Sohag University
Faculty of Agriculture
Department of Genetics

جامعة سوهـــــاج
كليــة الزراعـــــــــة
قسم الوراثـــــــة

المحاضرة السادسة

زراعة الانسجة والتكنولوجيا الحيوية

المستوي الثالث برنامج التكنولوجيا الحيوية

اعداد

د. احمد يوسف محمد
قسم الوراثة – كلية الزراعة – جامعة سوهاج

الاختلافات الوراثية الناتجة من زراعة الأنسجة

Somaclonal Variation

أحياناً ما تكون ظروف الزراعة في مزارع الأنسجة والخلايا النباتية والبروتوبلاست مصدراً للإختلاف الوراثي. وهذا يعني أن نسبة كبيرة من النباتات المتكشفة لا تكون مطابقة وراثياً ولا مظهرياً للنبات المصدر (يعرف بالنبات الأم وهو مصدر الجزء النباتي الذي تم زراعته Explant). وأطلق العالمان لاركين وسكوكروفت عام ١٩٨١م علي هذه الظاهرة مصطلح somaclonal variation.

مصادر وميكانيكية حدوث الإختلافات الوراثية الناتجة من زراعة الأنسجة

هناك نوعان من هذه الإختلافات ، فهي قد تكون وراثية genetic أي أنه يمكن أن تورث من جيل لآخر وهي تحدث بسبب الطفرات أو أي تغير يحدث في الحامض النووي DNA للنبات. والنوع الآخر غير وراثي ويطلق عليه Epigenetic وهو غير مورث من جيل لآخر ويحدث نتيجة تغيرات مؤقته في الشكل الظاهري للنبات.

أولاً: الإختلافات الوراثية Genetic variation

هناك العديد من الميكانيكيات الجزيئية التي قد تكون مسؤلة عن التغيرات الوراثية التي تصاحب الإختلافات الناتجة في مزارع الأنسجة.

- **التغيرات العددية للكروموسومات**
- **التغيرات التركيبية للكروموسومات منها**

أ- الإنقلاب Inversion: وهو تغير في ترتيب تتابع الجين.

ب-التكرار Duplication: تكرار مناطق جينية أو جينات كاملة.

ت-الإقتضاب Deletion : فقد مقطع من الجين أو جين كامل.

ث-الأنتقال Translocation: انتقال مقاطع من الجينات لمكان أخر

- **العناصر المتنقلة Transposable elements:**

قد تحدث الإختلافات نتيجة تنشيط مناطق العناصر المتنقلة في الجينوم ، وهي عبارة عن مقاطع من الـ DNA يمكنها أن تنتقل من مكان لآخر داخل الجينوم. وهي تتسبب في طفرات غير ثابته ولوحظت في نباتات الذرة وحنك السبع والدخان والطماطم.

- **الطفرة الموضعية Point mutation:**

بالإضافة للتغيرات التركيبية التي سبق توضيحها ، فيمكن حدوث طفرات موضعية في الـ DNA والتي قد تحدث علي مستوي نيوكليوتيدة واحدة في مناطق التشفير ويمكن أن تتسبب في إيقاف عمل جين بالكامل فضلا عن تغيرات في الشكل الظاهري للنبات. ومن أمثلة الطفرات الموضعية تلك التي تسببت في العقم الذكري وعدم التحام الأنبوبة السدائية للمتوك ولون الأزهار ونضج الثمار وغيرها في نبات الطماطم. كما لوحظ انعزال الطفرة في الجيل الثاني بنسبة ٣:١ مما يؤكد علي أنها حدثت في موقع جيني واحد.

- **زيادة نسخ الجين ونقصها:**

توجد بعض الجينات الخاصة لها القدرة علي نسخ نفسها بكميات كبيرة أثناء عملية التكشف والتميز أو الإستجابة لظروف الإجهاد البيئي. ونتيجة ذلك تحدث زيادة في البروتين الناتج من هذه الجينات وفي بعض الحالات بنخفض النسخ، ومثال علي ذلك لوحظ عند وضع معلقات الخلايا لنبات فول الصويا النامية علي بيئة محتوية علي سكر المالتوز كمصدر للكربون أن الخلايا فقدت ثلث نسخ الجينات الريبوسومية.

- **العبور الجسمي وتبادل الكروماتيدات الشقيقة:**

يتراوح معدل العبور الجسمي من $5.4X10^{-5}$إلي $7.7X10^{-6}$ وتم أكتشافه في نباتات الطماطم وفول الصويا والقطن وغيرها. وتبادل الكروماتيدات الشقيقة عبارة عن تبادل أجزاء متساوية أو غير متساوية بين كروماتيدات نفس الكروموسوم. فإذا حدث تبادل أجزاء غير متساوي تسبب ذلك في حدوث نقص Deletion أو تكرار duplication لبعض الجينات.

ثانياً: الإختلافات غير المورثة Epigenetic variability

يتسبب هذا النوع من التغيرات في حدوث Somaclonal variation ولكن بصورة مؤقتة كما يمكن لها أن ترجع للشكل الطبيعي مرة أخري. ومع ذلك فبعض هذه الإختلافات يمكنها أن تبقي ملازمة للنبات الناتج من مزارع الأنسجة طيلة فترة حياته. من أمثلة هذه النوعية من الإختلافات ما يعرف بالـ Rejuvenation أو أستعادة الشباب وهو حدوث بعض التغيرات في النبات مثل التبكير في الإزهار أو تكون جذور عرضية. وتحدث هذه الإختلافات **Epigenetic** نتيجة لإضافة مجموعة مثيل للـ DNA فيما يعرف بال DNA methylation أو حدوث تضاعف لل DNA أو عن طريق تنشيط لأماكن العناصر المتنقلة

العوامل التي تؤثر علي حدوث الـ somaclonal Variation فيما يلي:

١. التركيب الوراثي للنبات المستخدم:

٢. طريقة الزراعة المستخدمة:

٣. هل النبات المستخدم يحتوي علي تغيرات كروموسوميه في خلاياه أم لا:

٤. نوع منظمات النمو المستخدمة:

٥. نوع الـ Explant المستخدم:

في حالة استعمال أجزاء نباتية تحتوي علي أنسجة غير متميزة مثل أنسجة البريسيكل والكامبيوم فإن معدل حدوث الطفرات يكون قليل نسبياً عن أستخدام الأنسجة المتميزة. ومن المعروف أن الأجزاء النباتية المستعملة من الميرستيم والبراعم القمية الجانبية تكون فرصة حدوث الأختلافات معها أقل بكثير عن باقي الأجزاء النباتية من أجزاء الأوراق وقطع الساق والكالس وغيرها.

٦. عمر الـ Explant المستخدم:

٧. عدد مرات تجديد المزرعة Subculture:

فرصة حدوث الطفرات تزداد بزيادة عدد مرات تجديد المزرعة سواء كانت كالس أو خلايا مفردة. ولذلك فينصح دائما بعدم كثرة تكرار تجديد المزرعة. ومن المعروف أن زراعات نبات الموز تبدأ في زيادة معدل الطفور بعد التجديدة الخامسة مع الأخذ في الإعتبار الصنف النباتي وطريقة الزراعة المستخدمة.

٨. تبادل طبقات الميرستيم Meristem layers rearrangement:

تحتوي العديد من النباتات البستانية علي طبقات ميرستيمية مركزية مختلفة المحتوي الوراثي فيما يعرف بالـ Periclinal Chimaera. ويمكن لهذه الطبقات أن تتداخل مع بعضها وتتبادل أثناء تكشف النبات في مزارع الأنسجة مما ينتج عنه نباتات تحتوي خلاياها علي محتوي وراثي متنوع Chimaera وهو نوع آخر من مصادر الأختلافات الوراثية التي تحدث في زراعة الأنسجة.

أهمية الإختلافات الوراثية الناتجة من زراعة الأنسجة:

يمكن لهذه الاختلافات أن تكون مصدراً مناسباً لاستخدامها في برامج تربية النبات فمثلاً يمكن انتخاب النباتات الطافرة والتي ربما تحتوي علي صفات هامة، مثل التبكير وزيادة كمية وجودة المحصول بالإضافة لتحمل الإجهادات البيئية مثل الجفاف والحرارة والملحية والبرودة وبعض العناصر السامة، فضلاً عن المقاومة للمرضات النباتية وغيرها. وعلي الجانب الآخر، تعتبر هذه الإختلافات غير مرغوبة في حالة الإكثار الخضري الدقيق والرغبة في الحصول علي نباتات مماثلة للنبات الأم لاستخدامها تجارياً. كما تعتبر غير مرغوبة أيضاً عند أستخدام تقنية زراعة الأنسجة كخطوة أولي في برامج الهندسة الوراثية ونقل الجينات، لأنه يلزم في هذه الحالة استخدام أجزاء نباتية لها نفس المحتوي الوراثي للنبات المصدر. لذا فإنه يلزم دائماً الكشف عن وجود الإختلافات الوراثية في مزارع الأنسجة.

طرق الكشف عن الـ Somaclonal variation:

علي الرغم من أن استخدام تقنيات التحليل السيتولوجي والشكل الظاهري يمكن أن يكشف بعض الإختلافات التي تنتج من زراعة الأنسجة إلا أن تقنيات الواسمات الجزيئية تم أستخدامها بشكل كبير للكشف عن هذه الإختلافات في مراحل مبكرة من عمر مزارع الأنسجة ومن هذه التقنيات الـ RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) وهو من أوائل الواسمات التي تم استخدامها في الكشف عن الـ Somaclonal variation في العديد من الأنواع النباتية ولكن من عيوبه أنه صعب التنفيذ ويعتمد علي استخدام مجسات Probes خاصة بكل نوع نباتي.

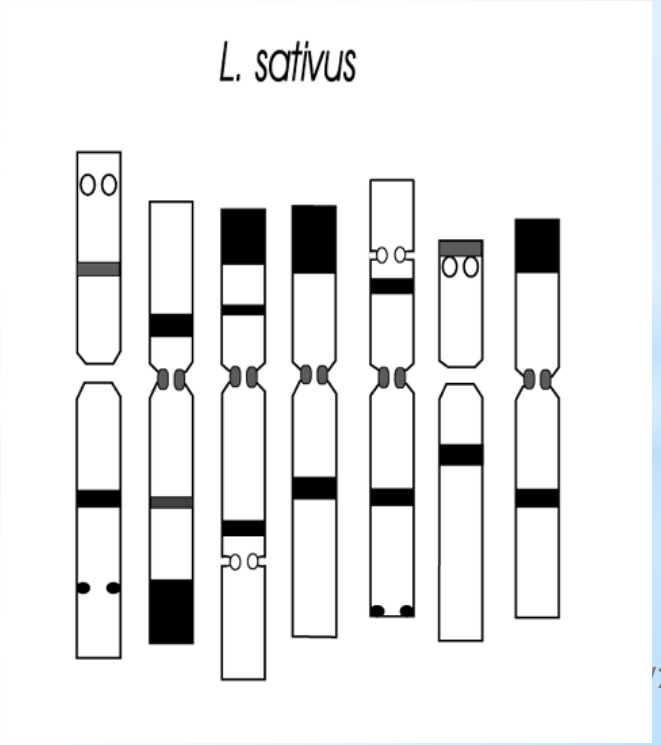
النوع الثاني من الواسمات الجزيئية هو الـ RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) وهذه التقنية تعتمد علي تفاعل البلمرة المتسلسل PCR ويتميز الـ RAPD بالبساطة والسهولة في العمل، كما أنه لا يحتاج لمعلومات سابقة عن النوع النباتي، ويعاب عليه أنه غير ثابت وإذا تم تكراره في المعمل يمكن أن يعطي نتائج مختلفة.

يأتي **النوع الثالث** والذي يعتمد أيضاً علي الـ PCR وهو الـ AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ويتميز هذا النوع بدرجة من الثبات العالية في نتائجة كما أنه لا يحتاج معلومات مسبقة عن النوع النباتي المستخدم في التحليل. وتعمل هذه التقنيات جميعها علي تحليل الـ DNA الخاص بالنباتات المتكشفة والناتجة من زراعة الأنسجة ومقارنتها بالـ DNA الخاص بالنبات المصدر.

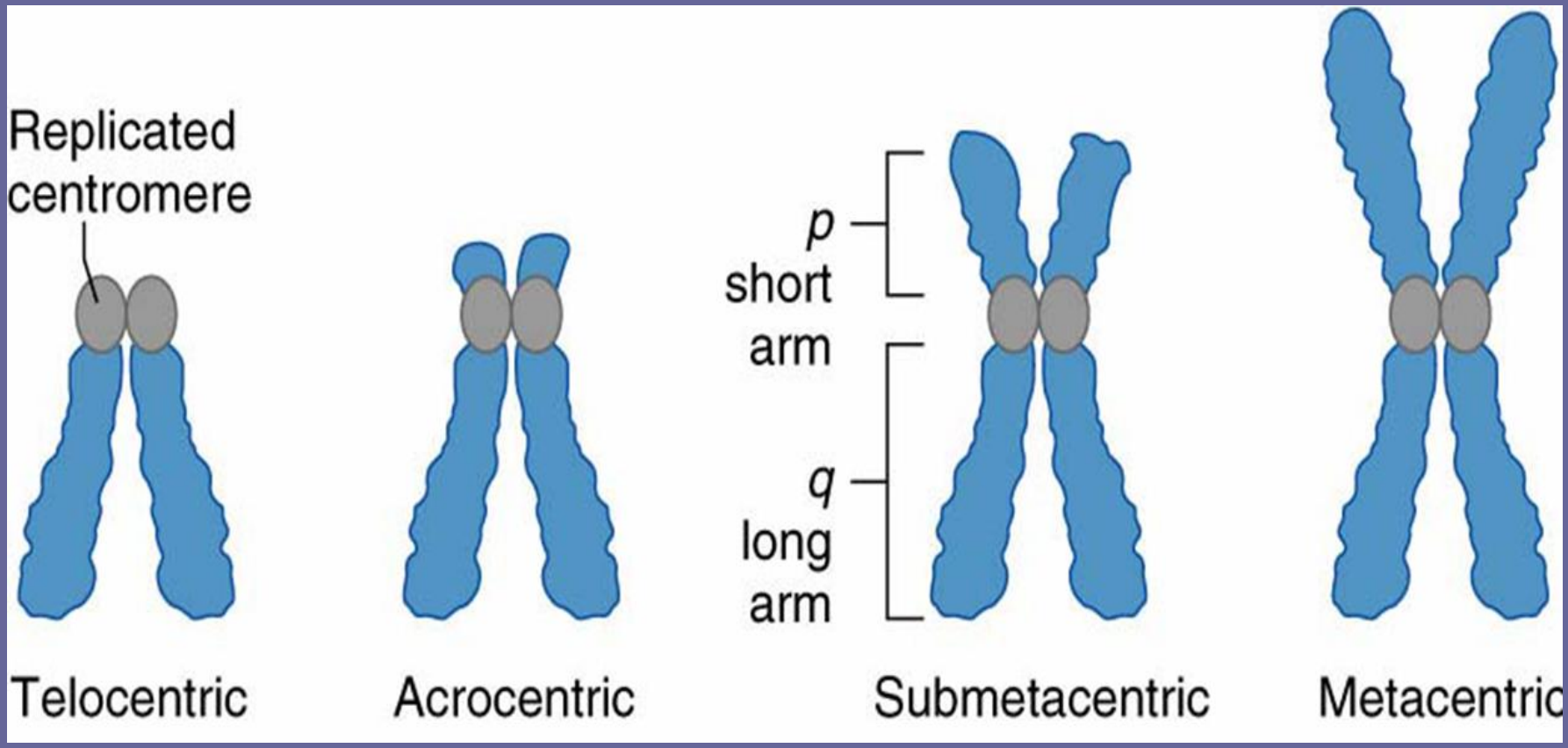
Cytological markers

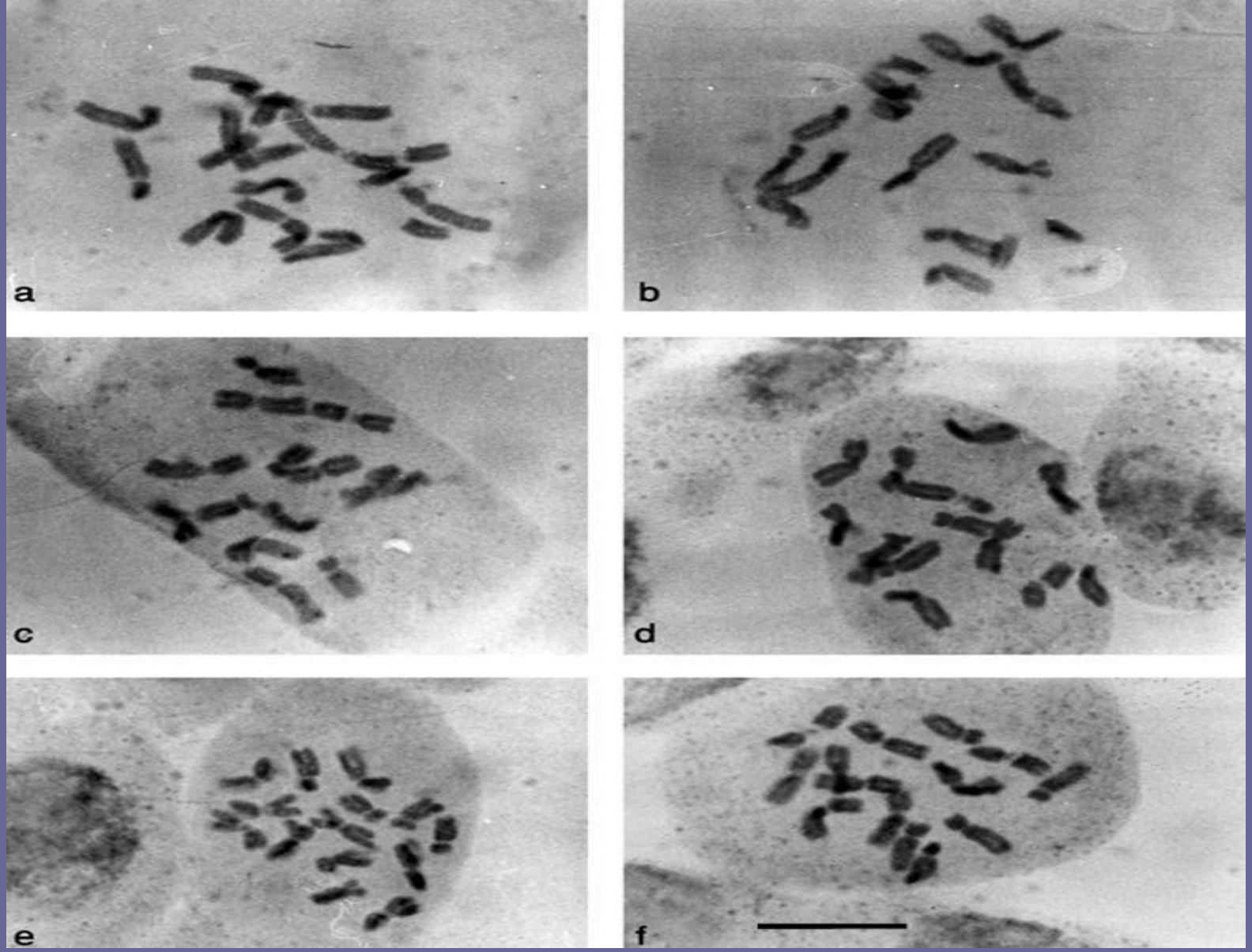
Depending on chromosome number, size, morphology and banding patterns.

- 2n= somatic chromosome number
- Centromere position and arm ratios can assist in identifying specific pairs of chromosomes

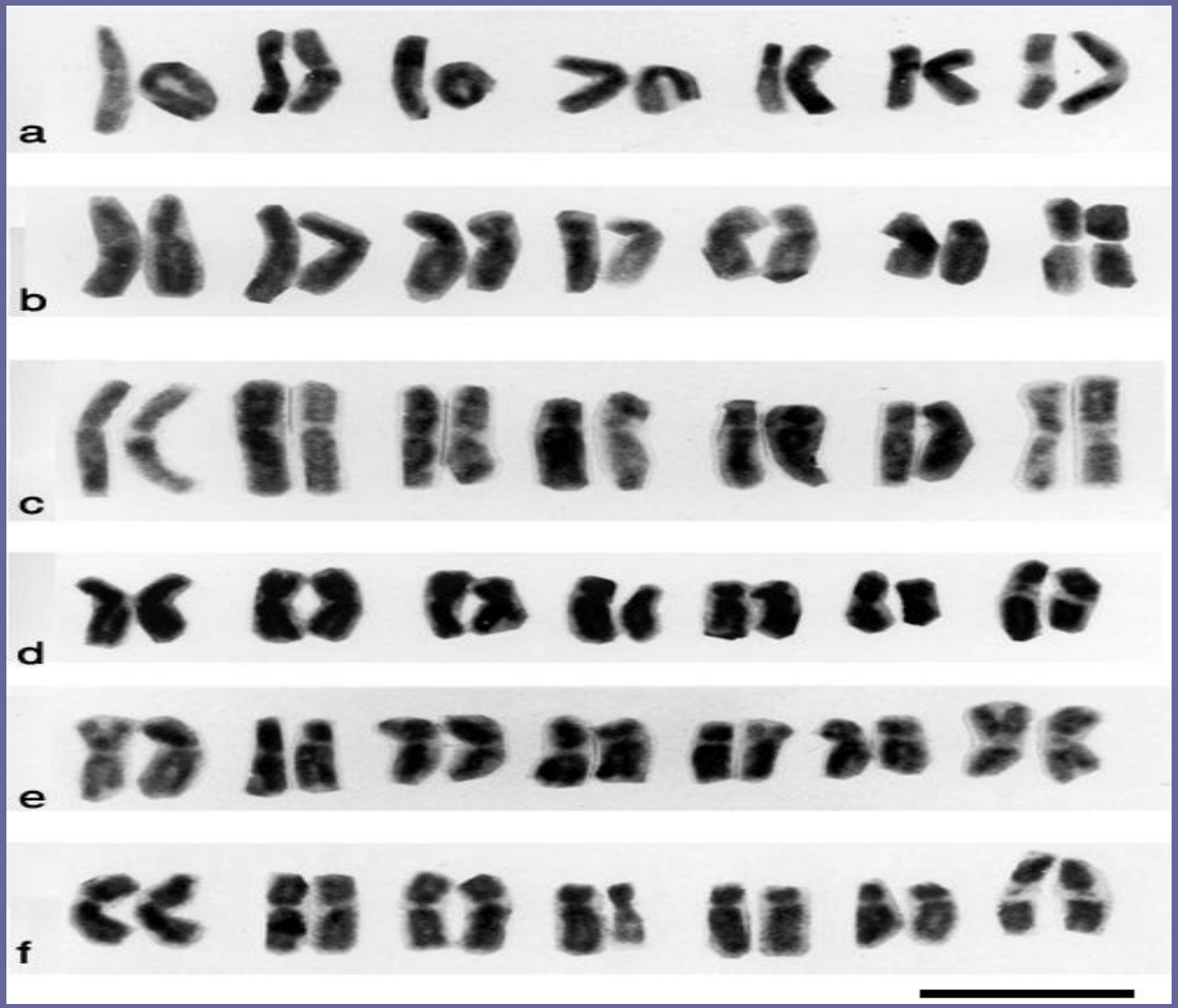


Chromosome types





- **Somatic metaphase Chromosome complement in six cultivars of Lentil**



- **Karyotype of six cultivar of Lentil.**

RFLP

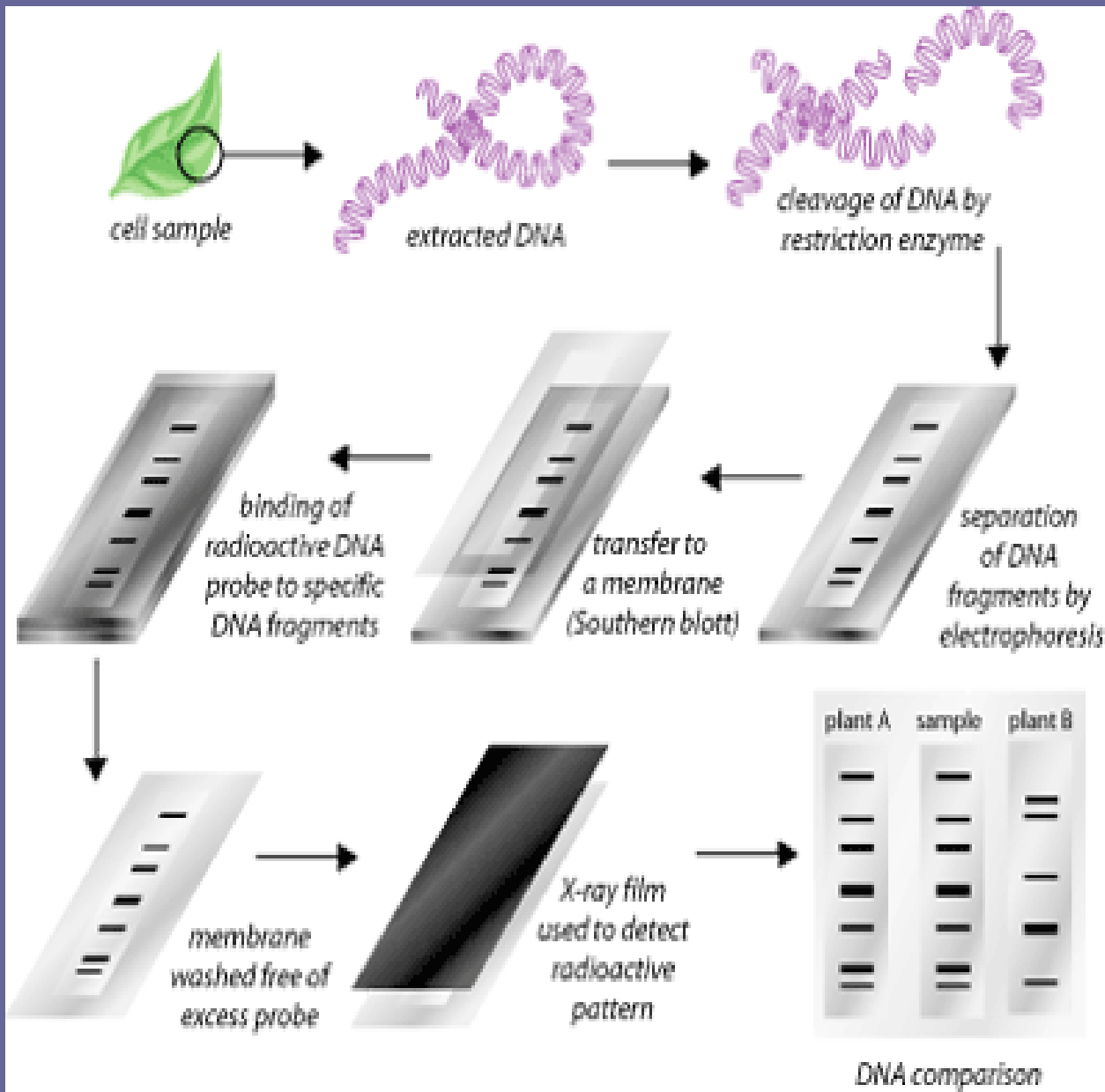
- **Restriction fragment length polymorphism.**

- It detects nucleotide substitution of DNA rearrangements like insertion or deletion of single nucleotide.

- Disadvantages:

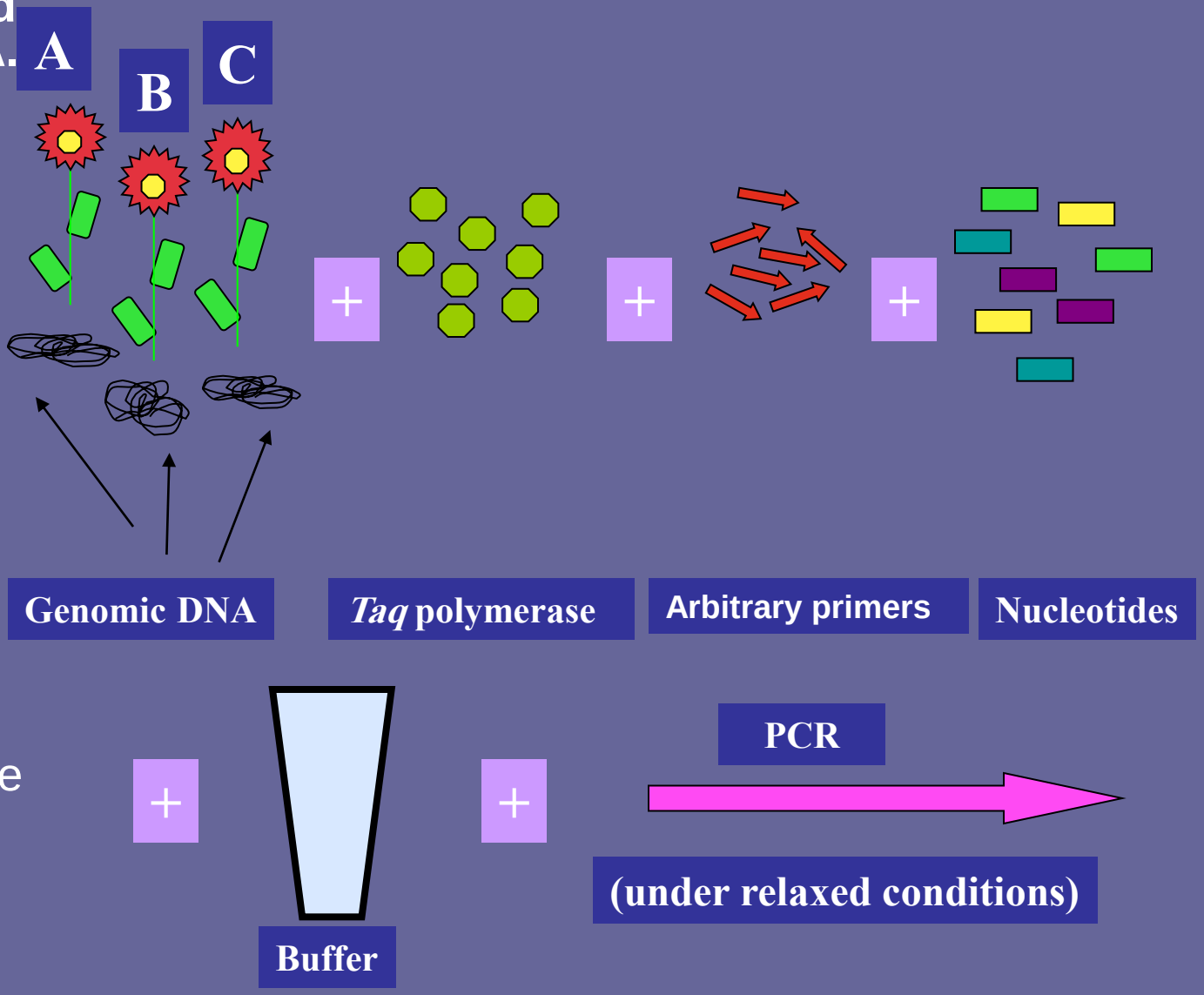
  - Requires large quantity of high quality genomic DNA.

  - It is time consuming and expensive.

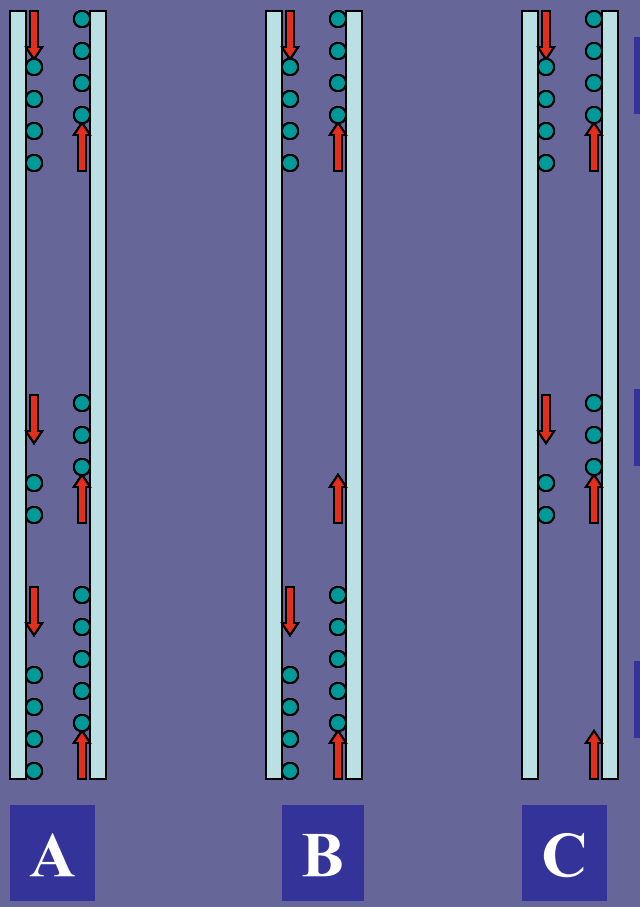


Arbitrarily primed PCR based marker
RAPD

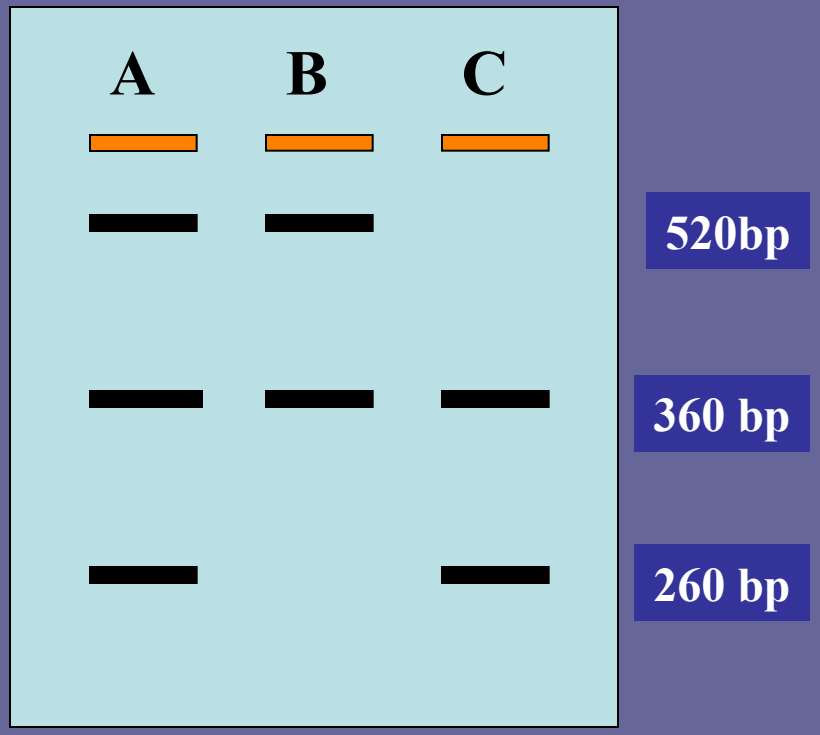
- **Random amplified polymorphic DNA.**
- It is the first PCR based molecular marker technique developed.
- **Advantages**
  - Fast, relatively inexpensive and highly variable
- **Disadvantages**
  - Cannot differentiate between heterozygous and homozygous sequence



PCR

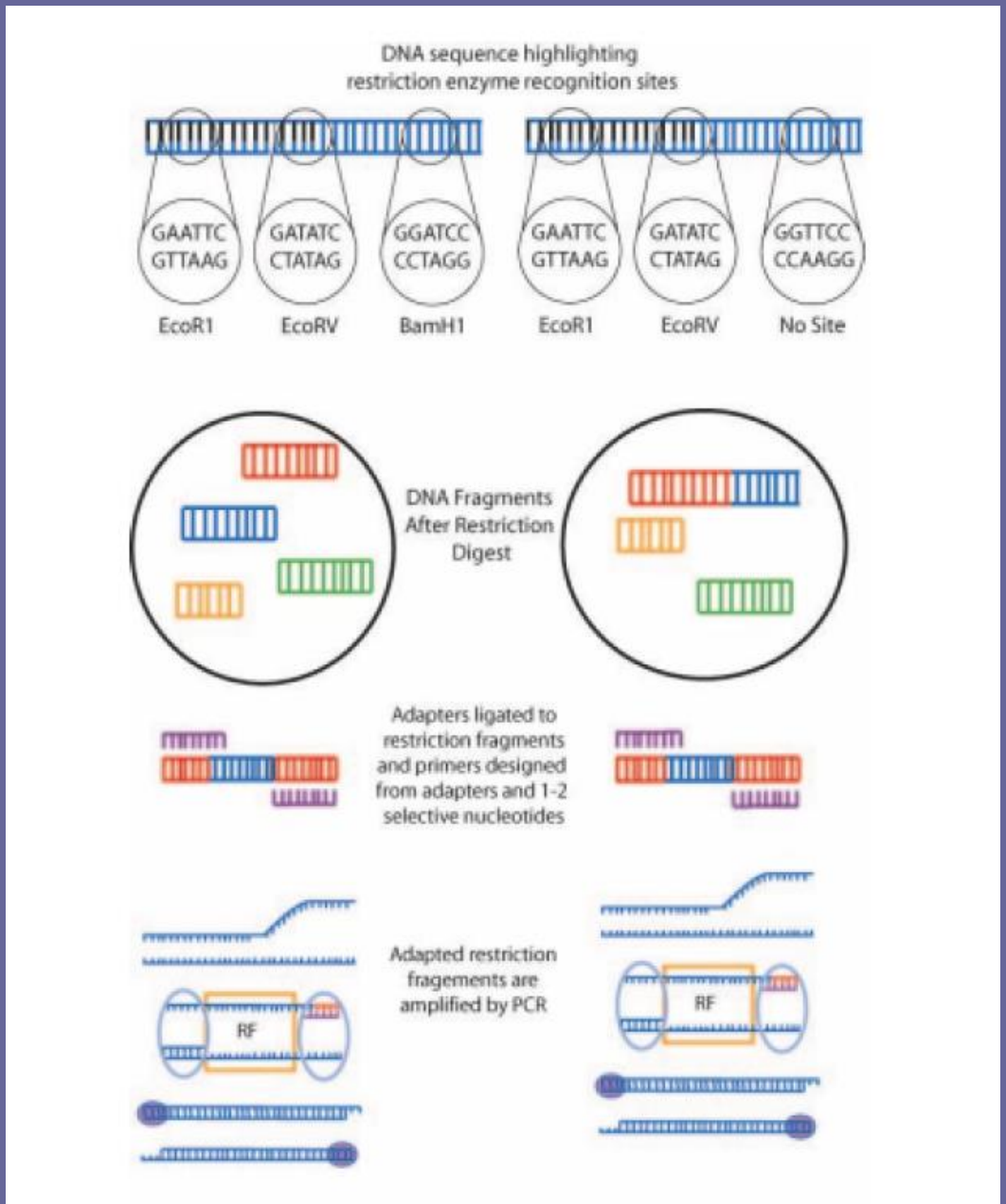


Electrophoresis



AFLP

- **Amplified fragment length polymorphism.**
- This method is used to overcome the limitation of reproducibility associated with RAPD.
- It is based on the combined concepts of RFLP and RAPD.
- Advantages: Fast, relatively inexpensive and highly variable.



الاختلافات الوراثية الناتجة من زراعة الأنسجة كتقنية لتحسين النبات:

عند معرفة إمكانية حدوث طفرات وتغيرات وراثية ناتجة من زراعة الخلايا والأنسجة النباتية معملياً فإن ذلك يقودنا إلي إحتمال الاستفادة من زراعة الأنسجة للحصول علي اختلافات وتنوع وراثي في أنواع النبات المختلفة واستخدامها كمصدر للإنتخاب واختيار بعض الصفات الهامة لتحسين المحاصيل. وكان من المعتقد أن إستراتيجية انتخاب النباتات الناتجة من مزارع الأنسجة المحتوية علي قدر من التنوع الوراثي بمثابة طريقة فعالة للحصول علي أنواع يمكنها تحمل الإجهادات البيئية مثل الحرارة والبرودة والجفاف والملوحة والمواد السامة أو أنها تكون قادرة علي مقاومة المسببات المرضية المختلفة.