المحاضرة التاسعة (تربية الطفرات)

المضامين الفسيلوجية والبايلوجية للجيل الاول الطفوري (M1)

التاثيرات السلبية في الM1

تعاني مجموعة الطفرة الأولى (M1) من اضطرابات فسيولوجية نتيجة للمعاملة بالمطفرات. وهذا هو السبب الرئيسي وراء عدم إمكانية إجراء الانتقاء المظهري للطفرة في جيل M1 بالإضافة إلى ذلك، فإن معظم الطفرات المستحثة تكون متنحية وبالتالي لا يمكن ملاحظة النمط الظاهري للطفرة حتى تصبح الطفرة متماثلة. علاوة على ذلك، فإن الطفرة المستحثة هي في الأصل حدث في خلية واحدة وليست موجودة في كل خلية من خلايا النبات وبالتالي، يجب اعتبار نباتات M1 نباتات كيميراس. التاثيرات المظهرية تتضمن تأخر النمو والعقم وموت نباتات M1. قد تكون الاضطرابات الفسيولوجية مرتبطة بتلف الكروموسومات و/أو خارج الكروموسومات، ولكن الفصل بين السببين غير ممكن عادة. وبغض النظر عن هذه التأثيرات، فإن الحالة العامة الضعيفة للنباتات M1 تعني عادةً أنه يجب زراعة العشيرة M1 في بيئات جيدة (خالية من الإجهاد) لتحقيق أقصى قدر من النمو والخصوبة وإنتاج الجيل التالي (M2). تعتمد جميع تأثيرات معاملة الطفرة على جرعات المطفرات المطبقة.

وفي تجارب الطفرات، يضع الضرر الفسيولوجي الناتج حدودًا عملية لزيادة الجرعة وفي الواقع يتم الوصول إلى نقطة النهاية بنسبة فتك 100 بالمائة للمادة المشعة و/أو عدم إنبات بذور M1. في حالة البذور، تم وصف اضطراب وعدم تنظيم مكونات البذرة والانبات أو طبقات البذرة وهور الثقوب في البادرة أو ضعف الانقسام أو حتى القضاء

التام على انقسام الخلايا كأسباب لفشل الإنبات بعد تشعيع جاما (Lokesha et al.، 1992). يؤثر تشعيع جاما للبذور أيضًا على معدلات بقاء النباتات عند النضج في علاقة تعتمد على الجرعة، وهذا ينطبق أيضًا بدرجة أقل على طفرات EMS (Mahamune and Kothekar، 2012). قد يحدث موت النبات في أي وقت بين بداية الإنبات والنضج؛ ومع ذلك، هناك مراحل حرجة أثناء نمو النبات تكون فيها التأثيرات المميتة أكثر وضوحًا، وغالبًا ما تكون نباتات M1 عقيمة بسبب الانحرافات في الانقسام الاختزالي أو حبوب اللقاح أو كيس الجنين أو نمو البذور (Micke and Wöhrmann، 1960). لذلك، عند الإبلاغ عن معدلات القتل أو نسب البقاء على قيد الحياة، من الضروري ملاحظة الوقت والمرحلة التي تم فيها جمع البيانات في تطور النبات. قد تختلف معدلات البقاء التي تم الحصول عليها في ظل ظروف المختبر بشكل كبير عن تلك التي لوحظت في الظروف الميدانية، وذلك بسبب احتمال حدوث ضغوط بيئية في المراحل الحرجة من تطور النبات.

على المستوى الكيميائي، يعد توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROSs) (البيروكسيدات) عاملاً رئيسياً مسؤولاً عن الاضطرابات الفسيولوجية بعد معاملات حث الطفرة. ROSs لها خصائص سامة وتسبب أكسدة الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة في الدهون (بيروكسيد الدهون) أو التعطيل التأكسدي لأنزيمات معينة وقد تسبب أيضًا ضررًا على الحمض النووي أو الحمض النووي الريبي (كما في الشكل التالي). بالإضافة إلى ذلك، قد تؤدي أنواع الأكسجين التفاعلية إلى تحفيز نسخ جينات معينة كاستجابة للضغط الناتج عن المعاملة. تتم مناقشة هذا حاليًا كأحد أسباب معدل الإنبات المحفز الذي يتم ملاحظته غالبًا عند جرعات تشعيع أقل (في حدود حوالي 10 إلى 50 غراي، اعتمادًا على النوع). كما تم وصف زيادة في تقسيم الصبغات، والكلوروفيل أ، والكلوروفيل ب، والكاروتينات، استجابة لزيادة جرعة التشعيع (ماركو، كريستيا ودارابان، 2013). يُطلق على التأثير المحفز لأشعة جاما على انقسام الخلايا ونموها وتطورها اسم "الهرمون". ومع ذلك، تجدر الإشارة إلى أن التأثيرات الهرمونية (تلك التي تتجاوز الأداء الطبيعي للضوابط او معاملة المقارنة غير المشعة) عادة ما تكون طفيفة وقصيرة

الأجل، ولا تسبب زيادات كبيرة في الإنتاج (Miller and Miller, 1987). مع زيادة الجرعات، تسود التأثيرات المثبطة والسامة لـ ROSs وكذلك التأثير المباشر للإشعاع المؤين على الحمض النووي وعلى تحفيز الهرمونات (Marcu، Cristea and Daraban، 2013).

يعتمد توليد ROS على محتوى الماء في الأنسجة المشعة؛ وهذا هو أحد أسباب تشعيع النباتات المستأصلة أو المواد المزروعة في الأنسجة بجرعات أقل بكثير مقارنة بالبذور (الجافة). يلعب المحتوى المائي للبذور في وقت التشعيع دورًا مهمًا فيما يتعلق بتأثير المطفر، ومن الممارسات العادية توحيد ذلك عن طريق وضع البذور في المجفف. كلما زاد محتوى الماء في البذور، زادت قابلية التعرض للإشعاعات المؤينة. ويمكن ملاحظة ذلك بوضوح في اختبارات الحساسية للإشعاع باستخدام البذور المعدلة لمستويات مختلفة من محتوى الماء. لذلك، من الضروري ضبط المحتوى المائي للبذور قبل حث الطفرة، عادة إلى حوالي 12-15 بالمائة .

بالنسبة لأي حث طفرة في تربية النباتات، ينبغي تطبيق مطفرة بجرعة معينة تؤدي إلى إصابة منخفضة للنبات، ولكنها تحفز تكرارًا عمليًا لحث الطفرة للصفات المستهدفة ذات الحمل الطفري (الخلفية) المنخفض. لذلك هناك حاجة إلى التوازن، والذي غالبًا ما يتم تحديده من خلال حجم M1 والمجموعات المتحولة اللاحقة التي يمكن للمربي التعامل معها. بالنسبة لأي معاملة مطفر، هناك علاقة، على سبيل المثال، في الحبوب بين ارتفاع بادرة M1 وبقائها على قيد الحياة من ناحية وتكرار طفرة M1 من ناحية أخرى، Gaul (1959) كما ورد في (Suresh et al., 2017).

يجب أن يكون التحديد الكمي لإصابة M1 واختبار الحساسية الراديوية من الإجراءات الروتينية في برامج تربية الطفرات. الطرق الأسهل والأكثر تطبيقًا بشكل روتيني لتقييم

إصابة M1 هي: 1) تحديد تردد الإنبات، و2) معدلات نمو البراعم و/أو الجذر في مرحلة نمو معينة للنبات (عادة في البادرات). يتم إجراء هذه الاختبارات عادة في المختبر أو في دفيئة. تشمل المعلمات التي يمكن قياسها ومقارنتها بالمكافحة (غير المعاملة) في ظل الظروف الميدانية و/أو المختبرية، الإنبات، وتكوين البادرات، والارتفاع، ونمو الجذر، ولون الأوراق، ووقت الإزهار، وإنتاج الزهور، ومجموعة البذور، والإنتاجية لكل نبات.

التأثيرات الخلوية

يمكن ملاحظة بعض تأثيرات المعاملة المطفرة على المستوى الخلوي ويمكن تحديد تواتر الانحرافات الكروموسومية في M1. بعد معاملة البذور، يقدم تحليل الدورة الانقسامية الأولى في البراعم أو الخلايا الجذرية اختبارًا سريعًا لتحديد تأثير المطفر وكما في الشكل التالي.

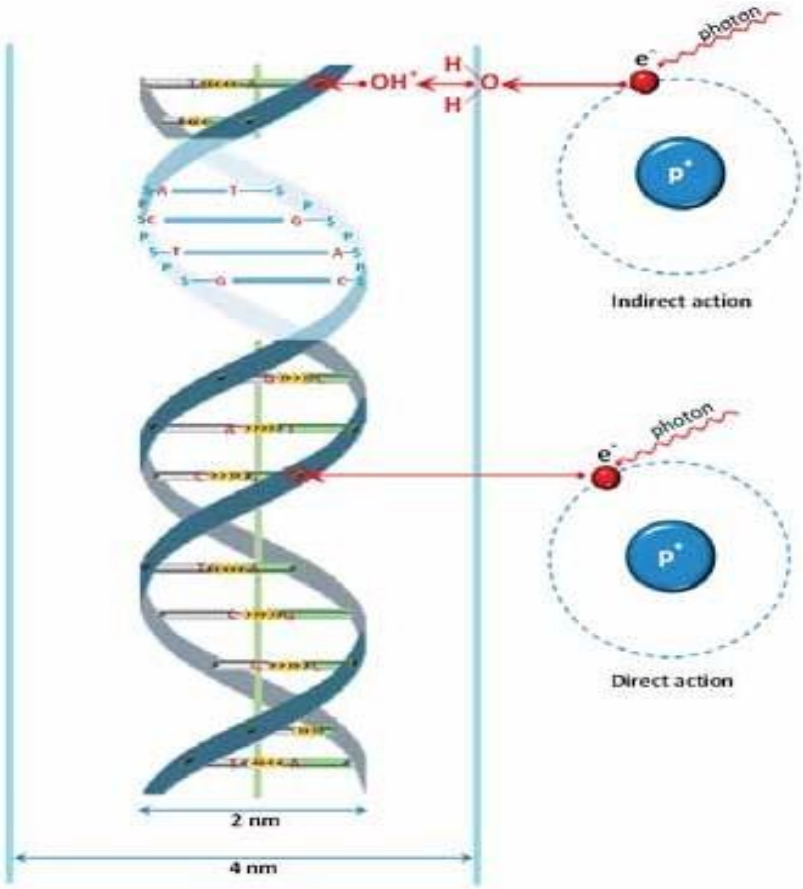

Figure 4.1. Direct and indirect action of gamma and X-rays on DNA. Top: reactive oxygen species (ROSs, here: hydoxyl radical) generated through ionizing radiation causing DNA strand breaks. Bottom: strand break is a direct effect of ionizing radiation on DNA.

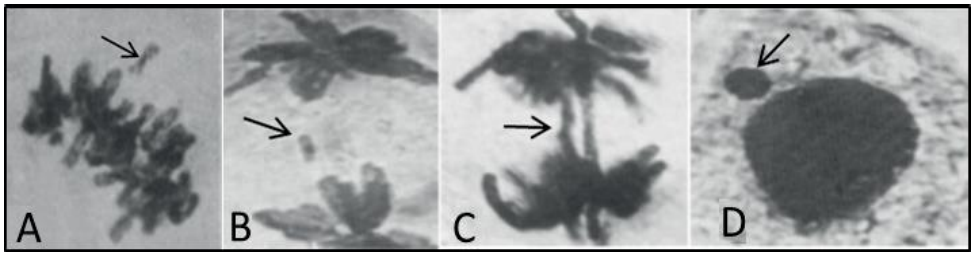

Figure 4.2. Chromosomal aberrations in onion Allium cepa L. induced by gamma irradiation. (A) Non- congression onto metaphase plate. (B) Laggards (C) Chromosome bridges. (D) Interphase with micro-nucleus. (Images are taken from Kumar et al., (2011) ; copyright © University of Florence, reprinted by permission of Taylor & Francis Ltd, www.tandfonline.com on behalf of University of Florence, Italy).

يعد هذا الاختبار أكثر صعوبة من قياس صفات البادرات، على سبيل المثال. تخفيض الارتفاع ومع ذلك، فهو يضيف معلومات إضافية وينبغي تطبيقه كلما تم إدخال معاملة مطفر جديد في برنامج التربية أو البحث. في العديد من المحاصيل، يتم استخدام جذور البادرات بشكل روتيني لدراسات الكروموسومات.

ملاحظات الكروموسوم

يمكن رؤية الانحرافات الكروموسومية في الأنسجة النشطة انقساميا (أطراف الجذور، الأوراق) للبادرات الصغيرة المشتقة من البذور المتحورة. في خلايا الطور الانفصالي، يتم ملاحظة جسور الكروموسومات والشظايا، وغالبًا ما تظهر المراحل البينية نوى صغيرة كتأثير للمعاملة.
غالبًا ما تؤخر المطفرات إنبات البذور المعاملة؛ قد تؤدي أيضًا إلى تأخير بداية انقسامات الخلايا وإبطاء الدورة الانقسامية. يجب أن تؤخذ هذه الحقيقة في الاعتبار عند معاملة أطراف الجذر أو البراعم وتثبيتها للفحص الخلوي. في الشعير تبدأ الانقسامات النووية في الجذور الجنينية.

فحص المذنب

يعد اختبار المذنب طريقة أنيقة لقياس درجة تكسر شريط الحمض النووي وبالتالي الانحرافات الكروموسومية بعد المعاملة بالطفرات. في الممارسة العملية، يتم إطلاق النوى من الأوراق الصغيرة عن طريق التقطيع بشفرة حلاقة في محلول Tris-HCl البارد. ثم يتم تضمين النوى على شرائح مغلفة بالاغاروز. عن طريق المعاملة بمحلول تحلل عالي الملوحة، تتم إزالة الأغشية والبلازما النووية، وتتعطل النيوكليوزومات

وتذوب الهستونات. تتعرض النيوكلويدات المتبقية ذات الحمض النووي فائق اللف بشكل سلبي إلى الرحلان الكهربائي. بعد التفريد وتلطيخ مع صبغة الفلورسنت، مثل بروميد إيثيديوم (EB) أو 4.6-ديميدينو-2-فينيليندولي (DAPI) يتم ملاحظة الشرائح تحت المجهر الفلوري باستخدام الإثارة فوق البنفسجية. يؤدي كسر الحمض النووي إلى فقدان اللف الفائق ويمكّن الحطام من الانتقال نحو القطب الموجب وبالتالي تشكيل بنية تشبه ذيل المذنب. وعلى النقيض من ذلك، فإن الحمض النووي فائق الالتفاف غير المتأثر لا يتحرك ويشكل رأس المذنب. هناك علاقة واضحة بين طول ذيل المذنب وتلف الحمض النووي والجرعة المطبقة لحث الطفرة. من المثير للاهتمام أن اختبار المذنب يسمح بمراقبة حركية إصلاح الحمض النووي عن طريق تحليل العينات المأخوذة في أوقات معينة بعد المعاملة. قام جيشنر وآخرون (2000) بتعريض بادرات التبغ للإشعاع بجرعات منخفضة من أشعة جاما (20 أو 40 غراي) وحددوا إصلاحًا كاملاً للحمض النووي بعد 24 ساعة. تعديل مثير للاهتمام للمقايسة هو تطبيق التهجين الفلورسنت في الموقع (المذنب-FISH). وهذا يسمح، بالإضافة إلى القياسات الكمية، بإجراء تقييم نوعي للكروموسومات

أظهر FISH وKwasniewska و2013) Kwasniewski) أن تسلسلات الحمض النووي التيلوميري موجودة بشكل متكرر في ذيل المذنب أكثر من تلك التيلوميرية، وهو ما يفسره العدد المختلف من الفواصل اللازمة لانحرافات الكروموسومات: استراحة واحدة للحذف في نهاية الكروموسوم، فترتان للحذف في المنطقة المركزية.

الشكل التالي يبين مقايسة المذنب – المبدأ (معدل للأنسجة النباتية، http://www.sigmaaldrich.com).

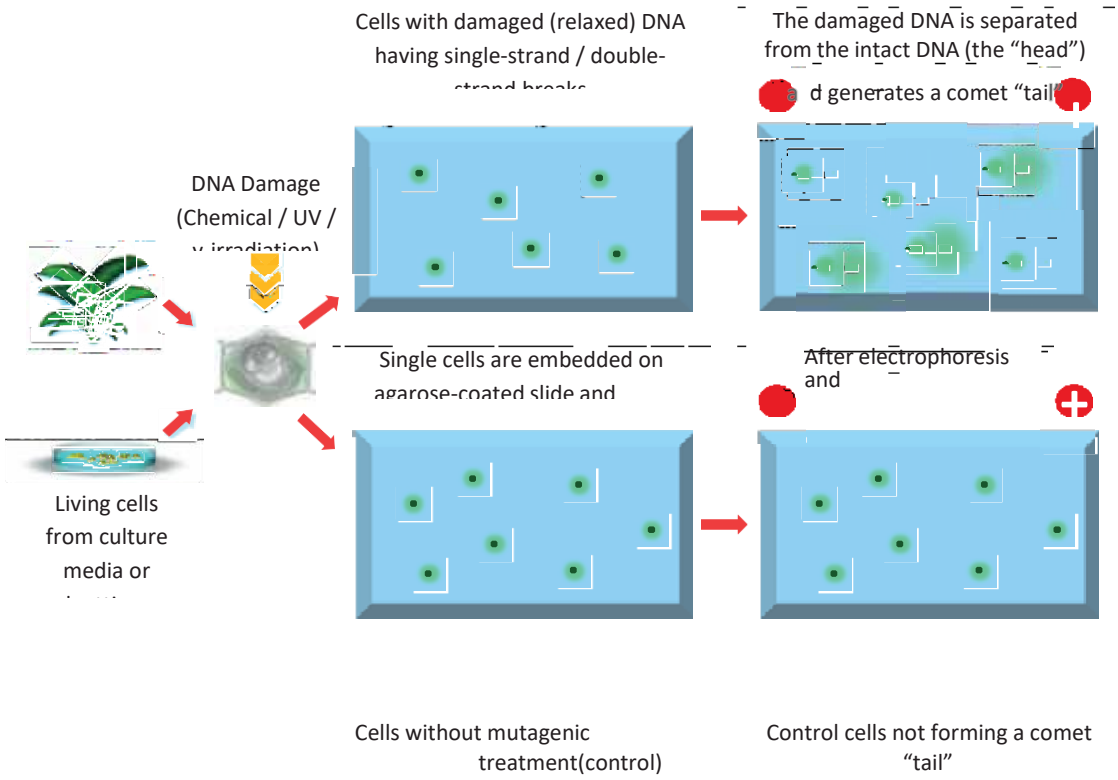

Figure 4.3. Comet assay – principle (modified for plant tissue, http://www.sigmaaldrich.com).

التحفيز بجرعة منخفضة

يؤدي التأثير التحفيزي للجرعة المنخفضة لأشعة جاما إلى زيادة النشاط الانقسامي، ولكن زيادة الجرعة تقلل أيضًا من انقسام الخلايا. على سبيل المثال، في تحليل تشوهات الكروموسومات في اللوبيا (بدر، الشاذلي وحلاوة، 2014؛ كوزغار وآخرون، 2014) في الطور الاستوائي، لوحظت أربعة أنواع من التشوهات المستحثة:

- تكوينات الطور الاستوائي، مع تثبيط كامل لتشكيل ألياف المغزل.
- التصاق الكروموسومات حيث تظهر الكروموسومات متجمعة معاً.

تكوينات الطور الاستوائي المضطربة و؛
• الخلايا متعددة الصيغ الكروموسومية، ولكن بشكل أقل.
في الطور الانفصالي-الطور النهائي، لوحظت جسور الكروموسومات والكروموسومات المتأخرة. المجموعة الكروموسومية لجذور الزنجبيل المشعة، قمر الدين وآخرون. (2016) لاحظ تكتل الكروموسومات في الطور الأول، والطور الاستوائي، والطور النهائي؛ وتم اكتشاف الكروموسومات اللزجة في الطور الانفصالي والطور الاستوائي.

آلتاثير في الانقسام الاختزالي

يعد الانقسام الاختزالي مرحلة حساسة في تطور النبات ويتأثر بالعوامل الوراثية والبيئية (Wijnker and de Jong، 2008). تعتبر السيطرة على الانقسام الاختزالي بمثابة "الركيزة الاساسية" لتربية النباتات ولكن نادرًا ما يتم تحقيقها في الظروف العملية باستثناء استخدام أبوميكسيس لإنتاج البذور (مثل حشائش العلف البراكياريا)، من خلال تقاطعات الجسور، وتعدد الصبغيات. تؤثر المعالجات المطفرة (الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية) على الاقتران وإعادة التركيب الكروموسومي الانتصافي، ويمكن أن تحفز عمليات نقل الكروموسوم في النباتات نتائج مرغوبة في بعض الأحيان (Puchta، Dujon and Hohn، 1996؛ Lagoda et al.، 2012). تم استخدام معاملات المطفرة التي تستهدف الانقسام الاختزالي للحث على إدخال قطعة الكروموسوم الغريبة في أنواع المحاصيل (Wang et al. في Shu et al.، 2012). على سبيل المثال، التشعيع عند الانقسام الاختزالي لمخزونات القمح المختلة الصيغة الكروموسومية التي تحمل كروموسومات إضافية من: 1) T. umbellulatum تحمل مقاومة للصدأ - تشعيع الأشعة السينية (Sears et al., 1956) و2) Leymus Racemosus يحمل مقاومة لفحة رأس الجرب - تشعيع جاما (تشن وآخرون، 2005)، تم استخدامها للحث على قطع الكروموسومات وتوفير الفرص للاتحادات مع الكروموسومات الأخرى في

إنشاء خطوط نقل القطع الغريبة للDNA. تسبب التشعيع في حدوث فواصل مزدوجة وأدت آلية الإصلاح إلى إعادة تركيب كروموسوم غير متماثل. للأسف، هناك أمثلة قليلة على المعاملات التشعيعية للتلاعب بالانقسام الاختزالي وإعادة التركيب؛ قد يكون هذا بسبب الحساسية الفائقة للانقسامات الاختزالية.

العقم

يشمل الحد من القدرة التكاثرية الناجم عن المطفرات ظواهر مختلفة ومصادر مختلفة. وتشمل هذه الظواهر: (1) التقزم الشديد أو تثبيط النمو مما يمنع الإزهار؛ (2) تتشكل الزهور ولكنها تفتقر إلى الهياكل التكاثرية (3) الهياكل التكاثرية موجودة ولكن حبوب اللقاح و/أو البويضات تُجهض؛ (4) يحدث الإخصاب ولكن الأجنة تُجهض قبل النضج؛ و/أو (5) بذور تتشكل ولكنها تفشل في الإنبات بشكل صحيح أو تموت بعد الإنبات. الأكثر شيوعًا هو حدوث الأمشاج غير الوظيفية نتيجة للانقسام الاختزالي الفاشل. قد يكون سبب العقم الناجم عن الطفرات (1) طفرات الكروموسوم، (2) طفرات الجينات (3) الطفرات السيتوبلازمية، و (4) التأثيرات الفسيولوجية.
ان الطفرات الكروموسومية ربما تكون الأصل الرئيسي لجميع العقم الناجم عن المطفرات. كما هو الحال مع الاضطرابات الفسيولوجية المستحثة، تضع مشكلات العقم حدودًا عملية لزيادة جرعات المعاملة.

بعد المعاملة الكيميائية (EMS) في نبات الأرابيدوبسيس، لوحظ أن تواتر الطفرة كان محدودًا بسبب العقم في نباتات M1، وليس بسبب زيادة فتك M1. تمت دراسة العديد من الطفرات بالتفصيل مع العيوب التي شملت مورفولوجيا المتك، وإنتاج السبورات البذرية الدقيقة، وتمايز حبوب اللقاح، وتفزر او سقوط المتك، مما أدى إلى عقم الذكور (ساندرز وآخرون، 1999). قدمت العديد من التقارير بيانات عن الجينات المشاركة في

العقم الناجم عن الطفرة لكل من حبوب اللقاح (الذكور) والبويضة (الأنثى)، (ساندرز وآخرون، 1999؛ روبنسون بيرز، برويت وجاسر، 1992). هذه مشكلة تتعلق بالتكاثر، لأنه على الرغم من أن مربو النباتات يريدون إنتاج عدد معقول من الخطوط التي تحمل الطفرة المرغوبة، إلا أنهم لا يريدون نسبة طفريًة واسعة القاعدة الوراثية اذ يتطلب الحمل الطفري إجراءات طويلة للتنظيف.

في حين أن العقم قد يكون مشكلة في تطوير السلالات الطافرة، إلا أنه يمكن استغلاله أيضًا، خاصة في إنتاج هجين F1. في سياق التربية الهجينة، فإن تطوير نباتات ذكرية معقمة (خطوط مؤنثة) أمر مرغوب فيه للغاية في الإنتاج التجاري للبذور الهجينة. وصف تشودري (1993) في مراجعة لخصوبة الذكور في النباتات العديد من الطفرات الذكورية العقيمة وخلص إلى أن العديد من الجينات تشارك في التحكم في خصوبة الذكور.

الكيميراس

في تعريف بسيط، النبات الكيميري هو نبات يتكون من خلايا تحتوي على أكثر من نمط وراثي واحد. في الفصول 2، 3، 5، 6 و 8 تتم مناقشة توليد وتحلل الكيميرا بالتفصيل. إن حدوث الطفرات بعد المعاملة بالطفرات له أهمية كبيرة لتنفيذ برنامج تربية الطفرات، وخاصة فيما يتعلق بالتعامل مع المجموعات المتحورة. الشكل التالي يبين النسيج النباتي لظاهرة الكيميراس.

الشكل( ). تنظيم طبقات الخلايا في اعلى القمة للنسيج الإنشائي

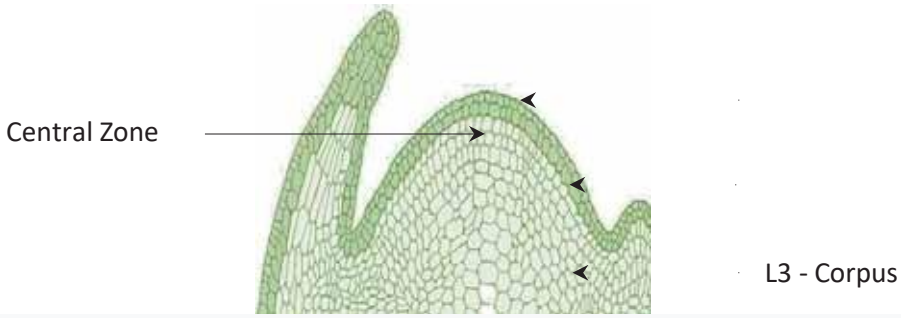

Figure 4.4. Organization of cell layers in the apical dome of a shoot meristem.

يتم تصنيف أنواع الكيميرا على نطاق واسع إما جسدية أو تكاثرية. المؤشر الأكثر وضوحًا للكايمرية الجسدية هو تلون الكلوروفيل في الأوراق ذات القطاعات الناقصة للكلوروفيل وتشكل خطوطًا طولية في أحاديات الفلقة وبقع غير منتظمة في ثنائيات الفلقة. يمكن أن تستمر نباتات الكيميرا في المحاصيل المتكاثرة خضريا (VPCs) ولكنها قد تذوب بسرعة في محاصيل البذور. ومع ذلك، حتى في محاصيل البذور، يمكن أن تنتقل الكائنات الكيميرية إلى الجيل التالي بتردد منخفض. يعتمد فصل الكيميرات في نباتات M2 على عدد الخلايا الأولية التي تؤدي إلى ظهور السلالة للسبورات التكاثرية (الخلايا الفعالة وراثيًا) وبالتالي تكوين الأمشاج، وكذلك على الطفرات المستحثة أو غير المحدثة في كل خلية على حدة.مربع النص التالي يوضح الكايميرا بصورة مختصرة.

Text box 4.1.

For barley it has been established that each of the main 4-5 spikes originate from 2-4 initial cells (Gaul, 1964). Ukai and Nakagawa in (Shu et al., 2012) presented an example of mutant segregation using the M1 spike method that was previously developed by Stadler (1928) and is based on separate harvests of M2 seeds from each spike of M1 plants. The segregation frequency of mutants in the M2 then appeared to depend on the number of initial cells that gave rise to a spike. In case of only one initial diploid mutated cell the segregation frequency in the M2 is equal to the segregation ratio of a recessive mutant (a'a'), namely 0.25. If in addition to the mutated cell, more cells are involved in the development of the spike, it will have a chimeric sector and the segregation frequency in the M2 will be lower than 0.25. The relationship between initial cells and segregation frequency can be described by the formula 0.25/k, with k being the number of initial cells. This means, in practical terms that with a higher number of initial mutant cells the chances of finding a homozygous recessive

mutant in the M2 becomes lower. It should be noted that mutagenic treatments can kill initial cells and that more than one initial cell can be mutated differently. In the latter case the breeder will obtain a larger number of M2 mutant plants with different characters. An additional influence on the segregation frequency is given by so-called diplontic- or haplontic selection, which refers to the competition among cells with different genotypes, specifically between mutated and non-mutated cells, either in the diplophase between somatic cells or the haplophase during gamete production and forming the zygotes (see Chapters 3,5, 6 and 8 for more information).

في المحاصيل المتكاثرة خضريا (VPCs)، يمكن أن تكون مسألة الكيمرات أكثر إشكالية لأنها تتطلب جهدًا كبيرًا للقضاء على الخيمرات والحصول على مادة نباتية متجانسة.

تنجم الكيميرات الموجودة في VPCs عن الطفرات المتولدة في النسيج الإنشائي القمي. تنتج الطبيعة المحددة للكيميرا من طفرات في النسيج الإنشائي القمي او الكالس المعروف بأنه منظم في هياكل ذات طبقات. الجزء القمي الخضري تحتوي على ثلاث طبقات متميزة من الخلايا، L1 وL2 وL3. الطبقة L1 هي الطبقة الوحيدة من الخلايا التي تشكل البشرة، والطبقة L2 هي طبقة تحت البشرة أحادية الخلية والتي تؤدي إلى ظهور خلايا الميزوفيل تحت البشرة في الأوراق والأمشاج وتشكل الطبقة L3 بقية الخلايا الداخلية بما في ذلك نظام الأوعية النباتية. يعتمد نوع الكيميرا على الطبقة التي تم إحداث الطفرة فيها. تسمى النباتات التي تحتوي على طبقة واحدة من الخلايا المتميزة وراثيًا عن طبقة أخرى بالكايميرات المحيطية. تعد الكيميرات المحيطة بالسريرية أكثر أنواع الكيميرات استقرارًا وتشتق من طفرة في خلية واحدة من الطبقة التي تشكل من خلال الانقسام المضاد للطفرة طبقة موحدة تحمل هذه الطفرة. في الكيميرا القطاعية، لا تنتشر الطفرة في طبقة واحدة، وتكون هذه الطفرات غير مستقرة وغالبًا ما تفقد الطفرة أو تتطور إلى كيميرات محيطية. تتميز الكيميرات القطاعية بقطاع متحور ينتشر على أكثر من طبقة واحدة. هذا النوع من الكيميرا غير مستقر وغالباً ما يتطور إلى براعم ليست كيميرا وقد تؤدي إلى أنواع متجانسة وراثياً. أحد فنون التكاثر الطفري للخلايا VPCs، مثل

موزة كافنديش ثلاثية الصيغة الكروموسومية، هو تفكك الكائنات الكيميرية بعد حث الطفرة، بهدف تطوير مستنسخات متجانسة يمكن فحصها بحثًا عن الصفة محل الاهتمام . (Roux et al., 2001a) اختبر طرقًا مختلفة لزراعة الأنسجة لتفكك الكيميرا في Musa acuminata ثنائي الصيغة الكروموسومية وثلاثي الصيغة الكروموسومية واستخدم السيتوكيمرات متعددة الصبغيات كنظام نموذجي للطفرات، والتي يمكن متابعتها بسهولة باستخدام قياس التدفق الخلوي. تم تطبيق ثلاث تقنيات مختلفة على ثلاث زراعات فرعية لكل منها (زراعة القمة النامية- ST، زراعة متعددة القمة- MA، وزراعة الدرنات- CS). انخفض متوسط النسبة المئوية للسيتوكايميرا من 100% إلى 36% باستخدام ST، ومن 100% إلى 24% عند التكاثر بتقنية CS، ومن 100% إلى 8% باستخدام تقنية multi-apexing.

في حالة القطاعات الخيمرية في نباتات الزينة البستانية ذات الطفرات الجذابة مثل لون الزهرة الجديدة أو شكلها، فيمكن عزل الأنسجة الطافرة وإخضاعها لتقنيات زراعة الأنسجة من أجل تجديد النباتات الحاملة للطفرة المواتية. وقد ظهر هذا على سبيل المثال من قبل (ماندال، تشاكرابارتي وداتا، 2000) الذين قاموا بتجديد أنسجة الزهرة القطاعية المتحولة من الأقحوان من خلال تكوين الأعضاء وبالتالي الحفاظ على الطفرة.

التأثيرات الثانوية: تنشيط الترانسبوزون

الغالبية العظمى من التباين الناجم عن جميع أشكال المطفرات هو فقدان وظيفة الجينات، وبالتالي فإن معظم الطفرات متنحية. في المقابل، يمكن أن تؤدي إدخالات العناصر القابلة للنقل (TE) إلى إنتاج نطاق أوسع بكثير من الأنماط الظاهرية (Lisch, 2013). تُسمى TEs أيضًا "الجينات القافزة" وهي عناصر متنقلة داخلية قادرة على التحرك وإدخال نفسها في مواقع مختلفة في الجينوم. ومن خلال القيام بذلك، غالبًا ما تنتج طفرات عند إعادة إدخالها في الجينات. على النقيض من المصادر الأخرى للتنوع الجيني، فإن إدخالات TE لديها القدرة على إحداث تحولات متشابهة في التعبير الجيني. هناك العديد من الأمثلة الموثقة جيدًا على المشاركة المباشرة لهذه المطفرات الذاتية في تدجين النباتات وتحسينها. الأهم من ذلك، أن العديد من هذه

الطفرات لم تكن لتنشأ عن طريق طفرات نقطية بسيطة أو عمليات الإدراج والحذف (INDELs). ويرجع ذلك إلى التسلسل التنظيمي الذي تحمله إدخالات TE، بالإضافة إلى التنظيم اللاجيني لـ TEs، والذي يمكن أن يغير تعبير الجينات المجاورة. وبالتالي، على الرغم من أنها تستطيع بالتأكيد إنشاء طفرات فارغة، إلا أن TEs لديها القدرة الإضافية على إنشاء طيف جديد من الطفرات التنظيمية.

الإجهاد، بما في ذلك التعرض للإشعاع يمكن أن ينشط TEs الصامتة (Bui and Grandbastien، 2012؛ Bradshaw and McEntee، 1989؛ Sacerdot et al.، 2005؛ Farkash et al.، 2006؛ Qüesta، Fina and Casati، 2013)، انظر أيضًا: (https://www.cospar-assembly.org/abstractcd/COSPAR-12/abstracts/F4.6-0009-12.pdf).

تم توثيق مشاركة TEs التي يتم تنشيطها بواسطة معالجات الشعاع الأيوني في حث طفرات الزهرة. في المختبر المشترك بين منظمة الأغذية والزراعة والوكالة الدولية للطاقة الذرية لتربية النباتات وعلم الوراثة، في سيبرسدورف، النمسا، أشار التحليل الجزيئي لنباتات الأرز المستمدة من اختبارات الحساسية الإشعاعية إلى أن العنصر الرجعي Tos17 قد تم تنشيطه عن طريق تشعيع بذور الأرز بأشعة جاما (نيلين، جوزمان وزاباتا-أرياس، 2000).). تشير هذه النتائج إلى أن TEs لها دور رئيسي في حث الطفرة، ولم تتحقق بعد الإمكانات الكاملة لاستغلال TEs في تربية الطفرات.

أمثلة على الطفرات التي يسببها TE في تربية النباتات

هناك عدد من النجاحات في الطفرة التي يسببها TE في تحسين المحاصيل. على سبيل المثال، يرجع انخفاض التفرع، المرتبط بتدجين الذرة من Teosintes، إلى إدخال عنصر محسن يحمله ناقل رجعي تم إدخاله في الجزء العلوي من الجين tb1). يرجع التعبير الحساس لدرجة الحرارة للصبغة الحمراء في البرتقال ذو اللون الدموي إلى العناصر التنظيمية المشفرة

بواسطة ناقل رجعي تم إدخاله في أعلى جين اللون (.Butelli et al، 2012)؛ وهذا يوفر طفرة مهيمنة مفيدة في اكتساب الوظيفة في الأنواع التي يتم نشرها عن طريق العقل أو عن طريق البذور المنزرعة. المثير للاهتمام، أن إعادة الترتيب الثانوية التي تترك وراءها جزءًا صغيرًا من العنصر القابل للنقل، تؤدي إلى تكثيف اللون الأحمر لثمرة البرتقال.

يؤدي ميل TEs لتعبئة تسلسلات الترميز عبر عمليات النقل الرجعية إلى تغيير في خصوصية الأنسجة في جين IQD12 في الطماطم (Solanum lycopersicum)، وهو المسؤول عن الشكل البيضاوي لمعظم الطماطم الحديثة (.Xiao et al، 2008). يرجع اللون الأبيض لتوت العنب (Vitis vinifera) أيضًا إلى إدخال ناقل ارتجاعي في اتجاه المنبع لجين مرتبط بـ Myb والذي ينظم عملية التخليق الحيوي للأنثوسيانين (كوباياشي وغوتو ياماموتو وهيروشيكا، 2004) والنمط الظاهري.
يتم عكسه جزئيًا فقط إلى لون التوت الوردي بعد إعادة التركيب الداخلي مما يترك LTR منفردًا في موقع الإدخال (Pelsy، 2010).
وبالتالي، يمكن أن تؤدي إدخالات TE إلى إجراء العديد من التغييرات التنظيمية الدقيقة التي يمكن أن تنتج صفات مفيدة لأغراض تربية النباتات. تم أيضًا الاشارة الى تغييرات تكيفية بوساطة إدخالات TE. إدخال retro transposon في فيتوكروم فول الصويا منح جين مستقبل الضوء GmphyA2 عدم حساسية الفترة الضوئية، مما ساهم في توسيع زراعة فول الصويا إلى خطوط العرض الأعلى في شرق آسيا (كانازاوا وآخرون، 2009). أيضًا ، تم إعادة تنشيط الجين المقاوم لمرض النقرة بشكل نسبي في صنف أرز مقاوم بسبب إدخال محفز جديد يوفره النقل الرجعي (Hayashi and Yoshida، 2009).
تم أيضًا ذكر عن العديد من الأمثلة على الطفرات التكيفية المماثلة الناتجة عن عمليات الإدراج المتكررة بما في ذلك طفرة زهرة الربيع الغريبة "خرطوم في خرطوم" (كما موضح في مربع النص). هذه مهمة لأنها تشير إلى أنه بدون وجود TEs ربما لم يتم استرداد هذه الطفرات. في خط قمح الخبز السداسي الصيغة الكروموسومية، يتم تنظيم جين Vrn3 للتنبيه بالارتباط مع الإدخال الأولي للناقل الرجعي، مما يسمح بالإزهار المبكر بعد معاملة الترقيع، وبالتالي يمنح عادة النمو الربيعي (Yan et al., 2006). في القمح القاسي رباعي الصيغة الكروموسومية، يتم التحكم في نفس النمط الظاهري عن طريق إدخال ناقل رجعي مختلف في جين Vrn1

المتماثل (Chu et al., 2011). تحمل الألومنيوم في القمح والذرة الرفيعة والشعير ينطوي على TEs. يرتبط تحمل الألومنيوم بالإدخالات الأولية لمختلف TEs التي تتوسط في التنظيم وإعادة التوجيه إلى قمة الجذر للتعبير عن جينات نقل السترات (Delhaize، Ma and Ryan، 2012).

هناك أدلة على أن TEs لا يمكنها الاستجابة للإجهاد فحسب، بل تمنح أيضًا القدرة على تحمل التوتر. على سبيل المثال، فإن إدخال العنصر الرجعي الذي يسبب تغير اللون في اللون البرتقالي الدموي يمنح أيضًا استجابة لدرجات الحرارة الباردة. وبالمثل، فإن إدخال العنصر المصغر القابل للتكرار المقلوب (MITE) في الأرز يمكن أن يمنح القدرة على تحمل الإجهاد البارد والملوحة (Naito et al., 2009). وينطبق الشيء نفسه على الأرجح على مجموعة واسعة من الضغوط الحيوية وغير الحيوية الأخرى، والتي لها أهمية في تكيف المحاصيل مع تغير البيئة.

عادةً ما يتم فحص TEs من خلال نظام متطور للتثبيط اللاجيني. أحد الجوانب الأكثر إثارة للاهتمام في استجابة TEs للتأكيد هو أنها يمكن أن تؤدي إلى عكس هذا الإسكات، مما يجعل TEs متاحة كمصدر للتنوع الجديد. Tos17، على سبيل المثال، هو عنصر رجعي في الأرز يتم إعادة تنشيطه بشكل عابر في زراعة الأنسجة وقد تم استخدامه لتوليد عشرات الآلاف من الأليلات الطافرة الجديدة (Piffanelli et al.، 2007). وبالمثل، تم إطلاق عنصر En/Spm في الذرة من السكون بسبب التعرض للإشعاع في الخمسينيات (بيترسون، 1991). تشير الدلائل الحديثة إلى أن الأشعة فوق البنفسجية - باء وربما تشعيع الحزمة الأيونية تؤدي أيضًا إلى تنشيط TE (Yan et al.، 2006؛ Huiru et al.، 2009؛ Ya et al.، 2011؛ Qüesta، Fina and Casati، 2013).

Text Box 4.2.

Other examples of TE-induced mutation include the much prized "hose-in- hose" (Figure 4.5) primrose flower phenotype, which shows a conversion of sepals to petals, resulting from changes in tissue-specificity of a MADS box gene that is associated with a gypsy

retrotransposon insertion in its promoter (Li et al., 2010), and the hose continuous flowering phenotype (blooming in all seasons) is caused by an intronic insertion that results in splicing failure of a gene controlling flower transition, a characteristic under photoperiodic and thermal control (Iwata et al., 2012). Recombination of the retrotransposon leaving a solo-LTR, restores normal splicing, but the resulting phenotype is not the wild-type phenotype (Spring blooming), but a climbing phenotype (occasionally re-blooming in Autumn).

Hose-in-hose Semi-revertant Revertant

Figure 4.5 Hose-in-hose mutant of primrose, Primula vulgaris

عد نشاط TE أقل ضررًا بكثير، في المتوسط، من الطفرات العشوائية لأنه تم اختيار TEs من خلال التطور لتقليل الآثار السلبية (Naito et al.، 2009). علاوة على ذلك، إذا كان من المعروف أن عائلة TE محددة تم تنشيطها في نوع معين، فسيتم وضع علامة على الطفرات الجديدة التي تسببها عائلة TE هذه، مما قد يجعل التحديد الجزيئي لسبب النمط الظاهري الجديد بسيطًا نسبيًا (مقارنة بسير الحمض النووي إلى نقطة ما). طفره). هناك ميزة إضافية محتملة للطفرات الناجمة عن الإشعاع المعزز TE وهي أن مستوى الإشعاع اللازم لتنشيط TEs قد يكون أقل بكثير من المستوى المطلوب لإنتاج أعداد كبيرة من الطفرات مباشرة من التعرض للإشعاع، وبالتالي تقليل الحمل الطفري كثافة الطفرات الناتجة. من المفترض أن يؤدي هذا إلى عدد أقل من عمليات إعادة ترتيب الكروموسومات الإجمالية التي يمكن أن تعيق، على سبيل المثال، تجارب التقديم اللاحقة. أخيرًا، يمكن استغلال TEs كعلامات DNA متعددة الأشكال في قياس دراسات التنوع البيولوجي والتنظيم الوراثي في تربية التراكيب الوراثية.