زراعتها لتُعطي نباتات نقية وراثيا ولكن لم يولي الموضوع الإهتمام لحين تمكن Guha و Maheshwari للفترة 1964-1967من إنتاج نباتات 1n من حبوب لقاح نبات الداتورة (*Datura innoxia*) بعد زراعة مُتوكها الكاملة (Intact anthers) .

جدول 5.2. النوع النباتي والعائلة التي يعود لها والتي تم إخلافها بنجاح من زراعة نسيج السويداء خارج الجسم الحي

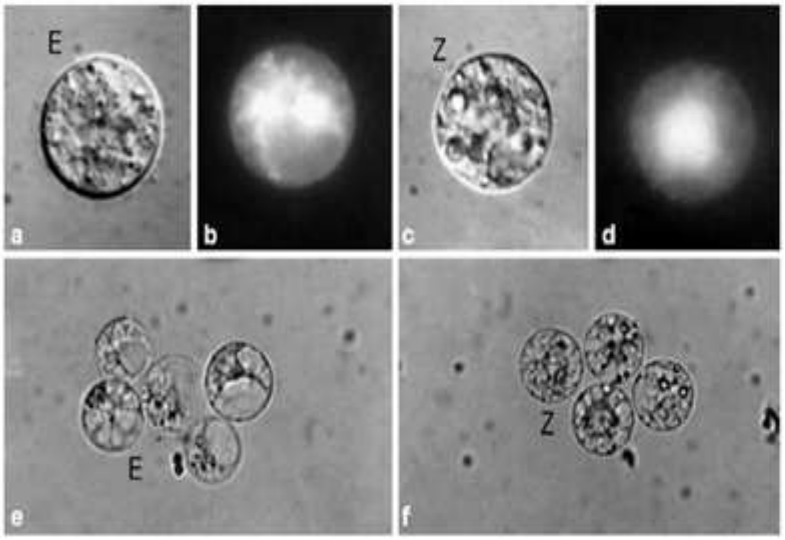
النوع النباتي	العائلة
Acinidia chinensis	Actinidiaceae
Actinidia هجن من	Actinidiaceae
Annona squamosa	Annonaceae
Petroselinum hortense	Apiaceae
Codiaeum variegatum	Euphorbiaceae
Jatropha panduraefolia	Euphorbiaceae
Putranjiva roxburghii	Euphorbiaceae
Dendrophthoe falcata	Loranthaceae
Scurrula pulverulenta	Loranthaceae
Taxillus vestitus	Loranthaceae
Oryza sativa	Poaceae
Prunus persica	Rosaceae
Pyrus malus	Rosaceae
Citrus grandis	Rutaceae
Citrus sinensis	Rutaceae
Exocarpus cupressiformis	Santalaceae
Santalum album	Santalaceae
Lycium barbarum	Solanaceae

فتح ذلك الباب لدراسات مُستفيضة في هذا الموضوع. بُنيت تقانة زراعة حبوب اللقاح والمُتوك في مبدأ زراعة النُطفة (Microspore) في وسط غذائي مُناسب لتنتج خلايا خضرية بدلاً من حبوب لقاح. يبدو ان

التحول من حالة تطورالنُطفة الجنسي (Sexual gametophytic) الى الحالة الخضرية (Sporophytic)، تبدأ في مرحلة مُبكرة من دورة الخلية عند توقف إستنساخ الجينات المُرتبطة بتطور المشيج الجنسي في الوقت الذي تُفعل فيها جينات التحول الى الحالة الخضرية. وبدلاً من إنتاج حبوب اللقاح للأبواغ وأنابيب اللقاح، فانها يمكن ان تُكون أجنة أولية جسمية أُحادية المجموعة الكروموسومية من الأبواغ مُباشرة (Haploid somatic pro-embryos) او كالس. يُطلق احيانا على عملية تكوين نباتات من حبوب اللقاح بمُصطلح Androgenesis. تنتج نباتات 1n من زراعة حبوب اللقاح وهي داخل المُتوك اسهل مُقارنة بزراعة حبوب اللقاح بعد إستخراجها من المُتوك اذ يُعتقد ان جدر المُتوك تحتوي على مُحفزات مُعينة لها دور في تحول حبوب اللقاح من الحالة الجنسية الى الخضرية. وبالرغم من عدم معرفة طبيعة المُحفز لكن يُعتقد بانه إما لسبب تغذوي او هرموني اوكليهما علما بان تكوين الأجنة (Embryogenesis) من حبوب اللقاح لاتزال محصورة في أنواع نباتية قليلة تكاد تنحصر في نباتات العائلة الباذنجانية وبعض نباتات العائلة الصليبية.

تُعد نواة خلية البيضة المؤنثة غير المُلقحة مصدرا ثانيا لإنتاج نباتات 1n بعملية يُطلق عليها Gynogenesis. توفرت تقانات عزل البيضة سواء كانت مُخصبة أو قبل إخصابها (شكل 5.16). وفي بعض الأنواع النباتية مثل الجربرا، الذرة الصفراء، البنجر السكري والبصل بالإمكان الحصول على نباتات 1n من زراعة البيوض غير المُخصبة، المبايض وكذلك البراعم الزهرية. وفي أنواع أُخرى من النباتات، تتوفر إمكانية إنتاج أعداد كبيرة من 1n بعد تلقيح المبايض بحبوب لقاح لنباتات أُخرى بعيدة عنها وراثيا لحد ما كتلقيح أفراد الجنس فيما بينها او تلقيحها بحبوب لقاح تم تشعيعها بأشعة X او كاما. تؤدي حبوب اللقاح هذه الى تحفيز إنقسام الخلية وتحفيز السويداء في النمو دون ان تنشأ الى جنين جنسي وبالتالي يُمكن إنتاج نباتات 1n. بينت الدراسات التشريحية بان التلقيح الناجح بإستعمال الوسائل أعلاه ينتج منه نمو في نسيج السويداء نتيجة إندماج أحد الأنوية المُولدة (Generative nuclei) لإنبوب اللقاح مع النواة المركزية المُدمجة (Central fusion nucleus) للبوغ الكبير مما يؤدي الى نمو نسيج السويداء. والمُلاحظ عدم حصول إندماج للأنوية المُولدة الأُخرى مع خلية البيضة ولكن تتحفز لتكوين بادرات دون ان تتخصب وهذا ما يُطلق عليه Gynogenesis وكما ورد سابقاً. تبنى مجموعة من الباحثين تقانة أُخرى أنتجت نباتات ورد البوري (*Petunia*) أُحادية المجموعة الكروموسومية وذلك بعد تشعيع المبايض بأشعة كاما ومن ثم تلقيحها بحبوب لقاح طبيعية. والجدير بالذكر ان إنتاج نباتات 1nمن البيوض غير المُخصبة (Gynogenesis) أقل إستعمالاً

مما هو الحال عند الإعتماد على المُتوك او حبوب اللقاح (Androgenesis). وكلتا الطريقتين لهما إستعمالاتهما في مجال تربية وتحسين النبات.



شكل 5.16. خلايا بيوض غير مُخصبة ومُخصبة معزولة من مبايض نبات *Torenia fournieri* (a) خلية بيضة معزولة من الكيس الجنيني قبل يومين من تفتح الزهرة. (b) حيوية البيضة المعزولة بعد فحصها بصبغة فلورسين داي أسيتيت (FDA). (c) بيضة مُخصبة معزولة من المبيض بعد 14 يوم من التلقيح. (d) حيوية البيضة المُخصبة بعد فحصها بصبغة FDA. (c) جمع خمس خلايا بيوض. (f) جمع البيوض المُخصبة.

تكون إحتمالية حصول نبات 1n في الطبيعة نادرة جدا، فقد تُلاحظ في البذور التوأم (البذور الحاوية على جنينين) حيث ينمو أحد الأجنة من البيضة غير المُخصبة والآخر من المُساعدة (Synergid). قد يتكون التوأم من 2n-n حيث ينمو الأول من بيضة غير مُخصبة والثاني من بيضة مُخصبة. يُمكن زيادة أعداد1n في النبات الكامل بوسيلة او أكثر من الوسائل التالية:

1- تحت الظروف الحقلية (*In vivo*) قد تتطور خلية البيضة غير المُخصبة أو المُساعدة الى نبات 1n(Gynogenesis) دون حصول إخصاب إما نتيجة حصول فشل أو تأخير في تلقيحها لاينتج عنه بيضة مُخصبة أو تكون حبة اللقاح مُجهضة بسبب تعريضها مُسبقاً لأشعة مُؤينة، ولربما تلقيحها بحبة لقاح من نبات قريب وقد يكون من نفس النوع. تتطور احياناً نباتات 1nمن البيضة غير المُخصبة بعد حصول التضريب بين نباتات تتبع لأنواع مُختلفة(Interspecific crosses) كالتضريب بين *Solanum tuberosum* و

حيث أُنتجت نباتات بطاطا ثُنائية المجموعة الكروموسومية ونقية وراثياً *Solanum phureja* (Dihaploid 2n=2x) والتي هي اصلاً رباعية المجموعة الكروموسومية (Tetraploid 2n=4x). يستلزم نمو البيضة غير المُخصبة الى جنين ومن ثم نبات أُحادي المجموعة الكروموسومية ان تكون أنسجة السويداء حية وبخلافه يجهض الجنين.

2- الإعتماد على حبوب اللقاح، اذ يتم التخلص من (او إيقاف فعالية) خلية البيضة قبل الإخصاب ويتطورنبات 1nمن خلية البيضة الحاوية على نواة ذكرية قادمة من حبة لقاح ويُطلق على تلك الحالة Androgenesis. تحصل تلك الحالات داخل المُختبر تحت ظروف مُسيطر عليها (*In vitro*). تُحفز النواة الخضرية او المُولدة من حبة اللقاح لتكون نبات 1n دون حصول الإخصاب. ورد في البحوث العلمية بان نباتات العائلة الباذنجانية على وجه الخصوص تستجيب وتتمكن من إنتاج نباتات 1nمن زراعة المُتوك او حبوب اللقاح المُفردة. ذُكرت ايضا حالات أُنتجت فيها نباتات أُحادية وبنفس الطريقة من العوئل النباتية الصليبية والبقولية ولربما عوائل أُخرى. وفي هذا السياق، لوحظ وجود إرتباط وثيق بين قابلية الإخلاف (Regenerative potential) التي تحصل عند الإكثار الخضري لمحصول الرز وبين ما يحصل عند زراعة المُتوك لنفس النبات. وبلاشك كان العالم الهندي مهشواري أول المُهتمين بهذا الموضوع ووضع الأُسس لإكثار أعداد كبيرة من النباتات من زراعة المُتك وخاصة من مُغطاة البذور (Angiosperms). كتب في إحدى مقالاته إمكانية إنتاج نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية من 247 نوعاً نباتياً تتبع الى 88 جنساً وتعود الى 34 عائلة نباتية. المُلاحظ وجود إختلافات كبيرة في إنتاج نباتات 1nحتى ضمن الجنس النباتي الواحد تتباين من سهولة إنتاجه الى صعوبة بالغة، فالتغاير واضح ضمن جنس الرز (*Oryza*) وجنس الطماطم (*Lycopersicon*) وكذلك الحال في العوائل النباتية المُهمة الأُخرى كالباذنجانية والنجيلية مع فُرصة نجاح ضئيل في الأشجار والشجيرات.

3- التخلص من مجين (Genome) والذي يتكون نتيجة تضريبات بين الأنواع أو ضمنها حيث يحصل الإخصاب وبعدها بقليل يتم التخلص من إحدى المجينات تاركاً الآخر مُنتجاً نبات 1n. من الأُمثلة على الحالة الأخيرة، التضريب الذي يحصل بين نوعي نبات الشعير *Hordeum vulgare* و *H. bulbosum* منتجاً نبات 1nمن النوع الأول للشعير.

4- تحصل في قسم من الحالات إنقسام مُستقل لنواة خلية البيضة ولنواة الخلية المُولدة لحبة اللقاح النابتة في إنبوب اللقاح (Generative nucleus) مما ينتج عن ذلك نبات كايميرا 1n وتُسمى الحالة هذه Semigamy.

5- المُعاملة ببعض المواد الكيميائية، فيُمكن التخلص من مجموعة كروموسومية بعد مُعاملة البيضة المُخصبة بمُركبات مثل التوليوين الأزرق، ماليك هيدرازايد، اوكسيد النتروز، الكولشسين، الكلورامفينيكول والبارافلورفينيل النين.

6- قد تحصل حالات تُنتج فيها نباتات أُحادية العدد الكروموسومي ونقية وراثياً بعد تعريض البيضة المُخصبة الى درجات حرارة عالية أو واطئة.

7- تنتج أحيانا نباتات 1n بعد تعريض البيضة المُخصبة الى أشعة X أو UV.

من المعلوم بأن تحفيز تكوين نباتات 1n قد أُكتشف في أثناء زراعة المُتوك وحبوب اللقاح بالزراعة النسيجية من قبل العالمان الهنديان جوها ومهشواري في ستينيات القرن الماضي. كانت البداية لهذين العالمين مع نبات الداتورة (*Datura innoxia*) اذ زرعا مُتوك النبات وانتجا أجنة ذات أعداد كروموسومية مُفردة مما حدا بالباحثين بورجن ونيش ان يحاولا مع التبغ وتكللت مُحاولتهما بالنجاح في إنتاج نباتات تبغ 1n بعد زراعة المُتوك المفصولة من النبات خارج الجسم الحي. كانت تلك النتائج بمثابة إنطلاقة موفقة من قبل العاملين في مجال التقانات الأحيائية النباتية وخاصة العاملين في وراثة النبات وتحسينه بالنظر للفوائد التالية التي يُمكن ان يُحققها إنتاج النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية:

1- إنتاج نباتات نقية وراثياً (Homozygous) بعد الحصول على نباتات حاوية على 1nومُضاعفة عدد كروموسوماتها لتنتج بالتالي نباتات خصبة ونقية وراثياً حاوية 2n. يُمثل هذا الإنجاز أقصر طريق وأسهله للعاملين في مجال تحسين النبات لكون الإنعزالات الوراثية في النباتات النقية تكون بسيطة لأن الجينات السائدة (Dominant) لاتحجب (Mask) الجينات المُتنحية (Recessive). تبرز الحاجة لإنتاج نباتات نقية وراثيا في النباتات ثُنائية المسكن (Dioecious) غير المُتوافقة ذاتياً، علماً ان التلقيح الخلطي يزيد من فُرصة الخلط الوراثي وينتج نباتات مُتغايرة (Heterozygous). تواجه مُربي النبات صعوبات ليس من السهل ان يحصل فيها على نباتات نقية نتيجة التلقيح الذاتي الذي يُرافقه تلقيحاً خلطياً في مجموعة غير قليلة من النباتات بسبب التربية الداخلية او ما يُسمى بزواج الأقارب (Inbreeding). بالرغم من الفوائد التي يُحققها التلقيح الذاتي بإتجاه النقاوة الوراثية، الا أنه يستغرق 5-7 أجيال من التلقيح الذاتي قبل ان يحصل مُربي النبات على

نبات نقي وراثياً في الوقت الذي توفر تقانة زراعة حبوب اللقاح او البيضة غير المُخصبة سنوات من سلسلة التلقيحات الذاتية لينتج بالنهاية نبات نقي وراثياً في عام واحد او أقل.

2- تتجلى أهمية الحصول على نباتات نقية في فترة زمنية قصيرة، في النباتات ذات مرحلة الحداثة الطويلة (Long juvenile phase) اي تستغرق مُدة طويلة من زراعة بذورها لحين أزهارها وتكوينها بذوراً مثل أشجار الفاكهة والغابات ومجموعة من نباتات الأبصال. يستغرق إنتاج نباتات نقية وراثياً وقتاً طويلاً عندئذٍ فيما لو إفترضنا ان تلك النباتات تتلقح ذاتياً ومن المؤكد ان يكون الموقف أكثر صعوبة عند التلقيح الخلطي.

3- أصبح بالإمكان توفر هُجن من الجيل الأول (F1 hybrid) نقية وراثياً نتيجة الحصول على خطوط نقية من زراعة حبوب اللقاح أو البيضة غير المُخصبة.

4- من المُفيد جداً إنتاج نباتات 1nعند الرغبة في التعامل مع نباتات مُتعددة المجموعة الكروموسومية (Polyploidy) لكون 1n ذو مُستويات مُنخفضة من التعدد الكروموسومي فدراسة التوريث وإنتاج توليفات لصفات مرغوبة أسهل بكثير في مُستوى النباتات ثُنائية المجموعة الكروموسومية مما هو عليه في النباتات مُتعددة المجموعة الكروموسومية.

5- توفر النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية (1n) فُرصة لمُربي النبات عند التطفيربأن يُميز الطفرات المُتنحية ($A \rightarrow a$) في الحال، بينما لن يكن ذلك مُمكناً في النباتات الثُنائية 2n اذ تكون توليفة الأليلات $AA \rightarrow Aa$. وحسب قوانين مندل فان Aa تُعطي نسبة1 :4 في الطافر المُتنحي الثنائي أي Double recessive mutant. يُمكن تحفيز وإنتخاب الكثير من الطفرات المُفيدة عند توفر أعداد كبيرة من نباتات 1n، فعلى سبيل المثال، يُمكن إنتخاب نباتات مُقاومة للفايتوتوكسينات من مُستعمرات خلوية أُحادية. ومن الفوائد الإضافية عند تحفيز الطفرات في الخلايا الأُحادية، تجنب حالات حصول الكايميرا.

6- إمكانية إنتاج نباتات 1n ذكرية حصراً بعد تضاعف أعداد كروموسوماتها مما ينعكس إيجاباً في إنتاجية بعض المحاصيل. لعل أقرب مثال على ذلك نبات الخضر الهليون (*Asparagus officinalis*) حيث تكون إنتاجية النباتات الذكرية أعلى وأبكر من نظيراتها الإنثوية. تُحدد النباتات الإنثوية على أنها XX والذكرية بأنها XY وعند التضريب بينهما، ينتج 50% نباتات ذكرية و 50% إنثوية بينما تكون النباتات 1n الناتجة من زراعة المُتك إما X أوY وبعد تضاعف نباتات Y ينتج عنها نباتات عالية الجودة من YY والتي يُمكن إكثارها خضريا فيما بعد.

7- تظهر بعض المشاكل عند مُضاعفة النباتات النقية 1n بعد المُعاملة بالكولشسين تحت ظروف الحقل في الوقت الذي غالباً ما تتضاعف كروموسومات نباتات 1n تلقائياً لتنتج 2n نقية وراثياً عند التعامل معها تحت ظروف الزراعة النسيجية.

8- من المُفضل التعامل مع بروتوبلاستات نباتات 1n بدلاً من نظيراتها من 2n لأغراض التهجين الجسمي إذ أن دمج إثنان من 1n سوف ينتج عنه 2n بينما ناتج دمج 2n مع بعضها ينتج عنه تضاعف رباعي (Tetraploid).

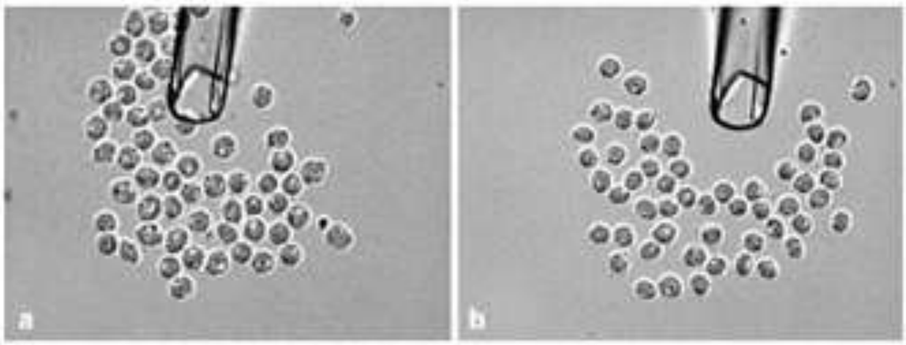
مما تجدر الإشارة اليه، بان نباتات 1n بحد ذاتها ليست مُهمة لمُربي النبات كونها عقيمة ولذلك ينبغي مُضاعفة أعداد كروموسوماتها لكي تصبح خصبة. تتوافر عدة وسائل لإجراء ذلك خارج الجسم الحي، أولهما تلقائياً بعملية الإنقسام الخيطي الداخلي (Endomitosis) والتي غالباً ما تتم في تكوين أجنة أو نموات خضرية عرضية أو المُعاملة بالكولشسين وسيرد تفاصيل ذلك لاحقاً. علماً ان الحصول على نباتات نقية بعد مُضاعفة عدد كروموسوماتها لايُعد هدفاً نهائياً لمُربي النبات بل تُعد مادة أولية لتضريبات مُستقبلية تُثمر عن هُجن ذات صفات كمية ونوعية عالية الجودة.

إنتاج نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية نسيجيا Production of haploid plants *in vitro*

يُمكن إعتماد أحدى الطرائق التالية في الحصول على نباتات 1n:

1- زراعة المُتوك (Anthers culture): ركزت الكثير من الدراسات في فصل المُتوك من النباتات وزراعتها في أوساط غذائية صلبة أو سائلة. يتم تعقيم البراعم الزهرية غير المُتفتحة وفي حالات أُخرى يجري تعقيم المُتوك غير المُتفتحة من الأزهارالمُتفتحة.

2- زراعة حبوب اللقاح المُفردة (Individual pollen grains): من النادر زراعة حبوب اللقاح بسبب المشاكل التقنية وكما سيرد لاحقاً. يدخل المشيج أُحادي النواة في إنقسام خلوي مُتناظر (Symmetric) أو غير مُتناظر (Asymmetric) لينتج عنها خلايا ثُنائية النواة. تستمر العملية لحين الحصول على أجنة ناضجة. تُستخلص حبوب اللقاح تحت ظروف التعقيم التام (شكل 5.17) من المُتوك وهي في مرحلة أُحادية النواة (Uninucleate stage) وتُزرع في وسط غذائي مُناسب. تبدأ بالإنقسام وتطوير أجنة 1n أو كالس دون ان تتحول الى أمشاج ذكرية ناضجة، ينتج عن ذلك نباتات أُحادية نتيجة عملية نشوء الأجنة (Embryogenesis) أو الأعضاء (Organogenesis) على التوالي.



شكل 5.17. عزل خلايا الأبواغ الدقيقة من نبات التبغ. (a) عينة مُكونة من مجموعة كبيرة من الأبواغ الدقيقة. (b) عينة صغيرة من الأبواغ الدقيقة بعد تخفيفها لتصبح أعداد مُناسبة للنشر وزراعتها بطريقة المزرعة الحاضنة.

تُفضل زراعة حبوب اللقاح المُفردة وليس المُتك كاملاً لأن حبوب اللقاح داخل المُتك مُتغايرة وراثيا فيما بينها واذا ما زُرع المُتك كاملاً فسينتج نباتات مُتغايرة. المشكلة التي قد تواجه زراعة المُتك هو ان النباتات الناتجة من الكالس ستكون أنسجة كايميرية وأن العديد من حبات اللقاح ضمن المُتك الواحد قد ساهمت في تكوين الكالس وليس حبة لقاح واحدة وبالتأكيد سينعكس ذلك في إنتاج نباتات تحمل أنسجة كايميرية. لعل من أهم المشاكل التي تُواجه زراعة المُتك كاملاً، نشوء أجنة جسمية من الخلايا الجسمية كغلاف المُتك وبقايا حامل المُتك وبالتالي تنشأ الى نباتات 2n غير مطلوبة هنا. يُمكن عمل شقوق أو فتحات في غلاف المُتك من جهة الوسط الغذائي مما يجعل حبوب اللقاح بمراحلها التطورية الأولى عُرضة الى الوسط وهي داخل المُتك مما لايسمح لها بالتطور الى حبوب لقاح ناضجة بل تنتج نُبيتات أُحادية ويبدو أن تطبيق التقانة الأخيرة بالغ الأهمية لتلافي الصعوبات التي تُواجه زراعة حبة اللقاح المُفردة (شكل 5.18).

3- زراعة النورات الزهرية (Inflorescences culture): غالباً ما تُزرع في وسط سائل.أُستعملت لأول مرة في زراعة نورات زهرية من نبات الشعير. يبدو إنها مُفيدة للحشائش عموماً والنباتات ذات الأزهار الصغيرة وذات الغلاف الزهري (Perianth) المُختزل.

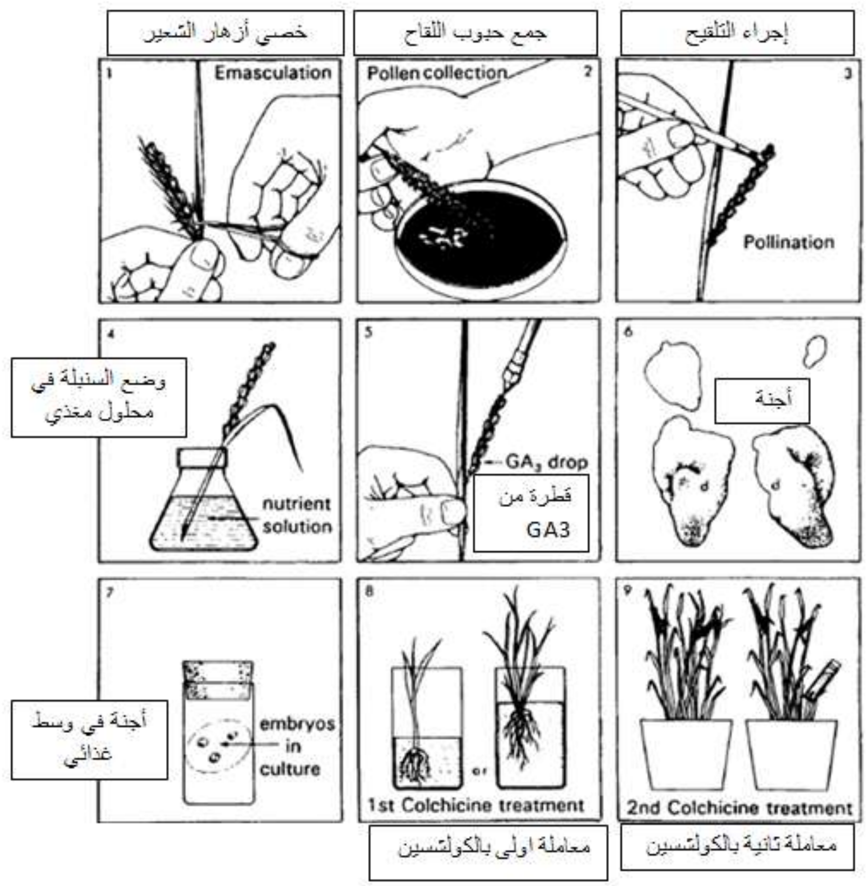
4- زراعة الأجنة (Embryos culture): كمثال على ذلك حصول الإخصاب عند تضريب نوعي الشعير *Hordeum vulgare* مع *H. bulbosum* ولكن سرعان ما يتم التخلص من كروموسومات النوع الثاني من الشعير. ينتج عن ذلك وبعد فترة قصيرة جداً أجنة شعير أُحادية المجموعة الكروموسومية بدون سويداء (مصدر غذاء الجنين) مما يستوجب الأمر نقلها الى أوساط غذائية قبل ان تجهض. تُنمى الأجنة وتصبح

نُبيتات وتؤقلم لتكون مادة نباتية مُفيدة يستثمرها مربو النبات.كمثال آخر موازٍ للمثال السابق، التضريب بين الحنطة (*Triticum aestivum*) والشعير نوع *H. bulbosum* منتجاً أجنة حنطة 1n مما يستوجب نقل الأجنة الى وسط صناعي بعد مدة قصيرة من حصول الإخصاب وتنميتها وبخلافه تجهض الأجنة.

شكل 5.18. المسالك النشوئية للأجنة الناتجة من حبة اللقاح لتعطي نباتات 1n.

5- الإخصاب الكاذب (Pseudo-fertilization): كمثال على ذلك لُقحت نباتات *Mimulus luteus* داخل أنابيب إختبار من حبوب لقاح لنبات قريب لها (*Toreniafournieri*) بوخزة، تطوِرت بعدها خلية 1nمن نبات *Mimulus* الى نبات كامل.

6- تطور بيوض غير مُخصبة بدون تلقيح كاذب: تكمن أهمية زراعة البيضة بأن النباتات الناتجة منها ذات لون أخضر وذات إستقرارية وراثية عالية. تحققت نجاحات في الحصول على نباتات شعير 1n بعد زراعة خلايا مفصولة من الكيس الجنيني والتي تم مُضاعفة عدد كروموسوماتها بالمُعاملة بالكولشسين. أُنتجت نباتات 1nمن الشعير بعد تهجين نوعين مُختلفين أُستعملت فيها حبوب لقاح تُحفز تكوين الأجنة فقط ولكن لا تساهم في طقم كروموسوماتها وأُنتجت أجنة حية تم نقلها الى أوساط غذائية مُناسبة وأنتجت نباتات شعير 1nعقيمة ومن ثم تمت مُضاعفة أعداد كروموسوماتها لتصبح 2n خصبة ونقية وراثياً (شكل 19.5).



شكل 19.5. طريقة عامة لإنتاج نباتات 1n في نبات الشعير (*Hordium vulgare*) بعد إجراء تهجين بين نوعين مُختلفين.

في السياق نفسه، أُنتجت نباتات 1n من زراعة بيوض لثلاثة محاصيل نجيلية (الحنطة، الرز، الذرة الصفراء). أُنتجت نباتات جربرا 1n ذات أزهار صفراء من زراعة البيوض غير المُخصبة. كما أُنتجت نباتات ورد البوري (*Petunia axillaris*) 1n بعد فصل البيوض مع قطعة من المشيمة وزراعتها في وسط

صلب. يبدو بأن زراعة البيوض لإنتاج نباتات 1n أفضل من زراعة المُتوك في بعض العوائل النباتية كالعائلة المُركبة (Compositae) لأسباب قد تكون تصنيفية (Taxonomic).هناك طريقة أُخرى لإنتاج نباتات 1n يتم من خلالها إجهاض حبوب اللقاح بالتشعيع ومن ثم زراعة المبيض (Ovary culture). نجحت التقانة نجاحاً مُنقطع النظير في إنتاج نباتات ورد البوري 1n حيث زُرعت مبايض النبات بعد إخصابها بحبوب لقاح مُشععة حيث لا تقوم حبوب اللقاح المُشععة بدور تحفيز نمو البيوض (Gynogenesis) فحسب بل لها دوراً في تحفيز الإخصاب الكاذب.

إختصاراً يُمكن القول بأن أغلب نباتات 1n قد نتجت من زراعة المُتوك واحياناً من زراعة حبوب اللقاح وذلك مُهماً للغاية لكون الأخيرة مُتوفرة بأعداد كبيرة بالرغم من الصعوبات التقنية من زراعتها لحين إنتاج نبات 1n كاملاً. تتميز زراعة حبوب اللقاح وبالرغم من صعوبتها هي الأُخرى بمجموعة ميزات مُقارنة بزراعة المُتوك أهمها:

1- إحتمالية إخلاف نباتات 2n تكون محدودة او معدومة بالنظر لإستبعاد زراعة أنسجة 2n مثل غلاف المُتك، الأغشية الفاصلة بين حبوب اللقاح داخل المُتك (Septum) وبساط المُتك (Tapetum).

2- لايُشكل المُتك حاجزاً لإنتقال المواد الغذائية من الوسط الغذائي الى حبوب اللقاح.

3- بعد التخلص من المُتك، عندئذٍ لاتُشكل المواد المُثبطة (ABA والمواد السامة) المُتوافرة فيه عائقاً في إنبات حبوب اللقاح.

4- يُمكن تجاوز نشوء الكالس من أنسجة المُتك وبذلك تُستبعد فُرصة تكوين الكايميرا واذا ما نشأ الكالس من حبة لقاح مُنفردة، فجميع خلاياه ستحمل نفس المعالم الوراثية ولكن اذا نشأ من مجموعة من حبوب اللقاح فهناك إحتمالية ظهور الكايميرا.

5- إمكانية إجراء التحوير الوراثي المُباشر في حبوب اللقاح.

6- تُفضل حبوب اللقاح وهي داخل المُتوك في بحوث التطفير والتلاعب الوراثي.

7- يُمكن ملاحظة نمو الجنين الناتج من زراعة حبة اللقاح بسهولة ووضوح أكثر مما هو عليه عند زراعة المُتك كاملاً فيُمكن ان تتحول حبة اللقاح المُفردة الى جنين.

8- التخلص من الإزدحام الكبير لحبوب اللقاح في المُتك الواحد وزراعة حبة واحدة وعليه تكون إنتاجية زراعة حبوب اللقاح من 1nأعلى من حاصل المُتوك كاملةً.

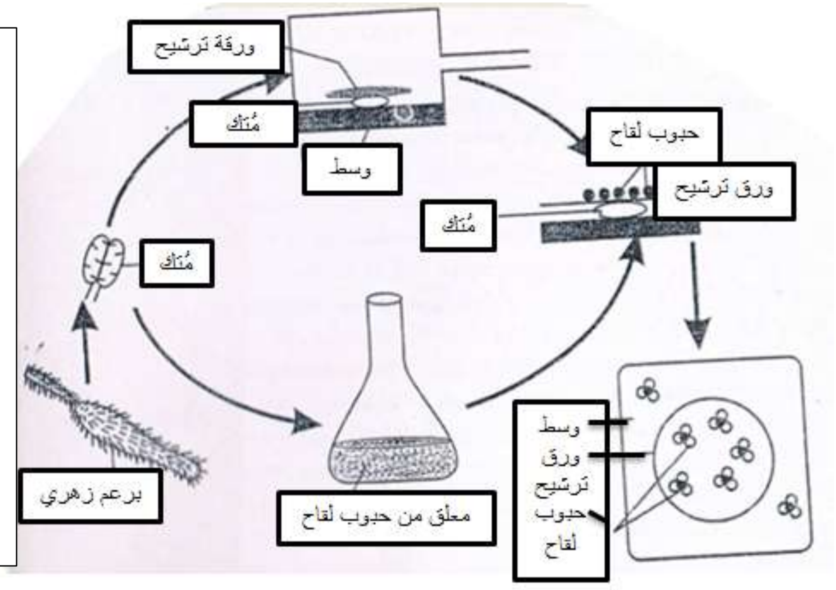
9- تتعرض جميع حبوب اللقاح بالتساوي الى مُكونات الوسط الغذائي.

10- توفر زراعة حبوب اللقاح فُرصة في دراسة مراحل تكوين ونضج السبورات الدقيقة في مراحلها المُختلفة والعوامل التي تتحكم فيها. لاتتوفر مثل تلك الفُرصة عند زراعة المُتك كاملاً.

بالرغم من فوائد زراعة حبوب اللقاح وحجم العمل الذي بذله علماء النبات في هذا المجال، لايزال تحفيز حبوب اللقاح المُفردة في تكوين نباتات 1n يواجه مجموعة من العقبات لعل أهمها إحتياج وسط إنبات حبوب اللقاح الى مُكونات أكثر تعقيداً من مُتطلبات زراعة المُتوك والأعداد الناتجة من نباتات 1n لاتزال قليلة جداً. يُضاف الى ذلك، نجاح زراعة حبوب اللقاح لايزال محدوداً في أنواع نباتية مُحددة أهمها؛ ورد البوري، الطماطم، الباذنجان، اللهانة، التبغ، والداتوره. يحتاج إنبات ونمو حبوب اللقاح الى تقانات مُتخصصة منها:

1- يتطلب زراعة حبوب اللقاح المُفردة تطبيق طريقة الزراعة بتقانة المزرعة الحاضنة (Nurse culture) ذات الإحتياجات الغذائية الخاصة وتقانة مُعقدة (شكل 5.20).

شكل 5.20. تقانة المزرعة الحاضنة المُستعملة في زراعة المُتوك وحبوب اللقاح والخلايا المُفردة وكُتل الخلايا الصغيرة والخلايا المُهندسة وراثياً وفي إنقاذ الجنين.



2- تحديد مرحلة نمو البرعم الزهري والمُتوك الموجودة بداخله. لاتنجح زراعة حبوب اللقاح ما لم تُدرس المرحلة المُناسبة من تفتح البرعم الزهري ودرجة إنغلاق المُتك.

3- تحتاج حبوب اللقاح الى مراحل في إستخلاصها مثل الغربلة، الغسل، الطرد المركزي وغيرها مما يُعقد العملية.

تُنتج نباتات 1n اساساً من المُتوك المفصولة بطريقتين؛ الأولى مُباشرة حيث ينشأ الجنين مُباشرة من حبة اللقاح والثانية غير مُباشرة، حيث ينشأ الكالس اولاً من حبوب اللقاح ثم يتكون جنين او أفرع خضرية عرضية منه. لاتُفضل كثيراً الطريقة الثانية لان غالبا ما يحتوي الكالس على خليط من خلايا بمُستويات تضاعف كروموسومي (Ploidy) مُختلفة كنتيجة لإستعمال مادة نباتية مُتباينة وراثياً (Hetrogeneous) في طبيعتها (1n+2n) وللدور الذي تلعبه مُنظِمات النمو المُضافة للوسط الغذائي من تغيير في مُستوى التضاعف والتشوهات الكروموسومية. تحصل ايضاً حالات تحول من 1n الى 2n تلقائياً، إضافةً الى ان الأجنة 1n ليس بإمكانها التنافس مع أنسجة ذات مُستويات عالية من التضاعف. كما أسلفنا سابقاً، فالمرحلة التي يتم فيها فصل المُتك تُعد أحد مفاتيح النجاح المُهمة في الحصول على نباتات 1n، فهناك إجماع من قبل المُختصين بأن تكون حبوب اللقاح اي الأبواغ الدقيقة (Microspores) لم تشرع بعد في الإنقسام وقت فصل المُتك. يُحدد وقت فصل المُتوك وفقاً للإعتبارات أدناه:

1- تُفصل المُتوك عندما تكون الأبواغ الدقيقة في داخلهاأُحادية النواة (Uninucleate) في مُنتصف طريقها بين الإنقسام الخيطي الأول وبين تحولها الى رباعية (Tetrad) حيث المُتوكأكثرإستجابة لإنتاج نباتات 1n. يُشخص الإنقسام الخلوي الأول عند ظهور نواة مولدة صغيرة ونواة خضرية كبيرة وتصبيغهما بصبغة Feulgen-staining التي تكشف عن نوى الخلايا.

2- يُمكن وفي حالات قليلة فصل المُتوك في مرحلة مُتاخرة قليلاً عن السابقة كأن تكون في مرحلة الإنقسام الأول للأبواغ الدقيقة او بعده بقليل. ولابُد من التأكيد ثانيةً على أهمية إختيار المرحلة النشوئية للبرعم الزهري لكون ذلك عامل مُعقد ليشتمل على نُضج حبة اللقاح P (P-grain maturation) وهي عبارة عن حبة لقاح جنينية (Embryonic pollen grain)؛ وكذلك نُضج حبة اللقاح الطبيعية؛ إضافةً الى نُضج جدار المُتك. تُحدد غالباً المرحلة النشوئية الصحيحة وفق أُسس مورفولوجية ففي نبات التبغ، يتم إختيار البراعم الزهرية عند بداية رؤية أوراق التويج بالرغم من كون المرحلة التطورية ليست بالضرورة دليلاً لتحديد بداية الإنقسام الأول للبوغ وليست كل الأبواغ داخل المُتك الواحد تمر بنفس المرحلة فتكون أكثر نُضجاً في مركز المُتك وأقلها القريبة من جداره. يتضح مما سبق عن زراعة المُتوك، حصول إختلافات في عدد نباتات 1n

الناتجة، إنتاج الكايميرا، ظهور نباتات مُتعددة المجموعة الكروموسومية والتي ترجع الى سبب او أكثر مما يلي:

1- يُسبب الإنقسام الخيطي الداخلي (Endomitosis) في تغيير عدد المجاميع الكروموسومية من X الى 2X ومن 2X الى 4X وجميعها نقية وراثياً.

2- تحصل احياناً حالات تندمج فيها نواتان مُتماثلتان او أكثر في نُطفة واحدة من 1n يتطور منها نباتات ثُنائية وثلاثية نقية وراثياً (X+X=2X؛ 2X+X=3X).

3- يحصل إخلاف من جدار المُتك ومن الأغشية الفاصلة داخل المُتك مُنتجةً نباتات 2n وهي مُتغايرة وراثياً (Heterozygous).

4- تحصل حالات إخلاف تتطور منها نباتات تحتوي على 2n مُتغايرة وراثياً نتيجة عدم إختزال الأبواغ (Non-reduced microspores).

5- ينتج نبات نقي 2n أينما حصلت مُضاعفة تلقائية في أنسجة 1n.

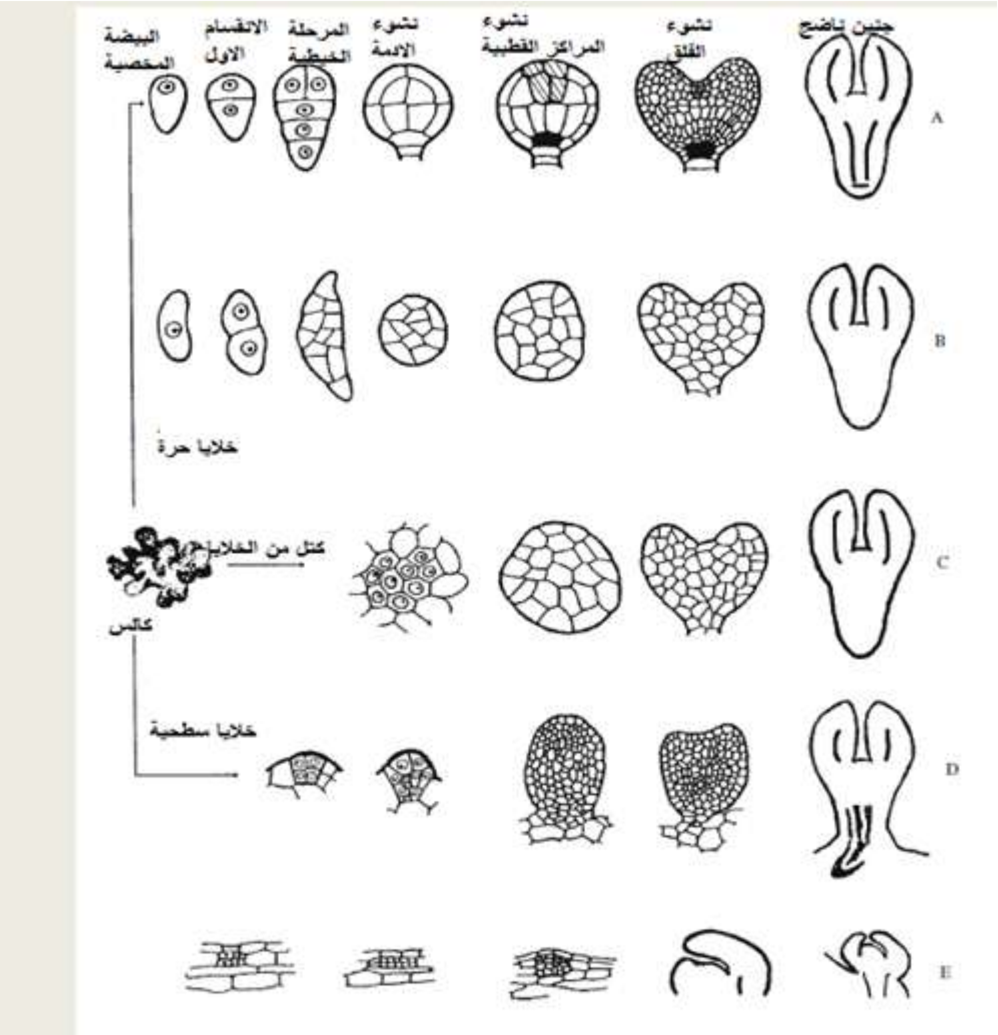
6- تحصل تشوهات (Abnormalities) في أثناء الإنقسام الإختزالي مؤديةً الى مُستويات مُختلفة من التضاعف الكروموسومي.

عند تطور نباتات 1n من المُتوك فانها تنشأ من بوغ بنواة واحدة ولكن يُمكن ان تنتج بوسائل مُختلفة (شكل 5.21) :

1- تنحل النواة المُولدة او تصبح ساكنة وتنقسم النواة الخضرية فقط وهذا يحصل في حالات عديدة بعد الإنقسام النووي الأول للبوغ (ينتج اساساً عنه نواة خضرية وأُخرى مولدة).

2- تنحل النواة الخضرية احياناً او تصبح ساكنة بعد الإنقساماالأول للبوغ ولكن تنقسم النواة المُولدة فقط.

3- تتكون نواتان مُتشابهتان في الإنقسام الأول وكلاهما ينقسمان وهذا ما يُطلق عليه بتكوين الأبواغ المُتناظرة (Symmetric microsporogenesis).



شكل5.21. رسم توضيحي لتطور جنين بفلقتين مُنتج جنسياً (A). ومن أجنة مصغرة (Embryoids) وكما مبين في B، C، D ومن براعم خضرية عرضية (E).

يُعتقد بأن التعريض للبرودة يُساعد في نشوء نواتين مُتشابهتين بدلاً من واحدة خضرية والأُخرى مولدة بعد الإنقسام الأول للبوغ. تُشجع بعض المُعاملات الأولية للبراعم الزهرية او المُتوك كالطرد المركزي للمُتوك، قطع النهايات العليا للنورات الزهرية للنبات الواهب، عملية عدم تفعيل نواة البيضة قبل إخصابها او ما يُسمى بالتخليق الذكوري (Androgenesis). يُنصح احياناً بقطع جدار المُتك ليُسهل على الأجنة او الكالس التكوين والظهور بسهولة. لعل المادة النباتية الواهبة وظروف نموها لها الأثر البالغ في عملية التخليق الذكور يمثل العائلة النباتية والنوع النباتي والصنف وان يتم إختيار النباتات السليمة غزيرة النمو. كما ان لعمر النبات الواهب وعمر البرعم الزهري لهما ايضاً تاثيرهماً الواضح في عملية التخليق الذكوري. بينت

نتائج البحوث التي أُجريت في مناطق مُختلفة من العالم على نباتات العائلة النجيلية بان المُتوك المفصولة من الأشطاء الرئيسة (Primary tillers) افظل من نظيراتها الجانبية ويُستثنى منها الرز إذ لن تُسجل فروقات بين الإثنين.

والجدير بالذكر ان إختيار الوسط الغذائي المُناسب لزراعة المُتك هو الآخر ذو أهمية بالغة في إنتاج نباتات 1n وغالباً ما يُفضل الوسط الصلب بالرغم من إستعمال الوسط السائل في حالات غير قليلة. يُضاف مصدر الكربون إعتماداً على النوع النباتي والعائلة وغالباً ما يُضاف السكروز بتركيز 2-4%. تعتمد الإضافات من العناصر المعدنية على نوع النبات ففي أغلب الحالات يُستعمل وسط MS المُحور أو العناصر الكبرى لوسط Nitsch (1969) ويُراعى ان يُعدل pH الوسط الى 5.8 قبل التعقيم بالبُخار. تُحذف مُنظِمات النمو في الغالب تجنباً لتكوين الكالس وفي حالات قليلة يُضاف الاوكسين أو السايتوكاينين أو توليفة منهما الى الوسط الغذائي. لوحظ بان إضافة خليط مُعقد من المواد الطبيعية قد ساهم إيجاباً في تشجيع عملية تكوين الأجنة. يلعب الفحم المُنشط دوراً مُهماً لكونه يمتص المواد السامة التي تُسبب في اللون القهوائي نتيجة إضمحلال المُتوك إضافة الى حامض ABA المُثبط لعملية نشوء الأجنة. سُجلت حالات عديدة في أفضلية إستعمال الأوساط السائلة وفي هذه الحالة تُترك المُتوك طافية قبل تحرير حبوب اللقاح منها حيث تنشأ وتتطور الأجنة في قاع الأطباق. وورد في بعض التقارير العلمية نجاح زراعة المُتوك بطريقة الطبقتين (Double-layer method) حيث تُضاف طبقة خفيفة من وسط سائل فوق وسط صلب مُضافاً له الفحم المُنشط. يُوصى بتحوير مُحتوى الوسط الغذائي حسب المرحلة التطورية للمُتوك فقد تم تغيير المقادير في وسط زراعة مُتوك البطاطا شملت الأُملاح الكبرى، السكروز، الاوكسين، السايتوكاينين، الفحم المُنشط وماء جوز الهند. أخيراً، تلعب العوامل الفيزيائية دوراً مُهماً في التخليق الذكوري كالفترة الضوئية، الإشعاع، نوعية الضوء، درجتي حرارة الليل والنهار والتعزيز بثنائي اوكسيد الكربون.

طرائق زراعة حبوب اللقاح المفصولة Methods of excised pollen grain culture

غالباً ماتُتبع طريقتان في زراعة حبوب اللقاح المعزولة من أجل إنتاج نباتات أُحادية العدد الكروموسومي يُمكن تلخيصهما كما يلي:

1- تقانة المزرعة الحاضنة (Nurse culture technique): توضع في هذه التقانة المُتوك المفصولة من برعم زهري واحد أُفقياً على سطح وسط غذائي نُصف صلب ويوضع قرص ورق ترشيح فوق المُتوك بحيث يغطيها بالكامل من الأعلى. وبشكل مُنفصل، يُحضر مُعلق من حبوب اللقاح مفصولة من برعم

زهري آخر وبتركيز 10 حبات لقاح لكل 0.5 مل من الوسط السائل وعليه يُنقل مُعلق (لقاح) يحتوي على حوالي 10 حبوب لقاح وتوضع فوق كل ورقة ترشيح. تنبت العديد من حبوب اللقاح خلال شهر وسُجلت في بعض التجارب نسبة في نجاح كفاءة النشر بالأطباق (Plating efficiency) وصلت الى 60% حيث تنشأ نُبيتات 1n مُتشابهة بهذه التقانة. حققت العديد من التجارب نجاحات كبيرة والتي بدأت بحبوب لقاح لأصناف مُختلفة من التبغ، الداتورة، نبات الزينة، ورد البوري، الطماطم، الذرة الصفراء وغيرها. أُضيفت مُكونات الوسط الغذائي كلوتامين، سيستئين وانوسيتول والواقع مُكونات وسط المُتوك الغذائية أبسط بكثير من وسط زراعة حبوب اللقاح حيث قسم من الإحتياجات يقوم المُتك بتجهيزها لذلك يجب إضافتها الى وسط تنمية حبوب اللقاح.

2- تقانات المزرعة الطافية Float culture technique: إقتُرحت التقانة لأول مرة عام 1977 من قبل سندرلاند وروبرتس في إنتاج نباتات أُحادية معزولة من حبوب لقاح. تجنب الباحثان سحق المُتوك من أجل عزل حبوب اللقاح. فُصلت المُتوك من براعم زهرية تم تعريضها للبرودة مُسبقاً ووضِعت في وسط غذائي سائل لتطفو، وبعد أيام قليلة تتفتح المُتوك وتُستبعد البقايا لتبقى حبوب لقاح في مراحل تطورية مُختلفة. أُستعملت التقانة في إنتاج نباتات أُحادية نقية من التبغ، الشعير، الداتورة ومجموعة أُخرى من النباتات. تحتوي العديد من النباتات على نوعين من حبوب اللقاح لنفس المُتك (Pollen dimorphism). يُلاحظ ايضاً بأن قسماً من حبوب اللقاح الجنينية منها تكون أكبر حجما، مليئة بالنشاء وتتصبغ بشدة بصبغة الأسيتوكارمين، في الوقت الذي تكون حبوب اللقاح غير الجنينية أصغر حجماً، ذات فجوات كبيرة وتتصبغ خفيفاً بالصبغة السابقة. تُفصل حبوب اللقاح الجنينية عن غير الجنينية بالنبذ المركزي التدريجي من أجل تحسين كفاءة عملية تكوين الأجنة.

زراعة البيضة المُخصبة Zygote culture

يُمكن وصف عملية زراعة البيضة المُخصبة بانها نظام تجريبي يتم من خلاله عزل البيوض المُخصبة تحت ظروف تعقيم من المبايض وتنميتها على وسط غذائي معلوم المُكونات وتحت ظروف مُسيطر عليها. تُساهم زراعة البيضة المُخصبة في فهم العوامل التي تُنظم نشوء البيضة المُخصبة الى جنين ناضج بعد مروره بمراحل تطورية مُختلفة. أصبح بالإمكانإبنات حبة اللقاح داخل أنابيب الإختبار حيث ينمو الكيس الجنيني (الموجود داخل البيضة) ويحث على الإخصاب ويعقبه نشوء الجنين. سجل العالم النباتي الهندي مهشواري والذي بدأ دراساته في هذا الصدد منذ خمسينيات القرن الماضي أولى نجاحاته بعد إنتاجه بذور

ذات حيوية طبيعية من زراعة بيوض مُخصبة معزولة من مبايض الخشخاش (*Papaver somniferum*). زرع مهشواري بيضة مُخصبة بعد 6 ايام من التلقيح عند إحتوائها خليتين جنينيتين وعدد قليل من أنوية السويداء. نجحت البذور في الإنبات التي أنتجها مهشواري داخل أنابيب الإختبار بعد زراعتها في الحقل. كان النمو الإبتدائي للأجنة بطيئا مُقارنةً بالطبيعة الخارجية عند زراعتها على وسط نيش (Nitsch's medium) دون ان يُضاف له مُنظِمات نمو ولكن بعد وصول الأجنة مرحلة الشكل الكروي (Globular stage)، تسارع نموها بشكل كبير. وصل طول الأجنة داخل المبايض المزروعة في أنابيب الإختبار الى 0.33 ملم. جرت مُحاولات لزراعة مبايض العديد من النباتات والتي يُمكن مراجعة المصادر المُتخصصة للإطلاع على تفاصيلها. يُمكن تلخيص أهمية زراعة المبايض وكما يلي:

1- لأغراض التلقيح والإخصاب خارج الجسم الحي: ساعدت تلك التقانة ولحد كبير في نشوء زراعة حبوب اللقاح وبطريقة مُشابهة لتلك التي أُعتمدت في زراعة البيوض غير المُخصبة مما ساعد في نجاح إنبات حبوب اللقاح وتخصيب البيضة داخل أنابيب الإختبار وبذلك تطورت تقانة الإخصاب خارج الجسم الحي في العديد من الأنواع النباتية. تم ومن خلال تلك التقانة مُلاحظة كافة مراحل النشوء لتشمل إنبات حبوب اللقاح الى الإخصاب المزدوج وأصبح بالإمكان الحصول على بذور تحتوي أجنة ذات حيوية طبيعية. أصبح بالإمكان ايضاً إخصاب بيوض معزولة من نبات *Malandrium album* من حبوب لقاح أنواع نباتية أُخرى تتبع عائلة Caryophyllaceae وحبوب لقاح من نبات الداتورا (*Datura stramonium*) وكذلك في التخلص من عوائق عدم التوافق في نبات ورد البوري نوع *Petunia axilaris*.

2- تطبيق التقانة في التهجين: نجحت تقانة زراعة البيضة في الحصول على بادرات هجينة من تهجينات بين الأنواع وحتى بين الأجناس والتي تكون مُجهضة في التهجينات الإعتيادية (لاتكون بذوراً) أو لا تتمكن بذور الجيل الاول من مُساندة نشوء الجنين. فقد سُجلت حالات عديدة فشل التضريبات بين الأنواع فعلى سبيل المثال، فشل الجنين الهجين لنبات *Abelmoschus* في النشوء الى مرحلة ما بعد شكل الطوربيد، ولكن تم الحصول على هُجن ذات حيوية عالية من تضريب *A. esculentus* x *A. ficunius*, *A. esculentus*x *A. moschatus* اضافةً الى التضريب بين *A. tuberculatus* x *A. moschatus*. أُنتج ايضاً هجين من تضريب *Brassicachinensis*x *B. pekinesis* بعد زراعة البيضة المُخصبة خارج الجسم الحي. وعلى مُستوى قرابة أبعد فقد أُنتج هجين بين جنسين مُختلفين من الحشائش حيث تم تضريب *Lolium perenne* مع *Festuca rubra* ونجح الهجين بعد زراعة البيضة المُخصبة. تم تجريب التقانة ايضاً في إجراء

تضريبات بين أصناف قطن حديثة وقديمة ودُرِسَ من خلالها نشوء البذور وإنتاج الألياف وَوجِدَ بان لمُنظِمات النمو المُضافة لوسط زراعة البيضة المُخصبة تأثيراً كبيراً في ذلك.

3- إنتاج نباتات أُحادية العدد الكروموسومي: جرت مُحاولات لزراعة البيوض غير المُخصبة لنبات الباذنجان *Solanum melongena* من أجل إنتاج مزارع كالس نشطة على وسط غذائي مُزود بالاوكسين IAA والكاينيتين وتبين بأن خلايا الكالس الناتج 1n وبذلك أنتجت خطوطاً خلوية من 1n بديلة عن زراعة حبوب اللقاح.

4- دراسات التطفل في مُغطاة البذور: كان الإعتقاد السائد بان المُتطفلات الإجبارية في جذور بعض نباتات مُغطاة البذور مثل Striga و Orobanche لها علاقة في تكوين البادرات نتيجة وجود مُحفز من جذور المُضيف. بينت نتائج زراعة بيوض كل من *Orobanche aegyptica* و *Cistanche tubulosa* تكوين نموات خضرية داخل أنابيب الإختبار بغياب المُحفز المُفترض من قبل المُضيف.

5- التطبيقات في إكثار نبات الاوركيد: في الطبيعة، لاتنبت بذور الاوركيد (وهي الأصغر حجماً من بين بذور نباتات مُغطاة البذور) الا بوجود أنواع من الفطريات تُرافق بذورها فعدم توفر سُلالة الفطر المُتخصصة لايُمكن للبذور الإنبات. يُضاف الى ذلك، فغلاف بذرة الاوركيد يحتاج الى فترة زمنية طويلة لكي ينضج. وحلاً لتلك المشاكل، جرت مُحاولات عدة لزراعة البيوض المُخصبة خارج الجسم الحي ولعدة أنواع من الاوركيد ونجحت الكثير من تلك المُحاولات.

زراعة البيضة غير المُخصبة Gynogenesis

الخلايا غير المُخصبة (البيضة غير المُخصبة) أو الكميتات الإنثوية التي تُمثل الكيس الجنيني داخل المبيض، جذبت مجموعة من الباحثين كبديل لزراعة المُتك أو حبوب اللقاح. سُجلت أول حالة لزراعة البيضة غير المُخصبة عام 1967 في نبات الشعير ومنذ ذلك الحين أُستعملت التقانة في إنتاج أجنة ونباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية في العديد من الأنواع النباتية مثل الشوندر، الجربرا، زهرة الشمس، الليليوم، التبغ، الرز، ورد البوري، الحنطة، الذرة الصفراء وغيرها. أُعتمدت زراعة البيضة غير المُخصبة بعدما فشلت زراعة المُتك في بعض جوانبها مثل تكوين نباتات عقيمة ذكرياً، مُصاحبة نشوء الأجنة وبالتالي النباتات بظاهرة الشحوب نتيجة فقدان صبغات الكلوروفيل (Albinism) أو التغاير مُتعدد المجموعة الكروموسومية (Ploidy variation). من جانب آخر فأن زراعة البيضة غير المُخصبة أكثر

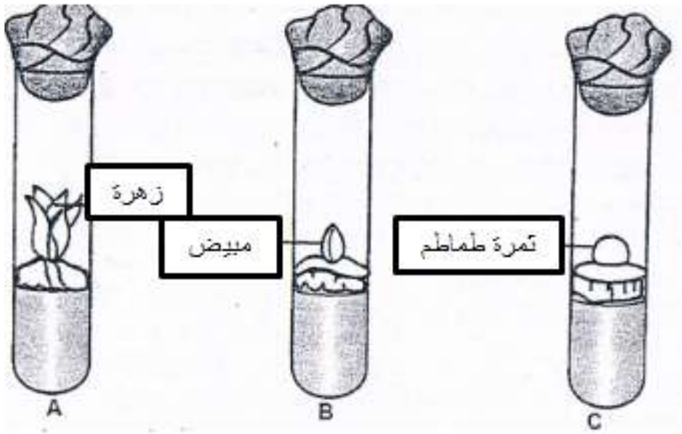
مشقة من زراعة المُتك ولكن لابُد من الإشارة الى الميزات الجيدة في إنتاج نباتات 1n من المُتوك والتي لاتتوفر في زراعة البيضة غير المُخصبة أهمها:

اولاً: توفر آلاف الخلايا الأُحادية (حبة اللقاح عبارة عن مشيج يحتوي 2-3 خلايا/انوية يكونان إثنان منها الأمشاج) في المُتك الواحد ويسهل الحصول عليها مُقارنة بالعدد المحدود من الخلايا/الأنوية التي تتراوح 4-16 فقط داخل الكيس الجنيني والتي تكون مطمورة داخل المبيض.

ثانياً: سهولة مُلاحظة المرحلة التطورية للسبور الدقيق/حبة اللقاح بعد تثبيت أحد المُتوك داخل برعم زهري معلوم الحجم بأحد المُثبتات المعروفة وبنفس الوقت يُستفاد من باقي المُتوك.

زراعة المبايض خارج الجسم الحي *In vitro* culture of ovaries

يُفضل زراعة المبيض أو البيضة قبل الإخصاب مع مُلحقاتهما من الزهرة فقد وِجد ان ذلك يُشجعهما كثيراً على الإستجابة وإنتاج نباتات أُحادية. غالباً ما تعتمد المرحلة الأكثر إستجابة عند زراعة الكيس الجنيني على النوع النباتي. فعلى سبيل المثال لا الحصر، تُفضل في نبات الشعير مرحلة أُحادية الى رباعية النواة (Uni to four-nucleate stage). يختلف هو الآخر الوسط المُناسب المُستعمل في إنتاج الأُحاديات من المبيض (Gynogenic haploids) بالرغم من ان علماء النبات الصينين والذين لهم الباع الطويل في هذا المجال، يضيفون في الغالب الاوكسين 2-methyl-4-chlorophenoxy acetic acid كأحد المُضافات. تظهر في بعض الحالات الأُحاديات من خلال النشوء العذري (Parthenogenesis) كما هو الحال في زهرة الشمس. تبين بأن النباتات الأُحادية الناتجة من زراعة البيضة غير المُخصبة أفضل من تلك الناتجة من زراعة المُتك في المحاصيل النجيلية من حيث لونها الأخضر، فعلى سبيل المثال كانت النسبة المئوية للنباتات ذات اللون الأخضر في الشعير الناتج من زراعة البيوض غير المُخصبة 100% بينما بلغت 1% فقط من تلك الناتجة من المُتوك. وبلغت النسبة المئوية لنباتات الرز الخضراء 89.3% الناتجة من زراعة المبيض بينما بلغت 36.4% عند إنتاجها من زراعة المُتك. إنطبق ذلك على أعداد النباتات الناتجة فبلغت 77.5% من زراعة البيوض غير المُخصبة يُقابلها 63.9% من زراعة المُتك. يُزرع المبيض بعد فصله من الأزهار المُلقحة أو غير المُلقحة شريطة أن يحوي جزء من المدقة (Pistil) وكما مُوضح في شكل 5.22 لِينتج ثماراً وبذور تمتلك حيوية في وسط غذائي مناسب يحتوي السكروز وأن تكون المبايض مُفصولة من أزهار قد لُقحت قبل 2-3 يوم من زراعتها.



شكل 5.22. تطور مبايض نبات الطماطم في وسط تركيبي. (A) زهرة مفصولة من النبات حديثاً ومزروعة. (B) مبيض مفصول من الزهرة ومزروع حديثاً. (C) نشوء ثمرة طماطم داخل إنبوبة الإختبار.ينتج عن زراعة المبايض في وسط مُناسب ثمار وبذور تمتلك حيوية شريطة أن تكون مفصولة من أزهار قد لُقحت قبل 3 ايام.

أُنتجت العديد من النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية من زراعة البيضة غير المُخصبة أو المبيض وبداخله البيضة غير المُخصبة وفي عوائل مُتنوعة (جدول 5.3). وفرت تلك النتاجات إستراتيجية في إنتاج نباتات نقية وراثياً بديلاً أو مُكملاً لزراعة حبوب اللقاح أو المُتك. المُلاحظ عدم نمو المبايض المفصولة من أزهار غير مُلقحة في وسط غذائي خالي من مُنظِمات النمو خاصةً 2,4-D, 2,4,5-D, NOA التي حفزت إضافتها الى الوسط نمو المبايض. غالباً لايفلح نمو المبايض الى حجم الثمار المُتعارف عليه بسبب الحيز الصغير لأنابيب الإختبار، ولمُعاجة ذلك تم تحوير طريقة زراعة تتطلب تعقيم جُزئي لغرض تكبير حجم المبيض وبالتالي الثمرة. تتلخص الطريقة بغرس حامل الزهرة الطويل في وسط غذائي مُعقم بحيث تكون فتحة إنبوبة الزراعة مفتوحة من الأعلى لِتُتِيحَ للمبيض النمو بحُرية خارج أنابيب الزراعة. يُمكن تلخيص فوائد زراعة المبيض بالنقاط الست التالية:

1- تفيد زراعة المبيض كثيرا في التحري عن أُسس وتطبيقات تطور الثمار والبذور تحت ظروف مُسيطر عليها.

2- تُفيد في دراسة المراحل التطورية المُبكرة للجنين والثمرة والمجالات المُختلفة لفسلجة الثمار كالتنفس، النضج، والتلف وغيرها.

جدول 5.3. قائمة لعدد من النباتات التي أنتجت نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية من زراعة البيضة غير المُخصبة أو المبيض (Gynogenesis)

النوع النباتي	العائلة النباتية	الجزء النباتي المزروع
Beta vulgaris	Chenopodiaceae	خلية البيضة
Gerbera jamesonii	Asteraceae	خلية البيضة
Helianthus annuus	Asteraceae	المبيض
Brassica oleracea	Brassicaceae	البيضة
Cucumis melo	Cucurbitaceae	البيضة
Hevea brasiliensis	Euphorbiaceae	البيضة
Coix lacryma-jobi	Poaceae	المبيض
Hordeum vulgare	Poaceae	المبيض
Oryza sativa	Poaceae	المبيض
Triticum aestivum	Poaceae	المبيض
Zea mays	Poaceae	المبيض
Allium cepa	Liliaceae	خلية البيضة
Allium tuberosum	Liliaceae	المبيض
Lilium davidii	Liliaceae	المبيض
Morus alba	Moraceae	المبيض
Populus simonigra	Salicaceae	المبيض
Mimulus luteus	Scrophulariaceae	المبيض
Nicotiana tabacum	Solanaceae	المبيض
Petunia axillaris	Solanaceae	خلية البيضة
Solanum tuberosum	Solanaceae	خلية البيضة

3- إمكانية الإستفادة من زراعة المدقة (Pistil) للزهرة غير المُلقحة في دراسة تأثير الهرمونات النباتية في نشوء الثمار العُذرية وتطور النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية والعُذرية.

4- توفر زراعة المبيض معلومات مُهمة حول دور أعضاء الزهرة الأُخرى من أوراق كأسية، تويجية، العصافات (Glumes) وغيرها في تطور الثمار.

5- تم ومن خلال زراعة المدقة والإخصاب خارج الجسم الحي، مُعالجة العديد من المشاكل التي تواجه مُربي النبات أثناء برامج التهجين. تشتمل تلك المعوقات فشل إنبات حبوب اللقاح على المياسم وبطئ نمو أنابيب اللقاح، إضافة الى سقوط الأزهار في العديد من النباتات. أصبح الآن بالإمكان مُعالجة عدم التوافق والعُقم وأُنتجت هُجن بين الأنواع في مجموعة كبيرة من النباتات.

6- تُحفز عملية الإخصاب المُزدوج (Double fertilization) كجزء من عملية تكوين الجنين والسويداء، نشوء المبايض الى ثمار. والجدير بالذكر ان أغلب النباتات التي تتكاثر عُذريا حيث لايحصل الإخصاب، يكون التلقيح المُحفز الوحيد لنمو المبايض ونشوء البذور ولذلك فزراعة المبايض لنباتات عذرية قد يكون مُفيداً في دراسة طبيعة المُحفزات التي وفرها التلقيح.

زراعة الأزهار Flower culture

تُزرع البراعم الزهرية أو المُتفتحة المقطوعة من النبات الأُم في وسط معلوم المُكونات حيث تستمر بالنمو داخل أنابيب الإختبار وتُحافظ على صحتها ناشئةً الى ثمار وبداخلها بذور ما لم تكن الزهرة غير مُلقحة أو من النوع الذي يكون ثماراً عذرية. تكتسب زراعة البراعم الزهرية والأزهار أهمية خاصة للأسباب التالية:

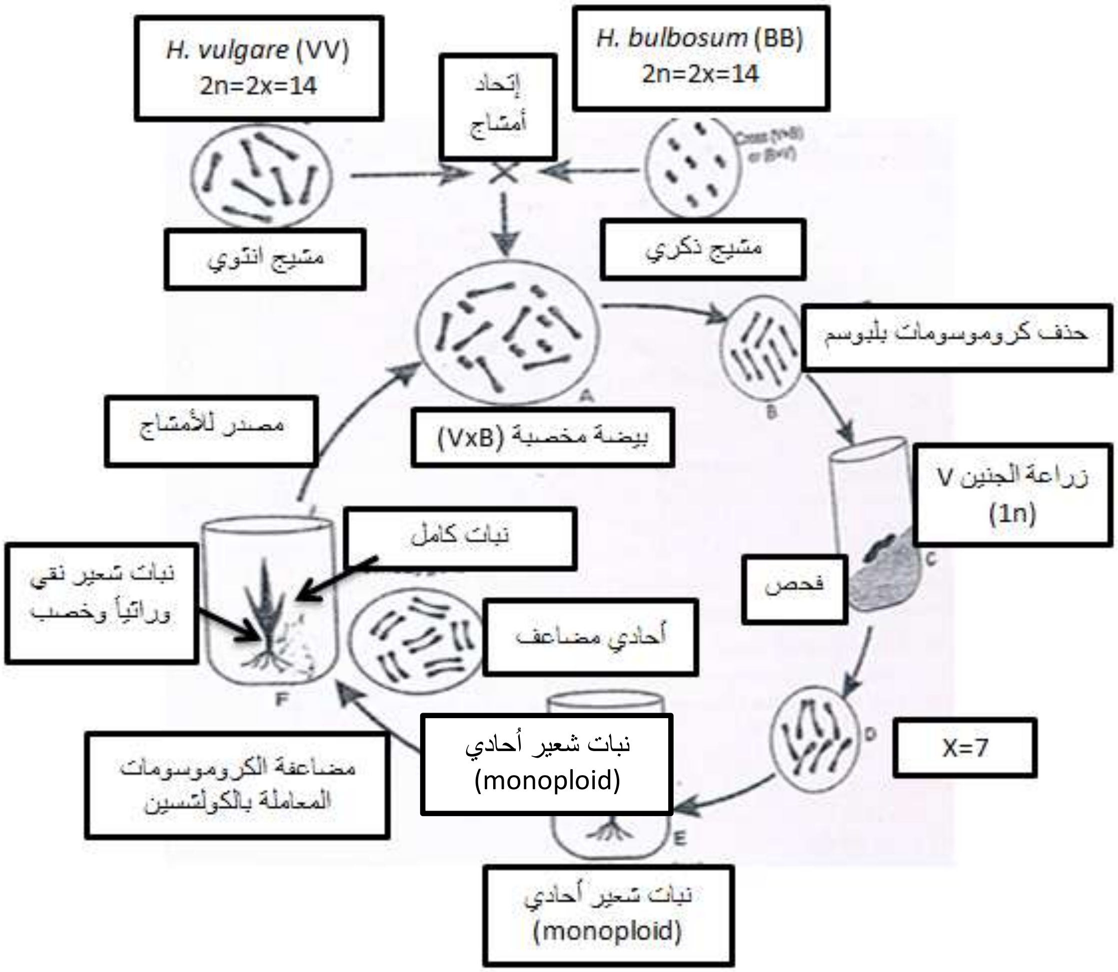
1- يُستفاد منها في دراسة مراحل نشوء وتطور الأزهار بمعزل عن النبات الأُم وتحت ظروف مُسيطر عليها.

2- لاتنتج الأزهار غير المُلقحة ثماراً وقد يؤثر الاوكسين المُضاف الى الوسط لينتج ثماراً عذرية. وإذا ما أنتجت ثماراً فيوفر ذلك فُرصة لدراسة مراحل تكوين الثمار. عادةً تكون الثمار المُنتجة خارج الجسم الحي صغيرة الحجم مُقارنةً مع نظيراتها المُنتجة في الحقل، ويُمكن زيادة حجمها عند إضافة مُنظِمات النمو المُناسبة الى الوسط الغذائي مثل الأوكسينات، الجبريلينات والسايتوكاينينات.

3- أثبتت تقانة زراعة الأزهار خارج الجسم الحي فائدتها في تحديد جنس النبات (Sex determination). فعلى سبيل المثال، توجد خطوط وراثية مُختلفة من نبات الخيار (*Cucumis sativus*) فمنها من يحمل أزهاراً إنثوية فقط (Gynoecious)، ومنها من يُكون أزهاراً ذكرية أو إنثوية فقط في ذات النبات (Monoecious)، ومنها ما يحمل أزهاراً ذكرية وإنثوية في ذات النبات (Hermaphrodite). بالإمكان السيطرة وتحت ظروف مُعينة في إنتاج أزهار ذكرية أو إنثوية فقط ولذلك فوائد كبيرة تَخص إنتاجية المحصول. بينت الدراسات إمكانية زراعة البراعم الزهرية للأزهار الذكرية وإنتاجها مبايض بعد إضافة IAA الى الوسط. وعلى العكس فإضافة GA_3 يُلغي تأثير الاوكسين. بينما لايتأثر نوع الجنس عند زراعة الأزهار الإنثوية أو الحاملة لأعضاء التذكير والتأنيث في ذات الزهرة حتى بإضافة IAA أو GA_3 وحتى بعد إضافة السايتوكاينينات الى الوسط الغذائي. يُستفاد من ذلك في الدراسات الفسلجية وتشكُل الأزهار (Floral morphogenesis).

الحذف الكروموسومي في التهجينات المُتباعدة Chromosomal deletion in interspecific crossings

سُجلت العديد من الحالات التي يُختزل فيها العدد الكروموسومي في الخلايا الجسمية تلقائياً أو نتيجة مُعاملات خاصة وسُمي ذلك بالإختزال الجسمي (Somatic reduction)، الإنقسام الخيطي المُختزل (Reductional mitosis)، تقانة بلبوسم (Bulbosum technique). كان أول من سجل حالة الإختزال الكروموسومي الباحثان الهنديان سوامناثان وسنك عام 1958 بعد تشعيعهما بذور الرقي وظهرت في أحد فروع النبات خلايا 1n. لاحظا ظاهرة الإختزال هذه في عدد كروموسومات الخلايا الجسمية وعزوه الى أسباب مجهولة. وفي عام 1970 إكتشف الباحثان الهنديان كاشا و كيو طريقة جديدة في إنتاج نباتات 1nبعد إجراء تضريبات بين الأنواع (Interspecific crossing) يتبعها حذف مجموعة كروموسومية من أحد الآباء. عند إجراء تضريب بين نوعي شعير ذات تعدد كروموسومي رباعي (Tetraploids) وهما *Hordeum vulgare* X *H. bulbosum* نتجت كافة النباتات تقريباً بهيئة أُحادية مُضاعفة (Dihaploid) وكما مُوضح في شكل 5.23.



شكل 5.23. إنتاج احاديات (Monoploids) وأُحاديات مُضاعفة من نبات الشعير بإستعمال التهجين المُتباعد المُشتمل على حذف كروموسومات شعير بلبوسوم (تقانة بلبوسوم).

لوحظ ايضاً ظهور نباتات أُحادية بعد تضريب نباتات ثُنائية (Diploids) من النوعين السابقين شابهت في مظهرها الخارجي نوع الشعير *H. vulgare*. كشفت التحريات الخلوية حصول إخصاب مُضاعف (Double fertilization) بشكل طبيعي ولكن يحصل حذف إنتخابي (Selective elimination) في كروموسومات نوع الشعير *H.bulbosum* أثناء المرحلة الأولى من نشوء الجنين والتي كانت اساساً من مجين الأول ومجين من الثاني، أدى ذلك الى تكوين جنين أُحادي. وبالرغم من حصول إجهاض للجنين بعد 10 أيام من الإخصاب، كان مُمكناً إنتاج نباتات كاملة بعد فصله وإنقاذه. وثق هذان الباحثان بعض الإستنتاجات بخصوص الحذف الكروموسومي بعد التهجين وكما مُبين أدناه:

1- يحصل بنسب عالية.

2- لم يرتبط مع هجين ثنائي (Diploid hybrid).

3- يصل في الشعير المزروع فقط ومن المُمكن إسترجاع كامل المجين للشعير المزروع بالتضريبات الرجعية.

تُنتج نسب عالية من الأُحاديات من الحنطة السداسية (Hexaploid wheat) بسبب الإحلال الكروموسومي (Subsitution) في هُجن الحنطة بعد تضريبها مع شعير *H. bulbosum*، علماً بأن الحنطة 4n والشعير 2n، يعقب ذلك إنقاذ الجنين لمنعه من الإجهاض. تبين بأن 13.7% من البذور العاقدة كانت نتيجة التلقيح مع 2n بلبوسوم، 43.7% من 4n بلبوسوم. ولاتزال التضريبات بين الأنواع المُتباعدة بحاجة الى دراسة دقيقة وفيها المُفاجآت.

العقبات التي تواجه زراعة وإنتاج النباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية

بلاشك يواجه إنتاج نباتات 1n والنسبة المئوية للمُتوك أو حبوب اللقاح التي تنشأ الى أجنة 1n ذات حيوية عالية يُمكن تلخيصها بالنقاط التالية:

1- لايحصل نمو ونشوء للأجنة خارج الجسم الحي بنسب عالية وقسم منها تُجهض في مراحل لاحقة.

2- يتزامن مع تكوين أجنة 1n، توالد أجنة ثُنائية ورباعية.

3- يُمكن تجاوز إخلاف نباتات 2n بزراعة حبوب اللقاح بدلاً من المُتوك ولكن تلك التقانة قد إنحسرت في أنواع نباتية معدودة.

4- صعوبة أو إستحالة توجيه الإنقسام الخلوي في الأبواغ بإتجاه حصول أجنة 1n وليس للحصول على 2n.

5- صعوبة التخلص من ظهور أجنة أو نباتات 1n فاقدة للصبغة الخضراء أي شاحبة (Albino) وخاصة مع محاصيل الحبوب.

6- قد لاتكون العملية إقتصادية بالنظر لإنخفاض نسب النجاح في إنتاج نباتات 1n.

7- يُعاب كثيراً في نشوء الكالس سواء كان تلقائياً أو نتيجة إضافة مُنظِمات النمو.

8- صعوبة عزل الأجنة 1n من خليط ذو تضاعفات كروموسومية مُتعددة.

9- تكون عملية إنتخاب أجنة 1n ومن ثم نباتات كاملة نقية وراثياً مُجهدة وتحتاج الى فترة زمنية طويلة ويُمكن ان تُنتخب احياناً بإستعمال المُؤشرات الوراثية.

10- لوحظ بان مُضاعفة نباتات 1n لاينتج بالضرورة نباتات 2n نقية وراثياً بسبب حصول إنعزالات وراثية في الأجيال اللاحقة.

النباتات الأُحادية المُضاعفة Double Haploids

يتطلب إنتاج نباتات أُحادية مُضاعفة توفر نباتات أُحادية المجموعة الكروموسومية أولاً. أُكتشفت النباتات الأُحادية لأول مرة في عام 1920 نتجت تلقائياً ولكن لن يُستفد منها في حينها لعدم تطور تقانات الإستفادة منها في ذلك الوقت علماً أن حصولها تلقائياً نادراً ويقتصر في مجموعة قليلة من الأنواع النباتية. فتحت تقانات الزراعة النسيجية الباب في بداية الستينيات من القرن الماضي في إنتاج نباتات 1n وكانت اولاً من زراعة البيضة غير المُخصبة (Gynogenesis) وبعدها من حبوب اللقاح الناضجة وغير الناضجة (Androgenesis). بالرغم من إنتاج نباتات أُحادية مُضاعفة (Doubled haploids) من زراعة البيضة غير المُخصبة الا أن أغلب النجاحات المتحققة كانت من زراعة حبوب اللقاح والمُتوك. تُنتج النباتات الأُحادية المُضاعفة بالتضاعف الإصطناعي لكروموسومات النباتات الأُحادية (Artificial doubling) وفي حالات نادرة يكون تلقائياً. النباتات الأُحادية المُضاعفة ذات قيمة كبيرة لكون النُصف الآخر من الكروموسومات الجديد عبارة عن نسخة مطابقة تماماً من القديمة التي تم تضاعفتها ولذلك سُميت النباتات الناتجة بالأُحادية المُضاعفة. توفر النباتات الأخيرة فائدة عظيمة لمُربي النبات لكونها تنتج نبات نقي (Homozygous) بخطوة واحدة مما يُقلل معنوياً من زمن برنامج تحسين النبات ويُمكن تلخيص فوائد الأُحاديات المُضاعفة بالنقاط التالية:

1- الإفادة من توليفات الإرتباطات الجينية: توفر الأُحاديات المُضاعفة الفُرصة في الإفادة من النباتات الأُحادية لأغراض الإنتخاب. تلك الحقيقة ذات أهمية كبيرة في الإنتخاب بعد تعريض النباتات الأُحادية الى طفرات مُستحثة حيث أن الطفرات التلقائية في الغالب تنتج نباتات مُتنحية للصفة المرغوبة ومُسيطر عليها من قبل أليلات مُتنحية. طالما النباتات الأُحادية تُعبر عن جينات مُتنحية، يُمكن والحالة هذه إنقاذ النباتات التي حصلت فيها إنعزالات مُتنحية وبكفاءة من خلال مُضاعفة عدد كروموسوماتها.

2- توفر الأُحاديات المُضاعفة فائدة كبيرة عندما تكون الحاجة الى مُجتمع نباتي صغير ويُراد البحث عن النباتات الأقل إرتباطاً وخاصةً في الصفات الكمية بالنظر لأن الإنتخاب في مُجتمع نباتي يكون في الواقع مؤثراً في توليفات الجين المشيجي. بناءاً على ذلك، وُظفت النباتات المُضاعفة في دراسة توريث الصفات الكمية كصفة وزن الحاصل المُهمة جداً.

3- يُستفاد من الأُحاديات المُضاعفة في برامج تحسين النبات بالتطفير، مُقاومة الأمراض، نقل الجين وغيرها من الفوائد.

4- يُستفاد من التقانة في إختصار برامج التربية والتحسين لدرجة كبيرة بتسريعها الحصول على خطوط نقية (Homozygous lines) بخطوة واحدة على عكس ما يحصل في المحاصيل خلطية التلقيح والتي تحتاج الى ما يُقارب من ستة مواسم زراعية للمحصول لكي يقترب من النقاوة الوراثية.

5- الحصول على نباتات أُحادية ومُضاعفة نقية ذات صفات مُتنحية وكمية له الفائدة العظيمة وذلك بسبب تداخل العديد من المواقع (Loci) وحجب (Masking) للأليلات المُتنحية في النباتات غير النقية أي المُتغايرة وراثياً (Hetrozygous).

6- يتم الحصول على الأُحاديات المُضاعفة في خطوة واحدة عند توفر الطريقة الصحيحة لذلك النوع النباتي. وبذلك يُمكن تثبيت كافة الإرتباطات الموروثة بخطوة واحدة ومنذ الجيل الأول.

7- يُستفاد منها وخاصة في شركات إنتاج البذور في تطوير آباء نقية وراثياً لأغراض إنتاج الهُجن المُفردة والمُضاعفة ذات القيمة التسويقية العالية وغزارة إنتاجها.

8- الإستفادة من تربية الطفرات إذ يتم التعبير عن الطفرات مُباشرة في النباتات الأُحادية والأُحادية المُضاعفة بعكس النباتات المُتغايرة وراثيا. أُدخلت صفة المُقاومة لمُبيد الأعشاب Imidazoline في نبات السلجم (*Brassica napus*) عالي الزيت بالإستفادة من الأُحاديات المُضاعفة ونجح التعبير الوراثي للصفة حقلياً. كذلك عُرضت حبوب لقاح نبات السلجم الى مُطفرات كيميائية وفيزيائية ونتج منها نباتات أُحادية ومن ثم أُحادية مُضاعفة مُقاومة للمُسببين المرضيين *Phoma lingam* و *Alternaria brassicola*.

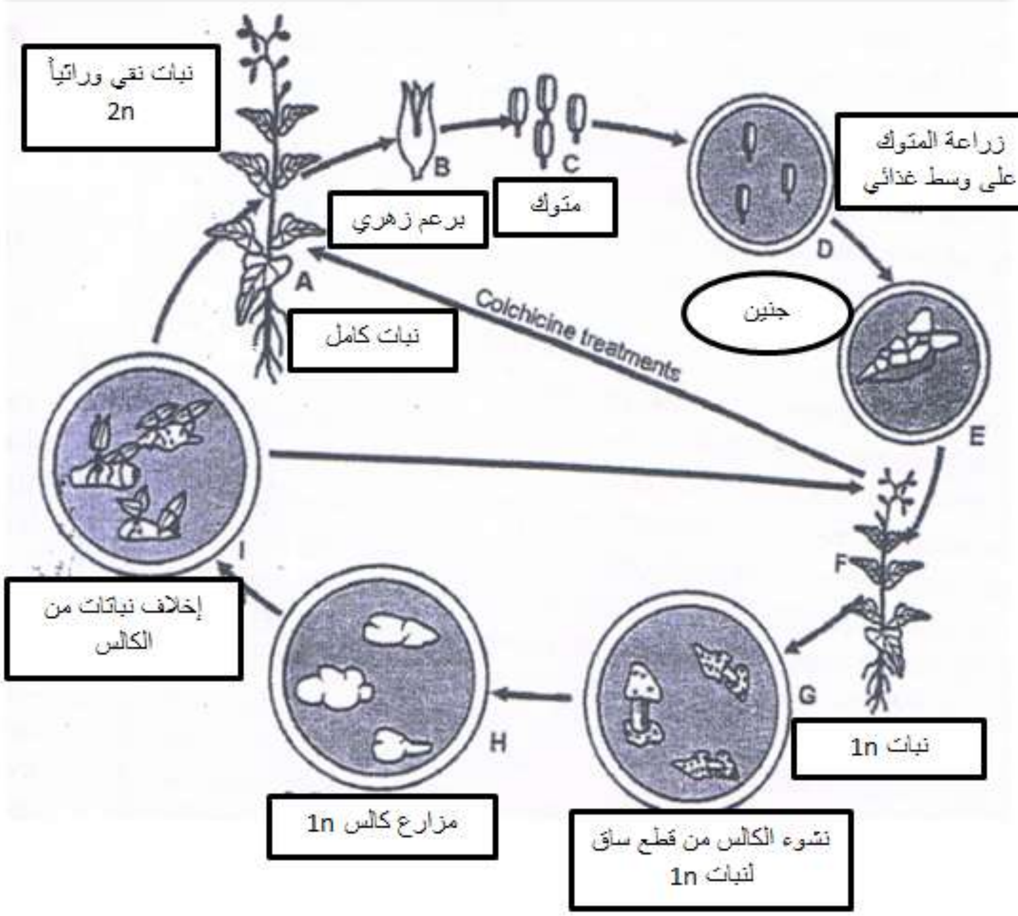
أُنتجت نباتات ايضاً ذات مُحتوى عالي من حامض الأوليئيك، بذور بأغطية نحيفة، مُحتوى زيتي وبروتيني عالي ومُحتوى ألياف مُنخفض في خطوط من نباتات أُحادية من نبات السلجم. تُمثل مزارع حبوب اللقاح إنموذجاً مُمتازاً لإنتخاب نباتات مُقاومة للأمراض خارج الجسم الحي بشرط أن يكون النظام الدفاعي

للمرض فعالاً في هذه المرحلة المُبكرة من نشوء النبات. يجب الإنتباه بأن السبورات (حبوب اللقاح) في النبات الواحد لاتتشابه خلاياها وفيها تغاير (Gametoclonal variation) وإعتماداً الى الحالة الأخيرة تم إخلاف نباتات أُحادية بعد تضمين وسطها الغذائي بسموم مُستخلصة من مُسببات مرضية. نجحت التقانة في الحصول على تراكيب وراثية مُقاومة للأمراض. تطبيقياً، الأُحاديات نباتات عقيمة لكونها تحتوي على طُقم (Set) واحد من الكروموسومات ويُمكنها النمو لحد فترة التزهير بالرغم من نُقص كروموسوماتها المُتناظرة وعليه يكون الإنقسام الإختزالي غير طبيعي ولاتتكون أمشاج ذات حيوية. ولإجل الحصول على ثنائيات نقية وراثياً وخصبة (Fertile homozygous dihaploids, isogeneic diploids)، يجب مُضاعفة طُقم الكروموسومات. تُظهر الثُنائيات النقية هذه إنعزالات في الإنقسام الإختزالي طبيعية المنشأ ولها أهميتها البالغة في برامج تحسين النبات. تتوافر عدة طرائق لمُضاعفة كروموسومات الأُحاديات سنُحاول تلخيصها وكما يلي:

1- المُعاملة بمادة الكولشسين: يتم في هذه الطريقة مُعاملة النُبيتات وهي لاتزال مُحاطة بالمُتك بمحلول مادة الكولشسين تركيز 0.5% لمُدة 24-48 ساعة. يُعاد زراعة النُبيتات في الوسط بعد غسلها بالماء المقطر. وعند مُعاملة النُبيتات الناضجة، تُعامل محاور الأوراق بعجينة من الكولشسين والأنولين.

2- إستثمار ظاهرة ميل الخلايا 1n لعدم الإستقرارية في مزارعها حيث تميل الى تضاعف أعداد كروموسوماتها دون حصول إنقسام نووي بعملية تُسمى بالتضاعف الذاتي أو الداخلي (Endomitosis). في خلال هذه العملية، تُنمى قطع من الأجزاء الخضرية لنباتات 1nعلى وسط مُناسب لنشوء الكالس.

تتضاعف العديد من كروموسومات خلايا الكالس نتيجة التضاعف الداخلي بعد فترة من نموها على الوسط الغذائي المُناسب. تُنقل قطع الكالس التي حصل فيها التضاعف الى وسط مُناسب ويتم إخلاف نباتات منها (شكل 5.24). تتطور أحياناً أُحاديات مُضاعفة من أجنة أو كالس نتيجة إندماج تلقائي لنواتين مُتشابهتين من حبوب لقاح مزروعة كما يحصل في نباتات العائلة الصليبية.



شكل 5.24. خطوات إنتاج نباتات نقية وراثياً ثُنائية المجموعة الكروموسومية من زراعة المُتك.

الكشف عن النباتات الأُحادية Detection of haploids

يوجد عدد من الطرائق للكشف عن النباتات الأُحادية من بين الأفراد الثُنائية. تُلاحظ الصفات المظهرية كإختزال الأجزاء الخضرية والزهرية وحجوم الخلايا بالمُقارنة مع نظيراتها من الثُنائية. يُمكن ان يكون حجم الثغور وحبوب اللقاح المُجهضة مِعيار آخر في الغربلة الأولية للكشف عن الأُحاديات مع مُراعاة وجوب إجراء فحص وتأكيد لأعداد الكروموسومات. حالياً، يُعد إستعمال المؤشرات الوراثية الأكثر فعالية في تشخيص النباتات الأُحادية. يُؤسس عمل المؤشرات الوراثية في التمييز بين النبات الهجين وغير الهجين وعليه فأي فشل في الإخصاب وتطور أجنة عذرية، يُمكن تمييزه في مرحلة البذور، البادرات وفي النبات الناضج. على سبيل المثال، إذا كان النبات الأُم حاملاً لمؤشر مُتنحي وهجين من نبات آخر حاملاً لمؤشر سائد، فالجيل المُتنحي للصفة الناتجة سيكون عموماً احادي مع إحتمالية وجود ثنائي من واحد او أكثر من الأنواع التالية:

1- هُجن ثُنائية حاملة لطفرة او نُقص في الجين المُعلم (Marker gene) في الأب مصدر اللقاح.

2- هُجن ثُنائية مع كبح في المُعلم السائد بسبب جين الكبح (Suppresser gene) أو بسبب مرض ما.

3- ثنائيات موروثة من الأم (Maternal) بسبب النشوء العذري (Apomictic).

تتطلب حالة تشخيص الأُحاديات احياناً في مرحلة البذور، عندئذٍ فالجين المُعلم يجب ان يُعبر عن نفسه في مراحل تطور الجنين المُتاخرة مثل لون الأليرون. إذا تطلب الأمر التشخيص في مرحلة البادرات، فالمُعلم يجب ان يظهر تاثيره في البادرات مثل اللون الارجواني للبادرات. وُظِفت تقانة المؤشرات الوراثية في الكشف عن نباتات ذرة أُحادية مُنتجة على نطاق واسع. عندما يكون الهدف تمييز الأُحاديات الموروثة من الأب (Paternal)، يجب توفر المُعلم السائد في نبات الأُم وعليه فالأُحادي الموروث من الأب يُمكن تشخيصه مظهرياً عن الهجين. تصل الحالة الى إستبعاد 90-98% من أفراد الجيل الأول مُبكراً عند إعتماد المُؤشرات الوراثية وبالإمكان حصول نسب عالية من الأُحاديات في الأفراد الباقية وذلك يتجسد على وجه الخصوص عند إنتاج خطوط تربية من الذرة الصفراء.

إستعمال تداخل الرنا في العُقم الذكري RNAi for Male Sterility

أُستعملت التقانة أيضاً وبنجاح في إنتاج نباتات عقيمة ذكرياً (Male sterile) ذات الأهمية البالغة في إنتاج البذور الهجينة (Hybrid seed industry). فالجينات التي تُعبر عن نفسها في أنسجة حبوب اللقاح بالإمكان إعتبارها هدفاً من خلال تقانة تداخل الرنا (RNAi). وتمكن علماء النبات في هذا المجال من تطوير خطوط تبغ عقيمة ذكرياً تُثبط التعبير الجيني لجين *ta29* الضروري لنشوء حبوب اللقاح، كما وأُستعملت التقانة في إيقاف التعبير الجيني لجين *Msh1* في نباتي التبغ والطماطم لِينتج عن ذلك إعادة ترتيب دنا المايتوكوندريا المُرتبط مع العُقم الذكري السايتوبلازمي طبيعي المنشأ.

حفظ حبوب اللقاح Storage of pollen grains

من المؤكد بأن قابلية حبوب اللقاح للإحتفاظ بحيويتها وبالتالي بقاء مقدرتها على الإخصاب لأطول فترة مُمكنة مُهما للغاية مع مُراعاة التنوع الواسع في المملكة النباتية. طُوِرت تقانات لحفظ حبوب اللقاح في ذات النمط المُتبع ببنوك خزن المصادر الوراثية في أماكن عديدة من العالم وحتى عدة مواقع ضمن البلد الواحد أُطلق عليها بنوك حبوب اللقاح (Pollen banks) وكما هو معمول به حالياً في بنوك حفظ حيامن الإنسان والحيوان وحفظ الأجنة. توفر بنوك حبوب اللقاح للعلماء ومُربي النبات مصدراً لحبوب اللقاح المحفوظة

لمُختلف الأنواع النباتية في مدار السنة وفي أي مكان من العالم. تُلخص فوائد خزن حبوب اللقاح بالنقاط الجوهرية الثمان التالية:

1- يُستفاد منها في تهجين النباتات التي تُزهر في مواعيد زمنية مُختلفة وفي مواقع جغرافية مُختلفة والنباتات التي لا يتزامن موعد أزهارها لسبب أو أكثر.

2- إمكانية التجهيز الثابت والمُستمر من حبوب اللقاح وخاصة للنباتات قصيرة دورة الحياة.

3- تُعد بنوك حبوب اللقاح مصدراً لتسهيل التلقيح الإضافي الذي تحتاجه بعض النباتات التي تظهر فيها مشاكل في التلقيح وإنخفاض نسبة عقد الثمار وبالتالي زيادة الإنتاج.

4- الإستغناء عن الحاجة الى زراعة خطوط ذكرية بإستمرار والتي قد تكون بهدف زيادة فُرصة التلقيح أو لبرامج تحسين النبات.

5- تجنُب التغاير في حبوب اللقاح غير المقصود نتيجة للجمع اليومي لها.

6- دراسة الحساسية التي تُسببها حبوب اللقاح لكثير من الناس.

7- دراسة آلية عدم التوافق الذاتي التي تحصل ضمن النوع النباتي الواحد.

8- تجهيز المواد النباتية لمُختلف البنوك الوراثية العالمية كوسيلة للتعاون الدولي في تبادل المادة الوراثية مما يُساهم في زيادة التنوع الاحيائي.

9- ضمان توفر حبوب اللقاح في مدار السنة وبذلك يُمكن الإستغناء عن المشاتل او تهيئة ظروف مناخية مُناسبة.

يعتمد طول فترة بقاء حبوب اللقاح بحيوية عالية في العديد من العوامل لعل أهمها الفروقات التصنيفية في المملكة النباتية والتي عزاها علماء النبات الى إختلافات في مجين (Genome) النبات والظروف البيئية الخارجية. قُسمت حبوب اللقاح على أساس طول فترة الإحتفاظ بحيويتها الى حبوب لقاح تبقى مُحتفظة بحيويتها لفترة طويلة تتراوح من 6 الى 12 شهراً وأُخرى تبقى حيويتها لفترة مُتوسطة تتراوح من 1 الى 3 أشهر بينما تُحافظ المجموعة الأخيرة على حيويتها لفترة قصيرة تتراوح من بضعة دقائق الى يومين. يبين جدول 5.5 طول فترة خزن حبوب لقاح لمجموعة من الأنواع النباتية تحت الظروف المُبينة في الجدول.

جدول 5.5. طول فترة حيوية حبوب اللقاح لأنواع نباتية مُختلفة عند خزنها على درجة حرارة ورطوبة نسبية معلومتين

النبات	حرارة الخزن (°م)	% الرطوبة النسبية	مدة الخزن
Carica papaya	1	10	153يوم
Citrus sp.	5	30-20	3 سنة
Cocos nucifera	5	40	1.5سنة
Fragaria sp.	4-2	30-10	3 سنة
Gladiolus sp.	10	50	100 يوم
Lycopersicon esculentum	4-2	10	252 يوم
Olea europea	20	33-28	1 سنة
Vitis vinifera	10	25	2 سنة
Pyrus malus	8-2	10	2 سنة
Pinus silvestris	2	75-25	1 سنة
Helianthus annuus	5-4	اقل من 40	25-20 يوم
Triticum aestivum	20	90	3-1 ساعة
Zea mays	2	100	6 يوم

أسباب فقدان حبوب اللقاح لحيويتها Reasons behind the loss of pollen grain viability

يعود سبب الفُقدان التدريجي لحيوية حبوب اللقاح لجُملة من الأسباب أهمها النُقص الذي يحصل في مُركبات الايض الثانوي نتيجة إستمرار النشاط الايضى لحبة اللقاح حتى وان كان الفقدان بمُعدلات واطئة. غالبا ما يكون النُقص في مُحتوى حبة اللقاح من الكربوهيدرات والحوامض العضوية والإنزيمات وكل ما يتعلق بالمواد التي تحتاجها الحبة في التنفس. السبب الرئيس الآخر لفُقدان الحيوية، فقدانها المُستمر للمُحتوى

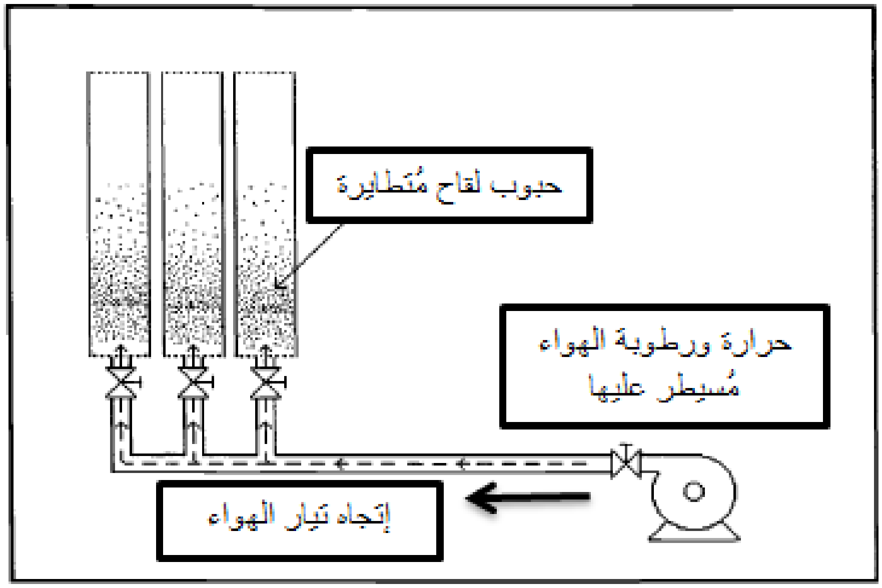
الرطوبي الذي يُشكل نسبة 15-35% من الوزن الطري لحبوب اللقاح عند وقت نضجها وإنفتاحها ونُثرها (Time of shedding) بالرغم من الإختلافات الكبيرة بين العوائل النباتية في مُحتوى حبوب لقاحها من الرطوبة حيث تصل في العائلة النجيلية 35-60%.

تكون حبة اللقاح في العائلة الأخيرة ثلاثية الخلية (Tricellular) وتتطلب ظروف خزن خاصة لحفظ حيوية وخصوبة حبوب لقاحها وحتى لفترة قصيرة. عزت دراسات حديثة سبب فقدان حيوية اللقاح خلال فترة قصيرة الى حصول تغييرات تركيبية غير قابلة للإصلاح في أغشية البلازما والعناصر الرئيسية لمُكونات حبة اللقاح. تُخزن حبوب اللقاح تقليدياً في عبوات زجاجية أو مصنوعة من مادة الأثيلين مُتعدد الكلايكول أو أية حاويات مُناسبة. تُستعمل عوامل تجفيف عند إستعمال حاويات غير مُحكمة مثل هلام السيليكا الجاف، محاليل مُشبعة من أملاح مُختلفة أو تراكيز مُختلفة من حامض الكبريتيك بهدف المُحافظة على رطوبة نسبية مُناسبة للهواء. تُضاف الى حبوب اللقاح عندما تكون لزجة مُخففات مطحونة مثل طحين الحنطة والذرة بعد مزجها مع حبوب اللقاح.

تُخزن حبوب اللقاح لعوائل نباتية معروفة في مُذيبات عضوية مُختلفةمثل البنزين، النفط، إيثر ثنائي الإيثر، أسيتون والكلوروفورم. تُحافظ حبوب لقاح الحمضيات على سبيل المثال لثلاثة أشهر عند خزنها في مُذيبات عضوية. المُلاحظ بأن حبوب اللقاح التي تتلقح أزهارالنباتات المعزولة منها بالحشرات كالجوز، الصفصاف، الكمثرى، الذرة الصفراء وغيرها، تُحافظ على حيويتها عند خزنها في مُذيبات عضوية على درجة حرارة 4 °م لمُدة 35-40 يوماً. تحققت زيادة في طول فترة حيوية حبوب اللقاح ثُنائية الخلية (Bicellular) والتي تُعد مُتحملة للذبول كونها ذات مُحتوى رطوبي قليل أصلاً وذلك بعد خزنها في درجات حرارة تحت الصفر المئوي (-10 و-34 °م). أُستعملت تقانة التجميد والتجفيف (التجفيد، Freeze-drying) في التجميد السريع لحبوب اللقاح والتي غالباً ما تكون -60 أو -80 °م يتبعها إزالة تدريجية للماء بإستعمال التفريغ والتبريد في آنٍ واحد حيث تُسحب الرطوبة بالتفريغ المُبرد (Vacuum cooling). علماً بأن إستجابة حبوب اللقاح للعديد من الأنواع النباتية تكون أفضل اذا ما جُففت بالهواء قبل إجراء التجميد والتجفيف. تُجفف حبوب اللقاح بأجهزة خاصة (شكل 5.25) حيث يُدفع هواء بدرجة حرارة ورطوبة مُحددتين الى داخل إسطوانات تحتوي حبوب اللقاح وبالنظر لِخفة وزن الأخيرة فانها تطفو نتيجة التيارات الهوائية وتجف.

حفظ حبوب اللقاح بالتجميد الفائق Cryopreservation by deep freezing

عندما لاتفلح وسائل المُحافظة لحيوية حبوب اللقاح بالوسائل أعلاه، تخضع حبوب اللقاح الى التبريد الفائق التي تتراوح بين -70 الى -196 °م (جدول 5.6). وُظِفت التقانة لأول مرة في حفظ حبوب لقاح نبات حلق السبع (*Anterhinum majus*) ذات المُحتوى الرطوبي المُنخفض (حوالي 10%) بعد تعريضها لتيار هواء سائل مُتجمد (-180 °م) ولم تنخفض نسبة إنباتها. يبين جدول 5.6 قائمة من نباتات مُنتخبة نجحت حبوب لقاحها الخزن في درجات حرارة مُنخفضة أقل من -70 °م. لاتحتاج أغلب حبوب لقاح الأنواع النباتية الى تبريد أو تدفئة عندما يكون مُحتواها الرطوبي مُناسباً للخزن بالتبريد الفائق. بينت الدراسات الحديثة حول التراكيب الجزيئية لأغشية حبوب اللقاح والتي أُستعملت فيها تقانات FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) حصول إنتقال في دهون الأغشية مما يُسبب في حصول تلف كبير أثناء التجميد أو التدفئة بعد التجميد ثم الإذابة (Freeze-thaw) وهذا يكون مسؤولاً في التلف عند تشرب (Imbibition) حبوب اللقاح الجافة والذي يُمكن تجنبه بالترطيب التدريجي لحبوب اللقاح برفع درجة الحرارة لتؤثر في الإنتقال الى حالة البلورات السائلة (Liquid crystalline phase).



شكل 5.25. مُخطط توضيحي لماكنة تجفيف حبوب اللقاح.

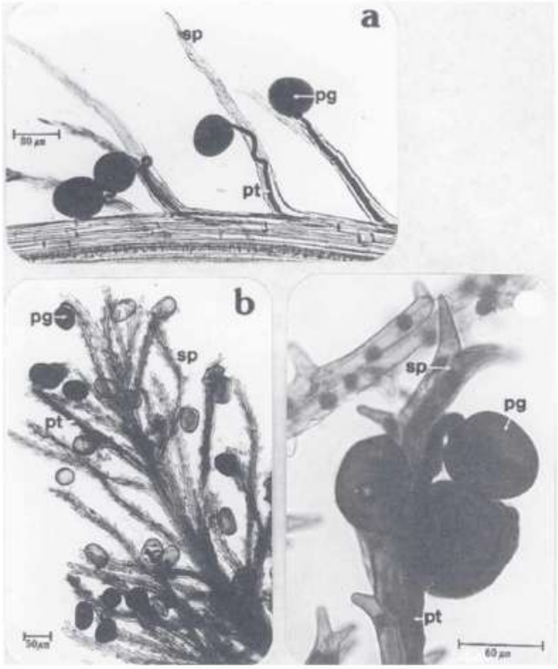
جدول 5.6. نجاح التجميد الفائق في خزن حبوب لقاح مجموعة من الأنواع النباتية

النوع النباتي	حرارة الخزن (°م)	فترة الخزن	النوعية
Beta vulgaris	196-	1 سنة	خصبة
Brassica oleracea	196-	16 شهر	خصبة
Capsicum annuum	196-	42 شهر	خصبة
Glycine max	192-	21 يوم	خصبة
Helianthus annuus	76-	4 سنوات	خصبة
Lycopersicon esculentum	190-	1062 يوم	خصبة
Prunus persica	196-	1 سنة	خصبة
Prunus persica	196-	1 سنة	خصبة
Pyrus communis	190-	1062 يوم	حيوية
Pyrus malus	190-	673 يوم	حيوية
Rosa spp.	196-	8 اسابيع	خصبة
Solanum tuberosum	196-	24-9 شهر	خصبة
Trifolium pratense	196-	24 اسبوع	خصبة
Vicia faba	196-	1 شهر	حيوية
Vitis vinifera	196-	5 سنوات	خصبة

يجب الإنتباه الى ان التجميد المُباشر لحبوب لقاح نباتات العائلة النجيلية قد يُسبب في تغييرات تركيبية غير قابلة للإِصلاح نتيجة مُحتواها العالي من الماء وبالتالي تتكون بلورات ثلجية في أنسجتها.

إنبات حبوب اللقاح خارج الجسم الحي Pollen germination *in vitro*

يُعد تنبيت حبوب اللقاح الوسيلة المُفضلة للتأكد من حيوية حبوب اللقاح وهي طريقة بسيطة وكمية وخاصة لحبوب اللقاح ثُنائية الخلية (شكل 5.26) وغالباً ما ترتبط حيوية حبوب اللقاح بقابليتها على الإخصاب.



شكل 5.26. إنبات حبوب اللقاح في مياسم الذرة الصفراء (a)، الشيلم (b)، الترتيكيل (c)، بعد 10 سنوات من خزنها بالنتروجين السائل. Stigma papilla=Sp (حلمة الميسم)؛ Pollen tube= pt (إنبوب اللقاح)؛Pollen grain = pg (حبة اللقاح).

يُستعمل وسط BK في إنبات أكثر من 86 نوعاً نباتياً مع مُراعاة الترطيب التدريجي قبل زراعتها لتفادي التلف نتيجة تشرب حبوب اللقاح بالرغم من محدودية إستجابة الأنواع النباتية ثلاثية الخلايا للإنبات خارج الجسم الحي وخاصة حبوب لقاح محصول الحنطة.

إنبات حبوب اللقاح في الميسم (Stigma): لُقحت المياسم المفصولة وغير المفصولة بحبوب لقاح مخزونة لرسم صورة حقيقية عن وظيفة حبوب اللقاح وسلوكيتها عند التلقيح. هذا النوع من إختبار الإنبات شبه خارج الجسم الحي (Semi *in vitro* germination test) تم تجريبه بكفاءة لإختبار حيوية حبوب لقاح من نباتات العائلة النجيلية وأُعيد ترطيبها بعد تعريضها الى خزن مُجمد وقيست نسبة حبوب اللقاح النابتة وقِيسَ طول إنبوب اللقاح بعد نشوئها وصبغها بصبغة القطن الأزرق (Blue cotton stain) او الأنيلين الازرق (Aniline blue). الذي يوضح إنبات حبوب اللقاح بالطريقة شبه خارج الجسم الحي لنباتات من العائلة النجيلية خزنت لفترة طويلة وعُرضت لمُدة 3 ساعات لجو الغرفة وصُبغت بصبغة القطن الأزرق. يُعطي عقد الثمار والبذور تقديراً دقيقاً لحيوية حبوب اللقاح ومقدرتها على الإخصاب ويتم ذلك بعد التلقيح الإصطناعي بنقل حبوب اللقاح الى مياسم تم حمايتها من التلقيح بعد خصي الأزهار. إختصاراً، الهدف النهائي من خزن حبوب اللقاح هو إنشاء بنوك لحبوب اللقاح ومن خلالها يُمكنالحصول على حبوب لقاح أي نوع نباتي وبأي وقت من السنة وفي أي مكان بالعالم. يُمكن التحقق من حيوية وخصوبة حبوب اللقاح بعد إختبارات إنباتها خارج الجسم الحي أو بتقانات شبه خارج الجسم الحي وكذلك بقياس نشاط البذور (Seed vigor) اي سُرعة إنبات البذور التي سبق وان تم تلقيحها بحبوب لقاح مخزونة وبذلك فالمُهم بالموضوع إختبار نشاط حبوب اللقاح وحيويتها.

الفصل السادس: تقانات البروتوبلاست

Protoplast Technology

مقدمة Introduction

تُحاط الخلية النباتية بجدار مُتماسك مُكون من البكتين والسليلوز وأشباه السليلوز وإذا ما أُزيل هذا الجدار فستكون الخلية مُحاطة بغشاء البلازما فقط وبداخله عضيات الخلية من النواة، المايتوكوندريا والبلاستيدات وغيرها. لذا فأن إزالة الجدار ينتج عنه خلايا عارية تُدعى البروتوبلاست. ولكون ان الجدار الخلوي يكون عائقاً لعمليات الدمج بين نوعين من البروتوبلاستات وعائقاً لدخول اي مادة وراثية ولنواقل المادة الوراثية، لذا كُرست الدراسات حول إذابة الجدار الخلوي والحصول على بروتوبلاستات ذات تطبيقات واسعة في مجال تحسين النبات وخاصة إنتاج الهُجن الجسمية.

بدأت فكرة عزل البروتوبلاست ميكانيكياً من خلايا مُبلزمة عام 1892 من قبل كليركر (Klercker) وبسبب النقص آنذاك في المُستلزمات البحثية لم تتحقق الفكرة لغاية عام 1968 عندما ركز تاكيب (Takebe) وفريقه البحثي وكذلك الاعمال الرائدة التي نفذها كوكنك وباور (Power و Cooking) في هذا الموضوع. تبنى كوكنك فكرة إمكانية إزالة الجُدر الخلوية كيميائياً كإستعمال الإنزيمات وبالتالي تحريرالبروتوبلاست وكانت توقعاته صحيحة في أهمية ذلك في مجال تحسين النبات. ركز هذان العالمان في دراساتهما على تحضير الإنزيمات المُحللة للجدار الخلوي وخاصة إنزيم السليليز والماسيروزايم (Macerozymes) ووظفوها في إزالة الجُدر الخلوية لخلايا النسيج الوسطي للورقة معزولة من نبات البتع.

كانت البدايات الأولى تتلخص بمُعاملة الخلايا بإنزيم السليليز أولاً ثم انزيم الماسيرو وبخطوتين مُنفصلتين، تبين لاحقاً بأن المُعاملة بمُستحضر الإنزيمين وبخطوة واحدة قد أثبت فعالية في إزالة الجُدر الخلوية. ولم يمضي سوى عام واحد (1969) حتى تمكن اركسن وجوناسن (Eriksson و Jonassen) من عزل أول بروتوبلاست من خلايا مُعلقات خلوية لنبات *Haplopappus gracilis*. وفي عام 1970 تحققت أولى النجاحات من دمج بروتوبلاستات معزولة من نوعين مُختلفين من النباتات من قبل كارلسون (Carlson) وزملاؤه. إذ تمكنوا من عزل وتشخيص نواتج طافرة (Mutants) خارج الجسم الحي. في الوقت نفسه تمكن باور (Power) وفريقة البحثي من وضع أُسس علمية رصينة لتقانة عزل وتنقية ودمج البروتوبلاستات وإمكانية توظيفها فعلياً في مجال تحسين النبات. في عام 1971 نجح تاكيب (Takebe) ولأول مرة من توالد نبات كامل من بروتوبلاست نبات التبغ مؤكداً وجود القُدرة الكامنة في البروتوبلاست

(Totipotency) في تكوين نبات كامل. إستمر البحث العلمي في هذا المجال ولسنوات عديدة تمكن فيها العديد من الباحثين تجاوز حدود عدم التوافق الطبيعي بين الأجناس عند عملية الدمج، إذ تمكن ميلكورس (Melchors) وزملاؤه عام 1978 من الحصول في نبات كامل من تهجين جسمي بين الطماطم والبطاطا.

بدأت لاحقاً تتطور وسائل دمج البروتوبلاست، ففي عام 1982 أدخل زمرمان (Zimmermann) تقانة إستعمال المُحفزات الكهربائية في دمج البروتوبلاستات مما فتح آفاقاً مُهمة في مجال هندسة الخلية وراثياً وتكلل ذلك عندما أدخل كرنس (Krens) عام 1982 دنا معزول من نبات وإدخاله الى بروتوبلاستات معزولة من نبات آخر وظهر التعبير الجيني في الخلايا المُهندسة وراثيا دليلاً في نجاح عملية التحول الوراثي (Transformation). ولأول مرة تمكن كتريت (Chetrit)عام 1985 من الحصول على هجين جسمي (Somatic hybrid) ناتج من دمج بروتوبلاستات معزولة من نباتات تعود الى العائلة الصليبية (Brassicacae) وأُخرى من نبات الفجل *Raphanus*. تميز الهجين الجسمي الجديد بحصول دمج بين أنوية البروتوبلاستات وسايتوبلازمها وأُنتج الهجين الجديد بذوراً هجينة.

تُعددت وتنوعت وسائل البحث العلمي في مجال تكنولوجيا البروتوبلاست في العقدين الاخيرين وإنتشرت في أغلب مُختبرات دول العالم بهدف تحسين أداء المحاصيل الزراعية كماً ونوعاً وأصبحت أداة لايستغنى عنها في مجال تقانات تحسين النبات خارج الجسم الحي. أثمرت نتائج تلك البحوث عن العديد من ألأصناف الجديدة والتيأصبحت في مُتناول أيدي المزارعين. وفي عام 1986 أثمرت جهود كل من شايدر وكــوهن (Schieder و Kohn) في إنتاج هجين من أجنة جسمية لمُغطاة البذور بعد دمج البروتوبلاستات بالطرائق الكيميائية والفيزيائية. درسا كذلك المعوقات التي تظهر من خلال إنتاج هذه الهُجن من دمج البروتوبلاستات حتى نموها الكامل. حصل تطور كبير عام 1987 عندما سجل كلاين (Klein) وزملاؤه تحويراً وراثياً في خلال النقل المُباشر لدنا معزول من نباتات ذات صفات مرغوبة الى أُخرى بواسطة جهاز قذف الجزيئات الدقيقة ذات السُرع الفائقة (Highvelocity microprojectile bombardment) أو ما يسمى بالمقذوفات البايولوجية (Biolistics). وبالنظر لإنتشار وتنوع طرائق نقل الجينات من نبات لآخر ولصفات مُختلفة، فقد إنتشرت النباتات المُحورة وراثياً (Genetically modified plants) لتصل العديد من مُختبرات العالم والمراكز البحثية لتُنتج محاصيل مُختلفة وبمساحات واسعة موزعة في عدد كبير من دول العالم. يُلاحظ مما سبق بأن تقانة البروتوبلاست كان شأنها شأن باقي فروع التقانة الحيوية إذ تطورت بخطوات مُتسارعة ودخلت تطبيقاتها حقل العمل مما ساهم في تحسين نوعية وكمية حاصل العديد من المحاصيل المُهمة اقتصاديا. وقبل الولوج في طرائق عزل وتنقية البروتوبلاست لابُد من الإشارة الى تطبيقاتها المُختلفة.

تطبيقات تكنولوجيا البروتوبلاست في المجال النباتي Applications of protoplast technology in plants

1- عزل الطوافر (Mutants) التي تنشأ تلقائياً أو نتيجة مُعاملة مُستعمرات الخلايا الناشئة منها بالمُطفرات (Mutagens) والإستفادة منها خاصة تلك التي تحمل صفات مرغوبة مُقاومة للأمراض والحشرات وتحمُل الإجهادات البيئية.

2- سهولة نسخ (Cloning) الخلايا المُفردة وإنتاج كالس منها وبالتالي توالد نباتات قدتحمل صفات مرغوبة وذلك لكون البروتوبلاستات لها القابلية في تكوين جُدر خلوية والإنقسام وتكوين نبات كامل اي لها القُدرة الكامنة على التوالد (Totipotent).

3- تمتاز البروتوبلاستات بكونها نظام فريد من نوعه يَسمح بدراسة عملية تكوين الجدار الخلوي ذات الأهمية الفسيولوجية الكبيرة.

4- يُستفاد من البروتوبلاستات كمادة نباتية في دراسة خواص الأغشية الخلوية وعمليات الإمتصاص والنقل وتراكيب الأغشية البلازمية.

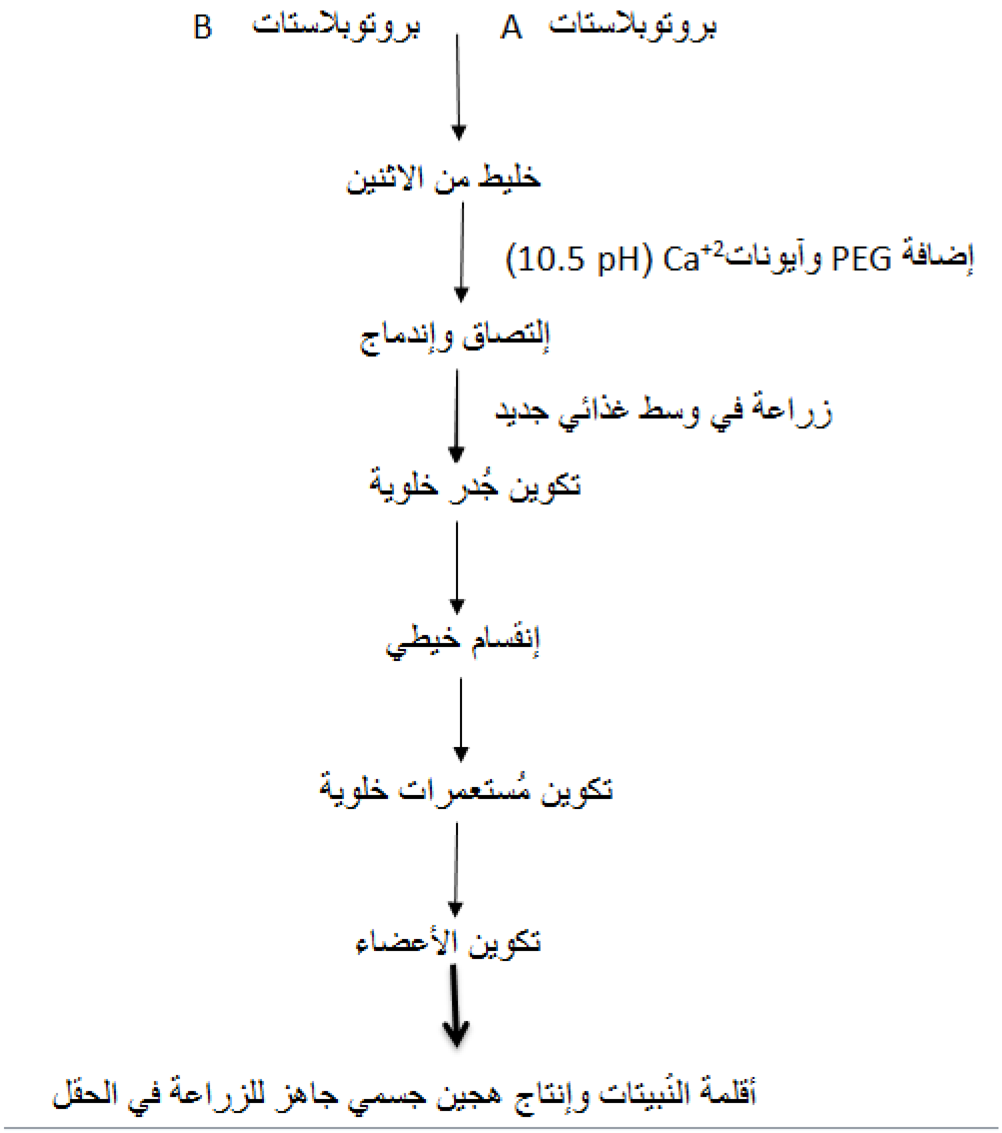
5- تُعد البروتوبلاستات وسيلة مُهمة في الدراسات الوراثية وفوق الوراثية (Genetic &epigenetic).

6- بعد إزالة جُدر الخلايا ستكون البروتوبلاستات مادة مُناسبة لدراسة الكروموسومات وعزل أعضاء الخلايا.

7- تُعد البروتوبلاستات وسيلة سهلة وتطبيقية للعاملين في مجال البيولوجيا الجزيئية والهندسة الوراثية لما توفره من نظام فريد في إدخال المادة الوراثية مُباشرةً أو بطرائق غير مباشرة من خلال توفر نواقل الكلونة (Cloning vectors).

عزل البروتوبلاست من خلايا النسيج الوسطي في الأوراق Isolation of protoplasts from leaf mesophyll tissues

ما يُميز الخلية النباتية عن خلايا باقي الكائنات الحية هو جدارها السليلوزي الصلب نسبياً وصفيحة وسطية غنية بالبكتين مما يجعل ذلك عائقاً في دراسة وراثة الخلية وصعوبة تطبيق تقانات البايولوجيا الجزيئية الحديثة. لذا فأن إزالة الجدار السليلوزي يُسهل دمج البروتوبلاستات بين نباتات النوع الواحد أو بين الأنواع المُختلفة لتُعطي في المُحصلة نباتات كاملة (شكل 6.1).



شكل 6.1. خطوات دمج البروتوبلاستات وإنتاج الهُجن الجسمية.

تُسمى عملية الدمج بين البروتوبلاستات بالتهجين الجسمي (Somatic hybridization) وناتج الدمج يُدعى بالهجين الجسمي (Somatic hybrid). أعد علماء النبات عزل وزراعة ودمج بروتوبلاستات الخلايا أحد أهم الإنجازات المُهمة في مجال زراعة خلايا وأنسجة النبات حديثاً. تعزل البروتوبلاستات عموماً من خلايا النسيج الوسطي في الورقة وهذا لايعني ان يكون ذلك هو المصدر الوحيد للبروتوبلاستات بل يُمكن عزلها من كافة أنسجة النبات ومن خلايا الكالس والمُعلقات الخلوية المُستحثة من الأجزاء النباتية المُختلفة. وغالباً ما يختار العاملون في هذا المجال أنسجة النسيج الوسطي للورقة لِسهولة إنتزاع خلاياها ميكانيكياً وإمكانية الحصول على خلايا مُفرده منها، إضافة الى قابلية خلايا النسيج الوسطي للورقة في تكوين نباتات

بسهولة. تعزل البروتوبلاستات أيضاً من خلايا المُعلقات الخلوية عندما تكون في أوج سرعة نموها اي في مرحلة الزيادة الخطية (Linear phase). والمعلوم بأن عدد البروتوبلاستات المعزولة وحيويتها يعتمد بدرجة كبيرة على ظروف نمو النبات الواهب فكلما كان الاخير نشطا وناميا تحت ظروف مُناسبة وذو عمر مناسب كلما أعطى عدداً اكبر ونوعية افضل من البروتوبلاستات.

طرائق عزل البروتوبلاست Methods of protoplast isolation

تُعزل البروتوبلاستات بعد التعقيم السطحي للأجزاء النباتية تحت ظروف خالية من المُسببات المرضية. تُستعمل العديد من المُطهرات (Disinfectants) لهذا الغرض وتتم عملية التعقيم السطحي داخل كابينة الهواء الطبقي (Laminar air flow cabinet). تُعزل البروتوبلاستات بطريقتين:

الاولى: الطريقة الميكانيكية Mechanical method

تُغمر الأنسجة المُراد عزل البروتوبلاستات منها في محلول مُبلزم لغشاء البلازما (Plasmoticum) إذ تنكمش جُدر الخلايا مما يُسهل من فصل البروتوبلاستات ويُستعمل في الغالب محلول المانيتول (13%) كمُبلزم لهذا الغرض إذ يؤمن عدم إنفجار البروتوبلاستات بعد إنكماش جُدر الخلايا. تُفصل الخلايا المُبلزمة بآلة حادة وتوضع في أطباق حاوية على المحلول المبلزم ولابُد من تعقيم الاوراق سطحياً بعد فصلها من النبات الام. تنفصل بروتوبلاستات الخلايا ذات الفجوات الكبيرة (Vacuolated cells) مثل الأوراق الحُرشفية للبصل وجذور نبات الفجل وغيرها. ومن الصعب عزل بروتوبلاستات الخلايا المرستمية وتلك ذات الفجوات الصغيرة. علماً بأن هذه الطريقة قليلة ألإستعمال حالياً ماعدا بعض الحالات التي يتم تجنب إستعمال الخليط الإنزيمي المُذيب للجدار الخلوي والذي قد يكون ضاراً لمُكونات الخلية في بعض الأحيان. يُسبب عزل البروتوبلاستات بهذه الطريقة الى كثرة الخلايا المُعرضة للتلف نتيجة إستعمال آلة حادة في قشط خلايا النسيج الوسطي للورقة من السطح الأسفل لورقة النبات.

ثانياً: الطريقة الإنزيمية Enzymatic method

غالباً ما تُستعمل هذه الطريقة على نطاق واسع في عزل البروتوبلاستات كونها تعطي كميات كبيرة منها مع الحد الادنى من التلف مع إنكماش أزموزي قليل. وبالرغم من ذلك ففي بعض الحالات يكون لخليط الإنزيمات تأثيرات مُميتة في فعاليات ايض الخلية. يعمل العديد من الباحثين في الجمع بين الطريقتين اي الميكانيكية والإنزيمية، إذ تُفصل الخلايا ميكانيكياً أولاً يتبعها عزل البروتوبلاستات إنزيمياً. يشتمل عزل

البروتوبلاستات من أوراق النبات وتعقيمها سطحياً أولاً ثم إزالة طبقة الأدمة السفلى من أجزاء الأوراق المُعقمة. يتم الحصول على البروتوبلاستات بإحدى الطريقتين التاليتين:-

أ- الطريقة المُباشرةً: وتنفذ بخطوة واحدة، إذ تُعامل خلايا النسيج الوسطي للورقة بإنزيم الماسيروزايم (إنزيم البكتنيز) إضافة الى إنزيم السليليز بوقت واحد. تُحضن أجزاء الأوراق لمُدة 15-18 ساعة في خليط الإنزيمات (5% ماسيروزايم + 2% سليليز) بمحلول 13% من السوربيتول والمانيتول ويُعدل ألأُس الهيدروجيني الى 5.4.

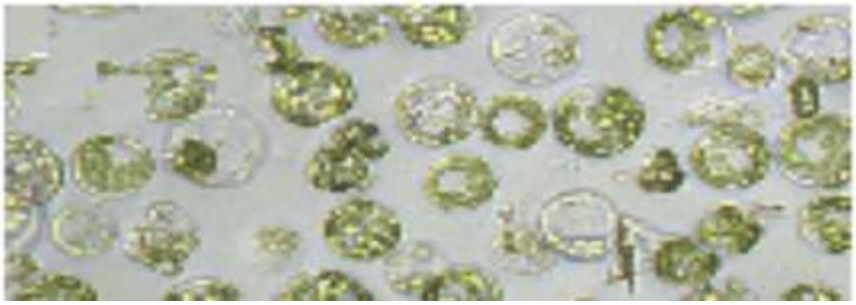
تُحضن الأجزاء ألنباتية في الخليط في درجة حرارة 25 °م وتُعصر الخلايا برفق لتحرير البروتوبلاستات من الخلايا بعدها يُرشح الخليط من خلال مُرشحات صغيرة لإزالة بقايا الأوراق. يُنقل بعدها الراشح الى أنابيب ذات أبعاد 13×100 ملم. تُوضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي في سرعة 100 g لمُدة دقيقة واحدة إذ تتجمع البروتوبلاستات مُكونة كُتل. ويتم التخلص من الراشح العلوي وتُعاد العملية ثلاث مرات بعدها تُغسل البروتوبلاستات بمحلول السوربتول تركيز 15% وتُغسل مرة أُخرى بمحلول السكروز تركيز 20%. توضع البروتوبلاستات المغسولة بجهاز الطرد المركزي مرة أُخرى في سرعة 20 g لمُدة دقيقة واحدة، إذ يُلاحظ ان البروتوبلاستات النظيفة تطفو على السطح ويتم سحبها بماصة وتودع في أوعية مُعقمة (شكل 6.2).

ب- الطريقة التدريجية: وتكون في خطوتين، تُغمر فيها مقاطع أوراق النبات بإنزيم الماسيروزايم أولاً ثم تُنقل الى محلول إنزيم السليليز.

تُحفظ أجزاء الأوراق في خليط الإنزيمات المُكون من 0.5% من الماسيروزايم زائداً 3% من محلول كبريتات دكستران البوتاسيوم (Potassium dextran sulphate) وبوجود 13% مانيتول وأُس هيدروجيني 5.8. يُنقل الخليط الى منظومة ترشيح تحت التفريغ لمُدة خمس دقائق ثم يُنقل بعدها الى حمام مائي في درجة حرارة 25 °م مع إهتزاز بطئ ومُستمر لمُدة 15 دقيقة، في الخطوة التالية يتم إحلال خليط الإنزيمات السابق بخليط إنزيمي جديد وبنفس المُكونات سابقة الذكر وبنفس النِسب. تُحضن أجزاء الأوراق في الخليط الجديد لمُدة ساعة إضافية بعدها يتم غربلة مقاطع الورقة بغربال دقيق وتُنبذ بالطرد المركزي على سرعةg100 لمُدة دقيقة واحدة تُغسل بعدها ثلاث مرات بمحلول 13% مانيتول. تُجمع البروتوبلاستات وتُحضن في خليط إنزيمي جديد مكوناً من 2% سيليليز و13% من محلول المانيتول ويُعدل ألأُس الهيدروجيني الى 5.4 ويُحضن الخليط في درجة حرارة 30°م لمُدة 90 دقيقة. أخيراً يُعاد نبذ الخليط

بالطرد المركزي بعد إنتهاء مدة الحضن أعلاه في سرعة g100 لمُدة دقيقة واحدة. تتجمع البروبلاستات في هذه المرحلة مُكونة تجمعات أشبه بالكريات (Pellets). يتم اخيراً تنظيف البروتوبلاستات لثلاث مرات وكما ذُكر سابقاً في الطريقة المُباشرة.

(أ) (ب) (ج) (د)



شكل 6.2. (أعلى) بروتوبلاستات معزولة من شعيرات جذرية (أ) إقتراب زوج منها. (ب) إلتصاقهما. (ج) إندماج جزئي. (د) إندماج كامل. (أسفل) بروتوبلاستات معزولة من خلايا النسيج الوسطي للاوراق.

والجدير بالذكر ان كِلتا الطريقتين أعلاه تستوجب وضع أجزاء الورقة المُزال منها طبقة الأدمة في السطح الأسفل اي المُواجه لطبق الزراعة الحاوي على الخليط الإنزيمي. وتُعد طريقة الخطوة الواحدة او ألمُباشرة أكثر إنتاجاً للبروتوبلاستات من الثانية بالنظر لتحريرها خلايا طبقة النسيج الوسطي للورقة بنوعيها العمادية (Palisade) والبرنكيمية ألأسفنجية (Spongy parenchyma) وكلاهما مصدراً للإنتاج البروتوبلاستات. وبالمقابل تنتج طريقة الخطوتين أعداداً أقل بالنظر لكون البروتوبلاستات المُتحررة تكون من الخلايا العمادية فقط. تختلف مُكونات الخليط الإنزيمي وطريقة المُعاملة للخلايا المعزولة من الجذر عن تلك المعزولة من أعضاء الخزن وعن تلك المعزولة من خلايا القمة النامية. كما ان الخليط الإنزيمي المُناسب لعزل البروتوبلاستات من حبوب اللقاح غالبا ما يحتوي على تركيز عالي من إنزيم (B-1,3-gluconase)

ذات الكفاءة العالية على هضم كلاً من السيليلز والكالوس (Callose)، علماً بأن الكالوس هو عبارة عن سكريات مُتُعددة تترسب في الصفيحة الوسطى بين الخلايا.

أصبح معلوماً بأن عزل البروتوبلاستات مُمكناً من أنسجة الكالس والمُعلقات الخلوية بالرغم من ان نجاح ذلك يعتمد على نوع الكالس المُستعمل وتوليفة الخليط الإنزيمي. غالباً ما تكون الخلايا ذات الجُدر الأولية أسهل عند الهضم الإنزيمي وإنتاج البروتوبلاستات. يُلاحظ مما سبق عدم وجود طريقة قياسية لعزل البروتوبلاستات إعتماداًعلى مصدر الجزء النباتي والنوع النباتي. يُراعى عند عزل البروتوبلاستات من المُعلقات الخلوية غربلتها أولاً ثم مُعاملتها بإنزيم السليليز تركيز 2.4% المُحضن في محلول المانيتول تركيز 0.6 M لمُدة 4-6 ساعة وعلى درجة حرارة 32°م داخل حمام مائي مع الرج البطيء ومما تجُدر الإشارة اليه بأن عزل البروتوبلاستات من أنسجة الكالس والمُعلقات الخلوية ذات فائدة كبيرة للأسباب التالية:

1- ان كليهما يُنميان تحت ظروف فسيولوجية وتغذوية معلومة وتحت ظروف معقمة ومن المُستبعد ان يحصل تلوث في مزارعهما مقارنة بما تتطلبه خلايا النسيج الوسطي للورقة من تعقيم سطحي لأنسجة الورقة.

2- من السهولة التعامل مع البروتوبلاستات الناتجة منها لأغراض الإنقسام وتوالد نباتات كاملة لكون ظروف النمو والتغذية والتمايز الى نباتات كاملة معلومة ومثبتة في المصادر العلمية. وفي الوقت ذاته هنالك بعض المعوقات عند عزل البروتوبلاستات من أنسجة الكالس منها :-

أ- تميل البروتوبلاستات المعزولة من أنسجة الكالس الى تَعدد المجموعة الكروموسومية (Polyploidy) خاصة عندما يخضع الكالس لإعادة زراعة ولعدة مرات فقد تتناسب طردياً مع عدد مرات إعادة الزراعة.

ب- قد تحصل لكننة (Lignification) أو ظهور تشققات في الجُدر الخلوية في هذا النوع من الخلايا مع تقدم عمرها مما يستوجب الامر التعامل الصحيح معها من حيث توفير ظروف بيئية وهرمونية مُناسبة تجعلها دائماً في مرحلة النمو النشطة والتي يُمكن عندئذً عزل البروتوبلاستات منها.

تنقية البروتوبلاستات المعزولة Purification of protoplasts

غالباً ما يُصاحب البروتوبلاستات المعزولة بقايا خلايا وعضيات تالفة مما يستوجب إتباع بعض الطرائق في تنقيتها من هذا الخليط أهمها :-

1- طريقة الترسيب والغسل Sedimentation and washing

يتم في هذه الطريقة نبذ المُعلق الحاوي على البروتوبلاستات والبقايا الأُخرى في سرعة واطئة (100-50 g) لمُدة خمس دقائق مما يُتيح للبروتوبلاستات السليمة بالتجمع في شكل كريات وتُسحب البقايا والوسط بماصة لِتُطرح خارجاً. يُعاد تعليق كتلة البروتوبلاستات بوسط جديد وتُضاف لها كمية من المانيتول ويُعاد غسلها وتكرر العملية مرتين الى ثلاث مرات لحين الحصول على محلول خزين حاوٍ بروتوبلاستات نقية نسبياً.

2- طريقة تطويف البروتوبلاستات Protoplast flotation

يُمكن ألإستفادة من تدرج كثافة مُكونات الخليط السابقة في المُعلق، إذ تطوف البروتوبلاستات كونها أخف من بقايا الخلايا المُهشمة حيث تترسب الأخيرة. يُحضر محلول مركز من المانيتول والسوربيتول والسكروز (0.3-0.6M) بشكل تدريجي ويُضاف مُعلق البروتوبلاستات الخام لهذا المحلول وتُنبذ المُكونات في سُرعة مُناسبة. تطوف عندئذ البروتوبلاستات في أعلى الوعاء في الوقت الذي تترسب بقايا جُدر الخلايا وغيرها من الشوائب في الأسفل. تسمح هذه الطريقة في الحصول على البروتوبلاستات بحالة جيدة مع الحد الادنى من الأضرار مقارنة بطريقة الترسيب والغسل.

تحديد كثافة النشر الطبقي للبروتوبلاستات Plating density of protoplasts

يُنصح بتحديد كثافة البروتوبلاستات وتحديد حيويتها (Viability) قبل الشروع بأي تجربة اوعمل. تُحدد كثافة النشر غالباً بإستعمال عداد الخلايا المُسمى (Fuchs-Rosenthel Haemocytometer) الذي يسمح بتقليل كثافة البروتوبلاستات لحد مُناسب لغرض حساب عددها . فعلى سبيل المثال تكون الكثافة المثالية لبروتوبلاستات نبات التبغ حوالي (5×10^5 – 5×10^3 سم^3). يُحسب العدد في حجم يساوي (1 مل = 1سم^3) بوساطة مقياس خلايا الدم. والمعلوم ان البروتوبلاستات لاتنقسم عند نشرها في أطباق (Plating)

والاوساط الغذائية مالم تتراوح كفاءة نشرها في الأطباق عشر مرات أكثر من القيمة المثالية للنشر، اي ان البروتوبلاستات لاتبدأ بالإنقسام الا بكثافة نشر طبقي مُناسبة، وكما سبق ذكره.

وتُحدد كفاءة نشر البروتوبلاستات طبقياً من حساب معدل عدد المُستعمرات المُتكونة في سنتمتر مربع واحد من طبق الزراعة وحسب المعادلة :

$$\text{كفاءة النشر} = \frac{م1 + م2 + م3 + م4 + م5}{\text{س} \times \text{مساحة طبق الزراعة الواحد}}$$

إذ تُمثل س: عدد الاطباق المزروعة

$م_1$ عدد المُستعمرات النامية في السنتمتر المُربع الأول من الطبق

$م_2$ عدد المُستعمرات النامية في السنتمتر المُربع الثاني من الطبق

$م_3$ عدد المُستعمرات النامية في السنتمتر المُربع الثالث من الطبق

$م_4$ عدد المُستعمرات النامية في السنتمتر المُربع الرابع من الطبق

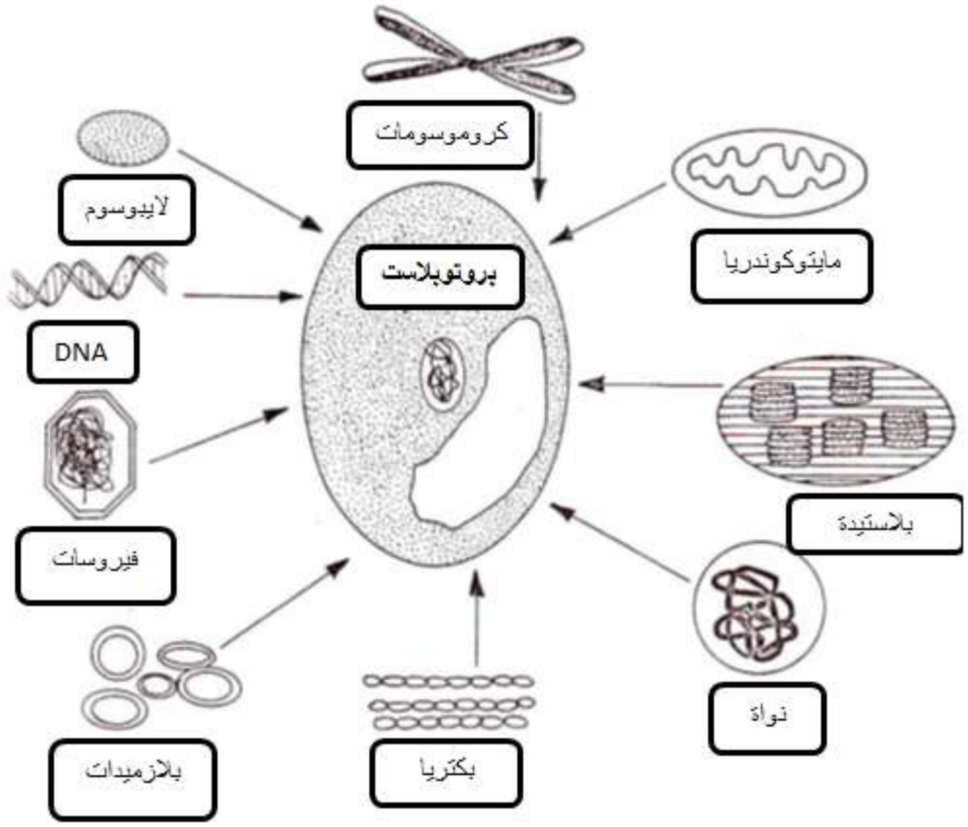
$م_5$ عدد المُستعمرات النامية في السنتمتر المُربع الخامس من الطبق

تحديد حيوية البروتوبلاستات Protoplast viability

تُستعمل العديد من الصبغات لتحديد حيوية (Viability) البروتوبلاستات في عينة من المُعلق الحاوي عليها. تشمل هذه الصبغات على صبغة الفلورسين (Fluorescein) وإختصاراً FDA، صبغة الفينوسفرانين (Phenosafranin)، صبغة الكالكوفلور البيضاء (Calcofluor) وتُختصر (CFW). ومن المعلوم ان هذه الصبغات تتراكم داخل أغشية بلازما البروتوبلاستات الحية والتي يتم الكشف عنها بِمجهر اللصنف (Florescence microscopy). كما يُمكن إستعمال صبغة إيفانس الزرقاء (Evans blue) لهذا الغرض أيضاً. ويُمكن في نطاق ضيق تحديد حيوية البروتوبلاستات من ملاحظة الانسياب البروتوبلازمي (Protoplasmic streaming) والذي هو خاصية الخلايا الحية.

خواص البروتوبلاستات المعزولة Characteristics of isolated protoplasts

ما يُميز البروتوبلاستات المعزولة داخل وسط حاوي مُركبات إزموزية بشكلها الكروي وهشاشتها وحملها شُحنة موجبة. وبعد غسلها وإزالة بقايا الإنزيمات تبدأ مباشرةً في تكوين جُدر لها وتتوالى عملية إنقسام الخلايا وتكوينها كالساً واخيراً تحولها الى نباتات كاملة بوجود الاوساط الغذائية المُناسبة لذلك. وبالنظر لميلان الخلايا الجديدة الى الإنقسام السريع لذلك يُستفاد من هذه الخاصية بإدخال الجزيئات الغريبة داخلها كالدنا، العضيات من بلاستيدات ومايتوكوندريا ونواة، جزيئات الفيروسات، البلازميدات عند التحوير الوراثي وغيرها (شكل6.3).



شكل 6.3. تطبيقات مُختلفة لتقانة دمج البروتوبلاستات.

العوامل المؤثرة في عزل البروتوبلاستات Factors affecting protoplast isolation

يتضمن عزل البروتوبلاستات هضم كلا من الجُدر الخلوية والصفيحة الوسطى. ومن المؤكد ان كافة العوامل البيئية والوراثية المؤثرة في صلادة الأنسجة وجُدر خلاياها تكون مُؤثرة في عزل

البروتوبلاستات. كما ان العاملين أعلاه يؤثران في مادة تكوين الجُدر الخلوية ومعدل إنقسام الخلايا في البروتوبلاستات المزروعة. ومن المعلوم ان نوع النسيج الواهب للبروتوبلاستات هو الآخر يؤثر في إعادة توالد البروتوبلاستات فعلى سبيل المثال فأن عزل الأخيرة من أنسجة الكالس يحتاج الى معاملات إنزيمية أقل مقارنة بتلك المعزولة من خلايا النسيج الوسطي للورقة ذات الجُدر المُثخنة.

زراعة البروتوبلاستات لأغراض الهندسة الوراثية Protoplast culture for genetic engineering

يُمكن زراعة بروتوبلاست مُفرد او مجموعة منها لغرض هندستها وراثياً ويتم ذلك من خلال الوسائل التالية :-

1- زراعة الحد الادنى من البروتوبلاستات إذ يؤخذ حجم صغيرمن المُعلق (أقل من 1 سم^3) والذي يتم بسحب قطرة معلقة واحدة من المُعلق وتتم المحافظة عليها لغرض هندستها وراثياً.

2- إستعمال ما يُسمى بالوسط المُكيف (Conditioned medium) وهي مُكونات الوسط ذاتها التي سبق وان كانت الخلايا النباتية قبل هضم جُدرها الخلوية نامية فيها. إذ يُرشح الوسط أعلاه وتُنمى فيه البروتوبلاستات المعزولة حيث تتمكن البروتوبلاستات من النمو بأقل كثافة في هذا الوسط.

3- إستعمال مايُسمى بالطبقات المُغذية (Feeder layers)، في هذه الطريقة تُنشر طبقات من البروتوبلاستات في وسط صلب ويتم تثبيط نموها بالتشعيع، بعدها تُنقل بروتوبلاستات بكثافة قليلة (50 – 5 بروتوبلاستات / سم^3) وتُنشر في السطح العلوي من البروتوبلاستات المُشععة. والجدير بالذكر ان البروتوبلاستات المعزولة، تنفصل عن بعضها كلياً بفعل الخليط الإنزيمي مما يوفر فُرص من التعامل مع خلايا مُفردة منزوعة الجدار. كما ان البروتوبلاستات المعزولة لاتميل تحت هذه الظروف الى الإتحاد أو الإندماج بل على العكس يبتُعد بعضها عن الآخر نتيجة حملها شُحنات سالبة مما يجعلها تتنافرعن بعضها، ولكن يجذب بعضها الآخر عند إضافة مُتعدد الأثيلين كلايكول PEG الى الوسط مما يُساعد في إندماجها وتكوين هُجن جسمية. ينتج اثناء عزل البروتوبلاستات ثلاثة أنواع (Sub-protoplasts) والتي تشتمل السايتوبلاست (Cytoplast) التي تكون فاقدة للنواة وحاوية على السايتوبلازم بالكامل او جزءاً منه ويُستفاد منها في إنتاج السايبرد (Cybrid) من خلال الهُجن الجسمية واحياناً في نقل جزء من جين البروتوبلاستات. يُسمى النوع الثاني البروتوبلاستات المُصغرة (Miniprotoplasts) ويُسمى أحياناً بالكاريوبلاست ويُطلق على النواة المُحاطة بقسم من السايتوبلازم وليس كله مع الإحتفاظ الكلي بالغشاء البلازمي. أما النوع الثالث

فيُسمى بالبروتوبلاستات الكبيرة (Macroplasts) والذي يُطلق على البروتوبلاستات الحاوية على جزء من السايتوبلازم فقط مع وجود الغشاء البلازمي.

يُمكن الحصول على السايتوبلاستات عند مُعاملة البروتوبلاستات بأشعة X أو بحُزمة من أشعة ليزر وهذا أشبه ما يكون بعملية جراحية صُغرى. تجري هذه العمليات على بروتوبلاستات معزولة حديثاً والتي تؤدي الى إيقاف نشاط النواة. ويُمكن الحصول على السايتوبلاستات تلقائيا دون المُعاملات أعلاه من خلايا أنسجة غلاف الثمرة (Pericarp) للثمار الناضجة كالطماطم مثلاً، إذ تُعزل بعد ان يُرشح عصير الثمار بغرابيل ذات فتحات صغيرة وتُرسب بالطرد المركزي. كما يُمكن الحصول على بروتوبلاستات عديمة النواة Cytoplasts (سايتوبلاستات) بعد رج تحت البروتوبلاستات إذ تنفصل الأنوية وتبقي السايتوبلاستات. واخيراً يُمكن إنتاج الأنواع الثلاثة بعد بلزمة الخلايا وفصل مُكونات الخليط.

زراعة البروتوبلاستات Protoplast culture

يُلاحظ وجود أشكال مُختلفة من البروتوبلاستات بعد عزلها والأنسب للزراعة يكون ذات الشكل الأقرب للكروي. وتتشابه طرائق زراعتها بتلك المُعتمدة عند زراعة الخلايا المُفردة. يُحدد الغرض من الزراعة طريقة زراعة البروتوبلاستات، فعلى سبيل المثال تُزرع حسب طريقة برجمان لنشر الخلايا طبقياً (Bergmann cell plating technique) والتي تُستعمل فيها طريقة النشر في وسط شبه صلب أو سائل مع أفضلية الأخير. تُعلق البروتوبلاستات بهذه الطريقة في وسط سائل داخل دوارق النماير دون تحريك وتؤخذ كمية قليلة منه بهيئة قطرات مُعلقة (Hanging drops) قد تكون مُفردة او مجموعة قطرات. يُمكن زراعة البروتوبلاستات بطمرها داخل وسط مُصلب بالإكار. وفيها يُخلط مُعلق البروتوبلاستات مع حجم مساوٍ له من الآكار نوع دفكو بتركيز 1.6% في درجة حرارة 37 °م ويُصب بعدها خليط البروتوبلاستات والاكار في أطباق بتري حاوية وسط غذائي مُصلب، وتُعرف هذه التقانة بنشر البروتوبلاستات. تمتاز التقانة بإمكانية التعامل مع الأخيرة بسهولة لتوفر إسناد عالي من قبل الوسط الصلب. غالباً ما يستعمل وسط MS المُجهز بالاوكسين والسايتوكاينين لزراعة البروتوبلاستات، إذ تُحضن في درجة حرارة 25°م في ضوء خافت.

يُمكن ملاحظة حيوية البروتوبلاستات من خلال تكوينها جُدر خلوية يُكشف عن حيوتها بعد تصبغيها بمحلول 0.1% من صبغة الكالكوفلور البيضاء والتي ترتبط بجزيئات الكلوكوسايدات في جُدر الخلايا المُتكونة حديثاً والتي تُظهر توهجاً عند تعرضها الى الضوء الازرق. كما يُمكن تصبيغها بصبغة فورسين داي

أسيتيت (Fouresceindiacetate) التي تُسبب في تلون جزيئات الكلوروفيل المُحطمة باللون الاحمر. يُمكن تسريع وتسهيل تكوين جُدر خلايا البروتوبلاستات بإضافة مُركبي كلوريد كالسيوم الفاصولياء الذي يُدعى (Phaseolus calcium chloride) ونترات الامونيوم الى الوسط الغذائي. تبدأ البروتوبلاستات بتكوين جُدرها الخلوية أثناء أربعة الى خمسة أيام. وبعد شروعها بالإنقسام تُنقل الى وسط جديد يحتوي على الاوكسين IAA بمقدار 5 ملغم/لتر وسايتوكاينين بمقدار 2 ملغم/لتر إذ تكوّن البروتوبلاستات مُستعمرات متُعددة الخلايا أثناء 2 الى 7 أسابيع وبعدها بمدة 2 ــ 3 أسابيع تكون أنسجة تُولد فروعاً ومن ثم نبيتات. تُنقل النُبيتات المتوالدة الى أُصص بعد مرورها بمرحلة الأقلمة. حققت تقانة زراعة البروتوبلاستات نجاحاً في العديد من الأنواع النباتية واقُترحت العديد من الطرائق لزراعتها.

مُعاملة وأقلمة النُبيتات المتوالدة Plantlet treatment and acclimation

تُعامل النُبيتات الناتجة من توالد البروتوبلاستات بعناية فائقة بعد نقلها من ظروف مُعقمة الى البيئة الخارجية غير المُعقمة كي تتكيف تدريجياً الى البيئة الجديدة. بينت الدراسات التشريحية بان النُبيتات تحت هذه الظروف تكون ذات طبقة كيوتكل رهيفة لا تُساعدها على تحمل ظروف البيئة الخارجية مالم يكون تعريضها بشكل غير مُفاجئ أو تدريجي. كما لوحظ بأن شُعيراتها الجذرية لا تزال غير ناشئة بالشكل الذي يجعلها تمتص الماء والعناصر المُذابة فيه بشكل سليم حيث انها كانت تعتمد على مصدر الكربون الموجود في الوسط الغذائي (Heterotrophic) وعند نقلها الى وسط النمو الجديد، عليها ان تقوم بعملية التركيب الضوئي اي تتحول الى ذاتية التغذية (Autotrophic). وهذه التغيرات تستدعي مرور النُبيتات وبشكل تدريجي من ظروف أقل قساوة الى أكثر قساوة من خلال أقلمتها بشكل تدريجي. والمُتعارف عليه في هذه العملية ان تُزرع النُبيتات في وسط جيد التهوية وتُغطى بأغطية بلاستيكية او تُرش النُبيتات بإستعمال أنظمة الري الرذإذي او غيرها والمُهم ان تكون في بداية الامر مُحاطة برطوبة نسبية عالية تُخفض بشكل تدريجي. تُفحص النباتات الناتجة بحثاً عن الصفة المطلوبة إما مظهرياً (Phenotypic) إذا كانت الصفة تظهر على أجزاء النبات أو بالطرائق الجزيئية المعروفة وقد تكون هناك حاجة لفحوصات بايوكيميائية خاصةً في الإختبارات النوعية.

التهجين الجسمي Somatic hybridization

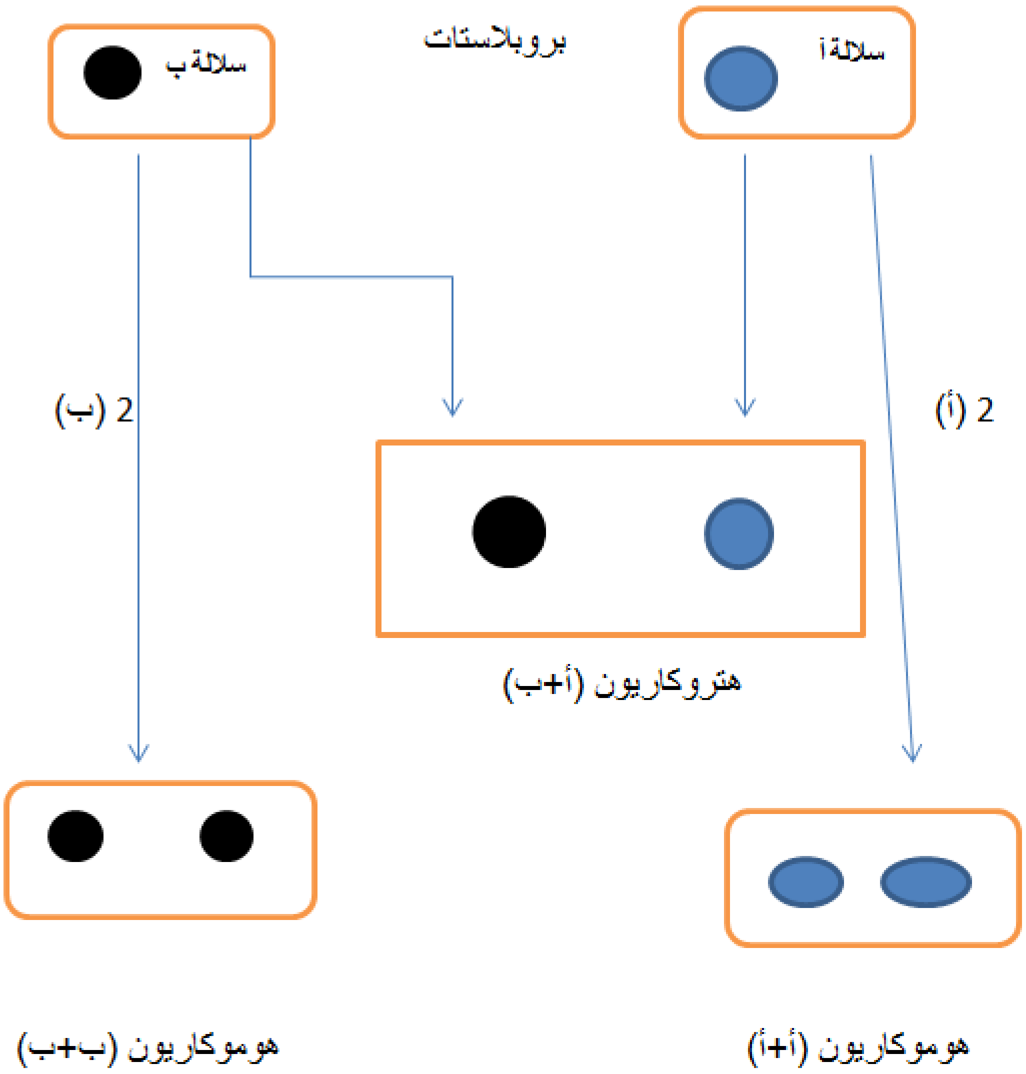
هو عبارة عن دمج بروتوبلاستات مفصولة من خلايا خُضرية لإنتاج هُجن تحمل صفات مرغوبة. توفر هذه التقانات بديلا واعداً في التخلص من الحواجز الطبيعية الموروثة لإجراء تهجينات جسمية بين أنواع

نباتية قريبة وكذلك بين الأنواع النباتية البعيدة وقد تكون من أجناس مُختلفة. تمتاز هذه العملية بكونها تحمل خواص مُهمة تشمل توريث كل من المادة الوراثية للنواة والسايتوبلازم وتمر تلك المعلومات الوراثية عبرألآباء عكس ما يحصل في الطرائق الكلاسيكية في التهجين التي يكون موقع الصفات السايتوبلازمية مورثاً من النبات الام. وحققت التهجينات الجسمية العديد من الاهداف في تحسين النبات وزيادة التغاير الوراثي وأصبحت لها تطبيقاتها المُختلفة. يُعد التهجين الجسمي أحد أهم إستخدامات عزل وزراعة البروتوبلاستات المعزولة من الخلايا الجسمية وتوظيفها في دمج البروتوبلاستات لإنتاج هُجن جسمية. تُفيد التقانة كثيراً مُربي النبات في عمل تهجينات بين الأنواع المُختلفة وقد تتعداه الى إجراء التهجينات بين الأجناس المُختلفة إذ يُمكن نقل كل من النواة والسايتوبلازم ومن كلا الابوين (شكل 6.4). أصبح بالإمكان نقل جينات المعلومات الوراثية للعُقم الذكري في خلال التهجين الجسمي. يُمكن كذلك توظيف التهجين الجسمي في زيادة التغايرات الوراثية لإنتاج نباتات مُقاومة للأمراض والحشرات او متحملة للإجهادات البيئية وكذلك تحسين خواص النمو الخضري والثمري كما ونوعاً، كما فتحت هذه التقانة آفاقاً للدراسات في حقول معرفية مُختلفة منها أساسية ومنها بحثية تطبيقية بهدف تحسين ألأصناف الزراعية وزيادة المردود الإقتصادي منها.

يوفر دمج البروتوبلاست فُرص كبيرة لمُربي النبات في تحسين المحاصيل الإقتصادية وكما مر سابقا. تُحاط البروتوبلاستات بغشاء بلازمي مرن ذو سطح خارجي مشحون بشحنة سالبة يسمح بعد التخلص من الجدار الخلوي للأغشية البلازمية إلتصاق إثنين او أكثر من البروتوبلاستات علماً بان لا وجود لعوائق عدم التوافق أثناء عملية دمج البروتوبلاستات. يحصل الدمج بين بروتوبلاستات النوع الواحد والأنواع المُختلفة وقد يحصل حتى ضمن الجنس الواحد وقد يتُعداه الى بروتوبلاستات معزولة ضمن نفس المملكة النباتية. تُعد تلك من المحاسن الرئيسة لهذه التقانة كونها تعدت الحواجز التصنيفية للتضريب بين الأنواع النباتية (Crossing barriers). تندمج البروتوبلاستات بعد أن تلتصق ببعضها بما يشبه فُقاعات مسحوق الغسيل بعد تعريضها الى حافز مُناسب.

يحصل أحياناً إندماج تلقائي نتيجة لهضم جُدر الخلايا إنزيمياً خاصة عند عزل أعداد كبيرة من البروتوبلاستات إذ ينتج عن ذلك هوموكاريونز (Homokaryons) او هوموكاريوسايتس (Homokaryocyts) يحوي كل منها 2-20 نواة. يحصل الدمج التلقائي في البروتوبلاستات المعزولة من خلايا سريعة الإنقسام نتيجة لتوسع الفتحات التي تربط بين الخلايا (Plasmodesmata) ويكون الدمج مُحدداً بين بروتوبلاستات معزولة من نفس النوع النباتي والتي غالباً لايستفاد منها كهُجن جسمية. وتحصل أيضاً إندماجات بين بروتوبلاستات غير متشابهة معزولة من أجزاء النبات المُختلفة. يُستفاد من هذه الظاهرة

في دراسة طبيعة ووظيفة فتحات البلازموديسماتا وفسلجة الإنقسام الخيطي والسيطرة عليه في الخلايا متُعددة الأنوية. كذلك يُستفاد منها عند دراسة دمج الأنوية ومُضاعفة أعداد الكروموسومات. يعتمد التهجين الجسمي في خلال دمج البروتوبلاستات في النباتات الى مجموعة عوامل أهمها :-



شكل 6.4. إنتاج الهُجن الجسمية من خلال دمج البروتوبلاستات.

1- العزل المُناسب وبطريقة مُناسبة للبروتوبلاستات.

2- الطريقة الصحيحة لدمج البروتوبلاستات لإنتاج هتروكاريونز (Heterokaryons) ذات حيوية جيدة.

3- تكوين الجُدر الخلوية في الهُجن الجسمية الناتجة من الدمج.

4- إنقسام خلايا الهُجن الجسمية وما يتبعه من عمليات النمو.

5- عزل وإنتخاب خلايا الهُجن الجسمية.

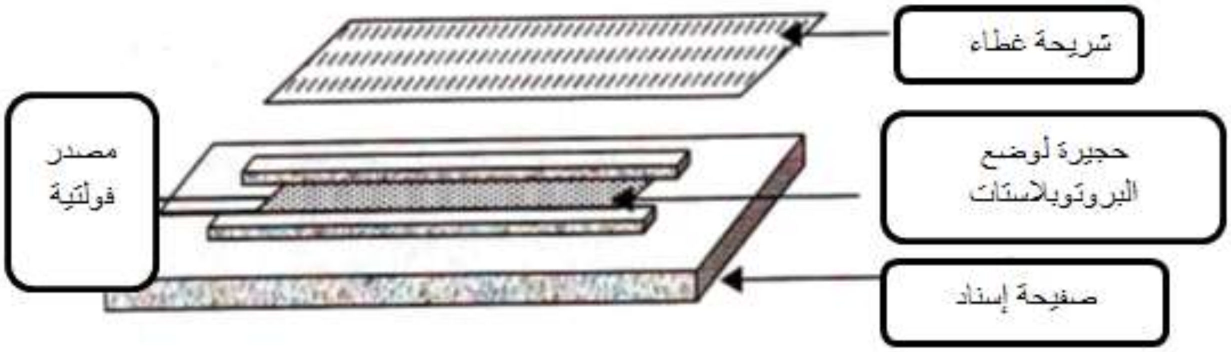
6- تحفيز تكوين الأعضاء (Organogenesis) من أنسجة الكالس الناشئ من خلايا الهُجن الجسمية.

7- توالد نباتات كاملة من النموات الخضرية المُتكونة بعد تجذيرها وأقلمتها.

تحفيز الإندماج كهربائياً Electrofusion

ساعد تحفيز الدمج بين البروتوبلاستات في عمل توليفات مُختلفة من الهيئات الوراثية (Genotypes) تتُعدى حدود الدمج بين الخلايا الجنسية. وبالرغم من ان تحفيز عملية الدمج قد تُجرى فيزيائياً عندما تتقارب البروتوبلاستات مع بعضها وتصبح في تماس بإستعمال جهاز الدمج الدقيق (Micromanipulator) أو بإستعمال ماصة دقيقة (Micropipette) أو بإستعمال الدمج الكهربائي (Electrofusion). تُنفذ الطريقة الأخيرة بعد إدخال البروتوبلاستات في كابينة زجاجية صغيرة تحتوي أقطاب متوازية في حقل كهربائي مربوط على التوالي وتمر موجات قصيرة من خلال صدمة كهربائية (شكل 6.5).

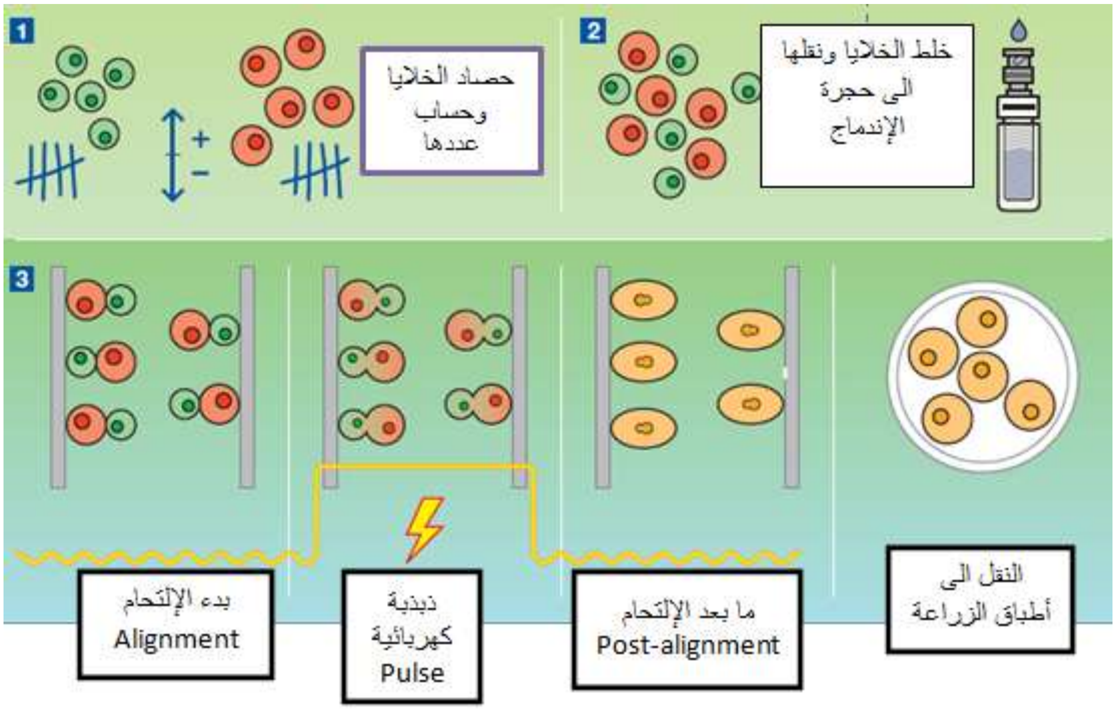
وتُعد طريقة الدمج الكهربائي تقانة بسيطة وسريعة وكفوءة ومُفضلة من قبل العديد من الباحثين. إضافةً الى ان الخلايا المُتكونة بعد الدمج الكهربائي، لاتُظهر اي إستجابة للتسمم كما هو الحال عند إستعمال الطريقة الكيميائية نتيجة إضافة عوامل الدمج (Fusogens) مثل أثليلين كلايكول المتعدد PEG. وتُستعمل حالياً أجهزة حديثة لإجراء الدمج تُنقل فيها عملية الدمج الى شاشة لِتُتيح رؤية ما يحصل بالكامل. أستعمل العديد من الباحثين جهاز المثقب الكهربائي ذي الموجات التربيعية (Square wave electroporator) وبالإسم التجاري Cell Manipulator, Model 200 والمُصنع من قبل شركة BTX الكندية. إذ يُنظم مقياس فولتية الالتحام (Alignment voltage) في قوة مجال كهربائي تتراوح 40-80 فولت/سم ولمُدة التحام مُقدارها 20 ثانية. يتم تعيير المجال الكهربائي للوخزة الكهربائية لدمج بروتوبلاستات معزولة من نباتات بطاطا على سبيل المثال في 1.250kV/cm ولمُدة وخز (Pulse duration) مقدارها 60 µs ولوخزة واحدة او وخزتين متتاليتين فقد تزيد الوخزة الثانية من عدد البروتوبلاستات المُدمجة مع إحتمالية تقليل حيوية نواتج الدمج. لذلك يُنصح بتجريب وخزة واحدة اولاً لإحتمالية عد متحمل نواتج الدمج لوخزة ثانية.



شكل 6.5. جهاز Zimmerman لدمج البروتوبلاستات بالتيار الكهربائي.

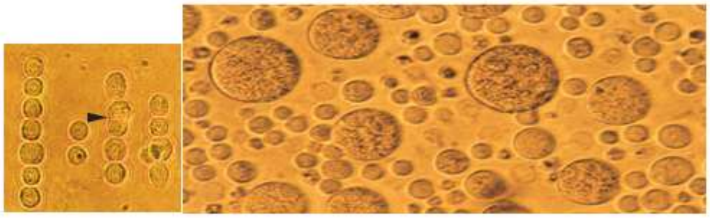
طور تشركة إبندورف جهاز دمج كهربائي ومُلحقاته ويمتاز بالمرونة العالية وسهولة العمل وإمكانية مُتابعة عملية الإندماج خطوة بخطوة (شكل 6.6) ونقل خطوات الإندماج الى كاميرا محمولة على المجهر وتصوير المراحل المُختلفة للإندماج (شكل 6.7).

شكل 6.6. جهاز دمج الخلايا حقيقية النواة والذي يصلح لدمج البروتوبلاستات (في اليسار) والجهاز مُرتبط بمجهر وكاميرا (في اليمين).



شكل 6.7. خطوات الإندماج بجهاز الدمج الكهربائي.

يعمل الجهاز بذبذبة (صعقة) فولتية (Pulse voltage) تتراوح من 5-300 فولت وعرض الذبذبة 0-300 ملي ثانية وبزيادات مُقدارها 5 ملي ثانية ذبذبة موجية مربعة. ويُمكن للجهاز ان يُوفر صعقات مُتعددة من 1-99 وبفترات زمنية مُقدارها ثانية واحدة وتردد الجهاز 2 ميكاهرتز (MHz Sinus). يُوفر جهاز الدمج (Multiporator) إختيار مُستلزمات الإلتحام قبل وبعد الصعقة الكهربائية. علماً بأن من مُستلزمات الإندماج الناجح هو الإلتصاق المباشر للخلايا مع بعضها (شكل 6.8 يمين)، ونتيجةً للصعقة بتردد عالي وبمجال تيار كهربائي مُتناوب، تتحرك الخلايا بإتجاه بعضها لتلتصق مع بعضها وتسبب ذبذبات الموجة المُربعة في حصول الإندماج (شكل 6.8 يسار).



شكل 6.8. بروتوبلاستات في أثناء الإندماج (يمين) ونواتج الإنجماد (يسار) كما تظهر تحت مجال المجهر الضوئي لجهاز الدمج الكهربائي.

ويُساهم مجال التيار الكهربائي المُتناوب من زيادة أعداد الخلايا المندمجة. كما تُوفر حجرة الإندماج الدقيق (Microfusion chamber) مُستوى عالي من المرونة بما يسمح بتوفير أمثل الظروف لعملية الدمج ولكل مرة.

الدمج بالوسائل الكيميائية Fusion by chemical means

تُدمج البروتوبلاست بمُساعدة مواد كيميائية مُختلفة وهي شائعة التطبيق. تحتاج عملية الدمج الى عامل دمج مُناسب (Fusogen) وكما مر سابقاً والذي غالباً ما يكون مركب الأثيلين كلايكول المتعدد (PEG) ذو التطبيقات الواسعة في تجارب الدمج. تؤدي المُعاملة الى الدمج إذا إنخفضت الشُحنة السالبة في سطح البروتوبلاستات مما يسمح لأغشيتها السايتوبلازمية ان تقترب مع بعض مما ينتج عن ذلك حصول عملية الدمج. تُستعمل أيضاً العديد من عوامل تحفيز الإندماج أمثلة نترات الصوديوم ذات الشحنات العالية وآيونات الكالسيوم بالترافق مع أُس هيدروجيني عالي ومادة الأثيلين كلايكول المُتعدد PEG وغيرها لغرض تحفيز الإندماج وفيما يلي شرحاً لمُحفزات الدمج الكيميائية الثلاث.

المُعاملة بنترات الصوديوم:- تمكن كيوستر (Kuster) عام 1959 من تحقيق أول عملية دمج بين تحت بروتوبلاستات بعد بلزمتها بمادة نترات الصوديوم، وفي عام 1970 سجل باور (Power) وزملاؤه عملية دمج بين بروتوبلاستات معزولة من جذور محاصيل حبوب عند إستعمالهم مادة نترات الصوديوم كمُحفز لعملية الدمج. شملت الطريقة تحضير معلقاً من بروتوبلاستات معزولة سابحة في خليط مُحفز للدمج (5.5 نترات مُذابة في 10%من محلول السكروز وحُضن الخليط في حمام مائي على درجة حرارة 35°م). يُستبدل الخليط بوسط سائل وتُحضن البروتوبلاستات مرة أُخرى. ولغرض الحصول لنسبة عالية من نواتج الدمج، تُعاد العملية مرة أُخرى او مرتين. يُمكن ملاحظة ومُتابعة مراحل عملية الدمج وكما موضح في شكل 9-6أثناء مراقبتها وتصويرها تحت عدسة المجهر المقلوب (Inverted microscope). تُنشر البروتوبلاستات المُدمجة بشكل صحيح في سطح وسط غذائي صلب. أُستخدمت هذه الطريقة وبنجاح عالي في دمج بروتوبلاستات معزولة من أطراف جذور الشوفان وأُخرى معزولة من بادرات الذرة الصفراء. وتُعد الطريقة هذه أقل تفضيلاً من الطرائق الأُخرى نتيجة لإنخفاض معدلات الدمج خاصة في بروتوبلاستات معزولة من خلايا النسيج الوسطي للورقة ذات الفجوات الكبيرة.

أ- المُعاملة بآيونات الكالسيوم Ca^{++} وبوجود أُس هيدروجيني عالي.

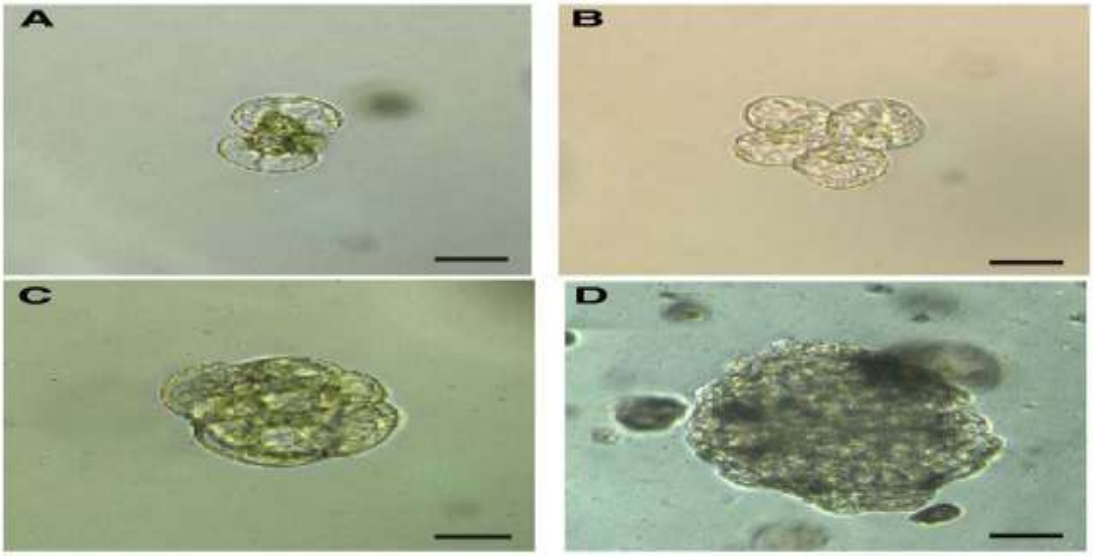
يسمح وجود آيونات الكالسيوم وتحت pH عالي بإتحاد أغشية البلازما. أُقترحت هذه الطريقة في عام 1973 من قبل كيلير وميلكر (Keller & Melcher) باعتبارها طريقة فعالة حصلا فيها نواتج دمج جيدة بين بروتوبلاستات في درجة حرارة 37°م وفي وسط حاوٍ تراكيز عالية منCa^{++} وفي أُس هيدروجيني مقداره 10.5.

ب- تتضمن هذه الطريقة نبذ البروتوبلاستات مركزياً بعد إضافة محلول إندماج مُركز مُكون من كلوريد الكالسيوم المائي تركيزM 0.05 + 0.4M مانيتول وفي أُس هيدروجيني 10.5 لمُدة ثلاثين دقيقة وبسرعة نبذ مركزي 50 g. تُستخرج أنابيب ألإختبار من جهاز الطرد المركزي وتوضع في حمام مائي على درجة حرارة 37° ولمُدة 50 ــ 40 دقيقة. تُحقق الطريقة هذه نسبة دمج تتراوح بين 20 الى 50% من العدد الكلي للبروتوبلاستات. لُوحظ في بعض الحالات ان هذه الطريقة مثالية لبروتوبلاستات معزولة من بعض النباتات وَوِجد أيضاً ان ألأس الهيدروجيني العالي (يزيد عن 8) سام لبعض بروتوبلاستات الأنواع النباتية.

جـ - المُعاملة بمادة كلايكول مُتعدد الأثيلين (PEG): يُعد مركب PEG أكثر عوامل الدمج تأثيرا، وللمركب أوزان جزيئية تتراوح بين 1800 الى 6000 جميعها تُحفز تكتل البروتوبلاستات مع بعضها وبالتالي تُحقق عملية الدمج. أُستعمل المركب لأول مرة عام 1974 من قبل كاو ومايكيلوك (Kaw & Michayluk) اللذان اكتشفا بأن PEG عامل دمج مهم للبروتوبلاستات، ومنذ ذلك الوقت وظِف لهذا الغرض وبنجاح في العديد من النباتات. علماً بأن المركب مُتوفر ورخيص الثمن وذو تأثير كبير في عملية الدمج. تبين بأن لهذا المركب القُدرة على دمج بروتوبلاستات بعيدة جداً من حيث القرابة النباتية كما هو الحال عند دمج بروتوبلاستات معزولة من نبات فول الصويا وتلك المعزولة من نبات التبغ وبين فول الصويا والذرة الصفراء وبين فول الصويا والشعير وغيرها. أثبت إستعمال PEG نسبة دمج عالية ونسبة سُمية مُنخفضة واثمرت عملية الدمج الى إنتاج خطوط خلوية من الهُجن الجسمية.

يُمكن زيادة فُرصة إلتصاق البروتوبلاستات وبالتالي زيادة فُرص حصول الدمج عند المُعاملة بمركب PEG بإضافة 1 سم^3 من الوسط الغذائي الحاوي على البروتوبلاستات المُعلقة الى نفس الحجم من PEGبنسبة 66%. تُرج إنبوبة ألإختبار 5 ثوان وتترك لمُدة 10 دقائق كي يُسمح للبروتوبلاستات بالترسيب، تُغسل بعدها بوسط النمو وأخيراً يتم فحص حيوتها يُخلط نوعي البروتوبلاستات المعزولة بكميات مُتساوية وبمعدل 6 ــ 4 قطرات صغيرة بما يقارب من 100 مايكروليتر من كل نوع وتُخلط مع محلول PEG الذي

يُسكب في الحافة الداخلية للأطباق الزرعية وتُحضن لمُدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة. يقترب زوج أو أكثر من البروتوبلاستات مع بعضها وتحصل عملية الدمج (شكل 6.9).



شكل 6.9. دمج البروتوبلاست كما تظهر تحت المجهر؛ (A) إقتراب زوج من البروتوبلاستات؛ (B) إقتراب زوجين من البروتوبلاستات مع بعضها؛ (C) إتمام عملية دمج زوج واحد من البروتوبلاستات؛ (D) إندماج زوجين منها.

يُساعد PEG في عملية تلاصق البروتوبلاستات، واحياناً وقبل سكب مُعلق البروتوبلاستات يوضع غطاء زجاجي في مركز الأطباق الزرعية لأجل تجنب إلتصاق البروتوبلاستات الى أرضية الطبق الزرعي إضافة الى انه يجعل التعامل معها أسهل فيما يخص تثبيتها وتصبغيها وإختبارها. تُغسل البروتوبلاستات برفق بعد المُعاملة بمركب PEG واخيراً تتم عملية الدمج عندئذ يتم إحلال الوسط الغذائي محل مركب PEG للسماح للبروتوبلاستات المُدمجة بالإنقسام والنمو. ولزيادة كفاءة دمج البروتوبلاستات في النباتات الراقية، أُقترحت بعض التحويرات كإضافة 10 ـ 15% من مادة الداي مثيل سلفا اوكسايد (DMSO) الى وسط الإندماج او إضافة مادة الكونكانفالين (Con A) أو إستعمال ماء البحر بعد خلطه بمادة PEG. كما يُمكن إضافة بعض المواد الكيميائية الأُخرى مثلبولي فينيل الكحول، اللكتينات، كبريتات الدكستران وبعض البروتينات. عموما فأن توليفة مركزة من PEG وآيونات الكالسيوم موجبة الشُحنة الثنائية (Ca^{++}) مع أُس هيدروجيني عالي نسبياً يؤدي الى نواتج دمج جيدة. تعمل مادة PEG ذات الوزن الجزيئي العالي (1000 ـ 6000) كجسور جزيئية تربط بين البروتوبلاستات وتساهم آيونات Ca^{++} في ربط جزيئات PEG سالبة الشُحنة مع أسطح أغشية البروتوبلاستات، وعند زيغان (Elution) جزيئات PEG، يختلف الشد السطحي

للبروتوبلاستات مما يؤدي الى التصاق وتداخل أغشيتها وأخيراً إندماجها. ولكن تبقى مُكونات (عضيات) السايتوبلازم الواهب كفؤة بعد دمجها مع بروتوبلاست المُستقبل.

يمكن دمج بروتوبلاستات حاوية على النواة مع آخرى فاقدة لها إذ يمكن الحصول على الأخيرة بعد عزلها بجهاز الطرد المركزي في سرع عالية حيث تكون أخف وزناً من البروتوبلاستات الحاوية نواة. وبالإمكان إيقاف فعالية اي بروتوبلاست عند المُعاملة بمثبطات ايضية (Metabolic inhibitors) مثل مركب آيودواسيتيت (Iodoacetate) ومن ثم تُدمج مع بروتوبلاست مُعامل بأشعة أكس لضمان تكوين هجين سايتوبلازمي. إضافةً الى إمكانية إيقاف الإنقسام النووي في بعض البروتوبلاستات ومن ثم دمجها مع أُخرى طبيعية.

ولعل من أهم التطبيقات والفوائد المتوخاة من إنتاج الهُجن السايتوبلازمية هي الإستفادة منها في حالة عدم التوافق الجنسي بين نباتين، فعندئذٍ يُمكن الجمع بين مشيجين من نباتين غير متوافقين سواء تابعين لنفس النوع أو لأنواع مختلفة بدمج بروتوبلاستات معزولة من الابوين مما ينتج عنه نباتات ثنائية المجموعة الكروموسومية خصبة (Fertile diploids).

وقد تنتج نباتات متعددة المجموعة الكروموسومية (Polyploids) والتي يُمكن مُعاملة البادرات الناتجة منها والحاوية على مجاميع كروموسومية مُفردة بمادة الكولشسين لمُضاعفة عددها وبالتالي تحويلها الى خصبة تنتج بذوراً ذات حيوية جيدة. وقد وردت في المصادر بعض الحالات التي نجحت التقانة في الحصول الى هُجن سايتوبلازمية لعل أهمها الهجين بين الطماطم والبطاطا وانتاج البوميتو (Pomato) تحت اسم جنس لم يكن معروفاً سابقاً (Solanopersicon). والمثال الآخر دمج بروتوبلاستات معزولة من أربعة أنواع من الرز لِتنتج جنساً جديداً ذو نوعية جيدة. وبهذا فقد وُظفت التقانة في نقل مجموعة من الجينات المرغوبة الى النباتات مما ساهم في تحسين صفاتها الوراثية. ومن التطبيقات الجوهرية لتقانة إنتاج الهُجن الجسمية (Cybridization) هو إمكانية نقل السايتوبلازم المرغوب الى بروتوبلاست النبات المُستقبل (الجدولين 6.1، 6.2) بخطوة واحدة وبذلك تُعد طريقة ناجحة في نقل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي ونقل صفتي المُقاومة لمُبيدات الأدغال والمُضادات الحيوية في المحاصيل المُهمة إقتصاديا. ومن المعلوم ان بعض الصفات الوراثية وفي نباتات مُحددة تكون تحت السيطرة السايتوبلازمية ومنها العُقم الذكري والمُقاومة لمُبيدات الأدغال والمُضادات الحيوية وتحمل الإجهادات.

جدول 6.1. صفات وراثية نُقلت الى محاصيل مهمة إقتصادياً بتقانة دمج البروتوبلاست وانتجت هُجناً بعد حصول دمج بين الأنوية

الصفة الوراثية (مُقاومة أو تحمُل)	الهجن الجسمية الواهبة
فيروس موزائيك التبغ	*Nicotiana tobaccum+ N.nesophils*
تحمُل الانجماد	*Solanum tuberosum+ S.commersounii*
فيروس التفاف البطاطا	*Solanum tuberosum+ S. brevidens*
تحمُل البرودة	*Solanum ochranthum+ L. esculentum*
التعفن الاسود	*Brassica oleracea+ B. napus*
التعفن الهراويClub rot	*Citrullus lanatus+ Cucumis melo*
النيماتود الكيسي Cyst	*Raphanus sativus+ Brassica napus*
تحمُل ملوحة، إنجماد	*Hordeum vulgare+ Daucus carota*
نيكوتين عالي	*Nicotiana tabacum+ N. rustica*
قلة حامض إريوسك	*Brassica napus+Eruca sativa*

جدول 6.2. صفات وراثية نُقلت الى محاصيل مُهمة إقتصادياً بتقانة دمج البروتوبلاست وأنتجت هُجناً سايتوبلازمية بعد حصول دمج بين سايتوبلازم الواهب والمُستقبل

الهُجن السايتوبلازمية	الصفة الحقلية
Nicotiana tabacum+ N. Sylvestris	المُقاومة للستروميسين
Nicotiana nigrum+ S. tuberosum	المُقاومة للاترازين
Brassica nigra+ B. napus	المُقاومة للهايكرومايسين
Solanum nigrum+ S. tuberosum	المُقاومة للاترازين
Nicotiana tabacum+ N. sylvestris	العقم الذكري السايتوبلازمي
Brassica napus+ B. tournefortii	العقم الذكري السايتوبلازمي
Brassica campestris+ B. napus	العقم الذكري السايتوبلازمي
Lycopersicon esculentu+ S.acaule	العقم الذكري السايتوبلازمي
Brassica napus+ B. campestris+ Raphanus sativa	العقم الذكري السايتوبلازمي والمُقاومة للأترازين

إنتخاب البروتوبلاستات المُدمجة Selection of fused protoplasts

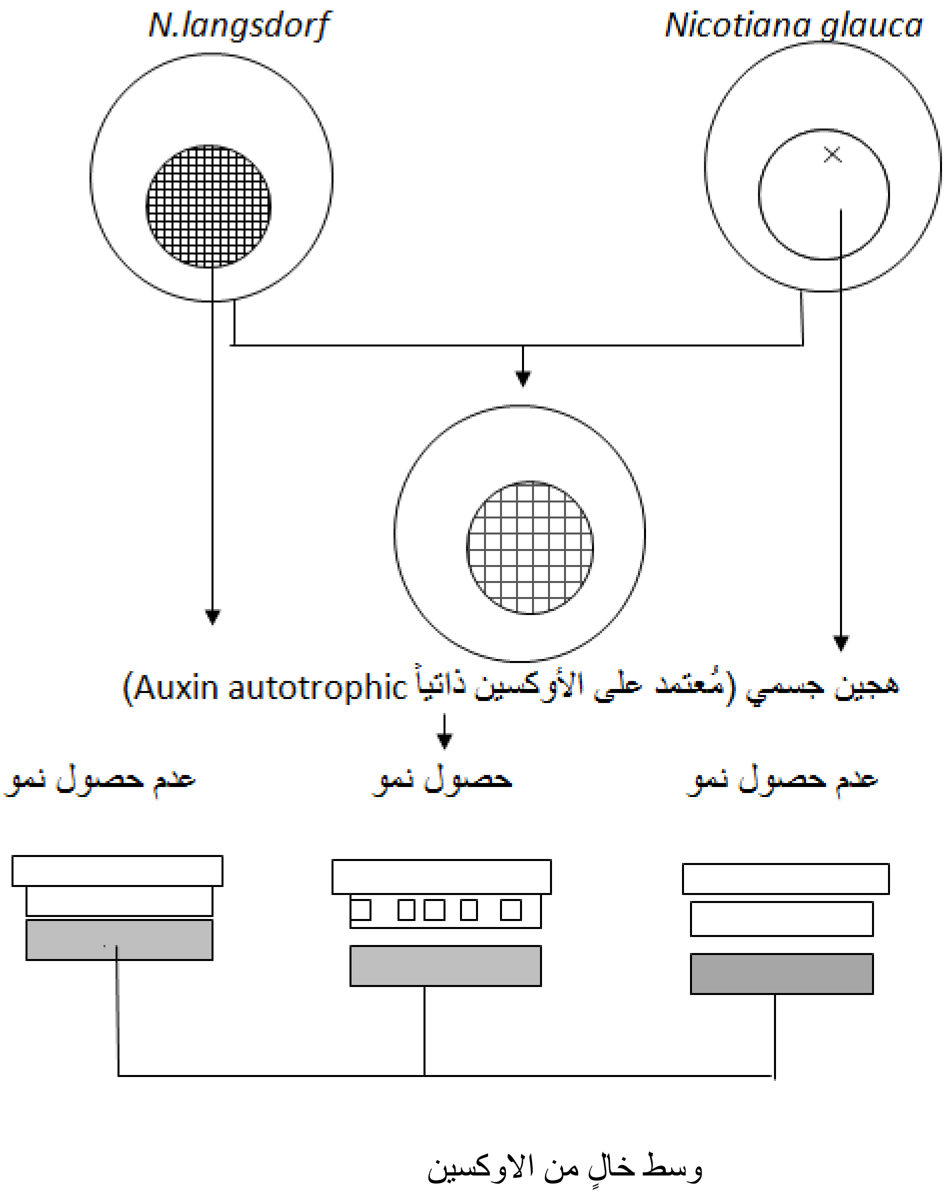
يُعد إنتخاب البروتوبلاستات المُدمجة مهمة صعبة بعد الإنتهاء من عملية الدمج بوجود خليط من الهُجن الجسمية المُختلفة وبروتوبلاستات غير مُندمجة من ألآباء. يوجد من بين نواتج الدمج نسبة تتراوح من 0.5-10% من الهتروكاريون والتي تُعد مصدرا مهما للهُجن الجسمية. تُنتخب الهتروكاريونات من بين الأنواع الأُخرى بإتباع أحد الطرائق التالية:

1- الإنتخاب المرئي Visual selection: يشتمل الإنتخاب المرئي للهتروكاريونات أو للكالس المُشتق منها بإستعمال وسائل بصرية مساعدة يتم من خلالها إنتخاب البروبلاستات الملونة إعتماداً الى توافر الصبغات في

الفجوات و حجم وعدد الكلوروبلاستات. تتحقق أعلى إستفادة من الهُجن الجسمية من البروتوبلاستات المُدمجة كليا بين الابوين بحيث تتوافر في الهجين مجموعة العضيات الموجودة في الابويين.

2- الإنتخاب الكيموحيوي وإستعمال المُضادات الحياتية Biochemical selection and use of antibiotics: يُمكن تبني طريقة بايوكيميائية للكشف عن الهُجن، إذ أُستعملت في الكشف عن هُجن التبغ بعد تعليم (Labelling) بروتوبلاستات الأبوين *Nicotiana glauca* و *N. Langsdorfii* بعامل مُشع (Flourescent agent). يتم إختيار الهُجن الناتجة من نوعي التبغ أعلاه على أساس تصنيعها للأوكسين ذاتياً (Auxin autotrophy) (لاحظ شكل 6.10).

تحتاج خلايا أو بروتوبلاستات الأبوين الى الأوكسين المُضاف الى الوسط الغذائي كي تنقسم في الوقت الذي لايحتاج الهجين الناتج من إندماج الأبوين الى الأوكسين المُضاف كي ينقسم كونه ينتج مُستويات كافية من الأوكسين اللازم للإنقسام داخليا أي انه Auxin autotrophic وبهذه الطريقة يُمكن عزل الهُجن بزراعتها في أوساط غذائية خالية من الأوكسين. تظهر حالة عدم الحاجة الى الأوكسين المُضاف نتيجة للتوليفة الوراثية الجديدة التي حصلت في الهجين بعد إندماج خلايا الأبوين. وكمثال في إنتخاب الطوافر الكيميوحيوية (Biochemical mutants)، لوحظ بأن البروتوبلاستات المعزولة من نبات ورد البوري الهجين (*Petunia hybrida*) غير قادرة على الإنقسام والنمو بوجود المُضاد الحيوي الأكتينومايسين D، بينما تلك المعزولة من ورد البوري نوع *P. parodii* أظهرت قابلية في الإنقسام وتكوين نباتات بعد نمو مزارعها النسيجية في وسط حاوٍ على الأكتينومايسين D. والمُلاحظ بأن الهجين الناتج من دمج بروتوبلاستات النوعين أعلاه من ورد البوري له القُدرة في النمو بوجود المُضاد الحيوي وله القُدرة الى إنتاج نباتات كاملة.
- الهتروكاريون أو يُسمى هتروكاريوسايت Hetrokaryon or Heterokaryocyte: إذ تظهر الحالة عندما تبقى نواتي الخليتين مُنفصلتين عن بعضهما دون إندماج يسبحان في السايتوبلازم المُدمج. وبالمثل فان خطوط خلايا التبغ نوع *N. sylvestris* المُقاومة للمُضاد الحيوي كانامايسين، تُستعمل كمُعلمات (Markers) وراثية لتمييز نواتج الدمج عند تهجين *N. sylvestris* مع *N. knightiana*. كما أُستعمل الطافر *N.tabacum* المُقاوم للستربتومايسين لإنتاج هُجن جسمية بين أنواع *N.sylvestris*. وتوجد معايير أُخرى للإنتخاب البايوكيميائي كتحليل الإنزيمات المُتناظرة (Isoenzymes) وإستعمال التكامل الوراثي (Genetic complementation) وطريقة التحري عن الحوامض الأمينية غير الشائعة وكذلك إستعمال الفايتوتوكسينات، إضافة الى الطوافر الايضية وطوافر مُبيدات الأدغال وغيرها والتي تُساعد في إنتخاب الهُجن الجسمية.



شكل 6.10. هجين جسمي من التبغ غير مُعتمد إضافة الأوكسين الى الوسط الغذائي نتج من دمج نوعي التبغ *N. langsdorfii* و *N. Glauca* .

الهُجن الجسمية المبنية على سلوك النواة Somatic hybrids based on nucleus

تنقسم أنواع الأجنة الجسمية إعتماداً على سلوك نواة الخلية الى:

1. السنكاريون Synkaryon: ينتج عند إندماج نواتي ألآباء مع بعضها مما ينتج نواة واحدة داخل السايتوبلازم المدمج من الخليتين.

2. السايبرد Cybrid أو مايسمى بالهجين السايتوبلازمي أو الهتروبلاست (Heteroplast): وينتج ذلك عند وجود نواة واحدة من أحد الأبوين في السايتوبلازم وتختفي الثانية تماما نتيجة فقدان المعلومات الوراثية من أحد الأنوية لذا تسمى العملية بالتهجين السايتوبلازمي (Cybridization).

الحالة الكروموسومية للهُجن الجسمية Karyotyping of somatic hybrids

عند حصول التهجينات الجسمية الناتجة بعد إندماج البروتوبلاستات، تُشير الأعداد الكروموسومية الى حالات قليلة يُحافظ فيها العدد الكروموسومي على حاله أي 2n=2x. ولغرض الحصول على هُجن تحتوي العدد الاصلي من الكروموسومات، يجب إنتخاب تلك الهُجن الحاوية على 2n=2x فقط. قد يعود سبب الإختلافات في أعداد الكروموسومات في الهُجن الجسمية الى:

1- تعدد الإندماجات مما يُعطي أعداداً كروموسومية عالية (لاحظ جدول 6.3). وغالباً ما تكون أعداد الكروموسومات في الهُجن الجسمية أعلى من مجموع كروموسومات الابوين بالرغم من إكتشاف تغايرات واسعة قد يكون سببها لواحد أو أكثر من الأسباب التالية:

أ- إندماج أكثر من زوج من الكلوروبلاست.

ب- حصول إنقسامات خيطية غير منتظمة.

ت- غالباً ما يكون ثلث الإندماجات بين أكثر من زوج من البروتوبلاست سواء أُستعملت طريقة الدمج الكهربائي أو الكيميائي.

2- إنتاج هُجن غير متشابهة ناتجة من إندماج البروتوبلاستات المعزولة من أنسجة سريعة الإنقسام من أحد الأبوين. قد يكون هنا كتغاير جسمي موجود أصلاً في خلايا أنسجة خاملة (Quiescent) لنبات آخر.

3- وجود كميات غير متساوية من الدنا في بروتوبلاستات ألآباء ينتج عن ههُجن غير مُتجانسة بعد الإندماج بين ألآباء المعزولة منها البروتوبلاستات مما ينتج عنه إختلافات مظهرية وربما وراثية.

جدول 6.3. الأعداد الكروموسومية في هُجن جسمية لأنواع نباتية مختارة

النوع النباتي وعدده الكروموسومي	أعداد الكروموسومات في الهجن
Petunia parodii (2n=48)+*P. hybrida* (2n=14)	48-44
Datura innoxia (2n=24)+ *D. stramonium* (2n=24)	46، 48، 72
Nicotiana tabacum (2n=48) + *N. nesophila* (2n=48)	96
Nicotiana tabacum (2n=48) + *N. glutinosa* (2n=24)	58-50
Lycopersiconesculentum (2n=24)+ *L. peruvianum* (2n=24)	72
Solanum tuberosum (2n=24, 48)+ *S. chacoense* (2n=14)	60
Brassica oleracea (2n=18)+ *B. campestris* (2n=18)	تغاير كبير في أعداد الكروموسومات
Brassica napus (2n=38)+ *B. juncea* (2n=36)	تغاير كبير في أعداد الكروموسومات

الهُجن السايتوبلازمية Cybrids or Cytoplasmic hybrids

وتشمل الهُجن التي يندمج فيها سايتوبلازمي الأبوين وبهذا يكون الهجين الناتج حاوٍ على خليط من كليهما عكس الهجين الجنسي والذي يكون فيه السايتوبلازم مُشتق من النبات الأم فقط وليس كلا الأبوين. توظف تقانة إنتاج الهُجن الجسمية السايتوبلازمية في الحصول على التوليفات من الهُجن الحاوية جينات مصدرها سايتوبلازمي (المايتوكوندريا والبلاستيدات) في خطوة واحدة وهي الدمج. ونتيجة لذلك، توفر الهُجن السايتوبلازمية الوقت والجهد اللازم عند إتباع برامج التربية والتحسين التقليدية مما تحتاجه الأخيرة من تضريبات رجعية تستغرق عدة سنوات وبالطبع يكون هذا مُمكناً بين ألأصناف والأنواع التي تتوافق جنسياً.

أما تلك غير المتوافقة جنسياً، فتوفر هذه التقانة فرصة فريدة لمُربي النبات. فمن المعلوم ان صفة العُقم السايتوبلازمي الذكري محمولة في جينات موقعها في السايتوبلازم وليس النواة. إستفاد الباحثون من الوراثة السايتوبلازمية في عدة مجالات منها إستنباط هُجن سايتوبلازمية تحمل صفة مُقاومة الأدغال والتي تكون محمولة في مجين الكلوروبلاست ومن المعلوم انه يُمكن السيطرة على العُقم الذكري السايتوبلازمي بنقل مجين المايتوكوندريا. ومن جانب آخر فان دراسة الهُجن السايتوبلازمية مفيدة في التحري عن التوليفات المُمكنة عند زيادة أعداد الكروموسومات وفي دراسة المجينات (الكلوروبلاست والمايتوكوندريا) بعد حصول الدمج.

تُنتج الهُجن السايتوبلازمية عندما تكون النواة قد أُشتقت من أحد الابوين فقط بينما أُشتق السايتوبلازم من كلا الابوين. تتكون تلك الهُجن عادةً بعد دمج بروتوبلاستات معزولة من نباتات مُتباعدة وراثياً وتكون العملية صعبة للغاية نتيجة لإختلاف المجينات ضمن السايتوبلازم ينتج عنها ما يُعرف بظاهرة عدم التوافق الجسمي (Somatic incompatibility). وبالرغم من حالة عدم التوافق لكن قد يُظهر الهجين تشوهات تركيبية وتطورية وقد يحتاج الى أجيال عديدة لكي يتم التخلص من الجينات غير المرغوبة.

بعد تكوين الهتروكاريون عند الدمج، بالامكان تحفيز النواتين للإنفصال عن بعضهما بحيث يُساهم أحد البروتوبلاستين بالسايتوبلازم فقط بينما يكون دور النواة الثانية محدوداً لنفسها اي لا تساهم بوظيفة السايتوبلازم وقد تُساهم كلاهما بالتضامن مع السايتوبلازم. ولابُد من التطرق الى الإجراءات التي يُمكن تطبيقها عملياً في الحصول على هُجن سايتوبلازمية ذات فائدة لمُربي النبات يمكن تشعيع بروتوبلاست النوع النباتي الواهب للسايتوبلازم بأشعة أكس أو كاما مما يُسبب في إيقاف فعالية البروتوبلاست ويُحد من إنقسامه.

إنتاج الهُجن السايتوبلازمية Production of cybrids

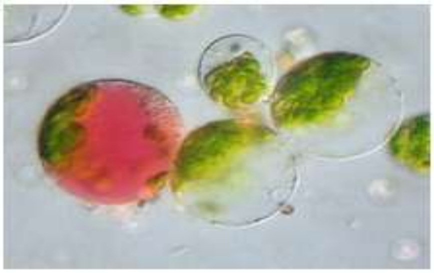
تُنتج الُهُجن الجسمية بواحدة او أكثر من الطرائق التالية:

1- دمج بروتوبلاست منزوع النواة (Protoplast Enucleated) ومن أحد الأبوين مع بروتوبلاست آخر حاوي على نواة من أب ثاني وبهذا يكون الهجين الناتج حاوٍ خليط من السايتوبلازم ونواة واحدة. ومن المعلوم ان نزع النواة من البروتوبلاست يتم بالطرد المركزي في سرع عالية تتراوح من 20000-40000g لفترة تتراوح 40-90 دقيقة أو يُمكن تشعيعها بروتوبلاستاتين أحدهما ذات نواة فاقدة لحيويتها بينما تكون نواة البروتوبلاست الآخر ذات حيوية جيدة.

3- التخلص من كروموسومات أحد البروتوبلاستات بعد فترة قصيرة من دمج النواتين.

4- التخلص من إحدى النواتين مباشرةً بعد حصول الإندماج وتكوين الهتروكاريون.

أصبحت لتقانة إنتاج الهُجن السايتوبلازمية فوائد عديدة في المجال الزراعي، إذ وُظف وبنجاح في إنتاج العديد من الصفات السايتوبلازمية بعد التهجين الجسمي لنوعين مختلفين من النباتات. كما ان التهجين الجسمي بين نباتات التبغ *Nicotiana* و القثاء *Brassica* و ورد البوري *Petunia* أنتجت هُجن تحمل صفة العُقم الذكري. إضافة الى ان التقانة قد عوضت عن التضريبات الرجعية التي تستغرق سنوات وتُعدى الأمر الى نقل صفة المُقاومة للمضاد الحيوي الستربتومايسين من نوع التبغ *N. tabacum* الى النوع *N. sylvestris*. إضافة الى مُقاومة مُبيد الأدغال الاترازين. ويُستفاد من التهجين الجسمي في إنتاج نباتات مُتعددة الألوان (شكل 6.11) بعد عزل وتنقية ودمج بروتوبلاستات بألوان مُختلفة وفي الغالب ينعكس ذلك في النبات الكامل. ومن المؤكد أهمية إستنباط نباتات ملونة وخاصة نباتات الزينة سواء كانت خارجية ام للتنسيق الداخلي.



شكل 6.11. بروتوبلاستاتات مهيئات للدمج أحدهما معزول من خلية ورقة خضراء والاخرى من ورقة تويج حمراء.

تطبيقات عزل وزراعة البروتوبلاستات Applications of protoplast isolation and culture

فتحت تقانة عزل البروتوبلاستات آفاقاً جديدة في التقانات الحيوية وبالإعتماد على القُدرة الكامنة للخلايا لِتكون نبات كامل (Totipotent) مما جعل من البروتوبلاستات مادة مثالية في الدراسات ألاساسية وفي تجارب علم الأحياء كذلك في مجال البحوث التطبيقية لصالح الجنس البشري. تُعد هذه التقانة ذات أهمية كبيرة في مجال وراثة الخلايا الجسمية فيما يخص فسلجتها وكيميائها الحياتية إضافة الى دراسة الهندسة الوراثية ومُنظمات النمو النباتية والتشكُل الظاهري والعلاقة بين الفايروس والنبات وعزل البكتيريا من عقد الجذور. تُعد الدراسات الجنينية أحد اهم ألإستعمالات المُهمة للبروتوبلاستات في مجال التهجين الجسمي وتوالد هُجن جسمية ذات الأهمية الكبيرة في علم أجنة وتوالد النبات. وفيما يلي أهم هذه التطبيقات:

1- توالد النباتات

منذ ان أعلن تاكيبي وزملاؤه عام 1971 عن توالد أول نبات من البروتوبلاستات المعزولة من نبات التبغ، تحفز العديد من العاملين في مجال التقانات ألأحيائية في العالم في إعادة توالد نباتات من البروتوبلاستات المعزولة. وتكللت العديد من النجاحات في توالد مدى واسع من ألأصناف وخطوط التربية من البطاطا (*Solanum tuberosum*) وأنواع أُخرى من ذات الجنس وتحقق إضافة الى ذلك نجاح كبير في توالد نباتات الاوركيد من البروتوبلاستات المعزولة وكذلك من نبات الكمثرى البرية (*Pyrus communis*) وبعض أنواع اللوزيات (*Prunus spp.*).

2- دراسة تكوين الجُدر الخلوية

تفرز البروتوبلاستات المزروعة وبسرعة دقائق ألياف سليلوزية على سطحها إذ يوفر إتجاه فرز هذه المواد نظاماً فريداً في دراسة تصنيع الجدار الخلوي.

3-دراسة الفعالية الفسيولوجية

يُلاحظ بأن البروتوبلاستات الموضوعة في محلول تحتي التركيز او في الماء ويتم إسقاطها من إرتفاع مُعين على شرائح زجاجية تنفجر بوقت قصير. يُستفاد من هذه الظاهرة في عزل الغشاء البلازمي من البروتوبلاستات وإجراء دراسات فسلجية مُختلفة عليه من ضمنها تأثير العوامل البيئية المُختلفة في التحكم بالسلوك الازموزي لهذا الغشاء. وبسبب عدم وجود الجدار الخلوي، يُمكن دراسة التركيب الكيميائي للغشاء البلازمي من حيث محتواه من الدهنيات والبروتينات وغيرها وكذلك دراسة الخواص الفيزيائية مثل إنتقال

المحاليل إضافة الى ذلك فأن البروتوبلاستات توفر أداة مثالية لدراسة العوامل الفيزياحيوية–الكيموحيوية لعملية التركيب الضوئي في نباتات C_3 و C_4. كذلك في التحري عن تأثير المواد المُضافة خارجياً في فعالية جدار الخلية والتي يُمكن تبسيطها بإستعمال البروتوبلاستات المعزولة. وعند إضافة مُنظمات النمو النباتية (مثل الاوكسين IAA) فأنها تؤثر مُباشرةً في الغشاء البلازمي وتزيد من نفاذيته من الماء مما يُسبب في إستطالة الخلايا. أصبحت هذه حقيقة بعد ان دُرست بشكل وافي في البروتوبلاستات المعزولة والمُنماة داخل أنابيب ألإختبار. فعند إضافة IAA الى محلول البلزمة الحاوي بروتوبلاستات معزولة، تتوسع الأخيرة بسرعة وتنفجر نتيجة التوسع الذي يحصل في فجوتها. والمُلاحظ ان المُعاملة بمُضادات الاوكسينات تؤدي الى توقف إنفجارها مما يؤكد بان موقع عمل وفعالية IAA هو الغشاء البلازمي.

4- دراسة التشكُل الخارجي

تُمثل البروتوبلاستات المعزولة نظام خلوي مُفرد نموذجي، فتحت الظروف المُثلى، تستطيع ان تُعيد تكوين جُدرها الخلوية بنفسها. تستمر خلاياها بالإنقسام والتمايز وتوليد نباتات كاملة. وبهذا توفر مجالات مُختلفة لدراسة التشكل وتوالد النباتات الكاملة من هذه الإنظمة الخلوية المُفردة. والمعلوم ان إعادة توالد النباتات ذات أهمية كبيرة في تجارب دمج البروتوبلاستات وعند التحوير الوراثي لها إذ تكون النباتات المُتوالدة ذات أهمية كبيرة والتي من المُمكن ان تحتوي صفات جديدة ذات قيمة إقتصادية كبيرة.

5- دراسة العلاقة بين النبات والفيروس

إستمر الغموض يدور حول علاقة الفايروس بالنبات وبالعكس لفترة طويلة نتيجة عدم توفر نظام يدرس العلاقة بين الأثنين. بعد التطور السريع في العلوم البايولوجية والزراعية، أصبح الآن وبسهولة تلقيح (نقل) الفايروس المُمرض الى داخل البروتوبلاستات النامية في وسط غذائي معلوم المُكونات ودراسة (إصابة) دخول الفايروس وطريقة تأثيره في المستويين الخلوي والجزيئي. إضافةً الى إستعمال العديد من الفايروسات كنواقل (Vectors) بعد تحميلها للمادة الوراثية المرغوبة.

6- عزل العضيات ونقلها

أصبح من المُمكن عزل العضيات من البروتوبلاستات لأجل التقصي عن تصنيع ونقل مواد الايض الثانوي والأولي بين مُختلف أجزاء الخلية. وبهذا وفرت البروتوبلاستات مادة مُناسبة لزراعة العضيات وآلية النقل منها واليها ولعضيات الخلية المُختلفة مثل البلاستيدة الخضراء والمايتوكوندريا والدنا (DNA)

واللايبوسومات الى آخره. حققت هذه التقانة نجاحات عديدة فقد عُزلت البلاستيدات الخضراء من الطحلب *Vaucheria dichotoma* ونُقل الى بروتوبلاستات نبات الجزر. كذلك أصبح بالإمكان نقل النويات والكروموسومات في مرحلة الطور ألإستوائي (metaphase) من البروتوبلاستات الى أنواع أُخرى من البروتوبلاستات مما وفر فُرصة كبيرة لِفهم العلاقة بين عضيات الخلية والسايتوبلازم فتبين على سبيل المثال لا الحصر بأن البلاستيدات الخضراء المعزولة من بروتوبلاستات محاصيل الحبوب لها مقدرة وكفاءة أكبر في تثبيت ثنائي اوكسيد الكربون من الجو.

7- عزل باكتريود من بروتوبلاستات عقد الجذور

يُمكن الحصول على أشباه باكتريا (Bacteriods) ذات حيوية عالية بعد عزلها من عُقد جذور نباتات العائلة البقولية. إذ تُعزل بروتوبلاستات العُقد أولاً ومن ثم تُشق ميكانيكياً او بطريقة التخفيض المُفاجئ لتركيز عامل البلزمة وهذا يُساعد كثيراً في تجارب زراعة العضيات.

8- إستحثاث الطفرات وتشجيع التغاير الوراثي

يُمكن إعتبار كل بروتوبلاست معزول، نظرياً ككائن دقيق اي نظام خلوي مُفرد وعليه يُمكن إستعمال البروتوبلاستات في إستحثاث طفرات وراثية ومن ثم إنتخاب خطوط خلوية طافرة (Mutant cell lines). تُشكل البروتوبلاستات أُحادية المجموعة الكروموسومية مادة مثالية لإستحثاث الطفرة إذ تُظهر الخلايا النباتية المزروعة مدى واسع من التغاير الوراثي والتي يُمكن إستثمارها بزراعة أعداد من البروتوبلاستات من قبل العاملين في حقل الوراثة او مُربي النبات وإستثمارها في برامج تحسين النبات.

9- نقل الكائنات الدقيقة

أُجريت العديد من المُحاولات للإستفادة من البروتوبلاستات المزروعة بهدف نشوء علاقة تعايشية داخلية بين الكائنات الدقيقة في بعض أنواع البكتريا المُفيدة مثل باكتريا العقد الجذرية والطحالب الخضراء (أنابينا) والخميرة وغيرها من جانب وخلايا النباتات من جانب آخر. أُدخلت خلايا البكتريا داخل البروتوبلاستات مثل باكتريا العقد الجذرية ووِجد بان آلية دخولها الى البروتوبلاستات يكون بعملية تشبه الإلتهام (Endocytosis) وتتعايش بشكل دائمي في الخلايا الناقلة في سايتوبلازم النبات. أُجريت دراسات مُشابهة مع الطحالب الزرقاء المُخضرة وخلايا الخميرة ووِجد ان إدخال الطحالب الزرقاء المُخضرة المُثبتة

للنتروجين مثل نوعي الأنابينا (*Anabaena*) وكليوكابسا (*Cleocapsa*) الى داخل البروتوبلاستات قد حقق نجاحاً بالرغم من عدم بقاء هذه الكائنات الدقيقة حية داخل البروتوبلاستات المزروعة.

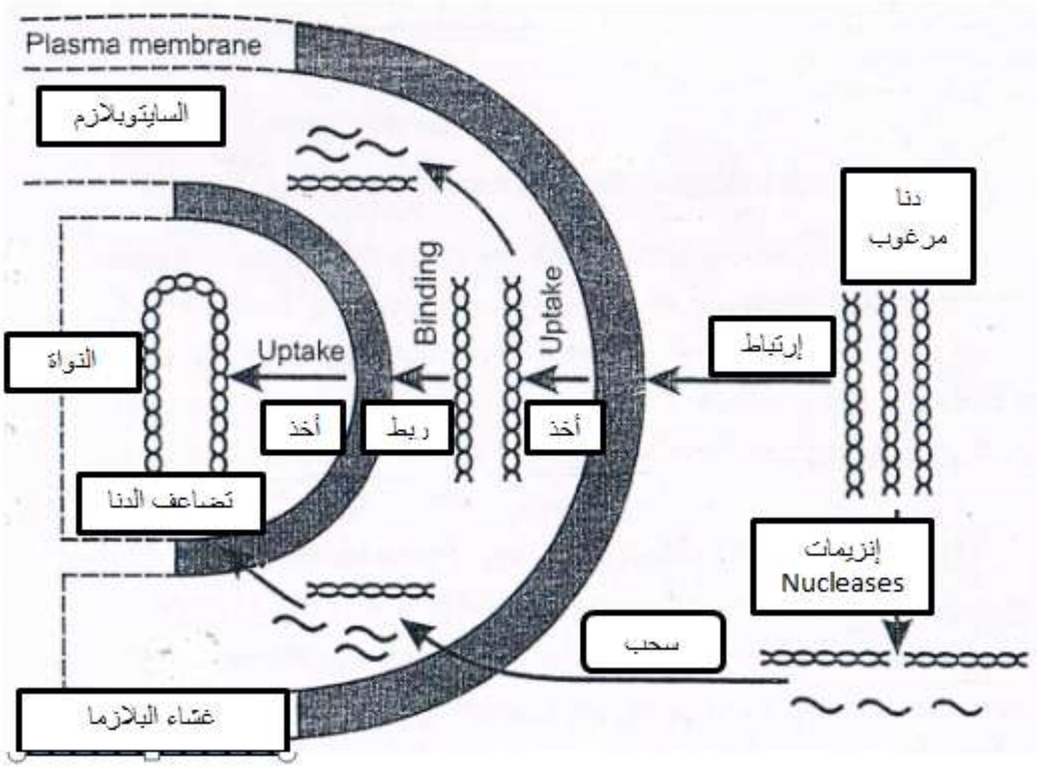
10- نقل الجينات الى البروتوبلاستات

بالنظر للفعالية العالية للبروتوبلاستات فبإمكانها إستقبال المواد الغريبة الفعالة بايولوجيا مثل البلاستيدات الخضراء والمايتوكوندريا والدنا والبلازميدات والبكتريا والفيروسات وغيرها الى داخل سايتوبلازمها بعملية تشبه الالتهام الداخلي. مما ينتج عنه حصول تغيرات داخل الخلية. ومن التطبيقات المُهمة في هذا الصدد هو حصول التحول الوراثي في البروتوبلاستات بعد إدخال جينات غريبة داخلها مما يُساهم وبشكل كبير في تحسين النبات (شكل 6.12). أُستعملت تقانات الإدخال المُباشر للـدنا بإستعمال التثقيب الكهربائي (Electroporation) او من إستعمال محلول من البولي أثيلين كلايكول (PEG) او مُعدات أُخرى لحصول على نباتات مُحورة او مُهندسة وراثياً. يُمكن إستعمال البروتوبلاستات في إختبارات التعبير الجيني إذ تُختبر التوليفات الجينية داخل النظام النباتي. كلما سبق من طرائق لها أهمية عظيمة لمُربي النبات ولها مُستقبل واعد في إنتاج أنواع نباتية ذات كفاءة عالية في المُستقبل القريب. ونجح بعض الباحثين من دمج بروتوبلاستات معزولة من أوراق البرتقال مع أُخرى معزولة من أوراق اللالنكي (اليوسفي) كهربائياً وأنتجت هُجن سايتوبلازمية لها نفس أعداد كروموسومات الابوين وظهر نمط دنا مُشابه لنمط الدنا الموجود في البرتقال اما دنا البلاستيدات والمايتوكوندريا فكان مُشابه لنمط دنا اللالنكي. وأُنتجت بطاطا مُقاومة لمرض اللفحة المتأخرة بعد الدمج الكهربائي بين بروتوبلاستات معزولة من أوراق صنف مُقاوم مع صنفين آخرين حساسين للمرض. وتم زيادة مقدرة نبات الفاصولياء في تثبيت النتروجين الجوي بعد تضمين بروتوبلاستاتها لمادة وراثية من بكتربا مُثبتة للنتروجين الجوي. وطُبقت الحالة الأخيرة في بروتوبلاستات معزولة من أوراق البرسيم ونجحت في رفع كفاءة النبات الأخير في تثبيت النتروجين الجوي. وتم إخلاف نباتات بطاطا مُقاومة لفيروس PVY وكذلك للإصابة بخُنفساء كوليرادو بعد الدمج الكهربائي بين ثلاثة أصناف من البطاطا والأمثلة كثيرة يمكن مراجعة المراجع المُتخصصة للإطلاع عليها.

التطبيقات العملية للتهجين الجسمي Applications of somatic hybridization

أُستثمرت تقانة دمج البروتوبلاست في إنتاج هُجن بين الأنواع والأجناس التي لايُمكن أن تحصل بطرائق التهجين الجنسية المعروفة. وبالرغم أن ذلك قد نجح بين الخلايا الحيوانية قبل النباتية الا ان إعادة إخلاف النبات قد تم بنجاح بينما لم يتحقق بعد في الخلايا الحيوانية. أهم مايُميز نواتج الدمج اي الهجين

الجسمي هو الحصول على توليفة مُختلفة من المجينات ومن مختلف الأنواع والأجناس مع إمكانية التغلب في عدم التوافق الجنسي وإزالة حواجز عدم التوافق بين النباتات. كما توفر التقانة فرصة لإنتاج خطوط من الهُجن العقيمة، وفيما يلي أهم التطبيقات المتوخاة من التهجين الجسمي:



شكل 6.12. سحب الدنا من قبل البروتوبلاست والخطوات العامة التي تحصل أثناء العملية.

1- إنتاج أنواع جديدة من الهُجن (Novel hybrids). فمن المعلوم أن اغلب ألأصناف الجديدة والمنتشرة في العالم من المحاصيل قد أُنتجت بالطرائق التقليدية من التهجين الجنسي بين الأنواع النباتية ولكن هناك العديد من المحددات لهذا النوع من التهجينات أهمها أنه يقتصر على الأنواع القريبة وراثيا مع بعضها. لذا فقد نتج التهجين الجسمي آفاقا جديدة وبديلة للتغلب على محددات التهجين الجنسي التقليدي من بإمكانية إجراء التهجين الجسمي بين الأنواع المتباعدة وراثيا وحتى بين الأجناس المُختلفة. إضافة الى ذلك فان إنتاج الهُجن الجسمية فتح آفاقا في إنتاج نباتات مُقاومة للأمراض، الشد البيئي، المُبيدات والأدغال، تحسين نوعية البروتين، تثبيت النتروجين الجوي وغيرها. إذ ان الصفات السابقة تحت السيطرة الوراثية ومن المُمكن نقلها من نوع لآخر. كما مكّنت التقانة الجديدة من تطوير نباتات هجينة لايُمكن إنتاجها بالطرائق التقليدية من التهجين الجنسي. أُستخدمت هذه التقانة عموماً في العديد من العوائل النباتية وخصوصاً نباتات

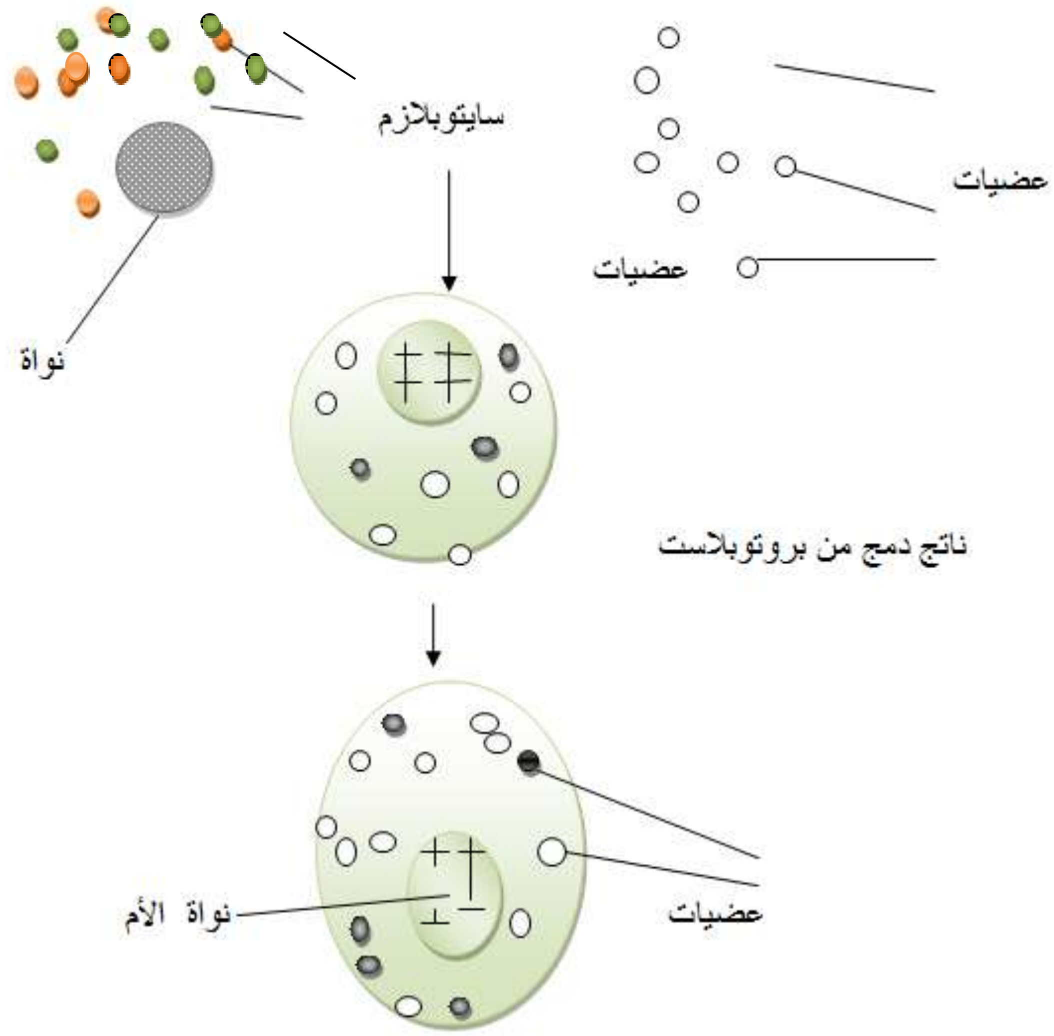
العائلة الباذنجانية كالتبغ، البنج، ورد البوري، الطماطم وغيرها. ومن العوائل النباتية الأُخرى التي أنتجت فيها هُجن جسمية شملت العوائل الصليبية، الخيمية، السذابية، البقولية، النجيلية وغيرها.

2- إنتاج هُجن جسمية بين أجناس مُختلفة Intergeneric hybrids: نتجت العديد من الهُجن الجسمية بين أجناس نباتية من دمج البروتوبلاستات أهمه ا ما أنجزه ملخرت وزملاؤه عام 1983 عندما انتجوا هجين جسمي ناتج من دمج بروتوبلاست معزول من الطماطم والآخر من البطاطا أُطلق عليه Pomato أو Topato وتحت اسم جنس *Solanopersicon*. وبالطريقة نفسها أُنتج هجين Bromato من دمج بروتوبلاست معزول من الطماطم وآخر من الباذنجان وهناك العديد من هذه الهُجن سُجلت في المصادر العلمية. تتم ألأستفادة من الهُجن الجسمية الخصبة بتضريبها رجعيا مع الأنواع المزروعة ومن ثم البحث عن الصفات الاقتصادية المرغوبة في الأجيال الناتجة خاصة تحملال جفاف ومُقاومة الحشرات والأمراض. إضافة الى نقل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي وتحمُل البرودة وغيرها.

3- مُقاومة الأمراض: تحققت أول نجاحات الهُجن الجسمية عام 1981 على يد Evans وزملائه إذ حصلوا على هجين جسمي مقاوم للأمراض بعد دمجهم بروتوبلاست معزول من أوراق التبغ نوع *Nicotiana nesophyla* مع بروتوبلاست معزول من مُعلق خلوي لطافر أشهب (شاحب) (Albino) من نوع التبغ *N. tabacum*. وجِد أن الهجين الجسمي الناتج مقاوم لفيروس تبقع التبغ (TMV) والذي إكتسب الصفة من الأب الأول. وكان لهذا الإنجاز الأثر الكبير في التحري عن إندماجات أُخرى ذات قيمة زراعية عالية أعطت ثمارها في هذا المجال. كما أُنتجت سلسلة من الهُجن الجسمية لنبات البطاطا بعد دمج بروتوبلاستات معزولة من البطاطا المزروعة (*Solanum tuberosum*) مع بروتوبلاستات النوع البري *S. brevidens* فنتج منها نوع مقاوم لفيروس إلتفاف الأوراق (PLRV) ومُقاوم لمرض اللفحة المُتاخرة على البطاطا (Late blight) الذي يُسببه الفطر *Phytophthora infestans* وهناك العديد من الأمثلة على ذلك.

4 – تحمل الإجهادات البيئية: وظفت تقانة التهجين الجسمي بهدف نقل جينات تحملال إجهادات البيئية من الأنواع البرية الى نباتات أُخرى ذات إنتاجية عالية. فقد وجد أن صفة تحملال ملوحة في الطماطم البرية *Lycopersicon cheesmanii* وصفة تحمل البرودة من النوع *L. hirsutum* يُمكن نقلها الى الطماطم المزروعة *L. esculentum* لتصبح الأخيرة مُتحملة للحرارة والبرودة. وهناك العديد من الأمثلة يُمكن للقاريء مراجعة المصادر المُتخصصة في الموضوع.

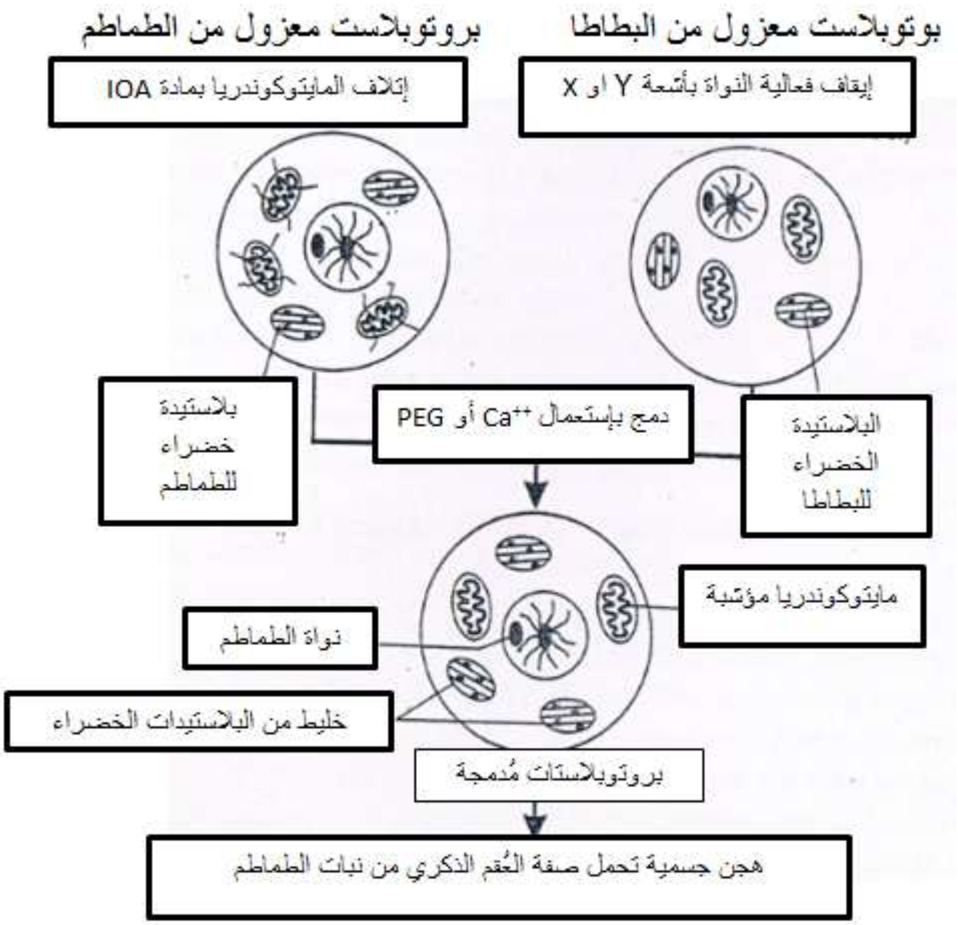
نقل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي: يُمكن من التهجين الجسمي نقل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي من نوع لآخر(شكل 6.13): نجح التهجين الجسمي بين أنواع التبغ ومحصول السلجم الزيتي *Brassica napus*.



شكل 6.13. توالد هجين يحمل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي بعد دمج بروتوبلاست ذو مايتوكوندريا غير مُفعلة معزول من طماطم مع نظيره من البطاطا معزول من بروتوبلاست يحتوي نواة غير مُفعلة (لاحظ التفاصيل في شكل 6.14).

وجرى دمج بروتوبلاستات بين *Brassica napus* x *Raphanus sativus* وبين *B. campestris* x *R. sativus* إذ يحتوي الهجين الجسمي الأول على بلاستيدة خضراء من *B. napus* وصفة العُقم الذكري السايتوبلازمي من *R. sativus*. أما الهجين الجسمي الأخير فقد كان حاملاً لصفة المُقاومة لمُبيد الأدغال

الأترازين من *B. campestris* وصفة العُقم الذكري السايتوبلازمي من *R. sativus*. كما جرت مُحاولات لنقل صفة المُقاومة للأترازين المُشفر في بلاستيدة خضراء لنبات عنب الذئب *Solanum nigrum* الى نبات البطاطا المزروعة *S. tuberosum*.



شكل 6.14. إنتاج نباتات تحمل صفة العقم الذكري بعد إندماج مايتوكونريا غير مفعلة لبروتوبلاستات معزولة من الطماطم مع أُخرى معزولة من البطاطا تم ايقاف فعالية النواة فيها.

كما دخلت التقانة في برامج تربية وتحسين الحنطة في إنتاج الهُجن الجسمية والسايتوبلازمية (Cybrids). وفي انجاز آخر تمكن ملخر وزملاؤه عام 1992 بعد مُعاملة بروتوبلاستات من نسيج وسطي أوراق الطماطم المعزولة بمادة الأيدواسيتامايد (IOA) بهدف إيقاف فعالية المايتوكوندريا مع بروتوبلاستات

معزولة من نسيج وسطي أوراق النوع *Solanum acaule* او من البطاطا المزروعة بعد تشعيع بروتوبلاستات هذين النوعين بأشعة Y أو X بهدف إيقاف فعالية النواة.

دُمِجت بروتوبلاستات في بنسب مُتساوية وحُفزت الى الإندماج بإستعمال آيونات الكالسيوم وPEG مما أدى الى إنتاج الهُجن. وتم الحصول على نواتج إندماج كان قسماً منها هُجن لنباتات طماطم تختلف عن ألأصناف الأصلية من حيث شكلها المظهري، فسلجتها وأعداد كروموسوماتها مع درجات مُختلفة من العُقم الذكري والتي تورثت في بعض أصناف الطماطم.

ومن فوائد ظاهرة العُقم الذكري السايتوبلازمي المُنتجة بهذه التقانة:

1- كونها خطوة واحدة تنتج من إندماج البروتوبلاستات وإعادة توالد نباتات منها.

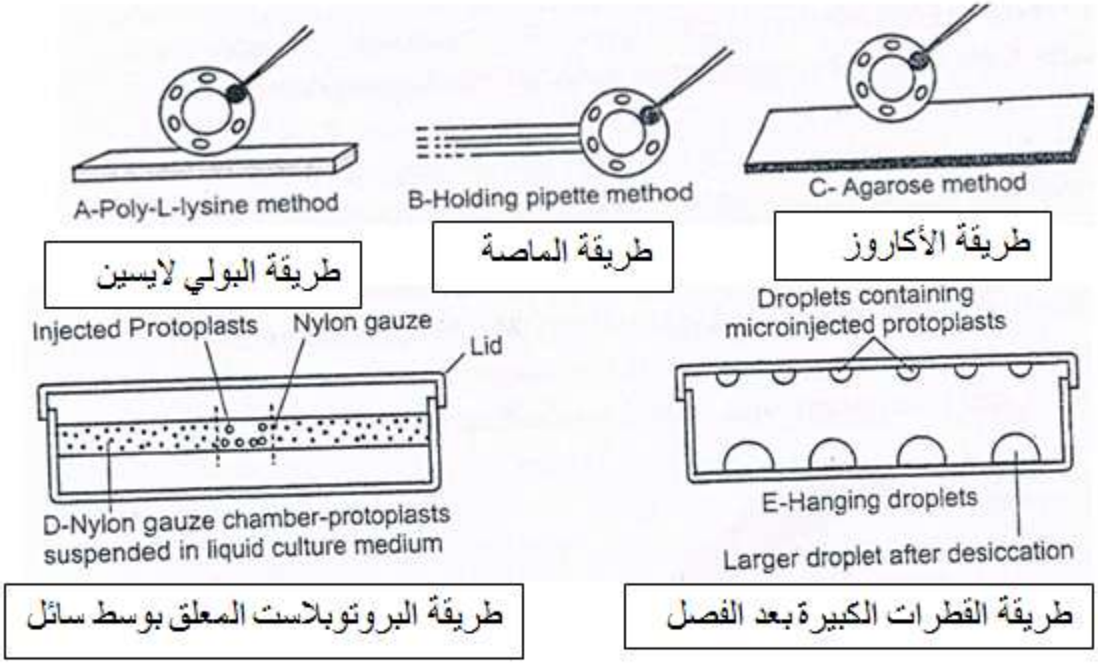
2- المُحافظة في الصفات الموروثة من النواة على حالها دون أن تتأثر.

3- إحتمالية بقاء الاجيال القادمة من الهُجن الجسمية حاملة لصفة العُقم الذكري السايتوبلازمي. لذا يُمكن إنتاج بذور هجينة دون الحاجة الى عملية الخصي (Emasculation). وقد وفرت شركات البذور خطوط إعادة (Restorer lines) ذات عقم ذكري سايتوبلازمي لهذا الغرض.

الحقن الدقيق Microinjection: تُستعمل تقانة الحقن الدقيق في حقن مادة وراثية معزولة من نبات جيد الصفات الى البروتوبلاستات. يُحقن الدنا المرغوب مُباشرةً الى البروتوبلاستات او الخلايا، بإستعمال ماصة دقيقة جداُ بنهايات زجاجية قطر فتحاتها 0.5-1.0 مايكروميتر بهدف تحسين النبات (شكل 6.15).

مُحددات التهجين الجسمي Limitations of somatic hybridization

بالرغم من سهولة دمج البروتوبلاستات الا ان الحصول على هُجن جسمية ومن ثم توالد نباتات منها لايزال محدوداً. ولكون نواتجها عقيمة في الغالب، هذا يجعل مدى ألأستفادة منها محدوداً. ومن عيوبها، أنها ينقصها الطرائق الكفوءة في إنتخاب الهُجن إضافة الى أن الناتج النهائي يكون عقيم وقد يكون مُشوهاً وذو صفات غير مُستقرة وقد تنشأ بعض حالات للكايميرا نتيجة دمج الأنوية. وعليه فالحصول على هُجن جسمية ذات صفات حقلية مرغوبة أمر ليس بسهل المنال.



شكل 6.15. طرائق الحقن الدقيق للبروتوبلاست بإستعمال خمس طرائق.

مُنتجات التهجين الجسمي Products of somatic hybridization

حقق التهجين الجسمي نتائج عديدة في مجال تحسين صفات النبات (جدول6.4) وفي العديد من الأنواع النباتية تمثلت في تحسين نمو النبات الخضري والثمري وزيادة المُقاومة والتحمُل للإجهادات البيئية الحيوية واللاحيوية وإنتاج ثمار عديمة البذور. وبذلك أصبحت وسيلة مهمة وسريعة في تحسين النبات خارج الجسم الحي مُختصرة الزمن الذي تستغرقه برامج التربية والتحسين التقليدية. ولابُد من الإشارة هنا الى ضرورة إنتخاب نواتج الهُجن من بين البروتوبلاستات غير المُدمجة وتلك التي إندمجت مع نظيراتها من البروتوبلاستات (Homo-fused protoplasts).

ومن دون وضع إستراتيجية لتشخيص وإنتخاب الخلايا الهُجن بعد الدمج مُباشرة، تصبح العملية في غاية الصعوبة وتأخذ وقتاً طويلاً بعدما تنقسم الخلايا وتكون كالساً أو نباتات. أثبتت تقانة التهجين الجسمي قابليتها في إنتاج الهُجن بأنواعها مما ساهم وسيُساهم في إختصار برامج تربية وتحسين النبات وتجاوز حالات عدم التوافق التي تحصل في التضريبات التقليدية.

جدول 6.4. أمثلة على الصفات حقلية مرغوبة ناتجة من دمج البروتوبلاستات في مجموعة من المحاصيل المُهمة

ألنوع النباتي (مصادر البروتوبلاست)	الصفات المرغوبة التي تم نقلها
Brassica napus+B.rapa	زيادة في الكتلة الحيوية والحاصل
B.napus+Crambe abyssinica	زيادة محتوى البذور من حامض erucic
B.napus+Orychophragmus violaceus	تحسين محتوى البذور من الاحماض الدهنية
B.napus+Sinapsis arvensis	زيادة المُقاومة لمرض الساق الاسود
Citrus amblycarpa+Citroncirus webberri C35	تحسين صفات اصل الليمون المكسيكي
Citrus limonia+C.sunki cv. *Tanka*	تحمُل لفحة الحمضيات، فيروس ترستيزا والفايتوفثيرا
C. reticulate cv. Blanco+*C. paradise*	إنتاج نباتات متعددة المجموعة الكروموسومية مُتحملة لفيروس exocortis
C. reticulate cv. Blanco+*C. volkameriana*	تحمُل لفحة الحمضيات، فايروس ترستيزا وفطر الفايتوفثيرا
*C. reticulata*cv. Blanco+*C. Poncirus trifolata*	نباتات مُقاومة لفايروس exocortis
C. sinensis cv. Rohde Re+*C. volkameriana*	تحمُل لفحة الحمضيات، فايروس ترستيزا وفطر الفايتوفثيرا
C. sinensis+C. Fortunella crassifolia	زيادة في نشاط نمو النبات
C. sinensis+F.obovata	تحمُل لفحة الحمضيات، فايروس ترستيزا وفطر الفايتوفثيرا

C. sinensis+*Clausena lansium*	إنتاج نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية
C. unshiu cv. Guoqing No.1+*C. grandis* cv. Buntan Pink	إنتاج هجن سايتوبلازمية عديمة البذور
C. unshiu cv. Guoqing No.1+*C. reticulata* cv. Blanco	إنتاج هجن سايتوبلازمية عديمة البذور
Solanum melongena+*S. aethiopicum*	المُقاومة للذبول البكتيري *Ralstonia solanacearum*
Solanum melongena+*S. sisymbrifolium*	المُقاومة للذبول البكتيري والفطري
Solanum tuberosum+*S. etuberosum*	المُقاومة لفيروس البطاطا Y
Solanum tuberosum+*S. nigrum*	المُقاومة للفحة البطاطا *Phytophthora infestans*
Solanum tuberosum+*S. stenotomum*	المُقاومة للذبول البكتيري *Rhizoctonia solanacearum*
Helianthus annuus L.+*H. maximiliani*	المُقاومة للامراض
Triticum aestivum+*Aeleuropus littoralis*	تحمُل الاملاح
T. aestivum+*Agropyron elongatum*	تحمُل الاملاح
T. aestivum+*Agropyron elongatum*	محتوى بروتيني عالي
Dendranthema grandiflorum+ *Artemisia sieversiana*	المُقاومة لمرض الصدأ
Oryza meyeriana+ *O. sativa spp. Japonica*	المُقاومة للفحة البكتيرية

الفصل السابع: الأجنة الجسمية وإنتاج البذور الصناعية

Somatic Embryogenesis and Synthetic Seeds Production

Introduction مُقدمة

طَورت العديد من الأنواع النباتية وسائل إكثار غير جنسية ومن ضمنها الأجنة الجسمية في مُواجهة الظروف البيئية والوراثية التي قد تمنع حصول الإخصاب وتكوين البذور وبالتالي إنقراض النوع النباتي. وورد في أحد التقارير الحديثة التي نُشرت عام 2014 بان كل الأنواع النباتية وبمُختلف أعضائها تستطيع تكوين أجنة جسمية وتحفيزها على النشوء ليس حصراً في المزارع النسيجية بل حتى النبات الكامل. فنشوء الأجنة الجسمية في أوراق سرخس البلوط (Asplenium) ونبات الثريا (Kalanchoe) ورؤيتها بالعين المُجردة كمثال على الحالة الاخيرة. كان الهدف الأول المرسوم عند دراسة الأجنة الجسمية هو فهم علم الأجنة وفعلاً أصبحت إنموذجا للدراسات الجنينية. لكن مجرى الامور سُرعان ما تغير عندما أُكتشفت التطبيقات العملية لإنتاج الأجنة الجسمية بإعتبارها منفذاً واسعاً لإكثار النباتات خُضرياً وعلى وجه الخصوص عند إستثمار المُفاعلات الحيوية في إنتاجها الواسع ليليها التغليف وإنتاج البذور الصناعية. ظهرت فيما بعد فائدة لايُتسغنى عنها بعد نجاح تقانات التجميد الفائق في حفظ المصادر الوراثية ولايكاد بنك جينات في العالم حالياً يخلو من الأجنة الجسمية المُجمدة التي سمحت بتداول المادة الوراثية بين علماء العالم بسرعة وسهولة.

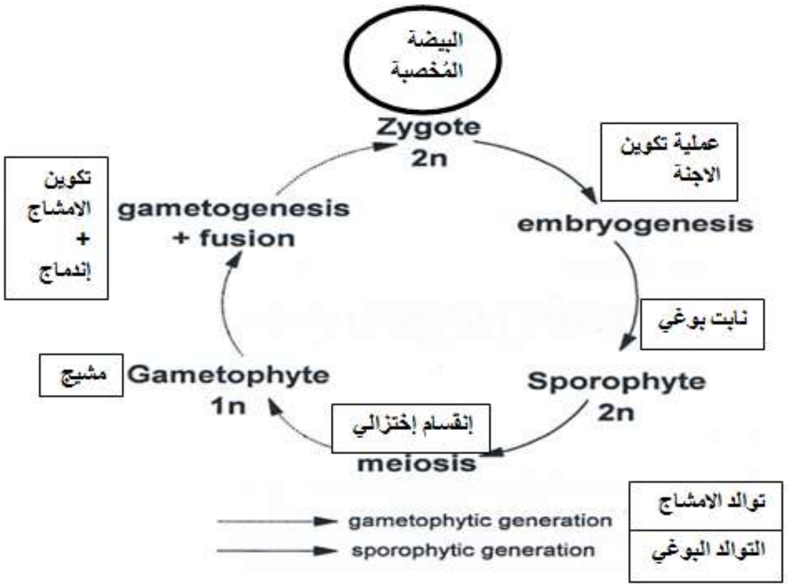
تنشأ الأجنة الجسمية في النظام النباتي المُعقد، من الأنسجة في طور الحداثة (Juvenile) والأنسجة المرستيمية فقط مثل الأجنة الجنسية غير الناضجة، فلق الأجنة الجنسية، السويقة تحت الفلقية (Hypocotyl) المفصولة من البذور في مرحلة الإنبات. تكون الاوراق الحديثة، أطراف الأفرع وحتى الجذور في بعض الأحيان مصدراً لنشوء مزارع الأجنة الجسمية. لكن المُلاحظ بان الإستجابة تعتمد وبشكل كبير الى التركيب الوراثي وبذلك فضمن النوع النباتي الواحد يستجيب أجزاء نباتية مُحددة لتكوين الأجنة. هناك العديد من المسالك الحيوية تمر بها خلالها الخلايا الخُضرية لتصبح مبادئ أجنة. فعلى سبيل المثال عندما يحتوي الجزء النباتي أنسجة جنينية غير مُتخصصة (Undifferntiated embryonic tissues) مثل جنين جنسي غير ناضج فالحالة هذه يكون نشوء وإدامة الكالس الجنيني مُتجانس لزراعة وإكثار مُعقد الأجنة الإبتدائية الموجودة اصلاً (Preexisting pro embryonal complex). بذلك تكون الخلايا الجنينية موجودة في الجزء النباتي قبل نشوء الزروعات وبذلك يُمكن إكثارها والتلاعب بها تحت ظروف

الزراعة خارج الجسم الحي. يحصل وفي العديد من الحالات تحفيز الخلايا الجنينية من خلايا غير جنينية وهذا يمثل تغييراً جذرياً لقدرها المُفترض. يشتمل التحول في النمط التطوري في إزالة التخصص (Dedifferentiation) بعيداً عن قدرها الأصلي بإتجاه إعادة التصميم نحو نوع من الخلايا الجنينية فعلى سبيل المثال، الخلايا في الجزء النباتي التي تتطور عادة الى مُكونات لأنسجة برنكيمية قصيرة العمر نسبيا، بدلاً عن ذلك تصبح جنينية تحت ظروف مُعينة. يُعد ذلك تغييراً تطورياً كبيراً لكون الخلايا في الوضع الطبيعي ستكون قادرة على المرور بإنقسامات قليلة قبل شيخوختها، لكنها والحالة الجديدة تغير إتجاهها لتصبح قادرة على تكوين نبات كامل (Totipotent) ولربما لن تستمر بالإنقسام. تصبح تلك الخلايا الجنينية خالدة (Immortal embryonic cells) بالمفهوم الذي يسمح لها بالنضج وان تصبح نباتاً منفصلاً يمتلك أعضاء تكاثر. تستطيع الخلايا الجسمية المُفردة المعزولة ان تنشأ طبيعياً الى أجنة مما يؤكد ان النهج النشوئي لعملية تكوين الأجنة الجسمية مُسيطر عليه من قبل الخلية نفسها وليست بعوامل خارجية. ولكن حاجة عملية تكوين الأجنة من الآليات المُحفزة سواء كانت فيزيائية او كيميائية او الإثنان لاتزال غير معروفة بالرغم من تشخيص جينات لها علاقة بالعملية (لاحظ فصل تطبيقات الهندسة الوراثية).

فتح إكثار النبات بإستعمال البذور الصناعية (Artificial seeds) او ما يُسمى بالبذور التركيبية (Synthetic seeds) من الأجنة الجسمية غير المُخصبة، مجالاتٍ جديدة في التقانات الأحيائية النباتية. توفر التقانة آفاقاً واعدة في إكثار النباتات المُحورة وراثياً، النباتات غير المُكونة للبذور، إكثار النباتات مُتعددة المجموعة الكروموسومية (Polyploidy) ذات الصفات النادرة والنباتات التي يصعب إكثارها بالبذور وبطرائق مُختبرية ذات جدوى إقتصادية. يُوفر الإكثار الدقيق مصدراً مُناسباً في مدار السنة من الانواع النباتية المرغوبة. تحصل في العديد من الأنواع النباتية عقبات عند إكثارها بالبذور كحصول تغاير وراثي في النباتات البذرية (Heterozygosity)، صغر حجم بذورها، إختزال في حجم سويدائها ولربما إحتياج البذور الى مُساهمة الفطريات الجذرية لغرض الإنبات (كما هو الحال في بذور الاوركيد) وكذلك في بعض أصناف المحاصيل التي تنتج ثمار عديمة البذور كالأعناب، الرقي وغيرها. والجدير بالإشارة بان الإكثار الخُضري التقليدي مُكلفاً ويحتاج الى وقت وجُهد لذلك فالإكثار بالبذور الصناعية يكون فعالاً وقد يكون بديلاً في الكثير من المحاصيل المُهمة إقتصادياً. تشتمل تقانات البذور الصناعية إنتاج أجنة جسمية تُشتق من مزارع نسيجية وتُغلف لحمايتها من المؤثرات الخارجية ولإطالة مُدة حياتها وقد تُغلف ببعض المُضافات من أسمُدة ومُبيدات لتصل كُتلتها الى حجم مُناسب يُمكن بذارها بالباذرات شائعة الإستعمال.

الأجنة الجنسية والجسمية Zygotic and somatic embryos

يُعرف الجنين بكونه أبكر مرحلة مُتعددة الخلايا يُمكن تمييزها في النبات قبل نشوء التراكيب او ظهور الصفات المُميزة للأعضاء في النوع النباتي. الأجنة من الناحية المورفولوجية عبارة عن كيانات لها وظيفتها كمرحلة وسطية في الإنتقال بين دورة الحياة من المرحلة المشيجية (Gametophytic) الى مرحلة النابت البوغي (Sporophytic). تنشأ الأجنة غير المُخصبة من خلايا النبات الخُضرية، الأنسجة التكاثرية، الأجنة الجنسية، خلايا الكالس المُشتقة مما سبق اي ان الأجنة الجسمية تنشأ من خلايا جسمية مع إمكانية نشوء أجنة جسمية من نسيج الجويزاء (Nucellar tissues) يُطلق عليها Nucellar embryos تتكون من أنسجة الجويزاء الخُضرية لأنسجة البذرة اي ليست جنسية. علماً بوجود إمكانية كبيرة وفي أغلب النباتات بتكوين أجنة ثانوية (Secondary embryos) من الأجنة الأولية التي تكونت سابقاً. وكلاهما اي الأجنة الأولية والثانوية يشتركان بصفة عامة هي إمكانية التلاعب (Manipulation) بهما في الزراعة النسيجية. بعد إخصاب البيضة لتصبح حاوية 2n، تدخل في مرحلة نشوئية من عملية تكوين الأجنة (شكل 7.1) لتنتج نوابت بوغية حاوية على 2n أيضاً وحال حصول الإنقسام الإختزالي،



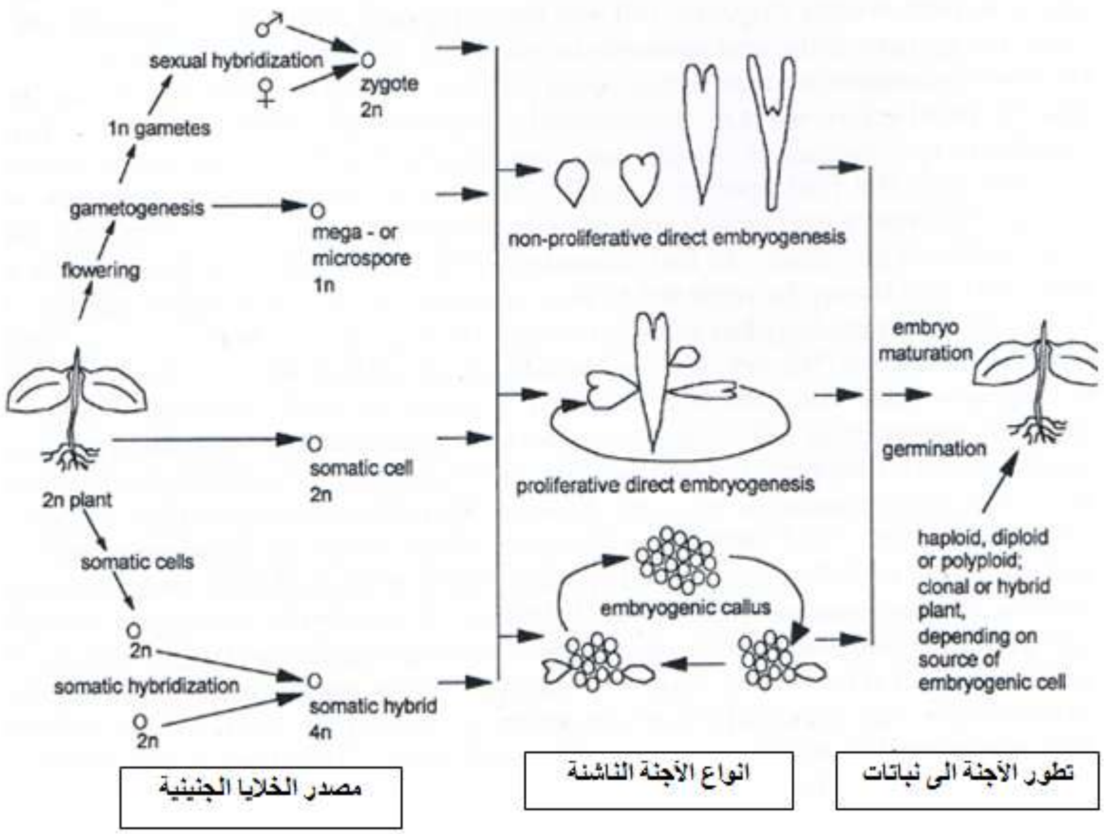
شكل 7.1. إنموذج لدورة حياة نباتات مُغطاة البذور ويتضح فيها الدور الطبيعي لعملية تكوين الأجنة في تطور النوابت البوغية.

تُختزل أعداد الكروموسومات الى النُصف لتتكون الأمشاج. تدخل الأخيرة بعملية تكوين الامشاج لتزداد أعدادها وحسب ما مُتعارف عليه وتكوين السويداء الحاوية على 3x. وفرت أنظمة المزارع الجنينية

الأُسس للعديد من الافكار التي ساهمت في تحسين النبات عند توظيف التقانات الاحيائية النباتية والتي سمحت بالإكثار السلالي وإدخال تغييرات مُحددة ومُباشرة الى نباتات مرغوبة من خلال هندسة الخلايا الجسمية وراثيا. يُمكن التلاعب خارج الجسم الحي في الخلايا المُحورة والأجنة بكفاءة. أدى ذلك الى التحسين الوراثي والتخلص من مُحددات التكاثر الجنسي (الإرتباطات الوراثية الكثيرة ودورات الإنتخاب المطلوبة) التي تتلازم مع تقانات التربية التقليدية.

مصدر الأجنة غير الجنسية Source of somatic embryos

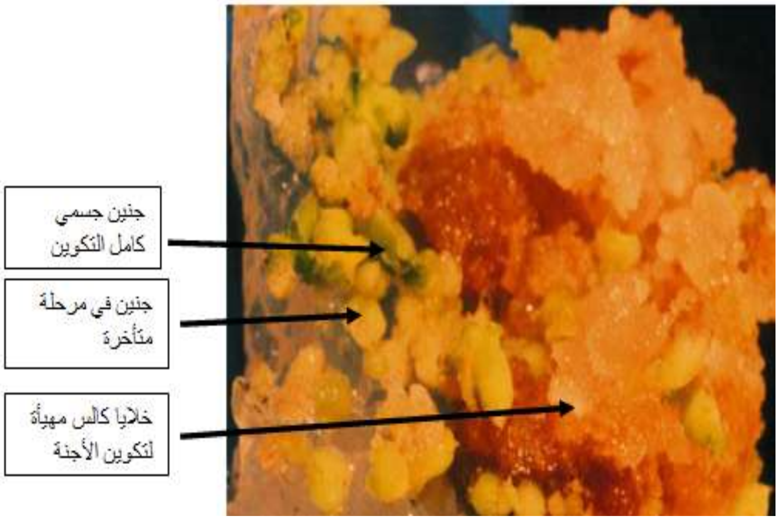
قبل البدء بشرح تكوين الأجنة الجسمية، لابُدَ من فهم آلية تكوين نشوئها في نباتات الفلقة الواحدة ونباتات الفلقتين من أجل زيادة إدراك القارئ حول ما يحصل في كلتي الحالتين عند تكوين الأجنة. تتطوّر الأجنة الجنسية داخل الكيس الجنيني بعد إخصاب البويضات في النبات ألأم وبطريقة مُنتظمة. تتشابه عملية تكوين الأجنة في النباتات المُزهرة لحد ما بالرغم من الإختلاف المظهري بين البادرات الناتجة من نباتات أُحادية الفلقة ونظيراتها ثُنائية الفلق. تختلف إثنين بوجود فلقة واحدة أو إثنتين في البادرات الناتجة. يَنتج عن الإخصاب تطوّر البيضة المُخصبة (Zygote) ثُنائية المجموعة الكروموسومية (2n =2x) وتُنتج كذلك السويداء ثلاثية المجموعة الكروموسومية (Triploid endosperm, 2n=3x). تمر السويداء في مراحل تطوّرية وتستمر بتجهيز الجنين بالمُغذيات لحين إعتماده على نفسه بعد الإنبات والبزوغ في إمتصاص الماء والعناصر المعدنية المُذابة فيه بعد ان يكون قد طوّر آلية تصنيع غذائه بعملية التركيب الضوئي. يُطلق للعملية التي من خلالها تنشا منها خلايا او أنسجة النبات الى أجنة ولكل جنين القابلية على التطوّر الى نُبيتة بعملية تكوين الأجنة. يُمكن الحصول على الأجنة بطريقة مُباشرة من زراعة الأجزاء النباتية كأجزاء الورقة، سويق تحت الفلق، الساق، أو أي جزء نباتي آخر لتشمل المُتك وحبة اللقاح. ويُمكن ان تُنتج الأجنة الجسمية بطريقة غير مُباشرة من كُتل نسيجية برنكيمية غير منتظمة نتجت من زراعة الأجزاء النباتية والتي يُطلق عليها بأنسجة الكالس (شكل 7.2). الملاحظ عن الأجنة الجسمية المُشتقة من الأجزاء النباتية والتي تكون في طور الحداثة أو مرستيمية، إما ان تكون مُفردة أو تتوالد من الجنين الواحد مجموعة جديدة من الأجنة تلتصق بالجنين الأول لتصبح بهيئة عنقود من الأجنة (Cluster of embryos) وتظهر كلتا الحالتين في عملية تكوين الأجنة المُباشر (Direct embryogenesis).



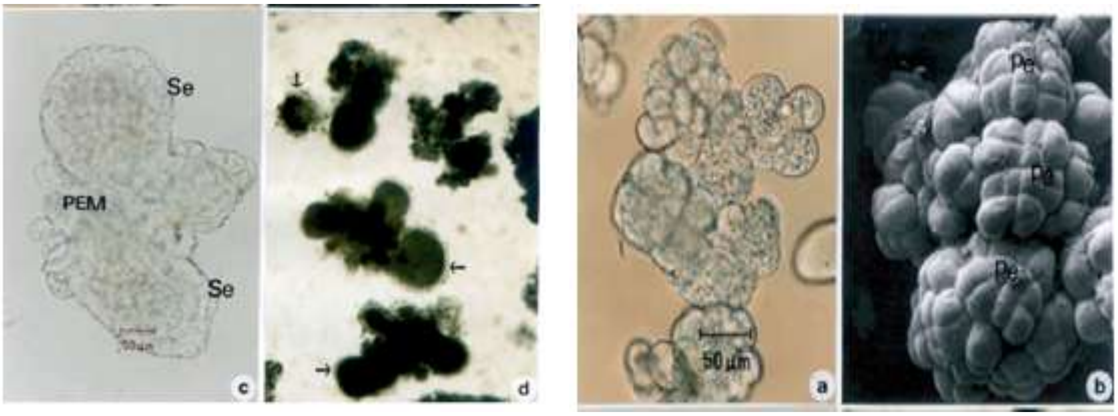
شكل 7.2. مصادر الخلايا الجنينية وأنواع الأجنة الناشئة ونشوءها الى نباتات كاملة.

لكن الحالة تختلف عند تكوين الأجنة الجسمية من كتلة نسيج الكالس او ما يُسمى بالكالس الجنيني أي بالطريقة غير المُباشرة (Indirect embryogenesis) فتظهر الأجنة وبأعداد مختلفة وجميعاً مُرتبطة بكتلة النسيج (شكل 7.3، 7.4 أ، ب).

شكل 7.3. نشوء أنسجة كالس النخيل من القمم الخُضرية وإستثمارها في إنتاج الأجنة الجسمية.



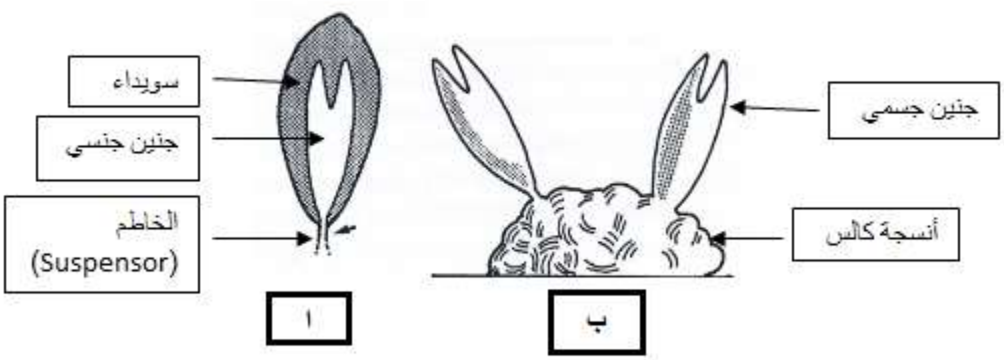
شكل 7.4 أ. تكوين الأجنة الجسمية من كالس جنيني وبمراحل مُختلفة.



شكل 7.4 ب. مراحل تطور الأجنة الأولية (PEM) في المُعلقات الخلوية لنبات *Glycine. cruciate* بعد ستة أسابيع من زراعتها على وسط MS مُجهز بالتراكيز (بالمايكرومول) 4.52 من Dic، 0.45 من NAA، 5.77 من BAP و 434 من AS وتصويرها بالمجهر الضوئي بعد تصبيغها ومن ثم بالمجهر الألكتروني الماسح (SEM). (a) خلايا جنينية غنية بالسايتوبلازم في المرحلة الاولى من PEM. (b) صورة بالمجهر الألكتروني الماسح للأجنة الأولية (750x). (c) أجنة أولية وأُخرى في مرحلة الشكل الكروي في المرحلة الثانية (SEM 600x). (d) تكاثر الخلايا من طبقة البشرة وتكوينها أجنة في الشكل الكروي (لاحظ إتجاه السهم) حيث تأثرت بالمعاملة بالاوكسين (المرحلة الثالثة).

نمو الأجنة خارج وداخل الجسم الحي *In vitro* and *in vivo* growth of embryos

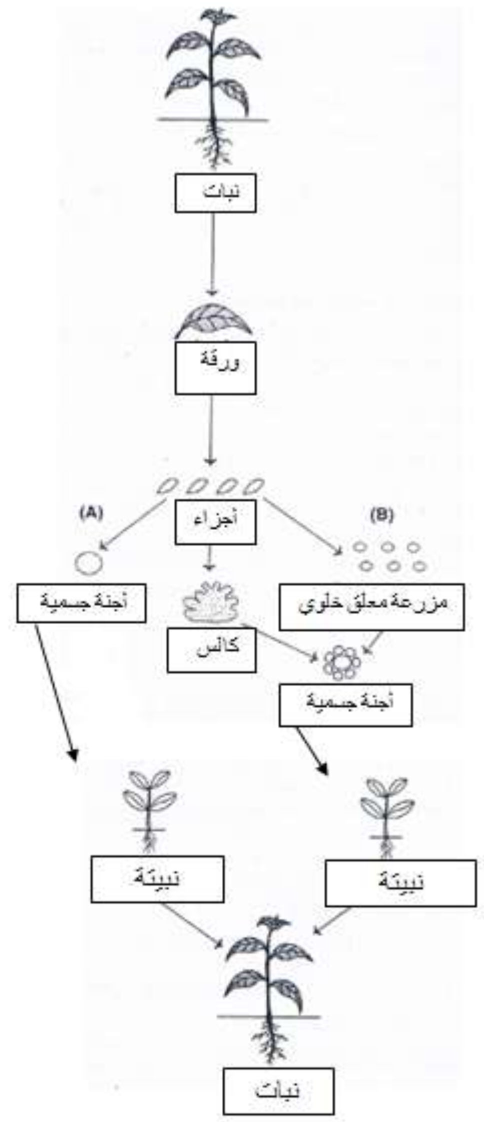
من المعلوم بأن الأنسجة التغذوية (السويداء) اللازمة للجنين داخل البذرة الطبيعية مُرتبطة مُباشرة بالجنين بخطم (Suspensor) تمر عبره المُغذيات من السويداء الى الجنين (شكل 7.5 أ) وهو الرابط الوحيد بين الجنين ومصدر غذائه. بينما يَستمد الجنين الجسمي غذائه من الوسط المُنمى فيه نسيج الكالس بعد إنتقال المُغذيات من الوسط عبر الخلايا. تتطور الأجنة الجسمية عارية حيث لاتوجد أنسجة سويداء تُحيط بها (شكل 7.5ب) ولاتحتاج الى أنظمة غذائية عالية التنظيم مثل ما هو موجود في مُكونات السويداء بالنسبة للجنين الجنسي. نشأت من هنا إمكانية فصل الجنين الجنسي وزراعته في أوساط معلومة المُكونات في حالة كونه مُهدداً بالإجهاض. وبذلك يكون الخطم مسلكاً لكافة الإحتياجات الغذائية للجنين الجنسي ولم تعُد في الواقع للسويداء أهمية في عملية تكوين الأجنة وإنبات البذور سوى انها مصدر غذاء الجنين. تنطبق الحالة هذه في الأجنة الجسمية الناتجة بالطريقة غير المُباشرة لان النسيج النباتي يكون قد مر في مرحلة الكالس، والتي وان سُجلت في الطريقة بعض المآخذ مثل إحتمالية حصول تغاير جسمي بين الأجنة الناتجة والنبات الام وفي الغالب ايضاً تحتوي القطعة الواحدة من الكالس الجنيني أجنة بأعمار مختلفة يصعب فصلها عن بعض، لكنها قد تنتج أعداد كبيرة من الأجنة.



شكل 7.5. مقارنة بين جنين جنسي داخل بذرة (أ) إذ يُلاحظ إرتباط الجنين الجنسي بالسويداء مصدر الغذاء الخزين للجنين بالخطم . (ب) أجنة جسمية نشأت من أنسجة كالس (عند تكوين الأجنة غير المُباشر) وتستمد غذائها من الوسط الغذائي المزروعة فيه أنسجة الكالس.

مراحل تكوين الأجنة الجسمية Stages of somatic embryos formation

أُستثمرت ولحد كبير الأجنة الجسمية في الإكثار الدقيق للنبات سواء أُنتجت مباشرةً على الجزء النباتي أو غير مباشرة من الكالس أو المعلقات الخلوية (شكل 7.6).

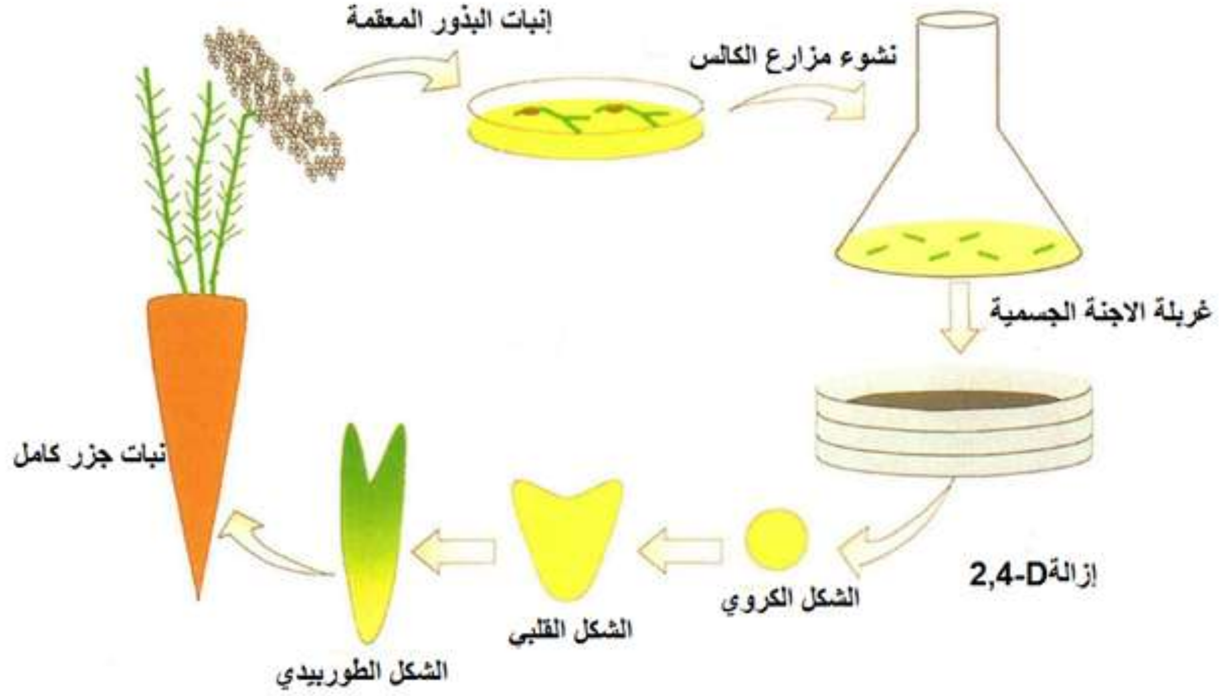


شكل 7.6. الإستفادة من تكوين الأجنة المُباشر (A) وغير المُباشر (B) في إكثار النبات خارج الجسم الحي.

حيث يمكن تحفيز الكالس للنشوء من أجزاء ورقة النبات وتحفيز الأخير لتكوين الأجنة الجسمية أو تُحفز الأوراق لتكوين أجنة مباشرة في أجزاء الورقة لِتُفصل وتُنمى الى نبات كامل. تدخل عملية تكوين الأجنة بمراحلٍ مُتعددة من التشكل المظهري (Morphogenesis) والنشوء (Development) لتتضمن؛ الجنين

الأولي (Proembryo)، والشكل الكروي (Globular)، مرحلة شكل القلب (Heart shape)، شكل الطوّربيد (Torpedo) وأخيراً مرحلة الجنين الفلقي (Cotyledonary). اُستُثمرت الأجنة الناتجة من الخلايا الجسمية واحياناً من حبوب اللقاح في إنتاج البذور الصناعية ذات الاهمية البالغة في برامج إنتاج البذور. ولابُد من التفريق بين عملية تكوين الأجنة الجسمية (Embryogenesis) وعملية تكوين الأعضاء (Organogenesis)، اذ يظهر الجنين الجسمي ثنائي الاقطاب (Bipolar) من خلية مُفردة ولايرتبط وعائياً مع النسيج ألأم او الجزء النباتي وذات جذر صغير جداً. وبالمقابل فان عملية تكوين الأعضاء تبدأ من مجموعة خلايا (Multicellular) وبتراكيب أُحادية القطب تتطوّر من حُزم الوعاء الأولي (Procambial) والذي يُنشأ روابط مع الأنسجة الوعائية الموجودة اصلاً والمُنتشرة في أنسجة الكالس او الجزء النباتي المزروع. ويكمن الفرق الرئيس في عملية تكوين الأعضاء وهي خصوصية الأنسجة الجسمية فقط بينما تختص عملية تكوين الأجنة الجسمية في الأنسجة التكاثرية.

تتكون الأنسجة التكاثرية بعد الوصول الى حالة إنتقالية (Transition phase) عندما يصبح المرستيم الخُضري برعماً زهرياً مُكتسب أساساً من خلايا جسمية بعملية يُطلق عليها بالطاقة الكامنة المُكتسبة (Acquisition of totipotency) والتي لم تُفهم الآلية الجزيئية لها بشكل كامل لحد الآن. تتحكم العديد من العوامل في النسيج النباتي لكي يتحفز في تكوين الأجنة الجسمية لعل أهمها الهيئة الوراثية (Genotype) للنبات ومنشأ الجزء النباتي المفصول إضافة الى مُكونات الوسط الغذائي وخاصة توليفة مُنظمات النمو المُجهز بها الوسط. والأخيرة لها دور جوهري في تحفيز نشوء الأجنة وبتراكيز منخفضة جداً. إذ وِجد بأن للاوكسين 2,4-D دوراً هاماً في إطلاق الشرارة الاولى (Triggering effect) في بداية تكوين الأجنة. يتكون الجزء النباتي المزروع نسيجياً من أنواع عديدة من الخلايا لتفقد تخصصها (De-differentiate) وتبدأ بالإنقسام بعد إضافة مُنظمات النمو الى الوسط (شكل 7.7). وبعد عدة أيام ولربما أسابيع وبوجود الاوكسين، تنشأ كُتل خلوية صغيرة مضغوطة تظهر من الكالس ويُمكن رؤيتها بالعين المُجردة والتقاطها بالملقط وحتى يُمكن عزلها عن باقي نسيج الكالس من خلال تعريضها الى قِوى طرد مركزية مُختلفة اذ تتجمع تلك الكُتل في قاع إنبوبة الطرد المركزي كونها أثقل من أنسجة الكالس الأُخرى. نشوء كُتل الأجنة الأولية: تنقسم الكُتل الخلوية الصغيرة والمضغوطة بطريقة لامُتناظرة (Asymmetrical way) وتلتصق الخلايا البنونية (Daughter cells) المُتكونة مع بعضها مُكونة كُتلة خلوية يُطلق عليها كُتل الأجنة الأولية (Proembryogenic masses) أو الأجنة العنقودية (Embryogenic clusters).



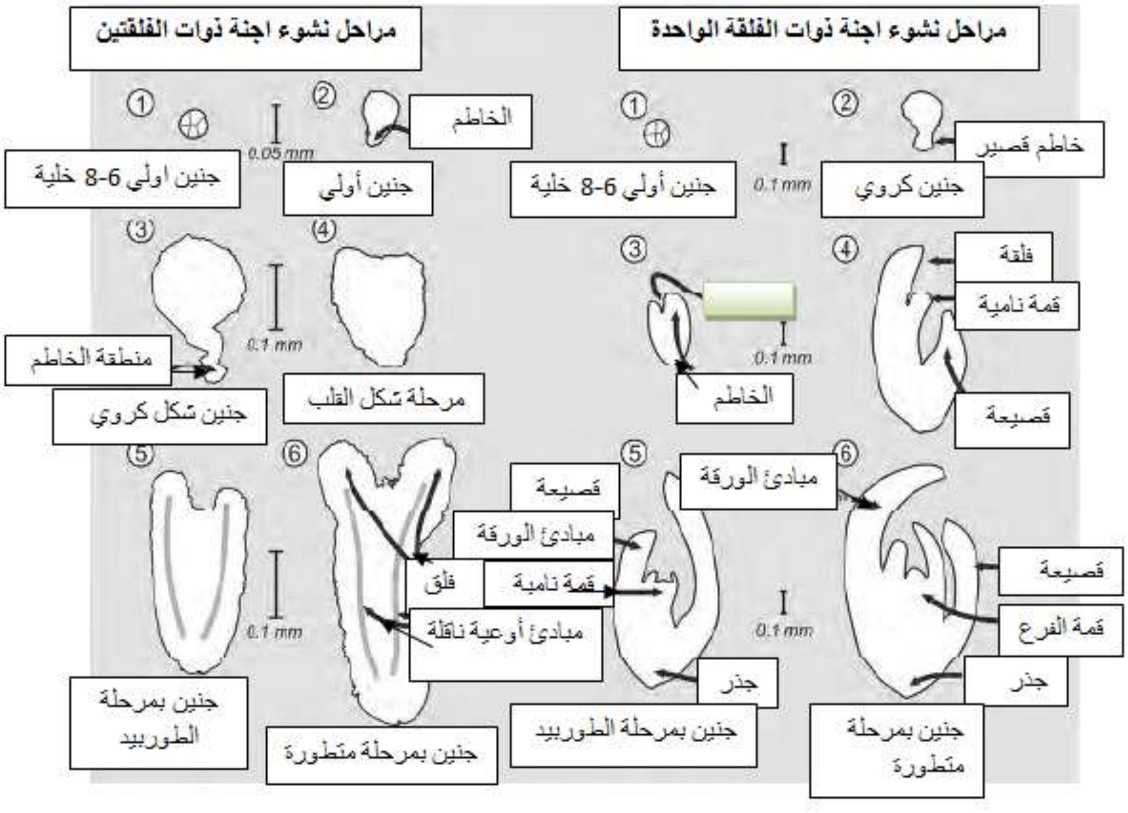
شكل 7.7. مثال على إستراتيجية ومراحل تكوين الأجنة الجسمية لنبات الجزر. يُمكن البدئ بزراعة بذور صنف جيد بعد تعقيمها سطحياً في وسطٍ زرعي مُناسب لتحفيز تكوين الأجنة الجسمية الأولية والذي غالباً ما يتضمن مُستويات مُنخفضة من 2,4-D لتُنقل بعدها الى وسطٍ جديدٍ خالٍ منه. تنشأ الأجنة الجسمية الأولية الى الشكل الكروي ثم القلبي وبعدها الطوربيدي لتُنتج أخيراً النبات الكامل.

تتطوّر الأجنة من تلك الكُتل بعد ان يزداد عددها في وحدة الحجم وتُنقل الى وسطٍ غذائي خالٍ من مُنظمات النمو. تستمر الخلايا بعد إكتسابها المقدرة على الإخلاف (Totipotency) في المُحافظة عليها لمُدة تزيد على اشهر وقد تصل الى سنوات وطالما تُزرع في وسطٍ على الاوكسين فانها تستمر بالإنقسام لتعطي أجنة ثانية بعد نقلها الى وسطٍ خالٍ من الاوكسين. يتضح مما سبق بضرورة تضمين الوسط الى الاوكسين بكميات عالية عند الرغبة في نشوء الكالس بهدف إزالة التمايز من الجزء النباتي، تُنقل بعدها الزروعات الى وسطٍ حاوٍ كمية محدودة جداً من الاوكسين لغرض تحفيز الأجنة للنشوء لتنقل بعدها الى وسطٍ خالٍ منها من أجل تطوّر الأجنة.

مقارنة نشوء الأجنة الجسمية بين نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين

Somatic embryos development in monocots and dicots

يبين الشكل 7.8 الفروقات التي تحصل بين نباتات الفلقة الواحدة ونباتات الفلقتين عند نشوء الأجنة.

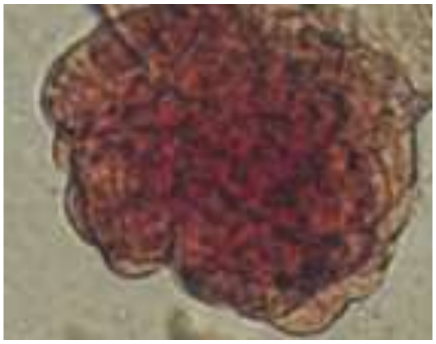


شكل 7.8. مراحل نشوء الأجنة في كلٍ من نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين.

تتشابه عملية نشوء الأجنة لحد ما في نوعي النبات عدا بعض الفروقات المُبينة في الشكل أعلاه، فالخاطم في الجنين الأبتدائي (Pro-embryo) يكون ذو خطم (Suspensor) صغير في ذوات الفلقتين وحصول إختلافات مظهرية بين نوعي الأجنة في مرحلة الشكل الكروي حيث تنشا بدايات القمة الطرفية مُبكراً عند هذه المرحلة ولكنها لاتزال غير واضحة في أجنة ذوات الفلقتين. تظهر الفلق مبكراً في مرحلة شكل القلب المُبكرة في ذوات الفلقتين لتزداد وضوحاً في مرحلة شكل الطوربيد بينما تظهر بشكل واضح القصيعة (Scutulum) في ذوات الفلقة الواحدة في مرحلة شكل الطوربيد وسريعاً ما تعلوها مبادئ الأوراق (Coleoptile) مع تقارب في حجم الأجنة بين نوعي الأجنة.

Development of somatic embryos نشوء الأجنة الجسمية

يحصل الإنتقال من المرحلة غير الجنينية الى الجنينية بعدما تبدأ الخلية المؤهلة والعازمة الى التحول الى جنين المُسماة Progenitor cell بالإنقسام الخيطي غير المُتساوي ينتج عنه خلية كبيرة ذات فجوة واسعة، وأُخرى صغيرة تحتوي سايتوبلازم كثيف (والتي تُكون الخلية الجنينية الأولى). تتميز الخلايا الجنينية بكثافة سايتوبلازمها (شكل 7.9)، صُغر حجمها وشكلها ذات الأبعاد المتساوية (Isodiametric). من المُهم الإنتباه هنا حول الإنقسام غير المُتساوي للخلية المؤهلة لِتُكون جنينا جسميا مشابهاً لما يحصل في البيضة المُخصبة عند تحولها الى جنين جنسي وهو دليل مُبكر على بداية القطبية في الجنين الذي يمر بالمراحل التي سبق الكلام عنها.



شكل 7.9. التشخيص المُبكر للمزارع الجنينية للنخيل بعد تصبيغها وتظهر الأجنة في مرحلة الشكل الكروي.

تظهر مبادئ الجذور في نباتات ذوات الفلقتين في المرحلة الاخيرة من نشوء الجنين وتتحدد الفلق من منطقتين جانبيتين في النهاية الطرفية. اذ تنشأ الفلق من مرحلة الشكل القلبي المُميز وفي الوقت نفسه تبدأ منطقة السويق تحت الفلق بالإستطالة من المحور وتحصل تغييرات مورفولوجية اثناء تلك الفترة يتخللها إنقسام خلوي تخصصي. يتكون المرستيم الخضري فيما بعد من طبقات خلايا تقع في الجزء العلوي من المحور بين الفلق. في الأنواع النباتية التابعة الى نباتات ذوات الفلقة الواحدة، تَستند المرستيمات الجذرية والخُضرية بشكل جانبي وليست علوي وسفلي كما في ذوات الفلقتين. نتيجة لذلك، لايلتزم محور الجنين الناضج مع محور الجنين الأولي (Proembryo) حيث تتوسع المنطقة العليا من المرستيم الخضري لِتُكون القصيعة (Scutellum). تتميز الفترة ألمُتأخرة من نشوء الأجنة في عاريات البذور (Gymnosperms) بتكوين الأنسجة والأعضاء وفي بداياتها الأولى تتحدد المرستيمات الطرفية للجذور والنمُوات الخُضرية ويبدأ محور النبات بالظهور. يتكون المرستيم الطرفي للجذر بالقرب من مركز الجنين كموقع مُتخصص للجذر بينما ينشأ المرستيم القمي في الجزء العلوي البعيد من الكتلة الجنينية الكروية وتكون سطحية مُقارنة مع

مركز تنظيم الجذور. تظهر مبادئ الفلق على شكل حلقة حول النهاية الطرفية للجنين. تتخصص عند هذه المرحلة بدايات الأنسجة الوعائية والقشرة. المُلاحظ في الصنوبريات بان البشرة الأولية تُغطي منطقة النمو الخضري والسويقة تحت الفلقية فقط بينما تُغطي في الأنواع الاخرى من عاريات البذور كل سطح الجنين.

التعبير الجيني اثناء عملية تكوين الأجنة في مغطاة البذور Gene expression during embros formation in angiosperms

أدى توصيف التعبير الجيني أثناء نشوء الجنين ونُضجه وإنباته الى تمييز عدة مُستويات من الجينات التي تُنظم المراحل التطورية للجنين في مُغطاة البذور. يُمكن تقسيم تلك الجينات الى خمسة أصناف وكما يلي:

الصنف الأول: جينات تكوينية خاصة في التعبير الجيني (Constitutively expressed genes) تتوافر نتاجاتها في كافة المراحل ولها وظائفها أثناء نمو النبات الطبيعي. لهذه الجينات وظائف داخلية (Housekeeping functions) ضرورية للعديد من الخلايا النباتية ومن ضمنها خلايا الجنين.

الصنف الثاني: جينات مُتخصصة في الجنين يتحدد تعبيرها الوراثي في الجنين تماماً وتتوقف عن العمل قبل الإنبات.

الصنف الثالث: جينات يظهر تعبيرها الجيني العالي في بداية عملية تكوين الأجنة ولحد مرحلة الفلق وتتوقف.

الصنف الرابع: يتمثل في جينات بروتينات البذرة ويظهر تعبيرها الجيني أثناء مرحلة توسع الفلق ونضج البذرة.

الصنف الخامس: جينات يظهر تعبيرها الجيني بِغزارة في المراحل ألمُتأخرة من عملية نشوء الأجنة ولحد نضج البذرة والتي تتنشط بوجود هورمون السقوط (IBA).

تُشفر عوائل لجينات مُتعددة الى بروتينات البذور (الصنف الرابع) وتتواجد بغزارة خلال مرحلة النضج من عملية تكوين الأجنة. وتمثل تلك المجاميع من الجينات المُتعددة حوالي 50% من الرنا المراسل (mRNA) في الجنين في النقطة الوسطية من مرحلة النضج. يتمحور التعبير في الجنين في خلايا مُعينة من الفلق والمحور ولن تتواجد في الأنسجة غير الجنينية المُحيطة بالبذرة. يتم تنظيم عمل جينات بروتين البذرة بعمليات الترجمة وما بعدها. من بين جينات الصنف الخامس والتي يظهر غزارة تعبيرها الجيني في المرحلة ألمُتأخرة من نشوء الأجنة الجسمية (LEA)، جينات البروتين المُسماة Dure111. تتشابه بروتينات LEA

في العديد من الخصائص المُشتركة بكونها جميعاً مُحبة للماء (Hydrophilic) وتحتوي على عدد كبير من الحوامض الأمينية غير المشحونة ذات جذر هيدروكسيل. يُعتقد بأن وظيفتها حماية الأغشية الخلوية والبروتينات اثناء تقليل رطوبة الجنين والفترة اللاحقة من سكونه. ولكون تلك الجينات بالإمكان تحفيزها في أجزاء اخرى من النبات بالمعاملة مع هورمون السقوط ABA او بإجهادات مُختلفة، لذلك فتعبيرها الجيني غير مُحدد بالأجنة.

توالد النباتات من الأجنة الجسمية Plant regeneration from somatic embryos

يُمكن ان تتمايز الأجنة الجسمية إما مُباشرة من الجزء النباتي دون تداخل لمرحلة الكالس أو غير مُباشرة بعد المرور بمرحلة الكالس. تستجيب الأجزاء النباتية مثل الابواغ الدقيقة، المبايض، الأجنة والبادرات مُباشرة لتكوين الأجنة الجسمية. ولابُد من الإشارة هنا بوجود خصوصية في عملية تكوين الأجنة المُباشر وهي إمكانية تصنيفها بأنها عملية تكوين أجنة جسمية ثانوية (Secondary embryogenesis) والتي يُطلق عليها تسمية تكوين الأجنة المُستمر (Continuous or recurrent or accessory). فعند فشل الجنين الجسمي الأول بالنشوء الى نبات، فبدلاً عن ذلك، تظهر دورات مُتعاقبة من الأجنة الثانوية والثلاثية والرباعية وهكذا. تنشأ الأجنة الثانوية مُباشرة من خلايا البشرة وتحت البشرة لأنسجة الفلق والسويق تحت الفلق. نشوء الأجنة الثانوية في بعض الأحيان يُعد ذا اهمية كبيرة في زيادة أعداد النباتات المطلوب إكثارها. عند تحول الأجنة الجسمية مُباشرة الى نباتات فليس من المُمكن إنتاج أجنة ثانوية وبالتالي ستكون أعداد النباتات الناتجة قليلاً. في الغالب من الصعب إيقاف العملية وبالتالي القليل من النباتات الطبيعية يُمكنها التوالد. التمييز بين إنتاج الأجنة الجسمية بالطريقة المُباشرة وغير المُباشرة غير واضح ما عدا حالة تكوين الأجنة الثانوية. تكمن المشكلة الرئيسة ووفقا لفرضية سابقة بان تكوين الأجنة المُباشر يجب ان يحصل من خلايا صَمَمَت وخَطت طريقها مُسبقاً بان تكون جنينية (Embryogenic pre-determined cells). على العكس، يحصل تكوين الأجنة غير المُباشر في خلايا غير مُصممة على ان تكون جنينية وان تتكون أنسجة الكالس اولاً. لكن في الواقع، الكالس الناشئ إما ان يكون جنينياً او لا ومن السهل التمييز بين الكالس الجنيني وغير الجنيني إعتماداً الى المظهر الخارجي للكالس ولونه. يتألف الكالس الجنيني من كُتل من الأجنة الأولية (Pro-embryogenic masses, PEMs) وحالياً لايزال لم يُعرف فيما إذا الكتلة الأولى من PEM واقعاً إنها جنين يَحيد عن التطور الجنيني الطبيعي إستجابة لمُنظمات النمو ويستطيل ام ليس كذلك. يتضمن توالد النباتات من الأجنة الجسمية خمس مراحل:

1- نشوء المزارع الجنينية بعد زراعة الجزء النباتي في وسط مُجهز بمُنظمات نمو نباتية غالباً أُوكسين وأحياناً يُضاف سايتوكاينين.

2- تفرع وإنتشار المزارع الجنينية في وسط غذائي صلب او سائل مُجهز بمُنظمات النمو بطريقة مُشابهة لطريقة نشوء الكالس المعروفة.

3- تنضيج أولي (Pre-maturation) للأجنة الجسمية في وسط خالٍ من مُنظمات النمو. يُثبط ذلك تفرع المزرعة ويُحفز الى تكوين الأجنة الجسمية وبداية نشوئها.

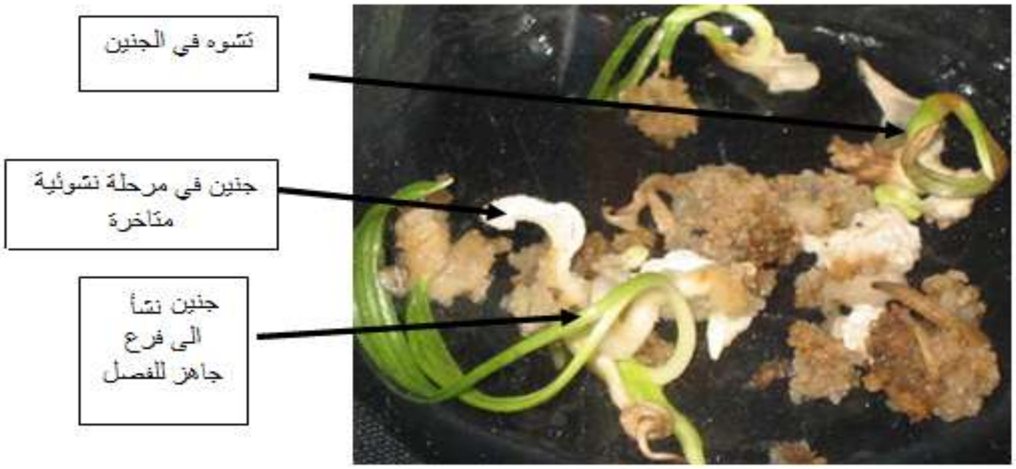
4- إنضاج الأجنة الجسمية بنقلها الى وسط مُجهز بهورمون السقوط (ABA) وقد يُصاحب ذلك تقليل الجُهد الازموزي.

5- توالد النباتات في وسط خالٍ من مُنظمات النمو.

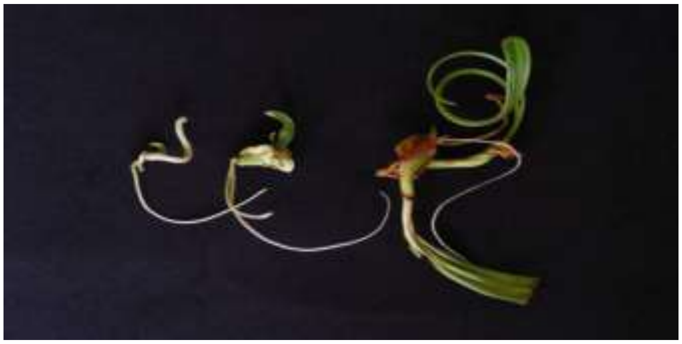
مُنظمات النمو وتحفيز الأجنة الجسمية Induction of somatic embryos via PGRs

يتطلب من الناحية العملية نشوء الخلايا الجسمية خارج الجسم الحي للجزء النباتي المُناسب المزروع في وسط معلوم المُكونات وحاوٍ مُنظمات نمو مُعينة وبتراكيزمحسوبة. تُضاف أنواع مُختلفة من الاوكسينات الى الوسط الغذائي من أجل تحفيز نشوء الأجنة الجسمية منها الاوكسين الطبيعي IAA والمُصنعة مثل NAA، IBA، Dicamba و 2,4-D والأخير الأكثر كفاءةً وشيوعاً من بين الاوكسينات. تتكشف بعدها مُكونةً أجنة ناضجة فيما إذا إستمرت في نموها على وسطٍ غذائي حاوٍ التوليفة المُناسبة من مُنظمات النمو (شكل 7.10). ومما تجدر الإشارة اليه ظهور أجنة مُشوهة ومُنتشرة بين أنسجة الكالس المُتناثرة (شكل 7.11أ) والأفرع المُتوالدة من الأجنة الجسمية بعد فصلها من نسيج الكالس وتجذيرها (شكل 7.11 ب).

شكل 7.10. نشوء ونمو الأجنة الجسمية من أنسجة كالس النخيل.



شكل 7.11 أ. نشوء بعض أجنة النخيل ويُلاحظ أجنة في مراحل نشوئية مُختلفة نشأت من مزارع الكالس.



شكل 7.11 ب. نُبيتات نخيل بمراحل مُختلفة ناتجة من إنبات أجنة جسمية.

تم إثبات وجود علاقة موجبة بين مُستوى الاوكسين المُضاف الى الوسط ومُستوى مَثيلة الدنا وهو مايعرف (DNA methylation) فيتمكن في سبيل المثال الاوكسين 2,4-D من الدخول وبتراكيز مُرتفعة الى داخل الخلايا كأوكسين حر لذلك يُعد الأكثر تأثيراً في تشجيع مَثيلة الدنا وفي زيادة فعالية عملية تكشف الأعضاء (Morphogenetic activity). والمُلاحظ بان تطوّر الأجنة الجسمية (شكل 7.12) يتوقف عند الإستمرار في تضمين الوسط الغذائي بالاوكسين قبل وصول الأجنة الى مرحلة الشكل الكروي.

شكل 7.12. الفروقات بين عمليتي تكوين الأجنة الجسمية والجنسية إذ يُلاحظ ان الأجنة الجسمية تبدأ من أنسجة الكالس وتنتهي في إخلاف النبات في الوقت الذي تبدأ الأجنة الجنسية بالبويضة المُخصبة وتنتهي بإنبات البذور ونمو البادرات.

بينت بعض التجارب بهذا الخصوص بأن تضمين الوسط بالمُركب [TIBA] (2,3,5 tri- iodobenzoic acid) يزيد من المُستويات الهرمونية الداخلية بالنظر لما يلعبه هذا الحامض في إيقاف خاصية النقل القطبي للاوكسين بين الخلايا. وسَجلت بعض التجارب توقف الأجنة في إنتاجها للاوكسينات لحين وصولها مرحلة الشكل الكروي لتبدأ الأجنة ثانية بعد مرحلة الشكل الكروي في إنتاجها للاوكسين IAA بدليل بدء نشوء الكالس عليها وتوقف نقله وتراكمه داخلها بما يؤدي الى نشوء الكالس عليها لتصبح الأجنة حساسة للاوكسين وتتصرف وكانها أنسجة جسمية.

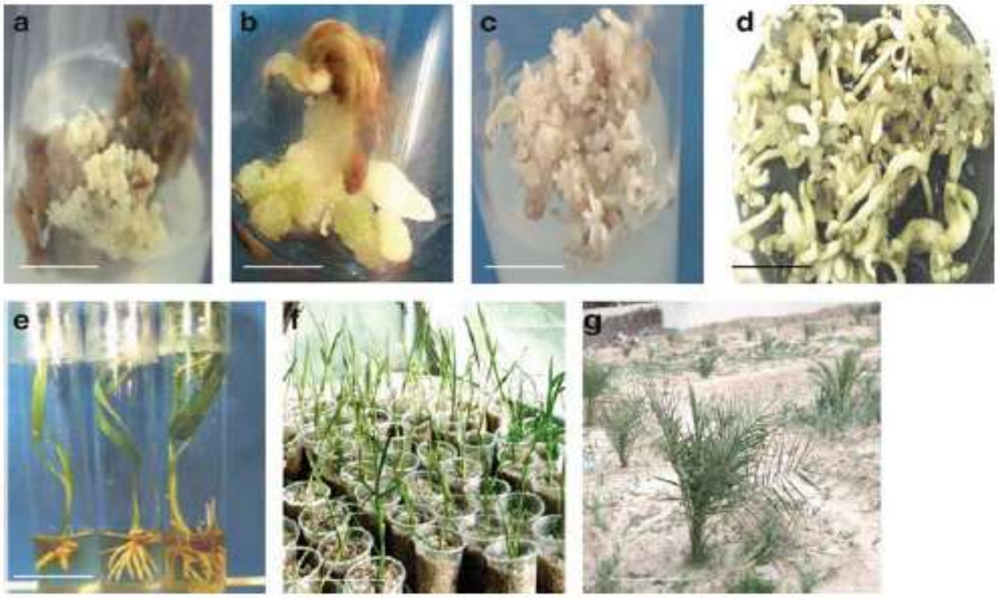
إضافة الى الاوكسينات، تحتاج العديد من ذوات الفلقتين الى السايتوكاينينات لتحفيز عملية تكوين الأجنة الجسمية ولكن وِجد وفي حالات قليلة تاثيراً للسايتوكاينين في نشوء مزارع الأجنة هذه. من أكثر السايتوكاينينات شيوعاً البنزل ادنين (BA)، ثايدايزوران (TDZ)، الكاينيتين والزياتين الطبيعي. من المؤكد تحتاج الزروعات الى تراكيز مثالية من مُنظمات النمو والتي غالباً ما تكون واطئة لكي تعطي

الإنطلاقة الأولى للشروع بتحفيز الأجنة الى التكوين والتراكيز العالية تصبح سامة وخاصة الاوكسينات من مجموعة الفينوكسي (Phenoxy-auxins).

يجب نقل الزروعات من وسط تحفيز الأجنة للنشوء الى وسط جديد خالٍ من مُنظمات النمو حيث لوحظ توقف نمو الأجنة الناشئة ونشوئها وموتها عند تضمين الوسط بالاوكسين. بالرغم من ذلك فلا يُمكن التعميم بإحتياج المزارع النسيجية لكل الأنواع النباتية الى مرحلتين اي مرحلة إضافة ومرحلة حذف مُنظمات النمو لتحفيز الأجنة ولضمان نشوئها على التوالي. لعل المثال الواضح للحالة الأخيرة تحفيز ونشوء أجنة نباتات النجيليات أُحادية الفلقة (Poaceous monocots). بالرغم من ان أغلب الدراسات أستعملت الاوكسينات وخاصة 2,4-D و NAA في تحفيز الأجنة الجسمية على التكوين من الأجزاء النباتية، الا ان قسماً من الدراسات وظّفت السايتوكاينينات لهذا الغرض (جدول 7.1). فعلى سبيل المثال، زُرعت الأجنة الجسمية لنبات البرسيم الأبيض التي تم تحفيزها من أجزاء السويقة تحت الفلق وهي في مرحلة الفلق (Cotyledonary embryos) في وسطٍ يحتوي على السايتوكاينين BAP مما أدى الى تحفيزها على تكوين الأجنة الجسمية. وعند إحلال 2,4-D بدل BA، تشكلت الأجنة في الأجزاء النباتية المفصولة من الفلق. وكانت الحالة مُشابهة في نبات البزاليا حيث تم تحفيز الأجنة الجسمية الى التكوين من أنسجة السويق تحت الفلق بعد تضمين الوسط بالسايتوكاينين في الوقت الذي تكونت الأجنة الجسمية من أنسجة الفلق بوجود الاوكسين. وِجد بان الثايدايزوران (TDZ) بمُفرده يُمكن ان يُعوض عن كلاً من الاوكسين والسايتوكاينين في العديد من الأنواع النباتية.

أُقترحت فرضية مفادها بأن TDZ يُحفز نشوء الأجنة الجسمية من خلال تنظيمه للمُستويات الداخلية لكلٍ من الاوكسين والسايتوكاينين، علماً انه تم تسجيل حالات في بعض الأنواع النباتية زيادة كبيرة في تحفيز الأجنة الجسمية بعد إضافة TDZ. حفز الأثيلين تكوين الأجنة الجسمية في حالات قليلة جداً. برهنت وفي دراسات حديثة بأن الجيل الجديد من مُنظمات النمو النباتية أمثال الجاسمونيت، الأمينات المُتعددة، السكريات قليلة التعدد (Oligosaccharides) وBrassinosteroids مُفيدة في نشوء الأجنة الجسمية في مجموعة من الأنواع النباتية. تحققت نجاحات كبيرة في تحفيز نشوئها أيضاً بعد إضافة مركبات من غير مُنظمات النمو مثل أنواع مُختزلة من النتروجين وخاصةً الأمونيوم أو أمايد النتروجين. وخلاصةً لما سبق يُمكن القول بان العوامل المُحددة لتكوين الأجنة الجسمية مُرتبطة بالتركيب الوراثي، نوع النسيج ومرحلته النشوئية ومُنظمات النمو وتراكيزها المُضافة الى الوسط. واصبح من المعلوم بان حذف او تقليل تركيز الاوكسين في وسطٍ النمو يوقف إستمرار دورة تكوين الأجنة مما يسمح للأجنة ان تنشأ الى مرحلة النضج (شكل 7.13).

كما سُجل بان الوسط الذي سبق وان أُستعمل في إنتاج الأجنة الجسمية والمُسمى بالوسط المُكيف (Conditioned medium) قد يُحفز من عملية تكوين الأجنة عند إستعمال لُقاحات منه تُضاف الى الوسط الجديد.



شكل 7.13. تحفيز الأجنة الجسمية وإخلاف النبات من أجزاء من سعف النخيل صنف دجلة نور. (a) كالس جنيني ضمن أجنة جسمية أولية في مرحلة الشكل الكروي أُنتجت في وسطٍ MS بعد 6 أشهر من زراعتها بعد تضمين الوسط 1 ملغم/لتر من الاوكسين 2,4-D (M2). (b) تكوين الأجنة المُباشر في النهايات السفلية من نهايات الخوص حديث التكوين بعد زراعتها في وسطٍ MS المجهز بنفس التركيز السابق من 2,4-D ولنفس المُدة الزمنية. c) نشوء وتمايز الكالس الجنيني بعد شهر من نقله الى وسطٍ MS حاوٍ 0.1 ملغم/لتر من 2,4-D. (d) أجنة جسمية ناضجة تم الحصول عليها من نقل كالس جنيني لمُدة 10 أسابيع الى وسطٍ MS خالٍ من 2,4-D. (e) نُبيتات نخيل تم تقسيتها ويظهر فيها الجذير والنمُوات الخُضرية بعد نموها في وسطٍ MS السائل بنصف القوة مضافاً له 1 ملغم/لتر من IBA. (f) فسائل مؤقلمة بعمر 3 أشهر مُنماة داخل البيت الزجاجي. g) فسائل بعمر سنتين نامية في الحقل المستديم.

جدول 7.1. توظيف تقانة الأجنة الجسمية في توالد وإكثار مجموعة من أشجار الفاكهة الإستوائية بعد إختيار أجزاء نباتية مُناسبة من أشجار في طور الحداثة أو ناضجة وزراعتها في أوساط غذائية مختلفة تم تضمينها بتوليفات من مُنظمات النمو.

مُنظم النمو	الوسط	النُضج/الحداثة	الجزء النباتي	النوع النباتي
KIN, IAA	MS	حداثة	الساق	*Carica papaya*
2,4-D, KIN	MS	حداثة	أجنة مُخصبة	*Carica papaya*
2,4-D, KIN	MS	حداثة	بروتوبلاست معزولة من أجنة جسمية	*Carica papaya*
2,4-D, BA	MS	حداثة	حامل الورقة	*Carica papaya*
2,4-D, IBA	MS	حداثة	سويق تحت الفلق	*Carica papaya*
IAA, KIN, GA_3	MS	نضج	الجويزاء	*Citrus aurantifolia*
IAA, KIN, GA_3	MT	نضج	الجويزاء	*Citrus aurantifolia*
IAA, KIN, GA_3	MS	نضج	الجويزاء	*Citrus clementina*
IAA, KIN, GA_3	MT	نضج	الجويزاء	*Citrus clementina*
IAA, KIN, GA_3	MT	نضج	الجويزاء	*Citrus grandis*
IAA, KIN, GA_3	MS	نضج	الجويزاء	*Citrus jambhiri*
IAA, KIN, GA_3	MS	نضج	الجويزاء	*Citrus limon*
BA, KIN, NAA, IBA	MS	نضج	أطراف الأفرع	*Citrus limon*
KIN, NAA	MS	نضج	الجويزاء	*Citrus sinensis*

وبالنظر لأهمية النخيل، فقد كُرست العديد من الدراسات وخاصةً في الدول المُنتجة لهذا المحصول المُهم من أجل إنتاج فسائل بأعداد كبيرة وقد حظي إكثار النخيل بوساطة الأجنة الجسمية أهمية بالنظر لإمكانية إنتاجها من أجزاء النبات المُختلفة. وتحمل اشجار النخيل المُكثرة بالأجنة الجسمية ثماراً بعد حوالي 4 سنوات (شكل 7.14).

المُركبات المُرافقة لتكوين الأجنة الجسمية (.Compounds associated with S.E. (S.E

يُرافق الشروع في عملية تكوين الأجنة الجسمية تغييرات كبيرة في ايض الخلية. إذ دُرس تراكم المُركبات في أنسجة الكالس غير المُتمايزة وقُورنت مع تلك المُتراكمة في الأجنة. وسَجلت البحوث زيادة في سرعة تصنيع البروتين ورافقتها زيادة في سرعة تصنيع الرنا والدنا وزيادة في مُستويات ألأُمينات المُتعددة. وفي المستوى الجُزيئي، فقد حصلت زيادة معنوية في التعبير الجيني لجينات التيوبيولين (Tubuline genes) أثناء مراحل نشوء الأجنة الجسمية مع تغاير ملموس في كمية الدهون المُتراكمة في الأجنة الجسمية. وفي مستوى الدنا، تحصل تغييرات في مثيلة السايتوسين (Methylated cytosine) مُرتبطة بالمرحلة النشوئية للجنين. وعند نقل الأجنة الى وسط خالٍ من مُنظمات النمو (المسؤولة عن الشروع في نشوء الأجنة)، تحصل مَثيلة مُفاجئة مُرتبطة بإستنساخ الرنا بعد ما تم قياسها بتقانة اللطخات الشمالية (Northern blots).

شكل 7.14. أشجار نخيل في مرحلة الإثمار ناتجة من زراعة الأجنة الجسمية.

التعبير الجيني أثناء تكوين الأجنة الجسمية (.Gene expression during S.M. (S.E

يُمكن تقييم التعبير الجيني أثناء عملية تكوين الأجنة الجسمية بعد عزل الجينات التي يظهر تعبيرها الجيني أثناء تلك العملية وبالتالي تشخيص وظيفتها ومقارنتها بالجينات المعزولة من الأنسجة غير الجنينية. وفي ضوء ذلك تم تشخيص عدد من الجينات (جدول 7.2) التي أظهرت تعبيراً عالياً أثناء مراحل نشوء الأجنة وتمت الإستفادة منها في تحليل آليات التحكم بالجينات أثناء عملية تكوين الأجنة. تُشير البحوث العلمية في هذا الصدد الى حصول زيادة في تصنيع الرنا خلال عملية التحول من أنسجة الكالس غير المُنتظمة في نموها الى بداية تكشف الأجنة ونشوئها مما يدعو الى إقتراح حصول إعادة برمجة في التعبير الجيني

جدول 7.2. عدد من الجينات وخصائصها المعزولة من الأنسجة الجسمية للجزر

الجين	المنتوج	التعبير في الكالس(a)	التعبير في الأجنة الجسمية(b)	التعبير في الأجنة الجنسية	الزيادة في ABA(d)
DC8	LEA (م3)	±(e)	+++(H)	+++	نعم في الجنين
DC49	غير معلوم (f)	+	+++	غير محدد	غير محدد
DC59	Oleosin	±	+++(H)	+++	نعم في الجنين
DC3	LEA (م3)	±	+++(PEM,G,T)	غير محدد	نعم الجنين والأنسجة الخضرية
DC5	غير معلوم	غير محدد	+++(PEM,G,T)	غير محدد	غير محدد
DC13	غير معلوم	غير محدد	+++(PEM,G,T)	غير محدد	غير محدد
EMB-1	LEA (م1)	±	++(G,H)؛+++(T)	+++ (البذور)	غير محدد
ECP31	LEA (م4)	غير محدد	+++(PEM)؛±(G,H,T)	+++(H)	نعم في الأجنة الجسمية
ECP40	LEA (م2)	غير محدد	+++(PEM)؛±(G,H,T)	+++(H)	نعم في الأجنة الجسمية
EP2	Lipid transfer	±	+++	+++	غير محدد
EP3	Chitinase	غير محدد	+++	غير محدد	غير محدد
DC1.2	غير معلوم	غير محدد	+	غير محدد	غير محدد
DC2.15	Proline rich	+	+++(G,H,T)	غير محدد	غير محدد
DC4.2	غير معلوم	+	+++(H)	غير محدد	غير محدد
DC7.1	غني بالكلايسين	+	++(G,H)	غير محدد	غير محدد
DC.9.1	غني بالكلايسين	+++	±	غير محدد	غير محدد
DC10.1	غير معلوم	+	+++(G)؛++(H,T)	غير محدد	غير محدد
EF1-a	عامل الاستطالة	++ لم ينقل	+++(G polysomes)	غير محدد	غير محدد
ATP-2	ATPase	++ لم يترجم	+++G polysomes)	غير محدد	غير محدد
CEM1	EF1-a	غير محدد	+++(PEM)؛+++(G,H,T)	غير محدد	غير محدد

(a)- تشير الى مزارع الكالس بنوعيها الجنينية وغير الجنينية. (b)- مراحل تكوين الأجنة الجسمية من ضمنها بداية تكوين الأجنة الاولية (PEMs) الى مرحلة النبيتات. (G) مرحلة الجنين الكروي. (H) مرحلة شكل القلب. (T) مرحلة الطوربيد. (c) تحليل الجنين الجنسي سواء من التهجين في الموقع (*in situ* hybridization) او تهجين الرنا (RNA blot). (d) زيادة ABA تنعكس في شكل زيادة في الرنا المراسل بعد معاملة الأجنة الجسمية بهرمون السقوط (ABA). (e) مستويات الرنا المراسل (mRNA) الذي يتراوح من ± أي تم الكشف عنه وموجود بكميات قليلة الى +++ اي موجود بكميات كبيرة. (-) غير موجود. (ND) لم يتم قياسها. (LEA) حصول التعبير الجيني بغزارة في الأجنة الجسمية عند مرحلة تكوين الأجنة المتأخرة (Late embryogenesis). (EP) بروتينات خارج الخلية (Extracellular proteins).

(Reprogramming of gene expression) لجينات تلك الأنسجة والتي تحصل غالباً في أثناء عملية الإستنساخ (Transcription).

أظهرت بعض الدراسات حول التغييرات التي تحصل في مُستوى البروتينات في أثناء عملية تكوين الأجنة الجسمية وسُجلت تغييرات محدودة في تصنيع البروتينات اذا ما قورنت بتلك البروتينات المُتوافرة في أنسجة الكالس. دُرست الجينات التي تُسرع من تكوين الأجنة الجسمية في نبات الجزر وفق إستراتيجية للمُقارنة بين الجينات والبروتينات التي تم تعبيرها في كلٍ من الأجنة الجسمية وأنسجة الكالس. عُزل العديد من الجينات من الأجنة الجسمية إضافةً الى عزل مجموعة أُخرى من الجينات التي زادت من عملها التنظيمي (Up-regulated) داخل الأجنة الجسمية والتي يُعتقد بأن الأجنة الجسمية تفرز بعض البروتينات الفريدة. فعلى سبيل المثال تم عزل جينات تُشفر لنوعين من البروتينات يُطلق عليها EP2 و EP3 والتي تزداد في أثناء تكوين الأجنة الجسمية. ونتج من تجارب دراسة الجينات المُسيطرة على ما بعد الإستنساخ (Post-transcriptionally) إكتشاف جينين آخرين هما EF1-a و ATP2.

أهمية عملية تكوين الأجنة الجسمية The importance of somatic embryogenesis

1- يُعد تكوين الأجنة الجسمية عملية مُهمة للغاية ويُمكن توظيفها إقتصادياً في إنتاج البذور الصناعية سواء كانت من خلايا أُحادية أو ثُنائية أو مُتعددة المجموعة الكروموسومية.

2- تُعد إنموذجاً حديثاً لدراسة عملية تكشُف الخلايا ونشوئها لتكوين وإنتاج الأجنة الجسمية.

3- يُمكن تطفير الخلايا ومن ثم تحفيزها الى تكوين الأجنة الجسمية وتحليل الطوافر وإنتقاء المُفيد إقتصادياً منها بعد إخلافها الى نباتات.

4- إمكانية إنتاجها بسهولة وعلى نطاق واسع دون الحاجة الى تداخل جراحي، في الوقت الذي تكون الحالة أكثر صعوبةً وتعقيداً في الأجنة الحيوانية.

5- إمكانية تغليف الأجنة بمُغلفات مُختلفة كالأسمدة ومُبيدات الأدغال لكي تكون جاهزة للبذار بإستعمال الباذرات كما هو معمول به في البذور الطبيعية.

6- يُمكن تحوير الأجنة وراثياً بهدف الحصول على نباتات مُحورة وراثياً ذات صفات مرغوبة وكما سيرد لاحقاً في هذا الفصل.

ولابُد وفي هذا السياق من الإشارة الى الفوائد المُتوخاة من إنتاج الأجنة الجسمية مُقارنة مع تكوين الأعضاء (Organogenesis) لأن الأجنة في الحالة الأولى تُنتج من خلايا مُفردة يُمكن إنتاجها في وقتٍ واحد مُتزامن (Synchronized) وغربلتها وتنقيتها من الخلايا غير المرغوبة ليكون الناتج خلايا مُتجانسة (Homogeneous). وحال شروع الأجنة الجسمية بالتكوين فلا حاجة لإجراء تغييرات في مُكونات الوسط الغذائي ولاحاجة لفصل الأجنة من أنسجة الكالس غير المُتمايزة. كما يُمكن الحصول على أجنة أُحادية المجموعة الكروموسومية (Haploids) من زراعة المتوك أو حبوب اللقاح وكذلك الحال إنتاج أجنة وبالتالي نباتات ثلاثية المجموعة الكروموسومية من زراعة أنسجة السويداء (Endosperm). أشار العديد من الباحثين الى الملاحظات التالية أثناء عملية تكوين الأجنة الجسمية:

1- تتباين أعداد الخلايا التي تدخل فعلاً في عملية تكوين الأجنة وتُكمل مراحلها ويقل العدد مع زيادة زمن بقائها في الوسط الزرعي.

2- إطالة مُدة بقاء الخلايا وما يتبعه من مراحل تكوين الأجنة في الوسط فقد يَنتج عنه تغاير جسمي (Somaclonal variation) ومن المُحتمل ان يؤدي الى إنتاج أجنة طافرة وبالتالي نباتات تحمل تلك الطفرة.

3- سُجلت حالات إعادة إخلاف لنُبيتات بمظهر غير مألوف (Unusual plantlet phenotypes) مثل إحتوائها فلق مُتعددة.

4- لأغلب خطوط الخلايا الجسمية دورة حياة مُحددة والتي غالباً لاتتجاوز 1 الى 2 سنة، ولايُمكن بعدها ان تتكون أية أجنة.

يتضح بأن الخطوة الأولى في عملية تكوين الأجنة الجسمية مُرتبطة في قابلية الجزء النباتي لتكوين أنسجة الكالس ليمُر بعدها بالمراحل المعروفة وبالتالي إخلاف النبات الكامل. تبدأ عملية تكوين الأجنة الجنسية حال إخصاب البويضة لتمُر بعدها البويضة المُخصبة بالمراحل المُبينة في الشكل ليتكون أخيراً الجنين الجنسي داخل أغلفة البذرة والذي ينشأ لمرحلة النضوج وفقدان البذرة لكمية من الرطوبة وبعدها تدخل البذور في الغالب في مرحلة السكون (Dormancy) لتنتهي بعدها بالإنبات وتكوين البادرات بعد كسر السكون.

إنضاج الأجنة الجسمية وإنباتها Embryo maturation and germination

لابُدَ من ان تكون الأجنة النابتة حاوية على نموات خضرية وجذور ذات قمم مرستيمية فعالة لضمان نجاحها بعد زراعتها في الحقل. وسُجل في أغلب الحالات تثبيطاً في إنقسام مرستيمات النمُوات الخُضرية بوجود تراكيز عالية من الاوكسين. لذا يستوجب ألأمر وكما ذُكر سابقاً وجوب نقل الأجنة الأولية الى وسطٍ غذائي خالٍ أو قليل المُحتوى من الاوكسين. وفي هذا السياق، قد يُضاف الفحم المُنشط الى الوسط بهدف إدمصاص الاوكسين وتقليل تركيزه. يُعد إنضاج الأجنة الجسمية المرحلة الأخيرة من عملية تكوين الأجنة بهدف الحصول على جنين ناضج مورفولوجياً. لابد من توفر المُواصفات التالية في الأجنة الناضجة:

1- تراكم خزين من الكربوهيدرات، الدهون والبروتينات.

2- إنخفاض المُحتوى الرطوبي.

3- إنخفاض تدريجي يقترب من التوقف في عمليات الايض. لوحظ في حالات قليلة إستمرار النمو لحد الإنبات.

بالرغم من كون الإنضاج الكامل للأجنة الجسمية ليست ضروريا تماماً عند الرغبة في الحصول على نباتات كاملة، ولكن الإنضاج مهماً في زيادة مُعدلات نجاح الإنبات. تؤثر العوامل التالية في تسريع نُضج الأجنة:

1- مُكونات الوسط الغذائي، وردت في المصادر مجموعة من الأوساط وبمُكونات معلومة وبتوليفات معلومة من مُنظمات النمو (شكل 7.15) شجعت في تسريع إنضاج الأجنة فالمُستويات العالية من السكروز (9-12%) أسرعت في نضج الأجنة.

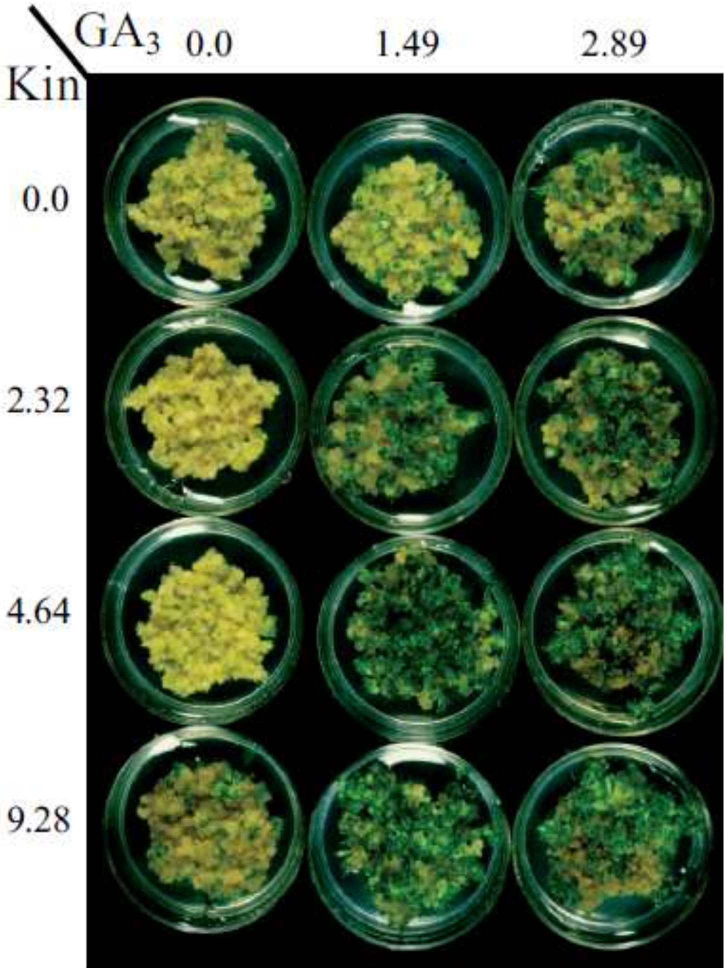
2- - إضافة دفعات مُتقطعة من هرمون السقوط (ABA).

3- المُضافات من المُركبات الفعالة ازموزياً.

4- المُضافات من الهرمونات طبيعية المصادر مثل ماء جوز الهند أو المُستخلصات النباتية.

5- إضافة أثيلين الكلايكول المُتعدد (PEG).

6- المُضافات من أحماض أمينية مُعينة خاصة الكلوتامين.



شكل 7.15. تطور الأجنة الأولية في نبات *Ginkgo tibetica* على وسط صلب مضافاً له 434 من AS و GA3 و كاينيتين بالمايكرومول بتراكيز مُختلفة.

السُكون والسُبات والإنبات Quiescence, dormancy and germination

لعل من أهم الفروقات بين الأجنة الجنسية والجسمية عدم الوضوح في دخول الأخيرة في مرحلة سكون كما هو الحال في الأجنة الجنسية التي تمر بمرحلة سكون حال نُضج البذرة ومع وجود الخزين الغذائي وأغلفة البذرة مما يؤهلها للخزن لفترات زمنية مُختلفة حسب النوع النباتي. على العكس من ذلك يميل الجنين الجسمي للإنبات والنمو قبل أن ينضج بصورة طبيعية لكونه غير مُنظم في هيئة أنسجة جنينية وقد يموت وفي حالات قليلة يمر في مرحلة راحة. الحصول على أجنة جسمية يبدو أصعب مما هو مُتوقع وإذا ماأُنتجت فنسبة الأجنة الناجية والتي تُعطي نباتات تكون مُتدنية جداً والغالبية تُعطي أجنة مُشوهة. عموماً

تتراوح نسب النجاة بين الصفر و50% وتلك النسب مُنخفضة جداً مُقارنة مع الأجنة الجنسية داخل البذور التي تزيد عن 90% عند زراعتها في التربة. تحسنت نسب نجاة الأجنة الجسمية بعد تركيز البحوث في أمثلة (Optimization) لظروف وطرائق زراعتها. يُمكن الإستنتاج عموماً بأن الظروف التي تُسرع من إنضاج الجنين الجسمي تكون من صالح رفع نسب النجاة. يُستنفد الخزين الغذائي من دهون وبروتينات ونشاء عند إنبات الأجنة الجسمية بشكل تدريجي تزامناً مع زيادة الحاجة للطاقة في أثناء الإنقسام الخلوي المُستمر في مرستيمات النمُوات الخُضرية والجذرية الى ان يصبح نبات يقوم بتصنيع غذائه بعملية التركيب الضوئي ويتأقلم تحت ظروف الحقل.

مُستويات السكروز المُضاف:

بهدف إنتاج نُبيتات نشطة، هناك فترة يستغرقها نمو الأجنة ونضجها قبل إنباتها. ولتحقيق ذلك يتم تجهيز الوسط بتراكيز من السكروز تتراوح من 3 الى 6% في الغالب الا أن بعض الحالات الإستثُنائية ولأصناف مُحددة قد تصل النسبة الى 40%. علماً ان التراكيز العالية من السكروز في الوسط قد تُسبب في الذبول الازموزي (Osmotic desiccation) للأجنة بالرغم من وجود بعض الأنواع النباتية التي تحتاج أجنتها الجسمية الى فترة ذبول مؤقت قبل إنباتها. وبالتاكيد هذا أحد مظاهر تقليد الأجنة الطبيعة التي تنضج في النبات الكامل والتي قد تكون إحدى الآليات لتحفيز عمليات الايض الثانوي اللازمة لعمليتي الإنبات ونمو البادرات.

ولغرض الإنتاج التجاري من البذور الصناعية لابُدَ من إتباع وتوافر الشروط التالية:

1- إنتاج الأنسجة الجنينية من أجزاء النبات المطلوب إكثاره أو من خلايا تم تحويرها وراثياً.

2- الإنتاج الواسع من الأجنة الجسمية المُتجانسة.

3- إنضاج الأجنة الجسمية.

4- إضافة مواد غذائية بمثابة سويداء لتجهيز الجنين بالغذاء أثناء عملية الإنبات وإجراء عملية التغليف بمواد غير سامة.

5- خزن البذور الصناعية ولمدد زمنية مُختلفة وحسب الأنواع النباتية.

6- القدرة العالية للتحول (Conversion) من أجنة مُغلفة الى نباتات كاملة سواء داخل مُنشآت الإكثار أو الحقل.

7- يشترط خلو او وجود مُستويات ضئيلة جداً من التغاير الوراثي أو فوق الوراثي في النباتات المنتجة .

8- ان يكون التعبير الجيني مُناسباً ومعلوماً في النباتات الناتجة فيما اذا كانت الأجنة ناتجة من خلايا مُحورة وراثياً.

9- تقييم النباتات الناتجة حقلياً من حيث شكلها المظهري وإنتاجيتها ونوعية الإنتاج.

وبخلاف النباتات العشبية، فان نمو ونُضج الأشجار يتطلب وقتاً طويلاً لإزهارها وتكوين البذور فيها مما يُبرر الحاجة الى إنتاج بذورها من الأجنة الجسمية نسيجياً. وتبرز الحالة أكثر عندما تُعبر الصفة المُحورة وراثياً عن نفسها في الشجرة الناضجة فقط ولتظهر فيما بعد بأنها صفة غير ثابتة أثناء عملية الإنقسام الإختزالي أي لا تنتقل من جيلٍ لآخر، مما يستوجب ألأمر إكثارها نسيجياً لغرض المُحافظة عليها بإعتبار الأخيرة وسيلة مُهمة من وسائل الإكثار السُلالي. ولابُد من الإشارة هنا الى أهمية التجميد الفائق (Cryopreservation) في المُحافظة على التراكيب الوراثية المرغوبة من الأشجار ويُعد ذلك من أهم ميزات إنتاج البذور الصناعية في أنواع الاشجار المُختلفة.

تُحافظ أنواع الاشجار المحفوظة أجزائها أو أنسجتها الجنينية بالتبريد الفائق للصفات التي تم تعديلها وراثياً وإكثارها في أي وقت دون الحاجة الى إنشاء مشاتل والإستمرار بإكثارها. عندما يتم الإنتهاء من إختبار الاجيال من حيث جودتها بالرغم من ان ذلك يحتاج الى وقت طويل خاصة في أشجار الفاكهة، يُمكن إستخراج المادة الوراثية المحفوظة كأن تكون الأنسجة الجنينية او غيرها وإذابتها (Thawing) لكي تُنتج على نطاقٍ واسعٍ وسريع من أجنتها الجسمية.

وفرت التكنولوجيا الحديثة وسائل لحفظ المادة الوراثية خاصة بالتجميد الفائق في درجة حرارة -196 °م بإستعمال النتروجين السائل والجدير بالذكر، فتلك التقانة لاتوفر المادة الوراثية في مدار السنة فحسب بل توفر فُرصة لِتبادل المادة الوراثية بين المؤسسات البحثية والمُختصين وتُعد حفظاً للمادة الوراثية للأجيال القادمة وحفاظاً للتنوع الأحيائي ومنع إنقراض الأنواع وخاصة المُهددة بالإنقراض التي يُطلق عليها (Endangered species).

فصل الأجنة الجسمية عن بعضها Separation of somatic embryos

تُستعمل الأشعة فوق الصوتية (Ultrasound) لتفريق عناقيد الأجنة الجسمية والتي وظفت وبنجاح في فصل أجنة الجزر والبلوط الفليني (*Quercus suber*) والعنب والكرز. صُممت أجهزة خاصة بذلك حيث تعمل بكفاءة عالية فيتم تعيير الجهاز بالنسبة لأجنة الجزر لتعمل على 190 كيلو هرتز (kHz) وبذبذبات 0.5-1.5 واط. ولأجنة الأشجار الكبيرة 175 كيلو هرتز وبذبذبات مقدارها 0.7 واط. تُفصل الأجنة بناءاً الى حجمها بعد تشغيل جهاز الأمواج فوق الصوتية وبإنسيابية حيث أن الجزيئات تكون أصغر بكثير من الأطوال الموجية الصوتية المُستعملة. ولكون الأجنة الجسمية يكون طولها حوالي 1 ملم بينما الطول الموجي الصوتي يبلغ حوالي 7 ملم والتي تمسك الأجنة في الأقطاب (Antinodes) الصوتية لمجال سرعة الصوت حيث تكون الطاقة الصوتية في أدناها ولاتتلف الأجنة نتيجة قوة الصوت. لاتُمسك الأجنة الصغيرة والخلايا غير المُتمايزة لحدٍ كافٍ في الأجهزة المُعتمدة على الإنسيابية والغرابيل لكي تُفرز جانباً. يُمكن أن تحل تقانة فرز الأجنة الجسمية بالموجات فوق الصوتية محل تقانات الغربلة واللتان كلاهما يعتمدان على فرز الأجنة حسب حجمها ولكن الموجات الصوتية أقل ضرراً وكفوءة وتُستعمل حالياً في تخمر الخلايا الحيوانية.

البذور الصناعية أو التركيبية Artificial or synthetic seeds

تُوفر البذور التركيبية أو الصناعية تقانة مُهمة لتطبيقات الأجنة الجسمية لغرض الإنتاج الواسع للنباتات مع إمكانية إنتاجها آلياً من خلال توظيف المُفاعلات الحيوية والمكائن الخاصة ويُمكن أن يُطلق عليها صناعة الإكثار الدقيق (Micropropagation industry). كانت فكرة تغليف الأجنة الجسمية قد بدأت عام 1977 من قبل العالم النباتي موراشيج وأُنتجت أول بذور تركيبية عام 1982 من قبل العالم النباتي الياباني كيتو، ولم يمضي طويلاً حتى أنتج ردنبوغ وفريقه البحثي أول جنين جسمي مُفرد ومُغلف عام 1984 لأجنة جسمية من نبات الجت. أُقترحت أربعة أنواع من البذور التركيبية إعتماداً على طبيعة الجنين الجسمي وتغليفه شملت:

1- أجنة جسمية غير مُغلفة وتم تقليل محتواها الرطوبي (Desiccated) وأُستثمرت في إكثار نبات الاوركيد.

2- أجنة جسمية غير مُغلفة وذات محتوى رطوبي عالي (Hydrated) وطُبقت عملياً في إنتاج أجنة جسمية لنبات الجزر وأُستخدمت في نطاق واسع في البذار الآلي (Fluid drilling).

3- أجنة جسمية مُغلفة وقُللت رطوبتها (Coated and desiccated) ووُظفت في إنتاج البذور الصناعية لنبات الجزر وزراعته في نطاق واسع.

4- أجنة جسمية مُغلفة ورطبة (Coated and hydrated) ووُظفت في إنتاج البذور الصناعية لمحصول الجت العلفي وزراعته في مساحات واسعة.

تغليف الأجنة الجسمية Encapsulation of somatic embryos

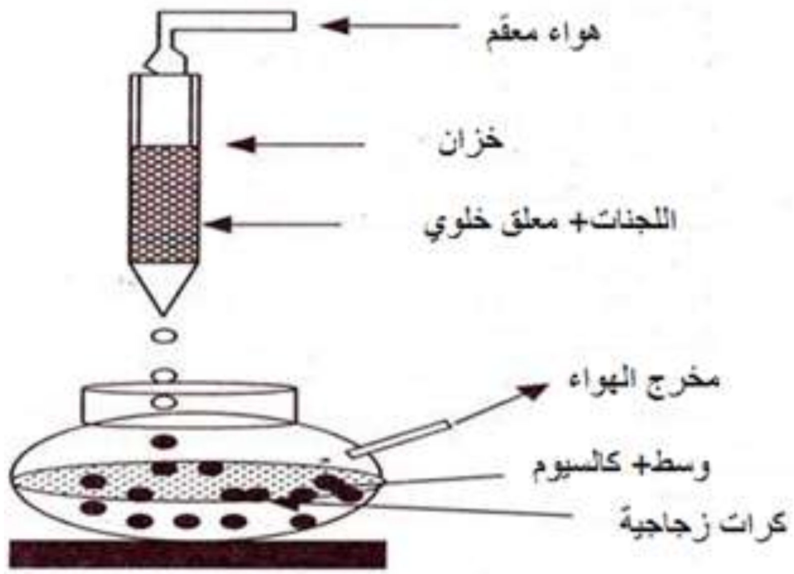
أُستعملت العديد من المواد في تغليف الأجنة الجسمية مثل الأكاروز، اللجنات الصوديوم، الاوكسيثيلين المُتعدد. أُختبرت ثمان مواد في تغليف أجنة الحمضيات، ووجِد بان الاوكسيثيلين المُتعدد كان الافضل في قابليته لتكوين طبقة مُغلفة للجنين الجسمي وللمادة تلك القابلية للذوبان السهل في الماء وليس لها تأثير سلبي في إنبات الأجنة وأُستعملت ذات المادة وبنجاح في تغليف أجنة نبات الكرفس. كرست دراسات عديدة على إنتاج أجنة جسمية رطبة ومُغلفة لنباتي الكرفس والجت وبإستعمال هُلام رطب وخاصة اللجنات الصوديوم وسُوقت نتاجات البحوث في الإكثار الدقيق لهذين النباتين وثبُت إنخفاض كُلفتها في إنتاج نباتات عالية الجودة ومُتجانسة حقلياً في الصفات الوراثية والمظهرية. أُنتجت البذور الصناعية تجارياً للعديد من الأنواع النباتية. ونذكر منها على سبيل المثال لاالحصر، الثوم، السلجم، القرنابيط، الجزر، القطن، الخس، الجت، الرز، الذرة الصفراء، وكذلك العديد من الحشائش وأشجار الغابات والشُجيرات وأشجار الفاكهة ومحاصيل الخضر ونباتات الزينة.

البذور الصناعية المُغلفة بالجيلاتين الرطب Hydrogel encapsulation of artificial seeds

أثبتت البحوث صلاحية الجيلاتين القابل للذوبان في الماء في تغليف الأجنة الجسمية وإنتاج البذور الصناعية. أُستعملت طريقتان في تغليف الأجنة، تتضمن الأولى التغليف بإستعمال مُعقدات من الجيلاتين بطريقة الإسقاط (Dropping) ثم قولبتها (Molding) فعلى سبيل المثال لا الحصر، تُخلط الأجنة الجسمية لنبات الجت مع اللجنات الصوديوم (2% w/v) ومن ثم إسقاطها في محلول نترات الكالسيوم (100mM). تتجمد القطرات تماماً أثناء 30 ثانية لتصبح مُحيطة بالأجنة (شكلا 7.16، 7.17). كانت ولاتزال الأغلفة الرطبة ضرورية للأجنة التي تتأثر عند تقليل رطوبتها أي فقر في تحمُلها لخفض الرطوبة بسبب إنخفاض نسبة تحولها الى نباتات (Poor conversion). لُوحظ عموماً بأن الأجنة الجسمية المُغلفة بهُلام رطب (Hydrogel) لها مُعدلات تحول مساوية تقريباً للأجنة غير المُغلفة عند زراعتها داخل ظروف المُختبر. ومن الأمثلة لتقليل رطوبة الأجنة الجسمية لمحصول الجت، تبين بأن فقد الرطوبة لمُدة 5 أيام في درجة

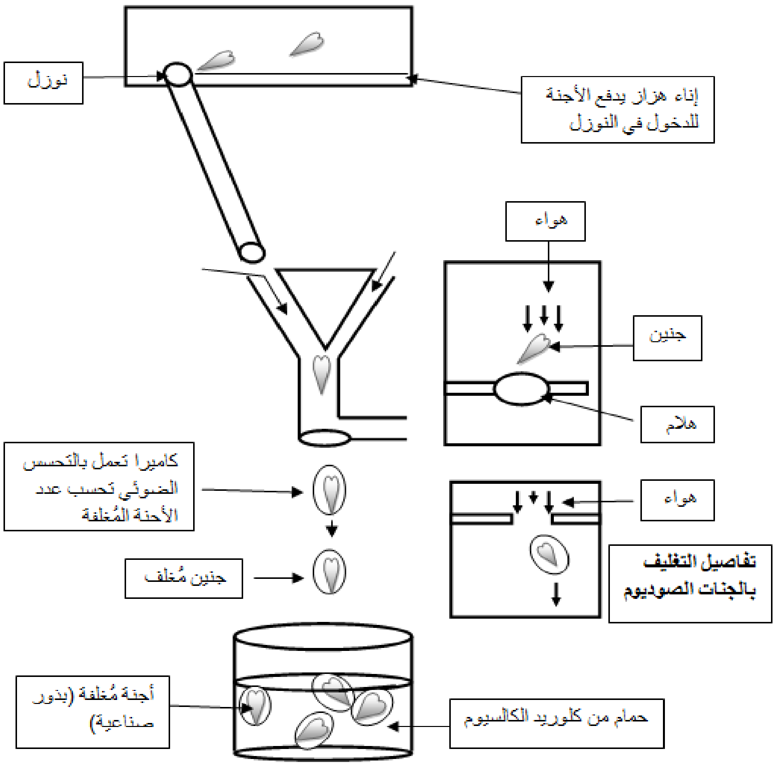
حرارة 20 °م قد أنتج أجنة جسمية لها المقدرة على ان تتحول الى نباتات بنسبة 73%، في الوقت الذي أنتجت الأجنة المُغلفة بمادة ألجنات الصوديوم نسبة تحول مقدارها 62% وكان بالإمكان زيادة نسبة التحول الاخيرة بإضافة الفحم الى الهُلام (ربما سبب في زيادة تنفس الجنين في الوسط).

ومن الأمثلة الأُخرى، فالأجنة الجسمية المُشتقة من الأبواغ الدقيقة من نبات الشعير والتي تم تغليفها بهُلام رطب من اللجنات الصوديوم لتصبح بذوراً صناعية، حصل فيها نسبة إنبات وصلت الى 80% عند مقارنتها بالأبواغ الدقيقة غير المُغلفة والتي لن تزيد نسبة إنباتها عن 62%. من جانب آخر فالأجنة المُغلفة يُمكن خزنها لمُدة 6 أشهر بينما لن تتجاوز مُدة خزن الأجنة العارية عن 3 أسابيع والتأخير عن تلك المدة أدى الى هلاكها. طَورت شركات مُتخصصة ماكنات خاصة لتغليف الأجنة الجسمية بالمواد المُناسبة لنمو الجنين عند بذارها (شكل 7.18) لتكون تلك البذور الصناعية جاهزة للبذار الآلي.



شكل 7.16. تغليف الأجنة الجسمية بالجيلاتين الرطب وإنتاج البذور الصناعية بطريقة مُختبرية.

ويوضح جدول 7.2 بعض أنواع الجيلاتين المُفيدة في تغليف الأجنة الجسمية والتراكيز التي يُمكن إعتمادها لهذا الغرض (جدول 7.3) ونجحت بعد زراعتها في الحقل. مبدئياً من الصعب تقييم عملية التغليف بسبب نوعية الجنين المُغلف فقد تُغلف أجنة ضعيفة النمو أساساً مما قد يؤدي الى عدم حصول الإنبات أو تأخره إضافة الى إنتقاء الجنين في الطوّر غير الصحيح.



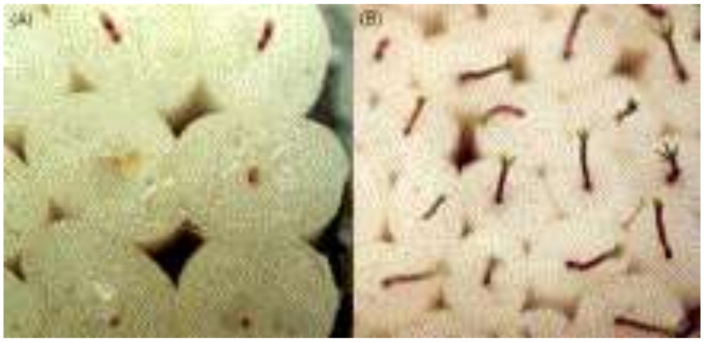
شكل 7.17. مُخطط توضيحي لوحدة مكننة مُخصصة لإنتاج البذور الصناعية.

شكل 7.18. ماكنة تصنيع البذور الصناعية بعد ان تُلقم بأجنة جسمية سبق وان أُنتجت نسيجياً أو داخل مُفاعلات حيوية.

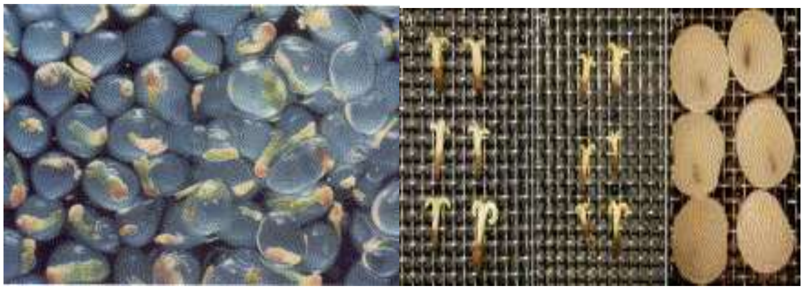
وبالرغم من ذلك فقد أُنتجت بذور صناعية نبتت بشكل طبيعي مكونةً قطبية ثُنائية (Bipolar) وجذر ومحور النمو الخُضري وكذلك فلق. ولكن وكما تمت الإشارة اليه سابقاً فالإنبات ونشوء الأجنة قد يكون غير مُقنعاً. ولهذا كرّست العديد من المُختبرات جُهدها في إنتاج أجنة ناضجة، مُطابقة للنبات ألأم وبنوعية عالية وبالتالي إنتاج بذور صناعية عالية الجودة وبكميات تجارية (الشكلان 7.19، 7.20) وتُحقق الهدف بعد ان أصبح المُقياس هو نشوء الجنين الى نبات كامل بعملية أُطلق عليها بالتحول (Conversion).

جدول 7.3. بعض أنواع الجيلاتين المُستعملة في تغليف الأجنة الجسمية وتراكيزها

نوع الجيلاتين	التركيز % (وزن/حجم)	عامل تكوين المعقد	التركيز (mM)
Sodium alginate	5.0-0.5	أملاح الكالسيوم	100-30
Sodium alginate+gelatin	2.0	كلوريد البوتاسيوم	100-30
Carrageenan	0.8-0.2	البوتاسيوم	500
Locust bean gum	1.0-0.4	كلوريد ألأمونيوم	500
Gelrite	0.25	تقليل درجة الحرارة	

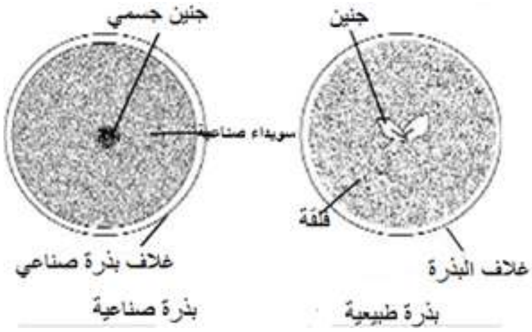


شكل 7.19. أجنة مُغلفة ذات نوعية مُتجانسة يُمكن إعتمادها كبذور صناعية عالية الجودة.

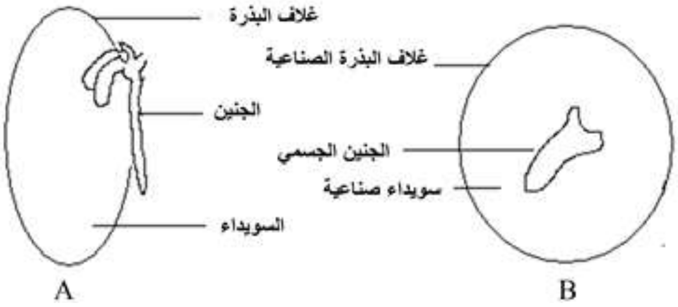


شكل 20.7. أجنة جسمية مُجففة Desiccated somatic embryos (يمين) وأجنة جسمية مُغلفة وغير مُغلفة (يسار).

ويوضح الشكلان 7.21 و7.22 الفروقات التركيبية بين البذور الصناعية والطبيعية بعد عمل مقاطع عرضية وطولية لكليهما حيث تبرز أوجه التشابه بين الإثنين عدا إحاطة الجنين الجسمي بمُغذيات تركيبية تجهزه بالمواد الغذائية لحين إكمال إنباته لكي يعتمد على بذاته بعد ان يصبح نباتاً كاملاً يقوم بعملية التركيب الضوئي.



شكل 7.21. مقطع عرضي لبذرة طبيعية وآخرى صناعية.



شكل 7.22 (A) مقطع طولي لبذرة حقيقية من ذوات الفلقتين. (B) مقطع عرضي لبذرة صناعية ويُلاحظ فيها تغليف الجنين الجسمي بطبقة من الهُلام وبغشاء أو غلاف كارهٍ للماء.

تم إضافة أغلفة من مُغذيات ومُبيدات ومواد خاملة ليصبح حجم البذرة مناسباً للبذار الآلي (شكل 7.23). تُباع البذور التركيبية في نطاق تجاري وتحت تسميات مُختلفة منها مقذوفات البذور (Seedbombs) وكما في شكل 7.24.

البذور التركيبية قليلة الرطوبة غير المُغلفة Uncoated desiccated synthetic seeds

بُذلت جهود كبيرة في تطوير بذور صناعية منخفضة المحتوى الرطوبي بعد ان كان الإعتقاد سابقاً بان تجفيف او تقليل المحتوى الرطوبي للأجنة الجسمية قد يؤدي الى تلفها وبمُعدلات تحول الى نباتات مُنخفضة جداً (جدول 7.4). تحقق أول نجاح في تحسين التحول من أجنة جسمية الى نباتات بعد خفض رطوبة اولى في نبات العنب وكان ذلك مُشجعاً لتطبيق التقانة على أجنة جسمية لنباتات أُخرى.

شكل 7.23. بذور صناعية مغلفة بالاسمُد ومبيدات لتصبح بحجم مُناسب لبذارها ميكانيكياً.

شكل 7.24. مقذوفات البذور لمجموعة واسعة من الأشجار والشُجيرات ونباتات زينة ونباتات برية المُنتجة في نطاق واسع ولإغراض التشجير (اليمين) وكذلك توفرها للمزارعين والهواة من خلال ماكنات مُتوفرة في الأسواق المحلية.

عند تقليل المحتوى الرطوبي في أجنة محصول الجت مثلاً الى 8 – 15%، إحتفظت بحيويتها بعد خزنها لمدة 12 شهراً تحت ظروف الرطوبة النسبية وحرارة الغرفة. ومع التقدم العلمي تبين بأن الأجنة الجسمية المُجففة لنسب رطوبة معقولة أكثر حيوية من نظيراتها غير المُجففة وأطول عمراً وتبقى حيوية وطول فترة خزن البذور التركيبية أقل مما هو عليه في البذور الطبيعية.

البذور التركيبية الرطبة غير المُغلفة Uncoated hydrated synthetic seeds

أُستعملت الباذرات أو قاذفات الهُلام (Fluid drilling) في زراعة المساحات الواسعة بأجنة جسمية رطبة وغير مغلفة. كان الجزر أول المحاصيل التي تم تجريب إنتاجها بهذه الطريقة ورش أجنته الجسمية المخلوطة مع الهُلام وحققت نسبة تحول (نجاح) الى نباتات بلغت 40% تحت ظروف البيت الزجاجي. نجحت التقانة في إنتاج بذور محاصيل مختلفة منها الطماطم، الفلفل، الرقي، البطيخ، الخس، الكرفس والبطاطا الحلوة.

جدول 7.4. تأثير خفض رطوبة الأجنة الجسمية في إنباتها وتحولها الى نباتات

النوع النباتي	رطوبة الجنين/أو الرطوبة النسبية	فترة الجفيف	% تحول المُجففة	% تحول غير المُجففة
كرفس	12% محتوى رطوبي	3 أيام	86	مُنخفضة
جزر	لم تحدد	6.5 ساعة	3	لم تسجل
فول الصويا	75% رطوبة نسبية	4-7 يوم	79	98
جت	20% رطوبة نسبية	20 يوم	33	21
الحنطة	10% رطوبة	37 يوم	33	6

تُبذر البذور الصناعية للمحاصيل التي تُزرع في مساحات واسعة بالباذرات (شكل 7.25) بينما تُخلط مع مواد هُلامية وتُرش في المناطق الوعرة وصعبة الوصول (شكل 7.26).

شكل 7.25. باذرة ميكانيكية تُستعمل لبذار البذور الطبيعية أو الصناعية على نطاق واسع.

شكل 7.26. توظيف البذور الصناعية في زراعة المساحات صعبة الوصول اليها بهدف زيادة الغطاء النباتي.

البذور التركيبية المجففة والمُغلفة Coated desiccated synthetic seeds

لعل البذور التركيبية عند تقليل رطوبة أجنتها الجسمية وتغليفها، تكون أشبه بالبذور الطبيعية. كانت البدايات الاولى مع أجنة الكرفس والجزر بعد تغليف أجنتهما بمادة الاوكسي اثيلين المُتعدد وتقليل مُحتواهما

الرطوبي وحققا نسب تحول زادت عن 80%. تضاف أسمدة ومُبيدات لكي يُكبر حجمها وكما تم توضيحه في شكل 7.21 وتصلح للبذار الآلي وكما أُشير اليه سابقاً.

عيوب البذور الصناعية Dismirits of synthetic seeds

على الرغم من الفوائد الكبيرة التي حققتها البذور التركيبية وماستُحققه مُستقبلاً من زيادة الغطاء النباتي وتنوعه وتقليل التصحر وتقليل كُلف الإنتاج، ظهرت بعض المُحددات التقنية التي يُمكن تجاوزها مستقبلاً مع تطور البحث العلمي والمكننة. ندرج أدناه أهم تلك المُحددات:

1- إنخفاض التبادل الغازي في الأجنة الجسمية المُغلفة مع إنخفاض في مُعدلات تحولها الى نباتات مع زيادة نسبة الهُلام. سُجل إنخفاض حاد في مستوى الاوكسجين داخل هُلام ألجنات الكالسيوم على سبيل المثال وكانت 70% من كرات ألالجنات وهذه خالية من الاوكسجين. الحل يكون بزيادة مُحتوى الكرات المُغلفة للأجنة بالاوكسجين وأُستعملت مواد كيميائية زيتية (Perfluorochemicals) لتكن حوامل للاوكسجين بعد خلطها مع الهُلام. العديد من البوليمرات لاتزال تحت الإختبار ومن المؤمل ان تحل المشكلة.

2- الحاجة الى خبرة ورأسمال وإنشاء مُختبرات موقعية في البلدان والمناطق المُتخصصة في إنتاج محصول ما مع ضرورة تطوير البُنية التحتية من طرق ومخازن مُبردة ووسائل نقل مُبردة ومصادر طاقة كهربائية مُستمرة وغيرها. تُعد هذه النقطة من أهم التحديات التي تواجه التطور الزراعي في البلدان غير المُتطورة.

ألإنتاج الواسع من البذور الصناعية Large scale production of synthetic seeds

تزداد الحاجة الى البذور التركيبية مع زيادة السكان والرقعة الزراعية لتكن ملايين بل بلايين من أجنة المحاصيل الحقلية والبستنية والتي لايُمكن إنتاجها الا من خلال مُفاعلات حيوية ذات حجوم مُناسبة بالرغم من أن الدلالات العلمية تُشير الى زيادة نسبة التحول في الأوساط الصلبة أكثر من السائلة (المُفاعلات). تبرز حاجة مُلحة عند الإنتاج الواسع في تطوير طرائق التغليف بحيث تُناسب البذار الآلي ولمُختلف أنواع الأجنة. يوضح شكل 7.18 طريقة مُبسطة لإنتاج الأجنة الجسمية وفيها تتحرك الأجنة الجسمية في إناء هزاز لتسقط الأجنة واحدٌ تلو الآخر ويُغلف بمادة ألجنات الصوديوم. تُراقب حركة الأجنة والهواء وتكوين الهُلام من خلال حساسات تُربط في الجهاز المُوضح في الشكل 7.17.

الفصل الثامن: التغاير الجسمي وانتاج الكايميرا

Somaclonal Variation and Chimera Production

التغاير الجسمي Somaclonal variation

يُطلق على النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية بالسلالات الجسمية (Somaclones). ووردت لها تسميات أُخرى في اللغة الإنكليزية مثل Calliclones و Protoclones وسُمي التغاير الذي يحصل فيها بالتغاير الجسمي (Somaclonal variation). أول من تعمق في دراساته في هذا الموضوع الباحثان لاركن وسكوكروفت (Larkin & Scowcroft) عام 1981. بالرغم من أن مُصطلح التغاير الجسمي الأكثر إستعمالاً، لكن توجد سجالات بين المُختصين فيُسميه البعض Gametoclonal variation مُستدلين بالتسمية للتغاير الحاصل في الأجيال الناتجة من زراعة حبة اللقاح. يُشير مُصطلح التغاير الجسمي عموماً الى التغايرات الحاصلة في النباتات الناتجة من زراعة الكالس، أجزاء النبات المُختلفة ومن زراعة البروتوبلاست. جلبت تلك التغايرات إهتمام الباحثين بالنظر لأهميتها في برامج تحسين النبات.

تنقسم خلايا النبات عند زراعة أنسجته لتتحول من مُتمايزة الى غير مُتمايزة وتعطي أفراداً قد يكونوا مُتغايرين مورفولوجياً، مُختلفين في أعداد وتركيب الهيئة الكروموسومية، أجيال عقيمة، أجيال ذات صفات كمية ونوعية مرغوبة. تحصل مجموعة من الحالات غير الطبيعية عند تحول الخلايا من مُتخصصة الى غير مُتخصصة وبالعكس متأثرة بمجموعة عوامل بيئية أهمها مُكونات وظروف الوسط الزرعي، أمثلة على تلك الحالات طفرات في جين مفرد (Single gene mutations)، زيادة في نشاط عناصر مُتنقلة (Activation of transposable elements)، كسور كروموسومية (Chromosomal breakage). أُقترحت العديد من الفرضيات في أسباب حصول التغاير الجسمي إضافةً الى ما سبق منها حصول طفرات مُختلفة مُباشرة وغير مُباشرة تتعلق بتغييرات عديدة في الدنا خاصةً مثيلة الدنا (DNA methylation).

تحصل في المزارع الخلوية المُنماة لفترة طويلة، تغايرات مظهرية (Phenotypic variability) لتشمل تغييرات في النواة ودنا العضيات الأُخرى اي دنا الكلوروبلاست والمايتوكوندريا، وهذا ما تم ملاحظته في النباتات التي أُخلفت (Regenerated) من مزارع الكالس. سُجلت كذلك تغايرات حتى في أعداد الكروموسومات ليس في خلايا الكالس فحسب بل في النباتات التي أُخلفت منه. إستنتج بيريك (Pierik) في دراساته المُعمقة عن أسباب نشوء التغايرات الجسمية خارج وداخل الجسم الحي وإستنتج بانها غير قابلة للرجوع (Irreversible) لحالتها الأصلية وثابتة وراثياً اذا ما تورثت الى الأجيال القادمة. ووصف الحالات

التي تكون فيها التغايرات مؤقتة وقابلة للرجوع (Reversible) الى حالتها الأصلية ولا تورث الى الأجيال اللآحقة بانها تغايرات فوق وراثية (Epigenetic or transient variations) والتي تعود الى أسباب مظهرية ولم يعدها بيريك نوع من التغاير الجسمي ولها أهمية محدودة في تحسين النبات (جدول 8.1). بالمُقابل فالتغاير الوراثي (Genetic variation) له دور جوهري في برامج تحسين النبات.

جدول 8.1. معيار تصنيف التغاير في المزارع النسيجية على أساس وراثي وفوق وراثي

الخصائص	**وراثي**	**فوق وراثي**
مَديات حصول التغاير	واطئ 10^{-5} الى 10^{-7}/خلية/جيل	عالي 10^{-3}/خلية/جيل
طبيعة التغيير	عشوائي	مُباشر
ثباتية التغيير في الأجنة	مُستقر في الغالب	مُستقر لكن قابل للرجوع بمُعدلات عالية
الإنتقال الجنسي للتغيير	نعم يتوارث	لا يتوارث

مصدر وأسباب التغاير الجسمي Source and causes of somaclonal variation

تشتمل العوامل المُحددة في فرصة حصول الطفرات ومَديات حصولها فيما يلي:

1- طريقة الإكثار الخضري المُستعملة في إكثار نبات ما.

2- فيما اذا كان جزء النبات الذي تم إكثاره من أصل كايميرا ام لا.

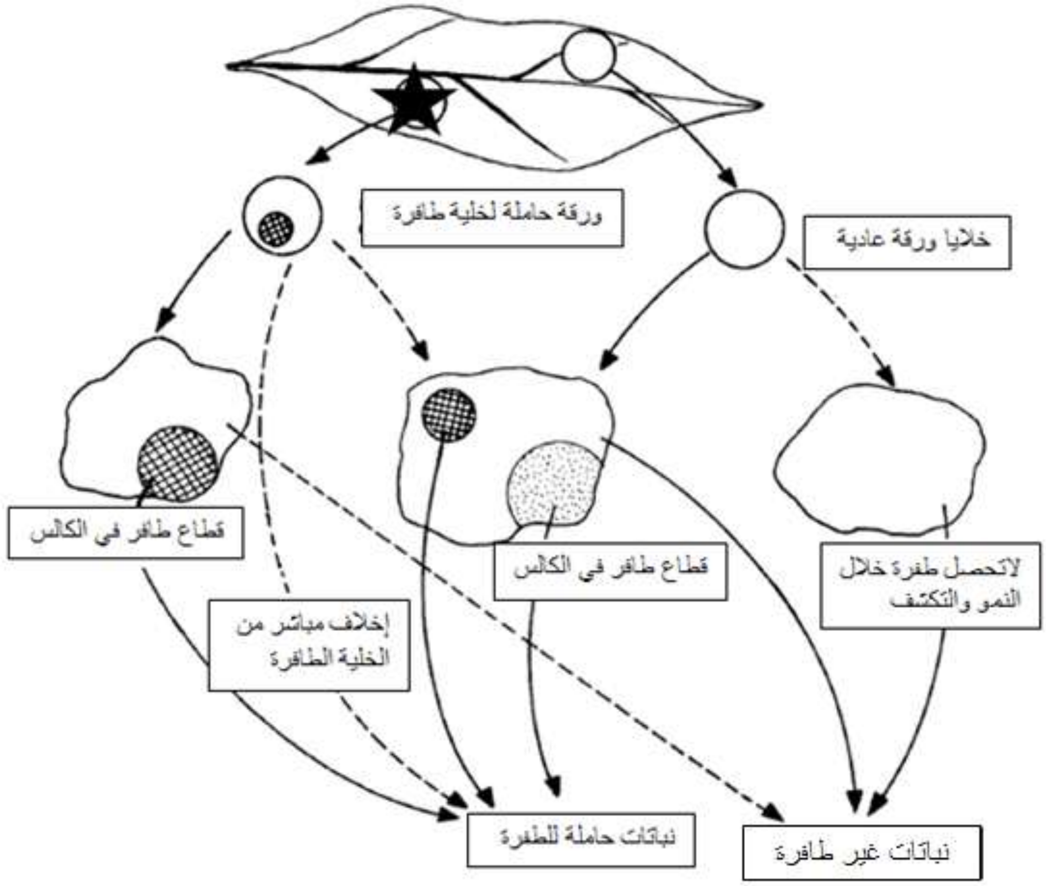
3- نوع مُنظمات النمو المُضافة.

4- طبيعة النسيج المُستعمل في الإكثار.

5- المادة النباتية التي بدأ بها برنامج الإكثار.

6- عدد مرات تقطيع الكالس وزراعته في وسط جديد (Number of subcultures).

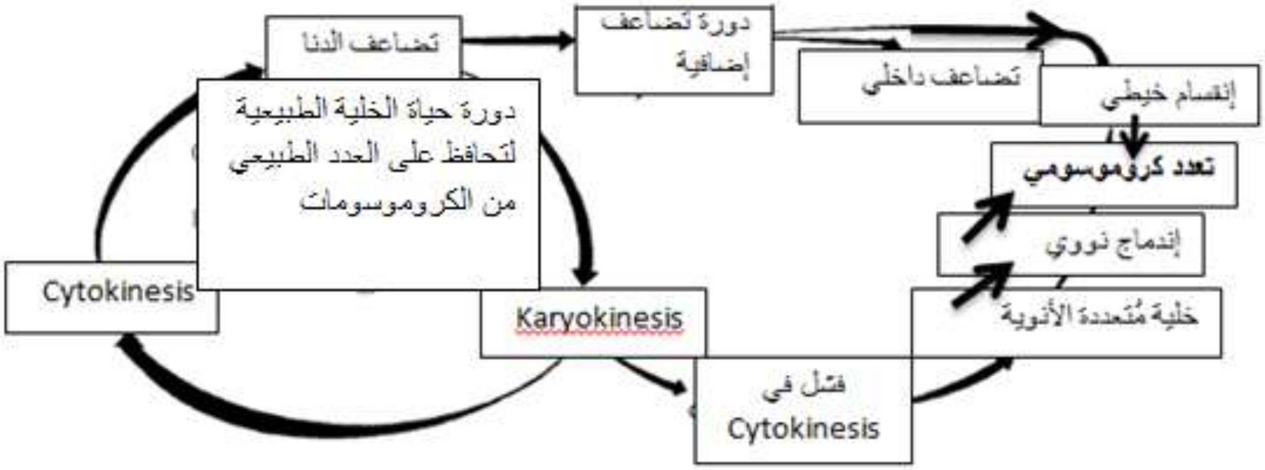
قد يُعزى التغاير الجسمي الناتج الى أسباب أُخرى غير التي سبق ذكرها مثل وجود تلك التغايرات أصلاً في الجزء النباتي (Pre-existing variation) في الخلايا الجسمية للجزء النباتي أو تغايرات تحصل أثناء مراحل الزراعة النسيجية واحياناً يُسبب كلا العاملان في حصول التغاير(شكل 1.8).



شكل 8.1. أصل التغاير الوراثي في النباتات الناشئ من جزء الورقة المزروع نسيجياً.

مُستوى التضاعف للمادة النباتية قد يلعب هو الآخر دوراً في تحفيز التغاير الجسمي. فمُستوى التعبير للتغاير في الأجزاء النباتية المفصولة من الأنسجة المرستيمية سواء كانت من براعم طرفية أو جانبية قليلا مُقارنةً بالنباتات التي يتم إخلافها من الأنسجة غير المرستيمية. تنقسم الخلايا المرستيمية إنقسام خيطي طبيعي وتُحافظ على مُستوى التضاعف الكروموسومي أي تبقى 2n . في الوقت الذي تكون فيه الخلايا من مصادر غير مرستيمية مُشتقة أصلاً من خلايا مرستيمية قد تخصصت وفي أثناء تخصصها لاتنقسم بطريقة الإنقسام الخيطي العادي كما تفعل المرستيمية بل تدخل في حالة من تضاعف الدنا (DNA duplication) وإعادة تضاعف داخلي (Endoreduplication) مما يؤدي الى تكوين كروموسومات بثمانية كروماتيدات

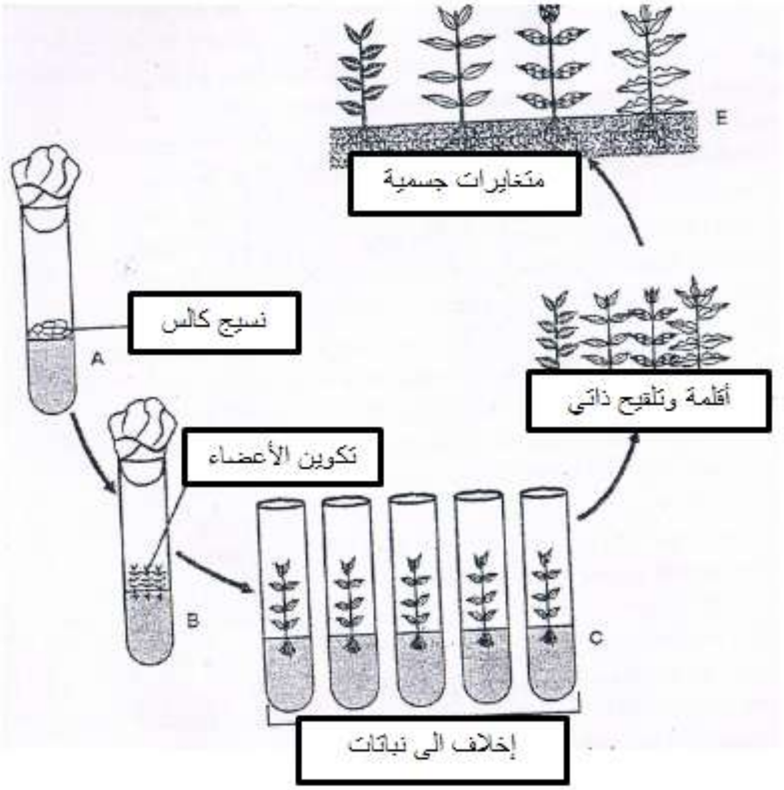
والتي يُطلق عليها Diplochromsomes وكذلك حالة تعدد الكروموسومات (Polychromosomes) أو ما يُسمى Polytene condition (شكل 8.2). عندما تُحفز خلايا من مصادر مُختلفة للإنقسام في المزرعة، تحصل تغيرات في أعداد الكروموسومات أثناء عملية تكوين الأعضاء (Organogenesis) او تكوين الأجنة (Embryogenesis).



شكل 8.2. دورة حياة الخلية الطبيعية والإنحرافات التي تحصل فيها والتي تؤدي الى تعدد كروموسومات الخلايا في الطبيعة دون تدخل الإنسان.

تُعبر تلك التغييرات في أعداد الكروموسومات عن لذاتها كتغاير جسمي وعند إخلافها الى نباتات كاملة تظهر درجة عالية من التغاير المظهري (شكل 8.3). يؤثر عُمر الجزء النباتي هو الآخر في تغاير النباتات الناتجة من الزراعة النسيجية فقد كشفت الدراسات الخلوية وجود الكثير من التشوهات الكروموسومية في النبات الكامل وخاصةً تلك الناتجة من عزل وزراعة البروتوبلاست.

تؤثر مُنظمات النمو في دورة حياة الخلية مُسببةً عدداً من التغايرات والتي تم إفتراضها في شكل 8.4. وتلعب درجة حرارة حضن الزروعات، الضوء، الاوزموزية ورج مزارع المُعلقات الخلوية دوراً جوهرياً في تحفيزالتغاير الجسمي. وخلاصةً فتلك المؤثرات تُسبب تغييرات في دورة الخلية وتُعد السبب الرئيسي في حصول التغايرات.



شكل 8.3. خطوات تحفيز التغاير الجسمي الذي يبدأ من تحفيز الكالس (A) ونشوء الأعضاء والإخلاف والأقلمة. تُلقح النباتات الناتجة من المزارع النسيجية ذاتياً ويُسجل التغاير في الجيل الأول سواء كان مظهري أو وراثي.

إنتخاب التغايرات الجسمية المفيدة Selection of useful somaclonal variants

هناك وسيلتان لإنتخاب الطوافر الجسمية أولهما؛ الإنتخاب في المُستوى الخلوي بعد زراعة الخلايا لفترات زمنية مُختلفة وبعدها تُغربل للصفات المُفيدة كمُقاومة مُبيدات الأعشاب، سموم الفطريات، الملوثات، درجات الحرارة المُتطرفة، الملوحة وغيرها ومن ثم يُعاد إخلاف تلك الخلايا الى نباتات كاملة. يتضمن الإنتخاب بالطريقة الثانية إختيار النباتات بعد إخلافها وفق أُسس مظهرية. تفيد الطريقة الاولى في المُستوى الخلوي كثيراً لكون ملايين من الخلايا يُمكن ان تُغربل بجهد بسيط ومكان صغير ومُستلزمات قليلة. لايمكن إنتخاب كافة الصفات في المُستوى الخلوي كصفات الزهرة وحاصل البذور كما ان الأشكال المظهرية في المُستوى الخلوي ليس بالضرورة ان تظهر على مُستوى النبات الكامل وبذلك يجب التأكد من ثباتية الصفة المُنتخبة في مُستوى الخلية والنسيج وفي مُستوى النبات الكامل.

بيئة الزراعة النسيجية

↓

حصول ارباكات في فسلجة الخلية مثل عدم التوازن النيوكليتيدي

↓

تحويرات في الدنا مثل عملية المثيلة

تغييرات في تركيب الكروماتين | تحويرات في قاعدة معينة

تضاعف متأخر	تغاير في الصفات الكمية	تفعيل العناصر المتنقلة	طفرات في جين منفرد
يسبب في تكسير		1- إدخالات	* تغيير في القواعد
الكروموسومات		2- قطوعات	* أو إحلال
1- إعادة تنظيم معتمد		3- كسور كروموسومية	* حذف
على توزيع ومستوى			* تضاعف
تضاعف الكروماتيدات			
المختلفة			
2- نوع الكروموسوم، كسر،			
دمج، تكوين جسور في أثناء			
الإنقسام الإختزالي			

شكل 8.4. فرضية تحويرات الدنا نتيجة طفرات مختلفة تؤدي بالنهاية الى تغاير جسمي.

عزل وتقويم الطوافر الجسمية Isolation & assessment of somaclonal variants

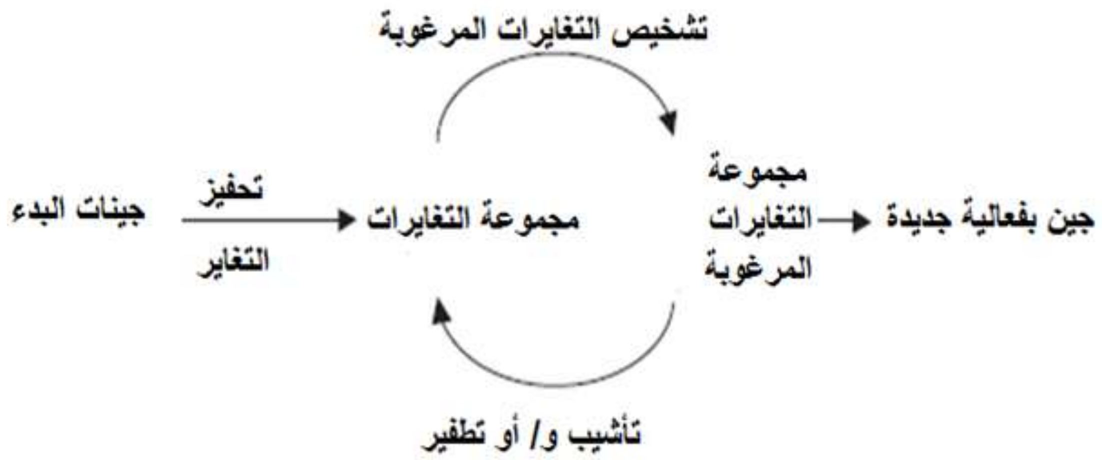
تُعد عملية عزل الطوافر وتقويمها عملاً ليس بالسهل بالنظر لكثرة وتنوع العوامل المؤثرة في تحفيز تكوين الطوافر ولذلك لابُد من ان يكون العزل والإنتخاب وفقاً لصفات مظهرية وفسلجية ووراثية (شكل 8.5).

1- المعايير المظهرية Morphological or Phenotypic parameters

تشمل المعايير المظهرية الصفات النوعية للنبات الطافر مثل حجم وشكل الورقة وإرتفاع النبات، وصفات نوعية مثل نمط تفرع النبات، لون الزهرة وغير ذلك.

2- المعايير الفسلجية Physiological parameters

تشتمل أنماط البروتين، كمية الإنزيمات، أنواع المُركبات الثانوية وغيرها.



شكل 8.5. مُخطط يوضح بدء عمل الجينات في تحفيز التغاير الوراثي لكي يتم تشخيص التغاير المرغوب ومن ثم تحديد الجين الذي يُعبر للصفة الجيدة. يُلاحظ إمكانية الإستفادة من مجموعة الصفات الجيدة لإعادة تأشيبها أو تطفيرها والحصول مرة ثانية على مجموعة من التغايرات المُفيدة.

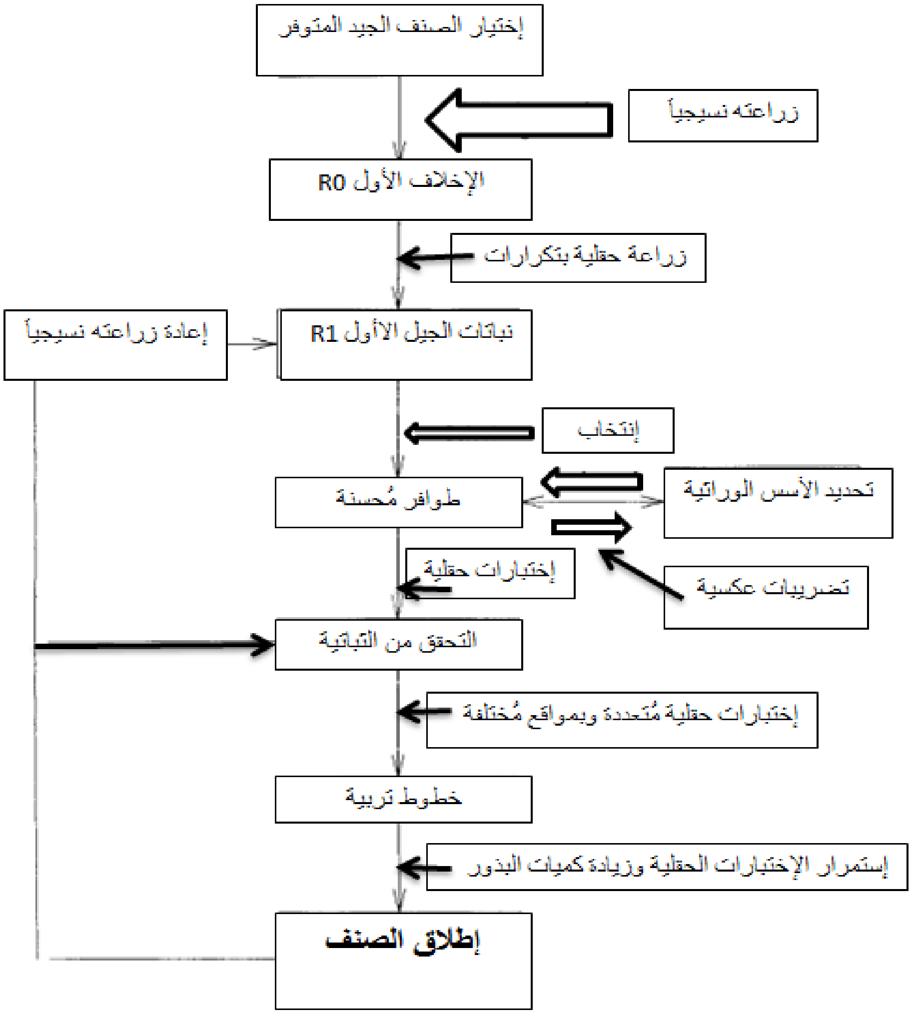
3- المعايير الوراثية Genetic parameters

وتشتمل أعداد الكروموسومات وتركيبها وتصبيغها والتغييرات الحاصلة فيها، التحري عن التغاير في دنا الطافر بإستعمال RFLP، RAPD وغيرها. أُقترحت إستراتيجية لإنتخاب الطوافر الجسمية المُتغايرة من أجل الإستفادة منها في برامج تحسين النبات (شكل 8.6) تبدأ بإنتخاب الصنف المُتوفر محلياً وزراعته نسيجياً وإخلافه ومن ثم إكثاره حقلياً بمُكررات وإنتاج بذور الجيل الأول منها وإنتخاب الطوافر المُحسنة وإخضاعها الى إختبارات حقلية وبمواقع مُختلفة. يستمر برنامج التحسين والحصول على خطوط تربية لحين إطلاق الصنف الى المزارعين.

المشاكل المُرتبطة بالتغاير الجسمي Problems associated with somaclonal variation

ترتبط بالتغاير الجسمي الذي يحصل عند زراعة النبات نسيجياً العديد من المشاكل التي تُمثل عائقاً لبرامج تحسين النبات يمكن تلخيصها كما يلي:

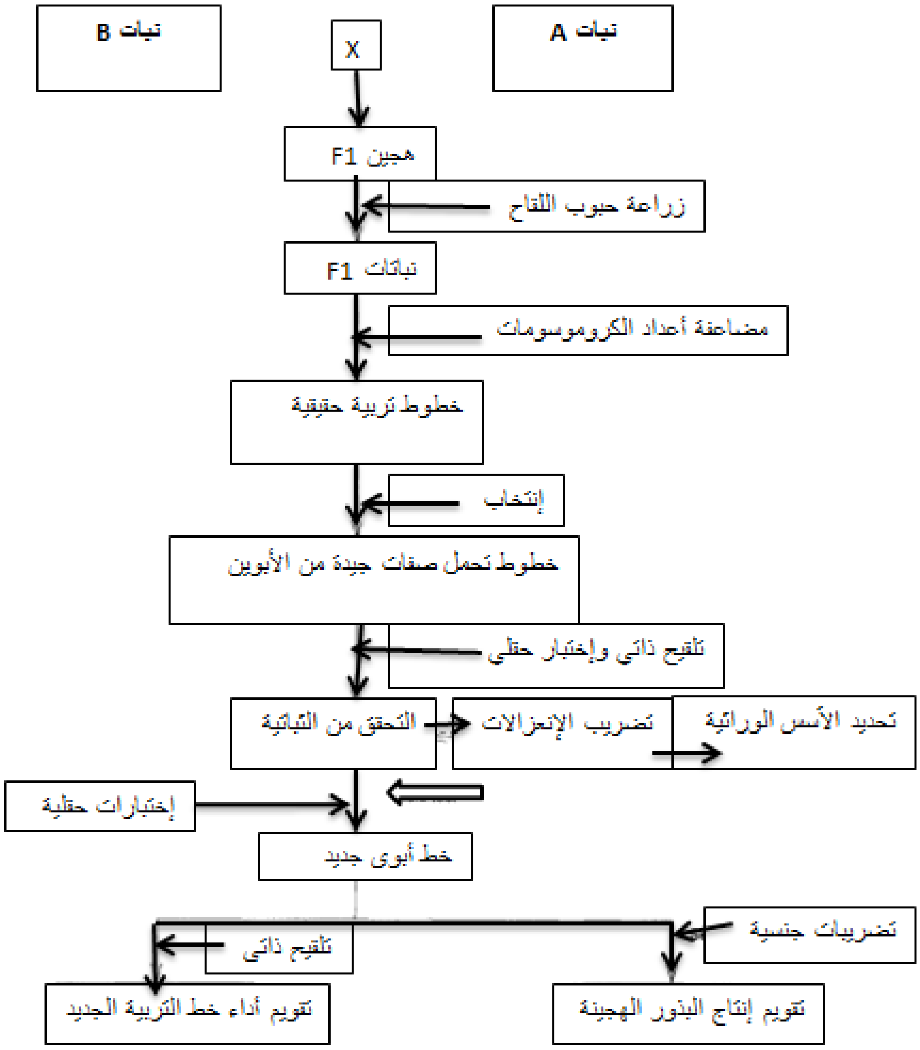
1- التغاير المُعتمد على الصنف Cultivar dependent variation: سُجلت حالات من التغاير في صنف مُعين لنوع نباتي مُعين ولكن لن تُسجل في صنف آخر من نفس النوع.



شكل 8.6. إستراتيجية إنتاج الطوافر الجسمية في تطوير أصناف جديدة.

لذلك فمن الصعب الحصول لذات التغاير لصنف ما في الأصناف الاخرى وهذا عائقاً لإدخال تلك الصفة ان كانت مُفيدة في النوع النباتي طالما انها مُعتمدة على الصنف. أُعتمدت ايضاً إستراتيجية الإعتماد على التغايرات في الأمشاج الذكرية وزراعتها من هجن تضريبات بين صنفين معلومين (شكل 8.7). تُنتج نباتات

1n ويتم مُضاعفة أعداد كروموسوماتها لإنتاج نباتات نقية وراثياً. تُنتخب الخطوط ذات الصفات الجيدة من الصنفين اللذين تم تهجينهما سابقاً، يتم إجراء التلقيح الذاتي لتلك الخطوط وتُختبر حقلياً ويتم التحقق من ثباتية الصفة وتحديد الأُسس الوراثية لخطوط التربية وفي الغالب يصحبها تضريبات بين الإنعزالات الناتجة والتي تخضع لإختبارات حقلية ومُلاحظة أداء الخطوط الجديدة وإخضاعها للتقويم وإنتاج بذور الهُجن.



شكل 8.7. إستراتيجية تطوير أصناف جديدة بإستثمار زراعة حبوب اللقاح بعد تضريب صنفين يحملان صفات جيدة.

المُلاحظ ايضاً وعند مُشاهدة أو إكتشاف وجود تغاير جسمي في تجربة ما في نطاق صغير، ليس بالضرورة ان تظهر تلك الصفة عند إعادة نفس التجربة أو مُحاولة إنتاج خطوط خلوية منها في نطاق واسع

ولربما تختفي الصفة في النبات الكامل بعد إخلافه من المزارع النسيجية. وخلاصةً، ليس من السهولة الإستفادة من التغايرات في مجال تحسين النبات.

2- إختلاف في تكرار عدد مرات حدوث التغاير Variation in frequency change: بالرغم من عدم وجود معايير قياسية لقياس التغاير الجسمي، لكن يُمكن إستعمال الصفات المظهرية، الترحيل الكهربائي للبروتينات والإنزيمات وكذلك إستعمال طرائق جزيئية حساسة مثل RFLP، RAPD، SSR وغيرها. عندما تكون هناك العديد من العوامل المؤثرة مثل الهيئة الوراثية للنبات، مُستوى التضاعف، عمر المزرعة النسيجية، مصدر المادة النباتية الأولية، نوع وتركيز مُنظمات النمو المُضافة الى الوسط الغذائي وغيرها مؤثرة في التغاير، فإمكانية تجلي التغاير تختلف باختلاف الأصناف ولربما بين نباتات الصنف الواحد وبذلك يكون مجال إستثمار الطوافر محدود جداً في برامج تحسين النبات.

3- التغايرات غير المرغوبة Undesirable variations: أصبح من المعلوم بأن التغاير المطلوب ليس تحت السيطرة المُباشرة وعند مُحاولة تحفيزالتغاير لصفة مرغوبة ما، ترافقها العديد من الصفات غير المرغوبة.

4- تغييرات غير مُستقرة Unstable changes: غالباً ما تكون النباتات الناتجة نسيجياً أقل نشاطاً وإنتاجيةً من مثيلاتها غير النسيجية. يرجع عدم الإستقرارية في النمو، الخصوبة، النشاط وغيرها الى التغاير الذي يحصل في أعداد الكروموسومات وتركيبها والنشاط الجيني. عدم الإستقرارية هذه غير مرغوبة عند زراعة أعداد كبيرة من السُلالات الجسمية (Somaclones).

5- التغييرات ليست جديدة (Changes are not novel): برهنت العديد من التغايرات المُتحققة من برامج تربية وتحسين النبات بالطرائق التقليدية كالتضريبات المُتباعدة أو الطفرات، أفضل من تلك التي عبرتها السُلالات الجسمية وبذلك لا يُعول مُربوا النبات التقليديون كثيراً على التغاير الجسمي في برامج تحسين النبات.

تطبيقات التغاير الجسمي Applications of somaclonal variation

تتجسد قيمة التغاير الجسمي في المحاصيل التي تتكاثر جنسياً ولكن تغايرها يكون محدوداً وكذلك في الأنواع التي تتكاثر خضرياً حيث يكون من الصعب إنتاج أنواع جديدة من تلك النباتات. سُجِلَ التغاير الجسمي خارج الجسم الحي في أعداد كبيرة من النباتات لتشمل الحنطة، الرز، الذرة الصفراء، الطماطم، الجت،

البطاطا، قصب السكر وغيرها (جدول 8.2). كان من ضمن السُلالات الجسمية الناتجة والتي نتجت من التغاير الجسمي نباتات قصيرة، تبكير بالتزهير، عقيمة ذكرياً، تَحمُل الإجهادات مثل الجفاف، البرودة، الملوحة وكذلك المُقاومة للمُسببات المرضية والآفات وسمومها (جدول 8.3). لوحظت مُتغايرات جسمية في نباتي الخردل الصيني *Brassica juncea* وسلجم الطيور *B. rapa* في الجيلين الثاني والثالث مثل إرتفاع النبات، لون الأزهار، نمط توزيع الصبغات في أجزاء النبات، عدد الأيام اللآزمة لبدء نشوء الأزهار، العُقم الذكري وفترة نُضج النبات. سُجِلت مجموعة كبيرة من التغايرات الجسمية في العديد من النباتات البستنية مثل اللوليوم، الجيرانيوم وغيرها وتم إطلاق العديد من النباتات نتجت من تغاير جسمي الى الأسواق وخاصة أسواق الزهور.

جدول 8.2. أنواع من المحاصيل تم تطويرها من خلال إستثمار التغاير الجسمي

المحصول	الصفة الجديدة
قصب السكر	زيادة الحاصل، مُقاومة الأمراض
ذرة الصفراء	زيادة محتوى التربتوفان
بطاطا حلوة	اللون، الشكل، تحسين نوعية الخبز
طماطم	مُحتوى المادة الجافة
رز	زيادة الإنتاج، مُقاومة الأمراض
كرفس	كفاءة الإنتاج، تحسين الصفات التصنيعية
خردل	زيادة الإنتاج

فعلى سبيل المثال لاالحصر، أُنتجت نباتات ذات صفات مُحسنة من نبات الكرفس ذو الأوراق كثيرة التجاعيد، الجزر الحلو، طماطم صلدة مع تغيير في صبغاتها، بطاطا مُقاومة للأمراض، فراولة وخس وذرة صفراء. بالرغم من حماس علماء النبات في إستنباط أصناف جديدة مُستثمرين التغاير الجسمي في تحسين النبات، الا أن إنتقادات ظهرت في الأمد البعيد بسبب عدم ثباتية العديد من الصفات لأجيال عديدة. وبالرغم

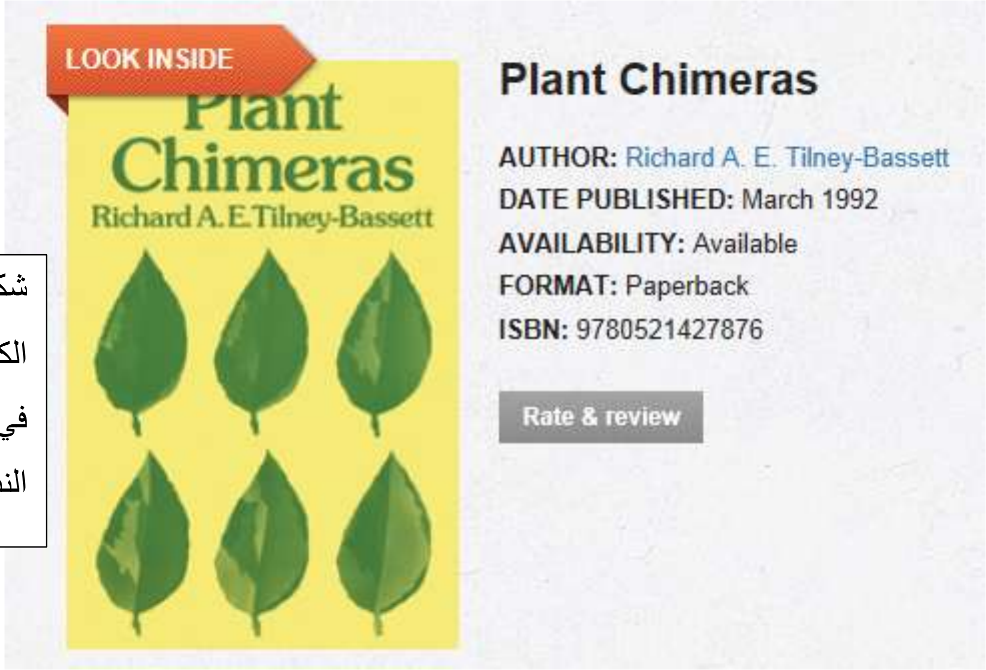
من التقدم الكبير في فهم طبيعة وأسباب التغاير الجسمي، لايزال من الصعب وضع إطار عام للسيطرة على التغاير لصعوبة التنبوء من مُخرجاته.

جدول 8.3. أمثلة على مُتغايرات جسمية (Somaclones) تورثت صفة مُقاومة الأمراض فيها بعد الإنتخاب على مُستوى الخلية

المحصول	لمسبب المرضي	عامل الإنتخاب	المزرعة	نظام المُقاومة
جت	*Fusarium oxysporum*	راشح المزرعة	كالس	زيادة مُقاومة
شعير	*Helminthosporium sativum*	السم الخام للمُسبب	كالس	زيادة مُقاومة
باذنجان	Mycoplasma like organisms	المُسبب نفسه	كالس من الجزء المُصاب	إختفاء الأعراض
ذرة صفراء	*H. maydis*	سموم المُسبب	كالس	زيادة مُقاومة
شوفان	*H.victorae*	فيكتورين	كالس	مُقاومة الفيكتورين
سلجم	*Phoma lingam*	راشح المزرعة	مُعلقات خلوية	زيادة مُقاومة
رز	*H. oryxae*	السم الخام للمُسبب	كالس	زيادة مُقاومة
قصب السكر	*H. sacchari*	سموم المسبب	كالس	زيادة مُقاومة
تبغ	*Pseudomonas syringae tabaci*	السم الخام للمُسبب، Methionine sulfoximine	خلايا، بروتوبلاست،	زيادة مُقاومة
تبغ	Tobacco mosaic virus	الفيروس نفسه	كالس من الأنسجة المُصابة	تقليل تضاعف الفيروس
طماطم	*F. oxysporum lycopersici*	راشح المزرعة، حامض الفيوزارك	كالس، بروتوبلاست	تحمل، مُقاومة
طماطم	Tobacco mosaic virus	الفيروس	أجزاء مُصابة	تحمل، مُقاومة
حنطة	*H. sativum*	السم الخام للمُسبب	كالس	مُقاومة

الكايميرا Chimeras

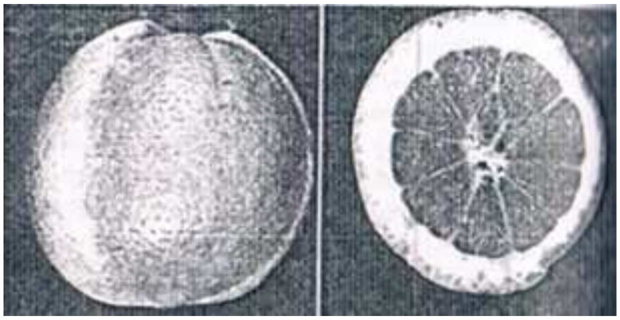
لعل موضوع الكايميرا في النبات قديم منذ ان خلق الله سبحانه وتعالى النبات وكانت تحصل تلك الظاهرة عبر هذا الزمن البعيد ولكن لم يستثمرها الإنسان لعدم مُلاحظتها وقلة إدراكه لأهميتها فكم من النباتات الكايميرية قد إنقرضت ومنها من حافظ على ذاته ليومنا هذا. بدأ الإهتمام بالكايميرا مع بداية القرن العشرين وتم تسجيل أعداد منها ومع تطور العلوم البيولوجية والزراعية، أصبحت موضع إهتمام الكثير من الباحثين وسُوقت نتاجاتها الى المعارض الزراعية وخاصة معارض الزهور. جمع العالم Richard, A. E. Tilney-Bassett نتاجات الباحثين في كتابه الموسوم Plant Chimeras الذي نُشر عام 1992 ليتضمن أغلب ما يحتاجه القارئ في هذا المجال ويكاد أن يكون الوحيد في هذا التخصص (شكل 8.8).



شكل 8.8. الكتاب المؤلف في كايميرا النبات.

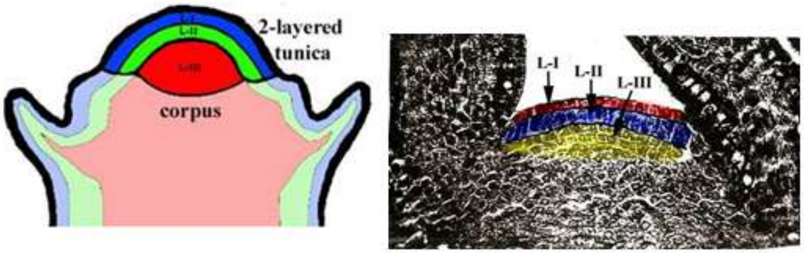
تتألف النباتات الكايميرية من إثنين أو أكثر من الأنسجة المُختلفة وراثياً وتنمو مُنفصلة لكن مُجاورة لبعضها وفي نفس النبات. غالباً ما يكون ترتيب تلك الأنسجة في شكل طبقات أو مقاطع في ساق النبات. تنشأ أغلب تلك الكايميرات من طفرات تحصل في أحد خلايا قمة الأفرع بالرغم من أن قسماً منها ينشأ من بادرات مُتغايرة نتيجة التهجين. تميل الكايميرا بأن تكون غير مُستقرة عند إكثارها وتعتمد درجة إستقرارها على تركيبها والهيئة الوراثية للنبات. للكايميرا أهمية في وجه الخصوص في المحاصيل البستنية وخاصة عندما ينتج عنها أوراق مُبرقشة كما يحصل في الحمضيات، العنب، الجيرانيوم، الداؤودي، نبات الوعاء المائي (الهيدرانجيا)، الداليا، السجاد، جلد النمر ونباتات أُخرى. يحصل في تلك النباتات نقص في إنتاج الكلوروفيل

داخل البلاستيدات في نسيج الورقة في الوقت الذي تكون فيه خلايا الورقة طبيعية مما ينتج عنه أنماط خضراء اللون مُميزة ومناطق أُخرى بيضاء أو صفراء على الورقة. يمكن مُلاحظة الكايميرا في لون وسُمك قشرة الثمار كما هو الحال في ثمار برتقال Washington Navel نتيجة طفرة تُسبب كايميرا طولية وهذا خيرُ مثالٍ على الطفرات غير المرغوبة (شكل 8.9).



شكل 8.9. كايميرا طولية في برتقال واشنطن نيفل. نشأ الجزء الأيسر من الثمرة من طفرة مُنتجاً غلافاً أصفر بدلاً من البرتقالي وأكثر سُمكاً وتُعد طفرة غير مرغوبة.

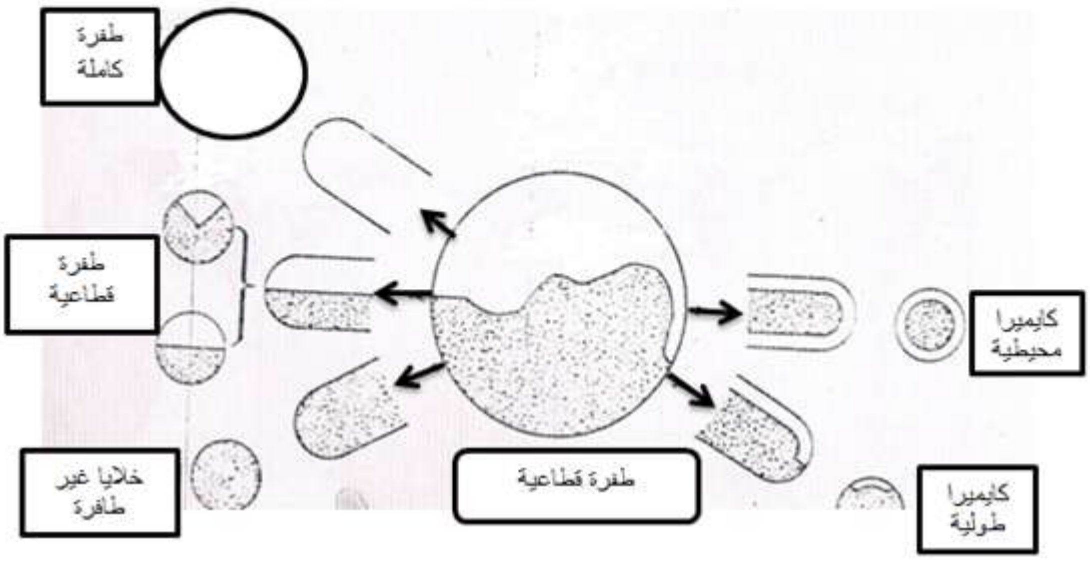
أُكتشفت ثمار تفاح تحتوي خليط من عصارة ذات مُحتوى سُكري عالي وعصارة ذات مذاق حامضي وكذلك ثمار خوخ تتألف قشرتها من جزء خشن وجزء آخر ناعم الملمس. أُكتشفت ايضاً أشكالاً حمراء من التفاح وبطاطا ذات قشرة حمراء نتيجة طفرة في الطبقة الخارجية من خلايا البشرة في الوقت الذي حافظت الطبقات الداخلية في لونها لأن خلاياها لم تتعرض الى التطفير. لعل أصناف الكرز الأسود عديم الأشواك (Thornless blackberry) خيرُ مثالٍ على الكايميرا التي نتجت من الطبقة الخارجية لساق النبات. يحصل أحياناً ما يُسمى بالكايميرا الكروموسومية (Cytochimera) والتي تكون قسم من خلايا الساق طبيعية تحتوي على 2n وخلايا في أجزاء أُخرى من الساق مُتعددة المجموعة الكروموسومية. تنشأ الكايميرا من الطفرات سواء كانت تلقائية (Spontaneous) أو مُستحثة (Induced) في إحدى خلايا المرستيم القمي



شكل 8.10. إنموذج الطبقات المُميزة (الغلالة) والأقل تخصُصاً (Corpus-Tunica) في تنظيم القمة الطرفية للفرع النباتي. يظهر من الشكل بأن الكايميرات التي تحصل في الأنواع التي تُظهر في أعلاه (Corpus-Tunica) منتظمة في تنظيمها وهذا شائع في نباتات ذوات الفلقة الواحدة وذوات الفلقتين. تتحول الطبقة الثانية في Tunica الى طبقة L11 بينما تُعطي Corpus طبقة L111.

تحتوي قمة الفرع نوعين أو أكثر من الطبقات المُميزة من الغلالة (Tunica) وتحتها كتلة من الخلايا الأقل تخصُصاً وهي الجسم الأصلي (Corpus). تحتوي نباتات مُغطاة البذور في الغالب ثلاث طبقات مُميزة من الخلايا بينما تحتوي عاريات البذور ونباتات أُحادية الفلقة وطبقتين وتم إختصار تلك الطبقات وللسهولة الى L-1, L-11, L-111. تُحافظ تلك الطبقات على كيانها (Integrity) لكون الإنقسام الخلوي يحصل في إتجاه مُحدد. تنقسم الخلية في نقطة النمو إما بزاوية قائمة بإتجاه السطح الخارجي (Anticlinally) أو بشكل مُتوازي (Periclinally) بإتجاه السطح الخارجي ايضاً (شكل 8.11). تنقسم خلايا الطبقة الاولى (L-1) بزاوية قائمة وتكون عموماً مميزة وأقل إستقرارية وينتج عنها خلايا الطبقة الخارجية. تنقسم خلايا الطبقة الثانية (L-11) غالباً بزاوية قائمة قرب القمة (Apex) ولكنها تنقسم بشكل عشوائي بعيداً عن القمة. إما خلايا الطبقة الثالثة (L-111) فتنقسم في الإتجاهين. يحصل احياناً ان تُنتج خلية في إحدى الطبقات الثلاث وتُزاح الى الطبقة المُحاذية، فإذا ما حصلت الإزاحة قريبة نسبياً الى القمة النامية، فسوف تنقسم تلك الخلية وان إستمرار إنقسامها ينتج عنه جزء مُهم من الساق الجديد أو الورقة ويحصل تغيير في التركيب الكايميري. على سبيل المثال، قد ينتج من إزاحة الخلية نشوء سايتوكايميرا (Cytochimera) من 2-4-2 الى 4-4-2 (أو من 2-2-4 الى 2-4-4) ولربما لايمكن رؤية التغيير الحاصل مظهرياً.

قد يحصل تغيير من 2-4-2 الى 2-4-4 ويمكن عندئذٍ رؤيته لكون التغيير يشمل طبقة البشرة، وهذا النوع من التغيير نادر الحدوث. ولفهم الأرقام أعلاه نُعطي مثالاً ليشمل الحالات الأُخرى فالأرقام 4-2-2 معناها أن نبات 2n ومن الطبقة الثانية أعطى نبات رباعي المجموعة الكروموسومية (2n=4x). تولد خلايا طبقةٍ ما جزء مُعين من ساق النبات وتُسمى حينئذٍ Hestogenic layers فمثلاً تنتج طبقة L-1 طبقة واحدة من نسيج البشرة ولكنها قد تصبح سميكة ومُتعددة الطبقات في الوقت الذي تنتج L-11 طبقة القشرة الخارجية (Outer cortex) وجزء من الإسطوانة الوعائية (Vascular cylinder) وتنتج الخلايا التكاثرية في المتك والبيوض من هذه الطبقة. بينما ينتج عن طبقة L-111 القشرة الداخلية (Inner cortex)، الإسطوانة الوعائية، واللب. لكن وكما موضح في شكل 8.12 بأن أجزاء الساق التي تنشأ من طبقتي L-11 و L111 ليست دائماً ثابتة. يعتمد نشوء الكايميرا على موقع الخلية الطافرة داخل تلك الطبقات. فالطفرة التي تحصل في خلية ما في إحدى تلك الطبقات تؤثر عموماً في ذلك الجزء من الساق المُتكون من تلك الطبقة. لذلك إذا نشأت خلية رباعية العدد الكروموسومي (Tertraploid) في طبقة L-11 لنبات ثنائي المجموعة الكروموسومية (Diploid, 2n)، فيوصف النبات الناتج بالسايتوكايميرا 2-4-2.



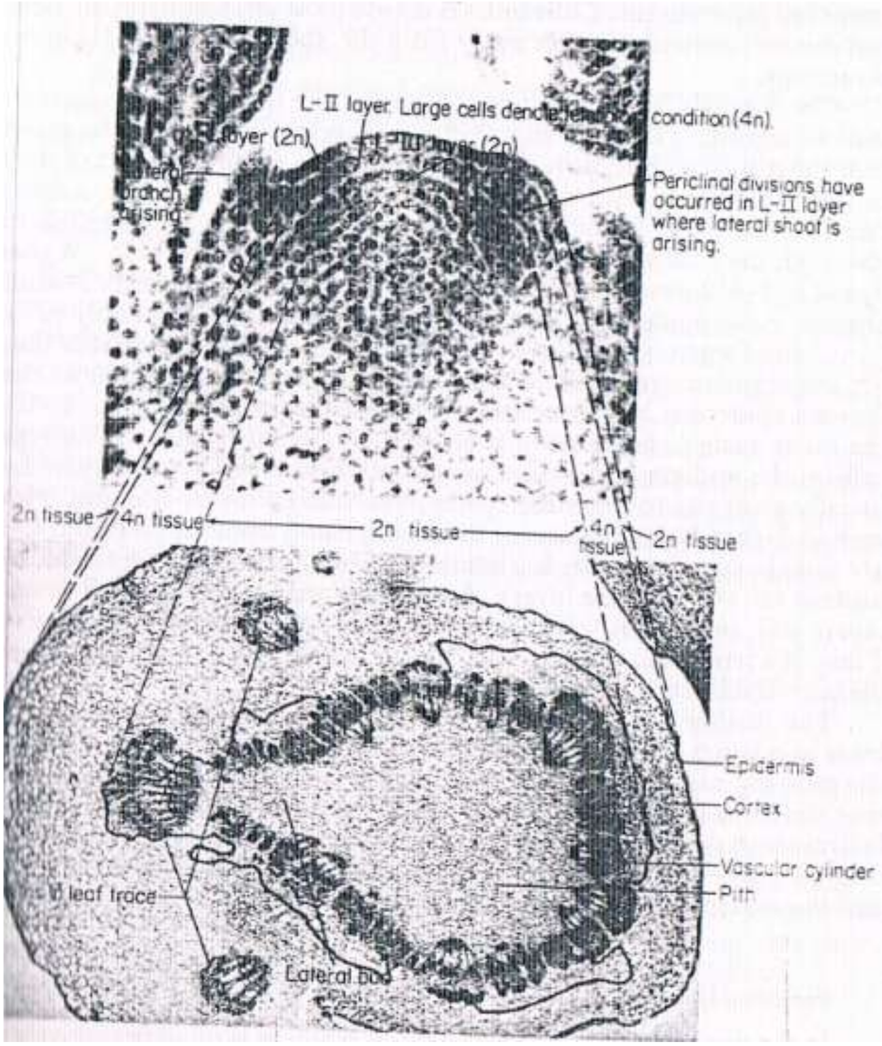
شكل 8.11. تنشأ بعض النباتات مبرقشة حيث يكون التركيب الاولي في شكل كايميرا قطاعية. يظهر هذا النوع عندما تحصل الطفرة في المراحل المبكرة من تطور الجنين او عند انتاج احدى خليتي الجنين اوالبيضة بلاستيدات طبيعية وطافرة. تكون في الغالب تلك الطفرة غير مُستقرة وتظهر البراعم ومن مواقع مُختلفة لتنتج نموات ذات خلايا طافرة بالكامل او غير طافرة بالكامل واحياناً تكون قطاعية في النموات، وقد تكون كايميرا محيطية او طولية اعتماداً على موقعها.

يعتمد تطور مُستقبل الكايميرا في موقع البراعم الجانبية وإرتباطه بالمنطقة التي حصلت فيها الطفرة فإذا ما حصلت طفرة في خلية تقع في جهة من نقطة النمو، قد يتأثر جزء صغير من الساق فقط ويحمل الفرع الخضري الجانبي الناتج من الجزء الطافر من الساق صفة الطفرة. وإذا ما تطور الفرع الجانبي من الجهة المُقابلة للساق الأصلي فتظهر الصفة الأصلية أي نسيج غير طافر. وإذا ما إحتوى البرعم أنسجة من الجانبين أي الطافرة وغير الطافرة، تظهر عندئذٍ أنماط مُختلفة من الكايميرا.

الكايميرا المحيطية Perclinal chimera

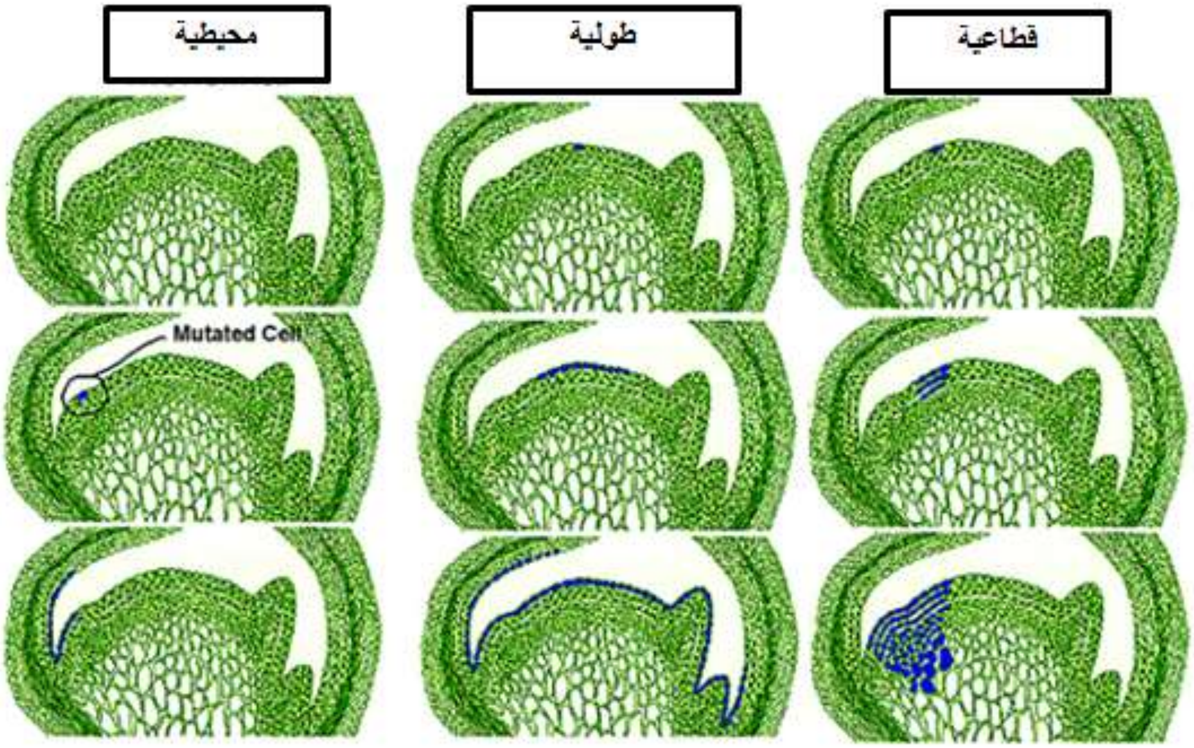
يحصل في هذا النوع من الكايميرا وجود نسيج بهيئة وراثية واحدة بطبقة واحدة أو من طبقات مُختلفة السمك، يُغلف بالكامل نسيجاً آخر مُختلف في هيئته الوراثية (شكل 8.13). يُعد هذا النوع من الكايميرا الأكثر شيوعاً والأكثر إستقراراً عند التكاثر بالعقل أو التركيب. فعلى سبيل المثال، جنس العليق ***Rubus*** يحتوي

على العديد من أنواع الكرز الأسود عديم الأشواك حيث لايوجد الجين المسؤول عن عدم وجود الأشواك في طبقة بشرتها.



شكل 8.12. كايميرا مُكبرة في الخوخ وبمقطع طولي لقمة الفرع (الأعلى) ولمقطع عرضي للساق تحت القمة الطرفية (الأسفل). تنشأ الكايميرا أحياناً من حصول طفرة في أحد طبقات الأنسجة للمرستيم القمي. يُلاحظ في المقطع الطولي وجود ثلاث طبقات في القمة وهي L1, L11, L111 ويتبين من الشكل بأن طبقة L1 تُشكل صف واحد من الخلايا بينما L11 زاد سُمكها في الجانبين بسبب الإنقسامات المُحيطية في نقطة نشوء الورقة. يوضح الشكل الأسفل خلايا بشرة الساق وهي 2n لكونها نشأت من طبقة L1 بينما أُشتقت خلايا القشرة وجزء من الجهاز الوعائي من الطبقة L11. لذلك فبقية الجهاز الوعائي واللب 2n وقد أُشتقت من L111.

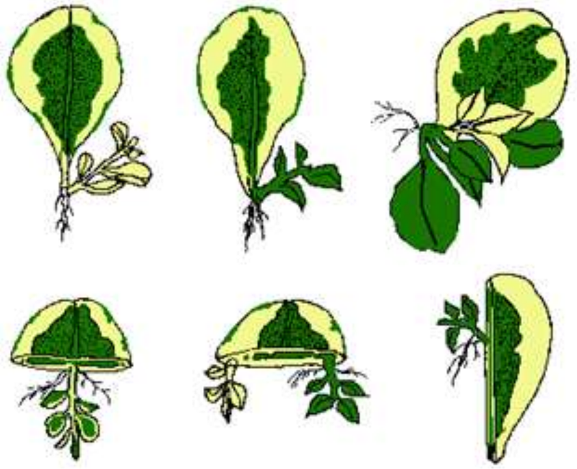
تُحافظ تلك الأنواع في هيئتها الوراثية عند إكثارها بالعقل أو الترقيد الطرفي. تظهر الجذور عند إكثار تلك الأنواع الكايميرية عديمة الأشواك بالعقل من تحت الأنسجة الطافرة مما يُنتج جذوراً من الأنسجة غير الطافرة. والمُلاحظ إذا ما تم إكثار هذه النباتات بالعُقل الجذرية فتكون النباتات الناتجة حاوية أشواك لكونها تظهر من الخلايا غير الطافرة. وعندما تُزرع بذور نبات عديم الاشواك، تنشأ نباتات تحتوي أشواك لأن الأمشاج قد نتجت من خلايا أو أنسجة نشأت أصلاً من طبقة L11 وهي الطبقة التي لن تحصل فيها الطفرة مع مُلاحظة بأن قسم من طبقة L11 قد حصلت فيها طفرة وتنتقل صفة عدم وجود الأشواك الى الأجيال القادمة.



شكل 8.13. مراحل نشوء ثلاثة أنواع من الكايميرا.

قد ينتج عن إكثار الكايميرا المحيطية بوساطة العُقل الورقية كما هو الحال في نبات جلد النمر (*Sansevieria*) ذو اللونين لرجوعه الى الحالة غير الطافرة وتظهر نباتات باللون الأخضر فقط والتي أصلها من خلايا غير طافرة. لعل خيرُ مثالٍ على الطفرات التي تحصل في طبقة L11 الكايميرا التي حصلت في نبات الملعقة (البيروميا) إذ تظهر أشبه ما يكون بالجزيرة (Island) من النسيج الأخضر يُصاحبه حافة خضراء في مُحيط نصل الورقة دليلاً بأن طبقة L1 طبيعية في نموها (شكل 8.14). يتكاثر نبات الملعقة ولحُسن الحظ خضرياً بالعقل الورقية (شكل 8.15) لينتُج منه نباتات تحتوي على كايميرا وأُخرى خضراء.

شكل 8.14. نبات الملعقة *Pepromia obtusifolia* وتظهر فيه كايميرا نتيجة طفرة وراثية في طبقة L11.

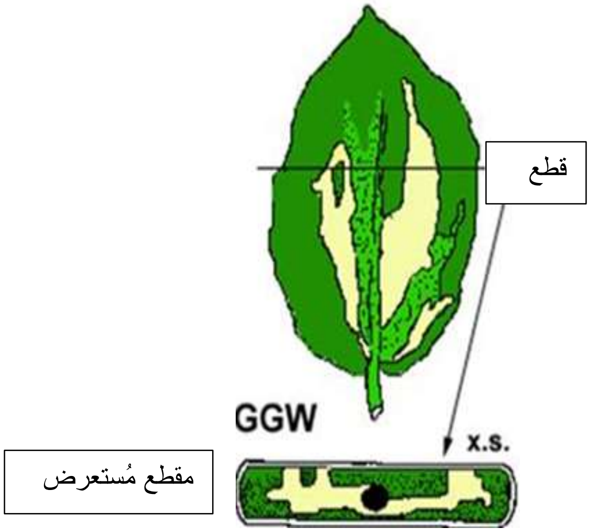


شكل 8.15. إكثار نبات البيروميا *Pepromia obtusifolia*حيث تظهر ثلاثة الوان من الشتلات المُختلفة.

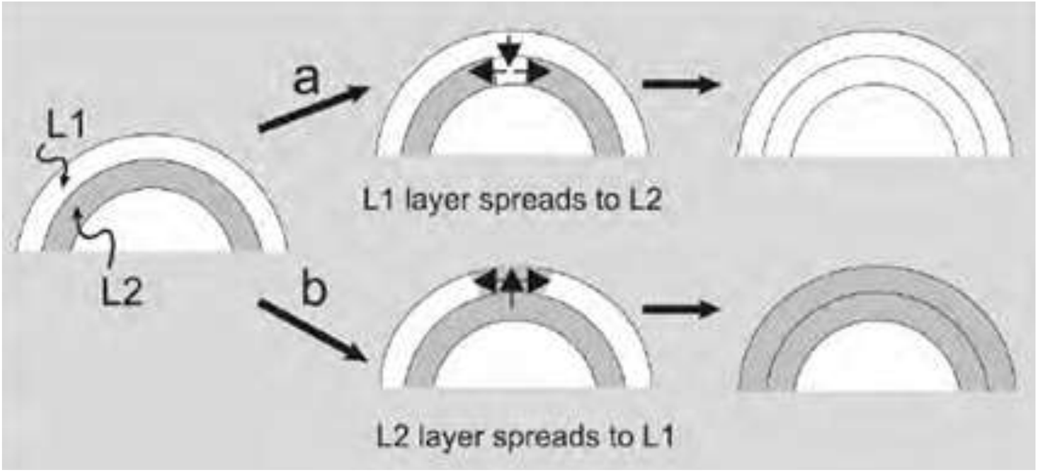
ينتج من حصول طفرة في طبقة L111 كايميرا ينتج عنها أوراق ذات أنسجة بثلاثة ألوان (شكل 8.16)، والتي يُمكن إكثارها بقطع الجزء الذي يضم الألوان الثلاثة وزراعته. يُفيد هذا النوع في الزراعة النسيجية خاصة إذا كانت مُتطلبات الأنسجة من المُغذيات مُتشابهة لتنتج ثلاثة أنواع من الخلايا تنقسم وتنشأ مع بعضها وفي الغالب تنتج نباتات مُختلفة الألوان بعد إخلافها.

الكايميرا الطولية أو الطبقية Mericlinal or layering chimera

يُشابه هذا النوع الكايميرا المحيطية ماعدا إحتلال الأنسجة الطافرة لطبقة واحدة فقط ولاتنتشر تماماً حول النمو الخضري. تحصل الكايميرات الطولية في الطبيعة بشكل واسع وذلك لبداية الطفرة في خلية واحدة عند نقطة النمو وهي غير ثابتة (شكل 8.17) نتيجة إحلال طبقة محل أُخرى أو إزاحة تلك الطبقة وفي حالات أُخرى فقدان الطبقة الخارجية وتتحول مع إستمرار إكثار النبات خضرياً أن تتحول الى كايميرا محيطية أو ترجع الى حالتها الاولى قبل حصول الطفرة.



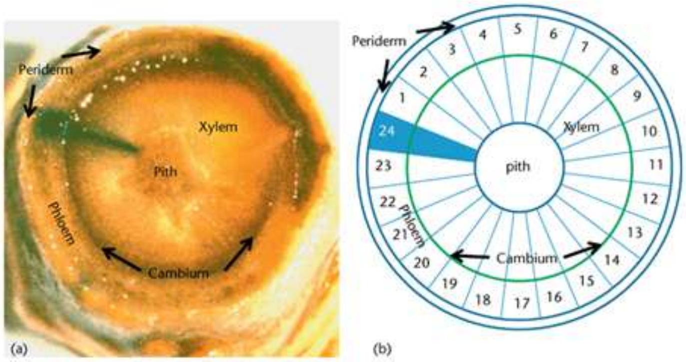
شكل 8.16. نبات نبق العجم *Elaeagnus pungens* وتظهر فيه كايميرا نتيجة طفرة وراثية في طبقة L111.



شكل 8.17. عدم ثباتية الكايميرا من (a) فقدان الطبقة الداخلية أو إزاحتها. (b) فقدان الطبقة الخارجية وفي الحالتين تبدأ الظاهرة بإنقسام خيطي طبيعي.

الكايميرا القطاعية Sectorial chimera

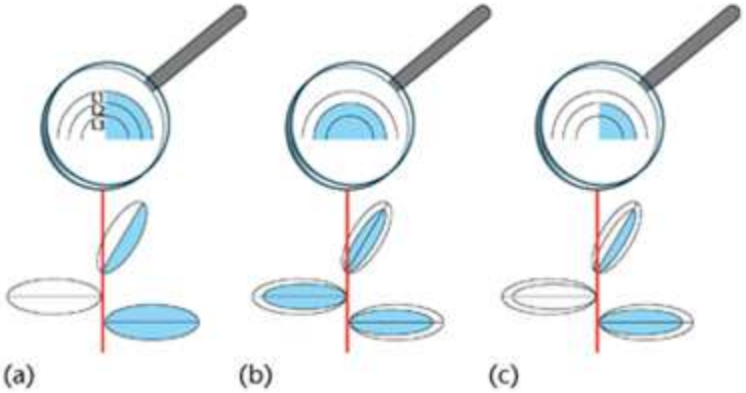
تظهر في هذا النوع من الكايميرا أفرعاً متكونة من نوعين من الأنسجة المُختلفة وراثياً مجاورة لبعضها وتحتل مقاطع متميزة في ساق النبات. تتالف الاوراق والبراعم المتطورة من تلك النموات من نوعين من الأنسجة متآلفة بوسائل شتى إعتماداً على موقعها (شكل 8.18).



شكل 8.18. (a) مقطع عرضي ورسم توضيحي (b) في ساق شجرة حور يُبينان مقاطع أنسجة مُحورة وراثياً (اللون الأزرق) مُمتدة من اللب (Pith) الى محيط الأدمة (Periderm).

فقد تحصل طفرة في طبقات متعددة في قمة الفرع الخضري وينتج عن انقسام خلاياها الطافرة شكل قطاعي بالكامل دليل حصول الطفرة فيه. الكايميرا القطاعية مُستقرة لحد كبير وتشكل النوع الاكثر شيوعاً في النباتات البستنية مكونةً اشرطة طولية تظهر في اوراق او ساق النبات (شكل 8.19). يمكن تفسير هذا القطاع بأنه مُشتق من نسيج مُحور مُفرد ويشتمل الخشب واللحاء وقد نشأ قبل تخصص تلك الأنسجة من الكامبيوم الاولي. يعني إستبعاد اللب والأدمة من المنطقة القطاعية هو تكوين ثلاث طبقات نسيجية مُميزة عند تطور قمة المرستيم الخضري في وقت التحول الوراثي. يحتل القطاع المُصبَغ حوالي 24/1 من قطر الساق مُشيراً الى ترتيب حوالي 24 نسيج كامبيوم أولي بشكل حلقة حول اللب المركزي المُحيط بخلايا نسيج البشرة النامي خلال وقت التحول.

شكل 8.19. كايميرا قطاعية في أوراق نبات العنكبوت (*Chlorophytum comosum*) في الجانبين وفي نبات الدراسينا (*Dracaena deremensis*) في المركز كأمثلة لنباتات أُحادية الفلقة.



شكل 8.19. (a) كايميرا قطاعية حيث الطبقات الثلاث التي يُمكن تمييزها والمؤشرة في الصورة. (b) كايميرا محيطية. (c) كايميرا طولية.

الكايميرا المُتحركة **Bud sport chimera**

يختلف في هذه الحالة جزء من النبات مثل غصن، نمو خضري، زهرة أو شمراخ زهري عن بقية أجزاء النبات ولكن يُحافظ على ذاته بعد إكثاره خضرياً. يرجع ذلك في الغالب الى طفرة تؤدي الى حصول الكايميريا أو تغيير التركيب في كايميرا موجودة أصلاً (شكل 8.20).

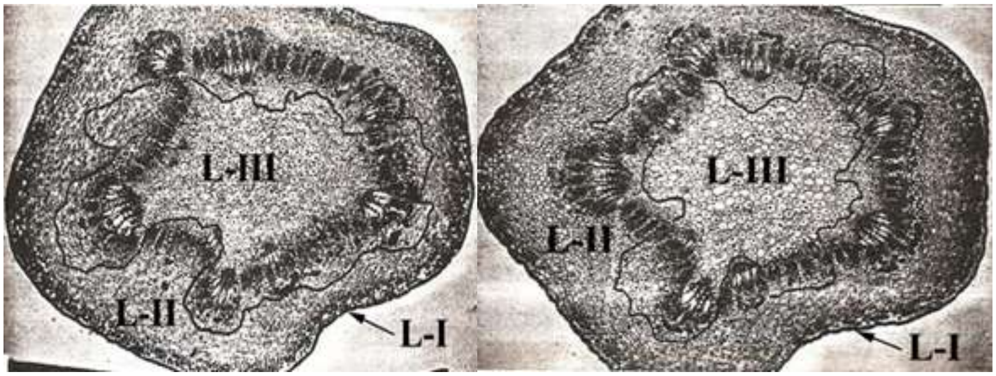
شكل 8.20. نباتات كايميرية ذات فائدة تنسيقية. (a) نبات حبل المساكين (*Hedera*). (b) نبات العنكبوتية (*Tradescantia*).

كايميرا التركيب Grafting chimera

تنتج عند تركيب نوعين مُختلفين من النباتات أو صنفين مُختلفين واحياناً بين جنسين مُختلفين تندمج أنسجة النباتين مع بعضهما جُزئياً بعد التركيب لتكونا جسماً واحداً نامياً مُحتفضاً بنوعي النسيجين في نمو خضري واحد. ولكون النسيجان مُختلفين في مدى واسع من خصائص النمو، لذا تظهر كايميرا مُتغايرة جدداً. عُرفت لأول مرة بعد تركيب الأطرنج على النارنج وسُميت بإسم Bizzaria وكما سيرد لاحقاً.

كايميرا مُحفزة بالكولشسين 4x في طبقة Cholchicine induced tetraploid   L111

يحصل هذا النوع من الكايميرا بعد مُعاملة النبات بمادة الكولشسين حيث يتضاعف عدد كروموسومات نسيج الطبقة الثالثة لتصبح رباعية العدد الكروموسومي (شكل 8.21). تؤدي المعاملة بالمادة الكيميائية الكولشسين الى مُضاعفة عدد الكروموسومات دون إنقسام الخلية الواحدة الى خليتين. تُحفز الخلايا الرباعية الى النشوء بعد مُعاملة القمة الطرفية للفرع النباتي (Apical dome) فإذا كانت طبقة واحدة حساسة للمُعاملة بالكولشسين، عندئذٍ تظهر وبشكلٍ واضح كايميرا.



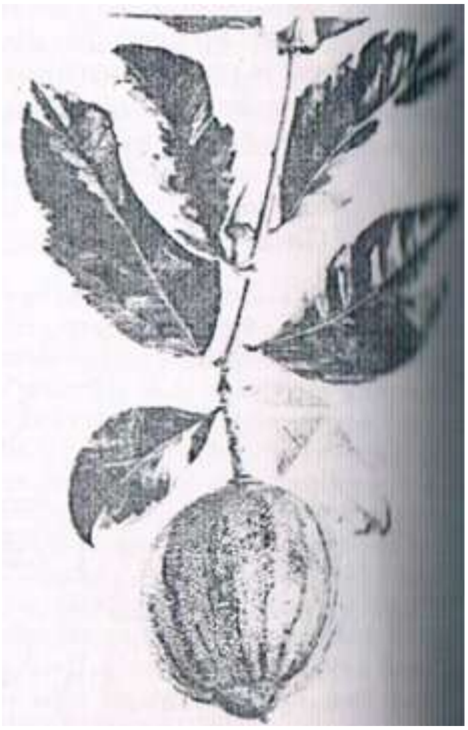
شكل 8.21. كايميرا ذات خلايا رباعية العدد الكروموسومي في الطبقة L111.

الكايميرا الكروموسومية أو الموزائيك Chromosomal or mosaic chimeras

يحصل هذا النوع من الكايميرا عندما تحتوي الطبقات أعداد كروموسومات مُختلفة. تظهر احياناً كايميرا من فقدان أو كسب كروموسوم مفرد أو قطعة منه نتيجة خطأ في الإنقسام. يحصل في الغالب كايميرا سايتوبلازمية ذات عدد طبيعي أو مُتعدد من الكروموسومات في الطبقة التي يحصل فيها التغيير وينعكس ذلك في حجم الخلية وخصائص نموها كما يحصل في أشجار الطقوس *Taxus spp.* (شكل 8.22).

شكل 8.22. **أشجار الطقوس *Taxus* وتظهر فيها كايميرا الموزائيك نتيجة إختلاف الأعداد الكروموسومية في طبقات الأنسجة التي حصلت فيها الطفرة.**

علماً بأن الموزائيك قد يكون مُتسبباً من فيروسات مُحددة، فعلى سبيل المثال الفواصل في ألوان بعض أصناف أبصال التيولب سببها فيروس وليس طفرة وقسم آخر يرجع الى جينات النبات. تظهر احياناً الوان غير طبيعية نتيجة أنظمة جينية غير مُستقرة بسبب وجود وحدات أو عناصر في الكروموسومات تُسمى بعناصر السيطرة (Controlling elements) وكذلك ما يُسمى بطوافر إدخال (Insertion mutants). والأخيرة لها القابلية على تبادل المواقع ضمن الكروموسوم الواحد وتنتج تغاير على شكل بقع أو قطاعات بأشكال مُنتظمة (شكل 8.23).



شكل 8.23. التبرقش الوردي في ليمون يوريكا كنوع من أنواع الكايميرا.

كايميرا جين النواة Nuclear gene chimera

يحصل هذا النوع من الكايميرا نتيجة طفرة تلقائية أو تحفيزها في النشوء بإستعمال المُطفرات. تحصل طفرة في أحد جينات النواة لأليل سائد أو مُتنحي وينتج عن ذلك تغيير في صفة واحدة في الوقت الواحد. تظهر تلك الطفرات في الأوراق، الأزهار، الثمار أو أجزاء النبات الأُخرى.

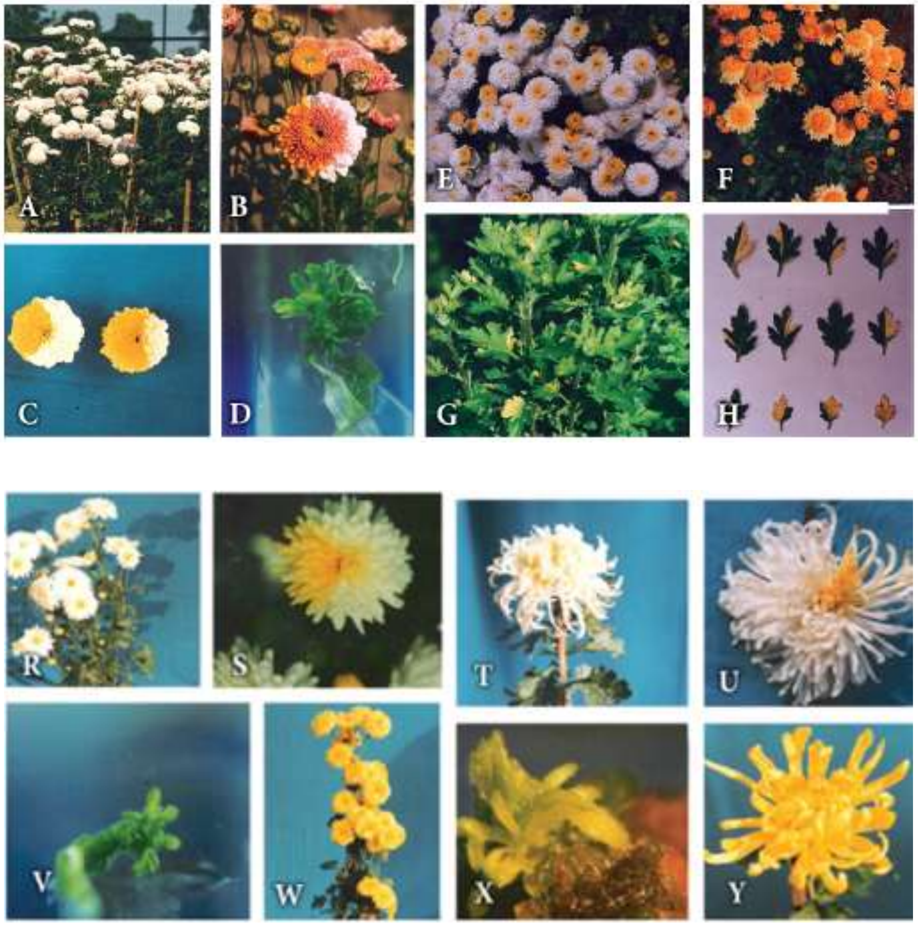
كايميرا جين البلاستيدة Plastid gene chimera

ينتج هذا النوع من الكايميرا بسبب طفرات تلقائية أو مُستحثة في جين بلاستيدة يعقبه فرز نوعين من البلاستيدات أثناء النمو الخضري. تحصل عملية فرز للبلاستيدات في حالات أُخرى مثل دمج بيضتين غير مُخصبتين أو مُخصبتين والتي يمكن تمييزها من نمط الألوان في الأوراق. عند فرز اللونين بالكامل لتكون كايميرا محيطية يُمكن تمييزها عن كايميرا جين النواة والتي تكون مُشابهة لها، بأنها لا تتورث حسب قوانين مندل علماً بان أغلب الكايميرات المُبرقشة من هذا النوع. يتأثر لون البلاستيدات ضمن الورقة بكايميرا جين البلاستيدة وبعض كايميرات جين النواة لذا jsln بكايميرات الكلوروفيل (Chlorophyll chimeras) ويُفضل بتسميتهما بكايميرات تبرقش الأوراق. أغلب أنواع التبرقش حاصل من فقدان الكلوروبلاست في النسيج الطافر.

تمييز أنماط الكايميرات Recognition of chimera patterns

تسمح أنماط التلون في أوراق نباتات ذوات الفلقتين بعد المُلاحظة الجيدة بالإستدلال جُزئياً في طبيعة الطبقات الكايميرية في قمة الفرع الخضري. لايمكن الإستدلال الكامل في طبيعة الطبقات الثلاث بالعين المُجردة لأن أغلب خلايا طبقة البشرة لذوات الفلقتين لاتنتج كلوروبلاست حتى بوجود المعلومات الوراثية التي تخص تطورها. لكن يوجد الكلوروبلاست في الخلايا الحارسة لمنظومة الثغور في الطبقة الاولى الخضراء ويجب التحري عنها تحت المجهر. تُستعمل مُصطلحات لوصف طبيعة طبقات خلايا القمة النامية بإستعمال أحرف كبيرة وبالترتيب للتعبير عن المُحتوى الوراثي للخلايا. على سبيل المثال، تكون التسمية الصحيحة لكايميرا طولية تحصل في طبقة L1 بشكل طبقة خضراء موروثة والطبقة الثانية بيضاء والثالثة خضراء بالأحرف، G-W-G (راجع شكل 8.16). تُشتق حافة الورقة لنباتات ذوات الفلقتين من L11 وتعتمد مُساهمة هذه الطبقة في حافة الورقة على النوع النباتي ولحد ما يختلف من ورقة لأُخرى على نفس الساق. في نباتات ذوات الفلقة الواحدة، لا تُساهم L1 في تطور حافة الورقة وأغلب الجزء الوسطي من

الورقة يتطور من L11 وعلى العكس من ذوات الفلقتين، تساهم L111 في جزء بسيط من خلايا في نصل الورقة. ويوضح شكل 8.24 الأنواع المُختلفة من الكايميرات وفي نباتات ذات قيمة إقتصادية وبستنية مهمة.



شكل 8.24. أنواع مُختلفة من الكايميرا ساهمت في ظهور الوان وأشكال أزهار جديدة وطوافر كلوروفيلية مبرقشة في نبات الداؤودي. (A) الصنف الأصلي للداؤودي Maghi، (B) كايميرا قطاعية صفراء، (C) كايميرا قطاعية أبيض واصفر، (D) إخلاف نموات خضرية من براعم على أجزاء نباتية مفصولة من زهيرات شعاعية سبق وان تم تعريضها للتطفير، (E) نبات نقي مُنتج كصنف جديد من نسيج مُطفر يحمل كايميرا قطاعية بيضاء، (F) نبات مُنتج بشكل نقي كصنف جديد من نسيج مُطفر ذو كايميرا قطاعية صفراء، (G الى H) طفرات كلوروفيلية مبرقشة معزولة من الداؤودي صنف Maghi، (I) كايميرا قطاعية صفراء من الصنف Puja، (L الى M) إنتاج نبات نقي كصنف جديد من كايميرا قطاعية لنسيج مُطفر للصنف Puja، (N) الصنف الأصلي لنبات الداؤودي Purnima، (O) كايميرا قطاعية صفراء للصنف Purnima،

(P) إخلاف نمو خضري من برعم نتج من أجزاء زهيرات شعاعية تم تعريضها للتطفير للصنف Purnima، (Q) نبات نقي تم إخلافه كصنف جديد من أنسجة مُطفرة لكايميرا صفراء صنف Purnima، (R) صنف الداؤودي الأصلي Lilith، (S) كايميرا قطاعية صفراء في الصنف Lilith، (T) إخلاف فرع خضري من برعم لأجزاء تم تطفيرها مفصولة من زهيرات شعاعية للصنف Lilith، (U) نبات نقي كصنف جديد نتج من كايميرا قطاعية صفراء تم تطفيرها للصنف Lilith، (V) صنف الداؤودي الأصلي Kasturba Gandhi، (W) كايميرا قطاعية تلقائية صفراء للصنف Kasturba Gandhi، (Y) نبات نقي كصنف جديد ناتج من كايميرا قطاعية صفراء لأنسجة من الصنف Kasturba Gandhi تم تطفيرها.

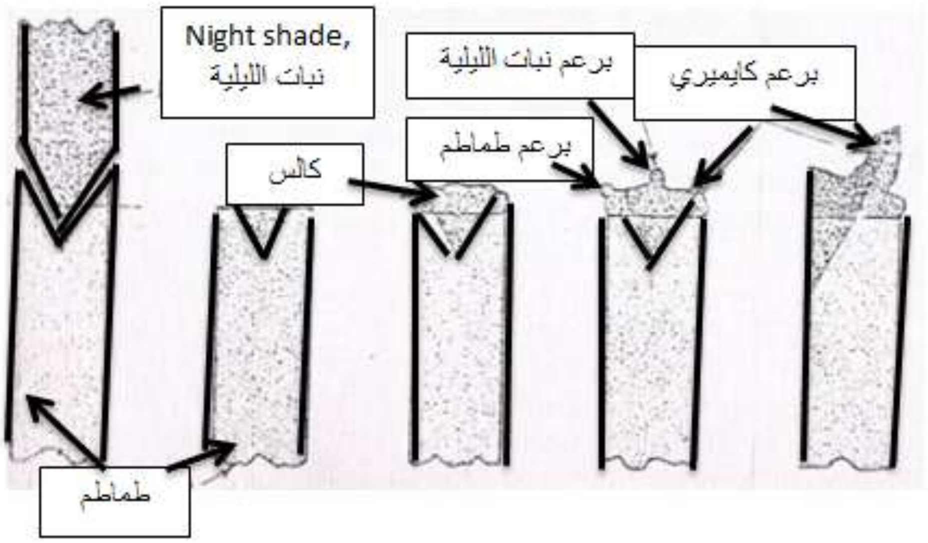
والذي يهمنا في هذا الموضوع هو كيفية إنتاج الكايميرا بوسائل الزراعة النسيجية والتي يُمكن تلخيصها كما يلي:

1- زراعة قطعتين من الكالس ومن نباتين مُختلفين في الألوان (مع مراعاة إحتياجاتهما الغذائية) في وسط غذائي واحد والسماح لمزارع الكالس بالتداخل مع بعضها ومن ثم نقل القطع المُتداخلة الى وسط إخلاف لِتنتج نباتات مُتداخلة أنسجتها وتظهر أنواع من الكايميرا ويُنتخب المرغوب منها.

2- إتباع نفس الطريقة أعلاه ولكن يتم خلط قطع الكالس في مزارع سائلة ومن ثم يُنقل لُقاح (Inoculum) الى وسط صلب ليُنشر طبقياً (Plating) المُعلق الخلوي على وسط إخلاف صلب وتُنتقى النباتات التي تداخلت أنسجتها.

3- التركيب الدقيق (Micrografting) إذ تُتبع طريقة التركيب الشقي (Clift grafting) المعروفة بتركيب طعم (Scion) على أصل (Rootstock) لنباتين مُختلفي اللون.

قد ينتج الكالس الناشئ في منطقة الإلتحام فروعاً من الكايميرا، تُفصل وتُجذر لينتج نبات كايميرا مع الأخذ بنظر الإعتبار التوافق (Compatibility) بين الأصل والطُعم عند إجراء عملية التركيب الدقيق وان تُنفذ العملية تحت ظروف مُعقمة خارج الجسم الحي. بُنيت الفكرة أساساً بعد حصول كايميرات بعد إجراء عملية التركيب بين أنواع مُختلفة تحت ظروف الحقل وسُميت بكايميرا التركيب (Graft chimera) ولعل مثال تركيب نبات الليلية (Night shade) كطُعم على نبات الطماطم كأصل خير مثالٍ على ذلك. ينشأ الكالس من منطقة الإلتحام ليُعطي براعم كايميرية واضحة (شكل 8.25).



شكل 8.25. طريقة نشوء كايميرا التركيب بين نباتي الليلية والطماطم.

4- التطفير بالمُطفرات الفيزيائية والكيميائية المعروفة للنسيج النباتي ومن ثم زراعته او لقطع من الكالس او المُعلق الخلوي او الى اللقاح المنشورطبقياً في وسط غذائي مُناسب. يُحفز التطفير إنتاج التغاير الوراثي (Genetic variation) وفوق الوراثي (Epegenetic) إذ يمكن إنتقاء الطوافر ذات الأنسجة الكايميرية والإستفادة منها كنباتات جديدة (Novel plants) ذات قيمة تنسيقية في الغالب.

5- تفضل زراعة حبوب اللقاح المُفردة وليس المُتك كاملا لأن حبوب اللقاح داخل المُتك مُتغايرة وراثيا فيما بينها واذا ما زُرع المُتك كاملا فسيُنتج نباتات مُتغايرة. المشكلة التي قد تواجه زراعة المُتك هو ان النباتات الناتجة من الكالس قد ينتج عنها أنسجة كايميرية لأن العديد من حبات اللقاح ضمن المُتك الواحد قد ساهمت في تكوين الكالس وليس حبة لقاح واحدة وبالتاكيد سينعكس ذلك في إنتاج نباتات تحمل أنسجة كايميرية.

6- المعاملة بالكولشسين للأجزاء النباتية المزروعة نسيجياً: هناك إمكانية الحصول على كايميرات مُختلفة بعد مُعاملة الأجزاء النباتية، الأنسجة أو الكالس بمادة الكولشسين. أُنتجت طفرات كلوروفيلية في أوراق أفرع النارنج (*Citrus aurantium*) المُحفزة من العقد المُعاملة بالكولشسين تركيز 0.05% ولمدة 90 دقيقة والمُنماة في الوسط MT والمُجهز 1.5 ملغم/لتر من BA و GA_3 (شكل 8.26). بلاشك سوف تكون أشجار الحمضيات الناتجة ذات لونين وبطيئة النمو وبذلك تكون مُناسبة في زراعتها داخل الحدائق المنزلية كشجرة فاكهة ونبات زينة في وقتٍ واحد.

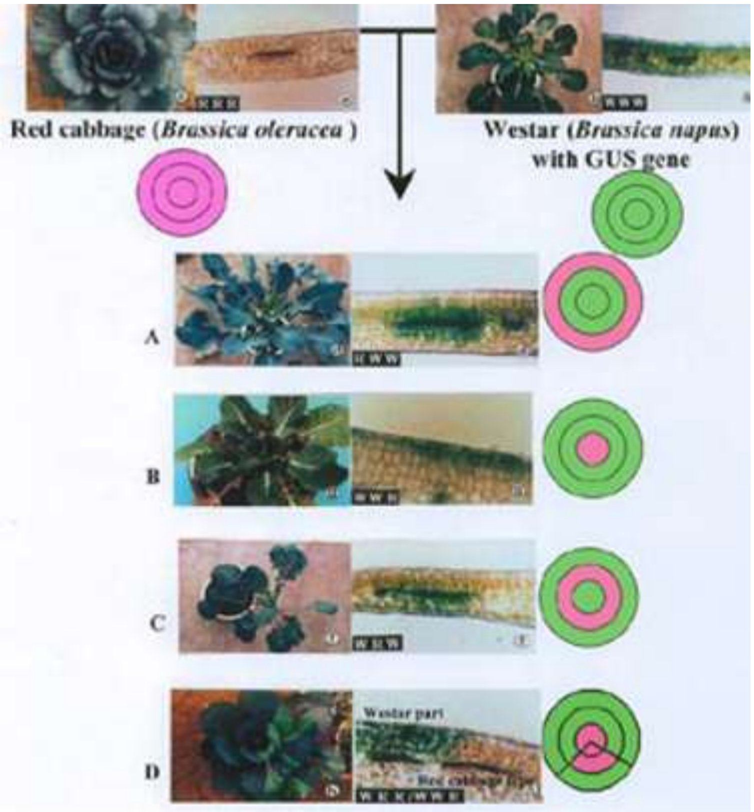
شكل 8.26. كايميرا كلوروفيلية في الزروعات النسيجية لنبات النارنج نتجت بعد مُعاملة الزروعات بمادة الكولشسين.

7- قطع وزراعة منطقة إلتحام الطُعم والأصل: تم تطوير طريقة نسيجية في تحفيز الكايميرا الى الظهور ومن ثم إكثارها. سُميت بطريقة مزرعة البادرات المركبة باللصق (Approach grafted seedling culture) وإختصاراً AGSC. أُستعملت الطريقة في مجموعة من نباتات شملت *Brassica rapa, B. oleracea, B. napus, Raphanus sativus*. عُقمت البذور وزرعت في وسط MS وأُنتجت البادرات وطُعمت بعمر سبعة أيام بطريقة التركيب باللصق داخل أنابيب الإختبار. قُطعت منطقة الإلتحام (Graft union) وجزء من السويق تحت الفلق (Hypocotyl) الى شرائح نحيفة وزرعت على وسط MS مُزود بالاوكسين IBA بتركيز 0.2 ملغم/لتر. ظهرت ثلاثة أنواع من الكايميريا ودُرِسَ التداخل الوراثي بين الأنسجة المُختلفة. تم توصيف النباتات الكايميرية المُستحثة من مُلاحظة الشكل الخارجي مثل شكل الورقة، حافة الورقة، تركيز صبغة الأنثوسيانين (شكل 8.27). تم التحري عن وجود التعبير الجيني بإجراء إختبار GUS في مقاطع من الورقة وخضعت النباتات لإختبار الإنزيمات المُتناظرة. لوحظ حصول تغييرات وراثية مُفيدة في النباتات الكايميرية منها نباتات تحمل صفة العُقم الذكري السايتوبلازمي في بذور الجيل الأول. تم التحري عن أُسس التغاير التي حصلت في هذه الصفة بعد تحليل 18 جين مايتوكوندريا و 17S من الجينات النووية للرنا الرايبوسومي بإستعمال PCR وتحليل اللطخة الجنوبية (Southern Blot Analysis).

إنتاج كايميرا البرتقال بالتركيب الدقيق Orange chimera using micrografting

أُستعمل صنفي البرتقال Kawano-Natsudaidai و Fukuhara في دراسات التركيب الدقيق والزراعة داخل أنابيب الإختبار بهدف الحصول على صفات مرغوبة من النباتات الكايميرية مثل العُقم السايتوبلازمي الذكري، مُقاومة الأمراض وتحسين المذاق. تم تشخيص كايميرا مُحيطية على أساس تركيب

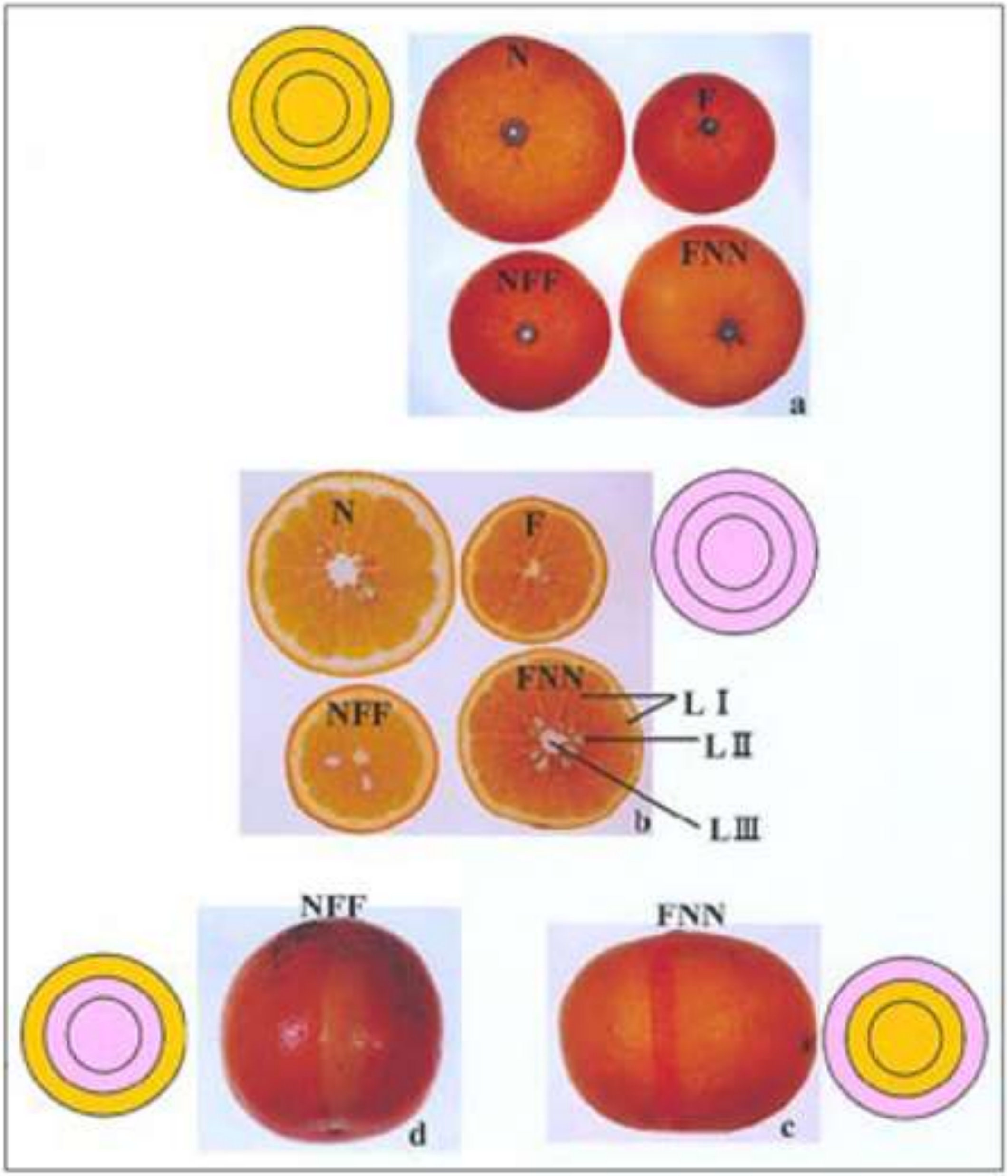
الطبقات الثلاث وتبين من التحليل المورفولوجي ظهور نوعين من الكايميرا في المرستيم القمي. سُمي نوعي الكايميرا FNN و NFF وللطبقات الثلاث (شكل 8.28). إختلف N عن F في لون الثمرة، حجمها وشكلها وأظهرت الكايميرا NFF إختلافاً عن النبات الواهب بزيادة حجم الثمرة ووزنها بينما قلت في الكايميرا FNN.



شكل 8.27 الشكل المظهري (يسار)؛ تركيب نسيج الورقة (وسط)؛ تركيب طبقات المرستيم القمي (يمين) لكل من الآباء والكايميرا الناتجة. (A) كايميرا مُحيطية بلون أحمر-أبيض-أبيض (RWW)؛ (B) كايميرا مُحيطية WWR؛ (C) كايميرا مُحيطية WRW؛ (D) نمط تعبير الكلوتاثيوز (GUS) في الكايميرا المُحيطية WWR/WRR.

أظهر تحليل التهجين الجنوبي (Southern hybridization) وجود خمس شظايا (Fragments) مُميزة في جينوم دنا FNN تختلف مع بعضها ومع كلٍ من الأصل والطُعم مما أنتج تغايراً في النباتات الكايميرية. لابُد من التأكيد على أهمية الكايميرا وخاصة في مجال تربية الطفرات وإستثمارها من الناحية البستنية، فظهور الوان جديدة أو إعادة أنماطها بشكل غير معروف سابقاً يمثل مكسباً لتجار الزهور والهواة. تبرز أهمية خاصة عند تطوير أصناف تحمل صفة العُقم الذكري في الأجيال اللاحقة لما يوفره ذلك من جهد

وكُلفة لمربي النبات. أخيراً، ظهور فرع جديد من علوم النبات يتقصى عن تداخلات خلية مع أُخرى في المُستويات المورفولوجية، الفسيولوجية والوراثية.



شكل 8.28. التداخل بين أنسجة F و N في كايميرا ثمار البرتقال. بينت التحليلات المورفولوجية والجزيئية حصول تغاير في دنا النباتات الكايميرية بسبب تداخل أنواع الأنسجة.

فصل الكايميرات في الزراعة النسيجية Separation of chimeras in tissue cultures

توفر تقانة زراعة الأنسجة النباتية فرصة إكثار أعداد قليلة من الخلايا ضمن النظام النسيجي وحتى الخلايا المُفردة المعزولة وبذلك يُمكن توظيفها بعد عزل الأنسجة الكايميرية وإكثارها ودراستها مورفولوجياً ووراثياً. يُمكن فصل الكايميرات بعد ظهور الأفرع العرضية من خلايا قمم الأفرع المُنتظمة على شكل طبقات وإكثارها خضرياً. لوحظ في العديد من النباتات بأن النُبيتات الناتجة من البراعم الأُبطية (Axilary buds) وبنسبة تتراوح حوالي 70% طبيعية مظهرياً والنسبة الباقية نُبيتات مُختلفة عن النبات الام (off-type) مثل إنعدام الكلوروفيل (تموت فيما بعد بسبب فقدانها المقدرة على التركيب الضوئي) أو نُبيتات بلون أخضر داكن وفي حالات قليلة ذات شكل برونزي.

الفصل التاسع: حفظ المصادر الوراثية

Storage of Genetic Resources

مُقدمة Introduction

تتوافر حالياً إستراتيجيتان أساسيتان في حفظ المصادر الوراثية، موقعياً (*in situ*) وخارج الموقع *ex situ)* وكلٍ مِنهما تشتمل على العديد من التقانات المهمة وتهدف جميعاً في النهاية الى المُحافظة في التنوع الأحيائي النباتي. عرّف ميثاق التنوع الأحيائي المُوقع من غالبية دول العالم، الخزن خارج الموقع بأنه المُحافظة على مكونات التنوع الاحيائي خارج موائلها الطبيعية (Natural habitats) وعرّف المُحافظة في داخل الموقع بأنه الحفاظ على النظام البيئي والموائل الطبيعية وبشكل فعال ولكافة الغطاء النباتي المُستوطن والمزروع في المنطقة الجغرافية التي نمت فيها وتميزت تلك المناطق بذلك النوع من الغطاء النباتي. ولحد الأمد القريب، كانت أغلب جُهود المُحافظة على المصادر الوراثية قد ركزت على الحفاظ عليها خارج الموقع بعد إنشاء بنوك البذور، وبعد منتصف القرن الماضي ومع بدء الثورة الخضراء وما حققته في مجال تحسين الأصناف، تبنى المزارعون أصناف عالية الإنتاج والجودة خاصية المحاصيل الإستراتيجية كالحنطة والرز على وجه الخصوص. نتيجةً لتبني الأصناف عالية الإنتاجية والنوعية وترك الأصناف المحلية والمُستوطنة التي تأقلمت لظروف المنطقة، ظهرت توجسات بشأن فُقدان المادة الوراثية لتلك الأصناف وإحتمال إنقراضها. لذلك شرعت المُنظمات العالمية ذات العلاقة ومنها مراكز البحوث الزراعية العالمية (IARC) المنضوية تحت المجموعة الإستشارية للبحوث الزراعية العالمية (CGIAR)، بجمع المواد الوراثية (Germplasm) للأنواع الرئيسة من المزارعين الذين لازالوا يزرعوها وحصل تنسيقاً عالياً مع المجلس العالمي للمصادر الوراثية (CGIAR) يهدف الى جمع المواد الوراثية النباتية وخزنها ومنعها من الإنقراض. حققت تلك المؤسسات نجاحات سجلها التأريخ حيث أُسست أكثر من 1750 بنك للجينات موزعة في أغلب مناطق العالم وما يُقارب من 130 من تلك البنوك تحتفظ الآن بما يزيد عن 10000 مادة وراثية في كلٍ منها وقُدِر مجموعها بحوالي 7.4 مليون مادة وراثية تعود لمُختلف النباتات.

مع تطور التقانات الأحيائية السريع ولِصعوبة خزن المواد الوراثية باشكالها القديمة وخاصةً على شكل بذور، دخلت تقانات المُحافظة على المواد الوراثية خارج الجسم الحي (*In vitro* conservation) والتجميد الفائق (Cryopreservation). ظهرت أهمية تبني تقانات الإكثار السُلالي السريع لتلك المواد النباتية وغيرت تقانات الزراعة النسيجية المُعادلة بعد أن ثبُت إمكانية إخلاف الأجزاء النباتية المخزونة بطرائق

التجميد التي سيرد الكلام عنها ولُحُسن الحظ تبنت العديد من المؤسسات العالمية والمحلية التقانات الحديثة ومن ضمنها الحدائق النباتية المُنتشرة في أنحاء العالم والتي يزيد عددها عن 2500 حديقة نباتية لتُكاثر وتُحافظ على ثلث الثروة النباتية (حوالي 80000 نوع).

الحاجة في المحافظة على المصادر الوراثية The need for genetic conservation

يَشمل الحفاظ على المصادر الوراثية مايُسمى بالمادة الوراثية (Germplasm) والتي تنتقل من جيلٍ لآخر وتوفر المادة الأولية للمُختصين في إنتاج أصناف جديدة من النبات. أستطاع الإنسان وعلى مر العصور بالإستفادة من النباتات كغذاء ودواء ومأوى. وكان يخزن بذور أو أجزاء خضرية مُنتجة من نباتات عالية الجودة من موسم لآخر أي أنه كان يخزن المادة الوراثية بطرائق إبتدائية. وبلاشك فإن الكثير من النباتات التي كانت تحمل صفات جيدة كمُقاومة الأمراض وتحَمُل الظروف البيئية القاسية وحتى ذات الإنتاجية الجيدة قد إنقرضت والقسمُ الآخر في طريقه إلى الإنقراض. لذا كان على المُختصين التفكير بالمُحافظة على المادة الوراثية بما يضمن التنوع الأحيائي الوراثي لنباتات معلومة الصفات وإستعمالها في المُستقبل القريب والبعيد بطرائق تضمن سلامتها وإعادة إخلاف نباتات كاملة منها عند الحاجة. ونتيجةً لما سبق فقد حلَت أصناف وأنواع نباتية جديدة ذات صفات مرغوبة محل القديمة نتيجة الإنتخاب المُستمر ولاتزال نباتات برية نامية في مواطن نشوئها الأصلية. واضاف مربو النبات أنواع جديدة أُنتجت من برامج تربية وتحسين النبات، مع الأخذ بنظر الإعتبار الحفاظ على تلك الأنواع القديمة ذات الصفات المرغوبة كتحمل الظروف البيئية الصعبة ومُقاومتها للآفات ومنعها من الإنقراض باعتبارها خزيناً طبيعياً للمادة الوراثية. ظهرت مُؤسسات عالمية ومحلية تبنت موضوع المُحافظة على المصادر الوراثية أهمها المجلس العالمي لِحفظ المصادر الوراثية النباتية (IBPGR). وضع المجلس أهدافه التي يُمكن تلخيصها بجمع المادة الوراثية، والمُحافظة عليها ومن ثم الإستفادة منها من خلال تداولها بين البُلدان المُختلفة وفق ضوابط مُحددة تُتيح لمُربي النبات الحصول عليها والإستفادة من الصفات المرغوبة التي تحملها. تبنت المؤسسات المُختصة وسيلتان لتحقيق الأغراض أعلاه شملت:

أولاً: المُحافظة على المصادر الوراثية في مواطنها (موائلها) الأصلية وهذا مايُطلق عليه *In-situ* conservation وذلك بتوفير بيئات مُناسبة لنمو النبات المُراد المُحافظة عليه من بإنشاء المحميات الطبيعية لهذا الغرض. تَضمن بيئة المحمية نمواً للأنواع المُستزرعة والبرية بما يوفر تنوعاً أحيائياً فريداً وقد لايُترك للتفاعل الطبيعي بين الأجناس والأنواع إذا ماظهرت بعض الأنواع الغازية (Invasive) على حساب الأنواع

الاخرى. وبالرغم من الفوائد المُتوخاة من هذه الطريقة في المُحافظة على الأنواع النباتية إلا أن الكثير من المخاوف قد تحصل نتيجة الكوارث الطبيعية إذا ماحصلت إضافةً إلى الكُلفة العالية التي تُصرف في إدارة هذه المحميات كنتيجة للأعداد الكبيرة من النباتات التي تنمو فيها.

ثانيا: المُحافظة على المصادر الوراثية في مواقع خارج مواطنها الأصلية (*Ex-situ* conversation) إذ تُجمع المواد النباتية سواءً المُستزرعة أو البرية من مُختلف مناطق العالم خاصة المحميات الطبيعية والحدائق النباتية على شكل بذور أو أجزاء خضرية أو مزارعها النسيجية وتُخزن تحت ظروف مُسيطر عليها ولمُدد زمنية مُختلفة وهذا مايُطلق عليه ببنوك الجينات (Gene banks). ومن المؤكد أن تكون هناك خبرة ودراية تامة من حيث التصنيف الصحيح للمادة النباتية وخصائصها والتقانات المطلوبة في جمعها والحفاظ عليها وإدامتها وإعادة زراعتها خاصةً النسيجية منها لضمان إعادة إخلاف النبات الكامل منها.

خزن البذور Seed storage

تُعد البذور أكثر المواد شيوعاً ومُناسبة للخزن وأن أعداد هائلة من النباتات تتكاثر جنسياً بالبذور ولا تأخذ حيزاً كبيراً عند الخزن والنقل إلا أنها تفقد حيويتها مع إطالة مُدة خزنها. وتتوقف حيوية البذور على الأنواع النباتية فمنها سريعة التلف لاتزيد مُدة خزن بذورها عن سنة واحدة والقسم الآخر من البذور يُحافظ على حيويته عدة سنوات. كما أن البذور عُرضة للتلف عند الخزن بسبب القوارض والحشرات والأمراض ما لم تُتخذ الإجراءات العلمية الصحيحة. والمعلوم أن خزن البذور ينحصر بالنباتات البذرية ولاينفع مع تلك التي تتكاثر بالطرائق الخُضرية كالبطاطا والألمازة والبطاطا الحلوة وغيرها. إضافةً إلى صعوبة المُحافظة على الثباتية الوراثية للسُلالات المُستنبطة لأن أغلب الأنواع النباتية تنتج بذورا متباينة وراثياً (Heterozygous). وبناءاً على ماتقدم وبفضل التقدم العلمي في مجال التقانات الأحيائية، أصبح بمقدور المُختصين المُحافظة على المصادر الوراثية خارج الجسم الحي (*In vitro*) تحت ظروف بيئية مُسيطر عليها. تحافظ البذور عموماً على حيويتها طالما وِجِدَ غذاء مخزون فيها لتوفير التفاعلات المطلوبة لبقاء البذرة حية. تعتمد سرعة التفاعلات الكيميائية على درجة حرارة الخزن، كلما إرتفعت الأخيرة زادت سرعة التفاعلات الكيميائية وقل خزين البذرة الغذائي، والقاعدة العامة هي إطالة مدة الخزن الى الضعف مع كل إنخفاض مقداره 5°م. وعلى سبيل المثال، تحافظ بذور البصل ذات المحتوى الرطوبي على حيويتها لمدة 16 إسبوع عند خزنها في درجة حرارة 35°م ولكن تستمر حيويتها لمدة 78 سنة عند خزنها في الصفر المئوي. يجب مراعاة عدم تجميد البذور الطرية وكذلك بذور المحاصيل الزيتية لذلك يستوجب الأمر التفكير بطرائق بديلة.

تزداد مدة محافظة البذور على حيويتها الى الضعف مع كل إنخفاض مقداره 1°م في المحتوى الرطوبي للبذور على ان لاينخفض الأخير دون 4%. تقترح تعليمات خزن البذور القياسية عند خزن البذور لفترات زمنية طويلة أن تكون النسبة المئوية للمحتوى الرطوبي 5% وخزنها في درجة -18° م.

الخزن المُبرد Cold storage

يَتضمن الخزن المُبرد أساساً للحفاظ على المادة الوراثية في درجات حرارة مُنخفضة لاتصل إلى درجة الإنجماد (1-9) °م. يتم تبريد المادة النباتية بشكل تدريجي على عكس التبريد الفائق لذا يُعد الخزن المُبرد تبطئ لنمو الزروعات. من الفوائد المُتوخاة من الخزن المُبرد، أن المادة النباتية سواء كانت خلايا أو أنسجة أو أعضاء لاتتعرض إلى أضرار الإنجماد. وتُعد طريقة بسيطة لخزن الزروعات وغير مُكلفة وتنتج مواد نباتية ذات حيوية وإخلاف عالي. أُستعملت في العملية العديد من زروعات أشجار الفاكهة كالأعناب والفراولة وأُخلف منها نباتات كاملة. وعلى سبيل المثال تم الحفاظ على زروعات فراولة خالية من الفيروسات لمُدة ست سنوات في درجة حرارة 10°م مع إضافة قطرات قليلة من الوسط الغذائي كل 2-3 شهر. كما حُفظت العديد من أصناف العنب لمُدة زادت عن 15 سنة في درجة حرارة 9 °م مع مراعاة نقلها سنوياً إلى وسط غذائي جديد.

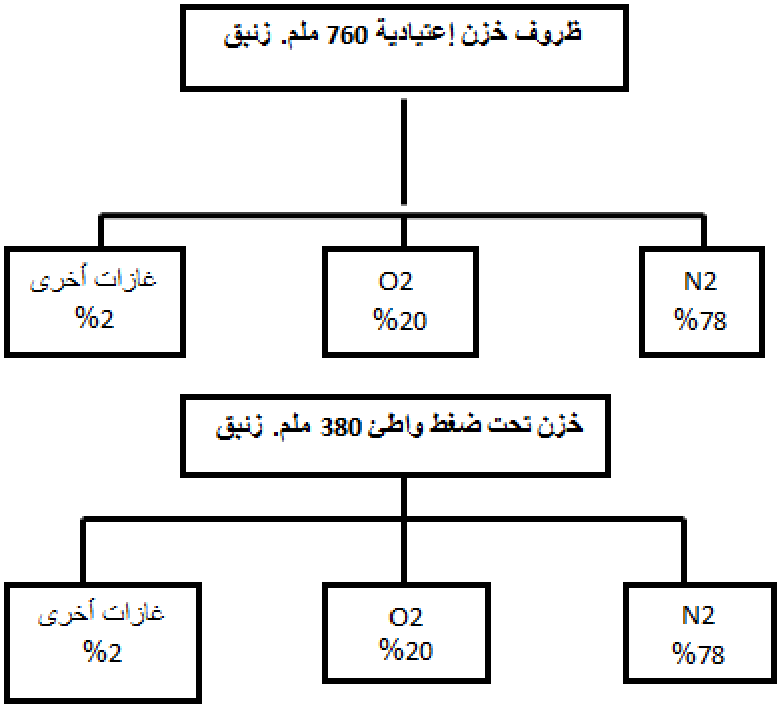
الخزن تحت الضغط الواطئ Low pressure storage (LPS)

كبديل للتبريد الفائق والخزن المُبرد، تُستعمل طريقة الخزن تحت الضغط الواطئ (LPS) في حفظ المصادر الوراثية النباتية (لاحظ شكل 9.1). يُقلل الضغط الجوي (ضغط الغازات) في الجو المُحيط بالمواد النباتية المحفوظة داخل العبوات مما يؤدي إلى إنقسام أو نمو الخلايا أو الأجزاء النباتية غير المُتمايزة والمُتمايزة منها على حدٍ سواء. يُستفاد من طريقة الخزن هذه في حفظ المصادر الوراثية في الأمدين القصير والطويل. ومن الناحية التطبيقية، أُستثمرت طريقة الخزن تحت الضغط الواطئ في زيادة العُمر المخزني (Shelf life) للعديد من الثمار والخضراوات وأزهار القطف والعُقل وتفيد كثيراً في التقليل من فعالية المُسببات المرضية وتُثبط إنبات السبورات وذلك عند الرغبة في خزن مواد نباتية لم يَجرى تعقيمها مُسبقاً.

الخزن تحت ظروف مُستويات أوكسجين مُنخفض Low oxygen storage (LOS)

تُقلَل مُستويات الأوكسجين مع المُحافظة لذات مُستويات الضغط الجوي (760 ملم.زئبق) الإعتيادية بتعزيز الجو الداخلي للعُبوات بغازات خاملة وخاصة غازالنتروجين (شكل 9.2). يُؤدي تقليل الضغط الجُزئي

لمُستوى الأوكسجين إلى أقل من 150 ملم.زئبق إلى تقليل نمو الأنسجة النباتية. يعود سبب ذلك إلى إنخفاض كمية الأوكسجين المُتوفرة وبهذا تقل كمية ثنائي أوكسيد الكربون المُتحررة ونتيجةً لذلك تقل فعالية التمثيل الضوئي وبالتالي تُقلل أو تمنع من نمو الأنسجة. يُعاب على طريقة الخزن تحت ظروف الأوكسجين الواطئ أنها لاتصلح لخزن الزروعات لمُدة طويلة لذا يَستوجب الأمر إجراء الفحص الدوري للزروعات.

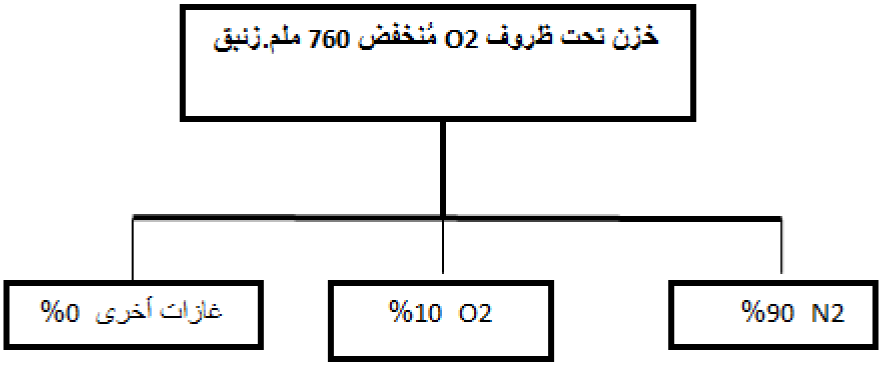


شكل 9.1. مُقارنة بين ظروف خزن المواد النباتية تحت الظروف الطبيعية وتحت ظروف الضغط الواطئ والاوكسجين المُنخفض.

الخزن بتبطئ النمو Slow growth storage

تُستعمل ظروف الزراعة القياسية في الخزن مُتوسط المدى (Medium-term storage) للأنواع النباتية ذات النمو البطئ بطبيعتها ولكن وفي العديد من الأنواع النباتية يحصل إختزال في نموها بسبب تغير ظروف زراعتها البيئية. من أكثر التقانات رواجاً في تبطئ نمو الزروعات، خفض درجات الحرارة وخاصة إذا ما صاحبها خفض في شدة الإضاءة. فعلى سبيل المثال يتم خزن زروعات نبات الفراولة في 4 °م في الظلام وتبقى مُحتفظة بحيويتها لمُدة 5 أعوام مع إضافة قطرات وبإُنتظام لوسطها الغذائي. نجحت زروعات من أفرع التفاح وأنواع أُخرى من العائلة الوردية بعد زراعتها تحت ظروف درجة حرارة مُنخفضة (2 °م)

لمدة 52 أسبوعاً. وكذلك نجحت زروعات نُبيتات الموز لمدة وصلت الى 15 شهراً بعد خزنها في 15 °م دون الحاجة لنقلها الى وسط جديد والأمثلة كثيرة.



شكل 9.2. خزن المواد النباتية تحت ظروف تقليل الاوكسجين.

تحويرالوسط الغذائي وتقليل النمو Medium modification and slowing growth

يُمكن عمل العديد من التحويرات للوسط الغذائي لتقليل النمو فالمزارع الجنينية للجزر تحتفظ بحيويتها لمُدة سنتن عند عدم تضمين الوسط الغذائي بالسكروز وتبدأ ألإنقسام حال إضافة محلول من السكروز اليها. وتحفظ نُبيتات القهوة في وسط خالي من السكروز وبنُصف قوة العناصر المعدنية. إضافة مُثبطات النمو الازموزية هي الأُخرى تؤخر نمو الزروعات مثل المانيتول أو مُثبطات النمو مثل ABA. تؤثر الحالة الفسيولوجية للجزء النباتي قبل خزنه في طول فترة خزنه، فقطع العُقد لنبات الداؤودي إحتفظت بحيويتها لفترة أطول من الأفرع الطرفية. عموماً تحتفظ الزروعات بحيويتها لفترة أطول عند إحتوائها على مجموع جذري كما هو الحال في نُبيتات القهوة. يٌمكن خزن الدرينات (Microtubers) للبطاطا ولفترات زمنية طويلة مُقارنة مع أجزاء نباتية مخزونة من النبات.

التكييف المبدئي (Preconditioning) للأجزاء النباتية بعد تعريضها الى درجات حرارة وضوء وسطية أي بين التي تحتاجها في الظروف الطبيعية وتلك التي تحتاجها عند الخزن البارد، كان مُفيداً في رفع سقف فترة الخزن كما هو الحال في زروعات الكورديلاين والنفرولبس (Cordyline & Nephrolepis). يؤثر وعاء الزراعة، حجمه، ونوع غطاء الوعاء كثيراً في إطالة أو قصر فترة الخزن حيث الحجم الأكبر والأكياس المصنوعة من البوليبروبلين المُحكمة حرارياً بدل أنابيب الإختبار الزجاجية قد أطال من فترة خزن

زروعات الفراولة. تُنقل الزروعات بعد إنتهاء مدة خزنها الى وسط جديد لمدة قصيرة لتشجيع نموها وبعدها تعاد الى ظروف الخزن ثانية عند الرغبة في إستمرار الخزن.

تتوافر تقانات بديلة لما سبق تهدف في إطالة مدة الخزن منها تحوير البيئة الغازية للزروعات، تقليل مُحتواها الرطوبي، تغليف الأجزاء النباتية. يُساعد تقليل تركيز الاوكسجين في أوعية الزروعات في إطالة عُمرها ويتم ذلك بتغطية الأجزاء النباتية بالبارافلم، الزيت المعدني أو بوسط سائل، فتغطية مزارع النموات الخضرية لأنواع عديدة من نبات الزنجبيل (Ginger) بزيت معدني أو وسط سائل أطال مدة خزنها لمدة سنتين مع إحتفاظها بحيوية عالية.

تطبيقات خزن المصادر الوراثية Applications of storage of genetic resources

تُعد الوسائل الحديثة في خزن المصادر الوراثية عصراً ذهبياً لِمُربي النبات والمُختصين في التقانات الأحيائية وفيما يلي أهم التطبيقات لهذا الحقل الحيوي:

1- المُحافظة على المزارع النسيجية وإدامتها إذ تم الحفاظ على المزارع النسيجية للعديد من الأنواع النباتية بإستعمال تقانات الخزن المُبرد الفائق. وأصبح بالإمكان خزنها لفترات طويلة من الزمن وإعادة إخلافها كلما دعت الحاجة لذلك (شكل 9.3).

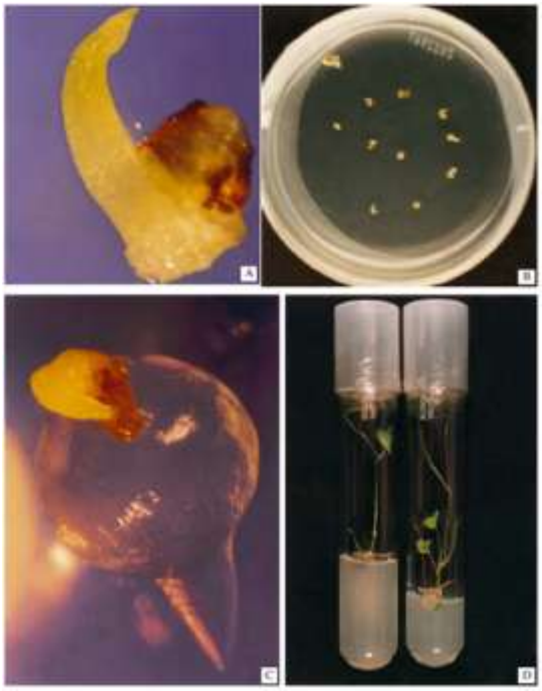
2- يُعد الخزن الفائق للزروعات ولفترات طويلة سهلاً بهدف المُحافظة على كل الأنواع النباتية ذات القيمة الصيدلانية.

3- بالإمكان المُحافظة على البذور التي لايُمكن خزنها لفترات طويلة في الأحوال الطبيعية إلى فترات طويلة.

4- إمكانية المُحافظة على المواد النباتية الخالية من الفيروسات بعد خزنها تحت ظروف التجميد الفائق وإستعمالها عند الحاجة.

5- كما أصبح بالإمكان المُحافظة على المواد النباتية ذات التغايرات الجسمانية والجنسية لفترات طويلة.

6- وفرت التقانات الحديثة في الحفاظ على المصادر الوراثية والمحافظة على الأنواع النباتية المُهددة بالإنقراض.



شكل 9.3. أفرع طرفية لأطراف أفرع من نبات *Daucus deltoidea* بعد تجميدها تجميداً فائقاً. (A) نهاية فرع مُقربة ويُلاحظ نموها دون المرور بمرحلة الكالس. (B) نسب توالد عالية من أطراف الأفرع التي خضعت للتجميد. (C) نهاية فرع مُقربة ويظهر فيها بداية النمو بعد ان كانت مُجمُدة. (D) فرع نامي بشكل جيد ناتج من نهايات أفرع كانت مُجمُدة.

7- وفرت ظروف الخزن الجديدة فرصة كبيرة في حفظ حبوب اللقاح لمُدة طويلة.

8- إمكانية المُحافظة على المادة الوراثية التي تم تطويرها بالتقانات الحديثة مثل الهُجن الجسمية والخلايا المُهندسة وراثياً وتلك التي عُدلت جينياً.

9- وفرت تقانة الخزن بالتبريد إمكانية إنتاج خطوط خلايا ذات تَحمل عالي للبرودة ولربما للإنجماد مما يُتيح فُرصة في إمكانية إخلافها ونشر زراعة تلك الأنواع في المناطق الباردة.

10- توفر بنوك المُهمة المصادر الوراثية فرصة عظيمة لتبادل المعلومات حول المواد الوراثية النباتية وسهولة نقلها بين الدول المُختلفة. دون شك هناك بعض المُحددات لتقانات الخزن المُبرد ولو على نطاق ضيق ويُمكن تجاوزها أهمها أن التقانة تحتاج إلى ملاكات مُدربة وإلى أجهزة مُتطورة والبحث مُستمر في إمكانية إيجاد طرائق للخزن أقلَ كُلفة وتعقيداً وكما سيرد لاحقاً. يُلخص جدول 9.1 محاسن ومساوئ التجميد الفائق.

جدول 9.1. مُختصر لمزايا وعيوب تقانات التجميد الفائق للأجزاء النباتية المُختلفة

التقانة	المزايا	العيوب
التجميد البطئ (Slow freezing)	ثباتية من واقيات ضرر الإنجماد غير السامة نسبياً	يتطلب أجهزة غالية، نسب نجاة قليلة، تطبيقها محدود في النباتات الإستوائية
التزجج (Vitrification)	لاتحتاج الى أجهزة مُتخصصة، طرائق سريعة، سرعة النجاة	سُمية محاليل التزجج للعديد من الأنواع النباتية، إحتمالية حصول تشققات، يتطلب توقيتات زمنية دقيقة عند تبديل المحاليل
التغليف وتقليل الرطوبة (Encapsulation & dehydration)	لاتحتاج الى أجهزة مُتخصصة، واقيات ضرر الإنجماد غير سامة، طرائق إذابة بسيطة	تتطلب عناية فائقة لكل خرزة (bead)، لايتحمل قسم من النباتات التراكيز العالية من السكروز
تجفيف البرعم الساكن (Dormant bud desiccation)	سهل، مُفيد للعديد من أشجار المناطق الباردة	يتطلب أجهزة تجميد، مناطق خزن واسعة، تتطلب النجاة إجراء تطعيم أو تركيب، يفضل العمل في مناطق العالم الباردة

ذللت بنوك الجينات الكثير من العقبات منها:

1- إمكانية خزن كميات كبيرة من المواد النباتية في حيز صغير.

2- يُمكن حمايتها ولحد كبير من المخاطر البيئية.

وفي الغالب تُنشأ مواقع الخزن في محافظات مُختلفة وبلدان مُختلفة وفي حالة حصول أي خطر طبيعي كالزلازل والبراكين والفيضانات وغيرها فتكون ذات المواد المخزونة مُتوفرة في مكانٍ آخر آمن.

3- ولكون ظروف الخزن مُسيطر عليها، فالمادة الوراثية تكون خالية من المُسببات المرضية على إفتراض أنها قد عُقمت قبل خزنها.

4- سهولة نقلها وتداولها لِصغر حجمها وقلة إجراءات الحجر الزراعي في المطارات والمنافذ الحدودية كونها مواد مُعقمة. وقد طُورت ثلاث تقانات جميعها فعالة في المُحافظة على المادة الوراثية تشتمل على:

أولاً: الحفظ بالتجميد أو ما يُسمى Cryopreservation أو Freeze-preservation

بُنيت تقانة الحفظ بالتجميد على مبدأ خفض درجة حرارة الخلية النباتية والنسيج النباتي وأي جزء يُراد خزنه إلى درجة مُنخفضة من البرودة بحيث توقف الإنقسام الخلوي والفعالية الأيضية من الإستمرار في خفض درجة الحرارة وبوجود مواد حافظة ضد أضرار الإنجماد (Cryoprotectants) وقد طُورت هذه التقانة لتشتمل التجميد بأربع طرائق:

أ- خزن المواد النباتية في ثنائي أوكسيد الكربون الجاف ذو درجة حرارة 79- °م.

ب- الخزن بمُجمدات ذات تبريد عالي بحيث تصل درجة حرارتها إلى 80- °م.

ج- الخزن بالنتروجين بحالة البُخار والذي تصل درجة حرارته إلى 150- °م.

د- الخزن في النتروجين السائل في درجة حرارة 196- °م.

علماً بأن الطريقة الأخيرة هي الأكثر شيوعاً بالنظر لكونها توفر برودة عالية تجعل من خلايا النبات في حالة شبه متوقفة إذ تتوقف فيها عمليات الأيض إلى الصفر وعليه تطول فترة خزنها. المُهم من الناحية التطبيقية أن يعود النسيج والعضو النباتي إلى الإنقسام وتكوين نبات كامل بعد إذابة (Thawing) المادة الوراثية المخزونة. أُستعملت التقانة وبنجاح في خزن المواد الوراثية المفصولة من الرز، الحنطة، قصب السكر، والكاكاو ونباتات طبية (جدول 9.2) وقد نجحت الكثير من الأنواع النباتية التي خضعت إلى التجميد الفائق في إعادة إخلافها.

جدول 9.2. أمثلة لنباتات طبية تم تجميد أنسجتها بالتبريد الفائق

النبات	الجزء النباتي/المزرعة	طريقة التجميد
Anisodus acutangulus (حاد الزاوية)	معلقات خلوية	LN2
Atropa belladonna (ست الحسن)	أجنة حبوب لقاح، بروتوبلاست	LN2
Catharanthus roseus (عين البزون)	معلقات خلوية	0-30، -196°م
Datura innoxia (البنج)	بروتوبلاست	عُرضت الى بُخار وغُمرت في LN2
Dioscorea alata (يام)	أطراف الافرع	تغليف وتجفيف
Dioscorea balanica (يام)	كالس	غمر مباشر في LN2
Dioscorea floribunda (يام)	أطراف الأفرع	تغليف وتجفيف
Dioscorea bulbifera (يام)	أطراف الأفرع	تغليف وتجفيف
Eucalyptus sp. (يوكابتوس)	أطراف الأفرع	تغليف وتجفيف
Ipomea batatas (بطاطا حلوة)	أطراف الأفرع	تزجج
Medicago sativa (جت)	أجنة جسمية	تغليف
Mentha sp. (نعناع)	أطراف الأفرع	تغليف وتزجيج
Nicotiana tabacum (تبغ)	بروتوبلاست	LN2
Panax ginseng (جنسنج)	مُعلقات خلوية	تقسية، -30، -70، ثم -196
Trifolium repenes (نفل)	أطراف الأفرع	تزجج

وقد طَورت الشركات التخصصية حاويات خاصة لهذا الغرض (ألاشكال 9.4، 9.5، 9.6). وقد تم تفصيل طرائق التجميد في الجدول 9.3 ويُمكن للقارئ الرجوع الى تفاصيل الجدول لتطبيقها عملياً.

شكل 9.4. حافظة العينات النباتية التي تُستعمل لأغراض التجميد الفائق.

شكل 9.5. مُجسم لحاوية العينات النباتية المُراد خزن المادة الوراثية النباتية فيها يوضح مُكوناتها الداخلية.

شكل 9.6. بعض العبوات المُخصصة لحفظ العينات النباتية المُجمدة بطريقة التجميد الفائق بالنتروجين السائل والمُنتجة من قبل شركة MVE.

يُتوخى الإنتباه إلى المسائل التالية عند التجميد الفائق للمادة النباتية لتقليل أضرار الإنجماد والحصول على إخلاف جيد من النسيج النباتي المخزون:

1- تؤثر المواد الحافظة (Cryoprotectants) في حيوية الخلايا والأجنة المخزونة.

2- تتسرب المحاليل من داخل الخلية إلى خارجها في بعض الحالات.

3- تجنب تكوين البلورات الثلجية داخل الخلايا كونها تتلف العضيات وجدر الخلايا.

4- يكون إختيار المواد الوراثية المُراد خزنها بالتجميد الفائق بحالة فسيولوجية مُمتازة من حيث التغذية والحداثة (Juvenility) وخلوها من الإصابات الحشرية والمرضية قبل خزنها.

جدول 9.3. مُختصر للطرائق المُختلفة المُستعملة في التجميد الفائق

التقانة	الجُزء النباتي	طريقة الخزن
1- التزجيج (Vitrification)	أطراف الأفرع، الأنسجة الجنينية، المزارع الخلوية	يُعامل الجزء النباتي بمادة الجليسرول 1M (LS) لمُدة 20 دقيقة في 25 °م، يتبعها تقليل الرطوبة بخليط PVS2 (30% جليسرول، 15% EG، 15% DMSO في 0 مئوي لمُدة 90 دقيقة، تجميد سريع في LN، إذابة في 40 °م لمُدة 1-2 °م، UL (1.2 M) سكروز، زراعة في وسط الإخلاف.
2- تغليف وتقليل رطوبة (Encapsulation & dehydration)	أطراف الأفرع، الأنسجة الجنينية	يُغلف الجزء النباتي بمادة اللجنات الكالسيوم ويزرع مبدئياً في محلول مركز من السكروز (0.5-0.75 M)، تُقلل رطوبة الجزء النباتي داخل منضدة الهواء الطبقي لمُدة 4-5 ساعة، تجميد سريع بالنتروجين السائل، إذابة سريعة في 40 °م لمُدة 1-2 دقيقة، يزرع على وسط الإخلاف.
3- تغليف وتزجيج (Encapsulation & vitrification)	أطراف الأفرع	المرستيمات المُغلفة والحاوية على 2M جليسرول+ 0.4M سكروز تُقلل رطوبتها بخليط PVS2 لمُدة 2 ساعة في الصفر المئوي يعقبها غمر في النتروجين السائل.
4- قبل النمو (Pre-growth)	أجنة مُخصبة، أجنة جسمية	تشتمل تقانة قبل النمو في زراعة عينات بوجود المواد الحافظة (Cryoprotectants)، تجميد سريع بغمرها بالنتروجين السائل.
5- تجفيف ما قبل النمو (Pre-growth desiccation)	قطع ساقية	يشير ذلك الى زراعة إبتدائية للجزء النباتي في وسط ذات تركيز عالي من السكروز أو ABA أو برولين، يليها تقليل الرطوبة ليتبعها التجميد بالنتروجين السائل.
6- التجفيف (Desiccation)	مجموعة كبيرة من الأنواع النباتية التي من الصعب إنبات بذورها (Recalcitrant)	يتم التجفيف عادةً في تيار هواء داخل منضدة الهواء الطبقي ويُفضل الهواء المضغوط المُعقم أو إستعمال مادة هلام السليكا.
7- تجميد القطرات الصغيرة (Droplet freezing)	أطراف الأفرع	تُعامل أطراف اللأفرع بمادة حامية من ضرر الإنجماد سائلة في وسط زرعي بعدها تُوضع في رقائق الألمنيوم في قطرات صغيرة جداً من حامي ضرر الإنجماد وتُجمد مُباشرةً بغمرها بالنتروجين السائل.

خطوات التجميد الفائق Steps of ultra-freezing

تَمر الخلايا والأنسجة المُراد تجميدها ولحين إعادة إخلافها عبر مجموعة من الخطوات والتي يُمكن إختصارها كما يلي:

أولا: إختيار المادة النباتية وتعقيمها سطحياً

يُحدد النوع النباتي والجُزء المُراد تجميده من نباتات ذات صفات مورفولوجية وفسيولوجية جيدة، علماً بأن كل أنواع الأنسجة يُمكن خزنها بالتجميد الفائق. نَجح المُختصون في تجميد وإخلاف المرستيمات، الأجنة، أنسجة الجويزاء، البويضات، البذور، خلايا الكالس، البروتوبلاستات، خلايا المُعلقات الخلوية عندما تكون في الطور الأسي وباقي أجزاء النبات. تُجرى معاملة أولية (Pretreatment) للأنسجة النباتية بمواد حافظة تمنع تلف الخلايا نتيجة الإنجماد والإذابة. تُخَفض المواد الحافظة من درجة إنجماد الماء داخل الخلايا مما يمنع من تكوين البلورات الثلجية في أثناء الإنجماد. أُستعملت العديد من المواد الحافظة لهذا الغرض أهمها ثنائي مثيل سلفوأوكسايد (DMSO)، الكليسرول، الأثيلين، البروبلين، السكروز، المانوز، الكلوكوز، البرولين ومادة الأسيتومايد. يُعد DMSO والسكروز والكليسرول أكثر المواد الحافظة إستعمالاً. وغالباً ما يُستعمل خليط من المواد الحافظة بدل المُعاملة بمادة مُفردة في الحصول على نتائج أكثر إيجابية في منع تلف الخلايا.

ثانياً: الإنجماد

تعتمد حساسية خلايا النبات لإنخفاض درجة الحرارة وبشكل كبير في النوع النباتي وهل موطنه الأصلي المناطق الإستوائية أم الباردة. طُورت أربع طرائق لتجميد خلايا وأنسجة وأعضاء النبات وفيما يلي شرحاً مُختصراً لها:

1- طريقة التجميد البطئ Slow freezing method

يُعَرض النسيج النباتي للإنجماد ببطئ وبمقدار 0.5-5 °م/دقيقة إبتداءاً من الصفر المئوي ونزولاً إلى 100 °م تحت الصفر ومن بعد ذلك تُنقل إلى النتروجين السائل (-196°م). يُحقق التجميد البطئ إنسيابية لقسمٍ من الماء من داخل الخلايا إلى خارجها مما يؤدي إلى إنجماد الماء خارج الخلايا بدلاً من داخلها. ونتيجة لذلك فإن الخلايا تفقد جزئياً جزءاً من مائها (Partially dehydrated) مما يُعزز من فُرصة إخلافها. أُستعملت هذه الطريقة وفي نطاق واسع في التجميد الفائق للمُعلقات الخلوية.

2- طريقة التجميد السريع Rapid freezing method

تتضمن هذه الطريقة غمرالأنابيب الحاوية على الأنسجة المطلوب تجميدها في النتروجين السائل. يَحصل عندئذٍ إنخفاض سريع في درجة حرارة الأنســـجة ليصل 300- إلى 1000- °م/دقيقة إلا أن التجميد السريع يؤدي إلى تكوين بلورات ثلجية صغيرة داخل الخلايا مع حصول الحد الأدنى من البلورات الثلجية بين الخلايا. يُنصح بإتباع طريقة التجميد السريع للبراعم الطرفية والأجنة الجسمية. ويُتوخى الحذر ولَبس قفازات سميكة لمنع سقوط النتروجين السائل على الملابس والجسم (شكل 9.7).

شكل 9.7.   قفازات من النوع السميك تُلبس عند تحضير العينات للتجميد الفائق.

3- طريقة التجميد التدريجي Stepwise freezing method

تَجمع هذه الطريقة بين طريقتي التجميد السريع والبطئ وتُجرى تدريجياً. تُبرد المادة النباتية إلى درجة حرارة مُناسبة لمُدة 30 دقيقة وبعدها تُغمر بالنتروجين السائل. تُستعمل الطريقة في التجميد الفائق للمُعلقات الخلوية وأطراف الأفرع والبراعم الطرفية والجانبية.

4- طريقة التجفيد Dry freezing method

وردت في الكثير من البحوث العلمية بأن البذور الجافة بإمكانها تَحَمل الإنـجماد تحـــت درجات حرارة مُنخفضة بعكس البـذور المُشربة بالماء (Water-imbibing seeds) والتي تكون حساسة للتجميد الفائق.

وبهذا فتكون الخلايا النباتية الفاقدة لجزء من مائها لها المقدرة في تحمل الإنجماد وبالتالي ينجح إخلافها بعد تجميدها تحت ظروف التجميد الفائق.

خزن الخلايا والأنسجة والأعضاء المُجمدة Storage of frozen cells, tissues, organs

يُحافظ على الحرارة المطلوبة دون تذبذب للمواد النباتية المُجمدة. وعموماً فإن مدى درجات حرارة الخزن تتراوح من 70 إلى 196 تحت الصفر المئوي مع إحتمالية تكوّن بلورات ثلجية داخل الخلايا عند الدرجات الأعلى من 130 تحت الصفر مما يؤدي إلى تقليل حيوية الخلايا المُجمدة. والظروف المثالية التي يُوصى بها في خزن المواد النباتية تكون أما على درجة حرارة 150 تحت الصفر المئوي في الحالة البُخارية للنتروجين السائل أو على 196 تحت الصفر في الحالة الصلبة له. وفي كلتا الحالتين يجب أن تُخزن المواد النباتية في حاوية النتروجين السائل المُخصصة لهذا الغرض. يُراعى الفحص الدوري لمستوى النتروجين في ثلاجة الخزن وبفترات مُنتظمة بما يضمن تحقيق الهدف من عملية خزن المادة الوراثية وهو إيقاف الفعاليات الحيوية لها مع المُحافظة على حيويتها لأطول مُدة زمنية مُمكنة ولهذا يستوجب الأمر فحص حيوية الخلايا والأنسجة في عينات مُنتخبة بين مُدة وأُخرى وقد يتطلب الأمر إجراء الإخلاف الدوري لها وتدوين المُلاحظات حولها مثل النسبة المئوية للإخلاف وفيما إذا حصلت تغايرات مورفولوجية أو وراثية للزروعات الناتجة من الإخلاف مُقارنة بالخزين الأم.

خطوات خزن مزارع الكالس Steps for storage of callus cultures

1- تُزرع خلايا النبات في وسط MS+ 6 % مانيتول داخل دوارق أرلنماير.

2- تُحصد الخلايا حال وصولها المرحلة الأُسية من النمو لمجموعة من خطوط الخلايا اي بعد مايُقارب الأربعة أيام من نقلها الى الوسط الزرعي.

3- يُضاف جزء واحد من مركب DMSO تركيز 1 مولار + جزء واحد من الكليسرول بنفس المولارية + جزء واحد من السكروز بضعف المولارية الى ثلاثة أجزاء من وسط MS.

يُبرد الخليط فوق الثلج ويُعد هذا وسط الحماية.

4- يُضاعف حجم الخلايا بإضافة ذات الحجم من وسط الحماية الى الدوارق.

5- يُحرك الخليط بإستعمال هزاز لمُدة ساعة ونصف.

6- يُسمح للدوارق للإستقرارلمُدة 15 دقيقة.

7- تُنقل الخلايا المُستقرة في قواعد الدوارق الى أنابيب إختبار تتحمل ألإنجماد سعة 2 مل ويُفضل نقل عينات من خلايا ذات كثافة عالية.

8- تُبرد أنابيب الإختبار في الثلاجة لمُدة ساعة واحدة.

9- تُجمد أنابيب الإختبار في درجة – 20 °م لمُدة ساعة واحدة.

10- تُخزن الخلايا النباتية المنقولة في وسط الحماية في درجة – 80 °م.

ويراعى ان يُحضر محلول الحماية في نفس يوم زراعة خلايا النبات وبهذا يكون كل شيء جاهزا في يوم تجميد الخلايا. ويجب تجنب إعادة خطوات الإذابة المُتكررة لكون ذلك يتلف الخلايا ويجعلها اقل ميلاً لإِعادة النمو. ومن المُهم جداً تعليم انابيب الإختبار والمُحافظة على بيانات المواد المخزونة لإِحتمالية خزنها لمُدة طويلة.

الخزن وفق مبدأ التزجج Storage based on vitrification principle

تعتمد الطرائق المُعتمدة على مبدأ التزجج بتقليل مُحتوى الخلية من الماء قبل تجميدها بتعريض العينات الى وسط يحتوي تراكيز عالية من واقيات ضد الإنجماد أو الى تيار هواء لتقليل الرطوبة. يتبع ذلك تبريد سريع للعينات وكنتيجةً لذلك فكُل العوامل التي تؤدي الى تكوين البلورات الثلجية داخل الخلايا يُمكن تجنبها. سُجلت حالات إنتقال العينات الى مرحلة التزجج أثناء التبريد وإعادة التدفئة والتي تم الكشف عنها بإستعمال مواد مُختلفة والتحليل الحراري. توفر التقانات المبنية على أُسس التزجج فوائد تطبيقية مُقارنةً مع طرائق التجميد التقليدية. فطريقة التجميد فائقة السرعة (Ultra-rapid freezing) تكون مُناسبة للأعضاء المُعقدة (أطراف الأفرع، الأجنة) والتي تحتوي على أنواع مُختلفة من الخلايا ولكلٍ منها إحتياجاتها الفريدة تحت ظروف التبريد المُحفز في التجفيف (Freeze-induced dehydration). عند تفادي تكوين البلورات الثلجية، تصبح الطرائق المُستندة الى التزجج من الناحية العملية أقلُ تعقيداً من الطرائق التقليدية فلا تحتاج الى مُجمدات مُسيطر عليها ولها تطبيقات واسعة إذ تتطلب تحويرات قليلة فقط لتُناسب أنواع الخلايا. تشترك تلك الطرائق الحديثة بخصوصية مرحلة التجفيف لضمان نجاة الخلايا المُجففة. إختصاراً، فالعينة النباتية تُقلل نسبة الرطوبة فيها لدرجة مُناسبة مع الإحتفاظ في نسب نجاة عالية عند المُقارنة مع طرائق عدم التجفيف ولم

يُسجل إنخفاضاً في نسب النجاة بعد التجميد والإذابة. تتوافر حالياً سبع طرائق مبني أساسها على التزجج، يمكن إختصارها كما يلي:

1- التغليف والتجفيف Encapsulation and dehydration

2- التزجج Vitrification

3- التغليف والتزجج Encapsulation and vitrification

4- التجفيف Dehydration

5- النمو الإبتدائي Pre-growth

6- النمو الإبتدائي والتجفيف Pre-growth- dehydration

7- تزجج القطيرات Droplet vitrification

تعتمد طريقة التغليف والتجفيف على تكنولوجيا طُوِرت لإنتاج البذور الصناعية. تُغلف الأجزاء النباتية في كُرات الالجنات، نمو إبتدائي في وسط سائل مُعزز بالسكروز لمدة 1-7 أيام، تُجفف جزئياً في تيار هواء منضدة الهواء الطبقي أو بهلام السيلكا لتقليل المُحتوى المائي الى 20% على اساس الوزن الطري، وتُبرد تبريداً سريعاً. تُحقق الطريقة نسبة نجاة عالية وسرعة شفاء (Recovery) مُناسبة للعينات التي تم تجميدها وطريقة مُباشرة دون المرور بمرحلة نشوء الكالس. طُبقت التقانة على قمم نامية مُفصولة من أنواع نباتية مُختلفة نامية في المناطق الباردة والإستوائية وكذلك على مُعلقات خلوية وأجنة جسمية لأنواع نباتية مُختلفة. ولتبسيط الطريقة، تُغلف العينات في وسط الجنات مُضافاً له 2 مولار جليسرول+ 0.5 مولار سكروز يتبعها مُباشرةً التجفيف بالهواء.

يشتمل التزجج مُعاملة العينات النباتية بمادة واقية ضد الإنجماد كالتعريض الى محلول تحميل مُكون من تركيز مُناسب من الكليسرول والسكروز (2 مولار+ 0.4 مولار) على التوالي يليها التجفيف بمحلول مركز من محاليل التزجج وتعرض بعدها الى التجميد السريع والإذابة واخيراً إزالة المادة الواقية من ضرر الإنجماد بإستعمال محلول يحتوي 1.2 سكروز ومن ثم شفائها. من أكثر محاليل التزجج شيوعاً تلك التي يُطلق عليها محاليل التزجج النباتي (Plant Vitrification Solutions, PVS2, PVS3) التي تم تطويرها من قبل

العالم النباتي الياباني ساكاي وفريقه العلمي. طُوِرت الطريقة لتجميد القمم النامية، المُعلقات الخلوية والأجنة الجسمية لأنواع نباتية مُختلفة.

التغليف والتزجج عبارة عن جمع بين طرائق التغليف والتجفيف والتزجج حيث تُغلف العينات في كُرات الألجنات وتُجمد بالتزجج. طُبقت الطريقة وبنجاح على أطراف الأفرع لأعداد كثيرة من الأنواع النباتية. تُعد طريقة التجفيف أبسط الطرائق لكونها تشتمل على تقليل رطوبة الأجزاء النباتية وتجميدها سريعاً بغمرها مُباشرةً بالنتروجين السائل. أُستعملت التقانة مع الأجنة المُخصبة أو محاور الأجنة المفصولة من البذور. طُبقت كذلك في مجموعة كبيرة من أجنة بذور النباتات صعبة الإنبات (Recalcitrant) ومتوسطة نسب الإنبات. يجري التجفيف داخل كابينة سريان الهواء الطبقي أو يُفضل تعريض العينات الى تيار هواء مضغوط ومُعقم ويُمكن إستعمال هُلام السليكا ايضاً. أُتبعت طريقة التجفيف السريع والفائق (Ultra-rapid drying) في مجرى هواء مضغوط وجاف بطريقة سُميت بالتجفيف الخاطف (Flash drying) والتي تم تطويرها في دولة جنوب افريقيا. تسمح الطريقة بتجميد العينات مع الإحتفاظ بمُحتوى عالي من الرطوبة نسبياً وبذلك يقل خطر تلف التجفيف. حصلت أفضل نسب للنجاة بعد تجميد العينات مع مُحتوى رطوبي بين 10 الى 20% على أساس الوزن الطري.

يشتمل النمو الإبتدائي في زراعة العينات بوجود واقيات ضرر الإنجماد ثم تجميدها وبعدها تُغمر بالنتروجين السائل مُباشرةً. طُورت تقانة النمو الإبتدائي لمزارع الموز المرستيمية حيث تُنمى الأجزاء النباتية نمواً إبتدائياً في طريقة تجفيف النموات الإبتدائية بوجود المواد الواقية للضرر وتُقلل رطوبتها داخل كابينة الهواء الطبقي أو بمادة هُلام السليكا وأخيراً تُجمد بسرعة. أُستعملت الطريقة في تجميد قطع من سوق نبات الاسبارجس، الأجنة الجسمية لنخيل الزيت ونبات الكوريندر.

ظهرت تقانة تزجج القطرات الصغيرة (Droplet vitrification) أخيراً وبزيادة كبيرة في أعداد القمم النامية التي تم تجميدها. تُعامل القمم النامية مُعاملة أولية بمحلول التحميل، ثم بمحلول التزجج وتوضع على رقائق الألمنيوم داخل قطرات صغيرة جداً من محلول التزجج وأخيراً تُجمد بسرعة بالنتروجين السائل. طُورت محاليل تحميل وتزجج بديلة سمحت بتطبيقها وبنجاح على الأنواع النباتية الحساسة لمحاليل التحميل والتزجج التقليدية.

توثيق المادة الوراثية Germplasm documentation

يُشترط عند خزن المواد الوراثية أن يُراعى التوثيق الصحيح والوافي عن المادة الوراثية التي يُراد خزنها. إتفق المُختصون على تثبيت المعلومات التالية في أنابيب خزن المادة الوراثية:

أ- التصنيف النباتي الصحيح للمواد المخزونة. ب - نبذة تأريخية عن المادة الوراثية.

ج- وصفها المورفولوجي وخصوصيتها. د- الإختبارات الوراثية التي أُجريت عليها.هـ- التغايرات الجسمانية فيما اذا حصلت في هذه المواد سابقاً. و- الوسط الزرعي الذي أُستعمل في تنشئة زروعاتها. ز- وصف لطبيعة نمو المادة الوراثية.

الإذابة Thawing

تُذاب المواد النباتية بوضع العينات المُجمدة داخل أنبولات في حمام مائي في درجة حرارة 37-45°م مع الرج القوي. يَحصل بموجب ذلك إذابة سريعة بمُعدل 500 إلى 750 °م/ دقيقة مما يُتيح حماية الخلايا النباتية من التأثيرات السلبية التي تُسببها البلورات الثلجية. تُنقل الأنبولات مُباشرة بعد ذوبان الجليد إلى حمام مائي على درجة حرارة 20-25 °م، علماً أن بقاءها داخل الحمام المائي الدافئ السابق (37-45 °م) قد يؤدي إلى تلفها. وفيما يخص المواد النباتية المُجمدة والتي تم تقليل محتواها من الماء (Dehydrated) فإن الخلايا والأنسجة المُجمدة ستكون أقل تأثراً بعملية الإذابة.

قياس حيوية الخلايا بعد الإذابة Measurement of cell viability after thawing

تقاس النسبة المئوية للخلايا الحية أو الناجية من تأثير التجميد وفق القانون التالي:

% للحيوية = (عدد الخلايا او الأنسجة او الأعضاء النامية / عدد الخلايا او الأنسجة او الأعضاء التي عُرضت للإذابة) 100X

علماً أنه بالإمكان فحص الحيوية في اي مرحلة من مراحل التجميد الفائق أو بعد الإذابة وحتى بعد زراعتها في الأوساط المُناسبة. تُستعمل تقانات تصبيغ الخلايا المُعتمدة بهذا الخصوص، وعادةً تُعامل المادة النباتية بمادة كلوريد الترايفينيل تترازوليوم (TTC) أو صبغة ايفانز الزرقاء (Evans blue) أو صبغة الفلورسنت داي أسيتيت (FDA). وخيرُ دليلٍ في حيوية الخلايا بعد إذابتها هو مُباشرتها بالإنقسام والنمو بعد نقلها إلى الوسط الزرعي المُناسب.

زراعة المواد الوراثية بعد إذابتها Culture of genetic materials after thawing

تُغسل المواد النباتية بعد الإذابة بالماء المُقطر المُعقم لعدة مرات للتخلص من المادة الحافظة لتزرع بعدها في الوسط الزرعي المُناسب وحسب ما موصى به. علماً بأن قسماً من المُختصين يزرع الخلايا والأنسجة مُباشرةً بعد إذابتها دون غسلها مُعللين ذلك بوجود مواد تُساهم في تشجيع ونجاح الإنقسام الخلوي ومن ثم الإخلاف تُطلق من الأنسجة في أثناء تجميدها.

إخلاف النبات Plant regeneration

طالما أن الهدف النهائي من تجميد الخلايا هو إخلاف نباتات مرغوبة الصفات، لذا فيجب توفر شروط حضانة (Nursing) عالية للخلايا والأعضاء التي تمت إذابتها. لذلك يتم إنتقاء الوسط المُناسب والتوليفة الصحيحة من مُنظمات النمو والحضن تحت الظروف البيئية المُناسبة بما يضمن إخلافاً ناجحاً. ويوضح جدول 9.4 قائمة في بعض المواد النباتية ومصدرها والتي أُذيبت وحقق الإخلاف فيها نسب عالية.

جدول 9.4. نباتات مُنتخبة تم مُعاملة مادتها المُذابة بنجاح بالتجميد الفائق وحققت إخلافاً جيداً

المادة النباتية	النوع النباتي
المُعلقات الخلوية	الرز- فول الصويا- الذرة الصفراء- التبغ- الفلفل
مزارع الكالس	الرز- الفلفل - قصب السكر
البروتوبلاستات	الذرة الصفراء – التبغ
المرستيمات	الباذنجان – الحمص
الأجنة الجنسية	الذرة الصفراء – الشعير – الكسافا
أجنة حبوب اللقاح	التبغ – أنواع الحمضيات – ست الحسن (البلدونا)

تقانة رؤية تكوين البلورات الثلجية Cryomicroscopy

تُتيح التقانة في رؤية لحظة تكوين النويات للبلورات الثلجية وإذابتها أثناء التجميد والإذابة وإعادة تدفئة الخلايا حيث صمم المهندسون الأجهزة التي تؤدي الغرض. بدأت المُحاولات في هذا الخصوص من قبل العالم ساش عندما طور مجهر ضوئي ذو منصة مُنخفضة درجة الحرارة وراقب تكوين البلورات الثلجية خارج الخلايا وتراكيز المحاليل داخل الخلايا. قاد ذلك علماء النبات الى فرضية مبنية على عاملين تُعلل سبب ضرر الإنجماد (Cryoinjury) وتم تصميم مجهر مُسيطر عليه كمياً وذلك بناءاً على توازن الحرارة الملازمة (Concomitant heating) ومُدخلات التبريد (Cooling inputs) المُستلمة من قبل العينة الموضوعة على مسرح المجهر والمربوطة بمجسات حرارية. يُمكن رؤية العينات بمجهر رؤيا البلورات الثلجية بعد وضعها على مسرح المجهر الشفاف بطريقتين:

1- إنعكاس صورة نواة البلورة في نظام مُجمد Nuclear imaging in cryogenic system

تُعد تقانة طيف الرنين المغناطيسي النووي (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) مُفيدة جداً وغير مؤذية وتسمح برؤية مواقع الماءغير المُجمد داخل خلايا النبات والأنسجة في درجات الحرارة تحت الصفر المئوي. تستفيد تقانة NMR من الخواص المغناطيسية للأنوية الكيميائية فعند وضع الاخيرة في مجال مغناطيسي، تنتج طاقة إمتصاص رنيني من حُزمة إشعاع ونوع تردد الرنين الصادر من خصوصيات الأنوية وقوة المجال والنواة. تسمح تقانة NMR بالتحري عن الأنوية بذاتها ويمكن تقدير كمية إشارة قوة الرنين إعتماداً على عدد الأنوية التي تعكس الرنين. تستوجب الحالة دراسة ذرات الهيدروجين من قبل المُختصين بالكيمياء الفيزيائية بالنظر لتوافر الهيدروجين في أغلبية الجزيئات ونواته تمتلك أكثر إشارات الرنين قوةً. تتشابه تقانة NMR مع تقانة إنعكاس صورة الرنين المغناطيسي (MRI) المُستعملة في التشخيص الطبي لكنها ذات وضوح أفضل تسمح برؤية الخلية والنسيج النباتي وبذلك أُعتمدت حديثاً في دراسة الإنجماد في الأنظمة البيولوجية (Cryobiology) .

التحليل الحراري Thermo analysis

تُعد تقانة ماسح السعرات التفاضلي (Differential scanning calorimetry, DCS) وسيلة أساسية في قياس المؤشرات الفيزيائية الحرارية لكونها أداة ذات مقدرة كبيرة في هذا الخصوص، وخاصة في قياس الإنجماد، الإذابة، وتحولات الزجاج عند صناعته. والتقانة لها أهميتها في نجاة الأنسجة المُجمدة وتُعد

تطبيقاتها مع التقدم الحاصل حديثاً في الهندسة الحرارية وعلاقتها في التجميد الفائق موضوعاً مهماً يُمكن تطبيقه في المُحافظة على المواد الوراثية لنباتات من المناطق الباردة والإستوائية.

مُستقبل هندسة الإنجماد Cry engineering future

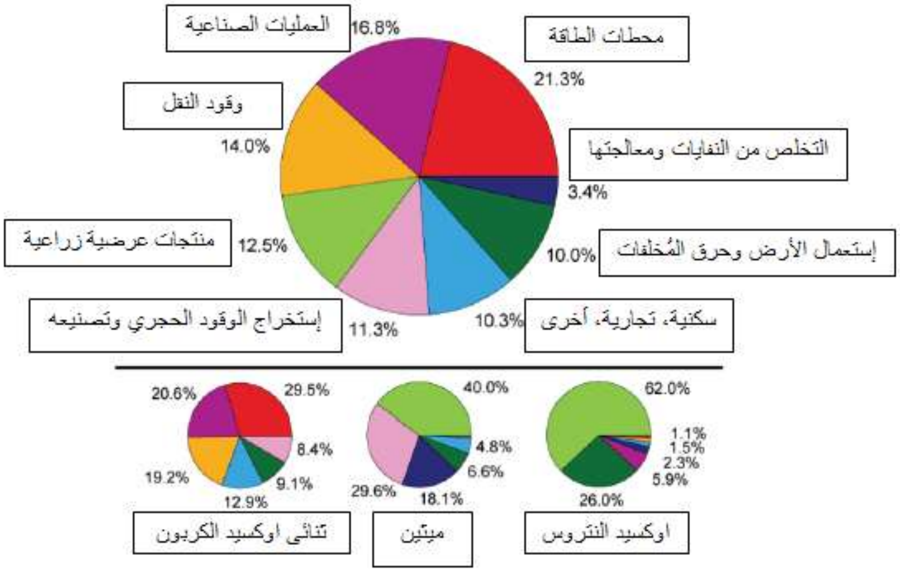
حالياً، وفرت تقانات التحليل الحراري (Thermal analysis) أفكاراً مُشجعة في دراسة حماية النبات من أضرار الإنجماد حيث صُممت مُعدات تعمل وفق تقانتي HyperDSC وماسح السعرات التفاضلي الفوقي (DSC) لتوفر إمكانية مسح مُعدلات التبريد والتدفئة لحد 500 °م في الدقيقة الواحدة. تُستعمل محارير مُقاومة مصنوعة من البلاتين وذات أوزان صغيرة جداً لاتتجاوز الغرام الواحد وتحتفظ بدرجة حرارتها ولها وقت تعادل أو تساوي حراري بإستجابة سريعة.

الفصل العاشر: الإستصلاح الحيوي النباتي

Phytoremediation

مقدمة

أدت الثورة الصناعية في القرن العشرين والواحد والعشرين وكذلك الحروب الى إطلاق كميات كبيرة من المُلوثات السامة الى البيئة بمُكوناتها من هواء وماء وتربة بل وتعدت الى طبقات الجو لتُهدد طبقة الأوزون وسببت في إرتفاع درجة حرارة الكرة الأرضية. تُسبب الغازات المُنبعثة من الكرة الأرضية ومن مصادرها المُختلفة المُبينة في الشكل (10.1) الى ما يُسمى بظاهرة الإحتباس الحراري (Global warming) أو تأثير البيت الزجاج (Greenhouse effect) . أدت الثورة الصناعية والتكنولوجيا الحديثة الى حدوث أضرار كبيرة في بيئة الكائنات الحية عموماً والإنسان خاصةً بعد ان توسعت على حساب الغطاء النباتي الذي كان سائداً.



شكل 10.1. النسب التقريبية لمُقدار الإشعاعات الغازية السنوية التي تتحرر من الكرة الأرضية مُصنفة حسب النشاطات المُختلفة (الأعلى) والنسب التي تُساهم بها القطاعات أعلاه في إطلاق CO_2، غاز الميثين وأوكسيد النتروس (اسفل).

(http://pt.scribd.com/doc/3323459/Effect-of-Climate-change-in-agriculture-and-ivestock

يُلاحظ من الشكل بأن محطات توليد الطاقة الكهربائية تُطلق النسبة الأعلى (21.3%) من الغازات المُشعة وتليها النشاطات الصناعية المُختلفة (16.8%). تتراوح النسب الآخرى وكما يلي؛ محروقات وقود النقل من طائرات وسيارات وقطارات وغيرها من وسائط النقل (14%)؛ مُنتجات عرضية من النشاط الزراعي (12.5%)؛ عمليات سحب الوقود اليحفوري وتصنيعه وتوزيعه (11.3%)؛ الغازات التي تُطلق من المناطق السكنية والتجارية واخرى (10.3%)؛ إستعمال الأرض وحرق الكتلة الحيوية (10%)؛ الغازات المتصاعدة نتيجة التخلص من النفايات ومُعاملتها (3.4%). يمثل غاز CO_2 الجزء الأكبر (29.5%) من مُخلفات محطات توليد الطاقة يليه النشاطات الصناعية بنسبة 20.6%. يُشكل غاز الميثين هو الآخر مُلوثاً رئيسياً ويُشكل ما نسبته 40% من النواتج العرضية الزراعية بينما يُشكل غاز اوكسيد النتروس 26% من تلك المُنتجات. ساهمت تلك الغازات المُنبعثة من المصادر أعلاه ولحد كبير في إرتفاع درجة حرارة الغلاف الجوي لسطح الأرض وغيرت الأنظمة الزراعية المُتبعة منذ زمن بعيد.

تكون المُلوثات في نوعين، مُلوثات عضوية واخرى غير عضوية. تشتمل غير العضوية معدنية ثقيلة مثل الكادميوم، الزئبق، الرصاص ومُركبات غير معدنية مثل الزرنيخ والمُخلفات النووية المُشعة والمُتفجرات والأسمدة ومُبيدات الأدغال. يُشكل التلوث مشكلة بيئية مُعقدة فعلى سبيل المثال تُطلق سنوياً 11000 طن من الزئبق الى الجو. وسُجل حوالي 12000 موقع مُلوث في الولايات المتحدة الامريكية وحدها كما سُجل 400000 موقع مُلوث في أوربا الغربية ومن المؤكد انه لم يتم حصر المواقع المُلوثة في دول العالم الثالث بالكامل. قُدرت كُلفة إستصلاح المواقع المُلوثة بالعالم بما مقداره 15- 18 بليون دولار امريكي في عام 1998 وقابلة للزيادة اذا ماتم حصرها وتسجيل كافة المواقع الملوثة على سطح الكرة الأرضية بدقة.

الطرائق التقليدية في الإستصلاح الحيوي Conventional bioremediation methods

تتضمن إستراتيجيات التخلص من المُلوثات، إستعمال الطرائق الفيزيائية في إزالة المُلوثات. وبالرغم من انها لاتحل المشكلة بالكامل بل تنقلها من مكان لآخر وبكونها مُكلفة وقد تكون مُدمرة للبيئة وتُزيد من تعرض المواقع المُلوثة للكيميائيات إضافةً الى إحتمالية بقاء قسم من المُلوثات في المواقع المُلوثة. لذا فالتفكير في الإستصلاح الحيوي النباتي (Phytoremediation) بإستعمال النباتات في إزالة أو تحطيم مُلوثات التربة وفي المياه السطحية من المُحتمل أن يكون البديل. تُعد تقانة الإستصلاح الحيوي النباتي مُناسبة وقليلة التكاليف وفعالة وصديقة للبيئة عند مُقارنتها بالطرائق التقليدية. تحتاج النباتات الى الطاقة الشمسية (من عملية التركيب الضوئي) لسحب الكيميائيات المُلوثة للتربة الذائبة في الماء بعد إمتصاصها بوساطة المجموع

الجذري وتراكمها في كتلتها الحيوية وقد تحولها الى مواد غير سامة أو قليلة السُمية. وبعد حصاد النباتات، تُجرى عليها معاملات إزالة المُلوثات أو قد تُجمع في أماكن أقل مساحة لِتُطمر أو تُحرق.

يُشترط في النبات كي يكون مُستصلحاً (Phytoremediater) طبيعياً للتربة ان تكون له القابلية في تحمُل المُلوث أو تحطيمه أو تركيزه في كتلته الحيوية وان يكون النبات ذا مجموع جذري واسع يستطيع فيه إمتصاص كميات كبيرة من المياه إضافةً الى نموه بمُعدلات نمو سريعة بحيث يَبني كُتلته الحيوية تحت هذه الظروف بمُعدلات عالية. وبالرغم من ان العديد من الأنواع النباتية اظهرت تحملها للنمو في مثل هذه المواقع الا ان أغلبها أظهر بطيء نموه وإنتاجه لكمية قليلة نسبياً من الكتلة الحيوية، ونموه تحت ظروف تلوث مُحددة ولا يتحمل مدى واسع من المُلوثات. في الوقت ذاته قد تظهر نباتات سريعة النمو وتكّون كتلة حيوية كبيرة ولها مجموع جذري واسع الإنتشار ومُستويات تحمل ضعيفة وقد لا تتراكم المُلوثات في كتلتها الحيوية. يتمكن النبات من سحب المُلوثات أو تحجيمها بطرائق مُختلفة (شكل 10.2) حسب النوع أو الجنس أو العائلة. وتوجد في الطبيعة الكثير من النباتات التي تقوم بواحدة أو أكثر من الآليات المُوضحة في الشكل والتي يُمكن إختصار التعاريف المُتداولة للآليات وكما يلي:

1- الإتلاف أو التحلل الضوئي (Phytodegredation) ويُعرف على انه قابلية النبات في تحلل المُلوثات داخل أنسجته والتي تتناسب عموماً مع المُلوثات العضوية وليست غير العضوية لكون الأخيرة تتحرك داخل أنسجة النبات ولكنها لاتتحلل.

2- الإتلاف أو التحلل في المنطقة المُحيطة بالمجموع الجذري (Rhizodegradation) ويشتمل تحلل المُلوثات نتيجة لإفراز المجموع الجذري للنبات مواد مُختلفة واذا ما تداخلت الأحياء المجهرية المُتواجدة حول الجذور وساهمت في تحلل المُلوثات عندئذٍ تدعى العملية بالتحفيز النباتي (Phytostimulation). واذا تداخلت مجموعة عوامل في التخلص من المُلوثات ضمن منطقة المُحيط الجذري عندئذٍ يُطلق على مجموعة العمليات هذه بالإستصلاح في مُحيط الجذور(Rizoremediation).

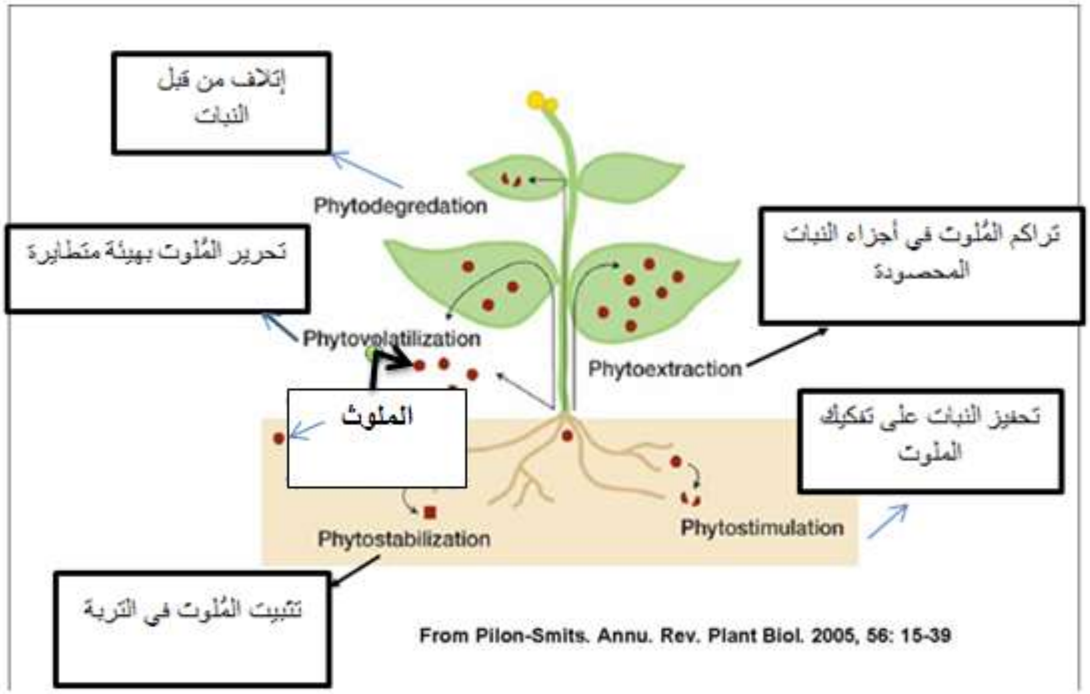
3- التثبيت النباتي (Phytostabilization) إذ تُحجم (Immobilized) المُلوثات في منطقة المُحيط الجذري ولا يُسمح لها بالنزول الى الأسفل بإتجاه الماء الأرضي كما انها لاتُمتص من قبل النبات.

4- تراكم المُلوثات في أنسجة النبات (Phytoextraction) وفيها تتراكم المُلوثات في أنسجة النبات بعد إمتصاصها من قبل الجذور وخاصة في أعضاء النبات التي تُحصد كالسوق والأفرع والأوراق. وتشمل في الغالب المُلوثات غير العضوية.

5- الترشيح بعد إدمصاصها (Adsorption) أو تراكمها في مُحيط المجموع الجذري (Rizofiltration) وذلك عند إستعمال نظام الزراعة في المحاليل المائية بعد إضافة الملوثات الى المحلول المغذي (Polluted hydroponic systems).

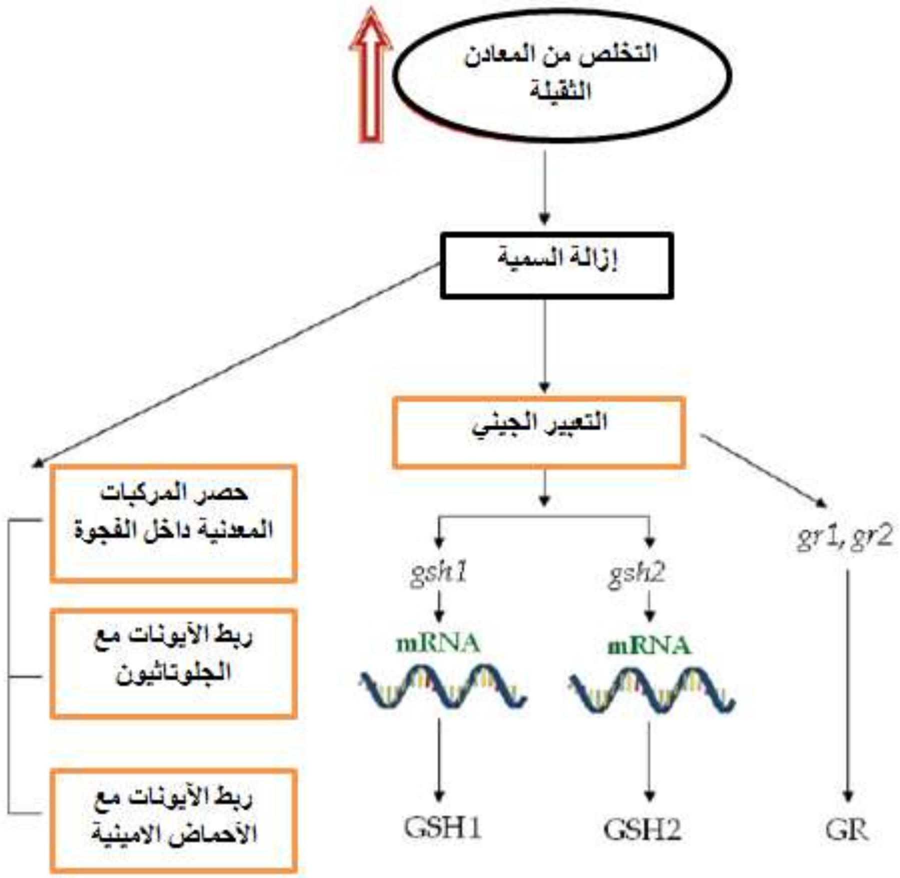
6- تبخير المُلوثات (Phytovolatilization) وتشمل آلية تبخر المُلوثات كالمُركبات العضوية المُتطايرة ومعدني الزئبق والسلنيوم. هناك العديد من العمليات المُهمة التي يقوم بها النبات ضمن إستراتيجية الإستصلاح الحيوي وتختلف من نوع نباتي لآخر. فعلى سبيل المثال، يُمكن ان تُسهل عملية الإستصلاح الحيوي في منطقة المجموع الجذري من خلال المُركبات التي تُحررها الجذور إضافةً الى تحطيم مُلوثات عضوية بعينها. كما ان بعض المُركبات التي تُحررها الجذور لها دوراً في تسهيل حركة المُلوثات بسحبها من جزيئات التربة وتحجيم عملية سحبها أو قد تُسهل من ذلك. وفي حالة سحب جزيئات التربة للمُلوثات من قبل نهايات الجذور فانها تنتقل الى الأجزاء الخضرية عن طريق أنسجة الخشب بفعل آلية السحب نتيجة عملية النتح وآلية فتح الثغور. عند وصول المُلوث الى المجموع الخضري قد يخضع الى عمليات مُختلفة قد تؤدي الى تحوير في تركيب المُلوث بفعل إنزيمي كإرتباطه مع مُركب آخر، تحطيمه، إرتباط المُلوث بمجموعة أو أكثر من المجاميع الفعالة ولربما يرتبط مع مجموعة مخلبية وعندئذٍ قد يُرحل المُلوث الى الفجوات أو الى جدر الخلايا والتي غالبا تتم بفعل ما يُسمى بالبروتينات الناقلة (Transporter proteins).

عند وصول المُلوث الى الأوراق قد يتحرك ثانية من خلال اللحاء ليكون مصيره الإستقرار في الأنسجة التكاثرية أو الأوراق الفتية ولربما ثانية الى الجذور وقد يعود الى التربة بعد سقوط الأوراق وفي كل الأحوال تكون الأغشية الناقلة من يقوم بهذه الأدوار. ومن المعلوم وجود أحياء مجهرية مُرتبطة بالنوع النباتي قد يكون لها دوراً في سحب المُلوث من جزيئات التربة وتضعه في مسار النسغ الصاعد داخل أنسجة اللحاء أو قد يتراكم المُلوث في أنسجة الجذور وقد يكون للنواقل المُختصة لأغشية الخلايا دورا ايضا في هذا المجال. يتضح مما سبق ومن الدراسات المُتوافرة، وجود إختلافات بين الأنواع النباتية في قابليتها على إستصلاح مُلوث مُحدد أو أكثر. يعتمد ذلك في الغالب على توافر البروتينات الناقلة، الإنزيمات، الكائنات الدقيقة المُرافقة لها وايضا سرعة نتحها للماء. إضافةً الى ما سبق فالخصائص العامة لأي نبات كي يكون مُستصلحاً حيوياً هي سرعة النمو وتكوينه كتلة حيوية كبيرة وتحمله للظروف البيئية القاسية وبنفس الوقت تحمله للمُلوثات وقد يُضاف الى ذلك الفائدة الإقتصادية من المُستصلح الحيوي.



شكل 10.2. آليات النبات في التخلص من المُلوثات.

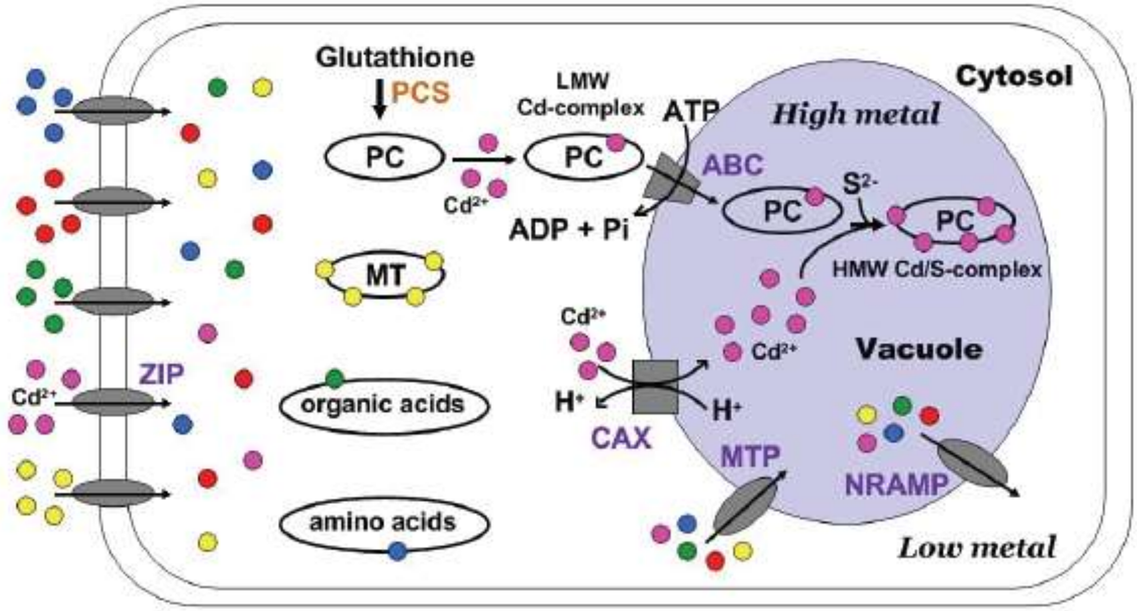
نُفذت العديد من التجارب لنقل صفة تحمل المُلوثات من كائنات حية مُختلفة الى النباتات إعتماداً في الغالب على نقل جين السايتوكروم *Cyt 450* من حيوان الأرنب الذي يمتاز بتحمله العالي للمُلوثات في الطبيعة الى نباتات كاشجار الحور *(Populus spp.)* ونبات الأربدوبسس (*Arabdopsis thaliana*) وغيرها بوساطة ناقل مثل بكتريا الاكروبكتيريوم المُحمل على بلازميداتها الجين أعلاه. حقق ذلك نتائج مُتواضعة بالإمكان إستثمارها لكي تدخل حيز التطبيق العملي في الإستصلاح الحيوي للترب الملوثة. فمن المُمكن زيادة مقدرة النباتات المختلفة في زيادة تحمل أنواع المُلوثات بإستعمال تقانات نقل الجينات والتي يُمكن إعتمادها مُستقبلاً كإستراتيجية ناجعة في إستصلاح المواقع المُلوثة ولايزال عدد كبير من تلك النباتات تحت التجربة والتقصي (شكل 10.3). توجد ثلاث آليات في الأقل تساهم في التخلص من المعادن الثقيلة أهمها آلية حصر تلك المُركبات داخل الفجوات، ربط الآيونات الضارة مع مُركب الكلوتاثيون، مع إحتمالية ربط الآيونات مع الأحماض الأمينية. ويلاحظ من الشكل ان تصنيع الفايتوكلينات يُرافقه إنخفاضاً في مُستوى الكلوتاثيون مع زيادة في الإنزيمات الموضحة في الشكل إنعكاساً لزيادة التعبير الجيني الذي تنتقل إشارته من الجينات الى الرنا المُراسل. ومما تجدر الإشارة اليه إمكانية توظيف وزيادة تحمل مجموعة من الأنواع النباتية للنمو في مواقع التلوث البيئي وقد أظهرت زيادة تحمل الخلايا النباتية من مزارعها النسيجية نجاحاً في هذا المضمار.



شكل 10.3. إستجابة الخلية النباتية لمُستويات سامة من المعاددن الثقيلة.

يُصاحب تصنيع الفايتوكليتينات (Phytochelatins, PCs) إنخفاض في مُحتوى الخلية من الكلوتاثيون وزيادة فعآليات إنزيمات Glytanyl cycteine synthase (GSH1)، Glutathione synthetase (GSH2)، Glutathione reductase (GR). ترتبط زيادة فعآليات تلك الإنزيمات مع زيادة التعبير الجيني للجينات ذات العلاقة التي تشمل gsh1، gsh2، gr1، gr2. تكون آليات سحب وحصر المعادن الثقيلة في الخلية النباتية مُعقدة وتشتمل العديد من المراحل (شكل 10.4) تقوم فيها النواقل (Transporters) مثل ZIP (Zinc/iron –regulated transporters) وآيونات المعادن الثقيلة مثل Cd^{+2} بالدخول الى عصير الخلية وتحفيز الكلوتاثيون كناتج تصنيعي من الفايتوكلاتينات (PCs) بوساطة إنزيمات PC synthases (PCS). يرتبط هذا الإنزيم مع Cd^{+2} في عصارة الخلية ليُكون مُعقد ذو وزن جزيئي واطئ (LMW) أولاً. ينتقل هذا المُعقد الى الفجوة بعد عبوره غشائها (Tonoplast) بوساطة نواقل مُتمركزة بمواقع على غشاء الفجوة وهي بمثابة حاويات ربط الى ATP (ATP-binding cassette). داخل الفجوة، تتراكم بهيئة مُركبات مُعقدة ذات وزن جزيئي عالي (HMW) بمُحتوى عالي من Cd^{+2} والتي تدخل الفجوة في الغالب

بطريقة التبادل المُباشر مع البروتونات بوساطة نواقل مُتبادلات الآيونات الموجبة/البروتونات المُتمركزة في غشاء الفجوة (CAX). تستقر بروتينات تحمل المعدن الثقيل (Transporters MTPs) وبروتينات المقاومة الطبيعية (NRAMPs) في غشاء الفجوة الذي يتوسط مرور آيونات المعادن لغرض التراكم أو إعادة تحريكها. تُساهم المُركبات المخلبية الآخرى مثل الأوثيونينات المعدنية (Metallothioneins, MTs)، الحوامض العضوية والأحماض الأمينية بمُعايرة تراكيز المعدن في عصير الخلية الى مُستويات آمنة للخلية.



شكل 10.4. آلية حجز المعادن الثقيلة داخل الخلية النباتية.

تُؤثر المعادن الثقيلة في إنتاجية النبات وفي كمية الكتلة الحيوية المُنتجة في وحدة المساحة إضافةً الى تأثيرها السلبي في خصوبة التربة وكذلك عند تراكمها في السلسلة الغذائية للإنسان والحيوان وحتى الأحياء المجهرية. تُحاول النباتات حماية نفسها من مخاطر سُمية الآيونات بعد ربطها مع أنواع مُحددة من البروتينات وفي ضوء ذلك حُددت ثلاثة أنواع من البروتينات لها المقدرة في إزالة سُمية المعادن الثقيلة في جسم النبات. يتخصص قسم من النباتات في سحب عنصر واحد أو أكثر (جدول 10.1). يدخل ضمن هذه المجموعة من البروتينات، الميتالوثيونين (Metallothionein) والفايتوكلاتين (Phytochelatin) والكلوتاثيون (Glutathione) علماً بان نجاح كلونة الجينات المسؤولة عن إنتاج هذه البروتينات قد تم بنجاح من أجل تحسين قابلية الأنواع النباتية في تحمل المُلوثات بعد إخضاعها لبرامج الهندسة الوراثية.

جدول 10.1. أمثلة على أنواع نباتية أظهرت تراكمها العالي للعناصر بما يزيد عن 1% من نموها الخضري الجاف وبما لايقل عن 100 مرة مما تتحمله المحاصيل المزروعة

موقع الجمع	الحد الأعلى للعنصر (mg kg-1 DW)	النوع النباتي	العنصر
ألمانيا	39600	شمرمر *Thlaspi caerulescens*	Zn
فرنسا	2908	شمرمر *Thlaspi caerulescens*	Cd
زائير	13700	ريح الزهر *Aeolanthus biformilolius*	Cu
كلدونيا	38100	زهري الورق *Phyllanthus serpentinus*	Ni
زائير	10200	حمراوي الورق *Haumaniastrum ruberlii*	Co
الولايات المتحدة	14900	الكثيراء *Astragalus racemosus*	Se
كلدونيا	11500	حمراوي الساق *Alyxia rubricaulis*	Mn
الولايات المتحدة	22300	جينح حيوي *Pteris vittata*	As
فرنسا	15200	الثنائي الأيسر *Bisculella laevigata*	Ti

وَرَدت في المراجع المُتخصصة العديد من الأمثلة فعلى سبيل المثال لا الحصر تم تعديل نوع التبغ الشجيري *Nicotiana glauca* وراثياً لإنتاج بروتين من نوع فايتوكلاتين (TaPCSI) والذي أظهر تحملاً لمُستويات عالية من الزنك والرصاص والكادميوم والنيكل والبورون مع إنتاجية عالية من الكتلة الحيوية. كما أمكن زيادة التعبير الجيني للإنزيمات التي تُحفز زيادة إنتاجية الفايتوكلاتين في نباتات الأربدوبسس والخردل الهندي والتبغ مما أتاح فرصة أكبر في تحملها للمُلوثات واعتبرت النباتات المُتحملة طبيعياً للعناصر الثقيلة مصدراً مهماً للجينات المسؤولة عن الإستصلاح الحيوي. فنبات الأربدوبسس المعدل وراثياً اظهر تعبيراً جينياً لإنزيم Selenocysteine methyltransferase (SMTA) والذي تم نقله من نبات الكثيراء (*Astralagus bisulcatus*) المُتحمل لمُستويات عالية من المعادن الثقيلة.

ومن المعلوم ان نبات الأربدوبسس المعدل وراثياً زاد من تراكمه لعنصر السلينيوم بمقدار ثمانية أضعاف مُقارنة مع نبات الأربدوبسس غير المُحور وراثياً. ووردت في المراجع العديد من الأمثلة منها ما توصل اليه المؤلف مع طالبة دكتوراه تحت إشرافه في نقل جين تحمل المُلوثات من حيوان الأرنب الى نباتات الحور والسيسبان والأربدوبسس والتي أظهرت تحملاً لمدى واسع من المُلوثات البيئية.

وكما سبقت الإشارة اليه سابقا، فان المُلوثات المُختلفة لها مصير مُختلف عن بعضها داخل النظام الأحيائي النباتي وبذلك تختلف مقدرة النوع النباتي عن غيره في قابليته على الإستصلاح الحيوي. وبالمُقابل فكل نوع نباتي له الخصوصية المُحددة في قابليته في الإستصلاح الحيوي وهنا يُمكن ان تتداخل هندسة النبات وراثياً لحل هكذا مُحدد. فعلى سبيل المثال فان إستصلاح المُركبات العضوية الكارهة للماء (Hydrophobic organics)، يُمكن ان يُحَسن بزيادة إنتاج الأسطح الفعالة بيولوجياً (Bio-surfactants) بوساطة الجذور أو الأحياء المجهرية المُتعايشة معها. وبالمثل فهناك معادن بعينها تكون هدفاً لإفرازات الجذور من مواد مخلبية وغيرها وعندئذٍ تكون آلية الإستصلاح الحيوي في منطقة الجذور (Rhizodegradation) قابلة للتطبيق في زيادة تنظيم الإنزيمات التي تطلقها الجذور أو الأحياء المُتعايشة معها. ولربما يؤدي الإفراز الإنزيمي الى تحفيز زيادة أعداد تلك الأحياء ولربما يزيد من فعاليتها وبالنتيجة زيادة في سرعة وكفاءة الإستصلاح الحيوي في مُحيط الجذور. ومن جانب آخر، فإمتصاص وإنتقال المُلوثات من قبل المجموع الجذري قد يتحدد نتيجة توافر النواقل عبر الأغشية بغزارة وخاصة للمُلوثات غير العضوية والتي تعتمد في دخولها الى أنسجة النبات على البروتينات الناقلة.

والجدير بالذكر فالمُلوثات العضوية يُمكنها عبور الأغشية سلباً (Passive) عندما يكون كُرهها للماء مُعتدلاً (Moderately hydrophobic) دون الحاجة الى نواقل. وهنا يتداخل عمل علماء الفسلجة مع نظرائهم من التقانات الأحيائية بالتحري والكشف عن النواقل التي تتوسط (Mediated) في سحب المُلوث ونقله وبالتالي زيادة إنتاج تلك النواقل (Overproduction) بما يضمن زيادة كفاءة النبات في سحب المُلوثات. وبالتاكيد فالعملية برمتها تحت السيطرة الوراثية والمطلوب التحري عن الجينات المسؤولة عن زيادة التعبير الجيني لتلك النواقل في النباتات. والنبات بدوره يتحمل تراكيز مُحددة من المُلوثات بسبب عدم توافر الإنزيمات التي تحور، تحطم، تمسك المُلوثات أو عدم توافر الإنزيمات المُضادة للأكسدة بكميات مُناسبة. وفي هذا السياق، لابد من التفكير بالنقاط التالية:

1- زيادة مُستويات العوامل المخلبية في أنسجة لحاء النبات بما يضمن المسك بالمُلوث وحجزه.

2- زيادة في تعبير النواقل الى خلايا المجموع الخضري، الفجوات وجدر الخلايا.

3- زيادة العوامل المخلبية في الأوراق.

4- زيادة مُستويات الإنزيمات التي تُحور، ترتبط أو تحطم المُلوثات.

5- زيادة تعبير نواقل المُلوثات المصدرة لها من فجوات الجذور وخلاياها بإتجاه أنسجة الخشب.

6- زيادة إفراز المُركبات المخلبية (الحوامض وغيرها) من قبل الخلايا النباتية عموماً والجذور وأنسجة الخشب خصوصاً.

7- زيادة تعبير النواقل في خلايا المجموع الجذري.

إعتماداً على العوامل التي يتم الشك فيها بانها مُحددة للإستصلاح الحيوي، بالإمكان زيادة إنتاج الإنزيمات المطلوبة في تسريع سحب المُلوثات، إضافةً الى دفع تعبير الجينات في النبات الى أقصاها مع إمكانية إدخال جينات جديدة (Novel genes) من أنواع نباتية أُخرى أو من كائنات حية غير نباتية تمتاز بتحملها العالي للمُلوثات. واخيراً فان ماسبق من مُقترحات بالتعامل مع موضوع الإستصلاح الحيوي جاري العمل فيها من قبل مُختصي التقانات الأحيائية ومن يسندهم من علماء فسلجة النبات والعلوم الساندة الآخرى وحققت نجاحات كبيرة كما سيرد لاحقاً.

النجاحات المتحققة Achieved successes

المُلوثات غير العضوية: تشتمل على المعادن (Metals or metalloids) مثل الزرنيخ (As)، الكادميوم Cd، النحاس Cu، الزئبق Hg، المنغنيز Mn، السلينيوم Se، الزنك Zn والذرات غير مُستقرة النواة (Radionuclides) مثل السيزيوم Cs، الفسفور P، اليورانيوم U إضافةً الى الأسمدة النباتية مثل النتريت والفوسفات. تتوافر تلك المعادن في الطبيعة بشكل آيونات ذات شحنات موجبة أو سالبة. يُمكن تغيير المُلوثات غير العضوية عن طريق الأكسدة والإختزال ويُمكن ان تنتقل الى داخل الخلايا وفي حالات أُخرى تتبخر الى الجو مثل الزئبق والسلينيوم ولكن للأسف لايُمكن تحطيمها.

تتوافر مجموعة من طرائق الإستصلاح الحيوي للمُركبات غير العضوية تشمل تقييد حركتها (Immobilization) أي ما يُسمى Phytostabilization، سحبها الى المجموع الخضري والثمري حيث تُحصد (Phytoextraction أو Rhizofiltration) وفي حالات إستثنائية تطايرها

(Phytovolatilization). ركزت طرائق التقانات الأحيائية في إنتاج نباتات مُتحملة أو مُراكمة للمُلوثات من خلال التركيز على الجينات الناقلة للمعادن وعلى الجينات التي تُسهل من إنتاج المُركبات المخلبية. وفي حالة العناصر التي يُمكن ان تتطاير، عندئذٍ يتم التركيز على الجينات المسؤولة عن تحول المُلوثات الى مُتطايرة.

ألتلوث والسُمية بالزرنيخ Arsenic pollution and toxicity

تُشكل السُمية التي يُشكلها الزرنيخ للتربة والماء مشكلة واسعة النطاق في كل أنحاء العالم ويواجه ملايين البشر من خطر الإصابة بالسرطان والتسمُم بسبب تلوث الماء والغذاء. اثبتت البحوث العلمية بان الزرنيخ مُسبب سرطاني وسم (Carcinogen and toxin) ويتلف أغلب أعضاء جسم الإنسان. وتكمن خطورته عند تسربه الى المياه الجوفية ويستهلكها الإنسان والحيوان وسُجلت الحالة في أكثر من 70 بلداً ومؤثرةً في صحة حوالي 150 مليون إنسان. وتتجلى الحالة بوضوح في بنكلادش والهند مما حدى بمُنظمة الصحة العالمية بتسميتها بأسوء تسمُم جماعي في حياة البشرية. ومن الواضح بان تلوث المياه الجوفية لايقتصر على تسمم الإنسان والحيوان فحسب بل يتعداه الى المياه المُستعملة في ري المحاصيل وخاصة محصول الرز وهذا يضيف حوالي 1000طن من As سنوياً الى الأراضي الزراعية في بنكلادش وحدها. ولسوء الحظ فان أنواع الزرنيخ غير قابلة للتحطيم وتتراكم على سطح التربة وتم تسجيل مُعدلات عالية من المُلوث في المحاصيل التي تؤكل والمزروعة في الترب المُلوثة.

عالمياً، تم تسجيل عشرات الآلاف من المواقع المُلوثة بالزرنيخ في الولايات المتحدة ودول أُخرى وبمُعدلات غير مقبولة من الزرنيخ ومعادن سامة أُخرى وبحاجة الى الإستصلاح. ويُمكن ملاحظة الموقع في الشبكة الدولية www.epa.gov/superfund/sites/npl/index.htm لمزيد من التفاصيل. تُسمى الأنواع غير العضوية من الزرنيخ وتحديداً Oxyanions arsenate ($AsO4^{-3}$ ويشار لها AsV) و Arsenite ($AsO3^{-3}$ ويشار لها Aslll) سائدة في البيئة وأكثر سُمية من الاشكال العضوية. ويُعد AsV أكثر الأنواع إنتشاراً في الترب جيدة التهوية بينما يسود Aslll في الترب رديئة التهوية كالترب المغمورة بالماء. إضافةً الى ذلك فان الأشكال العضوية من Arsenicals مثل Monomethylarsenate (MMA) و Dimethylarsenate (DMA) هي الاخرى متوافرة في البيئة علماً بان الأنواع العضوية من الزرنيخ عموماً أقل سُمية من الأنواع غير العضوية. تعتمد سُمية الزرنيخ للخلية بشكل رئيس على نوعه، Aslll على سبيل المثال له قابلية إنجذاب عالية الى مجموعة Sulfhydyl من الحامض الأميني السيستيئن. عند إرتباط

AsIII مع بقايا السيستيئن يُحطم تركيب البروتين ووظيفته وبهذا يؤثر في عمليات الايض الرئيسة داخل الخلية كالفسفرة التأكسدية، إنتاج الكلوتاثيون، تصنيع ATP، ايض الأحماض الدهنية وكذلك على Gluconeogenesis. علاوة على ذلك، فان قابلية AsIII على الإرتباط مع الجزء غير البروتيني من Thiol glutathione تُسبب في نفاد مُضاد الأكسدة الكلوتاثيون مما يؤدي الى حصول زيادة في مُستويات أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) وبالتالي حصول إجهاد تأكسدي (Oxidative stress). ولكون AsV نظير للفوسفات لذلك يُمكن ان يكون بديلاً للفوسفات غير العضوي في العديد من العمليات الكيموحيوية وهذا مايؤكده تكوين مُركب Glucose-6-arsenate و ADP-arsenate وتثبيطه تكوين ATP.

الغذاء والتلوث بالزرنيخ Food and arsenic pollution

من المعلوم بان محصول الرز يُشكل الغذاء الرئيسي لأكثر من نُصف سكان العالم، ويزرع في مناطق شرق آسيا حيث النسب العالية من التلوث بعنصر الزرنيخ. تهيئ بيئة نمو الرز المغمورة في الماء فرصة لتلوث الحاصل بنوع AsIII في تلك المناطق وفي البلدان الاخرى المُنتجة للمحصول، إذ سُجلت مُستويات عالية من أنواع الزرنيخ العضوي الكلي في حاصل حبوب الرز وحتى في مزارع داخل الولايات المتحدة الامريكية. ويُشكل تراكم المُلوث في مُخلفات النبات من القش (التبن) مشكلة إضافية لكونها مُستساغة من الحيوانات وتُمثل نسبة عالية من علف الحيوانات في الدول المُتقدمة ودول العالم الثالث على حدٍ سواء. فتراكم تراكيز عالية في قش نبات الرز له مخاطره الكبيرة على المواشي وصحة الإنسان بعد تناول الأخير المُنتجات الحيوانية. وبناءاً على ما تقدم فهناك هاجس مُتنامي في سكان المناطق المُنتجة والمُستهلكة نتيجة تراكم تراكيز عالية من As في الحاصل والمُنتجات الحيوانية من لحوم والبان، ويتسع نطاق المخاوف ليشمل كل المحاصيل التي تزرع في المناطق المُلوثة بالزرنيخ سواء أُستهلكت محلياً ام صُدرت لبلدان اخرى، وبناءاً على ذلك فيُمكن إعتبارها مشكلة عالمية من الصعب تلافيها ما لم يتدخل علماء التقانات الأحيائية في إيجاد الحلول الناجعة لها.

إضافةً الى ما سبق، فان أنواع As وبتراكيز مُعينة تكون سامة للنباتات (Phytotoxic) والتراكيز العالية منها في التربة تُسبب إنخفاضاً معنوياً في حاصل النبات. فينخفض حاصل الرز بمقدار 10% في تركيز 25 ملغم/كغم تربة. وبالنظر للنقص الحاصل في كمية مياه الري، يروي المزيد من المزارعين حقولهم بمياه أُعيد تدويرها أو بمياه المجاري مما يعطي بعداً آخر للمشكلة نتيجة لتراكم As في الأراضي الزراعية. إضافةً الى أن AsV هو نظير للفوسفات وينافسه في الإمتصاص مما يُقلل أو يُثبط من إمتصاص الفوسفات والمُغذيات

الاخرى. والمجال مفتوح للتفكير بإنتاج محاصيل مقاومة لإمتصاص As من أجل تقليل أو تفادي سُمية المُلوث للنبات والكائنات الحية الاخرى. وثانيةً يبرز الدور الذي يجب على مُختصي التقانات الأحيائية القيام به.

آلية إمتصاص وإزالة سُمية الزرنيخ من قبل النبات والأحياء المجهرية Mechanism of absorption and removal of As by plants and microorganisms

تتجلى آلية إزالة سُمية الزرنيخ في البكتريا والخمائر، إذ ان التشابه بين AsV والفوسفات، يُمكن خلايا الخمائر في سحب المُلوث بنواقل الفوسفات. والجيد في هذا السياق، مقدرة الكائنات الدقيقة في إختزال AsV الى AsIII كآلية تتبناها تلك الأحياء في تحمل المُلوث. ولايتوقف الأمر عند هذا الحد، بل تستبعد تلك الكائنات AsIII oxyanions من خلاياها عن طريق نواقل يتم توظيفها لهذا الغرض. فوِجِدَ مثلاً بان بكتريا القولون (*Escherichia coli*) يتم فيها إختزال AsV الى AsIII عن طريق إنزيم Arsenate reductase (ArsC)، ويتم نقل الأخير خارج الخلية بمضخة تصدير AsIII وبذلك تكون الآلية بمثابة مقاومة للمُلوث. وتُظهر الكائنات البدائية مسلكاً حيوياً آخر لإزالة سُمية الزرنيخ بإستقلاب الزرنيخ غير العضوي الى مُركبات عضوية مُتطايرة مثل Trimethyl arsine بعد سلسلة من تفاعلات المثيلة Methylation reactions تُستعمل فيها إنزيمات S-adenosylmethionine methyltransferases كعوامل مُساعدة. أثبتت قسم من الدراسات بأن AsIII يدخل خلايا البكتريا والخمائر وحتى خلايا اللبائن عن طريق بروتينات Aquaglyceroporins التي تعود الى عائلة مُهمة من البروتينات.

بينت الدراسات في مقدرة النباتات في إزالة سُمية الزرنيخ أو إمتصاصه بآليات مُتنوعة ولعل من أهمها ما تم إفتراضه بأن طالما AsV عبارة عن نظير للفوسفات لذلك فهو يُمتص من قبل النظام النباتي بوساطة ناقل الفوسفات (PHT1) والذي تم إثباته في دراسة على نبات الأربدوبسس. كما وِجِدَ أيضاً بان AsV يكبح فعل الجينات المُتعلقة بالإستجابة لحاجة النبات للفوسفات مما يُدلل على ان AsV يتداخل في التحسس بوجود الفوسفات من عدمها بما يضمن تغيير في آلية الإشارة للفوسفات (Phosphate signaling mechanism). وسُجل وجود حوالي تسعة نواقل فوسفاتية (PHT) ذات قابلية عالية في نقل الفوسفات داخل نبات الأربدوبسس (*A. thaliana*) وأُخرى بقوى مُختلفة لجذب الزرنيخات. ومن المؤكد ان تبرز الحاجة الى مزيد من الدراسات لتشخيص قابليات الجذب للنواقل الفوسفاتية المُختلفة لكلٍ من AsV والفوسفات. وتبرز الحاجة أيضاً الى فهم آليتي تحمل الزرنيخ والتخلص من سميته في المُستوى الجزيئي. وكما سبق ذكره،

فالنباتات تُزيل سُمية الزرنيخ بإختزال AsV الى AsIII ومن ثم يتم إزالة السُمية بعد تكوين مُعقدات مع ببتيدات الثايول الفعالة مثل ˠ-glutamylcysteine (ˠ-EC)، كلوتاثيون (GSH) ومواد مخلبية نباتية (Phytochelatins; PCs). ويعتقد في الغالب دفع مُعقدات AsIII-thiol الى فجوات خلايا المجموع الخضري والجذري بوساطة مضخات مقترنة بالكلوتاثيون ومع هذا فلا تزال تلك الآلية بحاجة الى إثبات قطعي.

اقترحت العديد من الدراسات حصول إختزال AsV الى AsIII داخل الخلايا النباتية بوساطة إنزيمات إختزال الزرنيخات داخل الخلية (Endogenous arsenate reductases) والتي تم تحديدها في نباتات الأربدوبسس، الرز، المخملي الصوفي *Holcus lanatus*، جنيح حيوي *Pteris vittata*. فقد وِجِدَ بان الجين المعزول من الأربدوبسس ACR2 يُكمل وظيفة إنزيم إختزال الزرنيخات في سلالات بكتريا القولون *E. coli* الفاقدة لهذا الإنزيم (ArsC). وبينت البحوث في المُستوى الجزيئي ايضاً بأن خطوط من نباتات الأربدوبسس تم فيها إخماد تعبير جين *ACR2* بتقانة تداخل الرنا (RNAi)، قد أظهرت وبوضوح ظهور أجيال من النبات تعتمد على الزرنيخات بوسعها نقل مُستويات عالية من الزرنيخ تصل 10-15مرة من الجذور الى أجزاء النبات فوق سطح التربة. وبينت دراسات حديثة إمتلاك مُركبات Aquaporins خصائص MIP اي عائلة البروتينات الحقيقية الكبرى (Major intrinsic protein superfamily) ووظيفتها نقل AsIII في الرز. تُقسم البروتينات النباتية MIPs الى أربع مجاميع من العويلات (Subfamilies) الرئيسة والتي تشمل؛ بروتينات الغشاء البلازمي الحقيقية Plasma membrane intrinsic proteins والتي تُختصر PIPs؛ بروتينات غشاء الفجوة الحقيقية (Tonoplast intrinsic proteins) وإختصاراً TIPs؛ بروتينات نوديولين 26 شبه الحقيقية (Nodulin 26-like intrinsic proteins) وتُختصر NIPs وأخيراً مجموعة صغيرة من البروتينات الحقيقية البسيطة (Small and basic intrinsic proteins) وتُختصر SIPs.

بينت دراسات أُخرى بان ناقل عنصر السليكون (Si) والذي يرمز له Lsi1 أو OsNIP2;1 وهو أيضاً يتبع عائلة بروتينات NIP يلعب دوراً رئيساً في دخول AsIII الى جذور الرز. ولحسن الصدف، فقد طورت طفرة وراثية من Lsi1 نتج عنها إنخفاض مقداره 60% في تدفق AsIII الى داخل جذور الرز. كما أُكتشف حامل لتدفق السيلكون (Lsi2) ويتبع أيضاً عويلة NIP في الرز ومسؤولاً عن تحميل AsIII الى داخل أنسجة الخشب، وعندما نُقلت قطعة دنا اليه في موقع Lsi2 locus حصل إنخفاض في تراكم As في المجموع

الخضري بمقدار 50%. يتبين مما سبق، الحاجة الى دراسات مستفيضة لتحديد نواقل أو من ساعد في تقليل نقل AsIII وبالتالي التقليل من خطورة التسمم بالزرنيخ دون التاثير في إمتصاص النبات للمُغذيات الآخرى.

الإستصلاح الحيوي النباتي لمُلوث الزرنيخ As phytoremediation

توفر الطبيعة وبلاشك تنوعاً أحيائياً كبيراً ومخزوناً ضخماً من المادة الوراثية (Germplasm) يُمكن إعتبارها مصرفاً للجينات (Gene bank) تحت طلب الإنسان متى يشاء. فالنبات السرخسي الجنيح الحيوي (*Pteris vittata*) على سبيل المثال له المقدرة في تراكم كميات كبيرة (Hyperaccumulator) من الزرنيخ وينمو بغزارة في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية. يُمكن ان يكون هذا النبات مُرشحاً قوياً للإستصلاح الحيوي للترب المُلوثة بالزرنيخ في تلك المناطق. وعلى النقيض من نباتات الأراضي الأُخرى، فالنبات يُراكم الزرنيخ على شكل AsIII بشكل رئيس حيث ينتقل As من رايزوم النبات الى الساق الورقي (Frond) ويخزن على هيئة AsIII حر. فقد وِجِدَ بان الجين PvACR3 والذي يُشفر لبروتين مشابه قليلا للجين ACR3 المتوفر في الخمائر ومسؤولاً عن تدفق الزرنيخات، ويقع في الغشاء الوعائي لمشيج السرخسيات، ومسؤولاًعن تدفق AsIII الى الفجوة لغرض عزله. والباب مفتوحاً للاستفادة من الطبيعة والبحث عن جينات مشابهة وخاصة من مصادر نباتية. وبالنظر للآلية الفريدة والكفوءة لهذا السرخس في تراكم المُلوث، لذا يُعد مصدراً مهماً لجينات التحمل ونقلها الى نباتات أُخرى وبامكان مختصي التقانات الأحيائية الإستفادة من هذه الفرصة التي وفرتها الطبيعة. وبالرغم من ان الدراسات قد بينت تحمل السرخس لمُستويات عالية من As في التربة تحت ظروف البيت الزجاجي، الا ان بعض المُحددات بحاجة الى حلول قبل استعماله كمُصلح حيوي تحت ظروف الحقل. أهمها عدم الدراية التامة بالآلية الجزيئية لإزالة سُمية Asمن قبل هذا السرخس. إضافةً الى إقتصار نموه الدائم في المناطق الاستوائية وتحت الاستوائية وقد يعتبر نوعاً غازياً (Invasive) عند نقله الى مناطق جديدة مما يؤثر سلباً في النظام البيئي الجديد.

وُضعت إستراتيجيات بديلة عن إستعمال السرخس الجنيح الحيوي *P. vittata* في البحث عن الأُسس وألآليات الوراثية لإيجاد نباتات بديلة بكُلف أقل ليُمكن نقل الصفة الى نباتات أُخرى تتوافر في مناطق جغرافية مُختلفة. يُبنى أساس عمل تلك الإستراتيجيات على التلاعب الوراثي في المادة الموروثة بما يُحقق الصفة المرغوبة، كزيادة تحمل النبات الجديد ليقاوم العيش تحت ظروف البيئة المُلوثة بالزرنيخ، زيادة قابلية النبات في سحب المُلوث ونقله الى أجزاء النبات التي تُحصد. وفي حالة التعامل مع نبات يؤكل، فعندئذٍ يجب ان تتوفر في النبات الجديد آلية كفوءة في عملية المثيلة (Methylation) بما يضمن سلامة الغذاء. تُوِجت

العديد من البحوث بالنجاحات في هذا المضمار بعد تطوير نباتات مُحورة وراثياً في صفة زيادة تحمل وتراكم As ليشمل حصول تعبير جيني عالي في تصنيع PCs أو بادئها (GSH) مما زاد من تحمل النبات لمُستويات عالية من As ولكن للأسف فشل في تراكم هذا المُلوث في أنسجته. إستنتجت تلك الدراسات بان زيادة تصنيع GSH و PC غير كافٍ لتحقيق كامل الهدف إذ لايزال النبات لايُراكم As في أنسجته بالرغم من تحمله لتراكيز عالية من المُلوث. أنتج التعبير المُشترك لكلاً من γ-ECS و PCS تأثير أكبر في تحمل وتراكم نبات الأربدوبسس للمُلوث من زيادة التعبير الجيني لكل جين على إنفراد. وهكذا فتحوير مُستويات GSH و PCs في النباتات يُعد فكرة مُهمة في زيادة تحملها وبالإمكان تطبيقها في إنتاج نباتات جديدة (Novel) ذات قابلية إستصلاح حيوي كبيرة.

طور العلماء نباتات مُحورة وراثياً ذات قابلية تحمل وتراكم جيدة من المُلوث As في المجموع الخضري بجمع التعبير المشترك لجينين معزولين من البكتريا. ونجح تعبير الجين المعزول من بكتريا القولون *E. coli* المُختزل للزرنيخات (arsC) في الأوراق وتم توجيهه من خلال مُحفز تم حثه من نبات فول الصويا بوساطة وحدة صغيرة من منظومة إنزيمات الروبسكو (RuBisCo small subunit 1). وحصل تعبير لجين γglutamylcysteine synthetase (γ-ECS) المعزول من بكتريا *E. coli* في المجموعين الخضري والجذري من خلال محفز تركيبي قوي المسمى Actin2. وبهذا فتكون النباتات قد حورت وراثياً مرتين واظهرت تحملاً عالياً مُقارنة بتلك التي حصل تعبيرها من γ-ECS وحده. والمثير في هذا الانجاز العلمي ان النباتات التي حورت وراثياً مرتين (Double transgenic plants) كونت كتلة حيوية اكبر بمقدار 17 مرة من النبات غير المُحور اي البري (Wild type) وراكمت الزرنيخات في المجموع الخضري أكثر بمقدار 3 مرات من النوع البري غير المُحور بعد تنميتها في وسط حاوٍ على 125 مايكرومول من الزرنيخات الصوديوم. أُعدت تلك الدراسة دليلاً قاطعاً في نجاح هندسة النبات وراثياً في مجال الإستصلاح الحيوي ويعزز اللجوء الى التقانات الأحيائية في التخلص من المُلوثات. لاتزال نتائج كثير من الباحثين في مجال نقل الجينات لم ترى النور بعد ولكن المستقبل القريب سوف يكشف عن الكثير منها وخاصة اصبح للقطاع الخاص نفوذاً واستثمارات كبيرة في مجال الإستصلاح الحيوي. ومن المؤكد ان يكون للنباتات المُحورة مرتين (وربما أكثر) أو نقل إثنين من الجينات أو أكثر الكلمة الفصل في إزالة المُلوثات من البيئة والتخلص (أو الحد) من مخاطرها.

إمتصاص المحاصيل الغذائية لعنصر الزرنيخ Absorption of food crops to As

يُشكل إمتصاص وتراكم As في المحاصيل التي تؤكل كالرز والخضروات مشكلة صحية بالغة الخطورة تنعكس وكما أسلفنا سابقا في صحة وبيئة الكائنات الحية وخاصة الإنسان. وبينا إمكانية توظيف التقدم الحاصل في مجال التقانات الأحيائية في تقليل مخاطر التسمم بالزرنيخات. ويمتلك الإنسان حاليا مجموعة خيارات قد تكون مؤثرة جدا في صالح الإنسان وبيئته لعل أولها تقليل As في الأجزاء الخضرية من المحصول اذ ان غالبية المحاصيل تؤكل اجزائها الخضرية أو الزهرية أو الثمرية أو بذورها. وهذا يتم بإختزال AsV الى AsIII في الجذور مع زيادة مُعقدات AsIII-thiol بزيادة التعبير الجيني للجينات المُشفرة لإنزيم اختزال الزرنيخات والتصنيع الحيوي لمسالك بروتينية في الجذور والتي لا تتم الا بإستعمال محفزات (Promotors) مُتخصصة في الجذور. فزيادة إنتاج AC في الجذور بإمكانه ان يحجم إنتقال As الى النموات الخضرية بعد تكوين مُعقدات من AsIII-PC وارسالها الى الأنسجة الوعائية الجذرية. وثانيا؛ يُمكن ايقاف إمتصاص AsV من قبل الجذور عند التلاعب بمُركبات PHTs ذات الميل الى AsV بدل الفوسفات. وثالثاً؛ يُمكن التقليل ولحد كبير من تراكم AsIII في المحاصيل وخاصة الرز بتقليل التعبير الجيني لجين Lsil والذي يتوسط في إمتصاص الجذور لكل من AsIII و Lsi2 المسؤولة عن نقل AsIII من الجذور الى النموات الخضرية. ورابعاً؛ يحصل تغيير في As غير العضوي الى أشكال من As العضوي المُمثيل (Methylated organic As) مما يُقلل من سُمية As إضافةً الى تطايرأنواع As المُمثيلة أمثال MMA و DMA الى حالة غازية من مُركب Trimethylarsine (TMA) والذي يتم بزيادة التعبير الجيني للجين lll-S-adenosyl methyltransferase (ArsM) المنقول من البكتريا والطحالب أو جينات نباتية مُشفرة لإنزيم As methyltransferases حال تشخيصها. ولكن تبقى سُمية TMA في الحقول المغمورة بحاجة الى مزيد من الدراسات. خامساً؛ يُمكن تقليل تراكم As في المحاصيل الغذائية بإضافةً الفوسفات والسلنيوم (Se) الى الترب، إذ كلاهما يلعب دوراً مهماً في تقليل إمتصاص As من قبل النباتات. ويُمكن تحقيق الحالة الأخيرة بزيادة التعبير الوراثي لجينات PHT المُتخصصة فقط لنقل الفوسفات أو جينات النواقل التي تتوسط إمتصاص Se وكما سيتم إيضاحها لاحقاً عند الكلام عن السلنيوم.

وخلاصة لما سبق، يتطلب تطوير ستراتجيات جديدة للإستصلاح الحيوي النباتي ومنع التسمم في السلسلة الغذائية، فهماً شاملاً لطريقة إمتصاص As، التخلص من سميته، وحصره داخل أنسجة النبات والأحياء المجهرية. كما يتطلب فهماً اعمق عن الجينات المسؤولة عن ايض As. حديثاً، وبفضل التطور السريع في مجال علم الأحياء الجزيئي وما نتج عنه من تحليل مجينات مجموعة من النباتات، فقد تم تشخيص مجموعة

من الجينات المُتخصصة والتي تظهر تعبيرها الجيني عند تعرض النبات أو خلاياه الى As. اذ حددت في نباتي الأربدوبسس والرز ومتى ما تم تحديد وظائفها بدقة، يُمكن عندئذٍ نقلها الى أنواع نباتية سريعة النمو وذات كتلة حيوية كبيرة من اجل زيادة كفائتها في سحب As أو لمنع تراكم المُلوث في السلسلة الغذائية وبالتالي استعمالها في الإستصلاح الحيوي.

الزئبق: التلوث والسُمية Mercury: pollution and toxicity

الزئبق مُلوث عالي السُمية ويُشكل إنتشاره في التربة والماء مصدر خطر كبير في صحة الإنسان وبيئته. يتحرر الزئبق عادة الى البيئة باشكال غير عضوية اما بهيئة عنصر معدني [Hg(0)] أو بهيئة آيونية [Hg(11)]. تميل الهيئة الآيونية للإرتباط بقوة الى مُكونات التربة مما يُقلل من توافرها وإمتصاصها. تكون الاشكال العضوية من Hg وعلى وجه التحديد، مثيل الزئبق (Methylmercury)، دايمثيل الزئبق (Dimethylmercury) وفينيل الزئبق (Phenylmercury) عالية السُمية وتتراكم في عضيات الأغشية فتؤدي تلك المُركبات الى تثبيط المسالك الحيوية للاكسدة والتصنيع الضوئي. ويختص مثيل الزئبق (CH_3Hg) بانه الأكثر سُمية ويُشكل الخطر الاكبر على الإنسان والبيئة لكونه يتراكم بكميات كبيرة في السلسلة الغذائية. شعر العالم بالخطورة البالغة لمثيل الزئبق في عام 1950 بعد حصول كارثة كبرى في اليابان نتيجة التسمم بالزئبق. وتكمن الخطورة في المواقع المُلوثة حيث لايُمكن إزالة الزئبق للأبد بسبب اشكاله المُختلفة التي لا تتحطم من جراء النشاطات البيولوجية لأحياء التربة ولإرتباطه القوي بالمواد العضوية مما يُشكل خطرا دائماً للبيئة. أدت الإشعاعات المُنبثقة من الزئبق الطبيعي الى إنتشاره في كل مناطق الكرة الأرضية.

تحصل العديد من العمليات الطبيعية التي تجعل من إنتشار الزئبق سهلاً الى البيئة مثل ثوران البراكين، اندلاع النيران، إضافةً الى العمليات البيولوجية كالاختزال الكيموكهربائي الى Hg(0) بما يجعلها نواقل لانتشار الزئبق في البيئة. إضافةً الى ذلك، فان الاشعاع الطبيعي للزئبق والفعآليات البشرية (Anthropogenic) كحرق المُتحجرات، التعدين عن الذهب والفحم والفضة والنشاطات الصناعية المُختلفة سببت في زيادة اشعاع الزئبق لعدة أضعاف أكثر من المُستوى الطبيعي وذلك حسب ما ورد في تقارير مُنظمة الصحة العالمية. وحالما يتاكسد الزئبق في الجو الى زئبق آيوني ويُطرح الى البيئة مُسببا زيادة في مُستويات الزئبق. تلعب البكتريا اللاهوائية المُختزلة للكبريت والنشطة في المناطق المغمورة بالمياه دوراً في تحويل الزئبق اللاعضوي (Hg11) الى مثيل الزئبق. تكمن خطورة التلوث بالزئبق عند إنتاج مثيل الزئبق بسبب

تلك البكتريا والتي غالباً ما تكون في كافة الأراضي المُلوثة بالزئبق والمغمورة بالماء. والجدير بالذكر وتحت ظروف البيئة المائية فان البكتريا المُلوثة بمثيل الزئبق يتم التهامها من قبل الحيوانات الإبتدائية (البروتوزوا) والأخيرة تلتهمها اللافقريات والأخيرة تلتهمها الأسماك الصغيرة وتلك تلتهمها الاسماك الاكبر لتصل السلسلة بالطيور الى ان تصل الى الإنسان باعتباره في قمة السلسلة الغذائية. وبسبب الذوبانية النسبية العالية لمثيل الزئبق داخل القناة الهضمية وفي أغشية الخلايا العصبية، لذلك سوف يتركز أكثر فأكثر في كل خطوة من السلسلة الغذائية مما هو عليه حال الزئبق الآيوني وبالتاكيد سوف يمر عبر الجهاز الهضمي لتلك الكائنات الحية. لذلك فان مثيل الزئبق يتعاظم أثره (Bio magnification) في السلسلة الغذائية وذو مخاطر جسيمة لصحة الإنسان والحيوان. واصبح جلياً الان بان الاسماك المُلوثة بالزئبق والحيوانات البحرية الآخرى تُعد المصدر الرئيس لتلوث الغذاء، وحذرت الولايات المتحدة مواطنيها من النساء الحوامل والأطفال من إستهلاك الأسماك بكميات كبيرة.

إزالة سُمية الزئبق من قبل النباتات والبكتريا Removal of Hg by plants and bacteria

تتوسط البكتريا المقاومة لأملاح الزئبق العضوية واللاعضوية بتحويل مسارها الايضي الى عنصر الزئبق غير السام Hg(0). تنتظم جينات البكتريا المقاومة للزئبق في جينات *mer* operon وتختلف الأخيرة من نوع بكتريا الى آخر في تركيبها. ففي حالات مقاومة البكتريا في مفهومها الضيق لعنصر الزئبق فان جينات *mer* operon تكون مكونة من الجينات التي تُشفر لبروتينات وظيفية لغرض تنظيم merR، النقل (merT, merP, mer C, merF) والاختزال الكيموكهربائي. بينما البكتريا ذات المقاومة بمفهومها الواسع تحمل جين إضافي يُشفر merB والذي يحمل المقاومة للعديد من أنواع الزئبق العضوي أمثلة مثيل الزئبق وفينيل الزئبق. فالإنزيم المحلل للزئبق العضوي (merB) يساعد في تحويل R-Hg الى Hg(11) ويختزل R-H وذلك عندما تكون R تمثل مدى واسع من المجاميع العضوية كمجاميع المثيل أوالفينيل. اما الإنزيم المُختزل لآيون الزئبق (merA) فهو يساعد الاختزال الكيموكهربائي لمُركب Hg(11) الى Hg(0). والأخير ذو سُمية أقل مُقارنة مع هيئة Hg الآيونية أو العضوية. فالزئبق المعدني يكون خامل نسبياً وذوبانية منخفضة جداً وبشكل غازي تحت ظروف درجات الحرارة العادية مما يسمح من إنتشاره من البكتريا المُنتجة له. يتبخر الزئبق بسرعة من البكتريا ويخفف في الجو الى تراكيز ذات مُستويات غير ضارة.

يميل Hg(11) في النباتات كما هو الحال في الحيوانات الى إحداث تلف في الأغشية البلازمية وخاصة النواقل مثل الاكوابورينات (Aquaporins) مما يؤثر سلباً في نقل الماء والمُغذيات. وبسبب الفعالية العالية

لهذا النوع من الزئبق، فانه يصبح ساماً للعديد من الأنظمة الإنزيمية عندما يكون بتراكيز عالية. سَجلت العديد من التقارير العلمية حصول تلف في منظومات النقل الالكتروني وتحرير الأوكسجين بعد دخول مُركبات الزئبق العضوية الى داخل أغشية البلاستيدات وتراكمها فيها. كما وجد بانها تتلف ايضاً عملية الفسفرة الضوئية، مُحتوى البلاستيدات من الكلوروفيل ولاصفات (فلورسينات) الكلوروفيل. والمعلوم هو عدم حاجة النبات الى الزئبق ويلعب دورا سلبياً في العمليات الكيميائية التي تحصل في أنسجة النبات. ويزداد الموقف غموضاً حيث لم يكتشف المختصون ولو نبات واحد في الطبيعة ذو قابلية في تراكم وتحطيم أو إزالة الزئبق بالرغم من فعالية بعض الأنواع النباتية بتغيير مُركبات الزئبق من شكل الى آخر. تقوم بعض الأنواع النباتية بتغيير كميات مُعتدلة من Hg(11) الى Hg(0) نتيجة فعالية العديد من الإنزيمات أمثال Catalase و Peroxidase. يتحرر Hg(0) الى التربة من الجذور أو قد يتبخر من خلال النموات الخضرية الى الجو، في الوقت الذي يميل Hg(11) الى الدخول في التفاعلات بشدة والإرتباط بمجاميع Sulfhydryl للإنزيمات الحاوية على الكبريت، مُنتجاً مُركبات كيميائية مُستقرة مع ثايول مُختزل. وبالرغم من ان تفاعل العديد من الإنزيمات مع الثايول والبروتينات قد يؤدي الى تثبيط نشاط تلك الإنزيمات، فالبروتينات ومُعقداتها والثايول المرتبط مع Hg(11) نوعاًما تكون غير سامة وفي كثير من الحالات يتم حجزها داخل الفجوات.

إنجازات التقانات الأحيائية النباتية في الإستصلاح الحيوي لمُركبات الزئبق Achievements of plant biotechnology in phytoremediation of Hg

أُختبرت العديد من الأنواع النباتية وللاسف لم ينجح اي نبات تم إختباره في إزالة سُمية أو تحويل مُركب مثيل الزئبق عالي السُمية الى أشكال عضوية أقل سُمية. وكما تم ذكره سابقاً، فالجينات البكتيرية المُشفرة لتحول الزئبق من شكل للآخر قد تم تحديدها مما وضع اساساً يستطيع من خلاله مختصو الوراثة الجزيئية من زيادة تحمل النباتات للزئبق. وضعت إستراتيجية لتحقيق هذا الغرض من قبل Richard Meagher وزملاؤه في في تسعينيات القرن الماضي بالإستفادة من جينين معزولين من جينات *mer* operon البكتريا وهما *merA* وجين البكتريا المُحلل للزئبق العضوي (Bacterial organomercury lyase gene) الذي يُطلق عليه *merB* ونقلهما الى النباتات. أثمرت الجهود التي بذلها مُهندسو النبات وراثياً من نقل الجينين الى أنواع نباتية مُختلفة أهمها؛ الأربدوبسس، التبغ، الحور الاصفر،أشجار الصوف القطني والرز. نجح تعبير الجينن وراثياً وزادت مقاومة النباتات المُحورة وراثياً للزئبق Hg(11) بمقدار عشرة أضعاف التراكيز القاتلة للنباتات غير المُحورة وراثياً. أظهرت النباتات بعد تحويرها قابليتها العالية في تطايرمُستويات مرتفعة من Hg(0) مُقارنة بالنباتات غير المُحورة. وتميزت أشجار الحور الأصفر(Yellow Populus) والحور

الرجراج (Cottonwood) بفائدة اضافية لكونهما يمدان جذورهما في اعماق التربة وينموان في الترب الرطبة ويمتصان شكل الزئبق Hg(11) من منطقة المجموع الجذري الواسع وسحبه الى المجموع الخضري ليتطاير الى الجو مما يوفر فرصة كبيرة للتخلص من هذا المُلوث في الترب الرطبة. وفي تجربة أُستعملت فيها تربة داخل اصص، تفوق نمو النباتات التي اظهرت تعبيرا في *merA* بشكل كبير عن نباتات المُقارنة عند زراعة كليهما في تربة مُلوثة بالزئبق.

أصبح معلوماً، وكما ذكر سابقاً بان مثيل الزئبق يُشكل أكثر خطورة من صورتي الزئبق الآيونية والمعدنية ويمر ويتراكم بالسلسلة الغذائية في الوقت الذي لاتكون الحالة كذلك لصورتي الزئبق الأخيرتين. وبناءاً على ذلك، تظهر سُمية مثيل الزئبق في الكائنات الحية بسرعة وخطورة بالغة ويهدد أغلبية سكان العالم. ولكون *merA* يحول فقط Hg(11) الى Hg(0) ولايُمكنه إزالة سُمية وبالتالي حماية النباتات ضد مثيل الزئبق الأكثر خطورة في صحة الإنسان وبيئته، لذا ولدت فكرة نقل الجينين *merA* و *merB* الى نبات واحد لحماية الخلايا النباتية من تاثير مثيل الزئبق القاتل. يساعد *merB* بتحطيم بروتونات جزيئات الأواصر التي تربط الكربون بالزئبق وبذلك تُزال الاربطة العضوية محررةً Hg(11) القليل الحركة ويميل الى التفاعل مُقارنة بمُركبات الزئبق الآخرى. حُوِرت النباتات وراثياً بزيادة التعبير الجيني للجين *merB* ليحول مثيل الزئبق الى صورته الآيونية. عبرت نباتات الأربدوبسس المحورة وراثياً بالجين السابق لتنمو بغزارة في تراكيز مُختلفة من كلوريد مثيل الزئبق الاحادي (Monomethylmercuric chloride) وفي خلات فينيل الزئبق (Phenylmercuric acetate) مُقارنة مع النباتات التي لم تخضع للتحوير الوراثي والتي تاثرت بشدة وماتت عند زراعتها في ذات التراكيز. بينت النتائج سابقة الذكر بان تعبير *merB* وحده كافياً لحمل صفة تحمل مثيل الزئبق التي قد تعود الى السُمية العالية للمُركب الأخير لأكثر خلايا الكائنات الحية حقيقية النواة. تمكنت النباتات المُحورة وراثياً من النمو بغزارة في بيئات ذات تراكيز عالية من مثيل الزئبق بعد تحويلها له الى Hg(11) والذي تراكم في تلك النباتات.

وفي محاوِلة لزيادة كفاءة النباتات للتخلص من سُمية مثيل الزئبق، حورت النباتات بالجينين *merA* و *merB* ليكون تعبيرهما مُتعاضداً. ولحسن الحظ، تبين بان النباتات المُحورة بكلا الجينين حملت تحول مثيل الزئبق بخطوتين (Two step conversion) لتحوله الى صورة مُتطايرة من Hg(0) وكانت مُتحملة بمقدار 50 مرة من مثيل الزئبق لنفس التركيز القاتل لنباتات المُقارنة وتحملت خمسة اضعاف التركيز الذي يقتل النباتات المُحورة بالجين *merB* فقط. وعند تطبيق نتائج الدراسة على أشجار الحور الرجراج بعد نقل كلا الجينين لهذا النبات، أظهرت تحملاً عالياً للزئبق العضوي. عززت النتائج السابقة من إمكانية هندسة مدى

واسع من النباتات وراثياً لتشمل الأشجار والشجيرات والحشائش وإستعمالها في إزالة سُمية الصور المُتوافرة بغزارة من الزئبق الآيوني والعضوي في المواقع المُلوثة بالزئبق. إتجه العلماء الى أبعد من ذلك عندما لاحظوا بان البلاستيدات والشبكة الاندوبلازمية (ER) كانت الهدف للتسمم بالزئبق، واستنتجوا بان حماية هذين الجزئين من مُكونات الخلية في بالغ الاهمية من بعد هندسة أنظمة إزالة السُمية في كلا مكوني الخلية وسيوفر حماية عالية للنبات من الزئبق. كانت البداية مع البلاستيدات إذ هندست وراثياً بنقل كلا الجينين merA و merB الى مجين الكلوروبلاست.

أظهرت نباتات التبغ المُحورة وراثياً تحملاً عالياً لمُركب الزئبق العضوي خلات فينيل الزئبق (PMA) حيث راكم ما يقارب من 100 ضعف في نمواته الخضرية بوجود PMA واربعة اضعاف عند نموه في وسط حاوٍ على HgCl2 مُقارنة مع نباتات تبغ غير مُحورة وراثياً. أعطت النتائج السابقة دلالةً في إمكانية إستثمار البلاستيدة الخضراء بعد هندستها وراثياً في مجال الإستصلاح الحيوي بإستعمال النباتات. وخلاصة لما سبق، فالزئبق عنصر سام لجميع الكائنات الحية ويستوجب التخلص منه بوسائل التقانات الأحيائية الحديثة. وُظفت الهندسة الوراثية في الإستصلاح الحيوي بعد نقل جيني merA و merB من البكتريا ونقلها الى مجموعة من النباتات. أظهرت النباتات المُحورة قابلية عالية في التخلص من سُمية مثيل الزئبق وتحويله الى صورة (Hg0) مُتطايرة أقل سُمية. وبالرغم من النتائج الإيجابية المُتحققة في المختبر والبيوت الزجاجية، لاتزال النتائج بحاجة الى إختبارات حقلية قبل تبنيها من قبل الجهات المُختصة. ويجب الاخذ بنظر الإعتبار هندسة النباتات في مواطنها الاصلية وخاصة المناطق المُلوثة بالزئبق لكي تكون ملائمة للنمو تحت ظروف تلك المناطق. إضافةً الى إستراتيجية تطاير Hg(0)، تبرز الحاجة الى إختزال مثيل الزئبق الى هيئة Hg(11) وبالتالي حصره داخل الأنسجة الخضرية. وأخيراً لابد من التركيز على هندسة الإنزيمات المؤكسدة للزئبق في عضيات الخلية النباتية مثل الشبكة الاندوبلازمية والبلاستيدات الخضراء كونها مواقع لتراكم الزئبق.

الايض الحيوي للسلنيوم Selenium في النبات Metabolism of Se in plant

يُعد السلنيوم مغذي أساسي للعديد من الكائنات الحية ومنها الإنسان، وتكمن خطورته عند زيادة تركيزه وبهذا فزيادته أو نقصه تمثل مشكلة على نطاق عالمي. وبالرغم من عدم ثبوتية إحتياج النبات للسلنيوم، الا ان النبات يمتصه ويمثله داخل أنسجته لكونه مشابهاً للكبريت وتقوم نواقل الكبريت والمسالك الكيموحيوية بنقله. يراكم النبات Se في كافة أعضائه ومن ضمنها البذور ويُمكن ان يتطاير الى الجو علماً ان بعض الأصناف

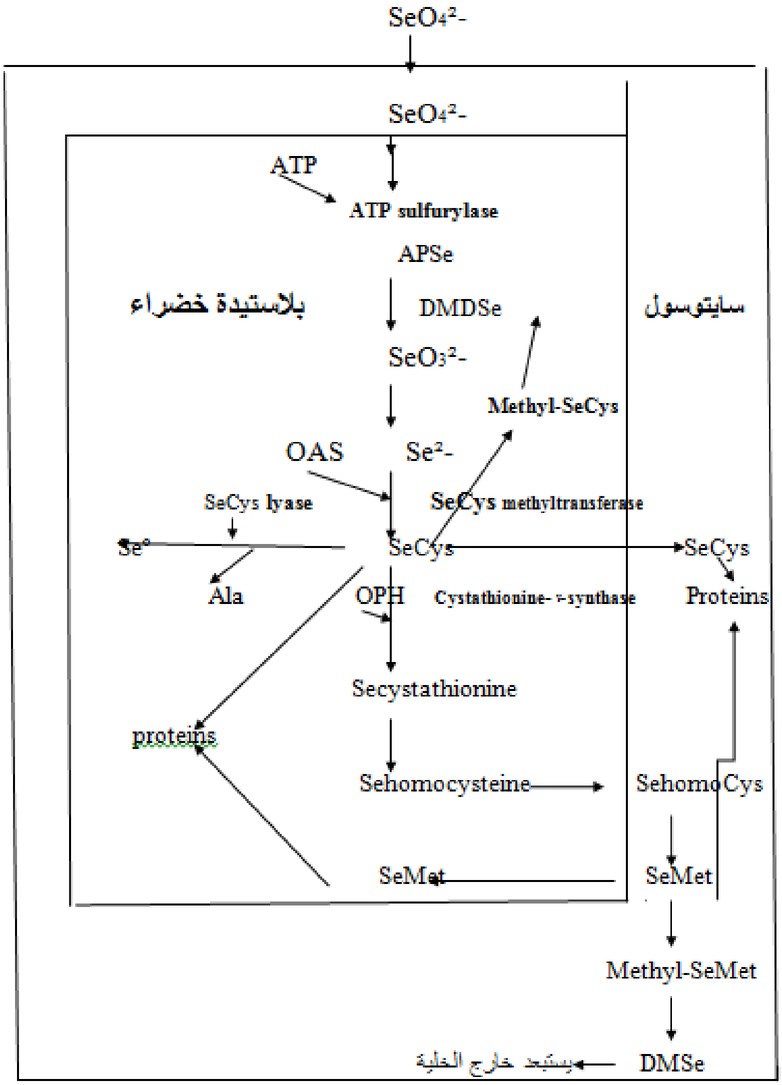
بامكانها تراكم تراكيز عالية من Se تصل الى 1% من وزنها الجاف. ومادام للعديد من الأنواع النباتية المقدرة في تراكم وتطاير Se، يُمكن إستثمارها في الإستصلاح الحيوي. وُظفت التقانات الأحيائية في دراسة الآليات الوراثية والكيموحيوية المُسيطرة في تحمل، تراكم وتطاير Se من النبات، من خلال تطوير تلك الآليات بما يُمكن النباتات من تحمل مُستويات عالية من المُلوث وبالتالي إستثمارها في الإستصلاح الحيوي وفي الغذاء المُعزز تغذوياً (Fortified food). تمتص النباتات عنصر السلنيوم في هيئة سلنيت (Selenate, SeVI) أو سلنايت (Selnite, SeIV) من بيئتها ليرتبط بالمُركبات العضوية حيث تستعمل إنزيمات تمثيل الكبريتات لهذا الغرض (شكل 10.5).

يُعتقد بان سُمية Se ترجع الى إتحاد غير مُتخصص بين الحامضين الأمينين سلينوسيستين (SeCys) والسلينومثيونين (SeMet) مع البروتينات. ولمنع تسمم النبات، يقوم الأخير بتكسير SeCys الى سلينيوم معدني آمن (Se0) أو تمثيله الى مُركب Methyl-SeCys غير السام نسبياً والذي قد يتراكم أو يتمثيل مرة أُخرى الى مُركب Dimethyldiselenide وإختصاراً DMDSe المُتطاير. ويُمكن ان يتمثيل SeMet ايضا لتكوين DMSe. تحصل مثيلة للمُركب SeCys بشكل أساسي في النباتات كثيرة التراكم للسلنيوم (Se hyperaccumulators) وتعد الآلية المُناسبة لتحمل السلنيوم. تراكم وتطاير Se مفيدان في الإستصلاح الحيوي لهذا العنصر. والمُلاحظ بان النباتات المُحبة للكبريت مثل الخردل، اللهانة، البصل والثوم تراكم في الأحوال الإعتيادية 0.1-0.01% من وزنها الجاف Se ومع هذا يُطلق عليها أنواع عادية التراكم من السلنيوم. أما التي تُراكم كميات كبيرة من Se فتمتلك خاصية فريدة من حيث تفضيلها لتراكم Se بدلاً من S وبامكانها تحمل 1% من وزنها الجاف تحت ظروف الحقل إضافةً الى تراكمها لمُركب Methyl-SeCys. وعموماً تنمو الأنواع النباتية عالية التراكم من السلنيوم في التربة الغنية بهذا العنصر اذ تستعمله في الغالب في الدفاع عن نفسها ضد الأحياء القارضة والمُسببات المرضية.

التقانات الأحيائية وايض السلنيوم في النبات Biotechnology and Se metabolism

بدأت الفكرة الأولى للتعامل مع تحمل وتراكم وتطاير Se عندما تم زيادة التعبير الجيني للجينات التي يتضمنها تمثيل وتطاير الكبريت والسلنيوم. أظهر نبات الخردل الهندي *Brassica juncea* تعبيراً عالياً لإنزيم ATP sulfurylase (APS) الذي يحول سلنيت الى سلنايت واستطاع النبات من زيادة إختزال السلنيت. تعززت الفكرة عندما أظهرت النباتات المُحورة وراثيا بالجين APS المجهز بمُركب سلنيت تراكماً من Se بصورته العضوية، في الوقت الذي راكمت النباتات غير المُحورة مُركب سلنيت دون تغيير صورته.

وسَجلت النباتات المُحورة زيادة في تراكم Se بمقدار 2 الى 3 مرات وبمقدار مرة ونصف من الكبريت مُقارنة مع النوع البري ولم يتأثر معدل تطاير العنصر بعد تحوير النبات. بينت نتائج التجارب زيادة في تعبير إنزيم Cystathionine gamma synthase (CgS) وهو أول إنزيم يدخل في تحويل SeCys الى SeMet في نبات الخردل الهندي الذي زاد من مُعدلات تطاير Se بمقدار 2 الى 3 مرات بعد تحويره وراثياً بالجين المُعبر لهذا الإنزيم. ومن جهة اخرى فقد سجلت النباتات المُحورة بهذا الجين إنخفاضاً في تراكم Se بمقدار 40% داخل انسجتها مُقارنة بالنبات البري وذلك بسبب الزيادة التي حصلت في مُعدلات التطاير في النباتات المُحورة.



شكل 10.5. مسالك الايض الثانوي للسلنيوم داخل النبات (راجع المتن للتفاصيل).

وركزت الفكرة الثانية للتعامل مع ايض Se في منع إرتباط SeCys بالبروتينات. ووضعت مجوعة إستراتيجيات لإنجاز العمل، كانت الأولى زيادة التعبير الجيني لإنزيم Selenocysteine lyase (SL) في نباتي الأربدوبسس والخردل الهندي. وتبين تحطم SeCys الى اللنين بفعل إنزيم SeCys، كما أظهر النباتان إنخفاضا في إرتباط Se بالبروتينات رافقها زيادة في تحمل Se مع زيادة تراكم العنصر بمقدار مرتين عند مقارنتهما مع النباتات غير المُحورة. كما نُفذت إستراتيجية ثانية لمنع إرتباط SeCys مع البروتينات حيث نُقل الجين المُعبر لإنزيم SeCys methyltransferase (SMT) من نبات الأربدوبسس *Arabidopsis bisulcatus*. أظهرت النباتات المُحورة بهذا الجين زيادة في تحمل وتراكم Se في صورة Methyl-SeCys، إضافةً الى زيادة مُعدلات تطاير Se في هيئة DMDSe. واظهرت نباتات الخردل الهندي التي خضعت الى تحوير لمرتين (Double transgenic) زيادة كبيرة في تعبير الجينين APS و SMT، إذ راكمت ما مقداره 9 أضعاف من Se مُقارنة مع غير المُحورة.

إستصلاح السلنيوم حيوياً، دراسة حقلية Phytoremediation of Se, a case study

بينت النتائج السابقة أهمية التحوير الوراثي في زيادة تحمل النباتات لعنصر Se وصلت الى 9 أضعاف من التراكم وثلاثة أضعاف من التطاير. وبالرغم من التفاؤل الكبير بالنتائج المُتحققة الا انها كانت مُختبرية، لذلك كان لابُد من إختبار تحمل وتراكم وتطاير النبات في ترب غنية بالسلنيوم أو مُلوثة بترسبات منه. نفذت تجربة داخل بيت زجاجي استعملت فيها اصص حاوية تربة طبيعية مُلوثة بالسلنيوم واخرى مُلوثة بترسبات منه. راكمت النباتات المزروعة في تربة مُلوثة بالسلنيوم والمُحورة بجين APS ثلاثة اضعاف من السلنيوم مُقارنة بنباتات الخردل الهندي غير المُحور في الوقت الذي إنخفضت نسبة التلوث بالعنصر بنسبة 40% في النباتات التي نقل لها الجين CgS وكانت النتائج مطابقة للبحوث المُختبرية. وعند زراعة النباتات في موقع مُلوث بترسبات السلنيوم، بينت النباتات المُحورة بجين APS تراكمها من Se ما مقداره 4 مرات أكثر من النوع البري (غير المُحور). وفي تجربة حقلية ثانية، استعملت فيها تربة تحتوي ترسبات من العنصر، أظهرت النباتات المُحورة بالجينين SL و SMT زيادة في تراكم العنصر بمقدار ضعفين وايضا كانت النتائج مطابقة لنتائج البحوث التي اجريت تحت ظروف المُختبر. يستنتج من ذلك اهمية توظيف التقانات الأحيائية في مجال الإستصلاح الحيوي النباتي.

المُلوثات العضوية Organic pollutants

يوفر الإستصلاح الحيوي للمُركبات العضوية فرصة لتحطيم المُلوث اذا ما تم إمتصاصه من قبل النبات واذا ما توفرت الجينات الضرورية لتحطيم المُلوث. تسبب اغلب المُلوثات العضوية تاثيرات سامة للنباتات مما يستوجب الأمر التخلص منها في المواقع المُلوثة. وتشكل صعوبة ذوبانها بعد إضافي للمشكلة. توجد اصناف مُتعددة من المُلوثات العضوية لتشمل؛ المُذيبات (Solvents) مثال Trichloroethylene؛ المتفجرات مثل Trinitrotoluene (TNT) و Cyclotrimethylenetrinitramine والمسمى Research Department Explosive (RDX)؛ وهيدروكربونات أروماتية مُتعددة الحلقات (Polycyclic aromatic hydrocarbons) أمثلة النفثالين والبايرين؛ المُنتجات البترولية أمثلة البنزين، التولوين، أثيل البنزين، والزايلين (BTEX)؛ Polychlorinated biphenyls (PCBs) والآفات المرضية ومُبيدات الأعشاب أمثلة الأترازين، Chlorpyrifos و 2,4-D.

تَستعمل النباتات عموماً مسالك بثلاث خطوات لإزالة سُمية المُلوثات العضوية. يتم في المرحلة الأولى إضافة مجموعة تفاعلية مثل OH، Amino أو Sulfhydryl الى المُركب الغريب (Xenobiotic). وفي الحالة الثانية يرتبط مُركب اخر مثل جزء سكري بواسطة مجموعة تفاعلية. وأخيرا يتم حصر المُلوث المُرتبط داخل الفجوة أو يتكامل مع مُكونات جدار الخلية مما يُحول المُركب الى أقل سُمية. تكرس الجهود حاليا في زيادة تفعيل الإستصلاح الحيوي للمُركبات العضوية بوساطة التقانات الحديثة من خلال زيادة التعبير الجيني في الخطوات الثلاث اعلاه. كما يتم تفعيل برامج الإستصلاح الحيوي بالإستفادة من الجينات التي تحملها الأحياء المجهرية والتي ترتبط بالتحطيم الحيوي لذلك المُلوث أو قد يكون من خلال تلقيح النبات بكائن مجهري يتعايش داخلياً مع أنسجة النبات وخاصة في أنسجة ألاوعية الناقلة (Endophyte). حُورت العديد من النباتات بهدف الإستصلاح الحيوي للمُلوثات العضوية وأثبتت نجاحاً في الإستصلاح الحيوي (جدول 10.2).

المذيبات Solvents

يتسبب غالباً التلوث البيئي بالمذيبات نتيجة رمي النفايات أو إستعمالها مباشرة في الأرض مما يؤدي الى تلوث الماء الأرضي. يُعد الترايكلورواثيلين (TCE) من أكثر المُلوثات العضوية إنتشاراً. تشتمل طرائق الهندسة الكلاسيكية في إستصلاح TCE بخلطه مع الهواء حي يتم التخلص من الماء المُلوث بوضعه في إسطوانة ونفخ الهواء (Air sparging) فيه مُسبباً في تطاير TCE الى الجو.

جدول 10.2. نباتات مُحورة وراثياً بالجينات المُبينة أثبتت نجاحها في إستصلاح الأراضي الملوثة بالمُلوثات العضوية حيوياً

المُركب	الجين	النبات
اترازين	*Bphc*	التبغ، الأربدوبسس، الجت
اترازين	*hCYP1A1/A2*	التبغ
اترازين	*hCYP1A1/2B6/2C19*	الرز
بنزين	*rCYP2E1*	الحور
بنزين	*hCYP2E1*	التبغ
PCBs	*bphC*	التبغ
PCBs	*bphA, bphE, bphF,bphG*	التبغ
PCBs	*bphC*	التبغ
RDX	*xplA*	الأربدوبسس
RDX	*xplA, xplB*	الأربدوبسس
TCE	*hCYP2E1*	التبغ
TCE	*rCYP2E1*	ست الحسن
TCE	*rCYP2E1*	الحور
TNT	*PETNr*	التبغ
TNT	*Nfsl*	التبغ
TNT	*pnrA*	الحور
TNT	*UGTs*	الأربدوبسس
Toluene	*hCYP2E1*	التبغ

ويُمكن إضافةً مُؤكسدات مثل برمنغنات البوتاسيوم أو بيروكسيد الهيدروجين اللذان يتفاعلان مع TCE.

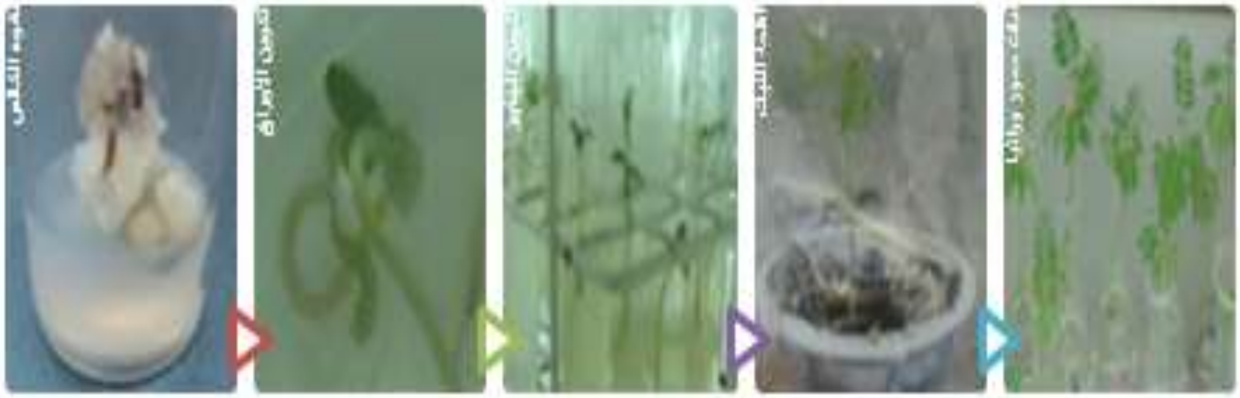
ومن الطرائق الشائعة في، إستصلاح المُلوث إستعمال البكتريا المُحطمة للمُركب كإستراتيجية ناجحة. ولتنفيذ عملية الإستصلاح، تُضاف كميات كبيرة من الأوساط أمثال المولاس، زيت نباتي أو لاكتيت ويُجهز بعدها بسُلالات من البكتريا المُحطمة لمُركب TCE لتحوله الى cisDCE و كلوريد الفينيل وأخيراً تحويله الى مُركب الإيثان غير الضار. تمثل الطرائق الهندسية السابقة وسائل فعالة في إستصلاح المواقع المُلوثة بمُركب TCE والتي تحتاج الى عدة سنوات. ولكن للطرائق الهندسية السابقة بعض المساوئ فهي مُكلفة وتمثل تحدياً وقد تؤدي الى تلف بيئي في المواقع التي تخضع للإستصلاح بتلك الوسائل. يُسبب تدفق الهواء (Air sparging) عند إمراره في المُلوث في تلوث الإثنين وقد يكون ذلك غير مُناسباً للمُجتمعات المجاورة.

إضافةً الى أن مُعاملة المُذيب بمادة برمنغنات البوتاسيوم يُخلف بقايا إرجوانية الشكل بالنظر لصعوبة نشر المادة المؤكسدة بالتساوي وبالتركيز المُناسب الذي يتفاعل مع TCE في الموقع المُلوث. ويؤخذ على طريقة تحطيم TCE لاهوائياً تسببها في إنتاج كلوريد الفينيل (VC) ذو السُمية العالية والمُسبب لأمراض سرطانية. وبالرغم من وجود سُلالات مُحددة من بكتريا *Dehalococcoides* بتحطيم VC الى إيثان لكنها حساسة لإنخفاض pH نتيجة إستعمال أوساط غير هوائية عند عملية الإستصلاح. كما ان إضافةً الدوارئ (Buffers) يؤدي الى تراكم الأوساخ في الأنابيب مما يزيد من كُلفة الإستصلاح.

وبالرغم من كفاءة الطرائق السابقة في التخلص من TCE إلا إنها وكما سبق الكلام عنها مُكلفة وتواجه صعوبة عملية عند التنفيذ مما يجعلها غير تطبيقية في المواقع قليلة وكثيرة التلوث. يكون إستصلاح المواقع ذات الماء الأرضي الضحل مؤثراً لكون ذلك يقع ضمن مدى المجموع الجذري للأشجار. وتُعد أشجار الحور مُناسبة جداً في إستصلاح TCE لإمتلاكها مجموع جذري مُتعمق. ويُمكن زراعة نباتات عشبية مُختلفة لهذا الغرض مثل النبات الرصاصي (*Leucaena leucocephala*)، الأربدوبسس والتبغ لكونها تمتلك قابلية وراثية للتخلص من TCE. ويبدو بان النباتات تسلك سلوكاً مُشابهاً للمسالك الحيوية التي تقوم بها الحيوانات اللبونة في تحطيمها لمُركب TCE. والجدير بالإنتباه، بأن إستصلاح TCE يكون مُحدداً بسبب التعبير المنخفض لإنزيم السايتوكروم P450 الذي يُفعِل المُركب قبل تحطيمه وان ايض TCE في النبات بطئ جداً وقد يؤدي الى تطاير المُلوث.

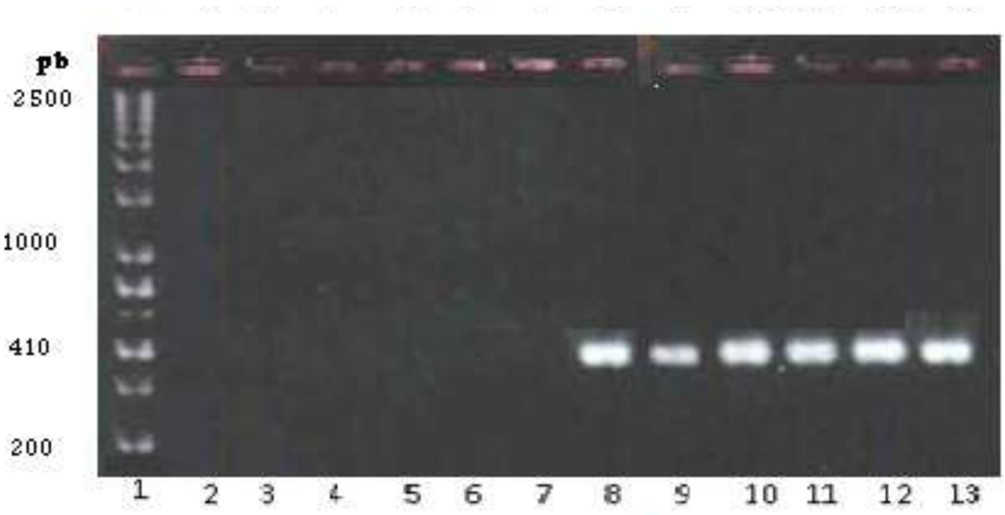
هناك إستراتيجيات يُمكن من خلالها تحسين إستصلاح TCE إضافةً الى ما سبق ذكره لتشمل توظيف الهندسة الوراثية أو إستعمال طُفيليات داخلية (Endophyte-assisted) تُساعد في الإستصلاح الحيوي. والتفاؤل الكبير الذي يُعول عليه من نتائج بحوث أثبتت نجاحاً بالغاً تلك التي تتعلق بالتعبير الجيني العالي

لمنظومة إنزيمات السايتوكروم P450 CYP2E1 في الحيوانات اللبونة عند نقلها الى نباتي التبغ والحور مما زاد من ايض TEC في النباتات المُحورة وراثياً والتخلص منه سواء كان في السوائل أو الهواء. كما أُجريت دراسات في العراق لنقل جينات السايتوكروم من حيوان الأرنب الى نبات السيسبان (شكل 10.6).



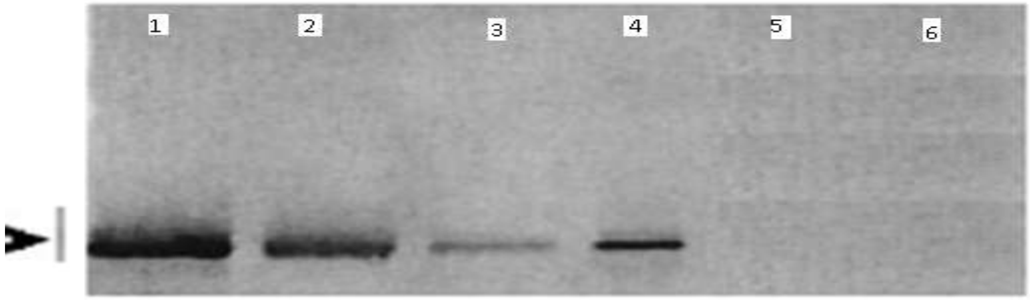
شكل 10.6. تحوير نبات السيسبان بزراعة أجزائه النباتية في وسط MS حاوٍ على المُضادات الحيوية وحضنها في درجة حرارة 25^{o}م (من اليسار الى اليمين) تحفيز نشوء الكالس في الأجزاء النباتية، إستطالة الأفرع النباتية وتكوين الأفرع، تكوين الجذور في الأفرع النباتية المُحورة، أقلمة نباتات السيسبان المُحورة وراثياً، تحضير النباتات للإختبارات الكيميائية في التربة والماء.

وتم الكشف عن وجود الجين في نباتات السيسبان المُحورة حيث أُختبرت 35 شتلة من السيسبان المُحوره وراثياً بوجود البكتريا الموجبة (pSLD50-6)، اذ اعطت نتيجة موجبة عند 410 قاعدة نتروجينية (الشكل 10.7). واختبرت 6 نباتات سيسبان و 6 نباتات الأربدوبسس مُحورة وتم التحقق من وجود بروتين جين السايتوكروم P450 2E1 باستعمال الجسم المُضاد المخفف P450 2E1 للأرنب (الجين)- الإنسان (الانتيجين). وتم الكشف عن بروتين السايتوكروم P450–2E1 في جميع نباتات الأربدوبسس وفي 5 نباتات سيسبان مُختارة (الشكل 10.8). وتتوافر عشرات الجينات التي يُمكن الإستفادة منها في تحطيم المُلوث مع إمكانية زيادة تعبيرها الجيني بإتجاه تحطيم المُلوث وهذا ما خلصت اليه البحوث في نبات الحور. شملت الدراسات تلك الجينات التي تُفعِل المُلوث أولا ومن ثم ربطه الى السكريات وأخيراً نقله. وتجارب التطبيق الحقلي جارية في نبات الحور المُحور وراثياً بعد نقل جينات منظومة السايتوكروم اليه من حيوان الأرنب سواء المزروعة في المحاليل المائية (Hydroponics) مُضافاً لها تراكيز عالية من المُلوث أو في ترب مُلوثة، ومرة أُخرى حققت التجارب الحقلية نجاحات باهرة.



شكل 10.7. الترحيل الكهربائي PCR amplicons لدنا نباتات السيسبان المُحورة وراثياً. المسار رقم 1 DNA القياسي طوله 200-2500 قاعدة نتروجينية. طول حزمة السايتوكروم 410 قاعدة نتروجينية، الآبار من 2-4 : نباتات سيسبان بري، المسارين 5و6: نباتات سيسبان مُحورة وراثياً مع بكتريا السيطرة (pK200)، المسار 7: بكتريا السيطرة السالبة (pK200) المسارات 8-12: نباتات سيسبان مُحورة وراثياً، المسار 13: بكتريا السيطرة الموجبة الحاوٍي على للبلازميد (pSLD50-6).

كان لتوظيف الطفيليات الداخلية كإستراتيجية أُخرى في الإستصلاح الحيوي للمُلوث TCE من خلال ايضها للمُركب حيث يُعتقد بتعاون النبات مع الطفيلي للعمل سويةً بإتجاه سحب النبات للمُلوث. تتمركز مُستعمرات البكتريا الداخلية (كمُتطفل) في أنسجة النبات الوعائية وفي الفراغات بين الخلايا وتحطم المُلوث.



الشكل 10.8. الكشف عن بروتين السايتوكروم P450–2E1 في جميع نباتات الأربدوبسس (المسارين 1و2) ونباتات للسيسبان (المسارين 3و4) المُحورة وراثياً والمسارين 5 و6 هي نباتات سيطرة الأربدوبسس والسيسبان على التوالي بإستعمال تقانة اللطخات الغربية (Western Blotting).

دُرست بإسهاب البكتريا *Burkholderia* الهوائية من السُلالة G4 المُحللة للمُلوث TCE حيث بلازميدها الكبير وإنتقاله الذاتي السهل الى أنسجة النبات مع سهولة إتلافه. تساهم البكتريا في ايض TCE بإستعمال إنزيم Toluene *ortho*-monooxygenase المُشفَر من قبل أوبيرون (Operon) لجينات *tom*، وبذلك تنتج عنها مُركبات غير ضارة. يُمكن نقل البلازميد أو نسخة طافرة منه وبوجود تعبير لجينات tom الى مُتطفلات داخلية تتعايش أصلاً مع الأنسجة الوعائية أو غيرها لنبات الحور. وبعد تلقيح اشجار الحور بسلالة البكتريا المُحورة بجين pTOMBu61، لوحظ حصول تحسن كبير في قابلية نبات الحور في إستصلاح TCE. بينت النتائج عدم حصول زيادة في إمتصاص المُلوث ولكن حصل إنخفاضا معنوياً في كمية المُلوث المُتطايرة ففي الوقت الذي كان النبات غير المُلقح بالبكتريا يُطاير ما مقداره 0.07 نانوغرام/سم$^{-2}$ في الساعة الواحدة أصبح يُطاير 0.01 نانوغرام/سم$^{-2}$ في الساعة بعد تلقيحه بتلك السُلالة من البكتريا. ومن المعلوم ان أغلب المواقع تكون مُلوثة بكلا المُلوثين العضوي وغير العضوي لذلك أُستعملت إستراتيجية التلقيح بالبكتريا لزيادة تحمل النبات لكلا المُلوثين. لُقح نبات الترمس الأصفر (Yellow lupine) بسُلالة بكتريا *Burkholderia* الحاوية لجينات *tom* والجينات المقاومة لعنصر النيكل (Ni *ncc-nre*). وبالرغم من عدم تسجيل زيادة في المجموع الخضري بعد التلقيح بالبكتريا، لكن زاد المجموع الجذري بمقدار 30% في النباتات المُلقحة المزروعة في ترب تحتوي تراكيز من النيكل وTCE عما هو عليه في النباتات غير المُلقحة بالبكتريا. والمُلفت للنظر، حصول إنخفاض في تطاير TCE في النباتات المُلقحة بالرغم من عدم معنوية الإنخفاض. عموماً، أدى الإستصلاح الحيوي بالتلقيح بالبكتريا المُرافقة لنمو النبات وخاصة بعد تحويرها وراثياً الى تحسين ملحوظ في زيادة قابلية النباتات للإستصلاح الحيوي.

إستصلاح المواقع المُلوثة بالمتفجرات Bioremediation of sites polluted with explosives

تبرز حاجة مُلحة في إستصلاح المواقع المُلوثة ببقايا المُتفجرات إبتداءاً من مُعسكرات التدريب العسكرية الى المناطق التي تحصل فيها حروب. تشتمل بقايا المُتفجرات مُركبات أروماتية من النايتريت (Nitroaromatic)، TNT، و Hexahydro 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX). يسبب التعرض الى TNT في أمراض فقر الدم وتلف الكبد بينما يؤثر RDX سلباً في الجهاز العصبي المركزي مُسبباً في حصول تشنجات في الجسم. تتعرض مساحات واسعة من العالم لتلك المُلوثات ففي الولايات المتحدة وحدها هناك ما يقارب 40 مليون أيكر من الأراضي المُلوثة. تحتوي مُتفجرات Nitroaromatic على حلقة أروماتية ترتبط بها مجاميع نايترو ($-NO_2$).

تكمن صعوبة إستصلاح المواقع المُلوثة بالمُركب TNT الى سُميته والى تراكيزه العالية في مواقع التلوث التي قد تصل الى 87000 ملغم/كغم بينما تكمن خطورة RDX (بالرغم من كونه أقل سُمية من TNT) في قابليته للذوبان في الماء مُسبباً تلوثاً للماء الأرضي. تتحمل بعض الأنواع النباتية تراكيز واطئة نسبياً من TNT محولةً إياهُ الى Aminodinitrotoluene والذي يرتبط بالسكريات أو الكلوتاثيون ليخزن في الغالب داخل الفجوات أو جدر الخلايا ولربما يُطرح خارج الخلية. كشفت إختبارات التعبير الجيني وتقانات Microarray بتداخل مجموعة من الإنزيمات ينتجها النبات إستجابة للمُلوثات من Nitroaromatics. وجِدَ في نبات الأربدوبسس على سبيل المثال وجود عائلة صغيرة نوع ما من إنزيمات Oxophytodienoate reductases (OPRs) يزداد تعبيرها الجيني إستجابةً للتعرض الى TNT. ووجِد في أنواع أُخرى حصول زيادة في التعبير الجيني لإنزيمات Glutathione-S-transferases (GSTs) كما هو الحال في الكلاميدوموناس نوع (*Chlamydomonas reinhardtii*) والحور نوع (*Populus trichocarpa*). وعند مُقارنة إستجابة التعبير الجيني للنبات من حيث الإستجابة للمُلوث TNT والمُلوث RDX، تبين وجود تشابه قليل في التعبير الجيني بينهما، مما يؤكد وجود تداخل قليل في المسالك الحيوية الخاصة بإزالة سُمية كلا المُلوثين. وبالمثل فأنواع مُختلفة من البكتريا تلعب دوراً مهماً في ايض كلا المُلوثين بإستعمال جينات مُختلفة. وبالرغم من توافر بعض أنواع الأحياء المجهرية التي لها القابلية في تحطيم مُلوثات النايترو الأروماتية، لكنها ذات كتلة حيوية صغيرة لا تُمكنها من تغطية المواقع المُلوثة بالكامل ولذلك لايُمكن ان يُعول عليها في عملية الإستصلاح.

نجحت العديد من التجارب التي أُجريت في نباتات حُورت وراثياً بعد نقل جينات بكتيرية لها ذات تعبير جيني عالي في تحطيم TNT و RDX. فالجين Pentaerythritol tetranitrate reductase (PETN) المعزول من بكتريا *Enterobacter cloacae* السُلالة PB2، يُشفر لإنزيم له القابلية في إزالة النايتريت من TNT مما يسمح للبكتريا بالإستفادة من المُلوث الأخير كمصدر للنتروجين. أظهر نبات التبغ المُحور وراثياً بالجين السابق زيادة في تحمل النبات للمُلوث. وتبين بان نبات التبغ المُحور وراثياً بالجين البكتيري Nitroreductase (*nfsl*) والمنقول من ذات البكتريا، أسرع كثيراً من مُعدلات ايض TNT مُقارنة مع النبات غير المُحور. لم يقتصر النبات المُحور في زيادة فرصة الإستصلاح فحسب بل ساعد في حفظ بيئة المجموع الجذري من حيث تنوعها الأحيائي نتيجةً لخفض سُمية التربة حول المجموع الجذري. وكمثال على إستعمال الأشجار لأغراض إستصلاح التربة من مُلوثات المُتفجرات، فقد حُوِرَ نبات الحور بجين إنزيم Nitroreductase (*pnr*A) الذي تم نقله من بكتريا تتبع سلالة *Pseudomonas* حيث تجلت قابلية الحور

في زيادة إمتصاصه للمُلوث TNT من التربة والماء. وعند إختبار أشجار الحور المُحورة وراثياً بمزارع سائلة (Hydroponics) إحتوت تراكيز عالية من TNT، سُجلت زيادة في سحب المُلوث مقدارها 5 أضعاف للأشجار المزروعة في مزارع سائلة ويقابلها زيادة بمُقدار الضعف للأشجار المزروعة في التربة المُلوثة مُقارنة مع أشجار الحور غير المُحورة. كشفت تقانات Microarray زيادة التعبير الجيني للجينات التي شملها إرتباط المُلوث بمُركبات أُخرى مما حدى بالباحثين الى الإستنتاج بإمكانية رفع التعبير الجيني الى أقصاه بما يُحقق التخلص من المُلوث. وتطبيقاً لما سبق وبإستعمال التقانة ألتي تمت الإشارة اليها، تم تشخيص جينين (Uridine glycosyltransferases) في نبات الأربدوبسس سببا في زيادة إنتاج المُركبات المُرتبطة والتخلص من سُمية TNT.

يُمكن تحطيم المُلوث RDX وكما سبق الكلام عنه وإستعماله كمصدر نتروجيني بوساطة مجموعة من السُلالات البكتيرية المعزولة من ترب مُلوثة. إكتشف الباحثون جيناً (*xpl*A) مسؤولاً عن تحطيم RDX ويُشفر لمُركب جديد ناتج من إندماج Flavodoxin مع إنزيم السايتوكروم P450. تَحَمل وازالَ نبات الأربدوبسس مُستويات عالية من RDX بعد تحويره وراثياً بجين *xpl*A (CYP177) المعزول من بكتريا *Rhodococcus rhodochrous* 11Y في الوقت الذي لم يكن للنبات غير المُحور دوراً في التخلص من المُلوث. أظهرت النباتات المُحورة نمواً جيداً في تربة تحتوي على 2000 ملغم مُلوث/كغم تربة اي بتركيز يُعادل 10 مرات أكثر مما تتحمله نباتات الأربدوبسس غير المُحورة. وبينت دراسات حديثة وُظِفَ فيها الباحثون إثنين من الجينات من أجل تعزيز التعبير المشترك لهما، فزادت مُعدلات إزالة المُلوث RDX بمقدار 30 ضعفاً عند إدخال *xpl*A و *xpl*B في نبات الأربدوبسس.

وخلاصةً لما سبق فلابُد من وضع إستراتيجيات لإستصلاح الأراضي المُلوثة بالمُتفجرات نوعي TNT و RDX كونهما الأكثر إستعمالاً في الذخيرة الحية. وبالرغم من عدم وجود ما يُشير الى دور الأحياء المجهرية الداخلية (Endophyte-assisted) في إستصلاح المواقع الحاوية لبقايا المتفجرات، ولكن بالإمكان ان تكون تقانة مُرشحة للقيام بهذا الدور. ويُعول كثيراً على البكتريا التي تعيش داخل أنسجة نبات الحور طبيعياً (Natural endophyte of poplar) والمسماة *Methylobacterium sp.* السُلالة BJ001 ذات القابلية في تحطيم TNT و RDX و HMX والتي تحول المواد الكيميائية الى شكل معدني بمقدار 60% وأثناء شهرين. واخيراً، يُمكن ان تكون أشجار الحور والصفصاف مُرشحتين لأداء الإستصلاح الحيوي لكونهما ذواتي كتلة حيوية كبيرة وفائدة إقتصادية ويُزرعان في مناطق واسعة من العالم.

الإستصلاح الحيوي للملوثات النفطية Bioremediation of petroleum pollutants

تُستعمل النباتات في الإستصلاح الحيوي للمُشتقات النفطية الحاوية سلاسل هيدروكربونية، البنزين الأروماتي، التوليوين، أثيل البنزين والزايلين عندما تكون تراكيزها مُنخفضة. تتواجد العديد من السُلالات البكتيرية المُحطمة للمُشتقات البترولية (Petroleum-degrading bacteria) إما داخل أنسجة الأشجار أو في مُحيطها الجذري. وجِدت تلك الأنواع البكتيرية مُرافقة لنمو أشجار الحور النامية في مواقع مُلوثة بالزايلين (BTEX) وحَسنَت من قابلية الأشجار للإستصلاح. ولزيادة كفاءة إستصلاح مادة BTEX والتوليوين، نُقلت الجينات المسؤولة عن تحطيم المُركبين الى سُلالة بكتيرية تعيش داخل الأنسجة الوعائية لنبات الترمس (Lupine) مما زاد من قابلية النبات على الإستصلاح. وتحملت النباتات المُحورة وراثياً تراكيز من التوليوين فاقت نظيراتها غير المُحورة بمقدار عشرة أضعاف. نُقلت تلك السُلالة الى نبات الحور ونقلت تلك السُلالة بلازميدها الى البكتريا المُرافقة لنبات الحور ونتج عن ذلك زيادة كبيرة في قابلية الأخير في إستصلاح المواقع المُلوثة للتوليوين وقللت من مُعدلات نتح المُركب. وأظهرت ألاشجار المُحورة بجين السايتوكروم P450 2E1 المنقول من اللبائن زيادة معنوية في تحمل أشجار الحور لكل من مُلوثي التوليوين والبنزين، إذ تمكنت وأثناء يومين من إزالة ما مقداره 10 أضعاف من التوليوين في المزارع السائلة مُقارنة مع غير المُحورة في الوقت الذي تمت إزالة كافة البنزين من المزارع السائلة أثناء 3 ايام من قبل نبات التبغ المُحور بجين سايتوكروم اللبائن أعلاه.

تحققت نجاحات محدودة في إستصلاح المواقع المُلوثة بالمُركبات الهيدروكربونية الأروماتية مُتعددة الحلقات (Polycyclic aromatic hydrocarbons) وإختصاراً PAHs نتيجة السُمية العالية لهذه المُركبات وخاصة ان أغلبها مُركبات ذات تراكيب حلقية ومُسرطنات قوية نتجت من إحتراق غير كامل للوقود الحجري. ويُعد النفثالين من مُركبات PAH ذات الوزن الجزيئي المُنخفض وأحد أكثر المُلوثات شيوعاً في قائمة الأولويات في الولايات المتحدة، سام للنباتات ويُثبط نموها، يُقلل عملية النتح، ويُسبب إصفرار وذبول النباتات وبالتالي موتها. وفي تجربة تم فيها تعريض نباتات من الصفصاف (Willow) المنماة في مزارع سائلة الى مُلوثات من PAHs ولم يُسجل اي تأثير سلبي لمُركبي Phenanthrene و Benzo pyrene في نمو أشجار الصفصاف، في الوقت الذي أدى التركيز 325 ملغم/لتر من مُركب النفثالين الى موت النباتات. وتبين من بحوث لاحقة بان قابليات تحمل مُركبات PAH تختلف بإختلاف أنواع أشجار الصفصاف. وفي دراسة مُشابهة، وِجِد بان أشجار الصفصاف قد إمتصت مُستويات مُنخفضة من النفثالين

ولكن توقف إمتصاصها للبايرين والفينانثرين بعد 3 أيام مع ظهور تاثيرات سامة في الأشجار مما يُعزز من فرضية إختلاف الإستجابة بإختلاف نوع الأشجار.

يبدو بان إستعمال المُتطفلات الداخلية في تحسين قابلية النباتات في إستصلاح المواقع المُلوثة تقانة واعدة. وإستناداً على ذلك تم عزل العديد من تلك المُتطفلات من أشجار الحور والصفصاف ذات القابلية على الإستفادة من PAHs كمصدر أساسي للكربون. عند نقل بلازميد البكتريا المُحطمة لمُركبات PAH الى سلالة من بكتريا *Pseudomonas putida* التي تنمو داخل الأنسجة الوعائية لأشجار الصفصاف، قللت من سُمية النفثالين للأشجار بينما لم يُسجل مثل هذا التأثير في البكتريا المُستوطنة طبيعياً داخل أنسجة النبات. يؤكد ذلك أهمية الإستفادة من المُتطفلات الداخلية وتحويرها وراثياً ونقلها الى النباتات ذات الكتلة الحيوية الكبيرة كالحور والصفصاف. تُستعمل مُركبات Poly chlorinated biphenyls (PCBs) على نطاق واسع في الكثير من التطبيقات الصناعية لإستقراريتها الحرارية. تستطيع بعض الأحياء المجهرية من تحطيم PCBs هوائياً ولاهوائياً تحت ظروف نمو مُختلفة. عادة ما يتم وتحت ظروف لاهوائية من إختزال ونزع الكلور من مُركبات PCBs تقوم بها مجاميع من بكتريا الجنس *Dehalococcoides* والذي غالباً ما يُستعمل في الإستصلاح الحيوي لمُركبات TCE. ويتم تحطيم مُركبات PCBs ذات المُستويات المُنخفضة من الكلور تحت الظروف الهوائية من خلال ايض تآزري من قبل مجموعة إنزيمات Dioxygenases مُسببةً في كسر حلقات المُركبات وقد تكون النتيجة تحولها الى معادن. شُخصت بكتريا *Burkholderia xenovorans* السُلالة LB400 بأنها الأكثر تاثيراً في تحطيم مُركبات PCB وتم تشخيص زوج من المُشغلات (Operons) في الجين *bph* تُساهم في تحطيم PCB تحت الظروف الهوائية.

تُساعد النباتات الأحياء المجهرية في عملية الإستصلاح الحيوي بطرائق مُتعددة أهمها:

1- تفرز جذور النباتات مواد (Exudates) تُشجع نمو الكائنات الدقيقة كالفينولات الضرورية للمساعدة في ايض PCB. 2- زيادة مُستويات الأوكسجين في التربة. 3- تحرير مواد فعالة سطحياً (Surfactants) تساعد في تحرير مُركبات PCBs المُرتبطة بجزيئات التربة.

أُختبرت سبعة أنواع نباتية وَوِجد بان 38% من المُركبات المُستخلصة أعلاه بقيت في التربة مُقارنة مع 82% في الترب غير المزروعة مما يُثبت دور النباتات في سحب تلك المُلوثات. وفي دراسة أُخرى استعملت فيها تسعة أنواع نباتية تم زراعتها في تربة مُلوثة بمُركبات PCBs وحتى ان قسماً من المُلوثات حاوية الكلور ومع ذلك تمكنت الأنواع النباتية من إمتصاصها ونقلها الى الأنسجة الخضرية. وبينت دراسات اخرى على

أشجار الحور الهجين بان النقل قد حصل في مُركبات PCBs واطئة الكلورة (Lower cholorinated) وادمصت المُركبات رباعية الكربون في أسطح الجذور فقط. وأوضحت التجارب الحقلية والمختبرية مقدرة أنواع كثيرة من النباتات لايض مركبات PCBs مباشرة حتى عند زراعة تلك النباتات في مزارع نقية غير مُلوثة (Axenic plant cultures). وعموما يبدو بان ايض النبات يكون مُحددا في المُركبات رباعية الكربون والمُركبات المُشابهة لها. إضافةً الى كون ايض PCB في النبات يشتمل على السايتوكروم P450s بعد إنتاج مُركبات وسطية سامة غير مُحطمة تماماً في الوقت الذي تقوم البكتريا بفتح حلقات المُركبات وتحطم تلك المُركبات تماما. من هنا تاتي أهمية هندسة النبات وراثيا بنقل جينات بكتيرية تعبر وراثياً بمسالك حيوية مُحطمة للمُلوثات كإستراتيجية ناجحة في الإستصلاح الحيوي للمُلوثات صعبة التحطيم (Recalcitrant pollutants). نُقلت بعض الجينات من مجموعة *bph* الى النباتات وانتجت إنزيمات داخلها مُحطمة للمُلوثات (جدول 10.3).

جدول 10.3. نباتات حُوِرت وراثياً واستثمرت في الإستصلاح الحيوي للملوثات العضوية

النبات	الجين	المركب
تبغ	*bphC*	أترازين
تبغ	*hCYPIA/A2*	أترازين
رز	*hCYPIA/2B6/2C19*	أترازين
حور	*rCYP2EI*	بنزين
تبغ	*hCYP2EI*	PCBs
تبغ	*bphC*	PCBs
تبغ	*phA, bpE, bphF, bphG*	PCBs
تبغ	*bphC*	PCBs
الأربدوبسس	*xpIA*	RDX
الأربدوبسس	*xpIA, xpIB*	RDX
تبغ	*hCYP2EI*	TCE
بلدونيا	*rCYP2EI*	TCE
حور	*rCYP2EI*	TCE
تبغ	*PETNr*	TNT
تبغ	*nfsI*	TNT
حور	*pnrA*	TNT
الأربدوبسس	*UGTs*	TNT
تبغ	*hCYP2EI*	Toluene

أُجريت دراسة مُفصلة عن تاثير تعبير جينات *bphC* في نباتات تبغ مُحورة وراثياً في إستصلاح PCB، ولوحظ تحمل النباتات المُحورة وراثياً فقط للمُلوث بينما لم يُسجل ذلك في غير المُحورة.

تسمح تقانة هندسة الكلوروبلاست في نقل أوبيرونات كاملة (Entire operons) من البكتريا الى نباتات بهدف زيادة التعبير الجيني لإنزيمات الإستصلاح الحيوي واعتُمدت كإستراتيجية مهمة لهذا الغرض. ومن جانب آخر يُمكن تبني إستراتيجية هندسة البكتريا المُرافقة لنمو النبات في نقل بلازميد حامل لأوبيرون *bph* الى بكتريا *Sinorhizobium meliloti* ومن ثم تلقيح نبات الجت بتلك السُلالة البكتيرية المُحورة. وُظفت الإستراتيجية الأخيرة في تحطيم مُركب 2,3,4-trichlorobiphenyl وحققت نجاحاً فائقاً اذ تضاعف تحطيم المُركب مُقارنة بالنباتات التي لُقحت بالنوع البري (Wild type) من السُلالة البكتيرية. وفي دراسة مُشابهة، تم ادخال أوبرون *bph* الى سلالة من بكتريا *Pseudomonas fluorescens* التي لُقحت في منطقة المُحيط الجذري (Rhizosphere) لأشجار الصفصاف وبعد 6 اشهر، حصلت زيادة معنوية في تحطيم مُركبات PCBs في منطقة المجموع الجذري الحاوِي سلالة البكتريا المُحورة.

مُبيدات الآفات Pesticides

تُسبب مُبيدات الآفات في حصول تشوهات مُزمنة في الإنسان وتقليل نوعية البيئة. تستعمل تقليدياً العديد من الطرائق الفيزيائية للتخلص من تلك المُبيدات كالحرق والطمر في الأرض ولكنها مُكلفة وغير كفوءة. تبرز هنا أهمية الإستصلاح الحيوي من خلال إستثمار الأحياء المجهرية وخاصة المُحورة وراثياً لتحطيم مُبيدات الآفات كحل ناجح ومؤثر وخاصةً لكونه مجالاً واسعاً يشمل حتى مُبيدات الحشائش. لذلك سوف يُختصر الكلام هنا حول ثلاثة أنواع من المُبيدات فقط لتشمل مُبيد الآفات Chlorpyrifos ومُبيدي الأدغال الأترازين و 2,4-D. يُمكن تحطيم مُبيد الآفات Chlorpyrifos كونه مُبيد فسفوري عضوي بإستعمال أنواع مُحددة من سلالات البكتريا المعزولة من بيئة مُلوثة. فعلى سبيل المثال تم عزل السُلالة البكتيرية *Stenotrophonomonas sp.* من تربة مُلوثة أحتوت المُبيد أعلاه محطماً ووجدت بانها تُسرع من إستصلاح المواقع المُلوثة بمُعدلات أسرع من المواقع التي لاتحتويها.

عُزلت سلالة بكتريا *Klebsiella* من وحدة مُعالجة مياه مجاري ووجدت بانها كفوءة في تحطيم المُبيد أعلاه. ويُمكن أيضاً تحطيم مُبيد Chlorpyrifos بنشر زراعة أنواع من الفطريات المُمرضة وغير المُمرضة. الأترازين مُبيد غير حامضي ضد الأعشاب وأصبح شائعاً كمُلوث لسطح المياه، وبالإمكان

تحطيمه بايولوجياً أيضاً. كُلونت الجينات الضرورية لتحطيمه حيوياً في بعض الحالات لتشمل الجينات المسؤولة عن إنتاج إنزيمات التحلل المائي Hydrolases، تحليل اليوريا Ureases، إزالة الهالوجينات (Dehalogenases) والسايتوكروم P450s والمُشفرة للجينات *atz*ABCDEF، *psb*A1 و *trz*ND.

أما المُبيد 2,4-D فيُمكن تحطيمه بسُلالة من بكتريا *Pseudomonas*، وكما هو الحال بالنسبة للأترازين فقد شُخصت وكُلونت العديد من الجينات المسؤولة عن تحطيم هذا المُبيد. تؤثر العديد من العوامل البيئية في نجاح إستصلاح المُبيدات حيوياً منها مُحتوى التربة من المادة العضوية، pH، درجة الحرارة، التهوية ومُحتوى التربة من الرطوبة. وبالرغم من تاثر تحطم الأترازين بمُحتوى التربة من المادة العضوية، الا ان ذلك لم يؤثر في تحطيم Chlorpyrifos. تتحطم مُبيدات الآفات عضوية الفسفور مثل Chlorpyrifos ببطئ عندما يكون pH التربة حامضياً. تظهر الى السطح أحياناً مشكلة إنتاج بعض الأحياء المجهرية لمُركبات وسطية قد تكون أكثر سُمية أو ثباتاً من المُبيد نفسه. ويُمكن اللجوء في حالات مُحددة الى عزل وتنقية الإنزيم المسؤول عن التحلل الحيوي للمُبيد، الا ان ذلك قد يُواجه بعدم توفر الظروف المثالية لعمل الإنزيم ولإحتمالية حاجة الإنزيم لعامل مساعد مع الاخذ بنظر الإعتبار وجود مصدر رخيص ومُتوفر لعزل الإنزيم منه. عُولِجت في إحدى الحالات، كمية من مُبيد Methyl-parathion المُلوثة لحجم مُقداره 84000 لتر من ماء فضلات، بإضافةً إنزيم نقي معزول من مصدر بكتيري وكانت النتيجة مذهلة حيث إنخفض مُستوى المُلوث عشرة أضعاف أثناء عشرين دقيقة فقط.

يُمكن إزالة سُمية Chlorpyrifos بوساطة الإنزيم المعزول من اللبائن Paraoxonase (PON1) والذي بالإمكان إنتاجه مُختبريا بمزارع وينقى ويعالج به الاشخاص المعرضون للمُبيد. ويُمكن تحضيره بشكل رغوة لمعالجة الحالات الطارئة عند ظهور بقعة من سطح ما مُلوثة بالمُبيد. وتبذل جهود حثيثة لإنتاجه بكميات كبيرة وبأسعار مُناسبة بطرائق هندسة بلاستيدات نبات التبغ وراثيا. ولزيادة فعالية الإستصلاح الحيوي لموقع ما من المُبيدات، يفترض الأخذ بنظر الإعتبار حزمة من الاجراءات منها؛ تقليل تسرب المُبيد، تهوية التربة بشكل جيد، تجهيز التربة بالمُغذيات التي تحتاجها الكائنات الدقيقة المُحطمة للمُبيدات إضافةً الى زراعة النباتات المُتحملة. يستطيع نبات الزوان (*Lolium multiflorum*) المُتحمل طبيعيا ان ينبت بذوره وينمو بشكل جيد بتربة تحتوي مُستويات عالية من الأترازين وتثبط تلك القابلية ولحد كبير بإستعمال مُثبط P450 (P450 1-aminobenzotriazole) لتؤكد الدور الايجابي للسايتوكروم P450 في آلية تحمل النبات. وبينت تجارب أُخرى بان عُقل الحور التي تم تجذيرها في مزارع سائلة لها المقدرة في سحب

الأترازين وتحويله الى مُركبات أُخرى بعمليتي التحلل المائي (Hydrolysis) وإزالة جذر الالكيل (Dealkylation).

تُساهم النباتات المائية هي الآخرى في التخلص من المُلوثات التي تتسرب الى المناطق المغمورة بالمياه أو الرطبة ويُمكن ان تُزيل ما نسبته 25% من مُبيد Chlorpyrifos السائل. تختلف قابلية النباتات في إمتصاصها ونقلها لمُبيدات الآفات من الجذور الى المجموع الخضري بحسب أنواعها وينطبق ذلك حتى في المزارع المائية دون تداخل جزيئات التربة. فعلى سبيل المثال يَمتص نبات الاسل (*Juncus effuses*) المُحب للأراضي الرطبة الأترازين أفضل مما يَمتص نبات العرمط (*Ludwigia peploides*) وتبين بأن الأول يحصر المُركب في مجموعه الجذري بدلاً من نقله الى المجموع الخضري. وفي دراسة أُخرى، وِجِدَ بان نبات الاسل أعلاه *J. effuses* يمتص كلاً من الأترازين و Chlorpyrifos مع أفضلية إمتصاص وتحطيم الأخير وبسرعة لاتزيد عن 24 ساعة. وسَجل نباتا الحور والصفصاف إزالة تامة وايض مُبيد الافات من مجموعة الفسفور العضوي Chlorpyrifos. وتبرز أهمية نباتي الحور والصفصاف من كونهما يُزرعان على ضفاف السواقي الفرعية والأنهار (Riparian) وبإستطاعتهما إزالة المُلوثات الزراعية التي تمر عبر تلك القنوات المائية.

وُظفت النباتات المُحورة وراثياً في إستصلاح المواقع المتاثرة بمُبيدات الآفات حيوياً، ويُستفاد من مجموعة من الجينات التي يُمكن نقلها من أحياء مجهرية الى نباتات تُستثمر في الإستصلاح الحيوي. فالجين *atz*A المُشفر لإنزيم Chlorohydrolase، أظهر تعبيره الوراثي في ست خطوات ضمن المسلك الحيوي للنبات. وحصل تعبيراً قوياً للجين أعلاه في نباتات التبغ والأربدوبسس والجت نتج منه زيادة كبيرة في تحمُل تلك النباتات للأترازين حيث أزال الجين الكلور من الأترازين ليُضيف محله الهيدروكسيل وتحويله الى مُركب Hydroxyatrazine في كافة أعضاء النبات. ونفذت تجارب ناجحة في نقل التعبير الجيني لجينات السايتوكروم *P450* من الحيوانات اللبونة المتمثلة في *CYP1A1* و *CYP1A2* الى نبات التبغ مما زاد من ايض الأترازين. وحصلت زيادة كبيرة في ايض عدة مُبيدات ادغال منها الأترازين و Metolachlor تجسدت في نبات الرز المُحور وراثيا بعد ان عبرت فيه جينات *CYP1A1*، *CYP2B6* و *CYPC19*. واظهرت نباتات الرز المُحورة تحملا عاليا لثمانية مُبيدات أعشاب مُختلفة في الوقت الذي أدى الرش بالأترازين الى قتل نباتات الرز غير المُحورة بسبب تثبيطه لعملية التصنيع الغذائي.

وبالنظر لنمو الرز في بيئة مغمورة بالماء، سجلت النباتات المُحورة إزالة مُبيدات الأعشاب بمقدار الضعف من سطح الماء بعد اسبوع من رشها على الأدغال المُرافقة لها. إضافةً الى انها ازالت المُبيدات من التربة وبشكل معنوي مُقارنة بنباتات الرز غير المُحورة. تبين ومن خلال البحوث المنشورة، نجاح التجارب التي نُفذت على الكائنات الأحيائية المُساعدة والمُرافقة لنمو الباتات في الإستصلاح الحيوي. وكان ابرز ما توصل اليه الباحثون في هذا المجال، الإستصلاح الحيوي لمُبيد الأدغال الجهازي 2,4-D بعد تلقيح نباتات البزاليا بالبكتريا *Pseudomonas putida* التي نشرت مُستعمراتها داخل أنسجة النبات وسببت إضافةً الى تحطيمها للمُبيد، زيادة في نمو النبات والذي تناسب طرياً مع كثافة نمو المستعمرات داخل أنسجتها ولم تراكم المُبيد في انسجتها كدليل لتحطيم المُبيد وليس تراكمه. وبالمقابل، أظهرت نباتات البزاليا غير المُلقحة بالسُلالة أعلاه، تسمماً في الجذور سببها المُبيد ونمت جذور النباتات المُلقحة بحالة صحية جيدة.

يتبين مما سبق، الاهمية البالغة لتقانات النبات الأحيائية في مجال الإستصلاح الحيوي للمُلوثات المُختلفة التي تُسبب أضراراً بليغة في بيئة الإنسان. وتبرز أيضاً أهمية التحوير الوراثي في إنتاج نباتات ذات قابلية إستصلاح عالية للمُلوثات بما يفتح نافذة واسعة للإستفادة منها في صناعة الإستصلاح الذي تتبناه حالياً شركات عالمية.

وتبرز الحاجة المُلحة أيضاً الى إجراء إختبارات حقلية على النباتات التي خضعت للتحوير الوراثي وإصدار تشريعات تُسهل من بيع تلك التقانات وتوظيفها في إستصلاح المواقع المُلوثة ما لم يثبت تسببها في أضرار بيئية. تم درج قاعدة معلومات (جدول 10.3) في النباتات التي يُمكن توظيفها في إستصلاح مواقع تعرضت الى مُلوثات مُختلفة واثبتت نجاحها من قبل شركات مُتخصصة والتي يبدو فيها المقدرة العالية لأشجار الحور والصفصاف في التخلص من مدى واسع من المُلوثات. وكذلك الفعالية العالية لنبات الخردل الهندي للتخلص من المُلوثات وخاصة المعادن الثقيلة والمُركبات الهالوجينية المُتطايرة.

قاعدة معلومات الإستصلاح الحيوي بالنباتات Phytoremediation database

أدناه قاعدة بيانات توفر للباحث والمستثمر الكثير من الجهد والعناء (جدول 10.3).

جدول 10.3. قاعدة معلومات لنباتات أُستثمرت في إستصلاح مواقع مُلوثة بمساحات مُختلفة وفي مناطق مُختلفة من العالم

النبات	المُلوث الرئيسي	وسط الإستصلاح	المساحة (دونم)
حور (Poplar)، مغطيات تربة	مُبيدات افات، VOCs	ماء ارضي	13
حور هجين (Hybrid poplar)	هالوجينات مُتطايرة	تربة، ماء أرضي	2
نباتات اراضي رطبة (Wetland plants)	فينولات	ماء سطحي	4
حور هجين	مُبيدات حشرية وادغال، VOCs	تربة، ماء أرضي	0.5
حور هجين، حشائش	أمونيا	تربة	1.5
حور هجين	معادن ثقيلة	تربة، ماء ارضي	10
صفصاف هجين (Hybrid willows)	ماء مالح من مُخلفات صناعية،	كثبان رملية	10
حور هجين وغير هجين	مُذيبات كلوريدية	تربة، ماء ارضي	8
حور هجين، حشائش	معادن ثقيلة	تربة، ماء ارضي	28
حشيش فسكيو(Fescue)، زوان معمر (Ryegrass)، برسيم	مُنتجات نفطية	تربة	10
حور هجين، حور الرجراج (Cottonwood)	TPH	غير مُحدد	180
اشجار مُختلفة	فضلات خطرة	غير مُحدد	غير مُحدد
زهرة الشمس	يورانيوم، سيزيوم، سترونيوم	ماء فضلات	غير مُحدد
حور هجين	معادن ثقيلة	تربة تحت السطحية	18
خليط حشائش وبقوليات	VOC	تربة، سواحل رملية	اللواح 120قدم^2
نبات الخردل	معادن ثقيلة	تربة	اللواح 1000 قدم^2

(*Brassica juncea*)			
عرعر Juniper	مُخلفات مشعة	غير مُحدد	مساحات مُختلفة
حور هجين، حشائش	مُخلفات تصفية	تربة سطحية	5
حور هجين، حشائش	غير مُحدد	تربة سطحية	8
اشجار ونباتات مناطق رطبة	تربة، رواسب	مُبيدات افات وادغال، صبغات	غير مُحددة
ارضيات من القصب (Reed beds)	مُخلفات سائلة	سوائل الفحم الحجري	30
خليط من الحشائش	معادن ثقيلة	تربة	1.5
اشجار	املاح، معادن، مُخلفات مشعة	ماء ارضي	45
اشجار وشجيرات	مُركبات غير هالوجينية	تربة	1
خليط حشائش وبقوليات	مشتقات نفطية	غير مُحدد	الواح بمساحة 375 قدم^2
حور هجين	مُبيدات افات وادغال	تربة، ماء ارضي	7
اشجار الحور	هالوجينات مُتطايرة	ماء ارضي	2
رجل الوزة Redroot pigweed	مُخلفات مشعة	تربة لعمق 6 انج	0.5
زهرة الشمس، خردل	مُخلفات مشعة	تربة، ماء، ماء ارضي	موقع مفاعل جرنوبل
حور هجين	مُنتجات نفطية مُتطايرة	ماء ارضي	غير مُحدد
حشيش فسكيو، لوبياء، برديات Cattails	مُنتجات نفطية مُتطايرة	منطقة انتشار الجذور، ماء ارضي، مياه فضلات	50، 150
حور هجين	مُنتجات نفطية مُتطايرة	ماء ارضي	300×15 قدم^2
نبات ريش الببغاء	متفجرات	تربة ضمن المجموع الجذري	غير مُحدد
شيلم، حشائش برمودا	غير مُحدد	ترب مزيجية رملية	2
ثيل	مياه فضلات، نتروجين، فسفور	غير مُحدد	2000
حشائش مراعي	مياه ثقيلة	معادن ثقيلة، PCBs	7500
حور	مياه فضلات	ارض مروية بمياه فضلات	غير مُحددة
حور هجين	اعادة استعمال مياه الفضلات	تربة	12
مغطيات تربة واشجار	مشتقات نفط هيدروكربونية	ماء سطحي	45

نباتات محلية	PAHs	تربة سطحية	2
حشائش، قش، اشجار محلية	سوائل طمر صحي	سوائل	20
حور هجين، مغطيات تربة	مشتقات نفطية مُتطايرة	تربة	2
حشيش فسكيو، شيلم، برسيم	TPH, PAHs	تربة	اللواح 5×4 م^2
حور هجين	معادن ثقيلة	تربة	1.5
حشيش فسكيو طويل	مشتقات نفطية مُتطايرة	تربة سطحية	1
أنواع من الحشائش والبرسيم	وقود هيدروكربوني	تربة	1
نباتات من الصليبيات	معادن ثقيلة	تربة، ماء ارضي	18
خردل	رصاص	تربة	1200 قدم^2
ارضيات من القصب	BOD، معلقات صلبة	سوائل فضلات معامل	240 ميل^2
حور هجين، صفصاف	مشتقات نفطية هالوجينية	تربة، ماء ارضي	1
حور هجين، حشائش	امونيا	تربة	0.75
شيلم، حشيش فسكيو احمر	مشتقات نفطية شبه مُتطايرة	تربة	اللواح بمساحات مُناسبة
حور هجين	نتروجين	تربة، ماء ارضي	14
حور هجين، حشائش	رماد متطاير	تربة	8
حور هجين، حشيش فسكيو، جت	مشتقات نفطية مُتطايرة	ماء ارضي	8
حور هجين	مُبيدات، نايتريت، امونيا	تربة، ماء ارضي	1.5
حور هجين	مُبيدات، نايتريت، امونيا	تربة طينية ومزيجية غرينية	1.5
اشجار وحشائش متنوعة	تراكيز عالية من الأملاح	تربة سطحية	1.5
حور هجين	مُبيدات، نايتريت، امونيا	ترب مزيجية غرينية	1.75
حور هجين	امونيا، نايتريت، نتروجين	ماء ارضي	1.75
حور هجين، صفصاف استرالي	امونيا، نايتريت، نتروجين	تربة، ماء ارضي	1.75
حور هجين	معادن ثقيلة	ماء ارضي	5
هجن من الحور والصفصاف	TPH، BTEX	رماد وبرادة معادن	1.5
حور هجين (DN34)	مشتقات نفطية مُتطايرة	وسط صناعي	8
هجن من الحور والصفصاف	TPH، BTEX	تربة، ماء ارضي	1
هجن من الحور	قمامة مخلوطة	طمر صحي	75

والصفصاف			
حور هجين	مذيبات مكلورة	ماء ارضي	18
حشائش وبقوليات	مشتقات نفطية شبه مُتطايرة	رواسب مُلوثة	4800 قدم²
أوراق الصفصاف	مُبيدات افات وحشائش، معادن ثقيلة	تربة، ماء ارضي	4
حور هجين وحشئش	لم تحدد	مواد غسيل، تربة سطحية	10
هجن من الحور والصفصاف	VOCs، مواد عضوية	تربة، مُخلفات تكرير	50
حور، حشائش	مواد حافظة للاخشاب	تربة	70
حور، صفصاف. حشيش كاما	معادن ثقيلة، هالوجينات مُتطايرة	تربة، ماء ارضي	الواح تجريبية
حور هجين	نواتج تكرير	تربة سطحية	12
ذرة حلوة، اللوبياء، برسيم حلو، شيلم	مُنتجات نفطية مُتطايرة	تربة، ماء ارضي	1800 قدم²
نبات الكوا (Koa)	مُبيدات افات	ماء ارضي	1.5
غطاء خضري	فضلات	ماء ارضي	100
ارضيات من القصب	COD	فضلات معامل سائلة	20
صفصاف، Ninebark، سعد قلفي Cypress	تربة سطحية، سطح الماء، ماء ارضي	متفجرات، اسمدة	13
حور وحور هجين	فضلات معامل سائلة	متفجرات، اسمدة	800
حور هجين	مُبيدات افات وادغال	ماء ارضي	6
حور هجين مع حشائش	مُركبات عضوية مُتطايرة، ثاليوم	ماء ارضي	20
Kootweed (عصا الراعي)، حشيش السرطان Crabgrass	معادن ثقيلة، مُبيدات افات وادغال	تربة لعمق 48 سم	غير مُحددة
اراضي رطبة ومتروكة	متفجرات	مياه فضلات وراكدة، تربة	غير مُحددة
حور هجين وحشائش	مُركبات هالوجينية مُتطايرة، معادن ثقيلة، غيرها	تربة تحت السطحية	36
شيلم، حشيش كنتاكي الازرق Kentucky Blue grass	مياه فضلات، نتروجين، فسفور، فضلات بيولوجية صلبة	تربة تحت السطحية	260
حور، حور هجين	مُخلفات مشعة	ماء ارضي سطحي	120

		وسواقي	
الصفصاف الاسود	TCE، DCE	تربة، ماء ارضي	الواح بمساحات مُختلفة
حور هجين	مذيبات مكلورة، PCBs	ماء ارضي	7
حور هجين وحشائش	مُركبات هالوجينية نصف مُتطايرة	ماء ضحل	20
Alpine pennycress	معادن ثقيلة	تربة	غير مُحددة
حور هجين وحشائش	فضلات طمر صحي	تربة، ماء	15
حشائش، حنطة، شعير، ذرة، جت	ماء من مُخلفات مصانع الاغذية	تربة	9000
حور هجين	نتروجين	تربة، ماء ارضي	0.5
خردل هندي، فسكيو، Trefoil، *Brassica sp.*		تربة طينية، تربة مزيجية	2
خردل هندي	معادن ثقيلة	تربة سطحية	مساحات مُختلفة
حور هجين (5 أصناف)	هالوجينات مُتطايرة	ماء ارضي، ترب طينية	1
صفصاف هجين	TPH في التربة	رماد، برادة مع التربة	4
حور هجين	نايتريت	تربة	5
حور هجين	مُخلفات ذات فعالية اشعاعية واطئة	تربة	غير مُحددة
خردل هندي	معادن ثقيلة، تربة تحتوي على مُركبات هالوجينية مُتطايرة	تربة	غير مُحددة
حشائش، قصب الذريرة Sweetflag، نبات ريش الببغاء Parrot feather	BODs، متفجرات (TNT,RDX,HMX)	ماء ارضي	تجارب توضيحية
حور هجين	مواد مُتطايرة مكلورة	ماء ارضي	1.5
حور هجين مواد مُتطايرة مكلورة ماء ارضي 1.5	نويدات مشعة(Radionuclides)	ماء ارضي	غير مُحددة
حور هجين DN34 *Populus nigra* *Populus deltoids* ×	مشتقات نفطية وهالوجينية مُتطايرة	ماء ارضي	3
حور هجين وحشائش	نايتريت وامونيا	تربة وماء ارضي	4

حور هجين	مُبيدات آفات وحشائش	تربة	8
حشائش مناطق دافئة دائمية، ذرة حلوة	مشتقات نفطية مُتطايرة	تربة، ماء ارضي	2000 قدم^2
حور هجين، صفصاف	TCE, PCE	تربة، ماء ارضي	0.75
الجت، الذرة ، حور هجين	مُبيدات آفات وحشائش	تربة، ماء ارضي	5
حور هجين، شيلم	مُنتجات نفطية مُتطايرة	تربة، ماء ارضي ضحل	3
حور هجين	مُنتجات نفطية مُتطايرة	ماء ارضي ضحل	اللواح مُختلفة المساحات
شيلم، بقوليات، حشيش فسكيو، اسلات Sedges	مُنتجات نفطية نصف مُتطايرة	تربة	100م^2
حور هجين DN34	VOCs ومُركبات شبه مُتطايرة	ماء ارضي	75 قدم^2
حور هجين	VOCs ومُركبات شبه مُتطايرة	ماء فضلات معامل	4
حور هجين، صفصاف	VOCs ومُركبات شبه مُتطايرة	تربة ضفاف انهار	150 م^2
فطريات، نبات الداؤودي	VOCs ومُركبات شبه مُتطايرة	تربة لعمق 30 سم	9 م^2
Campion، Alpine pennycress	معادن ثقيلة	تربة لعمق 12 سم	25 م^2
أثل (Tamarix)، يوكالبتوس	معادن ثقيلة	ماء ارضي	1.75م^2
حور هجين	مُنتجات نفطية نصف مُتطايرة	تربة	غير مُحددة
حور هجين	مُنتجات نفطية هيدروكاربونية	تربة	1
صفصاف هجين، كانولا، Brassica	Cesium 137, Cr, Hg, Ag, Se	تربة	مواقع بيوت زجاجية
حور هجين، شيلم	هالوجينات مُتطايرة	ماء ارضي ضحل وعميق	8
جت، اشجار متوغلات الجذور Phreatophyte	مُنتجات نفطية هيدروكاربونية	تربة، ماء ارضي	2
اشجار من		تربة في مُحيط	غير مُحددة

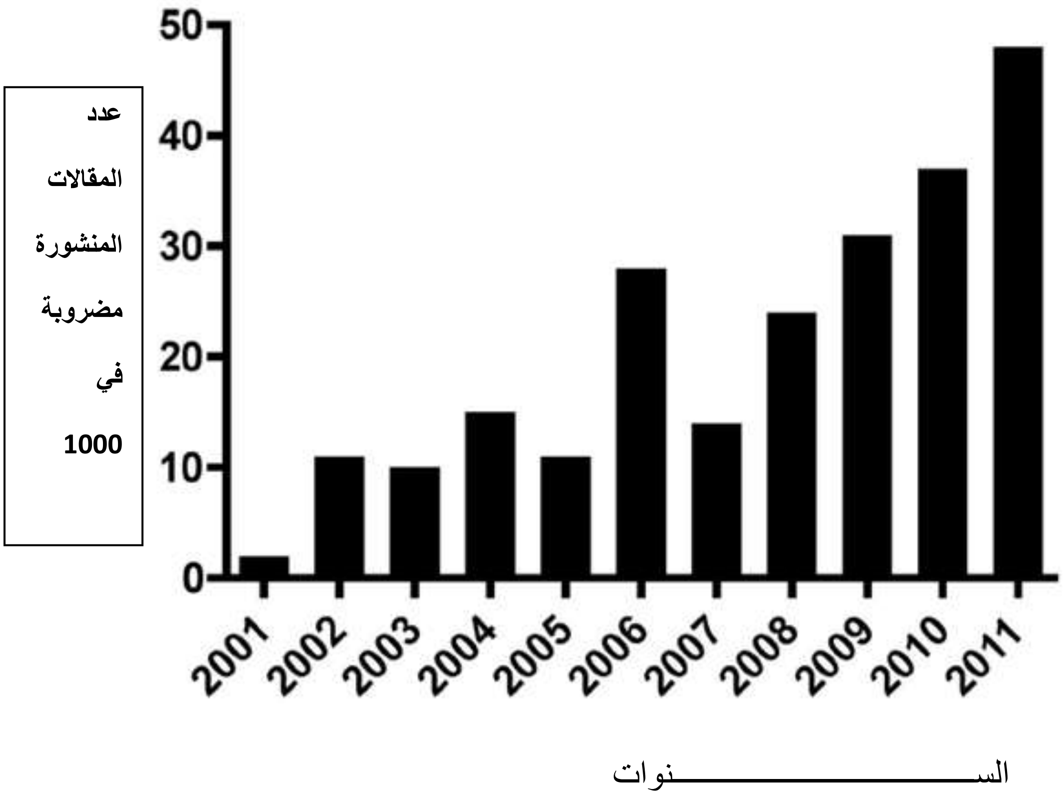
الصفصاف، البيلسان ،Elde ،Elderberry, حور		الجذور	
يوكالبتوس	غير مُحددة	ماء ارضي	غير مُحددة
حشائش النجيل (Turfgrass)	BOD, TSS	ماء فضلات	180
حور هجين وحشائش	مُنتجات نفطية شبه مُتطايرة	تربة	1.5
حشائش، جت، صفصاف	أوكسيدات الحديد	مياه مجاري	6
حشائش	مُركبات هايدوكاربونية	تربة	7000 قدم²
حور هجين، صفصاف هجين	BTX،TPH في الماء الأرضي	تربة موقع طمر صحي	0.75
حور هجين، أشجار الحور الرومي Alder	مُنتجات نفطية هايدروكاربونية	تربة	1.5
تربة مغطاة بالقصب	صبغات، COD وبقايا OPs	سوائل فضلات معامل	450 م²
حور واشجار اخرى	مُخلفات تعرية زراعية، فضلات مشعة	مياه انهار مُلوثة	مساحات مُختلفة تصل الى 165 دونم
حور، صفصاف، حور رومي Alder	فورمالديهايد	ماء ارضي	13
حشائش وبرسيم	مُنتجات نفطية هايدروكاربونية	تربة	30
اشجار صفصاف بعدد 185	مُركبات هالوجينية مُتطايرة	ماء ارضي بعمق 2-3 م	غير مُحددة
ذرة صفراء، خردل ابيض	معادن ثقيلة	تربة	1
محاصيل حبوب، بطاطا	معادن ثقيلة	تربة طينية وغرينية	غير مُحددة
حور هجين	متفجرات	ماء	غير مُحددة
حور هجين	معادن ثقيلة	تربة	300 م²
حور هجين	مُنتجات نفطية مُتطايرة	تربة، ماء ارضي	1.7
ارضيات قصب	مواد لزجة، مُركبات هايدروكاربونية، مواد عضوية	ماء ارضي	1

الفصل الحادي عشر: التقانات الأحيائية وتحمُل الإجهادات

Biotechnology and Stress Tolerance

مقدمة Introduction

تُشكل الإجهادات البيئية بنوعيها الأحيائية (Biotic) والأحيائية (Abiotic) الخطر الرئيس الذي يتعرض له النشاط الزراعي بالنظر لحجم الخسائر التي تُسببها تلك الإجهادات في خفض الإنتاجية الزراعية. فمن مجموع الأراضي المُتأثرة بالإجهادات الاأحيائية في العالم، تُشكل شحة المياه وحدها ما نسبته 64% ويأتي عامل درجة إرتفاع أو إنخفاض درجة الحرارة ما نسبته 27%. تتوالى عوامل الإجهاد الاخرى من الغمر بالماء، الضوء، ومُلوثات الترب والهواء. وبالنظر لأهمية الموضوع، كُرست البحوث العلمية وإزدادت طردياً في السنوات الأخيرة (شكل 11.1) ليتضاعف أعداد البحوث المنشورة الى عشرات الأضعاف مما يُدلل في أهمية الموضوع وتهديده للأمن الغذائي.



شكل 11.1. عدد النشريات في السنوات 2001 ولغاية 2011 التي نُشرت في المجلات العالمية بخصوص إنتخاب نباتات مُتحملة للإجهادات الاأحيائية.

لا تزال تلعب تقانات تربية وتحسين النبات التقليدية وإتباع إستراتيجيات الإدارة الصحيحة دوراً مهما في تحسين النبات. وُظِفت سابقاً ولا تزال طرائق تهجين النبات التقليدية مُتبعة في نقل جينات مسؤولة عن تحمُل إجهاداً واحداً أو أكثر من الإجهادات البيئية من نبات لآخر وحسب قابلية التهجين بين نباتين إعتمادا على القرابة النباتية بالرغم من حاجتها الى وقت وجهد كبيرين. إنعكس التطور السريع في التقانات الأحيائية إيجاباً في تطوير الزراعة المُستدامة عموماً وفي إنتاج نباتات مُتحملة للإجهادات في وجه الخصوص بعد توفر وسائل نقل الجين وتخطي الحدود النباتية (Distant gene pools) التي وفرتها التقانات الحديثة بالمقارنة مع الطرائق التقليدية.

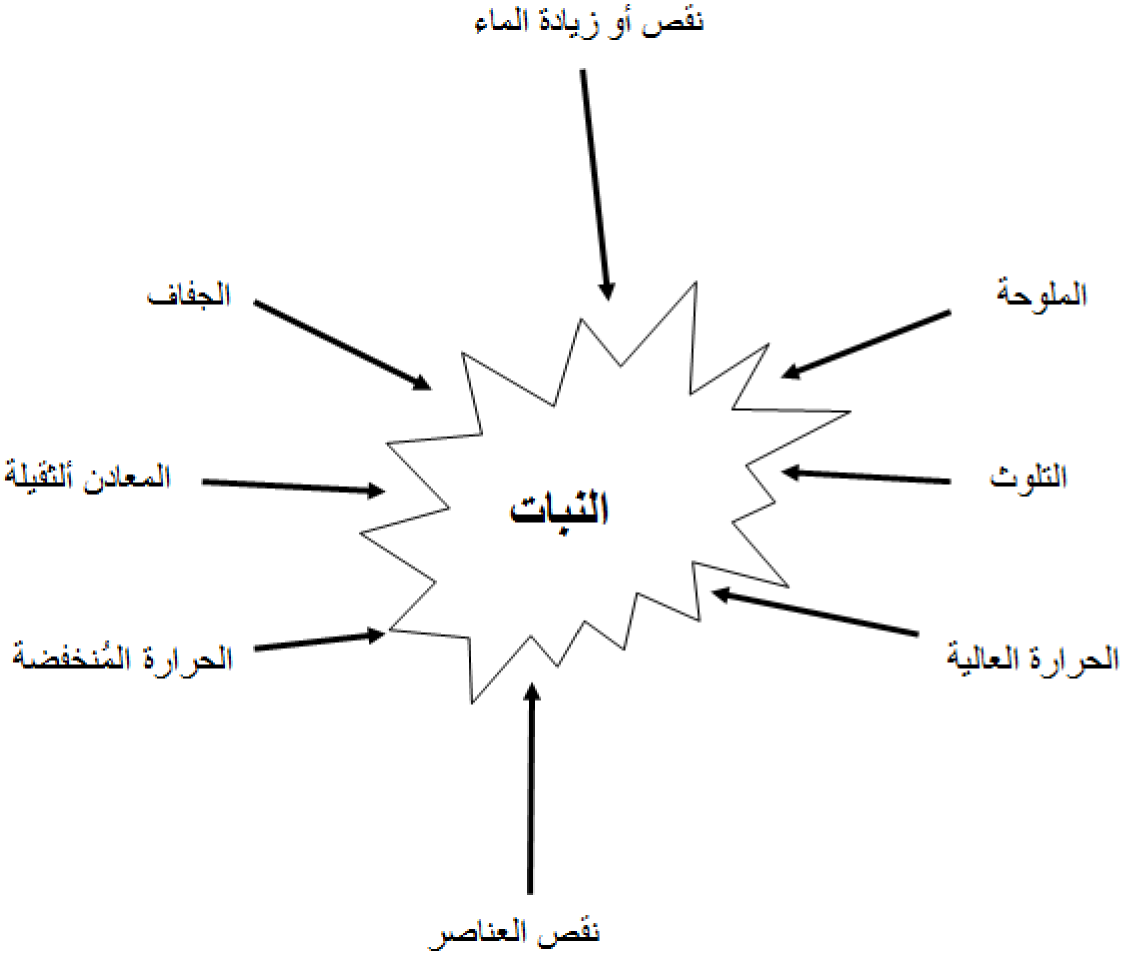
من المعلوم ان النباتات لا تستطيع الهروب من الإجهادات الاأحيائية وهي مُعرضة لها بإستمرار دون اية حماية بعكس الحيوانات التي تتحرك كي تتجنبها. وفي الوقت نفسه، طورت النباتات آليات مختلفة لتتماشى مع الظروف الصعبة التي تتعرض لها كتجنب الإجهادات بتحورات مورفولوجية وللاسف ليست كل النباتات تفعل ذلك. والخيار المُتوفر لدى النباتات ان تُغير في آلياتها كتراكمها للآيونات والمُركبات وزيادة التعبير الجيني وقد تكون نشوئية كتقصير دورة حياتها. ومن المؤكد ان نواتج فعل الجينات تلعب دور المفتاح في آليات تحمُل الإجهادات.

ولعل إخماد الجين المنقول (Transgene silencing) أحد مُحددات نقل الجينات مُسبباً في تقليل التعبير الجيني. ساهمت زراعة خلايا وأنسجة وأعضاء النبات بالنظر لكونها سهلة وإقتصادية وقابلة للتطبيق ولحد كبير في تسهيل وتسريع برامج الحصول على محاصيل مُتحملة او مُقاومة للإجهادات. ومن الضروري فهم آليات التحمُل او المقاومة وما يرافقها من تغييرات بايوكيميائية وفسلجية وبما يعزز من زيادة التحمُل.

تشمل الإجهادات الاأحيائية مجموعة من عوامل الإجهاد (شكل 11.2) كالجفاف، الملوحة، إنخفاض وإرتفاع درجة الحرارة، زيادة ونقصان الضوء، نُقص أو زيادة العناصر التغذوية، ألمعادن الثقيلة ومُلوثات مُختلفة. وتعمل عوامل الإجهاد أما مُنفردة أو تتداخل مع بعضها لعاملي إجهاد أو أكثر. لذلك سيتناول هذا الفصل مجموعة العوامل المؤثرة في تحمُل او مُقاومة النبات لتلك الإجهادات وتوضيح الآليات المُرافقة للتحمُل وطرائق التقانات الأحيائية التي يُمكن إعتمادها في إنتخاب نباتات مُقاومة أو مُتحملة للإجهادات الأحيائية والاأحيائية.

ألإجهادات الاأحيائية Abiotic stresses

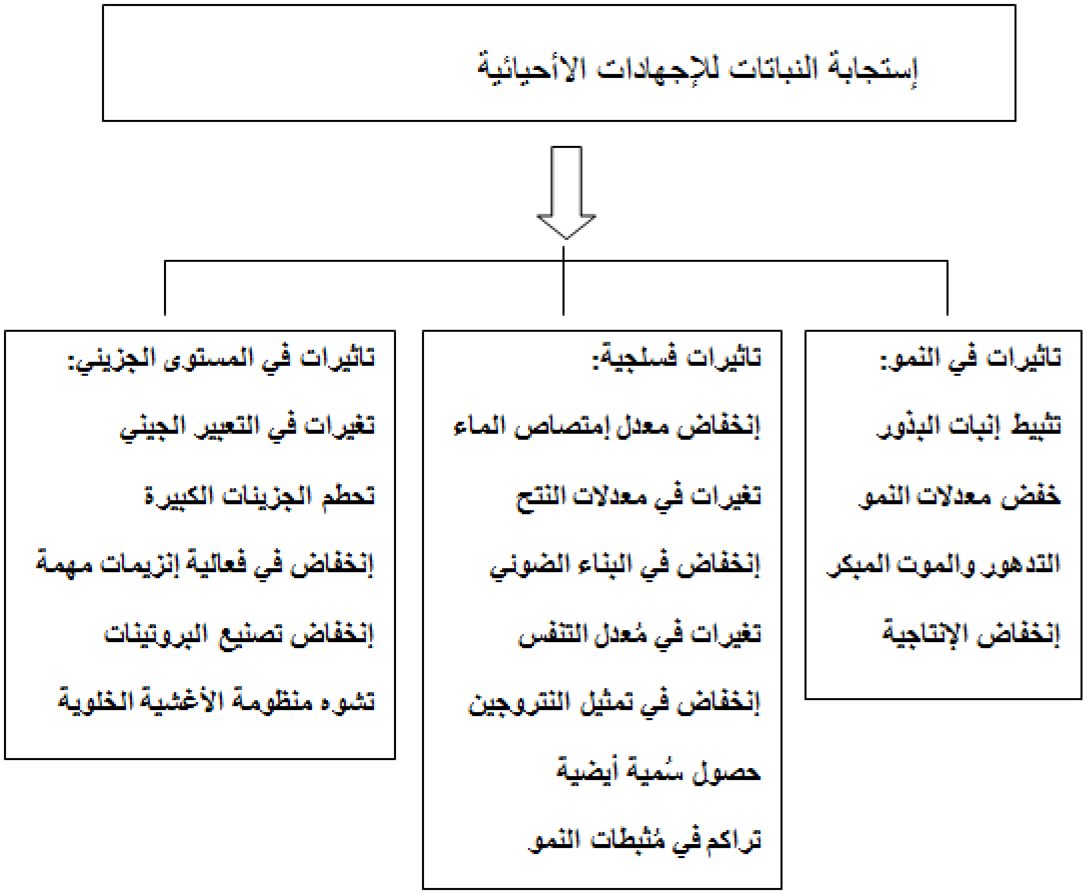
تؤثر الإجهادات الاأحيائية سلباً في نمو وتطور وإنتاجية النبات (شكل 11.2). طور النبات آليات للتحمُل (لحدود معينة) منها تجنب الإجهاد (Avoidance) التي من خلالها يُحور النبات شكله المظهري والتشريحي بما يصب في تقليل أثر الإجهاد مع الأخذ في الحسبان صعوبة نقل مثل هذه الصفات وإدخالها في برامج تحسين النبات مما يستوجب الأمر التركيز على آليات التحمُل.



شكل 11.2. بعض الإجهادات الاأحيائية المؤثرة في النبات.

وبالنظر للتباين في تغايرات تحمُل الإجهادات بين الأنواع وفي ضمنها وبين المجاميع المُختلفة منها، لذا تُعد الإستفادة من هذا التغاير مهماً في تطوير نباتات مُتحملة للإجهادات. تنتج أغلب عوامل الإجهاد مُشتركات بين النباتات بالرغم من أن لكل عامل تأثيراته المُحددة (شكل 11.3). وغالباً ما يكون الهدف المُشترك لعوامل

الإجهاد الاأحيائية هي أجهزة ألاغشية ألخلوية والتي تعمل تحت الظروف الطبيعية في إدامة الفعاليات الحيوية (شكلا 11.4، 11.5) لذلك تتعرض الأخيرة جميعاً لعوامل الإجهاد الأحيائية. ترتبط أنواع الاوكسجين الفعالة (Active oxygen species) وإختصاراً (ROS) دائماً مع ألظروف الهوائية وان عوامل الإجهاد الأحيائية تُسرع من إنتاجها من ROS في النباتات مما يُسبب في تلف أنظمة الأغشية الخلوية والعمليات الخلوية الأُخرى.

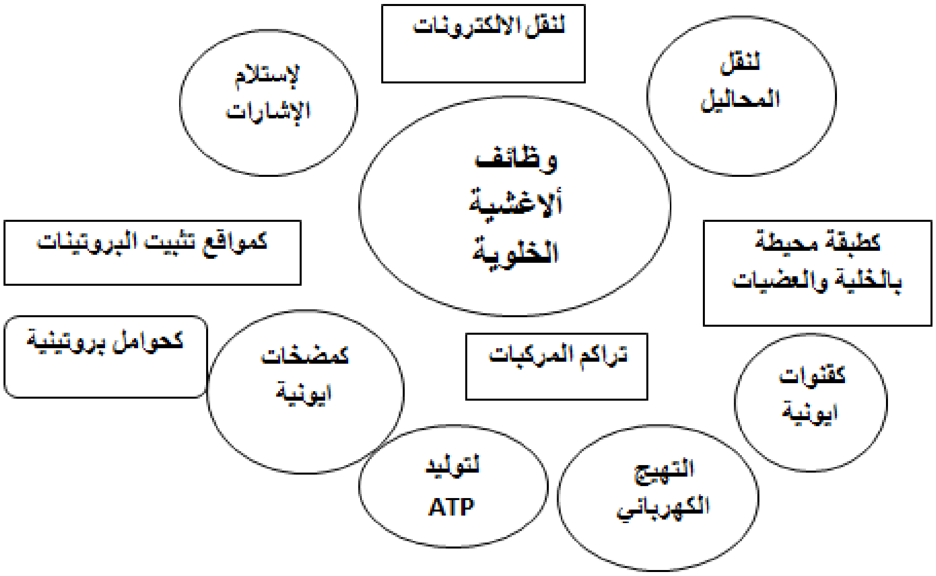


شكل 11.3. أهم إستجابات النبات للإجهادات الاأحيائية

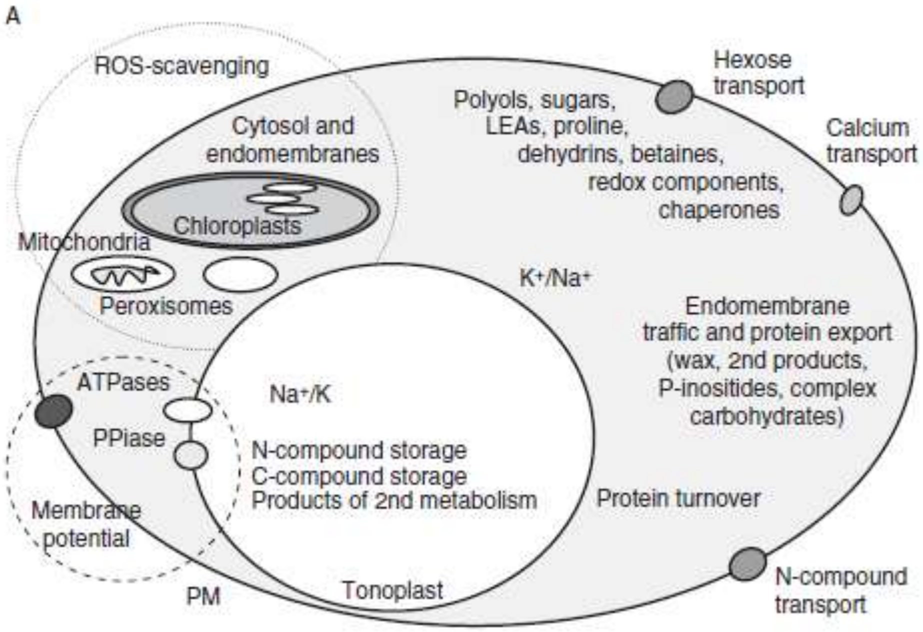
تلعب مضادات الأكسدة سواء كانت إنزيمية أو غير إنزيمية دوراً مهماً في مُوازنة ومنع التلف الناتج من الأكسدة بالرغم من إعتماد إنتاج وكفاءة أنظمة مُضادات الأكسدة على نوع النبات وتكوينه الوراثي. ولغرض تقليل حدة تاثير الإجهادات، فقد طَورت النباتات آليات تحمُل مُختلفة يمكن تلخيصها بالنقاط التالية (جدول 11.1).

جدول 11.1. بعض الإجهادات البيئية وتأثيراتها اللاحقة وإستجابات النبات لها

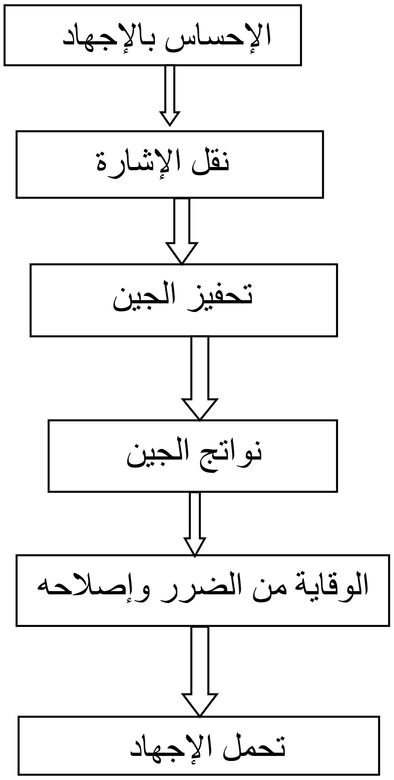
نوع الإجهاد	ألتأثير	إستجابات النبات
إجهاد حراري	يؤدي إرتفاع درجة الحرارة (T) الى تبخر عالي ونقص في الماء. ينتج عن ذلك زيادة في تحول الإنزيمات وبالتالي موت النبات.	عمل أنظمة إصلاح البروتين بكفاءة ومحاولة الإستقرارية مما يزيد من فرصة بقاء النبات حياً. قد تؤدي T الى تأقلم النبات.
إجهاد البرودة والإنجماد	تتباطئ التفاعلات البيوكيميائية، يزداد التركيب الضوئي، بطئ في تثبيت CO_2 مما يؤدي الى تلف جذور الاوكسجين. يسبب الإنجماد في تكوين بلورات ثلجية تتلف أغشية الخلايا.	توقف نمو النبات. وفي الأنواع التي تتكيف قد تتجاوزها بتغير الايض الثانوي. يُمكن تجنب تكوين البلورات الثلجية بتراكم المحاليل المُنظمة للإزموزية وتصنيع الخلايا لبروتينات مُحبة للماء.
الإجهاد الجفافي	عدم قابلية النبات على نقل الماء الى الأوراق مما يسبب في خفض سرعة التركيب الضوئي.	إلتفاف الأوراق وتكيفات مورفولوجية أُخرى. يؤدي غلق الثغور الى تقليل النتح نتيجة تراكم ABA. يُقلل تراكم مركبات الايض الثانوي من الجُهد المائي الداخلي.
جهد ألغمر بالماء والفيضانات	يُقلل من مُستويات الاوكسجين (Anoxia) وظروف لاهوائية تتداخل مع تنفس المايتوكوندريا.	تطورات في الفراغات داخل الجذور مما يُسهل من تبادل O_2 والاثيلين بين النموات الخضرية والجذور (Aerenchyma).
الإجهادات الناتجة من تراكم المعادن	في حالة زيادة تراكم المعادن، تفاعلات إزالة السُمية قد تكون غير كافية وقد يكون التراكم أكثر من قابلية الخلية للخزن.	قد تتم السيطرة على زيادة تراكم الآيونات المعدنية بنقلها الى الفجوات وقد تُولد جذور اوكسجين حرة.
الإجهادات الضوئية العالية	يؤدي زيادة الضوء الى زيادة إنتاج مُركبات وسطية عالية الميل للتفاعل وتكوين نواتج عرضية تسبب التلف نتيجة الأكسدة الضوئية وتوقف التركيب الضوئي.	زيادة التعريض للضوء تسبب في تثبيط تصنيع المُركبات وإنتاج ROS. يؤكسد الاخير الدهون، البروتينات، والإنزيمات الضرورية لأداء عضيات الخلية لوظائفها.



شكل 11.4. وظائف مؤكدة لأنظمة ألأغشية الخلوية النباتية.



شكل 11.5. المُحددات البايوكيميائية لتحمُل الإجهاد موضحة بمصطلحاتها باللغة الانكليزية حيث تم تمثيل الآليات الخلوية كمجاميع فعالة (المُحافظة على جهد الأغشية، ماسكات ROS، تغير حركة المرور عبر الأغشية، تحول البروتينات). تشخيص المُركبات الثانوية الرئيسة والعوائل البروتينية التي تشكل الدفاعات الخلوية ضد الجهد الآيوني.



شكل 11.6. مسلك تحمُل الإجهاد في النباتات.

وفيما يلي أهم الآليات التي تتبناها النباتات عند تعرضها للإجهادات:

1- تنشيط العوامل الناقلة للإشارة (Activation of signaling factors)

2- حصول تغيرات في التعبير الجيني (Altered gene expression)

3- تراكم في محاليل التوافق (Accumulation in compatible solutes)

4- تصنيع بروتينات الإجهاد (Synthesis of stress proteins)

5- التسريع في بناء مُضادات الأكسدة (Enhanced antioxidative metabolism)

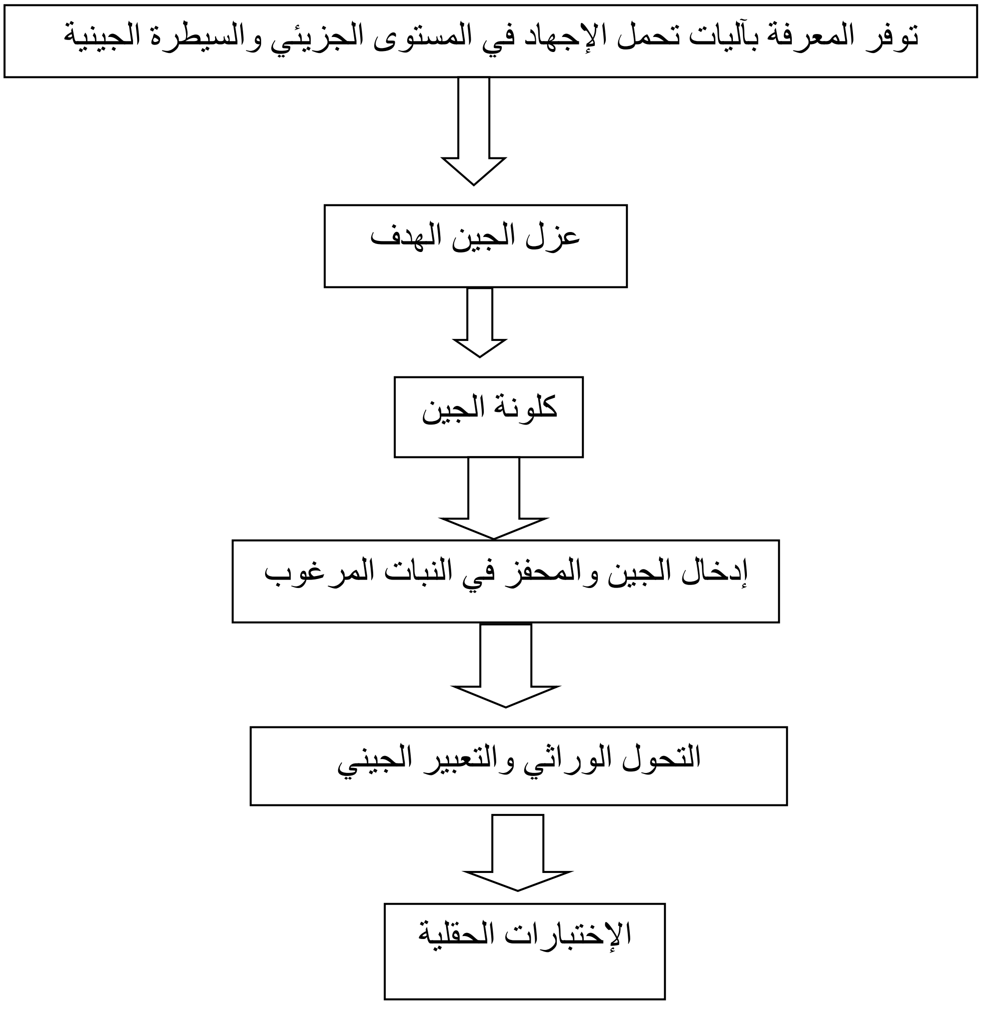
6- توازن وتراكم الآيونات (Ion homeostasis and compartmentation)

7- تسهيل النقل عبر الأغشية الخلوية (Membrane transport)

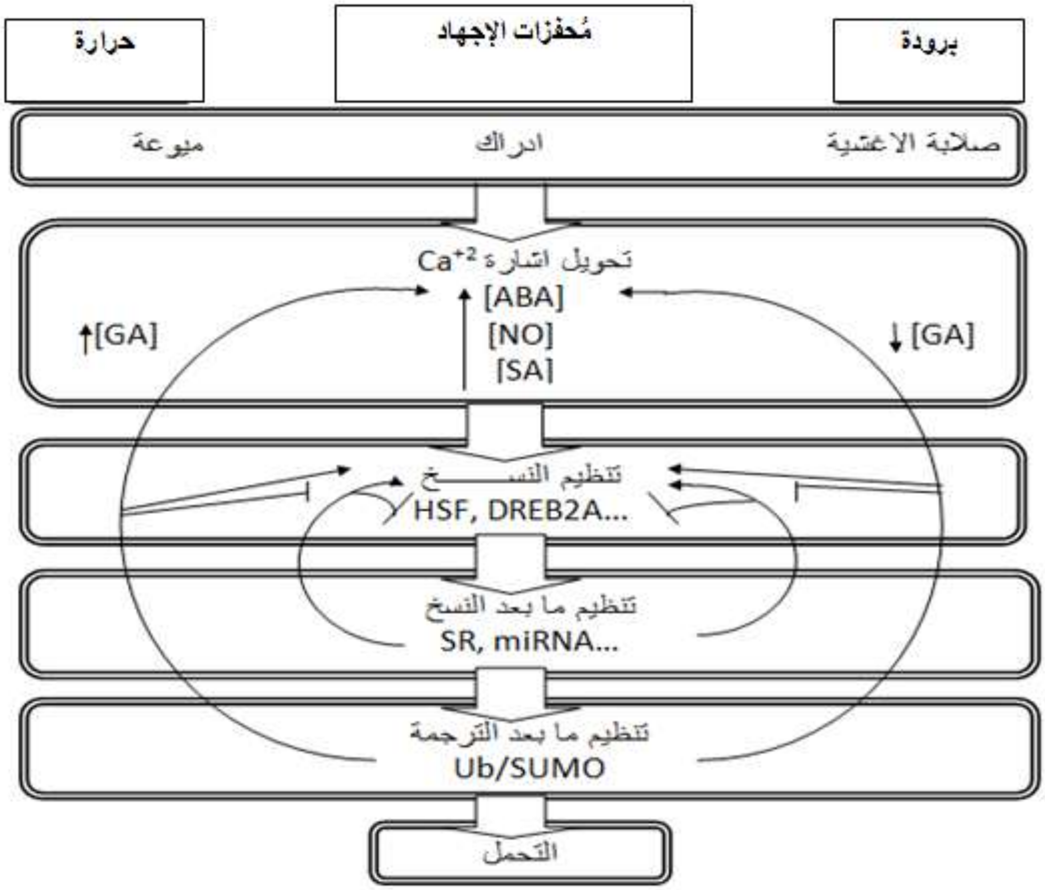
8- تراكم الأمينات المُتعددة (Polyamines)

9- تحقيق التوازن الهرموني (Hormonal balance). وتعتمد درجة تحمُل الإجهاد من نبات لآخر ومن تحمُل واطئ الى عالي وتبدأ الآلية (شكل 11.6) بتحسس الإجهاد يتبعها تكوين مُنتجات الجين المُرتبطة بحماية الخلية وتصليح بداية الضرر.

وبالنظر لأهمية إنتاج نباتات مُتحملة للملوحة تحت تهديد تملح الأراضي الزراعية المُتزايد وكذلك الحاجة الى تطوير نباتات تتحمُل الجفاف في ظروف أصبحت فيها حرب المياه أمراً واقعاً لامحال في الأمد القريب. لذا ففي هذا الفصل سيتم التركيز على هذين العاملين بالتفصيل. تلعب المسالك الحيوية لنقل الإشارة التي تكشف الإجهاد دوراً اساسياً في تحفيز آلية تحمُل الإجهاد. وتُعد تقانات نقل الجين من الطرائق المهمة في نقل صفة تحمُل الإجهاد (شكلا 11.7، 11.8).



شكل 11.7. إستراتيجيات نقل الجين في النباتات.



شكل 11.8. إنموذج مُقترح للتكامل بين مسالك نقل الإشارة عند إنخفاض وإرتفاع درجة الحرارة. يُعتقد بأن التغيرات التي تحصل في سيولة الأغشية الخلوية من الخطوات الاولى المُتوقع حصولها نتيجة التغاير في درجات الحرارة ويعمل الكالسيوم كمُراسل ثاني عند التعرض لهذا التغاير في نقله للإشارة. ومن جانب آخر، يُسبب الإجهاد الحراري في زيادة مُستويات هرمون ABA، أوكسيد النتروز NO وحامض الساليسليك SA وتعمل كوسيط في مُتغيرات التعبير الجيني والتي يحتاجها النبات لغرض التحمُل. كما تشترك الجبريلينات عند الإستجابة للإرتفاع والإنخفاض في درجات الحرارة. وأخيراً تنظم إستجابة النبات لهذه الإجهادات على مُستويات الإستنساخ وما بعده وما بعد الترجمة. تُمثل رؤوس الأسهم ونهاية الخطوط التنظيم الموجب والسالب على التوالي.

أما الإجهادات الاأحيائية، فتُعزى الى مُبيدات الأدغال، شحة المياه (نتيجة الجفاف، إرتفاع درجات الحرارة، مُستويات الملوحة العالية) إضافة الى تاثير الاوزون، شدة الإضاءة، تراكم المعادن الثقيلة في الترب، إنخفاض درجات الحرارة، الماء الزائد عن حاجة النبات وخاصة في أثناء الفيضانات ونقص العناصر

وكما أسلفنا سابقاً في شكل 11.2. والجدير بالذكر ان أغلب ما يحصل عبارة عن تفاعلات إنزيمية يُمكن التداخل معها في المستوى الجزيئي وكلونة الجينات ذات العلاقة بتنظيم منتظم لعملية النسخ يتبعه تنظيم ما بعد النسخ لكي تبدأ عملية تنظيم ما بعد الترجمة لتبدأ دورة تحويل إشارة Ca^{+2} عندئذٍ يكون الناتج النهائي تحمُل النبات للإجهاد سواء كان إنخفاض أو إرتفاع في درجات الحرارة. والمُلاحظ من جدول 11.2، العديد من النباتات التي جرى إنتخابها خارج الجسم الحي لتكون مُتحملة وحسب عامل الإنتخاب المُضاف الى الوسط الغذائي.

جدول 11.2. غربلة وإنتخاب مجموعة من المحاصيل لعوامل إجهاد لاأحيائية خارج الجسم الحي

النوع النباتي	الإجهاد	عامل الإنتخاب
فستق الحقل	جفاف	PEG
قصب السكر	الأشعة فوق البنفسجية	UV-B
الخردل الهندي	جفاف	مانيتول
أنواع من الصليبيات	Zn+Mn	Zn+Mn
فلفل الحار	جفاف	PEG
جوز الهند	جفاف	PEG ومانيتول
جزر	جفاف	PEG
تبغ	Cu	Cu
رز	جفاف، برودة، Al	PEG، برودة، Al
قصب السكر	جفاف	مانيتول
بطاطا	جفاف	مانيتول
ذرة حلوة	جفاف	PEG
قديفة	جفاف	مانيتول
برسيم أحمر	برودة	برودة
حنطة	برودة، جفاف	برودة، PEG، برولين
حنطة	ملوحة	NaCl
فول الصويا	ملوحة	خليط أملاح
سجاد	ملوحة	خليط أملاح
خس	ملوحة	NaCl
حور	معادن ثقيلة	معادن ثقيلة
حور والأربدوبسس	بقايا متفجرات	TNT
صفصاف	معادن ثقيلة	معادن ثقيلة

الجفاف Drought

تحصل حالات الجفاف أي نقص الماء المُمتص من قبل النبات لسبب أو أكثر من الحالات التالية:

1- إنخفاض في الجُهد الازموزي للماء المتوفر في التربة.

2- زيادة معدلات تبخر الماء سواء من سطح التربة (Evaporation) أو من النبات (Transpiration) أو من كليهما (Evapotranspiration) نتيجة ظروف الجفاف وإرتفاع درجات الحرارة وسرعة الرياح.

3- إرتفاع تراكيز الأملاح في محلول التربة إذ يحصل إنخفاض في الجهد الازموزي لماء التربة ويصبح من الصعب لجذور النبات إمتصاصه.

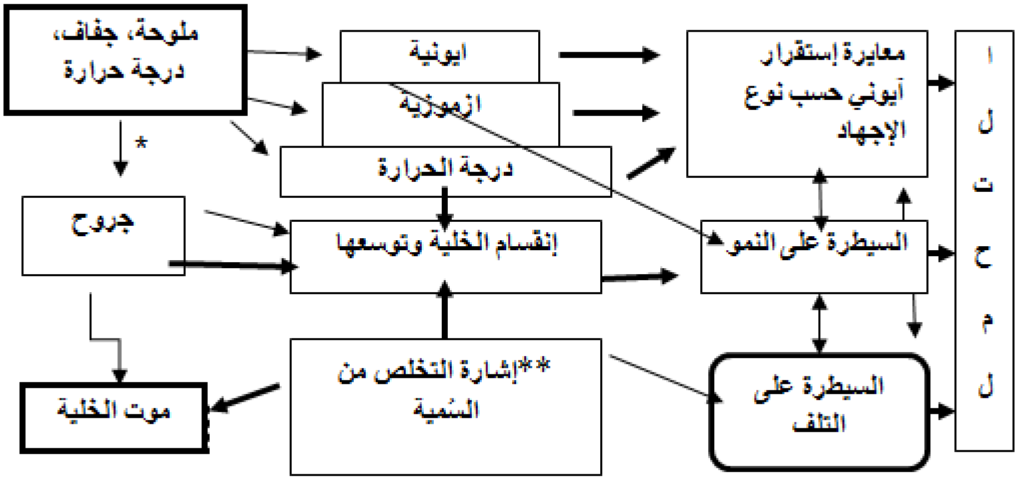
4- الإنخفاض الشديد في درجات الحرارة مما ينتج عنه تكوين بلورات ثلجية داخل أنسجة النبات أو في ماء التربة. عند تعرض النبات للإجهاد الازموزي، تنتج خلاياهُ مُركبات يُطلق عليها بمُركبات الحماية من الازموزية (Osmoprotectants أو Osmolytes) لمواجهة هكذا نوع من الإجهادات وهي غير سامة وتقسم الى مجموعتين:

أ- سكريات وسكريات كحولية مثل المانيتول، السربتول، بنيتول، اونونيتول، تريهالوز وفركتان.

ب- مُركبات تدعى Zwitterionic تحمُل شحنات موجبة وسالبة، ومن أمثالها البرولين والكلايسين بيتين.

يعتمد نوع مركب الحماية المُنتج على نوع النبات بالرغم من أن المُركبات الثلاثة المُتمثلة بالبرولين والكلايسين بيتين والمانيتول ترتبط مُباشرة بتحمُل الإجهادات الازموزية. بينت إحدى الدراسات حصول زيادة طردية للبرولين في مزارع كالس نبات الحنطة المُضاف لها 4، 8، 12% من مركب الكلايكول مُتعدد الاثيلين (PEG) وصلت النسبة المئوية للبرولين الى 150، 190، 276% على التوالي. تُرجح أسباب زيادة مُركب الحماية البرولين مع زيادة الجُهد الجفافي للأنسجة الى مجموعة من الأسباب لعل أهمها زيادة نشاط الإنزيمات المسؤولة عن بناء البرولين مثل إنزيم pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) والإنزيمات ذات العلاقة مثل pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS). سُجلت ايضا زيادة معنوية في البرولين بعد تعريض نفس المزارع أعلاه الى أشعة UV-C لمدة 60 دقيقة. كما بينت الدراسة السابقة حصول زيادة في حامضي الكاليك والساليسيلك بوجود الشد الرطوبي لذلك قد تكون مُؤشرات بايوكيميائية مقترحة لتحمُل الجفاف. ولابُد هنا من الإشارة الى الإستراتيجيات التي يُمكن إعتمادها في تطوير

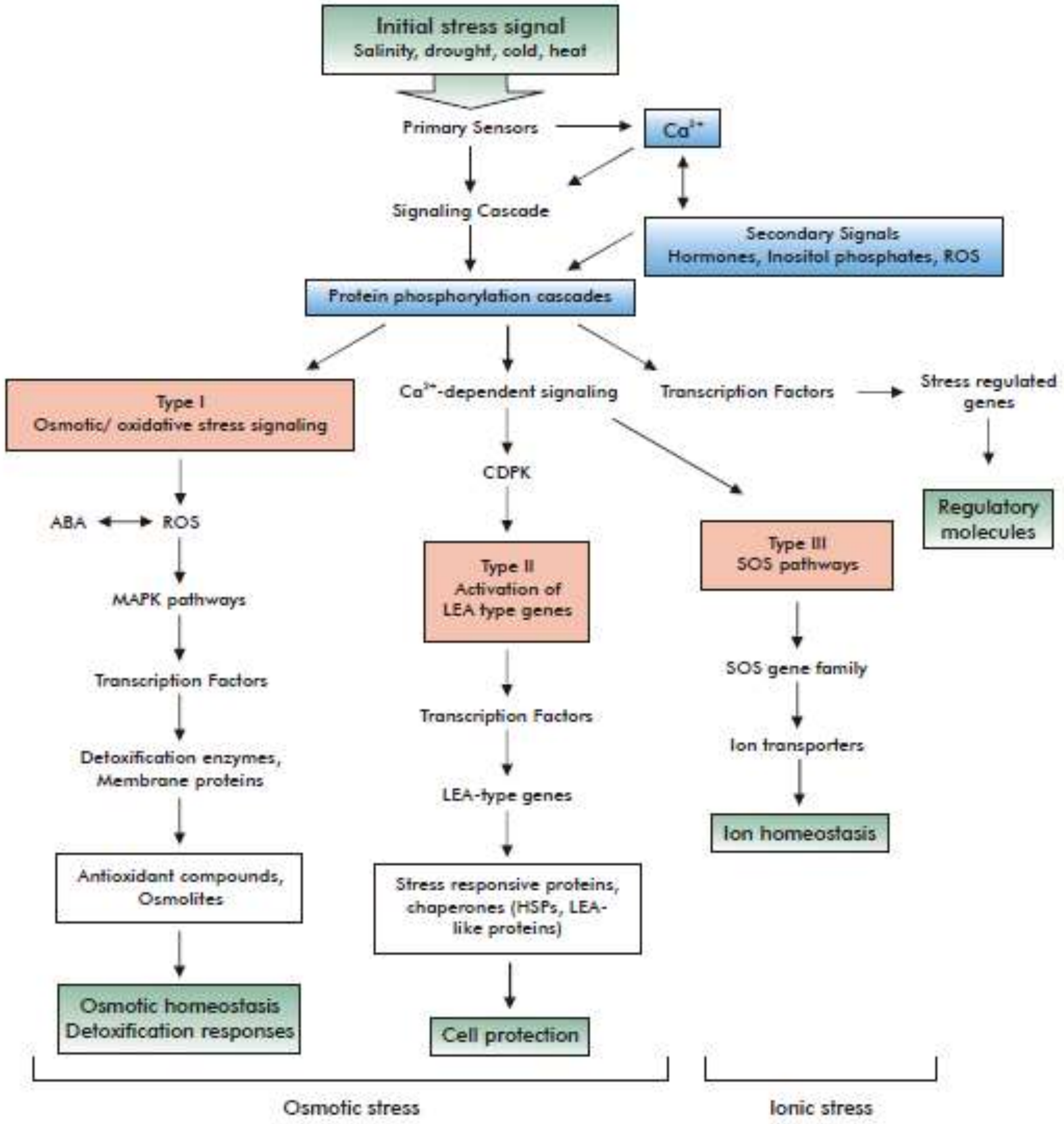
نباتات مُتحملة للجفاف أهمها التفكير في هندسة النبات وراثياً بإتجاه زيادة إنتاجه من مُركبات الحماية. حصلت بعض الإنجازات في هذا الصدد في فهم المسالك الحيوية الضرورية في إنتاج مركبات الحماية (شكل 11.9) وتم عزل الإنزيمات المفتاحية المُشفرة لها ونتجت عن تلك الجهود إنتاج نباتات مُحورة وراثياً ذات مستوى عالي منها مما جعلها أكثرُ تحمُلا للإجهادات (لاحظ فصل تطبيقات الهندسة الوراثية).



شكل 11.9. العمليات والآليات التي تربط بين الإجهادات اللاأحيائية، الضرر، الدفاع والتحمُل. تبدو الإستجابة للإجهادات اللاأحيائية كشبكة متكاملة من الشعور بالإجهاد، نقل الإشارة والإستجابات المتلاحقة في المسالك الحيوية. يتبين بان التفاعلات التي تحصل تكون مُحددة بعامل الإجهاد بينما تنشئ الإستجابات العامة بإستلام الإشارة عن عدم وجود توازن في المُركبات وقد يُصاحبه حصول إذى في النبات أو أحدهما. يؤدي ذلك الى تغيير تنظيم عمل مجموعة من الجينات التي تتداخل مع ظروف الإجهاد البيئية. يؤثر ذلك في دورة إنقسام الخلية وفي نمو وتطور النبات نتيجةً لمسالك إضافية تتحكم فيها الهرمونات. *= تسريب من أغلفة البروتين غير المطوية، إختلال التوازن المائي/الآيوني، إنتاج ROS. **= مسلك عام مُميز عن الإجهاد ناتج في مجموعة الجينات الوظيفية التي تتاثر بالإجهاد وغير مُحددة بإجهاد مُعين. تؤثر وفي كثير من الأحيان مجموعة من الجينات في مجموعة من الإجهادات. ***= التداخل بالمسالك الحيوية التي تربط إجهادات معينة بجينات معلومة التي قد يزداد أو ينخفض تعبيرها الجيني حسب الحالة والإستجابة.

ولكون المياه أصبحت حاجة مُلحة للقطاع الزراعي لذا يستوجب الامر الإستفادة القصوى من تقانات الري الحديثة إضافة الى الحاجة المُلحة الى تطوير أصناف جديدة مُتحملة للجفاف سواء بالطرائق التقليدية أو الهندسة الوراثية أو كليهما لمواجهة النقص الحاصل في مياه الري عالميا. ولابُد من فهم عميق لآليات الإجهاد

وخاصة الإشارات الثانوية من هرمونات وأنواع الأوكسجين التفاعلية التي تتكون ضمن مسارات الايض (شكل 11.10).



شكل 11.10. مسلك حيوي توضيحي لإنتقال الإجهاد الإزموزي والآيوني في النباتات. تبدأ إشارة المسلك الحيوي من إستلام إشارة الإجهاد يتبعها ظهور مراسل ثاني (فوسفات الإنوسيتول وأنواع الاوكسجين التفاعلية). يقوم المراسل الثاني بتنظيم مُستويات Ca^{+2} داخل الخلية مما يُولد في الغالب عملية فسفرة للبروتين والذي يهدف ويُصيب بالتالي البروتينات المُرتبطة بالحماية الخلوية أو عوامل الترجمة المُسيطرة في الجينات المُنظمة للإجهاد.

تطوير محاصيل مُتحملة للجفاف Developing drought tolerant crops

تتطلب برامج تحسين النبات التقليدية البحث عن التغاير الوراثي لصفة تحمُل الجفاف في المحاصيل المزروعة وخاصة ذات التوافق الجنسي فيما بينها وإدخال صفة تحمُل الجفاف الى الأصناف ذات الصفات الحقلية المرغوبة آخذين بنظر الإعتبار محدودية الأجناس والأنواع الحاملة لجينات تحمُل الجفاف. حققت طرائق تحسين النبات التقليدية زيادة في تحمُل الجفاف (رغم محدوديتها) في محاصيل الرز والحنطة والخردل وفي تطوير هجن ذرة صفراء مُتحملة لهذه الصفة مع الإستمرار في عمليات الإنتخاب (Selection). ومن جانب آخر تبرز ضرورة توفر جينات تحمُل الجفاف في عدد من النباتات المزروعة والبرية لغرض عزلها ونقلها بطرائق الهندسة الوراثية الى المحاصيل الإستراتيجية. يُسبب الجفاف العديد من الإستجابات الفسيولوجية التي تؤثر بدورها في نشاط عدد من الجينات، إذ بينت التجارب أن التعبيرالجيني قد ينجح في تشخيص عدة مئات من الجينات تكون قد حُفزت أو ثُبطت عند تعرض النبات للجفاف. فتحت تقانات الزراعة النسيجية آفاقاً واسعة إبتداءاً من غربلة خلايا أنواع نباتية مختلفة تحت ظروف مُسيطر عليها وإنتخاب المُتحمُل منها وإنتهاءاً بإخلاف الخلية الى نبات كامل وإختبار تحمُله حقلياً.

آليات تحمُل الجفاف Drought tolerance mechanisms

تستجيب النباتات للمُتغيرات البيئية بطرائق مُعقدة تسمح بالتفاعل معها في الوقت المُحدد وبهذا فالإستجابة للإجهادات البيئية ليست معقدة فحسب بل تتأثر بالعوامل البيئية وحسب مرحلة نمو النباتات. تتمثل إستجابات النبات فسيولوجياً لنقص الماء في ذبول أوراقه وصُغر مساحتها الورقية وسقوط الأوراق وتحفيز نمو الجذور الى أعماق التربة والجوانب بحثاً عن الماء والعناصر المُغذية. وتزداد حساسية النباتات للماء في مرحلتي التزهير ونشوء البذور (في المرحلة التكاثرية) حيث تتجه المُصنعات الغذائية (نواتج التركيب الضوئي) لتغذية المجموع الجذري. يَنتج عند تعرض النبات للجفاف هرمون الإنفصال (ABA) أو ما يُسمى بهرمون الإجهاد الذي يُحفز على غلق الثغور المسؤولة عن التبادل الغازي بين النبات ومُحيطه مما يُساهم في تقليل فقدان الماء نتيجة تقليل النتح وبالتالي إنخفاض معدلات التمثيل الغذائي. والجدير بالذكر ان الحالات أعلاه تُقلل من فقد الماء في الأمد القصير ويتطلب من خلايا النبات المُحافظة على التوازن المائي ولهذا تمتص الماء عندما يكون الجهد المائي (Water potential) سالبا كما انها تُقلل من جهدها المائي بعد تراكمها لمواد مُختلفة (Solutes) كالسكريات والاحماض الأمينية والعضوية إضافة الى آيون البوتاسيوم. يؤدي ذلك الى تثبيط عمل الإنزيمات خاصة بوجود الآيونات السامة مما يدفع الخلية النباتية الى خزنها في السايتوسول وفي

أعضاء الخزن كالفجوات. وفي بعض الحالات تتراكم المُركبات المتوافقة (Compatible solutes) في السايتوسول بحيث لا تُعارض التفاعلات الإنزيمية والتي غالباً ما تكّون الكُحولات السكرية (المانيتول والسوربيتول)، البرولين، كلايسين بيتين لتخفف من شدة تأثير عوامل الإجهاد وتزيد من تحمُل النبات للجفاف.

يُرافق إستجابة النبات للإجهاد حصول حالة من تنشيط الجينات المُرتبطة بالجفاف وعندئذٍ تنتقل إشارة الإجهاد الجفافي لتصنيع هذه المُركبات التي ترفع من درجة تحمُل النبات للجفاف. يقوم أحد مجاميع هذه الجينات المُشفر للبروتينات بحماية الخلية من فقدان الماء نظراً لوجود جينات تُسيطر في تراكم المُركبات المتوافقة وفي آلية النقل عبر الأغشية الخلوية وأنظمة نقل الماء التي تتطلب طاقة وكذلك في حماية وإستقرار التراكيب الخلوية من فُقدان الماء والتلف الذي تُلحقه جذور الاوكسجين الحرة. وهناك مجموعة ثانية من الجينات تعمل نتيجة الإجهاد الجفافي والمتكونة من بروتينات لها دور في تنظيم إنتقال إشارات الإجهاد وتُبرمج التعبير الجيني. وفي هذا الخصوص فقد عُرفت في اقل تقدير أربعة مسالك تنظيمية في النبات لتُشكل شبكة جينية عالية التعقيد. يعتمد إثنان منهما على هرمون ABA وإثنان لا يعتمدان عليه وتتداخل المسالك الأربعة مع عوامل الإجهاد الاخرى كالبرودة وإرتفاع درجة الحرارة والملوحة.

إستجابات النبات لتحمُل الجفاف Plant responses to drought tolerance

أولاً: التهرب من الجفاف (Drought escape): يتمكن للنبات التهرب من الجفاف وبنجاح بالإسراع في إكمال دورة حياته وتكوين أعضاء الإكثار كالبذور في النباتات البذرية وأعضاء التكاثر الخضرية للنباتات التي تتكاثر خضرياً. يجمع النبات بين قِصر دورة حياته وبين سرعة مُعدلات النمو والتبادل الغازي بالإستفادة القصوى من كافة المصادر المُتاحة لحد النقصان الحرج في رطوبة التربة.

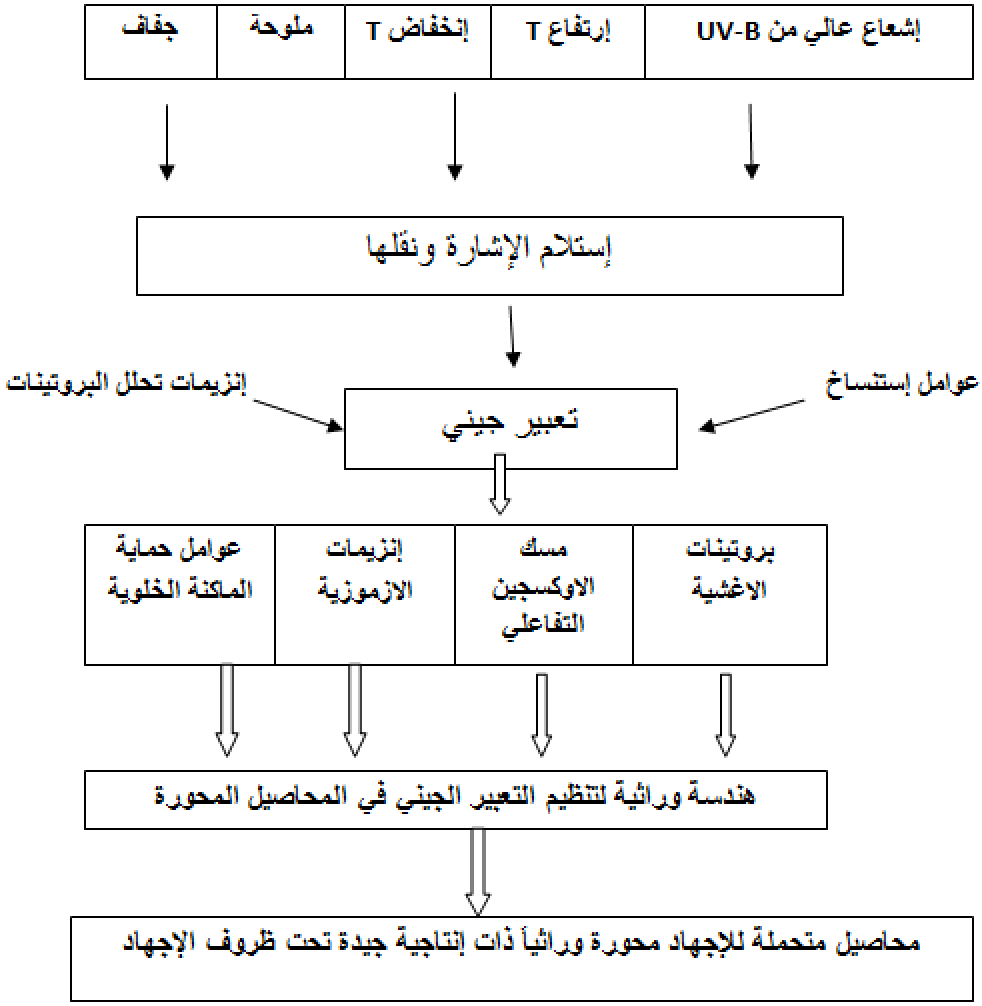
ثانياً: تجنب الجفاف (Drought avoidance): يشمل تجنب الجفاف بتقليل فقد الماء بغلق الثغور، التقليل من إمتصاص الضوء بإلتفاف أوراقه، تقليل المساحة الورقية، إمتصاص أكبر كمية ممكنة من الماء، إعادة توزيع المُغذيات المخزونة في الأوراق القديمة ونقلها الى الحديثة وكذلك بزيادة معدلات التركيب الضوئي.

ثالثاً: تحمُل الجفاف (Drought tolerance): يبدو أن تحمُل الجفاف ناتج من التنسيق بين التغييرات الفسلجية والكيموحيوية في المُستويين الخلوي والجزيئي. قد تشتمل تلك التغييرات المُعايرة الازموزية، جدر خلوية أكثرُ صلادةً، خلايا أصغرُ حجماً.

رابعاً: مُعايرة الإزموزية (Osmotic adjustment): تُعرف المُعايرة الإزموزية بأنها صافي الزيادة في المحاليل الخلوية إستجابة للإجهاد المائي بحيث تحافظ على إنتفاخ الخلية عند تعرضها الى جهد مائي مُنخفض. تُعد المُعايرة الإزموزية أحد أهم عمليات تكيُف النبات للجفاف لكونها تُحافظ على الفعالية الايضية وبذلك تساعد الخلية في الإستمرار بالنمو حال توفر الماء وتختلف حسب التركيب الوراثي. ترتبط إنتاجية عدد غير قليل من المحاصيل بالمُعايرة الإزموزية مثل الذرة الحلوة والحنطة ونباتات العائلة الصليبية.

الهندسة الوراثية وتحمُل الجفاف في النبات Genetic engineering and drought tolerance

من المعلوم بأن مُستويات هرمون السقوط ABA تزداد عند التعرض للجُهد المائي مما يؤدي بالنبات الى غلق ثغوره وكما سبق ذكره بهدف تقليل النتح وتنشيط جينات الإستجابة للإجهاد. والملاحظ بأن التفاعل يحصل بشكل عكسي إذ عند توفر الماء تنخفض مُستويات ABA ويُعاد فتح الثغور. وبذلك يشكل هرمون ABA منفذاً لهندسة النبات وراثياً إذ ان زيادة حساسية النبات له يُعد هدفاً مهماً عند تحسين صفة تحمُل الجفاف. فقد شُخّص جين ERAI في نبات الأربدوبسس الذي يُشفر الى B-subunit لإنزيم Farnesyl-transferase المتعلق بتنظيم إشارة هرمون ABA وَوِجد بأن النباتات الفاقدة لفعالية جين ERAI قد زاد تحمُلها للجفاف وللأسف حصل إنخفاض حرج في إنتاجيتها. ولغرض تنظيم عمل ABA، أستعمل مجموعة من الباحثين الكنديين بادىء مُحفز للجفاف (Drought-inducible promoter) لعمل تعبير جيني مُعاكس لجين ERAI (Antisense expression of ERAI) في نباتي الأربدوبسس والسلجم. أظهر النباتان المحوران وراثياً زيادة معنوية في تحمُلهما لظروف الشد المائي مع الإحتفاظ بإنتاجية أعلى من غير المُحورة. والمُدهش ان النباتين المحوران وراثياً لم يُظهرا فروقات في النمو عند التخلص من الإجهاد المائي اي تحت ظروف الري العادية. ولمزيد من التفاصيل حول الموضوع يُرجى زيارة الموقع http://www.performanceplants وبدأت شركة تقانات النبات الاحيائية الكندية وتحت اسم Performance plants Inc. بتسويق منتجاتها من النباتات المُتحملة للجفاف تحت اسم Yield Protection Technology ™ (YPT ™). ومما تجدر الإشارة اليه ان الشركة قامت بتطوير محاصيل الذرة الصفراء وفول الصويا والقطن والعديد من نباتات الزينة وانواع من الثيل وقد دخلت حقول المزارعين عام 2011. جذبت آلية نقل الإشارة إهتمام العديد من الباحثين (شكل 11.11) وعلاقتها بالتعبير الجيني وبالتالي التلاعب وراثياً في النباتات من أجل الحصول على نباتات تتحمُل مُستويات عالية من الإجهادات البيئية.



شكل 11.11. مخطط توضيحي لإنتقال الإشارات وحصول التعبير الجيني وتوظيف الهندسة الوراثية بالإستفادة من جينات تحمُل الإجهادات وإنتاج نباتات مُحورة وراثياً.

ومن جانب آخر فقد دُرست إمكانية تنظيم عمل الجينات المسؤولة عن تحمُل الجفاف غير المرتبطة بهرمون ABA ووجد بأن عاملي الاستنساخ (Transcription factors) DREB1 و DREB2 مُرتبطان بمسالك تحمُل الجفاف غير المرتبط بهرمون IBA. وهذان العاملان يُحفزان عمل الجينات المسؤولة عن الإجهاد الرطوبي. سُجلت زيادة في تحمُل نبات الأربدوبسس المحوّر وراثياً للجفاف والملوحة والبرودة ً بعد زيادة التعبير الجيني لعامل DREB1 الطبيعي وكذلك لعامل DREB2 المصنع مختبرياً. وبالرغم من ان الجينين قد تم تشخيصهما في نبات الأربدوبسس اولاً، لكن أُكتشفا ودُرِسَ دورهما المهم في تحمُل الإجهادات في العديد من المحاصيل المهمة مثل الرز، الطماطم، الشعير، الكنولا، الذرة الصفراء، فول الصويا، الشيلم

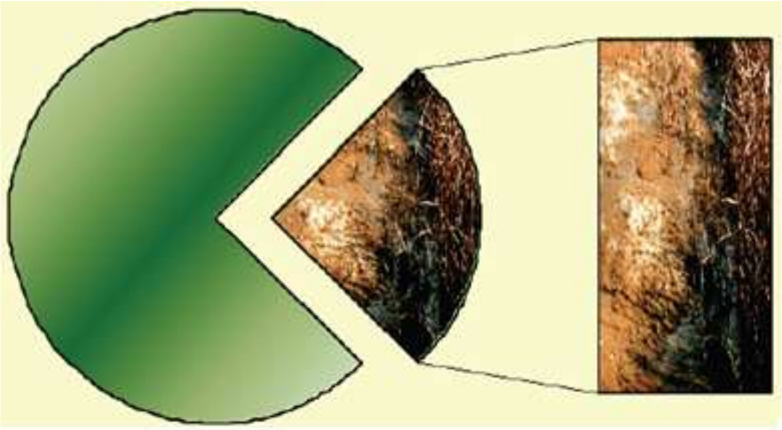
(Rye) مما يؤكد وجود الجينين ضمن المخزون الوراثي للنبات ويلعبان دوراً إستراتيجياً في زيادة تحمُل النباتات للإجهادات مما يجعلهما هدفين مهمين في تحسين تحمُل الجفاف من قبل مُهندسي النبات وراثياً. وخلاصة لما سبق، يمكن القول بأن البحث العلمي حقق تقدماً كبيراً في فهم الآلية الوراثية المرتبطة بتحمُل النبات للجفاف ولكن تتعرض المحاصيل الى مُستويات مختلفة ومُتغايرة من الإجهادات تحت ظروف الزراعة الحقلية. وبات من المُهم تطوير أصناف تتحمُل مدى واسع من الإجهادات البيئية واختبار أدائها الحقلي مع الاخذ بنظر الاعتبارحصول زيادة او في اقل تقدير المحافظة على إنتاجيتها. وكذلك ما يواجهه مُنتجو النباتات المُحورة وراثياً (GMP) في إمكانية حصولهم الموافقات الرسمية لأختبار تلك النباتات حقلياً ومن ثم نشرها الى مناطق أُخرى من العالم وفي ضمان سلامتها واتخاذ معايير السلامة المطلوبة.

ألتقانات الأحيائية وتحمُل الملوحة Biotechnology and salinity tolerance

بدأت مشكلة تملح الاراضي مع بدايات تدجين المحاصيل الزراعية وريها إذ ان تبخر مياه الري خاصة رديء النوعية يؤدي الى تراكم تدريجي للاملاح في منطقة الجذور وسطح التربة. ومع ان الري قد ساهم في زيادة رقعة الاراضي المزروعة في الاراضي الجافة وشبه الجافة وزاد من فرصة توفير الغذاء لسُكان هذه المناطق، إلا أنه نتج من سوء إستعماله تملح وظهور أراضي غدقة لاتصلح للزراعة آخذين بنظر الاعتبار ان ما يزيد عن 20% من الاراضي المزروعة في المناطق الجافة وشبه الجافة قد تأثرت سلباً وبشكل كبير وخاصة في الاراضي المروية (شكل 11.12). ومن المعلوم ان أغلب المحاصيل الزراعية تُعد حساسة للملوحة والتي تؤثر بشكل كبير في إنتاجيتها وتزيد من حساسيتها لأنواع الإجهاد الاخرى كالأمراض والمُلوثات والتي قد تؤدي الى هلاكها. كما ان تراكم الاملاح في التربة له تأثيراته السلبية في تركيب التربة وخاصة مساميتها وقابليتها في الاحتفاظ بالماء مما يجعل الاراضي غير صالحة للزراعة.

يُقلل الاستخدام العقلاني للمصادر الطبيعية من أرض ومياه من تلف البيئة ويضمن إنتاجية الارض. لذا فلا بد من تغيير نظم الزراعة التقليدية والإنتقال الى نُظم جديدة كإنتخاب الأصناف والأنواع المُناسبة وكذلك التحول الى نُظم الزراعة المُختلطة للتقليل من حِدة تراكم الاملاح. تستدعي الحالة وتحت هذه الظروف مواجهة الطلب المُتزايد حالياً ومُستقبلاً الى الغذاء في الاراضي المروية والمطرية التي يُشكل فيها نُقص المياه وتراكم الاملاح عوائق للإنتاج الزراعي. تختلف المحاصيل من حيث قابليتها تحمُل مُستويات الملوحة (جدول 11.3). فقسم منها حساس جداً والقسم مُتحمُل لتراكيز عالية نوعًما. جاءت فكرة تطوير الأنواع والاصناف الحالية والمُستنبطة بإتجاه زيادة تحمُل الملوحة والجفاف وغيرها من الإجهادات غير الأحيائية

لتُلبي جزءاً من إحتياجات المرحلة مع فتح آفاق لمستقبل جديد في هندسة النبات وراثياً ليحمل جينات تحمُل لتلك الإجهادات.



ألأراضي المُتأثرة بالملوحة   مجموع مساحة الاراضي المروية

شكل 11.12. نسبة الأراضي المُتأثرة بالملوحة نسبةً الى الاراضي المروية.

النظام الدفاعي ضد الاكسدة عند التعرض للإجهاد Defence system against oxidation

تتولد أنواع الاوكسجين التفاعلية (ROS) في الخلايا النباتية نتيجة عمليات الايض الخلوي العادية أو بسبب تعرضها الى ظروف بيئية غير مثالية لنموها مثل الجفاف، الملوحة، المعادن الثقيلة، الرش بمُبيدات الحشائش، نقص المُغذيات، التعرض للإشعاعات وغيرها. يُسيطر على إنتاجها من خلال نظام إنزيمي وغير إنزيمي مضاد للأكسدة ليشمل CAT، APX، POX، SOD، MDHAR، DHAR،GR والى أنظمة مضادات أكسدة غير إنزيمية تشمل الأسكوربات، جلوتاثيون، كاروتينويدات، مركبات فينولية، برولين، كلايسين بيتين، سكر، أمينات مُتعددة. تقوم مُضادات الأكسدة بحماية الخلية من الجذور الحرة التي تتكون نتيجة التعرض للإجهاد ومثل ما سبق ذكره فقسم من تلك مُضادات الأكسدة تكون إنزيمية تتحرر نتيجة إشارات من دنا النواة ينقلها الرنا الى الرايبوسوم لتصنيع نوع البروتين المطلوب. وقد تكون غير إنزيمية كمُركبات تنتجها الخلية لمُواجهة الإجهاد في خلق حالة من التوازن الازموزي. ولتعميم الفائدة للقارئ، تم إدراج جدول 11.4 كقاعدة بيانات مُصغرة لمجموعة من الأنواع النباتية المدروسة ونوع الجزء النباتي المُزروع ونوع الإجهاد وتركيزه إضافةً الى الإنزيمات المُضادة للأكسدة وطريقة الكشف عنها.

جدول 11.3. حساسية عدد من المحاصيل المهمة إقتصاديا للملوحة ويلاحظ النسبة المئوية للإنخفاض في الحاصل عند العتبة (Threshold)

النبات	تركيز العتبة ($ds.m^{-1}$)	الإنخفاض في الإنتاج % للإنحدار لكل $ds.m^{-1}$
الفاصولياء	1.0	19.0
الباذنجان	1.0	6.9
البصل	1.2	16.0
الفلفل	1.5	14.0
الذرة الصفراء	1.7	12.0
قصب السكر	1.7	5.9
البطاطا	1.7	12.0
اللهانة	1.8	9.7
الطماطم	2.5	9.9
الرز	3.0	12.0
فستق الحقل	3.2	29.0
فول الصويا	5.0	20.0
القمح	6.0	7.1
البنجر السكري	7.0	5.9
القطن	7.7	5.2
الشعير	8.0	5.0

جدول 11.4. مُضادات ألأكسدة المُتكونة نتيجة الإجهادات الاأحيائية عند تعرض إجزاء نباتية مُختلفة ولأنواع نباتية مُختلفة

طريقة الكشف	مضاد الأكسدة	عامل الإجهاد	الجزء النباتي	النوع النباتي
Spectrophotometric	CAT ،SOD، TBARS ،APX، Pro ،TRS ،TSS GB ،PC	0، 20% (W/V) PEG 8000	كالس جنيني	*Saccharum officinarium* L. cv. Co 86032
Spectrophotometric	SOD, CAT, PPO, H_2O_2, POX, MDA, PC, CARs, and Pro. DPPH, ABTS, PRO	0، 500 and 1000mM Mannitol	كالس	*Saccharum persica* and *S. europeca*
Spectrophotometric	H_2O_2, MDA, Flavonoid, Phenol and chlorogenic acid, Hypericin and Residual Sugars	0, 1, 3, 5, 7, and 9% (W/V) sucrose	جذور عرضية	*Hypericum perforatum* L.
Spectrophotometric	SOD, CAT, POX, H_2O_2, LOX, MDA, PP PO, DPPH, Anthocyanin, Flavonoid and Phenol, DPPH, APX, CAT, POX, GR, Proline, H_2O_2	0, and 20% (W/V) PEG-6000	بادرات	*Oryza sativa* L.(cv.IR.29, Pokkali, and PB)
Spectrophotometric	GR, Proline, H_2O_2, MDA, Ascorbate, Flavonoid, PP, Phenol	PEG-8000	نموات خضرية	*Deschampia antarctica*

Spectrophotometric	H_2O_2, MDA, GSH, AsA, SOD, APX, CAT, GR, PAL, TSS, AA,Phenol	0, 5, 10, 15, and 20% PEG	كالس	*Oryza sativa* L.
Spectrophotometric	SOD, CAT, POX, APX, GR, MDA, PP, Pro.	0, 1, 2, and 4% PEG 8000	نهايات الأفرع	*Prunus cerasus X* *P. canecens*
Spectrophotometric and isoenztme variations	SOD, CAT, POX, FRAP, H_2O_2, Pro, PP, MDA	0, and 576mM Manitol 0, and 562.5mM Sorbitol	نهايات الأفرع	*Malus domestica* Borkh. Rootstock MM 106
Spectrophotometric and isoenztme variations	POX, MDA, H_2O_2	0, and 300mM Mannitol	نموات خضرية	*Centaurea ragusina* L.
Spectrophotometric	SOD, CAT, APX, GR, MDA	0, and 40% PEG 6000	نهايات الأفرع	*Musa* AAA 'Berangan' and *Musa* AA 'Mas'
Spectrophotometric	SOD, CAT	100mM	كالس	*Cucumis melo* L. (cv. Besns, Yuva, Midyat, Semame and Galia C8)
Spectrophotometric	SOD, CAT, APX, TBARS, TSS, TRS, Pro, PC, GB	150mM	كالس	*Saccharum officinarum* L. cv. CO 86032
Spectrophotometric	SOD, CAT, PPO, H_2O_2, POX, MDA, PC, CARs, Pro.	0, 100, 300, 600 mM	كالس	*Salicornia persica* and *S. europea*
Spectrophotometric	PP, SOD, POX, CAT	0, 50, 100, 150, 200, 250mM	أجنة ناضجة	*Triticum aestivum* L.(cv. TeKirdag, Pehlivan and Flamura-85)

Spectrophotometric	SOD, CAT, APX, TSS, Pro, GB, MDA	0, 200, 400, 600mM	نموات ابطية	*Sesavium protulacastrum* L.
Spectrophotometric	SOD, POX, CAT, APX, H_2O_2, and NADPH Oxidase	0, 50, 100 and 200mM	كالس	*Nitraria tangutorum* Bobr
Spectrophotometric	MDA, PP, CARs, PC, Proline	0, 20, 40, 60, 80, 160mM	بادرات	*Paulownia imperialis* (Seibold and Zuccarins) and *P. fortune* (Seemann and Hemslehy)
Spectrophotometric	SOD, CAT, POX, MDA, Pro, Phenol, PP, and Sugar	0, 15, 30, 45, 60, 75, and 100mM	نموات خضرية	*Catharanthus reseus* L. cv. Rosea and Alba
Isoenzyme Variations and transcription analysis	MDA, SOD, and ROS mes.	0, 50, 100, 150mM	معلق خلوي	*Pinus pinaster*
Spectrophotometric	Sucrose, Trcholase Pro, Total Flavonoids, GB	0, 50, 100, 150, 200, 250mM	كالس	*Thellungiella halophile and Arabidopsis thaliana*
Spectroph-otometric	SOD, CAT, POX, PC	0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 and 140mM	أطراف الأفرع، كالس	*Solanum tuberosum* L. cv Cardinal and Desiree
Spectrophotometric and isoenzyme variations	SOD, POX, PC, Pro	0, 20, 40, 60, 80, 100mM	كالس	*Jatropha curcas*
Spectrophotometric	SOD, POX, CAT	0, 0.5, 1%	أطراف الأفرع	*Impomea batatas* L.

Spectrophotometric and Isoenzyme variations	FRAP, CAT, POX, PP	0, 30, 60mM (NaCl and $CaCl_2$)	نهايات الأفرع	*Pinus cerasus* L. Rootstock CAB-6P
Spectrophotometric	Sugar, Proline	0, 35, 100, 200mM (NaCl) 0, 5, 10mM ($CaCl_2$)	نموات خضرية	*Malus domestica* Borkh. Rootstock M 4

Spectrophotometric	SOD, POX, CAT, APX, GR, MDA, Proline	0, 50, 100, 150 mM	نهايات الأفرع	Sweet chery rootstock Gisela 5 *Prunus cerasus* X *P. carescens*
Spectrophotometric, immunofluor, Isonez and transcript	H_2O_2, GSH, Ascorbate, SOD, CAT, GR, PP, G6PHD, NADP-ICDH, and FNR	0, 25, 50, 100, 200mM	بادرات	*Olea europea* L. cv. Manzanillo
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, CAT, POX, FRAP, H_2O_2, FRAP, PP, Pro, MDA	0, and 240mM NaCl 0, and 220mM KCl	نهايات الأفرع	*Malus domestica* Borkh rootstock MM 106
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	CAT, POX, PPo, PC, Pro	0, 50, 100, 150, 200mM	بذور، كالس	*Trigonella foenum –graecum* and *Trigonella aphanoncura* Rech f.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD and POX	0, 50, 100, 150mM	سلاميات	*Solanum tuberosum* L. (cv. Agria, Kennebec, Diamant and Ajax
Spectrophotometric	SOD, POX, CAT, Pro, MDA	0, 50, 100, 150, 200, 300 and 400mM	معلق خلوي	*Citrus hybrid* 'Carvalhal' and *C. sinensis* cv. Valencia late

Spectrophotometric and Isoenzyme variations	POX, MDA, H_2O_2	0, 150, 300, 450, 600mM	نموات خضرية	*Centaurea ragusina* L.
Spectrophotometric	Pro, PP	0, 50, 100 mM	نموات خضرية	*Eucalyptus camadulensis Dehnh clones*
Spectrophotometric	APX, CAT, POX, Triols, Pytochelatins	0, 150, 250µM (Cd)	كالس	*Pinus nigra* L. (clone Poli and 58-861)
Spectrophotometric	POX, MDA, PP, CARSs and Polyamines	0.1mM (Zn)	طبقات رقيقة من الخلايا	*Brassica napus* L. cv. Jumbo
Spectrophotometric	SOD, CAT, POX, MDA, PP, ROS, mer (H_2O_2 and O_2)	0.05, 0.1, 0.2, 0.6, 0.8, 1mM (Cu)	كالس	*Alternaria phloxeroides*
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, CAT, POX, PPO, PAL	0, 0.05, 0.1, 0.2 and 0.4mM (Cd)	بذور	*Glycyrrhiza uralensis* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, CAT, POX, PAL	0, 100, 200, 400, 800mM (Pb)	أجنة	*Luffa cylindrical* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, CAT, POX, PAL	0, 100, 200, 400, 800µM (Zn)	أجنة	*Jatropha curcas* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, GR, GSSG, POX, MDA	0, 50, 100µM As (III) 0, 100, 500µM As(V)	بذور	*Oryza sativa* L. cv. lalat
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	CAT, POX, MDA	0, 50, 100, 200, 300µM (Cd)	بذور	*Arachis ypogaca* L. cv л-24

Spectrophotometric	Thiol, AA, Polyamines	0, 12.5, 25, 50, 100 and 200µM (Cd) 0, 50, 100, 200, 400 and 800µM (Zn)	معلق خلوي	*Picea tubous Sarg.*
Spectrophotometric, immunofluor, Isoenzyme and transcript	H_2O_2, Ascorbate, GSH, APX, SOD	0, 3, 10, 30µM Cd and Hg	كالس	*Medicago sativa* L. cv. Azagon
Spectrophotometric	SOD, APX, GR, GSSG, GSH	0, 10, 25, 50, 100, 250µM (Cd)	كالس	*Sesbania drummondii*
Spectrophotometric	SOD, CAT, POX, PP, FRAP	0.1, 0.5, 1, 3, 6mM (B)	نموات خضرية	*Malus domestica* Borkh. Rootstock MM 111
Spectrophotometric and fluorescein dye	MDA, GSH, GSSG, Phytocelatins, and ROS mes	150µM (Cd)	كالس	*Helianthus annuus* L. cv. Mycosol
Spectrophotometric	GSSG, Ascorbate, Ros mers,Dehydro-ascorbate Phytochelatins	150µM (Cd^{+3}, Al^{+3}, Cr^{+3})	كالس	*Helianthus annuus* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, CAT	0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1mM	كالس	*Saccharum officinarum* L.
Spectrophotometric	MDA, AsA, GSH, SOD, PAL, TSS, AA, Phenol, Flavonoid, H_2O_2 and O_2 mes, PAL, APX, CAT, POX	0, 5, 10, 15, 20Gy (gamma radiation (Co^{60})	كالس	*Rosmarinus officinalis* L.

Spectrophotometric and Isoenzyme variations	MDA, AsA, SOD, APX, CAT, POX	Different culture systems	كالس	*Gladiolus hybrida* Hort. Cv. Wedding Bouqet
Spectrophotometric	SOD, CAT, GR, GST	Paraquat, 2,4-D, dicamba	كالس	*Solanum tuberosum* L.
Isoenzyme variations	SOD, POX	0, 20, 50, 100, 200 Gy (gamma radiation (CO60)	كالس	*Vigna radiate* L. Wilczek
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, GR, GPX, MDHAR, DHARA, ROSmes	Bioreactor culture	قطع من العقد	Apple M9 EMLA
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, CAT MDHAR, GR, GST, DHARA, GPX, LOX, GSH, GSSG, MDA	Bioreactor culture	زهيرات	*Euphorbia millii* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme Variations	CAT, POX, H_2O_2 and FRAP	MS (+Fe) control MS(-Fe) MS(5mM) $NaHCO_3$ 0.5g ($CaCO_3$) (pH6.9) and MS (10mM) $NaHCO_3$ 0.5g ($CaCO_3$) (pH7.3)	نموات خضرية	*Pruuns* rootstocks (Barrier, Cadaman, Saint Julien
Spectrophotometric	SOD, APX, CAT MDHAR, POX GR, DHARA, GPX, LOX, PP, Ethylen, Lignin, ASA, MDA	Changing concentration of agar from 0.8% to 0.58%	نموات خضرية	*Dianthus caryophyllus* L. (cv. Oslo, Killer, and Alister)
Spectrophotometric	Proline, GPX, Ethylene, and Polyamines	Changing concentration of agar from 0.8% to 0.25% gelrite	نموات خضرية	*Prunus avium* L.

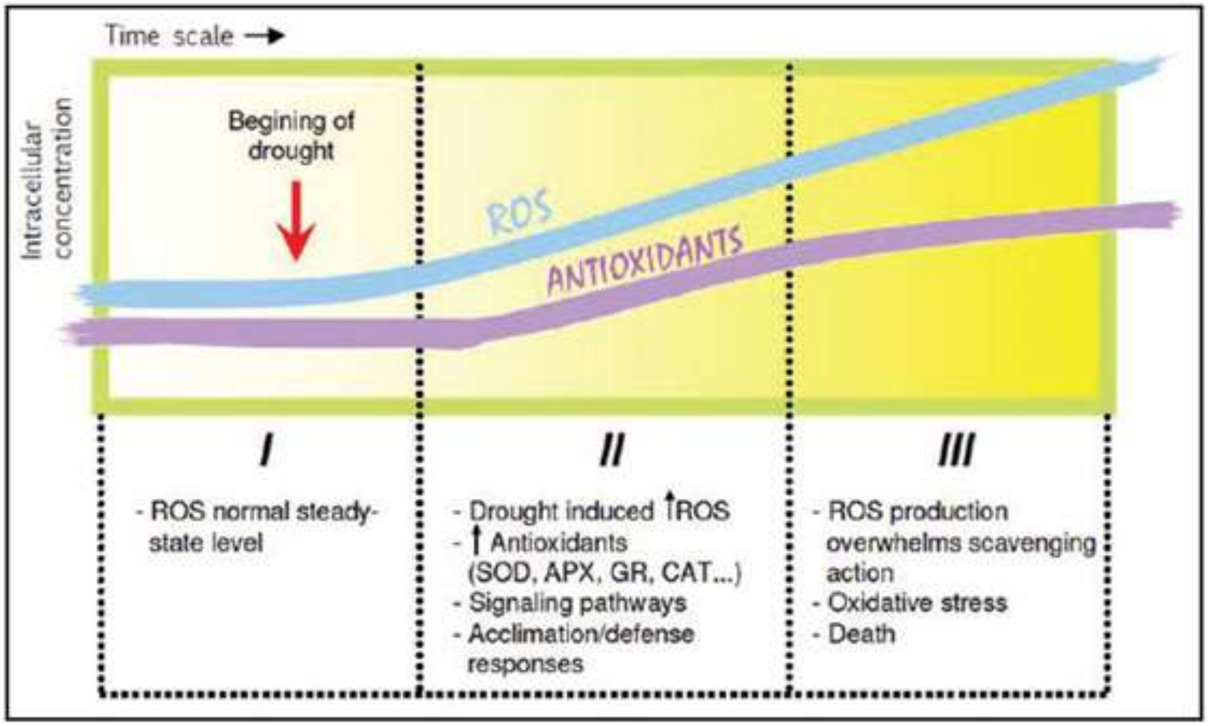
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	APX, CAT, MDA, GSH, PP, EPR	0, 13 and 27.8 Mg^{-1} $FeSO_4$	بذور	*Borage officinalis* L.
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	PP, CARs, CAT, SOD	Control MS (+Fe) and MS (+1mM $KHCO_3$)	نموات خضرية	*Prunus cerasifera* rootstocks Mr52L/5
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, CAT, POX	Drought (PEG)	نهايات الأفرع	*Beta vulgaris* L. cv. Felicta
Spectrophotometric	SOD, APX, CAT, POX, GR, H_2O_2, MDA, Pro, PP, TS, GB, Phenols	NaCl	بروتوبلاست	*Citrus limon* L. Burm f. cv. Feminello
Spectrophotometric	SOD, APX, CAT, POX	Drought (PEG)	عقد	*Solanum tuberosum* L. cv. Agat and Konsul
Spectrophotometric	SOD, APX, CAT, Pro, POX	NaCl	كالس جنيني	*Zoysia matrella* [L.] Merr.
Spectrophotometric	SOD, APX, CAT, POX	NaCl	عقد	*Solanum tuberosum* L. cv. Granola
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, CAT, DHAR, MDAR, GR, H_2O_2, O_2, CARs, PP, ROS scavenging	Atrazine	نبيتات	*Arabdopsis thaliana* (ecotype Colombia, Co10)
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	GR, APX, GS, LOX	Paraquat	حامل الورقة	Poplar clones *(Populus X Canescens)*
Spectrophotometric	SOD, APX, GR, Pro	NaCl	كالس	*Chrsanthemum morifolium* Ramat.cv.

Spectrophotometric	SOD, CAT, Pro	NaCl and drought	كالس	Maghi Yellow *Cynodon transualensis* X *C. dactylon* cv. Tifeagle
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, DHAR, MDAR, GR, H_2O_2, DPPH, PP, AsA, PP, CaRs, Pro.	NaCl	نموات خضرية	*Chrysanthemum morifolium* Ramat.cv. Regal time
Spectrophotometric	Pro, TSS	NaCl	كالس	*Saccharum sp.* cv.*CP65-357*
Spectrophotometric	Pro, Carbohydrates	Drought (PEG)	كالس	*Helianthus annuus* L. *cv.Myak*
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, AA	AEC res	كالس	*Oryza japonica* L. cv. Donganbyeo
Spectrophotometric	CAT, GR, Pro	Drought (PEG)	بذور	*Medicago sativa* L. cv. CUF
Spectrophotometric and Isoenzyme variations	SOD, APX, CAT, POX	Paraquat, Cd	معلق خلوي	*Amoracia rusticana* Geart.
Spectrophotometric	Pro, and TSS	Drought (Mannitol)	كالس	*Tagetes mututs*

المختصرات: AA =حامض أميني، CARs =كاروتينات، GB =كلايسين بيتين، Pro =برولين، PC =المحتوى البروتيني، PP = صبغات التمثيل الضوئي، TSS =السكريات الذائبة الكلية، TRS =السكريات المختزلة الكلية، FNR =إنزيم مختزل NADP فيريدوكسين، C_6PHD =إنزيم كلوكوز-6-فوسفيت ديهايدروجينيز، NADP.ICDH = NADP آيزوسايتريت ديهايدروجينيز، Transcript = تحليل الإستنساخ، SOD = بيروكسيد دزميوتيز، APX = أسكوربيت بيروكسيديز، CAT = كاتيليز، GR = كلوتاثيون ريداكتيز، GSH = كلوتاثيون مختزل.

العلاقة بين الإجهاد وتكوين أنواع الاوكسجين التفاعلية ومُضادات الأكسدة

لو أخذنا عامل الإجهاد الجفافي على سبيل المثال (شكل 11.13)، يُلاحظ وجود كمية طبيعية من ROS ومضادات الأكسدة عند المرحلة الاولى من نُقص المياه ويبدأ كلاهما بالزيادة مع زيادة النقص الرطوبي في المرحلة الثانية من الجفاف. تتكون في هذه المرحلة مجموعة من الإنزيمات التي تعمل لإعادة التوازن يُرافقها تبادل الإشارات بين المسالك الحيوية وتحصل بالنتيجة إما ان يتغلب النبات على الإجهاد في آلية التكيف أو ان يبدأ بتشغيل آلية الدفاع عن ذاته في الإستجابات الإنزيمية أو غير الإنزيمية التي أشرنا لها سابقاً. إذا لم يستطع النبات إستيعاب الإجهاد الجفافي عندئذٍ تتكون كميات كبيرة من ROS وتعمل آلية قنص الجذور الحرة بكامل طاقتها وإذا ما إستمر الإجهاد فتحصل حالة الإجهاد التأكسدي وبالتالي موت النبات وتلك المرحلة الثالثة والاخيرة.



شكل 11.13. إنموذج مُقترح للإستجابة للإجهاد الجفافي في ثلاث مراحل مُتعاقبة. (I) الحالة المُستقرة لمُستويات ROS في بداية الإجهاد. (II) زيادة في إنتاج ROS بسبب غلق الثغور مما يُحفز إنتقال إشارات الدفاع عبر المسالك الحيوية. (III) إطالة فترة الإجهاد ينتج عنها المزيد من ROS والتي تفوق توازن أنظمة عمل مُضادات الأكسدة مما يؤدي الى تسارع الأكسدة القاتلة وبالتالي موت النبات أو الخلية.

من المعروف ان الإجهاد الملحي يُقلل من فرصة توفر ماء التربة ألجاهز للإمتصاص من قبل المجموع الجذري مما يؤدي الى تداخل بين عاملي الملوحة والجفاف مما يُمكن تلك الأنواع من تحمُل الجفاف وإمتصاص المياه بكفاءة اكثر نتيجة للمرونة لتحمُل الملوحة. إضافة الى تأثير الملوحة في التوازن المائي، فالنباتات تتعرض الى مشكلة اخرى وهي زيادة تراكم الايونات الضارة داخل خلاياها قد تصل لحد التسمم. تؤثر الاخيرة وبشكل كبير في تثبيط او تلف الإنزيمات مما يؤدي الى تثبيط صنع البروتين وبالنتيجة يؤثر سلباً في تركيب ونفإذية الاغشية الخلوية وبالتالي إيقاف عملية البناء الضوئي. وفي الغالب ينتج عن ذلك تحرير أنواع الاوكسجين التفاعلي السام (ROS).

زيادة تحمُل المحاصيل للملوحة بالطرائق التقليدية Conventional methods for increasing crops salt tolerance

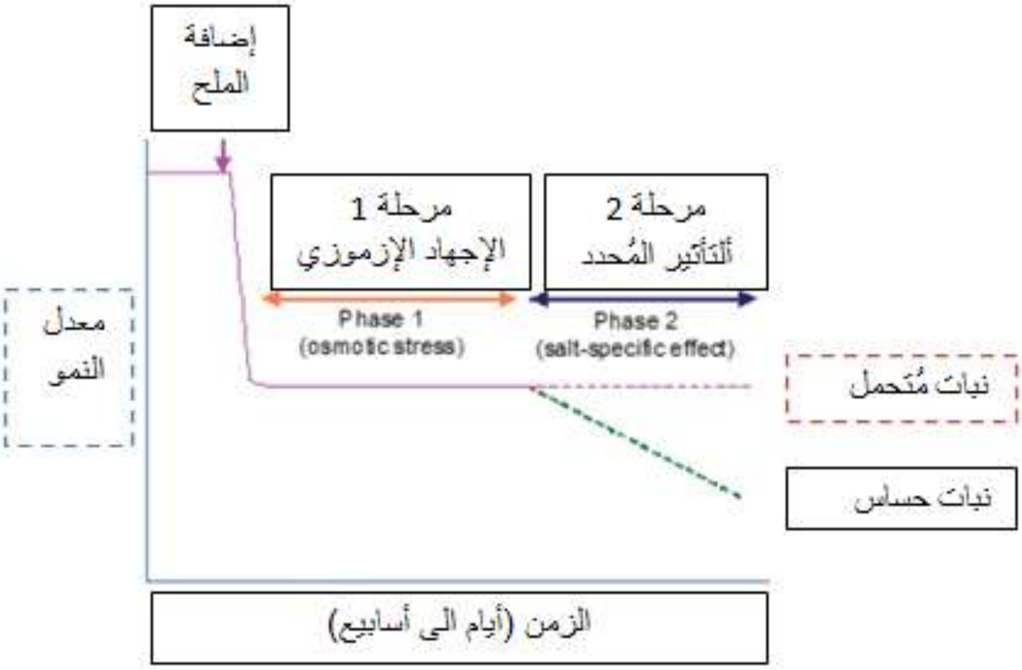
ان تحمُل عدد من النباتات الى مُستويات عالية من الاملاح (Halophytes) والاختلاف بين الاصناف في حساسيتها لتحمُل الملوحة، يؤشر وبشكل لاجدل فيه ان صفة تحمُل الملوحة تحت السيطرة الوراثية. وبالرغم من ان النباتات المُتحملة للملوحة تُشكل ما لايزيد عن 2% من الأنواع النباتية لكن افرادها تتواجد بما يقارب في نصف العوائل النباتية النامية في اليابسة ومعروفة بتنوعها. ويُعتقد بأن النباتات المحبة او المُتحملة للملوحة قد أنشأت وطـــورت آليــات التحمُل في عمليـــة التطور (Evolution) للانواع النباتية. إذ طوّرت هذه النباتات آلية خزن الايونات السامة في فجوات خلاياها وتراكمها لمحاليل عضوية لتعمل كمُنظمات إزموزية دفاعية (Osmoprotectants) في جبلة الخلية.

يتطلب برنامج تحسين النبات توفر التغارير في هذه الصفة في كل صنف نباتي او بين الأنواع المتوافقة جنسياً مما يُتيح فرصة إستنباط خطوط ذات تحمُل لهذه الصفة. تمكن الباحثون من زيادة تحمُل ملوحة العديد من النباتات بالطرائق التقليدية كزيادة تحمُل الرز والحنطة للترب المالحة والقاعدية وجهود تبذل حالياً لنقل صفة تحمُل الملوحة من الأنواع البرية القريبة من الحنطة الى حنطة الخبز. وقد ساهمت تقانات البايولوجي الجزيئي في زيادة كفاءة برامج تحسين الاصناف. اصبح من الثابت علمياً تداخل زيادة تركيز الاملاح في التربة او الوسط الغذائي مع العديد من العمليات الفسيولوجية والبايوكيميائية مسبباً مشاكل في عدم التوازن الآيوني، نقص في إمتصاص المغذيات، جهد ازموزي، سمية آيونية وإجهاد تأكسدي. تتداخل تلك العمليات مع المُكونات الخلوية ومن ضمنها الدنا، البروتينات، الدهون، والصبغات وبالتالي تؤثر في مُجمل عمليات النمو والنشوء. اصبحت حماية المحاصيل من التلف الذي تُسببه الملوحة تحدي عالمي. تستجيب النباتات

للملوحة بصورتين، الاولى، إلازموزية السريعة (Rapid osmotic phase) والتي تبدأ حال زيادة تركيز الملح حول الجذور الى مستوى العتبة (Threshold) حيث يبدأ نمو النبات بالإنخفاض بشكل جوهري. والصورة الثانية، التراكم الايوني البطئ والتي تبدأ عند تراكم تراكيز سامة من الملح في الاوراق القديمة وموتها.

آليات تحمُل الإجهاد الملحي Mechanisms of salt stress

وُضعت العديد من الفرضيات بصدد آلية تحمُل الإجهاد الملحي لعل أهمها الإستجابة بمرحلتين (شكل 11.14) والتي تفترض في المرحلة الاولى وبعد التعرض للملوحة حصول إجهاد إزموزي (Osmotic) فالنباتات الحساسة تهلك في المرحلة الاولى بينما تعبر المُتحملة الى المرحلة الثانية ذات التأثير المُحدد (Salt-specific effect). تتحمُل النباتات المُتحملة تلك المرحلة وفق حسابات فترة التعرض وتأثيرها في معدل نمو النبات.



شكل 11.14. مخطط يوضح الإستجابة للملوحة بمرحلتين.

بهدف الحماية من التاثيرات السلبية للإجهاد الملحي، طورت النباتات آليات بايوكيميائية وجزيئية، شملت الإستراتيجيات البايوكيميائية على (أ) تحفيز إنتاج إنزيمات مُضادات الاكسدة (ب) الإستقرار او التوازن الداخلي (ج) تصنيع محاليل التوافق العضوية وكما مُبين في ادناه.

1- منظومة الدفاع ضد الاكسدة (Antioxidative defense system): تتولد في المايتوكوندريا، السايتوبلازم والبيروكسيسومس وباستمرارالعديد من انواع الاوكسجين التفاعلية السامة (ROS) عند تعرض النبات الى تراكيز ملحية عالية. يؤدي ذلك الى تحطيم عملية الايض الحيوي بالتحطيم التاكسدي للدهون، البروتينات والاحماض النووية. تتكون ROS بشكل اساسي من جذور السوبر اوكسايد (O_2^-)، بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2)، جذور الهيدروكسيل (OH) والاكسجين المفرد ($^1O_2$). طورت خلايا النباتات وعبر مراحلها التطورية منظومة دفاعية ضد الأكسدة بشكليها الإنزيمي (SOD, APX, GPX, GR, CAT, etc.) وغير الإنزيمي (Ascorbate, glutathione, α-tocopherol, carotenoids, flavonoids, etc.) لحماية نفسها ضد الإجهاد الملحي.

لوحظ ومن خلال العديد من الدراسات ظهور فروقات في مستوى تعبير ونشاط إنزيمات ضد الأكسدة والتي غالباً ما ترتبط بالتراكيب الوراثية الأكثر تحمُلاً وفي حالات أقل مع الاكثر حساسية. يُعد إنزيم Superoxide dismutase (SOD) إنزيماً معدنياً (Metalloenzyme) يُحفزإقلاب Dismutation السوبر اوكسايد الى اوكسجين وبيروكسيد الهيدروجين. يتفاعل الاخير مع اهداف خلوية مُختلفة مُسبباً تلف في البروتينات والدنا والى اكسدة الدهون (Lipid Peroxidation). تزال فعالية H_2O_2 في النشاط الإنزيمي لكل من Peroxidase و Catalase. وفي الوقت نفسه، يُحفز إنزيم Ascorbate peroxidase (APX) وهو الأكثر اهميةً من بين إنزيمات Peroxidases، إختزال بيروكسيد الهيدروجين الى ماء بإستعماله القوة المُختزلة للاسكوربيت. تتمركز إنزيمات الكاتليس (CAT) في الغالب داخل البيروكسيسومس والكلايوكسيسومس وتلك الإنزيمات متشابهة ورباعية التقسيم Tetrameric homoproteins لها علاقة في إختزال H2O2 الى ماء. اما الإنزيم المُختزل للكلوتاثيون Glutathione reductase (GR) فيلعب دوراً مركزياً في دورة الأسكوربيت-كلوتاثيون (Ascorbate-glutathione cycle) في إدامة نسبة الكلوتاثيون المُختزل (Reduced glutathione) **الى** الكلوتاثيون المؤكسد (Oxidized glutathione) بنسبة مُفضلة لإختزال الأسكوربيت. والجدير بالذكر ان مسالك القنص لأنواع الاوكسجين التفاعلية (ROS) موجودة في اغلب المُكونات الخلوية وتوجد في دورة الماء-الماء في البلاستيدات. كذلك توجد دورة الأسكوربيت-كلوتاثيون في البلاستيدات، السايتوسول، المايتوكوندريا، الابوبلاست وفي البيروكسيسومس. في الوقت الذي

توجد فيه دورة إنزيمات الكلوتاثيون بيروكسيديسيس (GPX) وإنزيمات CAT في البيروكسيسومس فقط. تعمل SOD كخط دفاعي أول محولةً O_2^- الى H_2O_2 يعقبها إزالة سُمية الاخير بوساطة APX, GPX, CAT. وبالعكس من CAT، فكلاً من APX و GPX يتطلبان توليد دورة الاسكوربيت (AsA) و/او الكلوتاثيون. تستعمل الدورة الالكترونات مباشرةً من منظومة التركيب الضوئي او NADPH كقوة مختزلة.

2- الاستقرارية الآيونية Ion-homeostasis: تُسبب الملوحة في إجهادات آيونية مُحددة ناتجة من تغيير نسب K^+/Na^+ مؤديةً الى تراكم في تراكيز Na^+ و Cl^+ المحددة لنمو النبات. تحصل التغييرات في تلك النسب كنتيجة لدخول Na^+ من المسالك التي تعمل في إكتساب آيونات K^+ علماً بان المُحافظة على نسبة عالية من K^+/Na^+ في العصارة الخلوية يُعد المفتاح المطلوب لنمو النبات تحت ظروف الشد الملحي العالي. توظف النباتات إستراتيجيات مُختلفة للحفاظ على نسبة عالية من K^+/Na^+ في العصارة الخلوية (Cytosol) من خلال تقليلها من دخول آيونات Na^+ داخل الخلايا وايضاً بإستبعادها لآيونات الصوديوم خارج الخلية والفجوات. توفر آلية الإستبعاد الآيوني درجة من التحمُل لتراكيز واطئة من NaCl ولكنها لا تعمل وللاسف في التراكيز العالية من الملح. يمكن ولحد كبير الحفاظ في إستقرارية لآيونات البوتاسيوم في محلول الخلية بمنعها من تسرب K^+ من الخلية من خلال زيادة نشاط إنزيم H^+/ATPase. تولد الحالة الاخيرة تدرج الكتروني لصالح عملية النقل الآيوني. تُسبب زيادة فعالية ضخ البروتونات (Proton pumping) بمد قوة التبادل الآيوني في غشاء البلازما بإتجاه إستبعاد Na^+ خارج السايتوبلازم وحشره في الابوبلاست (Apoplast) وبالتالي تقليل العبئ الذي تتحمُله العصارة الخلوية من Na^+. تقع مواقع التبادل الآيوني نوع NHX (Na^+/H^+) والتي تسبب في زيادة تحمُل الملوحة للعديد من الأنواع النباتية في غشاء الفجوة (Tonoplast) بعد دفعها باتجاه تراكم Na^+ داخل الفجوة. اكتشف حديثاً تعبيراً عالياً في الطماطم المُحورة وراثياً لمواقع التبادل الآيوني داخل الفجوة (AtNHX1) عند نقل جين من نبات الأربدوبسس (*Arabidopsis thaliana*) الى الطماطم وعليه يُعتقد بان بروتين NHX يلعب دوراً أساسياً في تراكم K^+ بين العصارة الخلوية والفجوة مما يؤثر في تغذية النبات بالبوتاسيوم وتحمُل Na^+.

3- تراكم محاليل التوافق (Accumulation of compatible solutes): تُقنن النباتات المُعرضة للإجهاد الملحي من سحبها للملح وتقوم بتعيير الضغط الازموزي بتصنيعها لمحاليل التوافق العضوية والتي تمتاز بوزنها الجزيئي الواطئ وكونها مركبات سريعة الذوبان وغير سامة للخلايا بالتراكيز العالية. تشمل تلك المُركبات البرولين، سكروز، بوليولس (Polyols)، تريهالوز، ومركبات الامونيوم الرباعية (Quaternary ammonium compounds, QACs) مثل الكلايسين بيتين، الألنين بيتين، برولين بيتين،

هيدروكسي برولين بيتين والمركبان Choline O-sulfate و Pipecolatebetaine. لعل البرولين من اكثر المُركبات التوافقية الذي خضع للدراسة واتفقت الكثير من الدراسات في دوره الجوهري في حماية النبات من الجهد الازموزي. أُقترحت العديد من الفرضيات لوظائف البرولين المتراكم في الانسجة النباتية لتشمل المعايرة الازموزية، خزين كربوني ونتروجيني ليساعد في نمو النبات بعد تحمُله الإجهاد، ازالة سمية الامونيا الزائدة، استقرارية الاغشية، حماية عملية التركيب الضوئي وعمل المايتوكوندريا، ومسك الجذور الحرة. لكن لا يزال دور تراكم البرولين في المُعايرة الازموزية مثار جدل ويعتمد على النوع النباتي. تراكم الكلايسين بيتين هو الآخر دُرِسَ بغزارة في النباتات المُعرضة للإجهادات الملحية والجفاف والحرارة وسُجِلَ دوره كمُنظم للإزموزية، مُثبت لتركيب وفعالية الإنزيمات ومُعقدات البروتين وفي المُحافظة على كيان الاغشية الخلوية ضد التاثيرات الضارة للاملاح.

تقانات إنتخاب نباتات مُتحملة للملوحة خارج الجسم الحي Techniques for selecting salt tolerant plants using *in vitro* techniques

توفر تقانة زراعة الخلايا والانسجة والاعضاء على وسط حاوٍ على عامل الإنتخاب (Selective agent) الفرصة لتوالد نباتات مُتحملة للملوحة. تشمل عوامل الإنتخاب التي تضاف الى الوسط الغذائي بتراكيز تحدد وفق منحنى تثبيط النمو ملح كلوريد الصوديوم، خليط من الاملاح لتمثل الواقع الحقيقي للترب المتأثرة بالملوحة، أحماض عضوية لها دور في تنظيم إزموزية الخلايا النباتية، عينات من ماء البزل (يعاب عليها بانها قد تحتوي على ملوثات مختلفة كالمعادن الثقيلة وغيرها). تنجو الاجزاء النباتية وما يشتق منها من كالس ومعلقات خلوية وانسجة وبروتوبلاستات المُتحملة لعامل الإجهاد الملحي المضاف ويستبعد ما عدا ذلك. أُقترحت عدة وسائل او طرائق في انتخاب نباتات مُتحملة للملوحة اهمها الإنتخاب التدريجي لمدد زمنية طويلة (Stepwise long-term selection methods) حيث تعرض الزروعات الى الإجهاد بتراكيز تزداد تدريجياً الى حد الوصول الى التركيز تحت القاتل. وقد تعرض الزروعات الى صدمة من عامل الإنتخاب (Shock treatment) إذ تُعرض مباشرة الى تركيز ملحي عالي تنجو الخلايا المُتحملة وتهلك الحساسة. تبنى الطريقتان على تحفيز التغاير ضمن الخلايا او الانسجة او الاعضاء المزروعة حيث تحفز الزراعة النسيجية في حصول تغاير يظهر في النباتات المتوالدة نتيجة التغاير الجسمي الذي يحصل تحت ظروف الحد الادنى من التداخل البيئي لكون ظروف الإنتخاب مسيطر عليها. بالرغم من المحاسن العديدة للانتخاب ولكن هناك محددات لعل اهمها فقدان الاخلاف بعد الإنتخاب وضعف الارتباط بين الإنتخاب خارج الجسم الحي وواقع نمو النبات الكامل تحت ظروف الحقل وايضاً الى ظاهرة التكيف فوق الوراثي التي قد

تحصل (Epigenetic adaptation). قد لاتحصل الحالة الاخيرة وتكون التغايرات فوق الوراثية ثابتة وتورث أثناء الانقسام الخيطي فقط وليس من الانقسام الاختزالي ولهذا يكون البحث عن الطوافر الحقيقية (True mutants) التي تتورث بالانقسام الاختزالي وباستعمال عوامل انتخاب محددة. أُنتجت العديد من الأنواع النباتية المُتحملة لملح كلوريد الصوديوم منها القرنابيط، الخردل، السلجم، الداؤودي، السجاد، النارنج، الليمون، البرتقال، نجيل برمودا، الفراولة، فول الصويا، الشعير، زهرة الشمس، البطاطا الحلوة، الكتان، الطماطة، الجت، التبغ، الرز، قصب السكر، البطاطا، الحنطة.

هندسة النباتات وراثياً لتحمُل الإجهادات Plant genetic engineering for stress tolerance

سبق وان تم التطرق بإسهاب عن العلاقة بين الوراثة والبيئة في مُقاومة أو تكيف النبات للإجهادات. ويوضح جدول 11.5 كيف تتحفز العديد من الجينات ذات العلاقة في تصنيع البروتينات المختلفة لكي تدفع بالنبات في تحمُله للإجهاد. ولكل من الجينات التي يزداد تعبيرها الوراثي الوظائف المُناطه به. ويلاحظ أن قسماً من تلك الجينات قد تم نقلها من مصادر غير نباتية مما يفتح الباب للبحث عن جينات تحمُل الإجهادات في المملكتين النباتية والحيوانية. يبين جدول 11.6 أمثلة مُنتقاة عن تحسين صفات مرغوبة في مجموعة من النباتات بعد نقل جينات تحمُل الإجهادات اليها.

جدول 11.5. بعض الأمثلة عن الجينات التي تتحفز نتيجة الإجهاد الإزموزي ونواتجها

الجينات	البروتينات	وظائف الجينات
P5CCS, MtlD, IMT, ADC, ODC, CMO, Osmotin	إنزيمات لتصنيع البرولين، البوليولس، مانيتول، اونيتول، فراكتان، تريهالوس، أمينات متعددة، بيوترسين، مركبات الامونيا الرباعية	مجموعة جينات تشترك في تصنيع المُركبات التوافقية
AFPI, AFP2, LEAI, Dehydrins, HVAI, LEAIV, COR14, COR15, Osmotin	بروتينات ضد الإنجماد، بروتينات LEA، اشباه البروتينات LEA، أوزموتين	جينات تشفر لعوامل حماية الماكنة الخلوية
γTIP، PM28A, AthH2، AHA3، PMA2، LCA1، HKt1، AKt2، AtNHX1	بروتينات القنوات المائية، اكوابورينات، بروتينات النقل، H^+ATPase، Ca^{+2}ATPase، نواقل K^+،	جينات تشفر لبروتينات الاغشية

	Na^+/H^+antiporter	
جينات بروتينات مسك جذور الاوكسجين الحرة	Superoxidase dismulate Ascorbate peroxidase Glutathion synthetase Glutathion reductase	*Cu/Zn SOD, MnSOD, FeSOD* *APX* *GS* *GR*
جينات تشفر لعوامل الاستنساخ	Catalase Glyoxalase عوامل إرتباط الإستجابة للاثيلين Basic domain leucine zipper (BZIP) Myb&Myc like proteins	*Catalase* *GLY1, GLY11* *CBF1, Tsi, DREBF1* *ABF3, ABF4* *Atmy2, rd22BP1*
جينات تشفر ل Protein kinases	MAPK MAPKK MAPKKK Ca^{+2} dependent protein kinases	*At MPK 3/6, AtMPK4* *At MPKK 4/5, At MKK 1/2* *At MEKK1, At ANP1* *At CDPK1, At CDPK2*

جدول 11.6. أمثلة لمحاصيل حُورت وراثياً لتحمُل الإجهادات اللاأحيائية

المحصول	الجين المُدخل	مصدر الجين	سلوك المحصول تحت ظروف الإجهاد
الحنطة	*HVA1*	الشعير	تحسين الكتلة الحيوية تحت ظروف نقص الماء

الحنطة	*HKT1*	الحنطة	زيادة النمو في ترب متملحة
الحنطة	*MtlD*	*E. coli*	تحسين النمو تحت ظروف نقص الماء والملوحة
الرز	*CodA*	*A. globiformis*	التعافي السريع من صدمة ملحية
الرز	*CodA*	*A. globiformis*	تحمُل ضد الإجهاد الملحي
الرز	*GS2*	الرز	زيادة التحمُل للملوحة والبرودة
الرز	*PSCS*	فراشة الباقلاء	زيادة الكتلة الحيوية تحت ظروف الإجهاد المائي والملحي
الرز	*OSCDPK7*	الرز	زيادة التحمُل ضد الجفاف، الملوحة والبرودة
الرز	*HVA1*	الشعير	زيادة معنوية في تحمُل الملوحة والجفاف
الرز	*PMA80&PMA1959*	الحنطة	زيادة تحمُل الجفاف والملوحة
الرز	*ADC*	الشوفان	زيادة تحمُل الجفاف والملوحة
الرز	*SAMDC*	Tritoxleum	زيادة تحمُل NaCl
الرز	*Catalase*	الحنطة	زيادة التحمُل لإنخفاض T
الرز	*OtsA+OtsB*	*E. coli*	تحمُل إجهادات الملوحة والجفاف والبرودة
الرز	*TPS+TPP*	*E. coli*	تحمُل إجهادات الملوحة والجفاف والبرودة
الخردل	*Glutathione synthetase*	*E. coli*	زيادة تراكم Cd وتحمُله
الخردل	*Glutathione synthetase*	*E. coli*	تراكم Cd وتحمُله باستهداف الكلوروبلاست
الخردل	*CodA*	*A. globiformis*	تحمُل الملوحة والجفاف

الخردل	*AtNHX1*	الأربدوبسس	زيادة تحمُل الملوحة
الخردل	*Osmotin*	التبغ	زيادة تحمُل الملوحة والجفاف
فول الصويا	*Antisense P5CR*	الأربدوبسس	زيادة تحمُل الجفاف
الجت	*MnSOD*	التبغ	زيادة تحمُل البرودة
الجت	*MnSOD*	التبغ	زيادة تحمُل الجفاف
الجت	*MnSOD*	التبغ	زيادة تحمُل البرودة
الجت	*FeSOD*	الأربدوبسس	زيادة تحمُل البرودة
الجت	*MitMnSOD+Chl MnSOD*	التبغ	تحسين الكتلة الحيوية
الجت	*Alfin*	الجت	تحسين تحمُل النبات للملوحة
القطن	*MnSOD*	---	تحسين تحمُل النبات للأكسدة الضوئية وإنخفاض درجات الحرارة
القطن	*Apx*	البزاليا	حماية منظومة التركيب الضوئي ضد البرودة المتوسطة ومُستويات الضوء العالية
القطن	*GR*	الأربدوبسس	حماية ضد البرودة وكثافة تدفق الفوتونات
البطاطا	*Cu.ZnSOD*	الطماطة	زيادة التحمُل ضد الإجهادات التأكسدية
البطاطا	Osmotin like protein	البطاطا	زيادة تحمُل النبات لمرض اللفحة المتأخرة
البطاطا	*Osmotin*	التبغ	زيادة التحمُل للجفاف والملوحة
البطاطا	*AFP* (بروتين تركيبي ضد البرودة)	السمك المفلطح	زيادة تحمُل البرودة
البطاطا	*OtsA, QtsB*	*E. coli*	عدم تراكم سكر التريهالوس
البطاطا	*TPS1*	*S.cerevisiae*	تحسين التحمُل للجفاف

البطاطا	*Glyceraldehyde-3*	المحار	تحسين تحمُل الملوحة
البطاطا	Phosphate dehydrogenase	فطر المشروم	تحسين تحمُل الملوحة
البطاطا	*CDSP32*	البطاطا	زيادة تحمُل الضرر التاكسدي
الطماطم	*HAL1*	الخمبرة	تحسين تحمُل الملوحة
الطماطم	*ATNHX1*	الأربدوبسس	تحسين حاصل الثمار وإنتخابية K^+/Na^+
الطماطم	*CBF1*	الأربدوبسس	زيادة التحمُل الى 200mM من NaCl
الطماطم	*CBF3*	التبغ	زيادة تدريجية في تحمُل البرودة والاكسدة
الشوفان	*HVA1*	الشعير	تحمُل مُستويات ازموزية عالية
الجزر	*ODC*	فئران	لم تدرس الإستجابة للإجهادات اللاأحيائية

تحليل الطفرات الوراثية Analysis of mutations

تُعد عملية تحليــل الطوافر (Mutants) في الكــشف عــن الطــفرات الوراثية (Mutations) مهمةً للغاية في غربلة الطفرات المؤثرة في إستجابة نبات ما لعوامل الإجهاد وتحديد الجينات المسؤولة عنها. إذ تم تحليل وتحديد الطفرات ذات الصلة بزيادة او انخفاض تحمُل ألجفاف والملوحة والبرودة. وبعد اكتشاف تقانات DNA microarray حديثاً، أصبح بالإمكان السيطرة على التعبير الجيني وتحديد الجينات المسؤولة عن ما يحصل من زيادة او إنخفاض في تحمُل عوامل الإجهاد. عموماً وُظفت الهندسة الوراثية في مجال تحمُل النبات للملوحة وفق إستراتيجيات متنوعة منها زيادة قابلية النبات في زيادة مُستويات سحب آيونات الاملاح من التربة وكذلك في زيادة طرح أو التخلص من آيونات الاملاح الضارة إضافة الى زيادة مقدرة النبات في تراكم آيونات الاملاح في فجوات خلاياه على ان لا تؤثر في الوظائف الخلوية المعروفة. وأصبحت الجينات المسؤولة عن تراكم المُركبات ذات الحماية الازموزية (Osmoprotectants) هدفاً لِمُهندسي النباتات وراثياً من أجل زيادة تراكم هذه المُركبات وبالتالي زيادة تحمُل النبات الهدف لعوامل الإجهاد.

وبالرغم من ان زيادة التعبير الجيني لهذه المُركبات زاد من تحمُل النبات للإجهاد ولكن سُجل وفي حالات عديدة نُقص في إنتاجية النبات عند زراعته تحت ظروف عدم الإجهاد. يُسيطر على عملية سحب الاملاح من قبل النبات مجموعة من نواقل الآيونات (Ion transporters) لتنتقل عبر الاغشية الخلوية بوساطة بروتينات خاصة تدعى Trans-membrane proteins والتي بدورها تكون مسؤولة عن سحب آيونات البوتاسيوم. واصبح معلوماً بأن تدفق الآيونات من النبات يعتمد على فعالية جين SOSI إختصاراً الى Salt overly sensitive 1 والذي تم توصيفه في نبات الأربدوبسس وحديثاً تم تشخيصه في الرز وسُجل أيضا وجود نواقل في أغشية الفجوات تلعب دوراً في ضخ الايونات داخل الفجوات والتي يُشفرها جين ATNHXI في نبات الأربدوبسس.علماً بأن بروتينات NHXI متوفرة في العديد من المحاصيل وعُزلت منها بنجاح وسجلت زيادة في التعبير الجيني لجينات NHXI في نباتات الأربدوبسس والرز والطماطة مما ادى الى زيادة تحمُلها للشد الملحي.

خُلاصة لما سبق، تُعد صفة تحمُل الملوحة من الصفات المُعقدة على المستويين الفسيولوجي والجزيئي وتتأثر في نفس الوقت كثيراً بالعوامل البيئية المؤثرة في النبات. إضافة لذلك تختلف درجة السيطرة الوراثية بأختلاف مراحل نمو النبات فدرجة تحمُله في مرحلة النضوج ليس بالضرورة مرتبطا بتحمُل نفس النبات وهو في مرحلة البادرة او الإنبات. فعلى سبيل المثال تتأثر مرحلة إمتلاء السُنبلة بالبذور في نبات الرز اكثر مما عليه عندما يكون النبات في مرحلة النمو الخضري عند وجود تراكيزعالية نسبياً من الاملاح في التربة وهذا ما يزيد من تعقيد صفة تحمُل الملوحة. من الصعب إجراء تجارب حقلية بهذا الخصوص بالنظر لتغاير تراكيز الاملاح في الترب ونوعها وقد يُصاحب ذلك وجود مُلوثات في التربة ومياه الري مما يُعقد الموضوع أكثر مما هو مُتوقع. وعليه فالتجارب المُختبرية على المُستويات النسيجي والخلوي والجزيئي مُهمة من أجل زيادة فهم آلية التحمُل وإمكانية نقل جينات التحمُل من نبات مُتحمُل لآخر حساس.

الآفاق المُستقبلية في زيادة تحمُل المحاصيل للملوحة Future prospectives for increasing crop salt tolerance

وضع المُختصون مجموعة إستراتيجيات مُستقبلية لزيادة تحمُل المحاصيل للإجهاد الملحي والتي يُمكن تلخيصها كما يلي:

صفة الحاصل: بغض النظر عن التحمُل أو الحساسية فالحاصل وحده مهم جداً ولابُد من التركيز في حاصل النبات فلافائدة من زيادة تحمُل النبات بدون الحفاظ على كمية حاصل إقتصادية.

تربية الطفرات: التركيز على تصميم تراكيب مظهرية ووراثية من توظيف تقانة تربية الطفرات. تُعزل الطوافر وتُختبر في صفاتها المظهرية وكمية الحاصل ونوعيته.

الغربلة ضمن التراكيب المظهرية: يجب ان تُستثمر التغايرات الوراثية الموجودة ضمن وبين الأنواع النباتية وإنتخاب الاشكال المظهرية الجيدة خاصة في المحاصيل التي يُستفاد من حجم مجموعها الخضري مثل محاصيل العلف.

إجراء التضريبات: ضرورة غربلة الجبلة الوراثية (Germplasm) في النباتات البرية ونقلها الى النباتات المستزرعة بعد إجراء التضريبات الواسعة وبحدود التوافق بين الأنواع وإستثمار التقانات الحديثة مثل هندسة النبات وراثياً ودمج البروتوبلاستات.

إستثمار النباتات المُتحملة للملوحة: وضع خُطط للإستفادة القصوى من الأنواع النباتية المُتحملة لمُستويات عالية من الملوحة (Halophytes) ونقل صفة التحمُل الى المحاصيل الإستراتيجية بالوسائل أعلاه.

التحوير الوراثي: ضرورة تحوير المسالك الحيوية للمُركبات الثانوية أو إشاراتها ذات العلاقة بزيادة تحمُل المحاصيل للملوحة.

الخرائط الوراثية: ضرورة التحري عن الخرائط الكروموسومية لجينومات النباتات وإكتشاف تتابعاتها إعتماداً على التحاليل المُبنية على تقانة QTL.

تحريات على مستوى الجينوم: التحري عن البروتينات المُرتبطة بمجينات النبات (Proteomics) ذات العلاقة بتحمُل الملوحة.

ألأنظمة البايولوجية: ربط الصفات الناتجة من غربلة الطفرات الوراثية والإستفادة من التعاقبات الجينومية والوراثة الخلوية والمعلوماتية الحياتية.

الفصل الثاني عشر: إنتاج الوقود الحيوي من مصادر نباتية

Biofuel Production from Plant Sources

مقدمة Introduction

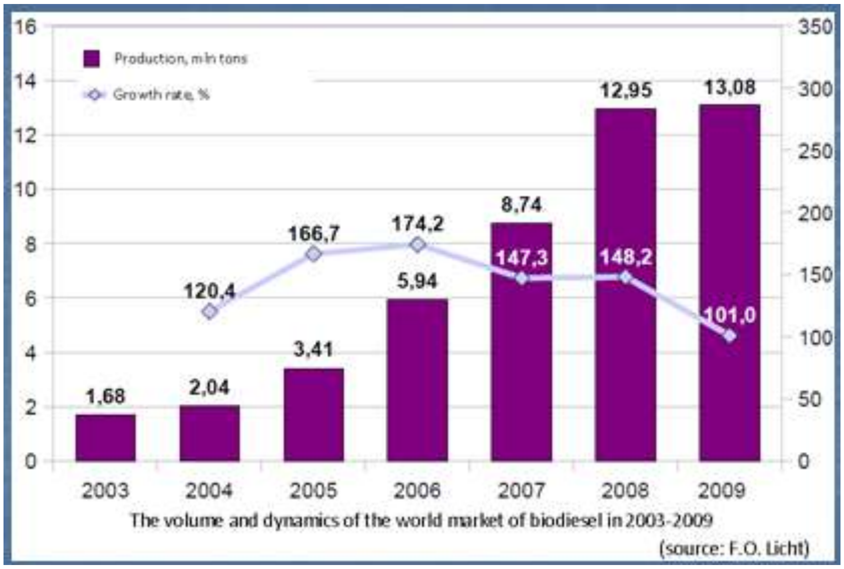
تعتمد دول العالم حالياً بشكل رئيس على ما يُسمى بالطاقة الاحفورية (Fossil fuel) التي تُستخرج من باطن الأرض والتي تتمثل بالنفط والغاز والفحم الحجري والمعادن وغيرها. وما يُميز هذا النوع من الوقود أنه يحتاج الى ملايين السنين لغرض تكوينه وقابل للنفاذ لمحدودية الخزين تحت الارض وحاجته الى كُلف عالية وتقانات مُتقدمة لإستخراجه من باطن الأرض. ومن المشاكل المعاصرة التي تستوجب الحل هو طرح كميات كبيرة جدا من الملوثات الى البيئة وغالبا ما يحتاج الى رؤوس أموال كبيرة لمُعالجتها نتيجة عمليات الإستخراج والتكرير ومختلف النشاطات الصناعية. وبالمقابل، يُعد الوقود الحيوي صديق للبيئة نوعاًما لقابليته للتحول الحيوي وبكُلفة إنتاج مناسبة وبوسائل سريعة لا تحتاج الى تكنولوجيا متقدمة. واهم ما يُميز هذا النوع من الوقود كونهِ مصدرا مُتجددا للطاقة إذ انه موجود طالما وِجدت الكائنات الحية وخاصة الطحالب والنباتات الراقية ولربما يحد من تذبذب أسعار الوقود الحالية.

أُشتقت كلمة الوقود الحيوي Biofuel من الكتلة الحيوية Biomass سواء كانت حيوانية او نباتية المصدر. وتطورت تقانات إنتاج الوقود الحيوي وبخطى مُتسارعة أثناء العقد الاول من القرن الواحد والعشرين فأُنتجت أجيال مُتعاقبة منه. أُنتج الوقود الحيوي في الجيل الاول من الزيوت النباتية والكحول الحيوي والغاز الحيوي والوقود الحيوي الصلب. واستُعملت في إنتاج الوقود الحيوي في الجيل الثاني محاصيل غير غذائية ومُخلفات نباتية ذات مصادر غنية بالسليلوز والكربوهيدرات بشكل عام.

أما في الجيل الثالث فتم التركيز على الطحالب لوفرتها في الطبيعة وإمكانية إنتخاب سلالات عالية الإنتاج مع إمكانية إنشاء مزارع طحلبية في أغلب مكانات الكرة الارضية وبذلك لا حاجة لتكاليف مد أنابيب لمسافات بعيدة أي إمكانية إنتاجه قرب مصادر الإستهلاك. وقد تم تطوير الجيل الثالث الى الرابع بتحويل زيت الطحالب الى بنزين بمواصفات عالية. حصلت زيادة مُضطردة في إنتاج وقود الديزل في العقد الماضي لترتفع الكميات ألمُنتجة من 1.68 مليون طن عام 2003 لتصل الى 13.08 مليون طن عام 2009 (شكل 12.1).

المصادر النباتية للوقود الحيوي Plant sources for biofuel

يُنتج الإيثانول من مواد مُختلفة كالحبوب والسُكريات والمولاس التي تُعد غنية بالكربوهيدرات ويُمكن زراعتها موسمياً على نطاق واسع ولا تنافس كثيراً الإحتياجات اليومية للبشر.

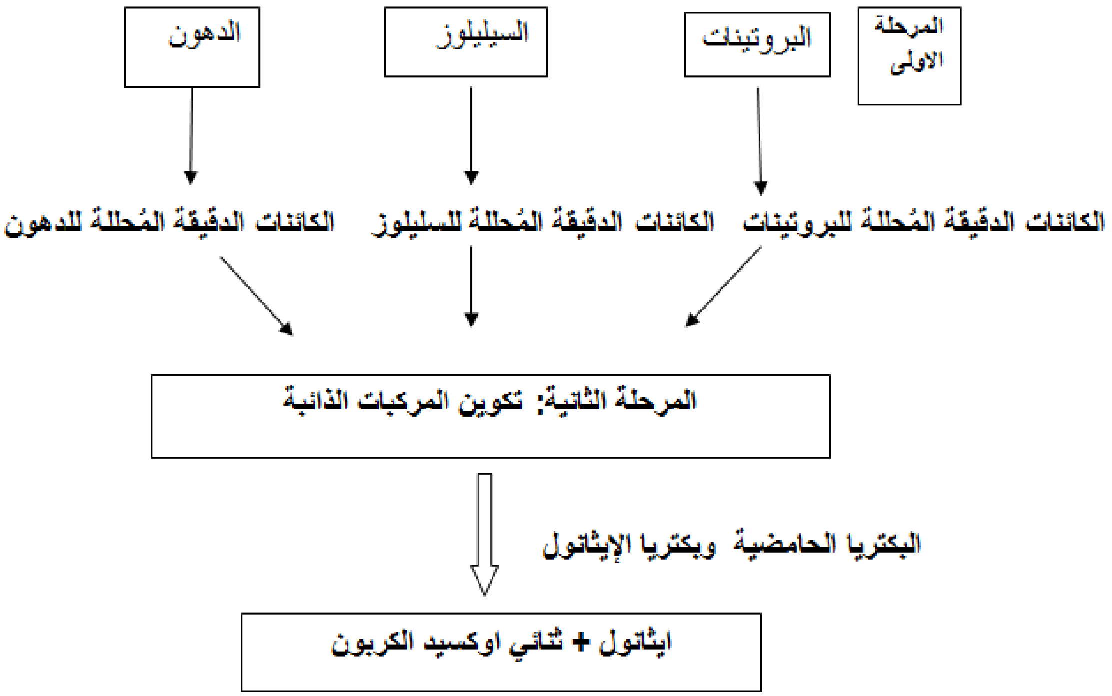


شكل 12.1. الإنتاج العالمي ونسب نموه لوقود الديزل للأعوام من 2003 ولغاية 2009.

تتم عادة الإستفادة الكاملة من المُركبات التي يصنعها النبات في عملية التصنيع الضوئي من كربوهيدرات وبروتينات ودهون (شكل 12.2). وتُستثمر الكائنات الدقيقة المُحللة لكل نوع من المُركبات الأساسية كخطوة أُولى في مرحلة التحلل ليَنتج منها مُركبات مُتحللة في الخطوة الثانية لتعمل عليها البكتريا التي تُفضل العيش والعمل على تحلل تلك المُركبات في وسط حامضي واخيراً تقوم البكتريا ألمُنتجة للإيثانول بتحويل تلك المُركبات الى إيثانول وثنائي اوكسيد الكربون كناتج عرضي.

برزت حاجة مُلحة لتحويل (Conversion) ما يُسمى باكاز قصب السكر (Sugar cane bagasse) والقش الناتج بعد عمليات الإستخلاص من خلال مُعاملات أولية مُناسبة وفي التخلص من بلمرة السليلوز وتحلل السُكريات المُتحررة، مما يخلق تحدي في إنتاج الإيثانول من مصادر سليلوزية. لذا يَستوجب الامر البحث عن سلالات بكتيرية تُحول السليلوز الى سُكريات الهكسوز والبنتوز وبالتالي الى إيثانول. ولا يقتصر الموضوع على نبات قصب السكر بل يتعداه الى مجموعة كبيرة من المحاصيل أغلبها ذات طبيعة صناعية

وغذائية بشرية وحيوانية مثل فول الصويا، البنجر السكري، الذرة الصفراء، البطاطا الحلوة وغيرها (جدول 12.1). ويلاحظ من الجدول تفاوت المحاصيل في إنتاجيتها من الوقود في وحدة المساحة وانها تعد ذات إنتاجية مُنخفضة اذا ما قورنت مع إنتاج الطحالب من الوقود الحيوي.



شكل 12.2. المراحل الرئيسة لتحول نواتج التصنيع الغذائي الى إيثانول وثنائي اوكسيد الكربون.

بالرغم من إحتواء المحاصيل الزيتية نسب لا يُستهان بها من الزيت، إلا ان بعض أنواع النخيل تُعد الأعلى إنتاجاً من الزيت. الملاحظ من الجدول بأن غالبية المحاصيل المذكورة تستعمل زيوتها في الإستهلاك البشري وتؤثر سلباً على مصادر الزيت فيما إذا زُرعت في مساحات واسعة لأغراض إنتاج الوقود الحيوي وهذا بالتأكيد أحد التحفظات على إستثمار زراعة تلك المحاصيل في إنتاج الوقود الحيوي. يبذل المختصون جهوداً كبيرة من أجل الإستفادة من مُخلفات تلك المحاصيل وغيرها والتي لا تدخل مُباشرة بالسلسلة الغذائية للإنسان أو الحيوان ومن هنا جاء التفكير في الجيل الثاني والثالث من الوقود الحيوي بالإستفادة من المُخلفات النباتية وتحليل المركبات السيليلوزية وغيرها بعد الإستعانة بالأنظمة الميكروبية والإنزيمية في تحلل تلك المُنتجات.

قصب السكر كإنموذج لإنتاج الإيثانول الحيوي Sugarcane as an example for bioethanol production

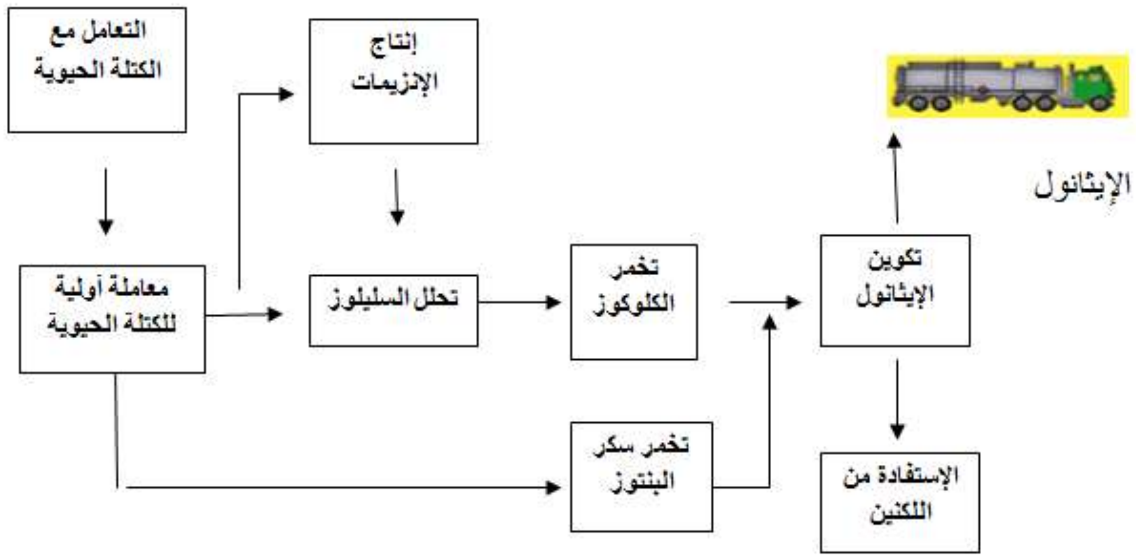
تُعد البرازيل أكثر الدول إنتاجاً وتصنيعاً للإيثانول من قصب السكر اذ قُدرت الكميات ألمُنتجة عام 2012-2013 بأكثر من 602 مليون طن نُقلت الى معامل تحويل السُكريات الى كحول.

جدول 12.1. إنتاجية محاصيل مُختلفة من الوقود في وحدة المساحة مُقارنةً مع الطحالب

المادة الخام	لتر زيت/ هكتار
سمسم	696
زهرة الشمس	952
فستق الحقل	1059
سلجم	1190
زيتون	1212
جاتروفا	1818
أفوكادو	2638
زيت النخيل	5950
طحالب	95000
فول الصويا	446
كتان	478

يتألف قصب السكر الداخل في الصناعة من سوق النبات وقش والأخير يشمل ثلاثة مُكونات أساسية، الأوراق الطرية، الأوراق الجافة وقمم النبات. تُطحن السوق لإستخراج عصير القصبة والذي يُستعمل كسكر

أو يتحول الى كحول (إيثانول). أما بقايا سوق قصب السكر المطحونة فتُسمى باكاز(Bagasse) وبقايا الأوراق والقمم تدعى بالقش (Straw) والتي غالباً ما تُحرق في المصانع لتجهيز الطاقة اللآزمة لتشغيل المطاحن. والسؤال هنا عن إمكانية إستثمار كليهما (الباكاز والقش) في إنتاج الإيثانول وبالتالي زيادة إنتاج الإيثانول في وحدة المساحة المُخصصة لزراعة قصب السكر. يحتوي كلا المُكونان على السليلوز والهيميسليلوز واللكنين. ومن المعلوم أن السليلوز واليهميسليلوز يتكونان من خليط كربوهيدراتي مُبلمر. يتبنى المُختصون مجموعة من التقانات التي تُحول السُكريات المُتعددة هذه الى سُكريات قابلة للتخمر، أحدها تحلل جزء الهيموسيليلوز بوساطة الأحماض المُخففة يتبعها تحلل السليلوز بإستعمال الإنزيمات المُتخصصة. والمعلوم أن الجزء السليلوزي يتكون من جزء صلب غني بالكلوكوز بينما جزء الهيموسليلوز يكون بشكل سائل وغني بسُكريات الزايلوز، الكلوكوز، والاربنوز، علما بأن كلا الجزئين الصلب والسائل يُمكن تخميرهما لإنتاج الإيثانول. ويلاحظ من الشكل 12.3 بأن عملية إنتاج الإيثانول تبدأ من إنتاج الكتلة الحيوية ومن ثم مُعاملتها إبتدائياً ليُنتج سيليلوز مُتحلل يتحول الى كلوكوز وفي نفس الوقت ينتج سكر البنتوز وكلاهما يخضعان الى عملية تخمر لينتجا الإيثانول.



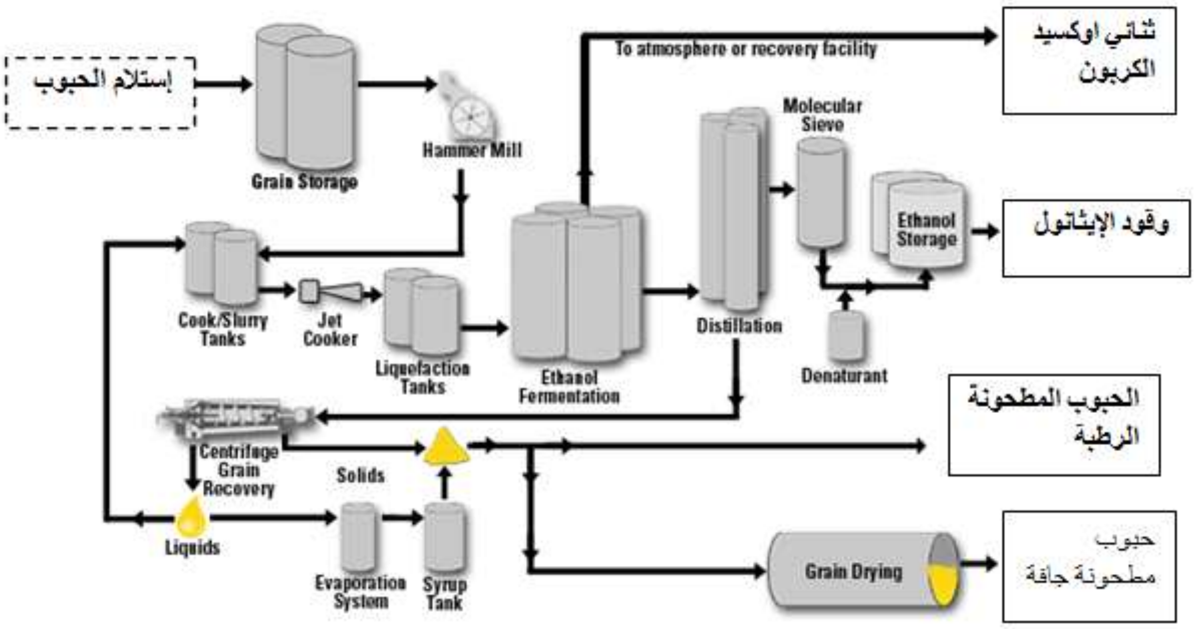
شكل 12.3. مُخطط مُختصر لعملية إنتاج الإيثانول يبدأ من جمع الكتلة الحيوية وحتى إنتاج الإيثانول ونقله الى مواقع الإستهلاك.

كما يُلاحظ من الشكل ذاته ظهور نواتج عرضية كالإنزيمات الي يُستفاد منها لأغراض صناعية، كما يُنتج اللكنين الذي يُمكن فصله وإخضاعه لعملية تخمر ومن ثم الإستفادة منه. ويُمكن الإستفادة كلياً من البذور

الجافة لبعض المحاصيل في إنتاج الإيثانول (شكل 12.4) حيث تُجهز منظومة كاملة إبتداءاً من توفر مخازن الحبوب وإنتهاءاً بتوفر مخازن للإيثانول ألمُنتج. تُستلم الحبوب وتُخزن حسب ما مُخطط له في خطة الإنتاج لِتُطحن ويُضاف لها الماء وتصبح مهروساً يسهل إزالة القشور وتُطبخ جيداً الى ان تصبح مهروساً مُتجانساً (Slurry) يُترك ليتخمر. يتم تقطير المواد المُتخمرة وتُغربل ليكون الناتج كحول الإيثانول. يتحرر جراء العملية ثنائي اوكسيد الكربون وحبوب غير مهروسة يُمكن الإستفادة منها بعد تجفيفها كأعلاف او يُستفاد منها ثانية في إدخالها في دورة الإنتاج مرة آخرى. تشتمل عملية التحول البايولوجي لكتلة الليكنوسيليلوز الى وقود الإيثانول المرور بالمراحل التالية:

1- معاملة أولية للتخلص من اللكنين والهيموسيليلوز من أجل تحرير السليلوز.

2- التخلص من بلمرة الكربوهيدرات المُبلمرة بهدف إنتاج سُكريات حرة بفعل إنزيم السليليز.



شكل 12.4. إنتاج الإيثانول من الحبوب الجافة لبعض المحاصيل.

3- تخمير الهكسوز أو البنتوز او كليهما لغرض إنتاج الإيثانول.

4- وأخيراً تقطير الإيثانول لغرض زيادة نقاوته.

يُعول حالياً في إنتاج الإيثانول من بقايا قصب السكر كبديل للوقود الحيوي بإعتباره مُتجدداً طالما تجددت زراعته وذو مُخلفات أقل من الكربون مما هو عليه في الكازولين. إضافة الى أن الإيثانول الحيوي يُقلل من تلوث الهواء ويتكيف مع التغير المناخي كونه يُقلل من إنبعاث الغازات المُسببة لظاهرة ما يُسمى بتاثير البيوت الزجاجية (Greenhouse effect). تحتوي قصبة (Cane) نبات قصب السكر من عصير القصبة والذي يُشكل 84-90% والألياف التي تُشكل 10-16%. ومُحتوى الألياف هو من السليلوز والبنتوز واللكنين بينما مُحتوى عصير القصبة يشتمل الماء الذي يُشكل ما نسبته 75-85% والمواد الصلبة الذائبة 10-25%. والذي يهم موضوعنا هو المُكون الأخير أي المواد الصلبة الذائبة التي تتألف من السُكريات التي تُشكل 15.5-24% والجزء المُتبقي من غير السُكريات 1-2.5% يتضمن مواد عضوية (0.8-1.8%) مثل النشاء والشمع والأحماض الامينية والعضوية ومُركبات فينولية وغيرها. إلا أن الجزء الأهم هو جزء السُكريات وكما سبق ذكره فإنها تُشكل 15.5-24% والكلوكوز 0.2-1% والفركتوز 0-0.5%. ولهذا فقد وفر تخمر السُكريات مصدراً لا ينضب من الإيثانول في الوقت الذي إنصب تفكير الباحثين في الإستفادة من الجزء الأخير غير المُستغل وألمُنتج من الألياف المُتمثل بالسليلوز والبنتوز واللكنين. وبالنظر لأهمية إنزيم السليليز في صناعة الوقود الحيوي فلابُد من التطرق الى موضوع إنتاجه من مصادر مُتوفرة ورخيصة كالبكتريا.

إنتاج السيليليز من البكتريا Production of cellulase from bacteria

تُمثل مادة السيليلوز ما نسبته 50% من المادة الجافة للكتلة الحيوية النباتية رخيصة الثمن والتي لاتزال غير مُستثمرة. تُشكل مُخلفات النباتات عموماً مصادر مُتعددة للمُركبات اللكنوسيليلوزية الناتجة من فضلات الأنشطة الزراعية والصناعية أمثلة قشور الحمضيات، نشارة الخشب، مُخلفات الورق، مُخلفات المنازل، الحشائش وغيرها والتي من الصعب حصرها. ويُقدر بأن 70% من الكتلة الحيوية النباتية تكون على شكل سُكريات خُماسية وسداسية تتوافر في الكتلة الحيوية اللكنوسيليلوزية ويُمثل السيليلوز الجزء الأكبر منها ويتحلل الأخير بنظام إنزيمي مُعقد يُدعى السيليليز. كما توجد كميات أقل من الهميسيليلوز ثم تليها كميات أقل من اللكنين وجميعها بوليمرات. تُساهم إنزيمات السيليليز وحدها ما مقداره 8% من تجارة الإنزيمات العالمية لِتُلبي حاجة الصناعة المُتزايدة من الإنزيم ومن المُحتمل حصول توسع كبير في سوق السيليليز العالمي مع زيادة الحاجة له في مُعاملة المواد السيليلوزية وتحولها الى سُكريات وبدورها تتخمر الأخيرة لتنتج الإيثانول الحيوي ونواتج حيوية عرضية اخرى.

وعند التكلم بلغة الأرقام فان تجارة إنزيمات السيليليز فقط تُقدر بحوالي 400 مليون دولار امريكي في الولايات المتحدة الامريكية مُنفردة ويتوقع مُضاعفة الرقم أثناء عام 2014. شرعت الشركات المُتخصصة بالتقانات ألأحيائية ألمُنتجة للإنزيم بالبحث عن وسائل رخيصة الثمن بهدف تقليل كلفة إنتاج الإيثانول من 5.4 دولار للغالون الواحد الى 0.25 دولار. ووضعت الشركات إستراتيجية في خفض سعر الغرام الواحد من إنزيم السيليليز بعد تحسين وسائل الصناعة وإنتخاب السُلالات البكتيرية عالية الإنتاج للإنزيم كالتحول الى أوساط تنمية أقل كلفة على سبيل المثال إستبدال اللاكتوز بالكلوكوز. ويُمكن تحسين كفاءة إنزيم السيليليز ليُحلل كمية أكبر من السيليلوز وبنفس كمية الإنزيم المُضافة كإستراتيجية ثانية تُقلل من سعر الوقود الحيوي.

وَظف الباحثون كلاً من الفطريات والبكتريا وإستثمارهما في إنتاج إنزيمي السيليليز والهميسيليليزمع التركيز لحد كبير على الفطريات بالنظر لقابليتها على الإنتاج الغزير من الإنزيمات السليليلوزية ولكون الإنزيمات التي تنتجها أقل تعقيدا من تلك التي تنتجها البكتريا وأسهل إستخلاصاً وتنقية. يُسهل ذلك كثيراً من عملية كلونتها بعد تأشيبها (Recombination) داخل بكتريا العائل سريعة النمو.

وبالرغم مما سبق فان عزل وتشخيص إنزيمات سيليليز جديدة من مصادر بكتيرية قد جلب إنتباه الكثير من الباحثين وحققوا نجاحات كبيرة وظِفت على نطاق واسع في التطبيقات الصناعية ومنها إنتاج الوقود الحيوي مُستفيدين من سرعة نمو البكتريا مقارنةً بالفطريات. فمُعدلات النمو النمو العالية للبكتريا تسمح لها في إنتاج مؤشب عالي من الإنزيمات، إضافة الى ان السيليليز ألمُنتج من قبل البكتريا (الذي غالباً ما يكون على شكل مُعقدات مُتعددة الإنزيمات تجعل عملها التكافلي عالي الكفاءة) أكثر تعقيداً من نظيره ألمُنتج من الفطريات. واخيراً، تعيش البكتريا في مدى واسع من البيئات فمنها البكتريا التي تعيش في بيئة ذات درجات حرارة مرتفعة (Thermophilic) واخرى تُفضل العيش في بيئة باردة (Psychrophilic) وأُخرى تعيش في بيئة قلوية (Alkaliphilic) ومنها ما ينمو بغزارة في بيئة حامضية (Acidophilic) وسُلالات تُفضل العيش في بيئة ملحية (Halophilic). ينتج عن ذلك سُلالات بكتيرية تنمو وتنتج إنزيمات سيليلوزية وبكميات مُستقرة تحت ظروف بيئية قاسية يسمح لإنزيماتها ألمُنتجة الدخول في تفاعلات التحول الحيوي تحت ظروف من التطرف البيئي. تستطيع العديد من السلالات البكتيرية العيش على السيليلوز وتُساعد في تحطيمه لحد كبير والإستمرار في تحطيم مُشتقات السليلوز الذائبة أو المناطق غير المُتبلورة من البلورات السيليلوزية (Amorphous regions of crystalline cellulose)، بالرغم من قلة أعداد البكتريا المُصنعة للنظام الإنزيمي الكامل في الطبيعة ذات القابلية على إذابة المواد البلورية. تُدعى تلك الأنواع البكتيرية القليلة بالسليلوزية الحقيقية (True cellulolytic bacteria) ألمُنتجة لبعض إنزيمات الكلوكان

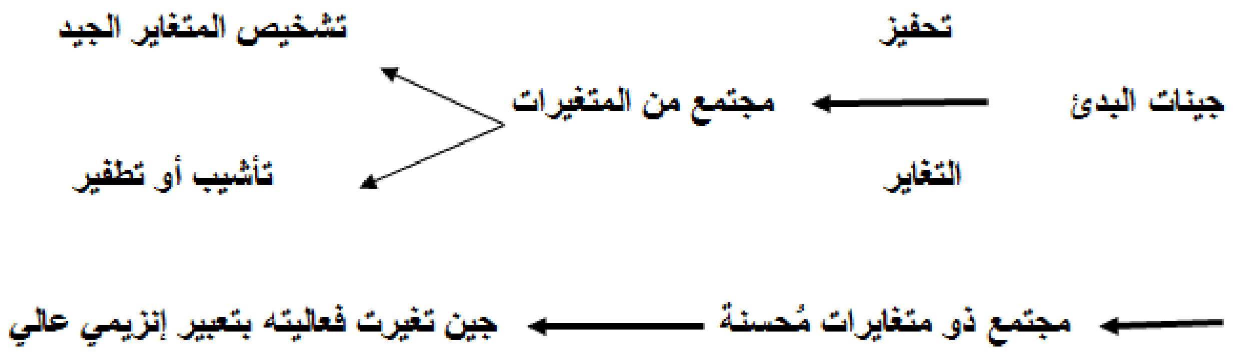
الداخلية (Endoglucanases) وأُخرى تنتج إنزيمات بيتا كلوكوسايد (β -glucosidases) ولكن ليس النظام الإنزيمي الكامل وتُسمى بالبكتريا السليلوزية الكاذبة (Pseudocellulotic).

ويُمكن الإطلاع في المراجع المُتخصصة لإنتخاب السُلالات البكتيرية ألمُنتجة والظروف المُناسبة لنموها. ولابُد من الإشارة هنا الى مُستقبل إنزيمات السليليز في التقانات ألأحيائية إذ يُعد إستعمال المواد السيليلوزية كمصدر لإنتاج الإيثانول أو لتغذية الحيوانات أحد أهم العقبات التي تواجه المُختصين. فدراسة إستفادة الأحياء المجهرية من السليلوز في تقدير كمية الإنزيم في الوسط الزرعي وتنقيته وبالتالي الإستفادة القصوى منه، يعتبر بالغ الأهمية في التقانات ألأحيائية المكروبية وبحاجة الى مزيد من البحث والتقصي بهدف أنمذجة (Optimization) عملية الإنتاج في كافة مراحلها مع تقليل كُلفة كل مرحلة من تلك المراحل.

إنتخاب وتحسين الأداء الإنزيمي Selection and improvement of enzyme performance

من المُهم جداً إنتخاب مصدر الإنزيم المطلوب هندسته وراثياً بحيث يكون نقطة بداية مثالية ليمارس فعاليته المطلوبة في التفاعلات. يُمكن ان تُنتخب الإنزيمات المرغوبة إعتماداً على المصادر الكثيرة وخاصةً ما يتعلق بالكيمياء الحيوية، اما الجينات فيمكن البحث عنها في بنوك الجينات التي إنتشرت في مناطق عديدة من العالم. وكبديل عن بنك الجينات، فيمكن تبني إستراتيجية لتشخيص إنزيمات المصدر بغربلة عينات من كائنات دقيقة ومن بيئات مُختلفة وتحديد فعاليتها الإنزيمية. عند إنتخاب إنزيمٍ ما وذو كفاءة جيدة، يُحدد الجين المسؤول عنه بهدف زيادة تعبيره الجيني لأقصى درجة مُمكنة وبالتالي يُحقق أعلى إنتاجية من الإنزيم المرغوب، وفيما يخص موضوعنا فالإنزيمات المُحللة للجُدر الخلوية النباتية هي الهدف.

تُغربل الكائنات الدقيقة ذات الجينات الجيدة والتي تم إنتخابها بالغربلة وعلى أساس فعاليتها الإنزيمية بحثاً عن الإختلافات الموجودة أصلاً بين الكائنات الحية (شكل 12.5)، ينتج عن الغربلة والإنتخاب مجموعة كبيرة من المُتغايرات (Variants). يُعاد تشخيص الكائن الذي يمتلك أعلى درجة من الفعالية الإنزيمية ولربما تكون هناك مجموعة من تلك الكائنات تُظهر زيادة في الفعالية الإنزيمية. يُمكن تعريض مجتمع الكائنات الدقيقة سواء كان بكتريا، فطريات، أعفان أو غيرها الى التطفير سواء كان فيزيائياً أم كيميائياً أو يُمكن تأشيب (Recombine) الكائن الدقيق لحين الحصول على كائن دقيق يُظهر أعلى فعالية إنزيمية في تحطيم مُكونات الجدر الخلوية.



شكل 12.5. مُخطط يوضح إمكانية تحسين أداء النشاط الإنزيمي في كائنات مُحللة لِجُدر الخلايا النباتية.

العديد من الإنزيمات الطبيعية ذات الوظائف المُميزة في المسالك الحيوية مثل تصنيع الأحماض الدهنية قد تم تشخيصها، ولكن تغيير تنظيم الفعالية البايوكيميائية للإنزيم بوساطة الهندسة الوراثية، فمواقع التحويرات ما بعد الترجمة (Posttranslational modifications) والفراغية (Allostery) منها، تُشكل فُرص غير مُستثمرة في مجال تقانات النبات الأحيائية. يتضمن التنظيم الفراغي إنموذجاً لفعالية الإنزيم سلباً أم إيجاباً بعد إرتباطه بمُركب ما أو أكثر ويكون ايض النشاء أحد الوسائل لتجاوز الفراغية هذه. أُستثمرت الحالة على سبيل المثال في درنات البطاطا بعد إدخال الجين المُعبر عن إنزيم Pyrophosphorylase مما أدى الى زيادة في تراكم النشاء داخل درنات البطاطا بنسبة 25-60%.

إذا ما تم توظيف هندسة الإنزيمات بشكل كفوء، وأُنتجت محاصيل عالية المُحتوى من الكربوهيدرات والدهون، فسيُعزز ذلك من مُستقبل الوقود الحيوي من المصادر النباتية. لاتزال هناك عقبات في تغيير الصفات الإنزيمية وقد وُضِعت ثلاث إستراتيجيات لتغيير تلك الصفات من خلال هندسة منظومة الروبسكو للتمثيل الضوئي المسؤولة عن إقتناص الضوء وبالتالي زيادة التركيب الضوئي وتراكم مركبات الايض الأولية مما ينعكس إيجاباً في زيادة مركبات الايض الثانوية. تمثلت الإستراتيجية الاولى بإدخال طفرات مُتعددة في النباتات الراقية تتضمن جينات *rbcL* ومن ثم إعادة الجينات المُحورة الى مواقعها الأصلية في موقع (Locus) في دنا الكلوروبلاست وهذا يحل مشكلة عدم إذابة تحت الوحدات البروتينية الكبيرة للنباتات الراقية والمنقولة من بكتريا القولون *E. coli* أو من حشوة كلوروبلاست الكلاميدوموناس.

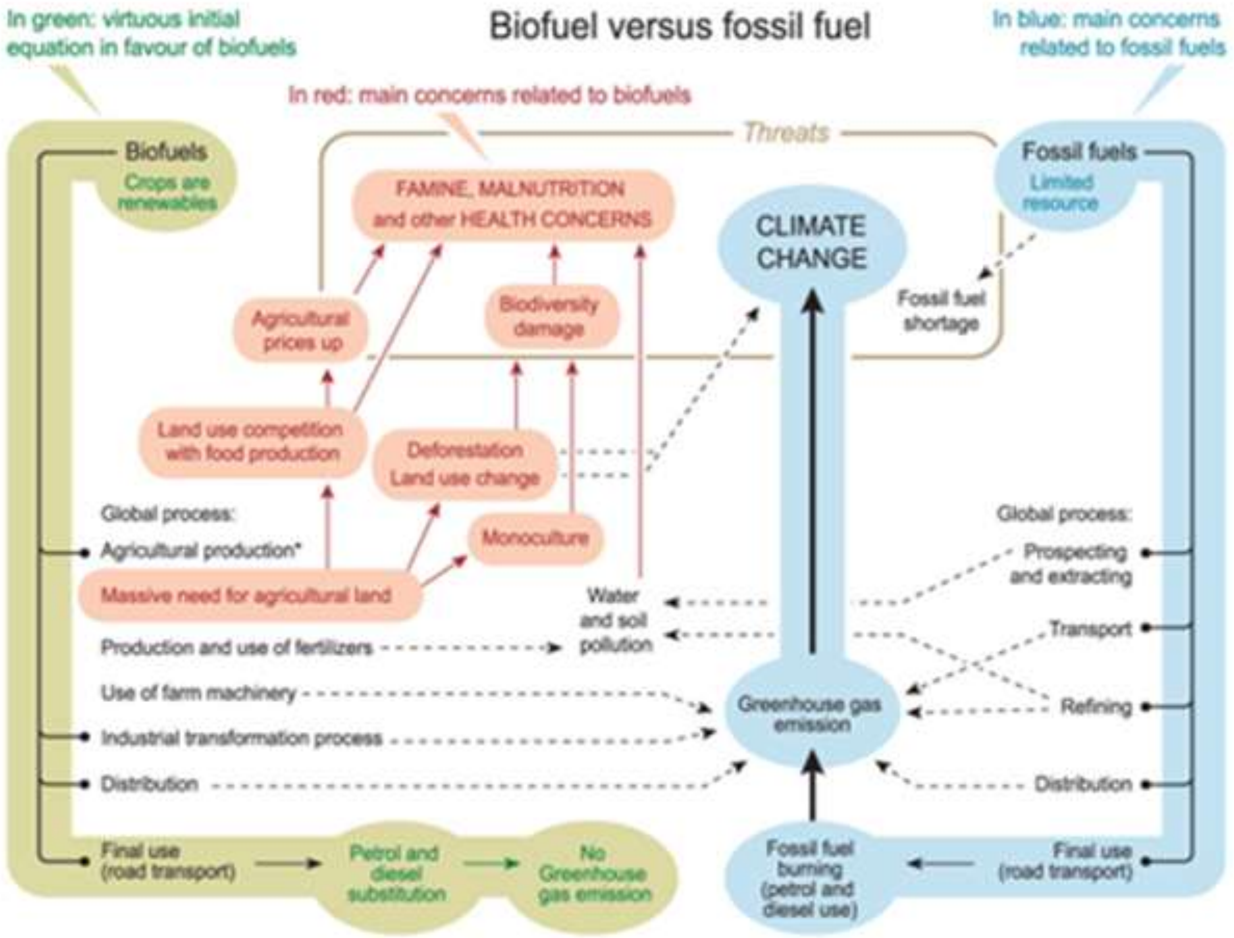
الطاقة الخضراء أو الوقود الحيوي (Green energy (Biofuel

يُؤمل أن يكون الوقود الحيوي بديلاً عن الوقود الأحفوري ويُصَنع من النباتات والمصادر المُشتقة منها. وطالما يُستعمل في وسائل النقل عموماً لذا فهناك نوعان من الوقود الحيوي وهما الإيثانول الحيوي (Bioethanol) والديزل الحيوي (Biodiesel). والأول يُعد بديلا عن البنزين ويُنتج من تخمر السُكريات سواء كانت سليلوز أو نشاء والتي عادةً ما تُستخلص من الذرة الصفراء وقصب السكر والبنجر السكري. أما الديزل الحيوي فيُنتج عادةً من المحاصيل الزيتية مثل فول الصويا، زهرة الشمس، السلجم وغيرها. وبالنظر لما يُسببه الوقود الأحفوري من تلوث بيئي نتيجة عمليات الإستخراج والتصفية والتصنيع، فقد يكون الوقود الحيوي صديقاً للبيئة مما يُعزز من زيادة الإنتاج الزراعي ويُحافظ على التنوع الأحيائي (شكل 12.6). كما يتبين من الشكل المزايا والمساوئ التي تحصل من جراء إنتاج وتصنيع وإستهلاك كلاً من المصادر الأحفورية وتلك المُعتمدة على المصادر النباتية. فالمصادر الأحفورية قابلة للنضوب وذات تاثيرات بيئية سيئة من أهم مضارها إرتفاع درجات حرارة سطح الكرة الأرضية وما يتبع ذلك من تأثيرات سلبية على النظام البيئي ككل. وبالمثل فان مصادر الطاقة المُتجددة وبالرغم من آفاقها الواعدة إلا انها تحتاج الى مساحات زراعية جديدة قد تكون على حساب أراضي مزروعة أصلاً بمحاصيل إستراتيجية تتعلق بقوت البشر.

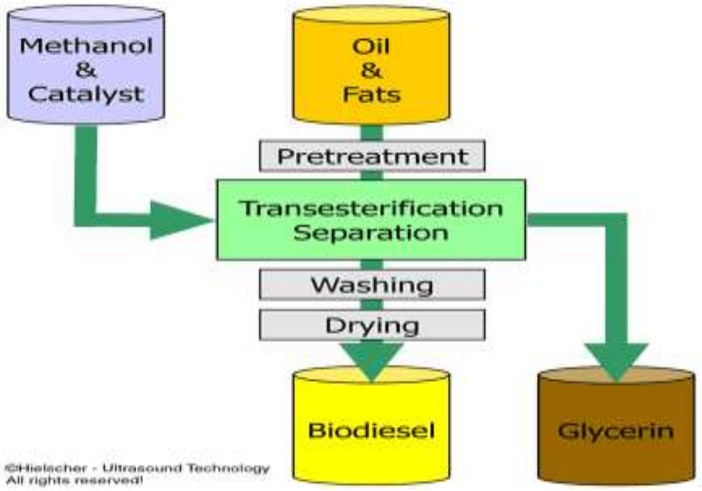
إنتاج وقود الديزل الحيوي Production of biodiesel

تبدأ عملية إنتاج وقود الديزل الحيوي من تفاعلات إنتقال الأسترة (Transertrification) وهذا يشمل الزيوت النباتية والدهون الحيوانية والزيوت التي تم تفاعلها مع الكحولات ذات السلسلة القصيرة والتي غالبا ما تُنتج الميثانول والإيثانول. تمر مراحل تصنيع وقود الديزل الحيوي بالخطوات التالية (لاحظ شكل 12.7).

أولاً: المُعاملة الأولية لمُخلفات الغذاء وهذا يشمل الدهون الصفراء الناتجة من إعادة تدوير الزيوت النباتية ومن تلك التي تُستهلك في الطبخ المنزلي ومن الشحم الحيواني (Tallow). تُزال الشوائب من الزيوت النباتية المُدورة بعد جمعها من مُخلفات الطبخ وتشمل هذه المُخلفات الأوساخ والماء وبقايا الأكل وغيرها. بينما تُعاد تنقية الزيوت النباتية غير المُستعملة (ذات الدرجات الأقل من تلك المُستعملة في الطبخ) للتخلص من الفوسفولبيدات وبقايا المواد النباتية وبغض النظر عن نوع الدهون الداخلة في عملية التصنيع، يجب إزالة الماء الذي يتكون نتيجة عملية إنتقال الاسترة مُسبباً تحلل الكليسيريدات الثلاثية مما يُعطي أملاحاً للحوامض الدهنية (الصابون) بدلاً من إنتاج وقود الديزل الحيوي.



شكل 12.6. محاسن ومساؤي كل من المصادر الأحفورية والمُتجددة للطاقة. تمثل الكتابة باللون الأحمر التوجسات المُتوقعة من إستعمال الوقود الحيوي. بينما تُمثل الكتابة باللون الأخضر التوجسات الناتجة من إستخراج وإستعمال الوقود الأحفوري. الكتابة باللون الأسود في اليمين تُمثل فوائد الوقود الأحفوري والتي على اليسار محاسن الوقود الحيوي. لاحظ المحاسن المُتوخاة من إنتاج الوقود الحيوي وخاصة في مجال تقليل إنطلاق المُلوثات الى البيئة. قد يدفع ذلك الى زيادة كبيرة في أسعار المحاصيل الإستراتيجية أو التي تدخل في سلسلة غذاء الفقير وقد تُسبب في مجاعات علاوة على زحف الشركات ألمُنتجة الى أراضي جديدة مما يؤثر سلباً في التنوع الأحيائي.



شكل 12.7. مراحل إنتاج وقود الديزل الحيوي.

ثانياً: مُعاملة الحوامض الدهنية حيث يتم تسحيح الدهون أو الزيوت الناتجة من الخطوة الاولى مع محلول قاعدي قياسي لتحديد تركيز الأحماض الدهنية والتي غالبا ما تكون أحماضا كاربوكسيلية موجودة في عينات الزيوت النباتية. تخضع هذه الأحماض إما الى عملية أسترة لتتحول الى وقود ديزل حيوي حيث تتأستر الى كلسرين أو يتم إزالتها بعد معادلتها (Neutralization).

ثالثاً: التفاعلات الكيميائية Chemical reactions

تؤدي عملية تبادل الأسترة الى تفاعل الدهون (الحيوانية والنباتية) مع الكحول (إيثانول أو ميثانول) لينتج وقود الديزل الحيوي ومنتوج غير نقي من الكليسرول (لاحظ شكل رقم 7.12). تُعتمد هذه الطريقة في حالة وجود أحماض في الدهون وبخلاف ذلك فهناك طرائق اخرى لامجال لتفصيلها أهمها إستعمال المُفاعلات الحيوية وإستعمال الموجات فوق البنفسجية أو إستعمال العوامل المُساعدة الكيميائية.

رابعاً: تنقية المنتوج Purification of the product

تُنتج العديد من المُركبات بعد حصول التفاعل وليس وقود الديزل الحيوي فقط أهمها الصابون، الكليسرول، الكحول الزائد وكميات صغيرة جداً من الماء. وبالرغم من أن هذه المواد تُعد مواد ثانوية إلا انه يجب إزالتها كي يكون وقود الديزل ألمُنتج مُطابقا تماما للمواصفات المطلوبة. وتكون كثافة الكليسرول أعلى من كثافة وقود الديزل الحيوي لذا تُستثمر هذه الخاصية في فصل هذين المُكونين. ويُعالج الميثانول الناتج

بعملية التقطير لإعادة إستعماله كما يُمكن إزالة الصابون أو تحويله الى حوامض كما يُزال الماء من الوقود ألمُنتج. آخذين بنظر الإعتبار ان بعض المحاصيل المُستعملة في إنتاج الوقود الحيوي تُمثل غذاءا رئيسيا للإنسان والحيوان وان دخولها في تصنيع الوقود الحيوي سيؤثر في زيادة أسعارها وعلى حساب غذاء الإنسان والحيوان كما هو الحال في أغلب البذور الزيتية وزيت النخيل ومحصول الذرة الصفراء وبذور فول الصويا وغيرها. وفي ذات الوقت هناك نباتات ذات قيمة إقتصادية ولكن إستهلاكها البشري أو الحيواني أقل بكثير من الأول والتي بالإمكان إستثمارها في إنتاج الوقود الحيوي مثل أخشاب الصنوبر، اليوكالبتوس، الحور الهجين، بقايا محصول الذرة، قش الحنطة والشعير والرز ومُخلفات قصب السكر. عموما هناك مرحلتان من التحول للمادة النباتية إما تحول بايوكيميائي أو تحول كيموحراري.

التحول الكيميائي Biochemical conversion

دُرس الموضوع بإسهاب وكانت بمثابة البدايات الاولى لإنتاج الوقود الحيوي حينما تم تحويل نشاء الذرة الى إيثانول وكانت هذه الخطوة بمثابة الجيل الأول من الوقود الحيوي وكان الأمل في إحلالها محل الوقود الاحفوري ولكن تنامت لدى المُختصين مخاوف حول تزايد أسعارها وتغيير نمط الزراعة والمساحات المزروعة وأثر ذلك وكما سبق ذكره في تغذية الإنسان والحيوان. يَشتمل التحول الكيميائي الخطوات التالية:

1- تصغير حجم الكتلة الحيوية (Comminution)

وتُعد الخطوة الاولى اذ تحول الكتلة النباتية الحيوية الى كتلة أصغر حجما بعد تصغير حجم دقائقها الى حجم يَسهل التعامل معه. إذ يُحصد المحصول ويُفرم (يُقطع) ويتبعه تقطيع وطحن بآلات خاصة بذلك وكلما صغر حجم دقائق الكتلة الحيوية كلما زادت المساحة السطحية الفعالة وبالتالي كمية السكر ألمُنتج. يُنتج تقطيع الكتلة الحيوية عموما وحسب الآلات المُتوفرة الى جزيئات بحجم 10-30 ملم بينما يَنتج الطحن جزيئات بحجم 0.02-2.0 ملم.

2- المعاملة الاولية Pre-treatment

تُعد المعاملة الأولية من أكثر الخطوات كُلفة والهدف منها تعريض أكبر كمية مُمكنة من السُكريات المُتعددة الى الإنزيمات المُحللة مع تقليل كمية اللكنين وزيادة تبلور السليلوز ولهذا تشتمل المُعاملات الأولية إستعمال إحدى الطرائق التالية:

أ- المُعاملة الأولية بأحد الأحماض المُخففة كحامض الكبريتيك الذي يُذيب أغلب الهيميسليلوز الموجود في الكتلة الحيوية المطحونة ويجعلها أكثر عُرضة للتحلل. وقد يُصاحب العملية (وهذه إحدى مساوئها) إنتاج مُثبطات ميكروبية نتيجة تحطم السكروز في درجات حرارة عالية مع تاثيرها القليل في اللكنين.

ب- المُعاملة الأولية بالماء الحار (Hydrothermolysis): يُستعمل الماء الحار السائل في درجة حرارة 200-230 °م لمدة 15 دقيقة وضغط 350-400 psig مما يؤدي الى تحول كل الهيميسليلوز الى سُكريات أُحادية مع إزالة ما يقارب 4-22% من السليلوز و35-60% من اللكنين. تُسهل العملية وتُحسن من قابلية الإنزيمات على الهضم.

ج- المعاملة الاأولية بألياف الأمونيا المُتمددة (AFEX): يَنتج عنها مُعدلات عالية من التحلل الإنزيمي وتصلح لمُخلفات النباتات. تُستعمل الأمونيا السائلة أو الغازية داخل مُفاعلات حيوية خاصة بذلك عند المُعاملة بالأمونيا الغازية أما عند إستعمال الأمونيا السائلة فَتُعامل المُخلفات النباتية المطحونة بنسبة 5-15% من محلول الأمونيا وفي درجة حرارة 160-180°م اذ تتفاعل الأمونيا السائلة مع اللكنين مُتخلصةً بذلك من البلمرة ومؤدية بالنتيجة الى تحلل اللكنين وبهذا تُسهل عملية التحلل الإنزيمي.

د- السائل الايوني Ionic liquid: وتحصل المُعاملة في درجة حرارة الغرفة إذ تُعامل المُخلفات النباتية المطحونة بأملاح ذائبة تقوم بدور المُذيبات في تفريق جزيئات المحلول وبهذا تُؤثر في الكتلة الحيوية من اللكنين والسليلوز. أثبتت العديد من السوائل الآيونية فعاليتها بهذا المجال مثل 1-n-buty-3- 3-methyl-N- methylimidazolium chloride و butylpyridinium chloride إذ يُذيب الأول 39% من السليلوز والثاني25%. وبالرغم من فعالية طريقة السائل الآيوني إلا أنه يُعاب عليها بإرتفاع كُلفتها وخاصة كُلفة إعادة تدوير السائل الايوني.

هـ- المُعاملة الأولية بالمُذيبات العضوية Organosolv pre-treatment: تتم بهذه الطريقة فصل مُركبي اللكنين والسليلوز بالإيثانول الحار وبوجود عامل مساعد كحامض الكبريتيك. يتكون في أثر ذلك سائل يحتوي كميات كبيرة من اللكنين السائل وتُفصل الكربوهيدرات. يُستخرج اللكنين من مذيب الإيثانول بعد التخفيف بالماء يتبعه غسل المُخلفات لإنتاج الإنزيمات والسكر.

3- التحلل السكري Saccharification

تُعد عملية تحلل السُكريات المُتعددة الى أُحادية من أكثر الخطوات كُلفةً في معامل إنتاج الوقود الحيوي. ولِحُسن الحظ هناك العديد من الإنزيمات التي تقوم بالمُهمة هذه فعلى سبيل المثال ولغرض تحلل السليلوز فهناك حُزمة من الإنزيمات (Enzyme cocktail) عددها 5-10 لتشتمل على endocellulase وبيتا exocellulase glucosidase. إما الهيمسيليلوز والذي يُعد أكثر تعقيدا من السليلوز وبالنظر للمجاميع الفعالة التي يحتويها، فهناك حزمة من الإنزيمات عددها 14-20 تقوم بتحليله. وفي بعض الأنظمة، تعمل حزمة من الإنزيمات تُدعى السيلولوسوم (Cellulosome) تقوم بالمُهمة وتُضاف الى المُفاعلات الحيوية التي يُمكن تقييدها (Immobillized).

تُحسن الخلطات الإنزيمية من إنتاج السكر وتراكمه في الغشاء الخلوي او قريبا منه. وثبت وجود إنزيمات غير مُتحللة ترفع من كفاءة عمل الإنزيمات بشكل كبير. لذا فإن تطوير حزمة إنزيمية مثالية سيعمل في مدى واسع من السواند (Substrates) وبالتأكيد يتطلب الأمر فهم آلية التداخل بين المُكونات الكيميائية ككل. ومن المعلوم ان أغلبية الإنزيمات المعروفة حالياً قد تم الحصول عليها من الكائنات الدقيقة فأغلب إنزيمات السيلليز والهيميسلليز التجارية قد اشتقت من مُضيفات فطرية (Fungal hosts) مثل *Trichoderma reesei* و *T.virde*، والمُهم في الموضوع أن كل خطوة لها ظروفها من حرارة وحموضة وقاعدية وملوحة، لذا لجأ الباحثون الى إستثمار الكائنات الدقيقة النامية في المناطق ذات التطرف المناخي مثل قاع المُحيطات والبحار والأقطاب ومنابع المياه الحارة والباردة ومناطق البراكين. عُزلت أنواع Archaeal من أعماق البحار تنمو في درجة حرارة 80-121°م وفي المناطق المُنجمدة لتعيش في -20°م وفي مواضع حامضية ذات pH أقل من 4 ومن ينابيع قلوية ذات pH أكثر من 8 ومن بُحيرات ملحية تراوحت ملوحتها 2-5 مولار من NaCl. ومن المؤكد أن إستثمار الكائنات الدقيقة المُتحملة لظروف مُتباينة سيُساهم كثيرا في إنتاج إنزيمات تعمل تحت ظروف مُختلفة وخاصة بعد التطور الذي حصل في البايولوجي الجزيئي والهندسة الوراثية إذ أصبح بالإمكان نقل جين واحد أو جينات من كائن لآخر لتحقيق غرض مُحدد أو مجموعة أهداف مُجتمعة. وعزز من ذلك التطور السريع في مجال المعلوماتية الحياتية (Bioinformatics) وتوفر بنوك الجينات وتقانات التجميد الفائق بما يضمن من تقليل كُلف تحلل السُكريات المُتعددة الى أُحادية والى تقليص مراحل الإنتاج ويتأمل الباحثون إنتاج كائنات دقيقة محورة وراثيا ستؤدي هذا الدور في المنظور القريب أو تحوير في مسارات التحول الكيميائي في الكائنات الدقيقة بإتجاه تحقيق الهدف وهذا ما يُسمى بهندسة الايض (Metabolic engineering).

التحول الكيموحراري Thermochemical conversion

توجد ثلاثة أنواع من تقانات التحول الكيموحراري عند التعامل مع الكتلة الحيوية يُمكن تلخيصها كما يأتي:

اولاً: رفع درجة حرارة الكتلة الحيوية بسرعة (Pyrolysis)

وهي الطريقة المُتبعة منذ مدة طويلة في إنتاج فحم المواقد وتعرف بانها التحول الكيميائي للكنين والسليلوز عند المُعاملة السريعة بالحرارة العالية تحت تراكيز مُنخفضة من الاوكسجين أو بعدمه. إذ ان العملية لا تشتمل حصول تفاعلات كيميائية بوجود الاوكسجين أو مع اي عامل كيميائي آخر. يَنتج من هذا الإجراء مدى واسع من ألمُنتجات منها الغازات، مواد صلبة وسوائل بما يُحقق التوازن بين ألمُنتجات الثلاث. يُشار عموماً الى السائل الناتج من هذه العملية بإسم Pyrolysis أو Bio-oil والذي يحتوي ما لايقل عن 200 مُركب مثل هايدروكربونات الأليفاتك والمُركبات العطرية والنافثنك (Naphthenic) إضافة الى مُركبات مُختلفة من المُركبات الاوكسجينية كالفورانس والإيثرات والكيتونات والألديهايدات. ومن المعلوم أن Bio-oil ذو طاقــة أكبر من الكتلة الحيوية الأصلية ويُمكن خزنه ونقله ويُحرر عند تنقيته العديد من المُركبات الصناعية. ويمكن إختصار عملية Pyrolysis بالنقاط التالية:

1- الإنتقال الحراري من المصدر الى الكتلة الحيوية.

2- نشوء تفاعل Pyrolysis في الكتلة الحيوية نتيجة إرتفاع درجة الحرارة.

3- تكوين ألمُنتج في حالة غازية مما يؤدي الى إنتقال الحرارة الى أجزاء الكتلة الحيوية جميعاً.

4- تكاثف ألمُنتج نتيجة تكاثف الغاز واخيراً

5- تفاعلات مساعدة ذاتية النشوء بين ألمُنتجات جميعا.

وقد قُسمت العملية عموما الى ثلاثة أشكال من عمليات التحول شملت تحول تقليدي Conventional (pyrolysis) والى تحول سريع (Fast pyrolysis) والى تحول سريع بعوامل مُساعدة (Catalytic fast pyrolysis) ولامجال في هذا الكتاب للغوص في تفاصيلها ويُمكن مراجعة المصادر المُتخصصة بالوقود الحيوي في هذا المجال.

التحول الغازي Gasification

تحصل أربعة أنواع من عملية التحول الغازي تشتمل:

1- مرحلة ماقبل تصنيع الكتلة الحيوية.

2- نشوء الغازات من الكتلة الحيوية وتوليد ما يُسمى بالغاز المُصاحب (Syngas).

3- تنقية الغاز المُصاحب.

4- الإستفادة من الغاز المُصاحب للمنتوج.

الطحالب: المصدر الواعد للوقود الحيوي Algae: the optimistic source for biofuel

ترجع عملية إنتاج الوقود الحيوي من الطحالب الى عام 1950 حيث أُنتج غاز الميثان في حينها ولكن لم تستمر جهود الباحثين في هذا المجال لحين عام 1980 اذ عملت وزارة الطاقة الامريكية في هذا المجال لإيجاد بدائل مُختلفة لمصادر الطاقة. وإنتشرت التقانة الى اوربا ودول العالم الأُخرى وبدأ إنتاج أجيال من الوقود الحيوي وتُستعمل حالياً كبديل للمُنتجات النفطية الأحفورية في تسيير السيارات والقطارات وحتى الطائرات. يُنتج زيت الديزل الحيوي من أسترة الدايكلسرول مع 3 جزيئات من الميثانول وبوجود عامل مساعد مثل KOH لينتج من التفاعلات الديزل الحيوي والكليسيرول. والطحالب كائنات أُحادية او مُتعددة الخلايا وذات أشكال مُختلفة ومُنتشرة في أغلب مناطق الكرة الأرضية الرطبة والمغمورة بالماء وتنمو بنوعيات مياه مُختلفة. وتكون ذاتية التغذية وتنمو بكثافة وسرعة عاليتين عند توفر الظروف المُناسبة لنموها. لذا فإن طاقتها مُستمدة أصلاً من الضوء وثنائي اوكسيد الكاربون المُتوفرين بغزارة في الطبيعة ولهذا فتعتبر الطحالب مصدر سريع ومُتجدد للطاقة ينتج عشرات الأضعاف من الأجيال مُقارنةً بالمصادر النباتية والتي غالباً ما تكون موسمية أو معمرة. تحتوي الطحالب على الزيوت (lipids) والأحماض الدهنية والتي تتراوح نسبتها 10-70% من الوزن الجاف. والإختلاف في نسب الزيوت دليل وجود إختلافات وراثية بين أنواع الطحالب من حيث تراكُمها للزيوت مما يُتيح فرصة لإنتخاب الأنواع الأكثر إنتاجية من الزيوت وإدخالها في مُفاعلات حيوية لإنتاج الوقود الحيوي. تنتج مزرعة طحالب مساحة 1م^2 بمُقدار 25 غم كتلة حيوية/ يوم وإذا افترض أن تلك الكتلة تُعطي وقوداً حيوياً فهذا يعني أن الثلث يَنتج 8 غم وقود وبمعنى آخر تنتج الطحالب 3 أطنان من الزيت سنويا/دونم أي بمُقدار 15 ضعف ما تُنتجه المحاصيل الزيتية. وفي مُقارنة بسيطة بين الطحالب والنباتات الراقية بخصوص إنتاجها من الزيوت، يُلاحظ أن للطحالب مُستقبل واعد في كثير من

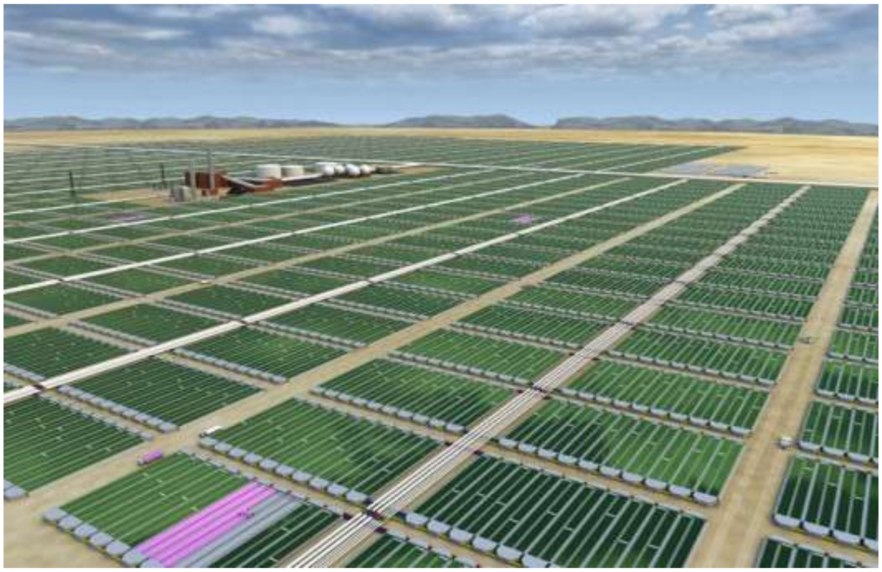
الأوجه وقابلة للتطور خاصة إذا ما وُظفت الهندسة الوراثية في هذا المجال وتم هندسة مُركبات الايض الثانوي وبالتالي إستنباط طحالب مُحورة وراثياً بما يُحقق ثورة جديدة في مجال التقانات ألأحيائية.

طرائق تنمية الطحالب صناعياً Methods of growing algae industrially

تنوعت وتطورت طرائق تنمية الطحالب وفيما يلي مُختصراً لهذه الطرائق:

1- التربية في البرك المفتوحة Open ponds

طريقة سهلة وسريعة وغير مُكلفة اذ تصنع غذائها من أشعة الشمس وثنائي اوكسيد الكاربون ولكونها مكشوفة فقد تتعرض للتلوث بأنواع أُخرى من الطحالب ذات الإنتاجية الأقل (شكل 12.8).



شكل 12.8. تربية الطحالب في البرك المفتوحة ووحدة إستخلاص وتنقية في مركز المشروع.

2- طريقة النظام المُغلق Close system

وهو نظام مُغلق يتم التحكم بالظروف المناخية داخله وإختيار نوع الطحالب الأكثر إنتاجاً للزيت وتأخذ الأنظمة المُغلقة أشكالاً مُتعددة فمنها ما يكون على شكل مُفاعلات حيوية ذات طبقة واحدة افقية (Horizontal single layer) إذ تُنمى الطحالب في طبقة واحدة داخل أنابيب شفافة أو عمودية (شكل 12.9) يُسهل من عملية توسع الإنتاج.

شكل 12.9. مفاعل حيوي من طبقة واحدة عمودي مُخصص لتربية الطحالب داخل مُنشآت مُسيطر على ظروفها البيئية.

وبالرغم من وجود بعض مساوئ لهذه الطريقة إلا أنها تعتبر كفوءة ومُسيطر عليها. وقد تُنمى الطحالب في أنظمة حيوية إنبوبية ثلاثية الأبعاد (Three-dimensional tubes) إذ تُمد أنابيب ترتبط مع بعضها افقياً أو عمودياً في شكل طبقات مما يُتيح في زيادة حاصل وحدة المساحة. وهناك نوع ثالث من المُفاعلات الحيوية تم تطويره وبنجاح ليُناسب المساحات صغيرة المساحة يُدعى بالمُفاعلات ذات الأوجه المُسطحة (Flat plate reactors) ويُعد أكثر إنتاجية من الأنظمة السابقة ولا يحصل تراكم في كمية الاوكسجين التي إن إرتفعت مُستوياتها تُسببت في تسمم الطحالب مع توفر كثافة ضوئية مُناسبة. ويُشترط أن تُعالج مشكلة خلط المُغذيات لتصل كل أجزاء المفاعل الحيوي بالتجانس. ويمكن إنتاج الطحالب داخل مُفاعلات حيوية تتحرك حسب زاوية ميل أشعة الشمس لتكتسب أكبر كمية من الإشعاع الساقط مما يُزيد من سرعة نمو الطحالب (شكل 12.10). والجدير بالإهتمام ان قسماً من الدول ألمُنتجة للوقود الحيوي باتت تنتجها في المُتنزهات والحدائق لِتُضيف عنصراً جمالياً في الموقع الذي تُنشأ فيه (شكل 12.11أ،ب). وتنوعاً في عناصر الحديقة الجمالية ومصدراً لتوعية الناس بالطاقة النظيفة.

شكل 12.10. مُفاعلات حيوية لتربية الطحالب مُتحركة بنظام هيدروليكي لإستلام أكبر كمية من أشعة الشمس الساقطة.

شكل 12.11أ. الإستفادة المُزدوجة من تربية الطحالب في مُفاعلات حيوية داخل المُتنزهات العامة بهدف إنتاج الوقود الحيوي ولأغراض جمالية وتعليمية.

شكل 12.11ب. إستغلال المُتنزهات العامة في تربية الطحالب لتوفر مصدراً للطاقة المُتجددة.

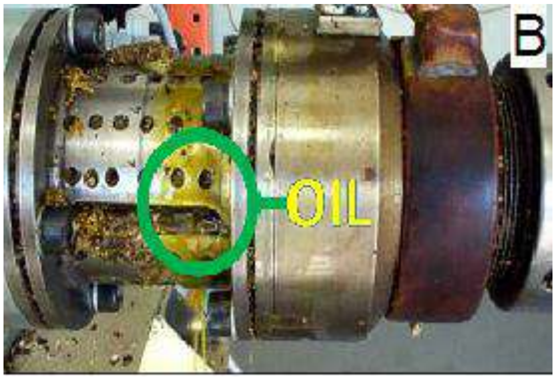
طرائق إستخلاص الزيت من الطحالب Methods of extracting oil from algae

1- طريقة العصر Press method

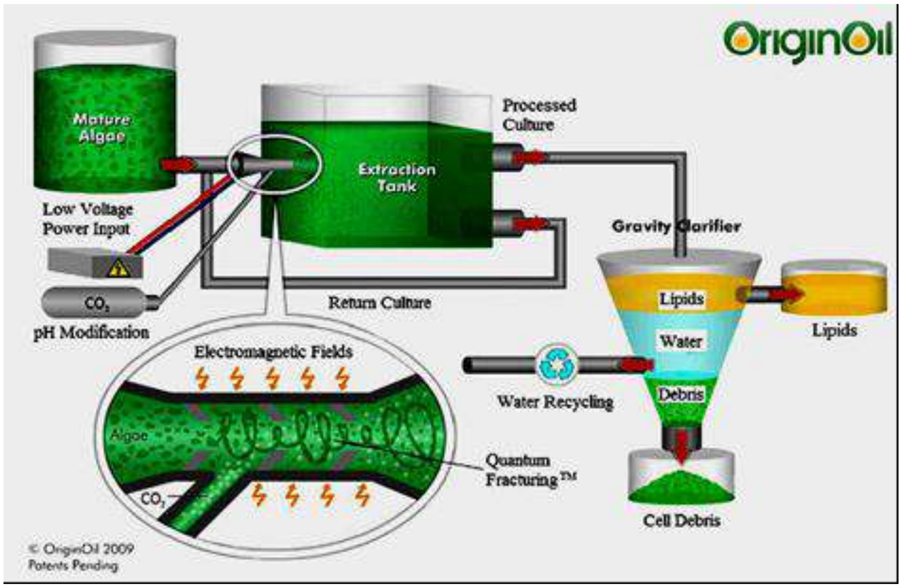
تُحصد الكتلة الحيوية من الطحالب وتُجفف وتُعصر في جهاز ميكانيكي خاص لهذا الغرض (شكل 12.12) اذ تُجمع قطرات الزيت من فتحة خاصة بالجهاز. كما يُمكن إستعمال مكبس يدوي بسيط لذات الغرض إلا ان ذلك لا يتماشى مع طرائق الإنتاج الحديثة وقد يُستعمل لأغراض تعليمية وتوضيحية لطلبة المدارس والجامعات.

2- طريقة الإستخلاص بخطوة واحدة

أنتجت شركة Origin oil منظومة مُتكاملة مُخصصة لإستخلاص زيت الطحالب بخطوة واحدة (شكل 12.12) يتلخص عملها في تعريض الطحالب المُنماة في الوسط الغذائي الى مجال مغناطيسي يقوم بتحطيم الطحالب ويخرج الزيت منها ليطفو فوق الماء بينما تترسب كتلة الطحالب الحيوية أسفل الخزان (شكل 12.13). وتُعد الطريقة صديقة للبيئة كونها لا تعتمد على إضافة مواد كيميائية وبالتالي لاحاجة لمُعالجات بيئية.



شكل 12.12. جهاز العصر الميكانيكي لولبي الحركة.



شكل 12.13. منظومة إستخراج الزيت من الطحالب مبنية على أساس تسليط مجال مغناطيسي الى الطحالب النامية في الوسط الغذائي.

الإستخلاص بالموجات فوق الصوتية Extraction using ultrasonic waves

أُستعملت الموجات فوق الصوتية في إستخلاص الزيت من الطحالب وتحويله الى وقود حيوي. تُستعمل ترددات عالية ومُنخفضة لتولد ضغطاً عالياً ومُنخفضاً مُسببة في تكوين فقاعات هوائية داخل سايتوبلازم خلايا الطحالب مما يؤدي الى تمزيق خلايا الطحالب وخروج الزيت منها. وقد تُضاف مُذيبات كيميائية تتغلغل الى داخل الخلايا المُحطمة وتُسهل من إستخلاص الزيت.

الإستخلاص بالمُذيبات العضوية Extraction using organic solvents

يتم في هذه الطريقة ترسيب الكتلة الحيوية للطحالب اولاً وتجفيفها ومن ثم طحنها لِتُخلط عندئذٍ مع خليط من المُذيبات مُكون من الهكسان والايزوبروبانول بنسبة 2/3 (حجم/حجم) داخل دوارق كبيرة مُزودة بمُسخنات وحركة دورانية. بعدها يُرشح الخليط ويُقطر للتخلص من المُذيبات وتُضاف مادتا هيدروكسيد البوتاسيوم والميثانول مع التسخين والتحريك المُستمر لمدة ساعة واحدة لِينتج أخيراً الوقود الحيوي والكليسيرول.

مُستقبل الوقود الحيوي The future of biofuel

طالما أن مصادر الطاقة الأحفورية في زوال لامحالة، فالوقت قد حان للبحث عن بدائل للطاقة المُتجددة بأقل التكاليف شرط ان لا تؤثر في غذاء الإنسان أو مُكوناته ولا تؤثر سلباً في بيئة الإنسان. ومن ناحية تقليل تكاليف الإنتاج فالبحث جارٍ عن زيادة سرعة التحول في العمليات الأربع الموضحة في شكل 12.14 التي تشمل تحولات الأسترة كيميائيا، طرائق إستخلاص الكتلة الحيوية فيزيائيا ام كيميائيا، التخمر الكيموحيوي واخيراً التحولات الكيموحرارية. ولابُد من الإشارة الى ان ضمن النواتج النهائية، مُنتجات ذات قيمة إقتصادية عالية مثل المواد الصيدلانية والبوليمرات وغيرها ويحتاج كل ذلك الى المزيد من التحري والمزيد من التجارب لكي تزيد من كفاءة عمل الأنظمة المُستعملة حالياً.

الناتج النهائي	التحول	تجهيز الانظمة	مصادر الكتلة الحيوية
وقود للنقل	تحولات أسترة كيميائية	الحصاد	النباتات الحاوية على الزيت
الوقود الصلب (خشب، بقايا، فحم)	إستخلاص فيزيائي وكيميائي	الجمع	المحاصيل الزراعية وبقاياها
ومصادر طاقة متنوعة	تخمر بايوكيميائي	التداول	الكتلة الحيوية للأخشاب
منتجات ذات قيمة عالية	معاملة كيموحرارية	الخزن	المخلفات الصناعية والبلدية

شكل 12.14. سلسلة عمليات إنتاج الوقود الحيوي التي يجب ان تخضع الى المراجعة المُستمرة.

الفصل الثالث عشر: تطبيقات هندسة النبات وراثياً

Applications of Plant Genetic Engineering

مقدمة Introduction

قبل البدء في تفاصيل كيفية هندسة النبات وراثياً من خلال نقل جين واحد أو مجموعة جينات التي يُفترض ان تكون حاملة لصفة مرغوبة أو أكثر من نبات لآخر يفتقر لهذه الصفة، لابُد من التطرق الى بعض المصطلحات المُتداولة في هذا السياق وايضاً لابُد من التعرف على تركيب جين النبات ليتسنى للقارئ متابعة الموضوع بسلاسة. وبالنظر لأهمية الموضوع في مجال التقانات الأحيائية النباتية ولوسع ماكُتب حوله فسأحاول الإختصار والتطرق الى تطبيقات الموضوع في مجال تحسين النبات بدلاً من الخوض في أُسس علم الأحياء الجُزيئي الموصوفة في كتب متخصصة بهذا المجال.

ألتحول الوراثي Genetic transformation

يُعرف التحوير أو ألتحول الوراثي بأنه تغيير وراثي في خلية ما ناتج من دخول مادة وراثية ومن ثم ظهور التعبير الوراثي للمادة الوراثية المُدخلة داخل الخلية أو الكائن الحي المنقول له. يُجرى التحوير الوراثي في النباتات بتسميات انكليزية مُتعددة منهاTransgenic, Genetically modified, Transformed ليكون الهدف النهائي من عملية إدخال وتكامل وتعبير للجينات الغريبة هو تحسين المحاصيل بصفات مرغوبة وفيما يلي أمثلة لهذه الصفات:

*المُقاومة أو التحمُل للإجهادات الأحيائية كمُقاومة الأمراض والحشرات والفيروسات والفطريات والبكتريا.

* مُقاومة أو تحمُل الإجهادات اللاأحيائية (Abiotic) كمُبيدات الأعشاب، الحرارة بأنواعها (إرتفاع، إنخفاض، إنجماد) والجفاف والملوحة والاوزون والإضاءة العالية أو القليلة).

* تحسين كمية ونوعية الحاصل وإطالة العُمر المخزني للثمار والأزهار والصفات الخزنية.

* نباتات مُحورة صفاتها التغذوية وراثياً.

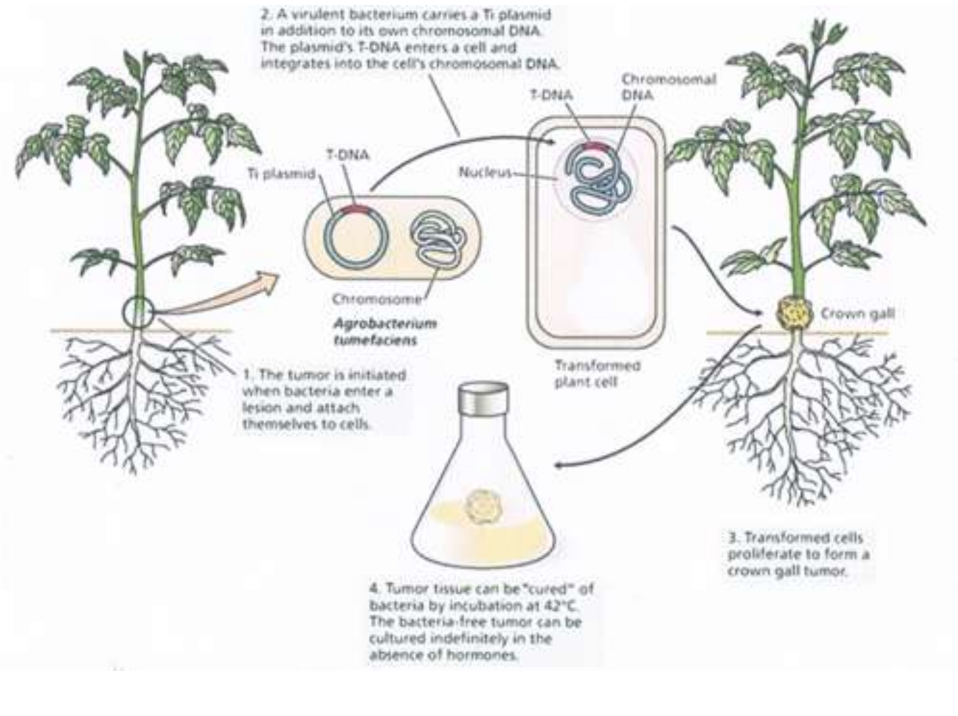
* نباتات مُحورة وراثياً كمفاعلات حيوية لمُنتجات تجارية كالبروتينات واللقاحات ومواد بلاستيكية قابلة للتحلل.

* تحسين قابلية النباتات البقولية في تثبيت النتروجين الجوي ومحاولة نقل الصفة الى نباتات غير بقولية وزيادة مقدرة البكتريا ايضاً على التثبيت. وتجري محاولات لإزالة تخصص السلالة البكتيرية فالمتخصصة على فول الصويا مثلاً كمضيف يمكن تحويرها وراثياً لِتصيب نباتات اخرى من العائلة البقولية مما يضمن ديمومة تلك السلالة أو السلالات في التربة عند زراعة النبات المضيف.

* نباتات خالية من مُسببات الحساسية التي تُسببها العديد من النباتات للإنسان والحيوان. وتشمل النقاط أعلاه العديد من المواضيع المُتشعبة منها والتي يُمكن الرجوع الى المصادر المُتخصصة لكل موضوع منها.

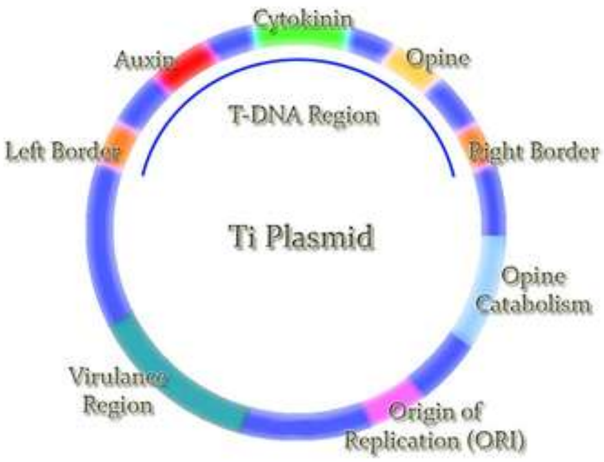
طرائق هندسة النبات وراثياً Methods of plant genetic engineering

هناك طريقتان معتمدتان من قبل الباحثين اولهما الطريقة المُباشرة والموضحة في الشكل 13.1 والتي تعتمد على بلازميد بكتريا الاكروبكتريوم (*Agrobacterium tumefaciens*) لمُسبب لمرض التعقد التاجي (Tumor induced plasmid) واختصاراً Ti (والمُوضحة أجزائه في الشكل 13.2) على الأشجار والذي يمتاز بخصائص مُهمة تؤهله لان يكون وسيطاً ناقلاً مثالياً لجين النبات المرغوب الى نبات آخر يُراد تحسينه.



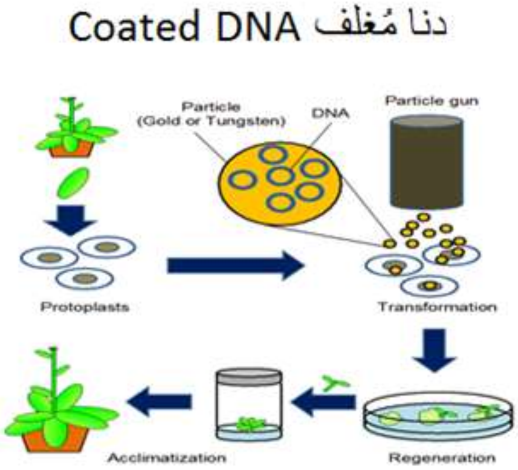
شكل 13.1. مُخطط يُوضح الطريقة المُباشرة لنقل دنا ذو صفة مرغوبة من نبات الى آخر بالإستفادة من بلازميد بكتريا الاكروبكتريوم.

إذ تَنقل البكتريا بعد إصابتها للنسيج النباتي من مناطق الجروح قطعة الدنا الحاملة للصفة المرغوبة الى كروموسومات المضيف لتُظهر تعبيرها الوراثي بعد تكاملها مع دنا النبات المُضيف.



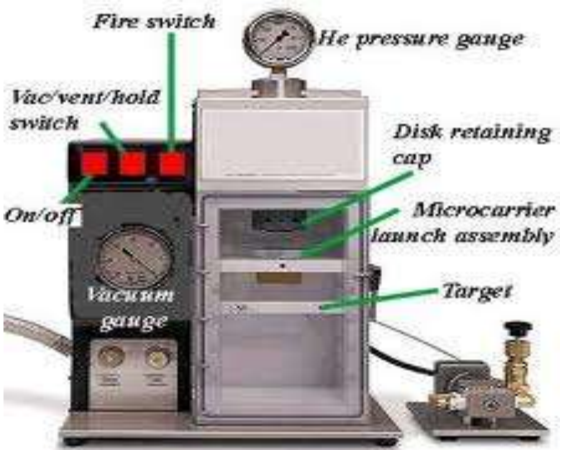
شكل 13.2. أجزاء بلازميد بكتريا الاكروبكتريوم والتي تؤهله ان يكون ناقلا مُهماً للجينات من نبات لآخر.

هناك العديد من الطرائق المُباشرة (Direct methods) التي يُمكن من خلالها هندسة النبات وراثياً والموصوفة في المراجع المُتخصصة. ولعل أهمها ولربما الأكثر رواجاً بين الباحثين هي تغليف الدنا المعزول من النبات الرغوب بجُسيمات من الذهب أو معدن التنكستن (شكل 13.3) وقذفها بسرعة محسوبة من خلال جهاز صُنع لهذا الغرض (شكل 13.4).



شكل 13.3. تغليف الدنا المعزول من نبات ذو صفات مرغوبة وقذفه داخل أنسجة النبات المُراد تحسينه ومن ثم إخلاف النبات الكامل من النسيج النباتي لينتج نبات مُعدل وراثياً.

وقد يكون الجهاز حقلياً يسهل حمله حيث تُقصف أنسجة النبات النامي في الحقل بِكُرات من الدنا المُغلف.



شكل 13.4. جهاز مُختبري لقصف النسيج النباتي بجُسيمات دقيقة حاوية على دنا معزول من نبات لتستقر في كروموسومات نبات آخر يُراد تحسينه ليصبح مُعدل وراثياً.

تطبيقات الهندسة الوراثية في مُقاومة الحشرات Applications in insect resistance

يُقدر المُختصون ان ما يُقارب من 15% من إنتاج المحاصيل العالمي يُفقد نتيجة الإصابة بالحشرات وباقي الآفات الزراعية. تختلف الحشرات في نوع الضرر الذي تُسببه للنبات إذ يُسبب قسماً منها خسائر إقتصادية كبيرة للمزارعين (جدول 13.1). يحصل التلف في المحاصيل عموماً بسبب يرقات الحشرات وفي حالات قليلة تكون الحشرة البالغة. وتعود غالبية الحشرات التي تُسبب أضراراً للمحاصيل الزراعية الى الرُتب التالية مع مثالٍ عليها:

1- حرشفية الأجنحة (Lepidoptera) مثل يرقات دودة جوز القطن الشوكية وحفار ساق الذرة.

2- غمدية الأجنحة (Coleoptera) مثل الخنافس.

3- مُتشابهة الأجنحة (Homoptera) مثل المن.

4- مستقيمة الأجنحة (Orthoptera) كقاطعات الحشائش.

ومن المعلوم بأن المُبيدات الكيميائية كانت ولوقتٍ قريب الوسيلة الوحيدة في السيطرة على الآفات مما حدى بالعلماء في البحث عن وسائل بديلة للأسباب التالية:

جدول 13.1. أمثلة لحشرات منتخبة تُسبب أضراراً كبيرة لمحاصيل مُهمة إقتصادياً

الاسم الشائع للحشرة	الاسم العلمي	المحصول المُضيف
دودة جوز القطن الشوكية	*Helicoverpa zea*	قطن
دودة أوراق القطن	*Spodoptera littoralis*	رز، ذرة صفراء، قطن، تبغ
دودة أوراق التبغ	*Manduca sexta*	تبغ، طماطم، بطاطا
حفار ساق الذرة الاوربي	*Ostrinia nubilalis*	ذرة الصفراء
الجراد	*Locusta migratoria*	الحشائش
دودة براعم التبغ	*Heliothis virescens*	تبغ، قطن
دودة ثمار الطماطم	*Heliothis armigera*	طماطم، قطن
خُنفساء بذور اللوبياء	*Callosobruchus maculatus*	لوبياء، فول الصويا
خُنفساء كوليرادو	*Leptinotarsa decemlineata*	بطاطا

1- أن ما يُقارب من 95% من المُبيدات التي تُرش بها النباتات تُغسل من سطح النبات وتتراكم في التربة.

2- صعوبة إيصال المُبيدات عند رشها الى كافة أجزاء النبات كالجذور والسوق والثمار.

3- تُسبب المُبيدات تلوثاً بيئياً لصعوبة تحللها عند تراكمها في الترب.

4- تُسبب المُبيدات أضراراً سامة لغير الآفات خاصة للإنسان والحيوان والحشرات النافعة وأحياء التربة المُفيدة.

أصبح البحث عن بدائل للمُبيدات الكيميائية أحد أولويات مُختصو التقانات الأحيائية. وبالرغم من تعدد الوسائل للوصول الى النتائج المرجوة، فسيتم التركيز في هذا الفصل على تقانات نقل جينات مُقاومة الحشرات من كائنات مُختلفة وإدخالها في النباتات لإكسابها صفة المُقاومة للآفات. وبهذا الصدد، فقد شُخص وعُزِلَ ما يُقارب من 40 جين من أحياء مجهرية ونباتات وحيوانات واثبت تعبيرها الجيني مُقاومة للحشرات.

جينات مُقاومة الحشرات معزولة من أحياء مجهرية Insect resistant genes isolated from microorganisms

سموم بكتريا *Bacillus thuringiensis* (**Bt**): أُكتشفت *Bacillus thuringiensis* عام 1901 من قبل Ishiwaki ولم تُستثمر من الناحية التجارية لحد عام 1951. تعيش البكتريا الموجبة لصبغة جرام في التربة وتنتج بلورات سبورية بروتينية سامة وذات فعالية ضد الحشرات. يُدعى البروتين المُنتج من قبل الحشرة بالبروتين البلوري ضد الحشري (Insecticidal crystalline protein) واختصاراً (ICP) الذي يُعد سم داخلي تنتجه البكتريا. أُكتشفت العديد من سُلالات هذا النوع من البكتريا وتنتج مدى واسع من البروتينات البلورية (Cry proteins) والتي تم إكتشاف خصائصها التفصيلية والجينات المُسيطرة في إنتاجها (Cry genes). صُنفت جينات كراي الى مجموعة كبيرة من العوائل المُميزة (حولي 40 عائلة) إبتداءاً من كراي 1 الى كراي 40 إعتماداً على حجمها والتشابه في التعاقب. والمُلفت للنظر وجود عويلات (Sub-families) ضمن العائلة الواحدة ليكون المجموع الكلي للجينات المُسيطرة على إنتاج سموم بروتينات كراي يزيد عن المئة. هناك إختلافات في بروتينات كراي المُختلفة إضافةً الى تماثل في بعض تعاقبات الدنا في جيناتها. يتراوح الوزن الجُزيئي لبروتينات كرايبين كبير الحجم (حوالي 130 كيلو دالتن) الى صغير الحجم (حوالي 70 كيلو دالتون)، وبالرغم من إختلافها الا انها تشترك بموقع فعال موزع على ثلاثة محاور.

سبق وان وُصِفت جينات سموم **Bt** المعزولة من بكتريا *B. thuringensis* سابقاً. وقد سُجلت جينات مُقاومة الحشرات معزولة من كائنات دقيقة أُخرى، فيما يلي أهمها:

1- جينات أكسدة الكولسترول (Cholesterol oxidases) المعزولة من مرشحات لبكتريا السبربتومايسس التي اثبتت تاثيرها السُمي في يرقات حشرة خنفساء جوز القطن (Boll weevil larvae) وقد حُوِرَ وراثياً نبات تبغ ليحمل جين أكسدة الكوليسترول.

2- عُزل جين Isopentenyl transferase من بكتريا *Agrobacterium tumefaciens* وأُدخل في نباتي الطماطم والبطاطا. إذ يُشفر الجين لإنزيم مُهم في تصنيع السايتوكاينينات وقد أظهرت نباتات التبغ المُحورة وراثياً بهذا الجين إنخفاضاً واضحاً في تغذية دودة أوراق التبغ (Tobacco hornworm) على أوراق النبات، كما قللت من أعداد حشرات المن في محصولي البطاطا والقطن.

شكل 13.5. آلية عمل سموم كراي **Bt** في يرقة حشرة حساسة. تذوب سموم كراي بعد تناول اليرقة لسموم كراي ووصولها الى القناة الهضمية بوجود pH عالي. تقوم الإنزيمات الهضمية بتفعيل السم بتقطيعه الى قطع صغيرة. يرتبط السم بالأغشية الطلائية لتجويف القناة الهضمية الوسطية لليرقة وتعمل شقوق في القناة الهضمية مما يُسبب لها صدمة ازموزية، تحلل الخلايا، تسمم دموي وبالتالي موت الحشرة.

آلية عمل بروتينات كراي Mechanism of cry proteins action

تُعد أغلب سموم **Bt** أي بروتينات كراي فعالة ضد يرقات حشرات رتبة حرشفيية الأجنحة (Lepidoptera) وقسم منها مُتخصص في حشرات رتبتي ثنائية وغمدية الأجنحة (Diptera و Coleoptera). سموم مجموعة كراي 1 ذات وزن جزيئي 130 كيلو دالتن وعند هضم الحشرة غذائها من النبات المُعدل وراثياً الذي يحتوي على البلورات البوغية (Parasporal crystals) تنشط عندئذٍ السموم الأولية (Protoxins)

في القناة الهضمية للحشرة بسبب الوسط القاعدي للقناة الهضمية للحشرة (ذات pH 7.5 – 8.5) وكذلك بفعل إنزيمات التحلل (Proteolytic enzymes) وخاصة البروتيز. ينتج عن ذلك تحول السم الأولي (Protoxin) الى سم فعال بوزن جزيئي 68 كيلو دالتن مما يؤدي الى نشوء قنوات آيونية (Ion channels) ليحصل من خلالها فقدان كبير في طاقة (ATP) الخلايا. يتوقف نتيجة لذلك الايض الحيوي للخلايا وتتوقف الحشرة عن التغذية وتفقد رطوبة جسمها الى ان تجف وتموت. إقترح بعض الباحثين في هذا المجال بأن سموم Bt تعمل ثقوباً في الأغشية ذات الإنتخابية للآيونات الموجبة (Cation-selective pores) فقط مما يؤدي الى دخول الآيونات الموجبة الى داخل الخلايا مُسببةً في تحلل ازموزي (Osmotic lysis) وتلف في أنسجة الخلايا المُبطنة للجهاز الهضمي وبالتالي موت اليرقة. ولحُسن الحظ، فان سموم **Bt** غير سامة للإنسان والحيوان لكون تحول السم الأولي الى سم فعال يتطلب pH قاعدي وإنزيمات تحلل بروتينات قليلة وهذه غير موجودة في الإنسان والحيوان إضافةً الى حموضة الوسط داخل أجهزتهما الهضمية.

إستعمال سموم Bt كمُبيدات حيوية Bt toxins as biopesticides

أُستعملت ومنذ مُدة تزيد عن خمسين سنة تحضيرات من سبورات **Bt** أو من البلورات المعزولة كمُبيدات حيوية عضوية ولكن لم يُكتب للمُبيد النجاح التام للأسباب التالية:

1- قصر مُدة بقاء السموم وإنخفاض ثباتها على أسطح الأوراق النباتية بعد المُعاملة إذ تتحطم السموم بعد التعريض لأشعة الشمس.

2- لايُمكن لسموم **Bt** ان تنفذ بفعالية الى أجزاء النبات المُختلفة وخاصة الجذور.

3- الكُلفة العالية لإنتاجها.

لذا فكر مُختصو التقانات الأحيائيةالإستفادة الكاملة من هذه السموم مع تلافي المساوئ أعلاه ووجدوا بأن الحل يكمن في هندسة النبات وراثياً بعد نقل جينات كراي من البكتريا الى النبات.

التحوير الوراثي في جينات كراي Genetic modification depending on cry genes

توفرت حالياً إمكانية تحوير النبات وراثياً لإنتاج نباتات مُحورة وراثياً (GM plants) بعد إدخال جينات **Bt** لتنتج نباتات تحمُل صفة المُقاومة للحشرات. ويستوجب الأمر إمتلاك جينات بكتريا *Bacillus thuringensis* تعبيراً عالياً لمُقاومة الحشرات في النبات المطلوب تعديله الوراثي. وهذا يعني بالتاكيد بأن

الجين المنقول يجب ان يكون تحت تاثير تعاقبات المُحفز (Promoter) والمُحدد (Terminator). وللأسف كانت المُحاولات المُبكرة للتعبير عن بروتينات Cry1A و Cry3A تحت سيطرة مُحفزات فيروس موزائيك نبات القرنابيط (CaMV35s) أو بكتريا الاكروبكتريوم مما أنتج تعبيراً جينياً مُنخفضاً في نباتات التبغ والطماطم والبطاطا ألمُحورة وراثياً.

تحوير جين Cry1A Modification of Cry1A gene

وجِدَ بأن التعبير الجيني للنوع البري من جين Bt cry1Ab المنقول من البكتريا كان مُنخفضاً جداً في النباتات المُحورة وراثياً. لذا عكف العلماء على إجراء تحويرات في التعاقب النيوكليوتيدي للجين وتمكنوا من تغيير مُحتوىG+C إضافةً الى إزالة العديد من إشارات الادنين المُتعددة (Polyadenylation signals) مع حذف تعاقبات ATTA وغيرها. وبعد إجراء التغييرات المُناسبة، حصلت زيادة كبيرة (حوالي 100 مرة) في إنتاج سموم **Bt**. وبموجب النتائج المُتقدمة التي حصل عليها العلماء، أظهرت النباتات المُحورة وراثياً حماية لنفسها من أضرار الحشرات. بدأت الولايات المتحدة الامريكية ومنذ منتصف تسعينيات القرن العشرين بزراعة النباتات المُحورة وراثياً وسوِقت على نطاق تجاري (جدول 13.2). كما بدأت العديد من الشركات التي تتعامل في التقانات الأحيائية بإنتاج نباتات مُحورة وراثياً وتسويقها الى المُزارعين بعد إستحصال الموافقات الاصولية بخصوص السلامة الأحيائية مع التركيز على محصولي القطن والذرة الصفراء.

جدول 13.2. أمثلة لمحاصيل حُورت وراثياً بجينات **Bt** وزُرِعت في حقول المُزارعين

المحصول	**ألاسم التجاري**	**بروتين Bt المُقاومة لحشرة**
قطن	Bollgard Cry 1Ac	دودة جوز القطن الشوكية، دودة براعم التبغ
ذرة الصفراء	Knock out Yield Guard Cry 1AB	حفار ساق الذرة الاوربي
ذرة الصفراء	Starlink Cry 9C	حفار ساق الذرة الاوربي
ذرة الصفراء	Herculex 1Cry 1F	حفار ساق الذرة الاوربي
ذرة الصفراء	Bt-Xtra Cry 1Ac	حفار ساق الذرة الاوربي
بطاطا	New-leaf Cry 3A	خُنفساء كوليرادو

مزايا وعيوب النباتات المُحورة وراثياً بجينات Bt Advantages and disadvantages of genetically modified plants with Bt genes

أدناه ألفوائد المُتحققة من النباتات المُحورة وراثياً بجينات **Bt**:

1- يُمكن لجينات **Bt** ان تُظهر تعبيرها الوراثي في كافة أجزاء النبات سواء كانت خضرية أم ثمرية أو جذور، الأمر الذي لاتُحققه المُبيدات الحشرية الكيميائية.

2- تُنتج البروتينات السامة داخل النبات وعليه يُمكن إعتبارها مُبيدات حيوية صديقة للبيئة.

3- تتحطم سموم **Bt** بسرعة خارج بيئتها أي تحت الظروف الخارجية.

وبالرغم من الفوائد أعلاه والتي تُعد بالغة الأهمية بنظر المُختصين، الا أن ذلك لايخلو من بعض المُحددات مثل ظهور أجيال من الحشرات مُقاومة لجينات **Bt** لكون الأخيرة سموم بروتينية ومُستقبلات أغشية في الجهاز الهضمي للحشرة والتي تعمل من خلالها سموم **Bt** وهي بروتينات أيضاً. إضافةً الى وجود فرصة لحصول طفرات في جينات الحشرات المُشفرة للبروتين المُستقبل مما يُقلل من فرصة إرتباط السموم بالأغشية وبالتالي يجعلها غير مؤثرة. قد تحصل الحالة السابقة بعد أجيال قليلة من تكاثر الحشرة ومع الإستمرار في زراعة محاصيل **Bt**. وفي هذا الصدد فقد تقصى الباحثون عن بعض الوسائل في التخلص من إمكانية تطور أجيال من الحشرات المُقاومة لجين **Bt** وفيما يلي بعض الإستراتيجيات المُقترحة بهذا الصدد:

1- إدخال إثنان من الجينات المُختلفة من سموم **Bt** في النبات لإستهداف الحشرة المقصودة.

2- تطوير نباتات مُحورة وراثياً تحتوي نوعين من جينات مُقاومة الحشرة المطلوب التخلص منها، فعلى سبيل المثال إدخال الجين المُثبط لإنزيم البروتينيز إضافةً الى جين **Bt**.

3- إدخال المحاصيل المُحورة وراثياً في دورات زراعية تتناوب فيها زراعة محاصيل **Bt** مع أُخرى غير مُحورة وراثياً بجين **Bt** لتجنب بناء مُقاومة في مُجتمع الحشرات.

التأثيرات البيئية لمحاصيل Bt Environmental effects of Bt crops

برزت مشكلة جوهرية في هذا المجال الا وهي ظهور جيل من الحشرات تحمل صفة المُقاومة لجينات **Bt** ومن المؤكد ان لذلك تأثيرات سلبية في البيئة الزراعية. وظهرت الى السطح مشكلة ثانية عام 1990 بخصوص محاصيل **Bt** إذ سجل المُختصون حبوب لقاح من ذرة **Bt** سامة ليرقات فراشة الملك

(Monarch butterfly). أدى ذلك الى حصول إعتراض واسع لدى المُهتمين في مجال التنوع الأحيائي لكون هذا النوع من الفراشات من أكثرالأنواع تلوناً في الولايات المتحدة الامريكية. ولحُسن الحظ تبددت المخاوف الأخيرة كونها لم تستند الى أُسس علمية. وكان ذلك درساً صعباً للمُهتمين في إنتاج محاصيل **Bt** مما يستوجب عليهم دراسة المخاطر البيئية المُحتملة عند إطلاقهم لمحاصيل مُحورة وراثياً للرد على المُعترضين اولاً بأول.

النباتات الراقية كمصدر لجينات المُقاومة Higher plants as a source for resistance genes

عُزلت العديد من جينات النباتات الراقية واظهرت تعبيراًجينياً في تصنيع مُركبات ذات فعالية ضد الحشرات إعتبرها بعض المُختصون بروتينات مُبيدات حشرية ليست من مجموعة **Bt**. يوضح جدول 13.3 أهم الجينات ذات التعبير القاتل للحشرات والتي نُقلت الى نباتات مُختلفة وأظهرت الأخيرة بعد تعديلها وراثياً قابلية على قتل الحشرات.

مُثبطات إنزيم البروتيز Protease inhibitors

تشتمل مُثبطات البروتيز على بروتينات تثبيط فعالية إنزيم البروتيز وتم تسجيل مجموعة من النباتات المُنتجة للإنزيم المُثبط للبروتيز كوسيلة دفاعية تستعملها ضد الحشرات القارضة. يتداخل الإنزيم المُثبط مع الإنزيمات الهاضمة للحشرة مما يؤدي الى حرمان الأخيرة من التغذية وبالتالي تجويعها وموتها. وبناءاً على ذلك أصبح بالإمكان السيطرة على الحشرات بإدخال جينات تثبيط البروتنيز الى المحاصيل التي عادة لاتنتجها وفيما يلي مثال على ذلك؛ جين تثبيط التربسين في اللوبيا (Cowpea trypsin inhibitor) إذ لوحظ بأن محصول اللوبيا النامي بشكل بري في أفريقيا مُقاوم لمدى واسع من الحشرات واثبتت البحوث لاحقاً إحتواءه على بروتين ذات فعالية ضد الحشرات وشُخص بأنه مُثبط لإنزيم التربسين ذو القدرة على قتل الحشرات التابعة الى رتبة حرشفية الأجنحة (Lepidoptera) كحشرة *Heliothis virescans* ورتبة مستقيمة الأجنحة (Orthoptera) مثل الجراد *Locust migratoria* ورتبة غمدية الأجنحة (Coleoptra) كحشرة *Anthonous grandis*. ولحُسن المُصادفة فقد وِجدَ بأن مُثبط تربسين اللوبياء (CPTi) ليس له تاثيراً في تربسين اللبائن لذا فهو غير سام لها. نُقل إنزيم CPTi الى نباتات التبغ، البطاطا والسلجم وتبين بأن نجاة الحشرات المُتغذية على النباتات الحاوية لجين **CPTi** أقل بكثير مقارنة مع نظيراتها غير المُحورة وراثياً.

جدول 13.3. قائمة بجينات من غير **Bt** متوفرة في نباتات راقية حيث أظهرت النباتات المنقول اليها الجين فعالية ضد الحشرات

إسم الجين	**النبات المُحور وراثياً**	**البروتين المشفر**	**المُقاومة لحشرات**
مجموعة مُثبطات البروتيز			
CPTi	البطاطا، التفاح، الرز، زهرة الشمس، الحنطة، الطماطم	Trypsin	غمدية الأجنحة، حرشفية الأجنحة
CII	التبغ، البطاطا	Serine protease	غمدية، حرشفية الأجنحة
PI-IV	البطاطا، التبغ	Serine protease	حرشفية الأجنحة
OC-I	التبغ، السلجم	Systeine protease	غمدية، مُتشابهة الأجنحة
CMe	التبغ	التربسين	حرشفية الأجنحة
مجموعة مُثبطات إنزيم الألفا اميليز			
ألفا *AI-Pv*	البزاليا، التبغ	ألفا أميليز	غمدية الأجنحة
WMAI-I	التبغ	ألفا أميليز	حرشفية الأجنحة
مجموعة اللكتينات			
GNA	البطاطا، الرز، قصب السكر، البطاطا الحلوة	اللكتين	مُتشابهة وحرشفية الأجنحة
WGA	الذرة الصفراء	Agglutin	حرشفية وغمدية الأجنحة
BCH	البطاطا	Chitinase	مُتشابهة وحرشفية الأجنحة
TDC	التبغ	Tryptophan decarboxylase	مُتشابهة وحرشفية الأجنحة

فوائد ومُحددات مُثبطات البروتيز Advantages and limitations of protease inhibitors

يُمكن بوساطة مُثبطات البروتيز السيطرة على مجموعة من الحشرات التي لايُمكن السيطرة عليها بوساطة Bt، كما ان نقل جين البروتيز مع جين **Bt** قد يتغلب على ظاهرة تطور المُقاومة ضد نباتات **Bt**.

اما مُحدداتها فأهمها شرط توفر كمية مُناسبة من مُثبطات البروتيز داخل النبات لضمان قتل الحشرة بعكس بروتينات **Bt** حيث ان كميات قليلة منها تكون كافية لقتل الحشرة. ومن مُحدداتها أيضاً، ضرورة ان يكون

تعبير مُثبطات البروتيز واطئ جداً في النباتات التي يستهلكها الإنسان بينما يكون تعبيرها عالياً في الأجزاء التي تتغذى عليها الحشرات، وتتجلى الحالة الأخيرة في المحاصيل الجذرية والسوق الخازنة التي تنمو تحت سطح التربة.

أللكتينات Lectines

اللكتينات عبارة عن بروتينات سكرية نباتية (Glycoprotiens) وتعمل كسموم حشرية. عُزل جين اللكتين GNA من نبات قطرة الثلج (*Galanthus nivalis*) ونُقل الى البطاطا والطماطم واظهر تعبيراً جينياً في كلا المحصولين الا إنه يؤثر في الحشرات الماصة والثاقبة فقط عند التراكيز العالية فقط.

جينات المُقاومة المعزولة من الحيوانات Resistance genes isolated from animals

نُقلت جينات مُثبط البروتيز من اللبائن وظهر تعبيرها الجيني في النباتات كصفة مُقاومة للحشرات رغم محدودية حصولها. كما أظهر جين مُثبط تربسين البنكرياس البقري (BPTI) وجينات ألفا المُضادة للتربسين كونها جينات واعدة في توفير صفة مُقاومة الحشرات في النباتات ألمُحورة وراثياً. هناك بعض المُحددات عند نقل جينات قتل الحشرات وخاصة **Bt** عند إنتاج نباتات مُحورة وراثياً مما حدى بالعلماء في البحث عن بدائل. لذا أُدخلت عام 1993 طريقة تدعى بإستراتيجية الإستنساخ من الطبيعة (Copy nature strategy) من قبل Boulter بهدف السيطرة على الآفات بطريقة صديقة للبيئة والتي تضمنت الخطوات التالية:

1- تحديد النباتات الحاملة لصفة المُقاومة بعد التحري عنها في مناطق مُختلفة من العالم.

2- عزل وتنقية البروتينات ذات الطبيعة ضد الحشرية من النباتات المُقاومة. يُحدد تعاقب البروتين ويشخص الجين المسؤول عن إنتاج هذا النوع من البروتين.

3- إختبار البروتين المعزول مختبرياً من حيث فعاليته ضد أنواع مُحددة من الحشرات التي عادة تصيب النبات المُستوطن.

4- إختبار سُمية البروتين المُنقى في الحيوانات اللبونة وخاصة الإنسان، وفي حالة ظهور أعراض سُمية البروتين في اللبائن يتم إيقاف البرنامج.

5- نقل الجين بإستعمال الطرائق التقليدية المعروفة في الهندسة الوراثية، إذ يُعزل الجين المسؤول عن إنتاج البروتين السام ويُدخل في النباتات الإقتصادية.

6- إنتخاب النباتات المُحورة وراثياً بعد نقل الجين اليها وتُجرى عليها إختبارات توريث صفة البروتين السام. كذلك يتم إختبار كفاءة البروتين كمُبيد حشري مُختبرياً أو حقلياً.

7- إجراء إختبارات السلامة الحيوية تحت الظروف الحقلية لتقويم إنتاجية المحصول، الأضرار التي تُسببها الحشرات للحاصل والتأثيرات المُحتمل ان يُسببها النبات المُعدل وراثياً للبيئة. وبالرغم من ان إستراتيجية الإستنساخ من الطبيعة تستغرق وقتاً طويلاً وقد لاتنتجح، الا انها تأخذ بنظر الإعتبار التداخل المُعقد بين المُجتمعات البايولوجية من إنسان وحيوان ونبات وكائنات دقيقة إضافةً الى البيئة.

المُقاومة للفيروسات Resistance to viruses

تُسبب الفيروسات حالة أو أكثر من الحالات التالية:

1- إنخفاض حاد في إنقسام الخلايا أو ما يُسمى Hypoplasia

2- الإفراط في إنقسام الخلايا أو ما يُسمى Hyperplasia

3- تنخر الخلايا وموتها أو ما يُسمى Necrosis

وعموماً تُسبب الفيروسات في تثبيط نمو النبات وإنخفاض إنتاجيته واحياناً الى فشل إنتاج النبات في إعطاء حاصل. ومن المعروف بأن الطرائق الكيميائية في السيطرة على الفيروسات تكون غير مُجدية كونها مُتطفلات إجبارية داخل الخلايا النباتية. ومع هذا فهناك بعض الممارسات الزراعية الآمنة للسيطرة أو التقليل من إصابة النباتات بالفيروسات والتي يُمكن إتباعها مثل:

1- إستعمال بذور وتقاوي خالية من الفيروسات.

2- السيطرة على الحشرات الناقلة للفيروسات.

3- السيطرة على الأدغال التي قد تكون موائلاً للفيروسات.

4- زراعة الأصناف المُقاومة للفيروسات.

طُورت تقانات تمنيع (Immunization) النباتات ضد أضرار الفيروسات من خلال تعبير بروتينات الفيروسات داخل خلايا النبات. ونتيجة للتطور السريع في مجال هندسة النبات وراثياً، بات من المُمكن إنتاج نباتات تحمُل صفة المُقاومة للفيروسات واصبحت تُسوق تجارياً عبر منافذ مُختلفة من العالم. تتضمن

إستراتيجية إنتاج نباتات مُقاومة للفيروسات بإستعمال فيروسات مُشفرة لجينات مُعينة وفي بروتينات غلاف الفيروس وكذلك عن طريق البروتينات المُتحركة والمنقولة، إضافةً الى الرنا التابع (Satellite RNA) والى الرنا غير المُشفرّ (Antisense RNA) واخيراً الى الرايبوسومات. جرت في السنوات الأخيرة مُحاولات لإدخال صفة المُقاومة للفيروسات بعد نقل جينات من مصادر حيوانية الى النباتات. وفيما يلي شرحاً موجزاً لأهم الطرائق المُتبعة:

طريقة الأغلفة البروتينية للفيروسات Virus coat proteins method

أُستعملت فكرة توسط بروتينات أغلفة الفيروسات (Virus coat protein-mediated approach) في الحصول على نباتات مُقاومة للفيروسات. إذ أُنتج في عام 1986 أول نبات تبغ مُعدل وراثياً ذو تعبير جيني لفيروس موزائيك التبغ (TMV) لجين غلاف البروتين، واظهرت النباتات مُقاومة عالية للفيروس. تلا ذلك الإنجازالعديد من المُنجزات العلمية الرائدة والتي تُوجت بالعديد من النباتات المُقاومة لما يُقارب من 30 نوعاً من الفيروسات (جدول 13.4).

والمُلاحظ ان قسماً من هذه النباتات مُقاومة لفيروس واحد وقسماً آخر لأكثر من فيروس. ولابُد من الإشارة هنا الى أهمية بروتينات غلاف الفيروس حيث يُعزز جين الغلاف البروتيني لفيروس معين أحياناً المُقاومة لفيروسات أُخرى وهذا ما يُدعى بالحماية المتقاطعة (Cross protection) وقد تكون تلك الفيروسات لاعلاقة لها بالفيروس الأول. تجلت الحالة في فيروس TMV في التبغ والذي أظهر مُقاومة لفيروس X في البطاطا ولفيروس موزائيك الجت وفيروس موزائيك الخيار.

مُحددات بروتينات أغلفة الفيروسات Limitations of virus coat proteins

ان الحماية التي تُسببها بروتينات اغلفة الفيروسات تكون ناجحة مع الفيروسات ذات الجينومات مفردة الذراع من الرنا ولكنها لاتصلح في المجينات الحاوية على رنا ذو ذراعين أو حتى مع الدنا ذو الذراع الواحد. وهنا لابُد من إيضاح آلية فعل بروتينات أغطية البذور، فحالما يُعبر النبات المُحور وراثياً عن جين أغلفة بروتين فيروس معين، فان قابلية إصابة النبات بذات الفيروس تقل بشكل كبير. والواقع لن تُعرف آلية الحماية لبروتينات أغطية الفيروس في المُستوى الجُزيئي وبحاجة الى المزيد من الدراسات.

جدول 13.4. مجموعة مُنتخبة من نباتات مُحورة وراثياً لتصبح مُقاومة للفيروسات في جينات الأغلفة البروتينية للفيروسات

النبات	مصدر جينات الغلاف البروتيني للفيروس
تبغ	TMV CMVAIMV
رز	RTSVRSVRYMV
حنطة	SBWMVBYDV
بطاطا	PVXPVYPLRV
قرع	CMVZYMV
بنجر السُكري	BNYVV
فستق السوداني	TSWV
اباباظ	PRSV
حمضيات	CTV
جت	AIMV

TMV= فيروس موزائيك التبغ؛ CMV = فيروس موزائيك الخيار؛ AIMV = فيروس موزائيك الجت؛ RTSV = فيروس تانكرو الحلقي في الرز؛ RSV = الفيروس المخطط في الرز؛ RYMV = فيروس التبرقش الاصفر في الرز؛ SMWMV = فيروس موزائيك الحنطة المحمول بالتربة؛ BYDV = فيروس التقزم الاصفر في الشعير؛ PVX = فيروس البطاطا X؛ PVY = فيروس البطاطا Y؛ PLRV = فيروس التفاف أوراق البطاطا؛ ZYMV = فيروس موزائيك زوكيني الاصفر؛ BNYVV = فيروس موت العروق الاصفر في البنجر؛ TSWV = فيروس ذبول وتبقع الطماطم؛ PRSV = فيروس التبقع الحلقي في الاباباظ؛ CTV= فيروس ترستيزا على الحمضيات.

مُقاومة الأمراض الفطرية والبكتيرية Resistance to fungal and bacterial diseases

تمتلك النباتات عموماً جهاز دفاعي ضد المُسببات المرضية الغازية لها، فمتى ما حصل تلف في خلايا النبات سواء كان بسبب فطر، بكتيريا أو أية آفة أُخرى، فان النظام الدفاعي يتهئ لتوفير بعض الحماية

للنبات. وتفيد زيادة المعرفة عن نظام الحماية الطبيعي للنبات ضد المُسببات المرضية المُختصون في تقانات النبات الأحيائية في تطوير نباتات مُقاومة وفي زيادة مُركبات الايض الثانوي التي تنتجها خاصة النباتات الطبية منها. تتراكم داخل النباتات عند تعرضها لمُسببات مرضية بروتينات ذات أوزان جُزيئية واطئة والتي يُطلق عليها بالبروتينات المُرتبطة بالإصابة (PR). تأخذ تلك البروتينات أشكال وخصائص مُختلفة (جدول 13.5).

جدول 13.5. أنواع وخصائص أهم البروتينات (PR) المُرتبطة بالإصابة التي تنتجها النباتات

نوع البروتين	الخصائص	نوع البروتين	الخصائص
PR-1	مضاد للفطريات	PR-8	كايتينيس/لايسوزايم
PR-2	إندو بيتا-1، 3- كلوكانيزيس	PR-9	بيروكسيديسس
PR-3	إندو كايتينيسس	PR-10	رايبونيوكليسيس
PR-4	مضاد للفطريات، إندو كايتينيسس	PR-11	فعالية الإندوكايتينيس
PR-5	مضاد للفطريات، بروتينات مشابهه للتوماتين، أوزموتينات	PR-12	الدفنسينات
PR-6	مُثبطات البروتييس	PR-13	ثانونيات
PR-7	إندو بروتييس	PR-14	بروتينات نواقل الدهون

إنزيم الكايتنيس: الكايتين عبارة عن مُكون لجُدر خلايا الفطريات والذي يُمكن تحلله بإنزيم الكايتينيس. عُزلت جينات كايتنيس من بعض النباتات وتم توصيفها. كذلك تم عزل جين الكايتينيس من بكتريا التربة *Serratia marcescens* ونُقِل الى نبات التبغ وظهر تعبيره الجيني في أوراقه. كما عزل بعض الباحثين جين الكايتنيس من نبات الفاصوليا (*Phaseolus vulgaris*) وطورو نباتا تبغ وسلجم مُحوران وراثياً حاملان لهذا الجين. وسجل نبات التبغ مُقاومة للمُسبب المرضي *Rhizoctonia solani* أما اللهانة فكانت مُقاومتها اقل نسبياً.

إنزيم الكلوكانيس: يُعد إنزيماً مُحللاً للعديد من جُدرخلايا الفطريات والأكثر شيوعاً هو إنزيم بيتا-1، 4 كلوكانيس. عُزل الجين المُشفر لهذا الإنزيم من نبات الشعيرونُقِل الى نبات التبغ ونجح تعبيره الجيني في النبات الاخيرووفر حماية له من فطر التربة *Rhizoctonia solani*. والمُلاحظ ان المُقاومة للمُسببات الفطرية تزداد بعد نقل كلاً من الجينين؛ الكايتينيس والكلوكانيس في النباتات المُحورة وراثياً وكانت النتيجة الحصول على نباتات تبغ، طماطم وجزر مُقاومة للفطريات.

البروتينات الموقفة لنشاط الرايبوسوم (RIPs): يوفر هذا النوع من البروتينات حماية ضد الإصابات الفطرية حيث تعمل في الرنا الرايبوسومي (rRNA) في حقيقية وبدائية النواة في إزالة الادنين من مواقع مُحددة. ينتج عن ذلك تثبيط في تصنيع البروتين وأخيراً نبات شعيرمُحور وراثياً مُقاوم للإصابات الفطرية. أطلق بعض الباحثين تسمية البروتينات المُضادة للميكروبات في هذا النوع من البروتينات المُثبطة لعمل الرايبوسومات. ومن الأمثلة على الأنواع الأُخرى للبروتينات التي تعمل كمُضادات ميكروبية؛ اللكتينات، الدفنسينات، اللايسوزايم والثايونينات وغيرها.

اللايسوزايم: يعمل اللايسوزايم في تحلل الكايتين والببتايد كلايكون في جُدر الخلايا مما يُقلل معنوياً من الإصابة الفطرية. أظهرت نباتات البطاطا المُحورة وراثياً بجين اللايسوزايم مُقاومة لبكتريا *Erwinia carotovora*.

الدفنسينات Defensins: وهي عبارة عن ببتيدات (بأعداد أحماض أمينية تتراوح من 26 الى 50) ضد المكروبات وتتواجد في كل الخلايا النباتية وتُهاجم الأغشية البلازمية الميكروبية لكنها غير مُناسبة لتجهيز النبات بالمُقاومة ضد المُسببات المرضية. وحديثاً تم تطوير جين دفنسين صناعي ونُقل الى البطاطا حيث أظهرت مُقاومة ضد البكتريا *Erwinia carotovora*.

الثايونينات Thionins: يوفر هذا النوع من البروتينات حماية ضد البكتريا. إذ أُدخلت الجينات المُشفرة لبروتينات الثايونين في نبات التبغ وأظهرت النباتات المُحورة وراثياً مُقاومة ضد بكتريا *Pseudomonas syringae*.

الفايتوالكسينات: وهي عبارة عن مُركبات ثانوية تنتجها النباتات إستجابة للإصابة، ذات وزن جزيئي قليل وذات طبيعة ضد ميكروبية. تتوافر عادة في خلايا أو أعضاء مُتخصصة وتتحرك حال وقوع الإصابة. ومن المُلاحظ بأن الجينات تتحفز لإنتاج المزيد من هذه المُركبات عند وقوع الإصابة. ويُعد الإنزيم المسؤول عن تصنيع مُركب ستلبين (Stilbene synthase) المفتاح لإنتاج الفايتوالكسينات المعروفة. ولحُسن الحظ، نجح

الباحثون من عزل الجين المُشفر لهذا الإنزيم من نبات فستق الحقل وأُدخل في نباتات التبغ والرز والسلجم *(Brassica napus)*. وكذلك وِجِدَ بأن النباتات المُحورة وراثياً بجين تصنيع الستلبينقد أظهرت مُقاومة لبعض أنواع الفطريات.وندرج في جدول 13.6 قائمة بنباتات تم تحويرها وراثياً بجينات مُختلفة وأظهرت مُقاومة ضد المُسببات المرضية.

جدول 13.6. مجموعة من المحاصيل التي تم تحويرها وراثياً بجينات لها علاقة ببروتينات الأمراض مع المُسبب المرضي الذي تُقاومه

النبات	الجين أو الجينات المنقولة	المُسبب المرضى الذي تقاومه
البروتينات المرتبطة بالأمراضية (PR)		
تبغ	الكايتنيس المعزول من بكتريا	*Serratia marcescens, Alternaria longipes*
تبغ	الكايتينيس من الفاصولياء	*Rhizoctonia solani, Phytophthora parasitica*
تبغ	الكايتينيس، 1، 3-بيتا كلوكانيس	*Cercospora nicotinae*
رز	الكايتينيس	*Rhizoctonia solani*
جزر	الكايتينيس، 1، 3-بيتا كلوكانيس	*Alternaria dauci, A. radicina*
طماطم	الكايتينيس، 1، 3-بيتا كلوكانيس	*Fusarium oxysporum*
سلجم	الكايتينيس	*Rhizoctonia solani*
بروتينات ضد الميكروبات		
تبغ	بروتين مُثبط لرايبوسوم الشعير	*Rhizoctonia solani*
تبغ	الدفنسين المعزول من الفجل	*Alternaria longipes*
تبغ	جين الفا ثايونين المعزول من الشعير	*Pseudomonas syringae*
بطاطا	باكتريوفاج T-4 لايسوزايم	*Erwinia carotovora*
الفايتوالكسينات		
رز	ستلبين سينثيس	*Pyricularia oryzae*
تبغ	ستلبين سينثيس	*Botrytis cinerea*

وُظفت تقانات زراعة الأنسجة النباتية في غربلة وإنتخاب العشرات من المحاصيل لمُقاومة الأمراض المُختلفة نظراً لما توفره تلك التقانة من الغربلة في مُستوى الخلية (جدول 13.7) وإنتخاب المُقاوم منها إعتماداً على التغاير الجسمي الموجود وعلى تطفير الزروعات وإنتخاب الطوافر.

جدول 13.7.غربلة وإنتخاب نباتات مُقاومة للأمراض خارج الجسم الحي بعد إضافةً عوامل إنتخاب مُختلفة للأوساط الزرعية

الأنواع النباتية	عامل الإنتخاب	المُسبب المرضي الذي تقاومه
فستق الحقل	راشح المزرعة	*Cercosporidium personatum*
سلجم	المُسبب المرضي	*Phoma lingum*
عصفر	راشح المزرعة	*Alternaria carthami*
ليمون	راشح المزرعة	*Phoma tracheiphila*
تمر هند	راشح المزرعة	*Pythium graminicolum*
كلاديولس	حامض الفيوزارك	*Fusarium oxysporum*
فول الصويا	راشح المزرعة	*Septoria glycines*
قطن	راشح المزرعة	*Fusarium oxysporum, Alternaria macrospora*
شعير	حامض الفيوزارك	*Fusarium sp.*
كتان	راشح المزرعة	*Fusarium oxysporum*
طماطم	راشح المزرعة	*Pyrenochaeta lycopersica*
مانجو	راشح المزرعة	*Colletotrichum gloeosportoides*
جت	راشح المزرعة	*Fusarium oxysporum*
موز	حامض الفيوزارك	*Fusarium sp.*
تبغ	Methionine sulfoximine	*Pseudomonas syrigae, Altarnaria,* virusTMV
رز	راشح المزرعة	*Helminthospotum oryzae*
خوخ	راشح المزرعة	*Xanthomonas campestris*
قصب السكر	راشح المزرعة	*Colletotrichum falcatum*
بطاطا	راشح المزرعة	*Phytophthora infestans*
حنطة	Deoxynivalenol	*Fusarium sp., F.graminearum*
عنب	راشح المزرعة	*Elsinoe ampelina*
ذرة صفراء	سموم المرض (Pathotoxin)	*Helminthosporium maydis*

مُقاومة النيماتود Nematode resistance

النيماتودا عبارة عن ديدان بسيطة تتواجد في التربة وتمتلك قناة هضمية كاملة وتُسبب خسائر كبيرة في الحاصلات الزراعية. تمكن بعض الباحثين من تشخيص وعزل جين من نبات شوندر بري أثبت تعبيره في مُقاومة النيماتود. وأقترح الباحثون بأن الجين يُشفر لبروتين يتحسس لوجود النيماتود ويبدأ بتشغيل منظومة تفاعلات دفاعية ضده داخل النبات. ويُعتقد تكوين بعض المُركبات الكيميائية التي تقوم بإتلاف الأجزاء العلوية من الجهاز الهضمي للديدان الثعبانية. جرت مُحاولات لنقل جين مُقاومة النيماتود الى نبات البنجر السُكري وللأسف كان النجاح محدوداً بسبب صعوبة زراعة خلايا البنجر السُكري ألمُحورة وعدم نجاح إخلافها.

إكتشاف تداخل الرنا Discovery of RNAi

حقق إكتشاف تعاقبات المجينات الكاملة للنبات (Complete plant genome sequences) أبعاداً جديدة في مجال هندسة النبات وراثياً وتحسين صفاته. فمنذ ان اعتقد العلماء في إمكانية الحصول على اي ناتج جيني (Gene product) بمُجرد إدخال جينات أُخرى (Foreign genes) الى داخل النبات المُراد تحسينه، لكن تبين لاحقاً ان ذلك لايتحقق دوماً. وبعد إجراء العديد من التجارب، بدأت مفاتيح الحلول تتكشف. فقد أكتشف العلماء فيما بعد ان إدخال نُسخ مُتعددة من جين يُشفر الى اللون الارجواني لأزهار نبات ورد البوري قد حققوا أكثر مما توقعوا اذ حصلوا على أزهار باللون الارجواني وأُخرى بيضاء وقسم منها مُخططة. ومن خلال آلية غير معروفة خمدت (Silenced) تأثيرات هذه الجينات المُدخلة وخمد معها الجين المسؤول عن اللون الارجواني. وفي دراسة أُخرى تم أخماد فعل الجين بعد إصابة النبات بفيروسات مُهندسة وراثياً تحتوي على أجزاء من جين نبات. ولم تُعرف آلية حصول الإخماد لوظيفة الجين الى ان توصل الاميركيان اندروفاير وكريج ميلو الى اللغز ومُنحا جائزة نوبل في العلوم عام 2006. أكتشف العالمان بأن حقن رنا مُزدوج (ds RNA) في ديدان *Caenorhabditis elegans* قد حفز إخماد الجينات ذات التعاقب المُشابه لتلك المحقونة من ds RNA. أطلقا على هذه الظاهرة اسم تداخل الرنا (RNA interference). عند إعادتهم إختبار المسلك الحيوي للإخماد في نبات ورد البوري وفي الفيروس الذي حفز إخماد الجين إكتشفوا بأن ذلك أدى الى تراكم ds RNA ومن ثم المسلك الحيوي للتداخل أي RNAi. بالإضافةً الى دور RNAi في تنظيم التعبير الجيني، فقد أُستعمل ايضاً في تحفيز الإستجابة المناعية عند الإصابة بمرض ما كوسيلة دفاعية طبيعية ضد الطُفيليات في المُستوى الجُزيئي أمثال الجينات الطافرة والوحدات الوراثية

الفيروسية والتي تؤثر في إستقرارية او ثباتية الجين. وسُجلت بعض الحالات لأنواع مُحددة من البكتريا قد سببت في تحفيز المسلك الحيوي للـ RNAi داخل النبات بعد إصابته بهذه الأنواع من البكتريا.

آلية عمل تداخل الرنا Mechanism of RNAi

تُلخص آلية العمل بالخطوات الخمس التالية:-

1- عند ولوج سلسلة مُزدوجة طويلة من الرنا (ds RNA) الى جسم كائن حي كإدخال جين أو عنصر وراثي شاذ أو فيروس فأن ذلك يُحفز المسلك الحيوي لرنا التداخل (RNAi) في الخلايا مما يُنعش الإنزيم دايسر (Dicer).

2- يقوم الدايسر بمسلك ds RNA في الموقع لقطع أجزاء قصيرة بطول 20-25 زوج قاعدي تسمى برنا التداخل الصغير أي Small interfering RNA (si RNA).

3- ينتج من الخطوة أعلاه مُعقد إخماد مُحفز بالرنا RNA-induced Silencing Complex وإختصاراً (RISC) له القابلية في التمييز بين قطعتي رنا التداخل الصغير (si RNA) أما بشكل مُشفر (Sense) أو بشكل غير مُشفر (Antisense). عندئذٍ فأن القطع المُرتبطة بالشكل المعقول ذات نفس تعاقب الجين الهدف بالضبط تتحلل وتتلاشى.

4- بينما القطع ذات الشكل غير المُشفر (Antisense) تتداخل مع مُعقد الإخماد (RISC) وهذه تُعد دليل للوصول الى الهدف وهو mRNA بطريقة ذات تعاقب مُحدد.

5- في الخطوة الأخيرة فأن mRNA المُشفر للأحماض الأمينية يرتبط مع مُعقد الإخماد (RISC) وبهذا فان المُعقد النشط يقوم وبإستمرار بإتلاف mRNA وبذلك يمنعه من صناعة البروتينات.

توظيف تقانة تداخل الرنا في مُقاومة المُسببات المرضية RNAi for pathogen resistance

أُستعملت تقانة إخماد الجين (Gene silencing) لأول مرة في تطوير أصناف نباتية مُقاومة للفيروسات اذ بُنيت إستراتيجيات هندسة النبات وراثياً ضد الفيروسات بذات منوال آلية إخماد الرنا الطبيعي. وتوضحت الصورة عندما تمكن العلماء من تطوير بطاطا مُقاومة لفيروس Y عبّرَ من خلالها النبات مُستنسخات الرنا (RNA Transcripts) لجين بروتينيز الفيروس (Proteinase gene). ظهرت فيما بعد مناعة ضد أنواع أُخرى من الفيروسات كموزائيك الخيار (CMV) والتبغ (TMV) وفيروس الذبول المُبقع في الطماطم

(Tomato spotted wilt virus) وإختصاراً TSWV وفيروس الموزائيك الذهبي في الفاصوليا (Bean golden mosaic virus) واختصاراً BGMV وفيروس موزائيك قنابات الموز (Banana bract mosaic virus) وإختصاراً BBMV وأنواع أُخرى من الفيروسات. إضافةً لما سبق، فأن النباتات يُمكن ان تُحور لِتنتج رنا مُزدوج يُخمد الجينات الضرورية في الآفات الحشرية والنيماتودا الطفيلية. ووظفت الطريقة الأخيرة في تطوير أصناف مُقاومة لنيماتودا العقد الجذرية وديدان جذور الذرة الصفراء وديدان جوزة القطن.

تداخل الرنا في تحسين المحاصيل RNAi for crop improvement

تُعد طريقة تداخل الرنا (RNA interference) وإختصاراً (RNAi) حديثة في حجب وظيفة جين معين بعد حشر تعاقبات قصيرة من حامض الرايبونيوكلك (RNA) والذي يتوافق مع تعاقب الجين الهدف وبالنتيجة لاتُنتج بروتينات. وبالنظر للإنجاز الكبير المُتوقع ان ينتج عن هذه التقانة التي عُرفت بداياتها عام 2003 لذا سُمي ذلك العام بعام إقتحام الحاجز (Breakthrough of the year) وسمته إحدى المجلات العلمية بانه الإنجاز في التقانات الأحيائية الذي إقتحم حاجز البليون دولار. واعتُبرت طريقة الرنا المُتداخل الإختيار الأفضل للباحثين في كشف تركيب ووظيفة الجينات المُهمة. وتزداد أهمية تداخل الرنا بكونها وسيلة فعالة جداً من الناحية العلاجية (Therapeutic) بإتجاه طبي معلوم الهدف. فالمدى من الأمراض والتشوهات التي يمكن ان يحلها لامثيل له تبدأ من السرطان، أمراض القلب، التشوهات العصبية وحتى تصل الى إلتهاب الكبد الفيروسي (HIV). وبالتأكيد ذات تطبيقات زراعية واسعة إذ سهلت تقانة تداخل الرنا من السيطرة على العديد من الآفات الحشرية والمرضية النباتية وساهمت في إدخال العديد من الصفات المرغوبة بإتجاه زيادة إنتاجية المحصول كماً ونوعاً. فقد طور العُلماء عن طريق تقانة تداخل الرنا محاصيل لاتُقدر قيمتها بثمن فعلى سبيل المثال لا الحصر تطوير نبات تبغ خالي من النيكوتين وتطوير نوع من فستق الحقل لايُسبب أعراض الحساسية عند تناوله وكذلك إنتاج قهوة خالية من الكافئين وذرة صفراء مُعززه تغذوياً.

تداخل الرنا وجينومات النبات الوظيفية RNAi and plant functional genomics

يُعد تحديد ومعرفة وظائف كل الجينات المحمولة في جينومات النبات من أهم التحديات الرئيسة التي تُواجه العاملين في علم النبات. الا أن تقانة تداخل الرنا (RNAi) وفرت بكفاءة عالية من إخماد عمل جين واحد أو مجموعة جينات. علاوة على ذلك فأن تعبير ds RNAs وبوجود حفازات (Promoters) بإمكانها السيطرة في مدى ووقت الإخماد الجيني وعندئذٍ فبالإمكان تخميد فعل الجينات الضرورية عند مرحلة نمو

معينة من مراحل نمو النسيج أو العضو النباتي. طَور عُلماء النبات العديد من طرائق تفعيل المسالك الحيوية لتقانة تداخل الرنا في النباتات، ولهذه التقانات المُتعددة مساوؤها ومحاسنها من حيث ثباتية هذه التأثيرات ومدى تطبيقها في مجموعات نباتية. أُستعملت تقانة تداخل الرنا وبنجاح في نواقل الرنا المُعبرة عن الهيربين (Hairpin RNA-expressing vectors) كما أُستعملت التقانة ايضاً عند القصف بالجسيمات الدقيقة (Particle bombardment) وكذلك في التحول الوراثي عند إستعمال بكتريا الاكروبكتيرم كوسيط (*Agrobacterium*-mediated transformation) وعند إستعمال الفيروسات في إخماد فعل الجين Virus-induced gene silencing (VIGS).

هندسة المسالك الحيوية لمُركبات الايض بتداخل الرنا Engineering plant metabolic pathways through RNAi

أُستعملت تقانة تداخل الرنا في تحوير المسالك الحيوية لايض النبات من أجل تحسين مُحتوى النباتات التغذوي مع تقليل إنتاجها من السموم وكما مُوضح في جدول 14.1 المبني على التغيرات الموروثة والمُستقرة لتداخل الرنا الحاصلة في الشكل المظهري (Phenotype) للنبات.

واقع حال التقانات الأحيائية الزراعية Current status of agric. biotechnology

للتقانات الأحيائية تطبيقات واسعة ومُتنوعة في مجالات الزراعة والصحة والصناعة والبيئة، اذ أشارت الدلائل القطعية بأن أدوات تلك التقانات من زراعة نسيجية وهندسة وراثية وتحسين النبات في المُستوى الجزيئي لا تزال المَعين الذي لا ينضب بالإنجازات بما يؤمل منه تحقيق الامن الغذائي وباقي المجالات التي ذُكرت سابقاً والتي تصب جميعاً في تحسين رفاهية البشر. وفي الوقت ذاته فالتقانات الأحيائية ليست بالعصا السحرية التي تستطيع تغيير الواقع بين ليلة وأُخرى. كونها ترتبط بسلسلة طويلة خاصة في المجال الزراعي فإنتاج البذور عالية النوعية يتطلب ممارسات حقلية ومختبرية وصحية دقيقة. وإنتاج نباتات ذات صفات مرغوبة من تحمُل للظروف البيئية ومُقاومة للافات والمُبيدات يتطلب عملاً مُضنياً يبدأ من المختبر ثم الحقل كي يدخل في سلسلة الإنتاج عند المزارع.

واقع حال القطن المُحور بجينات كراي Status of Bt cotton

أول من تبني القطن المُقاوم لدودة جوز القطن والمُحور وراثياً بعد إدخال جينات له من بكتريا *Bacillus thuringiensis* (Bt) عدد من المزارعين وفي نطاق ضيق عام 1999.

جدول 14.1. أمثلة لصفات نباتية جديدة هُندست وراثياً بتقانة تداخل الرنا

الصفة	الجين الهدف	المضيف	التطبيقات
زيادة المُحتوى التغذوي	LYC	الطماطم	زيادة تركيز اللايكوبين (الكاروتينويد كمضاد اكسدة)
زيادة المُحتوى التغذوي	DET1	الطماطم	مُستويات عالية من الفلافونيدات ومُحتواها من كاروتين b
زيادة المُحتوى التغذوي	SBE11	الحنطة، البطاطا الحلوة والذرة الصفراء	زيادة مُستويات الأميلوز لتحسين عمليات الهضم
زيادة المُحتوى التغذوي	FAD2	السلجم، فستق الحقل والقطن	زيادة مُحتواها من حامض الأوليك
زيادة المُحتوى التغذوي	SAD1	القطن	زيادة مُحتوى بذور القطن من حامض الستيرك
زيادة المُحتوى التغذوي	KLKR/SDH	الذرة الصفراء	ذرة صفراء معززة باللايسين
خفض إنتاج القلويدات	COR	الخشخاش	إنتاج قلويد غير مخدر بدل المورفين
خفض إنتاج القلويدات	CYP82E4	التبغ	خفض مُستويات كارسينوجين في الأوراق
تراكم المعادن الثقيلة	ACR2	الأربدوبسس	التراكم العالي لعُنصر الزرنيخ لغرض الاستصلاح الحيوي
خفض إنتاج الفينولات المُتعددة	S-Cadinene synthase gene	القطن	خفض مُستويات مُركب الكوسيبول في بذور القطن للإستهلاك الآمن
الحساسية للأثيلين	LeETR4	الطماطم	النضج المبكر لثمار الطماطم
الحساسية للأثيلين	ACC oxidase gene	الطماطم	تقليل سرعة نضج الثمار وبالتالي اطالة العمر المخزني
تقليل الحساسية	Arah2	فستق الحقل	فستق حقل خالي من مسبب الحساسية
تقليل الحساسية	LO1P1, LO1P2	الجازون	تقليل الحساسية من هذا العشب
تقليل إنتاج العامل المُسبب لفرز الدموع	Lachrymatory factor synthase gene	البصل	إنتاج بصل لا يُدمع العين (Tearless onion)

وبفضل وسائل الإرشاد الحديثة ونقل التكنولوجيا زاد عدد المزارعين للقطن Bt وأثناء ثلاثة أعوام فقط من 7 الى 90% مما يُعد مؤشراً لاشك فيه في نجاح عملية نقل التكنولوجيا وإتباع طرائق الارشاد الزراعي الصحيحة وبالمُقابل ثقافة المُزارع لتقبُل التقانات الحديثة وهذا ما يتطلبه الأمر لمزارعي بُلداننا. وخلال الثلاثة أعوام أعلاه، كانت نسبة مايُزرع من بذور قطن Bt يبلغ 80%، ونتج عن ذلك تقليل عدد رشات المِبيدات الحشرية من 10 الى 4 رشات فقط أثناء الموسم مما وفر في الكُلف وقلل من التلوث البيئي. ومن الآثار الإجتماعية المُفيدة عند تبني التقانات الحديثة إضافةً الى تقليل كُلف الإنتاج هو وفرة الوقت عند المزارع وعائلته مما يُتيح لافراد المُجتمع الفرصة للذهاب الى التعليم والإهتمام بالبيت مما ينعكس صحياً وثقافياً في المُجتمع الحاضن للتقانات الأحيائية.

واقع حال الذرة الصفراء المحورة بجينات Status of Bt maize Bt

زُرعت الذرة الصفراء المُحورة وراثياً (Bt) في جنوب أفريقيا لاولَ مرة عام 2001 لتحتل المساحة الاكبر بين المحاصيل الرئيسة اذ بدأت زراعتها بمساحة 166000 هكتار عام 2001 لترتفع المساحة الى 1.2 مليون هكتار عام 2006 (وتمثل 87% من المحاصيل المُحورة وراثياً). حصلت مقبولية لدى السُكان في إستهلاك الذرة البيضاء Bt واحتلت مساحة 704000 هكتار عام 2006 اي مايعادل 44% من المساحة الكلية المزروعة بالذرة البيضاء. وأخيراً حقق تبني زراعة الذرة Bt عائداً إضافياً بما يقارب من 43 دولار/هكتار نتيجة زراعتها.

سلامة مُنتجات المحاصيل المُنتجة بالتقانات الأحيائية Safety of biotech. crops

بعد مرور أكثر من عقد لإنتاج وإستهلاك الأغذية المُحورة وراثياً وكذا الحال لعلائق الحيوانات، لم تظهر اية مخاطر تخص صحة الإنسان أو الحيوان وحتى البيئة. جاء تأكيد ذلك من جهات غير رسمية ومصادر علمية رصينة منها إدارة البحوث العلمية في الاتحاد الاوربي والاكاديمية الفرنسية للعلوم والطب والجمعية الطبية البريطانية. وفي عام 2004، نشرت مُنظمة الزراعة الدولية (FAO) تقريراً اشار الى عدم حصول اية حالة من التسمم الغذائي وبهذا فالمحاصيل المُحورة وراثياً لا ينتج عنها تأثيرات سلبية نتيجة إستهلاكها أو إستهلاك مُشتقاتها اذ لم يثبت ذلك في اي مكان بالعالم. والجدير بالذكر ان هناك بعض المخاوف لدى المُستهلكين من التأثير التراكمي بعيد المدى الذي قد يحصل ولو لم يثبت علمياً بعد.

الفوائد الصحية للمحاصيل المُنتجة بالتقانات الأحيائية Health benefits of biotech. crops

إضافةً الى تقليل بقايا المُبيدات الحشرية في التربة وداخل أجزاء النبات، فقد أُضيف لهذه المحاصيل بُعد صحي عند زيادة قيمتها الغذائية، فعلى سبيل المثال لا الحصر فان المُستوى المُنخفض من الإصابة بالحشرات والفطريات سيقلل أو يمنع تراكم المايكوتوكسين في بذور الذرة الصفراء. كما ان تعزيز الرز في البيتا كاروتين سيكون مصدراً بديلاً لفيتامين A وسيخدم وينقذ ملايين الأطفال سنوياً من إحتمال فقدان البصر. وفي مجال الاستصلاح الحيوي فمحصول الكسافا المُعدل وراثياً يمكنه سحب عُنصر السيانيد من التربة وبذلك يُقلل من التلوث البيئي.

هندسة أيض الكربوهيدرات Engineering of carbohydrates metabolism

تُصنع الكربوهيدرات في مسالك تصنيعية معلومة وتخزن في عضيات خلوية مُختلفة. يُصنع النشاء ومُشتقاته داخل البلاستيدات وتنتج السُكريات ومُشتقاتها في السايتوسول وتتراكم في أجزاء الخلية. وفيما يلي إيجازاً عن هندسة ايض تلك المُركبات.

النشاء: النشاء عبارة عن بوليمر من الكلوكوز ويتكون من الأميلوز والأميلوبكتين. يُستعمل كغذاء للإنسان والحيوان ويدخل في العديد من الصناعات. وبالنظر لهذه الأهمية، كان ومايزال النشاء هدفاً إستراتيجياً لمُهندسي النبات وراثياً لغرض تحسين إنتاجه كماً ونوعاً. تُعد عملية التصنيع الحيوي للنشاء في غاية التنظيم يكون فيها إنزيم ADP-glucose pyrophosphorylase المفتاح الرئيسي في ذلك. والإنزيم تحت سيطرة بعض المُركبات وخاصة الفوسفات. تمت عملية تطفير الإنزيم داخل بكتريا *E. coli* لتغيير الخواص التفارغية (Allosteric properties) للإنزيم وتم نقل الجين الطافر الى نبات البطاطا واثبت تعبيره الوراثي. أُنتجت البطاطا المُحورة وراثياً بالإنزيم أعلاه كميات عالية من النشاء. يتألف النشاء عادةً من 20-30% أميلوز و 70-80% أميلوبكتين. تُحدد النسبة من المُكونين الخواص الفيزيائية والكيميائية للنشاء. ومن المعلوم بأن جزء الأميلوبكتين مادة هلامية ومُستقرة وعليه يكون مُفضلاً في الصناعات الغذائية. والجدير بالذكر بان إنزيم Granule-bound starch synthase (GBSS) مسؤولاً عن تصنيع الأميلوز في الوقت الذي يكون فيه إنزيم Starch branching enzyme (SBE) مسؤولاً عن تصنيع جزء الأميلوبكتين. وبعد توظيف تقانة Antisense تم تثبيط عمل إنزيم GBSS في نبات البطاطا مما أنتج درنات بطاطا تحتوي على نشاء خالي من الأميلوز أي بطاطا مُنتجة للأميلوبكتين فقط. وتتوفر إمكانية إنتاج نشاء عالي المُحتوى من الأميلوز ذو تفرعات محدودة في سلاسله مما يجعله ذو قيمة غذائية للإنسان والحيوان على حد سواء إضافةً

الى إستعمالاته في الأغراض الصناعية. ويُمكن إنتاج نشاء عالي الأميلوز في درنات البطاطا بتوظيف تقانة Antisense بتثبيط إنزيمي تفرع سلاسل النشاء A و B.

السايكلودكسترينات Cyclodextrins: مُركبات ذات حلقات شبيهة بالمخروط تتكون من تحت وحدات من 6-8 كلوكوبايرنوز (6-8 glucopyranose subunits) وهي محبة للماء بطبيعتها (Hydrophilic) ويُمكنها حصر المُركبات الكارهة للماء (Hydrophobic). وبالنظر للمزايا أعلاه، تُستعمل السايكلودكسترينات كمواد علاجية خاصة في إذابة المواد الصيدلانية الكارهة للماء مثل الأسترويدات. والإنزيم المسؤول عن تصنيع السايكلودكسترينات من النشاء هو Cyclodextrin glycosyl transferase والذي تم تشخيصه. وتمكن الباحثون من نقل الجين المُشفر لذلك الإنزيم من البكتريا الى نبات البطاطا وللأسف لم تُظهر النباتات المُحورة وراثياً بهذا الإنزيم زيادة في تصنيع الدكسترينات الحلقية وعزوا ذلك لأسباب مُختلفة.

الفركتينات Fructans: ويُطلق عليها أيضاً الفركتينات المُتعددة (Polyfructans) وهي بوليمرات ذائبة من الفركتوز. تصنع وتخزن في الفجوات، والفركتينات قصيرة السلسلة (Oligofructans) ذات طعم حلو شبيه بالسكروز وعليه يُمكن إستعمالها كبديل للسكر في الغذاء والمشروبات الغازية. ومن ميزات الفركتينات الأُخرى كونها لا تُهضم في الامعاء لذلك يُمكن تناولها كمحليات واطئة السعرات الحرارية. طور الباحثون نباتات بطاطا مُحورة وراثياً حاملة لجين Fructosyl transferase المنقول من بكتريا *Streptomyces*. وزاد الإنزيم من تصنيع الفركتينات. وأُنتجت حديثاً فركتينات قصيرة السلسلة في نبات البنجر السُكري (Oligofructans of sugar beet) وغيرها (لاحظ جدول 14.2) بعد تحويرها وراثياً وإستعمالها في الزراعة الجزيئية أو ما يُسمى هندسة مُركبات الايض والتي تستهلك كمُحليات واطئة السعرات الحرارية.

التريهالوز Trehalose: سكريات ثنائية تُنتج بوساطة النباتات والأحياء المجهرية إستجابة للإجهاد الازموزي. أجرى العديد من الباحثين دراسات وراثية حول إمكانية زيادة تصنيع تلك المُركبات داخل الخلايا النباتية كوسيلة لمواجهة الإجهادات وخاصة نُقص الماء والتي تُوِجت بالنجاحات. يُستعمل التريهالوز كمادة حافظة للأغذية ولذلك فهي مُهمة صناعياً.

جدول 14.2. كربوهيدرات مُهمة إقتصادياً مُنتجة من نباتات مُختلفة بالزراعة الجزيئية أو بما يُسمى بهندسة مُركبات الأيض

المُركب	النبات المُحور وراثياً	التطبيقات
نشاء خالٍ من الأميلوز(نشاء الأميلوبكتين)	البطاطا	غذاء، صناعة
نشاء عالي الأميلوز	البطاطا	غذاء، صناعة
دكسترينات حلقية	بطاطا	غذاء، دواء
فركتينات	تبغ، ذرة صفراء، بطاطا، بنجر السكر	غذاء، صناعة
تريهالوز	التبغ	مثبت غذائي

هندسة أيض الدهون Engineering of lipid metabolism

يُستهلك ثلثي الدهون المُنتجة من النباتات كغذاء ويُستعمل الثلث الآخر في أغراض صناعية كصناعة الصابون، المُنظفات، تزييت السطوح وكوقود حيوي. تلعب العديد من العضيات الخلوية دوراً مُهماً في تصنيع الدهون (كيميائياً الكليسريدات الثلاثية) أمثال البلاستيدات، السايتوبلازم والشبكة الاندوبلازمية والتي تُخزن بعد إنتاجها في الأجسام الدهنية. تَسحب البلاستيدات مُركب الأسيتيت المُتوافر في السايتوبلازم لتحوله الى مُركبي Acetyl CoA و malonyl CoA. تدخل هاتان الجزيئتان في سلسلة من التفاعلات حيث يساعدها في ذلك إنزيم تصنيع الدهون Fatty acid synthase (FAS) ليَنتج عنها دهون Acl حاملة للبروتينات ذات أعداد ذرات كربون مُختلفة ومن أمثلتها؛ Laurate-C12، Myristate-C14، Palmitate-C16، Stearate-C18، Oleate-C18. وبفعل إنزيمات Acyl-ACP thioesterases تتحرر الحوامض الدهنية لتنتقل الى السايتوبلازم حيث تمر بتحويرات معلومة مثل الإستطالة، فقدانها للتشبع (إدخال روابط مزدوجة)، إضافةً مجموعة هيدروكسيل وغيرها. تتفاعل تلك الحوامض الدهنية المُحورة مع مُركب الكليسيرول ثلاثي الفوسفات (داخل الشبكة الاندوبلازمية) لتكون أخيراً مُركبات-Triacyl (TG) glycerols. ينتقل المُركب الأخير الى الأجسام الدهنية حيث يخزن. تحتوي الأجسام الدهنية في البذور أيضاً بروتينات تسمى Oleosins في طبقات دهنية أُحادية. وفيما يلي بعض الأفكار التي تصف إمكانية هندسة تصنيع الدهون وراثياً.

1- إنتاج أحماض دهنية قصيرة السلسلة

تحتوي غالبية الدهون النباتية على أكثر من 16 ذرة كربون مثل Stearic، Palmitic، وحوامض Oleic. الدهون ذات السلاسل الدهنية الأقصر (C8 – C14) لها أهمية كبيرة في الصناعة وخاصة في إنتاج الصابون والمُنظفات ومواد تجميل وغيرها. ويُمكن تحجيم عملية تحلل ACP بوساطة إنزيمات Thioesterases لإنتاج نسبة عالية من الحوامض الدهنية. تم عزل إنزيم Acyl-ACP thioesterase والذي يُحلل Lauroyl-ACP من أشجار *Umbellulularia californica* النامية في خليج كالفورنيا. وتم بنجاح كلونة الإنزيم المُشفر للإنزيم أعلاه ونقله الى نبات بذور السلجم (Oilseed rape). أُنتجت نباتات السلجم المُحورة وراثياً بالجين أعلاه نسبة عالية من الحامض الدهني Lauric ذو 12 ذرة كربون.

2- إنتاج الأحماض الدهنية طويلة السلسلة.

كما تُصنع مُركبات الفركتان (Fructans) وتُخزن داخل الفجوات.

هندسة ايض البروتينات Engineering of proteins metabolism

بعد النجاح الباهر في إنتاج الرز الذهبي وتحسين قيمته الغذائية، إتجهت أنظار الباحثين نحو هندسة الأحماض الأمينية بإعتبارها وحدات بناء البروتينات. يتمكن جسم الإنسان من تصنيع 10 أحماض أمينية فقط من مجموع 20 حامضاً أمينياً طبيعياً ويتم تجهيز الأحماض الأمينية الأساسية الأُخرى من الغذاء. يسبب إستهلاك الغذاء المُتوازن المحتوي كميات مُتوازنة من الأحماض الأمينية مشاكل غذائية تكون مردوداتها سلبية في صحة الإنسان عند تركيزه على أنواع مُحددة من الأغذية. يستهلك الإنسان في الغالب محاصيل الحبوب كمصدر للطاقة ويستهلك بذور البقوليات كمصدر للبروتينات وينطبق ذلك في غذاء الحيوانات. من محددات بذور البقوليات، محدودية توفر الحامض الأميني اللايسين فيها في الوقت الذي تحتوي بذور البقول على كميات مُناسبة من هذا الحامض الأميني. ولكن الأخيرة ينُقصها الأحماض الامينة الحاوية على الكبريت مثل المثيونين والسيستين. والجدير بالذكر استطاعة الحيوانات على تحويل المثيونين الى سيستين وليس العكس وبذلك يمكن تحوير الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت بعد زيادة مُستويات المثيونين.

وظِفت تقانات التحوير الوراثي في زيادة مُحتوى المحاصيل من الأحماض الأمينية المُختلفة منها عزل الجين المسؤول عن فقر البروتينات بالكبريت وتحويره وإضافته الى تعاقب الحامض النووي للأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت. جرت المُحاولة مع بروتين بيتا فاسيولين (β-phaseolin) المتوفر في بذور نبات الفاصولياء (*Phaseolus vulgaris*) وبروتين فيسيلين (Vicilin) في نبات البأقلاء (*Vicia faba*) ولكن البروتينات المُحورة إما تكون غير مستقرة أو تحتوي كمية قليلة جداً من الميثيونين مما يجعل الإستفادة

من تلك البروتينات محدودة. تبنى الباحثون مبدأ بناء جينات تركيبية تماماً تشفر للبروتينات الحاوية على الأحماض الأمينية الغنية بالكبريت. نجحت المحاولة بعد تصنيع أول بروتين تركيبي بالكامل يحتوي 13% مثيونين في نبات البطاطا الحلوة (*Ipomoea batatas*). شُخصت العديد من البروتينات الغنية بالكبريت في بذور الذرة الصفراء منها 21-kDa zein ويحتوي ميثيونين بنسبة 28% وأيضاً 10-kDa zein والحاوي 23% مثيونين. الرز كمثال آخر، فقد شُخص بروتين 10-kDa prolamin وبنسبة 20% ميثيونين وفي زهرة الشمس تم تشخيص بروتين 2S sunflower seed albumin وبنسبة مثيونين بلغت 16% و 8% من السيستين. وكذلك في الفستق البرازيلي Brazil nut albumin الحاوي 18% ميثيونين و 8% سيستين. أُدخلت جينات تلك البروتينات في العديد من المحاصيل منها الذرة الصفراء، فول الصويا، ترمس الزهور (Lupin)، والسلجم بهدف زيادة مُستوى الأحماض الأمينية الكبريتية بعد خلطها مع علائق الحيوانات المُكونة من حبوب النجيليات والبقوليات.

برزت مشكلة رئيسة عند نقل البروتينات بين الأنواع النباتية تجسدت في البومين الفستق البرازيلي عندما نُقِلَ البروتين المسؤول عن الحساسية الى الأنواع الأُخرى وظهرت الحساسية بعد نقلها من بذور الفستق البرازيلي الى المحاصيل التي حورت بهذا البروتين مما يجعلها غير مُستساغة من قبل الإنسان مما يُثير مشكلة الأمان الحيوي عند التعامل مع المحاصيل المُرتبطة بغذاء الإنسان. شُخصت مشكلة ثباتية تلك البروتينات ومواقعها ضمن النبات فعلى سبيل المثال، يجب ان يظهر التعبير العالي للبروتينات الغنية باللايسين في سويداء بذور محاصيل الحبوب مثل الرز وليس في المجموع الخضري والجذري. أظهر الرز تعبيراً عالياً في سويداء بذوره لبروتين غني باللايسين بعد نقل جين له من فول الصويا.

تم اختيار بروتين الكلايسنين أحد أعضاء عائلة الكلوبيولين 11s بالنظر لكون تصنيع البروتين وخزنه في فول الصويا يكون بطريقة مُشابهة الى الكلوتلينات الموجودة في الرز. عند تحليل نباتات الرز المُحورة وراثياً، تبين أن الكلوبيولينات بنوعيها الجكلوتيلين والكلايسنين، قد ظهر تعبيرهما وكونا مُعقدات بحجوم مُختلفة. يُسنتج من ذلك بان تعبير الجين المنقول من فول الصويا الى الرز له فائدتان؛ الأولى زيادة مُحتوى اللايسين في بروتين السويداء والثانية؛ تعزيز الرز غذائياً من بروتينات (الكلوبيولينات) فول الصويا والمعروفة في خفضها لمُستويات الكلستيرول في الدم.

آلافاق المُستقبلية لتداخل الرنا Future prospects for RNAi

يُمكن إستعمال RNAi بالتهديف على مجموعة من الجينات لغرض إخمادها بعد تصميم تركيبة تحول وراثي مُفردة (Single transformation construct). كما يُمكن الحصول على طيف واسع من النباتات المُقاومة للمُسببات المرضية كالفيروسات. وبينت الدراسات الحديثة الدور الكبير لإخماد الرنا في آليات تكيف النباتات للإجهادات البيئية. وبالرغم من الدراسات المُكثفة في مجال RNAi في السنوات الأخيرة لكن لاتزال هذه التقانة غير مُستثمرة بالكامل في تحسين النبات ولعل من أهم أسباب ذلك هو المسالك الحيوية المُعقدة لإخماد الرنا والآليات الجُزيئية المُرافقة لها وكيفية إرتباط ذلك في تطوير النبات.

المُقاومة ضد الإجهادات الأحيائية Resistance to abiotic stresses

تتعرض النباتات وبإستمرار الى إجهادات بيئية ينتج عنها إما تلف كامل للمحصول أو إنخفاض وأحياناً إنعدام الحاصل. تعتمد النباتات مجموعة من الآليات التي تُراوغ من خلالها في زيادة تحمُلها للإجهادات المُختلفة. ولهذا فقد تعددت إستراتيجيات زيادة التحمُل وحسب نوع الإجهاد، وفيما يلي وصفاً لأهم الإجهادات ووسائل التغلب عليها.

مُقاومة مُبيدات الأدغال Herbicide resistance

المعلوم بأن الأدغال تمثل مجموعة من النباتات ترافق في نموها المحاصيل المزروعة وتنافسها على المُغذيات والضوء وقد تنقل لها مُسببات مرضية. قُدرت الخسائرالتي تُسببها الأدغال للمحاصيل المزروعة بما يُقارب من 10-15% كنسبة إنخفاض في كمية الحاصل. كان ولايزال قسم من المُزارعين يتبعون الوسائل اليدوية أو الميكانيكية في التخلص منها، ويُفضل قسم آخر رش مُبيدات الأدغال المُسماة Weed killers أو Herbicides والتي غالباً ما تكون غير مُتخصصة تقتل بعد رشها الأدغال والمحصول على حد سواء مما حدى بالمُختصين التفكير في إنتاج مُبيدات مُتخصصة والتي يُمكن الإطلاع على تفاصيلها في الكتب المُتخصصة. ويُشترط بمُبيد الأعشاب النموذجي أن تتوفر فيه الخصائص التالية:

1- قابليته في قتل الأدغال دون التأثيرفي المحصول المزروع.

2- غير سام للإنسان والحيوان والأحياء المجهرية ومُكونات الحياة البرية الأُخرى.

3- سرعة إنتقاله داخل أنسجة النبات المطلوب التخلص منه.

4- سرعة تحلله داخل التربة.

وللأسف لايوجد مُبيد حشائش تتوافر فيه الخصائص أعلاه وقلة أعداد المُبيدات المُتخصصة، من هنا برزت الحاجة المُلحة في إنتاج محاصيل مُقاومة لمُبيدات الأدغال تنفرد بقابليتها على قتل الأدغال من دون تاثيرات سلبية في المحصول.

إستراتيجيات هندسة النبات وراثياً لمُقاومة مُبيدات الأدغال Genetic engineering strategies of herbicide resistance in plants

طُورت العديد من التقانات في هذا الصدد لتشمل طرائق في هندسة المحاصيل وراثياً منها:

1- زيادة في تعبير البروتينات الهدف: يتم بهذه الطريقة زيادة إنتاج بروتين المحصول والمُستهدف من قبل مُبيد الأدغال لدرجة يصبح فيها تأثيرالمُبيد غير معنوي. وتتم زيادة التعبير البروتيني بعد تكامل عمل نُسخ متعددة من جينات تعبير البروتين (Integrating multiple copies of protein genes) و/ أو إستعمال مُحفز قوي (Strong promoter).

2- تحسين مقدرة المحصول في إزالة سُمية المُبيد (Improved crop detoxification): تمتلك عموم النباتات أنظمة دفاع طبيعية ضد المُركبات السامة ومنها مُبيدات الحشائش. تشتمل إزالة السُمية في تحويل المُبيد السام الى غير سام أو أقل سُمية بعد تسريع عمل جهاز إزالة السُمية وبهذا يقل تأثير المُبيد.

3- إزالة سُمية المُبيد بجين غريب (Detoxification of herbicide by using a foreign gene): يتم ذلك في إدخال جين غريب الى المحصول وظيفته إزالة سُمية المُبيد.

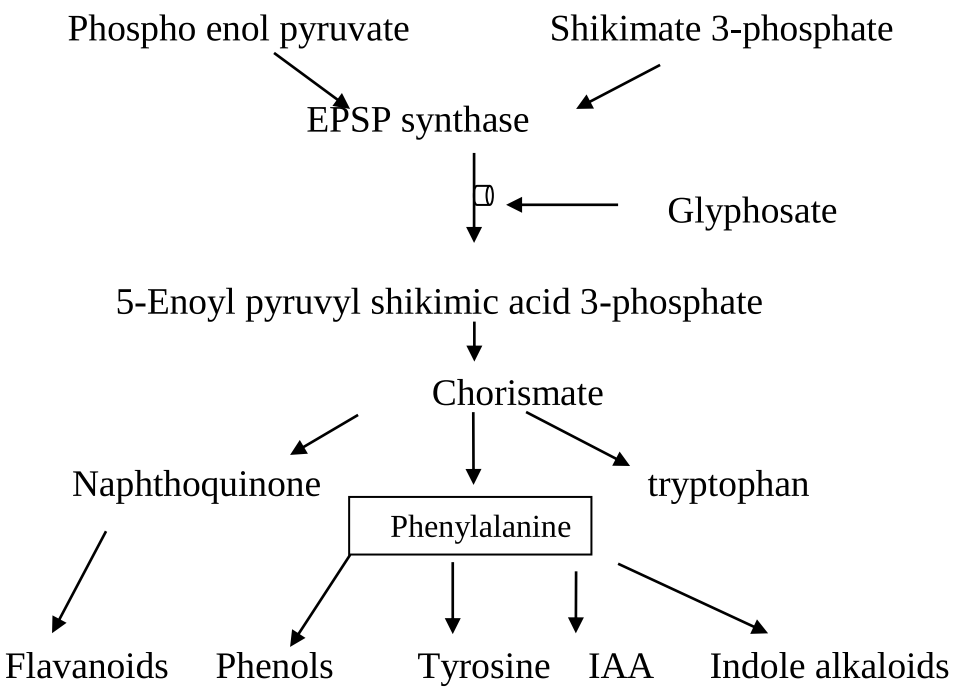
4- تطفير البروتين الهدف (Mutation of the target protein): يتم في تحوير البروتين الذي يستهدفه المُبيد بعد تعريض النبات للتطفير بحيث تُلغى وظيفة البروتين الأصلي ويصبح البروتين الجديد قادراً على إزالة سُمية المُبيد. فعند تشخيص الجين المسؤول عن البروتين المُقاوم للمُبيد، عندئذٍ يُمكن نقله الى جينوم المحصول وبذلك تُنتج محاصيل مُقاومة لمُبيدات الحشائش. تستوجب تقانة إنتاج محاصيل مُقاومة لمُبيدات الأدغال، معرفة جيدة للبروتين الهدف مع فهم لآلية فعل المُبيد. وأدناه شرحاً مُختصراً لبعض التطورات التي حصلت في السنوات الأخيرة في هذا المجال.

مُقاومة مُبيد الكلايفوسيت Glyphosate resistance

مُبيد الكلايفوسيت مُشتق من الحامض الأميني الكلايسين وله تاثيرقاتل في مدى واسع يشمل 78 نوعاً من الأدغال الأكثر ضرراً. ويمتاز بإنخفاض سُميته للحيوانات ومقدرة الأحياء المجهرية على سرعة تحلله إضافةً الى قصر مُدة النصف عُمر له (Short half-life). ويُسوق تجارياً من قبل شركة مونسانتو الامريكية للكيميائيات تحت الأسم التجاري Round up.

آلية فعل مُبيد الكلايفوسيت Mechanism of glyphosate action

ينتقل الكلايفوسيت بسرعة الى مواقع نمو النبات وله القابلية على قتل النباتات حتى في التراكيز الواطئة. يعمل المُبيد كمُثبط مُنافس للإنزيم 3-5-enoyl-pyruvylshikimate phosphate synthase (EPSPS) الذي يُعد المفتاح لمسلك حامض الشكيمك وينتج أحماض آروماتية (تربتوفان، فينيل الألنين، تايروسين) وفينولات ومُنتجات أيض ثانوي مُحددة (شكل 13.6).



شكل 13.6. مسلك الشكميت موضحاً فعل مُبيد الأدغال الكلايفوسيت.

يُساعدإنزيم EPSPS في تصنيع مُركب 5- enoylpyruvylshikimate 3-phosphate من المُركبين Shikimate 3-phosphate و Phosphoenoylpyruvate. يرتبط الكلايفوسيت بقوة مع EPSPS ويحجب المسلك الطبيعي لحامض الشكميك. لذلك يقوم مُبيد الكلايفوسيت بتثبيط تصنيع الحوامض الأمينية الآروماتية ومُركبات أُخرى مُهمة. وينتج عن ذلك تثبيط في تصنيع البروتين نتيجة النُقص الحاصل في الأحماض الآروماتية. وكنتيجة لذلك، يتوقف إنقسام الخلايا ونمو النبات ومن المعلوم ان الاوكسين IAA يُنتج من الحامض الأميني الآروماتي التربتوفان الذي سيحجب عمله بفعل المُعاملة بالمُبيد مما يجعل فعل الكلايكوسيت أكثر وطأةً مُسبباً موت النبات. علماً بأن الكلايفوسيت ساماً للأحياء المجهرية كونها تمتلك مسلك الشكميت ولكنه غير سام للإنسان والحيوان كونهما لايمتلكان هذا المسلك الحيوي.

إستراتيجيات مُقاومة مُبيد الكلايفوسيت Strategies of glyphosate resistance

هناك ثلاث إستراتيجيات مُميزة لتجهيز النبات بصفة مُقاومة الكلايفوسيت

1- زيادة تعبيرالنبات لجين EPSPS: إذ أُكتشفت زيادة في تعبير جين EPSPS في نبات البتونيا (ورد البوري) ووجِدَ بأن ذلك يرجع الى تضخيم في عمل الجين (Gene amplification) وليس زيادة في تعبيرالجين. عُزِلَ جين EPSPS من نبات البتونيا ونُقل الى نباتات أُخرى وكانت النتيجة زيادة في تصنيع EPSPS بقدار 40 مرة في النباتات ألمُحورة بهذا الجين مما يُجهز النبات بصفة المُقاومة للكلايفوسيت. وبهذا فالنبات الُمُحوريتحمُل جُرع من المُبيد أعلى بمقدار 2-4 مرات من النبات غير المُحور.

2- إستعمال جينات طافرة من EPSPS: حيث تم التحري عن جين طافر يحمل صفة المُقاومة لمُبيد الكلايفوسيت في بكتريا *Salmonella typhimurium* وَوجِدَ بعد التحري حصول إحلال في قاعدة مفردة (Single base substitution) إذ تحولت C الى T مما نتج عنه إنتاج الحامض الأميني السيرين بدل البرولين من قبل إنزيم EPSPS نتيجة تحويرالأخير. ونتيجة للتحوير الحاصل في هذا الإنزيم يجعله غير قادر على الإرتباط بالكلايفوسيت وبالتالي يُجهز النبات المُقاومة لهذا المُبيد. نُقل الجين الطافر EPSPS الى نباتات التبغ بإستعمال بلازميد Ti لبكتريا الاكروبكتريوم كناقل وأنتج الجين المنقول كميات كبيرة من إنزيم EPSPS ومع هذا لن تتجلى صفة المُقاومة لمُبيد الكلايفوسيت في نبات التبغ الا في نطاق ضيق ولم يُعرف السبب في حينها. تبين لاحقاً بأن مسلك الشكميت يحصل في البلاستيدات بينما المُقاومة للكلايفوسيت تنحصر في سايتوبلازم الخلية وان الإنزيم لايُنقل الى البلاستيدات ولهذا فلم تظهر المُقاومة. والواقع حفز هذا الإكتشاف الباحثون بأهمية ودور البلاستيدات في الهندسة الوراثية مما حدى بهم الى توسيم (ربط) الجين

الطافر أعلاه بتعاقب ببتيدي ناقل الى البلاستيدة وبهذه الوسيلة تم توجيه إنزيم EPSPS المسؤول عن المُقاومة بالدخول بحرية الى البلاستيدات وبالتالي أُنتجت نباتات مُقاومة لمُبيد الكلايفوسيت.

3- إزالة سُمية الكلايفوسيت Detoxification of glyphosate: تمتلك العديد من أحياء التربة الدقيقة الإنزيم المؤكسد للكلايفوسيت Glyphosate oxidase والذي يحول الكلايفوسيت الى كلايوكسيليت (Glyoxylate) والى حامض أمينومثيل فوسفونك (Aminomethylphosponic acid). عُزِلَ الجين المُشفر لإنزيم أكسدة الكلايفوسيت من بكتريا التربة *Ochrobactrum anthropic* وأُجريت عليه تحويرات مُناسبة بعدها نُقِلَ الى نبات السلجم الغني بالزيوت وأظهرت النباتات المُحورة وراثياً مُقاومة عالية للمُبيد بعد ان خضعت لإختبارات حقلية.

أُستعملت إستراتيجية توليف أكثر من جين لإنتاج نباتات ذات مُقاومة عالية لمُبيد الكلايفوسيت فعلى سبيل المثال تم توليف جين EPSPS مع جين مؤكسد الكلايفوسيت كإستراتيجية فعالة وناجحة وأُنتجت العديد من النباتات عالية المُقاومة. ولم يقتصر البحث العلمي في إنتاج محاصيل مُقاومة لمُبيد الكلايفوسيت بل تعداه الى العديد من مُبيدات الأدغال التجارية بالإستفادة من تطبيقات الهندسة الوراثية (جدول 13.6).

جدول 13.6. أمثلة مُختارة لنباتات هُندست وراثياً بجينات مُقاومة لمُبيدات الأدغال

المُبيد	**الجين المنقول أو آلية المُقاومة**	**المحصول المُعدل وراثياً**
كلايفوسيت	كلايفوسيت EPSPS	فول الصويا، الطماطم
كلايفوسيت	إزالة السُمية بمؤكسد الكلايفوسيت	ذرة الصفراء، فول الصويا
فوسفينوثريسين	نُقل جين *bar* المُشفر لإنزيم phosphinothricin acetyltransferase	ذرة صفراء، رز، حنطة، قطن، بطاطا، طماطم، بنجر السكر
سالفونيليوريس	نبات طافر حاوٍ على إنزيم يصنع الاسيتولاكتيت	رز، طماطم، ذرة صفراء، بنجر السكر
بروموكسينل	إزالة سمية إنزيم النتريليس	قطن، بطاطا، طماطم
أترازين	نبات طافر يحمل جين البلاستيدة الخضراء psb A	فول الصويا
حوامض الفينوكاربوكسيل	إزالة سُمية المونوأوكسيجنيس مثل 2,4-D و 2,4,5-T	ذرة صفراء، قطن
ساينمايد	جين cyanamide hydratase	التبغ

المُقاومة لمُبيدات الأدغال الأخرى: أُنتجت نباتات مُقاومة لمُبيد الفوسفينوثريسين (Phosphinothricin) والذي يُباع تحت الإسمين التجاريين Basta Aventis و Liberty. والذي يعمل على أكسدة الأمونيا وإيقاف عملية التمثيل الضوئي معاً. وكذلك أُنتجت نباتات مُقاومة لمُبيدي الأدغال سلفونيليوراس (Sulphonyureas) وإميدازولينونس (Imidazolinones) كالذرة الصفراء والطماطم والبنجر السُكري. إضافةً الى نباتات مُقاومة لمُبيدات الأدغال بروموكسينيل (Bromoxynil) والأترازين (Atrazine) وحامض الفينوكربوكسيل (Phenocarboxylic acid) والسايناميد (Cyanamide). وفي الوقت الذي تخضع فيه بعض النباتات المُحورة وراثياً بهذه الصفة لإختبارات حقلية، تم سحب المحاصيل المُقاومة لمُبيد الأترازين لإعتبارات تتعلق بالتلوث البيئي. علماً إن إنتاج نباتات مُقاومة لمُبيدات الأدغال يُساهم كثيراً في تقليل التلوث البيئي خاصةً التربة والماء الأرضي ويحافظ على التنوع الأحيائي.

ألآثر البيئي للمحاصيل المُقاومة لمُبيدات الأدغال Environmental effects of herbicide resistant crops

أدى التطور الحاصل في إنتاج محاصيل مُحورة وراثياً لصفة المُقاومة لمُبيدات الأدغال الى زيادة غلة المحاصيل في وحدة المساحة مما شجع المُزارعين في الدول المُتقدمة ومنها الولايات المتحدة الامريكية في تبني تلك المحاصيل. فعلى سبيل المثال، زادت نسبة المساحة المزروعة بهذا المحصول في الولايات المتحدة من 17% في عام 1997 لتصل الى 68% في عام 2001 ليستفيد المُزارعون من تقليل كُلف إستعمالهم لمُبيدات الأدغال. يَعتقد الكثير من المُختصين بأن إستعمال محاصيل مُحورة وراثياً لهذه الصفة أقلُ أثراً في البيئة من حيث التلوث مُقارنةً مع رش مُبيدات الأدغال. وبالرغم من ذلك فلاتزال بعض الإعتبارات البيئية قيد الدراسة لأسباب أهمها إحتمالية تقليل التنوع الأحيائي نتيجةً للقضاء المُبرمج على الأدغال وموائلها، إضافةً الى إمكانية ظهور أنواع من الأدغال مُقاومة للمُبيدات.

المُقاومة ضد البكتريا المُسببة للبلورات الثلجية Resistance against ice-nucleating bacteria

يُعد تكوين البلورات الثلجية على أسطح الأغشية الخارجية للخلايا النباتية من العمليات الكيميائية المُعقدة. شُخص حديثاً نوع من البكتريا تنمو في أغلب النباتات كمحاصيل الحبوب وأشجار الفاكهة ومحاصيل الخضر والتي تقوم بتصنيع البروتينات والأخيرة بدورها تُراكم جُزيئات الماء حولها لتكوين بلورات ثلجية عند إنخفاض درجة الحرارة الى الصفر المئوي. وبعد نمو تلك البلورات الى حجوم أكبر، تتمزق الخلايا النباتية وبالتالي حصول التلف الكامل للنبات. طُورت العديد من الوسائل للتخلص من البكتريا من أهمها رش النباتات

بالمُركبات الحاوية على عنصر النحاس لقتل البكتريا وكذلك مُعاملة النباتات المُصابة بمحلول من اليوريا لتقليل تكوين البلورات الثلجية. والذي يهمنا في هذا الفصل هو كيفية توظيف الهندسة الوراثية في التخلص من تلك البكتريا. اذ سجل المُختصون في علم الأحياء المجهرية القابلية العالية لبكتريا *Pseudomonas syringae* لتكوين البلورات الثلجية طبيعياً، ومن هنا ولدت فكرة إزالة الجين المسؤول عن تصنيع البروتينات الجاذبة للبلورات الثلجية من البكتريا أعلاه ونجح المُختصون في ذلك لذا سُميت بالبكتريا ناقصة الثلج (Ice minus bacteria).

تطبيقياً، اقترح الباحثون رش النباتات الفتية بالبكتريا منزوعة جين البلورات الثلجية مما يُعطي صفة مُقاومة الإنجماد لتلك النباتات وبالتالي زيادة في إنتاج الحاصل تحت الظروف الباردة بالرغم من وجود بعض المُعترضين من العاملين في حقل هندسة النبات وراثياً خوفاً من ظهور طوافر بكتيرية قد تتداخل مع صحة الإنسان. وبالمُقابل برر المُهتمون بالموضوع أن البكتريا *P. syringae* لم يُضاف لها جينات جديدة بل بالعكس حُذف منها جين وبقيت مُشابهة للسُلالة الأم المُتوافرة في البيئة. وبعد إجراءات طويلة في المحاكم المُختصة، وافقت أخيراً الحكومة الامريكية رش النباتات بهذه البكتريا. بدأ رش الحقول المزروعة بنباتات البطاطا والفراولة بالبكتريا منقوصة جين تكوين البلورات الثلجية عام 1987. كما أُستنبطت سُلالة جديدة من نفس البكتريا وسُوقت تجارياً تحت إسم *Frostban* وأُدخلت في حقول المُزارعين. والجدير بالذكر بأن *P. syringae* كانت أول بكتيريا مُحورة وراثياً وظفت خارج المُختبرات ولحُسن الحظ أعطت نتائج مُشجعة لتقليلها مخاطر الإنجماد في المحاصيل المُعاملة بها. ونجح العلماء في تطوير جينات تحمُل البرودة في نبات الأربدوبسس (Arabidopsis with cold-tolerant genes) بلغ عددها حولي 20 جيناً بعد تعريض النبات الى إنخفاض تدريجي في درجات الحرارة. كما شخص العلماء جيناً أسموه بالجين المُنسق (Coordinating gene) يُشفر لبروتين يعمل بدور عامل إستنساخ لتنظيم التعبير الجيني لجينات تحمُل البرودة. وبعد نقل الجين المُنسق الى النباتات، فقد حُفزت جينات تحمُل البرودة فيها مما عزز من تحمُلها لإنخفاض درجات الحرارة. ولاتزال العديد من البحوث في هذا المجال الحيوي قيد التجربة وسيُعزز نجاحها من التوسع في رقعة الأراضي الزراعية بإتجاه المناطق الأكثر برودةً من العالم.

تحسين المحاصيل كماً ونوعاً Improvement of crop yield and quality

بعد التطور السريع الذي حصل في هندسة النبات وراثياً والعلوم الساندة لها، أصبح تحسين نوعية المحاصيل وزيادة إنتاجيتها واقعاً ملموساً أعطى أُكُلُه في مدى واسع من المحاصيل. ومن المعلوم ان إنتاجية

محصول ما تتحدد بشكل أساسي بكفاءة عملية التركيب الضوئي له (Photosynthetic efficiency) وكذلك في مُعامل الحصاد (Harvest index) المُتمثل بوزن المادة الجافة مقسومة على الجُزء المحصود من النبات. بينما تعتمد نوعية الحاصل على مجموعة كبيرة من الصفات المرغوبة وفي المُحتوى التغذوي لأجزاء النبات المأكولة إضافةً الى الطعم ونوعية المُنتج وطول فترة خزنه.

توظيف الهندسة الوراثية في إطالة العُمر المخزني للثمار Exploitation of genetic engineering in extending fruit shelf life

وُظفت الهندسة الوراثية للأغراض التجارية في التحكم بنضج الثمار فتأخير نُضجها له عدة فوائد أهمها:

1- تُطيل من عُمر الثمار المخزني مما يُحافظ عليها بحالة جيدة لأطول مُدة مُمكنة.

2- تسهيل عملية نقل الحاصلات البُستانية مع الحد الأدنى من الأضرار.

3- يُحسن النضج البطيء من طعم الثمار.

وفي هذا الصدد نتطرق الى محصول الطماطم كنموذج لإطالة العُمر المخزني للثمار بعد توظيف الهندسة الوراثية في هذا المجال وبدأً يجب الإلمام ببعض الجوانب الفسلجية لنُضج الثمار. تُعد عملية نضج الثمار عملية فعالة تتميز في زيادة سرعة التنفس يُصاحبها زيادة سريعة في تصنيع الأثيلين. وفي أثناء تحطم الكلوروفيل فان اللون الأخضر يبدأ بالإختفاء وتبدأ الثمار بتصنيع صبغة اللايكوبين الحمراء. يعقب ذلك بداية لطراوة الثمار نتيجةً لزيادة فعالية الإنزيمان المُحللان للجدر الخلوية للثمار وهما Polygalacturonase (PG) و Pectin methyl esterase. ومن المعلوم بأن إنتاج هرمون الأثيلين مُرتبط بنُضج الثمار ويُعد الشرارة الأولى في الإيعاز للنُضج بدليل أن مُعاملة الثمار غير الناضجة بالأثيلين يُسرع من نُضجها وحجب تصنيع الأثيلين يُقلل وبشكل كبير من سُرعة نُضجها. ومن الواضح ايضاً ان تكسير مخزون النشاء وتحويله الى سكريات وبالتالي زيادة تراكم مواد الايض الثانوي يُحسن من نكهة وطعم ومذاق الثمار. عُزلت ثلاثة جينات مسؤولة عن نضج ثمار الطماطم وتمت كلونتها ويوضح جدول 13.7 الجينات المُشفرة لهذه الإنزيمات ودورها في نضج الثمار.

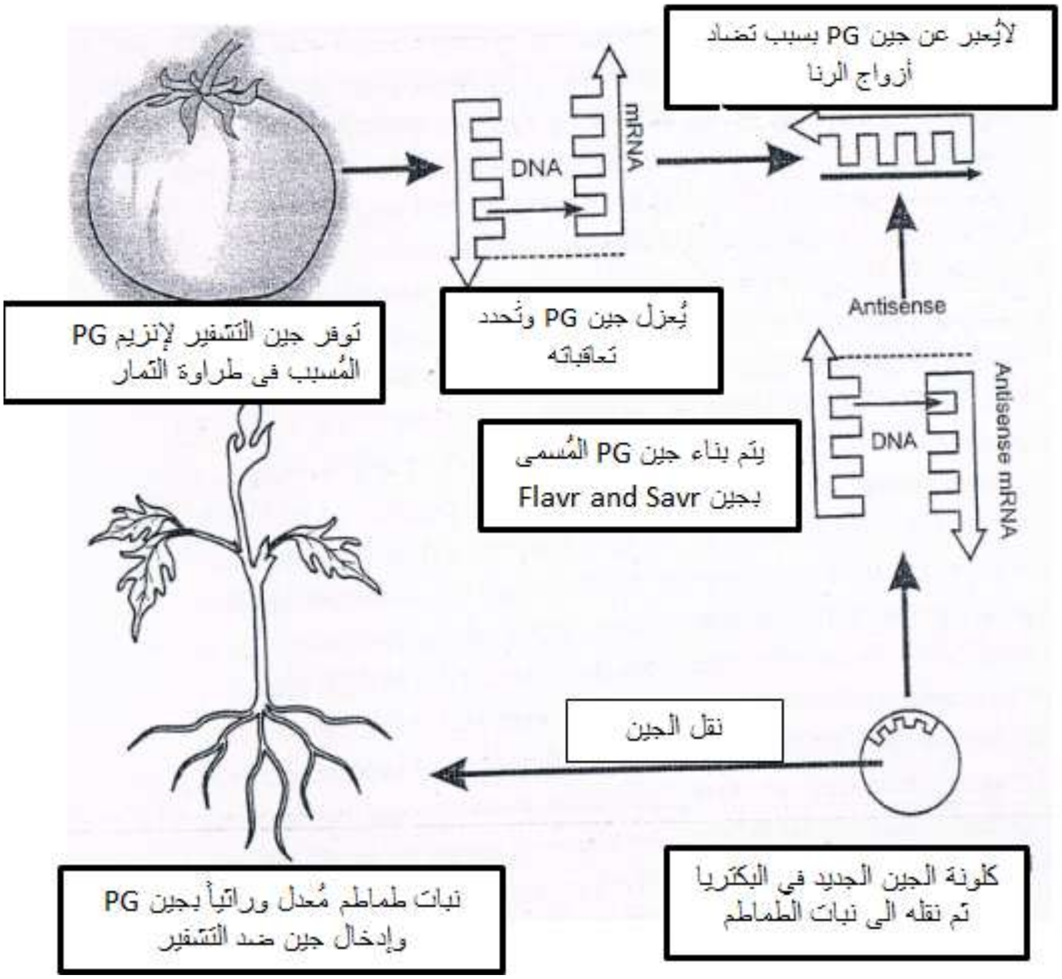
جدول 13.7. كلونة جينات نضج ثمار الطماطم ووظائفها

الجين المُكلون و الإنزيم الذي يُصنعه	**الإنزيم الذي يُصنعه**
pTOM5Phytoene synthase	تصنيع اللايكوبين الذي يُعطي اللون الاحمر
pTOM6Polygalacturonase	تحطيم جدر الخلايا مما يجعل الثمار طرية
*pTOM13ACC oxidase	تحرير الاثيلين المشجع على نضج الثمار

*(ACC= 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid)

التلاعب الوراثي في نضج ثمار الطماطم Genetic manipulation in tomato fruit ripening

المعلوم بان هرمون الأثيلين له علاقة بتنظيم نُضج الثمار ويُمكن تبطئ تلف الثمار بتقليل أو إيقاف إنتاج الأثيلين. يتم ذلك بإدخال جينات تكوين الأثيلين بطريقة تؤدي الى تقليل تعبيرها الجيني ذاتياً داخل النبات والسماح للثمار بالنضوج ببطئ. بالمُقابل يُمكن تسريع نُضج الثمار من خلال المُعاملة بالأثيلين. تأخير نُضج الثمار ذو أهمية بالغة عند تصدير الثمار لمسافات بعيدة وإطالة العمر المخزني مع أقل تلف مُمكن. تَنتج ثمار الطماطم الناضجة الإنزيم المُسبب لطراوة الثمار (Softening enzyme polygalacturonase, PG) والذي يُهاجم البكتين في جدر خلايا الثمار مُسبباً في سُرعة طراوتها. تحققت نجاحات في كلونة الدنا التكميلي لإنزيم PG في ثمار الطماطم وإدخاله في نبات الطماطم بالإتجاه غير المُشفر (Antisense orientation) وبالتالي الحصول على نباتات طماطم مُحورة وراثياً والتي أظهرت إنخفاضا في مُستوى PG لحد 99% مما زاد من العُمر المخزني للثمار بشكل كبير (شكل 13.7). حاول عدد من العلماء من التلاعب بالجينات المسؤولة عن عملية نُضج الثمار مُستندين في الغالب الى فلسفة الرنا غير المُشفر (antisense RNA). وكان موضوع تأخير نُضج ثمار الطماطم وإطالة عُمرها المخزني مسألة في غاية الأهمية لأصحاب المحلات التجارية لتلافي التلف السريع الذي يحصل عند فترة عرضها. وكما مر ذكره سابقاً، فطراوة الثمارترجع عموماً الى تحطيم جُدر الخلايا وبالتحديد تقطيع أواصر البكتين بوساطة إنزيم polygalacturonase (PG) الذي تم كلونته (pTOM6) ونتج عن التلاعب الوراثي لهذا الإنزيم بتقانة الرنا غير المُشفر تطوير صنف الطماطم Flavr Savr من قبل شركة كالجين (Calgene) الامريكية وكما موضح في شكل 3.13 والمُتضمن الخطوات التالية:



شكل 13.7. إنتاج الطماطم المعروفة بإسم Flavr Savr المُحورة وراثياً بإستعمال جين الرنا غير المُشفر (Antisense RNA gene).

1- عزل الدنا المُشفر لإنزيم PG من نبات الطماطم.

2- نقل جين PG الى بكتريا ناقلة وإنتاج جُزيئات دنا تكميلية (Complementary DNA).

3- إدخال الدنا التكميلي الى نبات طماطم آخر ليصبح مُحور وراثياً.

آلية عمل الرنا غير المشفر لجين PG Mechanism of antisense for PG gene

يقوم جين PG في نبات الطماطم العادي بالتشفير للرنا الناقل العادي (mRNA) والذي ينتج إنزيم PGالفعال في نُضج الثمار حيث أن الدنا التكميلي لجين PG يُشفر للرنا المُراسل غير المُشفر والذي يكون مُكملاً للرنا المُراسل العادي. وعند التهجين بين نوعي الرنا الناقل المُشفر وغير المُشفرينتج رنا ناقل مُشفر غير فعال وبهذا سوف لا تنتج الثمار إنزيم PG وعليه يتأخر نُضجها.

النجاح والإخفاق في الطماطم Flavr Savr المُحورة وراثياً Success and failure in genetically modified Flavr Savr tomatoes

أُعتمدت الطماطم Flavr Savr والتي تلفظ Flavor saver والتي حورت وراثياً بآلية الرنا غير المُشفر للإنزيم PG من قبل إدارة الغذاء والدواء الامريكية (FDA) في مايس من عام 1994 والتي صرحت بأن هذا النوع من الطماطم آمن الإستهلاك كونه أُنتج بطريقة مُشابهة للطريقة التقليدية في تربية النبات. وبموجب ذلك قررت الإدارة بأن لاحاجة لوضع علامات دالة على انها مُحورة وراثياً. والجيد بهذا النوع من الطماطم إمكانية شحنها لمسافات بعيدة دون الحاجة الى تبريد وتقاوم التلف والتعفن لمُدة تزيد عن ثلاثة أسابيع وهي مُدة تزيد عن ضعف المُدة اللازمة لتلف الطماطم العادية ومع كل ذلك فقد سُجلت عليها بعض الإنتقادات أهمها:

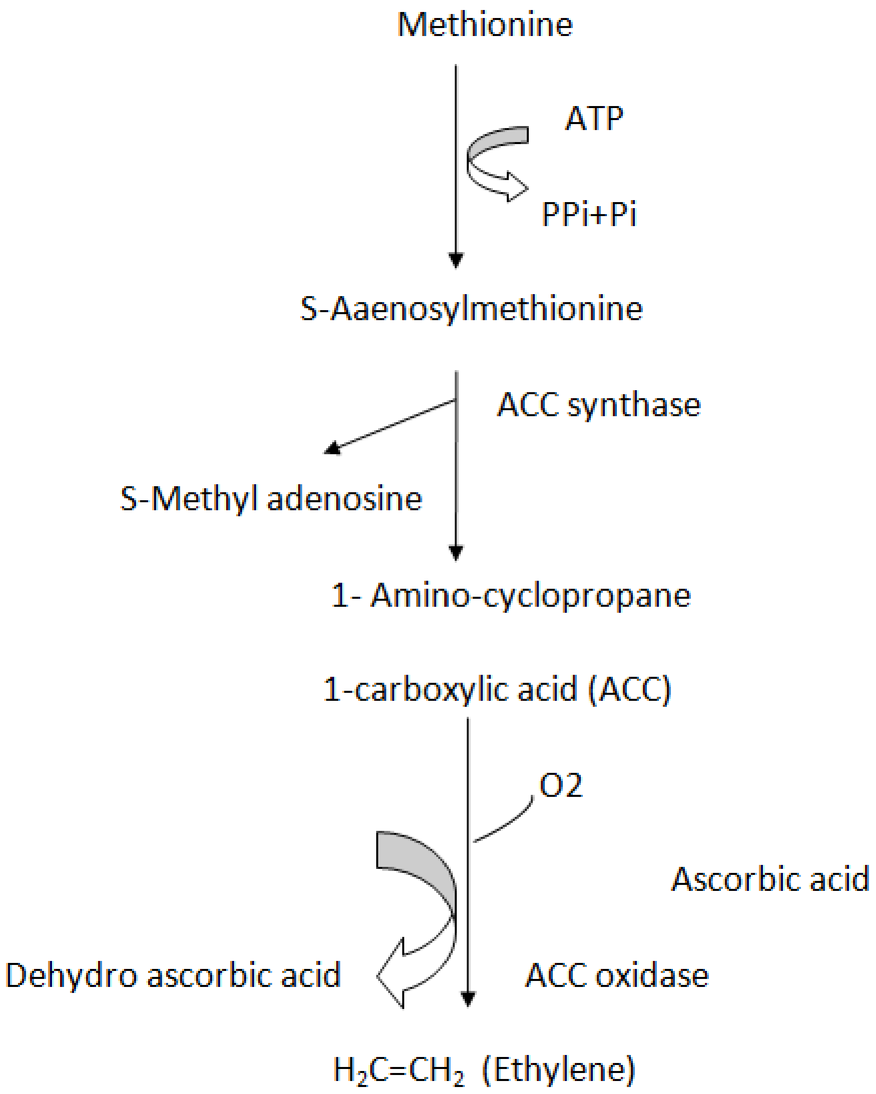
1- لاينمو هذا الصنف من الطماطم بنجاح في كل أرجاء الولايات المتحدة. 2- مُنخفض الإنتاجية.

3- كُلفة إنتاجه عالية.

ويزعم المُعترضون بأن الشركة التي طورت هذا الصنف من الطماطم بلغ فيها الحماس لتكون الشركة الأولى بالعالم في تسويق الأغذية المُحورة وراثياً ولم تتخذ الإحترازات المطلوبة عند إنتاجه، وبعد عام واحد من تسويقه، أوقفت الشركة إنتاجه وحالياً أصبح في حُكم النسيان.

التلاعب الوراثي في تصنيع الأثيلين Genetic manipulation in ethylene synthesis

أجمعت المراجع العلمية بأن للأثيلين دوراً اساسياً في نُضج الثمار وحسب ما مُبين من مسلكه التصنيعي في الشكل 13.8 حيث يُلاحظ أن مصدر إنتاج الأثيلين هو الميثيونين. ولهذا طُوِرت ثلاث إستراتيجيات لإيقاف التصنيع الحيوي للأثيلين وبالتالي تبطئ نُضج الثمار وكما يلي:



شكل 13.8. المسار الحيوي لتصنيع الأثيلين.

1-- الجين غير المُشفر لإنزيم ACC oxidase: طُورت نباتات مُحورة وراثياً ذات جين غير مُشفر لأكسدة إنزيم ACC وبذلك قللت هذه النباتات من إنتاجها للأثيلين بمقدار 97% مع حصول تأخير معنوي في نُضج ثمارها.

2- الجين غيرالمُشفر لتصنيع ACC: ثُبطَ التصنيع الحيوي للأثيلين الى ما يُقارب 99.5% بعد إدخال الجين غير المُشفر لإنزيم ACC synthase مما أدى الى تأخير نُضج ثمار الطماطم لحد كبير.

3- إدخال جين ACC deaminase: يعمل إنزيم ACC deaminase المُنتج من البكتريا في مُركب ACC إذ يُزيل منه مجموعة الأمين وبالتالي يُقلل من وفرة وسط (Substrate) التصنيع الحيوي للأثيلين.

نُقِلَ الجين البكتيري المُشفر لإنزيم ACC deaminase ونجح تعبيره الجيني في نباتات الطماطم. وثبطت هذه النباتات المُحورة وراثياً حوالي 90% من تصنيع الأثيلين وبذلك تأخر نُضج الثمار لمُدة تقارب الستة أسابيع. ويبدو بأن تثبيط تصنيع الأثيلين من الإستراتيجيات الناجحة في التقليل من تلف الثمار وشيخوخة الأزهار وخاصة الصالحة للقطف منها مما يزيد من العُمر المخزني للثمار بعد حصادها والعُمر المزهري للأزهار المقطوفة سواء عند عرضها في معارض الزهور أو عند وضعها في المزهرية. على ضوء ما سبق فان الإستراتيجيات المُشار لها سابقاً في النقاط 1 و 2 قد اعتمدت على تقانات الأثيلين غير المُشفر (Antisense ethylene technology).

هندسة النبات وراثياً في المُحافظة على تلوين الثمار Plant genetic engineering for conserving fruit coloration

يُعد فقدان تلون ثمار الفاكهة والخضروات من المشاكل الرئيسة التي تواجها الثمار ومُنتجوها في مرحلة ما بعد الحصاد (Post-harvest) والتي تؤثر سلباً في صناعة الأغذية. وبالرغم من أن إضافةً بعض المُضافات (Food additives) يُحافظ على الوان الثمار، الا أن هذه المُضافات قد تُسبب في حصول تداخلات في صحة الإنسان. يرجع فقدان الوان الثمار من الناحية الفسلجية الى أكسدة الفينولات الأُحادية والثنائية الى مُركبات الكوينينات (Quinones) بفعل مجموعة إنزيمات مُحللة تدعى مؤكسدات الفينولات المُتعددة (Polyphenol oxidases). تتمركز الأخيرة في أغشية المايتوكوندريا والبلاستيدات الخضراء. يتم العمل حالياً في التلاعب الوراثي بآلية عدم التشفير (Antisense) بهدف تثبيط تصنيع إنزيم الفينولات المُتعددة وتوجِت الجهود في منع فقدان لون البطاطا كمثال على نجاح هذه الإستراتيجية.

هندسة النبات وراثياً في المحافظة على تلوين الأزهار Plant genetic engineering for conserving flowers coloration

تُجري العديد من المُحاولات في صناعة الزهور لجعل الأزهار أكثرُ جاذبيةً بتحسين الوانها وإستنباط اللوان جديدة منها (لاحظ شكل 13.9) إضافةً الى إطالة عُمرها بعد القطف. وتتصدر أربعة نباتات زينة وهي الورد (الروز)، التيولب، الداؤودي والقرنفل قائمة صناعة الزهور لتُشكل حوالي 70% من تجارة الزهور. وتُعد صبغة الأنثوسيانين الأكثرُ شيوعاً بين الصبغات الأُخرى وتتبع مجموعة الفلافينويدات. تنتج صبغة الانثوسيانين بعد سلسلة من التفاعلات تبدأ بالحامض الأميني فينيل الألنين ويعتمد لون الأزهار الناتج على الطبيعة الكيميائية للأنثوسيانين المُنتج. شُخصَت الإنزيمات المسؤولة عن التفاعلات المُختلفة في المسالك

الحيوية لتصنيع الأنثوسيانين. وبالتلاعب الوراثي والتطفير، أُنتجت أزهار بالوان مُختلفة. ومن المعلوم بأن أزهار الورد والقرنفل والداؤودي ينُقصها اللون الأزرق بسبب غياب الإنزيم المفتاحي للفلافينويدات. وتمكنت شركة Florigene بعد التلاعب الوراثي من إدخال الجين المُشفر للإنزيم المسؤول عن إنتاج اللون الأزرق بعد عزله من نبات البتونيا (ورد البوري) ونقله الى العديد من النباتات المُزهرة. وأُنتِج أول نبات قرنفل ذو أزهار بلون ماوي (مزرق) في العالم في عام 1996 وتحت الاسم التجاري Moondust كما أُنتجت العديد من الأزهار لاحقاً وتم تسويقها على نطاق تجاري. تُستعمل الأزهار في أغلب دول العالم لأغراض الزينة ولكن تُشترى في بعض البُلدان لأغراض الإستهلاك البشري فتوضع أوراقها التويجية في اليابان مثلاً في وجبات الغذاء لغرض تزيينها وقد تؤكل. ذلك ما حدى بالسؤال عن السلامة الغذائية للأزهار ألمُحورة وراثياً لكونها لم تُخصص لأغراض الإستهلاك البشري عند إنتاجها. ومع هذا فان الإعتقاد السائد بأن صبغة الأنثوسيانين التي تتمثل بالجُزيئات الكيميائية المسؤولة عن تلوين الأوراق التويجية عبارة عن مواد طبيعية وان إستهلاكها ذو فائدة صحية.

شكل 13.9. ورد الروز مُحور وراثياً ليحمل صبغات مُختلفة ويجد سوقاً تجارية رائجة.

هندسة النبات وراثياً لأغراض العُقم الذكري Genetic engineering for male stirility

من الضروري منع التلقيحات غير الضرورية والتخلص من عملية إزالة أعضاء التكاثر الذكرية أي عملية الخصي (Emasculation) في تجارب تحسين النبات. يتم ذلك من خلال إدخال جين RNA

hydrolyzing enzyme والمُسمى barnase الذي يثبط تكوين حبوب اللقاح. يُعبر هذا الجين في وجه الخصوص في الخلايا المُجهزة لحبوب اللقاح بالغذاء (Tapetal cells) داخل المُتك بإستعمال مُحفز TA2 (Promotor) من أجل تحجيم فعالية الجين في خلايا مُستهدفة تساهم في إنتاج حبوب اللقاح. بالإمكان الرجوع الى الحالة السابقة اي خصوبة حبوب اللقاح بإدخال جين آخر يُسمى barstar الذي يقوم بكبح فعالية جين barnase. تورث صفة العُقم الذكري إما من النواة أو السايتوبلازم ويرجع سبب العُقم الذكري السايتوبلازمي الى عيوب (Defects) في مجين المايتوكوندريا. وبذلك تولدت فكرة إدخال صفة العُقم الذكري بالتلاعب الوراثي في الوقت الذي تُحافظ فيه النباتات المؤنثة على خصوبتها. اُدخلت هذه الصفة على سبيل المثال الى نباتات التبغ بإستعمال جين مايتوكوندريا نتج من عملية التطفير يُشفر لإنزيم الرايبونيوكلييس (Ribonuclease) والمُسمى *barnase* gene والذي تم عزله من بكتريا *Bacillus amyloliquefaciens* ونقله الى نباتات التبغ. ووِجد بأن إنزيم الرايبونيوكلييس ساماً للخلايا المُجهزة لحبوب اللقاح بالغذاء (Tapetal cells) وبذلك يمنع نشوء حبوب لقاح خصبة واخيراً تكون النباتات عقيمة ذكرياً. وإعتماداً على الفكرة أعلاه، فقد طُورت نباتات تبغ، قرنابيط، قطن، طماطم، ذرة صفراء، خس وغيرها حاملة لصفة العُقم الذكري.ولحُسن الحظ لُوحِظ إمكانية إسترجاع صفة الخصوبة في حبوب اللقاح في النباتات أعلاه بعد تهجينها بنباتات ثانية مُحورة وراثياً تحتوي الجين المُثبط لإنزيم الرايبونيوكلييس.

نباتات مُحورة وراثياً ومُحسنة تغذوياً Genetically modified and nutritious plants

يُعد تحسين المُنتجات النباتية لصفة تحسين القيمة التغذوية بوساطة التلاعب الوراثي بالغ الأهمية في مجال التقانات الأحيائية علماً بأن بعض النجاحات قد تحققت في برامج التهجينات التقليدية بين النباتات ولكنها بطيئة جداً وصعبة وقد لاتنتج الصفات التغذوية المطلوبة. والمعروف علمياً وجود 20 حامضاً أمينياً في الإنسان نُصفها اساسياً بينما يُصّنع النصف الثاني من قبل جسم الإنسان. ويجب تجهيز الجسم بالعشرة أحماض الأساسية الأولى من مصادر غذائية والتي غالباً ما تكون محاصيل الحبوب من رز، ذرة صفراء وحنطة كمصادر أساسية لها. وللأسف لاتحتوي الحبوب كميات مُناسبة من الحامض الأميني اللايسين ومن جانب آخر هناك محاصيل أُخرى غنية باللايسين مثل المحاصيل البقولية ولكن الأخيرة فقيرة المُحتوى من الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت وخاصة المثيونين. لذلك سعى العلماء لتطوير نباتات مُحورة وراثياً ذات مُحتوى جيد من الأحماض الأمينية الأساسية في العديد من بذور النباتات الخازنة للبروتين. تتكون أربعة أحماض أمينية أساسية وهي اللايسين، مثيونين، ثريونين وايسوليوسين من حامض الأسبارتك غير الأساسي ويُنظم تكوين اللايسين بتثبيط التغذية الرجعية (Feedback inhibition) للإنزيمين

(AK)Aspartokinase و Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS). وتم زيادة إنتاج اللايسين فعلاً بعد تثبيط التغذية الرجعية لهذين الإنزيمين. وقد تم عزل الجينات غير الحساسة للتغذية الرجعية والمُشفرة للإنزيمين AK و DHDPS من بكتريا *E. coli* و *Cornyne bacterium* بعد تلاعب وراثي مُناسب وأُدخلا الى نباتي فول الصويا والسلجم. أظهر النباتان المُحوران وراثياً تعبيراً جينياً وأصبحا ينتجان كميات كبيرة من اللايسين. شُخصت العديد من الجينات المُشفرة للبروتينات الغنية بالمثيونين كما في الأمثلة الثلاثة التالية:

1- جين زين (21 KDa zein) الحاوي 28% ميثيونين في الذرة الصفراء.

2- جين برولامين (10 KDa prolamin) الحاوي 20% ميثيونين في الرز.

3- جين البومين البذور (Seed albumin) الحاوي 16% ميثيونين في زهرة الشمس.

انُقلت تلك الجينات ونجحت في التعبير الجيني في بعض المحاصيل مثل فول الصويا، الذرة الصفراء والسلجم حيث أنتجت النباتات ألمُحورة وراثياً بروتينات ذات مُحتوى عالي من الأحماض الأمينية الحاوية على الكبريت.

إنتاج كلايسينين غني باللايسين في الرز Production of high lysine in rice

الكلايسينين عبارة عن بروتين غني باللايسين مُتوفر في فول الصويا. عُزل الجين المُشفر للكلايسين وأُدخل في نبات الرز ونجح تعبيره الجيني وأُنتجت نباتات رز مُحورة وراثياً مُنتجة للحامض الأميني كلايسينين ذو مُحتوى عالي من اللايسين. وللكلايسينين فائدة إضافية أُخرى فهو يخفض كوليسترول الدم (Hypo-cholesterolaemic effect) عند إستهلاكه من قبل الإنسان. جرت مُحاولات لبناء جين صناعي يُشفر للبروتينات الحاوية على الأحماض الأمينية الأساسية في الجزء النباتي المرغوب (اي في البذور، الدرنات، الثمار..الخ). وسجل الباحثون نجاحاً في إنتاج بروتين تركيبي يحتوي 13% من الميثيونين.

هندسة النباتات وراثياً لتحسين مطيبات الأغذية Plant genetic engineering for food flavouring

إضافةً الى القيمة الغذائية، فالطعم مهم في جذب الإنسان لتناول الغذاء. فالمُعتاد إضافةً الملح، السُكر، المُنكهات ومواد أُخرى كمُطيبات للغذاء لجعله ذو خواص مُشهية. ولتحقيق ذلك تم عزل بروتين مونلن

(Monellin) من نبات ينمو في أفريقيا (*Dioscorephyllum cuuinsii*) تُقارب حلاوته 100000مرة حلاوة السكروز حسب معايير المولارية. أُدخل جين المونلن في نباتي الطماطم والخس وحقق ذلك بعض النجاحات في إنتاج مادة المونلن في هذين النباتين مما حسّن من طعمهما.

الأغذية الوظيفية والتقانات الأحيائية Functional food and biotechnology

يُطلق على الأغذية أو مُكوناتها التي تُحقق فوائد صحية الى جانب وظيفتها التغذوية بالأغذية الوظيفية اذ تحتوي مواد فعالة بيولوجياً كمُضادات الأكسدة التي قد تُقلل من مخاطر الأمراض المُرتبطة بتقدم العُمر. تشتمل هذه على الفاكهة والخضراوات والحبوب والصويا والحليب وبعض المشروبات والمُكملات الغذائية. من المعلوم وجود علاقة قوية بين التغذية والصحة لذلك فالتقانات الأحيائية الحديثة تهدف في برامجها الى زيادة المواد الفعالة بايولوجياً في مُكونات الغذاء مما يُحقق زيادة مُقاومة الجسم للأمراض وإزالة مُكونات الغذاء غير المرغوبة. والسؤال الذي يُحاول المُختصون التحري عن جواب وافي له هو: ماهي المواد النباتية التي من المُمكن ان تكون الهدف بحيث تُحقق منافع صحية مُحسنة أو تُحسن من تغذية الإنسان والحيوان؟ لذا ونتيجة للبحث العلمي المُستمر تم وضع برامج مُختلفة في هذا الإطار.

الغذاء المثالي: المطلوب والمتوازن

أصبح من المعلوم بأن سُدس سُكان العالم يعانون من تحدي رئيس غير مقبول إنسانياً وهو الجوع. إضافةً الى ان أكثر من نُصف سُكان الكرة الأرضية متأثرون بشكل أو آخر من نُقص الغذاء وذلك حسب تقارير مُنظمة الغذاء والزراعة الدولية (FAO). وعموماً يحصل الجوع نتيجة نوعية الغذاء المُستهلك وليس كميته والذي يعتمد في الغالب على محاصيل رئيسة ذات مُستوى بروتيني مُنخفض وخاصة في دول العالم الثالث. يحصل نُقص التغذية بشكل رئيسي عن إنخفاض المُحتوى البروتيني والمُغذيات الصُغرى مثل فيتامين A والحديد والزنك والسلنيوم واليود. يُوصي خبراء التغذية بتناول مُكملات الأغذية كوسيلة تقليدية لتجاوز مشكلة سوء التغذية. ومع هذا فقد تظهر العديد من المشاكل أهمها، ان عينة المُجتمع المقصودة قد لايصلها هذا النوع من الغذاء المُعزز بالنواقص التغذوية أعلاه وخاصة العوائل الفقيرة الساكنة في الريف. ومن المعروف بأن الغذاء المُناسب والمُتنوع يشتمل على الفاكهة والخضروات والمنتوجات الحيوانية والذي يُلبي مُتطلبات الطاقة البشرية والإحتياجات من المُغذيات الصُغرى. وللأسف لايحصل أغلب سُكان كوكب الارض في التنوع الغذائي المطلوب. من هنا فكر المُختصون في مجال التقانة الأحيائية في تعزيز المحاصيل الرئيسية

التي يعتمد عليها الإنسان بمُحتويات غذائية أضافية تجعلها ذات قيمة تغذوية عالية النوعية بتحسين نوعية المحاصيل المزروعة.

يتمحور التعزيز الغذائي حول أنواع الأغذية الرئيسية التي يستهلكها ذوي الدخل المُنخفض اللذين لايُمكنهم الحصول على تنوع غذائي. لذا فأن المُضافات الغذائية ستشتمل كُلفة أولية بهدف إنتاج المحصول المُناسب عندئذٍ لايتحمل المُستهلك اي كُلفة إضافية مما يجعل من التقانة مُناسبة جداً وهادفة لطبقات المُجتمع الفقيرة. إضافةً الى المحصول الجديد المُعزز غذائياً قد يُستهلك في بُلدان عديدة أمثلة الحنطة والرز والبطاطا وغيرها وبالتأكيد يشمل المحاصيل التي تُؤكل ثمارها أو بذورها أو أجزائها الخضرية والزهرية والجذرية. ومن المعلوم بأن تعزيز البذور بالعناصر المعدنية الصُغرى يزيد حمايتها من الإصابة بالآفات الحشرية والمرضية ويرفع من قابليتها في تحمل الإجهادات البيئية وبالنتيجة زيادة في إنتاجيتها مع الأخذ بنظر الإعتبار بان التعزيز الغذائي ليس دواء لكل داء ولكنه يُعد مُكملاً غذائياً. تُطور المحاصيل المطلوب تعزيزها غذائياً بوساطة برامج تربية وتحسين النبات التقليدية شرط وجود تنوع وراثي في المجموعة النباتية للصفة المرغوبة (كإرتفاع مُحتواها البروتيني). يُستهلك الرز كمحصول حبوبي بشكل واسع على سبيل المثال، لذا فأن تحسينه في بعض الصفات المُعقدة كتعزيزه بفيتامين A يكون غير مُمكن بطرائق التحسين التقليدية لكون جميع أصناف الرز المزروعة تفتقرلهذا الفيتامين وتنتج البادئ لفيتامين A (Pro-Vitamin A) ولكن في أعضائها الخضرية وليس في أجزائها الخازنة للنشاء مثل البذور. ومن الصعوبة أيضاً تحسين الأصناف والأنواع النباتية التي تتكاثر خضرياً (كالبطاطا والألمازة والموز وغيرها) بالنظر لندرة وجود خطوط وراثية معلومة الصفات. كما ان الطرائق التقليدية في تربية المحاصيل قد تُغير من خواص المحصول المرغوبة من قبل المُستهلك كالطعم على سبيل المثال. في ضوء ماتقدم فطرائق التقانات الأحيائية الزراعية والهندسة الوراثية توفر إستراتيجيات مُكملة لايُستغنى عنها في تطوير محاصيل ذات قيمة غذائية عالية.

يعتمد جزء كبير من سُكان العالم وبشكل كبير على واحد أو أكثر من المحاصيل الرئيسة في غذائهم (Staple crops) في تغذيتهم والتي شملها الباحثون في مشاريع بحثية من أجل تعزيزها غذائياً وبكلا الطريقتين التقليدية والأحيائية. يُعد محصول الرز أكثر محاصيل الحبوب المُهمة للإستهلاك البشري كونه غذائاً أساسياً لأكثر من ثلاثة بلايين من الناس ونسبة كبيرة منهم فقراء. كما أن الذرة الصفراء تُعد محصولاً أساسياً لما يقارب من 22 بلداً غالبيتها تقع في افريقيا وامريكا اللاتينية. اما الحنطة فتُعد من محاصيل الحبوب الاساسية لما يُقارب من 35% من سُكان الأرض. وتُعد البطاطا أكثر المحاصيل من غير الحبوب أهمية

وتأتي بالمرتبة الرابعة في الإنتاج الزراعي. وأخيراً يتغذى مايقارب 800 مليون إنسان على محصول الكسافا (Cassava) أغلبهم من السُكان المحرومين وخصوصا في أفريقيا.

يُمكن للغذاء الوظيفي (Functional food) ومن خلال التطور الحاصل في التقانات الأحيائية ان يُجهز الدول ذات النُقص الغذائي بمصادر غذاء ذات قيمة تغذوية عالية. فالأغذية ذات المُحتوى العالي من النشاء والتي تعتمد عليها الكثير من الدول الفقيرة كغذاء أساسي (Staple food) مثل محصول الكسافا واليام قد حورت وراثياً لخفض الأميلوبكتين في نشاء هذين المحصولين بالنظر لما يُسببه الأميلوبكتين من رفع نسبة السكر للمرضى الذين يُعانون من هذا المرض خاصة نوع 2 (Type 2 Diabetes).

كما ان المناطق التي تتعرض الى الجفاف وذات تربة رديئة النوعية حيث تحصل ندرة في البروتينات ذات النوعية عالية الجودة فلابُد من إجراء تحويرات وراثية على المحاصيل المُهمة المزروعة في تلك المناطق. وفي هذا الخصوص فقد أُنتجت محاصيل بقولية وخاصة فول الصويا بمُستويات ونوعية عالية من البروتينات. ولايزال عُلماء النبات وبفضل التقانات الحديثة من زيادة كمية ونوعية المحاصيل من أجل مواجهة نُقص التغذية والإزدياد المضطرد في أعداد البشرية.

تعزيز المُحتوى البروتيني Fortification of protein content

تنتج الخلايا البشرية عشرة أحماض أمينية من مجموع 20 حامضاً أمينياً لذا يجب تجهيز الحوامض الأمينية الأساسية المفقودة من غذاء الإنسان. وللأسف لايتمكن الجسم البشري من خزن الأحماض الأمينية الزائدة عن حاجة الجسم لذا يستوجب تناولها يومياً أثناء وجبات الأكل. ولكون غالبية الناس في الدول الفقيرة لايُمكنهم تناول الأحماض الأمينية الأساسية في وجبات طعامهم اليومي نتيجة نُقص مصادر الغذاء الغنية بالبروتين والكربوهيدرات كاللحوم والأسماك وفول الصويا والرز والكسافا والبطاطا. تتوافر مصادر لتعزيز البروتين أهمها خازن البروتين سبورامين A (Sporamin A) المُنتج من البطاطا الحلوة وبروتينAmA1 المُتوفر في البومين بذور نبات ريشة الامير(*Amaranthus hypochondriacus*) وكذلك بروتين ASPI والذي يُعد مخزن بروتيني غني بالأحماض الأمينية الأساسية. أُدخل بروتين ASPI ونجح تعبيره الوراثي في محصولي الرز والكسافا ولاتزال البحوث مُستمرة لتحقيق أعلى مُعدلات التعبير البروتيني بتحوير هذين النباتين ونباتات أُخرى وراثياً لهذا الغرض.

مُعالجة نُقص فيتامين A Treatment of vitamin A deficiency

ينتشر نُقص فيتامين A على وجه الخصوص بين الأطفال في قارة أفريقيا وفي جنوب شرق آسيا مُسبباً العمى غير القابل للشفاء (Irreversible blindness) إضافةً الى الحساسية للأمراض وزيادة في أعداد الوفيات. والمعلوم بأن نباتات الرز تنتج بيتا كاروتين الذي يُمثل البادئ لفيتامين A (Provitamin A) في أنسجتها الخضراء وللأسف ليس في سويداء بذورها التي تؤكل. شجع ذلك أحدى الشركات المُختلطة بين قطاعي الدولة والخاص في الولايات المتحدة في التفكير في إنتاج أصناف من الرز غنية بذورها في بادئ فيتامين A. أُنتج ما يُسمى بالرز الذهبي (Golden rice) بعد إدخال جينين الى أحد أصناف الرز بوساطة الهندسة الوراثية ليتحقق حُلم ملايين الاطفال المُهددون بالعمى في إنتاج الرز الذهبي الحاوي على بادئ فيتامين A. يُشفر هذان الجينان لإنزيمي Phytoene synthase (PSY) و Phytoene desaturase (CRTI) (لاحظ الشكل 13.10). يحتوي الرز الذهبي 1 على جين PSY الذي تم نقله من نبات النرجس (Daffodil) بينما نُقل جين CRTI من بكتريا *Erwinia uredovora* وأظهر الجينان تعبيراً وراثياً في بذور الرز. وعند إحلال جين PSY بجينين معزولين من الذرة الصفراء والرز زاد مُستوى بيتا كاروتين الى 23 ضعفاً في صنف الرز الذهبي 2. وبهذا فيُمكن لطفل بعُمر 1-3 سنوات ان يَسد حاجته من فيتامين A فيما اذا تناول 72 غم من الرز الذهبي 2. أُنتج الرز الذهبي وتتبنى مُنظمات دولية إنسانية بتوزيعه على سُكان المناطق الفقيرة في العالم كما هُندست نباتات أُخرى وراثياً إضافةً الى الرز لزيادة مُحتواها من البيتا كاروتين شملت البطاطا والكنولا والطماطم والجزر والقرنابيط لتحل جزءاً كبيراً من مشكلة نُقص فيتامين A.

محاصيل غنية بعنصر الحديد لمعالجة مرض فقر الدم (الأنيميا) Crops rich with iron

تؤثر أنيميا نُقص الحديد في صحة أكثر من 2 بليون نسمة موزعة في كافة بُلدان العالم مما يجعل من نُقص الحديد الأكثر إنتشاراً من بين نُقص المُغذيات الصُغرى في العالم. يتوافر عنصر الحديد في محاصيل الخضر والحبوب واللحوم الحمراء. ومع هذا فان توافر عنصر الحديد في النباتات يُعد مُنخفضاً والمُعضلة الأكبر في محصول الرز اذ ان أحتواؤه مُثبط إمتصاص الحديد الفايتيت (Phytate) إضافةً الى نُقص عوامل تسريع إمتصاص الحديد. لذا كرس علماء التغذية جهودهم في زيادة مُحتوى محاصيل الحبوب من عنصر الحديد مع تقليل مُستوى الفايتيت وإضافةً عوامل تسريع إمتصاص هذا العنصر. نجح الباحثون في تعبير البروتين الخازن للحديد الفيرتين (Ferritin) المعزول من البزاليا الفرنسية وفول الصويا في سويداء بذور الرز مما نتج عنه زيادة في مُحتوى بذور الرز من عنصر الحديد بمقدار ثلاث مرات. ولأجل تقليل مُستوى الفايتيت، تم

نقل إنزيم الفايتيز (Phytase) الذي يُحطم الفايتيت الى الرز وكُلِلت المُحاولات بالنجاح. وأخيرا فالبحوث مُستمرة حالياً لزيادة تعبير بروتين غني بالحامض الأميني السيستين المسؤول عن نقل المعادن في الرز مما يُحسن من معدل إمتصاص الحديد عند الهضم.

Isoprenoid

↓ Sequential addition

Geranyl geranyl diphosphate

↓ Phytoene synthase

Phytoene

↓ Carotene desaturase

Lycopene

↓ Lycopene β-cyclase

β-carotene (provitamin A)

شكل 13.10. مُخطط المسلك الحيوي لتصنيع بادئ فيتامين A. ويُلاحظ من الشكل بأن التلاعب الوراثي لإنتاج الرز الذهبي يتطلب إدخال ثلاثة جينات مُشفرة لإنزيمات Phytoene synthase، Carotene desaturase، Lycopene β-cyclase.

زيادة مستويات حامض الفولك في الطماطم Increasing folic acid levels in tomatoes

يُعد نُقص حامض الفولك (Folic acid) مشكلة صحية عامة تظهر أعراضها على وجه الخصوص في النساء بعد عُمر الثلاثين عام والتي تكون السبب في أمراض فقر الدم (الأنيميا) فيما لايقل عن 10 مليون امرأة حامل في الدول الفقيرة. يتوافر حامض الفوليك في الغذاء بشكل فوليت (Folate) وبهدف زيادة مُستوياته في ثمار الطماطم، أفلح العلماء بزيادة التعبير الجيني المُشفر لإنزيمات تُساعد في تصنيع إثنين من بادئات الفوليت (Folate precursors). نتج عن هذا الإنجاز العلمي، ثمار طماطم مُحورة وراثياً راكمت فوليت أكثر بمقدار 25 مرة عما هو عليه بالثمار غير المُحورة.

تحديات تبني المحاصيل المُعززة تغذوياً Challenges in adopting fortified crops

تُعد الكُلف المُصروفة على البحوث التي تهدف الى إنتاج محاصيل مُعززة تغذوياً والضوابط التي تُفرض عليها وفي نشر الأصناف الجديدة، من أهم العقبات التي تواجه تطوير المحاصيل المُحورة وراثياً بالنظر للمُحددات الكثيرة عند إنتاج محاصيل بطرائق التقانات الأحيائية. إضافةً الى ان تبني القطاع الخاص لهكذا مشاريع لا يعود له إلا بهامش ربحي بسيط وبالمُقابل فهناك عجز مالي واضح في القطاع العام عند الصرف في مشاريع بحثية من هذا النوع. كما يجب الأخذ بنظر الإعتبار حقوق المِلكية الفردية فعلى سبيل المثال صدرت 16 براءة إختراع و 72 حق مِلكية فردية من أجل إطلاق الرز الذهبي الى فُقراء العالم بدون كُلف أي كمُساعدات إنسانية. ولتبني إستراتيجية تعزيز تغذوي ناجحة، يتطلب الأمر تبني المحاصيل المُحورة وراثياً من قبل المُزارع والمُستهلك على حدٍ سواء وهذا بدوره يواجه الكثير من العقبات أهمها المقبولية من قبل المُجتمع (المُستهلك) خاصة اذا كانت الصفة الجديدة تُغير من شكل المحصول ونوعيته كتغير لون بذور الرزمن الأبيض الى الذهبي وتغير الطعم ومُحتوى المادة الجافة وغيرها. وبذلك يتطلب الأمر برنامج معلوماتي وإرشادي مُناسب ليلعب دور أساسي في ضمان قبول المحصول. كما أن إنتشار التكنولوجيا الحيوية ونجاحها يستوجب وجود قنوات وبرامج تنشر المعلومات الزراعية بشكلها الصحيح، الا أن النُقص الشديد في البُنية التحتية وخاصة الزراعية منها في الدول الفقيرة كأفريقيا، يُعد تحدياً فعلياً في تبني محاصيل أو أصناف جديده مُعززة تغذوياً.

مُستويات عالية من الفايتوستيرولات لتقليل الكولسترول High levels of phytosterols

تتوافر في المملكة النباتية جُزيئات شبيه للكولسترول وهي في نوعين الأول فايتروستيرولايتات (Phytosterols) والثانية فايتوستانولات (Phytostanols) وتتواجد بتراكيز أعلى في الزيوت النباتية غير

المُصفاة كالزيوت المُستخرجة من الخضروات والفستق إضافةً الى زيت الزيتون. ويُعد الفستق والبذور عموماً والحبوب الكاملة والبقوليات مصدراً تغذوياً مُهماً تُجهز الجسم بالفايتوستيرولات. أثبتت الدراسات بأن هذه المُركبات تُقلل من مخاطر أمراض القلب وتُخفض من مُستويات الكوليسترول المؤذي. وقد وجد بأن الفايتوستانولات أكثر إستقرارية من نظيراتها الفايتروستيرولات أثناء تصنيع الغذاء. وُظفت الهندسة الوراثية في تطوير زيوت من نباتي السلجم وفول الصويا بتحويل الفايتوستيرولات الى الفايتوستانولات، اذ نُقِلَ جين من خميرة تُشفر لإنزيم أكسدة الهيدروكسي ستيرويد (Hydroxysteroid oxidase) الى النباتين أعلاه ليقوم بتحويل الفايتروستيرولات الى الفايتوستانولات.

زيادة مُستويات الكاروتينات بهدف زيادة فيتامين A Increasing carotein level

الكاروتينات عبارة عن صبغات باللوان صفراء وبرتقالية وحمراء موجودة في العديد من النباتات وتتحول بعضها داخل الجسم الى فيتامين A. والأخير أساسي للنمو الطبيعي والتطور ولوظيفة الجهاز المناعي إضافةً الى دوره في تقوية النظر. ومن أمثلة الكاروتينات في النباتات ألفا وبيتا في جذور الجزر وثمار القرع العسلي واللايكوبين في ثمار الطماطم والليوتين والزيانثين في أوراق الخضروات الورقية خاصة الداكنة منها. حُورت مجموعة من النباتات وراثياً لتصبح ذات مُستويات عالية في إنتاج الكاروتينات منها، الرز الذهبي المُدعم (المُعزز) في كاروتين بيتا، نبات السلجم (*Brassica rapa*) بزيادة مُستوى الكاروتين بعد إدخال جين يُشفر لإنزيم مسؤول عن تصنيع صبغة اللايكوبين. كما أُنتجت ثمار طماطم غنية بكاروتين بيتا بعد إدخال جينات معزولة من بكتريا تُشفر لإنزيمات المسالك الحيوية لتصنيع الكاروتينات.

زيادة مُستويات مُضادات الأكسدة Increasing anti-oxidant levels

يعود سبب تدهور صحة الكائنات الحية الى التلوث والإشعاع ودخان السكائر والإستعمال المُفرط للمُبيدات كونها السبب في تكوين جذور حرة داخل أجسامنا لها أضراراً وخيمة في الدنا والبروتينات وفي مُكونات الخلايا كالأغشية الخلوية مُسببة أمراض خطيرة أهمها السرطان. من هنا تأتي أهمية مُضادات الأكسدة كونها تحمي أجسام الكائنات الحية بتثبيطها لفعالية الجذور الحرة. تتخذ مُضادات الأكسدة أشكالاً مُختلفة منها أحماض فينولية مثل الفلافونيدات والتوكوفيرولات وتتوافر في أغلب ثمار الفاكهة والخضروات كاللهانة والجزر والبروكلي والباذنجان والثمار الصغيرة والبطاطا والقهوة والشاي والعنب وغيرها. حُورت بذور الذرة الصفراء لتحتوي خليط من مُضادات الأكسدة (شكل 13.11) وبهدف زيادة مُحتوى الفلوفونيدات في درنات البطاطا على سبيل المثال، تمكن مجموعة من الباحثين من نقل جين أو أكثر مُشفرة لإنزيمات

التصنيع الحيوي لها. أظهرت النباتات المُحورة وراثياً زيادة معنوية في مُستويات الفلوفونيدات مع زيادة واضحة في إنتاجها لمُضادات الأكسدة ذات الأهمية في التخلص من أنواع الجذور الحرة التفاعلية والتي غالباً ما تكون السبب الرئيس لأمراض السرطان (شكل 13.12).

شكل 13.11. عرنوص ذرة صفراء يحتوي على خليط من مُضادات الأكسدة بعد تحوير النبات وراثياً.

شكل 13.12. طماطم حُورت وراثياً لتصبح ذات مستوى عالي من مُضادات الأكسدة وبألوان غير مألوفة.

زيادة مُستويات الأحماض الدهنية الأساسية Increasing essential fatty acid levels

من المعلوم بأن الجسم لايُصنّع الأحماض الدهنية الأساسية التي تشتمل حوامض لينوليك (LA) والفالينولك (ALA) إضافةً الى مجموعة أُخرى من الأحماض الدهنية غير المُشبعة المُتعددة (PUFAs) ونُقصها في الغذاء يُعرض الإنسان الى مخاطر الإصابة بأمراض القلب. ويُعد السمك المصدر الغذائي الرئيسي للأحماض الدهنية ذات السلاسل الطويلة نوع اوميغا 3 وبالمُقابل فان النباتات ينُقصها الإنزيمات التي تكون سلاسل أحماض دهنية طويلة يحتاجها الإنسان وعموم اللبائن. لذا كرس العلماء في جامعة برستول جهودهم وتمكنوا من تحوير نبات الأربدوبسس (*Arabidopsis thaliana*) لينتج أحماض دهنية غير مُشبعة مُتعددة. اذ أضيفت ثلاثة جينات الى النبات تُشفر لإنزيمات مُختلفة لكي تحول حامضي لينولك

والفالينولك الى أحماض دهنية غير مُشبعة ومُتعددة مما فتح الباب لمزيد من البحوث من أجل تحسين نوعية النبات بما يخدم الكائنات الحية الأُخرى.

يُعد فول الصويا أحد أهم المصادر الرئيسة للزيوت النباتية المُستعملة في الطبخ ولكون بذور المحصول تحتوي حامضي لينوليك ولنولنك غير الثابتين وينتج منها مُكونات أحماض دهنية مُضرة بالصحة أثناء التصنيع. لذلك أُنتجت أنواع وراثية من فول الصويا ذات مُستويات عالية من حامض الأوليك ومُركبات قليلة من حامض لنولك ولينولنك مُناسبة جداً ومرغوبة عند تصنيع زيت فول الصويا وتتحمل درجات الحرارة العالية وطول مُدة خزنها. وحققت شركة VISTIVE عام 2004 مُنتج جديد تمثل بصنف من فول الصويا يحتوي نسبة لاتزيد عن 3% من حامض اللينولنك مُقارنة مع الأصناف المعروفة التي تبلغ فيها نسبة هذا الحامض الدهني 8%. علماً بأن الشركة التجارية أعلاه قد سبق وأنتجت صنف من فول الصويا مُقاوم لمُبيدالأعشاب Roundup Ready. والجدير بالذكر بأن شركة DUPONT قد طورت خطوط وراثية من فول الصويا تم تحويرها وراثياً لتحتوي نسب عالية من حامض الأوليك. سُميت الخطوط الوراثية الناتجة تحت تسميات G94-1 و G94-19 و G168. أُنتجت تلك الخطوط من خلال إسكات (Silencing) الجين المُسيطرفي فعالية الإنزيم المُسيطر على تحويل حامض اللينولنك الى حامض الأولك. اذ أُنتج خط وراثي ذو زيت أكثر ثباتاً عند إرتفاع درجات الحرارة مما يضمن إستعماله في الطبخ بأمان.

الذرة الصفراء ذات المُحتوى العالي من اللايسين Maize with high lysine content

أن المُستوى المُنخفض من اللايسين وكذلك التربتوفان في البروتينات المخزونة في بذور الذرة الصفراء والمُسماة Zeins يجعلها ذات قيمة نوعية غذائية واطئة. والجدير بالذكر بأن الحامض الأميني اللايسين يُعد مكون رئيس في علائق الحيوانات خاصة الدواجن والخنازير ووجد بأن بذور الذرة الصفراء ذات المُحتوى الواطئي من بروتينات Zeins تحتوي مُستويات عالية من اللايسين والتربتوفان. وعليه تم تطوير أصناف من الذرة الصفراء ذات مُحتوى عالي من اللايسين والتربتوفان بعد تعديلها وراثياً من خلال إدخال جينات تعبر عن إنخفاض في مُستوى تكوين وتراكم بروتينات a-Zeins. إضافةً الى ان البذور في الصنف المُعدل وراثياً قد أظهرت زيادة كبيرة في تراكم الأحماض الأمينية الحرة مثل الأسبارجين والأسبارتيت والكلوتاميت مما يزيد من قيمتها التغذوية.

مُعالجة نُقص حامض الفولك (فيتامين B9) Treatment of folic acid deficiency

يُسبب نُقص حامض الفولك أمراض مُختلفة للإنسان كالتشوهات الولادية، فقر الدم، أمراض العضلات القلبية، أمراض الجهاز العصبي وأنواع من مرض السرطان. وبالنظر لأهمية هذا الحامض وخاصة للنساء الحوامل حيث الحاجة الى زيادته في غذائهن الى نسبة 50%، لذا فالعديد من الدول تُنفذ برامج تعزيز غذائي للحيلولة دون حصول تشوهات ولادية. وقد تواجه هكذا برامج معوقات وخاصة في دول العالم الفقيرة بالنظر لإرتفاع كُلفة إنتاجه وصعوبة توزيعه في بُلدان ذات بُنية تحتية شبه معدومة. قدرت مُنظمة اليونيسف العالمية عدد الولادات المُشوهة بما لايقل عن 200000 حالة تشوه ولادي سنوياً في البُلدان الفقيرة يرجع سببه في الغالب الى نُقص فيتامين B9. ساهمت هندسة النبات وراثياً في تقليل تلك الأعداد ولحدٍ كبير بعد معرفة المسالك الحيوية لتصنيع الفوليت، ولكون النباتات المصدر الرئيس للفوليت والذي يدخل مُباشرةً في تغذية الإنسان. يتم تصنيع الفوليت من ثلاثة مُركبات تشمل البتريدين (Pteridine)، p-aminobenzoic acid (PABA) ومن بوادئ الكلوتاميت. أُنتجت أول ثمار طماطم مُحورة وراثياً عام 2007 والتي أظهرت زيادة في التعبير الجيني لإنزيم GTP cyclohydrolase 1 وهو الإنزيم الأول المسؤول عن تصنيع البتريدين علماً بأن إنزيم Aminodeoxychorismate synthase والذي يبدأ الخطوة الأولى في تفاعل تصنيع PABA. أُنتجت بهذه الطريقة ثمار طماطم لها المقدرة على تراكم الفوليت بمقدار 25 مرة (850 مايكروغرام/100غم مُنتج خام) وبهذا فقد أحتوت ثمرة الطماطم بالحجم العادي على كمية كافية من الفوليت لسد حاجة مرأة حامل منه (600 مايكروغرام/يوم). ونجحت مُحاولات مجموعة من الباحثين ايضاً في زيادة مُحتوى الرز (*Oryza sativa* japonica) من الفوليت ليُراكم ما مقداره 100 ضعف ماتحويه الأصناف العادية.

فيتامين E (α-tocopherol): أُنتجت العديد من النباتات ألمُحورة وراثياً ذات مُستويات عالية من فيتامين E أمثلة فول الصويا، اللهانة، الخس، والبطاطا.

فيتامين C (L-ascorbic acid): يلعب فيتامين C دوراً حيوياً كمُضاد للأكسدة ووظائف ايضية في النباتات والحيوانات. ولا يتمكن الإنسان والعديد من الحيوانات اللبونة من تصنيعه لتوقف نشاط الجين المسؤول عن الناتج النهائي في المسلك الحيوي لتصنيع الفيتامين، لذلك تعتمد على تجهيز إحتياجاتها من إستهلاك الخضروات والفاكهة. ولحُسن الحظ فالمسلكين الحيويين لتصنيع فيتامين C داخل النباتات أصبحا معروفان حيث يسود مسلك D-mannose في أنسجة الأوراق بينما يسود مسلك D-galacturonic في مراحل نشوء

الثمار. تم تسليط الضوء على التصنيع الحيوي للأسكوربيت في مسلك D-mannose بعد ان تم كلونة جين منقول من *Actinidia chinenesis* الى نبات التبغ يُشفر لإنزيم L-galactose guanyltransferase والذي يُحول GDP-galactose الى Hexose-1P. وكانت نتيجة التعبير الجيني حصول زيادة مُقدارها ثلاثة أضعاف في مُحتوى أوراق التبغ من الأسكوربيت. وسجل قسم من الباحثين زيادة في مُستويات الأسكوربيت في الأنسجة النباتية من زيادة التعبير الجيني لأحد الإنزيمات الداخلة في مسلك التصنيع الحيوي وإفترضوا إستعمال المايوانوسيتول (myo-inositol) كركيزة أولية (Initial substrate) في التفاعل بعد كلونتهم لإنزيم *Arabidopsis thaliana* myo-inositol oxygenenase والذي غالباً ما يظهر تعبيره في أوراق وأزهار النبات. أدت زيادة التعبير الجيني الى حصول زيادة في تراكم الأسكوربيت بمُقدار 2-3 أضعاف النباتات غير المُحورة. وتمكن باحثون آخرون من كلونة إنزيم L-gulono-1,4-lactone oxidase (GLOase) المعزول من الحيوانات ونقله الى نباتي الخس والتبغ مما أدى الى زيادة مُحتوى أوراقهما من فيتامين C بمقدار 4-5 أضعاف واقترح الباحثون في حينها إحتمالية وجود جزء من المسلك الحيوي الحيواني داخل النباتات. وتم تعزيز ذلك الإكتشاف بعد تحوير نبات الأربدوبسس البري بجين GLOase المعزول من الأرنب مما أدى الى زيادة مُحتوى أوراق النبات من حامض الأسكوربك بمُقدار ثلاثة أضعاف. وتبين بأن زيادة التعبير الجيني المسؤول عن إعادة تدوير الأسكوربيت أداة فعالة لرفع مُحتوى النبات من فيتامين C ذات الأهمية البالغة في توفير حماية للجسم كونه مُضاداً للأكسدة.

تحسين قابلية هضم النباتات Improvement of plant digestibility

من المعلوم بأن جدار الخلية النباتية يُعتبر العقبة الرئيسة عند هضم نباتات العلف من قبل الحيوانات وخاصة اللكنين المُكون من الألياف. ومن المؤكد بأن تحسين القابلية الهضمية للنباتات سيخفض من كمية محاصيل العلف اللازمة في تغذية الحيوانات وبالتالي تقليل أسعارها. أُنتج محصول جت ذومُستويات مُنخفضة من اللكنين بعد تقليل مُحتوى خلايا النبات من الألياف بتقانة إسكات الجين (Gene silencing). واتبعت آليات أُخرى في تحسين قابلية هضم النباتات، فقد تم تحوير النبات النجيلي *Festuca arundinacea* بجين Ferulic acid esterase (FAEA) المعزول من الفطر *Aspergillus niger* ويعمل التعبير الجيني لهذا الإنزيم بإستهدافه فجوات خلايا النبات. تتم أسترة حامض Ferulic داخل الجدر الخلوية لنباتات محاصيل العلف الى Arabinoxylans والذي يُساهم مع مونيمرات اللكنين (Monomers) في عمليات الأكسدة المُصاحبة للمسالك الحيوية لتوليد مُعقدات من اللكنين المُرتبط بالسُكريات المُتعددة ومع مُركب Ferulate والتي ترتبط بشكل مُستعرض مع جدار الخلية. والأخيرة تمنع تحطيم الجدر الخلوية من

قبل الكائنات الدقيقة وبالتالي تقلل من قابلية هضم النبات. وبعد حصاد هذا النوع من الحشائش وموت الخلايا، فالمُركب FAEA والذي كما ذُكر سابقاً يستهدف فجوات الخلايا ليُنتج أحماض أُحادية وثنائية من Ferulic بعد تحريرها من جدر الخلايا. ويُمكن زيادة الأحماض الاحادية والثنائية الى عدة أضعاف بإضافةً إنزيم Exogenous endo-1,4-β-xylanase. أظهرت النباتات التي عبرت عن إنزيم FAEA زيادة في قابليتها على الهضم وإنخفاض في مُستويات أسترة الفينولات مُقارنةً مع النباتات غير ألمُحورة وراثياً.

ومن الإنجازات التي حققتها هندسة النبات وراثياً في مجال تحسين نوعية الغذاء البشري والحيواني شملت تحسين هضم الفوسفور(P) إذ ان ما يُقارب من ثلثي الفسفور يكون على شكل حامض الفايتك (Phytic acid) ذو قابلية محدودة الهضم من قبل الحيوانات اللبونة والدواجن مما يجعله غير جاهز أو متوفر تماماً عند إستهلاكها للعليقة. والمعروف بأن الفسفور غير المهضوم الذي ينتج في مُخلفات تلك الحيوانات يُعتبر مُلوثاً بيئياً خاصةً عند إنتقاله الى المياه. عالجت مصانع الأعلاف الحديثة المشكلة من خلال إضافةً Phytases مركزة الى العليقة ولو ان ذلك أدى الى زيادة كُلفة إنتاجها. إضافةً الى أن الفايتيت يُعد عامل مُضاد تغذوي (Antinutritional factor) كونه مخلبياً للعناصر الضرورية للحيوان مثل الكالسيوم، الزنك والحديد. والحالة أقلُ أثراً في الإنسان نتيجة التنوع الغذائي الذي يستهلكه وقد تظهر أعراض نُقص الفسفورفي الناس النباتيين (Vegetarians). أُنتج أول نبات مُحور وراثياً عام 1993 والذي أظهر تعبيراً وراثياً لإنزيم Phytase، أُنتجت بعد ذلك العديد من النباتات ذات التعبير الوراثي المُماثل. وتم تطوير نباتات ذرة صفراء وفول الصويا ذات مُستويات مُنخفضة من الفايتيت نتيجة لإختلال نواقل عناصر معدنية مُحددة.

الثورة ألخضراء Green revolution

بدأت الثورة الخضراء في العقود الثلاثة الأخيرة من القرن العشرين حينما زاد الإنتاج العالمي ثلاثة أضعاف عما كان عليه والتي كان من أهم أسبابها تبني أصناف مُحسنة وراثياً وما صاحبه من تقدم في عمليات خدمة المحصول. وكان لتطوير أصناف عالية الإنتاجية من الحنطة والرز قد مكّن العديد من دول العالم الثالث كالهند مثلاً من الإنتقال من ندرة في إنتاج الغذاء الى دولة مُصدرة من هذه الحبوب. وبهذا أصبحت الثورة الخضراء واقعاً ملموساً تبناها المُزارعون بإستعمالهم بذور عالية الجودة وإتباعهم المُدخلات العلمية في الزراعة الحديثة وإدارة حقلية مثالية خاصة فيما يتعلق بإستعمالهم المُخصبات ومُبيدات حشرية ومُبيدات أدغال نوعية ومكننة ومحاصيل ذات إنتاج وفير (لاحظ شكل 13.13 الذي يُمثل الخس العملاق).

شكل 13.13. الخس العملاق الذي تم تحويره وراثياً مما حقق طفرة نوعية في كمية الإنتاج.

هندسة حشائش النجيل وراثياً لتحمُل الإجهادات Genetic engineering of grasses for stress tolerance

يُعد جنسا حشائش النجيل *Lolium* و *Festuca* من أهم الحشائش في تغذية الحيوان وكذلك كمُسطحات خضراء تنتشر زراعتهما في المناطق الباردة وكذلك حول العالم. تبرز أهميتهما كأعلاف للحيوانات وإستعمالهما كمُسطحات خضراء في الحدائق العامة وفي زراعة مواقع الطمر الصحي بعد الإنتهاء من طمرها. ولكون أغلب أنواع هذه النباتات خلطية التلقيح لذلك فهي ذات تنوع وراثي يُمكن مُلاحظته حتى ضمن النوع النباتي الواحد. حققت الهندسة الوراثية نجاحات كبيرة في هذين الجنسين بعد إدخال جينات ذات تعبيرات مُختلفة مما ساهم كثيراً في تحسين أدائهما تحت ظروف بيئية مُختلفة ويبين جدول 13.8 الصفات التي تم الحصول عليها في هذين الجنسين بعد تحويرها وراثياً والتي مثلت إنجازاً علمياً فريداً في إنتاج محاصيل العلف والمُسطحات الخضراء وزراعتها في مناطق جغرافية مُتباينة في تضاريسها المناخية والجيولوجية.

هندسة التركيب الضوئي وراثياً Genetic engineering of photosynthesis

يعتمد حاصل النبات كلياً على الضوء وتحولاته (حصاد الضوء والنقل الألكتروني) الى طاقة يُستفاد منها (ATP, NADPH) والتي تدفع بإتجاه تفاعلات الظلام والتي من خلالها يتحول CO_2 الى كربوهيدرات. تحصل تلك التفاعلات في الأوراق من قبل البلاستيدات الخضراء.

جدول 13.8. أنواع من حشائش النجيل التي حُورت وراثياً بجينات مُختلفة لتصبح متحمُلة أومُقاومة للإجهادات البيئية

الأنواع النباتية تحمل الإجهادات أللاأحيائية	الجينات المنقولة والجينات المعلمة بين قوسين	الصفة المتحققة
Lolium multiflorum	*sacB,(hpt)*	متقزم
Lolium perenne	*Ipt, uidA, (hpt)*	دائم الخضرة
Lolium perenne	*wft1, wft2, (bar)*	متحمُل للإنجماد
Festuca arundinacea	*Ipt, (bar)*	متحمُل للإنجماد
Festuca arundinacea	*CuZn-SOD, APX, (hpt)*	متحمُل للإجهادات
Festuca arundinacea	*DREB1A/CBF3, uidA, (hpt)*	متحمُل للجفاف
Lolium perenne	*OsNHX1, (bar)*	متحمُل للملوحة
Festuca arundinacea	*AtNHX1, (npt11)*	متحمُل للملوحة
Festuca arundinacea	*AeNHX1, (npt)*	متحمُل للملوحة
Festuca arundinacea	*CBF1, uidA, (hpt)*	متحمُل للملوحة، الإنجماد، الحرارة، الجفاف
الأنواع النباتية/ تحمُل الإجهادات الأحيائية		
Lolium perenne	*RgMV-CP, (npt11)*	مُقاوم للأمراض الفيروسية
Lolium multiflorum	*RCC2, (hpt)*	مُقاوم للأمراض الفطرية
Festuca arundinacea	*AGLU1, Pi9, dermaseptin S1, (hpt)*	مُقاوم للأمراض الفطرية
Festuca arundinacea	T4e, (hpt)	مُقاوم للأمراض الفطرية
الأنواع النباتية/ ذات قيمة غذائية عالية		
Festuca arundinacea	*Sfa8, (hpt)*	مراكم للبروتين
Festuca arundinacea	*CAD, (hpt)*	قابلية هضم عالية
Festuca arundinacea	*COMT, (hpt)*	قابلية هضم عالية
Lollium multiflorum	*FAE, (hpt)*	قابلية هضم عالية
Lolium perenne	*1-SST, 6G-FFT, (bar), npt11*	مراكم للفركتان
الأنواع النباتية/ التزهير المتاخر		

Festuca rubra	*LpTFL1, (bar)*	يزهر متاخراً
Lolium perenne	*ATH1, (hpt)*	يزهر متاخراً
الأنواع النباتية/عدم الحساسية		
Lolium rigidum	*Lol p, 5, (npt11)*	حبوب لقاحه لاتُسبب حساسية
Lolium perenne	*Lol p 1, Lol p 2*	حبوب لقاحه لاتُسبب حساسية

والأخيرة عبارة عن عضيات داخل الخلية النباتية والطحالب تُعرف بالكلوروبلاست وهي مواقع التركيب الضوئي والمصدر الرئيس لصُنع الغذاء. وللبلاستيدات الخضراء فعاليات مُهمة جدا في حياة الكائنات الحية كتحرير الاوكسجين وسحب ثنائي اوكسيد الكربون، إنتاج النشاء، تصنيع الأحماض الأمينية والدهنية، تصنيع الصبغات إضافةً الى ايض النتروجين. يتراوح حجم عضية البلاستيدة من 120-150 kb ويتراوح عددها في الخلية النباتية الواحدة من 1000 -10000. جذب موضوع هندسة البلاستيدات الخضراء العديد من الباحثين بإعتباره مُكملا او بديلا عن نقل الجين الى نواة الخلية وذلك لمجموعة من الإعتبارات منها؛ مُحتواها العالي من البروتين وإمكانية تعبيرها عن بروتينات مُتعددة من السيسترونك mRNAs المُتعدد إضافةً الى تجنب ما يُسمى بالتلوث الجيني لكون البلاستيدات الخضراء لاعلاقة لها بنقل الصفات الوراثية كما هو الحال مع حبوب اللقاح. ولغرض زيادة سرعة مُعدلات التركيب الضوئي، يُفترض التفكير اولاً بهندسة الإنزيمات المسؤولة عن سحب وتثبيت CO_2 إذا ما علمنا بان مجموعة إنزيمات روبسكو (RuBisCO) هي المسؤولة عن تثبيت CO_2 في البلاستيدة الخضراء. أحد إستراتيجيات هندسة إنزيم الروبسكو مبنية على أساس الإستمرار بتثبيت CO_2 تحت ظروف الجفاف أو الإجهاد عموماً حيث تكون الثغور مُغلقة لحد ما. والخطوة الاولى البحث عن التفاعل الجزئي للإنزيم المسؤول عن قلة سحب وتثبيت CO_2 تحت هذه الظروف وزيادة سرعته، بحيث يستمر النبات في التثبيت حتى تحت ظروف الإجهاد وبالنهاية تستمر عملية التركيب الضوئي وتصنيع الغذاء.

وثانياً؛ تُبنى الفكرة في التحري عن جينات في نباتات أُخرى تعمل فيها منظومة الروبسكو بكفاءةٍ عالية ويتم نقل الجين أو الجينات المسؤولة عن تثبيت CO_2 الى النبات الجديد وبالتالي زيادة التركيب الضوئي. عملياً، جرى إحلال جين rbcL وجين rbcS في البلاستيدة والنواة بجينات تُشفر لإنزيمات روبسكو نشطة في تثبيت CO_2، بالرغم من صعوبة هندسة الجين في دنا البلاستيدة الخضراء الجديد. ومع التقدم العلمي الحاصل أصبح بالإمكان هندسة الإنزيمات الكفوءة مثل جين rbcL الذي يحتوي تعاقبات مسؤولة عن تحسين أداء الروبسكو. وفي مُحاولات لفهم العلاقات الوظيفية والتركيبية لمنظومة الروبسكو، تم التلاعب ببعض

الحوامض الأمينية في بروتينات الروبسكو في شكليها I و II. ومن أجل تشخيص تلك الحوامض الأمينية المسؤولة عن خطوة واحدة أو تعاقب في تفاعل جزئي من تفاعلات الروبسكو، تم تغيير الطبيعة الكيميائية للسلسلة الجانبية للحامض الأميني وكذلك طول السلسلة الجانبية له. من جانب آخر، هناك إمكانية في ربط التعاقبات الأولية لأكثر من 2000 صنف نباتي للوحدات الكبيرة (Subunit I) من بروتين روبسكو ولحوالي 300 صنف نباتي للوحدات الصغيرة (Subunit II) من أجل الإفتراض أيٍ من الأحماض الأمينية أو التعاقبات مسؤولة عن زيادة سحب CO_2.

تعتمد هندسة بروتينات منظومة جينات الروبسكو على التصنيع الطبيعي للبروتينات المؤشبة (Recombinant proteins). أمكن تصنيع الوحدات الكبيرة والصغيرة للروبسكو لبكتريا مؤشبة داخل بكتريا القولون *Escherichia coli* ويمكن ان تُترجم جينات روبسكو حقيقية النواة في بكتريا القولون *E. coli* ولكن البروتينات المُصنعة تتكتل بدلاً من أن تكون إنزيم ذائب وفعال. يُعتقد ان السبب في ذلك يرجع جزئياً الى حقيقة أن الوحدات الكبيرة من بروتينات روبسكو غير ذائبة بغياب الوحدات الصغيرة من البروتينات في الكائنات حقيقية النواة ولربما الى أن مرافقات جينية (Chaperones) في بكتريا القولون *E. coli* غير مُتوافقة مع الوحدات الكبيرة من البروتينات. على ضوء ذلك فان التعقيد في منظومة عملية التركيب الضوئي وخزن نواتج العملية بإتجاه زيادة التراكم من المُصنعات، يتطلب التلاعب بمجموعة من الجينات وبالتاكيد يشتمل ذلك على جينات البلاستيدة الخضراء والنواة. ولابُد من الإشارة الى ضرورة التلاعب في الوقت نفسه في منظومة الفايتوكروم كونها مُستقبلات الضوء الساقط على سطح البلاستيدات الخضراء. ويبدو بان الإستجابة تختلف حسب النوع النباتي ولكل منها يستوجب الأمر تبني إستراتيجية خاصة به. ينطبق ذلك وبكل تأكيد في نباتات C_3 و C_4 لوجود طريقين في الإستفادة من CO_2 إما ثلاثية أو رباعية الكربون عند تثبيتها لثنائي اوكسيد الكربون. تولدت فكرة إدخال انزيمات مُختلفة من مسلك التركيب الضوئي لنباتات C_4 الى الأنواع النباتية من C_3. تتضمن نباتات C_3 محاصيل مهمة إقتصادياً كالحنطة وفول الصويا والشوفان والتي تتميز خلايا الطبقة الوسطية المُسماة الميزوفيل في أوراقها بوجود البلاستيدات الخضراء حيث يُثبت CO_2 من قبل منظومة بروتينات الروبسكو كجزء من دورة كالفن (Calvin cycle) في البلاستيدة الخضراء. والنظام للأسف غير كفوء في تلك الأنواع النباتية بالنظر لكون التراكيز المُثبتة من قبل نباتات C_3 مُحددة بعامل تثبيت CO_2 (Rate-limiting factor).

كذلك بمقدور منظومة الروبسكو إستعمال O_2 كركيزة (Substrate) لتفاعلات Ribulose 1,5-bisphosphate والتي تؤدي أخيراً الى حصول التنفس بوجود الضوء (Phtorespiration) وبذلك يكون

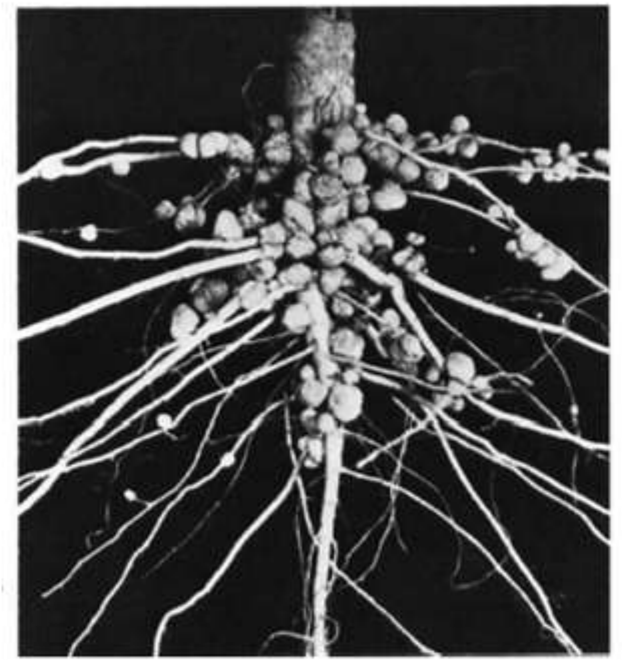
O_2 مُنافس تثبيطي لتثبيت CO_2 من قبل بروتينات الروبسكو. المعلوم بأن التنفس بوجود الضوء يُعد خسارة للطاقة التي يجب على النبات الإحتفاظ بها لزيادة تراكمه من نواتج التركيب الضوئي وليس لصرفها مما يُقلل من الخزين الغذائي. حدى ذلك في التفكير بإيقاف التنفس بوجود الضوء أو تقليله الى الحد الأدنى لتقليل الطاقة المصروفة وبالتالي زيادة تراكم النبات من مُصنعات التركيب الضوئي (Photosynthates) واخيراً زيادة المخزون الغذائي الذي هو غذاء الإنسان والحيوان. يتم ذلك عادة بتقليل سرعة تفاعلات التنفس بوجود الضوء الى الحد الأدنى بعد التلاعب الوراثي بالجينات المسؤولة عن تلك التفاعلات. ومما تجدر الإشارة اليه هو إمكانية هندسة المايتوكوندريا في السيطرة على سرعة تفاعلات دورة كربس وتقليل سرعتها وتقليل كمية الطاقة المصروفة وبالتالي المُحافظة على خزين غذائي عالي.

هندسة تثبيت النتروجين الجوي وراثياً Genetic engineering of nitrogen fixation

تطورت المعرفة سريعاً بشأن تثبيت النتروجين الجوي من قبل الاحياء المجهرية المتعايشة مع النبات بسبب حجم العمل الذي بُذل في هذا المجال والمبالغ المصروفة في البحث العلمي وتحديداً في زيادة كفاءة تلك الاحياء في تثبيت N_2. يُضاف الى ذلك الى التقدم الحاصل في طرائق هندسة النبات والأحياء المجهرية وراثياً. لايُخفى ما للنتروجين من أهمية في الزراعة وحاجة النبات له. النتروجين (N_2) مُكون مُهم للبروتينات والأحماض النووية وبقية جُزيئات الكائنات الحية. يُشتق أغلب النتروجين من أكسدة أو إختزال أشكال من N_2 في التربة من قبل النباتات لأن لايُمكن للنباتات والحيوانات الإستفادة من N_2 بصورته هذه رغم غزارته بالجو. يُعد نُقص N_2 في التربة مُحدداً لإنتاجية أغلب المحاصيل ويُضاف بالأسمدة النتروجينية وبمُعدل 50 الى 300 كغم/هكتار سنوياً. عموماً، مصادر تجهيز التربة بالنتروجين محدودة لعل أهمها تحلل المواد العضوية في التربة، خزين التربة، تثبيته من قبل بعض أحياء التربة الدقيقة، والقليل جداً يُضاف للتربة عند سقوط الأمطار.

إذا ما تمعنا بالمصدر الرئيس والطبيعي للنتروجين المُضاف الى التربة نجده لايزيد عن 5 كغم/هكتار وتقوم بتثبيته الأحياء المجهرية بعملية تحول إنزيمي لعنصر N_2 بالهيئة الغازية الى أمونيا. والواقع فإختزال N_2 يتم بمُساعدة بمنظومة إنزيمات النايتروجينيس (Nitrogenase system) ويتم الحصول على وحدات ثانوية منها من الأنواع المُثبتة للنتروجين. إضافةً الى أن تعاقبات الدنا المُشفر للبروتينات مُحافظٌ عليه لحد كبير ووظف في تجارب التهجين لتبيان وجود تلك الجينات في الأنواع المُثبتة للنتروجين التي تم إختبارها. المُدهش بأن إنزيم النايتروجينيس مُتوافر فقط في الكائنات بدائية النواة وليس في حقيقية النواة مثل النباتات

وعليه فالأخيرة لايُمكنها الإستفادة منه ما لم تتداخل مع الأحياء الدقيقة الحاوية هذا الإنزيم لكي تحصل على N_2 بعد موت تلك الأحياء. في ظل هكذا علاقة تعايشية (Symbiosis)، تستوطن الأحياء الدقيقة داخل النبات المُضَيف وتستلم مصدر الكربون لها من المُضَيف مُباشرةً وبالمُقابل N_2 المُثبت من قبل تلك الأحياء يكون مُتوفراً للمضيف بعد موتها علماً بأن دورة حياة تلك الأحياء المجهرية قصيرة (شكل 13.14). أصبح بحكم المؤكد ان تلك الكائنات تُحور نفسها داخل النبات عند عمل إنزيم النايتروجينيس ولايُمكنها الإستمرار بهضم N_2 وعليه تُطلق NH_4^+ ليجده النبات جاهزاً. وبالمُقابل إذا مازادت كمية الأمونيا عن حدها فالنبات يُقلل كمية الأنسجة المُصابة بالبكتريا المثبتة للنتروجين الجوي أو من خلال تقنينها للكربون المُعطى الى الأحياء الدقيقة أو بتقليلها عدد العقد الجذرية (Nodules).



شكل 13.14. العقد الجذرية في جذور نبات فول الصويا. معامل نتروجين مُصغرة تُجهز النبات بالنتروجين المُثبت من N_2 الغازي. تمتلك بعض البكتريا المُثبتة جينات سحب الهيدروجين وإعادة تدويره ايضاً.

وبالنظر للتعقيد الكبير في إنتاج وفهم وظيفة إنزيم النايتروجينيس، جرت مُحاولات كثيرة لكسر الحاجز والتحري عن الجينات المُسيطرة على هذا الإنزيم خاصةً وجينات تثبيت النتروجين (*nif* genes) عموماً. تم تشخيص عدد من أجناس الأحياء المجهرية الحاوية لتلك الجينات (جدول 13.9) ولكل جنس منها حالته

الخاصة واتي يجب دراستها دراسة مُستفيضة. لعل من أهم الأفكار المطروحة في هندسة تثبيت النتروجين الجوي هو مُحاولة نقل جينات *nif* الى أنواع أُخرى من الكائنات الدقيقة والنباتات من أجل زيادة عدد الأنواع المُثبتة للنتروجين وبالتالي توفر كميات إضافية من الأسمدة النتروجينية. عُرفت جينات تثبيت النتروجين الجوي بالتفصيل في بكتريا *Klebsiella pneumonia* وَوِجد أن ما يُقارب من 20 جين تتطلبها عملية تنظيم تثبيت النتروجين في تلك البكتريا. الشئ المُدهش في الموضوع، عند نقل تلك الجينات العشرين من بكتريا الكلبسلا المُثبتة للنتروجين الى بكتريا القولون *E. coli* غير المُثبتة له، تصبح البكتريا الأخيرة مُثبتة للنتروجين.

جدول 13.9. الأحياء بدائية النواة المُثبتة للنتروجين الجوي والعمل على دراستها وراثياً

الجنس	**الخصائص المُفيدة وحالة الدراسة**
Azotobacter	مثبت للنتروجين هوائياً، العمل عليه وراثياً في تقدم
Azospirillum	يرتبط بالمجموع الجذري للنبات، التلاعب الوراثي في تقدم
Rhizobium	يعمل عقد جذرية في بعض أنواع البقوليات، الدراسات الوراثية في تقدم سريع
Klebsiella	تم فهم الأُسس الوراثية لجينات *nif* فيه خاصة بعد نقلها الى بكتريا *E. coli*
Frankia	يعمل عقد في جذور عدد من شُجيرات ذوات الفلقتين، بالإمكان زراعة بعض أنواعه
Rhodospirillum، *Rhodopseudomonas*، *Anabaena*، *Nostic*	بكتريا تقوم بعملية التركيب الضوئي، التلاعب الوراثي فيها وصل الى مرحلة جيدة، تتعايش مع مدى واسع من النباتات والفطريات وغيرها

تُشفر قسم من الجينات المثبتة للنتروجين الجوي (*nif*) للمُكونات التركيبية لإنزيم النايتروجينيس بينما يُشفر جينان (*nif* L & *nif* A) لتنظيم العملية. اما بكتريا الرايزوبيا سريعة النمو مثل *Rhizobia legminosarum* التي تحتوي ثلاثة أنواع من الجينات لتثبيت النتروجين وهي؛ (a) الحاجة لجينات *nif* من أجل تكوين إنزيم النايتروجينيس الفعال وكما هو الحال في الكلبسلا. (b) تتطلب جينات تكوين العقد الجذرية

(Nod-genes) من أجل تكوين العقد في جذور النبات. (c) تتطلب وجود جينات التثبيت (Fix-genes) من أجل المُحافظة في إستمرارية عملية التثبيت النتروجيني من قبل العقد الجذرية. تُسيطر تلك الجينات على حماية الاوكسجين لإنزيم النايتروجينيس وكذلك ATP وفي تجهيز العامل المُختزل. يوجد حوالي 18 جين يُساهم في عملية تكوين العقد الجذرية والتي تتحفز بوجود المُحفز الفلافونويدي Leutolin المُتوفر في العصارة الجذرية. تُسيطر تلك الجينات على مُختلف مراحل الإصابة بالرايزوبيوم مؤديةً الى تكوين العقد. تقع جينات *nif*، *nod* و *fix* في بلازميدات البكتريا الرايزوبيوم سريعة النمو بينما يكون موقعها على الكروموسوم في بكتريا الرايزوبيوم بطيئة النمو. تُسيطر مجموعة جينات *nod* في المدى الذي يسمح للبكتريا ان تُصيبه (Host range) من النباتات والذي من المُهم جداً زيادة حدود المُضيف لكي تُصيب مجموعة من النباتات وليس كل سُلالة تتخصص في إصابة نوع معين من النباتات ويتم ذلك بالتلاعب الوراثي بتلك الجينات لِتُصيب محاصيل الحبوب مثلاً وتُكون عقداً في جذورها. تم حديثاً على سبيل المثال وبنجاح إصابة مزارع أنسجة الحنطة والرز ببكتريا الرايزوبيوم وبالرغم من عدم تثبيتهما للنتروجين الجوي، الا إنها تعتبر خطوة جيدة بالإتجاه الصحيح لِمُستقبل ثورة خضراء تُستبدل فيها الأسمدة الصناعية بالطبيعية بما يُحافظ على البيئة ويُقلل من كُلفة الإنتاج الزراعي.

الزراعة الجزيئية Molecular farming

تمتلك النباتات المقدرة الفريدة في إنتاج الآلاف من الجزيئات الكيميائية بتراكيبها المُختلفة وتلك نعمة كبيرة وثروة تُجهز بها الإنسان والحيوان ويُمكن إستثمارها صناعياً وخاصة في الصناعات الدوائية. يُمكن ان تعمل النباتات كمعامل (مُفاعلات حيوية) رخيصة الكُلفة لإنتاج تلك الكيميائيات بعد إدخال الجين الصحيح فيها وخاصة الكيميائيات المُهمة جداً مثل الأحماض الأمينية، الفيتامينات، البروتينات، المواد المطاطية القابلة للتحلل، المواد الصيدلانية الإنزيمات وغيرها. وُظِفَت الزراعة الجزيئية لِتُغطي ما لايقل عن خمسة محاور والتي تم تغطية غالبيتها في فصول الكتاب الأُخرى لتشمل تحسين نوعية الغذاء، تشخيص وإنتاج البروتينات العلاجية، اللقاحات المأكولة، زيادة وتسريع إنتاج مُركبات الايض الثانوي وإنتاج المواد المطاطية القابلة للتحلل (Biodegradable plastics). تُنتج الأخيرة من نباتات تم تحويرها وراثياً لتصبح بمثابة معمل لإنتاج مركب Polyhydroxy butyrate (PHB) وهو مادة مطاطية قابلة للتحلل. أُنتج نبات الأربدوبسس المُنتج لتلك المادة حصرياً داخل البلاستيدات الخضراء دون التأثير في نموه. وهناك إمكانية في إنتاج مركب PHB بكميات كبيرة داخل االبلاستيدات الخضراء لأشجار سريعة النمو كالحور (*Populus sp.*) وإستخلاصها من الأوراق.

تطبيقات المُؤشرات الجُزيئية في هندسة النبات وراثياً Applications of molecular markers in plant genetic engineering

تُستعمل المُؤشرات الوراثية من قِبل مُربي النبات كأدوات إنتخابية للصفات المُهمة إقتصادياً في العديد من المحاصيل (جدول 13.10) التي حققت نقلة نوعية كبيرة في رسم خرائط الجينات والتحري عن القرابة والكشف عن الجينات ذات العلاقة بالصفات الكمية والنوعية.

جدول 13.10. توظيف المُؤشرات الجزيئية في التحري عن جينات تحمل صفات مُفيدة وفي عينات من أنواع نباتية مُختلفة

المحصول	الصفة المدروسة	الجين	المؤشر الجزيئي
رز	رائحة البذور	*fgr*	RFLP
الذرة الحلوة	نوعية الحاصل ومكوناته	*QTL (6)*	RFLP, AFLP, SSR
حنطة	لون الطحين	*QTL (1)*	RFLP, AFLP
حنطة	حاصل الحبوب	*QTL (1)*	RFLP
حنطة	نوعية البروتين	*QTL (1)*	STMS, RFLP
حنطة	نوعية الخبز	*Glu-DI (IDx5)*	PCR
حنطة	محتوى الأميلوز	*Wx-B1*	RFLP
زهرة الشمس	محتوى البذور من الزيت	*QTL (2)*	AFLP, SSR
عنب	ثمار عديمة البذور	*QTL (1)*	AFLP, SSR, isozyme, RAPD, SCAR
تفاح	النمو والنشوء بمرحلة الحداثة	*QTL(1)*	RAPD
ورد الروز	إستمرار التزهير، كثافة الأشواك	*QTL(1)*	AFLP
خوخ	نوعية الثمار	*QTL(1)*	Isozyme, RFLP, AFLP, RAPD
رز	مقاومة المُسبب المرضي *Pyrcularia oryzae*	*Pi-2,4, Pi11*	RFLP
حمص	مقاومة *Fusarium sp.*	*Race 4*	ISSR
طماطم	مقاومة *Globodera*	*Hero*	SSR

	rostochiensis,		
طماطم	مقاومة Meloidogyne spp	*Mi-1*	RFLP
قطن	إسترجاع الخصوبة في نباتات ذات عقم ذكري سايتوبلازمي	*Rf1*	RAPD, SSR
زهرةالشمس	إسترجاع الخصوبة	*Rf1*	PAPD, AFLP, SCAR
حنطة	سحب مُلوث الكادميوم	*Cdu 1*	RAPD
حنطة	إرتفاع النبات	*Rht-B1, Rht-D1*	RFLP
حنطة	جينات التقزم	*Rht-B1, Rht-D1, Rht12, Rht8*	STMS, SSR, RFLP, AFLP
حنطة	تكوين نباتات 1n	*QTL (1)*	AFLP
بزاليا	تكوين عقد جذرية رايزوبية	*Sym9, sym10*	AFLP, RFLP

بعد توفر الأعداد الكبيرة من المُؤشرات الجزيئية مثل RFLP, RAPD, AFLP, Microsatellites أصبح عمل خرائط المجينات النباتية حقيقةً وخاصة في المحاصيل الإستراتيجية.

إستثمر المُختصون في رسمهم لخرائط المجينات المؤشرات المبنية أساساً على تقانة PCR مثل AFLP, STMS, RAPD, CAPS, SCAR, STS. بالرغم من دراسة مجينات مئات الأنواع النباتية، التركيز كان واضحاً في محصول الرز ومحاصيل أُخرى ترتبط مُباشرة بغذاء البشر. ويمكن للقارئ مراجعة المصادر المُتخصصة للإطلاع على إنجازات التقانات الأحيائية في هذا المجال الحيوي والإطلاع على ملاحق هذا الكتاب.

التوجسات من النباتات ألمُحورة وراثياً Fears of genetically modified plants

لاتزال بعض التوجسات من إحتمالية حصول مخاطر بيئية من النباتات ألمُحورة وراثياً عند العديد من الناس بالرغم من عدم ثبوت حصول مخاطر حقيقية لحد الآن. يرتبط نقل المنتوج بعد تحويره وراثياً من المُختبر الى الحقل بعقبات قانونية وتنظيمية إضافةً الى توجسات إجتماعية وإقتصادية. هناك توجس لدى

الناس وكذلك من المُختصين خوفاً من ظهور جينات مُقاومة في الحشرات على سبيل المثال وظهور جيل من الأدغال العملاقة (Super weeds)، علماً ان مُختصي التقانات الأحيائية قد إتخذوا التدابير المُلائمة.

ومما تجدر الإشارة اليه في هذا الخصوص والذي يتعلق بالمُزارعين في دول العالم الثالث هو تطبيق شركات البذور العالمية تقانات تحديد البذور (Seed terminator technology) مما يُجبر المُزارعون في تلك الدول الى شراء البذور مع بداية كل موسم زراعي لكون الثمار المُنتجة من الموسم السابق تنتج بذوراً غير قادرة في الانبات.

دور المُنظمات العالمية في الأغذية المُحورة وراثياً The role of international organizations in genetically engineered plants

تبنت المُنظمة العالمية للمُستهلك الإحتفال باليوم العالمي للمُستهلك في 15 آذار من كل عام بموضوع مُعين، وإختارت منذ عام 2000- 2003 الأغذية المُحورة وراثياً والمخاطر المُحتملة في صحة الإنسان ودور شركات تكنولوجيا المحاصيل المُحورة وراثياً في توطيد سيطرتها على الإنتاج الغذائي العالمي، وإستغلال المعونات الغذائية كأداة لإدخال المحاصيل المُحورة وراثياً في البُلدان النامية.

جمهورية العراق: صدر قانون حماية المُستهلك في العراق رقم (1) لعام 2010.

وضعت بعض القرارات القاضية بتنظيم دخول المُنتجات الزراعية المُحورة وراثياً ورد فيها مايلي:

أولاً : وضع بطاقة على المُنتجات الزراعية المُحورة وراثياً المسموحة من قبل الجهات المُختصة بإستعمال التقانات الأحيائية الحديثة وهي على النحو التالي :-

1- الفواكه والخضار الطازجة والتمور.

2- الحبوب المُستعملة كأعلاف للحيوانات مثل الشعير والذرة والدخن وفول الصويا والتبن والدريس والكُسب بأنواعها.

3- بذور التقاوي.

4- الشتلات الزراعية ونباتات الزينة.

توضح بأن تلك المُنتجات مُحورة وراثياً وبلون مُختلف عن لون البطاقة على أن تكون بيانات البطاقة مكتوبة بخط واضح يسهل قراءته وباللغتين العربية والإنكليزية.

ثانياً: أن تكون المُنتجات المُحورة وراثياً بإستعمال التقانات الأحيائية الحديثة ، المُراد تصديرها إلى البلد المستورد، مُصرح بإستهلاكها وإستهلاكها في البلد المُنتج لها وذلك بموجب شهادة رسمية تؤكد ذلك.

ثالثاً: أن تكون جميع المُنتجات المُحورة وراثياً موافقة للضوابط الشرعية والأخلاقية المرعية في البلد المستورد ومُطابقة للمواصفات القياسية المعتمُدة فيه.

رابعاً: يحظر إستيراد الحيوانات والطيور ومُنتجاتها المُحورة وراثياً بإستعمال التقانات الأحيائية.

الضوابط والإشتراطات المعمول بها في بعض الدول العربية في إستيراد وتدوال وتجارة الأغذية المُحورة وراثياً كالأتي :-

أولاً: وضع بطاقة على المُنتجات الغذائية ألمُحورة وراثياً بإستعمال التقانات الأحيائية الحديثة، توضح ان هذه الأغذية أو بعض مُكوناتها مُعالجة وراثياً، على أن تكون بيانات البطاقة مكتوبة بخط واضح يسهل قراءته وباللغتين العربية والانجليزية ، وبلون مُختلف عن لون البطاقة.

ثانياً: أن تكون المُنتجات الغذائية ألمُحورة وراثياً بإستعمال التقانات الأحيائية الحديثة، المراد تصديرها إلى البلد المستورد، مُصرح بإستهلاكها وإستعمالها في البلد المُنتج لها وذلك بموجب شهادة رسمية تؤكد ذلك.

ثالثاً: أن تكون جميع المُنتجات الغذائية ألمُحورة وراثياً موافقة للضوابط الشرعية والأخلاقية المرعية في البلد المستورد ومُطابقة للمواصفات القياسية المعتمُدة فيه.

رابعاً: حظر إستيراد الأغذية المُصنعة من المُنتجات الحيوانية المُحورة وراثياً بإستعمال التقانات الأحيائية الحديثة.

نص قرار الهيئة الإستشارية لسلامة الغذاء في العراق رقم (128) في 16 /9 / 2002 بخصوص الأغذية المُحورة وراثياً:

* منع دخول الأغذية المُحورة وراثياً وموادها الأولية للعراق من كافة المناشئ في العالم.

* طلب شهادة صحية للمواد الأولية المُستوردة للقطاع الاشتراكي والمُختلط والخاص وموادها الأولية والمواد العلفية تُبين خلوها من وجود التحوير الجيني أو كائنات مُحورة وراثياً، وانها صالحة للإستهلاك البشري وتُستهلك في بلد المنشأ لنفس الغرض.

* العمل على توفير المُستلزمات والأجهزة المُختبرية لغرض الفحص والتحليل لهذه الأغذية لضمان صحتها وسلامتها من التحوير الوراثي.

* مُفاتحة المُنظمات الدولية WHO ,FAO لإمكانية تدريب الملاكات للتخصص في فحص وتحليل الأغذية المُحورة وراثياً.

المُستوى العـالمـي

الولايات المتحدة الأمريكية: لايوجد قانون في الولايات المتحدة الأمريكية يفرق بين الأغذية المُنتجة بالطرائق التقليدية وتلك المُنتجة بوساطة التقانات الأحيائية في حالة عدم الإختلاف الجوهري بينهما أو تُسبب المُنتج الغذائي المُنتج بواسطة التقانات الأحيائية لأية أمراض أُخرى. بل توجد ثلاث هيئات حكومية تقوم بمراقبة إنتاج وتصنيع ونقل وتداول المُنتجات الغذائية ألمُحورة وراثياً وذلك عن طريق :-

* إدارة خدمـات الفحص لصحة الحيوان والنبـات التابع لوزارة الزراعـة الأمريكية (USDA-APHIS) وتتبنى إجراء الفحوصات الصحية للنباتـات والحيوانـات وذلك لمُراقبـة التطوير والفحص الميداني للنباتات المُنتجة حسب الاصول الوراثية، والتـأكد من سلامة وأمان تلك الفحوصات. كما تصدر الرخص اللآزمة والتعليمات الخاصة بشروط إنتقال المُنتجات الزراعية المُحورة وراثياً (كائنات حيوانية او نباتية أو كائنات دقيقة) بين الولايات والإستيراد الى الولايات المتحدة الأمريكية.

* وكالة حماية البيئة (EPA): يأتي دور وكالة حماية البيئة عندما تكون المحاصيل المُحورة وراثياً تحتوي خصائص جديدة مثل مُقاومة الحشرات أو مُبيدات الأعشاب حيث تقوم بدراسة التأثيرات الصحية والبيئية ومدى تأثير تلك المواد في الأغذية والأعلاف، كما تقوم الوكالة بدراسة المُستقبل البيئي وكذلك دراسة التأثيرات غير المُباشرة في أصناف أُخرى (حيوانات برية - حشرات مفيدة - أسماك - طيور - كائنات أُخرى).

* إدارة الأغذية والأدوية الأمريكية FDA: تتبنى مراقبة سلامة الأغذية والأعلاف حيث تشترط على الجهات التي تتولى تطبيق التقانة الأحيائية الزراعية إرسال ما يثبت بأن الأغذية المُحورة وراثياً سليمة تماما

كما هي الأغذية التقليدية والحصول على وثائق تتضمن شرحا عن الجينات التي تم إستعمالها، وفيما اذا كانت ناتجة عن مواد معروف عنها أنها تُسبب الحساسية لدى شريحة من الناس.

الاتحـاد الأوروبـي: صدر قرار الاتحاد الأوروبي رقم 1990/220 الذي يلزم بتوضيح الأغذية المُحورة وراثياً ببطاقة إيضاحية مميزة عن الأغذية التقليدية، كما طور هذا القانون عام 1997 ليشمل إضافةً كافة البيانات الإيضاحية على بطاقة المواد الغذائية. كما صدرالقرار الجديد للاتحاد الأوروبي رقم 2000/49 ليشمل وضع بطاقة تعريفية للأعلاف ألمُحورة وراثياً بصفة إلزامية إبتداء من العام 2003 . أما بالنسبة لمنتجات الحيوانات التي يتم تغذيتها بأعلاف مُحورة وراثياً مثل البيض، اللحوم والألبأن... الخ ، فلايوجد قانون يحكم تنظيم إستيرادها أو تداولها أو إستهلاكها.

استراليا ونيوزلنـدا: طور مكتب الغذاء الاسترالي النيوزلندي (ANZFA) مواصفات قياسية للأغذية المُحورة وراثياً والتي تختلف عن الأغذية التقليدية. بالإضافةً للإشارة إلى بطاقة المواد الغذائية بشكل إجباري بأن هذا المُنتج مُحور وراثياً إذا تجاوز التحوير الوارثي فيه نسبة 1%.

كنـدا: طورت الحكومة الكندية نظام بطاقة المواد الغذائية بحيث تشير البطاقة فيما اذا كانت المادة الغذائية مُحورة وارثياً أم لا. كما قامت بعرض وثيقة لمُنظمة التجارة العالمية (WTO) عن جميع المُنتجات المُحورة وراثياً برقم WT/GC/W/359.

روسيـا: أصدرت السلطات الصحية الروسية قرار بتاريخ 2004/6/2 بأن الأغذية الحاوية على أكثر من 0.9% من المواد المُحورة وراثياً يجب أن تلصق عليها بطاقة توضح ذلك من قبل المُنتجين لهذه النوعية من المُنتجات.

اليـابان: تشترط في بطاقة المواد الغذائية التمييز بين المُنتجات المُحورة وراثياً والمُنتجات الأُخرى، وقد وافقت مؤخراً على إستعمال (44) محصول زراعي مُحور وراثياً في صنع الأغذية.

كوريا: طورت الحكومة الكورية في آذار 2000 بطاقة المواد للأغذية المُحورة وراثياً ودخلت حيز التنفيذ عام 2001.

الهنـد: رفضت الهند مساعدات غذائية أمريكية بقيمة 100 مليون دولار بعد الإشتباه بإحتوائها كميات كبيرة من فول الصويا والذرة المُحورة وراثياً.

الصيـــن: أصدرت الحكومة الصينية قانون للأغذية المُحورة وراثيا ودخل حيز التنفيذ بتاريخ 2002/3/20، حيث يقسم الأغذية المُحورة وراثياً الى ثلاثة أقسام هي :-

- أغذية مُحورة وراثياً لغرض البحث العلمي.
- أغذية مُحورة وراثياً لغرض الإنتاج.
- أغذية مُحورة وراثياً لغرض إستعمالها كمواد خام.

الفصل الرابع عشر: الزراعة الجزيئية وإنتاج اللُقاحات المأكولة

Molecular Farming and Edible Vaccines

مقدمة Introduction

أُقترحت في السنوات الأخيرة النباتات كبدائل جذابة لإنتاج البروتينات العلاجية والتحصين من الأمراض مقارنةً بأنظمة إنتاج اللقاحات التقليدية مثل زراعة الخلايا الحيوانية. يتميز إنتاج البروتينات المؤشبة (Recombinant proteins) في النباتات بفوائد جمة منها؛ (أ) أكثر إقتصاديةً من أنظمة التعبير التقليدية، (ب) يتم تحوير البروتينات في مرحلة ما بعد الترجمة (Post-translationally modified) بطريقة مشابهة لما يجري في أنظمة الحيوانات اللبونة، (ج) توفر النباتات إمكانية التعبير عن البروتينات في أعضائها المختلفة وداخل عضيات الخلية مما يسمح في أمثلة (Optimization) تراكم البروتينات، (د) إمكانية زيادة تراكم المُنتج المؤشب لمستويات الإنتاج الصناعي، (ه) عدم وجود مخاطر للتلوث من المسببات المرضية الحيوانية، (و) توفر فرصة إنتاج اللقاحات المأكولة.

يُمكن أن يتم تعبير البروتينات الغريبة داخل النبات بالتحوير الوراثي إما بشكل مؤقت (Transient) أو ثابت (Stable). طُورت تقانات تهدف الى التحوير الوراثي الثابت لتشمل التحول الوراثي في نواة الخلية (Nuclear) وكذلك للبلاستيدة. من جانب آخر يتم التحوير الوراثي المؤقت بوساطة بكتريا الأكروبكتريوم وإستعمال النواقل الفيروسية.

التحوير الوراثي على مستوى النواة Nuclear genetic modification

تُعد التقانة الأكثر شيوعاً في إنتاج اللقاحات داخل النباتات وتشتمل على إيلاج الجينات المطلوب تعبيرها في المجين النووي داخل أنواع نباتية مُنتخبة. تُتبع حالياً طريقتان في التحول الوراثي للنواة تستند اولهما على توسط بكتريا الأكروبكتريوم في نقل الجين المطلوب وخصوصاً الى نباتات ذوات الفلقتين (Dicots) مثل التبغ والبزاليا. والثانية تستند في نقل الجين على تقانة المقذوفات الدقيقة وخاصة داخل نباتات ذوات الفلقة الواحدة (Monocots) مثل الحنطة، الرز والذرة. ولغرض تحقيق أعلى إنتاج من البروتين المرغوب، يجب أمثلة النظم التعبيرية (Expression constructs) فيتم الوصول الى أعلى حالات الإستنساخ وذلك بإختيار محفز قوي لهذا الغرض (جدول 1.14). يُفضل في الغالب فيروس موزائيك القرنابيط (CaMV 35S) كمحفز في نباتات ذوات الفلقتين في الوقت الذي يستعمل يوبيكيوتين الذرة (Maize ubiquitin) كمحفز

لنباتات ذوات الفلقتين فوجود الأنترونات (Introns) في تلك التعاقبات يزيد من معدل الإستنساخ. تستعمل حالياً محفزات تنظيمية (Regulated promtors) لتكون متخصصة في نسيج نباتي محدد وبذلك يمكن تلافي حصول تعبير البروتين في الأنسجة الخضراء والتي قد تؤثر في معايير نمو النبات. يسمح إستعمال المحفزات التحفيزية (Inducible promoters) في التعبير عن البروتينات المؤشبة مجموعة من النباتات التي يحصل فيها تعبير عالي من البروتينات غير الناضجة (Premature protein overexpression) والذي غالباً مايكون مثبطاً لنمو النبات. بإمكان القارئ مراجعة الكتب التخصصية للإطلاع على تفاصيل هندسة البروتينات ومنها Plant Biotechnology, by Nigel Halford.

جدول 14.1. مستويات عالية جداً من التعبير لبروتينات مؤشبة منتجة داخل النباتات بوساطة التحوير الوراثي النووي

البروتين	**شريط التعبير Expression cassette))**	**الإنتاج (mg/g) و % نسبة البروتينات الذائبة الكلية**
Phytase	35S	14.4%
ScFV	Arc5-1	36.5%
β- Glucuronidase	rbcS1	10%
Lactoferrin	Gt1	5.0
Lysozyme	Gt1	5.0 (45%)
Lysozyme	Puroindoline, Gt1	5.2-9.2
Cellulase 1	Globulin 1	16%
Cellobiohydrolase 1	Globulin 1	16%

التحول الوراثي للبلاستيدات الخضراء Genetic transformation of chloroplasts

الكلوروبلاست أحد عضيات الخلايا النباتية والطحالب حقيقية النواة الذي يُدعى بالبلاستيدة. وهو الموقع الذي يحصل فيه التركيب الضوئي والمصدر لإنتاجية الغذاء الرئيسي في العالم. يتحرر الأوكسجين داخل البلاستيدة ويتحرر الكربون وينتج النشاء وتُصنع الأحماض الأمينية والدهنية وتتكون الصبغات

والبلاستيدة موقع أيض النتروجين والكبريت. البلاستيدات عضيات خلوية جينومها بحجم kb 150-120 وبأعداد تتراوح من 1000 الى 10000 نُسخة في الخلية الواحدة. وبالنظر للمزايا أعلاه، أصبح التحوير الوراثي للكلوروبلاست بديلا أو مُكملا للتحوير الوراثي للنواة بالنظر للمزايا التي يوفرها كالمُستويات العالية للبروتين، إمكانية التعبير عن بروتينات مُتُعددة من الرنا المُراسل (Polycistronic mRNAs) وكذلك إمكانية إحتواء أو السيطرة على إنتشار الجينات من نباتات محورة وراثياً الى نباتات أُخرى لعدم عبور حبوب اللُقاح منها (Lack of pollen transmission). وبالنظر لوجود دنا البلاستيدات (ptDNA) في نُسخ متُعددة، لذلك فمن المُهم إستعمال جينات تعليم مُنتخبة (Selectable marker genes) لتحقيق تحول وراثي مُتجانس في كافة نسخ مجين البلاستيدة بعزل تدريجي للبلاستيدات غير المُحولة وراثياً بعد تنميتها في وسط إنتخابي (Selective medium). أُستعمل أول جين تعليم إنتخابي في التحول الوراثي للكلوروبلاست جين Plastid rRNA (*rrn16*) وتم إنتخاب الخطوط المُحورة وراثياً في وسط إنتخابي يحتوي المُضاد الحيوي السبكتينومأيسين (Spectinomycin) ولكن كفاءة هذا الجين كانت مُنخفضة في الحصول على خطوط مُقاومة للمُضاد الحيوي. ولكن إجراء التحول الوراثي بإستعمال جين *aadA* حسّن كثيرا من أعداد البلاستيدات المُحورة وراثياً لحدود معقولة وصلت الى خط واحد (Transplastomic line) في كل إنموذج ورقة تم إطلاق مقذوفة دنا عليه (Bombarded leaf sample). جرت بعدها العديد من المُحاولات أدت عموماً الى تحسين التحول الوراثي في البلاستيدات.

يُمكن إجراء التحول الوراثي للبلاستيدات حيث تم نقل الجينات المرغوبة الى مجين البلاستيدة بطريقة التأشب المُتشابه أي إعادة إرتباط متماثل (Homologous recombination) مما يمنع التغاير في التعبير والذي غالبا ما يحصل عند التحول الوراثي لنواة الخلية. إضافةً الى عدم ملاحظة حصول إخماد جيني (gene silencing) في النباتات التي حُورت فيها بلاستيداتها وراثياً. تكون مُستويات التعبير الجيني في الكلوروبلاست عالية جداً بالنظر لوجود ما يزيد عن 10000 نسخة من الجين المنقول في كل خلية تم تحويرها وراثياً. ومن المعلوم ان الأوراق يُمكن حصادها عدة مرات خلال دورة نمو النبات وليس كما هو الحال في البذور التي تُحصد مرة واحدة نهايةَ الموسم والأمثلة كثيرة فنباتي التبغ والجت يُعطيان حاصلاً سنوياً قد يصل الى 300 طن للهكتار الواحد. وبسبب توريث جينات البلاستيدات ولأغلب النباتات يكون من الام وليس من الأب الحامل لحبوب اللُقاح، لذلك فالخطر البيئي نتيجة تسرب الجين المنقول من خلال حبوب اللُقاح الى نباتات أُخرى يكون في حده الأدنى. وبالرغم من أن أغلب الدراسات في هذا الصدد قد اجريت على نبات التبغ الا أن ذلك لم يستثني نباتات أُخرى وخاصة محصول الخس لانه يُستهلك طازجاً

ويُمكن إستخلاص وتنقية البروتين المُعبر عنه ومن ثم إستعماله كمادة طبية مأكولة. في الواقع يتشابه التعبير الجيني في البلاستيدات عما هو عليه في خلايا البكتريا وبنفس المُحددات. يبدأ البروتين المُعبر عنه بالمثيونين ولكن البروتينات المُنتجة بالبلاستيدات غير مُرتبطة بالكلوكوز (Not glycosylated) مما يُقلل من قيمتها الدوائية لكون أغلب المواد الصيدلانية المُنتجة في الوقت الحاضر عبارة عن بروتينات مُرتبطة بالكلوكوز (Glycosylated proteins). اشتق أول مُضاد جين من الكلوروبلاست وبرهن فعاليته المناعية في دراسات على حيوانات مُختبرية كان وحدة ثانوية من لُقاح ضد مرض الكزاز المُتسبب عن *Clostridium tetani* اذ حصل تعبيرلجزء TetC من توكسين المُسبب المرضي في النباتات التي حُورت فيها البلاستيدات (Transplastomic plants).

وكانت المادة كفوءة مناعياً وحمت الفئران من الإصابة بمرض الكزاز. ووردت في المصادر العديد من البحوث التي اكدت حصول تعبير مناعي عالي لمُضادات الجين في النباتات التي حور فيها الكلوروبلاست ومُقاومتها لأنواع من البكتريا والبروتوزوا المُسببةً للعديد من الأمراض أهمها؛ *Bacillus anthracis*، *Borrelia burgdorferi*، *Vibrio cholera*، *Yersinia pestis*، *Entamoeba histolytica*. ولايقتصر ذلك في البكتريا بل أكدت دراسات عديدة في حصول تعبير عالي لمُضادات جينات معزولة من فيروسات على شكل وحدات ثانوية أو في شكل جُزيئات تشبه الفيروسات. ومن الإكتشافات المُدهشة في هذا الصدد، تطوير نباتات حُورَ فيها الكلوروبلاست وأظهرت تعبيرا عاليا لبروتينات ضد بكتيرية (Antibacterial proteins) مثل Bacteriophage lysins السامة للبكتريا والتي من الصعب إنتاجها بطرائق التخمر البكتيري المعروفة.

هندسة البلاستيدات الخضراء Plastid genetic engineering

طُورت تقانات إدخال جينات غريبة الى مجين البلاستيدات وأُنتجت نباتات بلاستيداتها محورة وراثياً (Transplastomic plants). تُوفر التقانة ميزتان مهمتان أولهما؛ حصول تعبير عالي جداً بالمظر لإحتواء الخلية النباتية على نُسخ متعددة (10000 في خلايا التبغ في سبيل المثال) في جينوم البلاستيدة. ينتج عن ذلك زيادة في تعبير البروتينات يصل الى 47% من كمية البروتينات الكلية الذائبة. وثانيهما؛ أن جينوم البلاستيدة يورث من النبات الام (Maternally)، وبذلك لاتحتوي حبوب اللقاح على دنا منقول مما يمنع من إنتشار الجين المنقول الى البيئة وبالتالي تقليل فرصة حصول تلوث أي تلقيح النباتات الاخرى بحبوب لقاح تحتوي على الجين المنقول. ولكون إيلاج الجين الغريب في موقع مُعين قد سبق تحديده في جينوم البلاستيدة، لذلك

لايظهر تأثير الموقع (Position effect) في الوقت الذي يلاحظ مثل هذا التاثير عند نقل الجين الى النواة. يؤدي ذلك بالنتيجة الى تعبير منتظم في خطوط الخلايا المحورة وراثياً والذي يُعد ميزة ثالثة لنقل الدنا الى اللاستيدة. إضافةً الى ما سبق، فان ظاهرة خمود الجين التي تظهر عند نقل جين الى النواة (Gene silencing)، لاتحصل تلك الظاهرة في النباتات التي يتم نقل جين غريب الى بلاستيداتها.

لاتخلو هندسة البلاستيدة من بعض العيوب منها حاجتها الى وقت طويل مقارنة بهندسة النواة وحاليا العملية محصورة في أنواع نباتية محددة ولكن العدد مرشح للزيادة. وهناك حقيقة مهمة وتُعد أحد عيوب هندسة البلاستيدة وهي عدم حصول إرتباط السكريات بالبروتينات (Glycosylation of proteins) في البلاستيدات، لذلك لا يمكن الإعتماد على تقانة نقل الجين الى البلاستيدة لغرض إنتاج البروتين لأن إنتاج الأخير يعتمد على إرتباطه بالسكريات لغرض فعاليته وثباتيته، ما لم يتم معالجة الحالة. أُستعملت طريقة إيلاج الدنا بطريقة المقذوفات البايولوجية (Biolistic) الى جينوم البلاستيدة في العديد من المختبرات وحصل تقدم ملموس في هذا المجال.

التعبير الوقتي بوساطة الأكروبكتيريوم Transient expression via *Agrobactrium*

تشتمل الطريقة على وضع أوراق النبات في مُعلق من خلايا بكتريا التعقد التاجي (*A. tumefaciens*) حاملة لقطعة الدنا المرغوب (Construct). يتم ذلك بإيلاج البكتريا المؤشبة (Recombinant) داخل أنسجة الورقة بمساعدة التفريغ الهوائي. ينتج من ذلك نسخ متعددة من قطعة الدنا داخل الخلايا حيث حالما تدخل البكتريا الى الخلايا تقوم بروتينات البكتريا بنقل الجين المرغوب الى خلايا المضيف كما سيرد لاحقاً. من المعلوم ان الدنا المنقول (T-DNA) لا يلج في كروموسوم المضيف ولكنه يتواجد داخل النواة ويتناسخ مؤدياً الى حصول تعبير مؤقت (عابر) في الجين المرغوب.

التحوير الوراثي العابر بوساطة النواقل الفيروسية Transient genetic modification via viral vectors

وتشتمل على فكرة بديلة لما سبق حيث يحصل تعبير مؤقت بإستعمال نواقل فيروسية. يتكاثر مجين الفيروس في هذه الحالة داخل الخلايا المصابة مسبباً في حصول تعبير بروتيني عالي جداً داخل الخلية النباتية (جدول 14.3). وبالنظر لصغر مجينات الفيروسات لذلك تمتاز بقابليتها العالية على التضاعف وبساطة طريقة الإصابة مقارنةً بالتحول الوراثي. لكن يؤخذ على طريقة النواقل الفيروسية أهمها عدم توريث الجين

الغريب، محدودية تتابعاته وصغر حجمه مع وجود توجسات من إنتشار الفيروسات المحورة وراثياً الى البيئة.

جدول 14.2. مستويات عالية جداً من التعبير لبروتينات مؤشبة منتجة داخل النباتات بوساطة التحوير الوراثي للبلاستيدات

البروتين	الإنتاج (% نسبة البروتينات الذائبة الكلية)
Tetanus toxin C fragment	25%
Canine parvovirus CTB-2L21	31%
Bacillus anthracis pagG	4.5-14%
Interferon α 2b	8-21%
Human papilloma L1	20-26%
HIV-1 p24 antigen	0.45%
Yersin pestis V-F1 antigen	14.8%
Lysin PlyGBS	>%70
Lysin Pal	30%
Lysin Cp-1	10%
Insulin-like growth factor	32%

جدول 14.3. بروتينات تم تعبيرها بوساطة نواقل فيروسية

البروتين	شريط التعبير (Expression cassette)	الإنتاج
HPV antigen L1	35S	0.5
Plasmodium PyMSP4/5 antigen	TMV	2.0

0.8	TMV	Norwal virus CP
1.6	35S	GFP
0.3	35S	IgG HT-2G12
0.5	CMV	GFP
0.4	AMV/CMV	GFV
0.8	BeYDV	Hepatitis B core antigen
0.3	BeYDV	Norwalk CP antigen
1.0	TMV	Griffithsin
0.4- 1.5	Plastocyanin	Murine IgG C5-1
0.5	BeYDV	Human IgG
0.3-0.5	TMV	G-CSF, GM-CSF
0.3-1.0	TMV	Aprotinin
0.5- 4.8	TMV/PVX	Non-Hodgkins lymphoma twenty different IgG
5.0	TMV	Mini-insulin
5.0	TMV	Human interferonα
5%	TMV	α-amyase
0.5	TMV	Non-Hodgkins lymphoma ScFv
2.5-4.0	TMV	GFP
1.0	TMV	Human somatotropin
0.5	TMV/PVX	IgG1, Mab A5
2-3	TMV	TMV CP-Protein A
1-2	TMV	Yersin pestis F1, V, F1-V
2.4	TMV	Hepatitis B core antigen

5.5	TMV	GFP
5.0	TMV	At adenosine kinase
0.8	TMV	Tuberculosis ESAT6 antigen

النباتات: معامل للأدوية واللُقاحات Plants: source for drugs and vaccines

تُستعمل اللُقاحات في كافة دول العالم وسببت في خفض نسبة الوفيات التي تُسببها الإصابات الجرثومية المُختلفة بنسبة كبيرة. ويُعد إستعمال النباتات التي تؤكل لتقوم بدور اللُقاحات وهي ما يُطلق عليها Edible vaccines فعالاً وآمن وبديلاً عن اللُقاحات التقليدية في السيطرة على أنواع مُختلفة من الأمراض. ولغرض الحصول على لُقاح ماكول، يُنتخب الجين المطلوب ويُدخل الى النبات ليقوم الأخير بتصنيع البروتينات المُشفرة لذلك النوع من اللُقاح ليؤدي وظيفة مناعية جهازية تُعطى المناعة المطلوبة لجسم الكائن الحي. وبغض النظر عن طريقة إستهلاك اللُقاحات المأكولة، فانها جميعا تشترك بهدف مُشترك في تحصين الجسم ضد العوامل الإمراضية أو المُسببات المرضية قبل ان تتضاعف بكميات كافية لتُسبب الأعراض المرضية. ومن المعلوم أن الطرائق التقليدية في التحصين تتم بتعريض الجهاز المناعي لبكتريا أو فيروسات مقتولة أو ضعيفة جداً. عند تحسس الجهاز المناعي لأي كائن حي غريب في اللُقاح، يتصرف وكأن الجسم تحت الهجوم ويُحرك كل قِواه من أجل إستئصال وتدمير المُهاجم بعد إستهداف الجين المُضادات والتي يُميزها الجهاز المناعي كبروتينات غريبة دخلت الجسم. في الواقع يحصل إخماد سريع في الإستجابة ولكنها تترك خلفها حارسا أو رقيبا في ذاكرة الخلايا يبقى على أتم الإستعداد عند دخول المُسبب المرضي الى الجسم مُستقبلاً. تزود بعض المصول واللُقاحات حمايةً للجسم مدى الحياة والقسم الآخر يتلاشى أثرها بعد مُدة من الزمن مثل لُقاح الكوليرا ولُقاح الكزاز مما يستوجب التحصين الدوري.

تمتلك اللُقاحات التقليدية مخاطر قليلة نسبياً أهمها ان الكائنات الحية ألمُحصن بها قد تعيش داخل الجسم مُسببةً أمراضاً كان من المُفترض التخلص منها. ومن هذا الجانب، تُفضل شركات صناعة اللُقاحات اليوم نوع آخر من اللُقاحات يدعى بتحضيرات الوحدات الثانوية (Subunit preparations) تتكون بشكل رئيس من بروتينات ضد الجينية (Antigenic proteins) تم إكتشافها من جينات المُسبب المرضي وبهذا فلا تتوفر أيةَ فرصة لحدوث الإصابة. يُعاب على لُقاحات الوحدات الثانوية كُلفتها العالية لكونها تصنع من مزارع بكتيرية أو خلايا حيوانية وان تكون في درجة عالية من النقاوة إضافةً الى حاجتها الى التجميد. تشبه

اللُقاحات المأكولة والتي هي موضوع فصلنا هذا تحضيرات الوحدات الثانوية من حيث هندستها وراثياً لتحتوي على المُضاد الجيني ولا تحتوي الكائن المُسبب للمرض. وكلاهما آمناً عند الإستعمال ولكن كان لابُد من إثارة مجموعة من الأسئلة قبل البدء بإنتاج اللُقاحات المأكولة منها هل النباتات المُحورة وراثياً الحاوية جينات الجين المُضاد ستنتج نُسخ فعالة من البروتين المقصود؟ وهل سيتلف الجين المُضاد المنقول الى الغذاء النباتي عندما تستهلكه الحيونات أو الإنسان وهل سيتحلل في المعدة قبل أن يؤدي دوره؟ مُقارنةً مع تحضيرات الوحدات الثانوية والتي تُعطى كحُقنة تجنباً لتلفها. وكذلك فيما اذا أنتجت الجين المُضاد هل ستجلب إنتباه الجهاز المناعي وهل ستكون إستجابة الأخير كافية لحد حمايةَ الإنسان أو الحيوان من الإصابة بالمرض ألمُحصن ضده؟ إضافةً الى ذلك على الباحثين معرفة فيما إذا يظهر تاثير اللُقاح المأكول في الجهاز المناعي المخاطي (Mucosal immunity) لكون العديد من المُسببات المرضية تدخل الجسم من فتحات الأنف والفم وأعضاء التكاثر وغيرها.

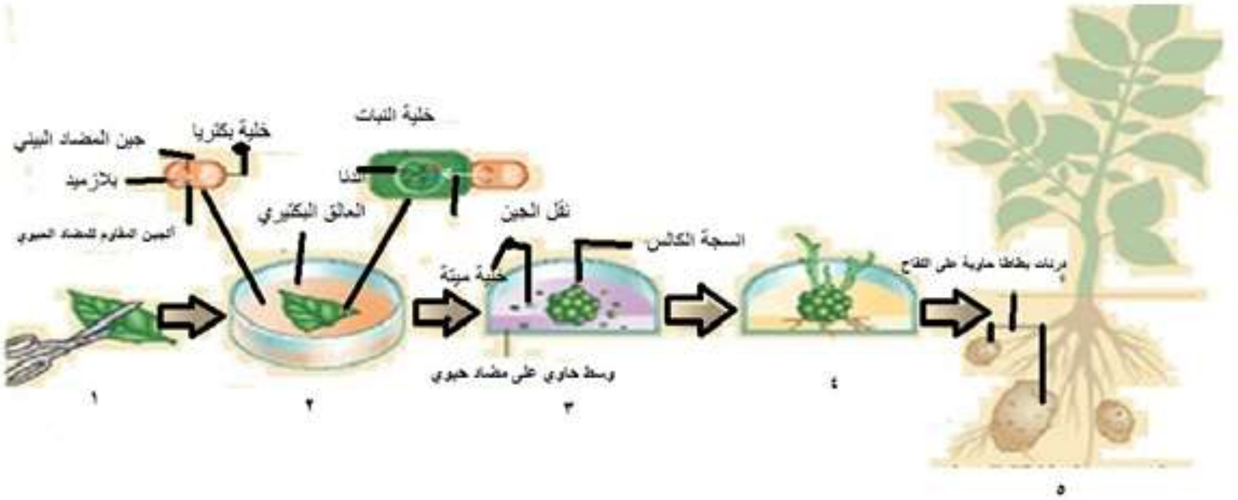
عندما تكون إستجابة الجهاز المناعي المخاطي فعالة تتولد جُزيئات تُعرف بمُضادات الأجسام الإفرازية (Secretory antibodies) تنطلق الى فجوات تلك الفتحات لتقاوم هجوم الكائنات المرضية التي تجدها وقد يحصل تفاعل مُؤثر يُنشط الجهاز المناعي في خلايا الجسم وبالتالي يقتل المُسبب المرضي المُهاجم. والمعلوم ان اللُقاحات المحقونة بالعضلات تتحاشى الأغشية المخاطية وتكون الإستجابة المناعية للأخيرة ضعيفة بينما تتلامس اللُقاحات المأكولة مع الجدر الداخلية للجهاز الهضمي لذلك يُفترض ان تقوم بتنشيط كلاً من إستجابة الأغشية المُخاطية والمناعة الجهازية (Systemic immunity).

من المُفترض ان يوفر ذلك التاثير الثُنائي حمايةَ ضد الأحياء المجهرية الخطرة وخاصة تلك المُسببةً لأمراض الإسهال مما حدى بالباحثين ان تكون الأولية في بحوثهم تنصب في مُكافحة مُسببات الإسهال أولاً ومن ثم مُسببات الأمراض الأُخرى خاصة فيروس Norwalk، Rotavirus، وبكتريا *Vibrio cholerae* (المُسبب لمرض الكوليرا) وضد بكتريا القولون *E. coli* الفارزة لسموم داخلية مُسببةً ما يُسمى بمرض إسهال المسافرين والتي تؤدي الى وفاة ما يُقارب من ثلاثة ملايين طفل سنوياً في دول العالم الثالث. وفي الواقع بدأت الأفكار تتوارد لدى العديد من الباحثين منذ عام 1995 فتم على سبيل المثال عزل جين مُشفر للبروتين من فيروس إلتهاب الكبد الفيروسي نوع B (المُسبب لتلف الكبد وسرطان الكبد) ونقله الى نبات التبغ مما حفز الأخير على تصنيع البروتين. وبعد حقن الجين المُضاد في الفئران، نشط الجهاز المناعي فيها بمقدار ما يحصل عند إصابة الأخيرة بالفيروس أعلاه. بموجب إحصائيات مُنظمة الصحة العالمية (WHO)، فان

ما يُقارب من 80% من الحالات المرضية البشرية تُعزى الى إنتشار الأمراض المُختلفة مُسببةً في موت حوالي 20 مليون شخص سنوياً.

طريقة تحضير اللُقاح المأكول Preparation of edible vaccine

تعتمد أحد أهم الطرائق المعتمُدة في إنتاج اللُقاح المأكول على بكتريا الاكروبكتريوم (*Agrobacterium tumefaciens*) كناقل (وسيط) في نقل المادة الوراثية (بروتينات الجين المُضاد) من فيروس أو بكتريا أُخرى الى النبات الهدف والذي يتجسد بالإستجابة المناعية لدى الكائن الحي بعد إستهلاكه لمقادير محسوبة من النبات (شكل 14.1). كما يُمكن إدخال الدنا المرغوب الى مجين النبات بالطرائق المُباشرة التي تم ذكرها سابقاً في هندسة النبات وراثياً ولربماً من الأسهل إستعمال طريقة المقذوفات (Bombardment) بوساطة مُسدس قذف الجين (Gene gun) بعد إطلاقها في مزارع المُعلقات الخلوية الجنينية (Embryonic cell suspension cultures) لكونها تخصصت الى أجنة ومن السهل نشوئها الى نبات كامل حاملاً للجين المرغوب. وبغض النظر عن طريقة تحوير النبات، فالدنا المرغوب يتواشج عشوائيا مع مجين النبات مُنتجاً مُستويات مُختلفة من تعبير الجين المُضاد ومُختلفا من نبات لآخر. وبذلك يفضل تحوير 50-100 نبات في نفس الوقت ويُعد كل نبات خط مُنفصل، ويتم من هذا العدد إنتخاب الخط (النبات) الأكثر تعبيرا للجين المُضاد مع أقل التأثيرات السلبية في الجسم. ويُمكن تلخيص طريقة إنتاج اللُقاح المأكول بخمس خطوات (شكل 14.1) وهي مُشابهة للطرائق المتبعة عند هندسة أي نبات وراثياً:



شكل 14.1. خطوات إنتاج اللُقاح المأكول بالإعتماد على بكتريا الاكروبكتريوم كوسيط لنقل مُضاد الجين من الكائن الدقيق الى مجين نبات البطاطا ليُظهر تعبيره في درناتها.

1- تُفصل أوراق نباتية (أوراق من نبات البطاطا مثلاً) بحالة صحية جيدة وتُعقم سطحيا وتُقطع الى أجزاء نباتية (Explants) وكلما زادت مساحات حافات القطع كلما زادت الفُرصة في إصابتها بالبكتريا الحاملة للجين المطلوب وبالتالي نجاح عملية التحول الوراثي.

2- تعريض الأجزاء النباتية للبكتريا الحاملة لجين الجين المُضاد وجين المُقاومة للمُضادات الحيوية في وسط زرعي مُناسب مما يسمح للبكتريا الحاملة للجينين بتسليمهما اي إيلاجها في المادة الوراثية للخلية النباتية.

3- تعريض الخلايا النباتية الى المُضاد الحيوي لقتل الخلايا غير الحاملة للجينات الجديدة ونقل الخلايا النباتية والحاوية على الجينات الجديدة الى وسط غذائي مُناسب لتحفيز نشوء الكالس وزيادة حجمه الى مقدار يسمح بإخلاف نباتات منه.

4- تُنقل كتلة الكالس الى وسط الإخلاف لتكوين أفرع جاهزة لنشوء الجذور منها وتُفصل النُبيتات المُتكونة لغرض أقلمتها.

5- تؤقلم النُبيتات وتُنقل الى التربة وبعد 3 أشهرتُنتج نباتات حاملة للُقاح الجين المُضاد ويظهر تعبيره الجيني في درنات البطاطا والتي يُمكن إستهلاكها بإعتبارها لُقاحاً ماكولاً.

نجح العُلماء في تعبير مصل الألبومين البشري وراثياً كأول بروتين كامل عام 1995 في نباتي التبغ والبطاطا المُعدلين وراثياً. وبعد سنوات من العمل الرائد في هذا المجال سُوِقَ نوعان من الأدوية المُشتقة من النباتات (Plant derived pharmaceuticals) وإختصاراً تدعى PDPs واحياناً بالمواد الصيدلانية المُصنعة من قبل النبات المسماة Plant made pharmaceuticals وإختصاراً (PMPs) الأول في كوبا والآخر في الولايات المتحدة. وفي عام 2009 سُوقت مجموعة من المُركبات الصيدلانية المُنتجة من النباتات وهناك العديد منها في المراحل النهائية لإقرار المُوافقات وإدخالها في السوق العالمية لمُعالجة الأمراض المُبينة في جدول (14.3).

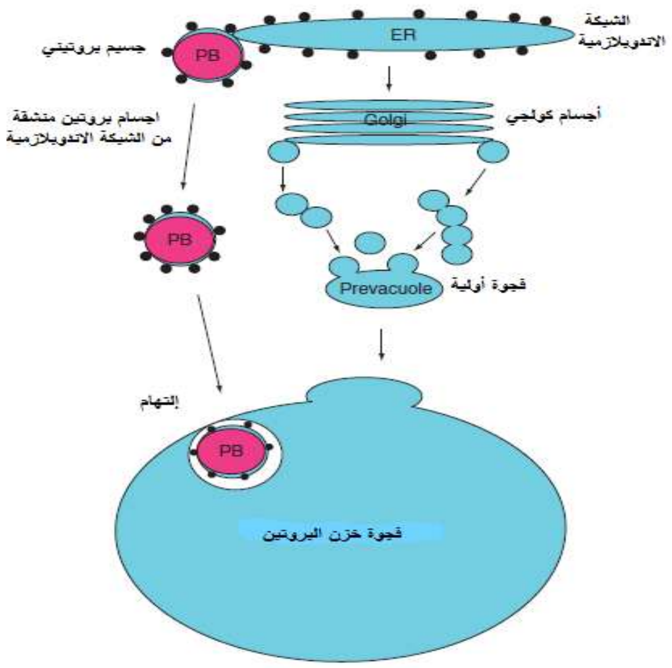
جدول. 14.3 مواد صيدلانية مُشتقة من نباتات وثبُت نجاحها في علاج الأمراض البشرية

المحصول	المرض المراد معالجته	التعبير الجيني	المنتوج
نواقل فيروسية في التبغ	Non-Hodgkin's lymphoma	مُضاد الجسم	اجزاء من مُضاد الجسم بسلاسل منفردة ومتنوعة
تبغ مُحور وراثياً	تسوس الاسنان	مُضاد الجسم	CaroRx
ذرة صفراء ودرنات بطاطا مُحورة وراثياً	الإسهال	لُقاح	سموم *E.coli* ثابتة حرارياً
ذرة صفراء مُحورة وراثياً	Cystic fibrosis, pancreatitis	إنزيم علاجي	Gastric lipase
بطاطا وخس مُحوران وراثياً	إلتهاب الكبد الفيروسي نوع B	لُقاح	Hepatitis B virus surface antigen
الأربدوبسس مُحور وراثياً	نُقص فيتامين B12	غذائي	Human intrinsic factor
ذرة صفراء مُحورة وراثياً	الإلتهابات المعوية	غذائي	Lactoferrin
بطاطا مُحورة وراثياً	Norwalk فيروس	لُقاح	Norwalk virus capsid protein
عصفر مُحور وراثياً	السُكري	هرمون	Insulin
رز مُحور وراثياً	الإسهال	غذائي	Lysozyme,Lactoferrin Human serum albumin

البروتينات العلاجية Therapeutic proteins

البروتينات عبارة عن جُزيئات كبيرة مُكونة من سلاسل طويلة بوحدات أصغر (Subunits) تُدعى الأحماض الأمينية وتلعب دوراً حيوياً في حياة الخلية وتُستعمل على نطاق واسع في مجالات البحوث

والدواء وفي التشخيص إضافةً الى إستعمالها كعلاج وكوقايةً من الأمراض. تتكون البروتينات في الشبكة الإندوبلازمية وتتراكم على سطحها (شكل 14.2) أو على أسطح الفجوات الأولية. وقد تنشق منها لِتلتهمها الفجوات الخازنة للبروتين. وبالنظر لتلك الأهمية فالعديد من الأدوية واللُقاحات هي بروتينات أو من مُشتقاتها لتشمل مُضادات الأجسام وبروتينات البكتريا أو الفيروسات (التي غالبا ما تُستعمل كلُقاحات) وكذلك البروتينات البشرية (مثل الأنسولين). أصبحت البروتينات العلاجية تُصنع في مُختبرات التقانات الأحيائية وفي معامل الأدوية. ولابُد من التركيز في أهمية الإنتاج الواسع من البروتينات العلاجية وبكُلف مُنخفضة لتصبح في مُتناول الطبقات الفقيرة من المُجتمعات.



شكل 14.2. مُخطط يوضح إلتهام الأجسام البروتينية من قبل فجوة خازنة للبروتين بعد تكتلها على الشبكة الإندوبلازمية أو الفجوات الأولية. بعد تكون الأجسام البروتينية إما تبقى مُلتصقة بالشبكة الإندوبلازمية أو تنفصل لكي تُلتهم من قبل الفجوات أو تتراكم في السايتوبلازم.

قدرت مُنظمة الصحة العالمية في تقريرها لعام 2010 بان مايقارب من مليوني طفل تحت سن الخامسة تم إبعاد عنهم خطر الموت من جراء عملية التحصين الروتيني. وقدر نفس التقرير بأن ما يقارب من 347

مليون شخص مُصابون بمرض السُكري وأعداد الوفيات المُرتبطة بهذا المرض والأمراض الناجمة عنه في حالة إزدياد مُضطرد في أنحاء العالم أثناء العقدين القادمين مما يُعزز من الطلب المُتزايد لعقار الأنسولين.

العقارات المُصنعة من قبل النبات Plant –made pharmaceuticals (PMPs)

أُستعمل نبات التبغ المُعدل وراثياً بشكل واسع في العديد من الدراسات كنبات مُنتج للبروتينات كونه يكوّن كتلة حيوية كبيرة ويُحصد بسهولة وبسرعة إضافةً الى كونه نبات إنموذج (Model) في دراسات البايولوجي الجزيئي وسهولة زراعة خلاياه نسيجيا وأهم من ذلك كله فانه لا يُستعمل كغذاء للإنسان ولا للحيوان مما يجعل منه أقل خطرا عند تُعديله وراثياً اذ لا يُلوث الغذاء. أُستعمل نبات التبغ في كوبا تجاريا لإنتاج مُضاد أجسام ضد إلتهاب الكبد الفيروسي (Hepatitis) نوع B2. وبجانب هذا النبات الورقي، أُستثمرت نباتات ورقية أُخرى كالخس والجت لنفس الغرض. تُحصد النباتات الورقية وتدخل المصنع مُباشرةً لغرض إنتاج البروتينات بسبب سُرعة تلف الأخيرة. ولتجنب التلف السريع لهكذا نوع من النباتات ذات العُمر التسويقي القصير، أُستعملت حبوب المحاصيل الحقلية كبذور الرز والحنطة والشعير والذرة الصفراء لإنتاج PDPS. فقد انتجت من بذور الذرة الصفراء وبنجاح وسُوِق تجاريا مادة الأفيدين (Avidin) التركيبية وإنزيم b – glucuronidase إضافةً الى إنزيم التربسين من قبل شركة Prodi Gene Inc في الولايات المتحدة الأمريكية.

ومع التقدم الحاصل في العلوم الطبية والزراعية والصيدلانية، أنتجت الشركات ومن مُختلف دول العالم لُقاحات من البطاطا، الطماطم ، المــوز، الخس، الجت، السبانغ، البرسيم الأبيض، ونبات الأربدوبسس اذ استعملت الــنباتات السابقة كمُضــيف لإنتاج اللُقاحات. كما حصل تقدم كبير في إستعمال الأنواع النباتية سهلة التداول مُختبريا لهذا الغرض أمثلة نبات الليمنا *Physcomitrella patens* ونوع من طحلب الكلاميدوموناس *Chlamydomonas reinhardtii*. وعموماً فلكل نبات مزاياه وعيوبه فيما اذا أُستعمل كلُقاح مأكول.

التبغ الفوائد:

- إنموذج جيد لتقويم البروتينات المؤشبة (Recombinant proteins).
- يُمكن المحافظة على النبات بكُلفة مُنخفضة إذ يُعطي النبات كميات كبيرة من البذور
- ويُمكن خزنها لفترة طويلة.

- سهولة تنقية مُضادات الأجسام من البذور.
- يُعطي كتلة حيوية كبيرة ويُحصد عدة مرات في السنة.

العيوب: ينتج مُركبات سامة.

البطاطا الفوائد:

- أكثر المحاصيل المُستعملة في التجارب المختبرية.
- سهولة التعامل مع النبات وسهولة تحويره الوراثي.
- سهولة إكثاره بالبراعم والتقاوي.
- سهولة خزنه لفترات طويلة مع إحتياجات تبريد قليلة.

العيوب: يحتاج الى طبخ وقد يؤدي الى تلف الجين المُضاد وتقليل قابليته في التحصين.

الموز الفوائد:

- لا يحتاج الى طبخ وبروتيناته لا تتلف حتى عند الطبخ.
- رخيص نسبياً ويزرع في الدول الفقيرة.

العيوب:

- تحتاج الشجرة 2-3 سنة لكي تصل مرحلة النُضج.
- تحتاج الأشجار المُحورة وراثياً الى حوالي 12 شهراً لكي تحمل ثماراً.
- يتلف الحاصل بسرعة بعد الحصاد.
- *يحتوي كميات قليلة من البروتين ولذلك فمن الصعب إنتاج كميات كبيرة من البروتينات المؤشبة.

الطماطم الفوائد:

- مُعدلات نموه عالية أي ينمو بسرعة.
- يُزرع في مدى واسع من الظروف البيئية والجغرافية.
- ذو مُحتوى عالي من فيتامين C مما قد يزيد من الإستجابة المناعية.
- بالإمكان تجاوز التلف السريع للثمار بتقانات التجفيد (Freeze-drying).
- الجين المُضاد ثابت حرارياً، يُمكن ان يُحضر مسحوق الطماطم الحاوي الجين المُضاد في شكل مسحوق بعد تجميده وتجفيفه، يُمكن ان يُصنع على شكل كبسولات.
- إمكانية خلط مجموعة من الجين المُضاد لتُعطى كجُرع تحصين من أمراض مُختلفة.

العيوب: سرعة تلف الثمار

ألرز الفوائد:

- يُستعمل في الغالب مع غذاء الأطفال لكونه عديم أو قليل الحساسية.
- ذات تعبيرعالي من البروتينات (الجين المُضاد).

العيوب: نموه بطئ ويستهلك كميات كبيرة من الماء.

الخس الفوائد:

- سريع النمو، يُستهلك مُباشرةً.
- ذو كتلة حيوية كبيرة، يُمكن زراعته في أكثر من موسم، يُزرع في مناطق جغرافية مُختلفة.

وهناك العديد من المحاصيل التي تم تحويرها وراثياً وتجربتها مثل فول الصويا، الجت، البطيخ، الجزر، الفستق، الحنطة، الذرة ولكلٍ منها أيضاً فوائده وعيوبه.

الجيل الثاني من اللُقاحات المأكولة Second generation of edible vaccines

نتيجة للنجاحات المُتحققة من تعبير الجينات الغريبة في الخلايا النباتية أو في أجزائها التي تؤكل، تجلت إمكانية تطوير نباتات لها القابلية في التعبير عن أكثر من بروتين مُضاد للجين. وتلك اللُقاحات مُتُعددة المُكونات (Multicomponent vaccines) يُمكن الحصول عليها من تهجين خطين نباتين لهما مُضادات جين مُختلفة وقد يظهر تعبير بعض أنواع البروتينات المُلازمة للجين المُضاد في ذات النبات فعلى سبيل المثال فان توكسين الوحدة الثانوية B لمسبب الكوليرا (VC-B) يميل للإرتباط مع نُسخ منه مُكوناً شكل الكعكة وبحلقة خماسية مع وجود فتحة في المُنتصف. وبإمكان تلك الهيئة تشكيل مُضادات جينية مُختلفة ومتُعددة لترتبط بخلايا M في وقت واحد فيتكون مثلاً لُقاح مأكول ثلاثي التكافؤ ضد الكوليرا وتوكسين كوليرا داخلي أو ما يُسمى *E. coli* Enterotoxigeneic (ETEC) إضافةً الى الفيروس العجلي (Rotavirus) مما يُظهر إستجابة مناعية عالية للثلاثة أمراض السابقة. تُعد مثل هكذا توليفات مُهمة جداً وذات أولوية في إنتاج لُقاحات ومُحصنات لدول العالم الثالث.

وفيما يتعلق بالأمراض ذاتية المناعة (Autoimmune diseases) ولأسباب غير معروفة يؤدي التجريع بمُضادات الجين الذاتية (Auto-antigens) الى كبح الفعالية المناعية في جسم الإنسان بعد تشغيل الخلايا الكابحة (Suppressor cells) للجهاز المناعي ويحصل بالنتيجة ما يُسمى بالتحمل المناعي (Immunological tolerance). فعلى سبيل المثال إمتصاص الكولاجين في مرضى إلتهاب المفاصل ينتج عنه الشفاء. وتتجلى تلك الظاهرة غالبا في الحيوانات المُختبرية وتعتمد على وقت ومُقدار الجُرعة. وبهدف تحفيز التحمل (Tolerance)، تبرز الحاجة الى ضرورة التكرار ولربما الإستمرار في إعطاء مُضاد الجين بجُرع أعلى من جُرع التمنيع. قد يتحفز التحمل عندما لا يُشخص النبات أو الثمرة بشكل دقيق أو عدم الإلتزام بالجُرع ومواعيدها. لذلك من الضرورة بمكان تشخيص النبات المُحور أو إجزائه التي تؤكل بدقة والتاكد من سلامة إستهلاكه والجُرع الفعالة وبرنامج التغذية بشكل صحيح وبالنتيجة ستكون الرؤيا واضحة فيما اذا كان المُضاد الجيني يحفز أو يُقلل المناعة. تحققت العديد من الإنجازات في مجال التشوهات ذاتية المناعة لعل أهمها منع أو تقليل حِدة مرض السُكري نوع 1، إلتهاب المفاصل الروماتزمي، التقليل من حالات رفض الأعضاء المزروعة (Transplant rejection)، تصلب الأنسجة المُتُعدد (Multiple sclerosis) وغيرها. البطاطا التي يُعبر فيها عن الإنسولين والبروتين Glutamic acid decarboxylase (GAD) والمُرتبط بالوحدة الثانوية CT-B، تمكنت من إيقاف الهجوم المناعي في سلالة من الجرذ المُعرضة لمرض

السُكري وآخيراً السيطرة على الزيادة في مُستوى السكر في الدم. يُستنتج مما سبق ضرورة زيادة كميات مُضادات الأجسام التي تنتجها النباتات للسيطرة على أمراض التمنيع الذاتي.

إنتاج مُضادات الأجسام في النباتات Production of antibodies in plants

توفر اللُقاحات عموما مصدرا لا يُستغنى عنه في الحمايةَ من الأمراض فتصنع اللُقاحات التقليدية من لُقاح اما حي او خامل (Live or attenuated vaccine) ولُقاح مقتول (Killed vaccine). تبلورت أفكار جديدة مفادها بان الهدف هو ليس الحقن بل الغذاء وأثبتت التجارب التي اجريت على نباتي الطماطم والبطاطا في إمكانية تصنيعهما لجين مُضادات فيروسات Norwal virus، وبكتريا *E. coli* المُمرضة، *V. cholera* و فيروس إلتهاب الكبد نوع B وكما تم ذكره سابقاً. عند تغذية الحيوانات المُختبرية بدرنات بطاطا أو ثمار طماطم حاوية على جين المُضادات، زُرع الأمل بعد حصول إستجابة في الجهاز المناعي والأغشية الطلائية للحيوانات التي خضعت للإختبار مما حصنها من الإصابة بالمُسببات المرضية لاحقاً. ليس من المُدهش ان تنجو مُضادات الجين في النباتات المأكولة وهي في طريقها من الفم الى المعدة وبالتالي تُحفز الجهاز المناعي فجدار الخلية النباتية الصلب نوعاً ما، يحمي الجين المُضاد مؤقتاً من العصارات الهضمية. وبعد تكسر الخلايا النباتية ومن ضمنها جُدرها داخل الأمعاء، تفرّغ تدريجياً حمولتها من المُضاد الحيوي.

نُشرت أول مقالة حول تجريب اللُقاح المأكول على الإنسان من قبل Arntzen وفريقه البحثي في معهد بويس ثومسن لبحوث النبات عام 1997 على 12 متطوعاً تم إطعامهم درنات بطاطا غير مطهية ومُزالة القشرة ومُحورة وراثياً بقطعة حميدة (Benign segment) من توكسين بكتريا *E. coli* (جزء من الوحدة الثانوية B أي B subunit) وكانت المُفاجاة السارة بظهور الإستجابة بنوعيها الجهازية وفي الأغشية المُخاطية. ونفذ الفريق البحثي تجارب أُخرى على مُتطوعين آخرين وحصلو على نتائج مُشجعة. حفز ذلك مجاميع بحثية أُخرى على تبني بحوث رائدة في هذا المجال وخاصة هيلري كوبروسكي من جامعة ثومسن جفرسن وفريقه البحثي حينما نجحوا في إنتاج نبات خس مُحور وراثياً حاوٍ الجين المُضاد B لإلتهاب الكبد الفيروسي (Hepatitis B antigen) وإطعامه لثلاثة مُتطوعين أظهر إثنان منهم إستجابة مناعية جهازية وكذلك في الأغشية الطلائية. مُضادات الأجسام عبارة عن جُزيئات بروتينية تنتجها خلايا اللمفوسايت نوع ب (Lymphocyte) المُتواجدة في الجهاز المناعي للفقريات حيث بإمكان مُضادات الجينات من تشخيصها والإرتباط بها. تتوافر مجموعة كبيرة من المواد والتي تعمل كمُضادات للجينات لتشمل البروتينات، الكربوهيدرات، الجُزيئات العضوية البسيطة وحتى آيونات المعادن. تدخل تلك المُركبات الجسم بعد إستهلاكها

أو قد تُحمل اليه بعد ان يُصاب الجسم بمرض معين نتيجة كائن حي. وهنا تلعب مُضادات الأجسام دورها في إستهداف وتحييد مُضادات الجينات ومن ثم إزالتها من الخلية. ومن المعلوم بان أصناف مُضادات الأجسام الرئيسة المتوفرة في مصل الكلوبيولين المناعي تشتمل على IgG، IgA، IgM، IgD و IgE. ومُضادات الجسم IgG هي النوع الأكثر شِيوعاً التي تتكون داخل الخلايا. تتكون مُضادات الأجسام IgG من زوجين من الببتيدات المُتعددة المُتشابهة يُطلق على الزوج الأول منه بالسلسلة الثقيلة وعلى الثاني بالخفيفة.

ولأمدٍ غير بعيد، كانت مُضادات الأجسام تُنتج تجارياً إما بإظهار الإستجابة المناعية في الحيوان المُضيف ومن ثم ذبحه وإستخراج مُضادات الأجسام من مصل دم الحيوان أو إنتاج تلك المُضادات بعد زراعة خلايا الحيوان. وفي كلتا الحالتين، فأن كميات مُضادات الأجسام المُنتجة وكُلفة التنقية تُعدان من مُحددات توفرها للمرضى. ومن هنا بدأت فكرة استثمار مجال هندسة النبات الوراثية، فاذا ما عُزلت الجينات المُشفرة لسلاسل البيبتيدات الثقيلة والخفيفة من اللمفوسايت، يصبح بالامكان تعبيرهذه الجُزيئات جينيا داخل الكائن الحي المُحور وراثياً بعد تلك الجينات اليه. كما هو الحال في إمكانية تعبير أي مُضاد جيني بروتيني داخل النبات، أيضاً من المُمكن ان يحصل التعبير لجُزيئات مُضادات الأجسام داخل النبات. يُطلق احيانا على تلك الأجسام ذات الدور الوقائي والمُنتجة من قبل خلايا النبات بمُضادات الأجسام النباتية (Plantibodies). انتجت ما لا يقل عن أربعة من مُضادات الأجسام لها مُستقبل لأن تكون عوامل علاجية ناجحة (Therapeutic agents) في الإنسان. وتم إختبار IgG-IgA ضد بكتريا *Streptococcus mutans* وتجري محاولات لصناعة أشكال من تلك المُضادات وخلطها مع معجون الأسنان لحمايتها من التسوس.

اختبرت مُضادات الأجسام أيضاً في الحيوانات وتبين بانها ذات مُستقبل واعد. تبرز صعوبة في إنتاج مُضادات أجسام إفرازية كاملة وذلك لكون جزء من سلسلة بروتيناتها الأربعة (إثنان ثقيلة وإثنان خفيفة) تحتوي بروتينات إضافية يُضاف أحدهما خارجياً عند الإفراز. أُنجز العمل بعد تهجين أربعة خطوط مُنفصلة من نباتات تبغ مُحورة وراثياً. فمُضادات الجينات المُعقدة وذات الوزن الجزيئي العالي بإمكانها التعبير الوراثي في خطوط مُختلفة من ذو النبات والتهجين بين تلك الخطوط يَنتج عنه جيل يحتوي جين مُضاد مُعقد ذات قيمة إقتصادية عالية. ومن الفوائد الأُخرى للأجسام المُضادة النباتية (IgA plantibodies) بان الجزء الأكبر منها (57%) يكون بهيئة جُزيئتين مُتشابهتين (Dimerized) وهذا على العكس من IgA المُنتج في خلايا الحشرات عند إستعمال Baculovirus والذي في الغالب يكون ذات جُزيئات مُفردة (Monomeric). والجدير بالذكر ان مُضادات الأجسام التي يحصل تعبيرها في البذور تكون أفضل بكثير عن نظيراتها التي يحصل تعبيرها في الأوراق لأسباب عديدة منها سُرعة تلف الأوراق ووجوب إجراء عملية الإستخلاص

حال قطعها من النبات بينما تُحافظ مُضادات الأجسام في البذور لفترات طويلة وتحت ظروف خزن اعتيادية لحين إستخلاصها أو إستهلاكها.

سُجلت أولى التقاريرعن نجاح التعبير الجيني للمُضادات الحيوية في النباتات المُحورة وراثياً في نهايةَ ثمانينيات وبدايةَ تسعينيات القرن الماضي عندما نشر Hiatt وفريقه البحثي بحثهم (إنتاج مُضادات الأجسام داخل النباتات) في مجلة الطبيعة (Nature) في العدد 342 لسنة 1989. تلا ذلك تطوراً سريعاً نتيجة تلاقح أفكار علوم المناعة وهندسة النبات وراثياً والعلوم الأُخرى السائدة. نتج عن ذلك إنتاج مدى واسع من مُضادات الأجسام داخل النباتات والطحالب الخضراء سُميت Plantibodies لتمييزها عن تلك المُنتجة من الحيوانات. وفرت النباتات ومزارعها النسيجية العديد من المزايا عند إنتاجها لمُضادات الأجسام النباتية مُقارنةً بتلك المُنتجة من مصادر حيوانية أو ميكروبية يُمكن تلخيصها بما يلي:

1- إنخفاض كبير في كُلف الإنتاج.

2- سهولة تراكم وحصاد الناتج وزيادته لمواجهة الطلب المُتزايد في السوق العالمية.

3- عدم الحاجة الى رأسمال كبيرمُقارنةً عند إستخراجها من حيوانات لبونة أو مزارعها النسيجية وحتى من مصادر حيوانية مُحورة وراثياً.

4- خلو المُضادات المُنتجة من مصادر نباتية من التلوث المُحتمل حصوله في المصادر الأُخرى خاصة المُسببات المرضية المحمولة في مصل الدم.

عموماً هناك وسيلتان مُختلفتان لإنتاج مُضادات أجسام فعالة داخل النباتات، أولهما نقل جينات السلاسل الثقيلة والخفيفة على إنفراد الى نباتين مُرشحين لإنتاج المُضادات. يتبع ذلك إجراء التلقيح الخلطي بين النباتين المُحورين وراثياً (الابوين) لإنتاج أفراد الجيل الأول (F1) الحاملة لجينات السلاسل الثقيلة والخفيفة.

إنتاج المواد الصيدلانية بالطرائق الجزيئية Molecular pharming

يُمكن إنتاج البروتينات بكُلف واطئة داخل أجزاء النبات اذ لاتحتاج الى أجهزة مُكُلفة ومُعقدة كما هو الحال عند إستعمال الأنظمة الميكروبية لإنتاج المواد الصيدلانية. يُدعى إنتاج هذه المواد من النباتات أحياناً بإسم إنتاج المواد الصيدلانية بالطرائق الجزيئية (Molecular pharming) واحيانا Biopharming بإعتبار توظيف البايولوجي الجزيئي في إنتاج مواد صيدلانية لذلك يُطلق عليها أحياناً بالزراعة الجزيئية

(Molecular farming) على إعتبار إنتاج تلك المواد من زراعة النباتات بعد تحويرها وراثياً. تُوظف النباتات أو خلاياها في إنتاج بروتينات ذات فائدة علاجية حيث يجمع هذا العلم الحديث علوم إنتاج الأدوية من مصادر بايولوجية مع علوم الوراثة الجزيئية في إختصاص التقانات الأحيائية الزراعية. أصبح بالإمكان إدخال الجينات التي تُشفر لبروتينات ذات قيمة صيدلانية عالية في محاصيل مُهمة أو في خلايا نباتية تُنمى على نطاق واسع، بعدها تُستخلص نواتج البروتين وتُنقى من الخلايا. وبذلك يُعد إنتاج المواد الصيدلانية من مصادر بايولوجية (Biopharming) طريقة بديلة لإنتاج عقاقير بوسائل التقانات الأحيائية ولها فوائدها الكثيرة مُقارنةً بالطرائق التقليدية والتي تكون مُعقدة ومكُلفة وفيها مخاطر في السلامة الأحيائية والأمان الحيوي. حصلت في عام 2010 أول مُصادقة على لُقاح PMP للإستهلاك البشري من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية. تضمن الدواء بروتين علاجي يُستعمل في إحلال إنزيم مُعين بدل آخر لمُعالجة أعراض إحدى الحالات الوراثية النادرة التي تُدعى بمرض غوشيه (Gaucher disease). طُور العقار بعد إدخال جين مُشفر للبروتين في خلايا الجزر والتي تم إكثارها في مُفاعلات حيوية وبكُلفة أقل بمُقدار 25% من تلك المُنتجة من خلايا الحيوانات اللبونة. وظفت الخلايا النباتية أيضاً في إنتاج لُقاح ضد فيروس مرض نيوكاسل والذي يُسبب في هلاكات كبيرة بالدواجن من قبل شركة Dow Agro Science الأمريكية ولكن لم تحصل الموافقة على تسويقه. أُستثمرت كذلك خلايا الطحالب والأشنات المُنماة داخل مُفاعلات حيوية مُغلقة في إنتاج البروتينات اللُقاحات والبروتينات العلاجية ولكن في الغالب تُواجه تلك المُنتجات تشريعات من الصعب على الشركات المُنتجة تنفيذها.

مع تطور علوم البايولوجي الجزيئي والهندسة الوراثية، تمكن العُلماء من هندسة الكائنات الحية وراثياً ابتداءاً من الخمائر الى الكائنات الراقية كالنباتات من أجل إنتاج مواد صيدلانية (Biopharmaceuticals) مُعينة. وتشتمل الأخيرة على مُنتجات دوائية كالبروتينات ومُضادات الأجسام التي تُنتج داخل أنظمة الكائنات الحية وتُستعمل لأغراض علاجية أو تشخيصية وقد تكون مُكملات غذائية. ترجع أهمية النباتات في إنتاج البروتينات للأغراض أعلاه الى كونها عملية آمنة وإقتصادية مُقارنةً مع الأنظمة البايولوجية الأُخرى كالكائنات المجهرية. نجح العُلماء في تعبير مصل الألبومين البشري وراثياً كأول بروتين كامل عام 1995 في نباتي التبغ والبطاطا المُعدلين وراثياً. وبعد سنوات من العمل الرائد في هذا المجال سُوق نوعان من الأدوية المُشتقة من النباتات (Plant derived pharmaceuticals) وإختصاراً تدعى PDPs وتدعى احياناً بالمواد الصيدلانية المُصنعة نباتياً (Plant made pharmaceuticals) وإختصاراً (PMPs) الأول في كوبا والآخر في الولايات المتحدة. وفي عام 2009 تم تسويق مجموعة من المُركبات الصيدلانية المُنتجة

من النباتات وهناك العديد منها في المراحل النهائية لإقرار المُوافقات الإصولية وإدخالها في السوق العالمية لمُعالجة العديد من الأمراض (جدول 14.4).

البروتينات العلاجية من هندسة البلاستيدات الخضراء Therapeutic proteins from chloroplast engineering

يُسبب التحول الوراثي لدنا نواة خلايا النبات سِجالات علمية واسعة بسبب الأضرار البيئية التي قد تُسببها النباتات المُحورة وراثياً وخاصة إذا ما انتقل الجين المنقول (Transgene) عبر حبوب اللُقاح الى نباتات أُخرى وأنواع نباتية غازية (Invasive). النبات ذاته والمُحور وراثيا من خلال دنا النواة يكون عرضة للأذى بسبب المواقع العشوائية التي من المُمكن ان ينتقل لها الجين أو الجينات المنقولة في كروموسومات النواة والذي قد يُسبب في إيقاف نشاط جينات أُخرى مُهمة ولربما يُسبب في تغييرات مُميتة في الكائن العائل.

جدول 14.4. مستحضرات أُنتجت أو في مراحل الإختبار بنظم تعبيرية ونباتات مختلفة

المستحضر الصيدلاني	مرحلة الموافقات	الشركة المنتجة	نظام التعبير والمضيف
CaroRx™anti-caries Mab	موافقة الإتحاد الاوربي	Plant Biotechnology	تحوير وراثي، تبغ
Newcastle virus subunit vaccine	موافقة الولايات المتحدة	DowAgro	تحوير وراثي، تبغ
Taliglucerase™ glucocerebrosidase	موافقة الولايات المتحدة	Protalix	تحوير وراثي، خلايا الجزر
Interferron α	المرحلة الثانية من الإختبار	Biolex	تحوير وراثي، دغل البط
Insulin	المرحلة الثانية من الإختبار	SemBioSys	تحوير وراثي، عصفر
H5N1 Influenza virus VLP vaccine	المرحلة الاولى من الإختبار	Medicago	تحوير وراثي مؤقت، تبغ
H1N1 Influenza virus subunit vaccine	المرحلة الاولى من الإختبار	Medicago	تحوير وراثي مؤقت، تبغ
Non-Hodgkins lymphoma	المرحلة الاولى من الإختبار	Icon Genetics/Bayer	تحوير وراثي مؤقت، تبغ

ولابُد من الإشارة الى أن تحوير النبات من خلال دنا النواة غير كفوء بالنظر لوجود نواة واحدة في كل خلية نباتية اي لا يوجد الا عدد محدود من نسخ الجين المؤشب وينعكس ذلك في كمية البروتين المُنخفضة جراء تحوير دنا النواة. لذلك ولِدت فكرت تحوير دنا البلاستيدة حيث يكون دنا البلازميد المؤشب مُرتبطاً بجُزيئة مُتناهية الصغر من جُزيئات الذهب أو التنكستن والتي يتم إيلاجها داخل بلاستيدة ورقة بإستعمال تقانة رمي المقذوفات. يوفر جهاز رمي المقذوفات ضغط عالي يكفي لإيلاج المقذوفة المُغلفة بالبلازميد الحامل لمجموعة من الجينات المرغوبة الى داخل الخلية. يحمل البلازميد جينات مُهمة تشتمل على جين المعالجة (Therapeutic gene) وجين المُقاومة للمُضادات الحياتية وجين آخر يزيد من تعبير الجين العلاجي إضافةً الى تعاقبين لاصقين (Flanking sequences) يؤمنان من إلتصاق البلازميد في المكان المطلوب في مجين الكلوروبلاست وليس عشوائياً. وإختصاراً، يقود التعاقبان اللاصقان الدنا البشري الهجين (Human recombinant DNA) الى موقع مُحدد على مجين البلاستيدة بعد ربطه في الأجزاء المُناسبة من المجين. تُنمى الورقة بعدها في طبق يحتوي المُضاد الحياتي الذي يؤمن نجاة خلايا النبات الحاملة لجين المُقاومة للمُضاد الحياتي وبالتالي ستحتوي تلك الخلايا كذلك على الجين العلاجي. تُنقل الخلايا الناجية الى وسط مُعتمد بالزراعة النسيجية يضمن إنقسامها وتمايزها الى أفرع لتُنقل الى وسط تجذير واخيراً نُبيتات، تؤقلم لتصبح نباتات كاملة تمتلك تعبير البروتين المرغوب.

إختيار نوع النبات لإنتاج المواد الصيدلانية Plant selection for pharmaceuticals

استعمل نبات التبغ المُحور وراثياً بشكل واسع في العديد من الدراسات كنبات مُنتج للبروتينات كونه يكون كتلة حيوية كبيرة ويُحصد بسهولة وبسرعة إضافةً الى كونه نبات إنموذج (Model) في دراسات البايولوجي الجزيئي وسهولة زراعة خلاياه نسيجيا وأهم من ذلك كله فانه لا يُستعمل كغذاء للإنسان ولا للحيوان مما يجعل منه أقل خطرا عند تُعديله وراثياً اذ لا يُلوث الغذاء. استعمل نبات التبغ في كوبا تجاريا لإنتاج مُضاد أجسام ضد إلتهاب الكبد الفيروسي (Hepatitis) نوع B2. وبجانب هذا النبات الورقي، أُستثمرت نباتات ورقية أُخرى كالخس والجت لنفس الغرض. تُحصد النباتات الورقية وتدخل المصنع مباشرةً لغرض إنتاج البروتينات بسبب سُرعة تلف الأخيرة. ولتجنب التلف السريع لهكذا نوع من النباتات ذات العُمر التسويقي القصير، استعملت حبوب المحاصيل الحقلية كبذور الرز والحنطة والشعير والذرة الصفراء لإنتاج PDPS. فقد انتج من بذور الذرة الصفراء وبنجاح وسُوِقت تجارياً مادة الأفيدين (Avidin) التركيبية وإنزيم b – glucuronidase إضافةً الى إنزيم التربسين من قبل شركة .Prodi Gene Inc في الولايات المتحدة الأمريكية. ومع التقدم الحاصل في العلوم الطبية والزراعية والصيدلانية، أنتجت الشركات ومن مُختلف دول

العالم لُقاحات من البطاطا، الطماطم، المــوز، الخس، الجت، السبانغ، البرسيم الأبيض، ونبات الأربدوبسس إذ استعملت الــنباتات السابقة كمُضــيف لإنتاج اللُقاحات. كما حصل تقدم كبير في إستعمال الأنواع النباتية سهلة التداول مُختبرياً لهذا الغرض أمثلة نباتي عدس الماء (اللمنا) وطحلب الكلاميدوموناس.

الفوائد المُتوخاة Expected advantages

الزراعة هي عصب حياة الدول النامية ومع تدهور الوضع الصحي في عموم هذه الدول، برزت الحاجة لإنتاج مواد صيدلانية بأسعار زهيدة وبمعدات بسيطة يُمكن إنشاؤها في أي مكان. وعليه فسوف تحقق العقاقير المشتقة من النباتات (PDPS) المتطلبات السابقة بعد إنتاج جُزيئات يُسيطر بواسطتها على الأمراض المُعدية على وجه الخصوص في تلك البُلدان مثل أمراض الملاريا، إلتهاب الكبد الفيروسي (HIV) أو نُقص المناعة المُكتسب (AIDS). حقق نبات التبغ نجاحا وأصبح مُنتجا لأنواع من المراهم مُضادة لإلتهاب الكبد الفيروسي (anti – HIV) والتقصي مُستمر حاليا من قبل شركة Dafra Pharma لإنتاج مُركب مُضاد للملاريا (Anti-malaria artemisinin) من نباتات الهندباء (Chicory) مُحور وراثياً. من الطبيعي ان تُنشأ مصانع لإنتاج المواد الصيدلانية في مواقع إنتاج النباتات وطالما لكل منطقة جغرافية نباتاتها الخاصة بها، لذا يُمكن تحوير أنواع مُنتخبة منها لإنتاج المواد الصيدلانية وبمعنى آخر بالإمكان إنشاء معمل لهذا الغرض طالما وجدت زراعة في تلك المنطقة مما يُتيح المرونة التامة لشركات الأدوية وسُكان المنطقة في إنشاء مُختبرات إستخلاص وتنقية وخزن لهذه المُنتجات وبذلك تكون التقانات النباتية قد حققت هدفا ساميا في خدمة المُجتمع.

والجدير بالذكر ان هناك طلب على بعض المُنتجات الصيدلانية على وجه التحديد وخاصة في الدول النامية مثل لُقاح إلتهاب الكبد الفيروسي نوع B والمُنتج من خميرة مُهندسة وراثياً ولكن الكميات المُنتجة لاتُلبي الطلب المُتزايد وأسعاراللُقاح مُكُلفة نوع ما. ستساعد PDPs وبلا شك كثيراً في برامج تلقيح الأطفال وبأقل الكُلف مع إمكانية إنشاء هذه المعامل وإستخلاص وتنقية وخزن المُنتجات في مواقع الطلب عليها. ولايقتصر إنتاج اللُقاحات المأكولة في مُقاومة أنواع البكتريا المُمرضة بل تُعداه الى التحصين ضد العديد من الأمراض البشرية والحيوانية التي تُسببها الفيروسات وبطرائق حقن مختلفة وحصل العديد من الباحثين والفرق البحثية براءات إختراع بهذا الصدد (جدول 14.4).

التحديات التي تُواجه إنتاج اللُقاحات المأكولة Challenges face edible vaccine production

لاتزال تُواجه الباحثين العديد من الاسئلة (والتي سبق وان تم ذكر قسم منها) والموضحة لاحقاً والتي يستوجب الإجابة عنها قبل تطوير لُقاح نباتي. فلابُد من تحديد الجُرعة الصحيحة بعد الأخذ بنظر الإعتبار وزن الشخص وعمره ومن المؤكد حجم الثمرة أو الجزء النباتي الحاوي اللُقاح إضافةً الى درجة النضج والمُحتوى البروتيني. فالكمية المُستهلكة حرجة جداً خاصة فيما يتعلق بالأطفال الرُضع اذ قد يؤكل جزءاً من الثمرة ويُرمي جزءاً منها.

جدول 14.4. لُقاحات مُنتجة داخل النباتات للتحصين من مجموعة أمراض فيروسية

الفيروس	العائل الهدف	النبات	طريقة تناول الدواء
Hepatitis B	الإنسان	التبغ	حقن بالبروتين المستخلص
Hepatitis B	الإنسان	البطاطا	عن طريق الفم
Hepatitis B	الإنسان	الخس	عن طريق الفم
Norwalk	الإنسان	التبغ	عن طريق الفم
Norwalk	الإنسان	البطاطا	عن طريق الفم
Rabies	الإنسان	الطماطم	إستهلاك البروتين السُكري
CMV cytomegalo	الإنسان	التبغ	ارتباط مناعي
Rabbit hemorrhagic disease	الارنب	البطاطا	حقن
Foot&mouth disease	اغلب حيوانات المزرعة	الأربدوبسس	حقن
Foot&mouth disease	أغلب حيوانات المزرعة	الجت	حقن وعن طريق الفم
Corona virus (TGEV)	الخنزير	الأربدوبسس	حقن
Corona virus	الخنزير	التبغ	حقن
Corona virus	الخنزير	الذرة الصفراء	عن طريق الفم

قد تفشل الجُرعة المُنخفضة في تحفيز مُضادات الأجسام في الوقت الذي قد تسبب الجُرعة العالية مردودات عكسية. ويبدو من المنطق عمل تراكيز من الجُرع معلومة الوزن أو الحجم كملعقة شاي مثلا بدلاً

من إستهلاك ثمرة بالكامل. ويُمكن تصنيع النباتات أو الأغذية المُحورة كلُقاح على شكل كبسولات أو قطع من الكيك وحتى رقائق ذرة على ان توضح تفاصيل الجُرع ونقاوة المُنتج.

الإعتبارات الواجب الإلتزام بها عند تطوير لُقاح مأكول: إختيار الجين المُضاد Selection of antigen

هل الجين المُضاد آمن وغير مرضي تحت كافة الظروف؟

هل يُمكن للجين المُضاد تحفيز الإستجابة المناعية التي تحمي الجسم؟

هل ان الجين المُضاد مُناسباً للتعبير الجيني داخل النبات؟

كفاءة اللُقاح Effeciency of the vaccine: هل يتراكم الجين المُضاد بكميات مُناسبة داخل النبات؟

هل الجين المُضاد المُشتق من النبات يوفر المناعة اللازمة؟

هل طورت حيوانات التجربة إستجابات مناعية تحميها من الأمراض؟

هل من إمكانية تداخل الخلايا النباتية مع الجين المُضاد بداخلها؟

هل من إحتمالية تحفيز تحمل الجين المُضاد وبالتالي فقدان التحصين؟

إختيار النوع النباتي المُستعمل كلُقاح Selection of plant material as a vaccine

هل هو غذاء مُفضل لدى المُستهلك؟

هل يؤكل النبات طري غير مطبوخ؟

هل النبات أو ثماره تصلح للاطفال الرضع؟

هل يُمكن إنتاج النبات بسهولة وفي نطاق واسع؟

هل يُمكن خزنه وهل مُقاوم للتلف؟

هل قابل للنقل بسهولة ويُمكن إكثاره بوسائل الإكثار المعروفة؟

هل كُلفة إنتاج النبات المُحور مُناسبة؟

الجُرع المُعطاة Given doses: هل يؤثر اللُقاح أيجاباً في ألأنسجة المخاطية ويُحفز الإستجابة المناعية؟

هل من إمكانية إعطاء الجُرعة بمُجرد أكل النبات أو ثماره؟

ما عدد الجُرع المطلوبة ومواعيدها؟

سلامة الغذاء المأكول Safety of edible food: هل يُسبب حساسية أو سُمية؟ أمثلة الكلايكان والكوتين وغيرها. هل يتداخل مع مُركبات أُخرى؟

هل يُسبب المُنتج في ظهور مرض الحصبة في النباتات المُحورة بجينات فيروس الحصبة؟

هل للنبات المُحور وراثياً مخاطر صحية وبيئية؟

هل يُمكن منع أو تجنب الإستعمال المُفرط أو غير الصحيح؟

وجهات النظر العامة من التحوير الوراثي Attitudes concerning genetic modification

هل هناك وجهات نظر سلبية تجاه الكائنات المُحورة وراثياً تؤثر في مقبولية اللُقاح؟

هل هناك موانع قانونية وأخلاقية بخصوص المُنتجات النباتية المُنتجة كلُقاح مثل التبغ؟

السيطرة النوعية والحصول على إجازة إنتاج اللُقاح Quality control and license

هل توجد ثباتية للجين المُضاد في المحصول المُنتخب كلُقاح مأكول؟

من سيكون مسؤولاً أو مسيطراً في توفر اللُقاح وعن إنتاجه؟

المخاطر والمحاذير في إنتاج PDPs Risks and precautions in PDPs production

يُعد إنتاج PDPs خطوة مُتقدمة وفريدة في مواجهة تحديات مخاطر السلامة العامة وإدارة المخاطر لأسباب عديدة أهمها أن النباتات تُنتج في بيئة مفتوحة. ومع هذا تظهر خطورة من نوع آخر مثل إمكانية إنتشار أو إنسيابية الجين (Gene flow) من النباتات المُحورة وراثياً الى غير المُحورة المُجاورة وخاصة المحاصيل والأدغال التابعة لنفس الجنس أو النوع أو الصنف ولربما لذات العائلة بالتلقيح الخلطي وإنتقاله الى بذور تلك النباتات وخاصة ما يؤكل منها أو عند إستثمارها في إنتاج المواد الصيدلانية في ذات الوقت. يُتيح ذلك عند حصوله دخول PDPs في سلسة الغذاء البشري والحيواني. وبهذا فقد عكفت المُنظمات المحلية

والدولية على دراسة الحالة وجعل مخاطر PDPs صفرا. ولتحقيق الهدف السابق فعلى المزارعين والباحثين ومُنتجي المواد الصيدلانية من نباتات مُحورة وراثياً إجراء العزل الفيزيائي الكامل للحقول المُنتجة مع إتخاذ معايير السلامة لمنع إنتشار البروتينات المُنتجة بطرائق غير مقصودة. وفي هذا الصدد فقد درس المُختصون آلية تحقق الهدف السابق وتوصلوا الى إمكانية هندسة النباتات وراثياً لإنتاج أنواع تكون بذورها فاقدة الحيوية (Non-viable seeds). اقترحت إستراتيجية أُخرى في إمكانية إنتاج المواد الصيدلانية من النباتات بعد حصادها، ومن ثم معاملة البروتينات بمُعاملات خاصة لتفعيلها موقعياً داخل المعامل. وبهذا يكون البروتين وهو داخل النبات بشكله غير الفعال ولايصح دواءاً أو لُقاحاً الا بعد تفعيله.

ومما يُسجل سلباً وخاصة في دول العالم الثالث هو نُقص التشريعات أو عدمها بخصوص قواعد السلامة العامة في تداول النباتات المُحورة وراثياً اذ بدونها لأيُمكن إدخال معامل تستند الى PDPs في إنتاج المواد الصيدلانية في تلك الدول. وبالرغم من ان إنتاج هذه المواد قد جرى في دول العالم المُتقدمة وصُرفت مبالغ طائلة من أجل تحقيق الهدف الا أن تطبيق ذلك في الدول النامية لازال يُواجه وكما سبق بنُقص التشريعات وحقوق الملكية الفردية في الدول التي تهدف تلك المشاريع لخدمتها بما يزيد عملياً من أسعار اللُقاحات والمواد الأُخرى المُنتجة. وأخيراً قد يُثير موضوع إنتاج PDPs من النباتات مسائل اخلاقية ودينية (Ethical and religious issues) فبعض الإعتقادات تعتبر تُعديل الكائنات الحية وراثياً أمراً يُعارض الأخلاق والمفاهيم الدينية وتدخلاً في شؤون الخالق. ويجب التفكير في إحتمالية إنتشار الجينات المنقولة افقياً عن طريق الحشرات الماصة والإنتقال الى أحياء التربة عند حصول جروح في جذور النبات أو عند تقطع الجذور وتلفها مما يؤدي الى تلوث التربة وحتى الماء الارضي. ووفق الحسابات الإقتصادية فقد كَلفَ إنتشار الجينات المنقولة الولايات المتحدة ما يقارب 12 بليون دولار. وخلاصة لما سبق فأن PDPs توفر بديلاً رخيصاً وعملياً ومساراً حديثاً يعود بالنفع لكافة البشرية مع إمكانية تنفيذ مشاريع إنتاجية في أيةَ منطقة بالعالم شريطة سن التشريعات المُناسبة وتفادي التوجسات من إنتاجها وتداولها. بالإمكان توظيف النباتات المُحورة وراثياً لتعمل كمُفاعلات حيوية من أجل إنتاج مُركبات متنوعة ذات أهمية بالغة لتشتمل الكربوهيدرات، الدهون، البروتينات إضافةً الى مُركبات الأيض الثانوي. تُعد تلك المُركبات مُهمة بمكان من النواحي الصناعية لتحسين صحة الإنسان والحيوان وبيئتهما.

الفصل الخامس عشر: آفاق التقانات الأحيائية وإتفاقية التنوع الحيوي، السلامة الأحيائية والأمان الحيوي

Prospective of Biotechnology,

Biodiversity Protocol, Biosafety and Biosecurity

التواصل في مجال التقانات الأحيائية الزراعية Communication in agricultural biotechnology

يكتسب هذا الموضوع أهمية خاصة كونه يُسلط الضوء على الإدارة الصحيحة للمحاصيل المُحورة وراثياً وهو الموضوع الساخن والمثير للجدل بين مُنتجي ومُستهلكي تلك المُنتجات. فالتقانات الأحيائية الزراعية تحتل خياراً ليس الوحيد من بين الخيارات العلمية في تحسين المحاصيل الزراعية ولكنه جذب الكثيرين بالنظر للفوائد المُتوخاه منه. ما يُقارب من 16.7 مليون مُزارع موزعين في 29 بلد يزرعون مساحة تزيد عن 160 مليون هكتار ليغذوا ملايين البشر بمحاصيل عُدلت وراثياً. وفي الوقت نفسه، أُثيرَ نقاشاً حاداً حول المخاطر والسلامة الأحيائية جراء إنتشار زراعة وإستهلاك هذا النوع من المحاصيل. تتضمن الإعتراضات العديد من الصفحات منها ما هو علمي ومنها ما هو سياسي أو قد يكون اقتصادي ومن يذهب الى أبعد من ذلك ليكون الإعتراض أخلاقياً وثقافياً وحتى دينياً مما يجعل الموضوع مُتشعباً بوجهات نظر مُتباينة. لذا فمن المُهم بمكان خلق حالة من التوازن بخصوص المخاوف المُحيطة بهذا المجال الحيوي بتوفير المعلومات العلمية المبنية على أُسس منطقية تُشجع العاملين في هذا الحقل من مواجهة النقاش وكسبه لصالحهم وبما يضمن مقبولية منتجاتهم. ولأجل تحسين صورة التقانات الأحيائية وما تساهم فيه من خدمة للمجتمع، لابُد من وضع إستراتيجية للتواصل بين المُنتج والمُستهلك. وقد نوهَ الكثير من المُختصين الى هكذا نقطة جوهرية وأجازوا لأصحاب القرار بتوعية الناس عن أهمية التقانات الحديثة وكونها أداة مُهمة لزيادة الإنتاج الزراعي وتحسين نوعيته إضافةً الى المردود الاقتصادي والبيئي والصحي مع توخي الدقة والصراحة فيما اذا كانت هناك اية مخاطر مُحتملة والتي كما أشرنا سابقاً في عدم حصول اي حالة تسمم جراء إستهلاك المُنتجات المُحورة وراثياً أثناء عقد من الزمن.

لابُد للعُلماء والباحثين والمزارعين المعنيين بحلقات البحث العلمي والإنتاج والتسويق من التواصل فيما بينهم وتبادل المعرفة بما يُتيح لهم اتخاذ القرار المُناسب والإجابة عن الأسئلة أين وكيف ومتى ولماذا المحاصيل المُحورة وراثياً وليس المُنتجة بالطرائق التقليدية. فقد سرد أحد المُختصين في مجال التقانات الأحيائية الأسباب التي تستدعي شمول جمهور الناس وإشراكهم في وضع السياسات الخاصة بالتقانات

الأحيائية مما يضمن الإسناد الشعبي اللآزم خاصة عند وضع القرارات وتنظيم القوانين. اذ من المعلوم ان آراء جمهور الناس لدى الحكومة قد تكون أكثر وزراً من آراء المُنتج. وفي هذا الخصوص قُسمت فعاليات التواصل الى خمس خطوات كما سيأتي لاحقاً تضمن الإنسيابية والإستمرارية في إعادة التقويم والتنقية.

1- التقويم Assessment

تشمل مرحلة التقويم في الحصول على المعلومات المطلوبة لإدارة إستراتيجية التواصل. يُحدد التقويم السلوك المطلوب، الرسائل المفتاحية، الحاضرين والمُساهمين وقنوات التواصل للوصول الى الجمهور مع وحدات مُتخصصة لتطبيق فعاليات التواصل.

2- التخطيط Planning

يتم إتخاذ قرار فعلي في ضوء المعلومات الواردة من مرحلة التقويم. تُتخذ القرارات بخصوص السلوكيات المطلوبة، والرسائل المفتاحية، حضور الجمهور، قنوات الاتصال وعن نشاطات الوحدات الساندة كالموازنة والجدول الزمني وخُطط بحوث التواصل وعن بناء القُدرات.

3- تطوير مواد التواصل وإختبارها مبدئياً Material development and pretesting

عند إنتاج مواد تواصل مُناسبة وفعالة يُفترض ان تكون على شكل رسائل واضحة ودقيقة ومؤثرة كي توجه الى الجمهور ويُشترط فيها ان تكون بسيطة وتراعي المشاعر الثقافية والأخلاقية والدينية وبذلك تكون مقبولة من الجمهور.

4- التنفيذ Implementation

يتم في هذه المرحلة إستلام وتوزيع مواد التواصل عن طريق المطبوعات أو وسائل الإعلام المرئية والمسموعة أو بالتواصل الشخصي.

5- التوجيه وتقويم الحالة Monitoring and evaluation

وتجرى هذه المرحلة بتزامن مع مرحلة التنفيذ لتحديد إستجابة الجمهور للرسائل التي وصلتهم والإستنتاج عن مدى التغيير الذي حصل في قناعاتهم المعرفية ووجهات نظرهم ومُعتقداتهم وتطبيقاتهم. تُجمع الإستنتاجات ويُعاد تقويم الموقف وإجراء التعديلات ان وجدت من أجل تطوير وسائل التواصل بما يفيد مُستقبلاً في وضع برامج تواصل أكثر دقة وفعالية.

خصوصيات التواصل Communication specialty

ترتبط خصوصيات التواصل وإستراتيجياته حسب توجهات البلد الثقافية والسياسية وغيرها. فدعم الجمهور وقبولية المُستهلك لمُنتجات التقانات الحديثة مُهماً في تحقيق المنافع المُشتقة من التكنولوجيا. والأخيرة مُرتبطة بعوامل عدة أهمها المُستوى المعرفي، الوعي من الفوائد المُتوخاة، الثقة بالنفس والثقة بالمنتوج. ولابُد من الإشارة الى أهمية بناء شبكات تواصل بين مُختلف الأطراف وخاصة عن طريق شبكة المعلومات الدولية (الأنترنت) كونها تُتيح لجمهور واسع وأينما كان في سطح الكرة الأرضية بتبادل المعلومات بسرعة مع محدودية الرقابة. والكثير من المواقع في الشبكة الدولية تقدم خدماتها مجاناً مثل الخدمة العالمية لإقتناء تطبيقات التقانات الأحيائية الزراعية The International Service for The Acquisition of Agri-biotic Applications وإختصاراً ISAAA ويوفر الموقع قنوات للتواصل المُهم في المجالات المذكورة أعلاه. وكذلك موقع مركز المعرفة العالمي حول التقانات الأحيائية الزراعية Global Knowledge Center on Crop Biotechnology وموقعه في جنوب شرق آسيا. إضافةً الى مراكز معلومات التقانات الأحيائية ومواقعها في أفريقيا وآسيا واوربا وأمريكا اللاتينية. أصبحت هذه المراكز وغيرها الصوت الذي يدافع عن التقانات الأحيائية الحديثة.

التقانات الأحيائية الزراعية: الحل لتقليل الفقر والجوع Agric. Biotech. the solution for reducing poverty and hanger

بلاشك بأن خفض مُستويات الفقر والجوع من أولويات وأهداف التقانات الحديثة. وفي هذا السياق فقد رسم المُختصون في مجال التقانات الأحيائية وخبراء الإقتصاد والمُنظمات الإنسانية العالمية والمحلية سياسة خفض الجوع والفقر بنسبة 5% بحلول عام 2015 وهذا ما أُقر في قمة الغذاء العالمية عام 1996. وللأسف الشديد ونحن قد دخلنا في عام 2015 وأعداد البشر المُعرضة للفقر والجوع في إزدياد. وللوقوف على واقع مايحصل فلابُد من ذكر بعض الحقائق. الحقيقة الأولى بأن أعداد الفقراء والمحرومين يزداد سنوياً بمُعدل 4 مليون نسمة وتمثل قارة أفريقيا مركز الصدارة في هذه الأعداد ولأسباب عديدة منها أن النشاط الزراعي في أفريقيا لايزال تقليدي لحد كبير ويعتمد أغلب الناس على المُساعدات الغذائية الإنسانية التي تصلهم من الدول المُتقدمة. يُمثل حجم المساعدات لأفريقيا فقط مايُقارب من ربع مايُجهز لباقي سُكان الكرة الارضية. ولابُد أذن من قلب الموازين وإعادة الحسابات والتي لاتُثمر إلا من خلال وضع إستراتيجية زراعية مبنية وفق أُسس

علمية ترفع إنتاجية وحدة المساحة كماً ونوعاً. ولتسليط الضوء أكثر على هذا المجال الحيوي لابُد من التطرق الى الحقائق التالية:

1- يُسبب الفقر في إنتشار الأمراض وزيادة عدد الوفيات وزيادة أعداد البشر غير المُنتجة.

2- مايُقارب من خُمس البشرية (1.1 بليون نسمة) متأثرة بالفقر.

3- مايقارب من 852 مليون نسمة يعيشون تحت خط الفقر وأغلبهم من دول العالم الثالث.

4- هناك 38 بلداً تصلهم مُساعدات غذائية إنسانية منها 25 بلداً افريقياً.

وعلى مُستوى الكرة الأرضية فقد شغلت المحاصيل الزراعية التي خضعت بطريقة أو أُخرى الى تعديل وراثي مايُقارب من 102 مليون هكتار في عام 2006 إذ زُرعت المحاصيل المُحورة وراثياً من قبل 10.3 مليون مزارع موزعين على 22 بلداً (11 من الدول المتقدمة و11 من دول العالم الثالث). وبنظرة أعمق ومُتابعة أدق الى إنتشار المحاصيل المُنتجة بطرائق التقانات الأحيائية وحسب إحصائيات مُنظمة الزراعة الدولية (FAO)، يُلاحظ بأن المساحة المزروعة من تلك المحاصيل قد زادت من 1.7 هكتار لعام 1996 لتصل الى 90 مليون هكتار في عام 2005 أي بزيادة مقدارها 50 مرة. ومع هذا لم ينخفض مُستوى الفقر في العالم الى ما كان مُخطط له في عام 1996 في قمة الغذاء العالمية وكما أُشير اليه آنفاً. والحقيقة الأُخرى والتي تُمثل حجر الزاوية في هذا المجال ان مُقدار العائدات المُتحققة للمزارعين نتيجة تبنيهم الأصناف الجديدة والمُنتجة بطرائق التقانات الأحيائية ولعام 2005 وصلت الى 13 بليون دولار وأغلبهم في دول العالم الثالث. ويُعد ذلك مؤشراً إيجابياً في رفع المُستوى المعاشي للمزارعين المُتبنين لهذا النوع من المحاصيل ويُعد ذلك مؤشراً إيجابياً في رفع المُستوى المعاشي للمزارعين المُتبنين لهذا النوع من المحاصيل الزراعية. ورافق ذلك إنخفاضاً في نسبة التلوث البيئي بلغ 14% نتيجة تبني أصنافاً جديدة مُقاومة للآفات ولِمُبيدات الحشائش مما قلل من إستعمال المُبيدات. وفي عام 2006، لم تقتصر زراعة المحاصيل المُحورة وراثياً في دول العالم الثالث بل تبنتها دول أوربية كثيرة وشُرعت القوانين اللآزمة لإنتاجها مثل المانيا، فرنسا، أسبانيا، البرتغال، جمهورية الجيك وسلوفاكيا.

التجربة الرائدة لدولة جنوب افريقيا The pioneer experiment of South Africa

كانت دولة جنوب أفريقيا رائدة في تبني زراعة وإكثار المحاصيل المُنتجة بالتقانات الأحيائية فبدأت بزراعتها وعلى نطاق تجاري منذ 1997. إزدادت المساحة المزروعة بشكل مُضطرد من 197000 هكتار

عام 2001 لتصل الى 1.4 مليون هكتار في عام 2006. تنتج جنوب أفريقيا وتُصدر قطن Bt وذرة صفراء Bt (بكلا اللونين الأصفر والأبيض) إضافةً الى فول الصويا ليزداد دخل المزارعين بمُقدار 76 مليون دولار للفترة 1998-2005. وحسب المعلومات التي توافرت لدينا ولحد عام 2003 فدولة جنوب أفريقيا ينتشر فيها 106 مُنظمة بحثية ذات علاقة بنشاطات التقانات الأحيائية. ويضم البلد 622 مجموعة بحثية تزاول نشاطاتها في هذا المجال. وأنتجت جنوب أفريقيا ما لايقل عن 154 منتوج أو خدمة دخلت التقانات على الأقل في أحد مراحلها. وزاد البلد من مساحاته الخضراء اذ أنتج البلد أكثر من 20 مليون شتلة صنوبر ويوكالبتوس بطرائق الزراعة النسيجية كما وأنتج أكثر من 20 مليون نبات موز وبنفس التقانة أعلاه. يعمل مايُقارب من 70% من الشعب في الزراعة لتُشكل المُنتجات الزراعية ما قيمته 40% من صادرات أفريقيا مُجتمعة. ولابُد من الإشارة الى بعض النواحي التي وظفها البلد كي تستفيد منها بُلدان المنطقة ومنها جمهورية العراق. واجه المزارعون الأفارقة عموماً وجنوب أفريقيا خاصة مشاكل مُعقدة ومُتداخلة وإستنتجوا بأنها لاتُحل من خلال تبني إستراتيجية مُفردة بل يكمن الحل بتبني خيارات مُختلفة ومُترابطة. علاوةً على أن الطرائق الكلاسيكية في تحسين المحاصيل وحدها لم تعد كافية لتضييق أو ردم الفجوة في نُقص الغذاء والقضاء على الفقر. أنطلقت سياسة دولة جنوب أفريقيا بعد تبنيها إستراتيجيات مُتعددة الأوجه لتركز على غذاء الإنسان وغذاء الحيوان وإنتاج الألياف (صناعة الملابس) وإنتاج الوقود الحيوي (وفي الغالب من المُخلفات النباتية). إتبعت الدولة سياسة زراعية مُتكاملة مع كل ما يرتبط بها من أوجه الحياة والتي إشتملت على إدارة زراعية نزيهة، تحسين البُنية التحتية، تعليم وتثقيف المزارعين، تحسين نوعية البذور ومُراعاة الوسائل المضمونة في إيصالها للمزارعين في الوقت المُناسب، سياسة تسويق زراعي صحيحة مع تبني كل ما هو جديد ومُنتج بوسائل التقانات الحديثة.

مؤتمر الأطراف في الاتفاقية المتعلقة بالتنوع البيولوجي

العامل كاجتماع للأطراف في بروتوكول

قرطاجنة للسلامة الأحيائية

الاجتماع الخامس

ناغويا، اليابان، 11-15 أكتوبر/تشرين الأول 2010

تقرير الاجتماع الخامس لمؤتمر الأطراف في اتفاقية التنوع البيولوجي العامل كاجتماع للأطراف في بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية

المحتويات **الصفحة**

مقدمة **Error! Bookmark not defined.**

ألف- خلفية **Error! Bookmark not defined.**

باء- الحضور **Error! Bookmark not defined.**

أولا- المسائل التنظيمية **Error! Bookmark not defined.**

البند 1- افتتاح الاجتماع **Error! Bookmark not defined.**

1-1 البيان الافتتاحي للسيد وولفغانغ كويهلر لألمانيا يلقيه بالنيابة عن السيدة جوليا كلويكنر وزير الدولة للشؤون البرلمانية في وزارة الأغذية والزراعة وحماية المستهلك الاتحادية في ألمانيا ورئيسة مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطرف **Error! Bookmark not defined.**

2-1 البيان الافتتاحي للسيد ميشيهيكو كانو وزير الزراعة والغابات ومصايد الأسماك في حكومة اليابان والرئيس الجديد لمؤتمر الأطراف**Error! Bookmark not defined.**

3-1 البيان الافتتاحي للسيد ماساكي كاندا حاكم مقاطعة أيشي **Error! Bookmark not defined.**

4-1 البيان الافتتاحي للسيد تاكاشي كاوامورا عمدة مدينة ناغويا **Error! Bookmark not defined.**

5-1 البيان الافتتاحي للسيد اكيم شتاينر المدير التنفيذي لبرنامج الأمم المتحدة للبيئة **Error! Bookmark not defined.**

6-1 البيان الافتتاحي للسيد أحمد جغلاف الأمين التنفيذي لاتفاقية التنوع البيولوجي

7-1 البيانات الافتتاحية للأطراف والمراقبين

8-1 العرض

البند 2- تنظيم الاجتماع

1-2 انتخاب أعضاء المكتب **Error! Bookmark not defined.**

2-2 إقرار جدول الأعمال

3-2 تنظيم العمل

البند 3- تقرير عن أوراق تفويض الممثلين إلى الاجتماع الخامس لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول

البند 4- تقرير لجنة الامتثال 591

البند 5- تشغيل غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية وأنشطتها 591

البند 6- حالة أنشطة بناء القدرات واستعمال قائمة خبراء السلامة الأحيائية 591

البند 7–المسائل المتعلقة بالآلية المالية والموارد 591

البند 8- التعاون مع المنظمات والاتفاقيات والمبادرات الأخرى

البند 9- تقرير الأمين التنفيذي عن إدارة شؤون البروتوكول وشؤون الميزانية

ثالثا- القضايا الموضوعية الناشئة عن برنامج العمل المتوسط الأجل وعن المقررات السابقة الصادرة عن مؤتمر الأطراف في البروتوكول **Error! Bookmark not defined.**

البند 10 – المناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية (المادة 18) 591

البند 11- حقوق و/أو التزامات الأطراف في حالة المرور العابر للكائنات الحية المحورة 591

البند 12- المسؤولية والجبر التعويضي (المادة 27) 591

البند 13- تقييم المخاطر وإدارة المخاطر (المادتان 15 و16) 591

البند 14- التوعية العامة والمشاركة (الفقرة 1 من المادة 23) 591

البند 15- الرصد وتقديم التقارير (المادة 33) 591

البند 16- التقييم والاستعراض (المادة 35)

البند 17- الخطة الاستراتيجية للبروتوكول وبرنامج عمل مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول 591

رابعا- شؤون ختامية **Error! Bookmark not defined.**

البند 18- مسائل أخرى **Error! Bookmark not defined.**

البند 19- موعد ومكان الاجتماع السادس لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول

البند 20- اعتماد التقرير **Error! Bookmark not defined.**

البند 21- اختتام الاجتماع **Error! Bookmark not defined.**

البند 4- تقرير لجنة الامتثال

البند 5- تشغيل غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية وأنشطتها

البند 6- حالة أنشطة بناء القدرات واستعمال قائمة خبراء السلامة الأحيائية

البند 7– المسائل المتعلقة بالآلية المالية والموارد

البند 10 – المناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية (المادة 18)

البند 11- حقوق و/أو التزامات الأطراف في حالة المرور العابر للكائنات الحية المحورة

البند 12- المسؤولية والجبر التعويضي (المادة 27)

البند 13- تقييم المخاطر وإدارة المخاطر (المادتان 15 و16)

البند 14- التوعية العامة والمشاركة (الفقرة 1 من المادة 23)

البند 15- الرصد وتقديم التقارير (المادة 33)

البند 17- الخطة الاستراتيجية للبروتوكول وبرنامج عمل مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول

برنامج العمل بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بنقل ومداولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن (2011-2015)

العنصر البرنامجي 1:

بناء القدرات اللازمة لتعزيز التوعية العامة والتثقيف والمشاركة

الغاية: تدعيم قدرات الأطراف المؤسسية والتقنية من أجل تعزيز وتيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن

الأهداف التشغيلية	النتائج المتوقعة	المؤشرات	الأنشطة المقترحة	الإطار الزمني	الأطراف الفاعلة
1-1 وضع أطر وآليات تمكينية قانونية و/أو سياساتية من أجل تيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن	• تحسين مستوى فهم الاحتياجات القطرية والتدابير اللازمة لتلبية هذه الاحتياجات • تحسين مستوى الكفاءة الوطنية في مجال القضايا المتصلة بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة • بناء الوعي بين صناع القرار بشأن أهمية	• عدد الأطراف التي وضعت أطرا سياساتية وقانونية بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة • عدد الأطراف التي تمتلك استراتيجيات توعية و/أو خطط اتصال منفذة	(أ) تقييم الأطر والآليات والهياكل التنظيمية القائمة وذات الصلة بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة، والاستفادة منها فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة	في غضون العام الأول	• الأطراف (نقاط الاتصال الوطنية) • المنظمات ذات الصلة
			(ب) تقييم الاحتياجات الوطنية فيما يتعلق	في غضون العام الأول	• الأطراف

	المشاركة العامة في عملية صنع القرارات، • آليات/منهجيات مرتبطة بإدراج عامة الناس في عمليات صنع القرار فيما يرتبط بالكائنات الحية المحورة المنشأة، • إجراء دراسات و/أو استقصاءات لتحديد احتياجات الأطراف فيما يتعلق بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة • تنفيذ الأطراف وغيرها من أصحاب المصلحة المعنيين لاستراتيجيات الترويج/خطط الاتصال المتعلقة بالسلامة الأحيائية		بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة وتحديد التدابير اللازمة لتلبية هذه الاحتياجات		
			(ج) إنشاء أو تعزيز أطر سياساتية وقانونية لتيسير سبل التوعية العامة والوصول إلى المعلومات	في غضون العام الأول إلى العام الثاني	• الأطراف
			(د) إعداد وتنفيذ استراتيجيات التوعية و/أو خطط الاتصال	في غضون العام الأول إلى العام الثالث	• الأطراف • الحكومات الأخرى • المنظمات ذات الصلة

	• وضع قوانين وطنية ذات صلة بالمادة 23				
2-1وضع آليات مؤسسية لتيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة	• وضع هياكل وترتيبات إدارية وظيفية لتيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة • تحديد الأدوار والمسؤوليات المؤسسية في مجال التوعية العامة والتثقيف والمشاركة • وضع إجراءات وآليات مؤسسية من أجل وصول الجمهور إلى المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية • تحديد وإنشاء مبادرات	• عدد الأطراف التي تمتلك وحدات أو إدارات أو هياكل مؤسسية أخرى كلفت بتعزيز التوعية العامة والتثقيف والمشاركة • عدد الأطراف المشتركة في الأنشطة التعاونية • عدد الأطراف التي لديها آليات	(أ) تعيين نقاط الاتصال من بين السلطات الوطنية المسؤولة عن تعزيز عمليات التوعية العامة والتثقيف والمشاركة والإشراف عليها	في غضون العام الأول	• الأطراف
			(ب) إنشاء وحدات ترويج ومراكز إعلامية وخدمات أخرى في مجال التوعية على المستوى الوطني والاستفادة مما هو قائم منها	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث	• الأطراف • المنظمات ذات الصلة

	بناء القدرات من أجل تطوير الهياكل الإدارية • زيادة مستوى التفاهم والتعاون مع الاتفاقات والعمليات الدولية ذات الصلة	مؤسسية ذات أداء فعال و/أو ذات التمويل المخصص لتحسين الآليات المؤسسية	(ج) إنشاء لجان استشارية تشمل ممثلين عن مختلف القطاعات العامة، بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة والاستفادة مما هو قائم منها	في غضون العام الأول إلى العام الثالث	• الأطراف
			(د) تشجيع التعاون مع الاتفاقات والعمليات الدولية ذات الصلة التي تشارك في عمليات التوعية العامة والتثقيف والمشاركة (مثل اتفاقية آرهوس، وبرنامج العمل بشأن الاتصال والتثقيف	مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي • المنظمات ذات الصلة

			والتوعية العامة في إطار اتفاقية التنوع البيولوجي)		
			(هـ) حشد الموارد المالية لتنمية القدرات المؤسسية	مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي • المنظمات ذات الصلة
3-1تنمية القدرات المهنية للموظفين المشتركين في تشجيع التوعية العامة والتثقيف	• تحديد الخبراء في مجال التثقيف بالسلامة الأحيائية والاتصال وإضافتهم إلى قائمة الخبراء	• عدد الخبراء في مجال التثقيف بالسلامة الأحيائية المرشحين في	(أ) تحديد الخبراء المعنيين بالتثقيف والاتصال في مجال السلامة الأحيائية وإضافتهم إلى قائمة	مستمر	• الأطراف

والمشاركة فيما يتعلق بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن	• زيادة عدد المعلمين أو القائمين بالاتصال في مجال السلامة الأحيائية على مختلف المستويات • إتاحة أدوات دعم (بما في ذلك مجموعة أدوات التوجيه، وكتيبات أفضل الممارسات وغيرها) على نطاق واسع • تقديم الدعم المستمر والتوجيه للمعلمين أو القائمين بالاتصال في مجال السلامة الأحيائية	قائمة الخبراء • عدد البرامج التعليمية، بما في ذلك الدورات الأكاديمية، ذات المكونات المتعلقة بالسلامة الأحيائية • عدد الدورات التدريبية، ومواد التوجيه، وغيرها من الأنشطة الداعمة في مجال بناء القدرات المهنية	الخبراء.		
			(ب) وضع برامج تدريب وإتاحتها للمعلمين أو القائمين بالاتصال في مجال السلامة الأحيائية على المستويات العالمي والإقليمي والوطني	مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية • المنظمات ذات الصلة
			(ج)إنشاء و/أو استخدام نظام لتيسير وضع وتبادل مواد التدريب والتوجيه المتعلقة بالسلامة الأحيائية بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة، بما في ذلك مجموعة الأدوات، وأدوات مساعدة ونماذج	في غضون العام الثاني إلى العام الرابع	• الأطراف • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي

			للتدريب (مثلا استخدام غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية لتيسير عملية التبادل)		
			(د) تشجيع التبادلات المهنية والتعاون والمنح الدراسية للموظفين المشتركين في تعزيز التوعية العامة والتثقيف والمشاركة	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث؛ مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • المنظمات ذات الصلة
			(هـ) تشجيع الاستخدام الفعال لوسائط الإعلام في الترويج لبرامج التوعية العامة والتثقيف، بما في ذلك وضع استراتيجيات/خطط وطنية، وتحسين مستوى التغطية الإعلامية لقضايا السلامة	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث؛ مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • المنظمات ذات الصلة

			الأحيائية، وإجراء الأنشطة المتعلقة بالصحافة والتدريب		
4-1تشجيع التعاون وتبادل الخبرات ومواد الموارد بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة	• وضع آليات للتعاون وتبادل المعلومات بين البلدان والمناطق فيما يتعلق بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة • إقامة شبكات لتيسير التبادل المستمر للخبرات والدروس المستفادة • توثيق وتبادل أفضل الممارسات والدروس المستفادة في مجال التوعية العامة (مثلا من خلال مركز موارد معلومات السلامة الأحيائية والموارد	• عدد الأطراف التي تستخدم آليات وخطط لتبادل الخبرات في مجال التوعية العامة والتثقيف والمشاركة • عدد دراسات الحالات الإفرادية وغيرها من المواد المتعلقة التوعية العامة والتثقيف والمشاركة التي تسنى إنتاجها وتبادلها من خلال	(أ) تحديد وتوثيق وتبادل دراسات الحالة المتعلقة بأفضل الممارسات والدروس المستفادة والمتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية لأغراض التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة	في غضون العام الأول؛ مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • المنظمات ذات الصلة • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي
			(ب) استخدام غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية لتبادل المعلومات	مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى

	الوطنية) • تحسين المهارات/المعارف المتعلقة باستخدام أدوات التوعية	غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية • عدد الشبكات المقامة و/أو المستخدمة لأغراض تبادل المعلومات والمواد • عدد الجهات التي تتبادل المعلومات من الأطراف وأصحاب المصلحة الآخرين في قطاعات مختلفة • عدد المنظمات غير الحكومية حسب البلد والإقليم التي	المتعلقة بأفضل الممارسات والدروس المستفادة لأغراض التوعية العامة والتثقيف والمشاركة		• المنظمات ذات الصلة
			(ج)تقاسم الخبرات بشأن استخدام أدوات الاتصال المختلفة (مثل المواد المطبوعة، وبرامج الإذاعة والتلفزيون، والصحف، والعروض الثقافية للترويج في المجتمعات)	مستمر	• الأطراف • الحكومات الأخرى • المنظمات ذات الصلة
			(د) إقامة شبكات وتشغيلها وتنظيم منتديات (مثل المنتديات على الإنترنت وقوائم النشر) من أجل تيسير تبادل	في غضون العام الثاني إلى العام الخامس؛	• الأطراف • الهيئات الإقليمية

		تقوم بأعمال التوعية فيما يتعلق بالبروتوكول	المعلومات والخبرات والدروس المستفادة بشأن النهوج الوطنية المتعلقة بالتوعية العامة والتثقيف والمشاركة (مثل غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية، والوحدات الوطنية أو الإقليمية أو المحلية)	مستمر	
			(هـ) إنشاء آليات و/أو استخدام الآليات الموجودة لتيسير إعداد وتبادل مواد التثقيف والتوعية بالسلامة الأحيائية وتكييفها للسياقات المحلية	في غضون العام الثاني إلى العام الخامس	• مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في اتفاقية التنوع البيولوجي
			(و) تحديد وتشجيع أوجه التآزر الممكنة في مجال تطبيق	في غضون العام الأول	• الأطراف

			الأدوات ذات الصلة وآليات تبادل المعلومات، حسب الاقتضاء، وهي الأدوات التي وضعت بموجب محافل أخرى مثل تعديل ألماتي لاتفاقية آرهوس، ومبادئ لوكا التوجيهية بشأن الوصول إلى المعلومات والمشاركة العامة والحصول على العدالة فيما يتعلق بالكائنات المحورة جينيا	إلى العام الثالث؛ مستمر	
			(ز) إعداد سجل بالمنظمات غير الحكومية التي تقوم بأعمال ترويجية ترتبط ارتباطا وثيقا بالبروتوكول، مثل غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ووحداتها الوطنية	في غضون العام الأول إلى العام الثاني	• الأطراف • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي

العنصر البرنامجي 2: التوعية العامة والتثقيف					
الغاية: تعزيز التوعية العامة والتثقيف على نطاق واسع بالقضايا المتعلقة بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن					
الأهداف التشغيلية	**النتائج المتوقعة**	**المؤشرات**	**الأنشطة المقترحة**	**الإطار الزمني**	**الأطراف الفاعلة**
2-1 تشجيع التوعية العامة فيما يتعلق بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن	• تقرير استقصائي تقدمه الأطراف فيما يتعلق بمستوى التوعية العامة • خطط وبرامج وطنية بشأن التوعية العامة • إبرام اتفاقات بين أصحاب حقوق التأليف والنشر والأمانة والأطراف المهتمة بالأمر	• عدد كبير من الناحية الإحصائية للردود المقدمة على الاستقصاءات بنهاية عام 2011 • عدد الخطط والبرامج الوطنية التي توضع في مجال التوعية	(أ) إجراء استقصاءات خط الأساس للتأكد من مستوى التوعية العامة وتقييم وعي الجمهور بالقضايا المتعلقة بالكائنات الحية المحورة. ويمكن للأطراف توسيع نطاق الاستقصاء استنادا إلى الأولويات والاحتياجات الوطنية	في غضون العام الأول	• الأطراف • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي لوضع أشكال الاستقصاء في لغات مختلفة
			(ب) وضع وتنفيذ خطط و/أو برامج للتوعية العامة تأخذ في الحسبان نتائج الاستقصاءات	في غضون العام الثالث؛ مستمر	• الأطراف • المنظمات ذات الصلة

	• وضع الأطراف لنظام يكفل نشر المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية • عقد حلقات دراسية وحلقات عمل بشأن التوعية العامة • إشراك وسائط الإعلام بشكل نشط في مجال التوعية العامة والتثقيف بالسلامة الأحيائية • ترجمة البروتوكول والمواد الأخرى المتعلقة بالسلامة الأحيائية إلى اللغات المحلية	العامة بنهاية عام 2013 • عدد برامج التعاون والتنسيق والأنشطة الأخرى القائمة • عدد ما يصدر وينشر من مطبوعات ومواد أخرى • الإتاحة العامة للرسوم التصويرية	(ج)تنظيم أحداث ودورات للتنسيق الوطني بشأن التوعية العامة مع مشاركة مختلف القطاعات الوطنية	مستمر	• الأطراف • المجتمع المدني والصناعة والأوساط الأكاديمية، الخ • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي
			(د) حفز التعاون والتنسيق بشأن أنشطة التوعية العامة والتثقيف مع الحكومات، والمنظمات، ووكالات الأمم المتحدة، والمجتمع المدني والصناعة والأوساط الأكاديمية والجمهور	مستمر	• الأطراف • المجتمع المدني والصناعة والأوساط الأكاديمية، الخ

	• استخدام برامج الاتصال المتعلقة بالسلامة الأحيائية لمجالي الفن والثقافة	والمواد في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية • عدد الأطراف التي ستكون قد وضعت نظما لنشر المعلومات بحلول عام 2015 • عدد أنشطة وسائط الإعلام • عدد			• أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي
			(هـ) إنتاج ونشر مواد التوعية بالسلامة الأحيائية (مثل النشرات الإخبارية والمعلومات المتعلقة بالقوانين)، وإتاحة الرسوم التصويرية المصممة لجمهور مستهدف والتي ليست خاضعة لحقوق الطبع والنشر بالمجان واستخدامها في أنشطة التوعية العامة والتثقيف	مستمر	• الأطراف، وخبراء الاتصال في مجال السلامة الأحيائية • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي
			(و) إنشاء نظم لتيسير الإعلان في الوقت المناسب (مثلا في الصحف، والبلديات/لوحات الإعلان العامة، والمكتبات العامة، ومواقع الإنترنت الوطنية، ووسائل أخرى) عن التجارب	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث؛ مستمر	• الأطراف، والسلطات المختصة

		الأطراف التي ترجمت البروتوكول والمواد الأخرى إلى اللغة الرسمية واللغات المحلية	الميدانية للكائنات الحية المحورة وإطلاقها تجاريا وفقا للتشريعات الوطنية		
			(ز) تنظيم حلقات دراسية وحلقات عمل للتوعية العامة في مجال السلامة الأحيائية لجمهور مستهدف، بما في ذلك نشر العروض التقديمية والمواد	مستمر	• الأطراف، والسلطات المسؤولة • المنظمات ذات الصلة
			(ح) تشجيع استخدام وسائط الإعلام لتعزيز التوعية بالسلامة الأحيائية	مستمر	• الأطراف • وسائط الإعلام
			(ط) ترجمة البروتوكول ومواد التوعية بالسلامة الأحيائية إلى اللغات الوطنية والمحلية و/أو استخدام العروض البصرية للبروتوكول	في غضون العام الثالث إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المجتمع المدني
			(ي) تشجيع استخدام استراتيجيات	مستمر	• الأطراف،

			الاتصال الاجتماعي، مثل الفن والثقافة		والسلطات ذات الصلة
2-2 تشجيع التثقيف فيما يتعلق بالنقل، والمناولة والاستخدام على نحو آمن للكائنات الحية المحورة من خلال المؤسسات الأكاديمية الرسمية	• إدماج قضايا السلامة الأحيائية في المناهج الدراسية • تقديم العديد من المؤسسات الأكاديمية لبرامج/دورات بشأن السلامة الأحيائية • إتاحة حزم تثقيفية، بما في ذلك وحدات للتعلم الإلكتروني، بشأن السلامة الأحيائية للمدارس والجمهور، بما في ذلك لأغراض	• عدد المناهج الدراسية التي أدرجت قضايا السلامة الأحيائية • عدد البرامج/الدورات الأكاديمية التي تتضمن قضايا السلامة الأحيائية • عدد وحدات التعلم	(أ) إدماج السلامة الأحيائية في المناهج الدراسية والبرامج التعليمية في مستويات مختلفة من التعليم الرسمي	في غضون العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية
			(ب) تشجيع الجامعات والمؤسسات التعليمية الأخرى على تقديم برامج أكاديمية، بما في ذلك الدورات التثقيفية المتواصلة بشأن السلامة الأحيائية والتواصل المتعلق بالسلامة الأحيائية	مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية
			(ج)وضع حزم تثقيفية بشأن السلامة الأحيائية للمدارس والمعاهد الرسمية للتعليم والبحوث من أجل تشجيع التوعية والتثقيف بقضايا السلامة الأحيائية	في غضون العام الثاني إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية

	الترفيه وإقامة الشبكات • توفير المكتبات والمؤسسات التعليمية لطائفة واسعة من المواد التثقيفية والترويجية بشأن السلامة الأحيائية • إشراك المجتمع المدني في تعزيز التوعية والتثقيف بالسلامة الأحيائية	الإلكتروني التي أعدت • عدد المواد والحزم التثقيفية المتاحة بشأن السلامة الأحيائية • عدد الأحداث التثقيفية بالتعاون مع المؤسسات التعليمية	(د) وضع وحدات تعلم إلكترونية بشأن السلامة الأحيائية لجميع المستويات التعليمية	في غضون العام الثاني إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية
			(هـ) ضمان تقديم المكتبات والمعاهد التعليمية لطائفة واسعة من المواد التثقيفية ذات الصلة وأنشطة ترويجية في مجال السلامة الأحيائية	في غضون العام الثالث إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المؤسسات التعليمية
			(و) تشجيع التعاون الرسمي وغير الرسمي مع المؤسسات التعليمية من أجل رفع الوعي ووضع أنشطة تثقيفية مشتركة	في غضون العام الثالث إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف • المجتمع المدني

العنصر البرنامجي 3: إمكانية وصول الجمهور إلى المعلومات

الغاية: تحسين إمكانية وصول الجمهور إلى المعلومات المتعلقة بنقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة على نحو آمن

الأهداف التشغيلية	**النتائج المتوقعة**	**المؤشرات**	**الأنشطة المقترحة**	**الإطار الزمني**	**الأطراف الفاعلة**
3-1 تشجيع إمكانية وصول الجمهور إلى المعلومات على نحو واسع وسهل وفي الوقت المناسب، بما في ذلك من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية وآليات أخرى	• سهولة عثور الجمهور معلومات صحيحة عن السلامة الأحيائية ومواد تثقيفية وحصولهم عليها بسهولة من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ومواقع الإنترنت الوطنية	• عدد الأطراف التي وضعت إجراءات من أجل وصول الجمهور إلى المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية • عدد	(أ) إبلاغ الجمهور بحقه، بموجب البروتوكول، في الوصول إلى المعلومات المتاحة في أشكال مكتوبة وإلكترونية وفي غيرها من الأشكال	مستمر	• الأطراف • المجتمع المدني • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي
			(ب) إبلاغ الجمهور بالوسائل المتاحة التي تساعد على الوصول إلى المعلومات في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية والعقد	مستمر	• الأطراف • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي

	وآليات أخرى	الأطراف	الوطنية وآليات أخرى		
	• الاستجابة لمطالب الجمهور المتعلقة بالوصول إلى معلومات صحيحة عن السلامة الأحيائية خلال فترة زمنية معقولة	التي تمتلك عقدا تابعة لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية أو مواقع شبكية تعنى بالسلامة الأحيائية	(ج)إقامة و/أو تحسين البنية التحتية اللازمة لتيسير فتح باب وصول الجمهور إلى المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية (مثل مواقع الإنترنت الوطنية، والعقد الوطنية التابعة لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية)	في غضون العام الثاني إلى العام الرابع؛ مستمر	• الأطراف
	• إتاحة مواد إعلامية بلغات مختلفة وفي أشكال سهلة الاستخدام	• عدد المواد الإعلامية المتاحة بلغات مختلفة	(د) وضع نظم إنذار في مجال المعلومات من أجل توجيه الجمهور إلى المعلومات الجديدة المتاحة	في غضون العام الثاني إلى العام الرابع؛	• الأطراف
	• يمكن للجمهور الوصول إلى معلومات متعددة عن السلامة الأحيائية عن طريق الإنترنت		(ه) وضع إجراءات لإتاحة المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية لعامة الجمهور بما يتوافق مع القوانين والالتزامات الوطنية بموجب البروتوكول، بما في ذلك الفقرة 6 من المادة 21	في غضون العام الأول؛ مستمر	• الأطراف • أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي

	أو غيرها من الوسائل غير الإلكترونية				

العنصر البرنامجي 4: المشاركة العامة

الغاية: تعزيز المشاركة العامة في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة

الأهداف التشغيلية	**النتائج المتوقعة**	**المؤشرات**	**الأنشطة المقترحة**	**الإطار الزمني**	**الأطراف الفاعلة**
4-1 وضع آليات وإجراءات لمشاورة الجمهور وإشراكه في عملية صنع القرارات المتعلقة بالكائنات المحورة وإتاحة نتائج هذه	• تحديد ووضع آليات ونقاط دخول للمشاركة العامة • تحديد/توضيح دور الجمهور في عملية صنع القرارات • ضمان القانون لحق	• عدد الهياكل التنظيمية التي تتضمن إشارة واضحة إلى المشاركة العامة • عدد الأطراف التي	(أ) وضع أو تعزيز الأطر القانونية اللازمة لتيسير المشاركة العامة في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات المحورة، مع مراعاة المعلومات	في غضون العام الأول إلى العام الرابع	• الأطراف • المجتمع المدني

القرارات للجمهور	الجمهور في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة وإعلام الجمهور بهذا الحق • المشاركة الواعية للجمهور والمناسبة من حيث التوقيت في عمليات صنع القرارات • وضع ضمانات تكفل مشاورة/مشاورة الجمهور بشكل منتظم وشفاف وهادف • ضمان القوانين الوطنية المتعلقة بالسلامة الأحيائية لحق الجمهور في المشاركة في صنع القرارات المتعلقة	تمتلك آليات للمشاركة العامة • عدد الأطراف التي تمتلك آلية لاستعراض المشاركة العامة، بما في ذلك نتائج المشاورات مع الجمهور • عدد الأفراد المشاركين في منتديات ومنابر النقاش وغيرها من الآليات المقامة • عدد الأطراف التي أشركت الجمهور في وضع	السرية		
			(ب) وضع آليات مؤسسية وإدارية لتيسير المشاركة العامة في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة	في غضون العام الأول إلى العام الثالث	• الأطراف • المجتمع المدني
			(ج)وضع آليات لإخطار الجمهور، في الوقت المناسب وبطريقة فعالة، عن المشاورات العامة المزمع تنظيمها وفرص المشاركة في صنع القرارات المتعلقة بالتطبيقات الجديدة للكائنات الحية المحورة (مثل	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث	• الأطراف

	بالكائنات الحية المحورة • القوانين الوطنية المتعلقة بالسلامة الأحيائية تتطلب إشعارا عاما وتعليقا على التطبيقات فيما يتعلق باستيراد الكائنات الحية المحورة والإفراج عنها • تخصيص الأموال لإشراك الجمهور في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة • توسيع نطاق دعم الجمهور للبروتوكول • إشراك الأطراف وأصحاب المصلحة	واستعراض أطرها القانونية للسلامة الأحيائية • عدد الأطراف التي لديها ميزانيات مخصصة لمشاركة الجمهور • عدد الأطراف التي تراعي نتائج المشاركة العامة عند النظر في صنع قرارات متعلقة بالكائنات الحية المحورة • عدد الأطراف التي	الإعلانات على مواقع الإنترنت الوطنية والصحف المحلية والمحافل والقوائم البريدية)		
			(د) وضع إجراءات تشغيلية لتوجيه عملية المشاركة العامة	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث	• الأطراف • المجتمع المدني
			(هـ) إقامة منابر (مثل جلسات الاستماع العامة، والمنتديات الإلكترونية، والقوائم البريدية) لتيسير تعليقات وردود أفعاله وطعونه المتعلقة بتطبيقات التجارب الميدانية والإعلانات التجارية	في غضون العام الثاني إلى العام الثالث؛ مستمر	• الأطراف

	الآخرين للجمهور بشكل استباقي • عكس/النظر بشكل كاف في التعليقات والآراء التي يقدمها الجمهور في القرارات المتخذة بشأن الكائنات الحية المحورة • إتاحة إسهامات الجمهور في الوقت المناسب • إضفاء طابع الشفافية على المشاورات العامة، وكذلك الموثوقية، والتوازن وتوفير الدعم القانوني لها	تجري مشاورات عامة	(و) وضع أو تعزيز آليات/هيئات لرصد وحفز المشاورة العامة والمشاركة العامة بشكل منتظم وشفاف وموضوعي	في العام الثالث إلى العام الخامس؛ مستمر	• الأطراف
			(ز) تشجيع المبادرات التعاونية لتدريب صانعي القرارات على استعمال نتائج المشاركة العامة، بما في ذلك تحديد مدخلات الجمهور في القرارات المتخذة	مستمر	• الأطراف
			(ح) إتاحة الموارد اللازمة لمشاركة الجمهور في عملية صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة	مستمر	• الأطراف
			(ط) إعلام الجمهور بحقه في المشاركة في عمليات صنع	مستمر	• الأطراف

		القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة			

-

التقرير الوطني الثاني بشأن تنفيذ بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية

منشأ التقرير

1. البلد:	[يرجى إدخال نصك هنا]

موظف الاتصال المسؤول عن التقرير

2. اسم موظف الاتصال:	[يرجى إدخال نصك هنا]
3. عنوان وظيفة موظف الاتصال:	[يرجى إدخال نصك هنا]
4. المنظمة	[يرجى إدخال نصك هنا]
5. عنوان المراسلة:	[يرجى إدخال نصك هنا]
6. الهاتف:	[يرجى إدخال نصك هنا]
7. الفاكس	[يرجى إدخال نصك هنا]
8. البريد الإلكتروني:	[يرجى إدخال نصك هنا]
9. المنظمات/أصحاب المصلحة الذين تم استشارتهم أو اشتركوا في إعداد هذا التقرير	[يرجى إدخال نصك هنا]

التقديم

10. تاريخ التقديم [يرجى إدخال نصك هنا]

11. الفترة المشمولة بهذا التقرير: [يرجى إدخال نصك هنا]

توقيع الموظف المسؤول عن الإبلاغ[1]

____

12. هل بلدك أحد الأطراف في بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا
13. إذا كانت إجابتك *لا* على السؤال 12، هل هناك عملية وطنية قائمة كي يصبح البلد طرفا فيه؟	☐ نعم ☐ لا ☐ لا ينطبق
14. يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل: *[يرجى إدخال نصك هنا]*	

المادة 2 - أحكام عامة

15. هل أدخل بلدك التدابير القانونية والإدارية وغيرها من التدابير اللازمة لتنفيذ البروتوكول؟	☐ يوجد إطار تنظيمي محلي كامل ☐ يوجد إطار تنظيمي محلي غير كامل ☐ لم توضع إلا تدابير مؤقتة فقط ☐ لا يوجد إلا مشروع إطار ☐ لم تتخذ تدابير بعد
16. ما هي الأدوات القائمة لتنفيذ الإطار الوطني للسلامة الأحيائية في بلدك؟	☐ قانون وطني واحد أو أكثر بشأن السلامة الأحيائية ☐ لائحة وطنية واحدة أو أكثر بشأن السلامة الأحيائية ☐ مجموعة واحدة أو أكثر من المبادئ التوجيهية بشأن السلامة الأحيائية ☐ القوانين أو اللوائح أو المبادئ التوجيهية الأخرى التي تطبق على السلامة الأحيائية على نحو غير مباشر ☐ لا توجد أدوات قائمة
17. هل أنشأ بلدك آلية لتخصيص أموال من الميزانية لتشغيل الإطار الوطني للسلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا
18. هل لدى بلدك موظفون دائمون لإدارة المهام المتعلقة مباشرة بالإطار الوطني للسلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا

19. إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 18، ما هو عدد الموظفين الدائمين الذين تتعلق مهامهم بصورة مباشرة بالإطار الوطني للسلامة الأحيائية؟	☐	واحد أقل من 5 أقل من 10 أكثر من 10 لا ينطبق
20. هل قدمت الأطر/القوانين/اللوائح/المبادئ توجيهية الخاصة ببلدك إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐	نعم جزئيا لا

21. يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 2 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا [

المادة 5 – المستحضرات الصيدلانية

22. هل ينظم بلدك الحركة العابرة للحدود للكائنات الحية المحورة ومناولتها واستخدامها التي تعتبر من المستحضرات الصيدلانية؟	☐	نعم نعم، إلى حد ما لا
23. إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 22، هل قدمت هذه المعلومات إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐	نعم جزئيا لا لا ينطبق

24. يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 5 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا [

المادة 6- المرور العابر والاستخدام المعزول

25. هل ينظم بلدك المرور العابر للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ لا
26. هل ينظم بلدك الاستخدام المعزول للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ لا
27. إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 25 أو 26، هل قدمت هذه المعلومات إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ جزئيا ☐ لا ☐ لا ينطبق

28. يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 6 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا [

المواد 7 إلى 10 - الاتفاق المسبق عن علم وإدخال الكائنات الحية المحورة عن عمد في البيئة

29. هل اعتمد بلدك قانونا (قوانين)/لوائح/تدابير إدارية لتفعيل الاتفاق المسبق عن علم للبروتوكول؟	☐ نعم ☐ لا
30. هل اعتمد بلدك إطارا تنظيميا محليا يتماشى مع البروتوكول فيما يتعلق بالحركات العابرة للحدود للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ نعم ☐ لا

31. هل أنشأ بلدك آلية لاتخاذ قرارات تتعلق بالحركات الأولى العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐	نعم لا
32. إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 31 هل تنطبق الآلية أيضا على الكائنات الحية المحورة التي لم تخضع إلى حركة عابرة للحدود التي تُدخل عن عمد في البيئة؟	☐ ☐ ☐	نعم لا لا ينطبق
هل أنشأ بلدك آلية لرصد الآثار المحتملة للكائنات الحية المحورة التي تطلق في البيئة؟	☐ ☐	نعم لا
هل لدى بلدك القدرات اللازمة للكشف عن الكائنات الحية المحورة وتحديدها؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، إلى حد ما لا
هل وضع بلدك متطلبات قانونية بموجب ولايته القضائية تشترط على المصدرين إبلاغ السلطة الوطنية المختصة لطرف الاستيراد خطيا قبل الحركة العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة التي تقع في إطار إجراء الاتفاق المسبق عن علم؟	☐ ☐	نعم لا
هل وضع بلدك متطلبات قانونية بشأن دقة المعلومات الواردة في الإخطار؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق أن تلقى بلدك طلبا/إخطارا بشأن الحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐	نعم لا

هل سبق أن اتخذ بلدك قرارا بشأن طلب/إخطار يتعلق بالحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐ ☐	نعم لا لا ينطبق
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 38، ما هو عدد الكائنات الحية المحورة التي وافق عليها بلدك حتى اليوم لاستيرادها من أجل إدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐ ☐ ☐ ☐	لا يوجد أقل من 5 أقل من 10 أكثر من 10 لا ينطبق
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 38، ما هو عدد الكائنات الحية المحورة، غير المستوردة، التي وافق عليها بلدك حتى اليوم لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐ ☐ ☐ ☐	لا يوجد أقل من 5 أقل من 10 أكثر من 10 لا ينطبق
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد الطلبات/الإخطارات التي استلمها بلدك فيما يتعلق بالحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐ ☐ ☐	لا يوجد أقل من 5 أقل من 10 أكثر من 10

في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد القرارات التي اتخذها بلدك فيما يتعلق بالحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة؟	☐	لا يوجد
	☐	أقل من 5
	☐	أقل من 10
	☐	أكثر من 10

إذا كانت إجابتك لا يوجد على السؤال 42، يرجى الانتقال إلى السؤال 50

بالإشارة إلى القرارات المتخذة بشأن الحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة لإدخالها عن عمد في البيئة، هل استلم بلدك إخطارا من طرف (أطراف) التصدير أو من المصدر (المصدرين) قبل الحركة العابرة للحدود؟	☐	نعم، دائما
	☐	في بعض الحالات فقط
	☐	لا
هل اشتملت الإخطارات على معلومات كاملة (كحد أدنى المعلومات المحددة في المرفق الأول ببروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية)؟	☐	نعم، دائما
	☐	في بعض الحالات فقط
	☐	لا
	☐	لا ينطبق
هل أقر بلدك للمخطر باستلام الإخطارات خلال تسعين يوما من الاستلام؟	☐	نعم، دائما
	☐	في بعض الحالات فقط
	☐	لا
	☐	لا ينطبق

هل أبلغ بلدك المخطر (المخطرين) وغرفة تبادل المعلومات بقراره (قراراته)؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ في بعض الحالات فقط، المخطر ☐ في بعض الحالات فقط، غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ لا ☐ لا ينطبق
هل أبلغ بلدك المخطر (المخطرين) وغرفة تبادل المعلومات بقراره (قراراته) في الوقت المحدد (خلال 270 يوما أو خلال الفترة المحددة في الرسالة الموجهة إلى المخطر)؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ لا ☐ لا ينطبق
ما هي النسبة المئوية من قرارات بلدك التي تقع في الفئات التالية؟	[%] الموافقة على الاستيراد بدون شروط [%] الموافقة على الاستيراد بشروط [%] حظر الاستيراد [%] طلب معلومات إضافية [%] تمديد فترة إرسال القرار ☐ لا ينطبق

في الحالات التي وافق فيها بلدك على الاستيراد بشروط أو حظر الاستيراد هل قدم الأسباب التي تستند إليها قراراته إلى المخطر وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ في بعض الحالات فقط إلى المخطر ☐ في بعض الحالات فقط إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ لا ☐ لا ينطبق

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المواد 7-10 في بلدك، بما في ذلك التدابير في حالة غياب اليقين العلمي بشأن الآثار الضارة المحتملة للكائنات الحية المحورة للإدخال عن عمد في البيئة:

[يرجى إدخال نصك هنا *]*

المادة 11 - إجراء بشأن الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز

هل اعتمد بلدك قانونا (قوانين) أو لائحة (لوائح) لصنع القرار المتعلق بالاستخدام المحلي للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز، بما في ذلك طرحها في الأسواق؟	☐ نعم ☐ لا
هل وضع بلدك شروطا قانونية بشأن دقة المعلومات التي يتعين أن يقدمها الطالب؟	☐ نعم ☐ لا

هل أنشأ بلدك آلية لضمان إرسال القرارات المتعلقة الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز التي قد تخضع لحركة عابرة للحدود إلى الأطراف من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ ☐	نعم لا
هل أنشأ بلدك آلية لاتخاذ القرارات بشأن استيراد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ ☐	نعم لا
هل أعلن بلدك من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية أنه في حالة عدم وجود إطار تنظيمي، فإن قراراته المتخذة قبل أول حالة استيراد من الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز ستتخذ وفقا للمادة 11-6 من بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية؟	☐ ☐	نعم لا
هل حدد بلدك احتياجاته من المساعدة المالية والتقنية وبناء القدرات فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق لبلدك أن اتخذ قرارا بشأن الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز (سواء بشأن الاستيراد أو الاستخدام المحلي)؟	☐ ☐	نعم لا

إذا كانت إجابتك لا على السؤال 57، يرجى الانتقال إلى السؤال 63

ما هو عدد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز التي وافق عليها بلدك حتى اليوم؟	☐ لا يوجد ☐ أقل من 5 ☐ أقل من 10 ☐ أكثر من 10 ☐ لا ينطبق
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد القرارات التي اتخذها بلدك فيما يتعلق بالاستخدام المحلي للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز، بما في ذلك طرحها في الأسواق؟	☐ لا يوجد ☐ أقل من 5 ☐ أقل من 10 ☐ أكثر من 10
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد القرارات التي اتخذها بلدك فيما يتعلق باستيراد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ لا يوجد ☐ أقل من 5 ☐ أقل من 10 ☐ أكثر من 10
إذا كانت إجابتك لا يوجد على السؤالين 59 و60، يرجى الانتقال إلى السؤال 63	
هل أبلغ بلدك الأطراف من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بقراره (قراراته) فيما يتعلق باستيراد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ لا

هل أبلغ بلدك الأطراف من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بقراره (قراراته) فيما يتعلق بالاستخدام المحلي للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز، بما في ذلك طرحها في الأسواق وذلك خلال 15 يوما؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ نعم، ولكن مع تأخير (أي أكثر من 15 يوما) ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 11 في بلدك، بما في ذلك التدابير في حالة غياب اليقين العلمي بشأن الآثار الضارة المحتملة للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 12 - استعراض القرار

هل أنشأ بلدك آلية لاستعراض وتغيير أي قرار يتعلق بالحركة العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ لا
هل سبق أن استلم بلدك طلبا لاستعراض أحد القرارات؟	☐ نعم ☐ لا
هل سبق أن استعرض/غير بلدك قرارا يتعلق بالحركة العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم، استعراض القرار ☐ نعم، استعراض القرار وتغيره ☐ لا
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد القرارات التي استعرضت و/أو تغيرت فيما يتعلق بالحركة العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ لا يوجد ☐ أقل من 5 ☐ أكثر من 5

إذا كانت إجابتك لا يوجد على السؤال 67، يرجى الانتقال إلى السؤال 71

هل أبلغ بلدك المخطر وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية باستعراض و/أو تغيير القرار؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ في بعض الحالات فقط، المخطر ☐ في بعض الحالات فقط، غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ لا
هل أبلغ بلدك المخطر وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية باستعراض وتغيير القرار خلال ثلاثين يوما؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ نعم، ولكن مع تأخير (أي أكثر من 30 يوما) ☐ لا
هل قدم بلدك إلى المخطر وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية أسباب استعراض و/أو تغيير القرار؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ في بعض الحالات فقط، المخطر ☐ في بعض الحالات فقط، غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 12 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 13 - الإجراء المبسط

هل وضع بلدك نظاما لتطبيق الإجراء المبسط فيما يتعلق بالحركة العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق أن طبق بلدك الإجراء المبسط؟	☐ ☐	نعم لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 73، هل أبلغ بلدك الأطراف من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بالحالات التي ينطبق فيها الإجراء المبسط؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عددا الكائنات الحية المحورة التي طبق عليها بلدك الإجراء المبسط؟	☐ ☐ ☐	لا يوجد أقل من 5 أكثر من 5

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 13 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا *]*

المادة 14 - الاتفاقات والترتيبات الثنائية والإقليمية والمتعددة الأطراف

هل أبرم بلدك اتفاقات أو ترتيبات ثنائية أو إقليمية أو متعددة الأطراف؟	☐ ☐	نعم لا

إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 77، هل أبلغ بلدك الأطراف من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بهذه الاتفاقات والترتيبات؟	☐	نعم، دائما
	☐	في بعض الحالات فقط
	☐	لا
	☐	لا ينطبق

إذا كانت إجابتك نعم على السؤال 77، يرجى تقديم وصف مختصر عن نطاق وهدف الاتفاقات أو الترتيبات المبرمة:

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 14 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 15 - تقييم المخاطر

هل أنشأ بلدك آلية لإجراء تقييمات المخاطر قبل اتخاذ قرارات تتعلق بالكائنات الحية المحورة؟	☐	نعم
	☐	لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 81، هل تشتمل هذه الآلية على إجراءات لتحديد خبراء لإجراء تقييمات المخاطر؟	☐	نعم
	☐	لا
هل وضع بلدك مبادئ توجيهية عن كيفية إجراء تقييمات المخاطر قبل اتخاذ قرارات تتعلق بالكائنات الحية المحورة؟	☐	نعم
	☐	لا
هل اكتسب بلدك القدرات المحلية اللازمة لإجراء تقييم المخاطر؟	☐	نعم
	☐	لا
هل أنشأ بلدك آلية لتدريب الخبراء الوطنيين على إجراء تقييمات المخاطر؟	☐	نعم
	☐	لا

هل سبق لبلدك أن أجرى تقييما لمخاطر أحد الكائنات الحية المحورة المراد إدخالها عن عمد في البيئة؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق أن أجرى بلدك تقييما لمخاطر أحد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ ☐	نعم لا
إذا كان بلدك اتخذ قرارا (قرارات) بشأن الكائنات الحية المحورة المراد إدخالها عن عمد في البيئة أو بشأن الاستخدام المحلي للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز، هل أجريت تقييمات للمخاطر بشأن جميع القرارات المتخذة؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
هل قدم بلدك تقارير موجزة عن تقييمات المخاطر إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، إذا كان بلدك اتخذ قرارات تتعلق بالكائنات الحية المحورة، ما هو عدد تقييمات المخاطر التي أجريت في سياق هذه القرارات؟	☐ ☐ ☐ ☐	لا يوجد 5 أو أقل 10 أو أقل أكثر من 10

هل سبق لبلدك أن طلب من المصدر إجراء تقييم (تقييمات) للمخاطر؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ لا ☐ لا ينطبق
هل سبق لبلدك أن طلب من المخطر تحمل تكاليف تقييم (تقييمات) المخاطر المتعلقة بالكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ لا ☐ لا ينطبق

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 15 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 16 - إدارة المخاطر

هل وضع وعزز بلدك آليات تشغيلية وتدابير واستراتيجيات ملائمة لتنظيم وإدارة ومراقبة المخاطر المحددة في تقييمات المخاطر من أجل:

(1) الكائنات الحية المحورة للإدخال عن عمد في البيئة؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا

(2) الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا
هل وضع وعزز بلدك تدابير مناسبة لمنع الحركات العابرة للحدود عن غير عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا
هل اتخذ بلدك تدابير لضمان أن يخضع أي كائن حي محور، سواء كان مستوردا أو مطورا محليا، إلى فترة ملاحظة ملائمة تتناسب مع دورة حياته أو فترة إنتاجه قبل بدء استخدامه المنشود؟	☐ نعم ☐ لا
هل تعاون بلدك مع أطراف أخرى بغية تحديد الكائنات الحية المحورة أو السمات المحددة التي يمكن أن تكون لها آثار ضارة على حفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام؟	☐ نعم ☐ لا
هل تعاون بلدك مع أطراف أخرى بغية اتخاذ تدابير تتعلق بمعالجة الكائنات الحية المحورة أو السمات المحددة التي قد تكون لها آثار ضارة على التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام؟	☐ نعم ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 16 في بلدك، بما في ذلك أي تفاصيل عن استراتيجيات إدارة المخاطر، وأيضا في حالة غياب اليقين العلمي بشأن الآثار الضارة المحتملة للكائنات الحية المحورة:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 17 - الحركات العابرة للحدود عن غير عمد وتدابير الطوارئ

هل أتاح بلدك لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بيانات ذات صلة بجهة الاتصال الخاصة به لأغراض تلقي الإخطارات بموجب المادة 17؟	☐ نعم ☐ لا
هل أنشأ بلدك آلية لتناول تدابير الطوارئ في حالة الحركات العابرة للحدود عن غير عمد للكائنات الحية المحورة المحتمل أن يكون لها آثار ضارة كبيرة على التنوع البيولوجي؟	☐ نعم ☐ لا
هل نفذ بلدك تدابير طوارئ استجابة لمعلومات حول حالات إطلاق أدت أو كان من المحتمل أن تؤدي إلى حركات عابرة للحدود عن غير عمد للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ لا
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هي عدد المرات التي استلم فيها بلدك معلومات تتعلق بأحداث أدت أو من المحتمل أن تكون قد أدت إلى حركة (حركات) عابرة للحدود عن غير عمد لكائن واحد أو أكثر من الكائنات الحية المحورة إلى داخل الإقليم الواقع تحت الولاية القضائية للبلد أو منه؟	☐ أبدا ☐ أقل من 5 ☐ أقل من 10 ☐ أكثر من 10
إذا كانت إجابتك أبدا على السؤال 103، يرجى الانتقال إلى السؤال 107	
هل قام بلدك بإخطار الدول المتأثرة أو التي من المحتمل أن تكون قد تأثرت وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية والمنظمات الدولية المعنية بحالات الإطلاق المشار إليها أعلاه؟	☐ نعم، لكل حالة ☐ نعم، لبعض الحالات ☐ لا

إذا أجبت *نعم* السؤال 104، ما هي الجهة التي قام بلدك بإخطارها؟	☐ الدولة المتأثرة أو المحتمل أن تكون تأثرت ☐ غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المنظمات الدولية المعنية
هل أستشار بلدك فورا الدول المتأثرة أو المحتمل أن تكون قد تأثرت لتمكينها من تحديد الاستجابات المناسبة والشروع في اتخاذ الإجراءات اللازمة، بما فيها تدابير الطوارئ؟	☐ نعم، دائما ☐ نعم، في بعض الحالات ☐ لا، أجريت مشاورات، ولكن ليس فورا ☐ لا، لم تجر مشاورات أبدا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 17 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا *]*

المادة 18 - المناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية

هل اتخذ بلدك تدابير تشترط مناولة وتعبئة ونقل الكائنات الحية المحورة الخاضعة للحركة العابرة للحدود بموجب شروط السلامة مع مراعاة القواعد والمعايير الدولية ذات الصلة؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا

هل اتخذ بلدك تدابير تشترط أن توضح الوثائق المصاحبة للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز، في الحالات التي تكون فيها هوية الكائنات الحية المحورة غير *معروفة* من خلال وسائل مثل نظم حفظ الهوية، أنها *قد تحتوي* على كائنات حية محورة وهي غير معدة للإدخال عن عمد في البيئة، فضلا عن نقطة اتصال للحصول على المزيد من المعلومات؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا
هل اتخذ بلدك تدابير تشترط أن توضح الوثائق المصاحبة للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز، أنه في الحالات التي تكون فيها هوية الكائنات الحية المحورة *معروفة* من خلال وسائل مثل نظم حفظ الهوية، أنها *تحتوي* على كائنات حية محورة وهي غير معدة للإدخال عن عمد في البيئة، فضلا عن نقطة اتصال للحصول على المزيد من المعلومات؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا
هل اتخذ بلدك تدابير تشترط أن تشير الوثائق المصاحبة للكائنات الحية المحورة المعدة *للاستخدام المعزول* بوضوح إلى أنها *كائنات حية محورة* وتحدد أي شروط لسلامة المناولة والنقل والاستخدام ونقطة الاتصال للحصول على المزيد من المعلومات، بما في ذلك اسم وعنوان الشخص أو المؤسسة التي ستشحن إليه الكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا

هل اتخذ بلدك تدابير تشترط أن تشير الوثائق المصاحبة للكائنات الحية *المحورة المراد إدخالها عن عمد في بيئة* طرف الاستيراد بوضوح إلى أنها *كائنات حية محورة؛* وتحدد هويتها والسمات و/أو الخصائص ذات الصلة، وأي متطلبات بشأن سلامة المناولة والتخزين والنقل والاستخدام، ونقطة الاتصال للحصول على المزيد من المعلومات، وحسب الاقتضاء باسم وعنوان المستورد والمصدر؛ وإعلان يفيد بأن الحركة تتوافق مع متطلبات هذا البروتوكول بالنسبة للمصدر؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، إلى حد ما لا
هل لدى بلدك القدرات اللازمة لإنفاذ متطلبات تحديد الهوية والتوثيق للكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، إلى حد ما لا
هل وضع بلدك إجراءات لأخذ عينات من الكائنات الحية المحورة والكشف عنها؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، إلى حد ما لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 18 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا *]*

المادة 19 - السلطات الوطنية المختصة ونقاط الاتصال الوطنية

هل عين بلدك نقطة اتصال وطنية لبروتوكول قرطاجنة تكون مسؤولة عن الاتصال بالأمانة؟	☐ ☐	نعم لا

هل عين بلدك نقطة اتصال وطنية لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية للاتصال بالأمانة فيما يتعلق بالقضايا ذات الصلة بإنشاء وتشغيل غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا
هل عين بلدك سلطة وطنية مختصة أو أكثر مسؤولة عن أداء المهام الإدارية المطلوبة بموجب بروتوكول قرطاجنة للسلامة وتكون مفوضة بالعمل نيابة عن البلد فيما يتعلق بتلك المهام؟	☐ نعم، سلطة وطنية واحدة ☐ نعم، أكثر من سلطة وطنية واحدة ☐ لا
في حالة ما إذا كان بلدك عين أكثر من *سلطة وطنية مختصة*، هل نقل بلدك مسؤوليات هذه السلطات إلى علم الأمانة؟	☐ نعم ☐ لا ☐ لا ينطبق
هل أتاح بلدك المعلومات المطلوبة المشار إليها في الأسئلة 116-119 إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ نعم، جميع المعلومات ☐ نعم، بعض المعلومات ☐ لا
في حالة ما إذا كان بلدك عين أكثر من سلطة وطنية مختصة، هل أنشأ بلدك آلية لتنسيق أنشطتها قبل اتخاذ قرارات تتعلق بالكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ لا ☐ لا ينطبق
هل وضع بلدك قدرات مؤسسية مناسبة لتمكين السلطة/السلطات الوطنية المختصة من أداء المهام الإدارية المطلوبة بموجب بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 19 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 20 - تقاسم المعلومات وغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية

يرجى تقديم نظرة عامة عن حالة المعلومات التي قدمها بلدك إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عن طريق تحديد لكل فئة من فئات المعلومات ما إذا كانت هذه المعلومات متوفرة وما إذا كانت قدمت إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية.

التشريعات واللوائح والمبادئ التوجيهية الوطنية القائمة لتنفيذ البروتوكول، فضلا عن المعلومات المطلوبة من قبل الأطراف لإجراء الاتفاق المسبق عن علم المعلومات (الفقرة 3(أ) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

القوانين واللوائح والمبادئ التوجيهية الوطنية المطبقة على استيراد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز (الفقرة 5 من المادة 11)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
الاتفاقات والترتيبات الثنائية والمتعددة الأطراف والإقليمية (الفقرة 2 من المادة 14 والفقرة 3(ب) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

بيانات عن جهة الاتصال للسلطات الوطنية المختصة (الفقرتان 2 و3 من المادة 19)، ونقاط الاتصال الوطنية (الفقرتان 1 و3 من المادة 19)، وجهات الاتصال في حالات الطوارئ (الفقرة 3(هـ) من المادة 17)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
هـ) التقارير المقدمة من الأطراف بشأن عمل البروتوكول (الفقرة 3(هـ) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

القرارات التي تتخذها الأطراف بشأن تنظيم المرور العابر لبعض الكائنات الحية المحورة (الفقرة 1 من المادة 6)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
حدوث حركات عابرة للحدود عن غير عمد من المرجح أن يكون لها آثار ضارة كبيرة على التنوع البيولوجي (الفقرة 1 من المادة 17)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

الحركات العابرة للحدود غير المشروعة للكائنات الحية المحورة (الفقرة 3 من المادة 25)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
القرارات النهائية المتعلقة باستيراد الكائنات الحية المحورة أو إطلاقها (أي الموافقة أو الحظر، وأي شروط، وطلبات للحصول على مزيد من المعلومات، والفترات الإضافية الممنوحة وأسباب القرار) (الفقرة 3 من المادة 10 والفقرة 3(د) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

معلومات عن تطبيق اللوائح المحلية على واردات معينة من الكائنات الحية المحورة (الفقرة 4 من المادة 14)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
القرارات النهائية المتعلقة بالاستخدام المحلي للكائنات الحية المحورة التي قد تخضع لحركة عابرة للحدود لاستخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز (الفقرة 1 من المادة 11)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

القرارات النهائية المتعلقة باستيراد الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز المتخذة بموجب الأطر التنظيمية المحلية (الفقرة 4 من المادة 11) أو وفقا للمرفق الثالث (الفقرة 6 من المادة 11) (متطلبات الفقرة 3(د) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
الإعلانات المتعلقة بالإطار الذي يتعين استخدامه للكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو أعلاف أو للتجهيز (الفقرة 6 من المادة 11)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

استعراض وتغيير القرارات المتعلقة بالحركات العابرة للحدود عن عمد للكائنات الحية المحورة (الفقرة 1 من المادة 12)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
الكائنات الحية المحورة التي مُنحت صفة الإعفاء من كل طرف (الفقرة 1 من المادة 13)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة

الحالات التي تتم فيها الحركة العابرة للحدود عن عمد في نفس وقت إخطار طرف الاستيراد (الفقرة 1 من المادة 13)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
موجزات عن تقييمات المخاطر أو الاستعراضات البيئية للكائنات الحية المحورة الناشئة عن العمليات التنظيمية والمعلومات ذات الصلة الخاصة بنواتجها (الفقرة 3(ج) من المادة 20)	☐ المعلومات متوفرة ومتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن غير متاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات متوفرة ولكن متاحة جزئيا فقط في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ☐ المعلومات غير متاحة
هل أنشأ بلدك آلية لتعزيز قدرات نقطة الاتصال الوطنية التابعة لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية للقيام بمهامها الإدارية؟	☐ نعم ☐ لا

هل أنشأ بلدك آلية للتنسيق بين نقطة الاتصال الوطنية التابعة لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية ونقطة الاتصال التابعة لبروتوكول قرطاجنة والسلطة (السلطات) الوطنية المختصة لإتاحة المعلومات لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ ☐	نعم لا
هل يستخدم بلدك المعلومات المتاحة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية في عمليات صنع القرارات بشأن الكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐ ☐	نعم، دائما نعم، في بعض الحالات لا
هل واجه بلدك صعوبات في الوصول إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية أو استخدامها؟	☐ ☐	نعم لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 128، هل أبلغ بلدك غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية أو الأمانة بهذه المشاكل؟	☐ ☐ ☐	نعم لا لا ينطبق
هل كانت المعلومات التي قدمها بلدك إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية كاملة وحديثة؟	☐ ☐	نعم لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 20 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 21 - المعلومات السرية

هل وضع بلدك إجراءات لحماية المعلومات السرية المستلمة بموجب البروتوكول؟	☐ ☐	نعم لا

هل يسمح بلدك للمخطر بتحديد المعلومات التي يتعين تناولها كمعلومات سرية؟	☐ نعم، دائما ☐ في بعض الحالات فقط ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 21 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 22 - بناء القدرات

هل حصل بلدك على دعم خارجي أو استفاد من الأنشطة التعاونية مع الأطراف الأخرى في تنمية و/أو تعزيز الموارد البشرية والقدرات المؤسسية في مجال السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا
إذا كانت إجابتك نعم على السؤال 135، كيف أتيحت هذه الموارد؟	☐ قنوات ثنائية ☐ قنوات إقليمية ☐ قنوات متعددة الأطراف ☐ لا ينطبق
هل قدم بلدك دعما إلى الأطراف الأخرى لتنمية و/أو تعزيز الموارد البشرية والقدرات المؤسسية في مجال السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا

إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 137، كيف أتيحت هذه الموارد؟	☐	قنوات ثنائية
	☐	قنوات إقليمية
	☐	قنوات متعددة الأطراف
	☐	لا ينطبق
هل بلدك مؤهل للحصول على تمويل من مرفق البيئة العالمية؟	☐	نعم
	☐	لا
إذا كانت إجابتك لا على السؤال 139، يرجى الانتقال إلى السؤال 143		
هل شرع بلدك أبدا في عملية للحصول على أموال من مرفق البيئة العالمية لبناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية؟	☐	نعم
	☐	لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 140، كيف تصف هذه العملية؟	☐	سهلة جدا
	☐	سهلة
يرجى إضافة المزيد من التفاصيل حول تجربة الحصول على أموال من مرفق البيئة العالمية تحت السؤال 150.	☐	متوسطة الصعوبة
	☐	صعبة
	☐	صعبة جدا

هل سبق أن حصل بلدك على تمويل من مرفق البيئة العالمية لبناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية؟	☐ نشاط تمكيني تجريبي في مجال السلامة الأحيائية ☐ إعداد أطر وطنية للسلامة الأحيائية ☐ تنفيذ أطر وطنية للسلامة الأحيائية ☐ بناء القدرات للمشاركة على نحو فعال في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية (المرحلة الأولى) ☐ بناء القدرات للمشاركة على نحو فعال في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية (المرحلة الثانية) ☐ لا شيء مما تقدم
خلال المرحلة الحالية المشمولة بالتقرير، هل اضطلع بلدك بأنشطة لتنمية و/أو تعزيز الموارد البشرية والقدرات المؤسسية في مجال السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا

إذا كانت إجابتك نعم على السؤال 143، في أي مجال من المجالات التالية اضطلع فيها بهذه الأنشطة؟

- ☐ القدرات المؤسسية
- ☐ تنمية قدرات الموارد البشرية والتدريب
- ☐ تقييم المخاطر والخبرات العلمية والتقنية الأخرى
- ☐ إدارة المخاطر
- ☐ التوعية العامة والمشاركة والتعليم في مجال السلامة الأحيائية
- ☐ تبادل المعلومات وإدارة البيانات بما في ذلك المشاركة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية
- ☐ التعاون العلمي والتقني والمؤسسي على الصعيد دون الإقليمي والإقليمي والدولي
- ☐ نقل التكنولوجيا
- ☐ تحديد الكائنات الحية المحورة بما في ذلك الكشف عنها
- ☐ الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية
- ☐ تنفيذ متطلبات التوثيق بموجب المادة 18-2 من البروتوكول
- ☐ مناولة المعلومات السرية
- ☐ تدابير لمعالجة الحركات العابرة للحدود عن غير عمد و/أو غير المشروعة للكائنات الحية المحورة
- ☐ البحوث العلمية في مجال السلامة

في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، هل أجرى بلدك تقييما بشأن الاحتياجات من حيث بناء القدرات	☐	نعم
	☐	لا
هل ما زال لدى بلدك احتياجات من حيث بناء القدرات؟	☐	نعم
	☐	نعم، بقدر محدود
	☐	لا

إذا كانت إجابتك نعم على السؤال 146، يرجى الإشارة إلى أي من المجالات التالية تحتاج إلى بناء القدرات.

- ☐ القدرات المؤسسية
- ☐ تنمية قدرات الموارد البشرية والتدريب
- ☐ تقييم المخاطر والخبرات العلمية والتقنية الأخرى
- ☐ إدارة المخاطر
- ☐ التوعية العامة والمشاركة والتعليم في مجال السلامة الأحيائية
- ☐ تبادل المعلومات وإدارة البيانات بما في ذلك المشاركة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية
- ☐ التعاون العلمي والتقني والمؤسسي على الصعيد دون الإقليمي والإقليمي والدولي
- ☐ نقل التكنولوجيا
- ☐ تحديد الكائنات الحية المحورة بما في ذلك الكشف عنها
- ☐ الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية
- ☐ تنفيذ متطلبات التوثيق بموجب المادة 18-2 من البروتوكول
- ☐ مناولة المعلومات السرية
- ☐ تدابير لمعالجة الحركات العابرة للحدود عن غير عمد و/أو غير المشروعة للكائنات الحية المحورة
- ☐ البحوث العلمية في مجال السلامة الأحيائية المتعلقة بالكائنات الحية

هل أعد بلدك استراتيجية أو خطة عمل لبناء القدرات؟	☐ نعم ☐ لا
هل قدم بلدك بيانات عن الخبراء الوطنيين في مجال السلامة الأحيائية إلى قائمة الخبراء الخاصة بغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 22 في بلدك، بما في ذلك المزيد من المعلومات عن تجربتك في الحصول على أموال مرفق البيئة العالمية:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 23 – التوعية العامة والمشاركة

هل وضع بلدك استراتيجية أو سن تشريعا لتعزيز وتيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بأمن نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، إلى حد ما ☐ لا
هل أنشأ بلدك موقعا إلكترونيا للسلامة الأحيائية؟	☐ نعم ☐ لا
هل أنشأ بلدك آلية تضمن إمكانية حصول عامة الجمهور على معلومات بشأن الكائنات الحية المحورة التي يجوز استيرادها؟	☐ نعم ☐ نعم، بقدر محدود ☐ لا
هل أنشأ بلدك آلية لإستشارة الجمهور في عملية صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، بقدر محدود ☐ لا

هل أنشأ بلدك آلية لإتاحة نتائج القرارات المتخذة بشأن الكائنات الحية المحورة إلى عامة الجمهور؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، بقدر محدود لا
هل اتخذ بلدك أي مبادرة لإبلاغ الجمهور حول وسائل الوصول إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ ☐	نعم لا
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، هل عزز ويسر بلدك التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بأمن نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، بقدر محدود لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 157، هل تعاون بلدك مع دول وهيئات دولية أخرى؟	☐ ☐ ☐	نعم لا لا ينطبق
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هي عدد المرات التي استشار فيها بلدك الجمهور في عملية صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة وأتاح نتائج هذه القرارات إلى عامة الجمهور؟	☐ ☐ ☐	أبدا أقل من 5 أكثر من 5

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 23 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 24 - غير الأطراف

هل دخل بلدك في ترتيب ثنائي أو إقليمي أو متعدد الأطراف مع بلد من غير الأطراف فيما يتعلق بالحركات العابرة للحدود للكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق لبلدك أن استورد كائنات حية محورة من بلد من غير الأطراف؟	☐ ☐	نعم لا
هل سبق لبلدك أن صدر كائنات حية محورة إلى بلد من غير الأطراف؟	☐ ☐	نعم لا
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 162 أو 163، هل تمت الحركات العابرة للحدود للكائنات الحية المحورة بما يتماشى مع هدف بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
إذا كانت إجابتك *نعم* على السؤال 162 أو 163، هل قدمت معلومات عن هذه الحركات العابرة للحدود إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
إذا لم يكن بلدك طرفا في بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية، هل قدم معلومات إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية بشأن الكائنات الحية المحورة التي أطلقت داخل حدود ولاية البلد القضائية أو نقلت إليها أو خارجها؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم، دائما في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 24 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا *[*

المادة 25 – الحركات العابرة للحدود غير المشروعة

هل اعتمد بلدك تدابير محلية تهدف إلى منع الحركات العابرة للحدود للكائنات الحية المحورة المضطلع بها بما يتعارض مع تدابير البلد المحلية المتعلقة بتنفيذ البروتوكول و/أو معاقبة المسؤولين عنها؟	☐ ☐	نعم لا
هل وضع بلد استراتيجية للكشف عن الحركات العابرة للحدود غير المشروعة للكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐	نعم لا
في الفترة الحالية المشمولة بالتقرير، ما هو عدد المرات التي حصل فيها بلدك على معلومات تتعلق بحالات عن الحركات العابرة للحدود غير المشروعة للكائنات الحية المحورة إلى أو من الإقليم الواقع تحت الولاية القضائية للبلد؟	☐ ☐ ☐ ☐	أبدا أقل من 5 أقل من 10 أكثر من 10

إذا كانت إجابتك أبدا على السؤال 170، يرجى الانتقال إلى السؤال 175

هل أبلغ بلدك غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية والطرف الأخر المعني (الأطراف الأخرى المعنية)؟	☐ نعم ☐ في بعض الحالات فقط ☐ الطرف (الأطراف) الأخر المعني فقط ☐ غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية فقط ☐ لا ☐ لا ينطبق
هل حدد بلدك منشأ الكائن أو الكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، في بعض الحالات ☐ لا
هل حدد بلدك طبيعة الكائن أو الكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، في بعض الحالات ☐ لا
هل حدد بلدك ظروف الحركة (الحركات) العابرة للحدود غير المشروعة للكائنات الحية المحورة؟	☐ نعم ☐ نعم، في بعض الحالات ☐ لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 25 في بلدك:

] يرجى إدخال نصك هنا [

المادة 26 – الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية

إذا اتخذ بلدك قرارا بشأن الاستيراد، هل سبق أن أخذ في الحسبان الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية الناشئة عن أثر الكائنات الحية المحورة على حفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام؟	☐ ☐ ☐ ☐	نعم في بعض الحالات فقط لا لا ينطبق
هل تعاون بلدك مع أطراف أخرى بشأن البحوث وتبادل المعلومات المتعلقة بأي آثار اجتماعية واقتصادية للكائنات الحية المحورة؟	☐ ☐ ☐	نعم نعم، بقدر محدود لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن تنفيذ المادة 26 في بلدك:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 27 – المسؤولية والجبر التعويضي

هل وقع بلدك على البروتوكول التكميلي ناغويا-كوالالمبور بشأن المسؤولية والجبر التعويضي؟	☐ ☐	نعم لا
هل شرع بلدك في خطوات نحو التصديق على البروتوكول التكميلي ناغويا-كوالالمبور، أو قبوله أو الموافقة عليه؟	☐ ☐	نعم لا

يمكن أن تقدم هنا المزيد من التفاصيل بشأن الأنشطة التي اضطلع بها في بلدك لتنفيذ بروتوكول ناغويا-كوالالمبور التكميلي المتعلق بالمسؤولية والجبر التعويضي:

[يرجى إدخال نصك هنا]

المادة 33 - الرصد وإعداد التقارير

هل قدم بلدك التقارير الوطنية السابقة (التقرير المؤقت والتقرير الوطني الأول)؟	☐ نعم ☐ نعم، التقرير المؤقت فقط ☐ نعم، التقرير الأول فقط ☐ لا ☐ لا ينطبق
إذا لم يقدم بلدك التقارير السابقة، أذكر التحديات الرئيسية التي أعاقت تقديم التقرير.	☐ عدم وجود موارد مالية لجمع المعلومات اللازمة ☐ عد وجود معلومات ذات صلة على الصعيد الوطني ☐ صعوبة جمع المعلومات من مختلف القطاعات ☐ لا يوجد التزام بتقديم تقرير (مثلا البلد لم يكن طرفا في ذلك الوقت) ☐ غيرها، يرجى التحديد *[يرجى إدخال النص هنا]* ☐ لا ينطبق

معلومات أخرى

يرجى استخدام هذا الإطار لتقديم أي معلومات أخرى بشأن القضايا المتعلقة بتنفيذ البروتوكول على الصعيد الوطني، بما في ذلك أي عوائق أو عقبات ووجهت.

[يرجى إدخال نصك هنا]

تعليقات على نموذج التقرير

يرجى استخدام هذا الإطار لتقديم أي معلومات أخرى بشأن الصعوبات التي واجهتها في ملء هذا التقرير.

[يرجى إدخال نصك هنا]

جمهورية العراق

رئيس الجمهورية

بناء على أحكام الدستور

وعلى ما أقره مجلس النواب في جلسته المنعقدة بتاريخ / / هـ الموافق / / م

يصدر ما يلي:

القانون رقم ( ) لسنة ( )

قانون السلامة الاحيائية للكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها

الفصل الأول

تعاريف

المادة (1). يقصد بالتعابير الآتية في معرض تطبيق أحكام هذا القانون المعني الوارد جانب كل منها:

الوزير: وزير البيئة.

الوزارة: وزارة البيئة.

الجهة المختصة: أية وزارة بما فيها وزارة البيئة أو مؤسسة أو هيئة معنية بتطبيق القانون حسب الحال.

اللجنة: اللجنة الوطنية الدائمة للسلامة الاحيائية.

الشخص: هو الشخص الطبيعي أو الاعتباري بما في ذلك الوكلاء والممثلين.

المفتش: شخص فني مختص يسمى بقرار من الوزير المعني ليقوم بتنفيذ المهام التي تكلفه بها الوزارة.

المفتش الوطني: خبير في مجال الهندسة الوراثية (تقنية الدنا المركب) والسلامة الاحيائية تسميه اللجنة الوطنية الدائمة للسلامة الاحيائية.

غرفة تبادل معلومات السلامة الاحيائية: آلية دولية لتبادل المعلومات الخاصة بالكائنات الحية المحورة وراثياً وفق بروتوكول قرطاجنة للسلامة الاحيائية.

الكائنات الحية المحورة وراثياً: هي الكائنات الحية التي تم تحوير مادتها الوراثية باستعمال تقنيات الهندسة الوراثية.

الهندسة الوراثية: التقنيات الحديثة (غير التقليدية) المستعملة لتحوير المادة الوراثية بواسطة إضافة أو حذف أو إعادة ترتيب مورثات والتي لا تحدث في الظروف الطبيعية.

نظام تحليل المخاطر: نظام مصمم لتقييم وإدارة والإعلام عن المخاطر المحتملة الناجمة عن إدخال الكائن الحي المحور وراثياً واستعماله وإطلاقه في البيئة.

إدارة المخاطر: نظام يهدف إلى ضمان الآمان عند التعامل مع الإحياء المحورة وراثياً واستعمالها وإطلاقها في البيئة المفتوحة أو مكان الاحتواء.

البيئة المفتوحة: التربة والماء والهواء والكائنات الحية الموجودة فيها.

مكان الاحتواء: المكان المغلق والمعزول عن البيئة الخارجية (مختبر، بيت زجاجي.....الخ) والذي تتخذ فيه إجراءات تمنع الانتشار غير المقصود للكائنات الحية المحورة أو منتجاتها إلى البيئة المفتوحة.

السلامة الاحيائية: السياسات والتعليمات والإجراءات المتبعة لنقل وتداول واستخدام الكائنات الحية المحورة وراثياً أو منتجاتها بشكل آمن.

الشحنة: كمية من النباتات أو المنتجات النباتية أو الحيوانات أو المنتجات الحيوانية أو الكائنات الحية الدقيقة المحورة وراثياً أو منتجاتها أو أي بنود أخرى تنقل من بلد لأخر وتشملها عند الاقتضاء شهادة صحية أو حجرية زراعية.

الشحنة العابرة: شحنة ليست مستوردة إلى العراق ولكنها تعبر من خلاله وتكون خاضعة لإجراءات الرقابة الرسمية بما يضمن الحفاظ عليها مغلقة دون تجزئتها أو إضافتها إلى شحنات أخرى.

الموافقة المسبقة: موافقة صادرة عن الوزارة المختصة ترخص باستيراد سلعة وفقاً لشروط الصحة العامة والصحة الزراعية بناء على موافقة اللجنة موجهة إلى وزارة التجارة لمنح إجازة الاستيراد.

إجازة استيراد: كتاب صادر عن وزارة التجارة يسمح باستيراد النباتات أو الحيوانات أوالكائنات الدقيقة الحية المحورة وراثياً أو منتجاتها بناء على الموافقة المسبقة.

بروتوكول قرطاجنة: برتوكول ملحق باتفاقية التنوع البيولوجي الدولية يهدف إلى ضمان مستوى ملائم من الحماية للبيئة وصحة الإنسان من جراء نقل وتداول واستخدام الكائنات الحية المحورة وراثياً الناتجة عن تقنيات الهندسة الوراثية.

تقنية الحامض النووي الرايبي منقوص الاوكسجين المركب (الدنا المركب): ناتج جمع أو حذف أو تعديل أجزاء من الدنا من مصادر مختلفة لتحوير البنية الوراثية للكائن الحي باستعمال تقنيات الهندسة الوراثية.

بطاقة التعريف (البيان): بطاقة تعريف بالمنتج تحوي معلومات واضحة وصريحة تكتب على الغلاف أو الحاوية بشكل غير قابل للإزالة والتعديل معدة من قبل المنتج. وتبين:-

اسم المادة وكميتها، اسم الجهة أو البلد أو المكان المصدر، الاسم وعنوان المراسلة الكامل للناقل والمرسل والمرسل إليه، رقم الشهادة الصحية الزراعية للاطلاق أو الإدخال، تاريخ الإنتاج وانتهاء الصلاحية ورقم الدفعة، وغير ذلك.

لجنة السلامة الاحيائية المؤسساتية: لجنة تشكل في المؤسسات والجهات التي تعمل في مجال الهندسة الوراثية وتتألف من خبراء في السلامة الاحيائية وتقنية **الدنا المركب** والمجالات ذات العلاقة وتحدد مهامها من قبل اللجنة الوطنية الدائمة للسلامة الاحيائية.

المختبر المعتمد: المختبر المكلف بإجراء التحاليل والاختبارات بموجب أحكام هذا القانون.

الفصل الثاني

أهداف القانون

المادة (2). يهدف القانون إلى تحقيق الآتي:

أ- ضمان مستوى ملائم من الأمان لصحة الإنسان والحيوان والنبات والبيئة في مجال نقل وتداول واستهلاك الكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها والتي قد يكون لها تأثيرات سلبية على صحة الإنسان وسلامته والحفظ والاستخدام المستدام للتنوع البيولوجي عن طريق وضع ضوابط لإدخال وتداول واستعمال واستهلاك الكائنات الحية المحورة وراثياً أو منتجاتها.

ب- وضع إطار تنظيمي للبحث والتطوير في مجال الهندسة الوراثية.

ج- الحفاظ على تنوع المصادر الوراثية المحلية من مخاطر ادخال واطلاق الكائنات الحية المحورة وراثياً الى البيئة.

د- توظيف تقنيات الهندسة الوراثية والكائنات المحورة وراثياً ومنتجاتها لدعم الانتاج الزراعي كماً ونوعاً وبشكل امن ومسيطر عليه.

الفصل الثالث

مجال تطبيق القانون

المادة (3). يطبق القانون على:

أ- الكائنات الحية والمواد الوراثية التي تم تغيير تركيبها الوراثي باستخدام تقنيات الهندسة الوراثية، وتشمل النباتات والحيوانات والأحياء المائية والكائنات الحية الدقيقة المحورة وراثياً المعدة للأبحاث والتجارب أو الإنتاج الزراعي أو الصناعي في مكان الاحتواء.

ب- الكائنات الحية المحورة وراثياً المعدة للإطلاق في النظم البيئية والزراعية.

ج- المنتجات غير الحية للكائنات المحورة وراثياً المنتجة محلياً أو المستوردة والمعدة للإنتاج الصناعي أو الغذاء البشري أو العلف الحيواني.

د- يستثنى من أحكام هذه المادة منتجات الكائنات الحية المحورة وراثياً المخصصة للأغراض الدوائية والعلاجية أو لإنتاج المواد الطبية والصيدلانية في مكان الاحتواء بغرض الاستخدام البشري أو البيطري والخاضعة للأنظمة النافذة في وزارتي الصحة والزراعة.

هـ- يستثنى من احكام هذا القانون الشحنات العابرة على ان تستحصل الموافقات الاصولية المسبقة.

الفصل الرابع

صلاحيات الوزير

المادة (4). يشرف الوزير المختص على تطبيق أحكام القانون ويصدر القرارات والتعليمات التنفيذية بما يتوافق مع الاتفاقيات الدولية المتعلقة بالمعايير والخطوط التوجيهية والتوصيات المتعلقة باستخدام ونقل

ونشر الكائنات الحية المحورة وراثياً أو منتجاتها، وله من أجل ذلك صلاحية اتخاذ الإجراءات التي تساعد على وضع هذا القانون موضع التنفيذ وخاصة الأتي:

أ- تفويض الجهة المختصة العائدة للوزارة بتطبيق أحكام القانون.

ب- منع أو تقييد استيراد أو تصدير أو بيع أو زراعة أو إكثار أو نشر أو نقل أي كائن حي محور وراثياً أو منتجاته بناءً على اقتراح اللجنة.

ج- إصدار القرارات والتعليمات التنفيذية المتعلقة بإجراءات المراقبة والتفتيش والإتلاف والحجز، ومنح إجازة الاستيراد وتحديد المختبرات المعتمدة للتحليل وأجورها ونظام الاعتراض على النتائج بناءً على اقتراح اللجنة.

د- تحديد شروط إدخال وإخراج وتداول ونقل الكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها بالتنسيق مع الوزارة أو الجهة المختصة ومنح الموافقة المسبقة.

هـ- تحديد متطلبات بطاقة التعريف (البيان) بالكائنات الحية المحورة وراثياً أو منتجاتها.

الفصل الخامس

اللجنة الوطنية الدائمة للسلامة الاحيائية

المادة(5). تشكل اللجنة الوطنية الدائمة للسلامة الاحيائية بقرار من رئيس مجلس الوزراء بناء على اقتراح من الوزير من خبراء مختصين تسميهم الجهة المختصة حسب الأتي:

وزارة البيئة.

وزارة الزراعة.

وزارة التجارة.

وزارة الصحة.

وزارة العلوم والتكنولوجيا.

وزارة التخطيط.

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي.

وزارة الداخلية.

اضافة عدد من المختصين وحسب ما يرتأيه معالي الوزير

المادة (6). مهام اللجنة:

أ- وضع سياسات السلامة الاحيائية في العراق.

ب- وضع وتحديث قواعد السلامة الاحيائية المتعلقة بإدخال وتداول واستخدام الكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها في مراحل البحث العلمي والتطوير والاختبار في مكان الاحتواء.

ج- وضع مبادئ تحليل المخاطر وتحديد مستوى الامان الحيوي للاغذية المحورة وراثياً.

د- منح الموافقة على إجراء بحوث الهندسة الوراثية والتجارب في مكان الاحتواء والإشراف على التجارب الحقلية واطلاقها الى البيئة.

هـ- في حالة وقوع اضرار ناتجة عن دخول احياء محورة وراثياً او منتجاتها تقوم اللجنة بتقدير الاضرار واقتراح المطالبة بالتعويضات.

و- اقتراح إصدار قرارات الموافقة المسبقة على قبول الكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها.

ز- تشكيل لجان متخصصة لمراجعة ودراسة الكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها حسب الحاجة.

ح- إصدار تقرير سنوي حول الأنشطة المتعلقة بالكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها يوزع على الجهات المختصة.

ط- تكليف المفتشين الوطنيين للتحقق فيما إذا كانت المنشآت العاملة في مجال الهندسة الوراثية ملتزمة بالقواعد والتعليمات التي أقرتها اللجنة لمنح أو رفض الترخيص للعمل أو تمديد العمل به.

ي- تقديم المشورة العلمية والفنية للوزارات والجهات المختصة والأفراد بناء على طلبها.

ك- التأكد من التزام لجان السلامة الاحيائية المؤسساتية بتنفيذ قواعد السلامة الاحيائية.

ل- تسمية خبراء من أعضاء اللجنة و خارجها بصفة مفتش وطني.

م- تستعين اللجنة بمن تراه مناسباً.

المادة (7). آلية عمل اللجنة:

أ- تجتمع اللجنة بدعوة من رئيسها كل ثلاثة أشهر وكلما دعت الحاجة .

ب- يتم اقتراح إصدار قرارات الموافقة المسبقة على قبول الكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها بأكثرية ثلثي الأعضاء على الأقل وبموافقة خطية من الوزارة المعنية وفق المواد 8 و9.

ج- يكون اجتماع اللجنة قانونياً بحضور رئيس اللجنة أو نائبه وثلثي الأعضاء وتتخذ القرارات بموافقة أكثرية ثلثي أعضاء اللجنة وفي حال تساوي الأصوات يرجح صوت الرئيس.

د- تستعين اللجنة بمن تراه مناسباً.

الفصل السادس

الجهات المسؤولة عن تنفيذ القانون

المادة (8). تعد الوزارات والهيئات التالية مسؤولة عن تنفيذ القانون حسب الآتي:

وزارة البيئة: تتابع كل ما يتعلق بالكائنات الحية المحورة وراثياً المعدة للمعالجة البيئية الحيوية، وعلى إدارة غرفة تبادل المعلومات الخاصة بالكائنات الحية المحورة وراثياً.

وعلى الوزارات والجهات المعنية المختصة بتنفيذ القانون تزويدها بالمعلومات المتعلقة بتداول الكائنات الحية المحورة وراثياً وأثارها والإجراءات والقرارات المتخذة بشأنها.

ب- وزارة الصحة: تتابع كل ما يتعلق بمراقبة واستخدام الكائنات الحية المحورة وراثياً المعدة للأغراض الطبية أو العلاجية أو للتصنيع الدوائي في مكان الاحتواء.

وزارة التجارة: تتابع كل ما يتعلق بتنفيذ أحكام التجارة الخارجية وتطبيق القوانين المتعلقة بقمع الغش والتدليس وحماية المستهلك وحماية الملكية التجارية والصناعية وسلامة الغذاء للكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها.

وزارة العلوم والتكنولوجيا: تتابع وضع الأسس التنظيمية للبحث والتطوير والأمان الحيوي للمؤسسات البحثية والخطط المستقبلية المتعلقة بالسلامة الاحيائية في المؤسسات البحثية.

هـ- وزارة الزراعة: تتابع كل مايتعلق بالكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها المعدة للاستخدام الزراعي والحيواني البيطري والأعلاف.

و- وزارة التعليم العالي والبحث العلمي: مراقبة ومتابعة مراكز البحوث ومشاريع طلبة الدراسات العليا في الجامعات والتي تهتم بالهندسة الوراثية.

مع مراعاة أحكام قانون الكمارك رقم 23 لعام 1983 ، تقوم الهيئة العامة للكمارك بالتنسيق مع الجهات المختصة لتنفيذ أحكام القانون.

المادة (9). تعد الوزارة هي الجهة المختصة عن تنفيذ أحكام القانون وتصدر التعليمات التنفيذية بشأن:

أ- تقديم طلبات الحصول على الموافقة المسبقة إلى الوزارة أو الجهة المختصة والتي تمنحها بناء على موافقة اللجنة، مع مراعاة المادة 8.

ب- تقديم الموافقة المسبقة بعد الحصول عليها إلى وزارة التجارة للحصول على إجازة الاستيراد.

ج- إصدار الآليات الإدارية لضمان التداول الملائم وحفظ الوثائق والمعطيات التي تخص استلام الطلبات والإشعارات من أصحاب العلاقة وفقاً لأحكام القانون.

د- تعزيز الوعي ونشر التعليمات والإرشادات التي تفسر وتوضح عمليات التداول والاستعمال.

هـ- وضع آلية المراقبة والتفتيش عن الكائنات الحية المحورة وراثياً ومنتجاتها.

المادة(10). العاملون المفوضون:

أ- يكون للعاملين المفوضين صفة المحقق العدلي ويخولون صلاحية ضبط المخالفات واقامة الدعاوي بحق المخالفين واعلام الجهات المختصة بذلك.

ب- تحدد مهام العاملين المفوضين و طريقة عملهم بقرار من الجهة المختصة.

الفصل السابع

متطلبات السلامة

المادة (11). يحظر على أي شخص ممارسة أي نشاط متعلق بالهندسة الوراثية أو منتجاتها بما في ذلك إجراء التجارب والأبحاث والتجارة والتداول والنشر والتصدير والاستيراد والنقل بالعبور، دون الحصول على موافقة مسبقة وفقاً لأحكام هذا القانون وتعليماته التنفيذية بما لا يتعارض مع أحكام المادة 8 فقرة أ و ب.

المادة (12). تلتزم الجهة المختصة بتطبيق نظام تحليل المخاطر لكل النشاطات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها ويتوجب عليها إيقاف أي نشاط بناء على قرار اللجنة.

المادة (13). في حال معرفة أو اكتشاف أية مخاطر أو أضرار، يلتزم الشخص الذي يمارس أي نشاط متعلق بالكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها إبلاغ الوزارة أو الجهة المختصة بالأضرار التي تحدثها منتجاته أو مستورداته.

المادة (14). يتحمل الشخص مسؤولية الضرر الناجم عن تداول الكائن الحي المحور وراثياً و منتجاته بما في ذلك نفقات الجمع وإعادة التصدير أو الإتلاف أو الإبادة وفق ما تقرره اللجنة.

المادة (15). يحظر الإعلان أو الترويج للكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها دون الحصول على موافقة مسبقة من الوزارة أو الجهة المختصة ويتحمل صاحب الإعلان مسؤولية الخطأ المرتكب بسبب الإعلان أو الترويج للمنتج المحور وراثياً إذا كانت المعلومة مغلوطة أو مضللة أو مبالغاً فيها.

المادة (16). على كل مستورد أو موزع أو ناشر للكائنات الحية المحورة وراثيا و منتجاتها التصريح في بطاقة بيان العبوة (بطاقة التعريف) بشكل واضح للمعلومات المطلوب ذكرها وتكون باللغات الاتية:- العربية والكردية والانكليزية ويحدد مضمونها بقرار من الوزير أو الجهة المختصة.

الفصل الثامن

المراقبة والتفتيش على الكائنات الحية المحورة وراثياً في المنافذ الحدودية

مع مراعاة القوانين المتعلقة بوقاية النبات والصحة الحيوانية والكمارك يتم تنفيذ ما يلي:

المادة (17). تتخذ الهيئة العامة للكمارك الإجراءات الضرورية لضمان تطبيق القانون أثناء إدخال أو عبور الكائنات الحية المحورة وراثياً و منتجاتها إلى العراق.

المادة (18). تخضع الكائنات الحية المحورة وراثياً لنظام المراقبة والتفتيش من قبل مفتشي الحجر الصحي الزراعي و البيطري في نقاط الدخول.

المادة (19). تخضع المنتجات المحورة وراثياً للتعليمات التي تصدر بهذا الشأن .

المادة (20). يتم تقديم خدمات التفتيش بعد استيفاء أجور الكشوف المحددة بقرار من الوزير المختص.

المادة (21). في حال مخالفة الشحنة الواردة لأحكام القانون وتعليماته التنفيذية يطلب إلى المستورد بموجب موافقة رسمية إعادة التصدير خلال أسبوعين كحد أقصى أو إتلافها بعد موافقة وزارة البيئة و تعلم الهيئة العامة للكمارك خلال مدة محددة وفقاً لتعليمات تصدر لهذه الغاية لتطبيق الإجراءات التنفيذية المعتمدة بشأن الشحنة.

المادة (22). يتحمل المستورد المسؤولية والتكاليف الناتجة عن الاجراءات المتخذة تنفيذاً لأحكام القانون بما في ذلك تكاليف الاختبار و التحميل والتفريغ والنقل وإعادة التصدير وإعادة الاختبار والإتلاف والإبادة .

الفصل التاسع

المراقبة و التفتيش داخل العراق

المادة (23). تحدد إجراءات الرقابة في مؤسسات البحث العلمي وفق تعليمات تصدر عن اللجنة.

المادة (24). يتم أخذ عينات عشوائية من المنتجات من أي مكان ويجري تحليلها وفق التعليمات التي تحددها اللجنة.

المادة (25). تقوم الجهة المختصة بالتعاون مع وزارة البيئة بدراسة ومراقبة تأثير الكائنات الحية المحورة وراثياً على البيئة .

المادة (26). ينظم محضر ضبط أخذ العينات للمنتجات المشتبه بها وتبقى الكمية المأخوذ منها العينة محجوزة حتى صدور النتيجة، وفي حال ثبوت مخالفتها ترسل الكميات المخالفة إلى احد المستودعات المعتمدة التي تحددها اللجنة مع التعهد بعدم التصرف بها حتى يصدر قرار بشأنها من الوزير بناء على اقتراح اللجنة.

الفصل العاشر

المخالفات

المادة (27). يعد مخالفاً لأحكام القانون كل من:

أ- استورد أو أنتج أو صدر أو أطلق أو نقل أو باع أو أعلن أو مارس أي نشاط متعلق بإنتاج كائنات حية محورة وراثياً أو منتجاتها دون الحصول على موافقة مسبقة من الوزارة أو الجهة المختصة.

ب- لم يضع بطاقة بيان على عبوة المنتج المحور وراثياً أو كانت المعلومات المصرح بها في البطاقة مغايرة للواقع أو قدم وثائق مخالفة للتحليل المختبري.

ج- روج أو ساهم في نشر أو قدم وصف كاذب بهدف التمويه بأن المنتج غير محور وراثياً.

د- عرقل عمل العامل المفوض أو من في حكمه أثناء قيامه بالمهام المحددة له وفق التعليمات النافذة.

هـ- عدل أو زور أو شوه أو اتلف أي وثيقة صادرة بموجب أحكام القانون.

و- لم يتقيد بالقرارات والتعليمات الصادرة تنفيذاً لأحكام القانون.

الفصل الحادي عشر

العقوبات

المادة (28).

أ- يعاقب بالحبس من ثلاثة أشهر إلى سنة أو بالغرامة من (10,000,000) عشرة مليون دينار عراقي إلى (50,000,000) خمسين مليون دينار عراقي كل من ارتكب مخالفة الفقرة (أ، ب، ج) من المادة (27).

ب- يعاقب بالغرامة من (1,000,000) واحد مليون دينار عراقي إلى (5,000,000) خمسة مليون دينار عراقي كل من يخالف أحكام المادة (27) الفقرة (د) من القانون.

ج- يعاقب بالحبس من شهر إلى ثلاثة أشهر أو الغرامة من (5,000,000) خمسة مليون دينار عراقي إلى (10,000,000) عشرة مليون دينار عراقي كل من خالف المادة (27) الفقرة (هـ).

د- في حال تكرا ر المخالفة تضاعف العقوبات المنصوص عليها في القانون.

هـ- في حال حدوث أضرار ذات منعكس صحي أو اقتصادي أو بيئي يتم فرض أشد العقوبات المنصوص عنها في القانون ما لم ينص قانون آخر على عقوبة أشد للفعل نفسه.

الفصل الثاني عشر

أحكام عامة وختامية

المادة (29). تراعى أحكام المادة (27) من برتوكول قرطاجنة للسلامة الاحيائية المتعلقة بالمسؤولية والجبر التعويضي وتقوم الوزارة أو الجهة المختصة بتنفيذ ما يخصها وفقاً لأحكام القانون.

المادة (30). تنظر المحاكم بالدعاوى المتعلقة بأحكام القانون على وجه السرعة.

المادة (31). يلغى العمل بالأحكام القانونية المخالفة لأحكام القانون.

المادة (32). يصدر الوزير التعليمات التنفيذية لأحكام هذا القانون.

المادة (33). ترصد الاعتمادات اللازمة في موازنة الوزارة أو الجهة المختصة لتنفيذ أحكام القانون.

المادة (34). ينشر القانون في الجريدة الرسمية ويعتبر نافذاً بعد ستة أشهر من تاريخ صدوره.

الاسباب الموجبة

نظراً لتوسع البحوث في مجال الهندسة الوراثية وانتاج الاحياء المحورة وراثياً في العالم واستخدامها وتداولها ونقلها عبر الحدود وبشكل موسع وعشوائي ولظهور بعض الاثار السلبية نتيجة لذلك، ظهرت الحاجة لسن قانون للسيطرة على نقل وتداول الكائنات الحية المحورة وراثياً وعلى البحوث الخاصة في هذا المجال داخل العراق، ولضمان مستوى ملائم من الامان لصحة الانسان والحيوان والنبات والبيئة.

BS-V/16 الخطة الاستراتيجية لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية للفترة 2011-2020

إن مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية،

إذ يشير إلى المقرر BS-IV/15 الذي يدعو الأطراف إلى تقديم تعليقات على الخطة الاستراتيجية للبروتوكول والذي يطلب إلى الأمين التنفيذي تقديم الخطة الاستراتيجية كيما يُنظر فيها خلال هذا الاجتماع،

وإذ يحيط علما بالتعليقات المقدمة من الأطراف والحكومات الأخرى؛ والعمليات التشاورية التي تم إجراؤها تحت إشراف المكتب بهدف المساهمة في إعداد خطة إستراتيجية،

يعتمد الخطة الاستراتيجية لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية للفترة 2011-2020 (المرفق الأول بهذا المقرر) وبرنامج عمله المتعدد السنوات لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول (المرفق الثاني بهذا المقرر)؛

يحث الأطراف، *ويدعو* الحكومات الأخرى، والمنظمات الدولية المعنية حسب مقتضى الحال إلى:

(أ) استعراض ومواءمة خطط وبرامج عملها الوطنية المتعلقة بتنفيذ البروتوكول، بما في ذلك خططها الاستراتيجية، وبرامج عملها بشأن التنوع البيولوجي؛

(ب) تخصيص الموارد البشرية والمالية اللازمة للإسراع في تنفيذ الخطة الاستراتيجية؛

يحث الأطراف على تقديم تقاريرها الوطنية الثانية بشأن تنفيذ بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية بطريقة شاملة وفي التوقيت المناسب من أجل تقديم مدخلات من شأنها أن تحدد، بالتلازم مع التقييم والاستعراض الثاني، بيانات خط أساس لرصد وتقييم التقدم المحرز في تنفيذ البروتوكول والخطة الاستراتيجية؛

يقرر إجراء تقييم منتصف المدة للخطة الاستراتيجية:

(أ) بعد خمس سنوات من اعتمادها بالتزامن مع التقييم والاستعراض الثالث المقرر إجراؤه خلال الاجتماع الثامن لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول؛

(ب) استخدام معايير التقييم الملائمة التي يتعين أن يقترحها الأمين التنفيذي خلال الاجتماع السابع لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول.

المرفق الأول

الخطة الاستراتيجية لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية للفترة 2011-2020

أولا- السياق

1- اعتمد بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية في يناير/كانون الثاني 2000 ودخل حيز النفاذ في 11 سبتمبر/أيلول 2003. واعتمد الاجتماع الأول لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول،

على أساس التوصيات الصادرة عن اللجنة الحكومية الدولية المعنية ببروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية، برنامج عمل متوسط الأجل للفترة التي تغطي الاجتماع الثاني إلى الاجتماع الخامس لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول.

2- وخلال السنوات الست الماضية منذ انعقاد أول اجتماع للأطراف، تحققت إنجازات كبيرة نحو تنفيذ البروتوكول. فقد زاد عدد الأطراف بأكثر من 100 طرف منذ بدء نفاذ البروتوكول. واعتمدت مقررات كثيرة لتيسير تنفيذ البروتوكول ودخلت غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية مرحلة التشغيل الكامل. وتلقى أكثر من 100 بلد، من خلال الوكالات المنفذة التابعة لمرفق البيئة العالمية، مساعدة لبناء القدرات دعما لجهودها في تطوير وتنفيذ أطرها الوطنية القانونية والإدارية للسلامة الأحيائية. كما زاد عدد الترتيبات التعاونية الثنائية ودون الإقليمية والإقليمية لدعم أنشطة بناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية في السنوات الأخيرة.

3- ولعب برنامج العمل المتوسط الأجل لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول دورا حاسما في توجيه عملية تنفيذ البروتوكول. ومن المقرر أن ينتهي برنامج العمل المتوسط الأجل في الاجتماع الحالي للأطراف في البروتوكول.

4- وقد وضعت عملية لإجراء تقييم واستعراض لفعالية البروتوكول وفقا للمادة 35 من البروتوكول. ويتيح بدء عملية التقييم والاستعراض، من ناحية، واستكمال برنامج العمل المتوسط الأجل من الناحية الأخرى، فرصة للأطراف للنظر في وضع رؤية طويلة الأجل للبروتوكول في شكل خطة استراتيجية يصاحبها برنامج عمل متعدد السنوات. ويتلازم ذلك أيضا مع العملية الجارية لتنقيح وتحديث الخطة الاستراتيجية للاتفاقية في ضوء التصميم على العمل فيما بعد هدف التنوع البيولوجي لعام 2010.

5- وما زالت هناك تحديات كبيرة فيما يتعلق بتنفيذ البروتوكول. ذلك أن مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول لا يزال في حاجة إلى تقديم توجيهات إضافية وإجراءات وعمليات توضيحية في عدد من المجالات، مثل تطبيق إجراء الموافقة المسبقة عن علم، والامتثال (المادة 34)، والمسؤولية والجبر التعويضي (المادة 27)، وتقييم المخاطر وإدارة المخاطر (المادتان 15 و16)، والمناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية (المادة 18) وبناء القدرات (المادة 22). وتتمثل إحدى الشروط المسبقة الرئيسية للتنفيذ الناجح للأنشطة المخططة في توفير موارد مالية كافية تشتمل على آليات بديلة للتمويل ودعم تقني وخصوصا للبلدان النامية والبلدان التي تمر اقتصاداتها بمرحلة انتقالية.

6- وقد أعدت هذه الخطة الاستراتيجية وبرنامج العمل المتعدد السنوات الذي يصاحبها (المرفق الثاني) على أساس الردود المستلمة من الأطراف، وتحليل التقارير الوطنية الأولى، والمقررات المتتالية الصادرة عن مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول في اجتماعاته الأربعة الأخيرة، ومن خلال مناقشات عامة والتعليقات المستلمة من الأطراف، والحكومات الأخرى وأصحاب المصلحة. وتأخذ الخطة الاستراتيجية أيضا في الحسبان الخبرة المكتسبة من خلال وضع وتنفيذ وتنقيح الخطة الاستراتيجية للاتفاقية.

ثانيا- الخطة الاستراتيجية: تفسيرها ورصدها

7- تتكون الخطة الاستراتيجية من رؤية، ومهمة وخمسة أهداف استراتيجية. ولكل هدف استراتيجي عدد من الآثار المتوقعة، والأهداف التشغيلية، والنتائج والمؤشرات. وقد اشتقت الأهداف الاستراتيجية وحددت أولوياتها وفقا لإسهامها في التنفيذ الكامل للبروتوكول، مع مراعاة التنفيذ المحدود الذي أوضحته عملية التقييم والاستعراض. وهناك مجالات بؤرية تبرز الأهداف الاستراتيجية الخمسة وهي حسب الأولوية كما يلي: (1) تيسير إنشاء ومواصلة تطوير نظم فعالة للسلامة الأحيائية من أجل تنفيذ البروتوكول؛ و(2) بناء القدرات؛ و(3) الامتثال والاستعراض؛ و(4) تبادل المعلومات؛ و(5) الإرشاد والتعاون.

8- وتعتبر الرؤية والمهمة بيانين شاملين للحالة المرغوبة والغرض المنشود في المستقبل، وتسعى الخطة الاستراتيجية إلى بلوغهما على المدى الطويل بينما تحدد الأهداف الاستراتيجية الخمسة ما يلزم الوفاء به من أجل تحقيق الرؤية والمهمة خلال فترة السنوات العشر للخطة. وبالإضافة إلى ذلك، عرضت الخطة الاستراتيجية في صورة إطار منطقي من أجل تيسير الرجوع إليها:

(أ) لكل هدف استراتيجي عدد من الآثار المتوقعة التي ستحدث إذا تحقق الهدف الاستراتيجي؛

(ب) تشمل الأهداف التشغيلية إجراءات يلزم الاضطلاع بها من أجل تحقيق الآثار؛

(ج) النتائج هي الآثار التي ستظهر عند تحقيق الأهداف التشغيلية، وسوف يسفر عن مجموع النتائج آثار الغايات الاستراتيجية؛

(د) تعمل المؤشرات كأداة لرصد وتقييم الخطة الاستراتيجية من أجل قياس ما يتحقق من إنجازات.

9- وسوف تختلف نوعية أصحاب المصلحة في الخطة الاستراتيجية حسب القضايا أو الإجراءات أو الأنشطة المذكورة في الخطة. وستنفذ بعض الإجراءات إما من قبل الأطراف أو الحكومات الأخرى أو الأمانة أو المنظمات الأخرى أو الأفراد أو بمزيج من كل هؤلاء.

10- وينبغي أيضا تفسير عناصر الخطة الاستراتيجية في ضوء نص بروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية. ولا ينبغي تفسير وفهم الخطة الاستراتيجية إلا في سياق برتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية ومجال تطبيقه.

11- وسيتم تنفيذ هذه الخطة الاستراتيجية من خلال برنامج عمل للبروتوكول مدته عشر سنوات، تدعمه خطط عمل لفترة سنتين. وسيعدل برنامج العمل المتعدد السنوات من وقت لآخر، عند الضرورة، على أساس ما يلي: (1) الخبرة المكتسبة في تنفيذ متطلبات البروتوكول؛ و(2) نتيجة التقييم والاستعراض الدوري لفعالية البروتوكول حسبما تنص عليه المادة 35 من البروتوكول. وسيجرى تقييم منتصف المدة بعد خمس سنوات من اعتماد الخطة الاستراتيجية. وستستخدم عملية التقييم هذه المؤشرات المدرجة في الخطة الاستراتيجية لتقييم مدى تحقيق الأهداف الاستراتيجية. وستستمد المعلومات أساسا من التقارير الوطنية ومن مصادر أخرى ذات صلة ومتاحة لتوليد البيانات اللازمة للتحليل. وسيظهر التقييم فعالية الخطة الاستراتيجية ويسمح للأطراف بالتكيف مع الاتجاهات الناشئة في تنفيذ البروتوكول. ويتطلب الأمر تخصيص موارد كافية لهذه العملية.

ثالثا- الافتراضات

12- طرح عدد من الافتراضات عند وضع الخطة الاستراتيجية. أولا، يفترض أن مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول سيعتمد عددا من المقررات بما في ذلك بشأن: النهوج العامة لتقييم المخاطر وإدارة المخاطر؛ وتحديد الهوية والتوثيق؛ وبروتوكول تكميلي بشأن المسؤولية والجبر التعويضي؛ والاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية وصنع القرار. ومن المفترض أيضا ما يلي:

(أ) تدرج الأطراف والمنظمات دون الإقليمية قواعد وإجراءات من المقررات الصادرة عن مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول في أطرها الوطنية أو الإقليمية؛

(ب) سيجرى تحديث منتظم "لخطة عمل بناء القدرات من أجل التنفيذ الفعال للبروتوكول"، والموافقة عليها وتنفيذها؛

(ج) تزود الأطراف آلية غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية، بشكل آني، بالتقارير الوطنية والمعلومات المطلوبة، مثل القوانين واللوائح والقرارات القائمة بشأن الكائنات الحية المحورة؛

(د) ستتاح موارد ملائمة ويمكن التنبؤ بها على المستويين الوطني والدولي. كما تجدر ملاحظة أن الميزانيات التفصيلية لفترة السنتين المقدمة في كل اجتماع لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول خلال فترة الخطة الاستراتيجية تعتبر ضرورية للتنفيذ الفعال للخطة الاستراتيجية.

13- وهناك افتراض آخر بأن خط الأساس لحالة تنفيذ البروتوكول والمؤشرات العالمية ستُحدد بعد عملية التقييم والاستعراض الثاني للبروتوكول، في الاجتماع السادس لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول من أجل إعداد صورة عالمية. وقد تمت صياغة المؤشرات بحيث يمكنها تيسير قياس التقدم المحرز مقابل خط الأساس هذا.

رابعا- الاحتياجات من الموارد البشرية لدعم تنفيذ الخطة الاستراتيجية

14- يتطلب تنفيذ الخطة الاستراتيجية موارد مالية كافية لدعم الأنشطة ذات الصلة على المستوى الوطني فضلا عن الأنشطة المتوقع أن تضطلع بها الأمانة.

15- ويلاحظ أن الأطراف تواجه تحديات في الحصول على الأموال المتاحة في إطار الآلية المالية القائمة. ولذلك، فإن من الضروري اتخاذ تدابير لتحسين إمكانيات الحصول على الأموال المتاحة. وفي هذا الصدد، يُدعى مرفق البيئة العالمية إلى إتاحة الأموال للأطراف المؤهلة بطريقة ميسرة ورصد الحصول السريع على هذه الأموال. كما يطلب إلى الأطراف أن تقدم، في تقاريرها الوطنية في القسم الخاص بشكل الإبلاغ الذي يشير إلى بناء القدرات، معلومات عن خبراتها في الحصول على الأموال الخاصة من مرفق البيئة العالمية.

عناصر الخطة الاستراتيجية لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية

<table>
<tr><td colspan="5">الرؤية

توفير حماية ملائمة للتنوع البيولوجي من أي آثار ضارة للكائنات الحية المحورة</td></tr>
<tr><td colspan="5">المهمة

تعزيز الإجراءات والقدرات على المستوى العالمي والإقليمي والوطني لضمان مستوى ملائم من الحماية في مجال أمان نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة التي قد يكون لها آثار ضارة على حفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام، مع الأخذ في الحسبان المخاطر على صحة الإنسان والتركيز تحديدا على التحركات عبر الحدود</td></tr>
<tr><td>الهدف الاستراتيجي</td><td>الآثار المتوقعة</td><td>الأهداف التشغيلية</td><td>النتائج</td><td>المؤشرات</td></tr>
</table>

المجال البؤري 1: تيسير إنشاء ومواصلة تطوير نظم فعالة للسلامة الأحيائية من أجل تنفيذ البروتوكول وضع الأدوات والإرشادات الأخرى اللازمة للتشغيل الكامل للبروتوكول	التنفيذ الكامل لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية من قبل الأطراف أداء معزز من قبل الأطراف نحو بلوغ الأهداف العامة لحفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام	1-1 الأطر الوطنية للسلامة الأحيائية تمكين جميع الأطراف من وضع أطر وطنية تشغيلية للسلامة الأحيائية من أجل تنفيذ البروتوكول	إسناد القرارات المتعلقة بسلامة أي كائن حي محور إلى قواعد تنظيمية وإدارية قائمة بشكل يتسق مع البروتوكول إدماج المسائل المتعلقة بالسلامة الأحيائية وبتنفيذ بروتوكول السلامة الأحيائية في القطاعات ذات الصلة	عدد الأطراف في مراكز المنشأ المعنية التي وضعت تشريعا وطنيا للسلامة الأحيائية ومبادئ توجيهية لتنفيذه في غضون فترة لا تتجاوز ست سنوات من تاريخ الانضمام إلى البروتوكول أو التصديق عليه النسبة المئوية للأطراف التي وضعت قواعد وإجراءات إدارية لمعالجة إخطارات وطلبات الموافقة على واردات الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف، أو للتجهيز؛ وللاستخدام المعزول أو لإدخالها في البيئة النسبة المئوية للأطراف التي عينت نقاط اتصال وطنية وسلطات وطنية مختصة النسبة المئوية للأطراف التي تقلت إخطارات وفقا للمادة 8 من البروتوكول أو التشريعات المحلية الملائمة النسبة المئوية للأطراف التي اتخذت مقررات تتعلق بالواردات وفقا للمادة 10 من البروتوكول أو التشريعات المحلية الملائمة

		2-1 التنسيق والدعم وضع آليات فعالة لتطوير نظم السلامة الأحيائية مع تزويدها بالدعم اللازم للتنسيق والتمويل والرصد	تحسين فهم احتياجات بناء القدرات للأطراف من البلدان النامية والأطراف التي تمر اقتصادها بمرحلة انتقالية إعداد نهج متماسك وآليات فعالة لبناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية أن يكون لدى الأطراف موارد مالية وتقنية كافية يمكن التنبؤ بها لتمكينها من تنفيذ التزاماتها بموجب البروتوكول بطريقة متكاملة ومستدامة أن يضع كل طرف وينفذ استراتيجيات وخطط عمل وطنية لبناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية تعزيز الموارد والفرص الموجودة واستعمالها على نحو أكثر فعالية تحسين التنسيق والتعاون بين الأطراف والكيانات التي تنفذ أو تمول جهود بناء القدرات في مجال	عدد الأطراف التي أجرت تقييما لاحتياجاتها بمجال بناء القدرات، بما في ذلك التدريب والاحتياجات المؤسسية، وقدمت معلومات إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية في فترة لا تتجاوز ثلاث سنوات من تاريخ الانضمام إلى البروتوكول أو التصديق عليه النسبة المئوية للأطراف التي أعدت خطط عمل وطنية لبناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية من أجل تنفيذ البروتوكول النسبة المئوية للأطراف التي وضعت برامج تدريبية للأفراد العاملين في مجال قضايا السلامة الأحيائية وللتدريب طويل الأجل للمتخصصين في مجال السلامة الأحيائية النسبة المئوية للأطراف التي وضعت آليات تنسيق وطنية لمبادرات بناء القدرات في مجال السلامة الأحيائية حجم الموارد الجديدة والإضافية المعبئة لتنفيذ البروتوكول عدد الأطراف التي لديها تمويل موثوق ويمكن التنبؤ به لتعزيز قدراتها على تنفيذ البروتوكول عدد الأطراف التي تبلغ عن الوفاء باحتياجاتها لبناء

		3-1 تقييم المخاطر وإدارة المخاطر مواصلة تطوير ودعم تنفيذ أدوات علمية بشأن النهوج العامة لتقييم المخاطر وإدارة المخاطر بالنسبة للأطراف	إرشادات عن تقييم المخاطر وإدارة المخاطر بما فيها إرشادات عن التطورات الجديدة في التكنولوجيا الأحيائية الحديثة إنشاء الأطراف والحكومات الأخرى واعتمادها للنهوج العامة لتقييم المخاطر وإدارة المخاطر، عند الاقتضاء	النسبة المئوية للأطراف التي اعتمدت وثائق إرشادية عن تقييم المخاطر وإدارة المخاطر وتستخدمها إجراء عمليات تقييم المخاطر وإدارة المخاطر الخاصة بها تقييم تقارير تقييم المخاطر المقدمة من أصحاب الإخطارات النسبة المئوية للأطراف التي اعتمدت نهوجا مشتركة إزاء تقييم المخاطر وإدارة المخاطر النسبة المئوية للأطراف التي تضطلع بعمليات تقييم المخاطر وفقا للبروتوكول

		4-1 الكائنات الحية المحورة أو السمات التي قد تكون لها آثار ضارة إعداد طرائق للتعاون وإرشادات لتحديد هوية الكائنات الحية المحورة أو السمات المحددة التي قد يكون لها آثار ضارة على حفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام، مع مراعاة أيضا المخاطر على صحة الإنسان	إعداد الطرائق ووضعها تمكين الأطراف من تحديد وتقييم ورصد الكائنات الحية المحورة أو السمات المحددة التي قد يكون لها آثار ضارة قيام الأطراف بإعداد وإتاحة إرشادات عن الكائنات الحية المحورة أو السمات المحددة التي قد يكون لها آثار ضارة على حفظ التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام، مع مراعاة أيضا المخاطر على صحة الإنسان	التوجيه بشأن الكائنات الحية المحورة أو السلالات المعينة التي قد يكون لها تأثيرات ضارة على صون التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام مع مراعاة المخاطر على صحة البشر عدد الأطراف التي لديها القدرة على تحديد هوية تقييم ورصد الكائنات الحية المحورة أو السلالات المعنية التي قد يكون لها تأثيرات ضارة على صون التنوع البيولوجي واستخدامه المستدام مع مراعاة المخاطر على صحة البشر

		5-1 المسؤولية والجبر التعويضي لاعتماد وتنفيذ بروتوكول ناغويا- كوالالمبور بشأن المسؤولية والجبر التعويض التكميلي لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية	يتخذ كل طرف التدابير الإدارية والقانونية اللازمة لتنفيذ بروتوكول ناغويا- كوالالمبور بشأن المسؤولية والجبر التعويضي التكميلي لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية على المستوى المحلي	بدء إنفاذ بروتوكول ناغويا- كوالالمبور بشأن المسؤولية والجبر التعويضي التكميلي لبروتوكول السلامة الأحيائية قبل الاجتماع السابع لمؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول النسبة المئوية للأطراف في بروتوكول ناغويا- كوالالمبور بشأن المسؤولية والجبر التعويضي التكميلي لبروتوكول قرطاجنة للسلامة الأحيائية التي لديها أطر إدارية وقانونية وطنية تتضمن قواعد وإجراءات بشأن المسؤولية والجبر التعويضي عن الأضرار الناشئة عن الكائنات الحية المحورة

		6-1 المناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية تمكين الأطراف من تنفيذ متطلبات البروتوكول ومقررات مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول بشأن متطلبات تحديد هوية الكائنات الحية المحورة ومستنداتها	تحديد هوية جميع شحنات الكائنات الحية المحورة المراد استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف أو للتجهيز، أو للاستخدام المعزول أو للإدخال عن عمد في البيئة، من خلال الوثائق المصاحبة وفقا لمتطلبات البروتوكول ومقررات مؤتمر الأطراف العامل كاجتماع للأطراف في البروتوكول وضع وإتاحة أدوات تقنية سهلة الاستخدام الحية المحورة غير المرخص بها استخدام التوجيه القائم لمناولة ونقل وتعبئة الكائنات الحية المحورة	نسبة الأطراف التي وضعت متطلبات الوثائق للكائنات الحية المحورة المقصود استخدامها مباشرة كأغذية أو كأعلاف، أو للتجهيز نسبة الأطراف التي وضعت متطلبات الوثائق للكائنات الحية المحورة للاستخدام المعزول والإدخال عن عمد في البيئة عدد الأطراف التي لديها فرص الحصول على الأدوات القادرة على رصد الكائنات الحية المحورة غير المرخص بها عدد الأطراف التي تستخدم التوجيه القائم بشأن المناولة والنقل والتعبئة الخاصة بالكائنات الحية المحورة

		7-1 الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية تقديم توجيه، يستند إلى البحوث وتبادل المعلومات بشأن الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية التي تؤخذ في الحسبان عند اتخاذ قرارات بشأن استيراد الكائنات الحية المحورة	البحوث المستعرضة من قبل النظراء ذات الصلة بالاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية، مع مراعاة طريقة استعراض النظراء حسبما هي محددة في القسم هاء من المرفق الثالث من المقرر 10/8 قيام الأطراف بإعداد واستخدام المبادئ التوجيهية المتعلقة بالاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية للكائنات الحية المحورة، حسب الاقتضاء قيام الأطراف بتطبيق الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية، عند الاقتضاء	عدد البحوث التي تخضع لاستعراض النظراء التي نُشرت والتي تتيحها وتستخدمها الأطراف لدى النظر في التأثيرات الاجتماعية والاقتصادية للكائنات الحية المحورة عدد الأطراف المبلغة عن نهوجها المتبعة من أجل مراعاة الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية عدد الأطراف المبلغة عن خبراتها في مراعاة الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية عند اتخاذ قرارات بشأن استيراد الكائنات الحية المحورة عدد الأطراف التي تستخدم مبادئ توجيهية بشأن الاعتبارات الاجتماعية والاقتصادية

		8-1 العبور، والاستخدام المعزول والتحركات غير المقصودة عبر الحدود وتدابير الطوارئ إعداد أدوات وإرشادات من شأنها أن تيسر تنفيذ أحكام البروتوكول بشأن العبور، والاستخدام المعزول، والتحركات غير المقصورة عبر الحدود وتدابير الطوارئ	تمكين الأطراف من إدارة الكائنات الحية المحورة العابرة إعداد إرشادات لمساعدة الأطراف على كشف حدوث إطلاقات غير مقصودة للكائنات الحية المحورة واتخاذ تدابير استجابة بصددها	النسبة المئوية للأطراف التي وضعت تدابير لإدارة الكائنات الحية المحورة العابرة النسبة المئوية للأطراف التي وضعت تدابير للاستخدام المعزول النسبة المئوية للأطراف التي تستخدم الإرشادات للكشف عن حدوث حالا إطلاقات غير مقصودة للكائنات الحية المحورة والتي تستطيع أن تتخذ تدابير استجابة ملائمة

المجال البؤري 2: بناء القدرات 2- مواصلة تطوير وتعزيز قدرات الأطراف على تنفيذ البروتوكول	زيادة مستوى أمان نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة قيام الأطراف بإعداد أطر تنظيمية وإدارية وللرصد بحيث تكون فعالة وتتسم بالكفاءة لتنفيذ البروتوكول وضع الآليات الضرورية لتمكين الأطراف من القيام بتقييمات المخاطر على أساس علمي تحقيق شفافية أكبر في صنع القرار وتعجيل اتخاذه الاستخدام الكامل لنظم تبادل المعلومات	2-1 الأطر الوطنية للسلامة الأحيائية زيادة دعم وضع وتنفيذ النظم التنظيمية والإدارية	إعداد وتنفيذ الأطر الوطنية للسلامة الأحيائية	عدد الأطراف التي لديها أطر تنظيمية تشغيلية عدد الأطراف التي لديها ترتيبات إدارية وظيفية

نسبة تقارير تلخيص تقييم المخاطر في ضوء عدد المقررات بشأن الكائنات الحية المحورة وبشأن غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد تقارير ملخصات تقييم المخاطر في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية، عدد الإفراد المدربين على تقييم المخاطر وعلى رصد وإدارة ومكافحة الكائنات الحية المحورة عدد الأطراف التي لديها بنية أساسية بما في ذلك المختبرات للرصد والإدارة والمكافحة المتوافرة عدد الأطراف التي تستخدم المواد التدريبية المعدة والتوجيه التقني عدد الأطراف التي ترى أن مواد التدريب والتوجيه التقني كافية وفعالة	توفير الموارد بما في ذلك الموارد البشرية اللازمة لتقييم مخاطر الكائنات الحية المحورة وإقامة الآليات الإدارية قيام الأطراف بإعداد مواد التدريب والتوجيه التقني بشأن تقييم المخاطر وإدارة المخاطر على المستويات الوطنية والإقليمية الفرعية والإقليمية إنشاء بنية تحتية وآليات إدارية لإدارة مخاطر الكائنات الحية المحورة على الصعيد الوطني أو دون الإقليمي أو الإقليمي	2-2 تقييم المخاطر وإدارة المخاطر لتمكين الأطراف من التقييم والتطبيق والتبادل وإجراء عمليات تقييم المخاطر وإقامة قدرات تستند إلى العلوم العملية لتنظيم وإدارة ورصد ومراقبة مخاطر الكائنات الحية المحورة		

		3-2 المناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية تطوير القدرات على مناولة ونقل وتعبئة وتحديد هوية الكائنات الحية المحورة	تمكين مسؤولي الجمارك/الحدود من إنفاذ تنفيذ متطلبات البروتوكول المتعلقة بالمناولة والنقل والتعبئة وتحديد الهوية للكائنات الحية المحورة تدريب الأفراد وتزويدهم بالمعدات لأخذ عينات الكائنات الحية المحورة والكشف عنها وتحديد هويتها	عدد مسؤولي الجمارك وأفراد المختبرات المدربين النسبة المئوية للأطراف التي أنشأت مختبرات موثوقة للكشف أو يمكنها الوصول إلى مختبرات موثوقة للكشف ترخيص المختبرات الوطنية والإقليمية التي لديها قدرة على كشف الكائنات الحية المحورة عدد المختبرات المعتمدة التي تعمل بالفعل

		4-2 المسؤولية والجبر التعويضي مساعدة الأطراف في البروتوكول في جهودها لإعداد وتطبيق القواعد والإجراءات بشأن المسؤولية والجبر التعويضي عن الضرر الناشئ عن التحركات عبر الحدود للكائنات الحية المحورة	تحديد أو إنشاء آلية أو عملية مؤسسية لتيسير تنفيذ القواعد والإجراءات الدولية بشأن المسؤولية والجبر التعويضي على المستوى الوطني	عدد الأطراف المؤهلة التي تلقت دعما لبناء القدرات في مجال المسؤولية والجبر التعويضي فيما يتعلق بالكائنات الحية المحورة عدد الصكوك الإدارية أو القانونية المحلية المعرّفة، أو التي تم تعديلها أو التي تم سنها حديثا التي تستوفى هدف القواعد والإجراءات الدولية في مجال المسؤولية والجبر التعويضي

		5-2 التوعية العامة والتثقيف والمشاركة تعزيز القدرات على المستويات الوطنية والإقليمية والدولية التي يمكن أن تيسر جهود زيادة التوعية العامة، وتعزيز التثقيف والمشاركة فيما يتعلق بأمان نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة	حصول الأطراف على الإرشادات والمواد التدريبية بشأن التوعية العامة والتثقيف والمشاركة فيما يتعلق بأمان نقل ومناولة واستخدام الكائنات الحية المحورة تمكين الأطراف من تعزيز وتيسير التوعية العامة والتثقيف والمشاركة في مجال السلامة الأحيائية	النسبة المئوية للأطراف التي وضعت آليات لضمان المشاركة العامة في صنع القرارات المتعلقة بالكائنات الحية المحورة في غضون مهلة لا تتجاوز ست سنوات بعد تاريخ الانضمام إلى البروتوكول أو التصديق عليه النسبة المئوية للأطراف التي تبلغ جمهورها بطرائق مشاركته الموجودة عدد الأطراف التي أنشأت مواقع شبكية وطنية وأرشيفا يمكن البحث فيه، ومراكز موارد وطنية أو أقسام في المكتبات الوطنية مخصصة للمواد التعليمية في مجال السلامة الأحيائية

		6-2 تبادل المعلومات تأمين سهولة وصول جميع أصحاب المصلحة المعتمدين إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية، وخصوصا البلدان النامية والبلدان التي تمر اقتصاداتها بمرحلة انتقالية	زيادة الوصول إلى المعلومات في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية وتبادل المعلومات من خلال الغرفة من قبل المستخدمين من البلدان النامية والبلدان التي تمر اقتصاداتها بمرحلة انتقالية سهولة الوصول إلى أدوات لتيسير تنفيذ البروتوكول من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية سهولة حصول أصحاب المصلحة بما فيهم الجمهور العام على معلومات عن غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية	عدد الردود إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية الواردة من البلدان النامية والبلدان التي تمر اقتصاداتها بمرحلة انتقالية حجم الحركة من المستخدمين إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية من البلدان النامية والبلدان التي تمر اقتصاداتها بمرحلة انتقالية

		7-2 التعليم والتدريب في مجال السلامة الأحيائية تعزيز التعليم والتدريب بالنسبة للمهنيين في مجال السلامة الأحيائية من خلال تنسيق وتعاون أكبر بين المؤسسات الأكاديمية والمنظمات المعنية	إتاحة قائمة مستدامة من مهنيي السلامة الأحيائية بكفاءات مختلفة على المستويين الوطني/الدولي تحسين البرامج التعليمية والتدريبية في مجال السلامة الأحيائية زيادة تبادل المعلومات ومواد التدريب، وبرامج تبادل الأفراد والطلبة بين المؤسسات الأكاديمية والمنظمات المعنية	عدد المؤسسات الأكاديمية حسب الإقليم التي تقدم دورات وبرامج تعليمية وتدريبية في مجال السلامة الأحيائية عدد المواد التدريبية والوحدات الإلكترونية المباشرة في مجال السلامة الأحيائية

المجال البؤري 3: الامتثال والاستعراض تحقيق الامتثال للبروتوكول وتحقيق فعالية البروتوكول	امتثال الأطراف لمتطلبات البروتوكول	3-1 الامتثال للبروتوكول تعزيز الآليات من أجل تحقيق الامتثال	قيام كل طرف بتنفيذ التزاماته بالكامل ورصد تنفيذ التزاماته بانتظام بموجب البروتوكول إبلاغ محسن من الأطراف عن طريق رفع تقارير وطنية كاملة وفي مواعيدها تمكين جميع الأطراف من إنفاذ أطرها التنظيمية وقراراتها تخصيص الموارد المالية الكافية للامتثال تمكين لجنة الامتثال من الاستعراض الشامل لتنفيذ الأطراف لالتزاماتها وتقترح تدابير مناسبة تحسين الدور المساند للجنة الامتثال	عدد الأطراف التي حددت وعالجت مشاكلها المتعلقة بعدم الامتثال عدد الأطراف التي اعتمدت وشغلت تدابير وطنية قانونية وإدارية وتدابير أخرى لتنفيذ البروتوكول النسبة المئوية للأطراف التي عينت نقاط اتصال وطنية عدد الأطراف التي وضعت نظاما لمعالجة الطلبات بما في ذلك اتفاق الموافقة الحرة المسبقة عن علم النسبة المئوية للأطراف التي نشرت جميع المعلومات الإلزامية من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد الأطراف التي وضعت نظاما للرصد والإنفاذ عدد التقارير الوطنية المستلمة بموجب كل دورة إبلاغ عدد الأطراف القادرة على الحصول على الموارد للوفاء بالتزاماتها بموجب البروتوكول

		2-3 التقييم والاستعراض تحسين فعالية البروتوكول، بما في ذلك من خلال عمليات منتظمة للتقييم والاستعراض	تقييم واستعراض البروتوكول، بما في ذلك إجراءاته ومرفقاته، على أساس منتظم تكييف البروتوكول، بما في ذلك إجراءاته ومرفقاته، إذا ظهرت تحديات جديدة من التطورات في مجال التكنولوجية الأحيائية الحديثة أو تكييفه مع التحديات التي تعترض التنفيذ	عدد تقارير التقييم المقدمة والاستعراضات المنشورة عدد الأطراف التي عدلت أطرها الوطنية للسلامة الأحيائية لتتناسب مع التعديلات المعتمدة على البروتوكول لمعالجة التحديات الجديدة

المجال البؤري 4: **تبادل المعلومات** تعزيز توافر المعلومات ذات الصلة وتبادلها	تحقيق الشفافية عند تطوير واستخدام الكائنات الحية المحورة امتثال متزايد للمتطلبات الوطنية والدولية صنع قرارات مستنيرة تعزيز توعية الجمهور بالسلامة الأحيائية	4-1 فعالية غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية زيادة كمية ونوعية المعلومات المقدمة إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية والتي يُحصل عليها منها	الاعتراف بغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية باعتبارها جهة إيداع مختصة للمعلومات عن السلامة الأحيائية المعلومات المقدمة إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية تكون دقيقة وكاملة وفي التوقيت المناسب قيام عدد كبير من البلدان بتقديم المعلومات والحصول عليها تبادل تقارير تقييم المخاطر بطريقة آنية من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية الحصول الميسر على الموارد والخبرات المتعلقة بالسلامة الأحيائية	النسبة المئوية للتقارير الموجزة عن تقييم المخاطر مقابل عدد المقررات بشأن الكائنات الحية المحورة عدد النشرات الواردة في مركز موارد غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية حجم الحركة من المستخدمين إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد مرات الإشارة إلى غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد البلدان التي لديها نقاط اتصال وطنية مسجلة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد البلدان/الأقاليم التي نشرت قوانين و/أو لوائح السلامة الأحيائية على غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد الموافقة المسبقة عن علم/القرارات المحلية المتاحة من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية عدد مستعملي غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية الذين يطالبون بتحسين الدقة والاكتمال للمعلومات ونطاقاتها الزمنية

		2-4 غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية كأداة إلكترونية مباشرة للمناقشات والمؤتمرات. إنشاء غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية كمنصة تشغيلية كاملة وفعالة لمساعدة البلدان على تنفيذ البروتوكول.	تكون البلدان مجهزة على نحو أفضل بالأدوات المتاحة من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية. تطبق على نحو مستمر مبادئ غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية المتعلقة بالشمولية والشفافية والإنصاف. تيسير عقد المناقشات وعمليات التفاوض بشأن البروتوكول من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية. زيادة التوعية بغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية في مختلف مجموعات أصحاب المصلحة والأقاليم.	عدد المناقشات الإلكترونية المباشرة والمؤتمرات الفعلية التي يتم إجراؤها من خلال غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية. النسبة المئوية للأطراف التي تشترك في مناقشات إلكترونية مباشرة ومؤتمرات فعلية على غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية. عدد المشاركين في المناقشات والمؤتمرات الإلكترونية المباشرة، وتنوعهم والمعلومات الأساسية عنهم عدد أنشطة بناء القدرات الرامية إلى زيادة الشفافية، والشمولية والإنصاف في المشاركة في غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية.

		4-3 تبادل المعلومات في أماكن أخرى بخلاف غرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية. تعزيز الفهم من خلال آليات تبادل المعلومات الأخرى.	تعزيز تبادل المعلومات في الاجتماعات الإقليمية والوطنية والدولية بشأن التنوع البيولوجي والسلامة الأحيائية. استعمال طرائق وفرص مختلفة لتبادل المعلومات المتعلقة بالسلامة الأحيائية.	عدد المناسبات المنظمة بالعلاقة إلى السلامة الأحيائية عدد النشرات المتعلقة بالسلامة الأحيائية التي يتم تبادلها.
المجال البؤري 5: **الإرشاد والتعاون** توسيع نطاق البروتوكول وتعزيز التعاون.	دعم سياسي متزايد لتنفيذ البروتوكول دعم متزايد وتعاون متزايد مع المنظمات والاتفاقيات والمبادرات المعنية من أجل تنفيذ البروتوكول.	5-1 التصديق على البروتوكول تحقيق الاعتراف العالمي بالبروتوكول	تصبح جميع الأطراف في الاتفاقية أطرافا في البروتوكول	النسبة المئوية للأطراف في اتفاقية التنوع البيولوجي التي أصبحت أطرافا في البروتوكول.

		2-5 التعاون تعزيز التعاون الدولي في مجال السلامة الأحيائية	إنشاء العلاقات الرسمية مع أمانات الاتفاقيات والمنظمات الأخرى. دعوة أمانة اتفاقية التنوع البيولوجي لحضور اجتماعات بصفة مراقب في لجنة التدابير الصحية وتدابير الصحة النباتية ولجنة الحواجز التقنية للتجارة التابعتين لمنظمة التجارة العالمية.	عدد العلاقات المنشأة مع الاتفاقيات الأخرى حسبما ينعكس في الأنشطة المشتركة.

		3-5 الاتصال والتواصل زيادة التوعية بالبروتوكول	تعزيز خدمات التواصل مع البروتوكول بين أصحاب المصلحة الوطنيين والدوليين ذوي الصلة. قيام جميع الأطراف بإعداد وتنفيذ استراتيجيات للتثقيف والاتصال. تغطية منتظمة لوسائل الإعلام المحلية وكذلك الدولية عن قضايا السلامة الأحيائية وأنشطة البروتوكول. فهم متزايد للعلاقة بين البروتوكول واتفاقية التنوع البيولوجي والاتفاقات الأخرى المتعلقة بالسلامة الأحيائية.	عدد البرامج الوطنية للتوعية والتواصل بشأن السلامة الأحيائية. النسبة المئوية للأطراف التي وضعت استراتيجيات اتصال وطنية بشأن السلامة الأحيائية في فترة لا تتجاوز 3 سنوات من اعتماد القوانين الوطنية للسلامة الأحيائية. النسبة المئوية للأطراف التي أنشأت مواقع شبكية وطنية للسلامة الأحيائية، بما فيها الوصلات الوطنية لغرفة تبادل معلومات السلامة الأحيائية التي يمكن للجمهور الوصول إليها والبحث من خلالها. عدد الأطراف التي لديها مواد للتوعية والتعليم بشأن السلامة الأحيائية والبروتوكول متاحة للجمهور ويسهل وصوله إليها، بما في ذلك تنوع هذه المواد.

المصادر

1- Al-Attar, E. S. A. (2012). Stimulation of some secondary metabolites with medical importance of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) *in vitro*. MSc Thesis, College of Science, Al-Mustansiriyah University, Iraq.

2- Al-Mafargi, K. I. R. (2010). Stydy the effect of some biotic and abiotic factors on enhancement of essential oils and rosemarinic acid in rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.) *in vitro*. Ph.D dissertation, College of Science, Al-Nahrain University, Iraq.

3- Altman, A. and Hasegawa, P. M. (2012). Plant Biotechnology Prospects and Agriculture for the 21 st Century. Elsevier Academic Press.

4- Azeez, H. A. (2012). Induction of secondary metabolites in *Hypericum triquetrifolium* Turra using some biotechnological approaches *in vitro*. Ph.D dissertation, College of Science, Sulaimani University, Iraq.

5- Ali, A. K. (2014). Using Bean pod mottle virus (BPMV) as virus-induced gene silencing (VIGS) vector to target multiple genes in *Glycine max* L. Merr. PhD Disserttion, College of Science, Al-Nahrain University, Iraq.

6- Bohnert, H., Nguyen (2008). Molecular Biology of Plant Pathways. Advances in Plant Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 1. Elsevier Ltd.

7- Chawla, H. S. (2011). Introductionn to Plant Biotechnology. (3rd ed.). Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd.

8- Chandra, S., Lata, H. and Varma, A. (2013). Biotechnology for Medicinal Plants. Springer.

9- Cramer, G. R. *et al*. (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective   BMC Plant Biology, 11: 163-177.

10- Duttagupta, S. and Ibaraki, Y. (2008). Plant Tissue Culture Engineering. Springer.

11- Evans, G. M. and Furlong, J. C. (2011). Environmental Biotechnology: Theory and Applications (2nd ed.). John Wiley & Sons,

12- Gaglani, S. (2006). Chloroplast Genetic Engineering a novel method to produce therapeutic proteins. Harvard Science Review. Pp 36-39.

13- George, F. E., Hall, M. A. and De Klerk, G. (2007). Plant Propagation by Tissue Culture (3rd ed.). Springer.

14- Guide to Biotechnology (2012). Biotechnology Industry Organization.

15- Harisha, S. (2007). Biotechnology Procedures and Experiments Handbook. Infinity Science Press LLC.

16- Hall, R. D. (1999). Plant Cell Culture Protocols, Humana Press.

17- Hartmann, H. T. and Kester, D. E. (1997). Plant Propagation, Principles and Practices. Prentice Hall International, Inc.

18- Hopkins, W. G. (2007). Plant Biotechnology. Chelsea House Publishers.

19- Khierallah, H. S. M. (2007). Micropropagation of two date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using inflorescences and study the genetic markers using AFLP markers. Ph.D dissertation, College of Agriculture, Baghdad University, Iraq.

20- Kirakosyan, A. *et al*. (2006). Natural Products from Plants**.**

(2nd ed.). Visit the Taylor & Francis Web site at http://www.taylorandfrancis.com and the CRC Press Web site at http://www.crcpress.com. Taylor & Francis Group

is the Academic Division of Informa plc.

21- Misra, S. P. (2009). Plant Tissue Culture. Ane Books Pvt. LTD.

22- Mohammed, R. S. (2010). The potential of some locally grown plants to genetic transformation with cytochrome *p450* and their use in phytoremediation. Ph.D dissertation, College of Science, Al-Nahrain University, Iraq.

23- Munns, R. and Tester, M. (2008). Mechanisms of salt tolerance. Annu. Rev. Plant Biol., 59:651-681.

24- National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. EPA/600/R-99/107 February 2000.

25- Rai, M. K., *et al*. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection- An overview of the recent progress. Environ. and Exper. Botany, 71:89-98.

26- Rao, K. V., Raghava, A. S. and Reddy, K. J. (2006). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer.

27- Ramawat, K. G. (2008). Plant Biotechnology (3rd ed.). S. Chand & Company LTD.

28- Sandelius, A. S. and Aronsson, H. (2009). The Chloroplast, Interactions with the Environment. Springer.

29- Satyanarayana, U. (2005). Biotechnology. Books and Allied LTD.

30- Scherper, T. (2001). Plant Cells. Springer.

31- Sen, A. (2012). Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture. http://dx.doi.org/10.5772/48292.

32- Shivanna, K. R. and Sawhney, V.K. (2005). Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement. Cambridge University Press.

33- Srivastava, P. S., Narula, A. and Srivastava, S. (2005). Plant Biotechnology and Molecular Markers. Kluwer Academic Publishers.

34- Suleiman, A. B. J. (2012). Transformation of salt tolerant *Lactuca sativa* with cholera toxin B gene for production of edible vaccine. Ph.D dissertation, College of Science, Al-Nahrain University, Iraq.

CRC Press, Woodhead Publishing LTD.

35- Touraey, A., *et al.* (2009). Advances in Haploid Production in Higher Plants. © Springer Science + Business Media B.V.

36- Trigiano, R. N. and Gray, D. J. (2000). Plant Tissue Culture Concepts and Laboratory Exercises (2^{nd} ed.). CRC Press LLC.

37- Pual, C. and Davey, M. R. (2010). Plant Developmental Biology, Biotechnological Perspectives (Vol. 2). Springer.

38- Oksmah-Caldentey, K. and Barz, W. H. (2002). Plant Biotechnology and Transgenic Plants. Marcel Dekker, Inc.

39- Rao, K. V. M. and Raghavendra, A. S. and Reddy, K. J. (2006). Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants. Springer.

40- Valpuesta, V. (2002). Fruit and Vegetable Biotechnology.

41- Wang, Y. Y., Kuang, A., Russell, S. D. and Tian, H. Q. (2006).

In vitro fertilization as a tool for investigating sexual reproduction of angiosperms. Sex Plant Reproduction.

DOI 10.1007/s00497-006-0029-1. Springer-Verlag.

42- Wink, M. (2010). Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites. (2nd ed.). Vol. 39, Annual Plant Reviews. A John Wiley & Sons, Ltd., Publications.

الملاحق

ملحق 1. بعض المركبات الثانوية المهمة والمنتجة من فطريات على نطاق تجاري بطرائق التقانات الأحيائية

المركبات الثانوية	الإستعمال
Organic Acids - Citric acid	Flavoring ingredient in candies, soft drinks, medicines; used in inks and the dye industry
Alcohols - Ethyl alcohol - Glycerol	Industrial solvent, medicines, raw material in the manufacture of materials such as ether, acetic acid, synthetic rubber Glycerin, explosives
Drugs - Penicillin - Griseofulvin	Oral and injectible antibiotic Oral and topical antibiotic
Vitamins and Growth Factors - B vitamins - Riboflavin - Gibberellin - Beta-carotene	Nutritional supplement and medical therapy Nutritional supplement and medical therapy Plant growth hormone with commerical applications in floriculture Synthesis of vitamin A (provitamine A), nutritional supplement, and coloring agent for margarine

Enzymes - Amylase - Rennet - Invertase - Pectinase - Proteases	Conversion of starch to sugars prior to fermentation Milk coagulation in the manufacture of cheese Hydrolyzes sucrose (table sugar) to glucose and fructose Pretreatment of fruit juices to remove turbidity removal of pectin before concentrating fruit juices Hydrolysis of proteins during food processing

ملحق 2. التحوير الوراثي لأشجار الفاكهة فيما يتعلق بنشوئها واكثارها

طرائق التحوير الوراثي Transformation =T

طرائق التغاير الجسمي Somaclonal variation=S.V

=*A. rh. Agrobacterium tumefaciens*; *A. t.= Agrobacterium rhizogenes*

نوع أشجار الفاكهة	التقانة	الجين المنقول	النظام/ البلازميد أو عامل الإنتخاب	مصدر المادة النباتية	التحوير الحاصل
Apple *(Malus* X *domestica)* M26 rootstock	T	*RiT-DNA*	*A.rh.*	عقل دقيقة	زيادة القابلية على التجذير وتغيير في الشكل المظهري
Apple (*Malus* X *domestica)* cv. Granny smith	T	*Ipt*	*A.t.*	أجزاء الورقة	شكل شجيري

Apple (*Malus* X *domestica)* (M26) rootstock	T	*rolA*	*A.t.*	ورقة	تغيير في الشكل المظهري
Apple (*Malus* X *domestica)* (M26) rootstock	T	*rolB*	*A.t.*	ورقة	تحسين قابلية التجذير
Banana (*Musa spp*. AAA group)	S.V	-	-	مرستيم	تقزم، أوراق بنمو غير طبيعي، تغيير لون الساق الكاذب، تغيير في مستوى التضاعف
Banana (*Musa spp*. AAB group)	S.V	-	-	مرستيم	نموات غير طبيعية للأوراق والأزهار
Blackberry *(Rubus lacimiathus*)	S.V	-	-	نهايات الأفرع	عديمة الأشواك، قزمية، تغيير في الشكل المظهري
Blackberry *(Rubus fruticosus)*	S.V	-	Tissue culture	براعم	عديمة الأشواك
Citrang troyer (*C. sinensis* X *Poncinis trifoliate) and Organe (C. sinensis)* cv. *Tarocco*	T	*rolABC*	*A.t.*	سلاميات	تغيير في الشكل المظهري
Clementine (*Citrus clementine)*	S.V	-	-	نسيج الجويزاء	عديمة الأشواك
Colt rootstock (*P. avium* X *P. pseudocerasus)*	T	*RiT-DNA*	*A.rh.*	جذور	مظهر الشعيرات الجذرية

Colt rootstock (*P. avium* X *P. pseudocerasus)*	T	*PhyA*	*A.t.*	ساق	تغيير طبيعة نمو الشجرة ومقدار تعرضها للضوء
Grape *(Vitis vinifera*) cv. Koshusanjaku	T	*Rit-DNA*	*A.rh.*	ورقة، كالس جنيني	إنتاج كتلة اكبر من الجذور
Grape *(Vitis vinifera*) cv. Parodok Magaracha	S.V.	-	Gamma irradiation		تضاعف رباعي
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) male (cv GTH) and female (cv. Hayward)	T	*rolABC*	*A.t.*	أقراص من الورقة	تغيير مظهري وإنتاج الجذور الشعرية
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) female (cv. Hayward)	T	*rolB*	*A.t*	أقراص من الورقة	شكل مظهري طبيعي
Kiwi fruit (*A. deliciosa), cvs*: Hayward, Abbot, Matsua and Bruno	T	*RiT-DNA*	*A.rh. IFO14555, A5, ArM123, A13*	حامل الورقة	براعم عرضية
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*)	T	*RiT-DNA*	*A.rh. NIAES 1724*	سويقة جنينية عليا	ظهور الجذور الشعرية
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*)	T	*OSHI*	*A.t.*	أوراق	تقزم
Kiwi fruit (*A. deliciosa*)	T	*rolC*	*A.t.*	أوراق	تغيير في الشكل المظهري
Mexican lime *(C. aurantifolia)*	T	*RiT-DNA*	*A.rh.*	سلامية	تغيير في الشكل المظهري
PaPaya (*Carica papaya* L.)	T	*Ri-TDNA*	*A.rh.*	أجنة من البيضة المخصبة	ظهور الجذور الشعرية

PaPaya (*Carica papaya* L.)	T	*rol genes*	*A.rh.*	حامل الورقة	ظهور الجذور الشعرية
Peach *(Pranis persica)*	T	*Ipt*	*A.T.*	أجنة من البيضة المخصبة	طبيعة نمو مضغوطة
Pear *(Pyrus communis*)	S.V	-	-	بروتوبلاست	تغيير في شكل الورقة وإستجابة اعلى للتجذير
Persimmon *(Diospiros kaki)*	T	*Rit-DNA*	*A.rh.*	ساق العقلة الدقيقة	تغيير في الشكل المظهري
Plum rootstock (MRS2/5)	T	*RiT-DNA*	*A. rh.*	جذور محورة وراثياً	تغيير في الشكل المظهري
Red raspberry *(Rubus ideaus)*	T	*Hpt, SAMase*	*A.T.*	أوراق وحامل الورقة	تغيير في الشكل المظهري
(Rubus ideaus and *Robus ursimus* loganobaccus*)*	S.V.	-	-	كالس مرستيمي	عديمة الأشواك
Strawberry *(Fragaria X Ananassa)* cv. Calypso	T	*rolC*	*A.t.*	أوراق	طبيعة نمو مضغوطة
Strawberry *(Fragaria X Ananassa)*	T	*rolABC*	*A.t.*	قنابات ورقية	طبيعة نمو مضغوطة
Trifoliate Orange *(P. trifoliate*)	T	*RiT-DNA*	*A.rh. 1724*	سويق فوق الأوراق الفلقية	تغيير في الشكل المظهري
Trifoliate Orange *(P. trifoliate*)	T	*rolC*	*A.t.*	سويق فوق الأوراق الفلقية	تغيير في الشكل المظهري

ملحق 3. تحويرات وراثية لتحسين نوعية الثمار في مجموعة من أشجار الفاكهة

محصول الفاكهة	التقانة	الجين المنقول	النظام/ البلازميد أو عامل الإنتخاب	مصدر المادة النباتية	خاصية النبات
Apple, Pear, Strawberry	T	thanmatin	*A. tumefaciens*	Leaf pieces	Sweeter (not determined)
Kiwi, Strawberry, grape	T	Defh9-iaaM	*A.t.*	Leaf	Parthenocarp y
Kiwi fruit (*A. chinensis)*	T	hEGF	*A.t.*	Leaf	Not determined
Peach (*P. persica)* (cv Redhaven)	T	EGases-encoding cDNA	*PB*	Cells	Not determined
Strawberry (*Fragaria* X *ananassa*)	T	SAMase	*A.t.*	Leaf	Not determined
Walnut (*J. nigra* X *J. regia)*	T	Chs (antisense)	*A.t.*	Somatic embryos	Low chalcone No quecitrin

ملحق 4. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة مقاومة للأمراض

Fruit crops	Technique	Alien gene (s)	System/Plasmid or selective agents	Origin of plant material	Resistance in *planta*
Apple (*Malus* X *domestica)*	T	*amp*	*A.t.*	Leaf	Confirmed
Apple (*Malus* X *domestica)*	T	*endochitinase*	*A.t.*	Leaf	Confirmed for apple scab
Apple (*Malus* X *domestica)*	S.V.	-	*Culture filtrate of P. cactorum*	Shoot regeneration	*Phytophthora cactorum*

Apple (*Malus X domestica)* Borkh McIntosh	T	*ThEn-42*	*A.t.*	Maternal	*Ventaria inequalis* Apple scab
Apple rootstock N545	T	*RS-AFP-2*	*A.t. supervirulent*	Leaf pieces	Not determined
Apple (*Malus X domestica)*	T	*Defensim*	-	-	Not determined
Apple (*Malus X domestica*), cv. Melba	T	*Thaaumatin II*	*A.t. CBE21, 35S promoter*	Leaf pieces	Not determined

Banana (*Musa spp)* Dwarf Parfitt (AAA-Cavendish)	S.V.	-	Irradiation	Shoots	Fusarium wilt-race 4
Banana (*Musa* (AAA group)	S.V.	-	-	Adventitio us buds	*Fusarium oxysporum* f.sp. cubense race 4
Banana *(Musa spp.)*	S.V.	-	-		*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense
Banana (*Musa* sp., AAB, Silk) cv.	S.V.	-	Fusaric acid	Multiple bud clumps	*Fusarium oxysporum* f.sp.cubense race 1
Kiwi fruit *(Actimidia deliciosa*) cv. Hayward	T	Asmoth pKYLX71\-35S	*A.t.*	Maternal	*Botrytis*
Lemon *(Citrus limon)*	S.V.	-	-		Mal secco disease *(Phoma*

					tracheiphilia)
Lemon *(Citrus limon)* cv. femminello continella	S.V.	-	Toxin of *P. tracheiphila*	Nucellar calli	Mal secco disease *(P.tracheiphilia)*
Lemon *(Citrus limon)* cv. femminello siracusano	S.V.	-	Toxin of *P. tracheiphila*	Protoplast	*P.tracheiphilia*
Mango *(Mangifera indica)*	S.V.	-	-	Embryogenic suspension	*Colletotrichum gloeosporioides*
Mango *(Mangifera indica)*	S.V.	-	Partially purified phytotoxin of *C. gloesporides*	Seedlings	*Colletotrichum gloeosporioides*
Olive (*Olea europaea*. L.*)* cv. Canino	T	Osmoth pKYLX71\-35S	*A.t.*	Maternal somatic embryogenesis	Not determined
Pear *(Prunus domestica*)	T	RS-AFP-2 (defensin)	*A.t.* supervirulent strain CBE 21	Leaf pieces	Not determined
Pear *(Prunus domestica*) cv. Burakovka	T	Thanmatin II	*A.t.* CBE21, 35S promoter	Leaf pieces	Not determined
Strawberry (*Fragaria* X *ananassa*)	S.V.	-	-	Shoot regeneration	*Fusarium oxysporum* f.sp fragaria
Strawberry (*Fragaria* X *ananassa*)	S.V.	-	Pectic enzymes *R. fragariae*	Leaf petioles	*Rhizocotinia fragariae. Botrytis cinerea*
Strawberry (*Fragaria* X *ananassa*)	S.V.	-	-	Shoots	*Phytophtora cactorum*
Strawberry (*Fragaria* X	S.V.	-	-	Receptacle	Calcareos soil and

ananassa)				s	fungal diseases
Strawberry *(Fragaria* X *ananassa*)		-	-	-	-
Strawberry (*Fragaria* X *ananassa)*	T	Thanmatin II	*A.t. CBE21*, *35S* Promoter	Leaf pieces	Not determined
Swingle *(Citrus aurantifolia)*	S.V.	-	-	Zygotic and mature material	Canker

ملحق 5. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة مقاومة للأمراض البكتيرية

Fruit crop	Technique	Alien gene (s)	System/Plasmid selective agents	Origin of plant material	Resistance in Planta
Apple (*Malus* X *domestica*) M26	T	AttE	*A.t.*	Leaf segment	*Erwinia amylovora*
Apple (*Malus* X *domestica)* cv. Galaxy	T	AtE; T4 lysozyme	*A.t.*	Leaf segment	*Erwinia amylovora*
Apple (*Malus* X *domestica*) Bork,cv. Royal Gala, M7	T	AttE;SB-37;shiva-1;lisozyme	*A.t.*	Leaf segment	*Erwinia amylovora*
Apple (*Malus* X *domestica*) rootstock M26	T	AttE	*A.t.*	Maternal	*Erwinia amylovora*
Apple (*Malus* *X domestica*) Borkh	T	cecropin	*A.t.*	Maternal	*Erwinia amylovora*
Apple (*Malus* *X domestica*) Borkh cv. Greenleaves	S.V.	-	-	Leaves	*Erwinia amylovora*

Apple (*Malus X domestica*)	S.V.	-	*E. amylovera*	Leaves	*Erwinia amylovora*

Grape (*Vitis vinfera*), cv. Thompson seedlings	S.V.	-	*E. amylovora*	Leaves	*Erwinia amylovora*
Peach (*Prunus persica)*	S.V.	*Shiva-1*	PB followed by *A.t.*	Somatic embryos	-
Pear (*Pyrus communis)*	S.V.	-	Culture filtrate of *X. campestris*	Callus from immature zygotic embryos	*Xanthomonas campestris* *Pv, puni and P. syringae pv. syringae*
Pear (*Pyrus communis)*	S.V.	-	-	Stem and root callus	*Erwinia amylovora*
Pear (*Pyrus communis)* cv. passe Crassane	T	AttE	*A.t.*	Leaf segments	*Erwinia amylovora*

ملحق 6. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة مقاومة للنيماتود

أشجار الفاكهة	**التقانة**	**النظام/البلازميد أو عامل الإنتخاب**	**مصدر المادة النباتية**	**المقاومة**
Peach *(Prunus persica)*	S.V.	Culture filtrate	Seedlings	*Meloidogyne incognita*
Papaya (*Carica papaya* L.)	CP-PRSV	PB	Thin layer embryogenic tissue	Not determined
Papaya (*Carica papaya* L.)	CP-PRSV-4	PB (pGA482GC/cpPR-V-4)	Zycotic embryos, hypocotyl	Increased resistance for some PRV strain
Papaya (*Carica papaya*	CP-PRSV-4	*A.t.*	Zycotic embryos, hypocotyl	Not determined in *planta*

L.)				
Papaya (*Carica papaya* L.)	CP-PRSV	*A.t.*	Zycotic embryos	Not determined
Papaya (*Carica papaya*) cv. Kamiya	CP-PRSV	*PB*	Embryogenic calli	Confirmid
Papaya (*Carica papaya* L.)	CP-PRSV		Embryos	Not determined

Plum *(P. domestica)*	*CP-PPV*	*A.t.* (pGA482gg) PPV-CP-33)	Hypocotyl slices	Confimed vs PPV
Plum *(P. domestica)* L. cv. Blue free	*CP-PPV*	*A.t.*	Leaf discs	Confimed
Strawberry *Fragaria X Annassa*)	*CP-SMYEL*	*A.t.*	Leaves	Not determined
Troyer cytranger (*C. sinensis* X *P. trifoliata)*	*CP-CTV*	*A.t.*		Not determined
Apricot *(P. armeniaca*)	*CP-PPV*[*]	*A.t. (pBinPPVin)*	Cotyledons of immature embryos	Confirmed vs PPV
Carrizo cytranger *(C. X P. trifolata)* and Sour Orange *(Citrus aurantium*)	*CP-CTV*	*A.t.*	Stem segment	Not determined
Grape *(Vitis spp.)* several	*CP-GFLV*	*A.t.*	Embryogenic calli	Not confirmed

rootstocks				
Grape *(Vitis berlandieri X V. riparia*) (110 Richter rootstock)	*CP-GCMV*	*A.t.*	Somatic embryos	Not confirmed
Grape *(Vitis vinifera*) L. cv. Thompson seedless	*TomRSV-cv*	PB followed by *A.t.*	Somatic embryos	Not determined
Grape *(Vitis vinifera*) L. cv. Chardonnay and *Vitis* rootstocks 41B, SO4	*CP-GFLV*	*A.t.* LBA4404	Anther derived embryos	Not determined
Grape *(Vitis berlandieri X V. riparia*) (110 Richter rootstock)	*CP-GFLV*	*A.t.*	Somatic embryos	Not determined
Grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.*)*	*uncp*	*A.t.*	Epicotyls	Not determined
Mexican lime (*Citrus aurantifolia* Swing) seedlings	*CP-CTV*	*A.t. EHA 105*	Stem segment	Not determined

CP= Coat protein; CTV= Citrus tristeza virus (Clostero virus groub); PPv= Plum pox virus (Potyvirus Group); GCMV= Grapevine chrom mosaic virus, GFLV= Grapevine fan leaf virus (Nepovirus group); PRV or PRSV= Papaya ring spot virus + (Potyvirus group).

ملحق 7. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة مقاومة للحشرات

محصول الفاكهة	الجين الملتحم **Alien gene (s)**	النظام/البلازميد أو عامل الإنتخاب	مصدر المادة النباتية	الحشرة الهدف	البروتين المعبر عنه
Apple (*Malus X domestica*) cv. Greenleaves	CryLAa (c)	*A.t.*	Leaf segments	Lepidoptera	CryLAc
Apple (*Malus X domestica*) cv. Greenleaves	CpTI;CryIAa	*A.t.*	Leaf segments	Lepidoptera Coleptera	CpTI
Cranberry (*Vaccininum macrocarpon*)	CryIAa	*A.t.*		Lepidoptera	CryIAa
Cranberry (*Vaccininum macrocarpon*) Ait.	Icp	*PB*	Stem section	-	-
Grape (*Vitis vinifera)*	CryIAa	*A.t.*		Lepidoptera	CryIAa
Grape (*Vitis vinifera)*	gna	*A.t.*		Lepidoptera	GNA
Grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.)	gna	*A.t.*		Aphids	GNA
Juneberry (*Amelanchier laevis*)	Bik-icp	*A.t.*	Basal cut end of shoots	-	Tpxin HD73
Juneberry (*Amelanchier laevis*)	cryC	*A.t.*		Lepidoptera, Coleoptera	Unspecified Ccry gene
Pear (*Pyrus communis)*	cryC	*A.t.*		Lepidoptera, Coleoptera	Unspecified Ccry gene
Persimmon *(Diospiros kaki)*	CryLAc	*A.t.*	Leaf disc	Lepidoptera	CryLAc

Strawberry (*Fragaria X ananassa*)	cpti	*A.t.*		-	Expresses CPTI
Strawberry (*Fragaria X ananassa*) some cultivars	cpti	*A.t.*		Vs *Otiorhynchus sulcantus*	Expresses CPTI
Walunt (*Juglans regia*) hybrids & cv. Sanland	CryLAc		Somatic embryos	Lepidoptera	CrylAc (vs coding moth)

ملحق 8. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة مقاومة لمبيدات الأدغال

محصول الفاكهة	التقانة*	الجين	النظام/المؤشر الجيني	الجزء النباتي	المقاومة
Apple *(Malus* X *domestica*) cv. Royal Gala	T	als	*A.t.*	Leaf pieces	Sulfonylurea
Damil GM61/1 rootstock (*P. dawyckensis*) Inmil GM9 rootstock (*P. incisa* X *serrula*) Cherry (*P. avium*) cv. Summit	T	bar	*A.t.*	Meristems, Shoots, Embryogenic calli	BASTA
Orange (*citrus sinensis)*	S.V.		2,4-D	Nucellar callus	2,4-D
Papaya (*Carica papaya* L.*)*	T	bar	PB	Zygotic embryos	-
Pepino (*Solanum uricanum*) Ait	T	als	*A.t.* (nptII; gus)	Leaf	Sulfonylurea
Tamarillo (*Cryphomandra betaceae*)	T	als	*A.t.*	Leaf	Sulfonylurea

* Technique= gene tranformation; S.V.= Somaclonal variation

ملحق 9. تحوير وراثي لإنتاج أشجار فاكهة متحملة لإجهادات مختلفة

محصول الفاكهة	التقانة	الجين الملتحم	النظام/البلازميد أو عامل الإنتخاب	مصدر الجزء النباتي	المقاومة
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) cv. Hayward	S.V.	-	Synthetic carbohydrates or NaCl	stem	Drought resistance
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) cv. Hayward and GTH	T	rolABC	*A.t.*	Leaf discs	Drought resistance
Kiwi fruit (*Actinidia deliciosa*) cv. Hayward and Tomuri	S.V.	-	High pH (7.5)	leaf	Lime tolerant
Quince *A.* (*Cydonia oblonga*)	S.V.	-	Low Fe	Leaf discs	Fe-deficient
Orange (*Citrus sinensis)*	S.V.	-	-	Nucellar and ovular callus	Salt tolerance
Colt rootstock (*Prunus avium X pseudocerasus*)	S.V.	-	-	Protoplast callus (root, stem)	Salt and drought tolerance
Sour Cherry *(Prunus cerasus*)	T	AFP antifreeze	*A.t.*	Maternal leaf	Cold tolerance
Strawberry *(Fragaria X ananassa)*	T	antifreeze	*A.t.*	Leaf	Cold tolerance
Kiwi (*A. chinensis)*	T	*hEGF*	*A.t.*	Leaf	-
Citrus spp.	T	*HAL2 of yeast*	*A.t.*	-	salt tolerance

ملحق 10. تحوير وراثي لإنتاج محاصيل مقاومة لأمراض فطرية

النبات	التحوير الوراثي	المسبب المرضي
Alfalfa	Peanut Resveratrol synthase	*Phoma medicginis*
Brassica napus	Bean chintinase Tomato/tobacco chintinase	*Rhizocotonia solani* *Cylindrosprium conc* *Sclerotinia sclerotiorum* *Phoma lingam*
Carrot	Tobacco Chitinase+ β-1,3 Glucanase Tobacco AP24	*Alternaria dauci* *Alternaria radicina* *Cercospora carotae* *Erysipine heracler*
Potato	AP24 Glucose oxidase Osmotin Tobacco class II catalase Aly AFP Soybean β-1,3-Glucanase PR-1a, SAR 8.2	*Phytophthora infestans* *Phytophthora infestans* *Verticillium dahlia* *Phytophthora infestans* *Phytophthora infestans* *Verticillium sp.* *Phytophthora infestans* *Peronospora tabacina*
Tobacco	Class III chitinase Class I Chitinase Bean Chitinase Barley RIP *Serratia marcescens* Chitinase Barley Chitinase+ β-1,3-	*Phytophthora parasitica, Pythium sp.* *Phytophthora parasitica* *Rhizocotonia solani* *Rhizocotonia solani* *Rhizocotonia solani* *Rhizocotonia solani*

	Glucanase Barley Chitinase+ RIP Rice Chitinase+Alfalfa Glucanase Sarcotoxin IA *Pseudomonas syringae* hrmA Oxalate decarboxylase Radish AFP	*Rhizocotonia solani* *Cercospora nicotinanae* *Rhizocotonia solani* *Phytophthora parasitica* *Phytophthora parasitica* *Sclerotinia sclerotiorum* *Alternaria longipes*
Tomato	Tobacco Chitinase+ β-1,3-Glucanase	*Fusarium oxysoprum*
Rice	Rice Chitinase	*Rhizocotonia solani*
Wheat	Aly AFP	*Fusarium sp.*

ملحق 11. بعض الأمثلة لبروتينات مهمة طبياً منتجة في أنواع نباتية

	التطبيق	النبات	البروتين
Vaccines	Hepatitis B Cholera HIV Malaria	Tobacco Potato Tobacco Tobacco	Hepatitis B surface antigen *V. cholera* toxin Ctoxa and Ctox B subunit HIV epitope (gp 120) Malarial B-cell epitope
Antibodies (single chain Fv fragments)	Production of protein in tubers	Potato	Phytochrome binding scFv

	Treatment of non Hodgkin's lymphoma Production of tumor associated marker antigen	Tobacco Cereals	scFv of IgG mouse B-cell lymphoma scFV against carcinoembryogenic antigen
Biopharmaceuticals	Anticoagulant Anemia Provitamin A deficiency Hypertension	Tobacco Tobacco Rice Tobacco	Human protein C Human erythropoietin Daffodil phytoene synthase Angiotensin-1-converting enzyme

ملحق 12. منظمات النمو الرئيسة، أوزانها الجزيئية، تحويل ملغم/لتر الى مايكافئها من مايكرومولر (µM) وتحويل المايكرومولر الى ما يكافئها من ملغم/لتر

Mg/L equivalents for these µM concentrations						
Plant growth regulator	Abbreviation	M.W	0.1	1.0	10.0	100.0
Abscisic acid	ABA	264.3	0.0264	0.264	2.64	26.4
Benzyladenine	BA	225.2	0.0225	0.225	2.25	22.5
Dihydrozeatin	2hZ	220.3	0.0220	0.220	2.20	22.0
Gibberellic acid	GA3	346.4	0.0346	0.346	3.46	34.6
Indolacetic acid	IAA	175.2	0.0175	0.175	1.75	17.5
Indolbutyric acid	IBA	203.2	0.0203	0.203	2.03	20.3
Potassium salt of IBA	K-IBA	241.3	0.0241	0.241	2.41	24.1
Kinetin	KIN	215.2	0.0215	0.215	2.15	21.5

Naphthalenacetic acid	NAA	186.2	0.0186	0.186	1.86	18.6
Picloram	Pic	241.5	0.0242	0.242	2.42	24.2
Thidiazuron	TDZ	220.3	0.0220	0.220	2.20	22.0
Zeatin	Zea	219.2	0.0219	0.219	2.19	21.9
2-Isopentenyl adenine	2-ip	203.3	0.0203	0.203	2.03	20.3
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.04	0.0221	0.221	2.21	22.1

µM equivalents for these Mg/L concentrations						
Plant growth regulator	Abbreviation	M.W	0.1	0.5	1.0	10.0
Abscisic acid	ABA	264.3	0.38	1.89	3.78	37.8
Benzyladenine	BA	225.2	0.44	2.22	4.44	44.4
Dihydrozeatin	2hZ	220.3	0.45	2.27	4.53	45.3
Gibberellic acid	GA3	346.4	0.29	1.44	2.89	28.9
Indolacetic acid	IAA	175.2	0.57	2.85	5.71	57.1
Indolbutyric acid	IBA	203.2	0.49	2.46	4.90	49.0
Potassium salt of IBA	K-IBA	241.3	0.41	2.07	4.14	41.4
Kinetin	KIN	215.2	0.46	2.32	4.65	46.7
Naphthalenacetic acid	NAA	186.2	0.54	2.69	5.37	53.7

Picloram	Pic	241.5	0.41	2.07	4.14	41.4
Thidiazuron	TDZ	220.3	0.45	2.27	4.54	45.4
Zeatin	Zea	219.2	0.46	2.28	4.56	45.6
2-Isopentenyl adenine	2-ip	203.3	0.49	2.46	4.92	49.2
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	2,4-D	221.04	0.45	2.26	4.52	45.2

ملحق 13. المستلزمات الأساسية لمختبر التقانات الأحيائية من الأجهزة

المُصطلحات المُتداولة في التقانات الأحيائية النباتية

Adventitious: صفة تُطلق لوصف الجذور، النموات الخضرية، أو أي عضو يتطور من مواقع غير المُعتادة مثل نموات خضرية من الجذور، أوراق من الكالس، أجنة من خلايا غير البيضة المُخصبة.

Aberrant: نمو مشتق من نوع طبيعي أو غير طبيعي وعلى هيئة نموات مشوهة في بعض الأنسجة النباتية.

Accession: عينات من نبات، بذور، سلالة، أو مجتمع من العينات أعلاه يتم حفظها في الغالب داخل بنوك الجينات للمحافظة عليها وإستعمالها في برامج تحسين النبات.

Activator: مادة أو عامل فيزيائي يُحفز إستنساخ جين أو أوبيرون معين.

Adventitious: ظهور نموات من مواقع غير مألوفة مثل ظهور نموات خضرية أو جذور من أنسجة الكالس أو تكوين أجنة من أجزاء غير البيضة المُخصبة، أو تطور أفرع من مناطق غير البراعم المعروفة.

Aflatoxin: سم فعال تنتجه أنواع مُحددة من الفطريات التي غالباً ما تنمو على البذور والحبوب غير المُجففة بشكل جيد.

Agar: سكر مُتعدد مُشتق من أنواع مُعينة من الطحالب ويُستعمل في تصليب الأوساط الغذائية لمزارع أنسجة النبات.

Alkaloid: مادة عضوية عديمة اللون، بلورية ذات طعم مر مثل الكيفين، كوينين، ستريكين وتمتلك خواص قلوية. توجد غالباً في المملكة النباتية وقد تكون لها تأثيرات سُمية على الإنسان.

Agroinfection: طريقة لإستحثاث إصابة بنقل بكتريا الأجروبكتريوم الحاملة لدنا معين على T-DNA الى النبات المضيف.

Amphidiploid: نوع نباتي هجين مشتق من تضاعف عدد كروموسومات هجين الجيل الاول الناتج من نوعين نباتيين يحتويان على العدد الكامل من أزواج الكروموسومات (2n). ينتج عن ذلك نوع نباتي تركيبي يحتوي على العدد الكروموسومي الكامل من المجينين.

Amplification: يشير الصطلح الى إنتاج نُسخ إضافية من التعاقبات الكروموسومية تتواجد إما ضمن الكروموسومات الأصلية أو المضافة الى نواة النبات.

Androgenesis: تطور النباتات من الأمشاج الذكرية.

Anthesis: تفتح المتك وخروج حبوب اللقاح.

Aneuploidy: حالة تحصل عندما لا تحتوي نواة الخلية على العدد الصحيح من الكروموسومات حيث ينقص النواة واحد أو أكثر من الكروموسومات مُقارنة بالخلايا الاخرى.

Anther: الجزء الطرفي من السداة (العضو الذكري في الزهرة) والذي يحتوي على حبوب اللقاح داخل أكياس.

Anther culture: زراعة المتوك المفصولة من أجل الحصول على نباتات احادية المجموعة الكروموسومية (1n) نقية وراثياً ما لم يكن مصدر النسيج خلايا جسمية وليس حبوب اللقاح مثل جدار المتك أو الأكياس المُحيطة بحبوب اللقاح عندئذٍ تحتوي الخلايا على 2n.

Artificial seed: أجنة جسمية مغلفة تُعامل كبذور لإنتاج نباتات.

Apex: قمة الفرع الخضري.

Apical: قمي، نهاية الفرع الخضري.

Apical dominance: ظاهرة توقف نمو البراعم الجانبية بوجود البرعم الطرفي على نفس النمو الخضري الذي يحتوي على براعم جانبية (ابطية) في آباط الأوراق.

Apical meristem: المرستيم الواقع في قمة الفرع الخضري الرئيسي أو الجانبي.

Aseptic culture: نشوء الزروعات من أنسجة أو أعضاء بعد تعقيمها والتخلص من الكائنات الدقيقة وفي بيئة خالية من المُسببات المرضية.

Asexual: خضري وليس جنسي.

Asexual propagation: إكثار النبات من أعضاء خضرية أو جزءاً منها.

Atomic weight: الوزن الذري الذي يُشير الى الوزن النسبي لذرة ما بناءاً على المقارنة مع عنصر قياسي مثل الهيدروجين (وزنه الذري 1، والاوكسجين 16).

Autoclave: المعقام أو الموصدة وهو عبارة عن وعاء لتعقيم المواد بداخله بتأثير البخار والضغط.

Autotrophic: الكائن الحي الذي يستطيع صنع غذائه بنفسه من مصادر عضوية.

Auxins: مجموعة من الهرمونات النباتية تُسبب في إستطالة الخلايا، السيادة القمية، نشوء الجذور، إنقسام الخلايا، نشوء الكالس. تشمل على IAA، NAA، IBA، 2,4-D وهي الأكثر شيوعاً وإستعمالاً في المزارع النسيجية للنبات.

Auxothroph: طافر لاينمو على المكونات الاساسية للوسط الغذائي بل يحتاج الى إضافة بعض عوامل النمو.

Axenic culture: مزرعة خالية من أشكال الحياة الاخرى غير المرغوبة ولكنها قد تحتوي على كائنات حية اخرى أو خلايا، أنسجة، أعضاء مرافقة مزروعة بقصد.

Axil: الزاوية المتكونة من وجود عضو جانبي (مثل الورقة) والساق.

Axillary shoot: النمو الذي يتطور من برعم يقع في ابط الورقة.

Backbulb: بصلة كاذبة قديمة تكون عديمة الأوراق ولكنها لا تزال حية تحمل واحد أو أكثر من البراعم خلف الجزء الفعال والنامي من أبصال الاوركيد.

Batch culture: مُعلق خلوي تنمو فيه الخلايا في حجم معلوم من المُغذيات ويأخذ منحنى نمو خلاياه شكل أو نمط حرف S.

Bio-conversion: تحول أو كسر مواد من شكل لآخر أو الى مُكوناتها نتيجة فعالية الأحياء الدقيقة أو الإنزيمات.

Bioreactor: وعاء يستعمل لمزارع خلوية، أجنة، نموات خضرية خالية من المُسببات المرضية وتحت ظروف مُسيطر عليها.

Biotransformation: تحول مركب ذات قيمة تجارية أو دوائية قليلة الى مركب آخر ذات قيمة أعلى.

Biosynthesis: تصنيع مواد كيميائية من خلايا حية.

Biotechnology: تطبيق تقانات تحوير العمليات الأساسية من النمو والتكاثر في النبات، الحيوان أو الكائن المجهري بهدف زيادة إنتاجيته من مركبات ينتجها أو مركبات جديدة.

Browning: تصف في هذا المجال حالات تلون الوسط الغذائي باللون الأسمر أو الداكن نتيجة ظهورمُنتجات مؤكسدة ناتجة من أكسدة الفينولات تتسرب من الأجزاء النباتية المزروعة الى الوسط وقد تكون سامة للجزء النباتي ومُثبطة لإنقسام الخلايا.

Callus: أنسجة تظهر من تفرعات غير مُنتظمة للخلايا إما داخل المزرعة النسيجية أو خارجها وتجمع Calluses أو Calli.

Carbohydrates: مركبات عضوية تتكون من الكربون، الهيدروجين والاوكسجين مثل السكريات، النشاء والسليلوز.

Casein hydroysate: خليط غني بالأحماض الأمينية يتم الحصول عليه من التحلل الحامضي لبروتين الحليب. يُستعمل كإضافات مُساعدة في زيادة مُغذيات أوساط مزارع النبات النسيجية.

Catalyst: مادة تؤثر في سرعة التفاعل لكنها لا تدخل فيه.

Caulogenesis: التمايز الى براعم خضرية.

Cell culture: زراعة الخلية المُفردة أو مجموعة من الخلايا المُتشابهة.

Cell generation time: المدة الزمنية بين إنقسامين متتاليين للخلية الواحدة.

Cell hybridization: إندماج خليتين أو أكثر غير مُتشابهتين لينتج عنها خلية ذات أنوية مختلفة ويُطلق على الخلية الجديدة Synkaryon.

Cell line: يُعبر عن أول ناتج من الزراعة الثانوية لنسيج الكالس (Subculture) نتيجة زراعة الكالس الأولي (Primary callus).

Chemically defined medium: وسط تغذوي لزراعة الخلايا والذي يكون فيه كل مركب مُحدد الكمية والصورة.

Chemostat: مزرعة مفتوحة ومُستمرة يكون فيها معدل النمو وكثافة الخلايا ثابت من خلال السيطرة على كمية المُغذيات الداخلة الى المزرعة.

Chimeras: نباتات أو أنسجة تحتوي على خلايا بأكثر من هيئة وراثية واحدة.

Chlorosis: قلة تطور أو غياب الصبغات الخضراء في نسيج نباتي مما يؤدي الى إصفرار أو إبيضاض الأنسجة الخضراء في النبات. تحصل الظاهرة بسبب نقص في الضوء الساقط، نقص المغنيسيوم، الحديد، وقد تحصل بسبب عوامل أُخرى.

Chromosome: أجسام بروتينية نووية مُشتقة تشبه الخيوط تتواجد في النواة وتحمل جينات مُنتظمة على شكل خطي. ولكل نوع نباتي خواصه وأعداد الكروموسومات الخاصة به.

Clonal multiplicational propagation: إكثار النبات خضرياً من نفس النبات.

Clone: مجتمع من الخلايا مُشتقة من خلية مُفردة نتيجة الإنقسام الخيطي. يُستعمل المصطلح ايضاً للتعبير عن مجتمع من النباتات مُشتق من نبات واحد تم إكثاره خضرياً.

Cloning: تضاعف وإكثار خضري يبدأ من خلية مفردة أو كائن حي واحد. يُشير المصطلح في التقانة الجزيئية ايضاً الى تضاعف جزيئة صغيرة من الدنا أو جين داخل ناقل كلونة.

Closed continuous culture: يكون حجم الوسط الجديد المُضاف في المزرعة المُستمرة مساوياً لحجم الوسط القديم المطروح خارجاً. تُعزل الخلايا من الوسط المطروح آلياً وتُسترجع الى الوسط الجديد المُضاف.

Coconut milk/water: يُشير الى السويداء (على شكل سائل) في ثمرة جوز الهند غير الناضجة حي يُضاف السائل الى الوسط الغذائي كمُغذيات إضافية للمزارع النسيجية.

Co-culture: مزرعة مشتركة لنوعين أو أكثر من الخلايا كزراعة خلايا نبات مع خلايا بكتيرية أو خلايا نوعين نباتيين.

Complementation: قابلية نوعين وراثيين مُختلفين من التشوهات الوراثية أن يعوض أحدهما الآخر.

Contaminants: يُشير معنى المصطلح في التقانة الأحيائية الى الكائنات الدقيقة المُثبطة لنمو الخلايا والأنسجة المزروعة.

Continuous culture: مزرعة معلق خلوي تُجهز بإستمرار بالمُغذيات كأوساط جديدة مع بقاء حجم الوسط ثابتاً.

Cryopreservation: حفظ وخزن الخلايا، الأنسجة والأعضاء على درجات حرارة حوالي (-196˚م) أو بالغمر في نتروجين سائل.

Culture: خلايا، أنسجة، أعضاء، أو نُبيتات نامية على وسط غذائي تحت ظروف تعقيم تام مثل مزرعة الخلية، الجنين، طرف الفرع، المتك وغيرها.

Culture medium: لاحظ Nutrient medium.

Cybrid: خلية نباتية (أو نبات) تكون فيها نواة أحد الأبوين مع جينات نووية من أب آخر أو من كلا الأبوين ناتجة من دمج البروتوبلاست.

Cytodifferentiation: تمايز مورفولوجي أو وظيفي أو كليهما يحصل في أثناء إنقسام الخلايا مؤدياً الى تغييرات في شكلها المظهري.

Cytolysis: تفرق الخلايا في المحلول وعدم تجمعها على شكل كتل.

Cytokinins: مجموعة من الهرمونات النباتية تحتوي على الأدنين مثل الكاينتين، BAP، الزياتين أو مُشتقات اليوريا مثل الثايدايزيرون، وتُسبب في إنقسام الخلايا وتمايزها، التمايز الى أفرع، كسر السيادة القمية وغير ذلك.

Cytoplasmic inheritance: التوريث المُتسبب نتيجة جينات نووية إضافية فعلى سبيل المثال جينات في العضيات السايتوبلازمية مثل المايتوكوندريا والكلوروبلاست.

Cytoplast: بروتوبلاست يحتوي على نواة.

Dedifferentiation: تحول التراكيب المُتمايزة الى حالة عدم التمايز.

Deionize: إزالة الآيونات من الماء بإستعمال جهاز إزالة الآيونات.

Differentiation: تطور خواص فسيولوجية ومورفولوجية فعلى سبيل المثال، مصدر الخلايا والأنسجة والأعضاء المُختلفة خلال عملية التطور لكائن حي مُتعدد الخلايا يكون من بيضة مُخصبة واحدة. يُستعمل المُصطلح في الزراعة النسيجية لوصف حالة تكوين أنواع مُختلفة من الخلايا، الجذور، النموات الخضرية، الأجنة أو أي عضو يظهر من الكالس أو مزارع الخلية.

Diploid: النوع النباتي الذي يحتوي على نُسختين من كل كروموسوم تحمل صفات النوع.

Disease-free: نبات مُصدق بعد خضوعه لإختبارات السلامة من مُسببات مرضية معلومة.

Electroporation: تثقيب غشاء البلازماليما بإستعمال التيار الكهربائي للسماح بدخول مادة خارجية وخاصة الدنا أو جينات الى داخل الخلية من وسط خارجي.

ELISA serological method: طريقة تُستعمل لإختبار وجود الفيروسات في الأنسجة النباتية والمصطلح إختصاراً الى Enzyme-linked Immunosorbent Assay.

Embryo: تركيب مُنتظم يتكون بعد تطور مُحدد مُسبقاً داخل أعضاء تكاثر إنثوية نتيجة حصول الإخصاب أو بدونه.

Embryo culture: زراعة الأجنة المفصولة من بذور ناضجة أو غير ناضجة.

Embryogenesis: عملية نشوء الأجنة وتطورها إما داخل البذرة أو في المزارع النسيجية.

Embryoid: تركيب أشبه بالجنين ينشأ من خلايا غير جنسية يتكون داخل المزارع النسيجية.

Endosperm: الأنسجة المُغذية أو السائل المحيط بالجنين المُتطور داخل البذرة.

Enzyme: بروتين مُتخصص تنتجه الخلايا الحية ويعمل بوظيفة أشبه بالمُساعد العضوي.

Epigenetic variation: تغاير مظهري لا ينتج من تغيير في تعاقب الدنا.

Etiolated: حالة من النمو يتم تحفيزها بالإضاءة الواطئة أو في غياب الضوء وتكون أعضاء النبات شاحبة أو بيضاء مع إستطالة واضحة.

Euploidy: الحالة التي تحصل عند إحتواء نواة الخلية على العدد المضبوط من مضاعفات العدد المفرد من الكروموسومات.

Explant: عضو نباتي أو قطعة من نسيج يُستعمل في نشوء المزرعة النسيجية.

Exudate: مادة تُطرح أو تنضح من الأنسجة المزروعة.

Feeder layer: طبقة من الخلايا عادة لا تُفعل كيميائياً أو تُشعع وتُستعمل لحضانة مزارع الخلية. تكون الخلايا الحاضنة في تماس مع الوسط الغذائي بينما توضع الخلايا أو الأنسجة فوقها إما مُباشرةً أو تُفصل بمادة مسامية مثل ورق الترشيح أو مُرشحات من الأغشية.

Friability: ميلان الخلايا النباتية للإفتراق عن بعضها مما يُعطي الكالس طبيعة هشة.

Fusogen: عامل محفز على إندماج الخلايا مثل PEG في تجارب التهجين الجسمي.

Gamete: خلية جنسية مُشتقة من أمشاج ذكرية أو إنثوية وتحتوي على نصف عدد كروموسومات الخلية الجسمية.

Gametoclonal variation: تغاير مظهري قد يكون وراثياً أو فوق وراثي (Epigenetic) ويظهر في نسل الأمشاج.

Gametoclone: نباتات تم إخلافها من خلايا جنسية.

Gene: أحد وحدات التوريث لها تأثير مُحدد في صفات الكائن الحي. تتكون الجينات من دنا مُنتظم على شكل شريط على الكروموسوم.

Genetic Engineering: تقانات مختبرية لغرض التحوير الوراثي للنباتات من خلال إدخال جين أو أكثر مُنتخب الى الخلايا بهدف تغيير الصفات الموروثة.

Genome: العدد الأساس من كروموسومات الكائن الحي (1n).

Genotype: الهيئة الوراثية للفرد والتي تتحدد من خلال الجينات المحمولة على الكروموسومات.

Germplasm: التغاير الكلي في المادة الوراثية لنوع معين والذي يُمكن المُحافظة عليه بهيئة نبات كامل، بذور أو أنسجة نباتية.

Gibberellins: مجموعة من مُنظمات النمو تؤثر في إستطالة الخلايا النباتية.

Growth regulators: مركبات عضوية غير غذائية والتي تؤثر وبتراكيز مُنخفضة في النمو والتمايز والتضاعف مثل الأوكسينات، السايتوكاينينات، الأثيلين والجبرلين.

Habituation: قابلية الخلايا على النمو بغياب مُنظمات النمو بعد فترة طويلة من زراعتها على أوساط كانت تحتوي على تلك المُنظمات.

Haploid: نبات أو خلية فيها نسخة واحدة من كل كروموسوم (1n).

Hardening-off: عملية الأقلمة التدريجية للنُبيتات الناتجة من الزراعة النسيجية لتكون جاهزة للزراعة في الحقل أو البيت الزجاجي. يتم ذلك بتقليل الرطوبة النسبية تدريجياً، زيادة شدة الإضاءة، وتغيير طريقة التغذية من رمية الى ذاتية.

HEPA filter: مُرشحات هواء عالية الكفاءة كجزء مهم من مُكونات منضدة سريان الهواء الطبقي لا تسمح بدخول المُسببات المرضية من خلالها وتوفير بيئة نظيفة ومُعقمة.

Heterokaryon: خلية تحتوي على نواتين أو أكثر وبهيئات وراثية مُختلفة تنتج عادةً بعد إندماج الخلايا وخاصةً البروتوبلاست.

Heterotrophic: كائن حي يحتاج مصادر خارجية من المُغذيات العضوية.

Heteroploid: يصف المصطلح حالة المزرعة النسيجية التي تمتلك أنوية خلاياها على اعداد كروموسومات ليست ثنائية العدد الكروموسومي (Diploid) ويصف المصطلح المزرعة وليس الخلايا المفردة وبذلك يُعد وصفاً للنسيج النباتي غير الحاوي على العدد الحقيقي (Aneuploidy) من الكروموسومات.

Heterozygous: نبات يمتلك أليلات مُختلفة في واحد أو أكثر من المواقع الكروموسومية (Loci) على كروموسومات مُتشابهة. يُعطي التلقيح الذاتي لفرد مُتغاير مجتمع مُتغاير.

Homokaryon: خلية تمتلك إثنان أو أكثر من الأنوية المُتشابهة تماماً في سايتوبلازم واحد تنتج عادةً بعد الإندماج الخلوي.

Homozygous: نبات ثنائي أو مُتعدد المجموعة الكروموسومية يمتلك أليلات مُتشابهة على كروموسومات مُتشابهة ويُعطي مجتمع نباتي مُتشابه.

Hormones: مواد كيميائية طبيعية أو صناعية تؤثر بشكل كبير في نمو النبات وتطوره بتراكيز قليلة. من المُعتاد أن يُطلق على تلك المُركبات التي يصنعها النبات بالهرمونات والتي تُصنع مختبرياً بمُنظمات النمو النباتية.

Hybrid: كائن ناتج من تهجين أبوين غير مُتشابهين.

Hybridization: أي طريقة تُتبع لإنتاج الهُجن.

Hyperhydration: نمو غير طبيعي للنموات النامية في المزارع النسيجية حيث تظهر النموات الخضرية عصارية جداً وكإنما مُتشربة بالماء وللمُصطلح تسميات عديدة أهمها Vitrification.

In vitro: حرفياً تعني داخل الزجاج. تُطلق حالياً على ايةَ عملية تُجرى تحت ظروف تعقيم تام.

In vivo: حرفياً تعني في الحياة. تُطلق على ايةَ عملية في الكائن الحي الكامل.

Indexing: إختبار النباتات من حيث تواجد المُسببات المرضية أو المُلوثات فيها.

Induction: إستحثاث أو نشوء عملية ما أو تكوين تركيب.

Inoculum: حجم من معلق خلوي يُستعمل لغرض زراعته بعد نقله لمزرعة جديدة.

Juvenile: حالة من دورة الحياة الجنسية للنبات تتميز بإختلاف الشكل عن النبات البالغ وينقصها عدم الإستجابة لمُحفزات التزهير.

Karyoplast: نواة خلية مُحاطة بطبقة خفيفة من السايتوبلازم والغشاء السايتوبلازمي يتم الحصول عليها بعد فصلها من الخلية.

Karyotype: العدد، الحجم والشكل المُميز للكروموسومات خلال الطور الإستوائي لخلية جسمية من كائن حي.

Linear phase: مرحلة الزيادة الثابتة نسبياً في أعداد الخلايا والتي تحصل بعد مرحلة النمو الاسي في مزارع المعلقات الخلوية ذات الحجم الثابت.

Liposome: وعاء دهني مغلق يحيط أو يُغلف مادة ما وفي الغالب تكون دنا معزول من نبات جيد لكي يتم نقل الأخير الى خلية اخرى بعد دمج الإثنان.

Lysis: تحطيم الخلايا غالباً بفعل إضافة إنزيمية.

Macerozyme: إنزيم البكتنيز الذي يساعد في فصل الخلايا عن أنسجتها.

Meiosis: إنقسام إختزالي يشتمل على إنتاج إمشاج ينتج عنه تكوين أربعة خلايا كل واحدة تحتوي على نصف العدد الطبيعي من الكروموسومات التي تحتويها الخلية الجسمية.

Meristem: مجموعة من خلايا نشطة في الإنقسام الخلوي ينتج منها الجذور، النموات الخضرية، الأوراق والأزهار. تشمل مجاميع المرستيمات الرئيسة على المرستيمات القمية (قمة

الساق وقمة الجذر)، المرستيمات الجانبية (الكامبيوم الوعائي والفليني)، ومرستيمات منطقة العقدة وفي قواعد أوراق مجموعة من النباتات.

Meristem culture: يُطلق في هذا السياق على التركيب الذي يشبه القبة بطول أقل من 0.1 ملم مفصول من قمة الفرع الخضري.

Meristemoid: مجموعة من الخلايا المرستيمية تظهر من الكالس وقد تُعطي جذوراً أو نموات خضرية.

Micrografting: تركيب قمة فرع من نبات جيد كطُعم على ساق نبات آخر فتي كأصل ينتج من بادرة نامية خارج الجسم الحي.

Microinjection: إدخال جينات أو دنا الى خلايا أو أجنة بإستعمال إبرة زجاجية رفيعة جداً قطرها أقل من 10 μm.

Micropropagation: إكثار النبات خضرياً خارج الجسم الحي.

Microspore: خلية بنواة أُحادية العدد الكروموسومي تتطور الى حبة لقاح كأعضاء تذكير.

Microtubers: درنات بطاطا مُنتجة خارج الجسم الحي بغض النظر عن حجمها وعن مصدر نشوئها سواء من الساق أو المدادات (Stolons).

Mitosis: نوع من إنقسام الخلايا ينتج عنه خليتين بنيويتين تحتوي كلٍ منهما على نفس العدد الكروموسومي لخلية الام.

Mole: الوزن الجزيئي لمُركب ما معبرٌ عنه بالغرامات.

Molecular genetics: دراسة طبيعة وكيموحيوية المادة الوراثية.

Molecular weight: مجموع الأوزان الذرية لجزيئة ما.

Monopodial: نوع من أنواع تطور النبات الذي يستمر فيه البرعم الجانبي من الساق بالنمو غير المحدود.

Morphogenesis: التغييرات التشريحية والفسلجية التي يتضمنها نمو وتطور الكائن الحي لتُكون خصائص الأعضاء وتراكيبها أو تؤثر في إخلافها.

Mutagen: العامل المُسبب في حصول طفرات وراثية.

Mutant: كائن حي ذات طفرة واحدة أو أكثر مما يجعل وظيفته الوراثية أو التركيبية تختلف عن الكائن غير الطافر أي البري (Wild-type).

Mutation: حصول تغاير موروث في الفرد نتيجة تغيير في الجينات أو الكروموسومات.

Mutagenic agents: عوامل فيزيائية أو كيميائية تُحفز على التغاير الوراثي.

Mycorrhiza: فطريات جذرية؛ تعايش الفطريات مع الجذور في الأشجار ونباتات أُخرى مما يُزيد من قابلية النبات على إمتصاص المُغذيات من التربة.

Neoteny: المحافظة على صفات الحداثة في النبات الكامل أو العكس حيث تظهر خصائص النضج على نبات لايزال في مرحلة الحداثة.

Nitrogen fixation: تحول النتروجين الجوي (N_2) الى أمونيا وأحماض أمينية بوساطة الكائنات الدقيقة المُثبتة للنتروجين.

Node: منطقة على الساق حيث يتواجد فيها البرعم الجانبي الذي يتطور الى نموات تحتوي على أوراق.

Nucellus: أنسجة في البيضة تُغلف الكيس الجنيني والأخير يُغلف الجنين.

Nucleic acids: جزيئات حامضية تتركب من وحدات ثانوية مُكونة من سكر، مجموعة فوسفات وإحدى القواعد الأربعة (أدنين، ثايمين/يوراسيل، سايتوسين، جوانين). تتوافر في أنوية كافة الكائنات الحية.

Nurse culture: لاحظ الطبقة المغذية Feeder layer.

Nutrient medium: توليفة من المغذيات والماء تشتمل على العديد من الأملاح، كربوهيدرات غالباً بصيغة سكروز، فيتامينات. يكون الوسط مُصلباً بمادة مُصلبة أو سائلاً ويُسمى بالوسط الأساس (Basal medium). تُضاف عند الضرورة للوسط الأساس مُنظمات نمو واحياناً مواد غير معلومة المُكونات وأُخرى معلومة.

Open continuous culture: مزرعة مُستمرة يكون فيها حجم الوسط الجديد الداخل متوازن مع الخارج. تُحصد الخلايا المُرافقة للوسط الخارج. يكون معدل الخلايا الخارجة في حالة النظام المُستقر (Steady-state system) مُساوياً لمعدل تكوين الخلايا الجديدة.

Organ culture: زراعة التراكيب المُتمايزة تحت ظروف تعقيم تام مثل طرف الجذر، طرف الفرع، أجزاء من فرع، جنين وغيرها.

Organogenesis: تمايز الخلايا أو الأنسجة المزروعة الى أعضاء.

Organotypic: تشكل عضو داخل الجسم الحي بثلاثة أبعاد.

Organoid: ظهور ما يشبه التركيب المشوه في المزارع النسيجية.

Osmoticum: مركبات تزيد من الضغط الازموزي في السوائل.

Passage: نقل الخلايا، الأنسجة، أو الأعضاء بعد التخفيف أو بدون تخفيف/إنقسام من الوسط القديم الى وسط جديد ويُطلق عليه ايضاً Subculture. وورد في بعض المصادر بأن Passage يُشير الى الفترة الزمنية بين Subculture وآخر.

Pathogen: الكائنات الدقيقة المُسببة للمرض.

Pathogen free: خالٍ من كائنات دقيقة معلومة مُسببة للمرض إعتماداً على إختبارات تشخيصية للمُسبب المرضي.

pH: قياس درجة الحموضة والقاعدية حسب مقياس من 1- 14.

Photoperiod: طول الفترة الزمنية التي تتعرض لها النباتات للضوء عند تناوب فترة الضوء والظلام.

Plagiotropic: النمو الافقي للنبات ويقابله النمو العمودي.

Plantlet: نمو خضري صغير يحمل جذوراً ويُطلق كذلك على الأجنة النابتة.

Plating efficiency: النسبة المئوية للخلايا أو البروتوبلاستات المنشورة والتي تنقسم وتكون مستعمرات.

Ploidy: العدد الكامل من أزواج الكروموسومات في النواة الواحدة.

Pollen: الجميتات الذكرية والتي تحتوي على نصف عدد الكروموسومات وبداخلها الأمشاج الذكرية.

Polyembryony: تطور أكثر من جنين داخل البذرة أو تطور مجموعة من الأجنة داخل المزرعة النسيجية.

Polyploidy: إحتواء النواة على ثلاثة أو أكثر من مجاميع الكروموسومات ولكل حالة تسميتها حسب الحروف اللآتينية (3n= triploid; 4n= tetraploid; 5n= pentaploid وهكذا).

Polysaccharide: مجموعة كربوهيدرات تتكون من وحات مُختلفة من السكريات.

Population density: عدد الخلايا في وحدة المساحة أو حجم وعاء الزراعة. كذلك يُشير الى عدد الخلايا في وحدة الحجم لوسط غذائي من معلق خلوي.

Primary culture: مزرعة تبتدأ من خلايا، أنسجة، أعضاء مفصولة مُباشرة من الكائن الحي.

Primordia: مفردها Primordium، أعضاء نبات في مراحلها المُبكرة من التمايز.

Proliferation: التضاعف السريع للخلايا، النموات، الأجنة وغيرها.

Propagule: جزء صغير من النبات يُستعمل في الإكثار.

Proteins: مجموعة كبيرة من المواد العضوية تحتوي على أحماض أمينية وعناصر مُختلفة.

Protocorm: في نبات الاوركيد، تحتوي البذرة على جنين غير منتظم مؤلف من مئات الخلايا فقط وخلال إنبات البذور، يتكون الجنين اولاً كتركيب درني يُدعى بروتوكورم يتطور منه النبات الكامل. في المزارع النسيجية للاوركيد، تُكون النموات الخضرية في العديد من أنواع الاوركيد تراكيب مستديرة تشبه البروتوكورمات والتي يمكن تضاعفها لتكون العديد من النباتات.

Protoplast fusion: تقانة يتم من خلالها دمج بروتوبلاستات من أنواع نباتية ذات صلة قرابة نباتية أو ليس ذات صلة لتكوين هوموكاريون أو هتروكاريون.

Protoplasts: خلايا مُفردة منزوعة الجدار الخلوي.

Pseudobulb: جزء مُتثخن من الساق لعديد من أنواع الاوركيد.

Pure culture: مزرعة خالية من أشكال الحياة الاخرى غير المرغوبة.

Recessive gene/character: الفرد الذي يتم التعبير عنه في خلية 2n أو كائن عندما تحمل الكروموسومات المُتشابهة نفس أليلات الهيئة المظهرية.

Recombinant DNA: ويُختصر (rDNA)، دنا هجين يُنتج خارج الجسم الحي بعد ربط قطع دنا من كائنات حية مُختلفة.

Reculture: عملية نقل طبقة من الخلايا أو الجزء النباتي الكامل دون تقطيع الى وسط غذائي جديد.

Regeneration: تُستعمل في مجال زراعة أنسجة النبات في التعبير عن الإستجابة المورفولوجية التي تحصل عند تكوين أعضاء جُدد، أجنة أو نباتات كاملة من أجزاء نباتية مزروعة أو الكالس المُشتق من تلك الأجزاء.

Rhizogenesis: تمايز الجزء النباتي أو نسيج الكالس الى جذور.

Secondary products: نواتج ايض النبات والتي لا تتعلق بنمو النبات وإكثاره مباشرةً، يُستعمل قسماً من هذه المواد في الصناعات الدوائية، مُنكهات، صبغات، مُبيدات حشرية وغيرها.

Senescence: صفة التعمير في عضو نباتي أو في النبات الكامل كجزء من تعاقبات التطور الطبيعي وهذه الظاهرة تحت سيطرة النبات الوراثية.

Shoot tip/shoot apex: جزء النمو الخضري بطول 0.1-1.0 ملم الذي يحتوي على المرستيم القمي (0.05-0.1 ملم) مع أعضاء النبات في مراحلها المُبكرة من التمايز ومبادئ الأوراق وأنسجة الساق المُحيطه بها.

Somaclonal variation: إختلافات وراثية يُمكن ملاحظتها بين النباتات المُكثرة بالزراعة النسيجية ومصدرها نبات أُم واحد.

Somaclones: نباتات مُشتقة من أي نوع من مزارع الخلايا الجسمية.

Somatic: يُشير الى جزء خضري أو لا جنسي.

Somatic embryogenesis: يُشير المصطلح في مجال زراعة أنسجة النبات الى عملية تكوين الأجنة وتطورها من خلايا غير جنسية.

Somatic hybrid: النبات الناتج من التهجين الجسمي أي إندماج خليتين جسميتين.

Somatic hybridization: إنتاج الهُجن بعد الدمج البروتوبلاستي لخلايا مُختلفة وراثياً.

Somatic tissue: كافة الأنسجة التي تُكون جسم النبات.

Stock plants: النباتات التي تُشكل مصدراً للأجزاء النباتية لغرض تضاعفها وإكثارها.

Stock solutions: محاليل مركزة تؤخذ منها تخافيف وتُضاف الى الأوساط الغذائية.

Spheroplast: خلية تمت إزالة معظم الجدار الخلوي منها.

Subculture: يُشير المصطلح في مجال زراعة أنسجة النبات الى تقسيم النسيج أو الجزء النباتي ونقله الى وسط جديد (لاحظ Passage).

Substrain: خط خلوي مُشتق من سلالة بعد عزل خلية مُفردة أو مجموعة خلايا تمتلك صفات أو دلالات لا تشترك مع خلايا السلالة الام.

Suspension culture: نوع من المزارع التي تُزرع فيه الخلايا، كتل الخلايا، أجزاء نباتية وغيرها في وسط سائل.

Synchronous culture: مزرعة خلوية تم معاملته بطريقة ما بحيث تكون كل أو أغلب خلاياها في نفس المرحلة التطورية.

Variant: خط خلوي أو نبات يبدو عليه تغيير مظهري ثابت سواء كان وراثي أو فوق وراثي.

Symbiosis: كائنان غير متشابهان يعيشان مع بعض بمنفعة مشتركة.

Sympodial: نوع من التطور النباتي حيث يتوقف نمو البرعم الطرفي للساق إما بسبب إجهاضه أو تحوله الى زهرة أو شمراخ زهري، عندئذٍ يتولى البرعم الجانبي العلوي النمو على حساب البراعم الابطية الاخرى. تلاحظ الظاهرة بوضوح في مجموعة من نباتات الاوركيد.

Synchronous culture: مزرعة أغلبية خلاياها في نفس مرحلة دورة الخلية أو أجنة في نفس المرحلة التطورية.

Synthetic seeds: أجنة جسمية مُغلفة بأغلفة رطبة أو مُجففة تحمي الأجنة من التلف الميكانيكي خلال التعامل معها وتسمح لها بالإنبات كالبذور الطبيعية. تُغلف الأجنة ايضاً بمُغذيات تكون بمثابة السويداء لتغذي الجنين كما هو الحال في سويداء البذور الطبيعية.

Tissue culture: إدامة أو تنمية نسيج خارج الجسم الحي بطريقة تسمح له بالتمايز والاستمرارية مع المحافظة على وظيفته.

Totepotency: قابلية الخلية على تكوين انواع الخلايا الاخرى في النبات الكامل المعزولة منه. ايضاً مقدرة أو خاصية الخلية المفردة في تكوين كائن حي.

Trasnsfection: إقتناء معلمات وراثية جديدة بعد إضافة دنا الى الخلية أو الكائن الحي.

Transformation: (لاحظ Genetic engineering).

Transgenic plants: نباتات تمت هندستها وراثياً لتحوير صفات مُحددة بعد إدخال جين واحد مُنتخب أو أكثر.

Turbidostat: مزرعة مُستمرة مفتوحة يدخل اليها الوسط الجديد إستجابةً لزيادة عكرة (كثافة) المزرعة. يتم إختيار كثافة معلومة من الكتلة الحيوية ويتم المُحافظة على نفس حجم الكتلة من خلال حصاد الخلايا عند إزدياد كثافتها.

Vector: ناقل لتمرير المعلومات الوراثية من خلية أو كائن لآخر. يتم إختيار البلازميدات البكتيرية والفيروسات في الغالب كنواقل لهذا الغرض.

Viroid: عوامل إصابة أصغر من الفيروسات وتتألف من رنا فقط وليس لها غطاء بروتيني وتُسبب في تسبب أمراض نباتية.

Virus: أحد أكبر المجاميع من عوامل الإصابة المرضية التي لا يمكن رؤيتها بالمجاهر الضوئية العادية وتصيب النباتات والحيوانات والبكتريا ولا يمكنها التكاثر خارج أنسجة مضيفاتها. يتألف الفيروس الكامل من دنا ورنا ومحاط بغلاف بروتيني.

Virus-free plant: نبات مصدق من خلال فحوصات معينة بانه خالٍ من فيروسات بعينها.

Index الكلمات المفتاحية وارقام صفحاتها

Acquisition of totipotency, 283
Actinomycin-D
Activated charcoal, 57, 105
Activation of signaling factors, 423
Activation of transposable elements, 313
Acyl-ACP thioesterases, 511, 512
Adhesion, 171
ADP-arsenate, 380
ADP-glucose pyrophosphorylase, 509
Adventitious buds, 227
Aerenchyma, 421
Agglutin, 494
***Agrobacterium rhizogenes*, 24, 134, 722**
***Agrobacterium tumefaciens*, 484, 488, 516, 566, 722**
AIDS, 580
Air sparging, 394, 395
Airlift bioreactors, 160
Albinism, 210
Albino, 217, 267
Alder, 414, 415
Alignment voltage, 247
Alkaliphilic, 466
Allosteric properties, 509
Allostery, 468
Alpine pennycress, 412
Altered gene expression, 423
AmA1, 532
aminobenzoic acid, 539
Aminodeoxychorismate synthase, 539
Aminodinitrotoluene, 399
Aminomethylphosponic acid, 518
Amorphous regions of crystalline cellulose, 466
Amphidiploids, 23
Anabaena, 265, 548
Androgenesis, 172, 193, 195, 206, 218, 744
Angiosperms, 171, 195, 287
Aniline blue, 229
Anoxia, 421
Anthers culture, 198
Anthropogenic, 386

PG (Polygalacturonase)

RISC (RNA-induced Silencing Complex)

si RNA (Small interfering RNA)

10-kDa prolamin, 513

10-kDa zein, 512

2,3,5 tri-iodobenzoic acid, 291

21 KDa zein, 529

2ip (IPA)

2S sunflower seed albumin, 513

4-CPa, 102

5-enoylpyruvylshikimate3-phosphate, 517

5-enoyl-pyruvylshikimate3-phosphate synthase (EPSPS)

6-8 glucopyranose subunits

ABA, 105, 108, 202, 206, 288, 289, 297, 300, 350, 358, 421, 425, 430, 431, 432, 433, 439

Abiotic, 151, 417, 419, 483, 514

Abiotic elicitors, 142

Abiotic stresses, 419, 514

Abnormalities, 74, 205

Aborted seeds, 8

ACC deaminase, 525, 526

ACC oxidase, 507, 525

ACC synthase, 525

Accumulation of compatible solutes, 450

Acetyl CoA, 511
Acidophilic, 466

Banana bract mosaic virus (BBMV), 505
BAP, 73, 106, 107, 140, 280, 292, 748
Barnase, 529
***barnase* gene, 529**
Barstar, 529
Basta Aventis, 520
Batch culture, 91, 745
Bean golden mosaic virus (BGMV), 506
Benign segment, 575
Bicellular, 226
Bio magnification, 388
Bio pharming, 577
Biocatalysts, 161
Biochemical conversion, 473
Biochemical mutants, 256
Bioconversion, 160
Biodegradable plastics, 549
Biodiesel, 469
Biodiversity Protocol, 585
Bioethanol, 462, 469
Biofuel, 459, 460, 469, 476, 482
Bioinformatics, 474
Biolistic, 6, 232, 561
Biomass, 135, 459
Biomaterials, 28
Bio-oil, 475
Biopharmaceuticals, 577, 738
Bioplastics, 28
Bioreactors, 6, 34, 63, 132, 161
Biosafety, 586
Biosecurity, 586
Bio-surfactants, 378
Biotic elicitors, 7,143
Biotransformation, 121, 126, 161, 745
Biotransformation reactions, 121
Bipolar, 284, 308
Blue cotton stain, 230
Bombarded leaf sample, 560
Brassicacae, 233
Brassinosteroids, 293
Brazil nut albumin, 514
Bromoxynil, 520
Browning, 56
BTEX, 395, 403, 412
Bud sport chimera, 335
Bulbosum technique, 216
Butylpyridinium chloride
Antibacterial proteins, 560
Antibiotics, 101
Antigenic proteins, 565
Anti-malaria artemisinin, 580
Antinodes, 303
Antinutritional factor, 541
Antioxidative defense system, 449
Antisense ethylene technology, 526
Antisense expression of ERAI, 432
Antisense orientation, 522
Antisense RNA, 497, 523
Anti-transpirants, 44
ANZFA, 554
Apomictic, 221
Apoplast, 450
Approach grafting, 70
Aquaporins, 342, 387
***Arabidopsis thaliana* myo-inositol oxygenenase, 540**
Arabinoxylans, 540
Archaeal, 474
Arsenate reductase, 381, 382
Arsenic Pollution and Toxicity, 379
Arsenicals, 379
Artificial doubling, 218
Artificial seeds, 19, 276
As methyltransferases, 385
Ascorbate peroxidase, 155, 449, 453
Aslll oxyanions, 381
Aslll-thiol, 382, 385
ATP sulfurylase, 391
ATP-binding, 475
Atrazine, 444, 519
Attenuation, 157
Auto-antigens, 573
Autoimmune diseases, 573
Autotrophic, 43, 244, 745
Auxin autotrophic, 256
Auxin autotrophy, 256
Avidin, 570, 579
Axenic plant, 403
Axilary buds, 344
Axillary shoots, 39
a-Zeins, 538
b – glucuronidase, 558, 570, 579
B-1,3-gluconase, 238
Bacteriophage lysins, 560
Baculovirus, 575
Bagasse, 460, 463

Cloning vectors, 233
Close system, 478
Closed Continuous cultures, 92
Cluster of embryos, 278
CMV, 498, 504, 563
CMV cytomegalo, 581
Coated desiccated synthetic seeds, 311
Co-cultivation, 183
Co-culture, 147, 747
Cold storage, 348
Coleoptera, 486, 489
Coleoptile, 148, 285
Comminution, 472
Compatibility, 14, 339
Compatible solutes, 423, 431, 450
Complementary DNA, 523
Complementation, 181, 226, 747
Complete plant genome sequences, 503
Concomitant heating, 367
Conditioned medium, 242, 293
Constitutively expressed genes, 287
Contamination, 74, 113
Continuous cultures, 92
Controlling elements, 336
Conventional pyrolysis, 476
Conversion, 302, 304, 307, 460
Coordinating gene, 520
Copy nature strategy, 595
Cottonwood, 388
Cotyledonary embryos, 292
Cowpea trypsin inhibitor, 493
Cross protection, 497
Crossing barriers, 245
Crown gall, 170
CRTI, 533
Cry proteins, 488, 489
Cryobiology, 367
Cryoinjury, 367
Cryomicroscopy, 366
Cryopreservation, 4, 20, 345, 354, 747
Cryopreservation by deep freezing, 226
Cryoprotectants, 5, 354, 358
Cultivar dependent variation, 320
Culture filtrate, 147, 726, 730
Culture media, 51, 98
Cyanamide, 519
Calcofluor, 241
Calgene, 523
Calliclones, 314
Callose, 239
Callus cultures, 76
Capsella bursa-pastoris, **179**
Carbon source, 136
Carcinogen and toxin, 379
CaroRx, 568, 578
Caryophyllaceae, 209
Casein hydrolysate, 186
Cassava, 532
Cassytha, **179**
Catalase, 152, 155, 388, 449
Catalytic fast pyrolysis, 476
cDNA libraries, 176
Cell cloning, 126
Cell counting, 94
Cell culture, 80, 746
Cell fresh weight, 94
Cell immobilization, 6, 131, 147
Cell plating, 21, 243
Cell suspension, 79, 111, 566
Cell theory, 1
Cell viability, 365
Cellularisation, 185
Cellulosome, 475
Central fusion nucleus, 194
Changes are not novel, 323
Chaperones, 546
Chemical agents, 143
Chemical inhibition, 94
Chemotherapy, 4, 38
Chicory, 580
Chimera, 525
Chitinase, 296, 494, 736, 737
Chlorohydrolase, 407
Chlorophyll chimeras, 337
Chlorpyrifos, 394, 405, 406, 407
Cholera toxin CT-B, 28
Cholesterol oxidases, 488
Choline O-sulfate, 451
Chromium trioxide, 85
Chromosomal breakage, 313
Chromosomal or mosaic chimeras, 335
cisDCE, 394
Clift grafting, 339
Clone, 95, 313, 747
Cloning, 126, 233, 747

Disinfectants, 235
Dismutation, 449
Distant gene pools, 418
D-mannose, 539, 540
DMSO, 161, 252, 357, 359, 361
DNA damage signaling, 153
DNA duplication, 315
DNA methylation, 290, 313
DNA microarray, 456
Dominant, 196
Donor plant, 50
Dormancy, 300
Double fertilization, 176, 214, 216
Double haploid lines, 13
Double Haploids, 218
Double recessive mutant, 197
Double transgenic plants, 384
Double-layer method, 207
Dow Agro Science, 577
Droplet freezing, 358
Drought, 427
Drought avoidance, 431
Drought escape, 431
Drought tolerance, 430, 431, 432,753
Drought-inducible promoter, 432
Dry freezing method, 360
ds RNA, 503, 504, 505
ds RNAs, 505
Dual cultures, 21, 22
DUPONT, 538
Dynamic center, 187
Early stationary phase, 90
Edible vaccines, 557, 564, 573
Egg, 174
Elde, 414
Elderberry, 414
Electrofusion, 4, 177, 247
Electroporation, 5, 265, 749
Elicitors, 7, 125, 142
ELIZA, 38
Elution, 252
Emasculation, 270, 527
Embryo and endosperm development, 183
Embryo culture, 22, 23, 749
Embryo isolation and culture, 178
Embryo maturation and germination, 299
Embryo rescue, 5, 23, 180, 189
Embryogenic clusters, 283
Cybrid, 7, 242, 258, 260, 269, 748
Cybridization, 253, 258
Cybrids or Cytoplasmic hybrids, 260
Cyclin genes, 185
Cyclodextrin glycosyl transferase, 510
Cyclodextrins, 510
GTP cyclohydrolase 1, 539
Cyclotrimethylenetrinitramine, 393
Cystathionine gamma synthase, 391
Cystic fibrosis, pancreatitis, 568
Cytochimera, 326, 327
Cytoplast, 242, 243, 748
Daffodil, 532
Dafra Pharma, 580
DAM, 41
Daughter cells, 283
Day light fluorescents, 86
Dealkylation, 406
Dedifferentiation, 276, 748
Dehalogenases, 405
Detection of haploids, 221
Determinate growth, 78
Detoxification of glyphosate, 518
Detoxification of herbicide by using a foreign gene, 515
D-galacturonic, 539
Dicamba, 289
Differential scanning calorimetry, 367
Differentiation, 85, 121, 748
Digitoxin, 160
Digoxin, 160
Dihaploid 2n=2x, 194
Dihydrodipicolinate synthase (DHDPS), 529
Dimerized, 575
Dimethylarsenate, 379
Dimethyldiselenide, 391
Dimethylmercury, 386
Dioecious, 196
Dioxygenases, 403
Diphenyl urea, DPU, 107
Diplochromsomes, 316
Diploid hybrid, 217
Diploids, 23, 190, 216, 226, 253
Direct embryogenesis, 13, 278, 279
Direct methods, 485
Direct somatic embryogenesis, 191
Discovery of RNAi, 503

Fast pyrolysis, 476
Fatty acid synthase, 511
Feedback inhibition, 528
Feeder cells, 176, 184
Feeder layers, 242
Feminization, 74
Fenugreek, 147, 715
Ferritin, 533
Fertile diploids, 253
Fertile homozygous dihaploids, 220
Fertile homozygous lines, 13
Ferulate, 540
Ferulic, 540
Feulgen-staining, 204
Filter sterilization, 147
Fixed beds, 132
Fix-genes, 549
Flanking sequences, 579
Flash drying, 364
Flat plate reactors, 478
Flaver Saver, 23
Flavodoxin, 401
Flavr Savr, 11, 522, 523, 524
Float culture technique, 208
Floral morphogenesis, 215
Florescence microscopy, 240
Florigene, 527
Flower culture, 214
Fluid drilling,303, 310
Fluidized beds, 132
Fluorescein diecetate, 95
Fluorodeoxypurine, 93
Foams, 131
Fog water vapor system, 41,
Folate, 535
Folate precursors, 535
Folic acid, 103, 535, 539
Food additives, 526
Foreign genes, 503
Fortified food, 391
Fossil fuel, 459
Freeze-drying, 225, 572
Freeze-induced dehydration, 362
Freeze-thaw, 226
Friable callus, 88
Fructans, 510, 512
Fructosyl transferase, 510
Fuchs-Rosenthel Haemocytometer, 239
Functional food, 530, 532
Embryogenic pre-determined cells, 288
Embryoids, 13, 191, 206
Embryonic cell suspension cultures, 566
Embryonic pollen grain, 204
Embryos culture, 200
Encapsulated seeds, 19
Encapsulation & vitrification, 358
Encapsulation & dehydration, 353, 357
Encapsulation of somatic embryos, 304
Endangered species, 302
Endocellulase, 474
Endocytosis, 264
Endogenous arsenate reductases, 382
Endogenous contamination, 113
Endogenous hormones, 84
Endoglucanases, 467
Endomitosis, 198, 205, 220
Endophyte, 394, 396, 401
Endophyte-assisted, 396, 401
Endopolygalacturonic acid lyase, 146
Endoreduplication, 315
Endosperm culture, 187
Enhanced antioxidative metabolism, 423
Enterotoxigeneic *E. coli*, 573
Entire operons, 405
Entrapment, 129, 131, 147
Enzyme optimization, 119
Epigenetic adaptation, 452
Esterase, 95, 511, 512, 521, 540
Ethical and religious issues, 584
Evans blue, 240, 365
Evaporation, 427
Evapotranspiration, 427
Evolution, 447, 541
ex situ, 345
Exogenous endo-1,4-β-xylanase, 541
Explant, 12, 50, 79, 567, 749
Explosives, 399, 721
Extracellular proteins, 297
Exudates, 403
F1 hybrid, 197
F2 generation, 184
Farnesyl-transferase, 432

Glyphosate Resistance, 516
Golden rice, 23, 533
Graft chimera, 399
Graft union, 341
Granule-bound starch synthase, 509
Green energy, 469
Green revolution, 541
Greenhouse effect, 369, 465
Grinding, 171
Gro-Lux, 33
Growth chamber, 34, 157
Growth retardants, 41
Gynoecious, 215
Gynogenesis, 5, 193, 194, 202, 210, 212, 218
Gynogenic haploids, 211
Habituation, 86, 750
Haemocytometer, 94, 239
Hairpin, 506
Hairy root culture, 133
Halophytes, 447, 458
Hanging drops, 243
Haploid somatic pro-embryos, 193
Harvest index, 521
HbsAg, 28
Heat treatment, 56
Hepatitis, 570
Hepatitis B antigen, 574
Hepatitis B virus surface antigen, 568
Herbicide Resistance, 514, 515
Hermaphrodite, 215
Hestogenic layers, 327
Heterotrophic, 98, 104, 244, 751
Heterozygous, 196, 347, 751
Hetrogeneous, 204
Hetrotrophic, 43
Hexose-1P, 540
HIV, 505, 580
Hollow fiber, 131
Homo-fused protoplasts, 271
Homokaryocyts, 246
Homokaryons, 246
Homologous fusion, 184
Homologous recombination, 559
Homoptera, 486
Homozygous lines, 13, 219
Hormonal balance, 424
Host range, 549
Housekeeping function, 287
Fungal hosts, 474
Fusion droplet, 176
Fusogens, 247, 250, 750
Future Prospects for RNAi, 514
Gametoclonal variation, 14, 220, 313
Gasification, 476
Gastric lipase, 568
GDP-galactose, 540
Gelling agents, 108
Gelrite, 109
Gene amplification, 517
Gene bank
Gene flow, 583
Gene product, 503
Gene silencing, 418, 504, 538, 540, 559, 561, 715
Generative nuclei, 193
Generative nucleus, 195
Genetic complementation, 256
Genetic engineering of nitrogen fixation, 546
Genetic instability, 85
Genetic parameter, 319
Genetic transformation, 89, 483
Genetic variability, 60
Genetic variation, 8, 13, 340
Genetically modified plants, 232, 429
Germplasm conservation, 20
Germplasm documentation, 365
Ginger, 351
Glasseness, 60
Glauciness, 68
Global Knowledge Center, 587
Global warming, 369
Globular stage, 209
Gluconeogenesis, 380
Glucose-6-arsenate, 380
Glumes, 214
Glutamic acid decarboxylase (GAD), 573
glutamylcysteine$^{\gamma}$-, 382
Glutathione, 375, 380
Glutathione reductase, 374, 449
Glutathione synthetase, 374, 455
Glutathione-S-transferases, 400
Glycoprotiens, 495
Glycosylated proteins, 560
Glycosylation, 160, 561
Glyoxylate, 518
Glyphosate oxidase, 518

Insecticidal crystalline protein, 488
Insertion mutants, 336
Insulin, 568, 578
Intact anthers, 191
Integrating multiple copies of protein genes, 515
Intergeneric hybrids, 267
Intermittent water misting, 44
Interspecific crossing, 215
Inverted microscope, 250
IOA, 269
Iodoacetate, 253
Ion homeostasis, 423
Ion transporters, 457
Ionic liquid, 473
Irreversible blindness, 533
Isodiametric, 286
Isoenzymes, 256
Isogeneic diploids, 220
Juvenile phase, 197
Juvenility, 37, 359
Karyogamy, 184
Karyotyping, 84, 258
Key metabolites, 119
Killed vaccine, 574
Lab. Incubator, 34
Lachrymat-ory factor synthase gene, 507
Lack of pollen transmission, 559
Lactoferrin, 558
Laminar air flow cabinet, 34, 235
Laurate-C12, 511
Lauroyl-ACP, 512
Lepidoptera, 486, 489
Leutolin, 549
L-gulono-1,4-lactone oxidase, 540
Liberty, 519
Light intensity, 86
Light period, 86
Lignification, 73, 239
Linear phase, 84, 91, 752
Liquid crystalline phase, 226
Live or attenuated vaccine, 574
Loci, 219, 232
Long juvenile phase, 197
Lupin, 399, 402
Lysozyme, 558
Macerozymes, 231
Macronutrients, 101, 103
Macroplasts, 243
Human intrinsic factor, 568
Human recombinant DNA, 579
Human serum albumin, 568
Hybrid seed industry, 222
Hydrogel, 19
Hydrogel encapsulation of artificial seeds, 304
Hydrolases, 405
Hydrophilic, 288, 510
Hydrophobic organics, 377
Hydroponic system, 372
Hydrothermolysis, 473
Hydroxyatrazine, 407
Hydroxylation, 160
Hydroxysteroid oxidase, 536
HyperDSC, 368
Hyperhydration, 72, 752
Hypericum, 25, 163
Hyperplasia, 496
Hypo-cholesterolaemic effect, 529
Hypoplasia, 496
Ice minus bacteria, 520
IgA plantibodies, 575
Imbibition, 226
Imidazolinones, 519
Immature embryos, 180
Immobilization, 6, 131,
Immortal embryonic cells, 276
Immunological tolerance, 573
Implementation, 586
Improved crop detoxification, 515
Improvement of plant digestibility, 540
***in situ*, 345**
***In vitro*, 1, 43**
***In vitro* budding, 70**
***In vitro* culture of ovaries, 211**
***In vitro* fertilization, 4, 174, 719**
***In vitro* grafting, 17, 70**
***In vitro* pollination, 177**
Inbreeding, 196
Incompatibility, 14, 260
Indeterminate growth, 78
Indirect embryogenesis, 279
Individual pollen grains, 198
Inflorescences culture, 199
Initial cell density, 90
Initial substrate, 540
Inner cortex, 327
Inoculum density, 21

Millicell, 176
Millipores, 34
Miniprotoplasts, 242
Moderately hydrophobic, 377
Molecular farming, 549, 557, 576
Monarch butterfly, 493
Monellin, 530
Monitoring and evaluation, 586
Monoembryonate, 186
Monomeric, 575
Monomers, 540
Monomethylarsenate, 379
Monomethylmercuric chloride, 389
Monoploids, 216
Moondust, 527
Morphogenesis, 53, 282, 753
Morphogenetic activity, 290
Morphological differentiation, 121
Morphological polarization, 186
Mouse GAD67, 28
Mucosal immunity, 565
Multicomponent vaccines, 573
Multiple sclerosis, 573
Multiporator, 249
Mutagens, 233
Mutant cell lines, 264
Mutation of the target protein, 515
Natural endophyte of poplar, 401
Natural habitats, 119, 345
Natural products, 117, 716
Necrosis, 75, 496
Nematode Resistance, 503
Neutralization, 471
nif genes, 547
Nigeran, 146
Nitroaromatic, 399, 400
Nitrogenase system, 546
Nitroreductase, 400
Nitsch's medium, 178, 209
NOA, 212
Nod-genes, 549
Nodules, 547
Nodulin 26-like intrinsic proteins, 382
Non-endospermous, 187
Non-Hodgkin's lymphoma, 568
Non-reduced microspores, 205
Non-viable seeds, 584
Northern blots, 295
Norwalk capsid protein, 28
Male gametophytes, 172
Male sterile, 222
malonyl CoA, 511
Malt extract, 186
Manipulator, Model 200, 247
Marker gene, 222, 559
Masking, 219
Mass fusion, 171
Material development and pretesting, 586
Mature embryos, 180
MCPA, 106
Mechanism of RNAi, 504
Medium-term storage, 349
Membrane transport, 423
mer operon, 387, 388
Mercury, 386, 388
Mericlinal or layering chimera, 331
Mericlonal variation, 14
Metabolic engineering, 475
Metabolic inhibitors, 253
Metalloenzyme, 449
Metalloids, 378
Metallothionein, 375
Metallothioneins, MTs, 375
Methionine sulfoximine, 324
Methods of protoplast isolation, 235
Methylated cytosine, 295
Methylated organic As, 385
Methylation reactions, 381
Methylmercury, 386
Methyl-parathion, 406
Methyl-SeCys, 391,
Metolachlor, 407
MHz Sinus, 249
Microchamber technique, 95
Microfusion chamber, 250
Micrografting, 17, 339
Microinjection, 270, 753
Micromanipulator, 247
Micronutrients, 102
Microprojectile bombardment, 6, 232
Micropropagation industry, 303
Micropylar, 184, 185
Microsatellites, 551
Microspectrophotometry, 127
Microspores, 172, 204
Microsporocytes, 172
Microtubers, 359, 753

Paternal, 222
Pathotoxin, 502
PBZ, 41
PC synthases, 374
PCR amplicons, 398
Pectin methyl esterase, 521
PEG, 242, 247, 250, 251
Perfluorochemicals, 312
Performance plants Inc., 432
Pericarp, 243
Periclinally, 327
Peroxidases, 152, 155, 449
Petroleum-degrading bacteria, 401
P-grain maturation, 204
Phaseolin-β, 512
Phaseolus calcium chloride, 244
Phenanthrene, 402
Phenocarboxylic acid, 519
Phenotypic parameters, 318
Phenotypic variability, 313
Phenoxy-auxins, 292
Phenylmercuric acetate, 389
Phenylmercury, 386
Phlorizin, 73
Phloroglucinol, 73
Phosphate signaling mechanism, 381
phosphinothricin acetyltransferase, 518
Phosphoenoylpyruvate, 517
Phosphorylated intermediates, 138
Photometer, 33
Photomorphogenic responses, 155
Photooxidation, 115
Photoproducts, 155
Photosynthetic efficiency, 521
Phototrophic, 5
Phreatophyte, 414
Phtorespiration, 545
Physiological parameters, 319
Phytagel, 109
Phytases, 534, 541
Phytate, 533
Phytic acid, 541
Phytoalexins, 146
Phytochelatins, PCs, 374, 375, 382
Phytochemicals, 117
Phytodegredation, 371
Phytoene desaturase, 533
Phytoene desaturase CRTI, 533
Phytoene synthase, 522, 533, 534
Norwalk virus capsid protein, 568
Not glycosylated, 560
Novel hybrids, 266
Novel plants, 340
Nucellar embryos, 277
Nucellar tissues, 277
Nucellus culture, 186
Nuclear gene chimera, 337
Nuclear imaging in cryogenic system, 367
Nuclear Magnetic Resonance, NMR, 367
Number of subcultures, 314
Nurse culture technique, 207
Nutrient depletion, 131
Obligate biotrophs, 8
off-type, 73, 344
Oilseed rape, 512
Oleate-C18, 511
Oleosins, 511
Oligofructans, 510
Oligofructans of sugar beet, 510
Oligosaccharides, 292
Open ponds, 477
Optimization, 49, 119, 301, 467
Organic pollutants, 393
Organic supplements, 101, 104
Organogenesis, 53,54, 198, 283, 755
Organosolv pre-treatment, 473
Orobanche, 210
Orthoptera, 486, 493
Osmolytes, 427
Osmoprotectants, 427, 447, 457
Osmotic adjustment, 432
Osmotic desiccation, 301
Osmoticbursting, 171
Outer cortex, 327
Ovary culture, 202Oxidative stress, 380, 718
Oxidized glutathione, 449
P450 CYP2E1, 396
Packed cell volume, 94
Palisade, 237
Palmitate-C16, 511
Palmitic, 512
Aminobenzotriazole, 406
Parasporal crystals, 489
Parthenogenesis, 211
Partially dehydrated, 360
Particle bombardment, 506

Polyphenol oxidases, 526
Polyphenolase, 112
Polyploidy, 2, 197, 238, 276, 756
Polyurethane foams, 131
Polyvinyl pyrrolidone (PVP), 60
Pomato,4
Poor conversion, 304
Post-harvest, 526
Post-transcriptionally, 297
Posttranslational modifications, 468
Potassium dextran sulphate, 236
Preconditioning, 350
Precursors, 141, 535
Pre-existing variation, 315
Pre-growth desiccation, 358
Pre-maturation, 289
Press method, 480
Primary endosperm cell, 174
Primary metabolites, 117
Primary tillers, 207
Procambial, 283
Prodi Gene Inc, 579
Production medium, 135
Proembryo, 283, 286
Proembryogenic masses, 183
Pro-embryogenic masses, PEMs
Progenitor cell, 286
Promoter, 432, 491, 505, 515, 558, 727
Protease inhibitors, 493
Proteinase gene, 504
Proteolytic enzymes, 490
Protoclonal variation, 14
Protoclones, 313
Proton pumping, 450
Protoplasmic streaming, 240
Protoplast culture, 14, 80, 242, 243
Protoplast enucleated, 261
Protoplast flotation, 239
Protoplast viability, 240
Protoxins, 489
Provitamin A, 533, 534, 738
Pro-Vitamin A, 531
Pseudocellulotic, 467
Pseudo-fertilization, 201
Psychrophilic, 466
ptDNA, 559
pTOM13ACC oxidase (ACC= 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylic acid), 776
Phytoextraction, 371, 378
Phytoremediater, 371
Phytoremediation, 369, 370, 383, 388, 393, 408, 717
Phytostabilization, 371, 378
Phytosterols, 535
Phytostimulation, 371
Phytotoxic, 380
Phytovolatilization, 372, 379
Picloram, 106, 739, 740
Pipecolatebetaine, 451
Planning, 586
Plant genotype, 49
Plant made pharmaceuticals, 568, 577,
Plant Regeneration, 288, 366
Plant Vitrification Solutions, PVS2, PVS3, 364
Plantibodies, 575, 576
Plasma membrane, 161, 382
Plasma membrane intrinsic proteins, 382
Plasmodesmata, 246
Plasmoticum, 235
Plastid gene chimera, 337
Plastid rRNA (*rrn16*), 559
Plating, 21, 98, 126, 239, 243
Plating efficiency, 208
Ploidy variation, 210
PLRV, 267, 498
Poaceous monocots, 292
Polar fashion, 184
Pollen banks, 222
Pollen dimorphism, 208
Pollen germination *in vitro, 228*
Pollen grain, 198, 204, 207, 222, 228
Pollen grain viability, 224
Pollen tube, 228
Poly chlorinated biphenyls, 403
Polychlorinated biphenyls, 394
Polychromosomes, 316
Polycistronic mRNAs, 559
Polycyclic aromatic hydrocarbons, 394, 402
Polyembryonate, 186
Polyfructans, 510
polygalacturonase (PG), 521, 522
Polyhydroxy butyrate (PHB), 549
Polyhydroxyalkanoates, 29
Poly-L-Lysine, 146

Ribonuclease, 146, 528
Ribonuclease-A, 146
Ribulose 1,5-bisphosphate, 545
Riparian, 407
Rizofiltration, 372
RNA interference, 503, 505
RNA Transcripts, 504
RNA-expressing vectors, 506
RNAi, 222, 382, 503, 504, 506, 514
RNAi and Plant Functional Genomics, 505
RNAi for Crop Improvement, 505
RNAi for Male Sterility, 222
RNAi for Pathogen Resistance, 504
Robot, 58
Rootstock, 70, 339
Rosette plant, 49
Rosmarinic acid, 143, 144
Rotary shaker, 33, 34, 89
Rotavirus, 566, 573
Round up, 516
Roundup Ready, 538
RT-PCR, 177
RuBisCo small subunit 1, 384
Saccharification, 474
Salt-specific effect, 448
Satellite RNA, 497
Scion, 70, 339
Scopoletin, 139
Scopolin, 139
Scutellum-like compact white tissue, 184
Se hyperaccumulators, 391
Secondary embryogenesis, 288
Secondary embryos, 277
Secondary metabolites, 24, 116, 117, 715, 719
Secondary nucleus, 174, 184
Secretory antibodies, 565
Sectorial chimera, 332
Sedges, 413
Seed albumin, 513, 529
Seed storage, 347
Seed terminator technology, 552
Seed vigor, 229
Seedless fruits, 190
Selectable marker genes, 559
Selection of fused protoplasts, 255
Selective agent, 24, 451
Selective elimination, 216
pTOM5Phytoene synthase, 552
pTOM6Polygalacturonase, 522
pTOMBu61, 399
PUFAs, 537
Pulse duration, 248
Pulse voltage, 249
PVC, 114
Pyrolysis, 475, 476, 763, 764, 767
Pyrophosphorylase, 468, 509
Pyrroline-5-carboxylate reductase, 427
Pyrroline-5-carboxylate synthetase, 427
Quaternary ammonium compounds, 450
Quiescent
Quiescent buds
Quinones, 75
Rabbit hemorrhagic disease, 581
Radioimmunoassay, 6, 127
Radionuclides, 378, 413
Raft-nurse tissue, 95
RAPD, 319, 322, 550, 551
Rapeseed, 536
Rapid freezing method, 360
Rapid osmotic phase, 448
Rate-limiting factor, 545
RDX, 394, 395, 399, 401, 404, 413
Recalcitrant, 7, 358, 364, 404
Recalcitrant pollutants, 404
Recessive, 196, 197, 757, 765
Recombinant DNA Technology, 7, 776
Recombinant proteins, 545, 557, 570
Recombination, 466, 559, 769
Reduced glutathione, 449
Reductional mitosis, 215
Regeneration, 4, 13, 288, 366, 726, 728, 757
Regenerative potential, 195
Repeated selection, 6
Reprogramming of gene expression, 297
Research Department Explosive, 394
Resistance against ice-nucleating bacteria, 519
Resistance to Abiotic Stresses, 514
Restorer lines, 270
RFLP, 319, 322, 550, 551,
Rhizodegradation, 371, 377

Southern hybridization, 342
Spectinomycin, 559
Sperms, 171, 172, 195, 286, 719
Spongy parenchyma, 237
Sporamin A, 532
Sporophytes, 172, 191
Sporophytic, 192, 277
Square wave electroporator, 247
Squashing, 171
SSR, 322, 550, 551,
Staminoides, 74
Staple crops, 531
Starch branching enzyme, 509
Starvation, 93, 94
Status of Bt Cotton, 506
Status of Bt Maize, 508
Stearate-C18, 511
Stearic, 512
Stepwise freezing method, 360
Stepwise long-term selection methods, 451
Stereoscopic, 57
Stigma, 228, 229
Stigma papilla, 228
Stilbene synthase, 500
Storage of pollen grains, 222
Straw, 463
Strong promoter, 515
Sub protoplasts, 242
Subculture, 26, 80, 85, 314, 746, 755, 758
Subsitution, 217
Substrate molecules, 141
Substrates, 120, 474
Subunit preparations, 565
Sugar cane bagasse, 460
Sulphonyureas, 519
Super weeds, 552
Superoxide dismutase, 152, 155, 449
Suppresser gene, 222
Suppressor cells, 573
Suspensor, 185, 281, 285
Symbiosis, 547, 758
Symmetric microsporogenesis, 205
Synchronization of suspension cultures, 92
Syncytium, 185
Synergid, 194
Syngas, 476
Synkaryon, 257, 746
Selective medium, 559
Selenate, SeVI, 391
Selenium, 8, 390
Selnite, SeIV, 391
Semi *in vitro* germination test, 229
Semigamy, 195
Sensitive balance, 34
Sensitivity disc, 113
Septum, 202
Serine protease, 494
Sex determination, 215
Sexual gametophytic, 192
Shear stress, 131, 151
Shelf life, 348
Shikimate 3-phosphate, 517
Shock treatment, 451
Short half-life, 516
sIgA Anti-S. mutans, 28
Signal transduction system, 148
Silenced, 503
Silencing, 418
Silica gel, 73
Single base substitution, 517
Single gene mutations, 313
Single node, 48
Single transformation construct, 514
Slow growth, 20, 349
Small and basic intrinsic proteins, 382
smHSP, 174
Sodium alignate, 19
Softening enzyme polygalacturonase, 522
Solanopersicon, 253, 267
Solidifying agents, 101, 108
Solvents, 393
Somaclonal variation, 4, 14, 21, 26, 298, 313, 322, 722, 752
Somaclones, 313, 324, 757
Somatic embryogenesis, 11, 18, 191, 275, 297, 757
Somatic hybrid, 7, 232, 234, 244, 257, 258, 757, 758
Somatic hybridization, 234, 244, 265, 271, 758
Somatic incompatibility, 260
Somatic reduction, 215
Sonication, 59
Source of somatic embryos, 278
Southern Blot Analysis, 341

Transformation, 3, 4, 5, 89, 89, 125, 160, 323, 483, 558, 560, 722
Transgene silencing, 418
Transgenic, 483
Transient variations, 314
Transition, 185
Transition phase, 283
Translucency, 72
Transpiration, 427
Transplant rejection, 573
Transplastomic line, 559
Transplastomic plants, 560
Transporter proteins, 372
Transporters MTPs
Trehalose, 510
Triacyl-glycerols, 511,
Tricellular, 171, 225
Triggering effect, 283
Trimethyl arsine, 381
Trimethylarsine,, 385
Trinitrotoluene, 393
Triploid, 2, 178, 190
Triploid endosperm, 278
Trisomics, 190
Triticale, 23
True cellulolytic bacteria, 466
True mutants, 452
True to type, 10
Trypsin, 493, 494
Tryptophan decarboxylase, 494
Tumor induced plasmid, 484
Tunica, 326, 327
Tunica-Corpus, 326
Two step conversion, 389
Two-phase system culture, 133
Type 2 Diabetes, 532
Ultra-rapid drying, 364
Ultra-rapid freezing, 362
Ultrasound, 159, 303
Uncoated desiccated synthetic seeds, 309
Uncoated hydrated synthetic seeds, 310
Undesirable variations, 322
Uni to four-nucleate stage, 211
Uninucleate stage, 198
Unorganized organ culture, 79
Unusual plantlet phenotypes, 298
Ureases, 405
USDA-APHIS, 554
Synthesis of stress proteins, 423
Synthetic seeds, 275, 276, 303, 309, 310, 311, 312, 758
Systeine protease, 494
Systematic infection, 38
Systemic immunity, 566
Tallow, 469
Tamarix, 414
Tapetal cells, 528
Tapetum, 202
TDZ, 140, 291, 292, 739, 740
Temperate zone plants, 52
Temporary immersion system (TIS)
Tetraploid 2n=4x, 194
Tetraploids, 190, 215
Thawing, 5, 302, 354, 365
The International Service for The Acquisition of Agri-biotic Applications, 587
Therapeutic, 27, 505, 569, 575, 578, 579, 716
Therapeutic agents, 575
Therapeutic gene, 579
Thermobile organics, 111
Thermochemical conversion, 475
Thermophilic, 466
Thermotherapy, 4, 15, 37, 56
Thidiazuron, 107, 739, 740
Thioesterases, 511, 512
Thiol glutathione, 380
Thionins, 500
Thornless blackberry, 326
Three-dimensional tubes, 478
Threshold, 174, 436, 448
Ti plasmid, 4
TIBA, 291, 260
Time of shedding, 225
TMV, 267, 497, 498, 504, 564
TNT, 393, 399, 400
Tobacco hornworm, 488
Tomato spotted wilt virus (TSWV), 505
Tonoplast, 161, 374
Tonoplast intrinsic proteins, 382
Topato, 267
Totepotency, 759
Transcription, 297
Transcription factors, 433
Transertrification, 469

Washington Navel, 326
Water potential, 430
Water-imbibing seeds, 361
Western Blotting, 398
Whip grafting, 70
Whip micrografting, 17
Willow,1, 402, 409
Xenobiotic, 394
Yellow lupine, 399
Zeins, 538
Zwitterionic, 427
Zygote culture, 208
α- tocopherol (E), 499, 539
UV germicidal lamps, 34
UV-A, 152, 155, 156
UV-B, 3, 140, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159
UV-C, 152, 156, 159, 427
Vacuum cooling, 225
Vascular cylinder, 327
Vicilin
Virus-induced gene silencing, 506, 715
VISTIVE, 538
Vitresence, 72
Vitrification, 60, 72, 353, 357, 358, 362, 364, 752

الأسماء العلمية التي وردت في الكتاب وارقام صفحاتها

***Allium tuberosum,* 213**
***Alternaria brassicola,* 219**
***Alternaria carthami,* 502**
***Alternaria dauci,* 501, 736**
***Alternaria longipes,* 501, 737**
***Alternaria radicina,* 736**
***Alyxia rubricaulis,* 376**
***Amaranthus caudatus,* 143**
***Amaranthus hypochondriacus,* 532**
Ammi majus, 169
***Acinidia chinensis,* 192**
***Acorus calamus,* 154**
***Actinidia chinenesis,* 540**
***Aeleuropus littoralis,* 273**
***Aeolanthus biformilolius,* 376**
***Agrobacterium rhizogenes,* 24, 134, 722, 760**
***Agrobacterium tumefaciens,* 484, 488, 561, 566, 722, 760**
***Agropyron elongatum,* 273**
***Allium cepa,* 213**

Botrytis cinerea, 501, 728

Botrytis sp., 148

Brassica campestris, 255

Brassica juncea, 323, 391, 409

Brassica napus, 19, 144, 219, 254, 255, 259, 268, 272, 441, 736

Brassica nigra, 255

Brassica oleracea, 213, 227, 254, 259

Brassica rapa, 341, 536

Brugsmansia candida, 143

Burkholderia xenovorans, 403

Caenorhabditis elegans, 503

Caesalpinia gillisesii, 123

Cakile maritime, 145

Callosobruchus maculatus, 487

Camellia sinensis, 144

Camptotheca acuminate, 154

Capsella bursa-pastoris, 179

Capsicum annum, 140

Capsicum frutescens, 134

Carica papaya, 224, 294, 730

Cassia acutifolia, 140

Catharanthus roseus, 123, 134, 136, 140, 148, 149, 156, 169, 355

Catharanthus trichophyllus, 140

Cenchrus pennisetiformis, 145

Cephaelis ipecacuanha, 119

Cephalotaxus harringtonia, 123

Cercospora nicotinae, 501

Cercosporidium personatum, 502

Anabaena, 265, 548

Anisodus acutangulus, 355

Anisodus luridus, 140

Annona squamosal, 192

Anterhinum majus, 226

Anthonous grandis, 493

Apium graveolens, 148

Arabidopsis thaliana, 29, 154, 437, 540, 761

Artemisia annua, 169

Artemisia genipi, 119

Artemisia sieversiana, 273

Asparagus officinalis, 197

Aspergillus niger, 148, 540

Astragalus racemosus, 376

Astralagus bisulcatus, 376

Atropa belladonna, 123, 136, 169, 355

Azadirachta indica, 140

Azospirillum, 548

Azotobacter, 548

Baccharis megapotanica, 123

Bacillus amyloliquefaciens, 528

Bacillus anthracis, 560

Bacillus thuringiensis, 488, 566

Balanites aegyptiaca, 139

Begonia x Cheimantha, 52

Beta vulgaris, 140, 143, 213, 227

Bisculella laevigata, 376

Borrelia burgdorferi, 560

Coptis japonica, 124

Cornyne bacterium, 529

Coscinium fenustratum, 140

Crambe abyssinica, 272

Crocus sativus, 82, 124

Cucumis melo, 254

Cucumis sativus, 154, 215

Cynachum vincetoxicum, 187

Dalanites aegyptiaca, 136

Dalia spp., 2

Datura candida hybrid, 169

Datura innoxia, 145, 169, 170, 191, 196, 259, 355

Datura sp., 162

Datura stramonium, 124, 136, 169, 170, 209

Daucus carota, 140, 148, 150, 162, 254

Daucus deltoidea, 352

Dehalococcoides, 395, 403

Dendranthema grandiflorum, 273

Dendrophthoe falcata, 192

Dendryphion sp., 148

Derris elliptica, 124

Digitalis lanata, 123, 134, 160, 163

Digitalis purpurea, 160, 162

Dioscorea alata, 355

Dioscorea balanica, 355

Dioscorea bulbifera, 143, 355

Dioscorea deltoidea, 123, 136, 138

Chlamydomonas reinhardtii, 400, 570

Chlorophytum comosum, 333

Choisya ternate, 162

Chrysanthemum, 124, 445

Cichorinm intybus, 140

Cinchona ledgeriana, **136, 148, 169**

Cinchona officinalis, 123

Cistanche tubulosa, 210

Citroncirus webberri **C35***, 272*

Citrullus lanatus, 254

Citrus amblycarpa, 272

Citrus aurantifolia, 294, 729, 732

Citrus clementine, 723

Citrus grandis, 192, 294

Citrus jambhiri, 294

Citrus limon, 272, 294, 444, 727, 728

Citrus limonia, 272

Citrus sinensis, 192, 294, 735

Citrus sp., 162, 224

Clausena lansium, 273

Cleocapsa, 265

Clostridium tetani, 560

Cocos nucifera, 224

Codiaeum variegatum, 192

Coffea Arabica, 162

Coix lacryma-jobi, 213

Coleus blumei, 113, 124

Colletotrichum falcatum, 502

Colletotrichum gloeosportoides, 502

Galanthus nivalis, 495

Galium mollugo, 162

Gerbera jamesonii, 213

Ginkgo biloba, 2

Ginkgo tibetica, 300

Gladiolus sp,.224

Globodera rostochiensis, 550

Glycine max, 134, 144, 145, 148, 277

Glycyrrhiza uralensis, 154, 441

Grevillea sp, 145

Gymnema sylvestre, 140

Gynostemma pentaphyllum, 140

Haplopappus gracilis, 150, 231

Haumaniastrum ruberlii, 376

Hedera, 334

Helianthus annuus, 213, 223, 227, 273, 442, 445

Helianthus tuberosus, 150

Helicoverpa zea, 487

Heliothis armigera, 487

Heliothis virescans, 493

Helminthosporium maydis, 502

Helminthosporium sativum, 324

Helminthospotum oryzae, 502

Hevea brasiliensis, 213

Holcus lanatus, 382

Hordum vulgare, 23

Hydrastis Canadensis, 119

Hydrocotyle bonariensis, 140

Dioscorea floribunda, 355

Dioscorephyllum cuuinsii, 530

Dracaena deremensis, 333

Elaeagnus pungens, 332

Elsinoe ampelina, 502

Entamoeba histolytica, 560

Enterobacter cloacae, 400

Eruca sativa, 254

Erwinia carotovora, 500, 501

Erwinia sp., 60

Erwinia uredovora, 533

Escherichia coli, 381, 545

Eschscholtzia californica, 149

Eucalyptus sp., 355

Exocarpus cupressiformis, 192

Fabiana imbricate, 140

Fagara zanthoxyloides, 123

Fagopyrum tataricum, 154

Festuca, 542

Festuca arundinacea, 540, 543

Festuca rubra, 209, 544

Fortunella crassifolia, 272

Fragaria sp., 224

Frankia, 548

Fusarium, 146, 148, 502

Fusarium oxysporum, 324, 501, 502, 727, 728

Fusarium roseum, 57

Fusarium sp., 148, 502, 550, 737

Maytenus bucchananii, 123

Medicago sativa, 355, 442, 445

Meloidogyne spp, 551

Mentha piperita, 154

Mentha spicata, 154

Mentha vulgaris, **136**

Methylobacterium sp., **401**

Mimulus luteus, **201, 213**

Morinda citrifolia, **124, 138, 139, 149**

Morus alba, **213**

Mucuna pruriens, **140, 162**

Nicotiana glauca, **256**

Nicotiana nigrum, **255**

Nicotiana tabacum, **136, 213, 254, 255, 259, 355,**

Ochrobactrum anthropic, **518**

Ochrosia moorei, **123**

Ocimum basilicum, **143, 154**

Olea europea, **224, 440**

Ornithopus, **190**

Orobanche aegyptica, **210**

Orychophragmus violaceus, **272**

Oryza meyeriana, **273**

Oryza sativa, **145, 192, 213, 434, 438, 441**

Oryza sativa **japonica, 539**

Ostrinia nubilalis, 487

Panax ginseng, **64, 170, 355**

Papaver somniferum, **123, 144, 148, 149, 162, 209**

Hyoscyamus albus, 149

Hypericum brasiliense, 144

Hypericum perforatum, 137

Hypericum triquetrifolium **Turra,** *715*

Ipomea batatas, 355

Jasmium sp, 123

Jatropha panduraefolia, 192

Juncus effuses, 407

Klebsiella, 405

Klebsiella pneumonia, 548

Lactuca sativa, 154

Lepidium sativum, 143

Leptinotarsa decemlineata, 487

Lilium davidii, 213

Lithospermum erythrorshizon, 139

Locust migratoria, 493

Lolium, 209

Lolium multiflorum, 406, 543

Lolium perenne, 209, 543, 544

Lotus, 190

Ludwigia peploides, 407

Lupinus angustifolius, 144

Lycium barbarum, 192

Lycopersicon cheesmanii, 267

Lycopersicon esculentum, 145, 224, 227

Malandrium album, 209

Malus domestica, 187, 438, 440, 442

Manduca sexta, 487

Prunus persica, 192, 227, 730
Prunus spp, 262
Pseudomonas carophylli, 57
Pseudomonas fluorescens, 405
*Pseudomonas putida,*403, 407
Pseudomonas syrigae, 502
Psoralea cordifolia, 140
Psychotria brachyceras, 154
Pteris vittata, 376, 382, 383
Putranjiva roxburghii, 192
Pyrcularia oryzae, 550
Pyrenochaeta lycopersica, 502
Pyricularia oryzae, 501
Pyrus communis, 227, 262, 725, 730, 733
Pyrus malus, 154, 192, 224, 227
Pythium aphanidermatum, 148
Pythium graminicolum, 502
Raphanus sativus, 254, 341
Rauwolfia serpentine, 140
Rhizobia legminosarum, 548
Rhizoctonia solani, 499, 500, 501
Rhodococcus rhodochrous, 401
Rhodopseudomonas, 548
Rhodospirillum, 548
Rosa domascena, 40
Rosmarinus officinalis, 120, 124, 150, 154, 442
Rubia tinctoria, 148
Salmonella typhimurium, 517
Pectobacterium parthenii, 57
Peganum harmala, 138
Penicillium exansum, 148
Pepromia obtusifolia, 786, *331*
Petroselinum hortense, 192
Petunia axillaris, 202, 213
Petunia hybrid, 256
Petunia parodii, 259
Phalaenopsis, 65
Phaseolus vulgaris, 148, 499, 512
Phoenix dactylifera, 66, 112, 716
Phoma lingam, 219, 324, 736
Phoma tracheiphila, 502
Phyllanthus serpentinus, 376
Physcomitrella patens, 570
Phythium aphanidermatum, 148
Phytolacca Americana, 140
Phytophthora infestans, 267, 273, 502, 736
Phytophthora megasperma, 148
Picea abies, 72
Pinus silvestris, 224
Pisum sativum, 154
Podophyllum peltatum, 119
Populus deltoids, 413
Populus nigra, 413
Populus simonigra, 213
Populus trichocarpa, 400
Prisms sativum, 144
Prunus, 70

Tagetes patula, 143

Taxillus vestitus, 192

Taxus brevifolia, 123

Taxus chinensis, 143

Taxus cuspidate, 157

Thalictrum dasycarpum, 123

Thalictrum rugosum, 149

Thaumatococcus damielli, 124

Thlaspi caerulescens, 376

Tradescantia, 334

Trichoderma reesei, 474

Trifolium, 25, 152, 163, 190,

Trifolium pretense, 227

Trifolium repenes, 355

Tripterygium wilfordii, 149

Triticum aestivum, 200, 213, 224, 273, 438

Umbellulularia californica, 512

Vanilla planifolia, 143

Vaucheria dichotoma, 264

Vibrio cholera, 560, 566

Vicia faba, 227, 512

Vitis vinefera, 187

Xanthomonas campestris, 502, 730

Yersinia pestis, 560

Zataria multiflora, 140

Zea mays, 154, 213, 224

Salvia miltiorrhiz, 144

Sanguinaria Canadensis, 148, 149

Sansevieria, 330

Santalum album, 192

Scrophularia ningpoensis, 144

Scurrula pulverulenta, 188, 192

Septoria glycines, 502

Serratia marcescens, *499*, *501*

Sesamum indicum L., 145

Sinapsis arvensis, 272

Sinorhizobium meliloti, 405

Solanopersicon, 253, 267

Solanum acaule, 270

Solanum aviculare, 134

Solanum tuberosum, 162, 194, 213, 227, 254, 259, 262, 267, 273, 439, 440, 443, 444

Solanum lanciatum, 138

Solanum melongena, 210, 273

Solanum nigrum, 255, 269

Solanum ochranthum, 254

Solanum phureja, 194

Spodoptera littoralis, 487

Stenotrophonomonas sp., 405

Stevia rebaudiana, 140, 160, 162

Streptococcus mutans, 575

Tagetes , 124

Ministry of High Education & Scientific Research

Al-Nahrain University

Applications in Plant Biotechnology

Kadhim M. Ibrahim, PhD

Professor in Plant Biotechnology

2015