المحاضرة الثامنة للمقرر الدراسي تربية الطفرات النباتية

أ.م.د.داود سلمان مدب

المطفرات الكيمياوية وتاثيراتها وطرق استخدامها في النبات

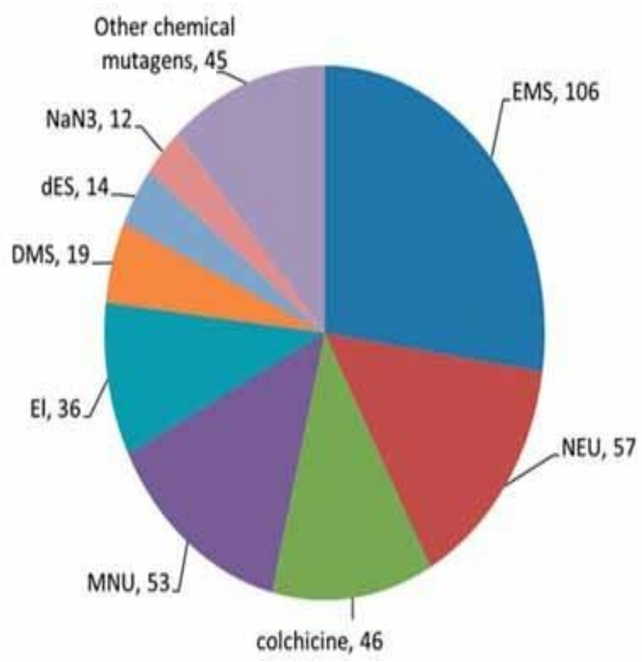
هذا الفصل يستعرض الموتاجينات الكيميائية المستخدمة بشكل شائع في النباتات مع الاهتمام الخاص بمحاليل الكيميائيية : الالكيلية ومركب الصوديوم ازايد، وهما المحاليل الكيميائيين الرئيسيين المستخدمين حاليًا في تحسين المحاصيل أو تحور النباتات التجريبية. يقدم هذا الفصل أيضًا إرشادات حول طرق التطبيق والمعايير المختلفة التي يمكن أن تؤثر على نتيجة تجربة تحور النباتات الكيميائية. يتم توفير المعلومات الأساسية حول الاعتبارات الصحية والسلامة لضمان الاستخدام الآمن لتحور النباتات الكيميائية. لقد حظيت تحور النباتات الكيميائية في الوراثة العكسية بنهضة منذ بداية الألفية الثانية بفضل الابتكارات التكنولوجية بما في ذلك تقنيات الجينات المحددة المستحثة في الجينومات (TILLING) ومؤخرًا تقنيات الجيل اللاحق لتسلسل الحمض النووي .(NGS) لقد أفضت هذه التقدمات إلى رؤى جديدة مهمة في آلية وطيف التحولات التي تسببها الكيماويات. تم تضمين أمثلة طيفية للمحاليل الكيميائيين الرئيسية والمحاصيل لمساعدة المربين و/أو الباحثين في تصميم تجارب تحور النباتات. على نحو مماثل، أتاحت التقدمات في زراعة أنسجة النبات في انابيب الاختيارات الجديدة لتوسيع تحور النباتات الكيميائية في الأنسجة الاختيارية. هذا مهم بشكل خاص للمحاصيل التي تنتشر عن طريق الانتشار اللاجنسي (VPCs) والتي تختلف عن المحاصيل السنوية المنتشرة من البذور في تربية التحورات النباتية. يتضمن الفصل بروتوكولات مفصلة لاستخدام تحور الإيثيل الميثانسلفونات (EMS)في النمو الأخضر النباتي (Musa acuminata) وبذور الشعير .(Hordeum vulgare) وكما موضح في الشكل اللاحق

المحاليل الكيلية

معروف أن المحاليل الكيلية تحور النباتات منذ عقود عديدة (إيرنبرج ، لوندكفيست وستروم ، 1958). إنها بلا شك الأكثر نجاحًا من وجهة نظر إنتاج سلالات متحورة جديدة بسبب فعاليتها وسهولة التعامل معها ، والأهم من ذلك العملية المناسبة للتخلص منها من خلال التحلل المائي البسيط. محاليل الكيلة مركبات تفقد الكترونات ذات مجموعة ألكيل واحدة أو أكثر ، يمكن نقلها إلى جزيئات بيولوجية مثل الحمض النووي الذي يحتوي على مجموعات نيوكليوتيدية. معظم محاليل الكيلة تنتج مواد وسطية تتفاعل مع الحمض النووي عن طريق التاصر مع مجموعات الفوسفات في أساس الفوسفودايستر وكذلك مجموعات الإيمينو أو الكربونيل الموجودة على قواعد البيورين (أدينين ، غوانين) أو البيريميدين (سيتوزين ، ثايمين).

محاليل الألكيلة يمكن تصنيفها إلى أنواع أحادية، ثنائية أو متعددة الوظائف، اعتمادًا على عدد مجموعات الألكيل الموجودة في المركب. محاليل الألكيلة الأكثر استخدامًا في تربية النباتات المتحورة هي ذات الوظيفة الواحدة. بين هؤلاء، يتم استخدام EMS و MNU و diepoxybutane بشكل متكرر قد تؤدي محاليل الألكيلة

ذات الوظيفة الثنائية إلى تكوين روابط متقاطعة لدنا-دنا بين جينات الدنا داخل الجينات مما يسبب تثبيط تكرار الدنا.



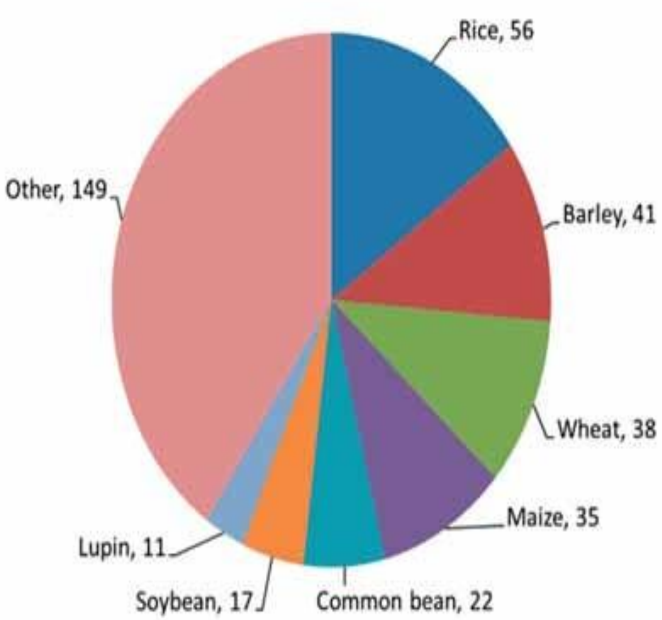


Figure a **Figure b**

Figure 2.1a. Chemical mutagens most frequently applied in generating mutant varieties. Among top agents are EMS (ethyl methanesulphonate), with 106 officially registered mutant varieties, NEU (nitrosoethyl urea) (57), MNU (N-methyl N-nitrosourea) (53), colchicine (46), and EI (ethylenimine) (36). Figure 2.1b. Officially released mutant crop varieties registered in the MVD produced via chemical mutagenesis.

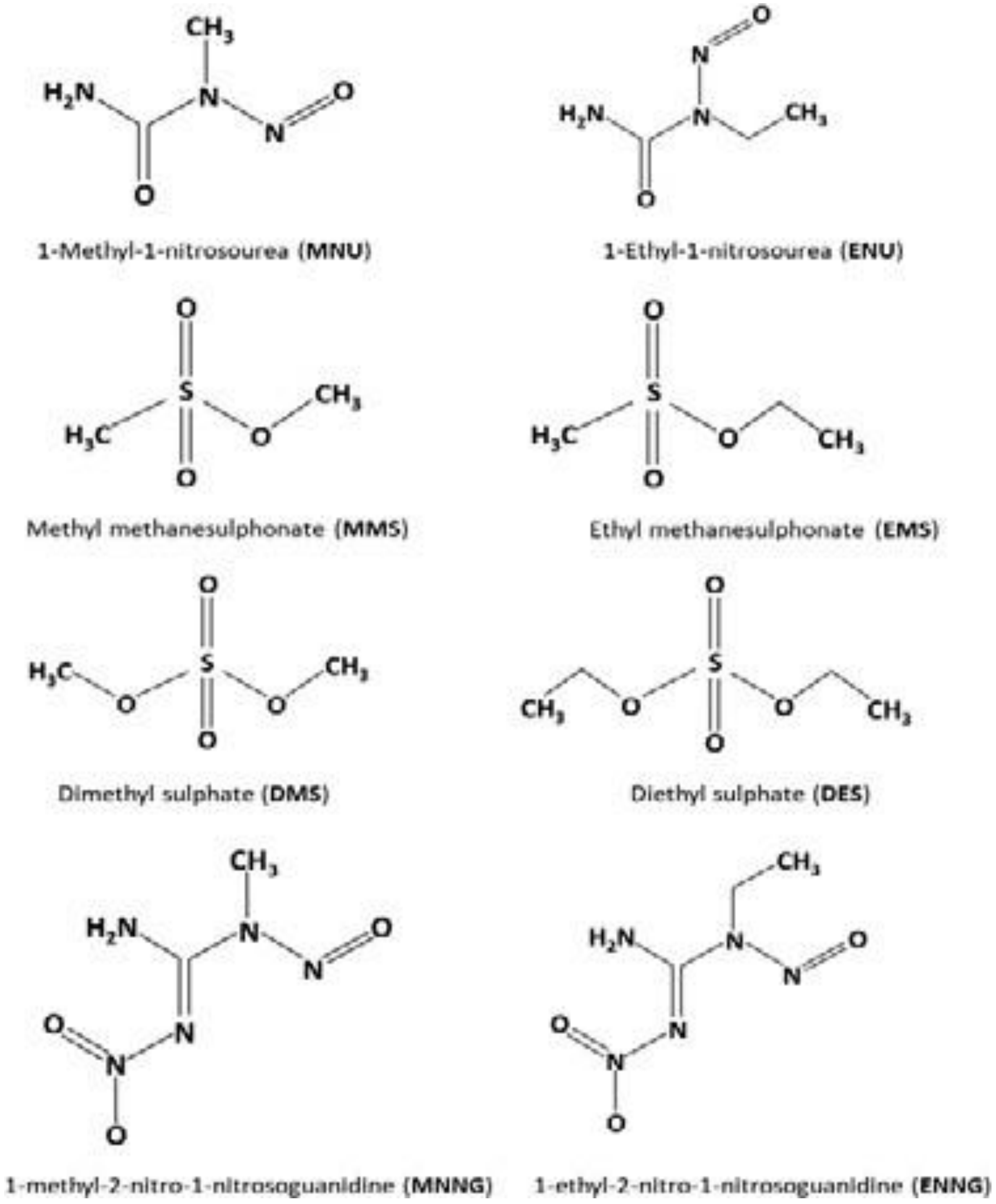


Figure 2.2. Molecular structure of alkylating agents commonly used in chemical mutagenesis of plants.

ازايد الصوديوم

الأزيد الصوديوم (NaN_3)؛ (SA) هو مركب لاعضوي سام للغاية وهو العامل المسبب للتحولات الوراثية الوحيد غير محاليل الألكيلة الذي تم استخدامه بشكل متكرر لتحسين المحاصيل العملية. يعتبر SA مثبطًا معروفًا لعمليات التنفس الخلوية في الخلايا الحية. وقد ثبت أنه مثيل فعال في العديد من أنواع المحاصيل مثل الشعير والأرز وفول الصويا والذرة ولكن ليس في أنواع النباتات الأخرى .

يعتبر أزيد الصوديوم أيضًا من العناصر المحفزة للطفرات حيث يتم استقلابه في الجسم الحي إلى مطفرات كيميائية قوية من خلال وسيط عضوي، تم تحديده في الشعير باسم L-azido-alanine. يبدو أن L-azido-alanine نفسه لا يتفاعل بشكل مباشر مع الحمض النووي، ولكن يتم التوسط في الطفرات من خلال العمليات الخلوية للنبات المضيف المشاركة في إصلاح استئصال الحمض النووي . بعض النتائج تشير عدم وجود تأثيرات مطفرة SA في بعض الأنواع النباتية مثل نبات الأرابيدوبسيس. ومن ثم، هناك حاجة إلى تجارب أولية لتقييم فعالية SA في أنواع نباتية جديدة قبل إجراء الطفرات على نطاق واسع. في النباتات، يؤثر SA على مسارات استقلابية متعددة موضحًا آثاره السامة للخلايا والفسيولوجية بالإضافة إلى آثاره المطفرة.

تمت دراسة التأثيرات المطفرة لـ SA على نطاق واسع في الشعير وكذلك في المحاصيل الأخرى، مثل الطماطم(Abdulrazaq and Ammar ، (.2015)، وأنواع الشوفان) Avena longiglumis خان، القريني وأنور، 2009)، والأرز حيث تم تطوير طرز عالية في محتوى الأميلوز المعزز .

يعتمد التأثير المطفر لـ SA بشكل كبير على حموضة محلول المعاملة .(Nilan et al., 1973) ينبغي تطبيقه عند درجة حموضة منخفضة (< 4)، على سبيل المثال. بالنسبة إلى طفرات الشعير، يتم إذابته في محلول فوسفات عند درجة حموضة 3.

المطفرات الكيميائية الأخرى

بالإضافة إلى العوامل المؤلكلة والأزيدات، وصفت الطبعة السابقة (الثانية) من دليل الوكالة الدولية للطاقة الذرية بشأن تربية الطفرات (الوكالة الدولية للطاقة الذرية، 1977) المجموعات التالية من المطفرات الكيميائية: (1) نظائرها الأساسية؛ (ب) المضادات الحيوية؛ (ثالثا) أكريدين؛ (رابعا) حمض النيتروز؛ و (ت) هيدروكسيلامين. وصف ليتاو (2012) الأكريدينات ضمن فئة أكثر عمومية من العوامل المقحمة مع مثبطات التوبويزوميراز والسموم. يعد استغلال هذه المطفرات الكيميائية لتحسين وراثة النبات أكثر تقييدًا مقارنة بالعوامل المؤلكلة والأزيد، لأنها إما أقل فعالية أو أقل دراسة أو أكثر صعوبة في التعامل معها من منظور الصحة أو السلامة. يعتبر الكولشيسين مادة كيميائية مطفرة بالمعنى الواسع، لأن تأثيره الرئيسي يكون على الصيغة الكروموسومية وليس على الجينات.

ترتبط نظائرها الأساسية ارتباطًا وثيقًا بقواعد الحمض النووي: الأدينين أو الجوانين أو السيتوزين أو الثايمين ويمكن دمجها في جزيء الحمض النووي دون إعاقة تكراره. ومع ذلك، نظرًا لأن هذه النظائر تختلف بمهارة، فقد يتم الاقتران الأساسي في بعض الأحيان ويمكن أن تحدث أخطاء أثناء تخليق الحمض النووي أو تكرار الحمض النووي. نظائرها الأكثر استخدامًا هي 5-برومو-يوراسيل (BU) و5-برومو-ديوكسيوريدين (BUdR)، وهي نظائر للثيمين والأدينين، على التوالي BU .قادر على إحداث طفرات في النباتات العليا لكن تكرار الطفرة يظل منخفضًا Handro) ، Gautam؛2014 ، Saxena and Kumar، .(2016بشكل عام، لم يتم اختبار نظائرها الأساسية على نطاق واسع كعوامل لتحفيز الطفرات في النباتات.

المضادات الحيوية

يتم تعريف المضادات الحيوية وظيفيًا على أنها ذات تأثيرات مضادة للميكروبات، ولكنها تشتمل من الناحية الهيكلية على مجموعة متنوعة جدًا من المركبات. تختلف المضادات الحيوية أيضًا فيما يتعلق بخصائصها السامة للخلايا أو المطفرة، والتي تمت دراستها بشكل أساسي في الأنظمة الميكروبية والحيوانية. على سبيل المثال، الستربتوزوسين (STZ) هو عامل مطفر قوي ومسرطن ويستخدم كعامل مضاد للأورام. تسبب STZ في المقام الأول طفرات نقطية بينما المضادات الحيوية الأخرى لها خصائص كسر الكروموسوم . Mitomycin C (MMC)هو مضاد حيوي طبيعي معزول عن MMC .*Streptomyces caespitosus* هو عامل ألكيلكي ثنائي الوظيفة يتفاعل مع بقايا الغوانوزين لتكوين روابط متقاطعة بين خيوط الحمض النووي.

كان استخدام المضادات الحيوية محدودًا في تربية الطفرات النباتية، فقد تم استخدام الستربتوميسين بنجاح للحث على عقم الذكور في العديد من أنواع النباتات بما في ذلك الأرز، والذرة الرفيعة، والدخن اللؤلؤي، وبنجر السكر، وعباد الشمس، مما أدى إلى الإطلاق الرسمي للعديد من الطفرات (هو جين تاو). وروتجر، 1991؛ جان وفيك، 2006؛ إلكونين وتسفيتوفا، 2008)

إقحام المحاليل

يمكن للعوامل المقحمة أن تقتحم بشكل عكسي مع الحمض النووي المزدوج الشريط، لكنها لا ترتبط به تساهميًا. تشتمل العوامل المقحمة الكلاسيكية على بروميد الإيثيديوم، 4'، 6- ديميدينو-2-فينيليندول (DAPI) والأكريدين التي تستخدم على نطاق واسع كأصباغ في الدراسات البيولوجية أو البيوكيميائية. الأكريدين ومشتقاته لها خصائص امتصاص الضوء، وتظهر تأثيرات سامة للخلايا ومطفرة. يمكن أن تتراوح التأثيرات المطفرة الناجمة عن الأكريدين من بدائل الزوج الأساسي إلى طفرات الازاحة او إلى فواصل الكروموسوم اعتمادًا على نوع الأكريدين المستخدم، وهي موضحة جيدًا في أنظمة بدائيات النواة والثدييات.

مع ذلك، نادرا ما تمت دراسة هذه المركبات في النباتات. تشمل التجارب الحديثة أنواع الزنجبيل البري (عائلة Zingiberaceae)ذات إمكانات الزينة. تمت مقارنة التأثيرات المطفرة للأكريدين مع المطفرات الكيميائية أو الفيزيائية الأخرى مثلEMS ، أو الكولشيسين، أو أشعة غاما أو الأشعة السينية. أظهرت الدراسات بوضوح التأثيرات المطفرة للأكريدين على نمو النبات وتطوره. على سبيل المثال، معاملة أنواع الزنجبيل البري

Larsenianthus Careyanus 1% أكريدين ينتج عنه تلون أبيض على الأوراق. إن القدرات المطفرة القوية لهذه المركبات، كما هو موضح في الخلايا بدائية النواة والثدييات، تستدعي إجراء مزيد من البحث في النباتات نظرًا لقدرتها على إحداث طفرات جديدة وفريدة من نوعها .

الكولشيسين.

الكولشيسين هو قلويد سام مشتق من نبات المرج: الكولشيكوم الخريفي (زعفران الخريف). يستخدم الكولشيسين على نطاق واسع في أعمال تربية النباتات لإحداث تغييرات في الصيغة الكروموسومية. عادةً ما يؤدي العدد المتزايد من الكروموسومات إلى حدوث تغييرات في شكل النبات ووظائفه. يمكن إجراء معاملات الكولشيسين للأنسجة أو الاجزاء المحتوية على المرستيم بعدة طرق باستخدام تركيزات تتراوح من 0.005% إلى 1.5% (van Harten, 1998). تتضمن الطرق الشائعة لمضاعفة الكروموسوم نقع البذور في محلول الكولشيسين، أو تطبيق الكولشيسين باستخدام فرشاة على قمم البراعم النامية، أو زراعة النباتات (في المختبر) في وسط يحتوي على الكولشيسين (Hamill, Smith and Dodd, 1992). أحد الاستخدامات الرئيسية للكولشيسين هو معاملة أحاديات الصيغة الكروموسومية لإنتاج أحاديات الصيغة الكروموسومية المضاعفة

والتي تكون متماثلة الزيجوت تمامًا، أي نقية وراثيًا. تتوفر أساليب عملية في إنتاج مضاعفة عدد الصبغيات في مجموعة واسعة من الأنواع النباتية.

طريقة العمل وأطياف الطفرة

يعتمد التأثير المطفر للمادة الكيميائية على الحمض النووي وكذلك على أي آليات الإصلاح للحمض النووي الموجودة في الخلايا النباتية المضيفة. لذلك، تلعب كل من خصائص المادة الكيميائية وعمليات إصلاح الحمض النووي المضيف دورًا مهمًا في تحديد الطفرات النهائية للمطفرات الكيميائية.

المحاليل المؤلكلة (الحاوية على الالكيل)

تم توثيق تكسر الحمض النووي وتأثيرات التكسير، أي تعطيل أو كسر الكروموسومات، الناجم عن عوامل الألكلة لأكثر من 80 عامًا(Auerbach and Robson ، 1946).حتى الآن، يتم تطبيق عوامل الألكلة على نطاق واسع للحث على تغييرات زوج أساسي قاعدي واحد لتغيير وظيفة البروتين أو بنيته.

يتم تعريف الألكلة على أنها نقل مجموعة ألكيل من جزيء إلى آخر. يمكن نقل مجموعة الألكيل على هيئة ألكيل كاربوكاتيون، أو جذر حر، أو أيون كربوني أو كاربين (أو ما يعادلها). تعتبر أمينات ثنائي إيثيل نيتروزو (مثل ثنائي إيثيل نيتروزو أمين) مركبات مستقرة، والتي يبدو أنها تعمل على الحمض النووي فقط بعد التنشيط الأنزيمي (إزالة مجموعة ألكيل واحدة).

أفاد لي وآخرون (2014) أن EMS يحفز الألكلة على الجوانين مما يؤدي إلى تحولاتGC> AT ، والتي يمكن أن تؤدي إلى طفرات نيوكليوتيدات مفردة. أظهرت مجموعات البيانات الناتجة من تجارب استهداف الآفات المحلية المستحثة في الجينوم (TILLING) في أكثر من 15 نوعًا نباتيًا أن EMS يتسبب في المقام الأول في تحولات GC إلى AT كما هو متوقع لألكلة الجوانين في موضع O 6

أظهرت العديد من الدراسات أن طفرات EMS يتم توزيعها بشكل عشوائي عبر الجينوم(Greene et al. ، 2003؛Till et al. ، 2003) .وفقًا لهؤلاء المؤلفين، فإن تجربة الطفرات السائبة التي تنتج مجموعة سكانية تتراوح من 3000 إلى 6000 سلالة تكون عادةً كافية لاستعادة أليلات متعددة في أي جين في حالة ثنائيات الصيغة الكروموسومية. أظهر التوصيف الشامل لطفرات الأرز المستحثة بواسطة EMS أن الطفرات المستحثة بواسطة EMS يستهدف على وجه التحديد بقايا الجوانين في سياق RGCG (R هو A أوG .

في حين أن كثافات الطفرات العالية التي تم تحقيقها في هذه الدراسات تمكن من استعادة المتغيرات الأليلية في أي جين، فإن هذا المطفر العالي قد يمثل تحديًا لدراسات الجينوم الوظيفية، وللتحسين العملي للمحاصيل.

أزيد الصوديوم

أزيد الصوديوم يستحث انحرافات الكروموسوم بمعدل منخفض للغاية. تمت دراسة نوع وعدد الطفرات الناجمة عن SA في الشعير (Talamè et al.‏2008 ، Kurowska et al.؛2011) ومؤخرًا أيضًا في الأرز . أظهرت هذه الدراسات أن SA هو عامل مطفر قوي لإحداث طفرات نقطية. في كل من الشعير والأرز، كانت التحولات من GC إلى AT هي نوع الطفرة السائدة. يبدو أن الطفرات الناجمة عن أزيد الصوديوم لها تحيز سياق تسلسل مختلف (GGR) مقارنةً بـ EMS. ، ولذلك، فإن الجمع بين المركبات المطفرة المختلفة قد يؤدي إلى توسيع نطاق الطفرات المستحثة والأنماط الظاهرية الطافرة الناتجة ويرد في الجدول التالي أنواع وكثافة الطفرات الناجمة عن المطفرات الكيميائية المختلفة بناءً على تحليل تسلسل الحمض النووي.

TABLE 2.1. SPECTRUM OF CHEMICALLY INDUCED POINT MUTATIONS IN DIFFERENTSEED-PROPAGATED SPECIES AND BANANA, A VPC

Species (common name), ploidy level	Mutagen	Mutation density (kb)	Transitions G/C > A/T (%)	Transitions A/T > G/C (%)	Trans-versions (%)	Reference
Arabidopsis thaliana, 2x	EMS	1/200	100	0	0	Greene *et al.*, 2003
Avena sativa (oat), 6x	EMS	1/24	94.4	0	5.6	Chawade *et al.*, 2010
Brassica rapa (field mustard), 2x	EMS	1/56 and 1/67	-	-	-	Stephenson *et al.*, 2010
Cucumis melo (melon), 2x	EMS	1/573	97.8	0	2.2	Dahmani-Mardas *et al.*, 2010
Glycine max (soybean), 4x	EMS (repeated)	1/74	84.3	-	23 to 47	Tsuda *et al.*, 2015
Hordeum vulgare (barley), 2x	EMS	1/500	n. a	n. a	n. a	Gottwald *et al.*, 2009
Hordeum vulgare (barley), 2x	EMS	1/1,000	70	10	20	(Caldwell *et al.*, 2004)
Musa acuminata (banana), 3x	EMS	1/57	100	0	0	Jankowicz-Cieslak *et al.*, 2012
Oryza sativa japonica (rice), 2x	EMS	1/147	88	-	-	Henry *et al.*, 2014
Solanum lycopersicum (tomato), 2x	EMS	-	-	-	55	Minoia *et al.*, 2010
Triticum aestivum (bread wheat), 6x	EMS	1/23.3 to 1/37.5	99.2	0	0.8	Dong *et al.*, 2009
Triticum durum (durum wheat), 4x	EMS	1/51	-	-	-	Uauy *et al.*, 2009
Triticum durum (durum wheat), 4x	EMS	1/50	-	-	-	Henry *et al.*, 2014
Glycine max (soybean), 4x	*Oryza sativa*	*japonica*	EMS orMNU 90	-	-	EMS and Cooper *et al.*, 2008

1/140 to 1/550 1/265 to (rice), 2x	70.4 to SA-MNU 66.7	Till *et al.*, 2007 1/294 0	29.6 to		33.3	
Oryza sativa (rice), 2x	MNU	1/135	92	-	-	Suzuki *et al.*, 2008a
Hordeum vulgare	MNU	1/504	23	33	37	Kurowska *et al.*, 2011
Hordeum vulgare (barley), 2x	SA	-	86	14	-	Olsen, Wang and von Wettstein, 1993
Hordeum vulgare	SA	1/374	95.5	-	4.5	Talamè *et al.*, 2008
Hordeum vulgare	SA-MNU	1/477	88	4.5	7.5	Szarejko *et al.*, 2017

ارشادات الطرق العملية للطفرات الكيميائية

يقدم هذا القسم إرشادات عامة للطفرات الكيميائية لكل من البذور والاجزاء الخضرية، بما في ذلك مزارع الخلايا المختبرية. هناك العديد من العوامل التي يمكن أن تؤثر على نتائج الطفرات الكيميائية بما في ذلك خصائص المادة النباتية المستهدفة، وجرعة المادة الكيميائية المطبقة، والخصائص الفيزيائية والكيميائية للمطفرة الكيميائية، وطبيعة المحلول المطفر (مثل الرقم الهيدروجيني)، والظروف البيئية للطفرات. المختبر (مثل درجة الحرارة) وكذلك ظروف النمو (الدفيئة، المشتل، الحقل، في المختبر، وما إلى ذلك) لبذور النباتات و/أو التكاثر قبل وبعد المعاملة المطفرة.

المواد النباتية المستهدفة

يعتمد اختيار المادة الأكثر ملاءمة على أهداف المعاملة المطفرة وأنواع النباتات. يتم وصف الأنواع المختلفة من الاجزاء النباتية أدناه، بما في ذلك البذور، والتي تسمى الاجزاء الخضرية "في الجسم الحي" والمستأصلات أو الأنسجة في المختبر. يعد المحتوى الجيني للمادة المستهدفة مثل تغاير الزيجوت أو مستوى الصيغة الكروموسومية أيضًا أحد الاعتبارات المهمة لدراسات الطفرات التطبيقية.

البذور هي الأنسجة المستهدفة الأكثر استخدامًا للطفرات الكيميائية. على سبيل المثال، يمكن بسهولة تخزين بذور الحبوب أو البقوليات وشحنها ومعالجتها بكميات كبيرة. على مدى العقود القليلة الماضية، تم إنشاء بروتوكولات موحدة لطفرات EMS للعديد من محاصيل البذور واستخدامها بشكل روتيني في مختلف المختبرات.

إن نقع البذور في محلول المطفر هو الطريقة الأكثر ملاءمة والأكثر استخدامًا، وبالتالي فإن الحبوب الصغيرة والبذور الأخرى التي تتشرب بسرعة تكون أهدافًا سهلة. قد تستجيب الأنواع والأصناف النباتية بشكل مختلف لمعاملة كيميائية معينة مطفرة.

وبالمثل، قد تختلف الظروف التجريبية الفعلية من مختبر إلى آخر. ولذلك، يوصى بشدة بإجراء تجارب الاستجابة للجرعة دائمًا لطفرات البذور للأنواع أو الأصناف الجديدة قبل إجراء تجربة طفرات واسعة النطاق. يتم وصف مثالين لبروتوكولات طفرات EMSوبروتوكول واحد لطفرات MNU وأزيد الصوديومSA (NaN_3)لبذور الشعير أدناه

تجدر الإشارة إلى أنه يمكن للمرء أيضًا معاملة الاجزاء الخضرية والنباتات المستأصلة في الجسم الحي، مثل الدرنات أو البصيلات أو الكورمات أو الحلقات النباتية أو العقل أو العقل الجذرية أو النباتات النامية أو البراعم أو المدادات. مع ذلك، فإن إجراءات معاملة هذه الاجزاء الخضرية أقل ثباتا مقارنة ببروتوكولات طفرات البذور، ويرجع ذلك أساسًا إلى التحديات التقنية المتعلقة بالامتصاص واختراق المادة الكيميائية في الأنسجة النباتية مما يؤدي إلى توزيع غير متساوٍ للمطفرة الكيميائية داخل النسيج الإنشائي المستهدف وبالتالي قد تفتقر هذه المعاملةات في الجسم الحي إلى إمكانية تكرار ظهور نفس النتائج. عندما تكون المادة المستهدفة صغيرة مثل القصاصات الصغيرة أو أطراف البراعم، فقد تكون التحديات التي تواجهها أقل.

أصبحت الاجزاء النباتية في انبوبة الاختبار حاليًا هدفًا مفيدًا للطفرات الكيميائية. قد توفر الأنظمة المختبرية العديد من المزايا مثل توفر ظروف أكثر توحيدًا وإمكانية منع أو تقييد تكوين الكيميرا (الطفرات الجسمية). على سبيل المثال، الطفرات الناجحة لـ EMS في النباتات المستأصلة لرؤوس براعم الموز(Jankowicz-Cieslak et al., 2012) ، وأنسجة الكالس من الأرز(Serrat et al., 2014) ، والقمح (Simonson, Baenziger et al., 1991)وقصب السكر (بورنامانينجسيه وهوتامي، 2016). تم استخلاص أنسجة الكالس من بذور البهيجراس المعاملة بأزيد الصوديوم تم تجديد مجموعة كبيرة من النباتات الطافرة المكونة من 19630 نباتًا من هذا الكالس عبر التولد الجنيني الجسدي وتم تحديد خط طفرة متفوق ذو سمات محسنة لاحقًا في تجارب ميدانية متعددة المواقع. عموما، توضح هذه الدراسات أن طفرات EMS يمكن أن تكون مثل

حالة البذور المطبقة على الاجزاء النباتية في انبوبة الاختبار لاستعادة المحاصيل الطافرة المتفوقة ذات الصفات المحسنة.

على حد علمنا، لم يتم تحديد تواتر وأنواع الطفرات المستحثة باستخدام مزارع الخلايا المختبرية إلا في حالات قليلة، على سبيل المثال. الموز والأرز. كانت أطياف الطفرة الجزيئية في المجموعات المستمدة من الاجزاء النباتية في انبوبة الاختبارفي هذه الدراسات متوافقة مع النتائج التي تم الحصول عليها من البذور المطفرة.EMS

يمكن تجديد مجموعة واسعة من النباتات من خلايا مفردة عن طريق زراعة الأنسجة في المختبر (انظر الفصل 8-أ). وهذا يوفر فرصة ممتازة للجمع بين بروتوكولات زراعة الأنسجة وتقنيات الطفرات كما هو الحال مع المعاملات الإشعاعية للخلايا VPCs، فإن تقنيات زراعة الأنسجة المناسبة سوف تسهل إلى حد كبير تجديد نبات متجانس كامل من خلية واحدة لتجنب تطور الكيميرا.

إن المادة النباتية المثالية للطفرات الكيميائية هي الخلايا أحادية الصيغة الكروموسومية، خاصة تلك التي يمكن معالجتها لإنتاج مضاعفة أحادية الصيغة الكروموسومية. تم وصف الطفرات الكيميائية لحبوب اللقاح على نطاق واسع بالنسبة للذرة.في الواقع، أصبح هذا هو الأسلوب المفضل للطفرات المستحثة كيميائيًا في الذرة لعدة عقود، ويرجع ذلك في المقام الأول إلى تجنب إنشاء نباتات خيالية قد تنقل أو لا تنقل الطفرات المستحثة إلى النسل.

الجرعة وتحديد الجرعة والحمل المطفر

المتغيران التجريبيان الأكثر استخدامًا لوصف الجرعة في سياق الطفرات الكيميائية هما تركيز المادة الكيميائية في المحلول المطفر ومدة المعاملة (الجرعة = التركيز × المدة)

من الناحية العملية، عندما لا يمكن العثور على الجرعة المثالية لمحصول معين (أو صنف)، أو الأنسجة المستهدفة، أو المطفرات الكيميائية في، يجب إنشاء منحنى الاستجابة للجرعة وهذا يعادل إجراء تجربة حساسية راديوية للطفرات الجسمية. يحدد منحنى الاستجابة للجرعة، والذي يسمى أيضًا "منحنى القتل" أو "اختبار السمية الكيميائية"، العلاقة بين معدل البقاء على قيد الحياة أو انخفاض نمو الاجزاء بعد المعاملة مع زيادة تركيزات المادة (المواد) الكيميائية المطفرة خلال فترات زمنية محددة.

في حالة البذور، يتم إجراء اختبار الشتلات حيث يمكن قياس إنبات البذور وبقاء الشتلات أو نموها بعد المعاملة المطفرة. بالنسبة للتكاثر الخضري كما هو الحال في قصاصات الجسم الحي أو في مزارع الخلايا المختبرية، يمكن اتباع طرق مماثلة لقياس نمو أو بقاء التكاثر. ويرد في القسم 2.5 مثال على منحنيات الاستجابة للجرعة لبراعم الموز وبذور الشعير في المختبر.

تجدر الإشارة إلى أن منحنى الاستجابة للجرعة في الطفرات الكيميائية قد يختلف بشكل كبير عن منحنى اختبارات الحساسية للإشعاع، ويرجع ذلك إلى خصوصية السمية الكيميائية على الخلايا ووفقاً لفان هارتن (1998)، فإن انخفاض النمو بنسبة 20-30 في المائة (والذي قد يتوافق مع معدل البقاء على قيد الحياة بنسبة 70-80 في المائة) قد يؤدي إلى إنتاج طفرة مثلى في محاصيل الحبوب. تعتبر مدة المعاملة أيضًا ذات صلة، حيث يجب أن تمكن الأنسجة النباتية من الامتصاص المناسب للمطفرة الكيميائية. في حالة البذور، يمكن تقصير المدة عند استخدام البذور المنقوعة مسبقًا (انظر أيضًا القسم 2.3.5). عادة، في تجربة الاستجابة للجرعة، سيتم تعريض البذور أو النباتات والاجزاء النباتية لتركيزات متزايدة من المطفر على مدى فترات مختلفة.

قد يؤدي حجم محلول المعاملة دورًا أيضًا: يجب أن يكون الحجم كبيرًا بما يكفي لمنح كل بذرة (أو تكاثر) فرصة امتصاص نفس الكمية من المطفرات. على سبيل المثال،

يوصى باستخدام 0.5 - 1 مل لكل بذرة في حالة الحبوب الصغيرة. لضمان تركيز موحد للمطفرة طوال فترة المعاملة مع رج المحلول بلطف بين مدة واخرى.

تؤثر درجة حرارة المحلول المطفر بشكل كبير على المعاملة، ويرجع ذلك أساسًا إلى تأثير درجة الحرارة على تفاعل المادة الكيميائية (انظر القسم 2.3.4). يوصي بعض المؤلفين بمعاملة قصيرة المدة تتراوح من 0.5 إلى 2 ساعة عند درجات حرارة حوالي 20 إلى 25 درجة مئوية للبذور التي تم نقعها مسبقًا لأوقات مختلفة في درجة حرارة الغرفة بالاضافة الى معاملة النبض الكهربائي. هذه الظروف تسهل امتصاص المطفر، وتزيد من النشاط الأيضي للبذور وتعزز التفاعل بين المادة الكيميائية والهدف الجيني. الجرعة المثالية تعتمد في النهاية على الهدف المنشود لتجربة الطفرات أو برنامج التربية. كما هو موضح في الجدول 2.1، فقد تم إنتاج مجموعات طافرة ذات كثافة عالية من الطفرات لإجراء دراسات وراثية عكسية على الحبوب والبقوليات الرئيسية.

في الواقع، في علم الوراثة العكسية، يتم تحديد تسلسل متغير ثم يشرع في تحديد تأثيره، إن وجد، على النمط الظاهري. لزيادة كفاءة هذه العملية، يصبح من الضروري إحداث حمل طفري عالي لكل سلالة لتقليل حجم السكان المتحولين المطلوبين. على سبيل المثال، في حالة القمح، يمكن للخطوط الطافرة المفردة أن تحمل، في المتوسط، عدة مئات الآلاف من الطفرات.

يمكن أن يكون لهذا التركيز المطفر العالي آثار كبيرة على التربية العملية للنباتات لأن هذه الطفرات قد تعطل النمط الجيني للتراكيب الابوية. من الناحية العملية، قد يفكر مربو النباتات في تطبيق جرعات أقل وزيادة حجم العشيرة الطافرة بشكل مماثل لطرق تنمية العشيرة الطافرة الموصوفة عند استخدام الطفرات الجسمية (انظر الفصول 1 و4 و6). عند محاولة تعديل خاصية واحدة أو اثنتين فقط، يوصى بجرعات تؤدي إلى انخفاض النمو بنسبة تقل عن 30 بالمائة في مشاريع تربية النباتات (Maluszynski et al., 2009).

يمكن الجمع بين المطفرات الكيميائية المختلفة لتوسيع نطاق الطفرة. ويرد في القسم مثال على المعاملة المشتركة لـ SA مع MNU لبذور الشعير وبالمثل، يمكن الجمع بين الطفرات الكيميائية ومعاملات الطفرات الفيزيائية لتوسيع نطاق الطفرة.

من الأفضل عادةً أن تتضمن البذور وكذلك التكاثر الخضري بتطبيق المعاملات أثناء وجودها في مرحلة النمو النشط. توجد طرق مختلفة لتحفيز أو تعزيز كفاءة توليد الطفرات الكيميائية في حالة عدم فعالية نقع البذور أو تكاثر النباتات، كما هو موضح أدناه.

أ. تم خدش بذور عشبة الباهيا، وتعقيم سطحها ومعالجتها بـ .SA بعد ذلك، تم تحفيز أنسجة الكالس في المختبر وتم تجديد النباتات عن طريق التطور الاجنة الجسمية لإنتاج ذرية متحولة في M2 .(Kannan et al., 2015)

ب. يمكن إجراء معاملة الإزهار (أو البرعم) عن طريق تغطية أجزاء النبات هذه بقطعة من الصوف القطني المنقوع في المادة الكيميائية(van Harten ، 1998).

ج. يمكن تطبيق المطفرة بتركيزات منخفضة على وسط النمو والسماح لها بدخول النبات من خلال الجذور. تقدم هذه الطريقة البسيطة المزايا عند دراسة التعرض للمطفرة ، أو لتحديد حساسية المراحل المختلفة من النمو والتطور للمطفرة الكيميائية.

د. يتضمن البروتوكول المستخدم بشكل متكرر لطفرات حبوب اللقاح EMS في الذرة استخدام زيت البارافين لتحضير مستحلب المطفرات وحبوب اللقاح وبالتالي تجنب تحلل حبوب اللقاح في المحاليل المائية(Weil and Monde ، 2009).

تشمل المواد النباتية الأقل ملاءمة للطفرات الكيميائية تلك التي لا تتشرب المحلول الكيميائي بسهولة؛ ويشمل ذلك الأنسجة الخشبية والبذور ذات القشرة السميكة (مثل المكسرات) وأجزاء النباتات الخاملة. ومع ذلك، يمكن استخدام معالجات مسبقة مختلفة لكسر حالة السكون أو لزيادة نفاذية الخلية وامتصاص المطفرة الكيميائية مثل الخدش أو الطرق المماثلة.

الخواص الفيزيائية والكيميائية للمطفرات الكيميائية والمحاليل المطفرة

خصائص المطفرات التي تحد من فعاليتها هي: (أ) قابليتها للذوبان،

)ب) السمية، و (ج) التفاعل الكيميائي. النطاق المفيد للتركيزات مقيد بقابلية ذوبان المطفر في محلول المعاملة بالإضافة إلى تأثيراته السامة على تكاثر النبات.

تختلف المطفرات بشكل كبير في سميتها. بشكل عام، عوامل الميثيل، على سبيل المثال . MMS، أكثر سمية من عوامل الإيثيل المقابلة لها، على سبيل المثال. إي إم إس. على الرغم من أن عوامل الميثيل هي أكثر طفرات من عوامل الميثيل، فإن كفاءة على سبيل المثال MMS أقل من EMS بسبب السمية العالية لـ MMS مما يؤدي إلى مستوى أعلى من الضرر لتكاثر النبات، والذي يؤدي بدوره إلى انخفاض معدل البقاء على قيد الحياة بعد معاملة المطفر.

تعتبر العوامل المؤلكلة عوامل تفاعلية للغاية وسوف تتحلل في محلول مائي وهذا يعني أنه يجب تحضير المحاليل طازجة وعدم تخزينها أبدًا. عادةً ما يؤدي التفاعل مع الماء إلى ظهور مركبات لم تعد مطفرة ولكنها قد تظل ضارة أو سامة بالنسبة للمشغل. بالنسبة لـEMS ، يكون تفاعل التحلل المائي كما يلي:

H3SO2OC2H5 + H2O CH3SO2OH + C2H5OH

إي إم إس ميثان إيثانول

حمض السلفونيك

عادة ما يتم قياس معدل التحلل المائي للمطفر الكيميائي بنصف عمره. بالنسبة لمركب معين، يعتمد عمر النصف على درجة الحرارة وأحيانًا على الرقم الهيدروجيني. على سبيل المثال، في حالة العوامل المؤلكلة، يتناقص معدل التحلل المائي مع انخفاض درجة الحرارة، وبالتالي، سيكون المغير مستقرًا لفترة أطول عند درجات حرارة أقل

درجة الحرارة، وضمان تفاعلها مع المراكز النووية الحاوية على الجينات. يعتبر الرقم الهيدروجيني مهمًا بشكل خاص لمشتقات الإيثيلينيمين والكبريت والنيتروجين وبعض مركبات النتروزو، والتي يجب دائمًا إذابتها في مخازن مؤقتة ذات درجة حموضة محددة جيدًا، وعادةً ما تكون أقل من 7.

من حيث التفاعل الكيميائي، تنتج سلفونات ألكيل ألكان وكبريتات ألكيل منتجات حمضية قوية عند التحلل المائي في المحلول المطفر، وكذلك داخل الخلية. لذلك، قد يحدث ضرر فسيولوجي كبير في المحاليل غير المخزنة وهذا يمكن أن يقلل من كفاءة الطفرات من خلال تقليل بقاء النبات M1. يمكن تقليل التأثيرات السلبية للتحلل المائي بشكل كبير عن طريق موازنة المحاليل بشكل صحيح مع المخازن المؤقتة. ومن ثم ينبغي مراقبة الرقم الهيدروجيني للمحلول قبل وبعد المعاملة

من المعروف أن DMSO ثنائي ميثيل سلفوكسيد يزيد من نفاذية الخلايا ويعزز الامتصاص من خلال الأغشية البيولوجية، وبالتالي، تم اختباره كحامل في الطفرات الكيميائية. وفي PBGL في مختبرات الزراعة والتكنولوجيا الحيوية المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة والوكالة الدولية للطاقة الذرية في سيبرسدورف، النمسا، يتم إجراء الطفرات في محلول DMSO بنسبة 2 في المائة لضمان إذابة نظام الإدارة البيئية. أظهر أمين ولاسكار وخان (2015) أن عمل المطفر الكيميائي MMS وحده وبالاشتراك مع DMSO يؤدي إلى اضطرابات فسيولوجية وكيميائية حيوية واستقلابية وجينية مما يؤدي إلى اختلافات بيولوجية مورفولوجية وكمية كبيرة في العدس (*Lens culinaris*) لكنهم أظهروا أيضًا تأثيرات معززة لـ DMSO على طفراتMMS.

إجراءات ما قبل وبعد المعاملة

بشكل عام، يؤدي النقع المسبق للبذور قبل معاملاتها بالطفرات إلى زيادة كفاءة تحفيز الطفرة عن طريق تنشيط العمليات الأيضية وتخليق الحمض النووي في الخلايا (الوكالة الدولية للطاقة الذرية، 1977). وبالتالي، فإن النقع المسبق للبذور أو البراعم يؤدي إلى الانتقال من حالة السكون إلى مرحلة التمثيل الغذائي. قد يؤدي النقع المسبق أيضًا إلى تسريع امتصاص المطفر عن طريق زيادة نفاذية غشاء الخلية. تحدث العديد من

التغييرات المهمة في البذور عندما يتم نقعها. وتعتمد هذه العوامل إلى حد ما على ظروف النقع (المدة، ودرجة الحرارة، ومحلول النقع) وعلى نوع البذور أو تكاثر النبات. ويمكن تقدير مدة نقع البذور في الماء تجريبيا. يجب أن تبقى البذور في المحلول طالما أنها تمتصه بشكل فعال. لتحسين مدة النقع المسبق، يمكن إجراء تجربة تجريبية حيث يتم وزن البذور المحتضنة كل ساعة لتحديد متى يصل وزنها المتزايد إلى مرحلة الاستقرار. يجب ألا يكون النقع المسبق أقصر من الوقت المقدر تجريبيا.

يمكن أن تؤثر أيضًا إجراءات التعامل مع ما بعد المعاملة وحتى بدء النمو على كفاءة المعاملة المطفرة. العوامل المهمة هي مدة ودرجة حرارة تخزين البذور المعاملة.

تخزين البذور المعاملة بالمطفرات (M1)

في الغالب يعزز الإصابة. ومع ذلك، يمكن تخزين البذور بعد غسلها وإعادة تجفيفها بسرعة عند درجة حرارة 0 درجة مئوية إلى 4 درجات مئوية لفترات طويلة دون تغيير التأثيرات المطفرة بشكل خطير، حيث أن الغسيل اللاحق يزيل بسرعة كلاً من المواد الكيميائية غير المتفاعلة ومنتجاتها الثانوية المحللة للماء. من البذور.

تم استخدام طرق مختلفة للغسيل و/أو التجفيف بعد المعاملة. يمكن ببساطة تجفيف البذور المعاملة والمغسولة بالهواء عن طريق وضعها على ورق نشاف. يمكن تقليل وقت التجفيف باستخدام مروحة كهربائية فوق البذور أو تحت غطاء دخان جيد التهوية. قد يكون التجفيف بدرجة حرارة مرتفعة مناسبًا أيضًا، ولكن في هذه الحالة يجب ألا تتجاوز درجة الحرارة المستخدمة 35 درجة مئوية ويجب عدم استخدام التسخين غير المتحكم فيه. يعد التجفيف بعد المعاملة أمرًا مرغوبًا فيه بشكل خاص من أجل التعامل والشحن المريح لبذور M1 المعاملة بالطفرات. مع معظم العوامل المؤلكلة، قد يحدث ضرر متزايد عند إعادة تجفيف البذور وتخزينها. يبدو أن هناك عدة عوامل مسؤولة عن الظواهر التي تمت ملاحظتها بما في ذلك: (1) معدل التحلل المائي للعامل المطفر؛ (2) الإجراءات الأنزيمية في النظام البيولوجي؛ (3) وامتصاص منتجات التحلل المائي الثانوية بواسطة البذور المعاملة أو النباتات المستأصلة. ولذلك يجب على العلماء والمربين أن يأخذوا في الاعتبار المتطلبات المحددة للمحصول المحدد وأن يخططوا

بعناية لأي أنشطة مختبرية أو دفيئة أو حقلية أخرى قبل البدء في برنامج تربية الطفرات باستخدام المطفرات الكيميائية.

مزايا وقيود الطفرات الكيميائية

لقد تم تلخيص مزايا وقيود الطفرات الكيميائية في الطفرات النباتية التجريبية أو تربية النباتات مسبقًا (van Harten، 1998). مع الأخذ في الاعتبار أحدث النتائج المتعلقة بالطفرات الكيميائية النباتية، يمكن تحديثها كما هو مذكور أدناه.

اهم المزايا:

•طيف طفرة يتميز بشكل جيد وينتج بشكل رئيسي طفرات نقطية.

•ضرر كروموسومي أقل بالمقارنة مع المطفرات الجسمية.

•ارتفاع وتيرة الطفرة يسمح بإنشاء تباين أليلي في أي جين مستهدف.

•يبدو أن الطفرات منتشرة بالتساوي عبر الجينوم بأكمله.

•بروتوكولات موحدة لمعاملة بذور المحاصيل الغذائية الرئيسية التي يتم إكثارها بالبذور.

•يمكن تطبيقه بالتساوي على الأنسجة المخبرية أو النباتات المستأصلة.

•يمكن تطبيق الطفرات EMS في بيئة مختبرية قياسية.

المحددات

•معدل طفرة كثيف، وهذا قد يتطلب عدة جولات من التهجين العكسي لإزالة الطفرات غير المرغوب فيها.

•غالباً ما يكون الاختراق في أنسجة النباتات الخشبية أو متعددة الخلايا صعباً أو ذو قابلية تكاثر منخفضة.

•المواد أو البذور الخاملة أو ذات فترات إنبات طويلة، على سبيل المثال. المكسرات، قد تتطلب معالجات مسبقة خاصة أو التلاعب.

• محدودية المطفرات الكيميائية ذات الخصائص الجيدة في إحداث الطفرات النباتية.

•قد لا يكون فعالاً في إحداث اختلافات صبغية كبيرة قابلة للتوريث.

•مخاوف تتعلق بالصحة والسلامة بسبب خصائصها السامة أو المسببة للسرطان.

إجراءات تخزين ومناولة وإزالة التلوث من المطفرات الكيميائية

معظم المواد المطفرة الكيميائية هي مواد مسرطنة محتملة، وبالتالي، يجب فهم قضايا الصحة والسلامة المناسبة والامتثال لها بشكل كامل والمتعلقة بتخزين ومناولة وتنظيف المواد الكيميائية المطفرة شائعة الاستخدام الموصوفة في هذا الفصل، أي EMS و MNUو.SA

يوصى بشدة أن يتم إجراء الطفرات الكيميائية بواسطة موظفين مدربين في مرافق متخصصة.

ينبغي للمرء دائمًا ممارسة إجراءات السلامة المعملية التالية.

ارتداء معدات الحماية الشخصية الصحيحة مثل القفازات، ونظارات السلامة، ومعاطف المختبر ذات الأكمام الطويلة.

•إجراء الطفرات الكيميائية تحت غطاء الدخان وظيفية لضمان التخلص من الأبخرة الكيميائية.

•قم بتخزين المواد الكيميائية في منطقة مخصصة مع وضع علامة المخاطر المناسبة والتهوية إذا لزم الأمر.

•راجع صحيفة بيانات سلامة المواد (MSDS) التي تعد عنصرًا مهمًا للسلامة والصحة المهنية والإشراف على المنتجات.

يمكن الحصول على معلومات إضافية حول السلامة والنشاط البيولوجي وخصائص المطفرات الكيميائية الأخرى من قاعدة بيانات Pubchem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/).

ألكان سلفونات الألكيل وكبريتات الألكيل (مثال شائع)

•ميثان سلفونات الإيثيل (EMS) الخواص الفيزيائية والكيميائية

•بشكل عام، السوائل، شديدة الذوبان في المذيبات العضوية، وقليلة الذوبان في الماء. يخضع للتحلل المائي الذي يشكل حمضًا قويًا مع معدل التحلل المائي الذي يعتمد إلى حد كبير على مجموعة الألكيل. تختلف تفاعلية العوامل المؤلكلة بشكل كبير ويتأثر ذلك بطبيعة محلول المطفرة أو وسط التفاعل.

التخزين

•قم بتخزينه في زجاجة صغيرة محكمة الغلق في الثلاجة، داخل حجرة محكمة الغلق تحتوي على مادة مجففة ومحمية من الضوء.

التنظيف

• في المختبر المشترك بين منظمة الأغذية والزراعة والوكالة الدولية للطاقة الذرية لتربية النباتات وعلم الوراثة، تتم إزالة التلوث من سطح العمل أو معدات المختبر أو الأواني الزجاجية التي لامست نظام الإدارة البيئية باستخدام محلول مخزون ثيوكبريتات الصوديوم 1 م المحضر حديثًا (Na2S2O3.10H20) المخفف إلى 100 ملم. . يجب توخي الحذر بشكل خاص عند الحاجة إلى ازالة كميات جرام أو أكثر من EMS أو MMS حيث يمكن أن تحدث تفاعلات عنيفة مع محاليل ثيوكبريتات الصوديوم. في هذه الحالة، يوصى بكميات كبيرة من محاليل البيكربونات المائية.

المخاطر الصحية

•إذا تم ابتلاع المادة المطفرة عن طريق الخطأ، قم بتحفيز القيء. شرب محلول ملحي أو محلول قلوي آخر. استعين بالطبيب ليقوم بفحص وظائف الكبد والكلى بعناية. يجب على الأشخاص الذين يعانون من أمراض الجهاز العصبي المركزي والكلى والكبد عدم العمل مع هذه المركبات.

مركبات النيتروسو

مثال شائع

•ن-ميثيل ن-نيتروسوريا (MNU) الخواص الفيزيائية والكيميائية

•بشكل عام، يوجد في الحالة الصلبة، وقابل للذوبان بدرجة عالية في المذيبات العضوية، ويعتمد تفاعله على الرقم الهيدروجيني للمحلول.

التخزين

•يخزن في وحدات صغيرة (50-100 جم) في الثلاجة. تجنب التعرض للحرارة أو الاحتكاك أو التأثير. خطر فوق درجة حرارة الغرفة ولذلك يجب أن يظل باردًا دائمًا.

التنظيف

•إذا انسكب المسحوق، بلل المسحوق وامسحه بعناية على صينية، ثم أفرغه في كيس بلاستيكي. إذا انسكب السائل، فامتصه بالورق أو الفيرميكوليت واغرفه في كيس بلاستيكي بإسفنجة مبللةبالماء ثم قم بإزالة التلوث بمحلول نترات الأمونيوم السيريك بنسبة 10 بالمائة.

التفاعلات

•يمكن لمركبات النيتروسو أن تخضع لتحلل حراري عنيف. ومن المعروف أن البخار فوق 200 درجة مئوية ينفجر.

•في وجود مادة نيتروسو القلوية، يتطور الجوانيدين الديازوميثين، والذي يمكن أن ينفجر حتى في درجات الحرارة المنخفضة في حالة وجود آثار للمواد العضوية.

المخاطر الصحية

•يمكن أن يؤدي التعرض لمركبات النيتروزو إلى تقرحات القرنية، والربو، والتهاب الجلد التماسي، وما إلى ذلك. وتشمل بعض الاختبارات التشخيصية ظلالاً نقيرية بارزة في الأشعة السينية على الصدر وتغيرات غير محددة في مخطط كهربية القلب.

الأمثلة الشائعة لمركب الأزايد

تشمل أزيد الصوديوم والبوتاسيوم بشكل رئيسي والخصائص الفيزيائية والكيميائية لهما هي كما يلي:

• يوجد بشكل رئيسي على شكل أملاح بلورية. أملاح الفلزات القلوية مستقرة نسبيًا، ولكن عند ملامستها للماء أو الأحماض تتحول بسهولة إلى حمض الهيدرازويك (HN3). الشكل الحمضي متطاير، ويغلي عند 36 درجة مئوية

التخزين

•يخزن على شكل أملاح فلزية قلوية بكميات صغيرة في عبوات زجاجية داخل الثلاجة عند درجة حرارة 4 درجات مئوية. لا تقم بتخزينها في مكان يمكن أن يؤدي فيه الانسكاب العرضي أو كسر الحاويات إلى اختلاط غير مقصود بالأحماض.

التنظيف

•قم بمسح أي انسكابات بالماء الزائد والصابون أو المنظفات. إذا كان الانسكاب في ظروف حمضية، قم أيضًا بتهوية المنطقة. ارتداء جهاز تنفس وقائي قائم بذاته.

المخاطر الصحية

•أزيد الصوديوم شديد السمية في جميع طرق التعرض، على سبيل المثال. تم تحديد LD50عن طريق الفم للجرذ عند 27 ملغم / كغم. حمض الهيدرازويك هو غاز سام ذو رائحة نفاذة.

الاحتياطات

•بالنسبة إلى طفرات البذور، يكون أزيد الصوديوم أكثر فعالية عند درجة الحموضة الحمضية وأثناء المعاملة يتم غلي المحاليل بالأكسجين أو الهواء. وفي ظل هذه الظروف، يتطاير HN3 بسهولة. ولذلك، ينبغي إجراء كافة المعاملات حصرا في غطاء دخان جيد التهوية.

أمثلة على إجراءات المعاملة

كما ذكرنا سابقًا، يمكن إجراء الطفرات الكيميائية في كل من النباتات التي يتم تكاثرها جنسيًا وكذلك في .VPCs يجب تحسين إجراءات المعاملة بناءً على المادة النباتية المختارة ونوع المطفر بالإضافة إلى أهداف تجربة الطفرات أو برنامج التربية.

يتم وصف ثلاثة إجراءات معاملة مفصلة للمحاصيل التي تتكاثر بالبذور والطفرات الكيميائيةVPCs ، والتي يمكن تكييفها مع المواقف التجريبية الأخرى هنا.

.بروتوكول لطفرات EMS للنسيج الإنشائي القمي لنبات الموز.(Musa acuminata)

2.إجراء معاملة طفرات بذور الشعير (Hordeum vulgare)باستخدام EMS.

3. إجراء علاجي فعال للطفرات المركبة لبذور الشعير باستخدام أزيد الصوديوم وN-نيتروزو-ن-ميثيل يوريا (NMU).

طفرات إيثيل ميثاني سلفونات (EMS) في نباتات مرستيم الموز في المختبر

فيما يلي وصف لإجراءات المعاملة، بصيغتها المعدلة والمقتبسة من-Jankowicz Cieslak and Till, (2016).

التحضير

إعداد عدد كبير بما فيه الكفاية من explants إطلاق النار في المختبر من الموز (على سبيل المثال 1000 للطفرات السائبة أو 50 لإنشاء منحنى الاستجابة للجرعة) لكل جرعة EMS (التركيز + المدة). حدد نباتات مستخرجة ذات حجم موحد وذات مظهر جيد وقم بتوزيعها في زجاجات معقمة ومن المهم أن نلاحظ أن جميع العناصر التي تتلامس مع الأنسجة في المختبر، بما في ذلك المغير، يجب أن يتم تعقيمها بشكل كاف

قبل بدء التجربة. ضع في اعتبارك منذ البداية أن ثلاث إلى أربع دورات من زراعات التكاثر الجزئي في المختبر ستكون مطلوبة لحل أي كائنات كيميرا. ونتيجة لذلك، فإن حجم العدد الأصلي سوف يزيد بشكل كبير خلال هذه العملية. ومع ذلك، قد تتم موازنة ذلك من خلال فقدان المواد التكاثرية بسبب الإصابات الناتجة عن المعاملة بالمطفر وبالتالي ينبغي النظر في الموارد والوقت والعمل وفقا لذلك قبل الشروع في أي تجربة للطفرات الكيميائية.

إنشاء منحنى الاستجابة للجرعة المستخدمة

في غياب معلومات موثوقة عن الجرعة المثلى لإجراء تجربة الطفرات، عادة ما يتم إنشاء منحنى الاستجابة للجرعة قبل إجراء الطفرات السائبة ومن المهم ملاحظة أن تواتر الطفرات المستحثة قد يكون مختلفًا في الأنماط الجينية المختلفة بسبب الاختلافات في الإجراءات التجريبية. في حالة أطراف براعم الموز، فإن المتغير التجريبي الذي يتم قياسه لتحديد الجرعة المثالية هو انخفاض الوزن الطازج بالنسبة لتركيزات EMS المختلفة وفترات الحضانة المختلفة.

يوضح الشكل 2.4 انخفاض النمو في أطراف براعم الموز في المختبر مع زيادة تركيزات .EMS وبناء على هذه النتائج، تم اختيار الجرعات المثلى لعلاج الطفرات السائبة. وقد تم تطبيق هذا البروتوكول بنجاح على الاجزاء النباتية الأخرى من الجاتروفا والبطاطس والكسافا، ويمكن تكييفه بشكل أكبر مع النباتات الاجزاء النباتيةالأخرى في المختبر مثل الكالس الجنيني، والقصاصات العقدية، والقصاصات في الجسم الحي، وما إلى ذلك.

معاملة الطفرات

إعداد الطازجة 1مولاري من محلول ثيوكبريتات الصوديوم وتمييع إلى 100 .MM سيتم استخدام هذا الحل لإلغاء تنشيط EMS وكذلك لإزالة التلوث من سطح العمل ومعدات المختبرات التي تلامست مع.EMS

حساب كميات EMS وDMSO اللازمة، والاستغناء عن الكميات المطلوبة من الماء المقطر والأوتوكلاف. دع السائل يبرد إلى درجة حرارة الغرفة. إضافة DMSO باستخدام طرف ماصة معقمة والحجم المطلوب من EMS باستخدام حقنة معقمة وغشاء التصفية. قم برج محلول EMS/DMSO بقوة لمدة 15 ثانية للحصول على الذوبان الأمثل.

صب خليط EMS في كل زجاجة تحتوي على المواد النباتية في المختبر لضمان غمر الأنسجة بالكامل في السائل.

احتضان في درجة حرارة الغرفة مع الرج ب 150 دورة في الدقيقة لمدة محددة مسبقا من الوقت. إذا لزم الأمر، اضبط سرعة الدوران بحيث تتحرك الأنسجة بلطف وبانتظام.

مرحلة ما بعد المعاملة

بعد الحضانة، املأ الزجاجات بالماء المعقم، واخلطها بلطف ثم صبها على الفور بعناية في كوب فارغ باستخدام منخل معقم لالتقاط أي مادة قد تسقط عن طريق الخطأ من الزجاجة.

من المهم تخفيف وإزالة أكبر قدر ممكن من محلول EMS مع الحفاظ على بيئة معقمة. ومع ذلك، يُنصح بترك كمية صغيرة من السائل في الزجاجة بدلاً من المخاطرة بسقوط المادة في الغربال وتلوثها. كرر خطوة الغسيل هذه أربع مرات. بعد الغسيل النهائي، صب الأنسجة في منخل معقم فوق كوب. لاحظ أنه على الرغم من غسل الأنسجة، قد تبقى رائحة قوية من .DMSO باستخدام ملقط معقم، قم بنقل الأنسجة إلى طبق بيتري الذي يحتوي على ماء معقم ثم قم بنقل مادة زراعة الأنسجة المغسولة بعناية إلى وسط

النمو. احتضان المواد المتحولة باتباع الإجراءات القياسية الموضوعة للمحصول الذي تم التحقيق فيه. في اليوم التالي، انقل جميع النباتات المعاملة إلى وسط نمو جديد لإزالة أي بقايا من DMSO. وينبغي مراقبة نمو الأنسجة بانتظام.

امسح غطاء التدفق الصفحي بمنشفة ورقية مبللة مبللة بثيوكبريتات الصوديوم متبوعة بشطف الماء لضمان عدم وجود أي أثر متبقي لتلوث EMS في منطقة العمل. قم أيضًا بتطهير جميع معدات المختبرات التي تلامست مع.EMS

الصور التالية توضح الشرح السابق

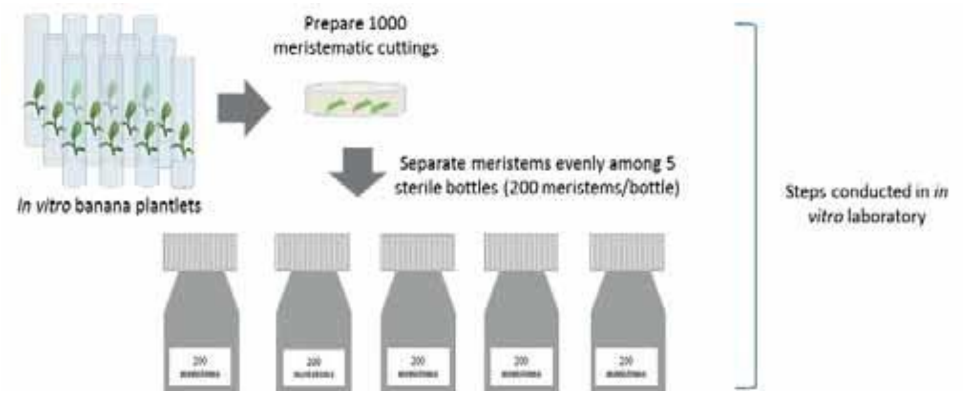


Figure 2.3. Preparation of banana in vitro materials for chemical mutagenesis. Steps include tissue multiplication under aseptic conditions and transfer of explants into autoclaved bottles, here 200 meristems/bottle, for transfer to the chemical mutagenesis laboratory.

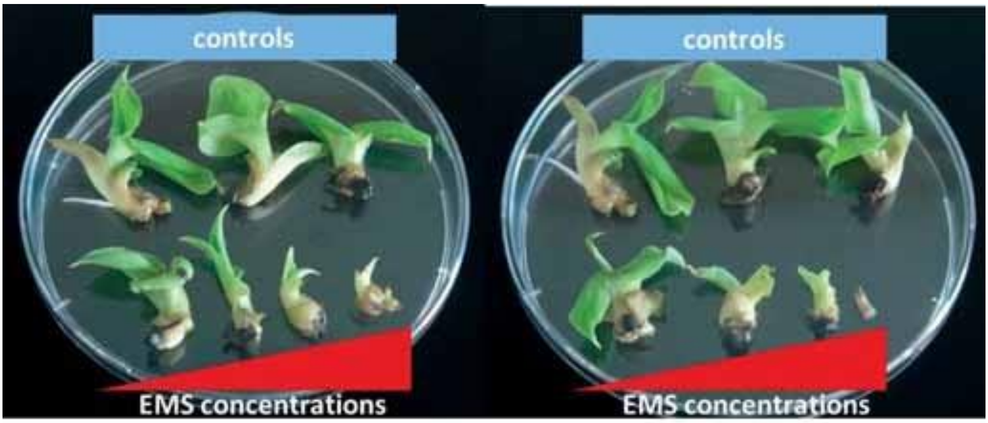


Figure 2.4. Establishing EMS dose-response curve for in vitro banana shoot tip explants. Explants below: different EMS concentrations, from left to right: 0.25%; 0.5%; 1% and 1.5% EMS. Explants on top: different types of controls, from left to right: water, DMSO and untreated explants. Plate left: 2 hr incubation; Plate right: 4 hr incubation. Figure adapted from (Jankowicz-Cieslak and Till, 2016).

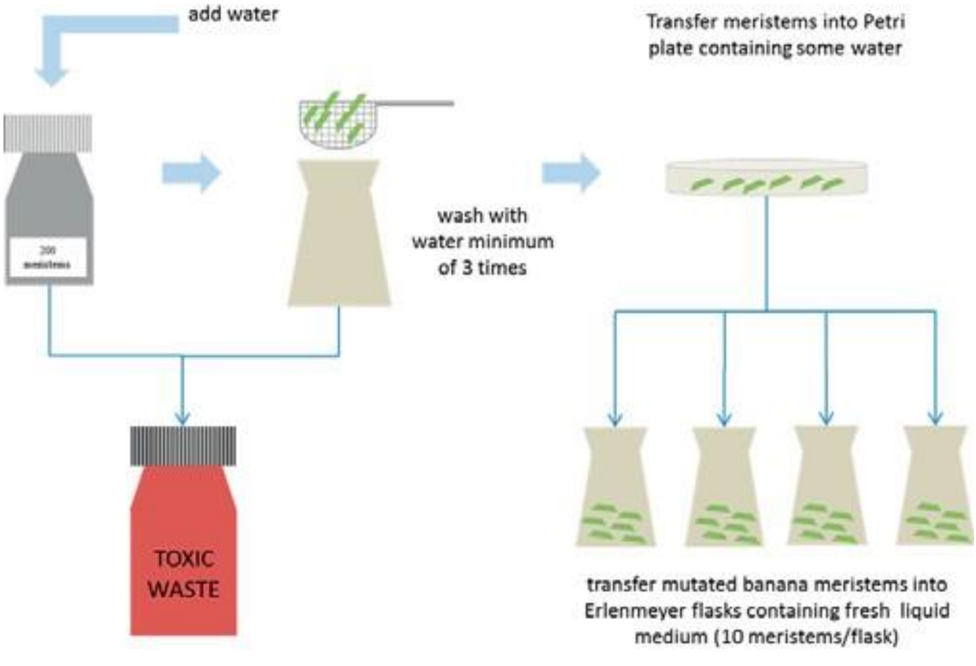


Figure 2.5. Post-treatment washing of banana in vitro explants. Treated meristems need to be carefully washed after EMS treatment to remove the remaining EMS solution. After a minimum of 3 washes, the explants are placed on Petri plates, sealed with parafilm and moved back into the in vitro laboratory. Mutated banana explants should be immediately transferred to fresh liquid growth medium. Figure adapted from Jankowicz-Cieslak et al., 2012.

Figure 2.6. A mutant banana plant exhibiting a stable rolled leaf phenotype induced via EMS mutagenesis. Courtesy of J. Jankowicz-Cieslak.

معاملة طفرات إيثيل ميثاني سلفونات (EMS) لبذور الشعير

هذا بروتوكول مدته ثلاثة أيام يتكون من ثلاث خطوات رئيسية كما تم تعديلها وتكييفها من كونزاك وميكايلسن (1977) ويانكوفيتش-سيسلاك وتيل (2016). تتضمن الخطوة الأولى نقع البذور مسبقًا طوال الليل في الماء. في اليوم الثاني، يتم تخفيف EMS إلى التركيز المطلوب وإضافته إلى البذور للحضانة طوال الليل. تتم إزالة محلول EMS في اليوم الثالث. ثم يتم غسل البذور بمحلول معطل (100 ملم ثيوكبريتات الصوديوم) وتشطف بالماء قبل الزراعة.

يتم تنفيذ كافة الخطوات التي تنطوي على معاملة EMS ويغسل بعد المعاملة في اليوم 2 و 3 تحت غطاء الدخان التهوية.

التحضير

اختر بذورًا ذات حجم موحد بمعدل إنبات يتراوح بين 95 و100 بالمائة. إذا لم تكن المعلومات المتعلقة بصلاحية البذور متاحة، فمن المستحسن تحديد نسبة إنبات مخزون البذور قبل المعاملة بـ.EMS

يعتمد العدد الإجمالي للبذور المعاملة على حجم التجربة، وما إذا كان يتم إجراء اختبار السمية الكيميائية أو الطفرات السائبة. لاختبار السمية الكيميائية، ما يقرب من 200 بذرة لكل معاملة كافية. كما ذكرنا سابقًا، بالنسبة للطفرات السائبة للنباتات ثنائية الصيغة الكروموسومية، فإن 3000 إلى 6000 سلالة تكون عادةً كافية لاستعادة الأليلات الطافرة في أي جين. عند محاولة تحسين سمة أو سمتين في الأصول الوراثية النخبة في برنامج تربية الطفرة، قد يلزم تعديل هذا العدد بالإضافة إلى الجرعة المثالية لتقليل الحمل المطفر العالي الذي لوحظ في الشاشات الجينية العكسية، كما تمت مناقشته في القسم 2.3. 2. وفي كلتا الحالتين، يجب معاملة البذور الزائدة مع الأخذ في الاعتبار أن نسبة مئوية من بذور M1 لن تنبت، وبالإضافة إلى ذلك، فإن نسبة مئوية من نباتات M1المنتجة ستكون معقمة بعد معاملة.EMS

النقع المسبق

تقدير أفضل نسبة من البذور إلى السائل لحضانة EMS. أضف البذور إلى ما يقرب من 5/1 من إجمالي حجم الدورق. أضف الماء المقطر (أو منزوع الأيونات) إلى حوالي ثلث الحجم الإجمالي وضعه على. اضبط سرعة الدوران حتى تتمكن جميع البذور من التحرك بحرية في الماء. قم بتقسيم البذور إلى أكواب متعددة ذات حجم منخفض لتجنب

انسكابها. نقع البذور لمدة 12 – 20 ساعة عند درجة حرارة 20 – 22 درجة مئوية (~ درجة حرارة الغرفة).

عد هذه الفترة من النقع المسبق، يصل امتصاص أو انتشار المطفر إلى معدله أو سرعته المثلى، مما يعني أن أكبر قدر ممكن من المطفر يمكن أن يخترق الجنين في أقصر وقت ممكن. في هذه المرحلة، يبدأ ظهور الرويشة والجذير في حالة الشعير أو الحبوب الصغيرة الأخرى.

معاملة الطفرات

جميع الخطوات التي يتعين تنفيذها تحت التهوية الجيدة.قم بإعداد محلول مخزون ثيوكبريتات الصوديوم الطازج 1 Mوتمييعه إلى 100 مل والذي سيتم استخدامه لإلغاء تنشيط.EMS

يمكن تقدير تركيزات EMS التي سيتم استخدامها بناءً على الدراسات المنشورة مسبقًا للأنواع التي تعمل عليها. ومع ذلك، من المهم ملاحظة أن تواتر الطفرات المتراكمة قد يكون مختلفًا في الأنماط الجينية المختلفة أو بسبب الاختلافات في الإجراءات التجريبية. ولذلك فمن المستحسن إجراء تجربة منحنى القتل باستخدام جرعات مختلفة من المطفرات. يوضح الجدول 2.2 مثال لحساب مخاليط EMS بتركيزات مختلفة تحتوي على 2% من DMSO (حجم/حجم) في حجم نهائي قدره 1 لتر. تستخدم بعض المنشورات مولارية EMS بدلاً من النسبة المئوية. يتم التحويل بين النسبة المئوية والمولارية باستخدام صيغة الوزن لـ 124.16) EMS جم/مول). EMS لا يذوب بسهولة في الماء لذا تتم إضافة DMSO إلى 2 بالمائة لتحسين قابلية الذوبان.

مكن تقدير تركيزات EMS المستخدمة بناءً على الدراسات المنشورة مسبقًا للأنواع التي تعمل عليها. ومع ذلك، من المهم ملاحظة أن تواتر الطفرات المتراكمة قد يكون مختلفًا في الأنماط الجينية المختلفة أو بسبب الاختلافات في الإجراءات التجريبية. ولذلك فمن المستحسن إجراء تجربة منحنى القتل دائمًا باستخدام جرعات مختلفة من المغير. EMS ليس قابل للذوبان في الماء بسهولة لذلك يتم إضافة 2 بالمائة (حجم / حجم) DMSO لتحسين قابلية ذوبان EMS. يظهر في الجدول 2.2 مثال لحساب مخاليط EMS بتركيزات مختلفة (بالمللي مولار) تحتوي على 2% من DMSO في حجم

نهائي قدره 1 لتر. تستخدم بعض المنشورات النسبة المئوية لـ EMS بدلاً من المولارية. يتم التحويل بين النسبة المئوية والمولارية باستخدام صيغة الوزن لـ EMS (124.16 جم/مول). يجب أن يتم خلط محلول EMS/DMSO جيدًا. يتم إعداد الخليط في زجاجة مغلقة بغطاء لولبي، ثم يتم رجها بقوة قبل إضافتها إلى البذور. اختبر الزجاجة أولاً عن طريق محاكاة عملية الرج باستخدام الماء الموجود في الدخان المهواة لضمان عدم تسرب الزجاجة. أضف بعناية الحجم المطلوب من محلول EMS إلى الدورق الذي يحتوي على البذور. تجنب إضافة محلول EMS/DMSO الزائد إلى الدورق الذي يحتوي على البذور لأن ذلك قد يؤدي إلى انسكابات أثناء الدوران المداري. تعيين السرعة المناسبة واحتضان لمدة محددة من الوقت.

TABLE 2.2. DIFFERENT CONCENTRATIONS OF EMS MIXTURE CONTAINING DMSO

Final EMS concentration (mM)	0	20	30	40	50	60
Volume EMS (ml)	0	2.1	3.1	4.1	5.2	6.2
Volume DMSO (ml)	20	20	20	20	20	20
Volume Water (ml)	980.0	977.9	976.9	975.9	974.8	973.8

صب السائلEMS وتصب في زجاجة النفايات السامة. كن حذرًا جدًا عند سكب السائل لتجنب تناثره. يمكن وضع شاشة شبكية في القمع لالتقاط البذور التي قد يتم سكبها من الدورق عن غير قصد. أضف 100 ملم من ثيوكبريتات الصوديوم إلى البذور المتحولة واحتضانها لمدة 15 دقيقة على شاكر المداري. كرر هذه الخطوة ليصبح المجموع 2 يغسل مع ثيوكبريتات الصوديوم. إضافة الماء منزوع الأيونات إلى الدورق واحتضان لمدة 10 دقائق تحت الدوران المداري، كرر هذه الخطوة ليصبح المجموع اثنين من الشطف.

صب كل السائل في زجاجة النفايات السامة. قم بتطهير منطقة العمل بأكملها بالإضافة إلى جميع الأدوات والأواني الزجاجية التي تلامست مع EMS باستخدام محلول ثيوكبريتات الصوديوم بحجم 100 مم.

بعد الغسيل التالي للبذور، يجب إما تجفيفها سطحيًا لفترة قصيرة أو زراعتها في الحقل في أسرع وقت ممكن. وهذا ما يسمى المعاملة الرطب. إذا لم يكن من الممكن زراعة البذور بعد وقت قصير من الغسيل، فيجب تجفيفها بسهولة إلى نسبة رطوبة تبلغ حوالي 13 بالمائة لمنع أي ضرر فسيولوجي إضافي. الإجراء العملي البسيط هو ترك البذور تجف على ورق الترشيح على طاولة المختبر في درجة حرارة الغرفة (20 - 25 درجة مئوية). ويسمى هذا الإجراء الجاف. في ظل هذه الظروف، ستبقى البذور في حالة سبات ويمكنها الحفاظ على قدرة إنبات جيدة لعدة أسابيع. إذا كانت هناك حاجة إلى وقت تخزين أطول، فمن المستحسن تخزينه في درجة حرارة منخفضة جدًا.

تعتمد إجراءات المعاملة الموضحة هنا على العديد من الدراسات التي أجراها المختبر المشترك بين منظمة الأغذية والزراعة والوكالة الدولية للطاقة الذرية لتربية النباتات وعلم الوراثة باستخدام الشعير ويمكن تكييفها بسهولة مع الحبوب الصغيرة الأخرى.

.المعاملة المشتركة لبذور الشعير مع أزيد الصوديوم و ن- نيتروزو ن- ميثيل يوريا

يصف هذا المثال تطبيق معاملة مطفرة مجمعة لبذور الشعير باستخدام أزيد الصوديوم (SA)و-Nنيتروزو-N ميثيل يوريا (MNU) مع فترة إنبات بين المعالجتين المطفرتين. يؤدي هذا البروتوكول إلى ارتفاع وتيرة الطفرات النقطية في الشعير وتم استخدامه لإنشاء مجموعة TILLING للشعير. "سيباستيان.Szarejko et al) "، 2017)والأرز.Till et al) ، .(2007يحفز كلا المطفرين في الغالب التحولات من GCإلى AT ولكن في سياق تسلسل محلي مختلف.Kurowska et al) ، 2011؛ Tai et al.، .(2016الهدف من استخدام مركبين مطفرين مختلفين في علاج مشترك هو توسيع نطاق الطفرات المستحثة.

التحضير

من الضروري اختيار بذور شعير مملوءة جيدًا وموحدة من دفعة ذات معدل إنبات مرتفع (~ 100 بالمائة.(تذكر أنه بالإضافة إلى آفات الحمض النووي في النواة والعضيات السيتوبلازمية، يمكن للمطفرة أن تولد ضررًا في جميع مكونات العصارة الخلوية واضطرابات في دورة تكاثر الخلية. ولذلك، فإن المعاملة بالمطفرات يمكن أن يضعف عملية التمثيل الغذائي للخلايا في الأنسجة والأعضاء المختلفة ويؤثر على نمو وتطور نباتات M1. وتتجلى هذه التأثيرات، التي تسمى "التأثيرات الجسمية"، في تأخير إنبات البذور، وانخفاض ظهور النباتات، وانخفاض النمو، وظهور عيوب الكلوروفيل، وانخفاض الخصوبة وبقاء النبات. وبالتالي، ينبغي حساب حجم مجتمع M1 مع الأخذ في الاعتبار مدى فتك وعقم نباتات M1 لضمان وجود بذور كافية لجيل M2 اللاحق. ومن المفيد تنظيم تجربة تجريبية لمقارنة التأثيرات الجسمية والوراثية الناجمة عن مجموعة من الجرعات. ستعمل مثل هذه التجربة التجريبية على توسيع الإجراء ولكنها ستساعد بالتأكيد في الاختيار الصحيح للجرعات المثلى للعلاج على نطاق واسع.

من الضروري إجراء علاج مطفر أولي بجرعات مختلفة من المطفرات لإنشاء منحنى القتل وتقييم جرعة المطفرات المثلى. بالنسبة للشعير، استخدم اختبار الشتلات القياسي لقياس ظهور الشتلات وتقليل النمو. لإجراء مثل هذا الاختبار، قم بزراعة البذور المعاملة بمجموعة من جرعات المطفرات في أوعية مملوءة بالتربة ومغطاة بطبقة من الرمل يبلغ سمكها 3 سم. بعد سبعة إلى عشرة أيام من المعاملة بالطفرات، قم بقطع جميع الشتلات القريبة من سطح الرمال، واحسب عددها وقياس طولها. احسب انخفاض النمو بشكل منفصل لكل صنف وجرعة وتكرار (انظر الفصل 1). إذا لم تتمكن من زراعة بذور M1 مباشرة بعد المعاملة، جفف البذور تمامًا على ورق الترشيح وقم بتخزينها في أكياس بلاستيكية عند درجة حرارة 4 درجات مئوية حتى وقت البذر. قد تختلف الاستجابة للمطفرة بين الأنماط الجينية للشعير، لذلك يوصى بتقييم الجرعة المثالية من المطفرات بشكل منفصل لكل نمط وراثي (الشكل 2.7). وكما ذكرنا سابقًا، قد تختلف الجرعات المثالية اعتمادًا على أهداف تجربة الطفرات أو برنامج التربية.

النقع المسبق

يجب نقع البذور مسبقًا في الماء المقطر قبل معاملتها بالمطفرة من أجل التنشيط الفسيولوجي. يجب أن تكون كمية الماء المقطر المستخدم في النقع المسبق على الأقل ضعفين إلى ثلاثة أضعاف حجم البذور الجافة. إن النقع المسبق لمدة ثماني ساعات في درجة حرارة الغرفة (20 – 24 درجة مئوية) هو الأمثل للشعير. يقلل النقع المسبق من التأثيرات الجسمية للمطفرة الكيميائية.

المعاملة بالطفرات

وينبغي التأكيد على أن معظم المطفرات الكيميائية هي أيضا مواد مسرطنة قوية. لهذا السبب، ينبغي تنفيذ جميع خطوات المعاملة المطفرة تحت غطاء دخان بيولوجي جيد التهوية. يجب ارتداء القفازات التي تستخدم لمرة واحدة ومعطف المختبر في جميع الأوقات عند إجراء المعالجات والتعامل مع البذور المعاملة. يعد اتخاذ هذه الاحتياطات

أمرًا مهمًا بشكل خاص أثناء المعاملة باستخدام MNU - وهو عامل مطفر قوي ومسرطن.

يعتمد التأثير المطفر لـ SA على الرقم الهيدروجيني الحمضي لمحلول المعاملة (Nilan et al., 1973). تتراوح جرعات SA المستخدمة بشكل روتيني في المعاملة المطفرة لبذور الشعير من 0.5 إلى 4 ملم لمدة 3 إلى 5 ساعات (Nilan et al., 1973; Maluszynski et al., 2003)، لاحظ أن جرعة عالية حيث تم تطبيق 10 ملم لمدة ساعتين لإنشاء مجموعة TILLmore .

عندما يتم إجراء معاملة مشتركة مع اثنين من المطفرات، فإن البروتوكول المنتظم الأول للمعاملة المطفرة يتبعه إضافة فترة إنبات بين الحضانة (iig) تتراوح من 5 إلى 6 ساعات بين المعالجات التي يتم خلالها تحضين البذور على ورق ترشيح مبلل في درجة حرارة الغرفة.

س/ احسب كمية المحاليل اللازمة للمعاملات (لجميع جرعات الاختبار).

بالنسبة لبذور الحبوب الصغيرة مثل الشعير، قم بإعداد حجم يضمن محلول 0.5 مل لكل بذرة واحدة.

إعداد كمية مناسبة من المحاليل الطازجة لأزيد الصوديوم و MNU. ينبغي حل MNU في dH2O ، في حين ينبغي حل SA في منطقة عازلة للفوسفات مع الرقم الهيدروجيني = 3.0. لتحضير المخزن المؤقت للفوسفات عند درجة الحموضة = 3.0، استخدم 54.436 جم KH2PO4 الذي يضاف إليه 3.67 مل H3PO4 لكل 1 لتر من المخزن المؤقت.

عند تقييم الجرعة المثالية قم بتحضير المحاليل المطفرة بدءاً من المحلول الأساسي (أعلى تركيز يستخدم للمعاملة). اترك جزءًا من هذا المحلول للمعاملة وقم بتخفيف الباقي إلى التركيزات الأخرى المطلوبة. يمكنك استخدام الصيغة: $C1 \times V1 = C2 \times V2$، حيث: C1 هو تركيز المحلول الأساسي، V1 - حجم المحلول الأساسي، C2 - تركيز المحلول المطلوب، V2 - حجم المحلول المطلوب. استخدام غطاء الدخان التهوية لإعداد المحاليل المطفرة. قبل المعاملة، اسكب dH2O من الأكواب التي تحتوي على البذور واشطفها مرتين بماء الصنبور. كن حذرًا لإزالة الماء تمامًا بعد الشطف

إجراء المعاملة، أي صب المحاليل المطفرة في الأكواب التي تحتوي على البذور المنقوعة والمشطفة مسبقًا. حافظ على نفس ترتيب المجموعات خلال الإجراء بأكمله، أي النقع المسبق، والشطف، والمعاملة، والشطف بعد المعاملة. إجراء المعاملة المطفرة في درجة حرارة الغرفة.

بعد 3 ساعات من المعاملة بـ SA (أول مطفر مطبق)، قم بتصفية محلول المطفر واشطف البذور جيدًا (3-4 مرات) في ماء الصنبور. ثم ضع البذور في صواني تحتوي على عدة طبقات من ورق الترشيح، وقم بتغطيتها بورقة مبللة من ورق الترشيح واحتفظ بها لمدة 6 ساعات في درجة حرارة الغرفة. بعد ذلك، قم بنقل البذور إلى الأكواب المسمى وأضف المحلول المطفر الثاني المراد تطبيقه، أي MNU. قم بمعاملة البذور لمدة 3 ساعات ثم قم بتصفية المادة المطفرة واشطف البذور مرة أخرى 3-4 مرات في ماء الصنبور الجاري. يجب دائمًا سكب المحاليل المطفرة في زجاجات النفايات السامة والتعامل معها بشكل مناسب.

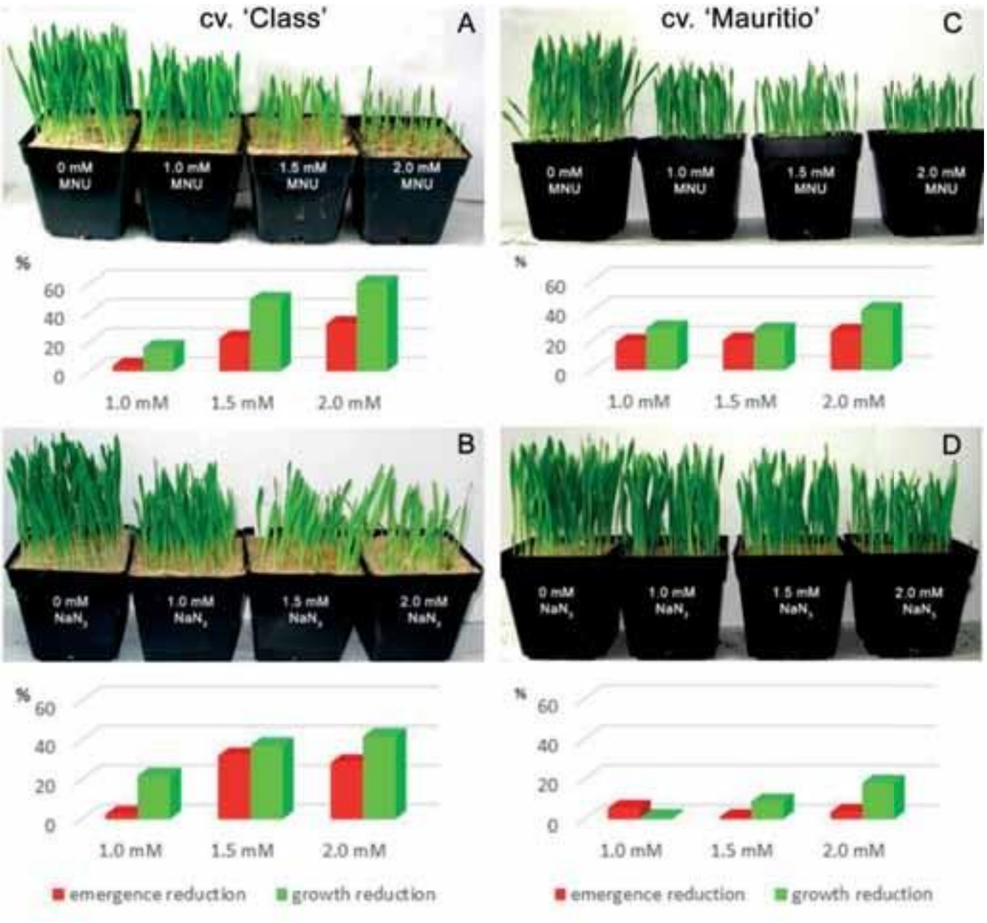


Figure 2.7. Differential sensitivity of barley cultivars 'Class' (A, B) and 'Mauritio' (C, D) to mutagenic treatment with MNU (A, C) and NaN_3 (B, D) based on seedling emergence and growth reduction.

بالنسبة لصنف الشعير "سيباستيان" الذي تم استخدامه لإنشاء مجتمعTILLING ، قمنا بتطبيق مجموعتين مختلفتين من المعاملة:

1.5 .1ملم NaN3/3 ساعة - 6 ساعات 0.75 - iig ملم MNU/3 ساعات

1.5 .2ملم NaN3/3 ساعة - 6 ساعات 0.5 - iig ملم MNU/3 ساعات

في كلا التوليفتين تم استخدام نفس الجرعة من SA (1.5 ملم/3 ساعات) بينما كانت جرعة MNUمختلفة. تسبب المعاملة بجرعة أعلى من MNU (0.75 مم / 3 ساعات) في حدوث طفرة أعلى من 0.5 مم، ولكنه أدى أيضًا إلى عقم أعلى بكثير للنباتات-M1 (Szurman، Zubrzycka pers.comm).

مرحلة ما بعد المعاملة

من الضروري إجراء معاملة لاحقة واسعة النطاق للشطف في ماء الصنبور لإنهاء عمل المطفر وإزالة أي بقايا مطفرة من سطح البذور. لتسهيل البذر، يمكن السماح للبذور المعاملة أن تجف على ورق الترشيح تحت غطاء الدخان التهوية. ومع ذلك، لا يمكن للتجفيف المكثف جدًا، خاصة عند ارتفاع درجة حرارة الهواء، أن يعزز آثار الضرر الجسدي للمطفر.

الخلاصة

أثبتت الطفرات الكيميائية أنها مفيدة للغاية في إنشاء متغيرات أليلية جديدة يمكن استخدامها بعد ذلك في دراسات الجينوم الوظيفية و/أو تربية النباتات. وتشمل المزايا التكلفة المنخفضة والكثافة العالية للتنوع ويمكن تطبيق هذه التقنية على العديد من الأنواع. يمكن أن يكون للطفرات النقطية الناجمة عن علاج EMS تأثيرات متفاوتة على التعبير الجيني تتراوح من الضربة القاضية إلى التغيرات (الدقيقة) في وظيفة البروتين. لذلك، يمكن لـ EMS إنتاج مجموعة من الأنماط

الظاهرية. قد يؤدي التطفير باستخدام اثنين من المطفرات المختلفة مثل SA مع MNU إلى نطاق أوسع وأنواع مختلفة من الطفرات. علاوة على ذلك، هناك حاجة إلى مجموعات صغيرة نسبيًا لاستعادة الصفات المرغوبة. ومع ذلك، فإن تراكم كثافة عالية من الطفرات المستحثة يعني أن كل خط نباتي سوف يؤوي العديد من الطفرات. لذلك، يجب اتخاذ خطوات إضافية، مثل التهجين العكسي، للتخصيص الواضح للجين الطافر الذي يسبب السمة المتغيرة ولتقليل أو إزالة الطفرات غير المرغوب فيها في الخلفية الجينية.