الوراثة النباتية

(الجزء العملي)

جامعة دمشق

كلية العلوم

السنة الثانية

قسم علم الحياة النباتية

منشورات جامعة دمشق
كلية العلوم

الوراثة النباتية

(الجزء العملي)

الدكتور	الدكتور	السيدة
غسان عياش	محمد سليمان	فرح علوش
أستاذ في قسم علم الحياة النباتية	أستاذ في قسم علم الحياة النباتية	مشرفة على الأعمال في قسم علم الحياة النباتية

جامعة دمشق

1436-1437 هـ
2015- 2016 م

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

الفهرس

الموضوع:	الصفحة
الفهرس	٥
المقدمة	٧
القسم الأول: تثبيت المواد وتلوينها والانقسام الخيطي.	٩
أولاً- تثبيت المواد وتلوينها.	١١
ثانياً- الانقسام الخيطي.	٢٢
القسم الثاني: الانقسام المنصف	٣٧
القسم الثالث: تحديد استمرار أطوار الدارة الانقسامية وأطوار الانقسام الخيطي	٧١
القسم الرابع: تحقيق بعض الدراسات الصبغية- طرائق إحصاء العدد الصبغي- النمط النووي- المخطط النووي- المخطط الصبغي.	٩٧
القسم الخامس: الطريقة المجهرية للقياس.	١٣٣
القسم السادس: الأسس الجزيئية للتوريث كشف الـ DNA والـ RNA و استخلاص الـ DNA .	١٤١
القسم السابع: تحديد القابلية الحيوية والاخصابية لحبوب الطلع.	١٦٩
القسم الثامن: دراسات مندلية والتحليل الوراثي لآليات التوريث.	١٩١
القسم التاسع: الطفرات والمطفرات.	٢١١
القسم العاشر: استعمالات الكولشيسين في احداث الطفرات- أثر التبريد على الصبغيات.	٢٤٤
القسم الحادي عشر: توريث الصفات الكمية	٢٤٣

- المراجع. ٢٥٩
- المصطلحات العلمية وترجمتها. ٢٦٩

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

مقدمة الطبعة الرابعة

يدرس علم الوراثة ظاهرتي التوريث والتبدل، حيث تتناول الخصائص المتوارثة عبر الأجيال، مع التبدلات الوراثية منها، والتي تميز كل فرد من آخر وفقاً لصفات محددة. وهكذا يهتم هذا العلم بالتشابهات والاختلافات، وبالطريقة التي تنتقل بها هذه الصفات من جيل لآخر. ويجب أن ندرك أن المتغيرات بين الكائنات الحية ليست عَرَضية، وإنما محكومة بعوامل وراثية متنوعة؛ وأن نكون على قناعة مطلقة بأن علم الوراثة علم غزير غزارة الأنهار. وما علينا إلا أن نختار بدقة ومسؤولية المكان المناسب على ضفة نهر الوراثة، وبالتأكيد ليس بعيداً عن منبعه، وذلك على قدر ما نعرفه من أساسيات هذا العلم، قبل أن نسير على ضفته بمحاذاة المجرى الذي يزداد غزارة كلما مضينا معه.

ومن المهم جداً أن نُراقب بدقة وحذر شديدين عبور المياه الغزيرة تحت جسور نهر الوراثة الهادر وبين ضفتيه مع ما يحمل من معلومات ومعارف جمة قبل أن نطالها وننهل من معينها، ونأخذ المعلومات من مصادرها ونبني عليها وإلا فسوف تبتعد عنا قبل أن ندركها.....

وإن من واجب الباحثين في مجال الوراثة ولاسيما العالِمين والمُتعلِّمين السعي الدائم لزيادة معارفهم، ورفع سويتهم، في المجالات النظرية والتطبيقية، لا سيما في مجال الوراثة التي تمس حياتنا بكل أبعادها سواء منها الأفضل أو الأسوأ كي نتمكن من تحقيق الحاجات والمتطلبات الضرورية التي توصلنا إلى إيجاد كائنات حيوانية ونباتية متوازنة صحتها جيدة وذريتها قوية، وإنتاجها غزير، وبالتالي يستطيع الإنسان، وهو سيد هذا الكون، أن يستفيد منها ومن خيراتها بكل أمان، وأن يتابع حياته ونشاطه بشكل أفضل. وتأتي أهمية الطبعة الرابعة من كتاب الوراثة النباتية (الجزء العملي) في الغرض الذي وضع من أجله بأن نكون قادرين على فهم وإجراء التجارب والتطبيقات ترجمةً لمعارفنا النظرية التي تُعني

بدراسة التوريث والتبدل، ولنتمكن من توريث النباتات بما نشاء من صفات لجعلها أجمل وأغزر إنتاجا وأكثر مقاومة للأمراض.

لقد حاولنا في هذه الطبعة المُنقحة والمزيدة أن نضيف بعض المعلومات الحديثة والتي تمس بشكل مباشر التقدم العلمي الكبير الذي واكب علم الوراثة في السنوات الأخيرة. ومع ذلك فإننا ملتزمون بمفردات المنهاج المخصص لطلاب السنة الثانية – علم الأحياء– والذي يمثل الجذع المشترك قبل التخصص. انطلاقاً من ذلك لم نعالج في هذا الكتاب مواضيع الوراثة الجُزيئية والتقانات الوراثية، كونها تُعطى في السنتين التاليتين، واكتفينا بعرض المواضيع الأساسية في الوراثة العملية وأهمها: الانقسامات الخيطية، والدراسات المندلية وتعديلاتها، والدراسات الصبغية وقياساتها، ودراسة القدرة الحيوية لحبوب الطلع، والكشف الكيميائي الحيوي للحموض النووية، وبعض الدراسات الإحصائية الخاصة بالتبدلات المتكيفة، وتأثير الأشعة والمواد الكيميائية على الصبغيات ودراسة التعدد الصبغي .....

لقد توخينا أن يكون هذا الكتاب عوناً للطالب، إذْ تمت صياغته بلغة علمية بسيطة وواضحة، ودُعِّم بكثير من الرسوم والصور والبيانات، كما تم وضع ملزمة من الصور الملونة في آخرة كي تُسهم في توضيح الكثير من المعلومات والأفكار، إضافة إلى بعض الصور الفوتوغرافية الحقيقية المأخوذة من المجهر وغير ذلك.

نأمل أن تُسهم غرستنا الجديدة، التي وضعنا بذورها في ثلاث طبعات سابقة، بتقديم أهم المعلومات المنوطة بأساسيات عملي علم الوراثة النباتية، عسى أن تُزود طلاب الدرجة الجامعية الأولى والمهتمين في هذا المجال بالمعلومة الوافية والصحيحة.

ولا يسعنا إلا أن نزجي كامل شكرنا وجُل تقديرنا لكل من يزودنا بملاحظاته وتساؤلاته وآرائه التي ستكون محل اهتمامنا البالغ، والله من وراء القصد.

المؤلفون

القسم الأول

تثبيت المواد وتلوينها

الانقسام الخيطي

أولاً- تثبيت المواد:

تعني كلمة التثبيت Fixation إلحاق الموت السريع بخلايا الكائن الحي Organism، ويتحقق التثبيت بفضل مجموعة من المواد الكيميائية التي تشكل المثبتات Fixatives لدى مزجها مع بعضها بنسب محددة. ويشترط في المحلول المثبِّت Fixative solution أن يحافظ على كل مكونات الخلية بوضعياتها التي كانت عليها قبل التثبيت؛ ولذلك ينفذ محلول المثبت بسرعة إلى الخلية، ويعرقل بعض التفاعلات الجارية فيها محدثاً مجموعة من التبدلات غير العكوسة. (انظر الملحق الخاص بأهم المثبتات).

تحضير المواد قبل عملية التثبيت:

تتم تهيئة وتحديد العضو أو النسيج النباتي المدروس للتثبيت بشكل يتناسب مع هدف الدراسة؛ فمثلاً لملاحظة انقسام الخلية في نهايات الجذور الفتية، لا بد من مراقبة حرارة الهواء ورطوبة الجو والمواد الغذائية الموجودة في التربة (إذا كانت الجذور مزروعة فيها). وبشكل آخر لا بد من إيجاد جميع الظروف المناسبة والمفضلة لنمو النبات لأن غياب هذه الظروف يعرقل نمو الأعضاء النباتية التي نرغب بدراستها.

١. تهيئة المواد اللازمة لدراسة الانقسام الخيطي:

لتحقيق الدراسات الخلوية الوراثية الجنينية لابد قبل كل شيء من تحديد العضو أو النسيج النباتي الذي يحقق هدف الدراسة. وهكذا يمكن ملاحظة الانقسام الخيطي في مرستيمات الجذور النباتية الفتية، وفي قمم الفوارع النامية وأطراف

الأوراق الفتية الصغيرة، وعادة يفضل استعمال الجذور الفتية لدراسة الانقسام، وإحصاء العدد الصبغي في الخلايا الجسمية للنبات.

٢. تهيئة المواد اللازمة لدراسة الانقسام المنصف والإلقاح:

لدراسة الانقسام المنصف وإحصاء العدد الصبغي خلال انقسام الخلايا الأم المولدة لحب الطلع، نلجأ إلى السنابل الفتية لبعض النجيليات قبل عدة أيام من نضجها، كما نصادف هذا الانقسام في البراعم الفتية لبعض أنواع الفصيلة الفولية والنباتات الأخرى وذلك قبل الإلقاح، أي في المآبر غير الناضجة، وأخيراً يمكن دراسة ظاهرتي الإلقاح وتطور الجنين في الأزهار الملقحة بدءاً من سقوط حب الطلع على المياسم، وبعد مرور فترات زمنية مناسبة على اندماج نوى الأعراس.

ولدراسة الانقسام المنصف ومراحل تطور الخلايا الجنسية والإلقاح، تثبت عادة البراعم الفتية (تُفضل النورات الزهرية لنبات البصل كونها تحمل عدداً كبيراً من البراعم وبقياسات متفاوتة)، والأسدية وأعضاء التأنيث، فمثلاً تثبت السنبلة بكاملها في النجيليات إذا كان طولها لا يزيد على نصف سم، وقد تثبت في حالات أخرى الأسدية فقط. إن البراعم و الأسدية و أعضاء التأنيث (المدقة) تستجيب للسائل المثبت ببطء، لذلك يفضل وضع هذه الأعضاء في مزيج الكحول وحمض الخل (١:٣) لمدة ١–٢ دقيقة، ثم نقلها إلى المثبت المستعمل.

٣. تهيئة المواد اللازمة لتحديد الانقسامات الأولى:

في بعض الأبحاث الخاصة نجد أنه ليس من المهم دراسة الانقسام في الجذور فقط، وإنما تحديد زمن ظهور أول الخلايا المنقسمة أيضاً، فمثلاً تبين أن أول الخلايا المنقسمة ضمن شروط حرارية واحدة (من٢٣°–٢٥°) لا تظهر بوقت واحد في جميع النباتات. وهكذا تظهر في نبات الكريبيس *Crepis capillaris* عندما يكون طول جذوره نحو ٢–٣ مم، وفي الفول *Vicia faba* نحو ١٢ – ١٧ مم، وفي شب الليل الدمشقي *Nigella damascena* نحو ٢–٤ مم، وفي

القمح الطري أو قمح الخبز *Triticum aestivum* نحو ٨-١٠مم وغيرها، إذاً يجب الانتباه إلى أطوال الجذور قبل تثبيتها.

ولتحديد الانقسامات الأولى توضع البذور على ورق ترشيح مبلل بدرجة (٢٤-٢٥°) لبضعة أيام، حيث يبدأ التثبيت بدءاً من الأطوال ٢-٣-٥-١٠ مم...الخ وتحفظ في الكحول، وتصنع منها محضرات هرس لتحديد بدء الانقسام وشدته ارتباطاً مع أطوال الجذور ، وتعد هذه التجربة مهمة لدراسة الطفرات الناجمة عن أثر الأشعة وبعض المُطفرات Mutagens الكيميائية.

٤. تهيئة المواد اللازمة لإحصاء العدد الصبغي:

لإحصاء العدد الصبغي يمكن زراعة البذور إما في التربة، أو في أطباق بتري فوق ورق ترشيح مرطب، وفي الحالة الثانية توضع الأطباق مع بذورها في محم حراري بدرجة ٢٥°، وتظهر الجذور خلال ٣-٥ أيام. ويجب الانتباه إلى ترطيب ورق الترشيح باستمرار وتثبيت الجذور عندما يصل طولها من (٨-١٥ مم) وذلك حسب النبات، وقد نلجأ إلى تثبيت مجموعات من الجذور متفاوتة الأطوال، وفي بعض الحالات تُثبت الجذور مع بذورها إذا كانت صغيرة الحجم، وأحياناً نلجأ إلى تثبيت الجذور النباتية المزروعة في التربة، لذلك يجب أن نتبع ما يأتي بالنسبة إلى هذه النباتات: تسقى النباتات ثم تسّمد بالأسمدة العضوية حتى تصبح رخوة، بعد ذلك نحفر حول النبات، ونقص منه البذور الفتية بالمقص ثم تُثبت، ويفضل أن يتمّ التثبيت في الظلام حرصاً على عدم تأثر الجذور بالشمس، وفي بعض الحالات لابدّ من دراسة الانقسام أو إحصاء العدد الصبغي في النباتات التي تتكاثر إعاشياً بوساطة البصلات أو الدرنات أو الجذامير وغيرها، لذلك توضع هذه الأعضاء في الرمل الرطب، أو في أوعية مائية، أو في أوساط غذائية مائية حتى تخرج الجذور منها.

شروط وأسس التثبيت:

١- يجب أن يحقق انتقاء المثبت أهداف الدراسة.

٢- يجب أن يفوق حجم محلول التثبيت حجوم المواد المثبتة بـ ٥٠-١٠٠ مرة تقريباً.

٣- يجب تثبيت الجذور والبراعم الطازجة فقط في مكان الاستنبات.

٤- تُجزأ الأعضاء الكبيرة قبل تثبيتها إلى أجزاء صغيرة (أزهار الفصلية النجمية أو المركبة مثلاً) وتُنتزع الأجزاء غير المهمة من الناحية الدراسية (أوراق وحراشف وأوبار وغيرها).

٥- تقص في أثناء التثبيت نهايات الجذور بطول ٢-٣ سم، وتوضع فوراً في السائل المثبت، أما السنابل والبراعم الفتية فتثبت بكاملها.

٦- تحدد مدة التثبيت بالنسبة إلى كل حالة كما يحدد أوان التثبيت بشكل مختلف، فمثلاً يفضل تثبيت الجذور في الأوقات التي يبلغ فيها الانقسام ذروته القصوى.

٧- تُستعمل في التثبيت أنابيب ذات سدادات بلاستيكية، وتملأ إلى منتصفها تقريباً بالمثبت، ويفضل وضع قصاصات ورقية بيضاء (من الورق المصقول) في المحلول المُثبِّت، وقد كتب عليها بقلم الرصاص اسم الطالب ونوع البذور واسم المثبت وتاريخ الاستنبات والتثبيت، بالإضافة إلى الأمور الأخرى التي يرغب صاحب التجربة إضافتها.

٨- يستبدل المحلول المثبت بعد انتهاء مدة التثبيت بالكحول الإيتيلي تركيز ٧٥-٨٠%، وتترك فيه المواد إلى حين دراستها، ويمكن أن تحفظ الجذور في الكحول لسنوات عديدة دون أن تعطب.

توجد حالياً مجموعة كبيرة من المثبتات لكل منها اسمه الخاص، وبصورة عامة يمكن تمييز نوعين من المثبتات: الأولى مائية تنفذ إلى النسج النباتية ببطء

شديد، لذلك يجب ترك المواد المثبتة فيها مدة لا تقل عن (٢٤) ساعة. والثانية كحولية تنفذ إلى النسج بسرعة كبيرة، لذلك تترك فيها المواد من ساعتين إلى ست ساعات، ولهذا السبب تبدو المثبتات الكحولية أكثر أهمية وأسهل استعمالاً، وفي جميع الأحوال يجب اختيار المثبت المناسب بشكل مرتبط مع هدف الدراسة ومع العضو أو النسيج المدروس، مثلاً تُحفظ البراعم الصغيرة والجذور الفتية في المثبتات المائية، في حين تحفظ الجذور الكبيرة والبراعم الناضجة في المثبتات الكحولية لبضع دقائق ثم تنقل إلى المثبتات المائية.

ومن أهم المواد الكيميائية التي تدخل في تركيب أكثر المثبتات استعمالاً نجد:

حمض الخل الذي ينفذ بشدة في النسيج، ويحافظ على مورفولوجية الصبغيات بشكل جيد، حمض الكروم الذي يكثر استعماله في دراسة السيتوبلاسما والنواة، بالإضافة إلى الفورمول والأسيتون والكلوروفورم والإتير والكحول الإيتيلي والديوكسان وغيرها.

طرائق استنبات البذور وتثبيتها:

لاستنبات البذور في أطباق بتري توضع ورقتا ترشيح داخل القسم السفلي من العلبة وورقة ترشيح واحدة داخل غطائها العلوي، ثم تبلل أوراق الترشيح بالماء مع مراعاة عدم دخول فقاعات هوائية فيما بينها، توضع بعد ذلك البذور المراد استنباتها داخل الطبق بكميات محدودة، بحيث نترك فيما بينها مسافات مناسبة كي لا يتوضع بعضها فوق بعض ثم يغلق الطبق ويوضع في المحم الحراري بدرجة (٢٥°). تبقى الأطباق داخل المحم فترة زمنية تتراوح من٣-٥ أيام وذلك حسب نوع البذور المستنبتة، حيث تنتش لتعطي جذوراً صغيرة تنشط في نهاياتها الميرستيمية الانقسامات المراد دراستها، ومن المستحسن أن تبلل ورقة الترشيح الموجودة داخل غطاء الطبق فقط بالماء ولمرة واحدة كل يوم، وتزال في الوقت نفسه البذور غير القادرة على الإنتاش، التي قد تنمو حولها بعض الفطريات وذلك

خوفاً من انتشار العدوى إلى بقية البذور السليمة، بعد الإنتاش ترفع البذور من العلب ثم تثبت جذورها بعد أن تقطع وذلك حسب الطريقة الآتية:

تحضر أنابيب زجاجية فارغة ذات سدادات بلاستيكية، وتملأ إلى منتصفها تقريباً بالمثبت، ثم تقطع الجذور التي يتراوح طولها من ٢-٣ سم وتغمس في المثبت المناسب وحسب المدة المطلوبة. يُسكب بعد ذلك المثبت ويستبدل به الكحول الإيتيلي تركيز ٧٥-٨٠% حيث تحفظ فيه الجذور لحين دراستها، ويمكن أن تحفظ الجذور طويلاً دون أن يطرأ عليها أي عطب.

ملاحظة: يمكن تثبيت البذور مع جذورها داخل الزجاجات المحتوية على المزيج المثبت في حال كون البذور صغيرة الحجم، كما هي الحال في بذور البصل و البندورة وغيرها.

ثانياُ- تلوين المواد:

تستعمل في تلوين الصبغيات وفي الدراسات الخلوية والجنينية مجموعة من الملونات التي لا تُعد نوعية في مجالات تأثيرها كما في تفاعلات كشف الحموض النوكليوتيدية مثلاً. ومن الملونات شائعة الاستعمال نجد الهيماتوكسيلين الذي يُعطي النواة والصبغيات لوناً بنفسجياً، والكارمن الخلي الذي يلونهما باللون الأحمر القرميدي بينما يُحدد اللاكمويد الخلي اللون الأسود المائل للزرقة؛ بالمقابل يعمل الأيوزين على تلوين السيتوبلاسما، وتوجد الكثير من الملونات غير النوعية التي تلون الصبغيات والبُنى والمكونات السيتوبلاسمية والنسيجية.

خطوات التلوين:

لتلوين Coloration الجذور الفتية نتبع الخطوات الآتية:

١- توضع قطع نهايات الجذور (المرستيمات) بطول نحو٥ ملم في الملون المناسب وتُغلي فيه مدة دقيقة واحدة.

٢- تُقطع النهاية المرستيمية (الأكثر تلوناً) بطول ٢ مم وتوضع على صفيحة زجاجية نظيفة مع نقطة من حمض الخل ٤٥% ، ثم تُغطى بساترة وتسخن بلطف على نار هادئة مع توخي الحذر من تطاير الساترة بعد الغليان. إن الهدف من وضع قطرة الخل والتسخين هو تفكيك النسج الخلوية عن بعضها (تفكيك الصفيحة المتوسطة) لتسهيل هرسها.

٣- يتم هرس مرستيم الجذر بعود الثقاب بهدوء (لتجنب كسر الساترة) بهدف الحصول على خلايا مبعثرة بشكل جيد ولا تتوضع فيه خلية فوق أخرى.

٤- يسحب السائل الزائد بورقة الترشيح، ويدرس المحضر باستعمال المجهر الضوئي.

ملحق بأهم المثبتات المستعملة في الدراسات الخلوية والنسيجية

١) مثبت نفاشين (١٠-٤-١):

يستعمل لتثبيت الجذور غير الثخينة والمستحضرات الجنينية الصغيرة، ويعدّ من المثبتات المائية يؤثر في المتعضية المثبتة به بلطف، كما أنه يحافظ على بنية الصبغيات و مورفولوجيتها، ويجب تحضير مثبت نفاشين قبل الاستعمال مباشرة لأنه سريع العطب، أما التثبيت فيتم في الظلام ولمدة لا تقل عن (٢٤) ساعة ويتكون من:

أ- حمض الكروم١% (١٠٠ مل)

ب- فورمالين تركيز١٦% أو الفورمالين التجاري تركيز ٤٠% (٦٠ مل)

جـ- حمض الخل الثلجي (١٠ مل)

د- ماء مقطر (٤٠ مل)

٢) مثبت كارنوي (٦-٣-١):

واسع الاستعمال في الأبحاث السيتولوجية والجنينية، وكذلك لتحضير المحضرات الميكروتومية الثابتة ومحضرات الهرس المؤقتة، ويعد من المثبتات الكحولية التي تنفذ إلى النسيج بسرعة كبيرة، لكنه لا يؤثر بلطف كما هي الحال في مثبت نفاشين. مدة التثبيت من (٢-١٢) ساعة، ويتكون من:

أ- كحول إيتيلي مطلق (١٠٠%) أو بتركيز (٩٥%) (٦٠مل)

ب- كلوروفورم (٣٠ مل)

جـ- حمض الخل الثلجي (١٠ مل)

٣) مثبت الكحول وحمض الخل أو كارنوي المعدل (٣-١)

يشبه مثبت كارنوي إنما بدون وجود الكلوروفورم حيث إنه يتكون من:

آ- الكحول الإيتيلي بتركيز ٩٦% (٧٥ مل)

ب- حمض الخل الثلجي (٢٥ مل)

يستعمل في الأبحاث السيتولوجية والجنينية ولاسيما لإجراء المحضرات المؤقتة أو محضرات الهرس، يمكن في بعض الحالات حفظ المتعضيات فيه بدرجة (٣°) ، مدة التثبيت من٢-١٢ ساعة، واسع الاستعمال.

٤) مثبت باتاليا (٥-١-١-١):

وهو مثبت سريع الاستعمال ويطبق بشكل خاص في مجال تثبيت سنابل الفصيلة النجيلية حيث يتم التثبيت في مدة (٥) دقائق تقريباً، كما يستعمل في الدراسات السيتولوجية الأخرى، يتكون من:

آ- كحول إيتيلي ٩٥% (٥٠ مل)

ب- كلوروفورم (١٠ مل)

جـ- حمض الخل الثلجي (١٠ مل)

د- فورمالين (١٠ مل)

٥) مثبت نيو كامير (٦-٣-١-١-١):

استعمل في السنوات الأخيرة لدراسة الانقسام المنصف عند النجيليات وذلك لإجراء محضرات الهرس، فالسنابل الفتية تثبت خلال (٢٤) ساعة في حرارة الغرفة، ثم يبدل المثبت القديم بمثبت جديد وتحفظ في البراد حتى موعد دراستها، تلون المآبر التي جرى تثبيتها بهذا المثبت بالكارمن الخلي، يمكن استعماله لدراسة الجذور ويتكون من:

آ- كحول آيزو بروبيلي (٦٠ مل)

ب- حمض البروبيلي (٣٠ مل)

جـ- ديوكسان (١٠ مل)

د- أسيتون (١٠ مل)

و- إيتروبترولي (١٠ مل)

٦) مثبت تشمبرلان (٩٠-٥-٥):

يمثل تقريباً المثبت العام للعضويات والنسج، يستعمل في الأغراض السيتولوجية والتشريحية وبخاصة المتعضيات الضخمة، يحتل مكاناً واسعاً من حيث تأثيره بين مثبتي كارنوي ونفاشين، مدة التثبيت (١٦) ساعة، ويمكن للمواد أن تحفظ فيه لمدة طويلة، يتكون من:

آ- كحول إيتيلي بتركيز ٥٠-٧٠% (٩٠ مل)

ب- فورمالين تجاري تركيز ٤٠% (٥ ملم)

جـ- حمض الخل الثلجي (٥ ملم)

٧) مثبت فليمنغ (٢٥-٥-١٠-٦٠):

وهو محلول خفيف لتثبيت العضويات الصغيرة، تحفظ فيه لمدة لا تقل عن (٢٤) ساعة، ثم تغسل بعد ذلك بالماء، يتكون من:

آ- حمض الكروم بتركيز ١%	(٢٥ مل)
ب- حمض الأوسميوم٢%	(٥ مل)
جـ- حمض الخل الثلجي	(١٠ مل)
د- ماء	(٦٠ مل)

ملحق بأهم الملونات المستعملة في الدراسات الخلوية والنسيجية:

١) ملون الكارمن الخلي Aceto carmine:

يعتمد هذا الملون على صبغة الكارمن ذات الصيغة ($C_{22}H_{20}O_{13}$) وتستخرج من حشرة *Coccus cacti*، ويحضر محلول الكارمن الخلي على النحو الآتي:

يوضع في حوجلة زجاجية مقدار (٥٥) سم٣ ماء مقطر، ويضاف إليه (٤٥سم٣) حمض الخل الثلجي، ثم يضاف نحو (٢) غ مسحوق الكارمن. يوضع على فوهة الحوجلة قمع زجاجي ثم تسخن بلطف على نار هادئة حتى الغليان، ويستمر التسخين لمدة ساعة تقريباً (يفضل الحمام المائي). يبرد الناتج ويرشح ثم يحفظ في زجاجة ذات غطاء محكم حتى الاستعمال.

يفضل استعمال الكارمن الحديدي وذلك بإضافة (٥) مل من كلوريد الحديدي $FeCl_2.6H_2O$ 10% مقدار ١% لكل ١٠٠مل كارمن خلي.

٢) ملون اللاكمويد الخلي Acetic lacmoid:

يعتمد هذا الملون على صبغة اللاكمويد ذات الصيغة ،($C_{24}H_{16}N_2O_6$) ويستعمل بكثرة في الأبحاث الوراثية ولاسيما لدراسة الصبغيات ويحضر حسب الطريقة الآتية:

يضاف في وعاء زجاجي (٥٥) مل ماء مقطر مع (١) غ صبغة اللاكموید، ثم يسخن حتى الانحلال. بعد ذلك يضاف للمحلول ببطء مقدار (٤٥) مل حمض خل ثلجي ويبرد، ثم يرشح في حال وجود راسب ويحفظ في وعاء زجاجي محكم الإغلاق لمدة طويلة.

٣) ملون الأرسين الخلي Aceto-orcein:

يعتمد هذا الملون على صبغة الأرسين ذات الصيغة ($C_{28}H_{24}N_2O_7$). ويحضر محلول الملون على النحو الآتي:

يوضع في حوجلة زجاجية (٤٥ سم٣) حمض الخل الثلجي، ويسخن على نار هادئة أو في حمام مائي حتى الغليان وذلك بعد وضع قمع زجاجي على فوهة الحوجلة، ثم يضاف بهدوء ١ غ من الأرسين، يبرد المزيج ويضاف إليه (٥٥ سم٣) ماء مقطر ثم يرشح بعد أن يمزج بشكل جيد ويحفظ في وعاء زجاجي محكم الإغلاق.

وتجدر الإشارة إلى كثرة استخدام ملون لاكتو- بروبيونيك-أرسين Lacto-Propionic-orcein تركيز ١% بكثرة في الأبحاث الوراثية والصبغية. ويمكن تحضيره وفق الآتي:

يضاف (٢) غ أرسين إلى (١٠٠) مل من جزئين متساويين من حمض اللبن Lactic acid وحمض البروبيونيك Propionic acid، ثم يرشح ويمدد بالماء المقطر لنحصل على محلول ٤٥%. يتم نقل المادة المثبتة (جذور) إلى محلول الملون لعدة دقائق وبعدها نقوم بعملية الهرس.

يعدّ هذا الملون فعالاً جداً، ويوصى به للعينات التي تعطي نتائج غير مرضية لدى معالجتها بالكارمن الخلي أو الارسين الخلي.

٣) ملون أزرق الميتلين:

يذاب مقدار ١٠٠-٥٠٠ ملغ من أزرق الميتلين Methylene blue في ١٠٠ مل ماء مقطر ويستعمل مباشرة بهذا الشكل.

٤) ملون الفوكسين الخلي:

يحضر هذا الملون بإذابة (١) غ من الفوكسين الأساسي (القاعدي) Basic fuchsin في (٥٠ مل) حمض الخل ٤٠%، ثم يسخن المزيج حتى درجة (٥٠°) للإسراع في ذوبان الفوكسين، بعد ذلك يبرد حتى الدرجة (٢٥-٣٠°) ويرشح، وقبل استعمال المحلول. تثبت المواد التي نرغب بدراستها بحمض الخل ٤٥% لمدة ١٠-٣٠ دقيقة وبدرجة (١٥°)، ثم تنقل إلى حمض كلور الماء النظامي الساخن بدرجة ٦٠° لمدة (١٥-٣٠) ثانية. يتم تلوين المواد المدروسة في أوعية مغلقة لمدة (١-٣) ساعة، ويمكن بعد ذلك تجهيز محضرات هرس Squash بمحلول حمض الخل ٣٠% الذي يزيل لون السيتوبلاسما، حيث تبدو الصبغيات بلون بنفسجي غامق.

٥) ملون الهيماتوكسيلين Hematoxylin:

يعدّ الهيماتوكسيلين من الملونات الأكثر استعمالاً في الدراسات الوراثية لأنه يلون الصبغيات بشكل جيد، وهو من أصل نباتي مستخرج من خشب شجرة البُقم *Hematoxylum campechianum*، يحمل الصيغة ($C_{16}H_{14}O_6$) ويمكن تحضيره بطرائق عديدة ومتنوعة. وفيما يأتي نذكر طريقتين:

الطريقة الأولى: أمزج ما يأتي:

١- (٢٥٠ مل) إيتيلين غليكول Ethylen glycol (مذيب)

٢- (٧٥٠ مل) ماء مقطر Distilled water (مذيب)

٣- (٢ غ) هيماتوكسيلين Hematoxylin (ملوِّن)

٤- (٠,٢غ) يود الصوديوم Sodium iodate (عامل مؤكسد)

٥- (٢٠غ) سلفات الألمنيوم Alluminium sulphate (محمِّض)

٦- (٢٠ مل) حمض الخل الثلجي Glacial acetic acid (منظم pH)

حرك المزيج لمدة ساعة في حرارة الغرفة ثم رشحه عند الضرورة واحفظه في زجاجات مغلقة.

ملاحظة: هذا المحلول أحادي الجرعة من أجل الدراسات السيتولوجية (نحو٣ دقيقة) هناك محلول ثلاثي الجرعة لدراسات أخرى مناعية.

الطريقة الثانية: تحضير هيماتوكسيلين حسب ماير Mayer's Hematoxylin solution أمزج ما يلي:

١- (٥٠غ) سلفات الألمنيوم والبوتاسيوم Aluminum potassium sulphate

٢- (١٠٠٠ مل) ماء مقطر Distilled water

٣- (١غ) هيماتوكسيلين Hematoxylin

٤- (٠,٢غ) يود الصوديوم Sodium iodate

٥- (٢٠ مل) حمض الخل الثلجي Glacial acetic acid

ثانياً – الانقسام الخيطي Mitosis

التوضيح النظري:

من الضروري لحدوث النمو والتكاثر في الكائنات الحية أن تكون لخلاياها كلها أو بعضها القدرة على الانقسام، الذي تنتقل من خلاله العوامل الوراثية من الخلايا المنقسمة إلى الخلايا الناتجة عن الانقسام. ويطرأ على الخلية الحية ثلاثة أنماط من الانقسامات وهي: الانشطار ، والانقسام الخيطي، والانقسام المنصف.

– يُلاحظ **الانشطار** بشكل رئيس في خلايا الكائنات البسيطة مثل الجراثيم وبعض الطحالب ووحيدات الخلية، حيث يتشكل انخماص في وسط الخلية فتنقسم السيتوبلاسما والنواة إلى قسمين متشابهين تماما وهذا ما يسمى الانشطار الثنائي Binary fission. وقد تتشكل خليتين غير متساويتين نتيجة انخماص طرفي كما في الخمائر من الفطريات وهذا ما يسمى التبرعم budding.

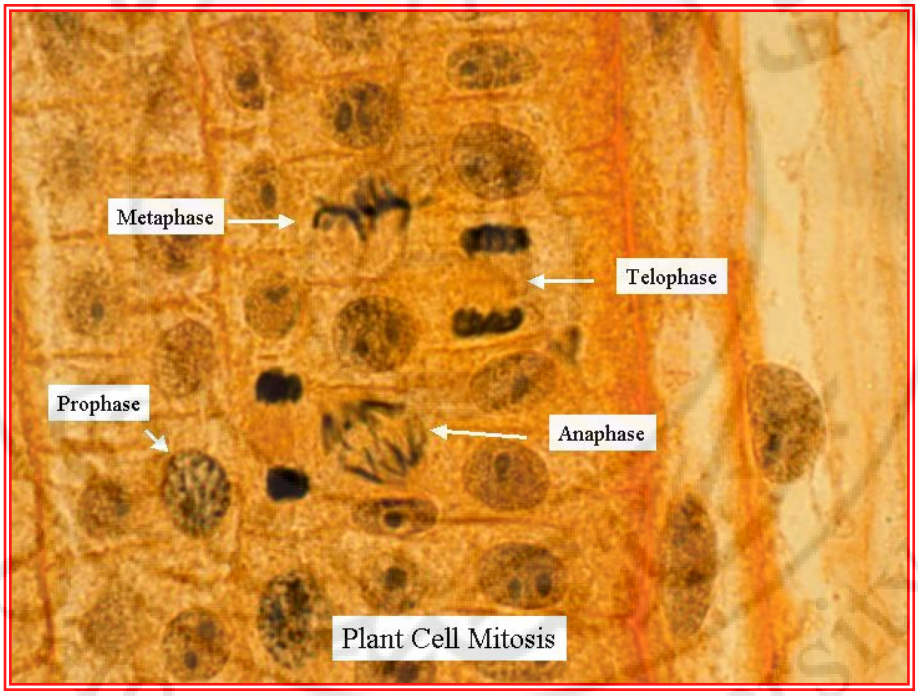
– يُلاحظ **الانقسام الخيطي** أو الميتوزي Mitosis في الخلايا الجسمية للكائنات الراقية وبعض خلايا الكائنات الدنيا، ويتحقق فيه انقسام الخلية الأم بآلية خاصة (تُعاني من اجتياز أربعة أطوار) معروفة تقود بالنهاية إلى تشكل خليتين بنتين شبيهتين بالخلية الأم.

– يُلاحظ **الانقسام المنصف Meiosis أو** الاختزالي في الخلايا الأم الجنسية المولدة للأعراس المذكرة أو المؤنثة، وهذه الخلية تمر بانقسامين وثمانية أطوار تُعطي بنهايتها أربعةَ خلايا عروسية مُنصَّفة الصيغة الصبغية (1n) (أنظر القسم الثاني).

١– أطوار الانقسام الخيطي في ساحة المجهر:

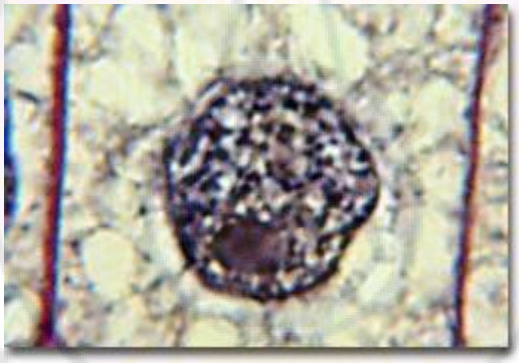
ينتمي الانقسام الخيطي إلى أحد الآليات البيولوجية المهمة لارتباطه الوثيق بنقل المعلومات الوراثية، ولهذا السبب يحوز اهتمام علماء الخلية الوراثيين

والباحثين في مجال الاصطفاء وتحسين الأنواع، ويمثل الانقسام الخيطي النمط المعقد الذي يصيب الخلايا الجسمية بالدرجة الأولى، ويؤدي هذا الانقسام من وجهة النظر الوراثية دوراً مهماً لأنه يوفر التوزيع الدقيق والعادل للمورثات إلى الخليتين البنتين الناتجتين عن الانقسام، ويمكن تمييز أربعة أطوار إضافة إلى الطور البيني الذي يمثل المرحلة الواقعة بين انقسامين متتاليين (شكل١)، ولن ندخل في تفاصيل هذه الأطوار وإنما سنتحدث عن كيفية تمييزها مجهرياً بشكل دقيق.



الشكل (١) أطوار الانقسام الخيطي في نهايات جذور الخلية النباتية ملاحظة من خلال مقطع مكروتومي، لاحظ أطوار: الأول Prophase، الثاني Metaphase، الثالث Anaphase، الرابع Telophase. جميع الخلايا غير المنقسمة هي في الطور البيني Interphase.

أ- الطور البيني Interphase: يضم القسم الأكبر من الخلايا المدروسة التي تبدو نواها محاطة بغشائها النووي، وتتميز تحت المجهر الضوئي بشكلها الكروي أو الإهليجي، وبشدة تلونها بالأصبغة المناسبة (الشكل٢). من الخطأ تسمية هذا الطور بطور الراحة لأن الخلية تُعاني فيه من نشاط بيوكيميائي ملحوظ، وتتوضع بداخلها مناطق لا تتعشق الأصبغة مطلقاً، ويُعتقد بأنها مناطق الكروماتين المغاير Heterochromatin. من السهل التعرف على خلايا الطور البيني مجهرياً لأنه يضم جميع الخلايا التي تظهر بشكل شبكة متماسكة ولا تُلاحظ فيها الخيوط الصبغية، علماً بأن المجهر الالكتروني يؤكد وجودها في هذا الطور; لا بل وبشكلها المضاعف (في المرحلة S أو مرحلة تركيب الـ DNA) .



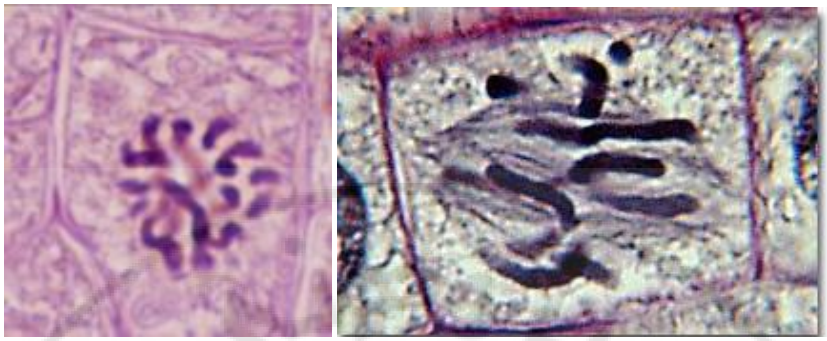
شكل (٢) الطور البيني كما يُلاحظ تحت المجهر.

ب - الطور الأول Prophase: يمكن تمييز أشكال مختلفة تتوافق مع درجة تلولب الصبغيات، وهكذا يزداد ثخنها بزيادة تلولبها، وتبدو النواة في المراحل الأولى مماثلة تقريباً بشكلها الخارجي لنواة الطور البيني، إنما يلاحظ بدء تشكل خيوط صبغية رفيعة جداً وملتفة على بعضها بشكل (كُبة الخيطان)، وتبقى النوية أو النويات واضحة داخل النواة في هذا الطور، وتبدأ بالتلاشي بعد زوال غشاء النواة في نهايته. أما في المرحل المتقدمة التي تقترب فيها الخلية من الطور الثاني فتبدو الخيوط الصبغية أكثر وضوحاً بسبب زيادة التلولب (الشكل٣)، ويرى

بعض الباحثين أن وضوح الصبغيات في الطور الأول المتأخر يُشكل طوراً ثالثاً يُدعى الطور طليعة الثاني Prometaphase، ومع ذلك لا يمكن إحصاء عدد الصبغيات في هذا الطور لتشابك الخيوط وتداخلها مع بعضها.

الشكل (٣) الطور الأول (المبكر والمتأخر) كما يُلاحظ تحت المجهر.

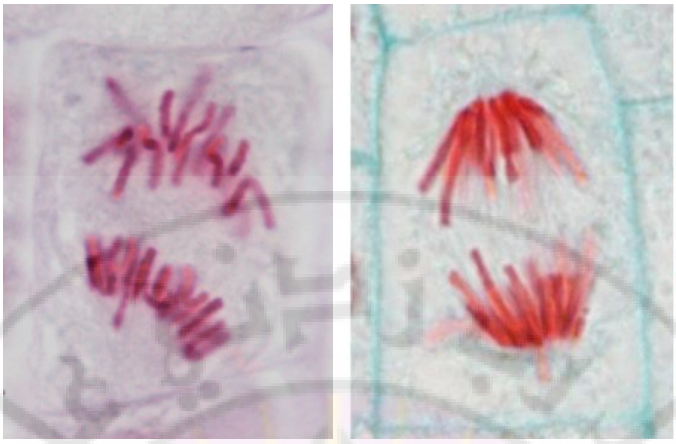
ج- الطور الثاني أو الاستوائي Metaphase: تبدو الصبغيات في هذا الطور ثخينة متداخلة ومتوضعة بشكل خطي في مركز الخلية، وقد يظهر كل صبغي منشقاً إلى صُبيْغيين Two chromatids يتصلان بجزيء مركزي واحد One centromere، حيث تتوضع الجُزيئات المركزية للصبغيات على اللوحة الاستوائية للخلية، كما تظهر خيوط المغزل Spindle fibers متصلة بالصبغيات عند جزيئاتها المركزية، حيث تمتد إلى قطبي الخلية المنقسمة فيما إذا كان المنظر جانبياً، أما إذا كان المنظر قطبياً فإن الصبغيات تتبعثر في الخلية وتملأ جوفها (الشكل٤)، ويمكن في هذه الحالة إحصاء العدد الصبغي بشكل تقريبي.



الشكل(٤) الطور الثاني من المنظر الجانبي (يمين) ومن المنظر القطبي (يسار) كما يُلاحظ تحت المجهر.

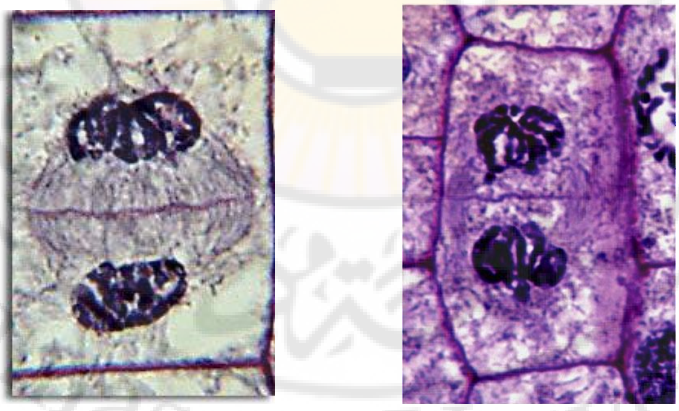
د- الطور الثالث أو الصعود Anaphase: تنشطر الجزيئات المركزية أفقياً في هذا الطور إلى نصفين متساويين ويتحرك صُبَيْغيي كل صبغي باتجاهين متعاكسين نحو القطب المقابل لهما، وتتدافع الصُبيغيات Chomatids (التي أصبحت منذ لحظة الانشطار صبغيات كاملة) ، وبذلك يصبح عددها عند كل قطب مساوٍ لعدد الصبغيات الأصلي. ويمكن تمييز الطور الثالث مجهرياً بهيئة هرمين من الصبغيات متقابلين بقاعدتهما(شبيه بخيوط المغزل)، ولا يلبثان أن يتباعدا في أواخر هذا الطور نظراً لانسحاب الصبغيات إلى القطبين(الشكل ٥).

هـ - الطور الرابع أو النهائي Telophase: يبدو تحت المجهر بشكل كتلتين شديدتي الاصطباغ في قطبي الخلية، وقد يلاحظ بداية ظهور حاجز في وسطها وذلك بتكوين الصفيحة الخلوية Cell plate، التي يستمر نموها حتى تصل إلى جدار الخلية ويتم بذلك انقسامها إلى خليتين متساويتين؛ ويتوضح الطور الرابع المتأخر بوجود خليتين لكل منهما نواة كاملة مستديرة إلا أنها أصغر حجماً من نواة الخلية الأم (الشكل ٦).



الشكل (٥) الطور الثالث Anaphase (الهجرة) كما يُشاهد تحت المجهر: يمين المبكر Early anaphase يسار: المتأخر Late anaphase.

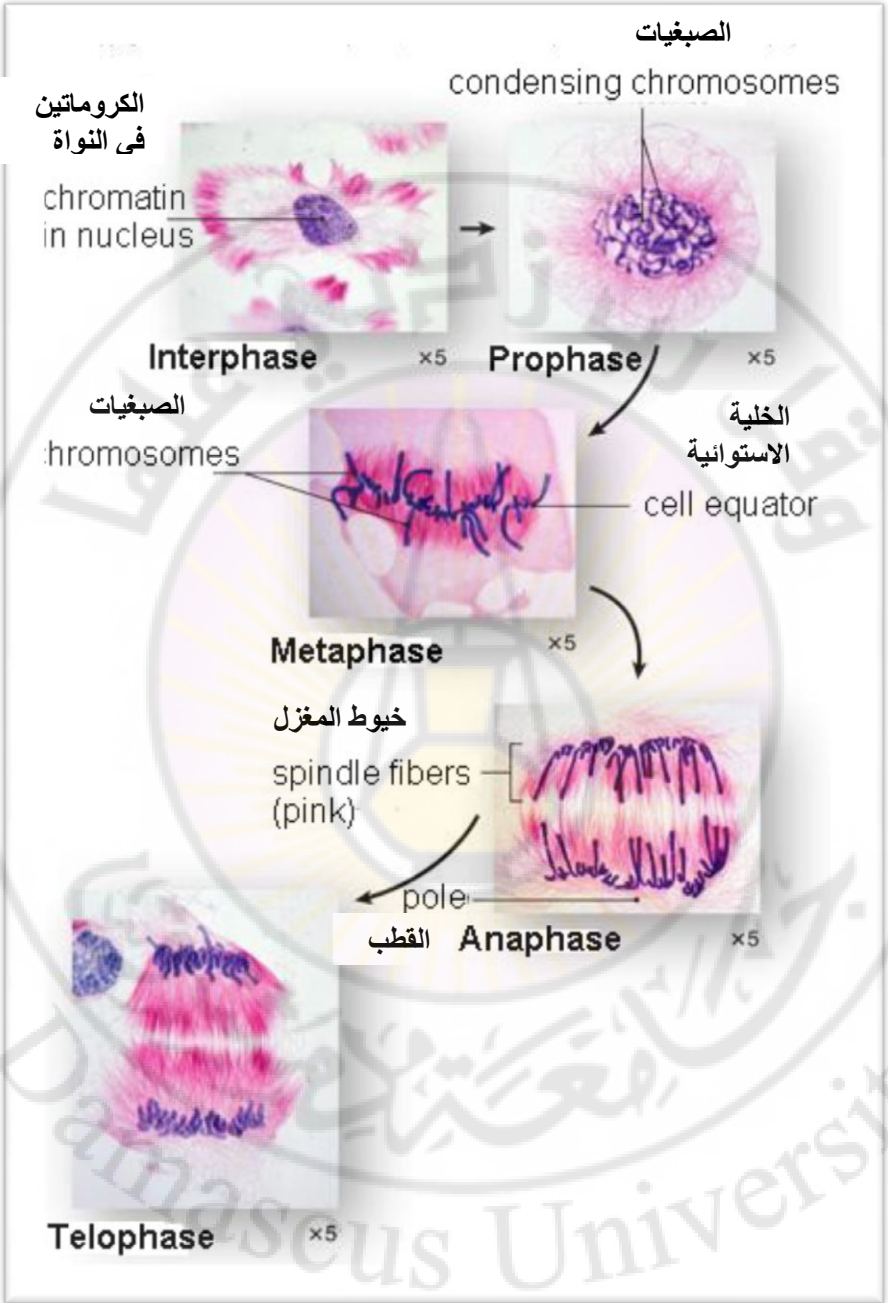
تدخل في هذه الحالة مرحلة الانقسام السيتوبلاسمي (الحرائك الخلوية) Cytokinesis وذلك بعد انتهاء مرحلة الانقسام النووي (الحرائك النووية) Karyokinesis.



الشكل (٦) الطور الرابع Telophase (النهائي) كما يُشاهد تحت المجهر: يمين المتأخر Late telophase يسار المبكر: Early telophase

يفضل، بالنسبة للدراسات الإحصائية، ألا يحسب الطور الرابع المتأخر في جداول الخلايا المنقسمة حرصاً على صحة النتائج نظراً لدخول خلاياه في الطور البيني (المرحلة G_1). ويوضح (الشكل٧) أطوار الانقسام الخيطي من خلال المقاطع الميكروتومية، بينما يوضح (الشكل٨) تتالي الأطوار الانقسامية انطلاقاً من الطور الأول وصولاً إلى الطور الرابع.

شكل (٧) صورة مجهرية لمقطع ميكروتومي توضح أطوار الانقسام الخيطي في مرستيم جذر البصل (بالتكبير الضعيف) .



الشكل (٨) تتالي أطوار الانقسام الخيطي لخلية مرستيم جذر نباتي (بالتكبير القوي)

التطبيق العملي:

١-تطبيقات الانقسام الخيطي:

هناك اختباران مهمان يستعملهما الباحثون لدراسة تآثر Interaction الانقسام الخيطي مع المؤثرات المختلفة سواء فيزيائية أو كيميائية، طوعية أو مُحدثة وهما:

- الأول اختبار البصل *Allium test*، تُستعمل فيه جذور البصل لسهولة الحصول على الخلايا المنقسمة وسهولة تمييز الأطوار في هذه النهايات ومتابعتها.

- الثاني اختبار الإنعاش (الإفاقة) Recovery test، حيث تتعرض نهايات الجذور إلى المؤثرات المختلفة كيميائية كانت أم فيزيائية ومن ثم تثبت خلال فترات زمنية متتابعة بحيث تبقى بعد المؤثر في الماء إلى حين التثبيت بهدف تخليصها من المؤثر، وهكذا تُجرى عملية نزع العامل المؤثر من الجذور المعالجة بوساطة الماء، ومن ثم متابعة ما يمكن حدوثة من خلال دراسة قرينة الانقسام Mitotic index وغير ذلك من المشاهدات.

- وللحصول على شرائح اختبار البصل توضع الجذور، مع بصلتها الحاملة لها، في زجاجات خاصة مملوءة بالمادة المؤثرة أو المطفرة بدلاً من الماء، أو تُعرَّض الجذور لعوامل فيزيائية كالأشعة ومن ثم تُصنع المحضرات المناسبة وتُدرس التأثيرات على مسيرة الانقسام الخيطي وعلى الصبغيات. من هذه المؤثرات نجد المواد الكيميائية المُحدِثة للطفرات، والمبيدات بأنواعها المختلفة، والكولشيسين، ومعرقلات تشكل المغزل الانقسامي الأخرى وغيرها كثير، إضافة إلى ذلك يمكن استعمال اختبار الإنعاش على الانقسام الخيطي (وغالباً في جذور البصل). ومن أهم نتائج الاختبارات نجد الآتي:

أ- انعدام الانقسام الخيطي بتأثير المعاملات الكيميائية باستمرار الخلايا بانقسامها حتى انتهائها من الطور الرابع، وبالتالي من المحتمل منع حصول الطور الأول مجدداً.

ب- توقف الانقسام وتجمعه في الطور الأول باستعمال مواد أخرى. وتوقف الانقسامات عند الطور الاستوائي وتشكل C-mitosis (الميتوز المكلشن)، أي باستعمال الكولشيسين المعيق لتشكل خيوط المغزل ولاستمرار الأطوار الانقسامية بعد الطور الثاني، إضافة إلى تشكل نوى مضاعفة 4n .وغيرها...

ج- إحداث طفرات صبغية أو وراثية وتشكيل نوى صغيرة في الطور الرابع .....الخ

٢-تجهيز محضرات الهرس Squash:

يتوجب على الباحث قبل حصوله على المحضرات المجهرية سواء أكانت بعملية الهرس (محضرات مؤقتة) أم بوساطة المقطاع المجهري Microtom (محضرات دائمة)، أن يراعي انتقاء الصفيحة المجهرية والساترة بشكل جيد. والمعروف أن المجهر الضوئي العادي يتميز بوجود عدسات تسمح برؤية النسج الموجودة على صفائح ذات سماكات محددة، فمثلاً يجب أن لا تزيد المسافة بين العدسة الغاطسة والصفيحة على ٠,١-٠,١٢ مم، وهذا يعني أن الصفائح السميكة نسبياً غير صالحة للاستعمال بوجود العدسات قوية التكبير، وعلى ما يبدو فإن السماكة المفضلة للصفائح المجهرية تتراوح من ١-١٢ مم، أما سماكة الساترات فلا تزيد على ٠,١٧ مم، بالإضافة إلى ذلك يجب أن تكون الصفائح المجهرية نظيفة وخالية من آثار النسج السابقة أو من طبقات الدهون والمواد الدسمة التي قد تغطي سطحها فتعيق التصاق المواد الجديدة عليها بشكل مقبول.

للحصول عل محضرات الهرس Squash الخاصة بالانقسام الخيطي يمكن اللجوء إلى الخطوات الاتية:

أ- ترفع الجذور من المادة الملونة أو من الكحول المحفوظة فيه، وتوضع على صفيحة نظيفة.

ب- تقطع النهايات الميرستيمية بطول (٢) مم فقط، ويجب الانتباه إلى هذه النهاية التي تبدو أشد تلوناً من الطرف الآخر إلى جانب كونها مؤنفة.

جـ- توضع قطرة صغيرة من حمض الخل ٤٥% ، بهدف تفكيك النسج الخلوية عن بعضها لتسهيل هرسها' ثم تغطى بساترة، وتسخن بلطف على نار هادئة على أن يتوخى الحذر من تطاير الساترة بعد غليان الحمض؛ ويمكن استعمال مواد أخرى مثل حمض كلور الماء النظامي أو بعض الأنزيمات وغيرها.

د- تبعد الصفيحة عن النار ويهرس النسيج بمؤخرة عود ثقاب للحصول على نسيج متجانس بشكل لا تتوضع فيه خلية فوق أخرى.

هـ- يُسحب السائل الزائد بورقة ترشيح ويدرس تحت المجهر.

٣ - مظاهر الانقسام الخيطي في النباتات الدنيا أحادية الصيغة الصبغية:

- **في الطحالب Algae:**

يمكن دراسة مظاهر الانقسام الخيطي في بعض الطحالب مثل السبيروجيرا *Spirogyra* وذلك وفقاً لما يأتي:

تترك الطحالب الشريطية كي تنمو على شرائح زجاجية مغطاة بالآغار السكري، حيث يتم حفظها بالرطوبة والظل، ومع بدء نمو الخلايا توضع الشرائح الحاملة للطحالب في محلول مائي للكولشيسين ٠,٠١%-٠,٠٥% لمدة ٤-٦ ساعات، ثم تغسل بالماء وتلون بالكارمن الخلي لمدة ٢٠-٣٠ دقيقة ثم تُحمَّل بالغليسرين الخلي (١٠ مل غليسرين + ٩٠ مل حمض الخل ٤٥%).

لتحضير الآغار السكري اللازم لنمو الطحالب نضع ١غ آغار مع٥غ سكر القصب (سكاروز) و١٠٠ مل ماء مغلي في وعاء ضمن حمام مائي حتى التجانس، ويسكب بعد التبريد فوق خيوط الطحالب الموضوعة فوق الشريحة. يتم البحث عن الانقسام الخيطي ضمن الخلايا النامية (الشكل٩):

(A) (B)

الشكل (٩) صبغيات السبيروجيرا *Spirogyra triformis* ملاحظة في الطور الأول Pro phase (n=6).

(A)– صورة. (B)– مخطط. (لاحظ وجود المنظم النووي على صبغيين من الصبغيات الستة)

- **في البريويات Bryophytes:**

من الصعب تلوين خلايا البريويات، ويستعمل عادة الكارمن الخلي وأحياناً الأرسين الخلي، الذي يتم تحضيره مثل الكارمن الخلي إنما بتركيز أعلى (٢غ أرسين Orcein +١٠٠ مل حمض خل ٤٥%)، وهذا يُحفظ كمحلول ٢% ويمدد بحمض الخل ٤٥% قبل الاستعمال مباشرة حسب الطلب).

يحصل في عليبات البريويات الانقسام المنصف، ويتحقق بعد استطالة النبات البوغي في العليبة النامية تحت البرقع، في حين يُدرس الانقسام الخيطي في أشباه الأوراق الفتية.

تحويل محضرات الهرس إلى محضرات دائمة:

في كثير من الحالات تبدو محضرات الهرس جيدة ومناسبة للحفظ، ولذلك نلجأ إلى طرائق خاصة لرفع الساترة عن المحضر دون أن يُلحق بالنسيج أي ضرر، وتعد طريقة التبريد الشديد للمحضرات من أفضل الطرائق محافظة على النسيج الخلوي، ويتم التبريد عادة باستعمال غاز الفحم المضغوط (الجليد الجاف) ضمن أسطوانات خاصة، أو بالآزوت السائل.

وهكذا نضع المحضر الذي نرغب بنزع ساترته فوق مسحوق غاز الفحم المضغوط (الجليد الجاف) لمدة (١-٢) دقيقة، بحيث تتجه الساترة نحو الأعلى، وبعد أن يصبح لون الصفيحة الملامسة لمسحوق غاز الفحم أبيضاً كدليل التجمد الشديد، ترفع الساترة بهدوء من أحد أطرافها الأربعة باستخدام شفرة عادية، ونستطيع تقدير نجاح الطريقة فيما إذا بقي النسيج بشكل كامل على الصفيحة ولم يبق أي أثر منه عالقاً على الساترة، وبعد مرور (٢٠) دقيقة من رفع الساترات تجرى على الصفائح الخطوات الآتية:

١) تجفف النسج من مائها بوضعها في الكحول الإيتيلي ٩٦% ثم بالكحول المطلق١٠٠% لمدة ١٠ دقائق في كل مرة.

٢) تنقل الصفائح إلى الكسيلول لمدة ٢٠ دقيقة.

٣) تلصق ساترة نظيفة على الشريحة وذلك بعد وضع قطرة صغيرة من بلسم كندا عليها مع الانتباه إلى عدم دخول فقاعات هوائية، ثم يترك المحضر حتى جفاف البلسم ويحفظ لسنوات طويلة جداً.

بالنسبة للمحضرات التي لا تملك أهمية كبيرة يمكن أن تحول إلى محضرات نصف ثابتة، أي إنها تحفظ لفترة محددة لا تزيد على بضعة أشهر ثم لا تلبث أن تعطب ويتم ضغط هذه المحضرات بعدة طرائق منها:

آ- الطريقة الأولى:

بعد رفع الساترة بعملية التبريد أيضاً، وبعد أن يجف النسيج المدروس فوق الصفيحة المجهرية توضع قطرة صغيرة من مزيج الغليسرين الجيلاتيني، ثم يغطى المحضر بساترة ويضغط عليها بعود ثقاب ويترك حتى التجمد حيث يحفظ للدراسة، ويمكن تحضير الغليسرين الجيلاتيني كما يأتي:

يضاف إلى حوجلة زجاجية لكل (١غ) من الجيلاتين مقدار (٦ مل) ماء مقطر، ويترك لمدة ساعتين للانتفاخ، بعد ذلك يضاف إلى المزيج السابق مقدار (٧ مل) من الغليسرين (لكل١غ جيلاتين أيضاً) وبلورة صغيرة من الفينول، يسخن المزيج النهائي في حمام مائي مع التحريك المستمر باستعمال قضيب زجاجي حتى الغليان وحتى يزول لونه الشفاف.

يلاحظ بعد مرور فترة من الزمن أن مزيج الغليسرين الجيلاتيني قد أصبح كتلةً جامدة متماسكة، لذلك يوضع قبل الاستعمال في حمام مائي حتى الذوبان.

ب- الطريقة الثانية:

نرفع الساترة بالطريقة السابقة نفسها، ثم توضع قطرة صغيرة من محلول السكاروز(القطر) بدلاً من محلول الغليسرين الجيلاتيني وتغطى بساترة نظيفة.

ويمكن تحضير محلول السكر بالطريقة التالية:

نضع في حوجلة زجاجية (٢٠٠غ) سكاروز و(٤٠٠غ) ماء مقطراً أو ما يعادلها، وبلورة واحدة من الثيمول. يسخن على النار حتى يصل حجم السائل إلى النصف وبهذا الشكل يمكن استعماله مباشرة وبصورة دائمة، يمكن حفظ

المحضرات المثبتة باستخدام محلول السكر لمدة تصل إلى السنتين إلا أن جفاف المحلول فوق الصفيحة يحتاج لمدة أطول بكثير من جفاف الجيلاتين الغليسريني.

المطلوب:

١- استنبات بذور الفول والبازلاء في طبق بتري واحد، مع ملاحظة أنه يجب ترك هذين النوعين من البذور في الماء قبل الاستنبات لمدة (٢٤) ساعة.

٢- استنبات بذور البصل والبندورة في طبق بتري واحد، مع ملاحظة أن إنتاش هذين النوعين من البذور متفاوت من حيث الزمن.

٣- تحديد أطوال الجذور التي تتوافق مع ظهور الانقسامات الأولى لبعض النباتات المستنبتة، وذلك بوساطة التثبيت المتلاحق مع النمو الطولي لها.

٤- تثبيت خمسة جذور على الأقل من كل نوع من البذور الأربعة المستنبتة بهدف دراستها، ومن ثم حفظها في الكحول تركيز ٧٥-٨٠%.

٥- تلوين الجذور بأحد الملونات المذكورة في النص.

٦- صنع مجموعة من محضرات الهرس ومتابعة ورسم جميع الأطوار الانقسامية.

٧- تثبيت بعض الشرائح الجيدة بطريقة التبريد الشديد وباستعمال بلسم كندا.

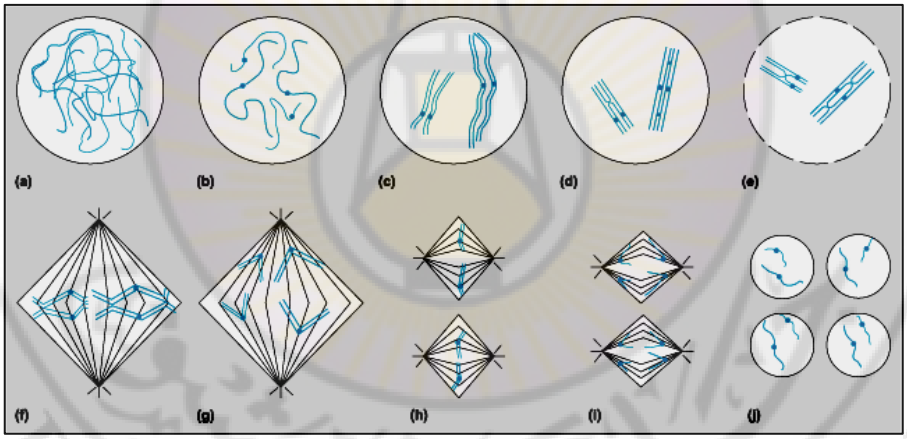
٨- تثبيت بض المحضرات بالجيلاتين الغليسيريني وبمحلول السكاروز (القطر).

القسم الثاني

الانقسام المنصف Meiosis

التوضيح النظري:

يمثل الانقسام المنصف نمطاً خاصاً من الانقسامات كونه يحصل في الخلايا الجنسية المولدة للأعراس المذكرة والمؤنثة. وهكذا تتشكل بنهاية الانقسام المنصف في الخلايا الأم المولدة للأبواغ الدقيقة لدى الأعضاء التكاثرية المذكرة (المآبر)، رباعيات Tetrads الأبواغ، وهي التي تعطي بتمايزها حب الطلع (الشكل١٠) و(الجدول١).



الشكل(١٠) مخطط صبغي يوضح مراحل وأطوار الانقسام المنصف في الخلايا الأم المولدة لحب الطلع:

a– خلية أم مولدة لحبوب الطلع، b– مرحلة الخيوط الرفيعة، c– مرحلة التزاوج، d– مرحلة التضاعف والثخن،e– مرحلة التشتت، f– الطور الثاني I ، g– الطور الثالث I ، h– الطور الثاني II ، i– الطور الثالث II ، j– الطور الرابع (الأبواغ الأربع).

بالمقابل تتشكل بنهاية الانقسام المنصف في الخلايا الأم المولدة للأبواغ الكبيرة لدى الأعضاء التكاثرية المؤنثة (المدقات)، أربعة أبواغ كبيرة تزول ثلاثة منها

لتبقى واحدة وهي التي تعاني من ثلاث انقسامات خيطية تُشكل في النهاية الكيس الجنيني ثماني النوى (الجدول٢) و(الشكل١١). ويلاحظ نقصان العدد الصبغي في الخلايا العروسية المذكرة والمؤنثة إلى النصف ليعود مضاعفاً بعد الإلقاح.

الجدول(١) مخطط يوضح أطوار ومراحل الانقسام المنصف في الخلايا المولدة لحب الطلع

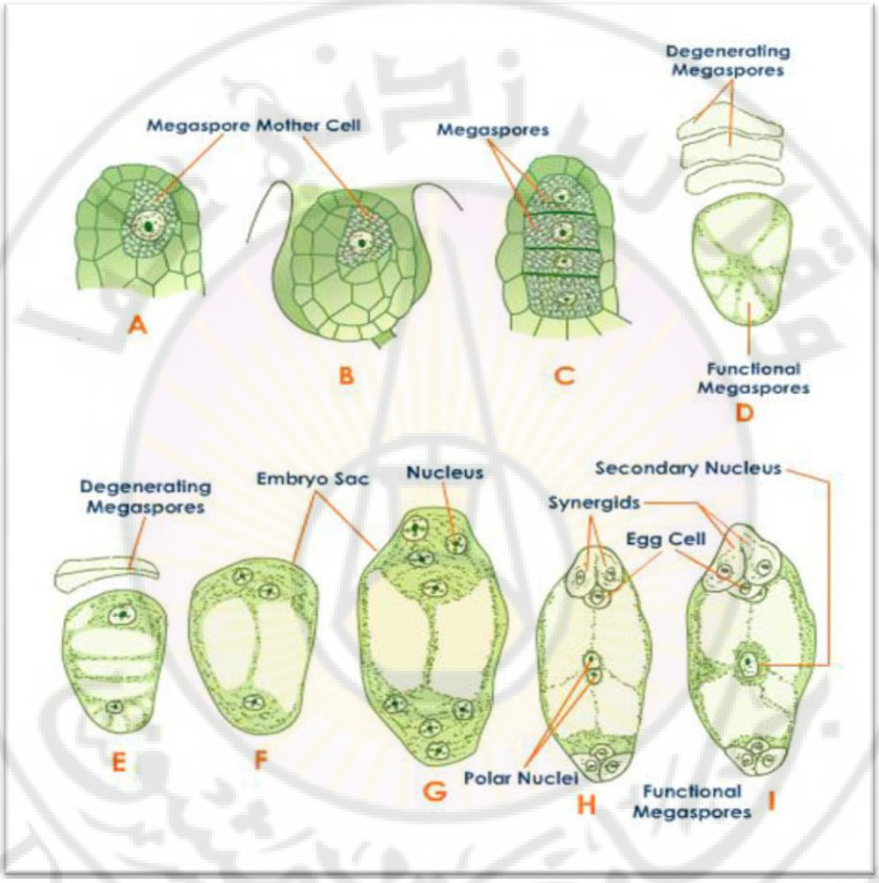
Meiosis	First meiotic division الانقسام المنصف I	الطور الأول Prophase I	Leptotene خيوط رفيعة Zygotene تزاوج Pachytene ثخن Diplotene تضاعف Diakinesis تشتت
		Metaphase I	
		Anaphase I	
		Telophase I	
		Interkinesis	
	Second Meiotic Division الانقسام المنصفII	Prophase II	
		Metaphase II	
		Anaphase II	
		Telophase II	

تتضمن عملية تشكل الخلايا الجنسية في كل من المأبر والمدقات مرحلتين هما مرحلة تشكل الأبواغ التي تعطي الخلايا الفردية (n١)، ومرحلة تشكل الأعراس.

الجدول (٢) مخطط يوضح أطوار ومراحل الانقسام المنصف في الخلايا المولدة للكيس الجنيني.

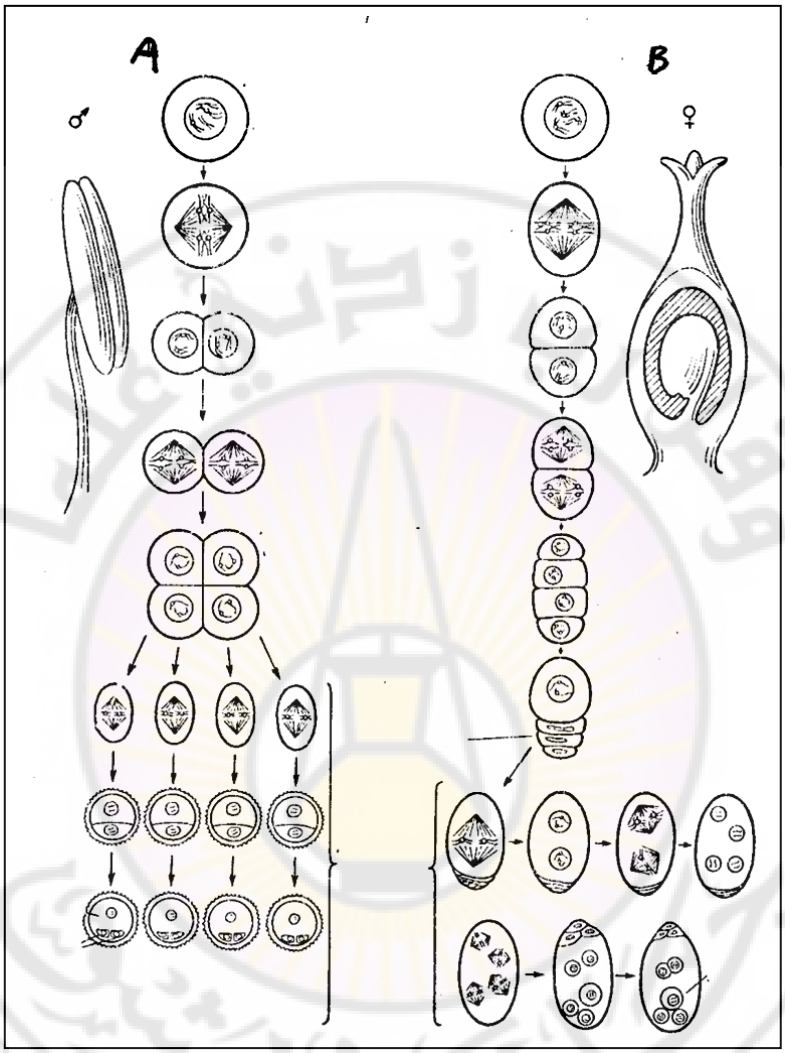
وهكذا نجد مرحلة تشكل الأبواغ الدقيقة microsporogenesis (حتى الرباعيات) ومرحلة تشكل الأعراس الدقيقة microgametogensis (حتى نضج حب الطلع) في الخلايا الجنسية المذكرة؛ بينما نجد مرحلة تشكل الأبواغ الكبيرة

megasporogenesis (حتى الرباعيات) ومرحلة تشكل الأعراس الكبيرة megagametogenesis (ظهور الكيس الجنيني ثُماني النوى الناضج الذي يحتوي البويضة) في الخلايا الجنسية المؤنثة (الشكل١٢).



الشكل (١١) مراحل وأطوار الانقسام المنصف في الخلايا المولدة للكيس الجنيني

A,B– خلية أم مولدة للكيس الجنيني، C– نهاية الانقسام المنصف وتشكل أربع نوى، D– زوال ثلاث نوى وبقاء واحدة، E– نهاية الانقسام الخيطي الأول وتشكل نواتينF–نهاية الانقسام الخيطي الثاني وتشكل أربع نوى، G– نهاية الانقسام الخيطي الثالث وتشكل نمان نوى، H,I– تشكل الكيس الجنيني ثماني النوى.



شكل (١٢) مقارنة بين مرحلتي تشكل حب الطلع و الأكياس الجنينية في النباتات الزهرية:

A- مخطط الانقسام المنصف في المآبر حتى الرباعيات (مرحلة الأبواغ الدقيقة)، وصولاً إلى تشكل حبوب الطلع ذات النواتين (مرحلة الأعراس الدقيقة).

B- مخطط الانقسام المنصف في المبيض حتى الرباعيات (مرحلة الأبواغ الكبيرة)، وصولا إلى زوال ثلاثة نوى وحصول ثلاثة انقسامات خيطية على النواة الباقية وتشكل الكيس الجنيني (مرحلة الأعراس الكبيرة).

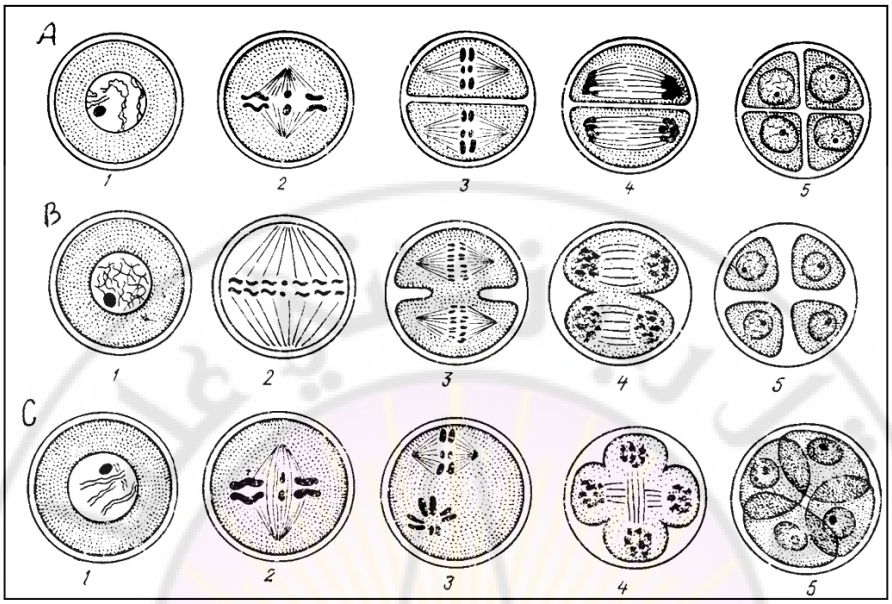
أنماط تشكل الأبواغ الدقيقة:

تجدر الإشارة إلى أنه يمكن تمييز نمطين مختلفين خلال تشكل الأبواغ الدقيقة في مغلفات البذور وهما:

– النمط المتتابع الذي يلاحظ في أحاديات الفلقة (زنبق، جودار، قمح، ذرة، وغيرها..)، حيث يترافق كل طور من اطوار الانقسام بظهور حاجز يفصل الخلايا عن بعضها.

– النمط المتواقت الذي يحصل بوقت واحد وبذلك لا تظهر الحواجز الفاصلة بين الخلايا المنقسمة إلا في نهاية الانقسام الثاني، ويلاحظ في النباتات ثنائيات الفلقة (بازلاء، قطن، عباد الشمس، بندورة وغيرها) (الشكل١٣).

تضم حبة الطلع غير الناضجة (البوغة) في البداية نواة فردية واحدة لا تلبث أن تبدأ فيها مرحلة تشكل الأعراس الدقيقة، وهكذا تنقسم النواة إلى نواتين لتظهر الخلية التوالدية والخلية الإعاشية التي تحوي المدخرات الغذائية اللازمة لنمو الأنبوب الإلقاحي، أما نواة الخلية التوالدية فإنها تنقسم لتعطي نطفتي الإلقاح الفرديتين، وتجدر الإشارة إلى أن استمرار الانقسام الخيطي لنواة حبة الطلع (ميتوز الهابلوئيد) يرتبط مع شروط الوسط الخارجي (حرارة، رطوبة، هواء..الخ)، ومع طبيعة الغذاء المقدم للأبواغ الدقيقة، ومع خصائص تطور الطبقات المغذية للمئبر.



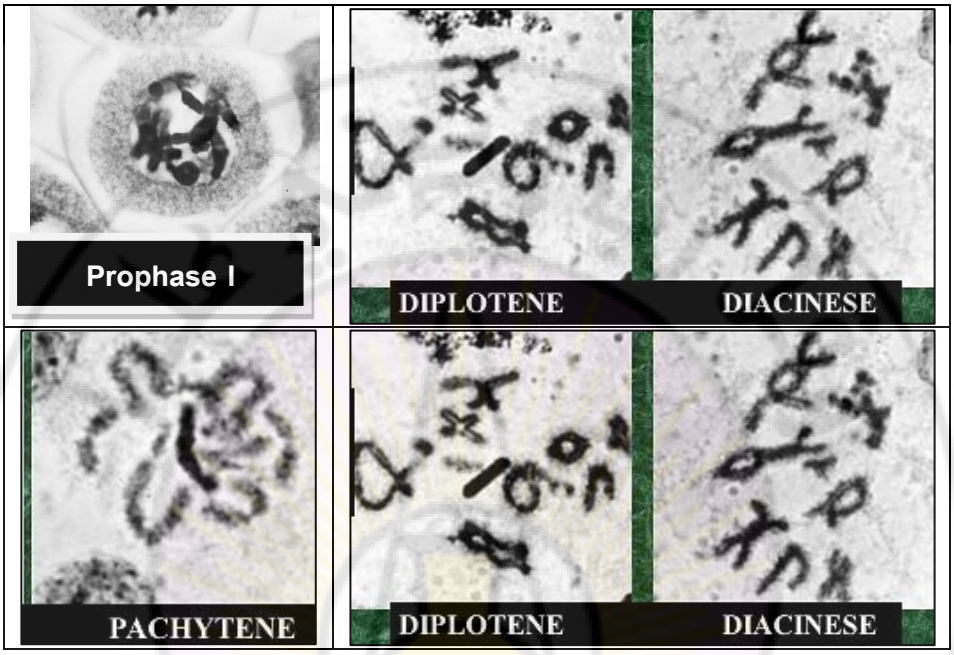
الشكل (١٣) أنماط تشكل الأبواغ الدقيقة (حبات الطلع) في مغلفات البذور:
A- في أحاديات الفلقة حيث النمط المتتابع. B- نمط متوسط.
C- في ثنائيات الفلقة حيث النمط الذي يتشكل فيه الحاجز في نهاية الانقسام (بوقت واحد).
(تشير الأرقام ١-٢ إلى الانقسام I، والأرقام ٣-٥ إلى الانقسام II).

أولا - أطوار الانقسام المنصف المذكر تحت المجهر:

كما هو مُلاحظ في (الجدول١) و(الشكل١٠) ينتهي الانقسام المنصف المذكر بنهاية انقسامين متتاليين (في كل منهما أربعة أطوار): الأول اختزالي تتشكل بنهايته خليتان مُنصَّفتا العدد الصبغي الأصلي، والثاني خيطي يأتي بعد انتهاء طور بيني قصير جداً تتوزع فيه الصبغيات بصورة متساوية.

تبدو الخلايا الأم والخلايا المنقسمة الأخرى كروية المظهر تقريباً وهذا ما يميزها عن الخلايا المرستيمية التي تعاني من الانقسام الخيطي. وفيما يأتي نتطرق إلى عرض سريع لأطوار الانقسام المذكر وطريقة تميزها بالمجهر.

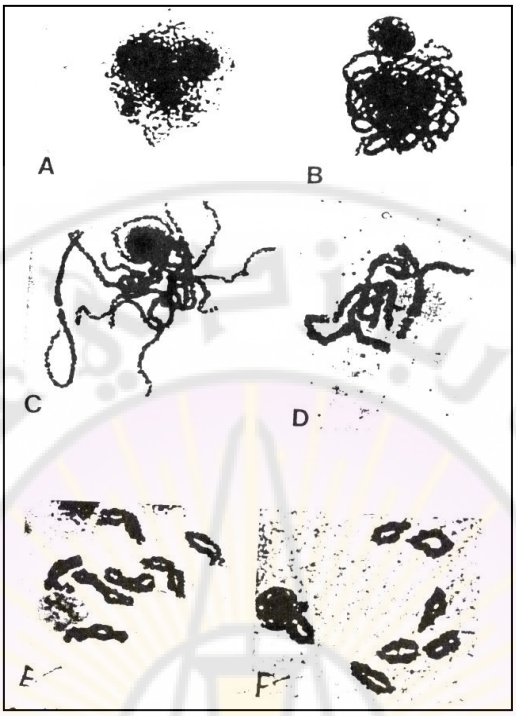
١- **الطور الأول Prophase I , I:** يعدّ من أعقد أطوار هذا الانقسام وأطولها زمناً ويتألف من خمس مراحل (الشكل ١٤) و (الشكل١٥) وهي:



الشكل (١٤) صور مجهريه توضح الطور الأول I ومراحله الخمس من الانقسام المنصف الذي يؤدي إلى تشكيل الأعراس المذكرة.

أ- مرحلة الخيوط الرفيعة Leptotene: تبدو فيها الصبغيات متداخلة مفردة الخيط إلا أن المجهر الالكتروني يُظهر طبيعتها المضاعفة بكل وضوح، وتبدو بشكل كتلة خيطية شديدة الاصطباغ تتوضع حول نوية كبيرة أو أكثر شديدة الوضوح.

ب- مرحلة التزاوج Zygotene: تقترب الصبغيات المتماثلة Homologous chromosomes من بعضها لتحقق تقابلاً صبغياً ومورثياً كاملاً، ومن الصعب تمييز هذه المرحلة مجهرياً لكنها تبدي ثخانة ملحوظة مقارنة مع المرحلة السابقة.



الشكل(١٥) صور فوتوغرافية (بالتكبير القوي) توضح المراحل الخمس للطور الأول I في نبات الشعير (2n=14) بعد المعالجة بالكارمن البربيوني: A- مرحلة الخيوط الرفيعة. B- مرحلة التزاوج. C- مرحلة الثخن. D- مرحلة التضاعف (مبكر). E- مرحلة التضاعف (متأخر). F- مرحلة التشتت (لاحظ وجود سبع أشفاع صبغية وأحدهما مرتبط بالنويَّة).

ج- مرحلة الثخن Pachytene: تأخذ الثنائيات الصبغية Bivalents المتزاوجة بالثخانة والقصر نتيجة لزيادة تلولبها، وقد تلاحظ تحت المجهر الضوئي على شكل تجمعات خيطية مضاعفة وشديدة التكثف، وتُبنى كل ثنائية من تزاوج الصبغيين الأبوين المتماثلين، حيث تشكل كل ثنائية أربع صُبيغيات Chromatids.

د- مرحلة التضاعف Diplotene: تبدو الصبغيات في هذه المرحلة مضاعفة، أقصر من سابقتها، وقد يحصل عبور Crossing over بين الصُبيغيين الداخليين من كل صبغي، مما يؤدي إلى تبادل المعلومات الوراثية بين الآباء، وقد نتمكن من ملاحظة التصالبات Chiasmata (الكيازمات) تحت المجهر الضوئي والتي تبدو على شكل حروف (XXX) وهذا ما يميز مرحلة التضاعف بشكل واضح.

هـ- مرحلة التشتت Diakinesis: يتهيأ كل صبغي في هذه المرحلة للابتعاد عن رفيقه وتُعطي أشكالاً عديدة، كما تبدأ عملية زحف الكيازمات باتجاهين متعاكسين من ذراعي الصبغي المضاعف، حيث تتصل الصبغيات مع بعضها عند أطرافها فقط. فإذا كانت الصبغيات صغيرة فإنها تأخذ شكلاً دائرياً يشبه الرقم (o)، في هذه المرحلة نستطيع إحصاء العدد الصبغي، حيث إنه يعادل ضعف عدد هذه الأشكال التي يمكن ملاحظتها بسهولة تحت المجهر.

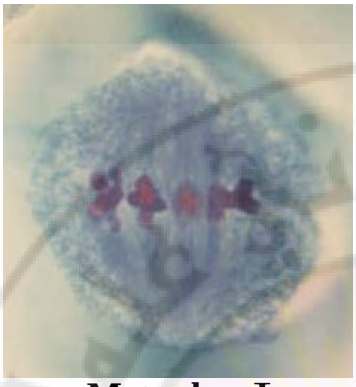
ملاحظة: يمكن اكتشاف بعض مراحل الطور الأول Prophase I مجهرياً بكل سهولة في البراعم الفتية الصغيرة، ويجب التنويه إلى أن ظهور هذه المراحل في أحد البراعم ينفي حتماً ظهور أي طور آخر، لأن الانقسام المنصف متواقت زمنياً في النبات، بالإضافة إلى ذلك تترافق مراحل الطور الأول بالنوية التي تبدو واضحة تحت المجهر إضافة إلى وجود الغشاء النووي.

وفيما يأتي نستعرض الأطوار الأربعة للانقسام المنصف الأولI (الشكلان ١٦،١٧).

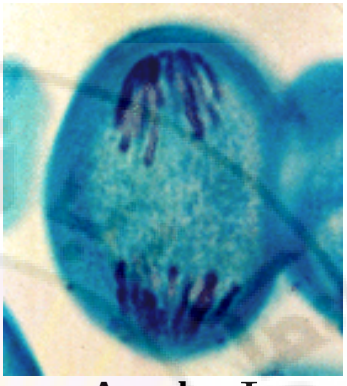
الطور الثاني Metaphase I , I:

يزول في هذه الطور الغشاء النووي ويكتمل تشكل خيوط المغزل وتتوضع أشفاع الصبغيات المتماثلة على اللوحة الاستوائية بشكل ثنائيات Bivalents، وتبدو من المنظر الجانبي للخلية كخط أفقي في مركزها، أما من منظرها القطبي

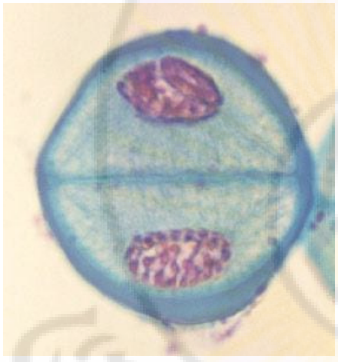
فتلاحظ الصبغيات مبعثرة وقد يسهل إحصاء عددها في هذه الحالة، حيث يبلغ عددها نصف عدد صغيات الخلية.



Metaphas I



Anaphas I



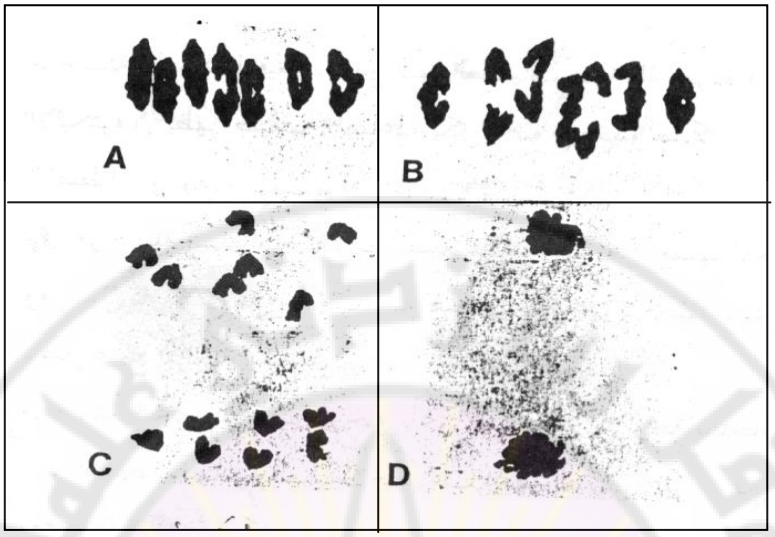
Telophas I

Prophase II

الشكل (١٦) صور فوتوغرافية توضح أطوار الانقسام المنصف الأول I إضافة إلى الطور الأول Prophase II , II من المنصف الثاني (لاحظ وضوح الخيوط الصبغية فيه).

الطور الثالث Anaphase I , I:

يبتعد في هذا الطور كل صبغي (مؤلف من صُبيغيين) عن رفيقه ويهاجر إلى أحد قطبي الخلية دون أن ينشطر الجزيء المركزي Centromere، وهذا هو السبب في تنصيف العدد الصبغي، كما وتتكمش خيوط المغزل، وعلى ما يبدو فإن



الشكل (١٧) صور فوتوغرافية (بالتكبير القوي) توضح الأطوار الثلاثة للانقسام الأول I في نبات الشعير (2n= 14) بعد التلوين بالكارمن البربيوني:A- الطور التالي I(M.I) (لاحظ وجود سبع ثنائيات Bivalents). B-الطور الثالث I (A.I) مبكر(لاحظ بدء فك ارتباط الثنائيات وهجرتها).C-الطور الثالث I (A.I) متأخر (لاحظ اكتمال هجرة الصبغيات السبعة المنصَّفة إلى القطبين).D- الطور الرابع I (T.I).

اكتشاف الطور الثالث مجهرياً في محضرات براعم البصل من الأمور الصعبة لأن الصبغيات تهاجر وتصل إلى الأقطاب بسرعة كبيرة، فإذا بنا أمام الطور الرابع، ولتمييز هذا الطور مجهرياً يجب البحث عن الخلايا التي يتوضع في مركزها صفان متقاربان من الصبغيات أي إن هذه الأخيرة ما زالت في بداية هجرتها إلى الأقطاب.

الطور الرابع Telophase I , I:

يمثل هذا الطور مرحلة الانتقال من الانقسام الأول (I) إلى الانقسام الثاني (II) ويتميز مجهرياً بوجود كتلتين صبغيتين شديدتي الاصطباغ في كل قطب من قطبي الخلية الأم، ونادراً ما يتشكل حاجز ناقص في وسط الخلية.

وتمر الخلية بعد ذلك بطور بيني قصير Short interphase (Interkinesis) تمهيدا للدخول في الانقسام الثاني دون تضاعف للمادة الوراثية.

الطور الأول Prophase II , II :

يتميز هذا الطور مجهرياً بوجود شبكتين من الخيوط الرفيعة داخل النواة وذلك في كل قطب من أقطاب الخلية المنقسمة، وقد يظهر حاجز في وسطها، وقد ينعدم هذا الطور من الناحية النظرية.

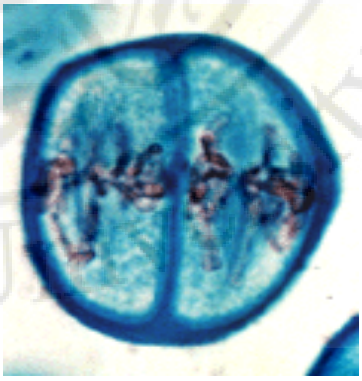
وفيما يأتي نستعرض باقي أطوار الانقسام المنصف الثاني II (الشكل ١٨):

الطور الثاني Metaphase II , II:

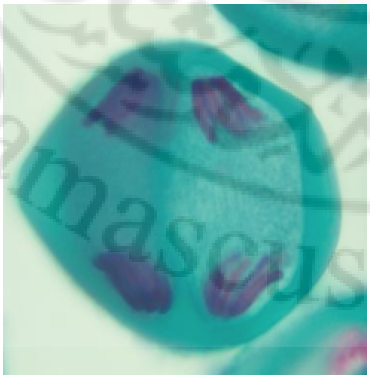
من السهل جداً تمييز هذا الطور وذلك لتشكل حاجز عمودي واضح يفصل بين خليتين يمينية ويسارية (في النمط المتعاقب)، أما الصبغيات فتتوضع أفقياً في وسط كل من هاتين الخليتين.

الطور الثالث Anaphase II , II :

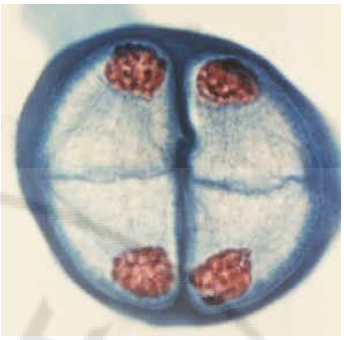
لا يختلف الطور الثالث عن الطور الثاني من حيث وضوح الحاجز العمودي، لكن الجزيئات المركزية للصبغيات تنشطر وتبدأ هجرة الصُبيغيات، ولذلك تبدو كخطين متقاربين في كل من الخليتين اليمينية واليسارية.



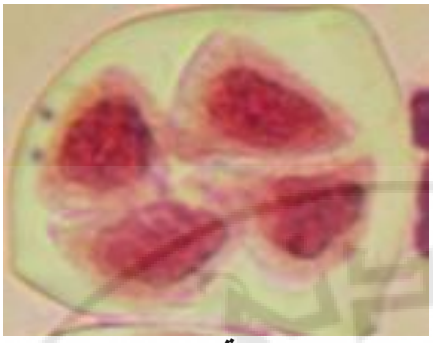
MetaphasII



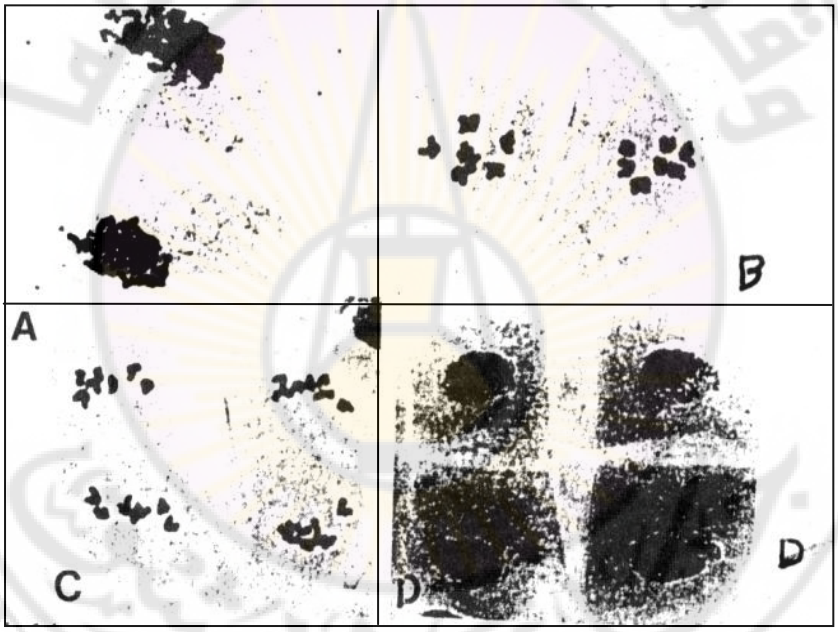
AnaphasII



Telophas II



Tetrad رباعية



الشكل (١٨) في الأعلى: صور فوتوغرافية توضح أطوار الانقسام المنصف الثاني II في مغلفات البذور

في الأسفل: صور فوتوغرافية توضح الأطوار الأربعة للانقسام II في نبات الشعير (2n=14) بعد التلوين بالكارمن البربيوني:

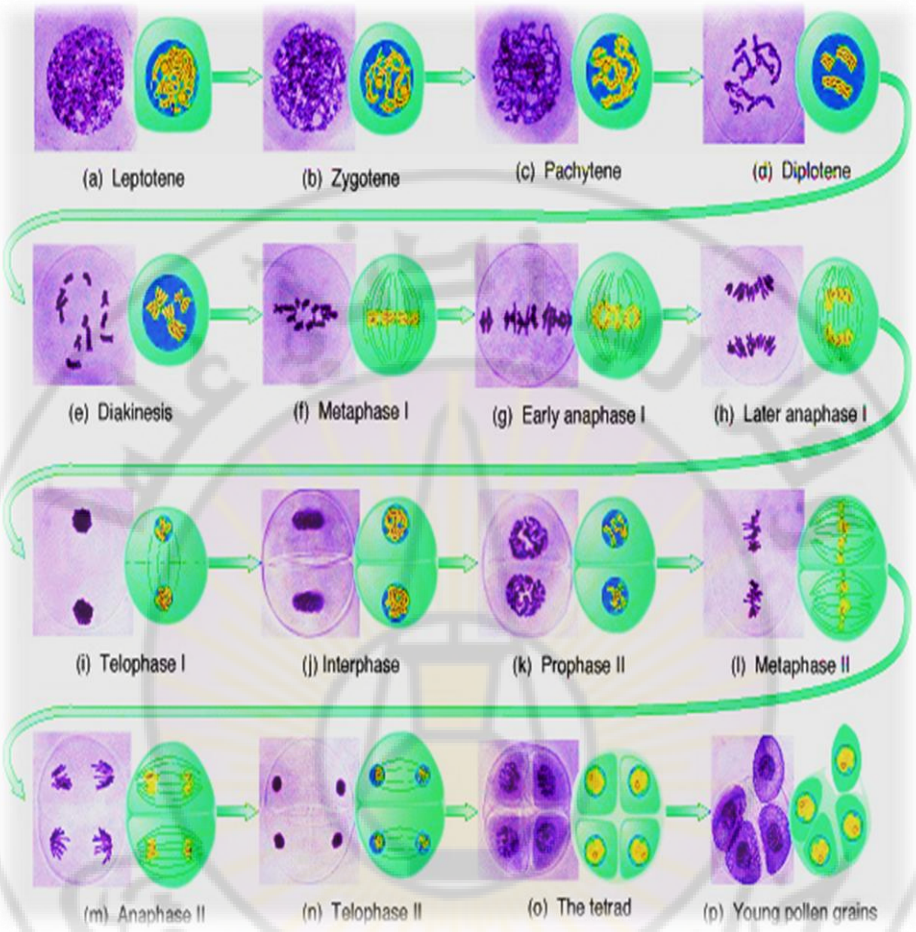
A- الطور الأول II (Pr. II). B- الطور الثانيII(M.II).

C- الطور الثالث II (A.II). D- الرباعيةTexrad.

الطور الرابع Telophase II , II:

يتميز هذا الطور مجهرياً بشكلين: الأول مبكر حيث تبدو الخلية الأم (بعد أن وصلت إلى نهاية الانقسام) بشكل مشابه للطورين السابقين إلا أن الصبغيات تتوضع بهيئة كتل شديدة الاصطباغ في الأقطاب الأربعة، والشكل الثاني متأخر يلاحظ فيه تشكل حواجز عرضية تقسم محتويات الخلية الأم إلى أربع خلايا شديدة الوضوح وهذا ما يسمى الرباعيات **Tetrads**.

ويوضح (الشكل١٩) المخطط الكامل للانقسام المنصف المذكر في مغلفات البذور.



الشكل (١٩): مخطط الانقسام المنصف المذكر الكامل (I , II) مع صور مجهرية لجميع المراحل والأطوار العائدة للنباتات ثنائيات الفلقة.

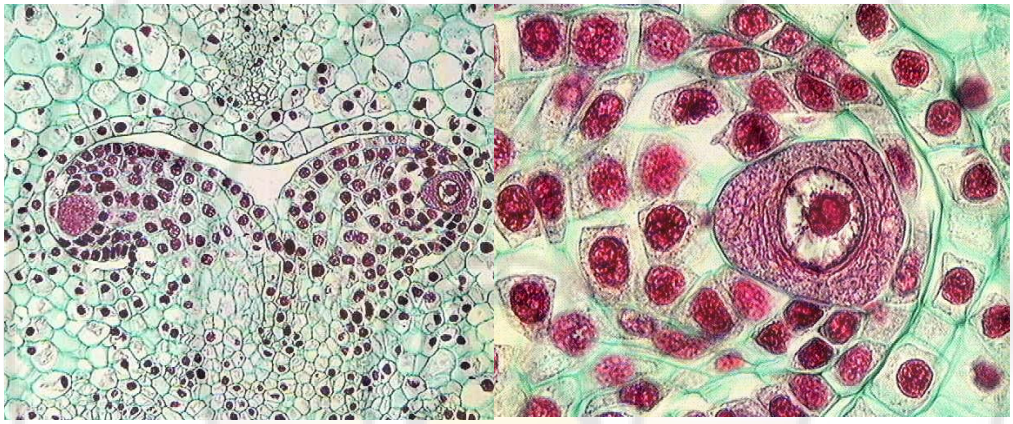
ثانياً – أطوار الانقسام المنصف المؤنث تحت المجهر:

كما هو مُلاحظ في (الجدول٢ والشكل١١) ينتهي الانقسام المنصف المؤنث بنهاية انقسامين متتاليين تتشكل فيهما أربع خلايا منصَّفة العدد الصبغي الأصلي، تزول ثلاث منهما وتبقى واحدة، وهي التي تمر بثلاث انقسامات خيطية لتعطي

الكيس الجنيني. تبدو الخلايا المنقسمة متطاولة المظهر تقريباً وهذا ما يميزها عن الخلايا المرستيمية التي تعاني من الانقسام الخيطي.

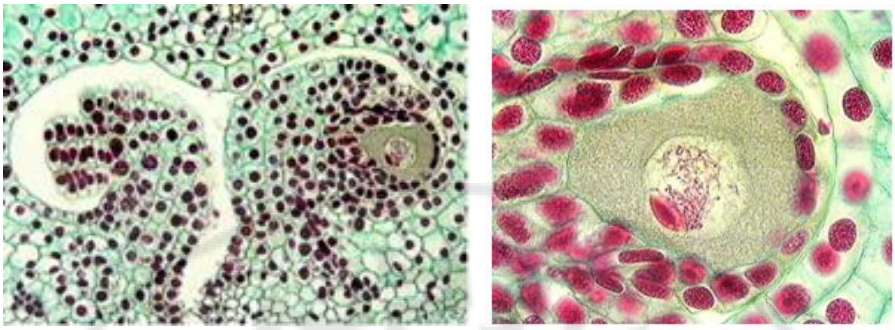
وفيما يأتي نقدم عرضاً سريعاً لأطوار الانقسام المؤنث وطريقة تميزها بالمجهر.

١- الخلية الأم المولدة للكيس الجنيني: تلاحظ في مركز البويضة Ovule خلية ذات نواة مضاعفة الصيغة الصبغية، كثيفة غير واضحة الخيوط وتستعد للدخول في الانقسام المنصف (الشكل٢٠).



الشكل(٢٠) البويضة (في المقطع العرضي للمبيض) وبداخلها الخلية الأم المولدة للكيس الجنيني.

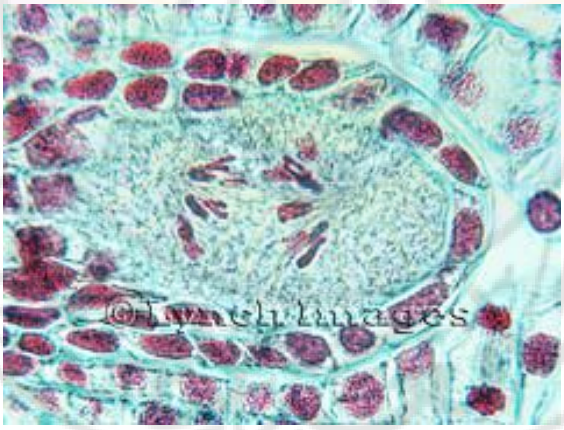
٢- الطور الأول Prophase I, I: تلاحظ في نواة الخلية الأم، المولدة للكيس الجنيني، الخيوط الصبغية مع النويَّة واضحة، لكننا لا نستطيع تمييز المراحل الخمس لهذا الطور كما هو الحال في مثيله من الانقسام المنصف المشكل للأعراس المذكرة (الشكل٢١).



الشكل (٢١) الطور الأول I من الانقسام المنصف الأول (لاحظ الخيوط الصبغية والنويَّة)

٣- **الطور الثاني Metaphase I, I:** تبدو الصبغيات على اللوحة الاستوائية وتُرى إما من منظر جانبي أو منظر قطبي.

٤- **الطور الثالث Anaphase I, I :** يلاحظ تحرك الصبغيات مُنصّفة العدد بمساعدة خيوط المغزل باتجاه القطبين (الشكل٢٢).

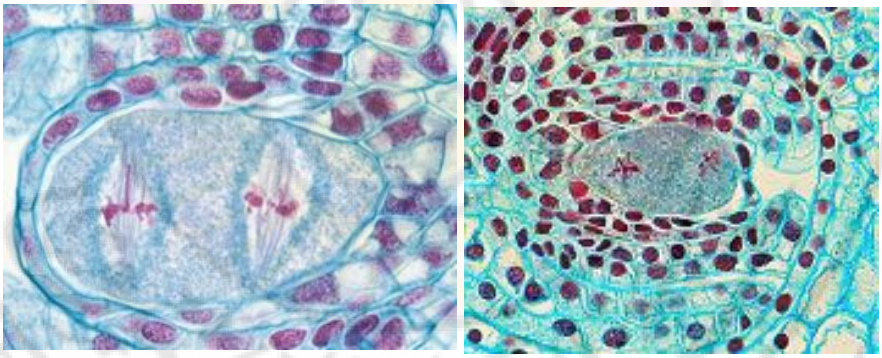


الشكل(٢٢) الطور الثالث I (لاحظ هجرة الصبغيات باتجاه قطبي الخلية عديمة الفجوة).

٥- **الطور الرابع Telophase I, I:** يُلاحظ وجود نواتين في كل قطب من الخلية حيث ينتهي الانقسام الأول I (الشكل٢٣).

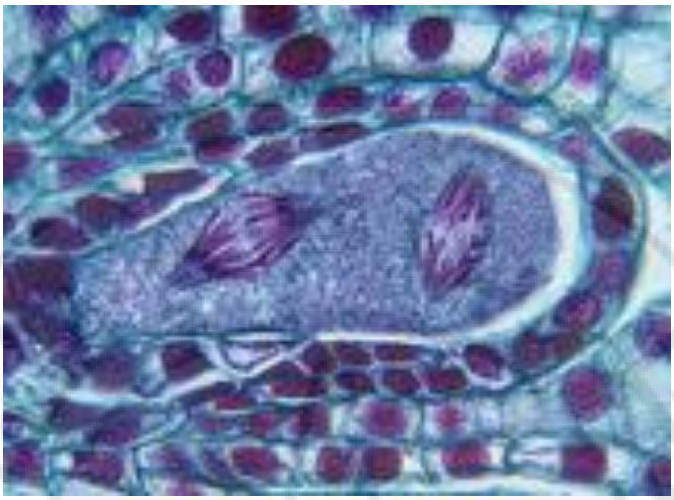
الشكل (٢٣) الطور الرابع I (لاحظ وجود نواتين في الخلية عديمة الفجوة).

٦- **الطور الثاني Metaphase II , II:** تبدو الصبغيات متوضعة على لوحتين استوائيتين إما من منظر جانبي وأما من منظر قطبي (الشكل٢٤) ، ومن الصعب ملاحظة الطور الأول II في هذه المرحلة.



الشكل (٢٤) الطور الثاني II إلى اليمين: الصبغيات متوضعة على لوحتين استوائيتين من منظر قطبي في الخلية عديمة الفجوة. إلى اليسار الصبغيات متوضعة على لوحتين استوائيتين من منظر جانبي في الخلية عديمة الفجوة

٧- **الطور الثالث Anaphase II, II:** تلاحظ في هذا الطور الصبغيات المُنصّفة والمنشطرة الجزيء المركزي متوضعة على لوحتين استوائيتين تمهيداً لتشكل أربع نوى منصفة، وإيذاناً بانتهاء الانقسام المنصف (الشكل٢٥).



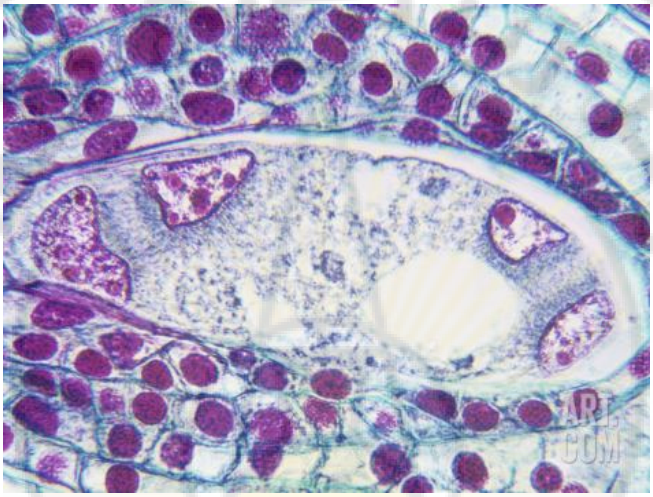
الشكل (٢٥) الثالث II لاحظ الصبغيات يعد انشطار جزيئاتها المركزية وهي تهاجر على خيوط المغزل إلى القطبين في مجموعتين ضمن خلية عديمة الفجوة.

٨- **الطور الرابع Telophase II، II:** تُلاحظ اربع نوى مُنصفة في الخلية عديمة الفجوة، وبعد فترة من الزمن تهاجر ثلاث نوى إلى قطب تهيئة لزوالها وتبقى نواة واحدة لتُعاني من ثلاث انقسامات خيطية (الشكل٢٦).

الشكل (٢٦) الطور الرابع II الذي يمثل نهاية الانقسام المنصف وتشكيل اربع أبواغ منصفة (لاحظ الى اليسار هجرة ثلاث نوى وبقاء واحدة فقط في القطب الآخر).

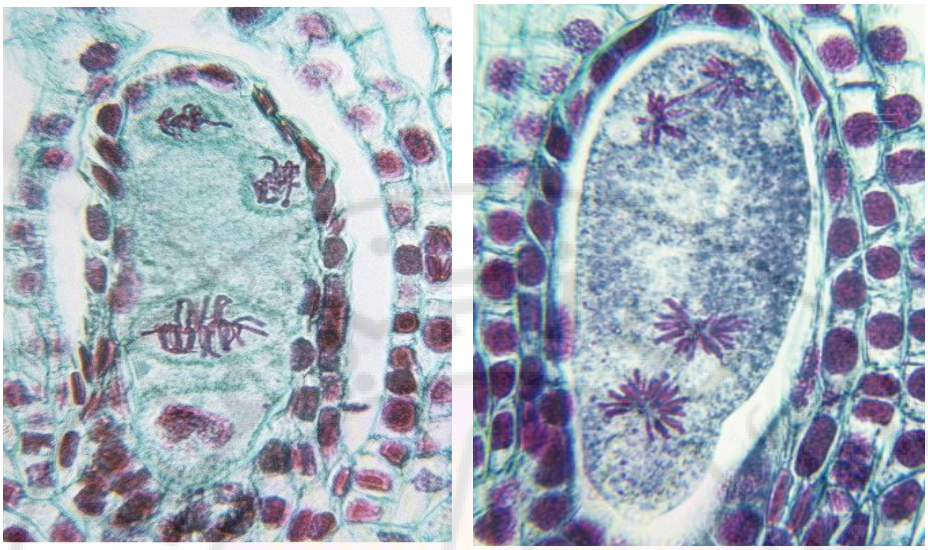
٩- **نهاية الانقسام الخيطي الأول :** على النواة بعد زوال النوى الثلاث وتشكل نواتين في خلية ذات فجوة دليلٌ على زيادة حجمها.

١٠- **نهاية الانقسام الخيطي الثاني:** على النواتين وتشكل أربع نوى في خلية ذات فجوات متعددة وكبيرة (الشكل٢٧).



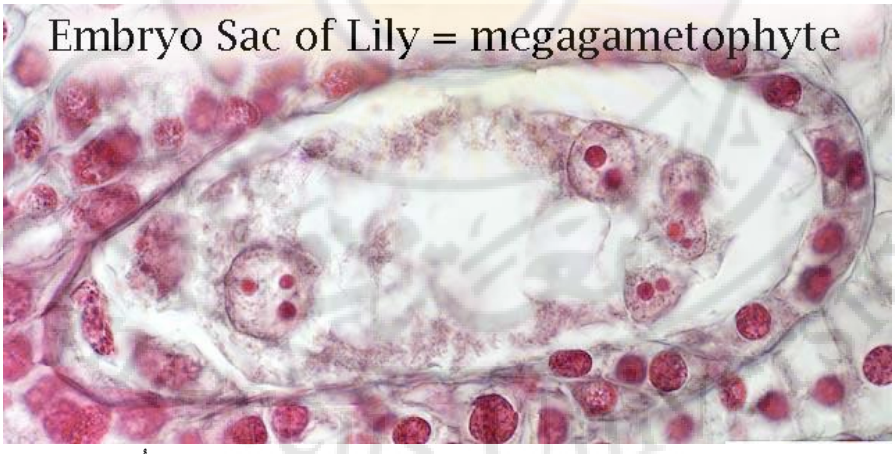
الشكل (٢٧) خلية تمثل نهاية الانقسام الخيطي الثاني الذي طرأ على النواتين (لاحظ وجود النويات في النوى ووجود الفجوات الكبيرة).

١١- **انقسام النوى الأربع:** الناتجة عن الانقسام الخيطي الثاني تمهيداً لتشكل ثمان نوى (الشكل٢٨).



الشكل (٢٨) بدء الانقسام الخيطي الثالث تمهيداً لإعطاء ثماني نوى (لاحظ وجود أربعة انقسامات في أطوار مختلفة).

١٢- **الكيس الجنيني الناضج:** والمكون من ثماني نوى (الشكل٢٩).



الشكل(٢٩) الكيس الجنيني الكامل في بويضة نبات الزنبق *Lilium* ثُماني النوى (خلية بيضية ومساعدتان وثانويتان وثلاث مقابلة للقطب).

التطبيق العملي:

الانقسام المنصف المذكر (في مآبر الأسدية)

تجهيز المحضرات السريعة: للحصول على محضرات سريعة التحضير ومضمونة النتائج يجب اتباع ما يأتي:

تستعمل في دراسة الانقسام المنصف السنابل أو البراعم الزهرية الفتية، ويفضل استعمال براعم البصل لوجود جميع القياسات في أزهارها (الشكل٣٠)، وكذلك براعم الزنبق. تثبت هذه البراعم بمحلول الكحول وحمض الخل (١:٣) لمدة (١٠-١٢) ساعة ثم تحفظ في الكحول ٧٠-٨٠%. ولتجهيز المحضر يؤخذ بالملقط أحد المآبر من البراعم الفتية (وقد يؤخذ البرعم بكامله) ويوضع على الصفيحة الزجاجية ضمن قطرة من الكارمن الخلي، ثم يقطع المئبر أو البرعم بالملقط وينثر محتواه فوق الملون وتزال القطع النسيجية الزائدة، يغطى السائل بساترة، وهكذا يكون المحضر جاهزاً للدراسة بعد نزع السائل الفائض بورقة ترشيح.

شكل(٣٠) نورة البصل المتفتحة وغير المتفتحة والتي تحمل عددا كبيراً من البراعم الزهرية.

وفي بعض الحالات تقتضي ضرورة الأبحاث التركيز على دراسة الصفات المورفولوجية لكل صبغي من الصبغيات المتشافعة، لذلك نلجأ إلى تحليل خاص يعرف باسم "التحليل الباكيتيني" أي تحليل الصبغيات في مرحلة الثخن Pachytene، ومن أهم هذه الصفات نجد: الطول النسبي لكل صبغي، والعلاقة النسبية بين الأذرع القصيرة، ودرجة انعدام تجانس التلولب في مناطق الصبغي المختلفة، وتوضع الجزيء المركزي وعدد وقياس المناطق الداكنة التي تتكون من الكروماتين المغاير (غير المتجانس) Heterochromatin وغيرها.

وعلى ما يبدو فإن كثيراً من هذه الصفات تعد علامات مميزة وفارقة لدى التحليل الخلوي الدقيق للصبغيات، وفيما يأتي نوضح الطريقة العملية لتجهيز محضرات التحليل الباكيتيني في نبات الذرة والمطبقة في أكاديمية العلوم السيبيرية في روسيا الاتحادية:

١- تؤخذ الأعضاء المذكرة من شرَّابات Tassels الذرة قبل عشرة أيام من حصادها أو نضجها (بطول ٤- ٥سم للشرابة و٢-٣ مم للمئبر)، وتوضع بعد تقطيعها في أبخرة النشادر (غاز النشادر NH_3) لمدة ٣-٥ دقائق، ثم في مثبت الكحول وحمض الخل بنسبة ١:٣ لمدة ٨-٢٤ ساعة.

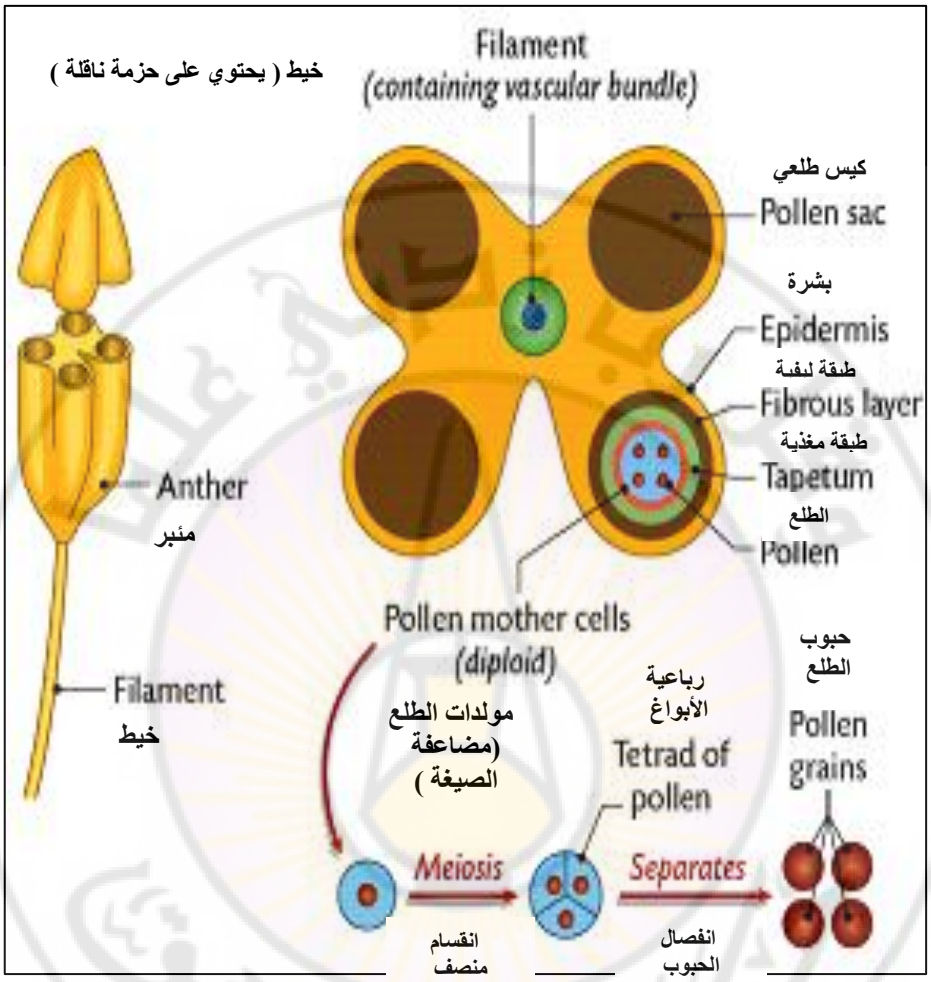
٢- تغسل المواد بعد ذلك بالكحول ٧٠% ثلاث مرات، ثم تحفظ في الكحول ٨٠% حتى دراستها.

٣- يؤخذ مئبر واحد ويوضع على صفيحة زجاجية فوق نقطة من الكارمن الخلي ثم يقطع وينثر محتواه بالملقط.

٤- ترمى البقايا الزائدة ويدرس تحت المجهر ويضاف الكارمن من حين إلى آخر حين اللزوم.

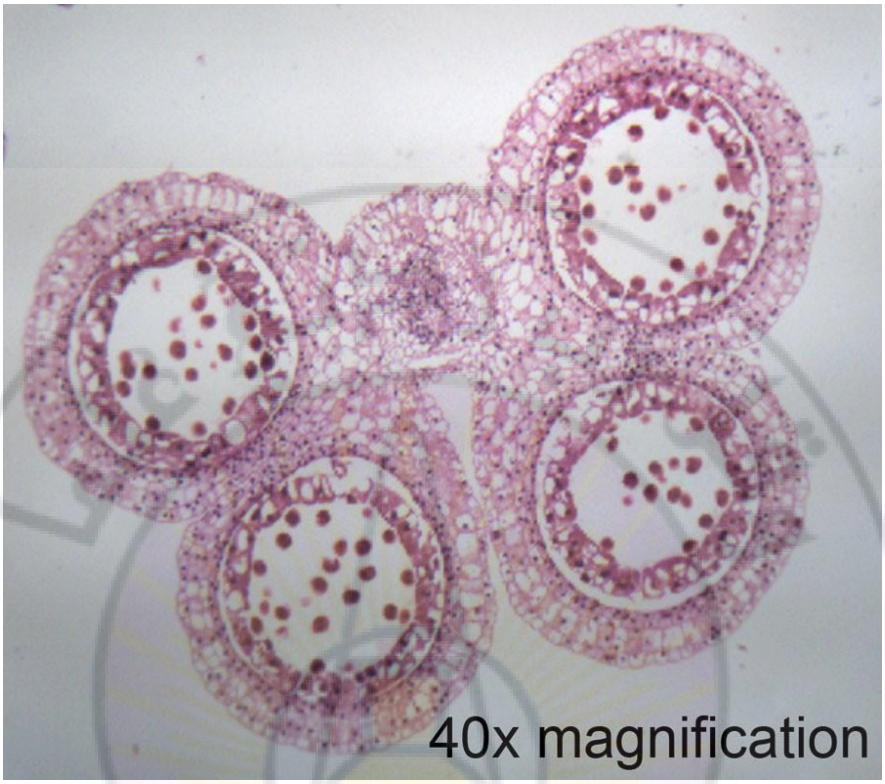
ويمكن متابعة أطوار ومراحل الانقسام المنصف المذكر من خلال مقاطع ميكروتومية جاهزة محضرة محلياً أو مستوردة وذلك لمآبر نباتات مختلفة ولاسيما الزنبق ***Lilium*** (الشكل٣١) و(الشكل٣٢).

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University



الشكل(٣١) مخطط يوضح السداة والمقطع العرضي في المئبر وتشكل حبوب الطلع نتيجة الانقسام المنصف.

Damascus University



الشكل (٣٢) صورة مجهرية لمقطع عرضي في المئبر توضح الجيوب الطلعية، وفيها يحدث الانقسام المنصف.

طرائق الحصول على الانقسام المنصف المذكر في بعض النباتات:

أ- في نبات الذرة والزنبق البري:

تجمع المآبر أو البراعم العائدة لهذه النباتات بقياسات صغيرة ومتفاوتة الحجوم، وتوضع في مثبت حامضي (مجهز قبل الاستعمال)، بحيث يحافظ على الصبغيات وجهاز المغزل والنوى ويكون التثبيت لمدة ١٨-٢٤ ساعة، ثم تحفظ في الكحول ٧٠% وفي البراد، ويفضل في هذه الحالة استعمال أحد المثبتين الآتيين:

– مثبت كارنوا (٦كحول مطلق:٣ كلوروفورم: ١ حمض خل ثلجي).

– مثبت فارمر (٣ كحول مطلق ١ حمض خل ثلجي).

لتجهيز المحضر يؤخذ مئبر من الكحول ويراقب تحت المكبرة بوجود اللوحة السوداء ويضاف إليه نقطة من الكارمن الخلي ويهرس بوساطة (حربة) أو إبرة تشريحية، ثم يسخن قليلاً دون الوصول إلى الغليان ويهرس ويفحص تحت المجهر ويثبت بالتجميد Freezing إن كان جيداً وذلك حسب الطريقة المقترحة من Conjer و Fairchild، وهكذا توضع الشريحة فوق الجليد الجاف (غاز الكربون المضغوط) لمدة ٦٠ ثانية، ثم تنزع الساترة بشفرة ويوضع فوقها بعد جفاف النسيج كحول مطلق I ثم كحول مطلق II بفاصل ٢,٥ دقيقة ثم كزيلول وتغطى بساترة مع بلسم كندا.

ب– البحث عن الطور الثاني M.I (Metaphase) I في النجيليات:

يتم اختيار زهرة مناسبة من السنبلة في النبات النجيلي المختار (شعير، قمح، جودار، شوفان..) ثم ينزع منها مئبر أو أكثر ويوضع على شريحة نظيفة مع قطرة من الكارمن الخلي الممزوج بقليل من كلور الحديد، وبمساعدة إبرة يتم تمزيق المئبر واستخراج محتوياته من الخلايا الأم المولدة لحب الطلع، وهي في أطوار انقسامية مختلفة ويفضل اختبار قياسات مختلفة من المآبر بصورة أولية حتى الوصول إلى الطور المناسب وهو الطور الاستوائي (M.I) حيث يتم تثبيت الأطوال المناسبة بشكل نهائي.

ويفضل لدى التثبيت النهائي استعمال مثبت كارنوا مضافاً إليه فوق كلور الحديد بنسبة (١) قطرة إلى (١٥) مل من المثبت على أن يتم التثبيت لمدة ٢٤– ٧٢ ساعة.

يتم حفظ المآبر المثبتة في الكحول ٧٠% بعد إجراء غسيلين بالكحول بفاصل (٥) دقائق، الأول ١٠٠% والثاني ٩٥%، ويتم الحفظ بدرجة °٥ على الأقل،

تلون المآبر حين دراستها بالكارمن الخلي ١%، وهكذا توضع على الشريحة مع قطرة من الملون وتفجر باستخدام المكبرة ثم تستخرج محتوياتها باستخدام إبرة تشريحية وتزال باقي النسج الجسمية وتوضع ساترة بعد مسحها بغليسيرين الألبومين Glycerin albumen وتسخن بحذر ولطف حتى يبدأ التدخين، ثم يضغط على الساترة بعود ثقاب ويسحب السائل الزائد بورق ترشيح. يمكن تحويل الشريحة من مؤقتة إلى ثابتة بالطريقة المعروفة بعملية التبريد.

ولتحضير غليسيرين الألبومين يمزج حجم واحد من بياض البيض مع حجم واحد من الغليسيرين ثم يخلط جيداً قبل الاستعمال ويفضل إضافة بلورة من التيمول أو الفينول.

ج–دراسة الانقسام المنصف في المكحلة (الترادسكانتيا *Tradescantia*):

يحصل الانقسام المنصف في مآبر زهرة المكْحَلة قبل أن تصل إلى مرحلة النضج الكامل، ويمكن التقاط أطوار الانقسام المنصف عندما يعادل طول المئبر ثلث طوله النهائي، وكذلك عندما يكون المئبر بلون أخضر فاتح (اللون الأصفر للمئبر يعني انتهاء النضج ووجود حب طلع). يمكن وضع براعم الترادسكانتيا في أنابيب اختبار مملوءة بالماء، وحفظها في درجات حرارة عالية (داخل حاضنة) أو منخفضة (داخل ثلاجة) أي من ١–٣٥ درجة حيث نلاحظ تأثيرات مختلفة في الانقسام المنصف، يتم التلوين إما بالكارمن الخلي أو بالأرسين البربيوني. ويمكن اللجوء في بعض الحالات إلى تثبيت محضرات الانقسام المنصف باستخدام محلول السكر، وهكذا يتم استخراج المطلوب من المئبر بعد تلوينه وهرسه، ثم يسحب الملون الزائد ويضاف إلى الخلايا المتبقية نقطة من المحلول وتغطى بساترة مع ضغط بسيط بعود ثقاب.

د- الانقسام المنصف في السراخس:

تتشكل الأبواغ في السراخس الراقية (مثل الخنشار) داخل كيس البوغ الموجود ضمن البقع البوغية Sori على الوجه السفلي لورقة السرخس، وكما هو معلوم يسبق هذا التشكل الانقسام المنصف. ولدراسة هذه الظاهرة تُفكَّك أكياس البوغ الصغيرة جداً في محلول الكارمن الخلي أو الأرسين، حيث يتم البحث عن الأطوار تحت المجهر ويثبت الجيد منها، وقد تصادف في بعض السراخس أعداداً كبيرة من الصبغيات قد تصل إلى ٢٠٠ صبغي أو أكثر.

ملاحظات:

١- تشير بعض الدراسات إلى أن السنابل المواجهة لأشعة الشمس تكون نشيطة انقسامياً حيث تنهي انقسامها المنصف بسرعة أكبر من تلك التي تكون في الظلام.

٢- يمكن معرفة انتهاء الانقسام المنصف في السنابل بمجرد خروج السفاة من قمة الغمد المحيط بالسنبلة وهي داخل الساق (بعد العقدة الثانية عادة).

٣- لوحظ أن وجود الصبغيات في المادة النباتية بالحرارة المرتفعة يؤدي إلى عطبها وتخريبها (سيلان صبغي) حتى وإن كانت هذه المادة داخل المثبت، لذاك يجب حفظ المثبت مع المادة في مكان بارد.

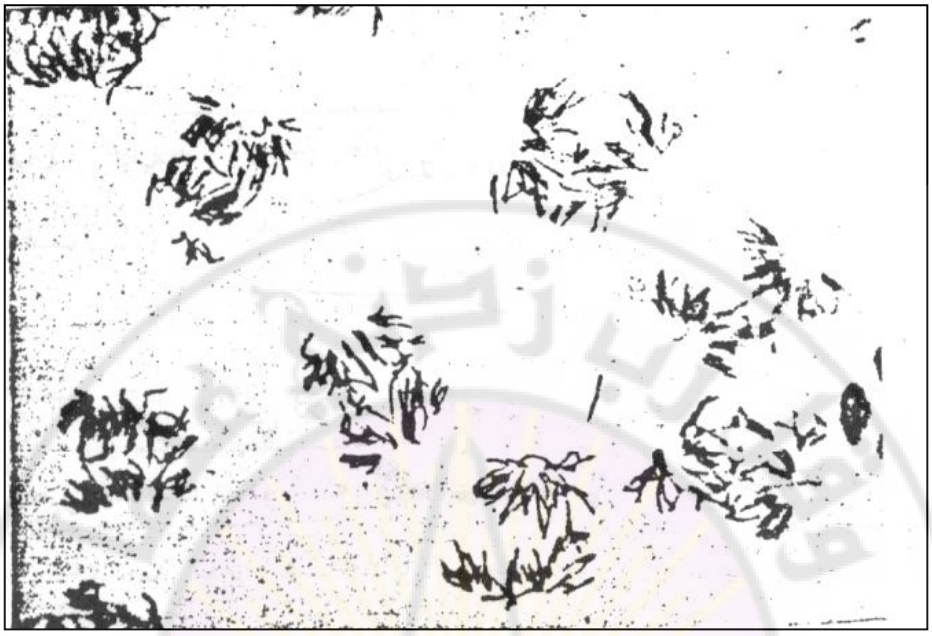
الانقسام المنصف المؤنث (في مبيض المدقة).

طريقة الحصول على الكيس الجنيني:

من الملاحظ أن مراحل تشكل الكيس الجنيني تحصل بعد انقسام نواة حب الطلع في الزهرة الخنثى بزمن قصير، تؤخذ البويضات (غالباً في الزنبقيات) من المبيض، وتثبت في كارنوا لمدة ساعة(كحول مطلق ٦٠ مل + حمض خل ثلجي

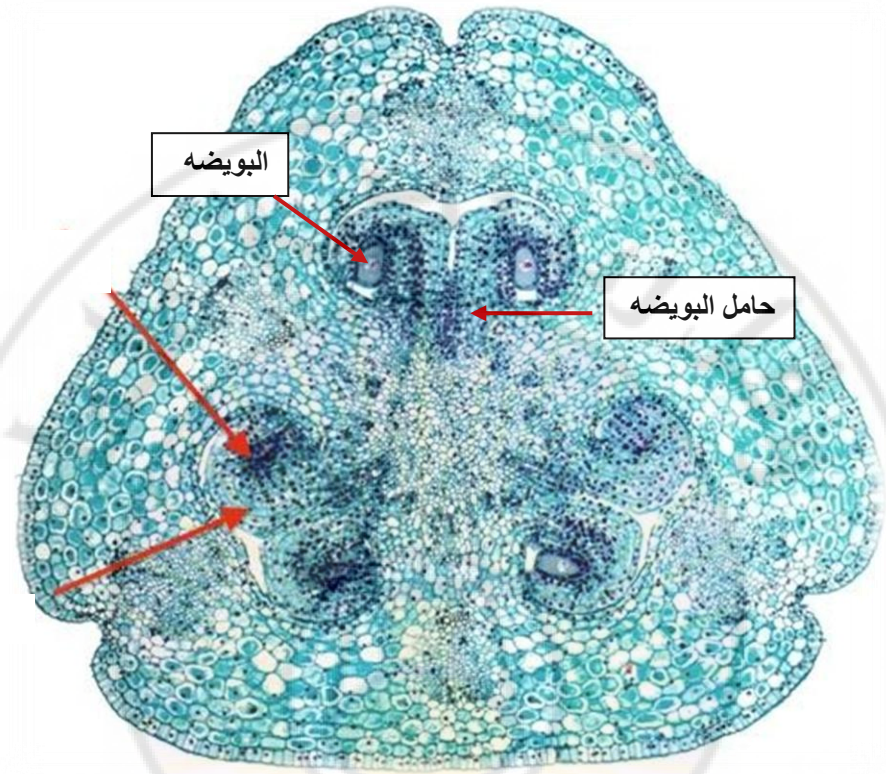
١٠ مل + كلوروفورم ٣٠ مل) ثم تحفظ بالكحول ٩٥% في الثلاجة لحين الاستعمال.

وللدراسة تؤخذ البويضات من المثبت وتوضع في Hcl نظامي بالدرجة (٦٠°) مدة (٨) دقيقة، ثم توضع في كاشف شيف. توضع بويضة واحدة ملونة فوق شريحة وتفحص بالمكبرة وتفتح باستخدام إبرة تشريحية، يلاحظ بداخلها الكيس الجنيني بشكل بيضوي صغير. ينقل إلى شريحة ثابتة وتزال النسج من حوله ثم يوضع ألبومين Albomin الغليسيرين ويُتابَع التحضير بالطريقة المعروفة. يفضل أخذ الشمراخ الزهري من داخل الأوراق في شهر تشرين الأول بالنسبة لنبات *Hyacinthus* وغيره من الزنبقيات، ويمكن متابعة الانقسام الخيطي في السويداء(3n) لبويضات النرجس وغيرها وذلك بعد الإلقاح بأوقات زمنية متفاوتة وتتحقق هذه الحالة بعد ذبول الزهرة الملقحة. وهكذا يفتح المبيض وتستخرج منه البويضات الحرة وتثبت ثم تلون بكاشف شيف (تفاعل فولكن). تبدو السويداء كجسم شبيه بالحويصلة في وسط البويضة مع نواة كبيرة وقد نشاهد أطوار الانقسام الخيطي فيها، وهي في حالة التواقت الزمني (انقسام متزامن) Synchronized divisions، وبذلك فهو يشبه الانقسام المنصف ولا يشبه الانقسام الخيطي (الشكل٣٣).



الشكل (٣٣) الانقسام الخيطي في سويداء بذور جنس *Suillasibirica* ثلاثية الصيغة الصبغية (3n) بالتكبير القوي: لاحظ أن جميع الخلايا المنقسمة موجودة في الطور الثالث وهذا يشير إلى التواقت الزمني للانقسام.

من الصعب متابعة أطوار الانقسام المنصف المؤنث في البويضات عن طريق الهرس أو إجراء المقطع بالشفرة العادية، ولكن يمكن تحقيق سلسلة من المقاطع المتتالية بوساطة المقطاع أو الميكروتوم وذلك بمعالجتها ثم تلوينها وذلك وفق الطرائق المعروفة في هذا المجال. وغالباً ما تتم متابعة أطوار الانقسام المنصف المؤنث من خلال المقاطع الميكروتومية المستوردة كونها رقيقة وأكثر وضوحا (الشكل٣٤). وهكذا يجب أن تكون المقاطع عديدة ومحققة على مبايض المدقات وهي بحجوم متدرجة النضج (من الأصغر حتى الأكبر)، وبذلك يمكن متابعة الأطوار من الخلية الأم (في المبيض الصغير) وصولا إلى الكيس الجنيني (في المبيض الكبير).



الشكل(٣٤) مقطع عرضي ميكروتومي في مبيض الزنبق من أحاديات الفلقة (لاحظ وجود ست بويضات، بحيث تتوضع بويضتان في كل خباء، وفيهم يحصل الانقسام المنصف المؤنث) يلاحظ في هذا المقطع خلايا أم مولدة دليل على أن البويضة صغيرة الحجم والانقسام في بدايته (لاحظ البويضة وحاملها – الأسهم).

Damascus University

المطلوب:

تابع أطوار الانقسام المنصف المذكر في المقاطع الجاهزة لمآبر نبات الزنبق وارسمها.

١- بالتسلسل انطلاقاً من الخلية الأم وصولاً إلى حبة الطلع ذات النواتين (يرسم في بداية السلسلة مخططاً إجماليا لمقطع عرضي في المئبر لتوضيح مكان حدوث الانقسام المنصف المذكر).

٢- اصنع محضرات للانقسام المنصف المذكر من براعم البصل، وذلك بهرسها بوساطة ملون الكارمن الخلي، وارسم الأطوار، وقارنها مع المحضرات الجاهزة (يراعى أخذ براعم من قياسات متنوعة بهدف الحصول على جميع المراحل والأطوار).

٣- تابع أطوار الانقسام المنصف المؤنث في المقاطع الجاهزة لمبايض نبات الزنبق (أو لنباتات أخرى) وارسمها بالتسلسل انطلاقاً من الخلية الأم وصولا إلى الكيس الجنيني (يرسم في بداية السلسلة مخططاً إجماليا لمقطع عرضي في المبيض لتوضيح مكان حدوث الانقسام المنصف المؤنث).

٤- تابع بعض محضرات الانقسام المنصف المذكر في مآبر لنباتات من ثنائيات الفلقة ووضح الفروق في هذا الانقسام بين الأحاديات والثنائيات.

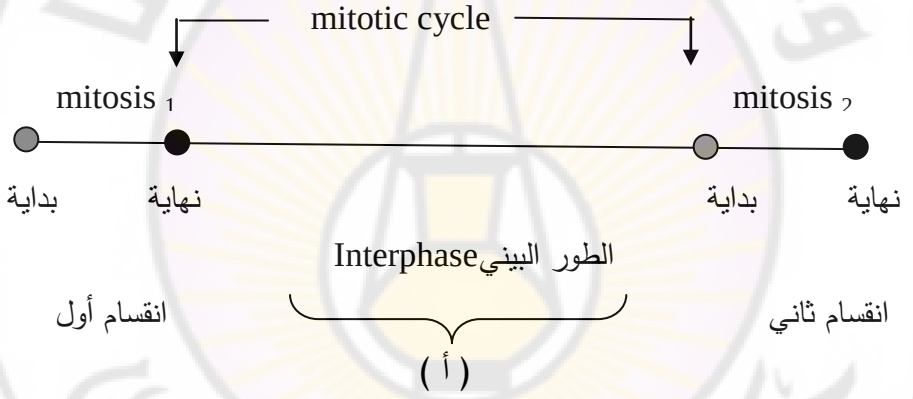
القسم الثالث

تحديد استمرار أطوار الدارة الانقسامية

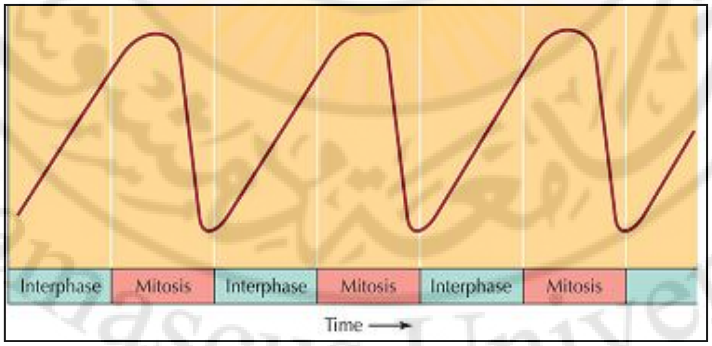
وأطوار الانقسام الخيطي

التوضيح النظري:

تمر الخلية أثناء فترة حياتها بعدة مراحل سهلة التمييز تُشكل بمجملها ما يُعرف بدورة الخلية Cell cycle أو الدارة الانقسامية mitotic cycle، وتتحدد الدارة بالفاصل الزمني بين نهاية انقسام خلوي أول ونهاية انقسام خلوي ثان (شكل٣٥).



(أ)



(ب)

شكل (٣٥) أ- مخطط يوضح بداية ونهاية زمن الدارة الانقسامية بارتباطها مع انقسامين خلويين. ب – مخطط يوضح مسيرة ثلاث دارات انقسامية بارتباطهم مع الزمن.

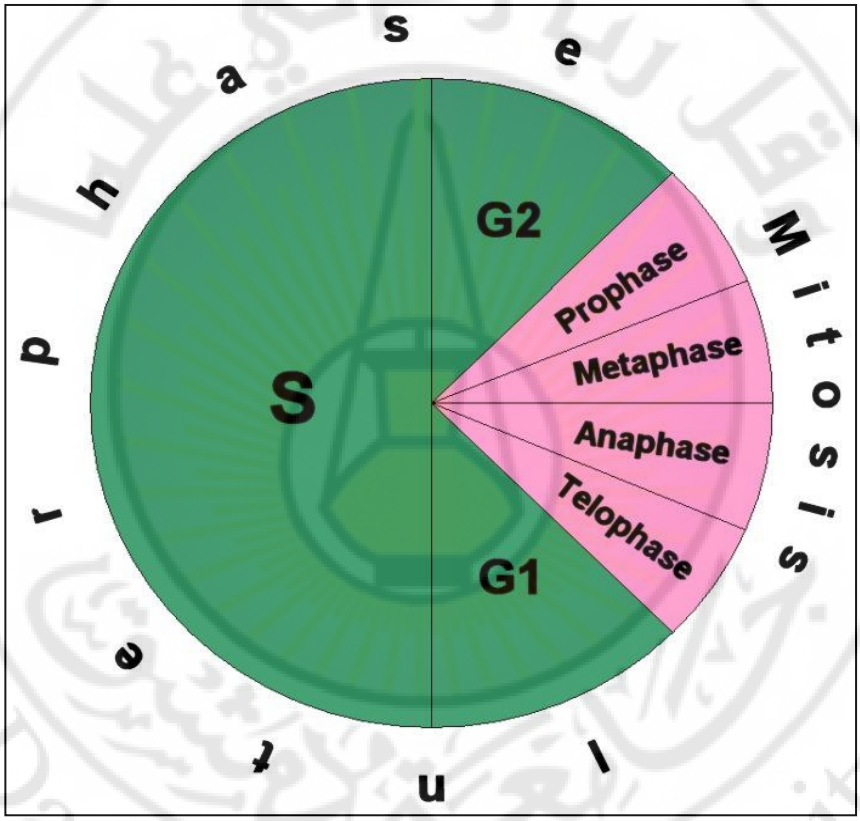
تضم الدارة الانقسامية مرحلتين رئيسيتين: الانقسام الخيطي Mitosis يحتل منها نحو٥-١٠% والطور البيني Interphase يحتل نحو ٩٠-٩٥%. ويتحقق الانقسام الخيطي في مناطق محددة من النباتات تُعرف بالمناطق المرستيميه التي تتوضع في قمة الجذر وقمم السوق والفروع الجانبية وحواف الأوراق الفتية (شكل٣٦).

شكل (٣٦) مقطع طولي في قمة جذر نباتي يوضح مناطقه المختلفة وهي من الأسفل باتجاه الأعلى: القلنسوة، المرستيم (فيه يحصل الانقسام الخيطي)، الاستطالة، التشعب (فيها تبدأ البنية الابتدائية بالظهور مع الأوبار الماصة).

يتضمن الانقسام الخيطي أربعة أطوار، ويطلق على المرحلة الفاصلة بين انقسامين خلويين اسم الطور البيني أو طور الراحة، حيث تقوم خلاياها بوظائفها الطبيعية وتتضاعف الصبغيات وتتهيأ الخلية للدخول بانقسام خيطي جديد، ويتغير

زمن الدارة بتغير الأنواع والأجناس المختلفة للنباتات زيادة أو نقصانا. يتضمن الطور البيني من الدارة **interphase** ثلاث مراحل هي:

$\mathbf{G_1}$ (مرحلة قبل تركيب DNA)، **S** (مرحلة تركيب DNA)، $\mathbf{G_2}$ (مرحلة بعد تركيب DNA والتهيئة للدخول في انقسام جديد) (شكل ٣٧).



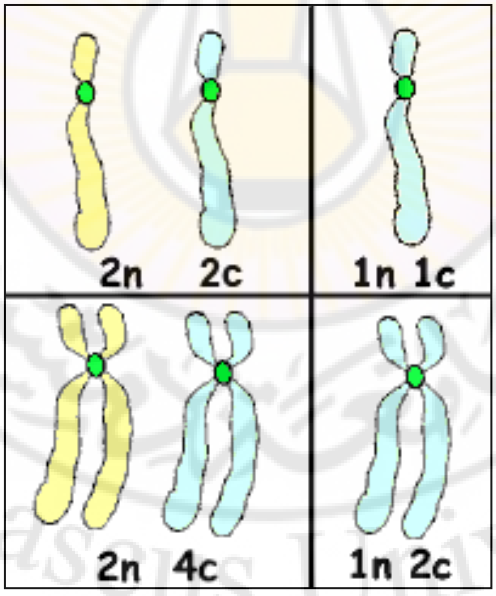
شكل (٣٧) مخطط الدارة الانقسامية.

ويتضمن **الانقسام الخيطي mitosis** أربعة أطوار هي:

الأول prophase (تُلاحظ فيه الشبكة الكروماتينية وغشاء النواة والنويَّات)، والثاني metaphase (يزول فيه غشاء النواة والنويَّات وتظهر خيوط المغزل spindles وتتوضع الصبغيات على اللوحة الاستوائية)، والثالث anaphase (تنشطر فيه الجزيئات المركزية من الصبغيات المكونة من صُبَيْغيات وتزحف هذه الأخيرة على خيوط المغزل مهاجرة إلى القطبين)، والرابع telophase (يعود فيه غشاء النواة والنويَّات للظهور عند كل قطب، حيث تتشكل نواتين بنتين جديدتين متساويتي العدد الصبغي الذي كان موجوداً في الخلية الأم).

نميز كميتين من الـ DNA في نوى الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة، وهكذا إما أن تكون الكمية 2c وإما 4c وبذلك نميز أربعة نماذج وهي:

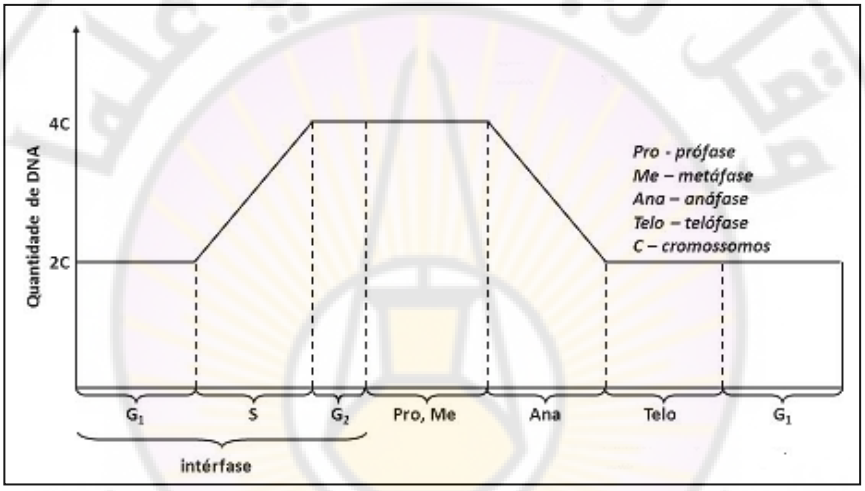
(2n =4c , 2n =2c , 1n = 2c ,1n = 1c) (شكل ٣٨).



شكل (٣٨) كمية الدنا (1c,2c,4c) بالعلاقة مع الصيغة الصبغية (1n, 2n)

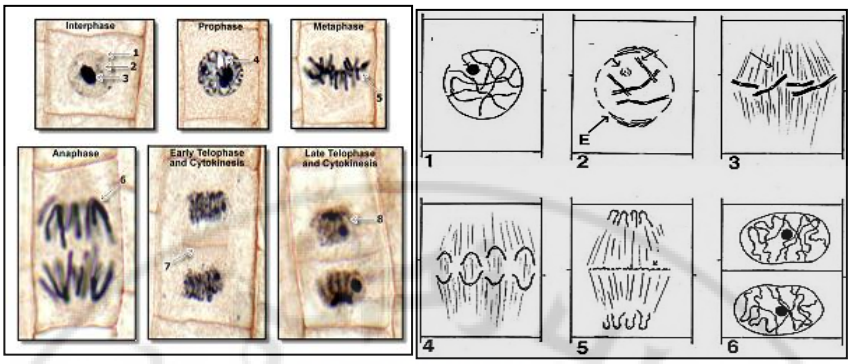
(c تعني صبغي Chromosome ، n تعني نواة Nucleus).

تتفاوت كمية الـ DNA تبعاً للمراحل الثلاث للطور البيني وتبعاً لأطوار الانقسام الأربعة. وهكذا تكون كمية الدنا في G_1 وفي الطور الرابع من النموذج 2c(صبغي مفرد بجزيء مركزي واحد) وفي مرحلة تركيب الدنا (S) تبدأ كميته بالتزايد إلى أن تصبح من النموذج 4c في كل من المرحلة G_2 وفي الطورين الأول والثاني، لتعود كمية الدنا بالتناقص في الطور الثالث (شكل٣٩).

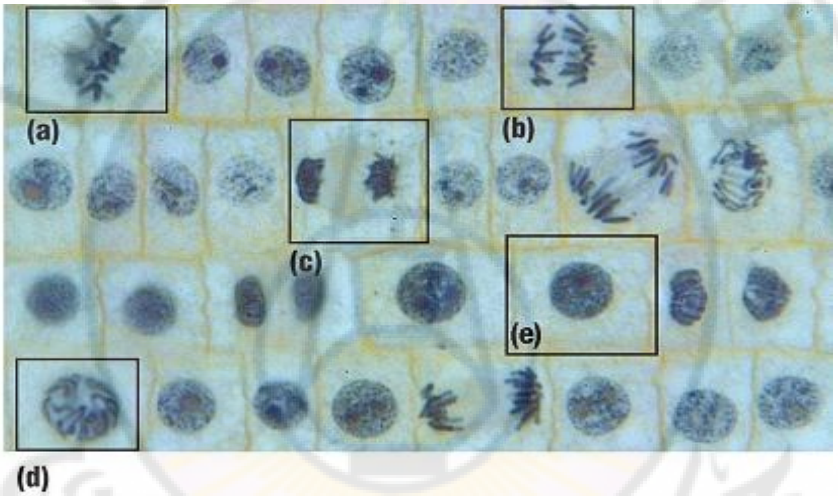


شكل(٣٩) كمية الدنا (2c,4c) بالعلاقة مع مراحل الطور البيني وأطوار الانقسام.

ويمكن التعرف على أطوار الانقسام الخيطي وطور الراحة في مرستيمات الجذور النباتية (بهدف إجراء عملية إحصاء أعدادها) من خلال (الشكل٤٠).



ب أ



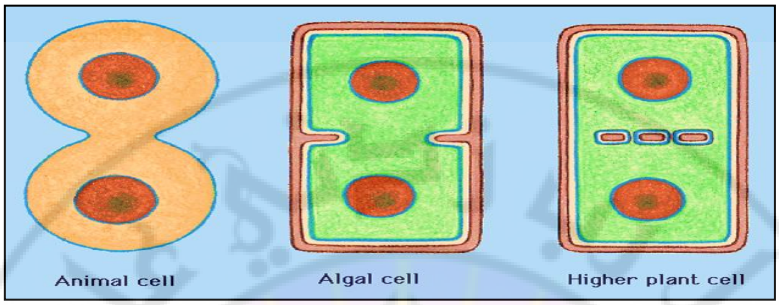
ج

شكل(٤٠) أطوار الانقسام الخيطي في الخلايا النباتية

أ- رسم نظري (2n=4) ب- صور مجهرية ج – مقطع ميكروتومي يوضح خلايا الطور البيني والأطوار الأربعة.

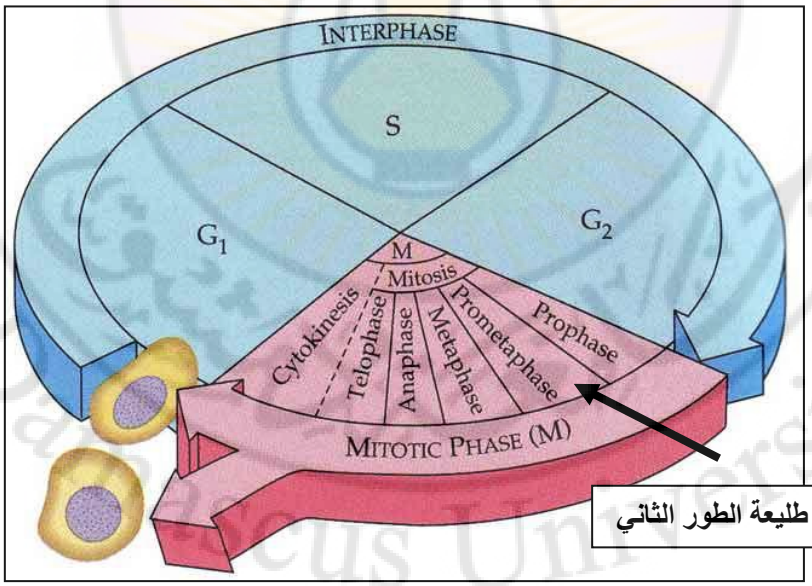
لقد علمنا سابقاً أن الانقسام الخيطي في الخلية النباتية يتضمن مرحلتين: يُطلق على الأولى اسم الانقسام النووي أوالحَرائِكُ النَّوَوِيَّة Karyokinesis؛ تنتهي بتشكل الطور الرابع Telophase وتُسمى المرحلة الثانية الانقسام السيتوبلاسمي أو

الحَرائِك الخَلَوِيَّة Cytokinesis ؛ وفيها يتشكل حاجز أو انخماص يفصل بين الخليتين البنتين الناتجتين عن انقسام النواة (شكل٤١).



شكل (٤١) توضيح تشكل مرحلة الانقسام السيتوبلاسمي في خلايا الكائنات المختلفة: النباتية (يمين)، الطحالب(وسط)، الحيوانية (يسار).

ويرى بعض العلماء أن الانقسام النووي يتضمن خمسة أطوار بدلا من أربعة وهي: الأول، طليعة الثاني Prometaphase، الثاني، الثالث، الرابع. (شكل٤٢). وسنتعامل في تجربتنا مع الأطوار الأربعة فقط.



شكل (٤٢) مخطط الدارة الانقسامية يوضح مراحل الطور البيني والانقسام النووي بأطواره الخمسة والانقسام السيتوبلاسمي حيث تتشكل خليتين بنتين.

يخضع الاستمرار الزمني للانقسام الخلوي (ميتوز) إلى عوامل كثيرة أهمها:

① نمط النسيج والخلايا المكونة له.

② الحالة الوظيفية للخلية المنقسمة.

③ العوامل الخارجية المؤثرة في الخلايا المنقسمة مثل الحرارة والنظام الضوئي والمواد الكيميائية والعوامل الفيزيائية والرطوبة وغيرها من العوامل.

وقد أشارت الدراسات إلى أن العدد الصبغي يؤدي دوراً مهماً في تحديد الاستمرار الزمني للانقسام الخلوي وبالتالي استمرار الحلقة الانقسامية. فقد تبين أن زمن الانقسام الخلوي في قمح الخبز السداسي (2n=6x=42) أطول من زمن القمح الصلب الرباعي (2n=4x=28)، وهذه أطول من القمح الثنائي (2n=2x=14).

وبشكل عام يتفاوت استمرار الانقسام الخلوي في مختلف المتعضيات الحية من (٣٠) دقيقة إلى (٣) ساعات. ومن الواضح أن الطور البيني يحتل الزمن الأكبر من الحلقة الانقسامية وقد لوحظ أن نسبة الانقسام الخلوي إلى الطور البيني تُراوح من ١/١٠ إلى ١/٢٥، (شكل٤٣).

ما زالت الأسباب المباشرة التي تحث الخلايا على الانقسام غير واضحة تماماً، ومن المرجح أن هذه الظواهر الحيوية تنحصر بشكل رئيس في:

ـ عرقلة النسبة أو العلاقة النووية السيتوبلاسمية ($\frac{ن}{س}$). وبشكل آخر فإن نقصان هذه النسبة يعني زيادة حجم السيتوبلاسماونقصان حجم النواة كما في الخلايا المتطاولة، مثل($\frac{5}{20}$ =0.25) بينما تعني زيادة نسبة هذه العلاقة نقصان حجم السيتوبلاسما وزيادة حجم النواة كما في الخلايا المرستيمية المنقسمة، مثل($\frac{20}{5}$ =4).

ـ يتعرقل انقسام الخلايا المرستيمية بالحرارة المرتفعة.

ـ يتعرقل الانقسام بالجرعات الإشعاعية، وببعض المواد الكيميائية السامة مثل الكولشيسين وغيره.

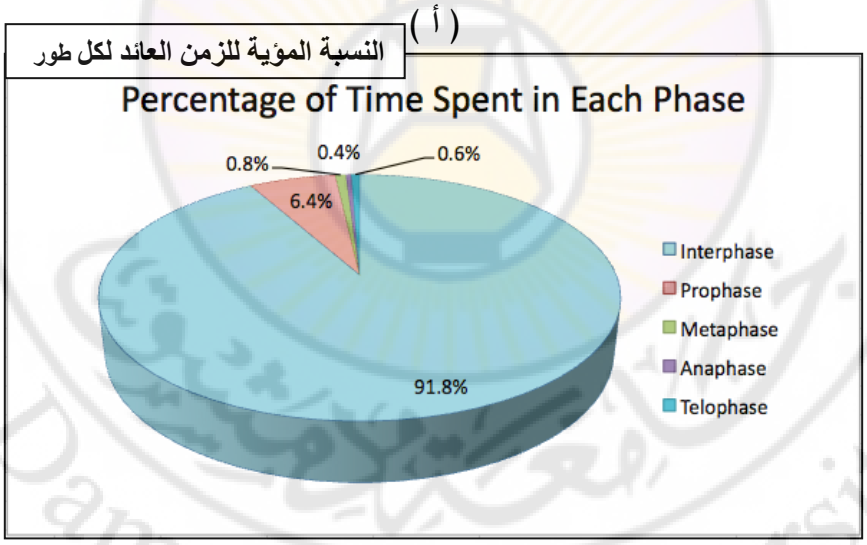
Interphase			Mitosis
G1	S	G2	M
5	7	3	1

Hours

Pro	Met	Ana	Tel
36	3	3	18

Minutes

(أ)



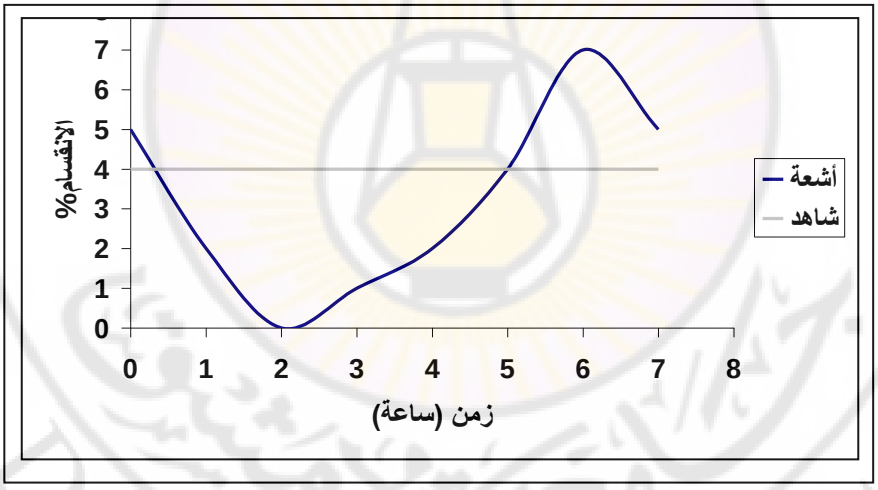
(ب)

شكل (٤٣) أ – مقارنة بين زمن مجموع مراحل الطور البيني الثلاث (بالساعات) مع زمن مجموع أطوار الانقسام الأربعة (بالدقائق).

ب– مقارنة بين النسبة المؤية للطور البيني في الدارة الانقسامية (٩١،٨ %) والنسب المؤية للأطوار الأربعة للانقسام (وهي بالتسلسل: أول– ثاني– رابع – ثالث).

لقد استفاد الباحثون من هذه الحالات المعرقلة للانقسام في تحديد الاستمرار الزمني للطور البيني ولأطوار الانقسام الخيطي؛ ومن أشهر طرائق تحديد زمن الانقسام نجد:

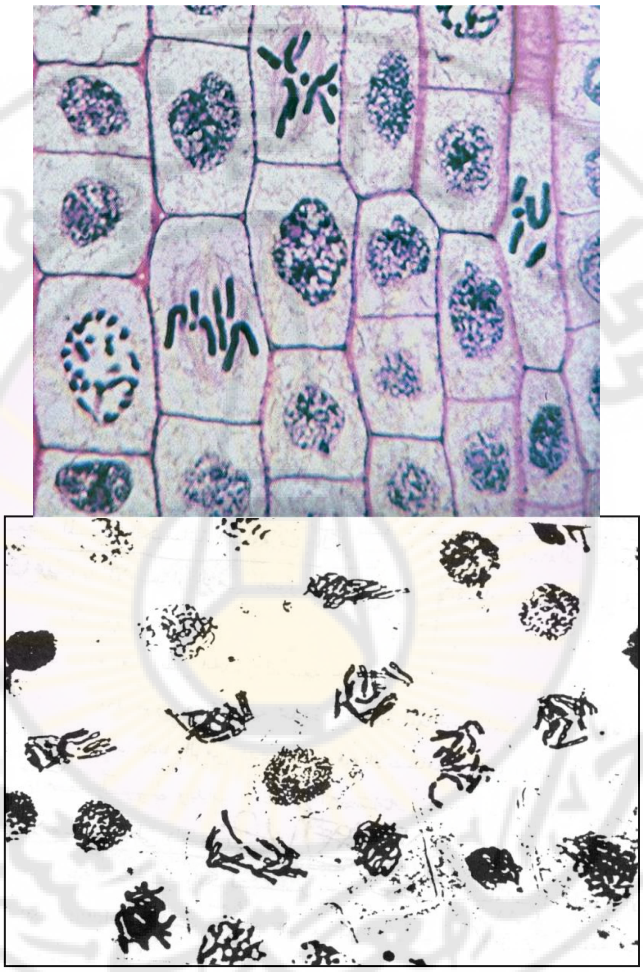
١- **طريقة تعريض الجذور للأشعة** ربطاً مع الزمن، وهكذا تتعرقل مسيرة الانقسامات إلى أن تتوقف نهائياً بعد مرور فترة زمنية محددة من نهاية المعالجة تتناسب مع الجرعة الإشعاعية. وبمعرفة الزمن الذي تزول فيه الانقسامات تماماً(وهو الزمن الفاصل بين بداية زوال الانقسامات وبداية انتعاشها مجدداً) يمكن تحديد استمرار زمن الانقسام الخيطي الميتوزي. (شكل ٤٤)



شكل (٤٤) منحنى بياني يوضح توقف الانقسام الخيطي لدى معالجة الجذور بأشعة X ارتباطاً مع الزمن (بعد ٢ ساعة من المعالجة) ومن ثم عودة الانقسامات من جديد وبذلك يكون زمن الانقسام الخيطي في هذا المثال نحو ٢ ساعة و ١٥ دقيقة (انظر بدء انتعاش الانقسامات بعد توقفها).

٢- **طريقة المعالجة بالكولشيسين**، حيث تتوقف الانقسامات في الطور الاستوائي (الثاني) Metaphase بسبب تقطع خيوط المغزل الانقسامي، وبالتالي

تصبح المنطقة المرستيمية المنقسمة في مرحلة ك- ميتوز C-mitosis أي انعدام الطورين الثالث والرابع (شكل٤٥).



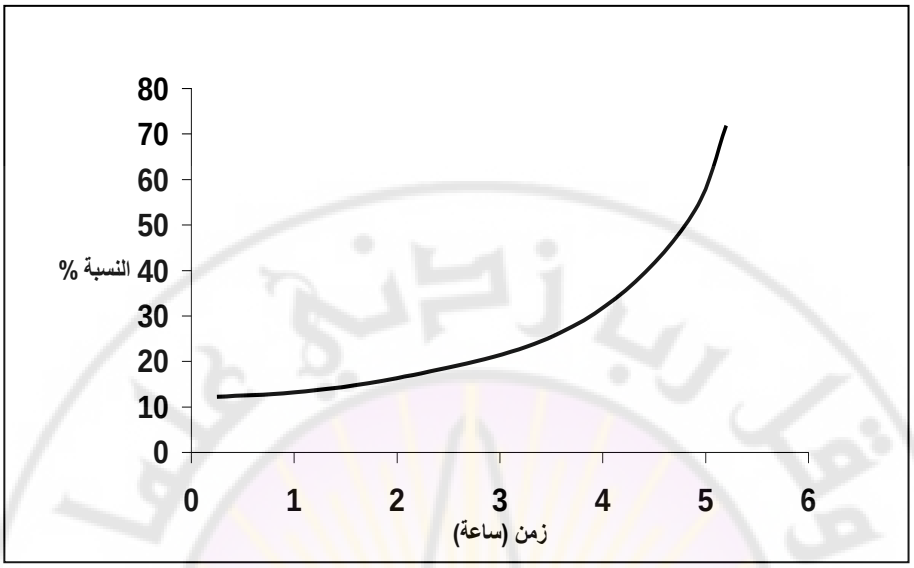
شكل (٤٥) ظاهرة توقف الانقسام الخيطي عند الطور التالي (الاستوائي) لدى معالجة الجذور بالكولشيسين لمدة (٥) ساعات وعدم ملاحظة الطورين الثالث والرابع وهي حالة C-mitosis
في الأعلى: مقطع مكروتومي في جذور البصل (لاحظ وجود ثلاث لوحات استوائية وطور أول فقط).
في الأسفل: منظر بالتكبير القوي لمحضر هرس في جذور الفول (لاحظ وجود سبع لوحات استوائية واضحة إضافة إلى الطور الأول فقط).

للحصول على المحضرات العائدة لطريقة الكولشيسين في تحديد الاستمرار الزمني للانقسام الخيطي نتبع الخطوات الآتية:

- نضع الجذور النباتية في محلول الكولشيسين بتركيز (٠,٠١) أو (٠,٠٢).
- نثبت عدداً من الجذور بعد مرور ساعة واحدة من بدء المعالجة.
- نثبت عدداً آخر من الجذور بعد مرور ساعتين من بدء المعالجة.
- نثبت عدداً ثالثاً من الجذور بعد مرور ثلاث ساعات من بدء المعالجة.
- نثبت عدداً رابعاً من الجذور بعد مرور أربع ساعات من بدء المعالجة.

يتم التثبيت بمحلول كارنوي المعدل (١:٣) لمدة ٢-٤ ساعة ثم الحفظ في الكحول ٨٠%.

- يتم تجهيز محضرات ملونة وهرسها وتحويل الجيد منها إلى ثابتة.
- يتم إحصاء عدد الطورين الأول والثاني وتحديد نسبتها المئوية وذلك في كل من الساعات الأربع المذكورة.
- نرسم خطاً بيانياً يوضح العلاقة بين النسبة المؤية للطور الثاني والزمن، فيبدو أنه تصاعدي كما في (الشكل٤٦)، بعد ذلك نعمد إلى تطبيق الطريقة الرياضية المناسبة وهي التي تعرف بعلاقة ديوستين Dustin ١٩٥٩ وذلك للحصول على الاستمرار الزمني للميتوز وأطواره الأربعة (لا داعي للدخول في تفاصيل هذه الطريقة).



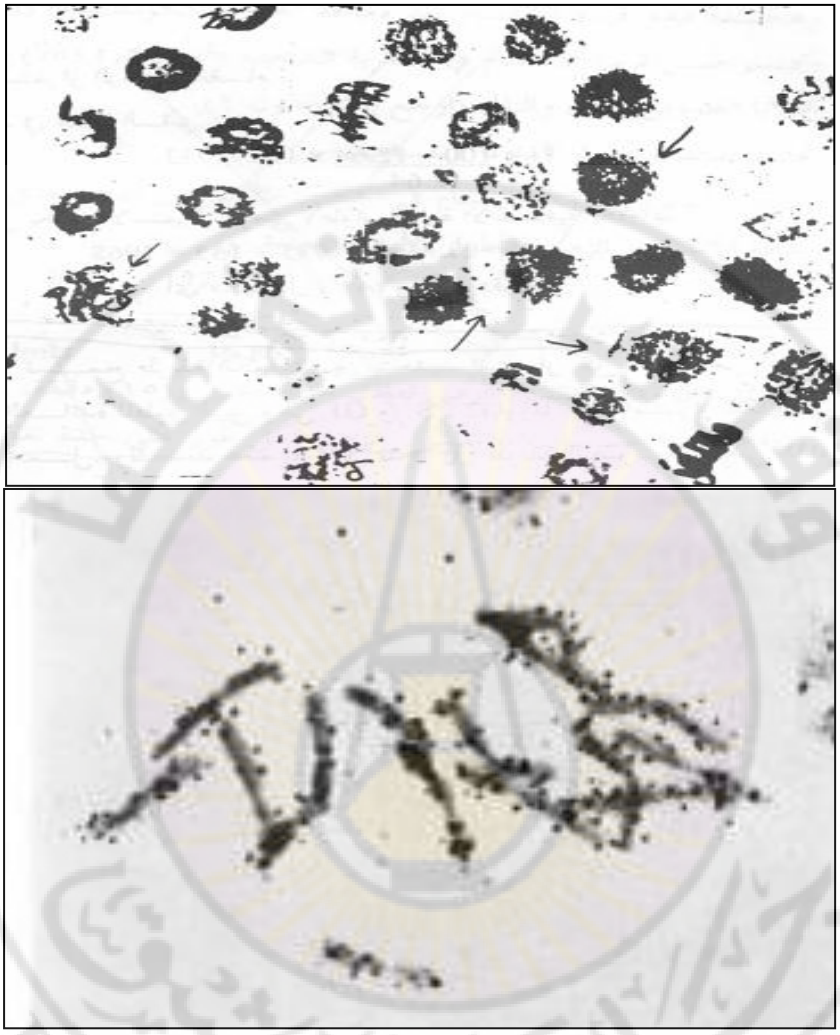
الشكل (٤٦) منحنى بياني يوضح تزايد النسبة المئوية للطور الثاني لدى معالجة الجذور بالكولشيسين بالارتباط مع الزمن.

٣- حساب الاستمرار الزمني لمراحل الطور البيني:

لا تسمح طريقة الكولشيسين بتحديد استمرار كل مرحلة من المراحل الثلاث العائدة للطور البيني وهي GI و S و G2، وإنما تحدد استمرار هذا الطور بشكل مجمل. ولتحديد هذه المراحل نلجأ إلى طريقة التصوير الشعاعي الذاتي Autoradiography. تعتمد هذه الطريقة على وضع الجذور في محلول التيميدين الموسوم بالتريتيوم thymidin الذي يدخل في النواة بجرعة نحو ٣٠٠ ميكروغرام/١٠٠سم^{3} ماء. تتحقق المعالجة في غرفة خاصة بدرجة ٢٥° لمدة ساعة، ثم تغسل الجذور بالماء وبالتيميدين غير المعالج بالتريتيوم (غير الموسوم)، ثم تثبت خلال فترات زمنية متدرجة من بدء المعالجة (من٣-٣٠ ساعة) وبفاصل من ١-٢ ساعة لكل تثبيت. بعد ذلك تصنع محضرات وتلون ويوضع عليها مستحلب خاص حساس للجسيمات بيتا ß التي تنبعث من تلاشي التريتيوم المشع، ثم تحفظ في الظلام لفترة زمنية كافية (شهر أو أكثر) وتجرى

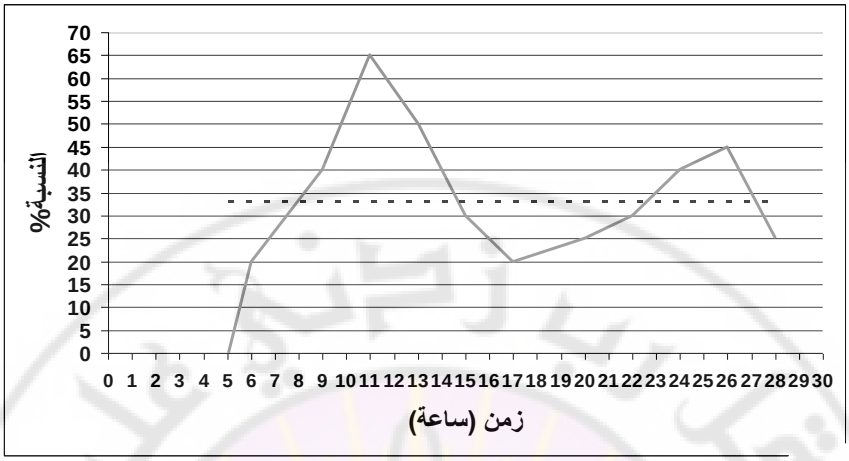
عليها عملية إظهار مماثلة لإظهار الأفلام الحساسة وتفحص تحت المجهر. وهكذا تبدو أماكن تناسخ الDNA محملة بنقاط سوداء ناجمة عن ترسب معدن الفضة في أماكن الوسم (شكل٤٧).

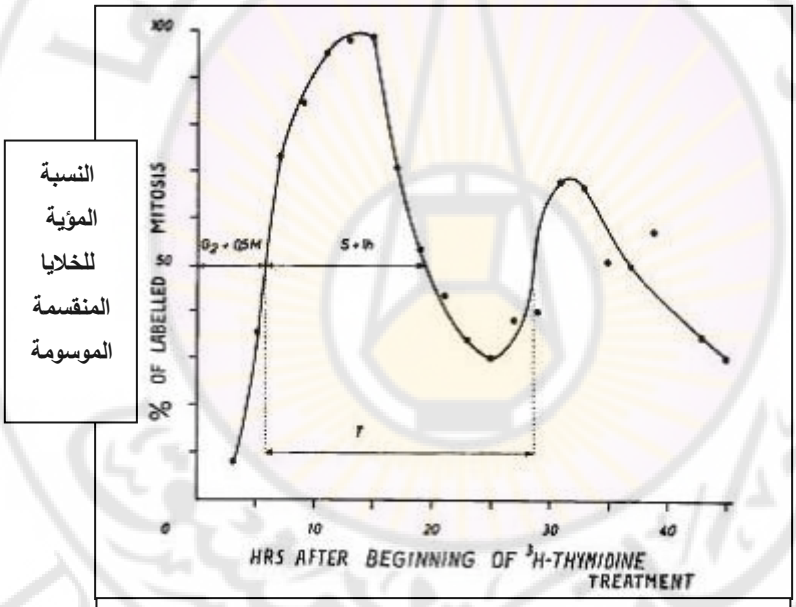
يلي ذلك إحصائية دقيقة للشرائح المثبتة خلال فترات زمنية متدرجة واكتشاف ظهور أول الانقسامات الموسومة وإحصاء نسبتها المئوية. (ظهرت في جذور الفول بعد مرور ٦ ساعات من التثبيت). **يلي ذلك** حساب أعلى نسبة للأطوار الانقسامية الموسومة (لوحظت بعد مرور ١١ ساعة من بدء المعالجة) وهي التي تمثل القمة الأولى، ثم حساب النسبة العليا الثانية (لوحظت بعد مرور ٢٦ ساعة في جذور الفول). وهكذا يتم رسم الخط البياني المناسب الذي يحدد وجود قمتين متتاليتين الثانية أخفض من الأولى وذلك حسب كواستلير و شتيرمان Quastler and Sherman عام1959 (شكل ٤٨).



الشكل (٤٧) في الأعلى: صورة فوتوغرافية بالتكبير القوي توضح آثار ظهور الوسم بالتيميدين الموسوم بالتريتيوم على النوى باستعمال طريقة التصوير الشعاعي الذاتي في نهايات جذور الفول (لاحظ الأسهم).

في الأسفل: صورة توضح ترسب معدن الفضة على صبغيات البصل وهي في الطور الثاني بعد مرور ١٧ ساعة من المعالجة بالوسم (1000^{X}).





الساعات بعد المعالجة بالتيميدين الموسوم بالتريتيوم

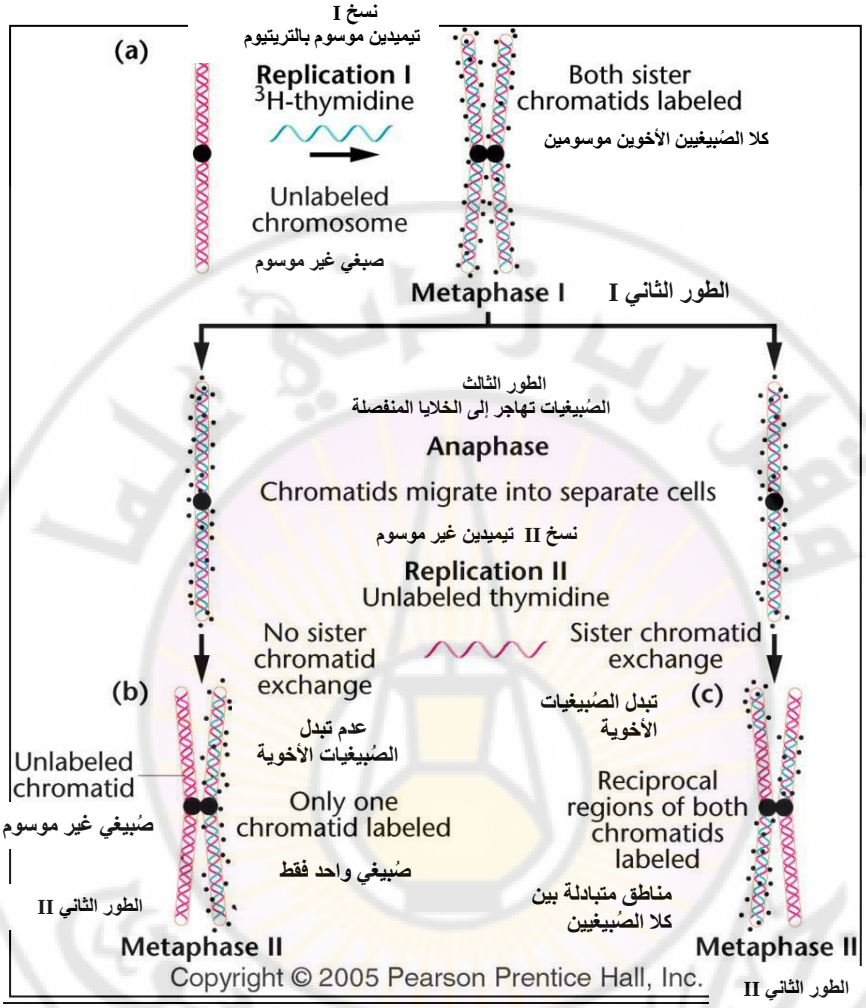
شكل (٤٨) في الأعلى: مخطط بياني يوضح تبدل عدد الانقسامات الموسومة في خلايا جذور الفول ربطاً مع الزمن.(من دراستنا) الشرح في النص

في الأسفل: مخطط قرينة الوسم يُظهر العلاقة بين نسبة الميتوز الموسوم وزمن التثبيت بعد بدء المعالجة بالتيميدين المشع(حسب كواستلر).

ومن (الشكل٤٨) الصورة بالأعلى نجد أن قيمة G1 تساوي (٥) ساعات (بدء ظهور الانقسامات الموسومة). وقيمة S تساوي (٦) ساعات (من القمة الأولى١١-٥ = ٦)، وقيمة كامل الحلقة الانقسامية (T) تساوي (١٥) ساعة من حاصل طرح القيمتين (١١-٢٦). أما G2 فتساوي

(٦ +٥) - ١٥ =٤ ساعة.

من المعروف أن وسم DNA الصبغيات بالتيميدين الموسوم بالتريتيوم وظهور آثار معدن الفضة عليها يرتبط بنتائج تجربة تيللر (شكل٤٩).



شكل (٤٩) تجربة تيللر a- كلا صُبيغيي الصبغي في الطور الثاني موسومين (نقاط سوداء) بعد المعالجة بالتيميدين الموسوم بالتريتيوم.

b- في الدورة الانقسامية الثانية صُبيغي واحد موسوم، أو تبادل الوسم بين الصِّبيغيين.

٤- حساب الاستمرار الزمني النسبي لأطوار الانقسام الخيطي:

تعتمد هذه الطريقة على حساب النسبة المئوية للانقسام الخيطي ولأطواره الأربعة، إضافة إلى نسبة الخلايا غير المنقسمة (الطور البيني). ومن ذلك فإن

الطور الذي يأخذ أعلى نسبة يكون أطول زمناً من الطور الذي يأخذ النسبة الأقل. ومن مساوئ هذه الطريقة أنها لا تُحدد الأطوار بالدقائق أو بالساعات، لكنها تعطي فكرة أولية عن تفاوت الزمن بين الأطوار، وبالتالي تحدد ترتيبها واختلافها من نوع نباتي إلى لآخر.

التوضيح العملي:

سنعتمد في دراستنا العملية على طريقة حساب الاستمرار الزمني النسبي فقط والتي يمكن تحقيقها وفق الخطوات الآتية:

١- تجهيز المحضرات

تُقص الجذور المنتشة بالماء العادي بطول (١-١,٥سم)، ثم تلون بالكارمن الخلي أو أي ملون آخر، ويجهز منها محضرات هرس وتثبت بطريقة التبريد (CO_2 المضغوط)، ثم تحول لمحضرات دائمة.(راجع طريقة تحويل محضرات الهرس إلى محضرات دائمة). يجب أن تتمتع هذه المحضرات بمواصفات جيدة من حيث توافر الانقسامات وتلونها المناسب وعدم توضع الخلايا فوق بعضها.

٢- طريقة العمل:

توزع خلال الجلسة المحضرات على المجموعات الطلابية (لكل مجموعة ٣ محضرات)، وعلى كل طالب أن يتعرف أطوار الانقسام الخيطي Mitosis في البداية ويرسمها، ثم يقوم بإحصاء ٣ ساحات مجهرية جيدة بالتكبير القوي (400^x) ويحدد فيها عدد خلايا كل طور من أطوار الانقسام وعدد خلايا الطور البيني. بعد ذلك يتم إحصاء عدد الخلايا للمجموعة الطلابية الواحدة (المؤلفة من ثلاث طلاب)، ثم عدد الخلايا لجميع المجموعات الطلابية وتجمع النتائج في (الجدول٣)، بعد ذلك نقوم بتسجيل (الجدول ٤) كمتابعة (الجدول٣) بهدف تحديد الشدة الانقسامية أو قرينة الانقسام (MI%) ومن ثم تحديد الزمن النسبي للأطوار المنقسمة وغير المنقسمة.

(انظر نماذج من صور الساحات المجهرية للانقسام الخيطي في نهاية هذا البحث، وتعّرف الأطوار الموجودة في كل صورة وميزها جيداً).

ملاحظة: كلما زاد طول الجذر نقصت الانقسامات وبالعكس، فمثلاً الجذر بطول (١٥مم) أكثر انقساماً من الجذر بطول (٢٥مم) وهكذا.

جدول (٣) نتائج إحصاء الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة (الأرقام مأخوذة كمثال افتراضي)

المجموعة الطلابية	أطوار الانقسام الخيطي Mitosis				مجمـــوع خلايـــا الانقسام	خلايا الطور البيني	مجموع الخلايا المدروسة
	Pro	Meta	Ana	Telo			
١							
٢							
٣							
٤							
٥							
٦							
٧							
المجموع Σ	١٥٠	١٠٠	٦٢	٨١	٣٩٣	٥٨٨٠	٦٢٧٣

Damascus University

جدول (٤) يوضح الشدة الانقسامية (MI%) والزمن النسبي للأطوار المنقسمة وغير المنقسمة(مثال افتراضي).

المعطيات	Mitosis				المجموع Σ	راحة Inter.	مجموع الخلايا المدروسة
	Pro.	Meta.	Ana.	Telo.			
% العامة	١٠٠×١٥٠ / ٦٢٧٣ = ٢,٤	×١٠٠ / ١٠٠ / ٦٢٧٣ = ١,٦	×٦٢ / ١٠٠ / ٦٢٧٣ = ١	×٨١ / ١٠٠ / ٦٢٧٣ = ١,٣	×٣٩٣ / ١٠٠ / ٦٢٧٣ = ٦,٣	٥٨٨٠ / ١٠٠× / ٦٢٧٣ = ٩٣,٧	١٠٠
الشدة الانقسامية (قرينة الانقسام) MI%	/		/	/	%٦,٣	/	/
% للأطوار المنقسمة من الميتوز	١٠٠×١٥٠ / ٣٩٣ = %٣٨,٢	٢٥,٤ %	١٥,٨ %	٢٠,٦ %	%١٠٠	/	/

من (الجدول٤) نجد أن الزمن النسبي (من النسبة المئوية) للأطوار هي حسب التسلسل التالي: الطور الأول ← الطور الثاني ← الطور الرابع ← ثم الطور الثالث أي أن أطول الأطوار هو الطور الأول وأقصرها هو الطور الثالث (من النسبة المئوية وليس من الزمن).

وفي حال وجود اختلاف في الزمن النسبي عن التسلسل المذكور للأطوار، فإن السبب يعود إلى عدة أخطاء منها:

١- العدد القليل للخلايا المدروسة (يجب أن يكون العدد بحدود /٢٠٠٠٠/ خلية، وعندها تحسب الشدة الانقسامية MI (Mitotic index) بالنسبة الألفية ‰ وليس بالنسبة المئوية % وهذا هو الأصح، وتُراوح قيمتها في مرستيمات الجذور النباتية في مجال٧- ١٥%.

٢- عدم تمييز الطالب بين بعض الأطوار الانقسامية، ولاسيما بين الطورين البيني والأول، والطورين الرابع والبيني، وبشكل أقل بين الطورين الأول والثاني.

٣- سوء المحضرات المجهزة بطريقة الهرس Squash أوعدم جودة المجاهر المستعملة.

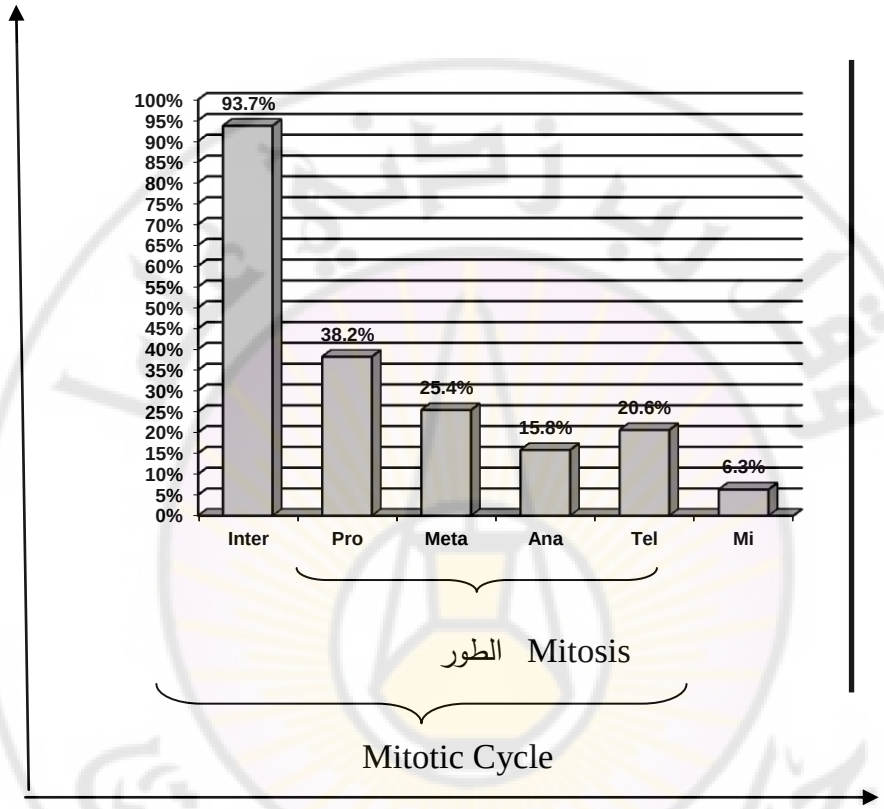
٤- عدم جدية الطالب في العمل والبحث عن الأطوار وإحصائها.

٥- عدم أخذ الجذور بشروط بيئية وعلمية واحدة (يجب أن يكون للجذور الطول نفسه) ومأخوذ من محطة زراعية واحدة، ومزروعة في حاضنة بدرجة حرارة واحدة للجميع.

بعد الانتهاء من كتابة (جدول٤) ومناقشة النتائج نقوم برسم الخط البياني العائد لهذه التجربة وهو كما يأتي (شكل٥٠).

الهدف من تجربة تحديد شدة الانقسام وزمن أطواره:

١- معرفة دورات زراعة النباتات والاهتمام بزراعة النباتات ذات الشدة الانقسامية الأعلى، لأن انقسامها أسرع وأكثر ومن المحتمل أن يكون محصولها مبكراً وأكثر وفرة، مع العلم أن الشدة الانقسامية تختلف حسب النبات ونوعه وعمره.



شكل (٥٠) المنحني البياني لتحديد الطول النسبي لأطوار الانقسام الخيطي في نهايات جذور البصل.

(لاحظ التسلسل الصحيح لأطوار الانقسام والدارة الانقسامية وقرينة الانقسام)

٢- يُفضل تحديد الشدة الانقسامية للنبات الداخل في تجارب بحثية قبل البدء بها، لربط نتائج البحث مع شدة ونوعية الأطوار الانقسامية لهذا النبات.

مثال تطبيقي(١):

في مرستيم عباد الشمس لوحظ (٨١٤٤) خلية منها (١٢٠) خلية في طور بروفاز، و(٦٢) خلية في طور الميتافاز، و(٣٦) خلية في طور الأنافاز، و(٤٨) خلية في طور التلوفاز.

حدد قرينة الانقسام (MI)، والاستمرار الزمني النسبي لكل طور.

استخرج النسبة المئوية لخلايا الإنترفاز.

الجواب:(MI=%٣,٢٦)، (Pr=%٤٥,١)، (Met=%٢٣,٣)، (A=%١٣,٥)، (T=%١٨,١).(Int. =% 96.74).

مثال تطبيقي(٢):

بفرض أن الاستمرار الزمني للميتوز في المثال المُوضح بالجدول رقم (٢) هو(١٣٠) دقيقة، حدد زمن الأطوار المنقسمة كل على حده ، وزمن الطور البيني وذلك بالدقائق، سجل طريقة الحل.

الجواب: (زمن الطور الأول=٩,٤٤ دقيقة)،(زمن الطور الثاني=٣٢,٩٦ دقيقة)،(زمن الطور الثالث=٢٠,٦ دقيقة)، زمن الطور الرابع=٢٦,٧٨ دقيقة)،(زمن الطور البيني=٣٢,١٧ دقيقة).

المطلوب عمله:

١- مناقشة ودراسة جدول النتائج المشتركة الخاصة بإحصاء المجموعات الطلابية للخلايا المدروسة أثناء الجلسة، وحساب النسبة المؤية لكل طور مع الطور البيني.

٢- حساب قيمة قرينة الانقسام (MI) ومناقشتها.

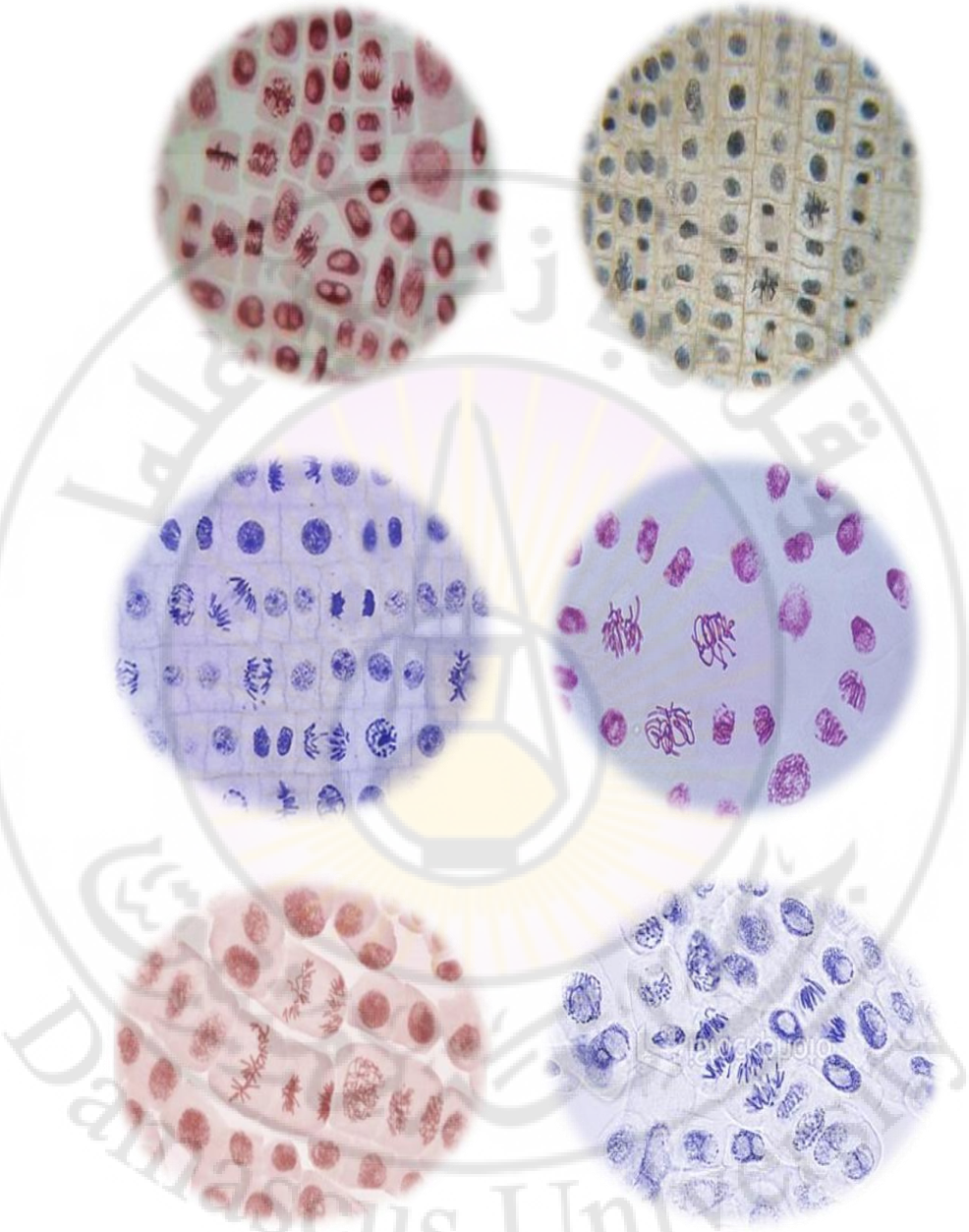
٣- رسم الدارة الانقسامية وفق نتائج العمل المخبري ومقارنتها بالدارة النظامية المعروضة والخاصة بنهايات جذور للبصل ومناقشة النتائج.

٤- رسم منحني بياني بالأعمدة وفق نتائج العمل المخبري المشترك للمجوعات ومقارنتها مع الخط البياني لنتائج انقسام خلايا البصل.

٥- حل المثالين التطبيقيين المذكورين سابقاً.

٦- حل المثال الذي سيُعطى لك في الجلسة المُنفذة.

ويوضح (الشكل٥١) عينات من صور لساحات مجهرية تضم أطوار الانقسام الخيطي بهدف التعرف عليها من قبل الطلاب وإحصاء نمط وعدد الأطوار المنقسمة وغير المنقسمة.



شكل (٥١) نماذج مجهرية للانقسام الخيطي في الخلايا النباتية (مقاطع وهرس)

القسم الرابع

تحقيق بعض الدراسات الصبغية

طرائق إحصاء العدد الصبغي – النمط النووي

المخطط النووي – المخطط الصبغي

التوضيح النظري

أولا – طرائق إحصاء العدد الصبغي:

تتميز الخلية الجسمية في كل نوع نباتي بوجود عدد صبغي ثابت يرمز له (2n)، وقد نصادف في بعض الأنواع النباتية أعداداً صبغية متفاوتة. كما نجد في بعض الأنواع العائدة للذرة والجودار وغيرها صبغيات إضافية لا تدخل في حساب العدد المضاعف نطلق عليها اسم الصبغيات (B) خلافاً للصبغيات الأصلية التي تسمى الصبغيات (A)، ويعتقد أن الصبغيات الإضافية (التي قد يتراوح عددها من ١–٣٤ صبغياً) ناتجة عن الانقسام المنصف غير الطبيعي، أو عن الانقسام غير الطبيعي للجزيء المركزي، وهي غالباً صغيرة الحجم وأكثر تعشقاً للملونات من الصبغيات (A).

لقد لاقت دراسة الأعداد الصبغية، ولاسيما في محضرات الهرس، استعمالاً واسعاً وأهمية كبيرة بالنسبة إلى الخلية والوراثة والانتخاب وإنتاج البذور. وتقدم هذه الدراسات خدمات جمة في المجالات الزراعية وفي مجال التصنيف النباتي.

تتحقق دراسة الأعداد الصبغية في نهايات الجذور النباتية التي لا يزيد طولها على ١–٢ سم، أو في الأوراق الفتية بطول من ٣–٧ مم، ويمكن الكشف عن الأعداد الصبغية في مآبر بعض البراعم الزهرية وذلك من خلال الانقسام المنصف ولاسيما في مرحلتي التشتت أو الطور الاستوائي(I).

يفضل استعمال بعض المكثفات الصبغية قبل الشروع بتلوينها كي يسهل إحصاء عددها أو باستعمال التبريد للجذور العائدة للنباتات المراد إحصاء العدد الصبغي فيها. كما يفضل استعمال طريقة الهرس لسهولة وسرعة انجازها نظراً لعدم وجود المراحل المعقدة والطويلة التي نصادفها في طريقة المحضرات الميكروتومية الثابتة. ومن أشهر الملونات المستعملة في دراسة الأعداد الصبغية نجد الكارمن الخلي إضافة إلى طريقة تفاعل فولكن بكاشف شيف.

ويشير الجدول التالي إلى العدد الصبغي الجسمي (2n) لأهم الأنواع النباتية:

النبات	الاسم العلمي	العدد الصبغي المضاعف 2n
القمح أحادي البذرة	*Triticum monococcum*	١٤
القمح الرباعي	*Triticum durum*	٢٨
القمح السداسي	*Triticum aestivum*	٤٢
الجودار	*Secale cereal*	١٤
الشعير	*Hordeum sativum*	١٤
الذرة	*Zea mays*	٢٠
الشوفان	*Avena sativa*	٤٢
الرز	*Oryza sativa*	٢٤
البازلاء	*Pisum sativum*	١٤
الفاصولياء	*Phaseolus vulgaris*	٢٢
العدس الطعامي	*Lens esculenta*	١٤

عباد الشمس	*Heliantus annus*	٣٤
الخردل الأبيض	*Sinapsis alba*	٢٤
القنب	*Cannabis sativa*	٢٠
البطاطا	*Solanum tuberosum*	٤٨
التبغ	*Nicotiana tabacum*	٤٨
القطن العشبي	*Gossypium herbaceum*	٢٦
القطن العادي	*Gossypium hirsutum*	٥٢
الفصفصاء المزروعة	*Medicago sativa*	٣٢
الترمس	*Lupinus luteus*	٥٢
النفل الأحمر	*Trifolium pretense*	١٤
النفل الزاحف	*Trifolium repens*	٣٢
الفول المزروع (بيقية)	*Vicia sativa*	١٢
الفول الوبري	*Vicia villosa*	١٤
الحمص	*Cicer arietinum*	١٦
البندورة المغذية	*S.lycopersicum esculentum*	٢٤
الفليفلة الحمراء	*Capiscum annum*	٢٤
الخيار	*Cucumis sativa*	١٤
القرع الكبير	*Cucurbita maxima*	٤٨
الملفوف	*Brassica oleracea*	١٨
الفجل	*Raphanus sativus*	١٨
الشمندر السكري	*Beta vulgaris*	١٨

البصل	*Allium cepa*	١٦
التفاح	*Malus domestica*	٣٤
الأجاص	*Pyrus communis*	٣٤
المشمش	*Armeniaca vulgaris*	١٦
الكرز	*Cerasus vulgaris*	٣٢
الخوخ	*Prunus domestica*	٤٨
الدراق	*Persica vulgaris*	١٦
الفريز	*Fragaria vesca*	١٤

ثانياً- النمط النووي (الكاريوتيب) Karyotype.

يُعرف كل كائن حي بامتلاكه عدداً صبغياً محدداً ومتميزاً بمورفولوجية تختلف عن غيره من الكائنات الأخرى، كما تحدد مورثاتها شكله وصفاته؛ وهذا ما يسمى النمط النووي أو الكاريوتيب، الذي يُشاهد في اللوحة الاستوائية الصبغية للخلية الجسمية المنقسمة؛ وأول من استعمل هذا المصطلح الوراثي الخلوي نافاشين.

يتحدد الكاريوتيب بشكل رئيسي بميزتين هما:

I- العدد الصبغي الذي يشكل الصيغة الصبغية المضاعفة Diploid (2n) في الخلايا الجسمية والصيغة الصبغية المفردة Haploid (1n) في الخلايا الجنسية أو العروسية.

II- المورفولوجية الصبغية ذات الأهمية الكبيرة في تحديد وتمييز الكاربوتيب تبعاً للنوع المدروس، والتي تتصف بالمواضيع المهمة الآتية:

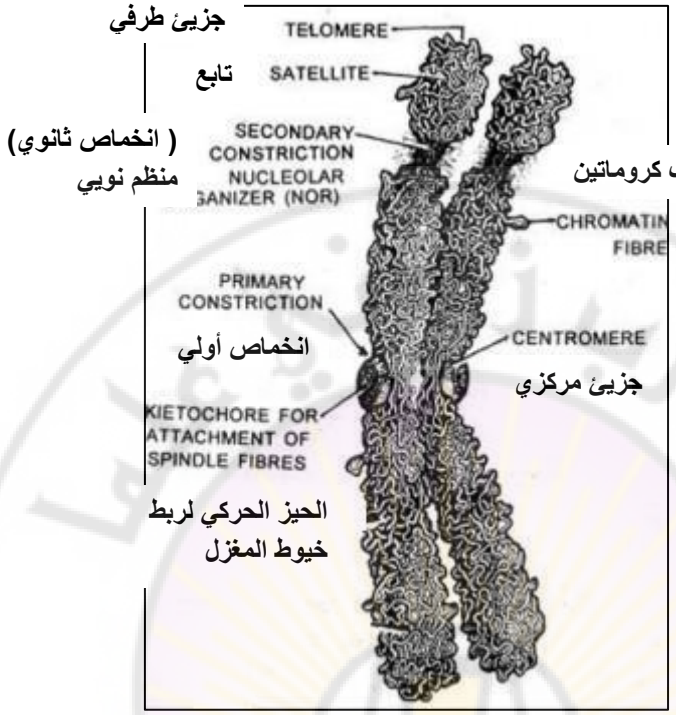
١- تتفاوت صبغيات الأنواع المختلفة بقياساتها وأشكالها من طويلة (بطول ٥٠ مكرومتر وقطر ٥ ميكرومتر) إلى قصيرة (بطول ١ميكرومتر وقطر ٠,٢ ميكرومتر).

٢- تبقى المورفولوجية الصبغية ثابتة في النوع الواحد.

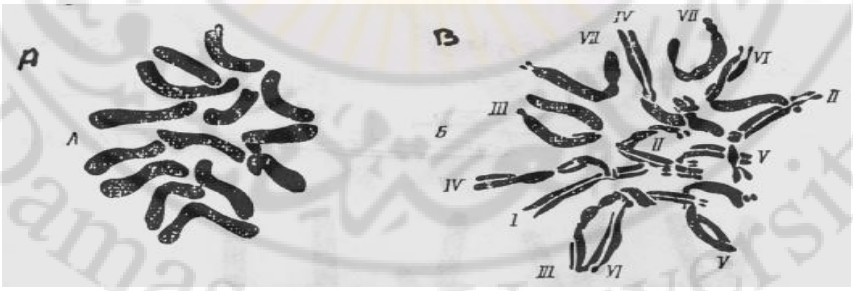
٣- تختلف مورفولوجية الصبغيات بعضها عن بعض بشكل جلي في الخلية الواحدة، وقد يصعب في بعض الأنواع، التمييز بين الأشفاع الصبغية المختلفة.

٤- تتحدد مورفولوجية الصبغي بمكان الجزيء المركزي centromere الذي يكون ثابتاً على الصبغي (بالنسبة لكل شفع)، ويبدو كمنطقة فاتحة (قليلة التلوين) يطلق عليه اسم الانخماص (التضييق) الأولي أو الحركي، كما تتميز بعض الصبغيات بوجود منطقة أخرى تشكل الانخماص الثانوي أو النويِّي (منطقة المُنَظِّمٌ النُوَيِّيّ nucleolus organizer). وفي هذه المنطقة يمتلك الصبغي سماكة قليلة تعادل (٧) نانومتر فقط وهي قليلة التلولب لذلك تبقى بدون اصطباغ، وعلى الغالب تنتهي هذه القطعة الصبغية القصيرة بالتابع Satellite وهو جزء كروي أو متطاول يتصل مع الصبغي بخيط رفيع وقد يكون قطره أقل من قطر الصبغي أو أكثر (شكل٥٢).

لقد أوجد الباحث ليفينسكي طريقة لتفكيك الصبغي تفكيكاً أولياً وثانوياً بهدف توضيح مورفولوجية صبغيات الطور الثاني metaphase (أو طور طليعة الثاني Prometaphase) بشكل جيد، وبذلك يتم تحديد مكان الجزيء المركزي والانخماص الأولي والثانوي والتوابع الأمر الذي يحدد شكل الكاريوتيب بكل وضوح. (شكل٥٣).



شكل (٥٢) منطقة الانخماص الأولي حيث الجزيء المركزي للصبغي، ومنطقة الانخماص الثانوي حيث تتشكل النويَة ويتوضع بجانب التابع.



شكل (٥٣) دراسة مورفولوجية لصبغيات الشعير *Hordum vulgare* (2n=14):
A- بالتلوين العادي. B– بطريقة التفكيك حسب ليفتسكي.

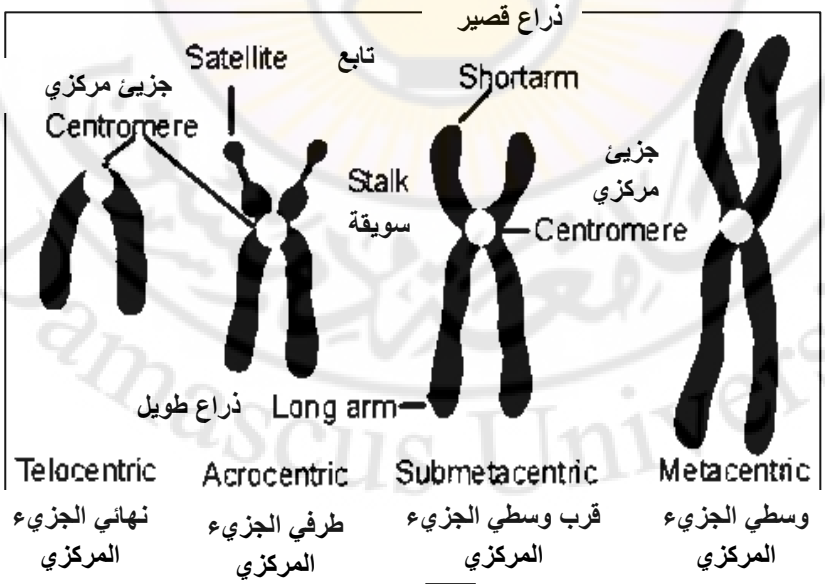
٥- يمكن تحديد أربعة أنماط من الصبغيات بما يتوافق مع مكان توضع الجزيء المركزي على الصبغي وذلك حسب قيمة النسبة الذراعية وهي نسبة طول الذراع الطويل Long arm للصبغي إلى نسبة طول الذراع القصير Short arm (L/S). وهذه المجموعات هي:

أ- صبغيات وسطية الجزيء المركزي Metacentric (m) تُراوح النسبة الذراعية عندها من (١-١,٩).

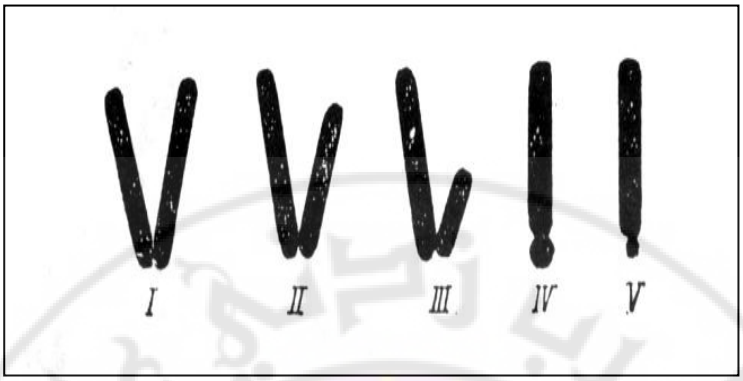
ب- صبغيات قرب وسطية الجزيء المركزي Sub metacentric (s) تُراوح النسبة الذراعية عندها من (٢-٤,٩).

ج- صبغيات طرفية الجزيء المركزي Acrocentric,(a) تكون النسبة الذراعية عندها فوق (٥).

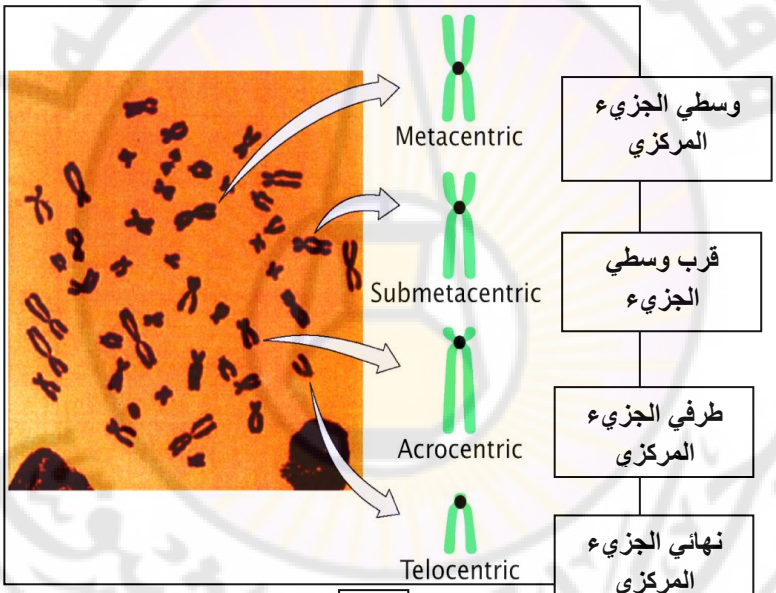
د - صبغيات نهائية (نقطية) الجزيء المركزي Telocentric (t) تكون النسبة الذراعية فوق (٨) (شكل٥٣).



أ



ب



ج

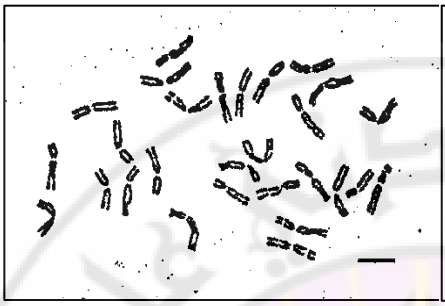
شكل (٥٤) أ – الأنماط الأربعة الصبغيات حسب مكان توضع الجزيء المركزي الذي يقسم الصبغي إلى ذراعين: طويل (L) وقصير (S)

ب–I– وسطي الجزيء المركزي (m). II– قرب وسطي الجزيء المركزي(s).

III– أقل من قرب وسطي الجزيء المركزي.IV– طرفي الجزيء المركزي (a).

V– نهائي الجزيء المركزي (t) ج–الأنماط الأربعة للصبغيات بعلاقتها مع لوحة النمط النووي (الكاريوتيب)

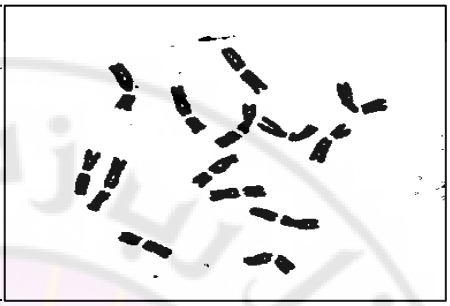
ويوضح (الشكل٥٥) نماذج من لوحات استوائية (كاريوتيب) لمجموعة متنوعة من النباتات.



القمح الرباعي (الصلب)

x = 7 2n=4x=28

Triticum durum



القمح الثنائي

2n=2x=14 x=7

Triticum monococcum

القمح السداسي الطري(قمح الخبز)

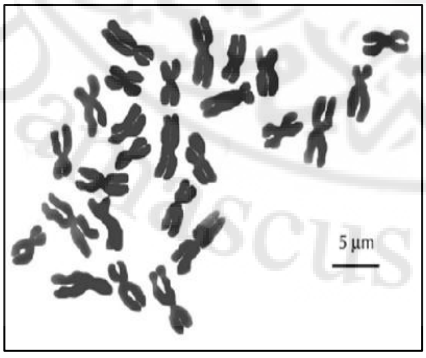
Triticum aestivum

(x= 7) 2n=4x=28

الفول *Vicia faba*

(x=6) 2n=2x=12

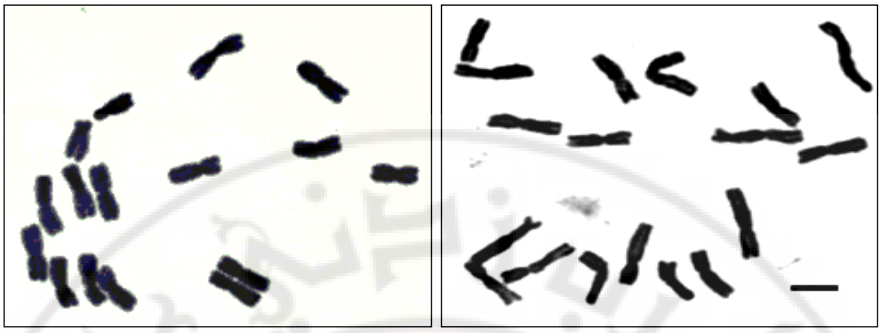
لاحظ وجود شفع طويل



***Betula* بتولا**

البصل *Allium cepa*

2n= 26 (x=8) 2n=16



سيسترووم *Cestrum* 2n=16 (x=8) استر *Aster* 2n=18 (x=9)

الجلبان *Lthyrus sp* الشعير *Hordium*

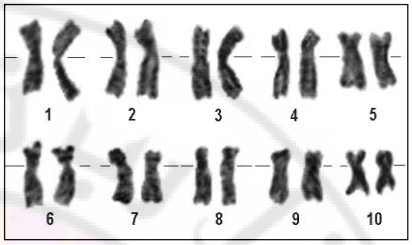
(x=7) 2n= 14 (x=7)2n=14

شكل (٥٥) صور فوتوغرافية لعشر لوحات استوائية نباتية (كاريوتيب) مع توضيح العدد الصبغي (2n) والعدد الأساسي (x).

ثالثاً- المخطط النووي (الكاريوغرام) Karyogram:

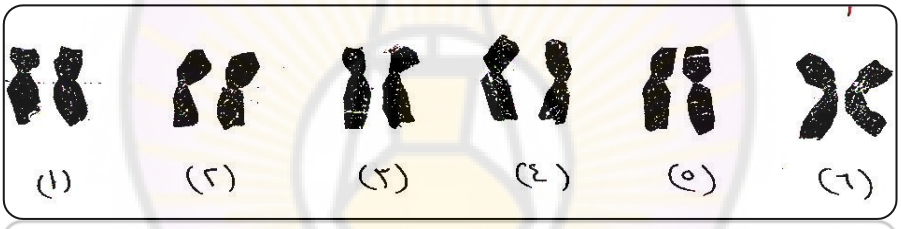
يرى بعض الباحثين أن مُصطلحَيْ الكاريوتيب والكاريوغرام يصبان في مفهوم واحد يتمثل بالصبغيات المبعثرة والمتوضعة على اللوحة الاستوائية في الطور الثاني من الانقسام الخيطي؛ بينما يرى البعض الآخر أن الكاريوغرام هو صبغيات اللوحة الاستوائية المصورة عن المجهر التي تم قصها، ومن ثم لصقها (على ورق أو غير ذلك) مرتبةً بهيئة أشفاع متماثلة وذلك بشكل تنازلي من الشفع الأطول انتهاءً بالشفع الأقصر. فإذا قمنا بتصوير هذه اللوحة،الملصق عليها الأشفاع

الصبغة، فإننا سنحصل على ما يسمى المخطط النووي أو الكاريوغرام Karyogram (شكل٥٦).



المخطط النووي لنبات الذرة *Zea mays*
لاحظ وجود عشرة أشفاع صبغية مرتبة تنازلياً

المخطط النووي لنبات الصبر *Aloe*
لاحظ وجود سبعة أشفاع صبغية مرتبة تنازلياً



كاريوغرام يوضح ستة أشفاع مرتبة تنازلياً بعد قصها من الصورة ولصقها وإعادة تصويرها.

شكل (٥٦) مخططات نووية (كاريوغرام) لبعض النباتات، حيث يبدو الترتيب التنازلي للأشفاع الصبغية.

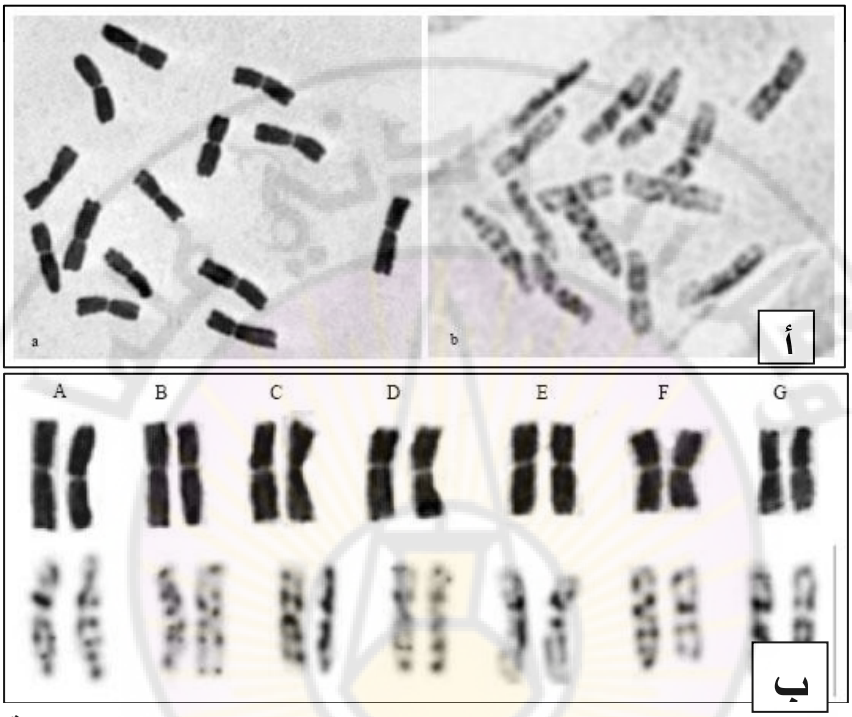
يتم في الكثير من الأبحاث التعبير عن الكاريوغرم بإجراء تعصيب وتلوين الصبغيات بتقنية غيمزا Giemsa technic وإظهار عصابات س C–banding (أو عصابات أُخرى بتقنيات متنوعة)، وبذلك تبدو على الصبغي مناطق غامقة اللون تتناسب قياساتها، وحجومها مع الطبيعة الكيميائية له، وتتناوب مع مناطق أخرى فاتحة ولهما علاقة بمناطق الكروماتين

المغاير (هتروكروماتين) Heterochromatin والكروماتين الحقيقي (ايوكروماتين) Euchromatin. وتسمح هذه التقنيات بالتمييز بين الأشفاع الصبغية، ومعرفة صُبْغِيَيْ كل شفع من تطابق العصابات لدى كل منهما (شكل٥٧).

شكل (٥٧) A– ثلاثة أشفاع من الصبغيات المتماثلة ملونة بتقنية غيمزا: لاحظ تطابق العصابات (المناطق الغامقة) لدى كل شفع.

B– المخطط النووي(كاريوغرام) لصبغيات نبات الجودار الملونة بتقنية غيمزا (لاحظ الأشفاع الصبغية السبعة التي يمكن تمييزها بتطابق العصابات).

هذا ويوضح (الشكل٥٨) مقارنة الكاريوتيب والايديوغرام كل على حدة، وذلك بالتلوين العادي والتلوين بتقنية غيمزا.



شكل (٥٨) صور لصبغيات جنس هيتيرانتيليوم *Heterantheium* من الفصيلة الكلئية أو النجيلية (2n =14): أ- كاريوتيب بالتلوين العادي (a) وبغيمزا (b) لنفس اللوحة الاستوائية.

ب- كاريوغرام بالتلوين العادي (أعلى) وبغيمزا (أسفل) لنفس اللوحة الاستوائية.

رابعاً- المخطط الصبغي (ايديوغرام) Idiogram:

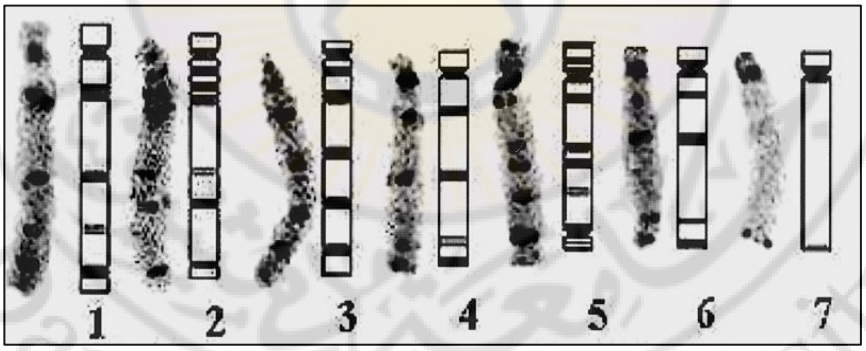
يمثل الإيديوغرام ترتيب الأفراد الصبغية من الأشفاع المتماثلة العائدة للوحة الاستوائية (كاريوتيب) ترتيباً يبدأ من الأطول فالأقصر. ويتحقق ذلك بأن يوضع كل صبغي على خط مستقيم يمثل فيه الجزيء المركزي كنقطة على الخط، ويكون الذراع القصير باتجاه الأعلى والذراع الطويل باتجاه الأسفل، وتمثل هذه اللوحة رسماً تخطيطياً ذاتياً للصبغيات ولا تمثل الصورة الفوتوغرافية لها، (شكل٥٩).

شكل (٥٩) مخططات صبغية للعدد النصفي للصبغيات:

A- نبات الجلبان *Lathyrus* (2n = 14)

B- نبات الفول *Vicia faba* (2n = 12)

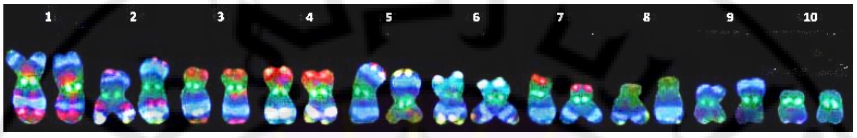
ومن المفيد جداً في الدراسات الصبغية مقارنه لرسم مخطط صبغي (ايديوغرام) مع ما يوافق الصبغيات المطبق عليها تقنية غيمزا نفسها (شكل٦٠).



شكل (٦٠) صورة لسبعة صبغيات معالجة بتقنية غيمزا تظهر فيها عصابات bands الكروماتين المغاير (هيتيروكروماتين) في مناطق محددة على الصبغيات، وقد رسم بجانب كل صبغي المخطط (ايديوغرام) المماثل له مع توضيح أماكن العصابات.

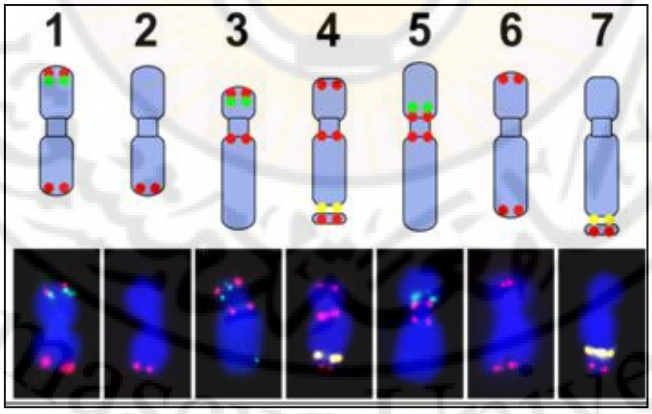
لقد استُعملت في الأيام الأخيرة مجموعة من التقنيات الحيوية لدراسة الصبغيات مثل التهجين في الموقع المفلور Fluorescent In Situ Hybridization

والمعروفة بالرمز فيش(FISH)، والتهجين في الموقع الجينومي In Situ Genome Hybridization والمعروفة بالرمز جيش (GISH) وغير ذلك. وباستعمال تقنية فيش لدراسة الكاريوتيب والكاريوغرام يمكن تمييز الأشفاع الصبغية بالألوان المتماثلة الموجودة على طول صبْغِيَّيْ الشفع الواحد (شكل٦١).



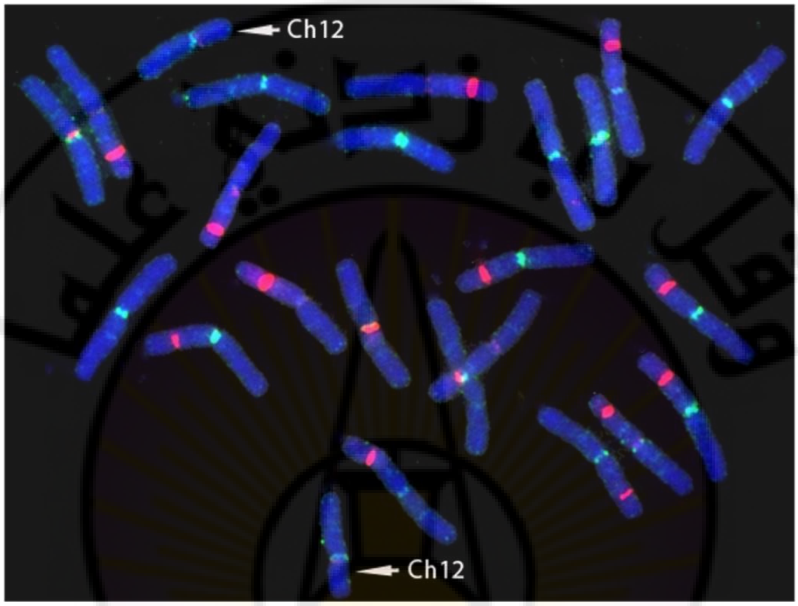
شكل (٦١) كاريوغرام يوضح الأشفاع الصبغية العشرة لنبات الذرة باستعمال تقنية فيش.
(لاحظ الألوان المتطابقة بالنسبة إلى كل شفع صبغي من الصبغيات المتماثلة)

وباستعمال تقنية فيش بهدف إظهار النمط النووي لصبغيات نبات الذرة *Zea mays* أمكن التمييز فيما بينها من خلال الوسم اللوني الذي يميز كل صبغي إضافة إلى توضيح ذلك في الرسم الصبغي(ايديوغرام) (شكل ٦٢).



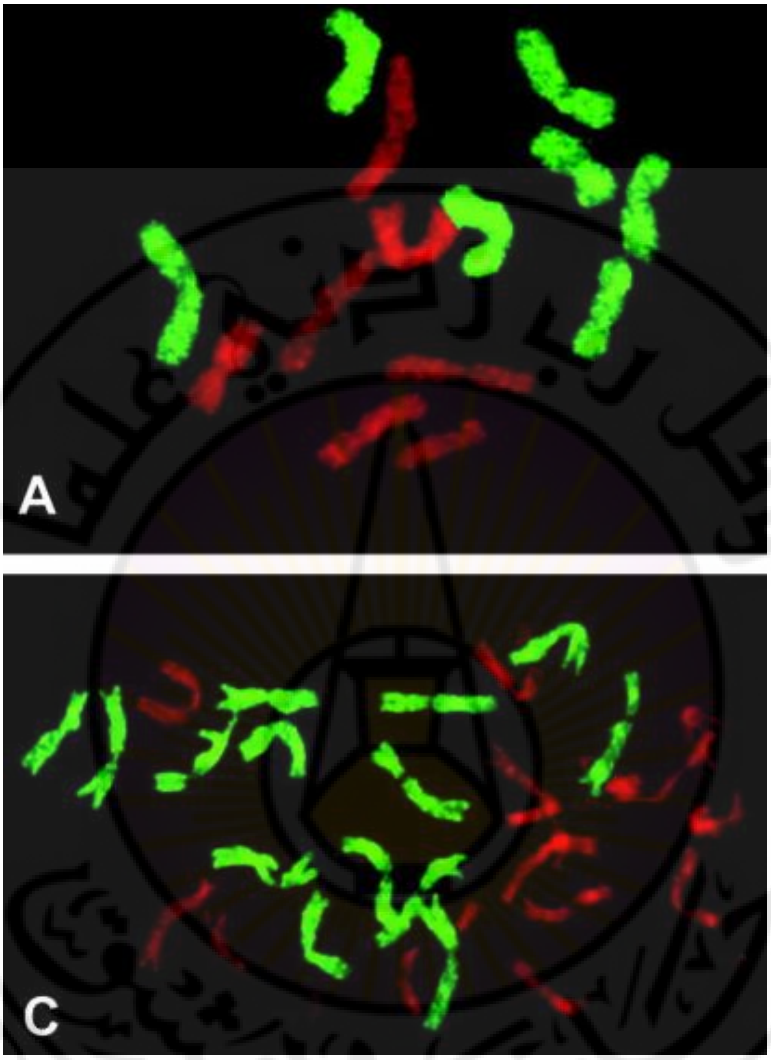
شكل (٦٢) في الأسفل صور لنمط نووي يوضح الصبغيات الإفرادية للذرة بتقنية فيش (لاحظ الألوان التي لها ما يماثلها في الشفع الصبغي الواحد).في الأعلى: رسم مخطط صبغي يوضح الصبغيات ذاتها مع وضع الألوان المشار إليها.

كما تم تطبيق هذه التقنية على صبغيات الصنوبر *Pinus* وذلك بإظهار بقع حمراء وخضراء على الأشفاع الصبغية كعلامات تتوافق مع تسلسل الـDNA في مناطق مختلفة منها(شكل ٦٣).



شكل (٦٣) نمط نووي يوضح صبغيات نبات الصنوبر المعالجة بتقنية فيش (لاحظ وجود ٢٤ صبغي تتضمن ١٢ شفع متماثل من حيث نوع ومكان توضع الألوان بما يتوافق مع الحمض النووي المناسب لكل صبغي).

وتتم دراسة النمط النووي بتقنية جيش GISH وذلك بوجود جينومين أو أكثر، كما يلاحظ في حالات التهجين الخلطي Amphiploid أو Allopolyploid بحيث يُعطى لكل جينوم لون خاص به وبذلك يمكن تمييز صبغيات الجينوم المعني داخل خلايا الهجين من خلال لونها (شكل٦٤).



شكل (٦٤) تقنية جيش في هجين القمح والجودار *Triticale* (2n = 28) ، حيث تبدو صبغيات القمح (جينوم A) باللون الأحمر وصبغيات الجودار (جينوم R) باللون الأخضر: A - الصبغيات قبل تضاعف عددها أي (7A+7R) فالنبات عقيم لعدم إمكانية التشافع.C – الصبغيات بعد تضاعف عددها أي (14A+14R) والنبات خصب لإمكانية التشافع.

التوضيح العملي:

أولا – دراسات حول الأعداد الصبغية ومورفولوجيتها:

طرائق تقصير الصبغيات:

من المكثفات الرئيسة التي تستعمل لزيادة تلولب الصبغيات (ولا سيما الطويلة منها) وذلك قبل تثبيت الجذور نجد الآتي:

١- ٨- **إكسي كينولين:** تستعمل إما وحدها قبل تثبيت الجذور، أو بإدخالها في عداد مكونات المثبت نفسه. ففي الحالة الأولى توضع الجذور لمدة ثلاث ساعات في محلول هذه المادة، ثم تغسل بالماء وتثبت مباشرة. ولتحضير المحلول يذاب مقدار (٠,٥٨غرام) من هذه المادة في (٢٠٠سم^{3}) ماء مقطر دافئ. وتبدو الصبغيات قصيرة جداً لدى تبريد الجذور إلى درجة الصفر لمدة (٢٤) ساعة قبل معاملتها بمادة ٨- إكسي كينولين، مما يجعل لهذه الطريقة أهمية كبرى في إحصاء العدد الصبغي للنباتات التي تتميز بصبغيات طويلة وكثيرة العدد.

٢- **كلور هيدرات:** تترك الجذور لمدة ساعة واحدة في محلولها المائي(٠,٣-١%)، ثم تغسل في الماء لمدة ساعة أخرى، وتترك في مكان رطب لمدة ٢-٤ ساعات وتثبت.

٣- **بارادي كلور بنزول:** يستعمل بإذابة (٥-١٠) غ من بلوراته في (٥٠٠سم^{3}) ماء مقطر على أن يوضع في وعاء مغلق وفي المحم بدرجة ٥٦٠ لمدة (١٠-١٢) ساعة، ثم تعالج الجذور في هذا المحلول لمدة (٢-٣) ساعة بدرجة(٥١٢-٥١٦).

٤- **التبريد:** يمكن تقصير أطوال الصبغيات وتسهيل إحصاء عددها بتبريد الجذور وهكذا توضح علب بتري المحتوية على المستنبتات الجذرية المدروسة في البراد بدرجة(١-٥٢) لمدة (٢٤) ساعة وبعد ذلك تثبت تمهيداً لدراستها.

٥- **مونو بروم نفتالين:** لدراسة صبغيات الفصيلة النجيلية توضع مستنبتات بذورها في محلول مائي طازج ومشبع من مونوبروم نافتالين (٣-٤) ساعات وتثبت بعد ذلك في حمض الخل الكثيف ثم تعالج بحمض كلور الماء النظامي بدرجة ٦٠° لمدة (١٢) دقيقة، ثم تنقل إلى كاشف شيف (تفاعل فولكن).

٦- **الكولشيسين:** تعد هذه المادة من أشهر المواد الكيميائية استعمالاً في مثل هذه الدراسات. فمثلاً تغمس جذور نبات الـ *Crepis Capillaris* (الذي يتميز بصبغيات نموذجية من حيث العدد والطول) في المحلول المائي للكولشيسين تركيز (٠,٠١%-٠,٠٥%) لمدة ساعتين، وتستعمل هذه الطريقة بكثرة في محضرات الهرس الذي سيجري تحويلها إلى محضرات ثابتة بعملية التبريد.

استعمال طريقة التبريد لدراسة صبغيات النجيليات:

يمكن تطبيق طريقة التبريد على جذور نبات القمح بشكل خاص، وعلى جذور النجيليات بشكل عام وذلك بهدف تقصير أطوال الصبغيات، ومن ثم إحصاء أعدادها الصبغية. وتتحقق هذه الطريقة وفقاً لما يأتي:

١. تزرع حبات القمح في علب بتري (بحدود ١٠حبات في كل علبة) فوق ورق الترشيح المرطب وبوجود ماء كاف مع زيادة منه لأن الجفاف يمنع وضوح الصبغيات، ثم توضع العلب في الظلام وبدرجة(٢٢°) من ٤٨-٧٢ ساعة إلى أن يصل طول الجذر إلى ١سم.

٣. توضع علبة بتري في البراد بدرجة ٢-٤ لمدة ٧٢ ساعة، تسمح هذه العملية بإنهاء السبات البذري، وتعمل على حث الخلايا المنقسمة على التنسيق لتنشيط الانقسام بطور واحد.

٣. توضع علب بتري بدرجة (٢٢°) مع تحقيق تعاقب ضوء وظلام (١٦) ساعة ضوء يليه(٨) ساعات ظلام حتى يصل طول الجذر إلى نحو ٢,٥-٣سم.

٤. بعد مراحل الإنتاش السابقة تقطع الجذور، ثم توضع في وعاء زجاجي يحوي ٥سم^{٣} ماء صنبور وهذا الماء يغمر بدوره في وعاء آخر أكبر منه يحوي الجليد المكسر، ثم ينقل هذا الجهاز البسيط (دون أن يغلق) إلى البراد بدرجة ٢-٤° لمدة ٢٤ ساعة.

لقد أثبتت هذه الطريقة أثرها الملموس في تقصير الصبغيات الذي يمكننا من إحصاء عددها دون أن يوقعنا في مشكلات استعمال المواد الكيميائية الخطرة والسامة أحياناً، إضافة إلى كونها غالية الثمن.

٤. بعد انتهاء عملية التبريد هذه نستخرج الوعاء الزجاجي من الجليد المكسور ونستبدل الماء الموجود بمثبت كارنوي المعدل (١:٣) الطازج، ويترك لمدة ٢٤ ساعة في جو الغرفة. بعد ذلك إما أن تحفظ الجذور حتى دراستها في الكحول ٧٥% أو يجرى عليها التلوين والهرس.

وبفضل استعمال طريقة فولكن المعدلة المعروفة باسم (كاربول فوكسين المعدل) (أنظر بحث الأسس الجزئية للتوريث).

التبريد والقمح:

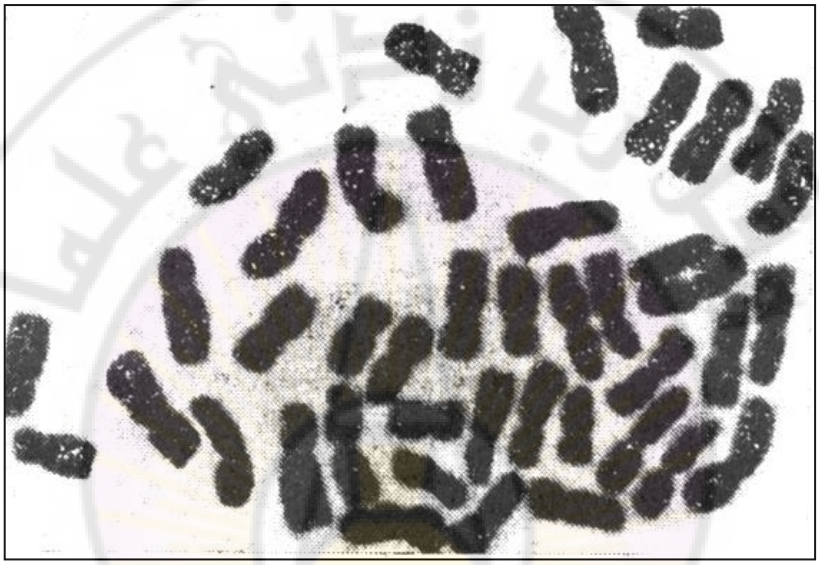
يمكن استعمال طريقة التبريد وبعض المكثفات الكيميائية لدراسة العدد الصبغي في جنس القمح الطري أو القاسي كما يأتي:

① تنقع حبات القمح في الماء المقطر حيث توضع في علبة بتري لمدة ٢٤ ساعة في المحم بدرجة ٢٥-٢٧°.

② يسكب الماء وتوضع البذور (في العلبة مع ورق ترشيح مرطب) نهاراً في البراد بدرجة ٣-٥°، ثم تنقل ثانية ليلاً إلى المحم بدرجة ٢٥-٢٧°.

يسمح هذا النظام من التعاقب بين الحرارة والبرودة بتسريع عملية الإنتاش مع احتمال ظهور نسبة عالية من الطور الاستوائي.

③ توضع الجذور وهي بطول ١٠مم في محلول مشبع من α بروم نفتالين لمدة ٥ ساعات وبدرجة حرارة الغرفة، ثم يثبت بـ (١:٣) لمدة ساعة واحدة وتخضع بعد ذلك لتفاعل فولكن بوجود حلمهة لمدة (١٢) دقيقة (شكل٦٥).



الشكل (٦٥) صورة توضح صبغيات القمح الطري (2n=6×=42) معالجة بطريقة التبريد.

طرائق خاصة لإحصاء العدد الصبغي في الجذور النباتية:

أ- معالجة جذور الفول بالتبريد:

توضع بادرات (مستنبتات) الفول من عمر (٨) **أيام في** البراد بدرجة (٤°) لمدة ٣-٤ أيام، ثم تنقل قمم الجذور النباتية إلى محلول الكولشيسين ٠,٠٥% لمدة (٣,٥) ساعات، بعد ذلك تثبت في (١:٣) لمدة ١٢ ساعة ويجري عليها تفاعل فولكن.

تسمح هذه الطريقة بإحصاء العدد الصبغي إضافة إلى دراسة مناطق الكروماتين المغاير Heterochromatin في الصبغيات وهي المناطق الخاملة مورثياً وشديدة التلولب والتلون خلافاً لمناطق الكروماتين الحقيقي Euchromatin التي تكون نشيطة مورثياً وقليلة التلولب والتلون.

ب- الطريقة الحمضية في دراسة جذور الفول:

توضع قمم جذور الفول في محلول الكولشيسين ٠,٠٥% لمدة ٣,٥ ساعات، ثم تثبت بـ (١:٣) مدة ١٢ ساعة وبعد ذلك تخضع لإحدى الطريقتين الآتيتين في التلوين:

١- المعالجة بمزيج حمض كلور الماء النظامي مع حمض الخل ٤٥% بنسبة (٩:١) على الترتيب لمدة ١٥ دقيقة بحرارة ٦٠° ثم تحقيق تفاعل فولكن.

٢- وضع الجذور في حمض الخل ٤٥% لمدة (٣٠) دقيقة، ومن ثم إجراء تفاعل فولكن عليها.

ج- طريقة خاصة لاستعمال الكارمن الخلي:

تطبق الطريقة الآتية بهدف إحصاء العدد الصبغي في بعض النباتات مثل الجودار والقمح و الشمندر وعباد الشمس والذرة.

تثبت الجذور بطول (٥-٦) مم في محلول الكحول وحمض الخل (١:٣) مع إضافة (٥-٦) نقط من محلول الكارمن الخلي لكل ١٠سم^{٣} من المثبت.

ولدى تثبيت جذور القمح يوضع من الكارمن الخلي (٣٠-٣٥)غ من كلور الحديد، ويفضل معالجة الجذور بالبرودة بدرجة ١-٢° قبل تثبيتها أو بمادة ٨-إكس كينولين.

دراسة مورفولوجية الصبغيات:

لدراسة مورفولوجية الصبغيات. إضافة إلى إحصاء العدد الصبغي في الأنواع النباتية يمكن تطبيق إحدى الطريقتين الآتيتين:

أ- وضع المواد (الجذور) المراد دراستها في محلول الكومارين ٢% لمدة ساعتين في درجة حرارة ١٢-١٦°.

ب - وضع المواد (الجذور) في مزيج الكومارين مع ٨ - إكسي كينولين بنسبة (١:١) لمدة ساعتين بالدرجة ١٦°.

ج - طريقة استعمال محلول الصيانة (بوفر):

لقد تبين أن استعمال محلول الصيانة (تريس بفر) (وهو تترا آمين أمينو ميتان بوزن جزيئي ١,١٩) بعد معالجة الجذور بمحلول الكولشيسين يؤدي إلى تكثف شديد للصبغيات إضافة إلى انفراج الصبغيات بشكل ملحوظ كما هي الحال في صبغيات الإنسان، إن المعالجة بهذا المحلول تظهر الأذرع الصبغية بكل وضوح. وتطبق هذه الطريقة بوضع الجذور في محلول الكولشيسين تركيز ٠,٠١% لمدة (٤) ساعات، ثم وضعها في محلول تريس بفر لمدة نصف ساعة ثم تثبت بـ (١:٣) إلى حين تلوينها وتحضير الشرائح بالهرس.

يحضر محلول تريس بفر كما يأتي:

محلول (١): يحل (٦,١) غ من مادة تريس بفر في (٥٠٠) سم^3 ماءً مقطراً، ثم يمزج مع (٣٧) سم^3 حمض كلور الماء النظامي ويمدد بالماء إلى الليتر.

محلول (٢): يحل (٢,٥) غ من كلور البوتاسيوم في ١٠٠سم^3 ماء مقطراً.

للاستعمال يمزج حجم واحد من محلول (١) مع حجم واحد من محلول (٢).

إحصاء العدد الصبغي من الأوراق النباتية الفتية:

لقد لجأ الباحثون في الأعوام الأخيرة إلى طريقة إحصاء عدد الصبغيات من الأوراق النباتية الفتية التي يتراوح قياسها من ٣-٧ مم، ويمكن ملاحظة الصبغيات بوضوح لدى استعمال المواد الكيميائية ولاسيما الكولشيسين كمادة ملولبة

للصبغيات، وفيما يأتي نستعرض الخطوات المتبعة لإحصاء العدد الصبغي في أوراق الشمندر الفتية:

١. توضع الأوراق الفتية (٣-٧) مم في المثبت (١:٣) لمدة ٣٠-٦٠ دقيقة (يمكن تركها في المثبت لمدة ٢٤ ساعة).

٢. تغسل الأوراق بالماء المقطر لمدة (٥) دقائق.

٣. بهدف تليين الخلايا وتفكيك النسيج توضع الأوراق لمدة (٥) دقيقة في وعاء مع مزيج حمض كلور الماء والكحول الميتيلي بنسبة متساوية.

٤. تغسل الأوراق بالماء المقطر لمدة (٥) دقائق لإزالة آثار المزيج مع استبدال الماء باستمرار.

٥. لجعل الأوراق شفافة خالية من اليخضور والمكونات الأخرى توضع في محلول كلورال فينول لمدة (٥) دقائق. يحضر هذا المحلول بإضافة (٢) غ كلورال هيدرات إلى (١) غ فينول تذاب في (١٠٠) سم^{٣} ماء.

٦. تغسل الأوراق بالماء المقطر لمدة (٥) دقائق.

٧. توضع ورقة واحدة على شريحة نظيفة، ويضاف إليها قطرة من الكارمن الخلي وتهرس بعود ثقاب وتدرس تحت المجهر بالعدسة الغاطسة لإحصاء العدد الصبغي.إذا كانت الأوراق كبيرة (بطول٧ مم) يفضل أخذ الأجزاء الطرفية الخالية من الأضلاع الكبيرة وتوضع على الصفيحة وتسخن مع الملون إلى الدرجة (٥٠-٦٠°) بمصباح كحولي.

إحصاء العدد الصبغي من مرستيم الساق:

لقد أشارت التجارب إلى وجود صعوبات عديدة لدى تحضير المحضرات في القمح وفي جذور النباتات المشابهة له ولاسيما خلال هرس الجذور لقساوتها الشديدة وشدة اصطباغ السيتوبلاسما المحيطية بالصبغيات، لذلك يفضل دراسة

صبغيات هذه النباتات في مرستيم الساق. وفيما يأتي طريقة الدراسة في بذور القمح القاسي (الصلب) *Triticum durum*:

نضع كوليوبيتيل القمح الناتج عن مستنبتات البذور (بطول ١سم) في علب بتري التي تحوي مزيج الكولشيسين (٠,٣%) ومحلول مشبع من بارادي كلوربنزول لمدة لا تقل على ثلاث ساعات، ثم تثبيت هذه القطع النباتية في محلول الكحول وحمض الخل (١:٣) وتنقل إلى الكحول بتركيز (٨٠%و ٥٠%) و(٣٠%) على التسلسل وبعد ذلك تغسل بالماء وتلون بكاشف الـ DNA.

إحصاء العدد الصبغي من سنابل القمح (من الانقسام المنصف):

يمكن استعمال القمح الطري *T.aestivum* لدراسة الصبغيات في الطور الاستوائي I (M.I) من الانقسام المنصف. ولمعرفة المرحلة المناسبة يفضل إجراء اختبار تمهيدي وذلك كما يأتي:

نختار زهرة واحدة من إحدى السنابل الطازجة ونستخرج منها سداة واحدة نضعها على شريحة مع قطرة من الكارمن الخلي الحديدي. ثم نستخرج من الزهرة الأبواغ الدقيقة باستخدام إبرة تشريحية ونفحصها تحت المجهر، ونتأكد من وجود أطوار عائدة للانقسام المنصف فيها ولا سيما المرحلة الاستوائية MI. ونعيد العملية على أزهار من أماكن مختلفة من السنبلة الواحدة ومن السنابل الأخرى حتى نصل إلى الطور المناسب، ونحتفظ بالسداتين الباقيتين من الأسدية الثلاث في كل زهرة مناسبة. بعد الانتهاء من الاختبارات التمهيدية نقوم بمعالجة الأزهار المناسبة (الأسدية الجيدة) بمحلول مائي مشبع لمادة الفابروم نفتالين لمدة (١٦) ساعة وبالدرجة (٥°) (ويمكن استعمال محلول الكولسيشين)، ثم نثبت السنابل (الأزهار) المعالجة بـ (١:٣) خلال ٢٤-٧٢ ساعة في درجة حرارة الغرفة. يتم حفظ المواد المثبتة في الكحول الإيتيلي ٧٠% بعد غسلها من المثبت مرتين باستخدام الكحول مطلق١٠٠%، ثم كحول ٩٥% لمدة (٥) دقائق في كل مرة.

لتليين المآبر وتسهيل تفككها وسحقها يفضل استعمال أنزيم البكتيناز Pectinase تركيز ٢% في الماء المقطر خلال٤٥ دقيقة بدرجة حرارة الغرفة. يتم إجراء تفاعل فولكن بكاشف شيف بعد إجراء الحلمهة بحمض كلور الماء النظامي بالدرجة (٦٠°) لمدة١٢-١٣ دقيقة. ثم تجهز الشرائح بوضع السداة على الصفيحة مع قطرة من كارمن بيلينغ وتحرر الخلايا بإبرة تشريحية بعد نزع غلاف المئبر والتسخين اللطيف.

ثانياً – الحصول على محضرات وصور النمط النووي:

للحصول على محضرات هرس Squash تتضمن لوحات استوائية لأي نوع نباتي فيها صبغيات مبعثرة (نمط نووي أو كاريوتيب) نلجأ إلى الخطوات الآتية:

١- تُستنبت البذور (أو البصلات) للحصول على جذور بطول (١-١,٥سم).

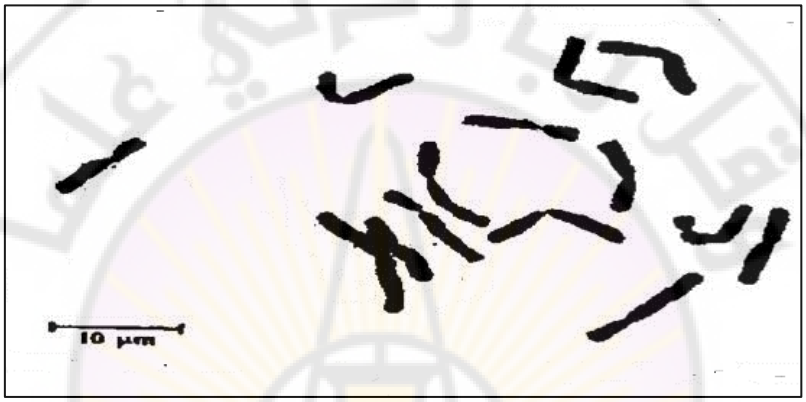
٢- تُغمس الجذور في محلول مائي للكولشيسين بتراكيز متفاوتة تُراوح بين (٠,٠١%-٠,٠٥%) وذلك لمدة ٤-٥ ساعات، ثم تثبت فوراً بمثبتكارنوي المعدل (١:٣) وتحفظ في الكحول تركيز من (٧٠% - ٨٠%)، حيث تترك لحين دراستها.

ملاحظة: يمكن استبدال الكولشيشن بأي مادة مكثفة أو ملولبة للصبغيات.

٣- تلون الجذور بأحد ملونات الصبغيات مثل الكارمن الخلي، الأرسين الخلي، اللاكموید الخلي، الهيماتوكسيلين، تفاعل فولكن- شيف .. وغير ذلك، ثم تُصنع منها محضرات هرس،وتثبت بطريقة التبريد بغاز الفحم الثلجي (CO_2 المضغوط).

٤- تدرس المحضرات بالمجهر الضوئي، ويتم اختيار لوحات استوائية ممتازة ومتباعدة الصبغيات على أن تكون بدرجة تلولب متماثلة.

٥- تُصور عدة لوحات من الصبغيات بتكبير مناسب، كما تُصور معها الشريحة الميكرومترية بشروط التكبير نفسها كي تُستعمل التدريجة العائدة لها كمقياس للصورة، ويوضع هذا المقياس في الجزء السفلي من الصورة (شكل٦٦).



شكل (٦٦) نسخة من صورة عن المجهر تمثل النمط النووي (كاريوتيب) لجنس الشعير البُصيلي *Hordium bulbosum* (2n = 14). لاحظ مقياس الصورة (الأسفل يسار) والذي يعادل 10 µm

ثالثاً – خطوات تحقيق الدراسات الصبغية العائدة لنوع ما:

١- توزع لوحات الكاريوتيب على المجموعات الطلابية، بحيث تعطى لكل مجموعة لوحة واحدة، (تمثل اللوحة إما صورة فوتوغرافية محضرة بالطريقة السابقة أو صورة مأخوذة من مرجع ما).

٢- يَرسم الطلاب هيكلية الصبغيات على الدفتر بشكل خطوط مع توضيح شكلها وأماكن توضعها.

٣- تُجرى عملية القياس بالمسطرة بدقة ± ٠,٥ مم وذلك لطول كل جزء من أجزاء الصبغي وهي: الذراع الطويل Long arm (L)، الذراع القصير (S) Short arm، الجزيء المركزي Centromer (C)، التابع Satellite إن وجد،

والمنظم (الانخماص) النويي أو الثانوي Nuclear organizer (N) ويحدد الطول الكلـــي للصبـــغي Total length (La) ثم توضع الأطوال فوق "هيكل" كل صبغي مرسوم على الدفتر.

ملاحظة: يمكن استعمال الفرجار لقياس الصبغيات شديدة الانحناء، حيث تُحول إلى أجزاء صغيرة ومن ثم إلى صبغي مستقيم قابل للقياس.

٤- تُحول جميع الأطوال (La, S, L ,C ,N) من مم إلى مكرومتر عن طريق معرفة طول مقياس الصورة (الموجود في أسفل كل لوحة) والذي يعادل (١٠) مكرومتر مثال:

إذا كان طول المقياس على الصورة ١٢ مم (الذي يعادل ١٠مكرومتر) فإن طول أحد الصبغيات على الصورة البالغ ٣٠ مم يعادل (س) مكرومتر

ومنه: س= (٣٠×١٠) ÷ ١٢= ٢٥مكرومتر

(أي إن الصبغي الذي طوله على الصورة المدروسة ٣٠ مم يُعادل ٢٥ميكرومتر)

ملاحظة: يمكن قياس أطوال الصبغيات من اللوحات الاستوائية وذلك بشكل مباشر من المجهر بوساطة الشريحة الميكرومترية (بالميكرومتر)، وبذلك نستغني عن طريقة التحويل من مم إلى ميكرومتر، إلا أن هذه الطريقة من القياس عن المجهر شاقة ومُجهدة.

وبهذه الطريقة يتم تحويل أطوال جميع الصبغيات إلى مكرومتر.

٥- ترتّب الأشفاع الصبغية تنازلياً (من الأطول إلى الأقصر) حسب أرقام الطول الكلي (La) لكل صبغي، ثم يُملأ الجدول المُعطى لكل مجموعة طلابية جدول (٥)، حيث تُسجل فيه نتائج المؤشرات Indicators الإحصائية ودلالاتها وهي: (L/S, IC% ,Lr%)، ثم يُحدد وضع الجزيء المركزي؛ ولفهم مدلول المؤشرات المذكورة نجد الآتي:

آ- يُحدد الطول المطلق لكل صبغي(La) من حاصل جمع طول الذراع الطويل(L) وطول الذراع القصير(S) وطول الجزيء المركزي (C).

ب- يُحدد الطول النسبي لكل صبغي(Lr%) Ratio length أو Relative length من العلاقة:

$$Lr\% = \frac{\text{طول الصبغي المعني (المدروس)}}{\text{أطوال جميع الصبغيات من الكاريوتيب}} \times 100$$

ج- تُحدد النسبة الذراعية (L/S) بالعلاقة :

$$L/S = \frac{\text{طول الذراع الطويل}}{\text{طول الذراع القصير}}$$

د- يُحدد دليل الجزيء المركزي centromere index (Ic%) من العلاقة:

$$Ic\% = \frac{\text{طول الذراع القصير للصبغي}}{\text{طول الصبغي بأكمله}} \times 100$$

وقد حدد الباحثون مدلول قيم مؤشر دليل الجزيء المركزي Ic% وفق الآتي:

a) عندما تكون قيمة الدليل ٥٠ %، يكون موقع الجزيء المركزي من النمط median (m) أي وسطي الجزيء.

b) عندما تكون قيمة الدليل من ٤٠ %- ٤٧,٥ %، يكون موقع الجزيء المركزي من النمط nearly median (nm) أي قرب وسطي.

c) عندما تكون قيمة الدليل من ٣٣- ٣٧%، يكون موقع الجزيء المركزي من النمط Submediam (Sm) أي تحت وسطي الجزيء.

كما تم تحديد مدلول قيم مؤشر النسبة الذراعية وفق الآتي:

١- عندما تكون قيمة النسبة الذراعية من ١-١،٩ يكون موقع الجزيء المركزي من النمط (met) metacentric أى وسطي.

٢- عندما تكون قيمة النسبة الذراعية من ٢-٤،٩ يكون موقع الجزيء المركزي من النمط (sub) submetacentric أي تحت وسطي.

٣- عندما تكون قيمة النسبة الذراعية (٥) فما فوق يكون موقع الجزيء المركزي من النمط (acro) acrocentric أى طرفي.

٤- عندما تكون قيمة النسبة الذراعية (٨) فما فوق يكون موقع الجزيء المركزي من النمط (telo) telocentric انتهائي.

هـ- في المحضرات المجهزة بصبغ غميزا يتم تحديد نسبة مناطق الكروماتين المغاير(الخاملة والملونة من الصبغي) إلى الطول العام له وهذا ما يُعرف باسم دليل الهيتيروكروماتين Heterochromatin Index (Ih%) ويعطى بالعلاقة:

$$Ih\% = \frac{\text{طول مناطق الكروماتين المغاير}}{\text{طول كامل الصبغي}} \times 100$$

٦- يُحسب معامل التكبير الذي يختلف من لوحة إلى أخرى لكنه يبقى ثابتاً في اللوحة الواحدة كما في المثال الآتي:

إذا كان طول أحد الصبغيات (٢٥) مكرومتر في المجهر وطوله في الصورة (٣٠) مم (أي ٣٠×١٠٠٠= ٣٠٠٠ مكرومتر)

فإن طول(١) مكرومتر يعادل في الصورة (س) ومنه:

$$\text{س} = \frac{٣٠٠٠ \times ١}{٢٥} = ١٢٠٠$$

وبشكل آخر نقول إن كل (١) مكرومتر على المجهر يعادل (١٢٠٠) مكرومتر على الصورة أي إن معامل التكبير يساوي (١٢٠٠) مرة.

٧- للحصول على المخطط النووي أو الكاريوغرام Karyogram تُقص صبغيات لوحة الكاريوتيب المدروسة بعد أن تُصوّر ثم تُلصق الصبغيات المتماثلة بشكل أشفاع على ورق مقوى وبترتيب متسلسل وذلك من الأطول إلى الأقصر، بحيث يكون الجزيء المركزي على مستوى واحد والذراع القصير باتجاه الأعلى والذراع الطويل باتجاه الأسفل. ثم يعاد تصويرها مرة أخرى.

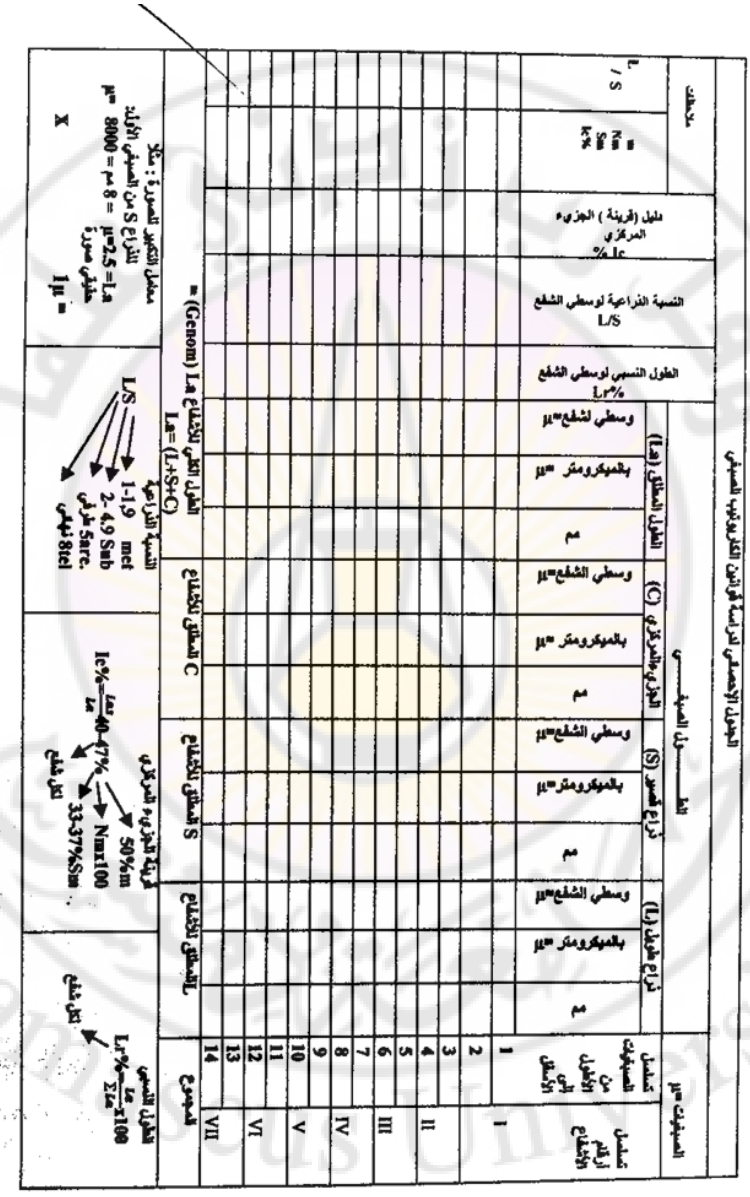
٨- للحصول على الرسم الصبغي الإيديوغرام Idiogram يتم رسم تخطيطي للعدد النصفي للصبغيات وترتب من الأطول إلى الأقصر، بحيث يكون الجزيء المركزي على مستوى واحد والذراع القصير باتجاه الأعلى والذراع الطويل باتجاه الأسفل.

ملاحظة (١): لا تُعبِّر قياسات الصبغيات المدروسة في الكاريوتيب عن أطوالها الحقيقية نظراً لكونها متلولبة بدرجات مختلفة حسب تأثير الكولشيسين عليها. ولكي تكون الدراسات أكثر دقة يُفضل تحقيق الآتي:

يتم إجراء قياس أحد الصبغيات في اللوحة الاستوائية من تجربة شاهدة لجذور غير معالجة بالكولشيسين، ومن الطبيعي أنها ستكون أكثر طولاً من الصبغيات المعالجة. بعد ذلك يمكن مقارنة قياس هذا الصبغي الشاهد مع مثيله في لوحة الكاريوتيب المعالجة بالكولشيسين.

وبشكل آخر نستطيع تحديد رقم أو درجة التلولب كي نقوم بإجراء عملية الضرب بينه وبين جميع الصبغيات. مثال على ذلك: بفرض أن طول الصبغي رقم (١) في اللوحة الشاهدة (٢٤) ميكرومتر، وطول الصبغي نفسه المعالج بالكولشيسين (٨) ميكرومتر تكون درجة التلولب لصبغيات هذه اللوحة هي: ٢٤ ÷ ٨ = ٣ ؛ أي أن طول كل صبغي معالج أقصر من طوله الأصلي بثلاث مرات، لذلك يُحسب الطول الحقيقي له بحاصل جداء طوله بالرقم (٣). ونتابع ذلك في (الجدول ٦) نموذج الدراسات الصبغية وسيُطلب تعبئته من قبل الطلاب.

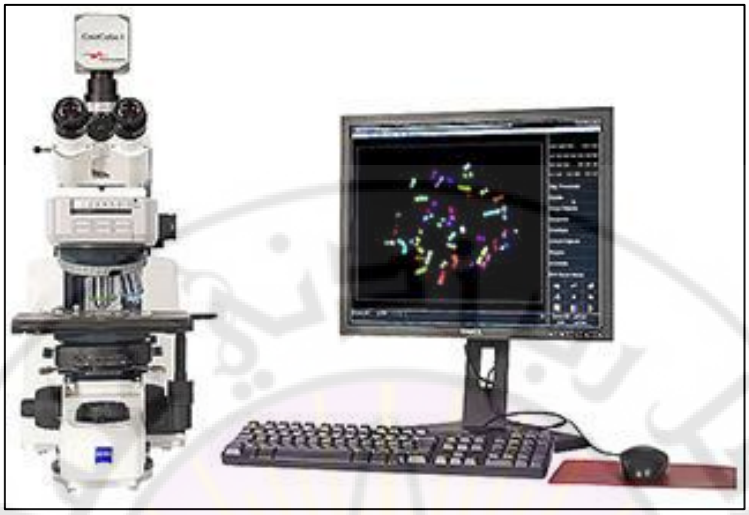
الجدول (٦) نموذج الدراسات الصبغية والذي سيطلب تعبئته من قِبَل الطلاب.



ملاحظة(٢): في الدراسات البحثية يفضل إجراء الدراسة الإحصائية للصبغيات بما لا يقل عن تحليل(٤٠) لوحة استوائية مأخوذة من (١٠) محضرات، ويجب أن تكون هذه اللوحات مالكة لقرينة التلولب نفسها (IS – Spiralization)، حيث تحسب من العلاقة:

$$IS = \frac{\text{مجموع طول اثنين من الصبغيات القصيرة}}{\text{مجموع طول اثنين من الصبغيات الطويلة}}$$

ملاحظة (٣): تعتمد الدراسات الحديثة على استعمال مجاهر متطورة مجهزة ببرامج كومبيوترية قادرة على إعطاء نتائج فورية لجميع المؤشرات الصبغية التي يحتاجها الباحث، بما فيها رسم الكاريوغرام والإيديوغرام، إضافة إلى استعمال تقنيات الفلورة على الصبغيات المدروسة وتقنيات فيش وجيش.... وغير ذلك (شكل٦٧).



شكل (٦٧) صورتان كنموذجين من المجاهر المتطورة المتصلة مع الحاسوب حيث توضع شريحة الصبغيات على اللوحة، وتعمل البرامج الخاصة بإظهار الصبغيات بأشكال وتقنيات مختلفة على الشاشة، ومن ثم تُنفذ الأوامر الإحصائية وغيرها بما يتوافق مع رغبة الباحث.

ويوضح (الجدول٧) تطبيقاً واقعياً على نبات الفستق العادي.

جدول(٧) نتائج دراسات إحصائية مطبقة على صبغيات الفستق العادي *Pistachio* (2n=14).

أرقام أشفاع الصبغيات	أرقام الصبغيات	ذراع طويل (L) µm		ذراع قصير (S) µm		الطول المطلق La لوسطي الشفع µ m	الطول النسبي Lr% لوسطي الشفع	النسبة الذراعية L/S لوسطي الشفع	دليل (قرينة) الجزئي المركزي IC%	ملاحظات	
صبغيـــــــــــــــــــــــات جنس الفستق العادي											
/	/	لكل صبغي	وسطي	لكل صبغي	وسطي					IC %	L/S
I	١ ٢	٤,٣٧ ٤,٣٧	٤,٣٧	٢,٥ ٢,٥	٢,٥	٦,٨٧	١٧,١٢	١,٧٥	٣٦,٣٦	sm	met
II	٣ ٤	٤,٣٧ ٤,٠٦	٤,٣٧	٣,٤٣ ٢,٥	٢,٩٦	٧,١٨	١٦,٨٩	١,٤٢	٤١,٠٣	nm	met
III	٥ ٦	٣,٤٣ ٣,٧٥	٣,٥٩	١,٨٧ ١,٥٦	١,٧١	٥,٣١	١٣,٢٢	٢,٠٩	٣٢,٣٥	tel	sub
IV	٧ ٨	٣,٧٥ ٤,٠٦	٣,٩٠	١,٥٦ ١,٨٧	١,٧١	٥,٦٢	١٤,٠٠	٢,٢٧	٣٠,٥٥	tel	sub
V	٩ ١٠	٣,٤٣ ٣,٤٣	٣,٤٣	١,٨٧ ١,٨٧	١,٨٧	٥,٣١	١٣,٢٢	١,٨٣	٣٥,٢٩	sm	met
VI	١١ ١٢	٣,١٢ ٣,١٢	٣,١٢	٢,٨٨ ١,٨٧	٢,٠٣	٥,١٥	١٢,٨٤	١,٥٣	٣٩,٣٩	sm	met
VII	١٣ ١٤	٣,١٢ ٣,١٢	٣,١٢	١,٢٥ ١,٨٧	١,٥٦	٤,٦٨	١١,٦٧	٢	٣٣,٣٣	sm	sub
		الطول L للأشفاع= 25.78 µm		الطول S للأشفاع = 14.4 µm		الطول الكلي للأشفاع La Genome= µm 40.1563					

المطلوب:

١- تقديم تقرير مشترك لكل مجموعة طلابية على الجدول المقدم لها يوضح فيه النتائج الإحصائية لمؤشرات القوانين ومناقشتها لعمل جدول إحصائي لدراسة قوانين الكاريوتيب لكل مجموعة. بعد ذلك يقوم كل طالب بتحقيق ما يأتي:

أ- رسم محضر كاريوتيب الفول (2n=12) *Vicia faba* مع ملاحظة الشفع الصبغي الطويل.

ب- رسم محضر كاريوتيب البصل (2n=16) *Allium cepa*.

ج- رسم محضر كاريوتيب القمح الطري (قمح الخبز) *Triticum aestivum* (2n=42).

د- رسم محضر C-mitose، وهو المحضر الذي يحوي الطورين الأول والثاني فقط بفعل الكولشيسين (لاحظ انعدام الطورين الثالث والرابع).

٢- تعطى كل مجموعة طلابية عدداً من البذور (أو الحبوب) النباتية المتنوعة، حيث تقوم بتطبيق إحدى الطرائق المذكورة والخاصة بالأعداد الصبغية ودراسة مورفولوجيتها، وذلك تمهيداً لتلوينها ودراستها بعد صنع المحضر المناسب.

٣- يلصق كل طالب الأشفاع الصبغية لصبغيات اللوحة المقدمة له بهدف الحصول علة الكاريوغرام.

٤- يرسم كل طالب مخطط الإيديوغرام لصبغيات اللوحة المقدمة له.

القسم الخامس

الطريقة المجهرية للقياس

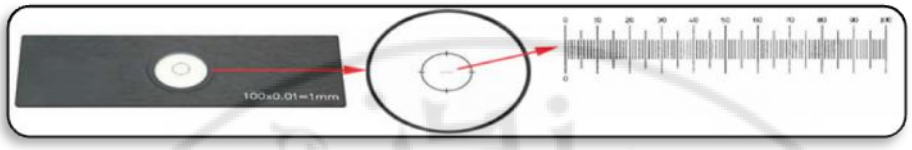
التوضيح النظري:

تُعدّ عملية القياس المجهري من أساسيات البحث العلمي وضروراته لمتابعة التغيرات والتطورات التي تطرأ على المتعضية خلال المراحل المختلفة لنموها، ولقياس مُكوناتها المجهرية الدقيقة. وفي مجال دراساتنا الوراثية بشكل خاص والنباتية بشكل عام، نحتاج لإجراء قياسات متنوعة لأجزاء من النباتات مثل قياس أطوال الصبغيات، وأقطار حبوب الطلع وأنابيبها الطلعية ، وقطر الكيس الجنيني أو البويضة، وطول وعرض خلية ما أو قطر نواتها..... وغير ذلك.

لهذا السبب كان لابدّ من إيجاد طريقة لإجراء مثل هذه القياسات بدقة عالية عند استعمال المجهر، لذلك يستعمل الباحثون بهدف القياس قطعتين: تتمثل الأولى بالشريحة المجهرية التي تتضمن مسطرة مدرجة بالغة الدقة تدعى المحضر الميكرومتري Objective micrometer . ويبلغ طول المسطرة في هذه الشريحة معلومة القياس (١) مم وتكون مقسمة إلى (١٠٠) جزء أو تدريجة، وبذلك فإن قيمة الواحدة منها تعادل (١٠) ميكرومتر (كل ١مم = ١٠٠٠ميكرومتر) (شكل ٦٨). وتتمثل القطعة الثانية بالعدسة العينية الميكرومترية Ocular micrometer، التي تضم مسطرة ميكرومترية طولها إما /٠,٥/ أو /١/ سم مقسمة إلى تدريجات صغيرة، وقد يحملها المجهر في إحدى عدساته العينية؛ أو قد تضاف إلى إحدى العدسات العينية للمجهر صفيحة زجاجية دائرية تتضمن المسطرة المذكورة (شكل٦٩).

وتجدر الإشارة إلى أن قيمة التدريجة الواحدة في المسطرة العينية تتغير من مجهر إلى آخر ربطاً مع التكبير العائد للمجهر، كما تختلف من شركة مُنتجة

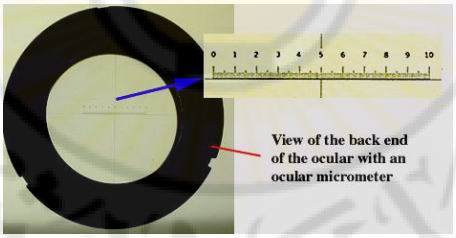
لأخرى. لذا لا بد من تحديد قيمة التدريجة الواجدة من العينية الخاصة بكل مجهر وذلك بالاستعانة بالمحضر الميكرومتري.



شكل (٦٨) نموذج الشريحة الميكرومترية مع توضيع لمكان وشكل المسطرة (بطول ١مم) والتي تتكون من ١٠٠ تدريجة (إلى اليمين).

أ

ب



ج

شكل (٦٩) نموذج العينية الميكرومترية: ضمن عينية المجهر(أ)، أو أن يتم وضعها داخل إحدى عدسات المجهر(ب). لاحظ المسطرة (ج) بطول (٠،٥ أو ١ سم) مع تدريجاتها المراد تحديد قيمة الواحدة منها بمساعدة الشريحة الميكرومترية.

ملاحظة: يُمكن لبعض المجاهر الحديثة المُتطورة والمستعملة في مراكز الأبحاث أن تعطي قياسات العينات المدروسة بشكل تلقائي دون استعمال العينيات والشرائح الميكرومترية.

التوضيح العملي:

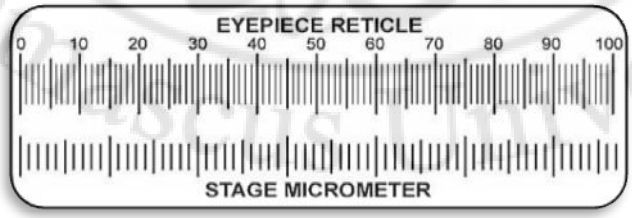
لتحديد قيمة التدريجة الواحدة من مسطرة العينية الميكرومترية بهدف استعمالها في قياس نماذج مختلفة من العينات يمكن اتباع الخطوات الآتية:

١- تُوضع القطعة الزجاجية الدائرية، المتضمنة للمسطرة العينية، بمكانها المخصص لها داخل العدسة العينية، إن لم يكن المجهر المستعمل مزوداً بمسطرة ميكرومترية خاصة به.

٢- تُثبت الشريحة الميكرومترية على لوحة المجهر الموضوع على التكبير الضعيف $(100)^X$، حرصاً على عدم تعرضها للكسر، ثم تُحرك لوالب المجهر بشكل مناسب حتى تظهر تدريجات مسطرة الشريحة.

٣- تُدار مسطرة العينية بجميع الاتجاهات إلى أن يتحقق التوازي تماماً بين المسطرتين بشكل واضح وبدون تداخل.

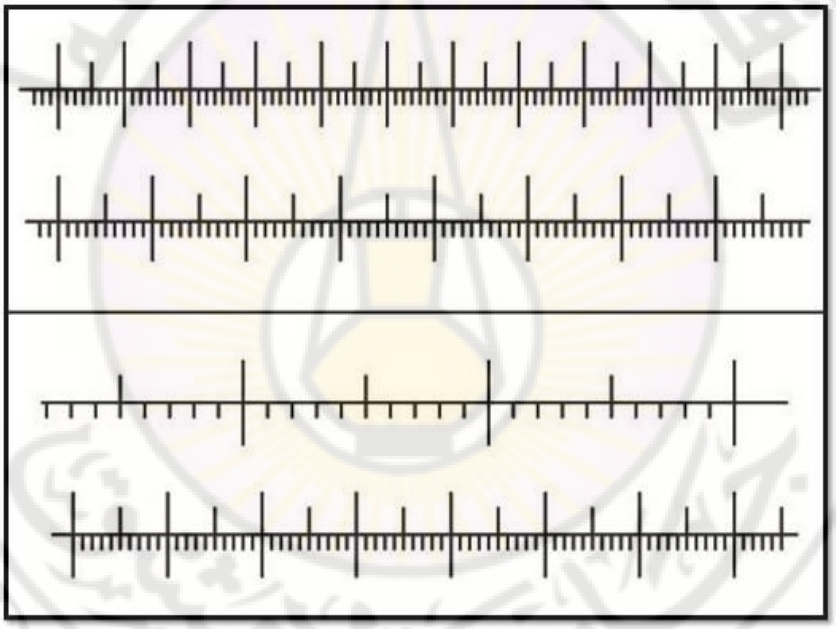
٤- تُحدد بداية ونهاية واضحة ومتطابقة بين المسطرتين المتوازيتين بهدف حساب قيمة التدريجة العينية المجهولة بمساعدة قيم تدريجات الشريحة الميكرومترية معلومة القياس (شكل٧٠).



الشكل (٧٠) التوازي والتطابق بين مسطرتي العينية (العُلوية) والشريحة (السُفلية)

٥- يُدار قرص العدسات العينية للمجهر المستعمل حتى يَثْبت على التكبير القوي^{X}(400) ، ثم تُعاد إجراءات التوازي ومطابقة البداية والنهاية وصولاً إلى تحديد قيمة التدريجة بهذا التكبير.

ملاحظة: لقد تم رسم بطاقات خاصة توضح التوازي والتطابق بين مسطرتي الشريحة والعينية بوجود كلٍ من التكبيرين الضعيف والقوي، كي يتدرب عليها الطلاب بدلاً من استعمال الشريحة الميكرومترية حرصاً على عدم كسرها (شكل ٧١).



شكل (٧١) لوحة توضح التوازي والتطابق بين مسطرتي العينية والشريحة المكرومترية بالتكبير الضعيف (في الأعلى) والتكبير القوي (في الأسفل).

ولتوضيح طريقة حساب قيمة التدريجة الواحدة من العينية الميكرومترية نعرض **المثال** الآتي:

من اللوحة الممثلة في (الشكل٧١) وبالتكبير الضعيف نجد أن التطابق بين مسطرة العدسة العينية ومسطرة الشريحة الميكرومترية ظهر كما يأتي:

كل ٧٠ تدريجة من المسطرة العينية يقابلها ١٠٠ تدريجة من الشريحة الميكرومترية المعلومة التي فيها قيمة التدريجة (١٠ ميكرومتر) ومنه:

٧٠ تدريجة عينية يقابلها ١٠X١٠٠= ١٠٠٠ ميكرومتر من الشريحة الميكرومترية، وبذلك تكون قيمة التدريجة الواحدة من المسطرة العينية:

١٠٠٠÷٧٠= ١٤,٢ميكرومتر

٦- بعد أن يتم تحديد قيمة التدريجة الواحدة من العينية بالتكبيرين الضعيف والقوي تُرفع الشريحة الميكرومترية من لوحة المجهر وُيوضع مكانها المحضر المراد إجراء قياسه. وللحصول على القياس المطلوب بالميكرومتر يتم ضرب عدد التدريجات الملاحظة على الجزء المقاس من المحضر بقيمة التدريجة الواحدة من العينية التي تم تحديدها (شكل٧٢).

وكمثال على قياس حبة الطلع لنبات المشمش الهندي *Eriobotrya Japonica* نجد أن قطر إحدى حباته تُوافق (٧) تدريجات. فإذا علمنا أن قيمة التدريجة الواحدة على المجهر المستعمل للقياس تساوي (١٤,٢ ميكرومتر) بالتكبير الضعيف، عندها يكون قطر حبة الطلع:

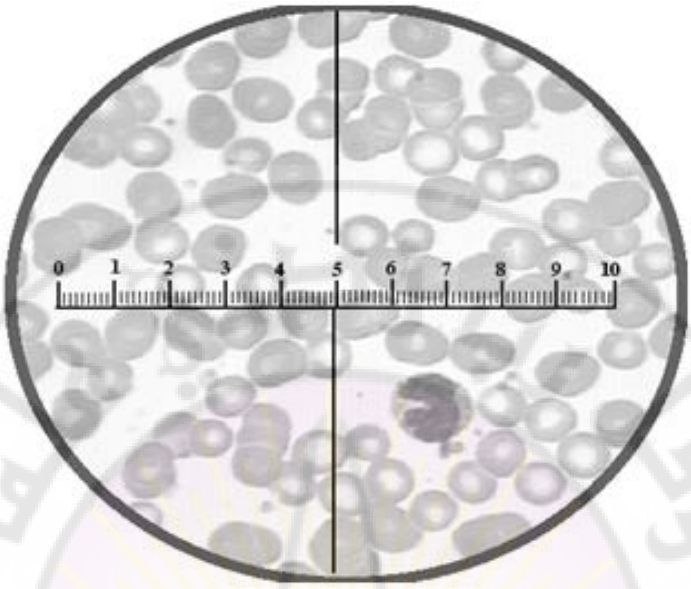
٧ x ١٤,٢ = ٩٩,٤ ميكرومتر.

ولدى حساب قطر الحبة نفسها بالتكبير القوي نجد أنها توافق ٢٩ تدريجة. فإذا علمنا أن قيمة التدريجة الواحدة على المجهر المستعمل للقياس تساوي (٣,٨ ميكرومتر) عندها يكون قطر حبة الطلع:

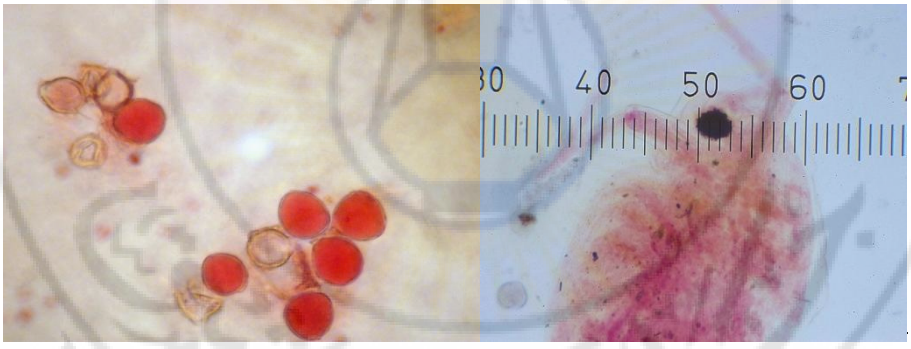
٢٩ x ٣,٨ = ٩٨,٨ ميكرومتر.

وبذلك يكون الارتياب في الحساب:

٩٩,٤ - ٩٨,٨ = ٠,٦ميكرومتر



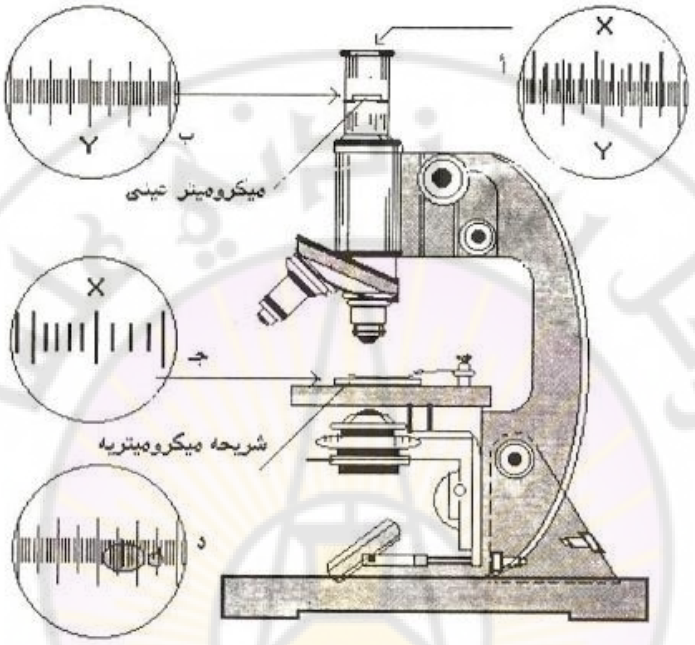
أ



ب ج

شكل (٧٢) أ – ب مسطرة العينية المكرومترية بعد معرفة قيمة تدريجتها موضوعة فوق الأجزاء المراد قياسها (كريات دم وحشرة) ج _ حبات طلع خصبة (ملونة) وعقيمة (فاتحة) سيتم قياسها.

ويوضح (الشكل٧٣) ملخص خطوات القياس المجهري.



الشكل (٧٣) توضيح للمجهر المُعد لقياس العينات: أ–ب–ج مسطرتي العينية (Y) والشريحة (X) ومطابقتهما بهدف تحديد قيمة التدريجة، د– إجراء قياس الجزء المطلوب بعد تحديد القيمة.

المطلوب:

١– تحديد قيمة التدريجة الواحدة من العدسة العينية بالتكبيرين $(100)^X$ و $(400)^X$.

٢– قياس قطر حبة الطلع بالتكبيرين $(100)^X$ و $(400)^X$.

٣- مقارنة القياسات الناتجة بالنسبة إلى حبة الطلع وذلك بإجراء عملية طرح قيم كل من التكبيرين $(100)^X$ و $(400)^X$ لهذه القياسات وتحدد دقة العمل.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

القسم السادس

الأسس الجزيئية للتوريث

كشف الـ DNA و الـRNA

استخلاص الـ DNA

التوضيح النظري

تعتمد معظم الدراسات على الصبغيات Chromosomes خلال عملية الانقسام الخلوي Cell division، لكن التقدم العلمي الذي حدث خلال الفترة الأخيرة باستعمال تقنيات خلوية جديدة لغرض دراسة النواة أسهم بصورة جيدة في إغناء معلوماتنا حول الكيمياء الحيوية وفيزيولوجيا النواة. يتغير حجم النواة أو شكلها دون تغير محتواها من الـ DNA ، ويختلف حجمها أيضا باختلاف الخلايا وباختلاف النوع species؛ وتميل النواة إلى الاحتفاظ بنسبة ثابتة بين حجمها وحجم السيتوبلاسما، ويُعدّ الحمض النووي (DNA) أو الدنا السجل الكامل لكل المعلومات البيولوجية التي تحدد التركيبة الفيزيولوجية والتشريحية للكائنات الحية وهي التي تحدد شكل وتركيب الخلايا لذلك الكائن، وتشفر بناء جميع البروتينات التي تؤلف الخلية وعضياتها.

وكما هو معروف يتصف الدنا بصورة خاصة بأهمية كبرى في مجال توريث الصفات، ولذلك فإن التعرف على بنيته ووظيفته تشكل أساس الدراسات الوراثية.

يمكن كشف الحموض النووية Nucleic acids بطرائق مختلفة سندرس منها تفاعل فولكن Feulgen ويتحقق بوجود كاشف شيف الذي يُستعمل لكشف الـ DNA فقط، وملون أخضر الميتيل مع البيرونين المُستعمل لكشف الـ DNA والـ

RNA معاً، ويمكن تحقيق هاتين الطريقتين في جميع المقاطع سواء أكانت بالميكروتوم أم بالشفرة العادية أم بطريقة الهرس.

بالمقابل يمكن استخلاص الدنا والحصول على خيوطه البيضاء بطرائق متنوعة ومن أجزاء نباتية مختلفة مثل الأوراق وبعض الثمار والأبصال وغيرها.

أولاً- الطريقة الخلوية الكيميائية لكشف الـ DNA (تفاعل فولكن- شيف):

كان للباحث الألماني فولكن (١٩٢٤) دور مهم في الكشف عن الـ DNA بالتفاعل الشهير الذي حمل اسمه(تفاعل فولكن) Feulgen reaction ، والذي يُعدّ من أفضل التفاعلات النوعية الدقيقة، كونه يحدد وجود أو غياب الـ DNA فقط، ولذلك يُطبق هذا التفاعل لتحديد وضعية النواة في الخلية وقياسها وشكلها ومكان وجودها وغيرها. بالإضافة إلى ذلك فإن شدة التلوين تشير بشكل واضح إلى التبدلات الكمية.

يعد الحمض الريبي النووي منقوص الأوكسجين أو الـ DNA من المركبات المعقدة التي تتميز بأوزانها الجزيئية المرتفعة (من ٤- ٨ ملايين أو أكثر). ويتألف من سلسلة مضاعفة من النوكليوتيدات، ويدخل في تركيب كل نوكليوتيد بقية حمض الفوسفور وسكر الريبوز الخماسي المنقوص الأوكسجين وبقية آزوتية (أدنين- غوانين- سيتوزين- تيمين). لقد وضع كل من واطسون وكريك عام ١٩٥٣ البنية المضاعفة الحلزونية لسلسلتي النوكليوتيدات وأشارا إلى أن الأدينين من السلسلة الأولى يرتبط مع التيمين من الثانية والغوانين مع السيتوزين. هذه الروابط تنشطر لدى تضاعف الدنا لتُبني من جديد خيوطاً مماثلة يتحقق فيها تتابع النوكليوتيدات بشكله المحدد، وبالتالي تنتقل الرسالة الوراثية بكل أمانة من جيل إلى آخر.

التطبيق العملي

١- تحضير كاشف شيف (حمض الفوكسين الكبريتي).

يعتمد تفاعل فولكن على الكاشف الخاص بالألدهيد وهو كاشف شيف Schiff's reagent، ويعتمد نجاح هذا الكاشف على الدقة البالغة في تحضيره ونظافة الأدوات وخلوها من أي أثر لمواد أخرى، إضافة إلى المحافظة على شروط التحضير من الوزن الدقيق للمواد الداخلة فيه ودرجات الحرارة ..... وغير ذلك؛ ويتم التحضير وفقاً للآتي:

يوضع في حوجلة زجاجية ٢٠٠ مل ماء مقطر، ثم يسخن حتى الغليان وبعد انقطاع فقاعات الهواء تماماً يضاف بهدوء (١)غ فوكسين قاعدي basic fuchsine ثم يعاد التسخين لمدة (٥) دقائق. وبعد ذلك يُبرد المحلول حتى الدرجة ٥٠° تماماً ويضاف إليه ٢٠ مل حمض كلور الماء النظامي، ثم يُبرد ثانية حتى الدرجة ٢٥° تماماً ويضاف إليه (١)غ ثاني كبريتيت الصوديوم $Na_2S_2O_5$. وأخيراً يوضع المحلول النهائي في وعاء زجاجي ذي غطاء مُصنفر مُحكم الإغلاق ويُلف بورق أسود ثم يترك بالبراد مدة ٢٤ ساعة. ويجب أن يكون المحلول بعد هذه المدة عديم اللون أو مائلاً للاصفرار. أما إذا بقي لونه أحمراً، فينبغي إضافة ١-٢ ملعقة من مسحوق الفحم النباتي المُنَشَّط Activated charcoal، ثم يُرشح ويُحفظ في البراد بعد إحاطته بالورق الأسود أو ورق القصدير حتى الاستعمال.

لتحضير حمض كلور الماء النظامي نضيف ١٠٠مل حمض كلور الماء الكثيف (١,١٩) إلى ١٠٠٠ ملم ماء مقطر.

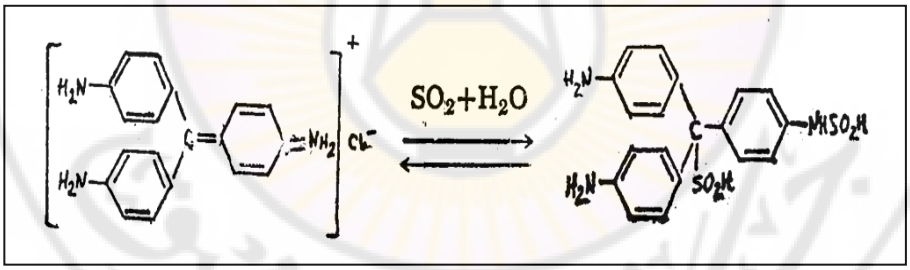
ملاحظة: يُضاف الحمض إلى الماء وليس العكس.

ما سبب انعدام اللون الأحمر لكاشف شيف ؟

يتشكل كاشف شيف عديم اللون من إشباع محلول الفوكسين القاعدي المحمَّض (فوكسين+ حمض كلور الماء النظامي) بـ SO_2، وهذا الأخير يتشكل من تفاعل حمض كلور الماء مع ثاني كبريتيت الصوديوم حسب المعادلة الآتية:

$$Hcl + NaHSO_3 \rightarrow Nacl + SO_2\uparrow + H_2O$$

يؤدي انطلاق SO2 في محلول الفوكسين الحامضي إلى تحطيم الرابطتين المضاعفتين للفوكسين، وبتحطيمهما يختفي اللون الأحمر البنفسجي ويصبح كاشف شيف الناتج عديم اللون، والتفاعل العكوس الآتي يوضح مراحل الحصول على كاشف شيف عديم اللون وعودته إلى محلول ملون بانطلاق SO_2 منه، ويحدث هذا التفاعل ضمن زجاجة كاشف شيف أثناء حفظه لذلك يتوجب إغلاقها بإحكام للحفاظ على فعالية المركب وعلى بقاء الروابط مشبعة (مفردة).



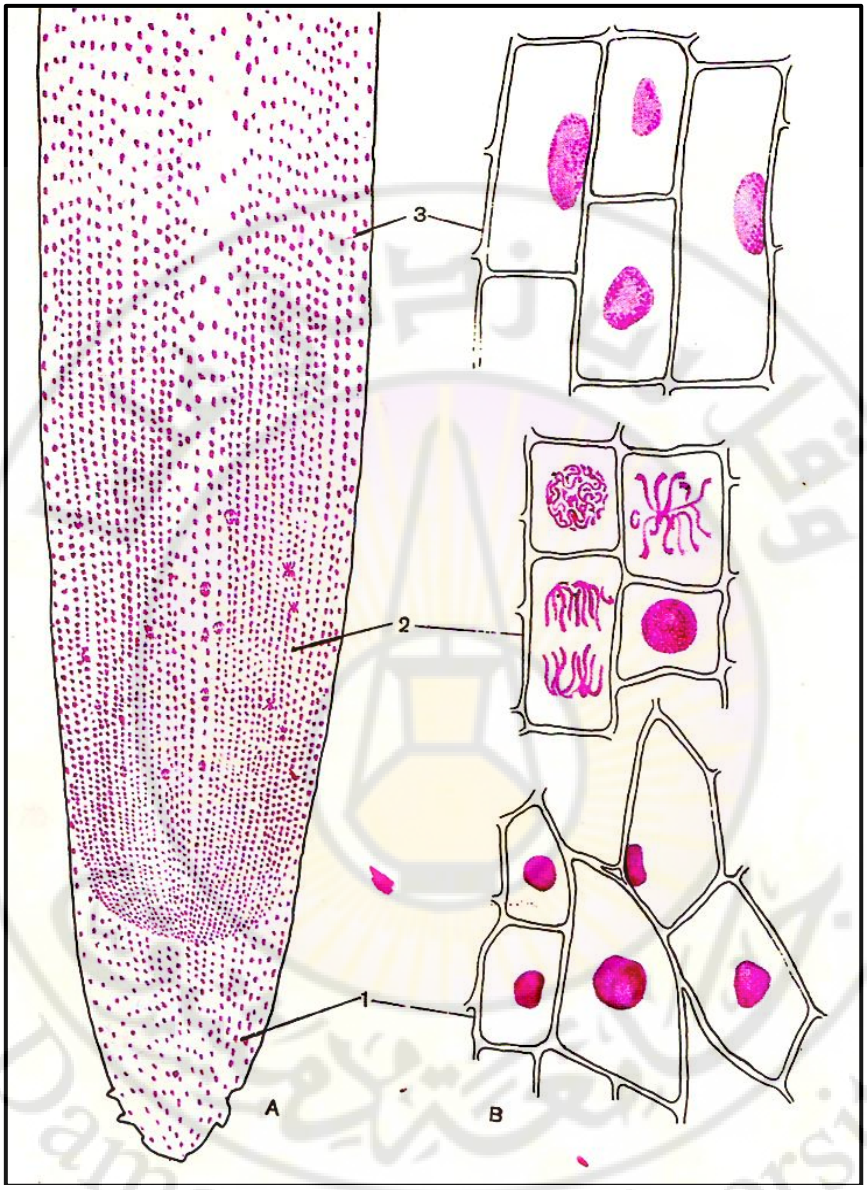
حمض الفوكسين الكبريتي (كاشف شيف) **الفوكسين القاعدي المُحمَّض**

(عديم اللون لعدم وجود رابطتين مضاعفتين) (أحمر اللون لوجود الرابطتين المضاعفتين)

يُعد كاشف شيف مركب عديم اللون غير ثابت يتحد مع جزيئة الـ DNA الحاملة للوظائف الألدهيدية الحرة مشكلاً معها جزيئة ملونة، فهو يتفاعل مع الصبغيات في النواة فقط ليعطيهم اللون الأحمر البنفسجي، في حين تبقى السيتوبلاسما والنويَّة عديمة اللون (الشكل٧٤) وتزداد شدة التلون (التفاعل) بزيادة

كمية الـ DNA في نوى خلايا النسيج المختلفة. ولتلوين السيتوبلاسما والغلاف الخلوي يفضل بعد ذلك استعمال ملونات إضافية مثل ١% محلول أزرق الميتيلين الفاتح أو الأحمر الأورانج الفاتح (أورانج G).

يستعمل كاشف شيف بشكل واسع مع جذور البصل والفول والشمندر السكري و الجوادر وغيرها من النباتات، ويفضل تثبيت النباتات المدروسة بمثبت كارنوي أو نافاشين، أما مدة التثبيت فيجب ألا تكون طويلة كيلا تتحطم الروابط بين الحموض النووية (الدنا) والبروتينات.



الشكل (٧٤) تفاعل فولكن في مرستيم جذور البصل

A- مقطع طولي مكروتومي. B- مناطق تفصيلية من الجذر:

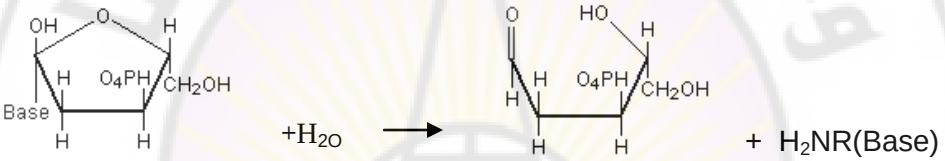
١- القلنسوة، ٢- منطقة الانقسام، ٣- منطقة الاستطالة.

(يشير اللون الأحمر الليلكي إلى أماكن تواجد الدنا)

٢- آلية التفاعل:

يتحقق تفاعل فولكن بمرحلتي الإماهة، والتلوين(إجراء التفاعل).

آ- الإماهة hydrolysis: ولما كان كاشف شيف (حمض الفوكسين الكبريتي) هو كاشف خاص بالألدهيدات، وجب تحرير الروابط الألدهيدية في جزيئة الـ DNA كي ترتبط مع جزيئات هذا الكاشف، وهكذا تُؤدي المرحلة الأولى إلى فصل الأسس الآزوتية البيورينية (أدينين- غوانين) من جزيئة الدنا، وبذلك تبدو بقية الجزيئة حاملة للمجموعات الألدهيدية الحرة كما في التفاعل الآتي:



Deoxyribose with base — Deoxyribose aldehyde

ريبوز منقوص الأكسجين مع الأساس — ألدهيد ريبوز منقوص الأكسجين — الأساس

يحصل هذا التبدل في ذرة الكربون الأولى من جزيئة الريبوز منقوص الأوكسجين، وبذلك تظهر الوظيفة الألدهيدية في مكان انقطاع الأساس البيوريني، ويتحول الشكل الحلقي للريبوز المنقوص الأوكسجين إلى الشكل المنشور.

ب- إجراء التفاعل: يحصل أثناء سير التفاعل أن تتحد جزيئة واحدة من كاشف شيف Schiff's reagentعديم اللون بوظيفتين ألدهيديتين 2R-CHO عائدتين للريبوز منقوص الأوكسجين كما هو موضح في المعادلة المشار إليها في الصفحة (١٤٤) . من هذه المعادلة نرى أن كاشف شيف يضم المجموعتين SO_2H –، وبوجودهما تظهر رابطتان مفردتان، فيبدو الكاشف عديم اللون، وبالتفاعل مع الألدهيد (من الـ DNA المميه) ينتعش من جديد اللون

بسبب وجود الرابطتين المضاعفتين، عندها يأخذ الدنا (الصبغيات) اللون الأحمر الخاص والمميز لكاشف شيف.

٣- طريقة العمل:

يمكن إجراء تفاعل فولكن للكشف عن الـ DNA في جذور النباتات المختلفة بإحدى الطريقتين الآتيتين:

الطريقة الباردة:

يُحضر كاشف شيف لإنجاحها بشكل مختلف عمَّا ذكر سابقاً، حيث نتبع ما يأتي:

١- تُغسل المواد التي نرغب بدراستها(الجذور وغيرها...) من آثار الكحول (إذا كانت محفوظة فيه) بالماء المقطر.

٢- توضع في حمض كلور الماء ٥٠%، وتترك في حرارة الغرفة فترة ٤٠ دقيقة (فترة الحلمهه).

٣- تغسل الجذور جيداً بالماء بعد الانتهاء من الحلمهة لإزالة آثار الحمض.

٤- تُترك في كاشف شيف (المحضر خصيصاً لهذه الطريقة) لمدة ١,٥-٢ ساعة.

٥- تُغمس الجذور بالماء المقطر.

٦- تصنع منها المحضرات المناسبة حسب الطرائق المعروفة.

يمكن حفظ الجذور الملونة بتفاعل فولكن (حسب الرغبة) في الكحول ٧٠% حتى دراستها.

الطريقة الساخنة:

وهي أسرع من الباردة يستعمل فيها كاشف شيف المحضر بالطريقة المذكورة في البداية. ويتحقق التفاعل حسب الخطوات الآتية:

١- تُرفع الجذور من الكحول ٧٠% (إذا لم تكن طازجة أوغير مُثبتة) وتوضع في الكحول ٥٠% مدة ١٠-٢٠ دقيقة ثم في الماء المقطرI مدة ١٥-٢٠ دقيقة ثم في الماء المقطرII مدة ١٥-٢٠ دقيقة، ثم تنقل إلى حمض كلور الماء النظامي البارد.

٢- تنقل الجذور فوراً من حمض كلور الماء النظامي الموجود في حرارة الغرفة، إلى حمض كلور الماء النظامي المسخن إلى الدرجة (٦٠°) (يُفضل وجود حمام مائي مُثبت على هذه الدرجة) بهدف حلمهتها مع المحافظة على ثبات هذه الدرجة من الحرارة طول وجود الجذور في الحمض من (٥-١٠) دقيقة (تختلف مدة الحلمهة من نبات إلى آخر، ويجب معرفتها مسبقاً، مثلاً تستغرق حلمهة جذور البصل /٨/ دقيقة وجذور القمح /١٢/ دقيقة.... الخ).

تحقق هذه الطريقة تحرير الزمر الألدهيدية، إضافة إلى تفكيك الجذور بإذابة بكتات الكالسيوم في الصفيحة المتوسطة وهذا يسهل من هرسها.

٣- تُنقل الجذور ثانية إلى الماء المقطر لغسلها من آثار الحمض لأن بقائه يُفسد التفاعل.

٤- تُوضع الجذور في كاشف شيف من ١-٢ ساعة وتُترك في مكان مظلم، علماً بأن التفاعل يبدأ تقريباً بعد نصف ساعة من بدء الحلمهة، وبعد ذلك تأخذ مرستيمات الجذور اللون الأحمر المميز للدنا (شكل٧٥).

شكل (٧٥) جذور البصل المُعدَّة لإجراء التفاعل عليها، وجذران منها بعد نهاية التفاعل حيث المرستيمات شديدة التلون دليل وجود كمية كبيرة من الدنا.

٥- يعمد بعض الباحثين إلى غسل الجذور في الماء الكبريتي (يُحضر بإضافة ٢٠٠ مل ماء مقطر إلى ١غ من $Na_2S_2O_5$ و٢٠ مل حمض كلور الماء النظامي)، ويُستعمل على ثلاث وجبات بحدود من (٥-١٠) دقيقة في كل مرة.

٦- تُغسل الجذور في ماء الصنبور عدة مرات ثم تنقل إلى الماء المقطر.

٧- تُصنع من الجذور المحضرات المناسبة أو تحفظ في حمض الخل ٤٥% داخل البراد ولفترة غير محدودة حتى دراستها. ويتحقق ذلك بوضع نهاية الجذر الملونة فقط على شريحة مع قطرة من حمض الخل تركيز ٤٥% وتغطى بساترة ثم تهرس بعود ثقاب حصراً (شكل٧٦).

ملاحظة: يرى بعض الباحثين أنه يمكن وضع الجذور الملونة في وعاء زجاجي نظيف مع قطرة من الكارمن الخلي أو كارمن بربيوني تركيز١% ثم تجهز محضرات الهرس. وفي حال استعمال الماء الكبريتي يجب تحضيره في كل مرة قبل إجراء التفاعل مباشرة، حيث يوزع في ثلاثة أوعية توضع بالتسلسل لنقل المحضرات أو الجذور من خلالها بعد رفعها من كاشف شيف.

شكل (٧٦) طريقة هرس نهاية الجذر الملونة بوساطة حمض الخل ٤٥%
بين الشريحة والساترة وذلك بمساعدة عود الثقاب.

طريقة معدلة لتفاعل كشف الدنا:

تستعمل بعض المخابر الوراثية طريقة جديدة لتلوين الصبغيات بتفاعل بيوكيميائي خاص يعرف باسم كاربول فوكسين المعدل Carbol Modifid Fuchsin وتنحصر هذه الطريقة باتباع الخطوات الآتية:

آ- تحضير صبغة الفوكسين القاعدي:

① يضاف مقدار (٣)غ فوكسين قاعدي Basic Fuchsin إلى ١٠٠مل كحول إيتيلي ٧٠%، ويتم التحريك دون تسخين حتى الذوبان.

② يضاف (٠,٥)غ من بلورات الفينول (أو ٥ مل فينول سائل) إلى ٩٥ مل ماء مقطر مرتين وتجري العملية تحت ساحبة هواء مع التحريك دون تسخين وذلك لأن أبخرة الفينول تسبب أضراراً للمتعامل معها.

ب- تحضير الملون (A):

مزج١٠مل من ① العائد للمرحلة (آ) مع ٩٠ مل من ② للمرحلة (آ). يتم المزج بدون تسخين وتحت الساحبة.

ج- تحضير الملون (B) (يمكن حفظه لعدة أسابيع):

يتم مزج ٥٥ مل من المحلول الملون (A) للمرحلة (ب) مع ٦ مل حمض خل ثلجي و٦ مل فورم ألدهيد (فورمول) مع التحريك المستمر تحت الساحبة وبدون تسخين.

د- تحضير المحلول النهائي المستعمل في التلوين:

يتم مزج ٥ مل من الملون (B) العائد للمرحلة (ج) مع ٩٥ مل حمض الخل ٤٥% و١,٨غ سوربيتول Sorbitol.

ملاحظات:

١- يفضل استعمال ماء مقطر مرتين في تحضير الملون.

٢- يجب تحضير حمض الخل ٤٥% المستعمل في عمليات المزج طازجاً واستعماله مباشرة.

٣- يجب التحريك المستمر بدون تسخين ولاسيما في المرحلة (د) حتى ذوبان السوربيتول بشكل كامل.

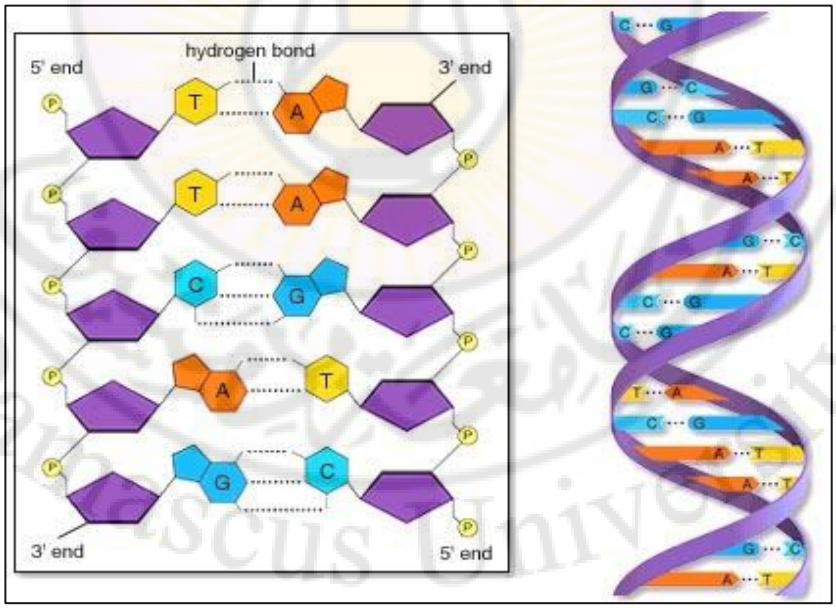
٤- يفضل إنقاص الأوزان والحجوم المذكورة في قائمة التحضير بالشكل الأدنى كي لا نحصل على كمية كبيرة من الملون لا حاجة لنا بها.

تتم عملية حلمهة الجذور المراد تلوينها بالكاربول فوكسين وذلك بغسلها أولاً من المثبت بالماء العادي مرتين، ثم وضعها في حمض كلور الماء النظامي المسخن للدرجة ٦٠° مدة (١٠-١٢) دقيقة، ثم غسلها بالماء المقطر عدة مرات، بعد ذلك توضع الجذور في الملون النهائي وبعد فترة من الزمن (٠,٥-١) ساعة تهرس بالملون ذاته ثم تدرس تحت المجهر.

ثانياً- استخلاص الـ DNA

التوضيح النظري:

تحتوي كل خلية على الجينوم المتمثل بمجموع المورثات العديدة المتوضعة على صبغيات الكائن الحي والموجودة بدورها في النواة. تؤدي المورثات وظائفها المرسومة لها عن طريق الـ RNA المرسال، الذي يقوم ببناء بروتين نوعي(إنزيم) يعمل على تسيير الصفة المنوطة بالمورثة المعنية. وتتركب المورثة من الحمض النووي DNA الذي يأخذ الشكل الحلزوني بهيئة شريطين يرتبطان بروابط هيدروجينية. وهكذا يرتبط الأدنين (A) مع التيمين (T) برابطتين، والغوانين (G) مع السيتوزين(C) بثلاثة روابط هيدروجينية (شكل ٧٧).



شكل(٧٧) بنية الدنا (الحلزون المضاعف) وبجانبها توضيح الروابط الهيدروجينية بين الأدينين والتيمين (رابطتان)، وبين السيتوزين والغوانين (ثلاثة روابط).

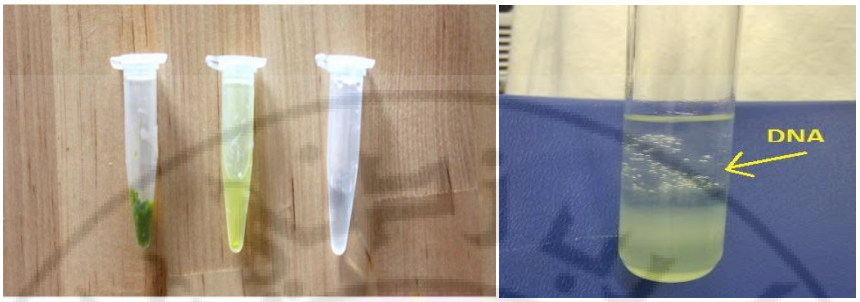
يتم تطبيق جميع التجارب والتحليلات على الدنا في علوم التقانة الحيوية والهندسة الوراثية، فهي التي تتحكم بعملية نمو وتغيير خصائص جميع الكائنات الحية (نبات – وإنسان – وحيوان – أو حتى كائنات دقيقة)؛ كما أنه يُستعمل في الاختبارات التي سيتم من خلالها تحديد المجرمين بعد حدوث جريمة ما، كما يمكن استعمال الدنا لتحديد أو نفي صفة الأبوة أو البنوة، ويتم تحديد هوية الأشخاص (دراسة البصمة الوراثية) والكشف عن الأمراض الوراثية ودراسة الخارطة الوراثية (تحديد موقع المورثات على الصبغيات وأهم من هذا كله التلاعب بالأشكال وتغيير الخصائص عن طريق الهندسة الوراثية...)، ولما كنا لا نستطيع الاستفادة من الدنا الموجود في الخلية بشكل مباشر، لهذا يتطلب استخراجه من الخلية الحية، ومن ثم تنقيته وتخزينه في بيئة مخبرية مناسبة للاستعمال المستقبلي. وتجدر الإشارة إلى أن الحمض النووي القديم المُستخرج من الخلية منذ مدة طويلة له غالباً قدرة وفعالية أفضل من الدنا المستخلص من الخلية الحية حديثاً. ومن التطبيقات الخاصة بالهندسة الوراثية الحيوية نجد: الأغذية النباتية المعدلة وراثياً، إنتاج الأدوية الحيوية، تسريع نمو النباتات، زيادة مقاومة النباتات للأمراض، والكثير الكثير من التطبيقات العلمية المفيدة!!

بشكل عام لا يوجد الحمض النووي منفصلاً في الخلية، لكنه يوجد داخل نواتها، كما يوجد داخل العضيات السيتوبلاسمية مثل الصانعات الخضراء والميتوكوندريا.

التطبيق العملي:

الحصول على الحمض النووي (الدنا) من الأوراق النباتية:

تتطلب عملية استخراج الحمض النووي من الخلية استعمال بعض المواد الكيميائية لتحليل وتفكيك الأغشية المحيطة بالحمض النووي دون الإضرار به مثل الغلف الهيكلية المحيطة بالخلايا النباتية والغشاء السيتوبلاسمي والغشاء المحيط بالنواة. لذلك يجب أولا حل هذه الغلف والأغشية دون الإضرار بالحمض النووي، الذي يؤدي إلى إضعاف الروابط السليلوزية في جدار الخلايا وكذلك روابط الشحوم الفوسفاتية في الغشاء الخلوي، وتحليل الأنزيمات النووية وهي النوكلياز Nucleases والدناز DNAses التي تعمل على تقطيع وتجزئة الحمض النووي إلى قطع صغيرة. ولتحقيق ذلك يتم هرس وسحق النسيج النباتي بالآزوت السائل (-١٩٦ تحت الصفر)، ثم يضاف إلى المسحوق الناعم لنسيج الأوراق المسحوقة محلول CTAB (Cationic decyl Trimethyl Ammunium Bromid) وهو سائل تنظيف (Detregent agent) الذي يحطم الإنزيمات ويرتبط مع البروتينات والسكريات المتعددة ويغير تركيبها أو يحطمها، ويحطم الدهون الموجودة في الأغشية. يلي ذلك إذابة الأجزاء العضوية المتبقية وغير المرغوب بها باستعمال المذيبات العضوية اللاقطبية مثل مركب مزيج (الكلوروفورم: ايزواميل) بنسبة (١:٢٤)، واستعمال المواد الكحولية الباردة لتجنب تخريب الـ DNA الذي يتخرب بالحرارة، وعندها تترسب خيوط الدنا التي يتم غسلها بالكحول٧٠% ثم بالمحلول الموقي TE (Tris EDTA)، أو الماء المعقم منزوع الشوارد (شكل٧٨).



شكل (٧٨) خيوط الدنا في نهاية عملية استخلاصه من الأوراق النباتية.

استخلاص الـ DNA من البصل:

١- تقطع البصلة (مقدار ١٠٠ ملغ) إلى قطع متوسطة الحجم ولا تفرم بشكل ناعم.

٢- يجهز حمام مائي بدرجة (٥٠ – ٦٠) درجة، كما يجهز حوض ماء مثلج.

٣- يوضع البصل المقطع في هاون خزفي ويضاف إليه محلول الاستخلاص المكون من: ملعقة كبيرة (١٠مل) من الشامبو أو مسحوق الغسيل أو سائل الجلي + نصف ملعقة شاي (١,٥ غ) ملح الطعام + (١٠٠ مل) ماء مقطر ويذاب ببطء مع الحرص على عدم تشكل فقاعات هوائية.

الهدف من إضافة الملح هو حماية النهايات الفوسفاتية السالبة في جزيئة الدنا الحلزونية، الأمر الذي يسمح لشريطي الدنا بالتقارب وزيادة الالتفاف، مما يفصله عن المحتويات الأخرى للخلية ويجعله سريع الترسب.

والهدف من إضافة الشامبو أو المنظفات هو وجود تراكيز عالية من المركبات الكيميائية مثل SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) وتسمى أيضا SLS (Sodium Lauryl Sulphate) وهي التي تفكك روابط البروتينات والشحوم في الغشاء البلاسمي، وهذا يسهم في تحطيمه وتحطيم الجدار.

٤- يهرس البصل بالهاون مع محلول الاستخلاص، أو بظهر الملعقة الكبيرة، ثم ينقل إلى وعاء أو أنبوب اختبار.

٥- يوضع وعاء البصل المهروس في الحمام المائي لمدة (١٠) دقائق فقط كي لا يتحلل الدنا، ويسحق خلال هذه المدة بالملعقة.

٦- ينقل الوعاء إلى حوض الماء المثلج ويترك لمدة (٥) دقائق مع استمرار الضغط بالملعقة.

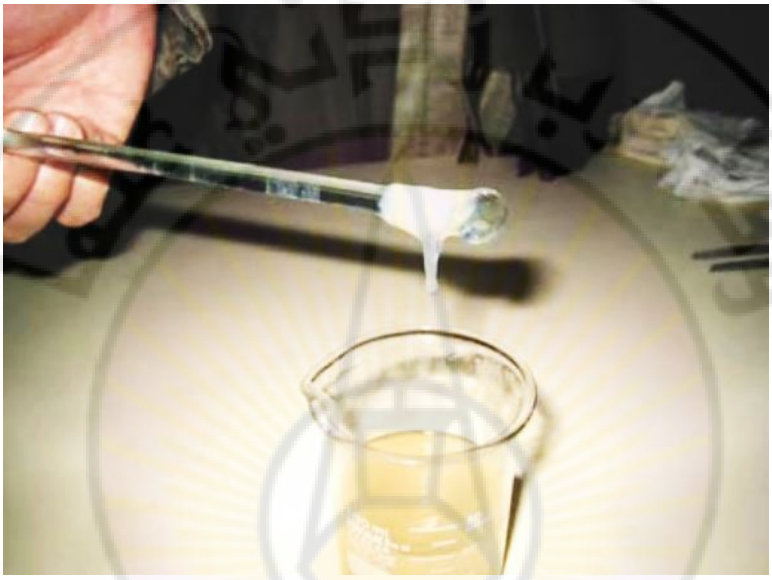
٧ - يرشح الخليط فوق (٤) طبقات من النسيج الناعم أو الشاش للتخلص من محتويات الخلية المرتبطة مع الدنا، ويجب محاولة منع مرور الرغوة (ومن الأفضل وضع المزيج في البراد وتركه يرشح ببطء طول الليل).

٨- توضع الرشاحة Filtrate في أنابيب اختبار (مقدار الثلث لكل أنبوب)، ويمكن خزنها في البراد لمدة يوم واحد.

٩ - يضاف كحول إيتيلي بارد إلى كل أنبوب من الرشاحة بمقدارٍ مساوٍ لها لتشكيل طبقة كحولية في الأعلى، وتتم الإضافة بطرق مختلفة مثل:

- وضع الكحول في قعر أنبوب اختبار، ثم صب الرشاحة فوقه ببطء.
- صب الكحول على طرف أنبوب الاختبار الحاوي على الرشاحة ببطء.

١٠- يترك المزيج الكحولي دون هز أو تحريك مدة (٢ – ٣) دقيقة، فيلاحظ تجمع راسب أبيض في الطبقة الكحولية هو الـ DNA ، حيث يمكن سحبه بتدوير قضيب زجاجي باتجاه واحد ليتجمع حوله الدنا ويتم حفظه في الكحول (شكل٧٩).



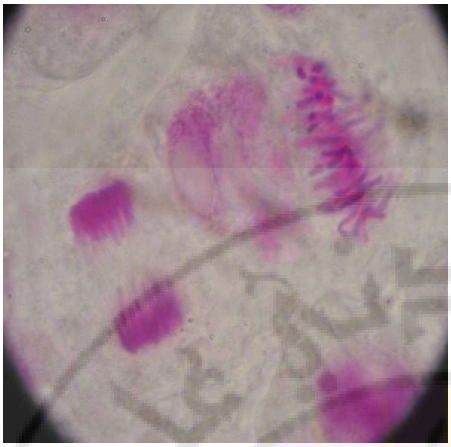
شكل (٧٩) خيوط الدنا بهئية مادة قطنية متجمعة حول القضيب الزجاجي وهي مكونه من آلاف الجزيئات الجاهزة للخزن والاستعمال في العديد من تطبيقات بالهندسة الحيوية.

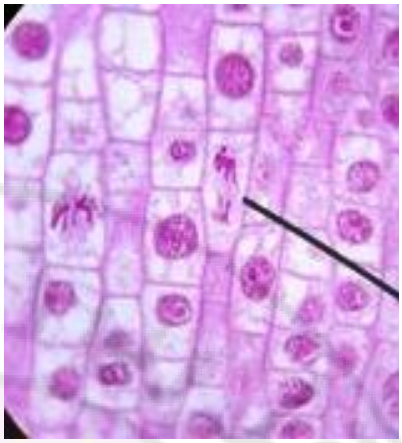
المطلوب:

١ – تقوم كل مجموعة طلابية بإجراء تفاعل لجذور القمح والبصل بكاشف شيف (تفاعل فولكن بالطريقة الساخنة).

٢ – تُرسم الجذور مورفولوجياً بالألوان بعد الانتهاء من تفاعل فولكن.

٣- يُجهز محضر هرس وتُرسم بالألوان أطوار الانقسام الخيطي المختلفة (شكل٨٠).





شكل (٨٠) صور مجهرية لأطوار الانقسام الخيطي في نهايات جور البصل معالجة بتفاعل فولكن – شيف.

ثالثاً– كشف الـDNA و الـRNA بطريقة أخضر الميتيل والبيرونين:

التوضيح النظري:

إن الدور المهم الذي يؤديه الـ RNA في الخلية بأنواعه الثلاثة: الرنا المرسال m– RNA، والرنا الناقل –RNAT، والرنا الريبوزومي r–RNA، يدفعنا إلى البحث عن طرائق تساعدنا في الكشف عنه وعن أماكن وجوده في الخلية.

تختلف بنية جزيئة الـ RNA عن بنية جزئية الـ DNA، لاسيما بخصوص النوكليوتيدات؛ وهكذا تضم الواحدة منها سكر الريبوز بدلاً من الريبوز منقوص الأوكسجين، والأساس الآزوتي المعروف باليوراسيل بدلاً من التيمين في الـ DNA. إضافة إلى ذلك تملك جزيئة الـ RNA سلسلة مفردة من النوكليوتيدات.

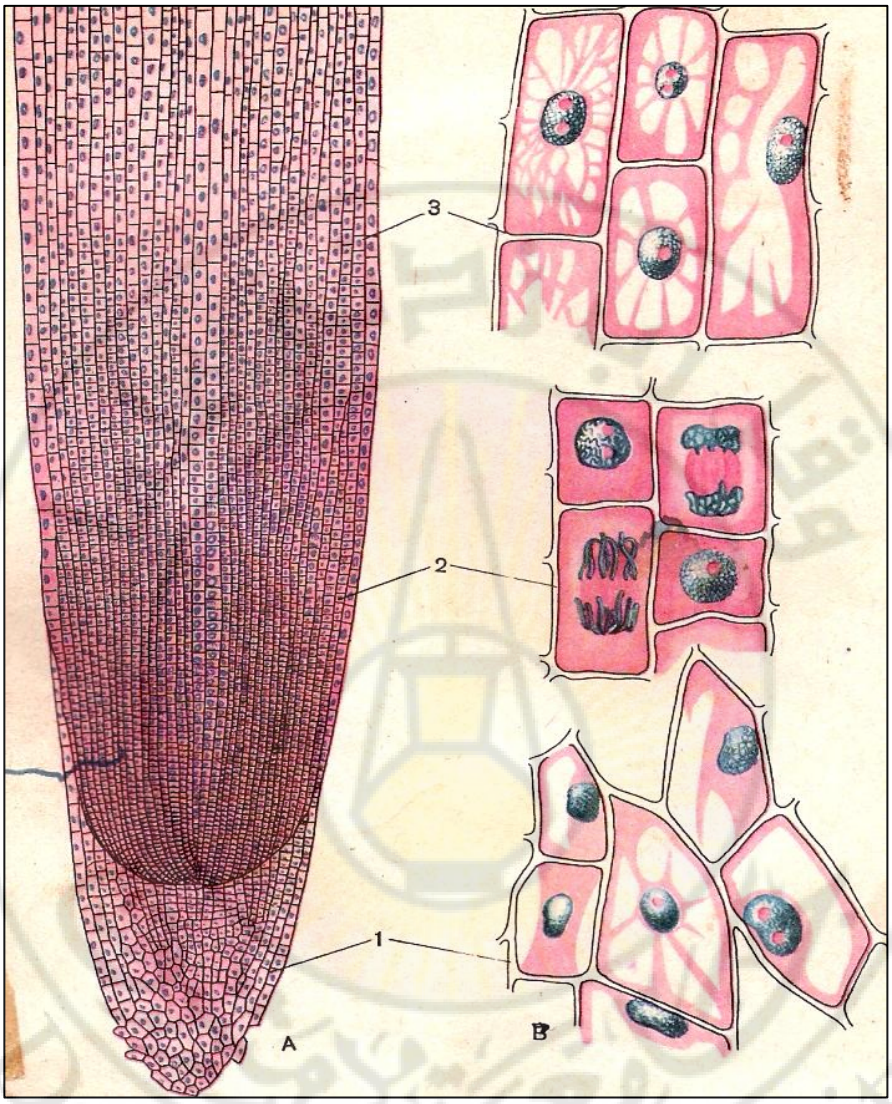
تُلاحظ جزيئات الرنا المرسال في السيتوبلاسما وهي التي تتشكل من انتساخ الصبغيات، كما تُلاحظ في الريبوزومات، حيث تؤدي دوراً مهماً في تركيب

البروتين النوعي حسب شفرة مناسبة. وهكذا تأتي إلى الريبوزومات جزيئات الـ RNA الناقل التي تحمل الحموض الأمينية اللازمة لتركيب هذه البروتينات.

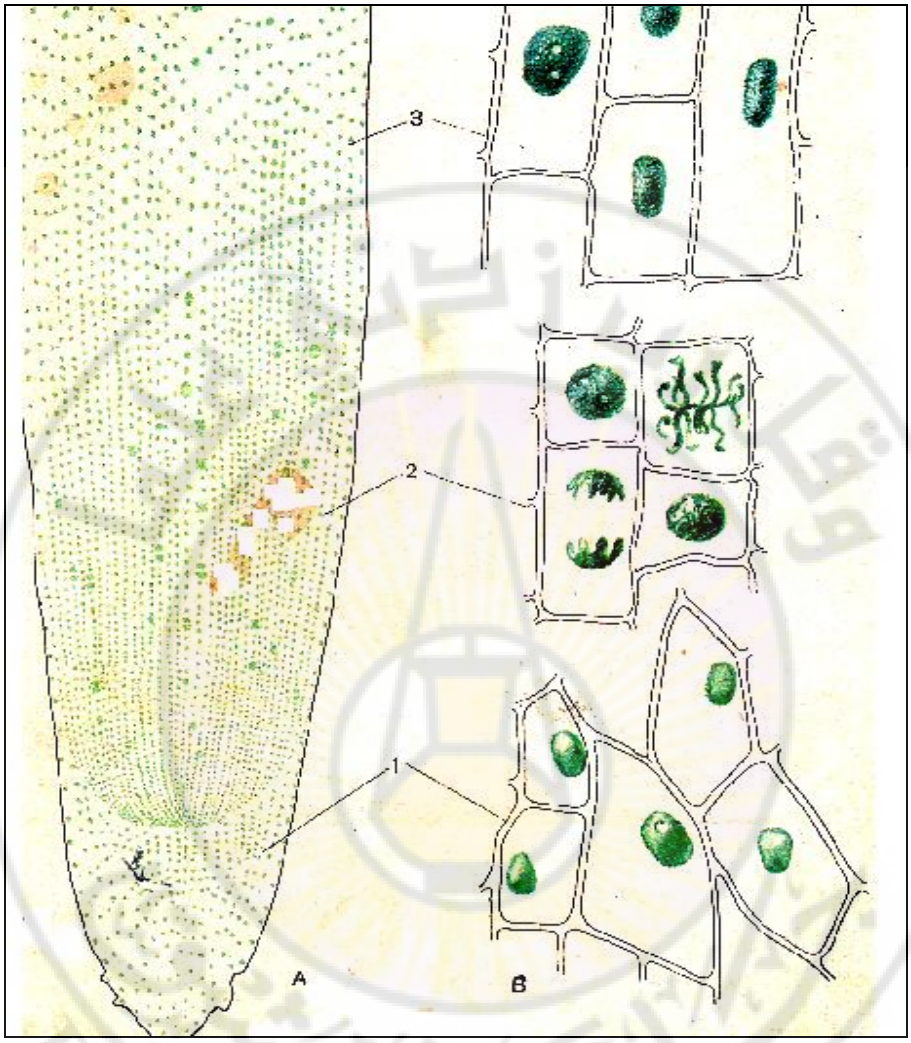
يعتمد تفاعل كشف الـ DNA و الـ RNA بمزيج أخضر الميتيل metyl green مع البيرونين pyronine على وجود المجموعة الفوسفاتية الحامضية (HPO_4^-) في هاتين الجزيئتين.

وكما هو معروف فإن معظم الملونات القاعدية يلون كل من الـ DNA والـ RNA بدرجة واحدة تقريباً، لكن مُلوِّن مزيج أخضر الميتيل مع البيرونين يلونهما اصطفائيا، وبذلك يأخذ الـ DNA اللون الأخضر بتفاعله مع أخضر الميتيل في حين يأخذ الـ RNA اللون الأحمر بتفاعله مع البيرونين.

يلاحظ لدى إجراء تفاعل كشف الـ DNA والـ RNA بهذه الطريقة، أن نوى الخلايا لا تتلون بالأخضر وإنما تأخذ اللون الأزرق بسبب اختلاط اللونين معاً، وهما الأحمر والأخضر (RNA+ DNA) (شكل٨١). وبتحطيم RNA الخلية نجد أن السيتوبلاسما تصبح عديمة اللون وتكتسب النواة اللون الأخضر الواضح (شكل٨٢).



شكل(٨١) تفاعل أخضر الميتيل مع البروبين لكشف الدنا والرنا في نهايات جذور البصل اصطفائياً. يشير اللون الأحمر إلى أماكن وجود الرنا في السيتوبلاسما والنوية، ويشير اللون الأزرق إلى وجود الدنا مزيج اللونين (أحمر + أخضر) في النواة.



شكل(٨٢) تفاعل أخضر الميتيل مع البيرونين بعد تأثير إنزيم ريبونيكلياز في نهايات جذور البصل. يشير اللون الأخضر إلى مكان تجمع الـ DNA. لاحظ أن السيتوبلاسما والنوية عديمتا اللون بسبب تحطيم الـ RNA.

يشير بعض الباحثين إلى أن القدرة الاصطفائية لأخضر الميتيل على تلوين الDNA ترجع إلى الروابط الموجودة بين جزيئات كل من الـ DNA والمادة الملوِّنة أو المتفاعلة. وهكذا يعتقد بأن المسافة بين المجموعات المشحونة إيجاباً من المادة الملوِّنة تعادل تماماً المسافة بين المجموعات المشحونة سلباً لجزيئات الـ DNA، وبذلك ترتبط مع بعضها كونها متساوية المسافات ومتعاكسة الشحنات فيتحقق التلوين.

يُعد البيرونين في مزيج المحلول الملوِّن غير نوعي ١٠٠% تجاه الـ RNA كونه يتفاعل أحياناً مع بعض مكونات الخلية غير المحتوية على الـ RNA ويلونها أيضاً.

ولكشف نوعية أحمر البيرونين في المزيج تجاه RNA نعمد إلى تحطيم دنا الخلية بأنزيم دي اكسي ريبونيكلياز Deoxyribonuclease ومن ثم نضع الملون المزيج عليها فنجد أن النواة وبعض المتضمنات الأخرى تتلون بالأحمر(إن نوعية هذا الملون لكشف الـ RNA لا تتجاوز ٣٠-٤٠%).

بالمقابل يُعد أخضر الميتيل نوعي بدرجة كبيرة تجاه الـ DNA، ولكشف هذه النوعية نعمد إلى تحطيم الـ RNA بأنزيم ريبونيكلياز Ribonuclease ثم نضع الملون المزيج على الخلية فنجد أن النواة تتلون بالأخضر بدلاً من الأزرق ويختفي بذلك اللون الأحمر، وهذا يدل على النوعية المرتفعة لأخضر الميتيل تجاه الـ DNA (النوعية تصل هنا إلى ٨٥-٩٠%).

ولإجراء عملية تحطيم الـ RNA قبل التلوين بالمزيج توضع الجذور (أو الشرائح) في الماء المقطر ثم تنقل إلى المحلول المائي لأنزيم الريبونيكلياز تركيز ٠,١% في المحم بالدرجة ٣٧-٤٠° لمدة ٢-٣ ساعات بعد ذلك تغسل بالماء المقطر ومن ثم تنقل إلى محلول الصيانة لمدة٢٠ دقيقة.

ملاحظة:

يجب أن يتحقق تفاعل مزيج اخضر الميتيل والبيرونين في وسط غير حامضي لأن الحموض (كالمثبتات الحمضية مثلاً) تحطم الروابط بين مجموعة المادة الملونة و الـ DNA و الـ RNA وبالتالي يفشل التفاعل (تتلون الجذور بالأحمر)، لذلك لابدّ من تجنب استعمال التثبيت الطويل ويفضل عادة استعمال الكحول بدلاً من الحموض.

التطبيق العملي:

١ – تجهيز المحاليل اللازمة للعمل

يتم تجهيز المحاليل قبل إجراء التفاعل وفق الآتي:

محلول A: ويتألف من ثلاثة أجزاء:

- محلول مائي للبيرونين تركيز٥% بمقدار (١٧,٥) مل.
- محلول مائي لأخضر الميتيل تركيز٢% بمقدار (١٠) مل.
- (٢٥٠) مل ماء مقطر.

يحضر كل محلول على حدة ويحفظ في وعاء ذي غطاء زجاجي، ويفضل وضعه في البراد. ويمكن استعمال محلول A عدة أشهر.

تجدر الإشارة إلى أن المحلول المائي لأخضر الميتيل٢% يتعكر دائماً بشوائب الميتيلين البنفسجي، ولذلك لا بدّ من تنقيته من هذه الشوائب بغسله بالكلوروفورم. وهكذا يُضاف إلى محلول أخضر الميتيل٢% كمية مماثلة من الكلوروفورم، ويوضع المزيج في قمع فصل لمدة (١–٢) يوم مع تكرار إضافة الكلوروفورم عدة مرات. وتزال بهدوء في كل مرة الطبقة السفلية التي تتكون من الكلوروفورم مع شوائب الميتيلين البنفسجي عن الطبقة العُلْوية المُكونة من أخضر الميتيل حتى تصبح الطبقة السفلى عديمة اللون أي إن الكلوروفورم قد أزال جميع آثار الشوائب

من أخضر الميتيل، وبهذا الشكل يمكن استعماله بمزجه مع البيرونين والماء حسب النسب المذكورة أعلاه (شكل٨٣).

شكل (٨٣) قمع الفصل حيث تُبدي الطبقة العُلوية أخضر الميتيل المُنقى من الشوائب، وتمثل الطبقة السفلية الكلوروفورم عديم اللون وذلك بعد تكرار عملية الفصل به لمرات عديدة.

محلول B: أو المحلول الموقي Buffer Solution الذي يحافظ على pH = 4.8 ويتألف من مكونين:

– نضيف في وعاء مدرج مقدار (١,٢) مل من حمض الخل الثلجي إلى (١٠٠) مل ماء.

– نضيف في وعاء مدرج مقدار (٢,٧٢) غ من خلات الصوديوم $CH_3COONa.H_2O$ إلى (١٠٠) مل ماء مقطر.

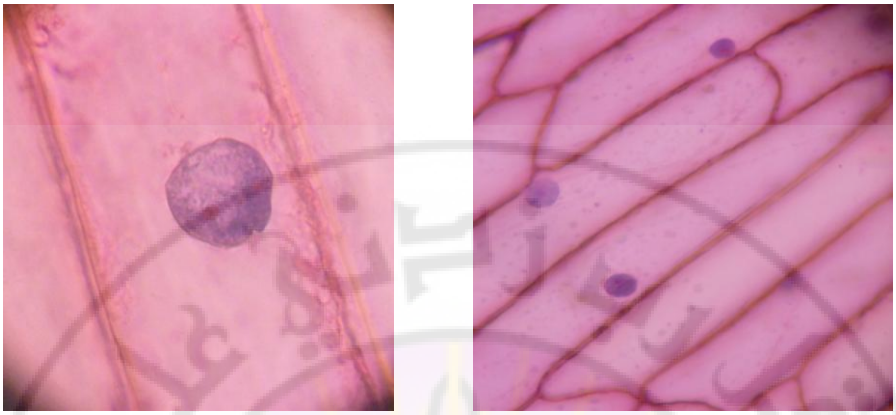
بعد ذلك نمزج في وعاء واحد (٧٧) مل من المُكون الأول مع (١٠٠) مل من المُكون الثاني. وقبل استعمال أخضر الميتيل وأحمر البيرونين مباشرة نمزج في وعاء واحد كمية من محلول (A) مع كمية مماثلة من محلول (B). تُجري عملية التفاعل إما على المحضرات الميكروتومية، أو بوضع نقطة منها مباشرة على الشريحة حاملة النسيج (مثل خلايا بشرة البصل) (شكل ٨٤).

شكل (٨٤) وضع مزيج أخضر الميتيل والبيرونين فوق خلايا بشرة البصل.

٢- المطلوب

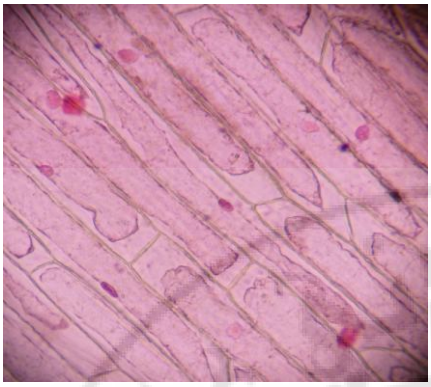
يتم تحقيق العمل وفق الخطوات الآتية:

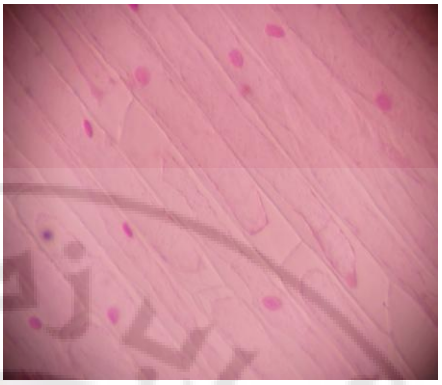
١) يُنزع جزء من البشرة الداخلية لحرشفة البصل ٠,٥ × ٠,٥ سم، وتوضع على صفيحة زجاجية نظيفة في قطرة من محلول (A)، وتغطى مباشرة بالساترة وبعد مرور عدة دقائق تكتمل عملية التلوين. ثم ترسم خلية من خلايا البشرة وتُلون السيتوبلاسما والنوية باللون الأحمر نتيجة وجود الـ RNA بينما تُلون النواة باللون الأزرق نتيجة وجود الـ DNA و الـ RNA (الشكل ٨٥).



الشكل (٨٥) تفاعل أخضر الميتيل مع البيرونين (محلول A) مع خلايا بشرة البصل بالتكبيرين الضعيف والقوي: لاحظ اللون الأزرق للنواة (أحمر + أخضر) واللون الأحمر للسيتوبلاسما والنوية.

٢) تعاد العملية السابقة وتوضع فوق البشرة قطرة من HCL تركيز ٣٠% وتترك عدة دقائق كي يتمكن الحمض من تخريب الروابط بين الملون والحموض النووية (تحطيم كاذب)، ثم يضاف محلول (A) وتغطى الشريحة بالساترة وترسم الخلايا بالألوان. إن السيتوبلاسما والنوية تصبحان عديمتي اللون، والنواة ذات لون أحمر (الشكل٨٦).





الشكل (٨٦) استعمال حمض كلور الماء مع خلايا بشرة البصل ومن ثم وضع محلول A بالتكبيرين القوي والضعيف: لاحظ تلون النواة بالأحمر بدلا من الأزرق بسبب فساد التفاعل.

القسم السابع

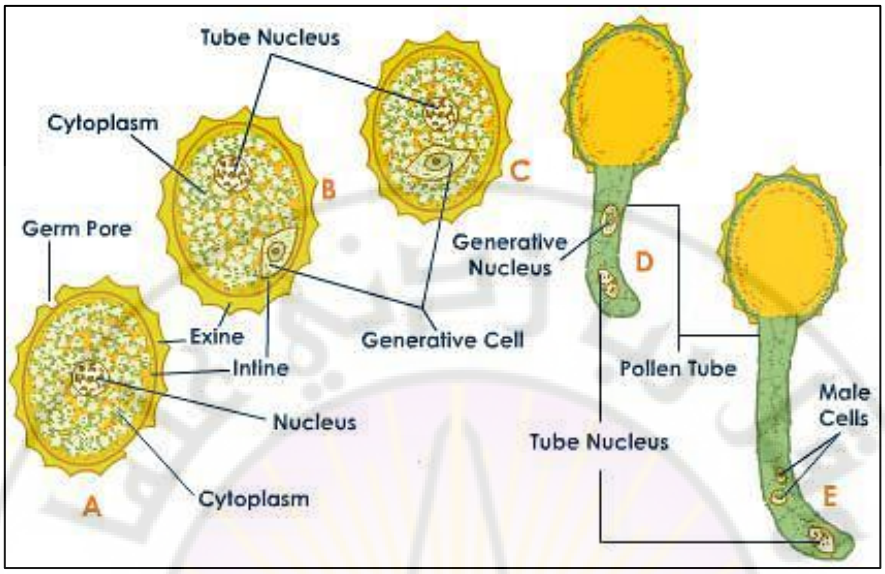
تحديد القابلية الحيوية والاخصابية لحبوب الطلع

التوضيح النظري

أولا- مفاهيم عامة:

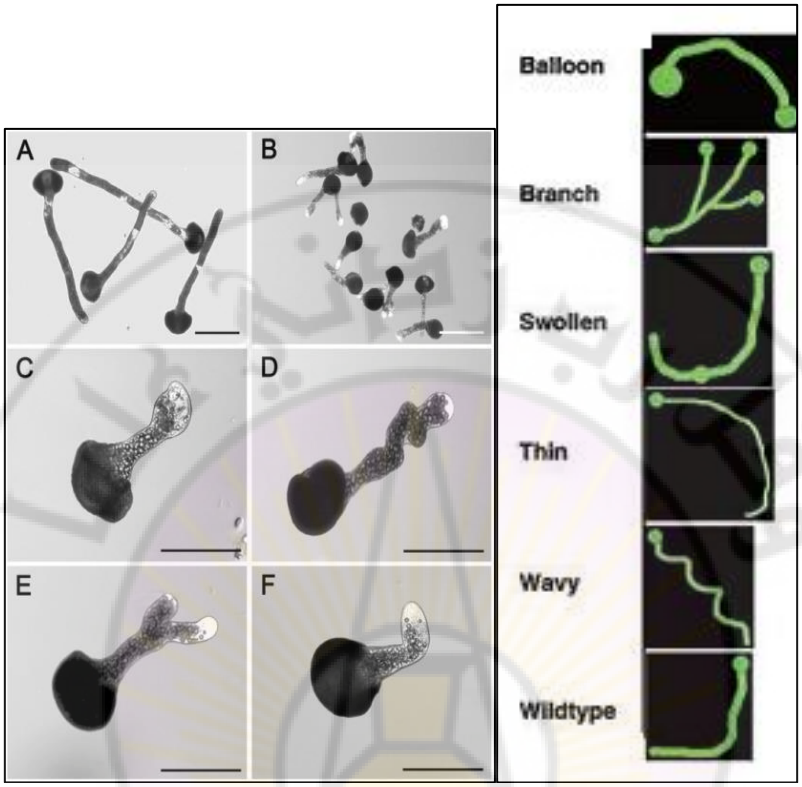
هناك آراء متفاوتة حول تُعريف القابلية أو القدرة الحيوية Pollen viability لحبوب الطلع، فبينما يصفها البعض بأنها قابلية الحبوب على العيش والنمو، يصفها آخرون بأنها قابلية الإنتاش على مياسم الأزهار في الشروط المناسبة، ويُعرِفها فريق ثالث بقابلية إنتاش حبوب الطلع في المختبر؛ وينحصر مفهوم الإنتاش بظهور أنابيب طلعية يساوي طولها على الأقل قطر حبة الطلع المدروسة، أو ما يعادل مجموع قطريها.

توصف القدرة الإخصابية Pollen fertility لحبوب الطلع بتلك التي تنتش وتمتلك خلية إعاشية وأخرى توالدية، أو خلية إعاشية ونطفتين لهما القدرة على إخصاب البويضة. وتستغرق الفترة الزمنية بين لحظة إنتاش حبوب الطلع والإخصاب في النباتات الزهرية من ٢٤ إلى ٤٨ ساعة بسبب بطء نمو الأنبوب الطلعي. ولكي تتمكن حبوب الطلع من إتمام عملية الإخصاب بنجاح لا بد لها أن تشكل أنابيب طلعية بأطوال كافية، كي تتمكن من اجتياز نسج القلم وصولاً إلى المبيض فالبويضة وهناك تقوم بعملية الإخصاب، وعليه يتوقف الطول المطلوب للأنبوب الطلعي على شكل الميسم وبنيته وطول القلم في المدقة (شكل٨٧).

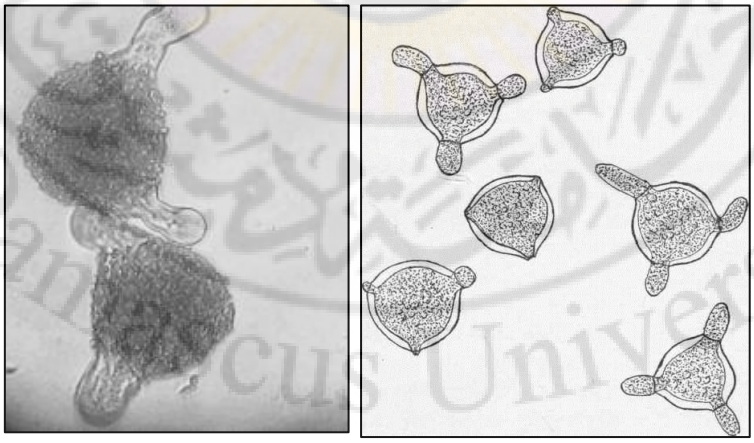


شكل(٨٧) مخطط يوضح خطوات إنتاش حبة الطلع الخصبة وصولاً إلى الأنبوب الطلعي الجيد.

يلعب شكل الأنابيب الطلعية دوراً مهماً في قدرة حبوب الطلع على الإخصاب، وخلافاً لنمط الأنبوب الطلعي الطبيعي أو البري Wild type فقد تُشكل بعض حبوب الطلع أنابيب طافرة مثل: المنتفخ في نهايته Balloon ، المتفرع Branch، المتورم في أحد أجزائه Swollen ، الرقيق Thin ، المتموج Wavy (شكل٨٨). إضافة إلى ذلك قد تشكل بعض الحبوب الطافرة أكثر من أنبوب طلعي (شكل٨٩).



شكل (٨٨) الأنماط الطافرة المختلفة من الأنابيب الطلعية إضافة إلى النمط الطبيعي: يمين مخطط يسار صور (الشرح في النص).



شكل (٨٩) ظهور أكثر من أنبوب طلعي في حبوب الطلع: (إلى اليسار صورة عن المجهر تكبير قوي)

أشارت دراسة على حبوب الطلع المنتشة في نبات الذرة إلى أنّ نوى الأنابيب الطلعية تدخل إليها بعد ٤٠-٦٠ دقيقة من بدء الإنتاش، وقد لوحظ توضع النوى في الجزء الأوسط من الأنابيب بعد ٥٥ دقيقة، بينما لوحظ توضع ثلث النوى في الجزء السفلي من الأنابيب بعد ٨٥ دقيقة، وهي التي ستكون فعالة في عملية الإخصاب.

يتم تحديد القدرة الحيوية لحبوب الطلع في النباتات التي تتميز بظاهرة العقم السيتوبلاسمي المذكر، وفي النباتات المعرضة لتأثير العوامل المطفرة mutagens، كما يمكن تحقيق هذه الدراسة في الحقل مباشرةً لاسيما في نبات القمح لانتشاره وأهميته الاقتصادية، كما يمكن تحديدها في مجال البحث العلمي والانتخاب selection. وتحسين الأنواع النباتية.

ثانياً- طرائق تحديد القدرة الحيوية والانتاشية لحبوب الطلع:

يتم تحديد القدرة الحيوية لحبوب الطلع بطرائق متنوعة منها:

١- أزرق الأنيلين ويعتمد على صبغ النشاء وعديدات السكاكر في حبوب الطلع.

٢- اليود اليودي ويعتمد على صبغ النشاء.

٣- الكارمن الخلي والسفرانين والهيماتوكسيلين hematoxylin وغيرها من الملونات التي تعتمد على صبغ الكروماتين والحموض النووية الريبية الموجودة في نوى حبوب الطلع الخصبة.

٤- الفلوريسين ثنائي الأسيتات ويعتمد على تحديد نشاط إنزيمة الاستيراز في الحبوب الخصبة.

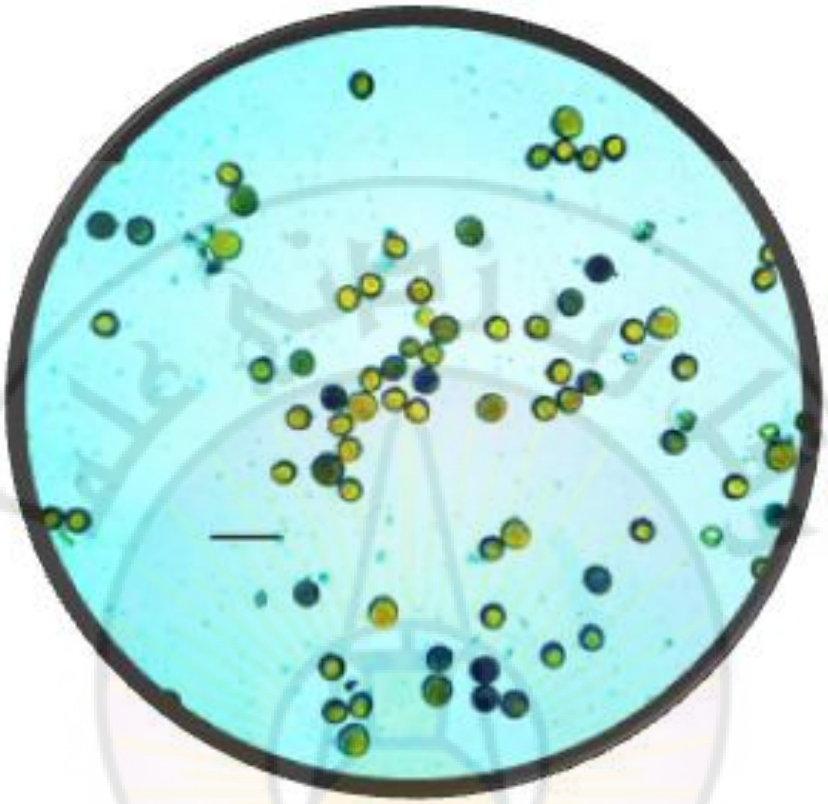
ومن الأوساط الصنعية المجهزة لزراعة حبوب الطلع بغية إنتاشها نجد الزراعة على:

١. وسط ترانكوفسكي Transkovski.

٢. وسط بروباكر – كواك Brewbaker and Kwack

٣. وسط شارداكوف ويعتمد على نسبة إنزيمة البيروكسيداز Pyroxidase الموجودة في حبوب الطلع القادرة على الإنتاش، وهذه الإنزيمة ضرورية لتسيير مجموعة من التفاعلات التركيبية خلال الإنتاش، فكلما زادت نسبتها في حبة الطلع زادت قابلية إنتاشها (شكل٩٠).

٤. مياسم النباتات الحاملة لها.



شكل (٩٠) تلوين حبوب الطلع بطريقة شارداكوف (لاحظ تدرج الألوان ارتباطاً مع نسبة إنزيمة البيروكسيداز في الحبوب الخصبة)

وبشكل عام يدخل السكروز في أوساط الإنتاش لأهميته في تنشيط إنتاش حبوب الطلع ونمو الأنابيب الطلعية، كما أنّ لبعض العناصر أهمية كبيرة في نمو الأنابيب الطلعية، مثل البور والكالسيوم والمغنزيوم والبوتاسيوم وغيرها.

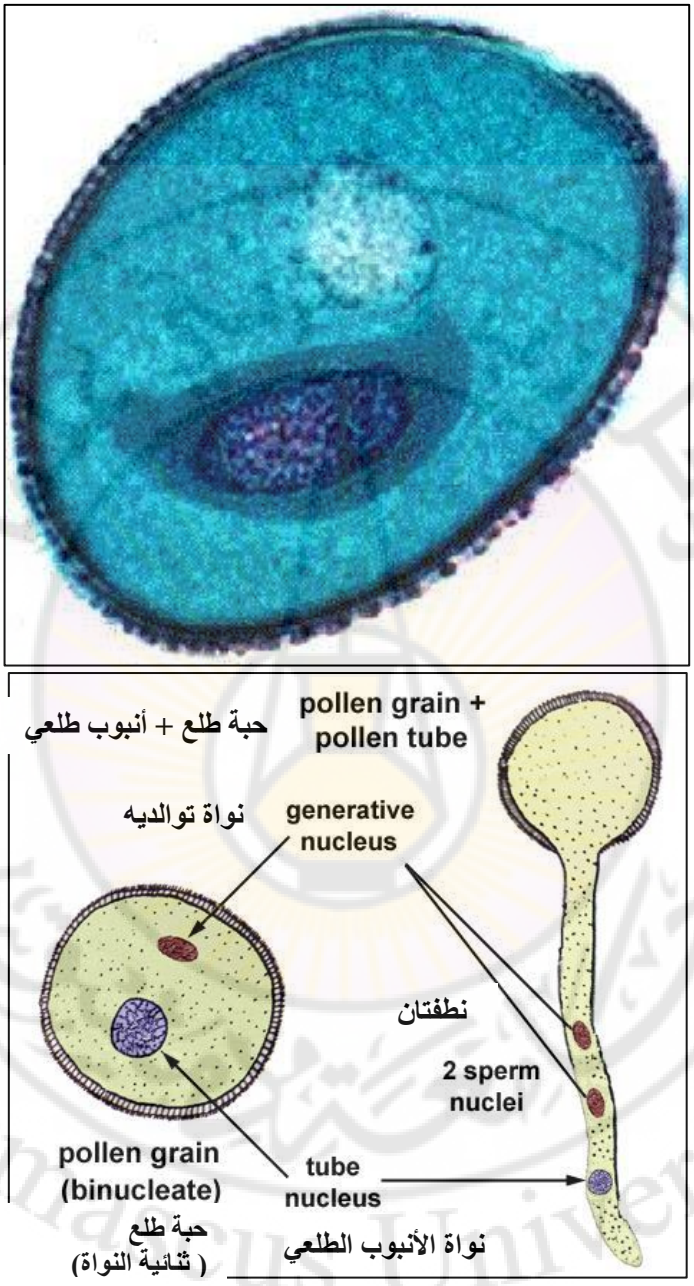
التطبيق العملي:

سنتعرف في هذه الجلسة على بعض طرائق تحديد القدرة الحيوية لحبوب الطلع، وإنتاشها على الأوساط الصنعية.

١- طريقة الكارمن الخلي:

تتميز حبوب الطلع الناضجة لبعض النباتات مثل القمح والجودار والشعير والذرة وغيرها بوجود نواتين توالديتين ونواة إعاشية واحدة. الأمر الذي يحدد الصفة البارزة من صفات حيويتها وقدرتها على الإنتاش (شكل٩١).

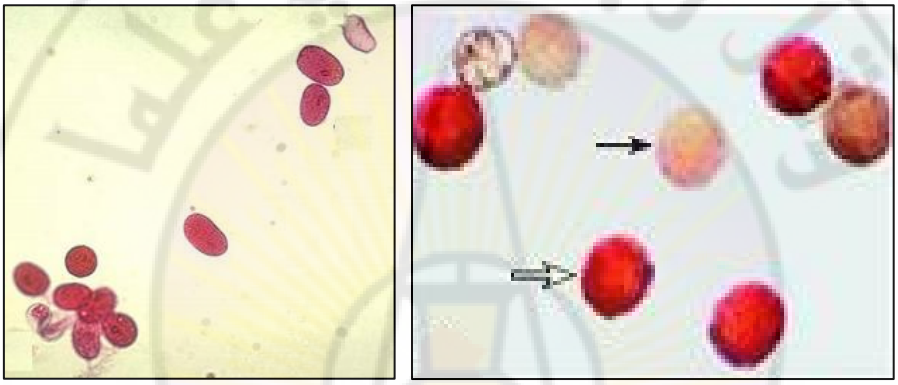
ولتحديد القدرة الحيوية لحبوب الطلع تثبت الأسدية أو البراعم الناضجة من ساعة إلى ساعتين بمثبت كارنوي الذي يتكون من (٧٥) مل كحول إيتلي ٩٥% و(٢٥) مل حمض الخل الثلجي (١:٣)؛ ثم تحفظ الأسدية في الكحول ٨٠% لحين دراستها. ويمكن أخذ حبات الطلع من المآبر الطازجة مباشرة دون إجراء عملية التثبيت.



شكل (٩١) في الأعلى: حبة طلع ناضجة بنواتين، في الأسفل: حبة طلع ناضجة بنواتين وبجانبها الحبة المنتشة الخصبة مع ظهور النطفتين.

تُستعمل صبغة الكارمن الخلي التي تلون وتثبت حبوب الطلع بشكل جيد، وهكذا تأخذ الحبوب الكبيرة الخصبة اللون الأحمر القرميدي. بينما تأخذ الحبوب الصغيرة العقيمة اللون الوردي المائل إلى الاصفرار (شكل٩٢).

. بالإضافة إلى ذلك لا تلاحظ النوى في بعض الحالات، ولاسيما في حب طلع النباتات التي تتميز بالعقم السيتوبلاسمي المذكر أو في حب طلع الهجائن الخلطية.



شكل (٩٢) نماذج من حبوب الطلع الخصبة (ملونة) والعقيمة (غير ملونة) بطريقة الكارمن.

تحضير الملون:

لتحضير صبغة الكارمن الخلي يضاف ٥٥ مل من الماء المقطر إلى ٤٥ مل من حمض الخل الثلجي، ثم يوضع فوقه ١-٢ غ من ملون الكارمن. يُسخن المزيج تدريجياً وببطء وصولاً إلى مرحلة الغليان نحو ٣٠-٦٠ دقيقة، ثم يبرد ويرشح (يفضل أن يتم التسخين في حمام مائي).

وتحضر صبغة السفرانين بإضافة ٢,٥غ سفرانين إلى ١٠ مل من الإيثانول ٩٥%، ثم يضاف هذا المحلول إلى ١٠٠ مل ماء مقطراً.

طريقة العمل:

تُنثر حبوب الطلع على الشريحة المجهرية، ويوضع فوقه قطرة من الكارمن الخلي ثم يغطى بساترة بعد مرور ١-٢ دقيقة ويدرس المحضر بالمجهر. تُرسم (بالألوان) نماذج من حبوب الطلع الخصبة والعقيمة وذلك بالتكبير القوي.

ملاحظة: لا يجوز الضغط على الساترة (أثناء تحضير الشريحة) خوفاً من تمزق أغلفة حبوب الطلع وخروج محتواها، وبالتالي النظر إلى هذه الأغلفة على أنها حبات طلع عقيمة غير ملونة.

من السهل تحديد الفروق المذكورة سابقاً بين حبوب الطلع الخصبة والعقيمة، لاسيما إذا تميزت بغلاف خارجي رقيق، لأن الغلاف الثخين يمنع مشاهدة محتوياتها من السيتوبلاسمى والنوى. وقد لا تظهر النواتان التوالديتان في حبوب طلع بعض النباتات المزروعة، وإنما تبدو واضحة في أنابيبه الإلقاحية الناجمة عن إنتاش الحبوب. وفي مثل هذه الحالات لا يمكن تحديد قدرتها الحيوية والإنتاشية بوجود هذه النوى، وإنما بشدة التلوين وبحجوم الحبوب.

تعدّ طريقة الكارمن الخلي من الطرائق السهلة لتحديد القدرة الإنتاشية لحبوب الطلع، وتسمح بمعرفة مدى نضجها ونموها وتميزها من الحبوب غير الناضجة بسرعة كبيرة. إلا أنه من الصعب في الكثير من الحالات الحكم على حيوية الحبوب انطلاقاً من الدراسة الشكلية واللونية وبخاصة لدى حفظها الطويل (في الكحول مثلاً). ولذلك نلجأ إلى طرائق أخرى أكثر دقة.

بعد الانتهاء من الرسم نحصي عدداً من حبوب الطلع الخصبة والعقيمة في ساحات مجهرية متعددة من المحضر ونسجل جدولاً مشابهاً للجدول الافتراضي (جدول ٨) بهدف تحديد النسبة المئوية للحبوب الخصبة.

جدول رقم (٨) تحديد نسبة حبوب الطلع الخصبة بطريقة الكارمن الخلي.

عدد الساحات	حبوب طلع خصبة	حوب طلع عقيمة	المجموع	النسبة المئوية للحبوب الخصبة
١ ٢ ٣				
المجموع	٦٥	١٥	٨٠	%٨١

تُستعمل طريقة الكارمن الخلي لتحديد القدرة الحيوية لحبوب طلع جميع الأجناس النباتية كونها تستند إلى مبدأ التلوين. ومن أفضل الأجناس التي تُقدم لتحقيق هذه التجربة هي التي تعود إلى الفصائل الآتية:

أ- جنس المنثور *Matthiola* من الفصيلة الملفوفية Bracicaceae

ب- جنس الخبيزة الإفرنجية *Pelargonium zonale* من الفصيلة الغرنوقية Geraniaceae.

جـ- جنس *الداتورة Datura* والباذنجان *Solanum melongena* والبندورة *Solanum esculatum* من الفصيلة الباذنجانية Solaniaceae.

د- جنس الفول *Vicia Faba* من الفصيلة الفولية Fabaceae .

هـ- جنس المشمش الهندي(الأكي دنيا) *Eryobotrya* ، وتوت العليق من الفصيلة الوردية Rosaceae.

٢- طريقة اليود اليودي:

تتميز حبوب الطلع في بعض النباتات بوجود غلاف خارجي قاس يحول دون إظهار النوى فيها بطريقة الكارمن الخلي. لذلك نلجأ إلى طريقة اليود التي تعتمد على كشف النشاء بشكل رئيس. فقد تبين أن حبوب الطلع الخصبة لبعض نباتات الفصيلة الخبازية Malvaceae والنجمية Astraceae وغيرها من النباتات

مملوءة بالنشاء في حين أن هذه المادة لا توجد في حبوب الطلع العقيمة إلا بكميات قليلة ومحدودة.

لقد أشارت أبحاث أريول Ariol عام١٩٦٧ إلى أن تشكل النشاء في حبوب الطلع يمر بمراحل مختلفة، ويرتبط بشكل وثيق بدرجة تطور الجهاز العروسي المذكر. فإذا انتهت مرحلة تشكل النواتين التوالديتين في حبة الطلع فإن نسبة النشاء فيها تصل إلى الحد الطبيعي. وفي حال عدم الانتهاء من تشكل النواتين فإن نسبة النشاء تبدو أقل من الحد الطبيعي، أما حبة الطلع العقيمة فإنها لا تحمل إلا كمية قليلة جداً من النشاء، ومع ذلك تبين أن وجود النشاء لا يُحدِدْ دوماً خصوبة أو عقم حبوب الطلع حتى ولووجدت النوى التوالدية.

تحضير الملون:

يمكن تحضير ملون اليود اليودي وفق الآتي:

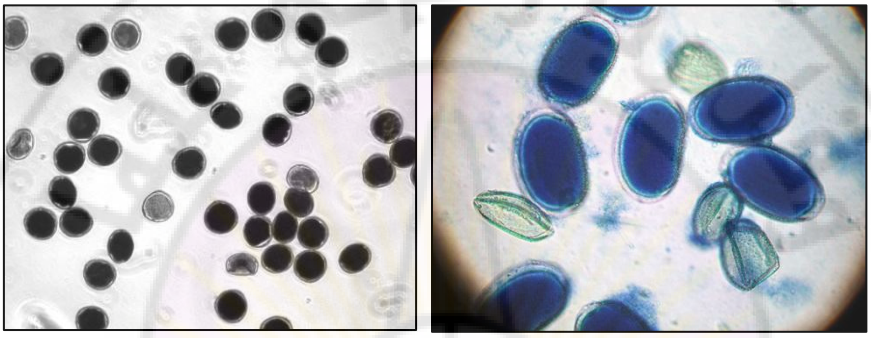
يذاب مقدار٢ غ من يود البوتاسيوم في٥ مل ماء مقطر مع التسخين، ثم يضاف إلى المزيج السابق مقدار ١ غ من اليود المعدني ويحفظ المزيج بعد تمديده بالماء إلى ٣٠٠ مل في وعاء زجاجي ذي لون برتقالي داكن.

طريقة العمل:

تُنثر محتويات المآبر الناضجة فوق الشريحة المجهرية وتوضع فوقها نقطة من ملون اليود وتغطى بساترة بعد إبعاد النسج الزائدة. ويمكن تمييز حبوب الطلع الخصبه بكل سهولة تحت المجهر فيما إذا اكتسبت اللون البنفسجي الغامق (شبه الأسود)، أما حبوب الطلع العقيمة فتبقى دون لون تقريباً لأنها لا تحتوي على النشاء أو أن كميته قليلة (شكل٩٣). ويجب الانتباه إلى عدم إدخال أغلفة حبوب الطلع (فيما إذا وُجدت في المحضر) ضمن حساب نسبة حيويتها. من الأجناس المفضلة لتحديد حيوية حبوب الطلع بطريقة اليود اليودي نأخذ جنس الخبيزة

Mala و الختمية *Althea* من الفصيلة الخبازية Malvaceae وجنس الأقحوان *Calendula* من الفصيلة النجمية Asteraceae.

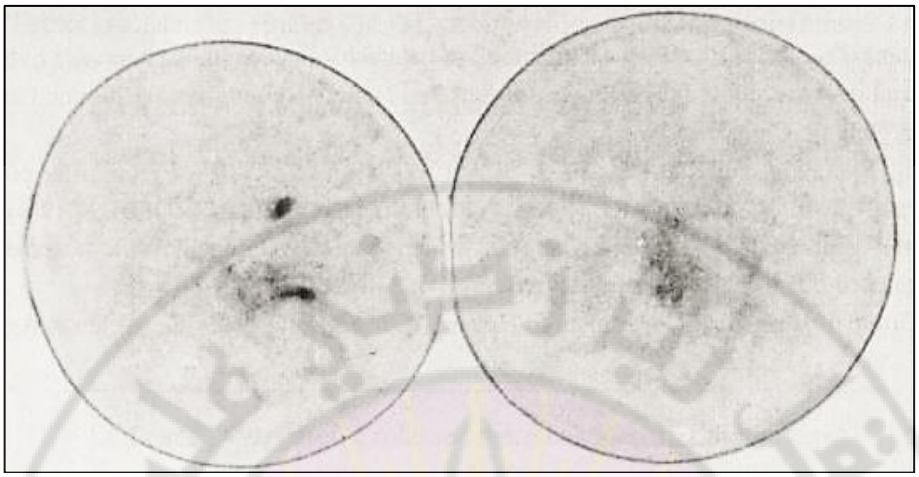
بعد الانتهاء من تجهيز المحضر يتم اختيار حبوب واضحة خصبة وعقيمة بالتكبير الضعيف، ثم تُرسم نماذج منها بالتكبير القوي.



شكل (٩٣) نماذج من حبوب الطلع الخصبة والعقيمة باستعمال طريقة اليود اليودي.

٣- طريقة التلوين بالهيماتوكسيلين:

تُشير بعض الأبحاث في نبات الرز إلى أن استعمال ملونات خاصة لحبوب الطلع مثل الهيماتوكسلين يُؤدي إلى تلوين النطفتين الناتجتين عن النواة التوالدية في الحبوب الخصبة دون أن تتلون في الحبات العقيمة (شكل ٩٤).

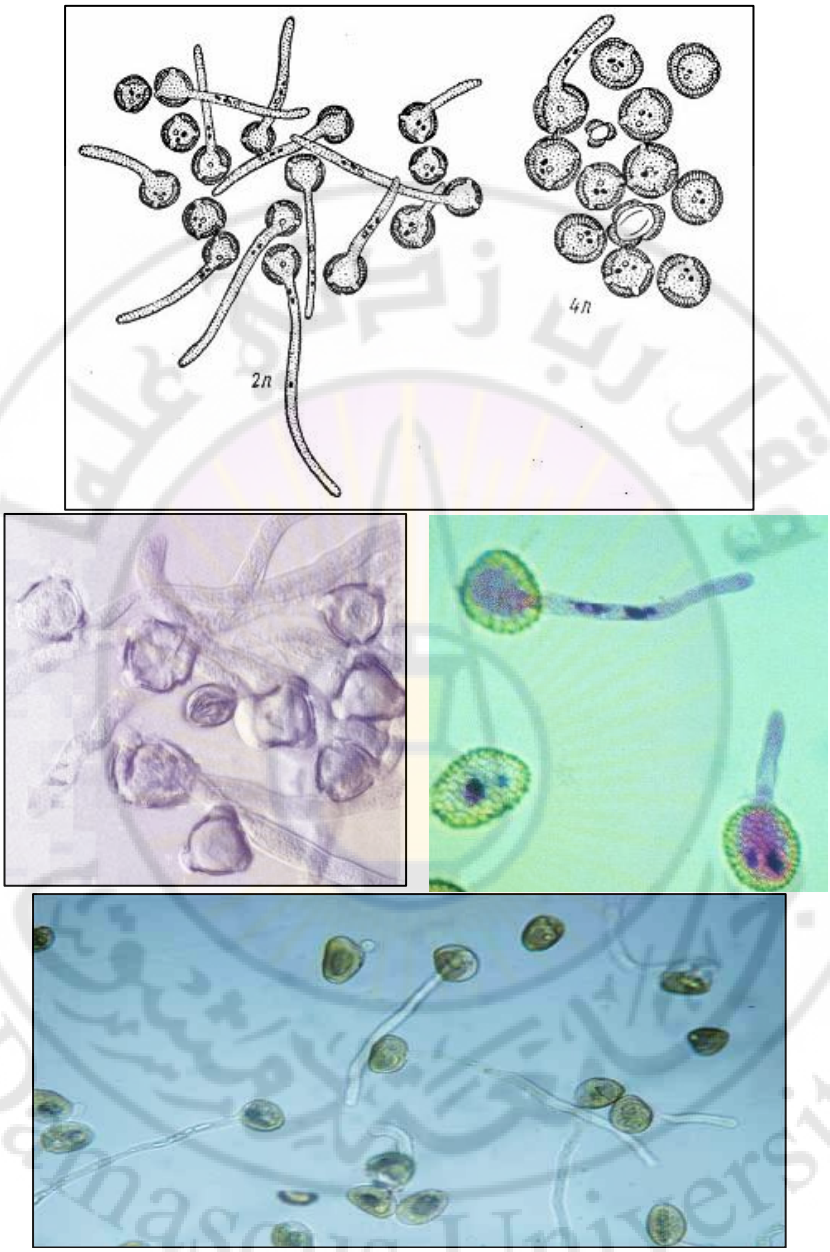


شكل (٩٤) حبة طلع عقيمة (يمين) وخصبة (يسار) بطريقة الهيماتوكسيلين ولهما الحجم نفسه لاحظ وجود نطفتين واضحتين في الحبة الخصبة ووجود النواة الاعاشية فقط في الحبة العقيمة.

وفيما يأتي نتعرف على بعض **طرائق زراعة حبوب الطلع على أوساط صُنعية:**

١) الزراعة على وسط ترانكوفسكي:

يتكون وسط ترانكوفسكي من محلول الآغار آغار السكري١% ، ويُستعمل بشكل واسع لتحديد القدرة الإنتاشية لحبوب الطلع بزراعتها عليه. وهو يعادل ذاك الوسط الموجود على أسطح مياسم الأزهار، حيث تنتش حبات الطلع. ويُشترط حدوث الإنتاش وجود الرطوبة المناسبة والحرارة الثابتة. ويفضل زراعة حبوب طلع الأجناس الآتية: الجودار و البازلاء والفول و اللوبياء و البطاطا و البندورة والبصل والتبغ وغيرها من النباتات (شكل ٩٥).



شكل (٩٥) في الأعلى: مخطط يوضح إنتاش حبات طلع الحنطة السوداء (2n) و (4n) مغذية حسب ترانكوفسكي ، في الأسفل: صور مجهرية توضح إنتاش حبوب الطلع.

تحضير وسط ترانكوفسكي:

يوضع ١ غ من الآغار آغار الجاف أو المسحوق في حوجلة زجاجية تحوي ٥٠ مل ماء مقطر، ويُترك عدة ساعات في المحم بدرجة ٤٠-٦٠حتى الانتفاخ. وفي الوقت نفسه يحضر محلول السكر بإذابة ١٠-١٥غ سكروز في ٥٠ مل ماء مقطر. بعد ذلك يتم مزج محلول الآغار والسكر في وعاء واحد ويترك في حمام مائي حتى الغليان.

ويفضل في بعض الحالات إضافة محاليل خفيفة من برمنغنات البوتاسيوم أو بروم البوتاسيوم لتنشيط إنتاش حبوب طلع في بعض النباتات. وأخيراً يوضع الوسط المغذي في وعاء زجاجي نظيف ضمن ماء ساخن ويجهز بغطاء ينفذ من خلاله قضيب زجاجي.

طريقة العمل:

لزراعة حب الطلع في الوسط المغذي تُؤخذ شريحة زجاجية نظيفة ويمرر عليها شريحة أخرى حاملة الوسط المغذي حتى تتشكل طبقة متجانسة من محلول الآغار السكري. ثم ينثر عليها حب طلع من مئبر ناضج ويوضع في وسط رطب وفي المحم بدرجة ٢٠-٢٥؛ ولتوفير الوسط الرطب توضع ورقتا ترشيح مبللتان بالماء على الوجه الداخلي لغطاء علبة بتري، ثم تترك الشريحة مع حب الطلع المزروع عليها داخل هذه العلبة طوال فترة الدراسة.

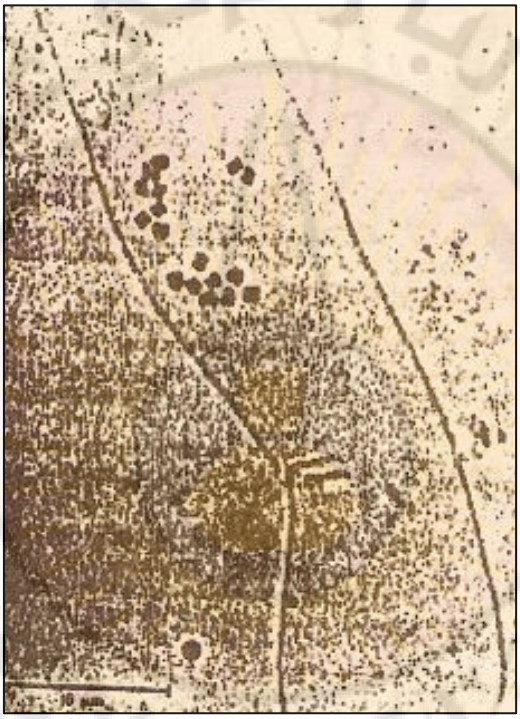
وبعد مرور ٣٠-٦٠ دقيقة يُدرس المحضر تحت المجهر شريطة أن تصل الأنابيب الطلعية إلى أطوال مقبولة نسبياً، ثم ترسم ظاهرة الإنتاش بالتكبيرين الضعيف والقوي.

وإذا أردنا الاحتفاظ ببعض المحضرات نلجأ إلى الطريقة الآتية:

يثبت المحضر بمحلول (١:٣) لمدة ٢٠-٦٠ دقيقة، ثم يُغسل بالكحول الإيتيلي ٧٠% ، ثم في الماء، بعد ذلك تُجرى عليه عمليات التلوين بالهيماتوكسيلين حسب

طريقة (ديلفيد Delphyld). وبعد جفاف المحضر يثبت في بلسم كندا بالطريقة المعروفة.

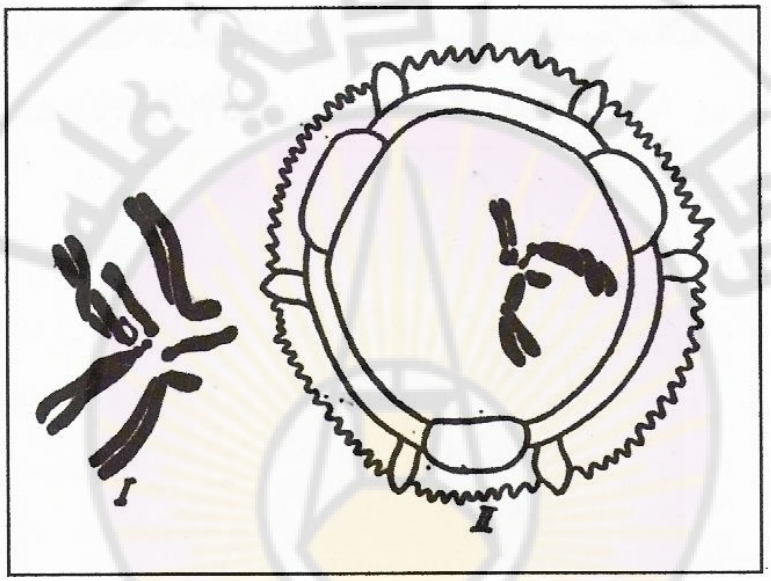
يلجأ بعض الباحثين إلى إضافة مادة الكولشيسين تركيز ٠,٠٥% إلى الوسط المغذي لإجراء بعض الدراسات الخاصة على حب الطلع ولتجميع خلايا الطور الثاني خلال دراسة الانقسام الجاري في الأنابيب الطلعية (شكل٩٦).



شكل (٩٦) صبغيات شديدة التلولب بفضل الكولشيسين وهي متضاعفة العدد في طور الثاني لعدم هجرتها إلى الطور الثالث وذلك أثناء الانقسام الخيطي الذي طرأ على النواة التوالدية لإعطاء نطفتين في حبات طلع التفاح *Malus* (تُلاحظ مجموعتين في كلٍ منها n = 8).

ترجع أهمية حب الطلع كونها تملك طاقماً إفرادياً من الصبغيات، الأمر الذي يجعل دراسة الصبغيات فيها من الأمور المهمة جداً (شكل٩٧)، لذلك يلجأ الباحثون إلى إيجاد الطرائق المناسبة للحصول على لوحات استوائية تمثل الطور

الثاني Metaphase في حبات الطلع 1n وذلك بعد إجراء عمليات تكثيف للصبغيات كما في الطريقة الآتية المطبقة على القمح الطري *Tritcum aestivum*.



الشكل(٩٧) العدد الصبغي الثنائي (2n) والأحادي (1n) في نبات الكريبيس *Crepiss* capillaries:

I- طور ثاني في خلايا الجذر(2n=6). II - طور ثاني في حبة الطلع (n=3) حسب ليفنسكي.

يتم اختيار زهرة واحدة من سنبلة القمح ثم يستخرج منها مئبر ويوضع على شريحة بوجود نقطة من الكارمن الخلي الحديدي، ثم تستخرج الأبواغ الدقيقة ويتم البحث عن حبات طلع فيها نواة أو نواتان من عدة اختيارات. بعد ذلك تعالج الحبات المماثلة الحية بألفا- بروم نفتالين لمدة ١٦ ساعة بالدرجة (٥٥°) وتثبت بـ١:٣ لمدة ٢٤-٧٢ ساعة بحرارة الغرفة، ثم تحفظ بالكحول تركيز ٧٠% . تجرى

عليها عمليات الحلمهة بـ HCL نظامي بالدرجة ٦٠° خلال ١٢-١٣دقيقة، ثم بمحلول مائي مقطر من إنزيم البكتيناز تركيز ٢% لمدة ٤٥ دقيقة وبجو الغرفة. يتم التلوين بتفاعل فولكن- شيف لمدة ١-٢ ساعة في جو الغرفة، ثم توضع نقطة من الكارمن الخلي على الشريحة المجهرية وتُهرس تحت الساترة وتفحص بالمجهر، ثم يتم البحث عن حبات طلع تحمل الصبغيات المتلولبة من الطور الثاني. (شكل٩٨).

شكل(٩٨) صبغيات الطور الثاني من الانقسام الخيطي الذي طرأ على نواة حبة الطلع لإعطاء نواتين: توالدية وإعاشية في القمح الطري *T. aestivum*(لاحظ النوية والصبغيات المنصفة n=21).

٢) **الزراعة على وسط بروباكر – كواك :**

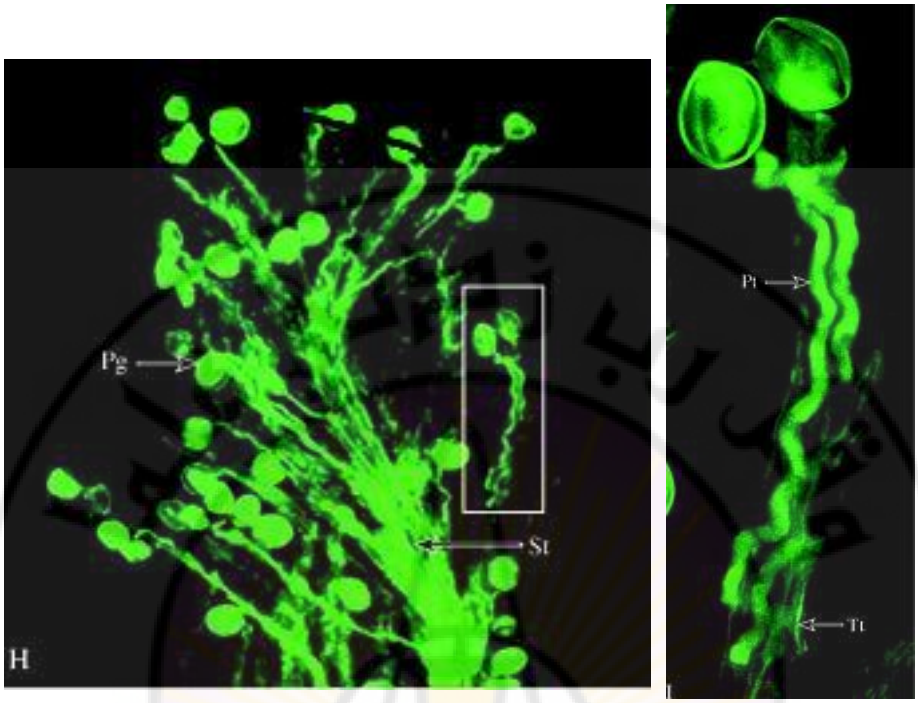
يُعد وسط Brewbaker and Kwack من الأوساط ذات الاستعمال، وهو واسع النطاق في مجال إنتاش حبوب الطلع وأطوال الأنابيب الطلعية ويتكون من المواد الآتية:

- ١٠% سكروز
- ٠,٥ غ حمض البوريك (H_3BO_3)
- ٠,٣ غ نترات الكالسيوم المائية [$Ca(NO_3)_2 . 4H_2O$]
- ٠,٢ غ كبريتات المغنزيوم المائية [$MgSO_4 . 7H_2O$]
- ٠,١ غ نترات البوتاسيوم (KNO_3)
- ١ لتر ماء مقطر

ويضبط مقياس الحموضة (pH) عند الدرجة 7.3

٣) **الزراعة على المياسم:**

إضافة إلى استعمال الأوساط الصنعية للإنتاش، يتم تأبير المياسم الزهرية (المقطوعة من أزهارها والموضوعة بالماء) بحب طلعها، وتطبق هذه الطريقة على النباتات التي تملك مياسم رقيقة وشفافة ريشية مثل القمح والشعير والجودار. وهكذا توضع المياسم على الشريحة وتلون بالكارمن الخلي؛ ويمكن عندها رؤية حبات الطلع وقد أنتشت على هذه المياسم. وحساب قابلية الحياة لديها (شكل٩٩).

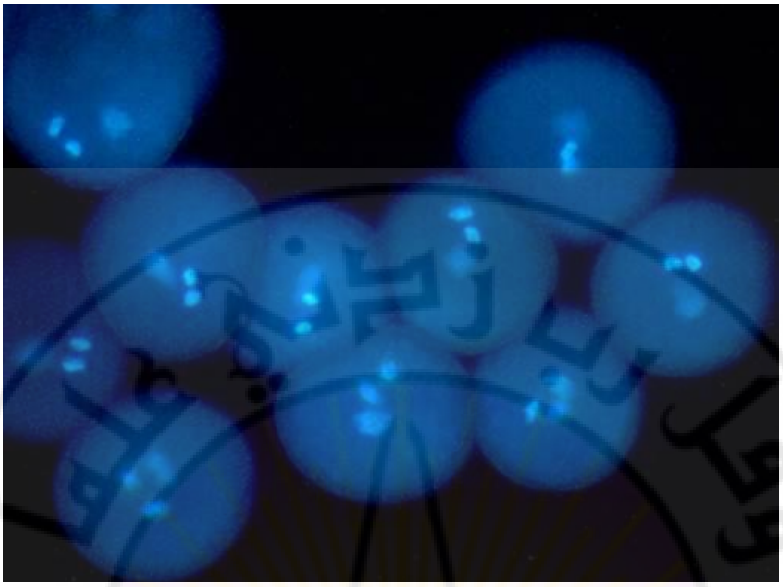


شكل (٩٩) حبوب طلعية لأحد أجناس الفصيلة الكلئية النامية على ميسمه الريشي باستعمال تقنية الفلورة.

ومن الطرائق الحديثة أيضاً في الكشف عن حيوية وخصوبة حبوب الطلع استعمال الفَلورة Fluorescen حسب تقنية (DAPI) 4-6 Di Amino 2- Phenyl Indol (٤- ٦ دي أمينو-٢ فينيل ايندول)، وهي التي تسمح بمشاهدة ثلاث نوى متفلورة في حبة الطلع الخصبة: الإعاشية والنطفتين الناتجتين عن انقسام النواة التوالدية (شكل١٠٠).

المطلوب:

١- طبق طريقة ترانكوفسكي على أحد أجناس الفصيلة الفولية (الفراشية) وهي طازجة، وتابع نتائج إنتاشها، ثم ارسم حبة طلع منتشة بشكل جيد مع توضيح الأنبوب الإلقاحي.



شكل (١٠٠) تقنية الفلورة في إظهار حيوية حبوب الطلع (لاحظ وجود النطفتين والنواة الاعاشية في الحبوب الخصبة).

٢ – ارسم حبات الطلع الخصبة والعقيمة باستعمال طريقة التلوين بالكارمن الخلي لبعض النباتات بالألوان التي تظهر بها، وسجل نتائج عدّها في جدول، ثم احسب نسبة الإخصاب في النوع النباتي الذي تقوم بدراسته في المختبر، وذلك بإحصاء كل من حبوب الطلع الخصبة والعقيمة التي ظهرت في الساحات المجهرية التي درستها.

٣ – استعمل طريقة اليود اليودي للحصول على حبوب طلع خصبة وعقيمة لأحد الأجناس.

٤ – تعرف على طريقة الهيماتوكسيلين وطريقة الفلورة الحديثة في تحديد حيوية حبوب الطلع من خلال الصور وافهم الهدف من كلٍ منهما.

٥ – أجب عن الأسئلة المتعلقة بالصور الموجودة في الأشكال أرقام (٩٦ – ٩٧ – ٩٨).

القسم الثامن

دراسات مندلية

التحليل الوراثي لآليات التوريث

التوضيح النظري:

يتكون النبات من بيضة ملقحة أو لاقحة zygote تحوي عدداً صبغيا مضاعفا وذلك بعد إخصاب البويضة بنواة حبة الطلع في مبيض الزهرة. تحمل خلايا النبات الصيغة الصبغية المضاعفة(2n)، نصفها أتى من البويضة والنصف الآخر من حبة الطلع، وبذلك يتمّ نقل الصفات الوراثية المختلفة من الأبوين إلى الأجيال المتلاحقة.

تدرس آلية نقل هذه الصفات بمساعدة طرائق التحليل الوراثي، والتي يعد مندل أول من أسس لدراسة انتقال المادة الوراثية من جيل إلى آخر منذ عام /١٨٦٥/ بتجاربه الشهيرة على نبات البازلاء *Pisum sativum* التي فتح من خلالها آفاق علمية جديدة لمعرفة قوانين الوراثة .

بعد أن انتهى مندل من اكتشاف قوانينه الخاصة بالهجونات: الأحادية والثنائية والثلاثية والمتعدة، اكتشف العلماء حالات من الهجائن تختلف بنتائجها عن المندلية عُرفت باسم التعديلات الوراثية عن المندلية. وهكذا نجد ظواهر: الأثر المتتام والتفوق والأثر التراكمي والأثر المتعدد للمورثة وغير ذلك.

ستشمل الدراسة بدايةً هذه التجارب ومتابعة النتائج التحليلية والإحصائية لبذور الجيلين الأول والثاني في نبات البازلاء، يليها دراسة التعديلات على النسب المندلية من الجوانب الإحصائية فقط.

التطبيق العملي:

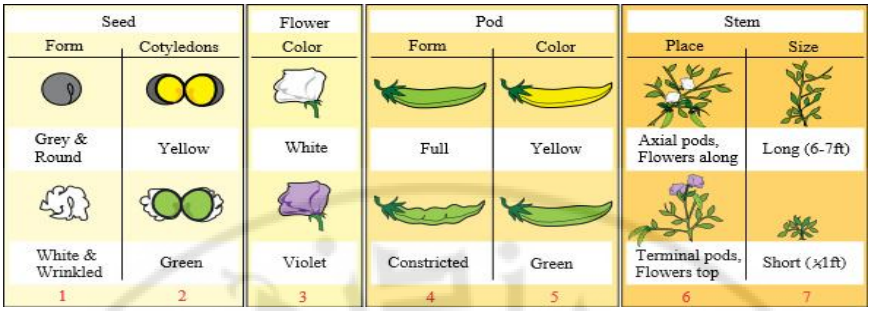
من خلال العمل في حقل البيولوجيا النباتية **من المفترض أن** يُخصص للطلاب حقلا وراثياً يتضمن نباتات لآباء صافية، إضافة إلى نباتات الجيل الأول والجيل الثاني الناتج عن تهجين افراد الجيل الأول ذاتياً. ويتعرف الطلاب من خلال هذه النباتات على الصفات الشكلية للآباء وللأجيال الناتجة عنهما، ومن ثم يتم جمع كمية كبيرة من بذور الجيل الثاني لإجراء الدراسة الإحصائية عليها.

نظراً لعدم توفر مثل هذا الحقل، ولتسهيل تحقيق الدراسات المندلية وتعديلاتها من الناحيتين الإحصائية والوراثية، يمكن اللجوء إلى تحضير عينات خاصة من حبوب الذرة متنوعة ومدروسة جيداً، وتمثل جميع النسب المعروفة في هذا المجال.

أولاً – في الهجونة الأحادية:

١ – العمل الإحصائي:

تابع مندل دراسة توريث سبعة أشفاع من الصفات المتضادة في نباتات البازلاء كل على حدة (الشكل١٠١) وهي: لون فلقات البذرة (اصفر – أخضر)، شكل البذرة (أملس– مجعد)، لون الزهرة (أحمر– أبيض)، طول الساق (طويل– قصير)، لون القرن (أخضر أصفر) ، شكل القرن (أملس – مجعد)، موقع الزهرة (جانبي – قمي). وقد أبدت الصفة الأولى لدى كل شفع – من الأشفاع السبعة – سيطرتها على صِنْوها (أليلها) وانفصل الجيل الثاني بنسبة (١:٣).



الشكل رقم (١٠١) الصفات السبع التي درسها مندل في نبات البازلاء
تمثل الأشكال في السطر العلوي الصفات السائدة، وأشكال السطر السفلي الصفات المتنحية.

يمكن إجراء المتابعة الإحصائية **للمثال الافتراضي** من خلال (الجدول٨) الخاص بنباتات الجيل الثاني والعائدة إلى صفة لون فلقات البذور (صفراء – خضراء):

يبدو القانون، المسجل في الجدول التالي (χ^2) أو كاي سكوير، كمقياس لمطابقة النتائج الحقلية مع النتائج المتوقعة نظرياً وفق نسبة مفترضة (١:٣ في مثالنا) . وهكذا تبدو قيمة مقياس المطابقة كحاصل جمع القيمتين أي:

$$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{Q} = ٠,٢٢٧ + ٠,٠٧٥ = ٠,٣٠٢$$

جدول (٨) النتائج الإحصائية الخاصة بلون فلقات بذور البازلاء الصفراء الخضراء.

المعطيات	البذور الصفراء	البذور الخضراء	المجموع
العدد الحقلي (المشاهد)	١٣١٠	٤٥٠	١٧٦٠
العدد المتوقع نظرياً **Q** حسب النسبة (١:٣)	(١٧٦٠×٣)÷٤= ١٣٢٠	(١٧٦٠×١)÷٤ =٤٤٠	١٧٦٠
الانحراف d Deviation	١٠−	١٠+	صفر
مربع الانحراف d^2	١٠٠	١٠٠	/
$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{Q}$	٠,٠٧٥	٠,٢٢٧	٠,٣٠٢

بعد الحصول على قيمة χ^2 من الجدول (٨) لا بدّ من إجراء تقويم مدى توافق النتائج الحقلية مع النظرية وفق النسبة (١:٣) أي مدى صحة التجربة. وهكذا في أي عمل لا بد من وجود خطأ تجريبي Experimental error، ويتحقق تقويم هذا الخطأ خلال جدول الباحث فيشر Fisher (جدول ١٠) الذي يربط قيم χ^2 مع الاحتمالات وعدد درجات الحرية degrees of freedom (d.f).

يشير السطر العلوي (الأفقي) في جدول فيشر إلى الاحتمالات (من ٠,٠٠٥− ٠,٩٩٥) بينما يشير العمود اليساري إلى عدد درجات الحرية (من ١− ٣٠).

جدول(١٠) جدول فيشر الخاص بالقيم الإحصائية الحرجة التابع لتوزع χ^2 بدرجات حرية مختلفة ولمجال احتمالات محصور بين ٠،٩٩٥ و ٠،٠٠٥

p → / d.f ↓	0.995	0.975	0.9	0.5	0.1	0.05	0.025	0.01	0.005
1	.000	000	0.016	0.455	2.706	3.841	5.024	6.635	7.879
2	0.010	0.051	0.211	1.386	4.605	5.991	7.378	9.210	10.597
3	0.072	0.216	0.584	2.366	6.251	7.815	9.348	11.345	12.838
4	0.207	0.484	1.064	3.357	7.779	9.488	11.143	13.277	14.860
5	0.412	0.831	1.610	4.351	9.236	11.070	12.832	15.086	16.750
6	0.676	1.237	2.204	5.348	10.645	12.592	14.449	16.812	18.548
7	0.989	1.690	2.833	6.346	12.017	14.067	16.013	18.475	20.278
8	1.344	2.180	3.490	7.344	13.362	15.507	17.535	20.090	21.955
9	1.735	2.700	4.168	8.343	14.684	16.919	19.023	21.666	23.589
10	2.156	3.247	4.865	9.342	15.987	18.307	20.483	23.209	25.188
11	2.603	3.816	5.578	10.341	17.275	19.675	21.920	24.725	26.757
12	3.074	4.404	6.304	11.340	18.549	21.026	23.337	26.217	28.300
13	3.565	5.009	7.042	12.340	19.812	22.362	24.736	27.688	29.819
14	4.075	5.629	7.790	13.339	21.064	23.685	26.119	29.141	31.319
15	4.601	6.262	8.547	14.339	22.307	24.996	27.488	30.578	32.801
16	5.142	6.908	9.312	15.338	23.542	26.296	28.845	32.000	34.267
17	5.697	7.564	10.085	16.338	24.769	27.587	30.191	33.409	35.718
18	6.265	8.231	10.865	17.338	25.989	28.869	31.526	34.805	37.156
19	6.844	8.907	11.651	18.338	27.204	30.144	32.852	36.191	38.582
20	7.434	9.591	12.443	19.337	28.412	31.410	34.170	37.566	39.997
21	8.034	10.283	13.240	20.337	29.615	32.670	35.479	38.932	41.401
22	8.643	10.982	14.042	21.337	30.813	33.924	36.781	40.289	42.796
23	9.260	11.688	14.848	22.337	32.007	35.172	38.076	41.638	44.181
24	9.886	12.401	15.659	23.337	33.196	36.415	39.364	42.980	45.558
25	10.520	13.120	16.473	24.337	34.382	37.652	40.646	44.314	46.928
26	11.160	13.844	17.292	25.336	35.563	38.885	41.923	45.642	48.290
27	11.808	14.573	18.114	26.336	36.741	40.113	43.194	46.963	49.645
28	12.461	15.308	18.939	27.336	37.916	41.337	44.461	48.278	50.993
29	13.121	16.047	19.768	28.336	39.088	42.557	45.722	49.588	52.336
30	13.787	16.791	20.599	29.336	40.256	43.773	46.979	50.892	53.672

١ – المناقشة الإحصائية للنتائج:

من (جدول٨) نجد أن العدد الحقلي لبذور البازلاء الصفراء هو (١٣١٠)، وللبذور الخضراء (٤٥٠) بذرة. فإذا اخترنا عدد البذور الخضراء وهو(٤٥٠) بشكل حر وطرحناه من مجموع عدد البذور الحقلية وهو (١٧٦٠)، فإن الناتج يشير إلى البذور الصفراء أي (١٧٦٠–٤٥٠ = ١٣١٠)، بهذا الشكل نكون أمام درجة حرية واحدة أي (d.f = n–١ = 2–1 = ١).

بالرجوع إلى جدول فيشر (جدول١٠)، وبدرجة حرية واحدة، نجد من السطر العلوي أن قيمة χ^2 في مثالنا البالغة (٠,٣٠٢) تقع بين الرقمين (٠,٠١٦–٠,٤٥٥)، أي بين الاحتمالين (٠,٩–٠,٥).

لقد تمّ اعتماد الاحتمال (٠,٠٥) كأساس لقبول أو رفض أي نسبة انفصال مندلية مدروسة، وهي قيمة عشوائية اعتمدها علماء الوراثة لرفض أو قبول قيمةχ^2. وبشكل آخر إذا كانت قيمة χ^2 المحسوبة أكبر من القيم الموجودة في العمود تحت (٠,٠٥)، فالنسبة المدروسة مرفوضة، أما إذا كانت قيمة χ^2 المحسوبة ضمن هذا العمود أو في الأعمدة ذات القيم الأكبر فإن النسبة مقبولة.

بهذا الشكل تكون قيمة χ^2 البالغة (٠,٣٠٢) في مثالنا مقبولة (تقع بين الاحتمالين ٠,٩–٠,٥) وبالتالي الفرضية صحيحة أي أن النسبة (١:٣) تعبر عن انفصال مندلي للهجونة الأحادية.

ملاحظة: يُطلب تسجيل الجملة الآتية: في مثالنا وبالرجوع إلى جدول فيشر عند درجة حرية واحدة نجد أن قيمة χ^2 محصورة بين القيمتين (٠,٠١٦–٠,٤٥٥) وهي توافق الاحتمالين (٠,٩–٠,٥) أي إن العدد الحقلي يتوافق مع العدد المتوقع نظرياً وفق النسبة الانفصالية المُفترضة (١:٣)؛ وتكون قيمة الاحتمال الدقيق عند الرقم (0.555)، ويتم حسابها كالآتي:

χ^2 محصورة بين القيمتين = (0.455 - 0.016)

محصورة بين القيمتين $P = (0.9 - 0.5)$

$$P > 0.5 > 0.9$$

$$P = 0.5 \div 0.9 = 0.555$$

٢ – المناقشة الوراثية:

يتمثل الحل المورثي للنسبة ١:٣ (كهجونة أحادية) بالشكل الآتي:

P الأبوان بذور صفراء x بذور خضراء

AA aa

↓

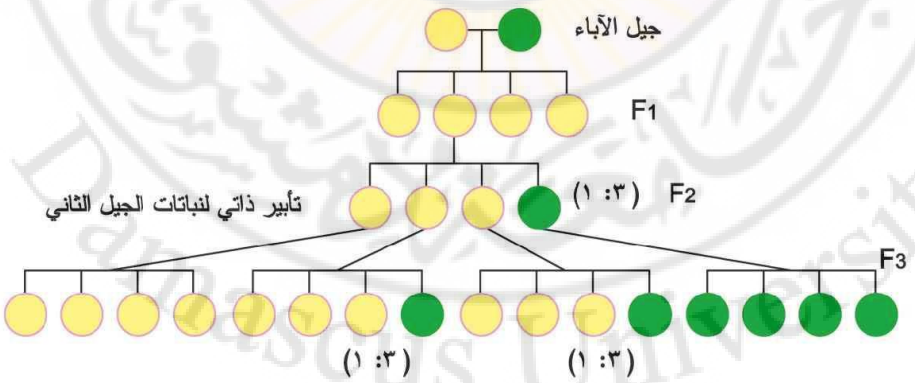
F1 الجيل الأول بذور صفراء Aa

↓

F2 الجيل الثاني 1/4 AA 2/4 Aa 1/4 aa

بذور صفراء بذور خضراء

ويوضح الشكل (102) مخططاً للآباء وللأجيال المتتابعة في الهجونة الأحادية.



الشكل (١٠٢) مخطط يوضح نتائج التهجين بين الأبوين بصفة لون بذور البازلاء وصولاً إلى الجيل الأول فالثاني فالثالث.

وتجدر الإشارة إلى أن النسبة (١:٣) تمثل أيضاً ظاهرة الأثر المتعدد للمورثة الواحدة، حيث يتميز الأبوان بوجود صفتين أو أكثر وتقع هذه الصفات تحت تأثير مورثة واحدة.

ثانياً – في الهجونة الثنائية:

يقصد بالهجونة الثنائية متابعة توريث شفعين من الصفات غير المرتبطة دفعة واحدة بشرط عدم ارتباطهما، وهكذا تتميز أفراد الجيل الأول بظهور الصفتين المسيطرتين في حين يحقق أفراد الجيل الثاني انفصالاً بأربعة أنماط شكلية تتوافق مع النسبة (٩:٣:٣:١).

الجدول رقم (١١) متابعة توريث صفتي لون بذور البازلاء وشكلهما (أصفر – أخضر) (أملس – مجعد) غير المرتبطتين وحساب قيمة χ^2

المعطيات	بذور ملساء صفراء	بذور مجعدة صفراء	بذور ملساء خضراء	بذور مجعدة خضراء	المجموع
العدد الحقلي (المشاهد)	٨٠٧	٢٦٨	٢٧٣	٩٢	١٤٤٠
العدد المتوقع نظرياً Q حسب النسبة (٩:٣:٣:١)	١٤٤٠× ٩ / ١٦ = ٨١٠	١٤٤٠× ٣ / ١٦ = ٢٧٠	١٤٤٠× ٣ / ١٦ = ٢٧٠	١٤٤٠× ١ / ١٦ = ٩٠	١٤٤٠
الانحراف d	−٣	−٢	+٣	+٢	٠
d^2	٩	٤	٩	٤	–
d^2/Q	٠,٠١١	٠,٠١٤	٠,٠٣٣	٠,٠٤٤	٠,١٠٢

ويمكن عملياً متابعة توريث صفتي اللون والشكل في البازلاء من خلال الجدول الافتراضي السابق (جدول ١١).

$$\chi^2 = \sum \frac{d^2}{Q} = \text{ومنه } ٠،١٠٢$$

١ – المناقشة الإحصائية للنتائج:

بالرجوع إلى جدول فيشر وبوجود ثلاث درجات حرية (3 =1- 4) نجد أن أن قيمة χ^2 البالغة (٠,١٠٢) تقع عند السطر بين القيمتين (٠,٢١ –٠,٠٧٢) أي بين الاحتمالين (٠,٩٩٥– ٠,٩٧٥) وهذا يقيني ومقبول ضمن الشروط المندلية، وبالتالي فإن العدد الحقلي في تجربتنا يتوافق مع التوقع النظري وذلك حسب النسبة المفترضة (١:٣:٣:٩) ولحساب الاحتمال الحقيقي نجد الآتي:

χ^2 = (0.216-0.072) محصورة بين القيمتين

P = (0.995- 0.975) محصورة بين القيمتين

P > 0.975 > 0.995

P = 0.975 ÷0.995 = 0.9799

٢ – المناقشة الوراثية:

يتمثل الحل المورثي للنسبة ١:٣:٣:٩ (كهجونة ثنائية) بالشكل الآتي:

بذور صفراء ملساء x بذور خضراء مجعدة

P الأبوان aabb ↓ AABB

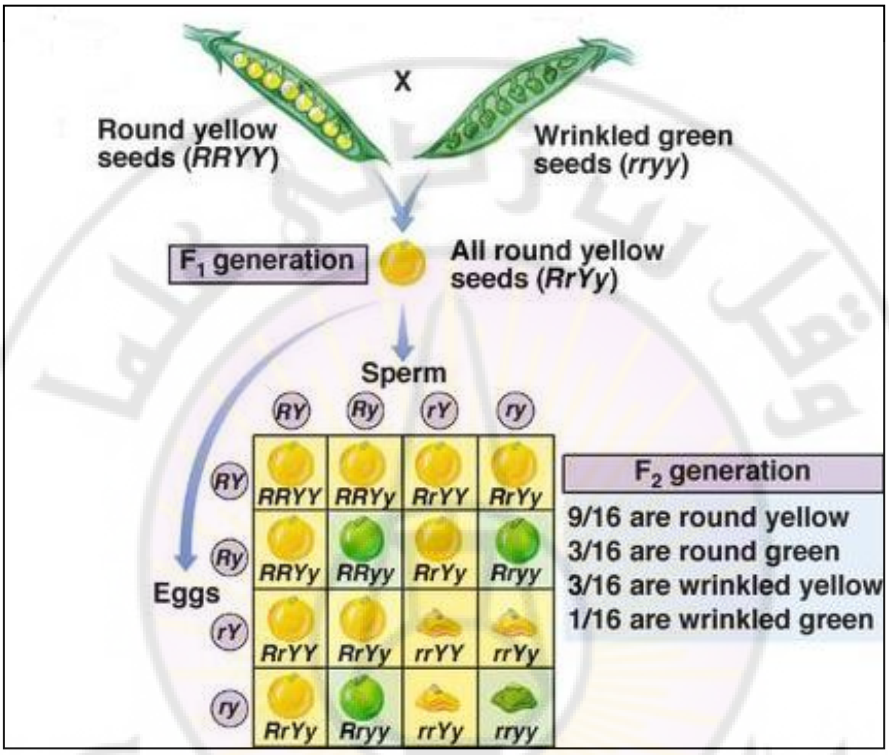
بذور صفراء ملساء

F1 الجيل الأول AaBb

↓

بذور ملساء صفراء	بذور ملساء خضراء	بذور مجعدة صفراء	بذور مجعدة خضراء
F2 9/16 A-B-	3/16 A-bb	3/16 B-aa	1/16 aabb

ويمثل (الشكل١٠٣) مخططاً يوضح التوريث في الهجونة الثنائية.



الشكل (١٠٣) الهجونة الثنائية: الأبوان، والجيل الأول، والجيل الثاني ضمن شبكة مربعات بينيت (رمز مورثة اللون الأصفر الأخضر Y, y ومورثة الشكل الأملس المجعد R, r).

ثالثاً – التعديلات على النسب المندلية:

تنحصر التعديلات على النسب الوراثية بمجموعة من الحالات التي لم يتعرض لها مندل وتتناول الآتي:

الأثر المتتام تتضمن أربع نسب وراثية وهي:

- (٧:٩) ،(١:٣:٣:٩) ، (٤:٣:٩)، (١:٦:٩).
- التفوق المسيطر تتضمن نسبتان وهما: (١:٣:١٢)، (٣:١٣).
- الأثر المتعدد للمورثة الواحدة تتضمن نسبة واحدة هي: (١:٣).

- نمط السيطرة غير الكاملة أو لارجحان تتضمن نسبتان هما: (١:٢:١)، (٣:٦:٣:١:٢:١).
- الأثر التراكمي أو الوراثة الكمية تتضمن ثلاث نسب هي: (١:١٥)، (١:٤:٦:٤:١)، (١:٦:١٥:٢٠:١٥:٦:١).
- الهجونة الاختبارية أو التحليلية تتضمن نسبتين هما: (١:١)، (١:١:١:١).

وفيما يأتي نتابع الدراسة الإحصائية والوراثية لبعض النسب المذكورة أعلاه:

١- النسبة (٩:٣:٤):

تمثل هذه النسبة ظاهرة الأثر المتتام، حيث تعمل مورثتان على إظهار صفة جديدة غير موجودة في الأبوين الداخلين في التهجين؛ ويمكن عدّها تفوقاً متنحياً مفرداً. وفيما يأتي نتابع هذا التوريث من خلال المثال الافتراضي لألوان حبات الذرة الحمراء والصفراء والبيضاء (جدول ١٢).

جدول (١٢) حساب قيمة χ^2 بوجود النسبة (٩:٣:٤:) في نبات الذرة بمعطيات افتراضية.

المعطيات	حبات حمراء	حبات صفراء	حبات بيضاء	المجموع
العدد الحقلي (المشاهد)	٣٣٨	١٣٤	١٤٣	٦١٥
العدد المتوقع نظرياً Q حسب النسبة (٩:٣:٤)	٩×٦١٥ / ١٦ = ٣٤٥,٩ ≈ ٣٤٦	٣×٦١٥ / ١٦ = ١١٥,٣ ≈ ١١٦	٤×٦١٥ / ١٦ = ١٥٣,٧ ≈ ١٥٣	٦١٥
الانحراف d	٨ −	١٩+	١١ −	٠
d^2	٦٤	٣٦١	١٢١	−
d^2/Q	٠,١٨٤	٣,١١٢	٠,٧٩٠٨	٤,٠٨٦٨

بالرجوع إلى جدول فيشر وعند درجتي حرية (2=1- 3) نجد أن قيمة χ^2 البالغة (4.1) تقع عند السطر الثاني بين الرقمين (١,٣٨٦–٤,٦٠٥)، أي بين الاحتمالين(٠,٥–٠,١) وهذا مقبول ضمن الشروط المندلية أي إن النسبة الانفصالية(٩:٣:٤) هي نسبة انفصال مندلية. نعبر عن المناقشة بالشكل الآتي:

χ^2 = (4.605- 1.386) محصورة بين القيمتين

P = (0.5-0.1= 0.4) محصورة بين القيمتين

P > 0.1 > 0.5

P = 0.1÷0.5 = 0.2

وهي قيمة الاحتمال الحقيقية لهذه النسبة.

وتكون المناقشة الورثية كالآتي: بتهجين نباتين(أبوين) من الذرة بيضاء وصفراء الحبات بدى الجيل الأول أحمر الحبات، وأنفصل الجيل الثاني بنسبة ٩ أحمر: ٣ أصفر : ٤ أبيض.

تُعبر النسبة (٩:٣:٤) عن ظاهرة الأثر المتتام لأن المورثة A (أصفر) تتمم عمل المورثة B (أبيض) لإعطاء صفة جديدة في الجيل الأول وهي الحمراء كما في المخطط الآتي:

حبات بيضاء حبات صفراء

P AAbb x BBaa

حبات حمراء

F1 AaBb

	حبات بيضاء	حبات صفراء	حبات حمراء
F2	1/16 aabb	3/16 B-aa	3/16 A-bb 9/16 A-B-

ومن التفسيرات الأحدث لهذه النسبة هو أن الصنويان المتنحيان aa يتفوقان على المورثة غير الصنوية معهما وهي B في النمط المورثي الأبيض BBaa (أي B > aa) وهذا هو التفوق المتنحى المفرد؛ لأن الصنويين المتنحيين bb لا يتفوقان على المورثة A في النمط المورثي الأصفر AAbb.

٢ – النسبة (٩:٦:١):

يمكن تفسير مثل هذه الظاهرة بأنها الحالة التي تسببها المورثات السائدة خلال وجودها مع بعضها في نمط وراثي أي (A-B-) حيث تؤدي إلى ظهور صفة جديدة بالمقارنة مع عمل كل مورثة بانفراد (A-bb) أو (B-aa) وبذلك فإن أفراد الجيل الأول **تتميز** بظهور صفة جديدة غير موجودة في الأبوين نتيجة اجتماع المورثتين السائدتين (A-B-)، لأن كلاً منهما تتمم عمل الأخرى. إن التفسير الوراثي لأفراد الجيل الثاني بوجود الانفصال غير العادي بالنمط الشكلي ما هو إلا

تحوير للنسبة المندلية (١:٣:٣:٩)، ويمكننا تطبيق ذلك على ألوان حبوب عرانيس الذرة كما في (جدول ١٣).

الجدول (١٣) حساب قيمة χ^2 بوجود النسبة (١:٦:٩) في نبات الذرة بمعطيات افتراضية.

المعطيات	حبوب لونها أحمر	حبوب لونها وردي	حبوب لونها أصفر	المجموع
العدد الحقلي	٤٩٠	٣١٠	٦٠	٨٦٠
العدد المتوقع نظرياً Q حسب النسبة (١:٦:٩)	≈٤٨٣,٧٥ ٤٨٤	٣٢٢≈٣٢٢,٥	٥٤≈٥٣,٧٥	٨٦٠
الانحراف d	٦	١٢-	٦	٠
d^2	٣٦	١٤٤	٣٦	-
d^2/Q	٠,٠٧٤	٠,٤٤٧	٠,٦٦٦	١,١٨٧

لدى الرجوع إلى جدول فيشر بوجود درجتي حرية (2 = 1-3) نجد:

χ^2 = (4.605- 1.386) محصورة بين القيمتين

P = (0.5÷0.1= 0.2) محصورة بين القيمتين

$$\mathbf{P > 0.1 > 0.5}$$

$$\mathbf{P = 0.1 \div 0.5 = 2}$$

وهي مقبولة وصحيحة بالنسبة إلى القوانين الإحصائية.

للتفسير المورثي يُعطى لكل من الأبوين اللون الوردي وذلك بنمطين مورثيين مختلفين وهما AAbb , BBaa ويكون الجيل الأول أحمر الحبوب نمطه المورثي

AaBb (لأن المورثة المسيطرة A تتمم عمل المورثة المسيطرة B لإعطاء الصفة الجديدة). وتنفصل أفراد الجيل الثاني وفق الآتي:

(٩: أحمر A-B- + ٦ وردي A-bb و B- aa + ١ أبيض aabb)

٣ – النسبة (٣:١٣):

يمكن تفسير مثل هذه الظاهرة بأنها تفوق سائد للمورثة المسيطرة (I) القامعة Inhibitor، حيث تتفوق على مورثة لون الحبوب (C) Color, ويوضح (جدول ١٤) التطبيق الإحصائي لتوريث ظاهرة التفوق السائد لدى حبوب الذرة وفق النسبة المذكورة:

جدول (١٤) حساب قيمة χ^2 بوجود النسبة (٣:١٣) في نبات الذرة بمعطيات افتراضية.

المعطيات	حبوب ملونة	حبوب بيضاء	المجموع
العدد الحقلي	١٦٧	٤٠	٢٠٧
العدد المتوقع نظرياًQ حسب النسبة (٣:١٣)	١٦٨,١٨≈ ١٦٨	٣٨,٨≈٣٩	٢٠٧
الانحراف d	١–	١+	٠
d^2	١	١	٠
d^2/Q	٠,٠٠٥٩	٠,٠٢٥٦	٠,٠٣١٥

وبالرجوع إلى جدول فيشر بوجود درجتي (1=1-2) نجد:

χ^2 = (0.455- 0.016) محصورة بين القيمتين

P = (0.9 – 0.5) محصورة بين القيمتين

$$P > 0.5 > 0.9$$

$$P = 0.5 \div 0.9 = 0.55$$

وهي مقبولة وصحيحة بالنسبة إلى القوانين الإحصائية.

ويكون التفسير المورثي لهذه النسبة كما يلي:

حبوب بيضاء		حبوب بيضاء
P	IIcc x	CCii

حبوب بيضاء

F1 CcIi

حبوب بيضاء	حبوب ملونة	حبوب بيضاء	حبوب بيضاء
F2 9/16 C-I-	+ 3/16 I-cc	+ 3/16 C-ii	+ 1/16 ccii

– النسبة (١:٤:٦:٤:١):

يمكن تفسير النسبة الانفصالية في هذه الظاهرة بأنها توزع تَدرُجي لأنماط شكلية متشابهة (لون، طول، عدد، نسبة مئوية...الخ)، وفقاً للوراثة الكمية أو التراكمية المرتبطة بالنسبة العامة (١:١٥). وهكذا كلما زاد عدد المورثات المسيطرة زادت شدة الصفة المنوطة بها، وبالتالي تظهر الصفة المتنحية باختفاء جميع المورثات المسيطرة.

ويوضح (جدول١٥) التطبيق الإحصائي لتوريثها لدى حبوب الذرة:

جدول (١٥) حساب قيمة χ^2 بوجود النسبة (١:٤:٦:٤:١) في نبات الذرة بمعطيات افتراضية.

المعطيات	أحمر شديد	أحمر	أحمر وسط	أحمر ضعيف	أبيض	المجموع
العدد الحقلي	١٣	٤٤	٧٠	٤٣	١٠	١٨٠
العدد المتوقع نظرياً Q حسب النسبة (١:٤:٦:٤:١)	١١,٢٥ ≈١١	٤٥	٦٧,٥ ≈٦٨	٤٥	١١,٢٥ ≈١١	١٨٠
الانحراف d	+٢	−١	+٢	−٢	−١	٠
d^2	٤	١	٤	٤	١	
d^2/Q	٠,٣٦٣	٠,٠٢٢	٠,٠٥٨	٠,٠٨٨	٠,٠٩	٠,٦٢١

وعند أربع درجات حرية (4 = 1- 5) نجد:

(1.064 - 0.484) = χ^2 محصورة بين القيمتين

(0.97- 0.9) = P محصورة بين القيمتين

P > 0.9 > 0.97

P = 0.9÷0.97 = 0.92

وهي قيمة مقبولة وصحيحة بالنسبة إلى القوانين الإحصائية.

وللتفسير المورثي تُكتب المورثات بحروف متماثلة وأرقام مختلفة، ولذلك يُسمى هذا النمط من التوريث متماثل الرمز والأثر. وهكذا يكون الأب المسيطر(الحبات الحمراء مثلاً) من الشكل $A_1A_1A_2A_2$ والأب المتنحي (الحبات البيضاء

مـثلاً) مـن الشـكل $a_1a_1a_2a_2$ وبالتـالي يكـون الجيـل الأول (اللـون الأحمـر الوسطي) من الشكل $A_1a_1A_2a_2$. بنـاءً علـى ذلك نسـجل نتـائج الجيل الثـاني الموافقة للنسبة المذكورة وفق (جدول ١٦).

جدول (١٦) توزيع أرقام النسبة (١:٤:٦:٤:١) بما يتوافق مع عدد المورثات المسيطرة في نبات الذرة.

عدد المورثات المسيطرة	٤	٣	٢	١	صفر
نسبة الظهور في F2	١٦/١	١٦/٤	١٦/٦	١٦/٤	١٦/١
لون البذور	أحمر شديد	أحمر	أحمر وسط	أحمر ضعيف	أبيض

ملاحظات عامة:

١- نظراً لعدم إمكانية التعامل مع جزء من البذرة أو الحبة خلال حسابنا للعدد المتوقع نظرياً Q فقد اصطُلح على أنه إذا كان الناتج عدداً كسرياً إلى جانب العدد الصحيح مثل /٤٨٣,٧/ فإننا نلجأ إلى جبر الكسر الأكبر، فإذا تساوت الكسور نجبر العدد المتوقع نظرياً الذي يكون عدده الحقلي أكبر وهكذا.

٢- يمكن إجراء مثل هذه الدراسات الإحصائية لتحديد مدى مطابقة النتائج الحقلية مع النتائج المتوقعة نظرياً على عرانيس الذرة مباشرة (شكل١٠٤). وهكذا ستكون نتائج إحصاء عدد البذور من حيث أشكالها وألوانها على العرانيس مباشرة موافقة للنتائج الواردة في الجداول السابقة.

النسبة الانفصالية ٣ أحمر: ١ أصفر (هجونه أحادية).

النسبة الانفصالية ٩ أحمر أملس:٣ أصفر أملس: ٣ أحمر مجعد: ١ أصفر مجعد (هجونه ثنائية).

النسبة الانفصالية ١ أحمر أملس: ١ أحمر مجعد:١ أصفر أملس:١ أصفر مجعد (هجونة تحليلية بشفعين).

شكل (١٠٤) بعض عرانيس الذرة وهي تحمل حبوب مختلفة الألوان والأشكال وفق النسب المندلية: (٣:١) ، (٩:٣:٣:١) ، (١:١:١:١).

المطلوب:

١- تعرف على اللوحات التي تمثل الهجونة الثنائية في بذور البازلاء وتشكل النسبة (١:٣:٣:٩) انطلاقاً من الاحتمالين العائدين للأبوين.

٢- تعرف على عرانيس الذرة وملاحظة الانفصال الواضح على بذورها.

٣- تابع التجربة المشتركة وسجل وناقش نتائجها وتأكد من صحة النسبة المفترضة في بداية الدراسة. وتابع نتائج حلولها الإحصائية والمورثية.

٤- لتسجل كل مجموعة طلابية نتائج مجموعتها في التجربة المشتركة بجدول جديد وتتأكد من أن العدد الإحصائي القليل يؤدي إلى زيادة الأخطاء الوراثية.

٥- لتدرس كل مجموعة النسب المندلية المجهولة أو تعديلاتها ،والتي يقترحها لهم المدرسون، ومن ثم تفترض النسبة الموافقة لعدد البذور المدروسة، وتسجلها-وتدرسها إحصائيا ثم مورثياً انطلاقاً من أفراد الجيل الثاني فالجيل الأول وصولاً إلى لأبوين.

٦- يطلب من جميع الطلاب التعرف على طرق حل جميع النسب الأخرى لدى جميع المجموعات الطلابية، وتسجيلها حلولها على دفاترهم.

القسم التاسع

الطفرات والمطفرات Mutation and mutagens

أولا- التوضيح النظري:

يمكن تعريف الطفرة Mutation بأنها تغير في تسلسل أو عدد النوكليوتيدات في الدنا DNA مما يؤدي إلى تكوين تسلسلات جديدة من النوكليوتيدات، فتنتقل آثارها بصفات معينة إلى الأبناء؛ ويمكن لأصغر عدد من النوكليوتيدات أن تكون قادرة على انتاج طفرات ظاهرية. وقد تتشكل طفرة ما ناتجة عن تبدل أو نقص أو تكرار نوكليوتيد واحد فقط، وهذه هي الطفرات النُقطية أو المورثية point or gene of mutations. وقد يكون هذا التغير خطيرا يؤدي إلى وقف عمل المورثة من انتتاج إنزيم أو هرمون ما، فيتوقف النشاط أو يزيد هذا التغير من مقدرة المورثة في إنتاج نشاط باتجاه جديد.

تؤدي اغلب الطفرات إلى اختلاف في عدد الصبغيات (طفرات جينومية) أو تغيرات في بنية الصبغي أو ما بين الصبغيات (طفرات بنيوية). ويمكن للطفرات أن تحدث بصورة تلقائية (طوعية) أو بصورة مستحدثة من خلال المُطفرات mutagens مثل الأشعة والمواد الكيميائية وغير ذلك. كما يمكن للتبدلات أن تكون موروثة أو غير موروثة (أو متكيفة)، وهي التي تحصل تحت تأثير الوسط الخارجي حيث تبدو صفات النبات متكيفة مع هذه الأوساط.

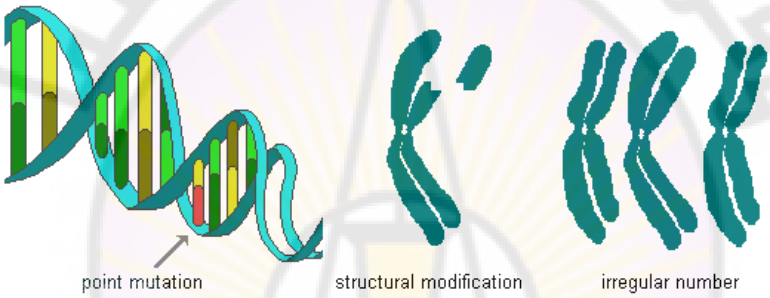
يمكن للتبدل أن يكون تلقائياً (طوعياً)، أو أنه بتأثير مطفرات مختلفة كالأشعة أو المحرضات الكيميائية، وبشكل عام نميز الأنماط الآتية من الطفرات:١- طفرات مورثية، ٢- طفرات الزيوغ الصبغية، ٣- طفرات تبدل الأعداد الصبغية

أوالجينوم Genome (الشكل١٠٥) وقد تتناول الطفرات المكونات السيتوبلاسمية التي قد تلعب دوراً وراثياَ مهماَ.

ترجع أهمية الطفرة بأنها:

أ- تعطي اتحادات جديدة تقوم بإعادة ترتيب التباين الوراثي في تبدلات وتوافقات جديدة .

ب- يحافظ الانتخاب الطبيعي أو الصناعي على التراكيب الأكثر تكيفاً مع الظروف البيئية الموجودة.



طفرة نقطية (مورثية) **طفرة بنيوية (زيوغ صبغية)** **طفرة جينومية (غير منتظمة العدد)**

شكل (١٠٥) مخطط يوضح الأنماط الثلاثة للطفرات: النقطية، البنيوية، العددية أو الجينومية.

وهكذا لولا وجود الطفرة لوُجدت كل المورثات في صورة واحدة، و بالتالي لما وُجدت الصنويات (الأليلات) Alleles و لما كان التحليل الوراثي ممكناً. والأهم من ذلك لولا حدوث الطفرات لما كانت الكائنات قادرة على التطور والتكيف مع التغيرات البيئية. وعلى ذلك تُعد الطفرة ظاهرة مهمه لأن وجودها سيؤدي إلى التغيير الوراثي و يسمح للكائنات بالتكيف مع البيئات الجديدة؛ و في الوقت نفسه قد يؤدي ازدياد معدل الطفور إلى عدم انتظام انتقال المعلومات الوراثية بدقة من جيل إلى آخر.

ملاحظة: يرى معظم الباحثين أن الطفرة الحقيقية True mutation هي تلك التي تتناول تبدلات بنية المورثة حصرا، وما دون ذلك ما هو إلا تبدلات تصيب الصبغيات من حيث عددها وبنيتها.

١- الأشعة والتبدلات البنيوية للصبغيات:

توضيح الدراسة:

تؤثر الأشعة المؤينة على بعض جزيئات الـ DNA وتؤدي إلى تغير في بنيتها الكيميائية؛ وقد تبين أن معدل الطفرات المستحدثة تتناسب طرديا مع الإشعاع. ومن الأشعة التي تؤدي إلى تأيُّن بعض الجزيئات نجد: أشعة الفا وبيتا وغاما. تقاس جرعة الإشعاع بوحدات الراد Rad و رونتجن roentgen.

للأشعة المؤينة تأثير بيولوجي (مباشر أو غير مباشر) على الكائن الحي بشكل عام، وعلى الصبغيات بشكل خاص. ويقصد بالفعل المباشر الضرر الذي يلحق بالجزيئات المهمة بيولوجيا في الخلية الحية والتي تتأين مباشرة أو تصبح بحالة متهيجة وقد تؤدي إلى تلف جزيئات الدنا. وتظهر هذه التبدلات على البنية الصبغية بشكل انقطاعات أو انكسارات breakage تترك النهايات المقطوعة بحالة لزجة أو دبقة Sticky ends تبحث عن نهايات لزجة أخرى لتتحد معها إذا لم تلتئم. ونتيجة لهذه الأشكال الجديدة من الالتحامات المحتملة تتشكل تناسقات صبغية جديدة تُحدد أساس هذا النمط من التبدلات البنيوية أو الزيوغ الصبغية Chromosomal aberration.

وهكذا تنشأ التبدلات البنيوية الصبغية نتيجة لانقطاعات تؤدي إلى تشكيل نهايات لزجة قابلة للالتحام مع أي نهاية لزجة أخرى.

يرتبط نمط التبدل الصبغي حسب المرحلة التي توجد فيها الدارة الانقسامية خلال الانقطاع أثناء تعرضه لأشعة ضعيفة لا تتجاوز ٢٠٠ رونتجن وذلك وفقاً لما يأتي:

أ- قد تؤثر الأشعة على الصبغي أثناء وجوده بمرحلة الخيط المضاعف (أي في المرحلتين S وG_2 من الطور البيني أو في الطورين الأول والثاني من الانقسام). في هذه الحالة نكون أمام احتمالين من الانقطاعات:

- إما أن يحصل الانقطاع في مكان ما من أحد صُبيغيي (كروماتيد) الصبغي وهذا ما يُعرف بالزيغ الكروماتيدي Chromatid aberration.
- أو أن يحصل الانقطاع في مكان ما لكلا صُبيغيي الصبغي وهذا يعرف بالزيغ الإيزوكروماتيدي Isochromatids aberration.

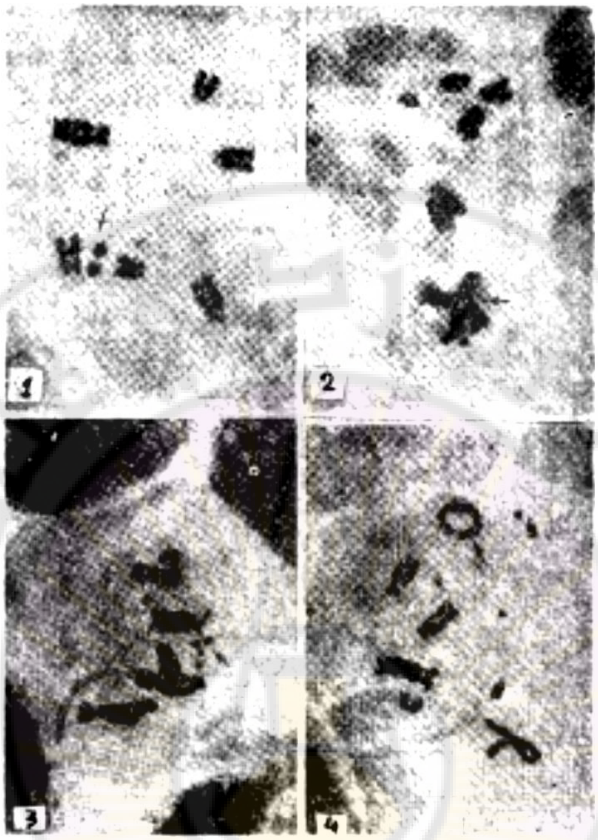
ب- قد تؤثر الأشعة على الصبغي أثناء وجوده بمرحلة الخيط المفرد (أي في المرحلةG_1 من الطور البيني) وهذا ما يُعرف بالزيغ الكروموسومي أو الصبغي Chromosome aberration.

ويلاحظ أنه من الصعب متابعه التبدلات التي تظهر على الصبغيات في مراحل الطور البيني والأول وذلك لعدم وضوح الصبغيات، وكذلك الحال في الطور الثاني لبقاء الأجزاء المقطوعة والمتبدلة من الصبغيات في وسط الخلية؛ بينما من السهل متابعة الزيوغ الصبغية أثناء وجودها في الطورين الثالث والرابع من الانقسام، نتيجةً لهجرة الصبغيات مع تبدلاتها إلى قطبي الخلية المنقسمة.

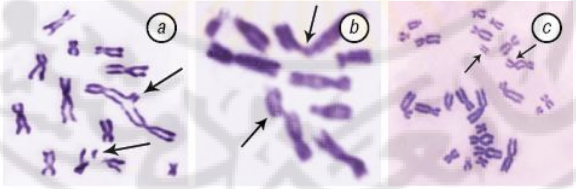
من التبدلات الصبغية ما يحصل داخل الصبغي الواحد مثل النقص، التضاعف، الانقلاب، ومنها ما يحصل بين المجموعات الارتباطية للصبغيات وتتمثل بحالة الانتقال.

تُتابع دراسة التبدلات الصبغية بطريقتين:

- الأولى طريقة التحليل الميتافازي Metaphase analysis أي في الطور الثاني من الانقسام الخيطي (الشكل١٠٦) وهي طريقة دقيقة لكنها تُستعمل في النباتات التي تملك أعداداً صبغية قليلة نظراً لصعوبة متابعتها بوجود الأعداد الكثيرة كونها



أ



ب

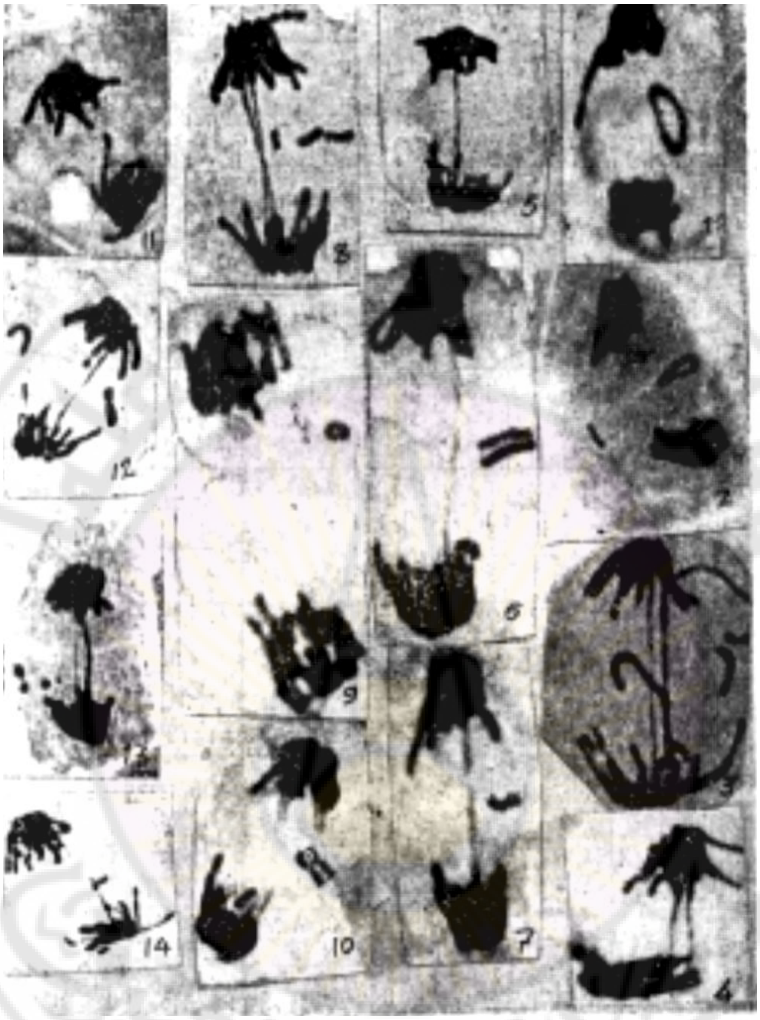
الشكل (١٠٦) نماذج من الزيوغ الصبغية بطريقة التحليل الميتافازي: أ – في نهايات جذور نبات الكريبيس *Crepis* (حسب نيمينسييف) ١ – حلقتان معدومتا الجزيء المركزي (السهم).٢– انتقال صبيغي (كروماتيدي) غير متناظر(لاحظ الشكل الصليبي عند السهم).

٣- كسرات صبغية صغيرة (ميكروفراغمنت) بقياسات مختلفة (عند السهم).٤- حلقة صبغية (كروماتيدية) مع جزيء مركزي ناجمة عن الصبغي. ب - في المرضى الذين يعانون من سرطان بطانة الرحم a) تبادل صُبيغي – صُبيغي وكِسرة مفردة فاقدة للجزيء المركزي. b) كِسرات مفردة ومضاعفة فاقدة للجزيء المركزي. c) صبغي ثنائي الجزيء المركزي (جسر) مع كسرة مضاعفة فاقدة الجزيء المركزي (التلوين بغيمزا).

تتوضع بعضها فوق بعض في اللوحة الاستوائية. ويعد نبات الكريبيس نوع *Crepis capillaris* النبات الأكثر سهولة واستعمالاً في دراسة التبدلات الصبغية بطريقة التحليل الميتافازي، حيث يملك ثلاثة أشفاع من الصبغيات 2n = 6 .

- الثانية طريقة التحليل الأنا- تلوفازي Ana-telophase analysis وتتحقق في الطورين الثالث المتأخر والرابع من الانقسام الخيطي (الشكلين١٠٧ - ١٠٨)، وهي التي تحظى باهتمام الباحثين، وستشكل محور دراستنا الرئيس.

من النباتات الجيدة لدراسة الزيوغ الصبغية بهذه الطريقة نجد البذور المنتشة للبصل والفول والشعير... وغيرها وذلك بعد معالجتها بأشعة غاما أو أشعة X أو بعض المطفرات الكيميائية. إن أكثر الزيوغ الصبغية مصادفة هي الكسرات Frgments والجسور Bridges (صبغيات ثنائية الجزيء المركزي) بجميع أنواعها.



الشكل (١٠٧): نماذج من الزيوغ الصبغية بطريقة التحليل الأنا – تلوفازي:

صور فوتوغرافية لتبدلات في نهايات جذور الفول *Vicia faba* بتأثير الأشعة لدى تعريضها لأشعة (X) بالجرعة ٢٠٠ رونتجن وقد جرى تثبيتها بعد مرور (٢٠) ساعة من التشعيع، ثم تلوينها باللاكموید (من دراستنا): ١- حلقة كروموسومية. ٢- حلقة مع كسرة. ٣- جسر مضاعف مع ثلاث كِسرات. ٤- جسران مفردان. ٥- جسر مفرد. ٦- جسر مفرد مع كسرة مزدوجة. ٧- جسر مفرد مع كسرة مفردة. ٨- جسر مضاعف مع ايزوميكروفراغمت وكسرات أخرى. ٩- حلقة ناعمة. ١٠- كسرة مزدوجة. ١١- فراغمنت أحادي. ١٢- جسر وصبغي وكسرة. ١٣- جسر مضاعف وميكروفراغمنت. ١٤- جسر وكسرة.

شكل(١٠٨) صور فوتوغرافية لتبدلات في نهايات جذور البصل *Allium cepa* بتأثير عامل مُطفِر: ١- س – ميتافاز ٢- طور ثاني مع صبغي حلقي ٣- طور ثالث مع جسر صبغي ٤- طور ثالث متأخر مع صبغي متلكئ ٥- ٦- طور رابع مع جسرين مفردين ونوى صغيرة وكسرة ٧- طور رابع مع جسرين مفردين وصبغي متلكئ.

ثانياً – التوضيح العملي:

١- تجهيز محضرات التحليل الميتافازي:

للحصول على محضرات التحليل الميتافازي في نهايات جذور نبات الكريبس *Crepis capillaris* تتبع الخطوات الآتية:

أ- تترك البذور في الماء مدة (٢٤) ساعة ثم توزع في علب بتري.

ب- توضع البذور مع جذورها وهي بطول (١) مم على ورقة ترشيح ثم تعرض للمصادر الإشعاعية بجرعات (٢٠٠-٣٠٠) رونتجن.

جـ- توضع البذور مع جذورها بعد مرور (٤) ساعات من بداية التعرض للأشعة في المحلول المائي للكولشيسين (٠,١%) وتترك فيه لمدة ساعتين.

د- تتثبت الجذور في مثبت (١:٣) وتحفظ في الكحول ٧٠% لحين دراستها.

هـ- تلون الجذور بالكارمن الخلي٢% مع الغليان في حمام مائي لمدة (١٠) دقائق، ثم تنقل إلى حمض الخل٤٥% لمدة (٥) دقائق.

و- تهرس نهايات الجذور بوجود نقطة من حمض الخل ٤٥% وتدرس بالمجهر الضوئي.

٢- تجهيز محضرات التحليل الأنا – تلوفازي:

للحصول على محضرات التحليل الأنا – تلوفازي في نهايات جذور البصل أو الفول تتبع الخطوات الآتية:

أ – يوضع الجزء السفلي للبصلة في الماء ضمن وعاء خاص لمدة ٢-٣ يوم، حيث تبدأ الجذور بالظهور. (إذا اردنا الحصول على جذور الفول نقوم بنقع البذور في الماء لمدة ٢٤ ساعة، ثم تزرع في أطباق بتري مع ورق ترشيح مرطب بالماء وتوضع في المحم بالدرجة ٢٤ لحين إنتاشها).

ب- تُعرَّض البذور المنتشة إلى أشعة غاما (أو أشعة X) بجرعة ١٠٠ – ٢٠٠ رونتجن، وتثبت بعد مرور (١٠-٢٠) ساعة من المعالجة في (١:٣) .

ج- تصنع محضرات هرس بعد تلوينها بشكل مناسب وتدرس الزيوغ الصبغية بالمجهر.

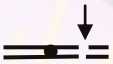
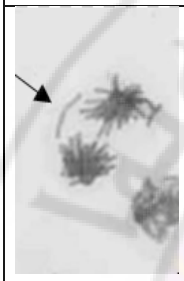
٣ – توضيح احتمالات تشكل الزيوغ الصبغية:

تُدرس الزيوغ الصبغية بطريقة التحليل الأنا – تلوفازي في الطورين الثالث والرابع. ونظرا لأن الانقطاعات الصبغية تحققت في أطوار ومراحل تسبق هذين الطورين فإن تفسير تشكلها وتوضيح ماهية التبدلات التي حدثت قبل وصولها إلى الطورين المذكورين يرتبط بنمط الانقطاع: هل تحققت الضربة في مرحلة الخيط المفرد (تبدل كروموسومي) أو أن الضربة حصلت في مرحلة الخيط المضاعف (تبدل كروماتيدي). ويوضح ا(لجدول١٧) احتمالات تشكل أهم أنماط الزيوغ الصبغية واحتمالات تفسيرها.

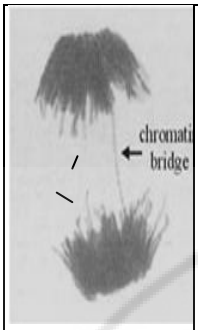
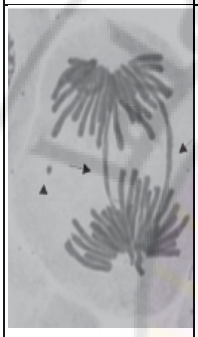
تشير الدراسات العديدة إلى أن تعرض البذور للأشعة يعطي نتائج متفاوتة حسب النبتات المدروسة. بالإضافة إلى ذلك فإن نتائج تعريض البذور الجافة

للأشعة تختلف عن نتائج تعريض الجذور لها. مثلاً توجد خلايا الأجنة في بذور نباتات القمح والبازلاء والفول في جميع مراحل الطور البيني وهي G_2-S-G_1، لذلك يؤدي تعريض بذور هذه النباتات للأشعة إلى ظهور نمطي التبدلات الكروماتيدية والكروموسومية. أما تعريض بذور نبات الكريبس *Crepis capillaris* للأشعة فإنه يؤدي إلى ظهور التبدلات الكروموسومية فقط لوجود خلاياها في مرحلة الخيط الواحد أو المرحلة (G_1). وأخيراً فإن تعريض الجذور النباتية للأشعة غالباً ما يؤدي إلى ظهور تبدلات كروماتيدية لوجود صبغياتها في مرحلة الخيط المضاعف، وذلك بنسبة أكبر مما هي موجودة في مرحلة الخيط المفرد.

جدول رقم (١٧) احتمالات تفسير الزيوغ الصبغية بما يتوافق مع أطوار الدارة الانقسامية والصور الفوتوغرافية لمختلف أنماط الزيوغ.

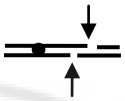
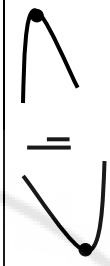
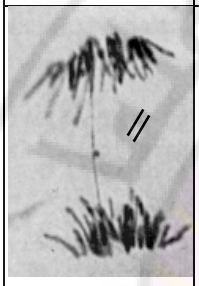
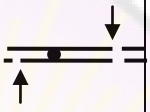
اسم الانقطاع ونمطه	الصبغيات في مختلف أطوار ومراحل الدارة الانقسامية M.C				اسم التبدل	الصورة
	الطور الثالث و الرابع	G_2 S+ + الطور الأول	G_1	رمز التبدل		
انقطاع إيزو كروماتيدي Isochr omatid - break يليه التحام جديد					كسرة Fragme nt صبغية مفردة عديمة الجزيء المركزي	
انقطاع صبغي كروموسومي Chro mosome- break يليه التحام جديد (لم يثبت مجهرياً)						
انقطاع كروماتيدي (كسرة كروماتيدية)						

كسرة مزدوجة ناتجة عن انقطاع ايزو كروماتيدي بدون التحام					كسرة صبغية مزدوجة عديمة الجزيء المركزي	
كسرة مزدوجة ناتجة عن انقطاع كروموسومي بدون التحام						
كسرة كروماتيدية ناتجة عن التحام من انقطاعين على صبغيين مختلفين أو كسرة معقوفة					كسرة منحنية ناتجة عن انقطاعين مختلفين	
جسر مع كسرات مفردة ناجمة عن انقطاعين كروموسوميين على صبغيين مختلفين يليه التحام					جسر صبغي (ثنائي الجزيء المركزي) مع كسرة (كسرات) صبغية مفردة	

جسر مفرد ناجم عن انقطاع على صُبيغيين مختلفين وينجم عن هذا القطع كسرتين مفردتين						
في الصورة جسران مفردان مع كسرات ناعمة كل جسر ناتج عن انقطاع إيزو كروماتيدي يليه التحام					جسر صبغي (ثنائي الجزيء المركزي) مع كسرة مزدوجة	
جسر مفرد مع كسرة مضاعفة ناجم عن انقطاع ايزو كروماتيدي						
جسر مفرد مع كسرة مضاعفة ناتج عن انقطاع كروموسومي						

جسر صبغي مضاعف مع كسرة مضاعفة ناجم عن انقطاعين على صبغيين في مرحلة الخيط المفرد					جسر صبغي مضاعف مع كسرتين مزدوجتين	
جسر صبغي مضاعف مع كسرة مضاعفة ناجم عن انقطاعين على صبغيين في مرحلة الخيط المضاعف						
حلقة كروماتيدية ناتجة عن انقطاعين خارج الجزيء المركزي					حلقة عديمة الجزيء المركزي	

Damascus University

	كسرة مزدوجة غير متساوية					كسرة مزدوجة من انقطاعين غير متساويين في مرحلة الخيط المضاعف
	جسر مفرد مع إيزو فراغمنت وميكرو فراغمنت					جسر مفرد من ضربة إيزو كروماتيدية مع ميكرو فراغمنت من ضربة كروماتيدية
وعند عدم ظهور الكسرات المفردة أو المزدوجة المرافقة للتبدلات كالجسور وغيرها في الطور الثالث من الانقسام نعلم أن هذه الكسرات قد جرفها تيار هجرة الصبغيات معه إلى قطبي الخلية						

٤- حساب نسبة الزيوغ الصبغية لمحضرات التحليل الأنافازي:

يتم في الدراسات الإحصائية والبحثية تحديد العدد الكلي لخلايا الطورين الثالث والرابع حامل الزيوغ الصبغية تحت المجهر وتحديد أنماطها وذلك بحدود (٥) شرائح ولا أقل من١٠-٢٠ ساحة رؤية لكل شريحة، ثم تسجل النتائج في جدول مناسب وتحدد نسبة الزيوغ الصبغية مقارنة مع التجربة الشاهدة وذلك كما في الجدول الافتراضي الآتي (جدول ١٨):

جدول رقم (١٨) تواتر ظهور الأنماط المختلفة من الزيوغ الصبغية لدى المعالجة بالأشعة مقارنة مع الشاهد.

حالة التجربة	عدد الخلايا الحاملة لأنماط الزيوغ الصبغية						مجموع الخلايا الحاملة لأنماط الزيوغ	عدد الخلايا غير الحاملة للزيوغ	المجموع الكلي للخلايا المدروسة	النسبة المئوية % للخلايا الحاملة للزيوغ
	جسور	كسرة مفردة + جسر	كسرة مضاعفة + جسر	كسرة مفردة	كسرة مضاعفة	تبدلات أخرى				
شاهد	٤	صفر	صفر	٢٧	٧	٤	٤٢	٩٥٦	٩٩٨	%٤,٢
معالج بالأشعة	١٢	٢	١	١٤١	٢٥	١٥	١٩٦	١١٠٠	١٢٩٦	١٥,١ %

من الواضح لدى متابعة الأرقام في الجدول المذكور أن الأشعة تزيد بشكل ملحوظ من النسبة العامة للزيوغ الصبغية (١٥،١ % مقابل ٤،٢% للشاهد). والملاحظ أن الكسرات (لاسيما المفردة) تحتل المقام الأول تليها الجسور والتبدلات المتنوعة الأخرى.

ملاحظة: تجدر الإشارة إلى أن حساب النسبة المئوية للخلايا حاملة الزيوغ الصبغية لا يعبّر بدقة عن المقدار الحقيقي للتشوهات. ولذلك يجب حساب النسبة المئوية للأضرار الصبغية على عدّ أن الخلية الواحدة تحمل أحيانا أكثر من إصابة أو ضربة إشعاعية واحدة.

المطفرات الكيميائية و التبدلات الصبغية

١- توضيح الدراسة:

لنجاح طريقة الحصول على الطفرات يمكن اختيار الشروط الأفضل باستعمال المطفرات الكيميائية (نوع المطفر، جرعته، الحالة الوظيفية للعضوية..الخ) ويمكن الحصول، بمساعدة المطفرات الكيميائية، على نماذج مختلفة من الطفرات المفيدة التي تستعمل في مجالات الانتخاب وتحسين الأنواع.

يرمز للنباتات الناتجة عن زراعة البذور المعاجلة كيميائياً التي تمثل الجيل الأول بـ (M_1) ولنباتات الجيل الثاني بـ (M_2)... وهكذا بالنسبة إلى باقي الأجيال.

وتجدر الإشارة إلى أنه لا بد من أخذ الحيطة والحذر الشديدين لدى استعمال بعض المواد الكيميائية الخطرة إما بسبب أبخرتها السامة أو تخريشها للجلد.. ولكي نحصل على نتائج مؤكدة لا بد من معالجة كميات كبيرة من البذور بحيث تعطي في الحقل بما لا يقل عن ١٠٠٠ نبتة.

غالباً ما تكون نباتات الجيل الأول (M_1) شديدة التبدل بالإضافة إلى ارتفاع نسبة العقم فيها، ومع ذلك نصادف بعض النباتات التي تتميز ظاهرياً بصفاتها الطبيعية غير المتبدلة، أما الطفرات القيمة فإنها لا تظهر إلا في نباتات الجيل الثاني (M_2) لأن معظمها من الطفرات المتنحية، ويمكن لسنابل الجيل الأول (M_1) في نباتات القمح والشعير وغيرها من المحاصيل أن تختلف عن بعضها بكثير من الصفات الوراثية، ولذلك فللحصول على بذور الجيل الثاني (M_2) تزرع بذور الجيل الأول منفردة، ثم تزرع بذور الجيل الثاني الناتجة عن النباتات الطافرة منفردة، ويُضبط توارث الصفات المتبدلة في الجيل الثالث (M_3).

يفضل أن يكون عدد بذور الجيل الثاني نحو٤٠٠-٥٠٠ بذرة، وعدد البذور المعالجة بالمادة الكيميائية المرافقة أكثر بمرتين أو ثلاث مرات من العدد المذكور

نظراً لموت كثير من نباتات الجيل الأول (M_1). وتشير الدراسات إلى أن نسبة ظهور الطفرات في النباتات المعالجة بالمواد الكيميائية تختلف باختلاف الصنف النباتي، وإن تساوت شروط التجربة من حيث المادة الكيميائية والتركيز المستعمل.

التوضيح العملي:

١- طريقة تجهيز محضرات الاطفرار الكيميائي ونتائج تأثير المطفرات:

آ- تؤخذ من حبوب الشعير والقمح أفضلها وبما يعادل (٥٠٠) حبة كي تكفي لإجراء ثلاثة اختبارات.

ب- تجهز محاليل المطفر الكيميائي N – نيتروزميتيل- البولة بتركيزين هما (٠,٠١%) و (٠,٠٠٨%).

جـ- توضع مجموعتين من الحبوب في تركيزين من محلول المطفر الكيميائي وتترك المجموعة الثالثة في الماء كتجربة شاهدة.

د- بعد مرور (١٨) ساعة تغسل الحبوب في الماء الجاري ثم تجفف.

هـ- نزرع حبوب جميع الحالات السابقة في الحقل.

و- تسجل النتائج في جدول مناسب يُوضَّح فيه الصنف المدروس و التراكيز المستعملة في التجربة ومدة المعالجة.

يشير(الجدول١٩) إلى أن الأصناف المختلفة من القمح تعطي نسباً مختلفة من الطفرات حتى ضمن التركيز الواحد من المطفر الكيميائي.

نتيجة المعالجة بالمطفرات الكيميائية يمكن أن تتشكل طفرات يخضورية من أشهرها: (البياض Albino) أي فقدان الصانعات الخضراء من الأوراق و Xantha أي الاصطباغ الذهبي للأوراق و Striata، و Macalata حيث تتوضع على الأوراق بقع فاتحة غير يخضورية.

جدول (١٩) نسب ظهور الطفرات المتنحية في M2 عند القمح الطري بعد المعالجة بمطفرين كيميائيين.

أصناف القمح	التأثير بالمحاليل							
	N – نيتروزوايتيل البولة بالتراكيز			ايتيلين أمين بالتراكيز				
	%٠,٠٥	%٠,٠٧	%٠,٠١	%٠,٠٤	%٠,٠٥	%٠,٠٦	%٠,٠٨	%٠,١
أول	٣٩,٦	٣٠,٨	٢٠,٥	١٠,٠	١٢,٥	–	–	–
ثاني	٥٣,٣	–	١١,٠	١٠,٩	٢٢,٩	٢٨,٠	٢٧,٠	١٨,٩
ثالث	٥٠,٠	٤٥,٧	–	–	–	١٠,٤	١٦,٠	٢٤,٩
رابع	٥٦,٢	٢٦,٨	٢٨,٩	١٧,٠	٨,٧	١٤,٥	٣٣,٠	٢٥,٠
خامس	٣٣,٦	٤٨,٤	٧٨,٤	٢١,٨	٢٥,١	٢٦,٩	٣١,٥	١٦,٠
سادس	٢٥,٠٠	–	–	١٦,٠	٢٢,١	١٢,٨	–	–

ومن الطفرات الأخرى نجد: تبدل الصفات المورفولوجية مثل ظهور صفوف كثيرة من الحبوب على السنابل إلى جانب وجود صفين في حبوب الشعير. وفي القمح نلاحظ طفرات تبدل طول السفاة (الحسكات) ولون السنابل وكثافتها وغيرها. ويمكن أن تتناول تبدلات الصفات المتعلقة بالثبات تجاه الإصابة بالأمراض، والإنتاجية، وسرعة تشكل السنابل أو تبدل صفة وزن١٠٠٠ بذرة وغيرها.

يمكن للطفرات اليخضورية أن تشاهد في (M_1) بينما تظهر باقي الطفرات في (M_1) إضافة إلى (M_2)، (M_3) وغيرها.

للحصول على الطفرات في نبات الذرة الصفراء *Zea mays* توضع الحبوب في أكياس من الشاش وتترك لمدة (٢٤) ساعة في محلول الإيتيلين أمين $NH\langle\begin{matrix}CH3\\CH3\end{matrix}$ بتركيز ٠,٥% ثم تغسل بالماء من ١٥–٢٠ دقيقة وتزرع في الحقل مباشرة، وللحصول على الطفرات في نبات البازلاء توضع الحبوب في أكياس من الشاش أيضاً وتترك لمدة (١١–١٢) ساعة في محاليل الإيتيلين أمين حسب التراكيز:

٠,٠١%– ٠,٠٥%– ٠,١٠%– ٠,١٥%– ٠,٢٠%– ٠,٣٠% ثم تغسل بالماء من١٠–١٥ دقيقة وتزرع مباشرة في التربة، ويمكن استعمال مادة دي ايتيل سولفات أو مادة دي ميتيل سولفات بالتراكيز السابقة للحصول على الطفرات الكيميائية.

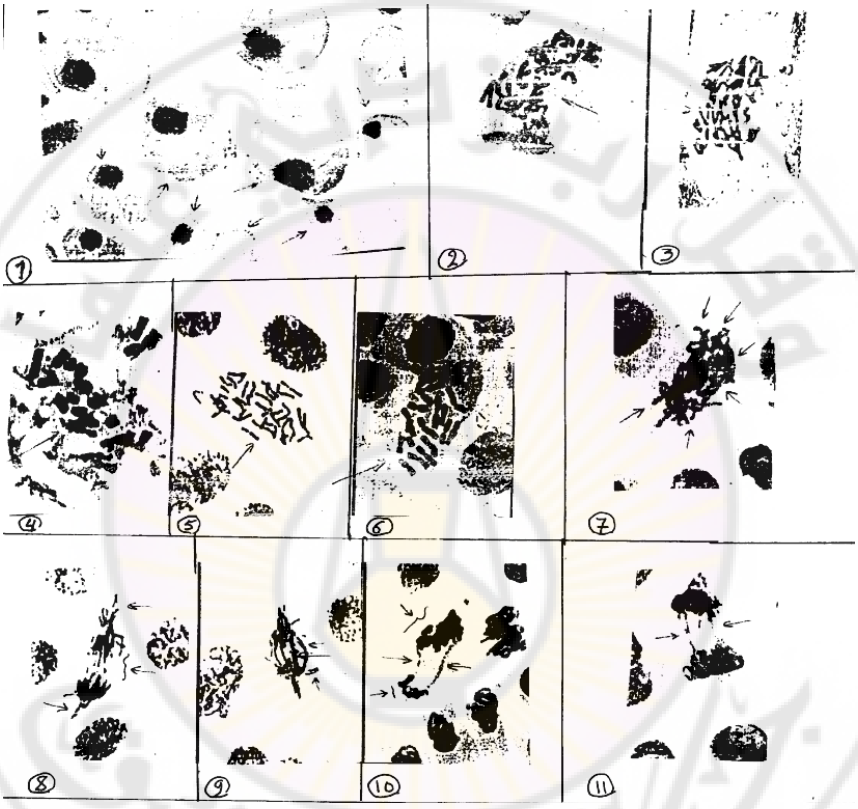
٢– المطفرات الكيميائية وتأثيرها على الانقسام والصبغيات:

لقد أشارت الدراسات التي أجريناها على نهايات جذور البصل لدى معالجتها بتراكيز مختلفة من محلول قطران السجائر (النيكوتين ومشتقات كيميائية سامة أخرى) إلى وجود حالات كثيرة جداً من التشوهات الصبغية إضافة إلى تثبيط الانقسام الخلوي إلى درجة انعدامه كلياً في بعض التراكيز.

وقد تمكنا من تمييز تشوهات في الطور الثاني Metaphas ومنها: تلولب الصبغيات، التحام الصبغيات، تضاعف الصبغيات، وتشوهات في الطورين الثالث والرابع Ana-Telophase ومنها تشوه هجرة الصبغيات، جسور صبغية، كسرات صبغية.

وقد تمكنا من التقاط نسبة عالية جداً من التشوهات الصبغية لدى معالجة الجذور بالقطران تركيز٠,٠٢٥% وتخليصها بالماء لمدة٣ ساعات (اختبار الإنعاش Recovery test) حيث وصلت إلى نسبة ٥٢,٠٣% مقارنة مع الشاهد

التي لم تتجاوز ١,٥٧. وقد تنوعت نماذج هذه التشوهات الصبغية بدرجة كبيرة (الشكل١٠٩).



الشكل (١٠٩) نماذج من التشوهات الصبغية الملاحظة في نهايات جذور البصل وذلك بعد المعالجة بالقطران والتخلص من الماء: ١- عدم تجانس نوى. ٢-٣- فوضى حادة بهجرة الصبغيات إلى القطبين. ٤- تلولب كثيف للصبغيات. ٥- تضاعف الصبغيات (2n=4x=32). ٦- كاريوتيب (2n=16). ٧- ميل لتعدد الأقطاب. ٨-٩- تشوهات وجسور وكسرات. ١٠- جسران مفردان وتوزع غير متساوٍ للصبغيات. ١١- جسران مفردان.

وهكذا نستنتج أن نواتج التدخين تؤدي دور الأثر الإشعاعي في مجال تقطع الصبغيات وإحداث الزيوغ الصبغية فيها وبشكل يثير الانتباه، وتجدر الإشارة إلى وجود مواد كيميائية لها أثر إشعاعي على الصبغيات أيضاً منها: بيروغالول، هيدروكينون، ماء البروم، كوبالت النترات وغيرها.

المطلوب:

١- جهز محضرات هرس لجذور نباتية معرضة مسبقاً لأشعة X أو أشعة غاما وادرسها تحت المجهر.

٢- استخرج من المحضرات السابقة الطورين الثالث والرابع وهي تحمل أنماطاً مختلفة من التشوهات الصبغية (كسرات ، جسور، وحلقات..... ألخ).

٣- ارسم المحضرات العائدة للأشعة والمثبتة تحت المجاهر، ثم سجل جدولاً مناسباً تسجل فيه احتمالات ظهور كل زيغ صبغي على حدة واشرح آلية حدوثه.

٤- تعرف وارسم التشوهات والزيوغ الصبغية الناجمة عن التدخين وذلك من المحضرات واللوحات المناسبة.

القسم العاشر

استعمالات الكولشيسين في إحداث الطفرات وأثر التبريد على الصبغيات

أولاً: استعمالات الكولشيسين في إحداث الطفرات.

١- التوضيح النظري:

يتميز كل نوع نباتي بوجود عدد صبغي ثابت يرمز له (2n)، ويمكن لهذا العدد أن يتبدل خلال الانقسام الخيطي أو الانقسام المنصف نتيجة لمجموعة من الأسباب أهمها انعدام هجرة الصبغيات إلى قطبي الخلية المنقسمة. فمثلاً إذا كان العدد الأساسي للصبغيات في القمح *Triticum* يساوي (٧) صبغيات (X=7) فإن العدد الثنائي 2n=2x=14 والعدد الرباعي 2n=4x=28 والعدد السداسي 2n=6x=42...الخ.

ويمكن تثبيط الانقسام وعرقلة خيوط المغزل بشكل رئيس باستعمال بعض المواد الكيميائية ولاسيما مادة الكولشيسين Colchicine بتراكيز محددة، وهكذا تعالج نهايات الجذور النباتية بهذه المادة لإحداث تعدد الصيغة الصبغية Polyploidy وتطبق في المجالات الزراعية بشكل واسع للحصول على سلالات جديدة وجيدة.

ويستخرج الكولشيسين من نبات الكولشيكوم *Colchicum autumnale* (شكل ١١٠) والمعروف أن المحلول المائي لهذه المادة يسبب تضاعف الأعداد الصبغية حتى بالتراكيز الضعيفة جداً.

ويرجع سبب ذلك إلى تثبيط تشكل خيوط المغزل الانقسامي، وبالتالي عرقلة هجرة الصبغيات إلى القطبين وإذا استمر تأثير الكولشيسين في الخلية فإنه يحدث فيها مضاعفات صبغية متكررة (2n,3n,4n,16n,32n,.....) (شكل١١١) لكن تكدس

الأعداد الصبغية في الخلية بشكل كبير يترافق غالباً بنقصان قدرتها على الحياة وبالتالي موتها المحقق. وقد تمكن الباحثون من الحصول على النباتات المضاعفة في الجودار والشعير والقطن والبطيخ والبطاطا والبرسيم وغيرها وذلك بطرائق متنوعة.

الشكل (١١٠) نبات الكولشيكوم *Colchicum autumnale* الذي تستخرج منه مادة الكولشيسين.

في الأعلى: النبات الكامل. في الأسفل: منظر للزهرة المتفتحة.

٢- طرائق استخدام الكولشيسين:

يستخدم المحلول المائي للكولشيسين بتراكيز تتراوح من (٠,٠١-٠,٠٣%) وذلك لأهداف متنوعة، ويمكن تحديد ثلاث حالات رئيسة وهي:

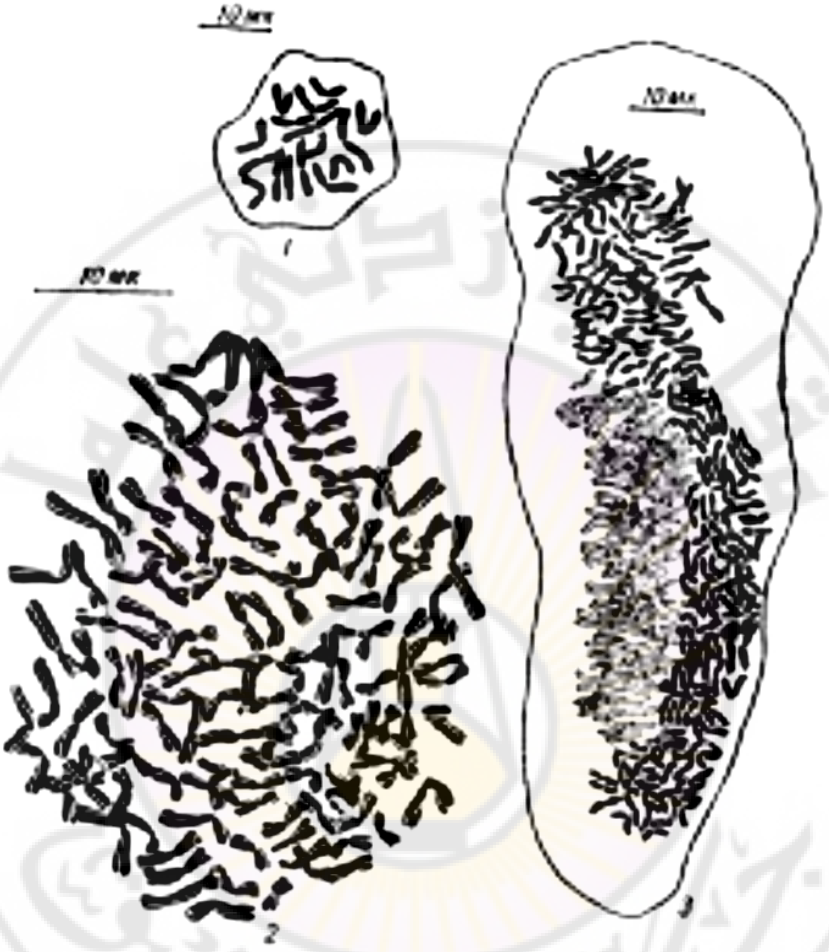
آ- تعالج الجذور النباتية بالمحلول المائي للكولشيسين لمدة (٤) ساعات ثم تثبت فوراً بـ (١:٣) وتحفظ بالكحول٧٥% لحين الدراسة. والهدف من هذه الحالة دراسة العدد الصبغي والكاريوتيب.

ب- تعالج الجذور النباتية بالمحلول المائي للكولشيسين لمدة (١٢- ١٥) ساعة وتثبت فوراً وتحفظ لحين الدراسة. والهدف من هذه الحالة دراسة التضاعف الصبغي لا سيما من النمط 4n ونادراً 8n.

جـ- تعالج الجذور النباتية بالمحول المائي للكولشيسين لمدة (٤٨) ساعة، ثم تترك في الماء لمدة (٢٤-٤٨) ساعة إلى أن تظهر التورمات في نهاياتها بشكل واضح (شكل١١٢). إن الهدف من هذه الحالة متابعة الخلل الكبير في الانقسامات الخلوية.

٣- الدراسة السيتولوجية للأورام الجذرية:

تشير محضرا الهرس المجهزة بالأورام الجذرية بعد تلوينها إلى مصادفة أنماط مختلفة جداً من الخلايا المنقسمة الشاذة وهي أشبه ما تكون بالخلايا السرطانية وهكذا نصادف نسيجاً غير متجانس (كيميرا Chimaera) من الخلايا بعضها كبير الحجم وبعضها صغير الحجم.

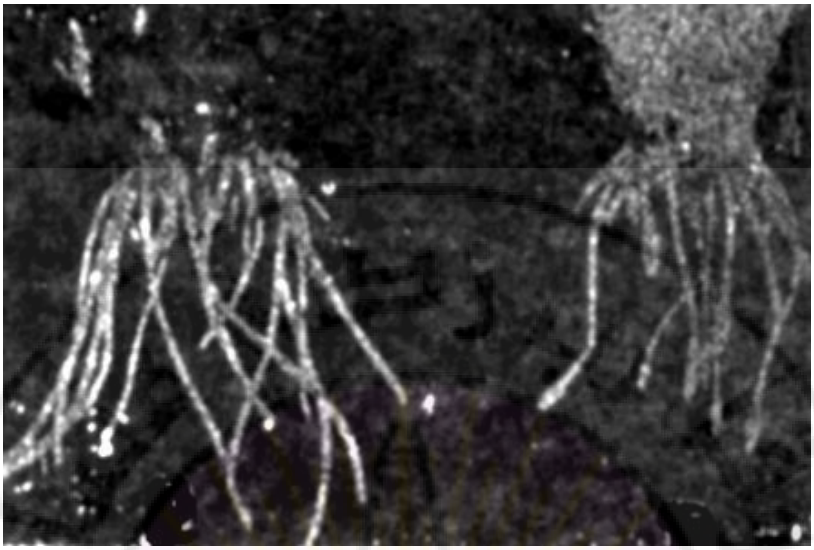


الشكل (١١١) ظاهرة التعدد الصبغي المتكاثر والمتزايد في نهايات جذور البصل *Allium cepa* بتأثير الكولشيسين:

١- خلية عادية (n=16٢).

٢- خلية مضاعفة الصبغيات تحوي (١٢٨) صبغياً (X١٦).

٣- خلية مضاعفة الصبغيات تحوي (٥٠٠) صبغي تقريباً.



الشكل(١١٢) نهايات جذور البصل المعالجة بالكولشيسين للحصول على الأورام: إلى اليمين جذور تحمل أورام في نهايتها، إلى اليسار جذور طبيعية.

وقد تمكنا من خلال دراستنا الخلوية لأورام نهايات جذور الفول أن نتعرف على أشهر الأنماط الخلوية الشاذة والتي نوجزها فيما يأتي (شكل١١٣):

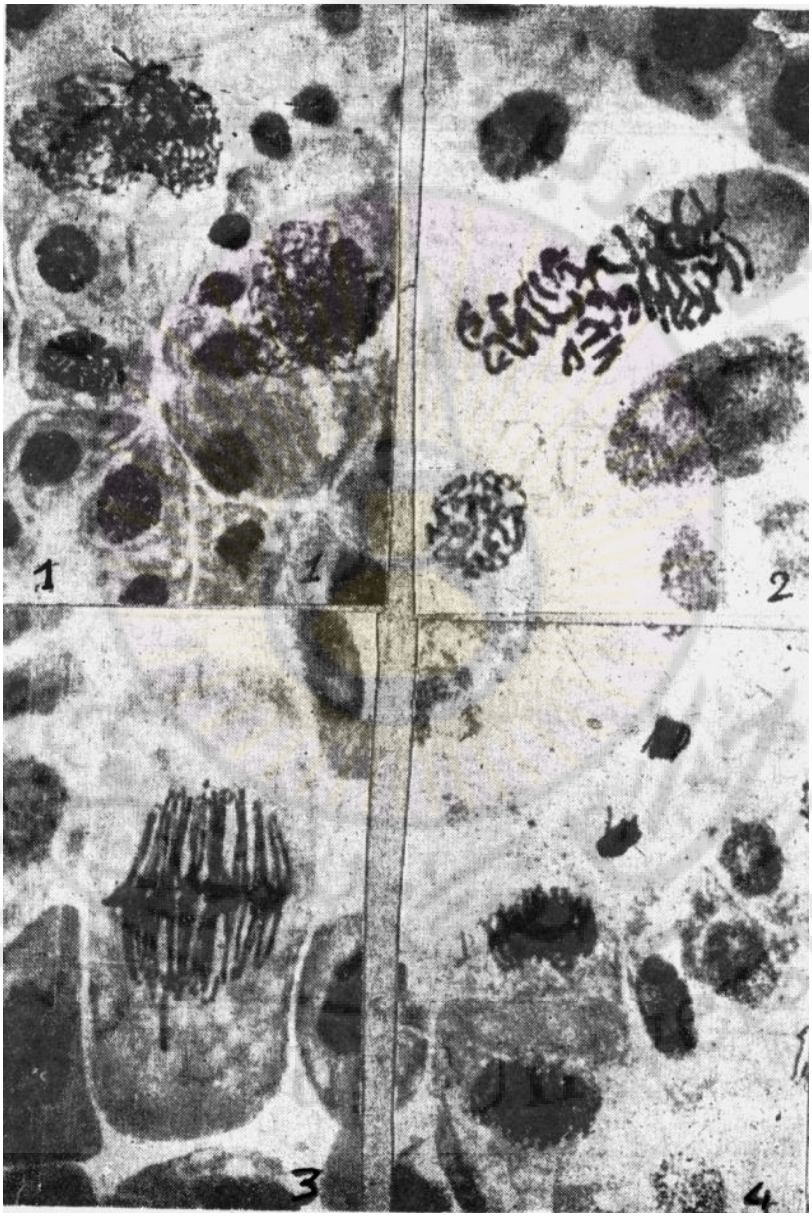
آ- خلايا متضخمة من الطور الثاني Metaphase نتيجة لمضاعفة صبغياتها مرات عديدة قد تصل أحياناً إلى (٦-٨) مرات.

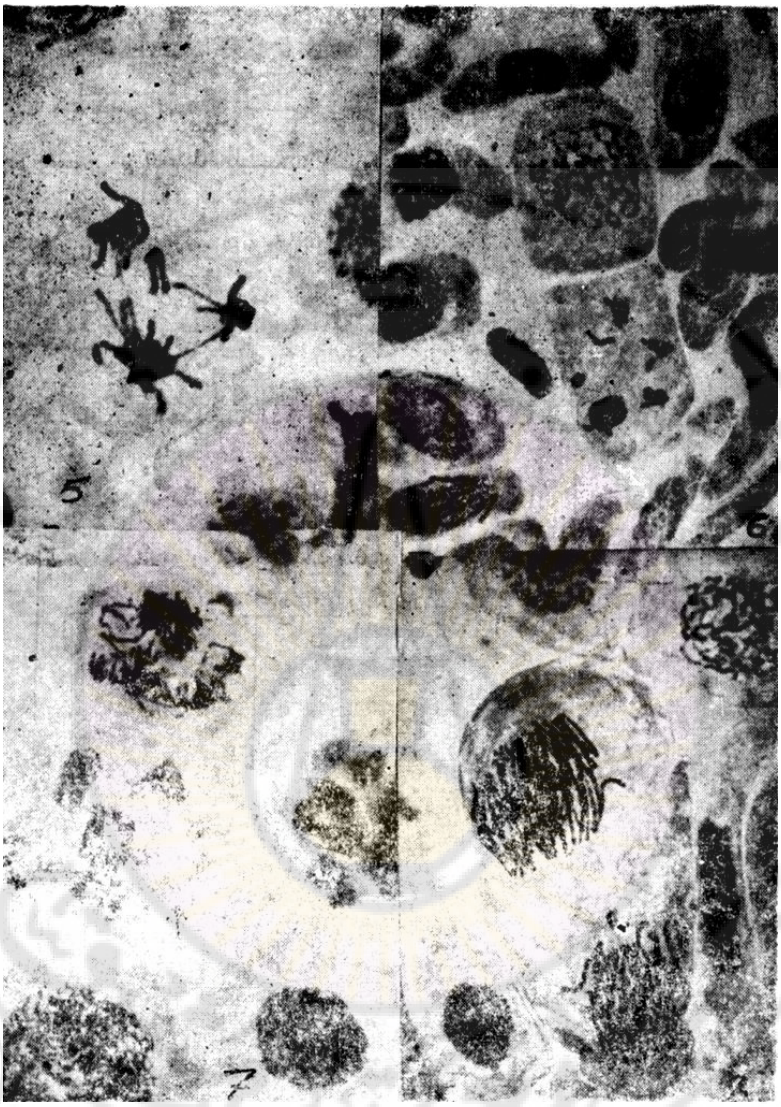
ب- خلايا متضخمة تمثل الطور الأول Prophase المضاعف وتبدو على هيئة خيوط ملتفة وكبيرة.

جـ- خلايا متضخمة تمثل الطورين الرابع Telephase والثالث Anaphase. تتشكل مثل هذه الخلايا نتيجة لعودة خيوط المغزل إلى العمل إثر ترك الجذور بالماء بعد المعالجة، وبذلك يتلقى كل قطب من قطبي الخلية المنقسمة أعداداً مضاعفة من الصبغيات، في هذه الحالة يعود الانقسام إلى حالته الطبيعية التي قد تتوارث خلال الأجيال المتعاقبة.

هـ- خلية واحدة متعددة النوى وكأنها المرحلة النهائية من تعدد القطبية.

و- خلية واحدة فيها انقسامان بآن واحد، كأن نجد مثلاً تجمعين للطور الثالث أو تجمعين للطور الرابع في الخلية الواحدة، وهذا دليل آخر على عدم انتظام خيوط المغزل وعدم تشكل الحاجز الخلوي.





الشكل (١١٣) صور فوتوغرافية توضح نماذج مختلفة من الانقسامات والخلايا الشاذة الملاحظة في أورام نهايات جذور الفول(من دراستنا):

١- طور أول مضاعف(8n) وبجانبه (2n). ٢- طور ثاني مضاعف. ٣- طور ثالث مضاعف. ٤- طور رابع مضاعف وبجانبه رابع (2n). ٥- فوضى في الهجرة (ثلاثة أقطاب).٦- فوضى في الهجرة (تعدد أقطاب). ٧- تعدد نوى حيث يشير السهم. ٨- انقسامان في خلية واحدة.

المطلوب:

١- تعرف على بذور الجودار العادية(2n) والمضاعفة(4n) وارسمها.

٢- تعرف على بذور القمح الثنائية (2n) والرباعية (4n) والسداسية (6n) وارسمها.

٣- ارسم محضرات توضح الصبغيات المضاعفة في البصل (2n=4x=32) (2n=8x=64).

٤- ارسم جذور البصل والقمح المتورمة (لاحظ الكوليوبتيل المتورم).

٥- ارسم جميع حالات الخلايا المنقسمة الشاذة الموجودة في محضرات الأورام.

ثانياً- دراسة أثر التبريد في الصبغيات.

تشير الأبحاث الوراثية والخلوية المرتبطة بسلوك الصبغيات إلى وجود منطقتين متميزتين عن بعضهما: الأولى منطقة الكروماتين الحقيقي Euchromatin قليلة التلولب في الطور البيني، وقليلة التعشق للملونات ونشيطة وراثياً، والثانية منطقة الكروماتين غير المتجانس أو الهيتروكروماتين Heterochromatin التي تبدو شديدة التلولب في الطور البيني وكأنها من صبغيات الطور الثاني وتتلون بشدة وخاملة وراثياً، وبذلك فهي تؤثر في طول الصبغي وأسلوب التشافع والعبور والتحسس تجاه الانقطاع والالتحام وغيرها. وبالمقابل فإن منطقة الكروماتين الحقيقي تتلولب حسب المخطط المعروف للصبغي وقليلة التعشق للملونات وتوصف بأنها نشيطة مورثياً.

إن تبريد جذور بعض الأنواع النباتية يبدل من مورفولوجية الصبغيات بشكل ملموس، وهكذا تبدو الصبغيات قصيرة الأطوال وقابلة لإحصاء عددها. بالإضافة إلى ذلك يلاحظ فيها بعض المناطق التي لا تتلون بالأصبغة المعروفة، أو لا تستجيب لتفاعل فولكن. وقد توصل دارلنكتون Darlington عام ١٩٤٠ إلى نتيجة مهمة، وهي أن مناطق الهيتروكروماتين هي التي تتأثر بالبرودة دون سواها،

وقد تبين له أن هذه المناطق تفتقد بالتبريد جزءاً كبيراً من حموضها النووية Nucleic acids، الأمر الذي يجعلها عديمة الاستجابة للملونات.

كما أشار دارلنكتون إلى قصر هذه المناطق بشدة ولذلك فقد أطلق على هذه الظاهرة اسم (الجوع النيكليوتيدي) حيث يرتبط بإعادة نيكليوتيدات جزيئة الـ DNA في الطور البيني بوجود الشروط غير المناسبة كالتبريد مثلاً (شكل١١٤).

وتعد طريقة التبريد من الطرائق الجيدة المستعملة للتمييز بين مناطق الكروماتين الحقيقي (لا تتأثر) ومناطق الهيتروكروماتين (تتأثر) حيث يصعب التمييز بينهما في الحالة الطبيعية.

طريقة العمل:

تزرع البذور النباتية في علب بتري للحصول على الجذور المناسبة (يفضل نبات الكريبس أو الترليوم – من الزنبقيات) وتوضع بعد إنتاشها في البراد (من صفر – ٥ درجات) لمدة ٤٨ ساعة ثم تثبت وتحفظ في الكحول ٨٠% إلى حين دراستها. بعد ذلك تجهز محضرات الهرس وتدرس باستخدام المجهر ويلاحظ أن صبغيات الخلايا المختلفة وأحياناً صبغيات الخلية الواحدة لا تتأثر بدرجة واحدة، فقد تبين أن ظهور مناطق الهيتروكروماتين يرتبط بشدة مع الوضعية الاستقلابية للخلية ومع عوامل كثيرة داخلية أو خارجية وما زال بعضها مجهولاً حتى الآن.

الشكل (١١٤) صبغيات الزنبق التي تلاحظ في نهايات الجذور المعالجة بالتبريد لمدة أربعة أيام بدرجة الصفر. لاحظ مناطق الهيتروكروماتين عند الشفع (E) حيث انخفض محتوى الـ DNAفيها (جوع نيكليوتيدي). 2n=10 والأشفاع الصبغية هي: (E,D,C,B,A).

A- صورة فوتوغرافية. B- مخطط.

المطلوب:

١- عرض جذور نباتية للتبريد بالدرجة (-٣°) لمدة ٤٨ ساعة، ثم اصنع منها محضر هرس وارسم الصبغيات محدداً مناطق الكروماتين الحقيقي والهيتروكروماتين.

٢- استخدم أحد المطفرات الكيميائية لمعالجة جذور نباتية واصنع منها محضرات هرس مناسبة وادرسها.

القسم الحادي عشر

توريث الصفات الكمية ودراسة الصفات المتكيفة

التبدلات المتكيفة الخاضعة لشروط الوسط الخارجي

التوضيح النظري

من الواضح أن الصفات تقسم إلى قسمين: نوعية، وكمية. مثلاً تُعد صفات لون الأزهار الأحمر والأبيض، وطبيعة حب الطلع الخصب والعقيم، وشكل الثمار، ولون حبات الذرة من الصفات النوعية، بينما يُعبَّر عن الصفات الكمية بتلك التي تتدرج في إظهار الصفة الواحدة فهي تقاس بنسب مئوية وتُدرس من خلال خطوط بيانية مثل تدرج ظهور لون حبوب القمح، وطول الأوراق النباتية، ونسبة الدسم في الحليب، ولون بشرة الإنسان وغير ذلك. ولقد تبين للباحثين أن الصفات الكمية هي أكثر تعرضاً لتبدلات الوسط الخارجي من الصفات النوعية التي نادراً ما تستجيب لتغيرات هذا الوسط. ويُمكن تمييز نمطين من التبدلات الكمية هما:

– التبدلات المتواصلة وهي التي تقاس ولا تُحصى، وتُعطى بأرقام غير صحيحة (أي عشرية) مثل ٢,١، ٢,٢، ٢,٣، ٢,٤ سم، وبذلك لا تترك فيما بينها فواصل ومن هنا جاءت التسمية متواصلة، من أمثلتها قياس أطوال الأوراق، وأطوال السنابل، وأطوال القامة عند الإنسان وغيرها.

– التبدلات المتقطعة وهي التي تُحصى ولا تقاس ويُعبر عنها بأرقام صحيحة وبذلك لا تترك فيما بينها فواصل ومن هنا جاءت التسمية متقطعة، من أمثلتها إحصاء عدد أسنان الأوراق، وإحصاء عدد السُنَيْبلات في سنابل القمح وغيرها مثل ٢٠، ٢١، ٢٢، ٢٣... سناً في الأوراق.

أن كل نبات (أوعَينة) يؤخذ للدراسة يسمي احتمالاً ويرمز له (X)، و بما أن دراسة التبدلات في جميع النباتات الموجودة في منطقة ما مستحيلاً، لذلك يتم

اختيار نماذج محدودة من هذه النباتات وتجرى عليها الطرائق الإحصائية مع استعمال القوانين المناسبة، ومن ثم تعمم النتائج على كامل المجموعة سلباً أو إيجاباً. هذه الطريقة تسمى طريقة الاختيار، ولا بد من أن يكون اختيار (انتقاء) العينات صُدفياً ومتجانساً وبأعداد مقبولة كي تكون النتائج صحيحة وجيدة. ولدراسة التبدلات المتكيفة لا بد من تحقيق الشروط الآتية:

١- يجب أن تكون المادة المدروسة متجانسة مورثياً ومزروعة في شروط واحدة.

٢- يجب أن تتم قياسات الإحصاءات الأولية للعينات بشروط متماثلة.

٣- يجب أن تكون كمية العينات المدروسة كثيرة.

٤- يجب أن يتم اختيار العينات بشكل شامل وصُدفي لجميع النماذج الممكنة والمتوفرة وعدم إهمال أي نموذج.

ولتسهيل العمل تُقسم العينات المأخوذة للدراسة عادة إلى مجموعات أو صفوف محددة، بحيث يتناسب عددها مع مدى التبدل الموجود فيها، وبذلك يُعامل كل صف (مجموعة) على أنه احتمال واحد (كأنه X). من القوانين التي تُدرس لتقييم التبدلات المتكيفة هي: المتوسط الحسابي ($\bar{X}$)، والانحراف المعياري (σ)، ومعامل التبدل (V).

المفهوم الوراثي للمتوسط الحسابي

يُحدِّد المتوسط الحسابي الإظهار الوسطي للصفة المدروسة في مجمل النباتات، ومع ذلك فهو لا يعطي الحقيقة الكامنة في تنوع أو تغير الصفة؛ مثلاً بفرض أن المتوسط الحسابي لعدد السنيبلات في سنابل كل من الصنفين (A) و(B) من القمح هو ($\bar{X}$ =٣٣,٥) سنيبلة، وأن التبدل في الصنف (A) تراوح من ٢٩-٣٩ سُنيبلة أي (تبدل قليل)، بينما تراوح التبدل في الصنف (B) من

(٥-٤٥) أي (تبدل كبير)، فإنَّ قيمة $\bar{X}$ الموحدة وهي (٣٣،٥) لا تُعبر عن التبدل الحقيقي لهذه الصفة. هذا الأمر يدعونا لاستخراج قيمة الانحراف المعياري σ التي تُعبر عن حدود الانحرافات المقبولة للصفة عن المتوسط الحسابي بالزيادة والنقصان (انحراف المتوسط الحسابي). ويُعدُّ هذان المعياران ($\bar{X}$ σ,) من أهم معايير دراسة التبدلات المتكيفة إضافة إلى كونهما يساعدان على استخراج معايير مهمة أخرى مثل معامل التبدل (V).

التطبيق العملي:

أولاً – دراسة التبدلات المتواصلة في مثال أطوال سنابل القمح:

لتحقيق هذا المثال الافتراضي نتبع الخطوات الآتية:

١- تُجمع بشكل عشوائي١٠٠ سنبلة من سنابل القمح المزروع وتقاس أطوالها بدقة ±١ مم مع وضع الكسور العشرية مثال ٣,١- ٣,٢- ٣,٣- ٣,٤ سم ...ثم توضع في جدول خاص دون أي ترتيب لها وهذا هو الجدول الأول (يقوم طلاب كل مجموعة بهذه العملية).

٢- يُسجل أكبر طول X_{max} (الاحتمال الأعظمي)، وأصغر طول X_{min} (الاحتمال الأدنى).

٣- يُستخرج مدى التبدل من حاصل طرح الاحتمال الأدنى من الاحتمال الأعظمي ($X_{max} - X_{min}$).

٤- يتم اقتراح عددٍ من المجموعات يتوافق مع مدى التبدل على أن يؤخذ بالحسبان ما يأتي:

عدد النباتات المدروسة	عدد الصفوف أو المجموعات المقترحة
من ٣٠- ١٠٠ نبات	٦-٨ مجموعات
أكثر من ١٠٠ نبات	٨-١٢ مجموعة

٥- تُحدد قيمة الفاصلة (i) بين مجموعة وأخرى، ثم تحدد القيمة الوسطية لكل مجموعة والتي تسمى درجة التغيير (x_v).

٦- يُسجل الجدول الثاني الذي يضم المعطيات وهي(f, x_v, fx_v)

٧- يُرسم الخط البياني الذي يعبّر عن التبدلات المتواصلة.

مثال تطبيقي افتراضي:

بعد تسجيل طول (١٠٠) سنبلة من القمح في جدول مناسب (الجدول الأول)، من هذا الجدول نجد أن الأطوال تراوحت بين ٧,٠- ١١,٢سم ومن الجدول تبين أنَّ:

X_{max} =11.2، X_{min} = 7.0 ومنه فإن مدى التبدل هو:

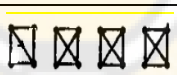
X_{max}- X_{min}= 11.2_7.0 = 4.2

نقترح تقسيم رقم مدى التبدل على ٠,٦ فيكون الجواب هو (٧) أي عدد المجموعات هو (٧) وقيمة الفاصلة i = 0.6.

نقوم بعد ذلك بتسجيل الجدول المناسب (جدول 20)، حيث توضع على يمينه المجموعات السبع (بترتيب تصاعدي) بدءاً من الأسفل باتجاه الأعلى، وهكذا تكون حدود المجموعة الأولى السفلية من ٧,٠- ٧,٥سم أي بفاصل ٦ مم، تليها المجموعة الثانية التي تكون حدودها من ٧,٦-٨,١ ...الخ، بحيث تكون المجموعة الأخيرة ١٠,٦- ١١,١، وبذلك قد تنقص المجموعة العليا عن الاحتمال الأعظمي وهو ١١,٢ بـ (١) مم، وهي أكبر قيمة ممكنة لا يجوز أن يتجاوزها الطول الأعظمي أي ٠,١ سم كما هي الحال في مثالنا.

جدول رقم (20) طريقة تسجيل المجموعات والتواتر (f) مع حساب القيم النهائية المناسبة في التبدلات المتواصلة.

حدود المجموعات بترتيب تصاعدي من الأسفل إلى الأعلى (سم)	درجة التغيير لكل مجموعة (المتوسط) x_v	التواتر Frequency		fx_v
		بالنقاط	بالأرقام	
١٠,٦– ١١,١	١١,٠		١	١١,٠
١٠,٠– ١٠,٥	١٠,٣		٧	٣٢,١
٩,٤ – ٩,٩	٩,٧		١٧	١٦٤,٩
٨,٨ – ٩,٣	٩,١		٣٩	٣٥٤,٩
٨,٢– ٨,٧	٨,٥		٢٣	١٩٥,٥
٧,٦ – ٨,١	٧,٩		١٠	٧٩
٧,٠ – ٧,٥	٧,٣		٣	٢١,٩
			$\sum f = n =$ ١٠٠	٨٩٩,٣



Damascus University

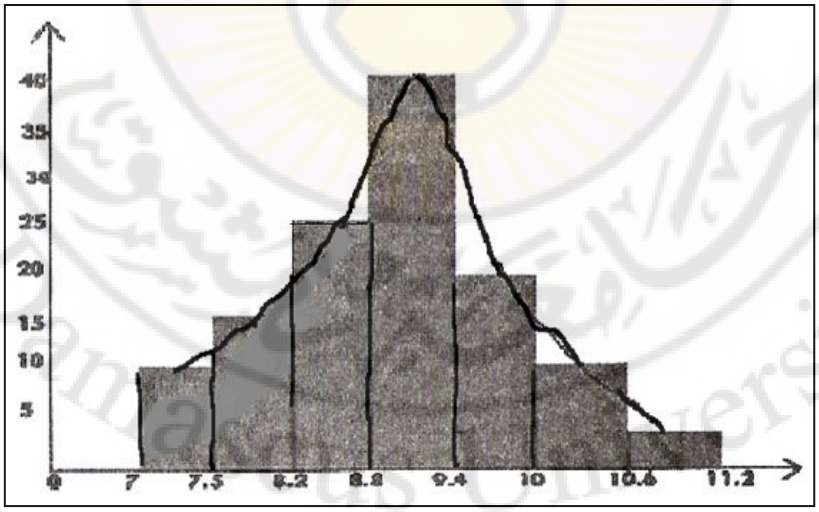
دلالة النقاط										
معناها بالأرقام	١	٢	٣	٤	٥	٦	٧	٨	٩	١٠

بعد ذلك يتم رسم الخط البياني المناسب للتبدلات المتواصلة (شكل115)، ويستخرج المتوسط الحسابي للتبدلات المتواصلة من العلاقة:

$$\bar{X} = \frac{\sum f.Xv}{n}$$

وبذلك نجد من (الجدول20): $\bar{X} = \frac{899.3}{100} = 8.993 = 9$

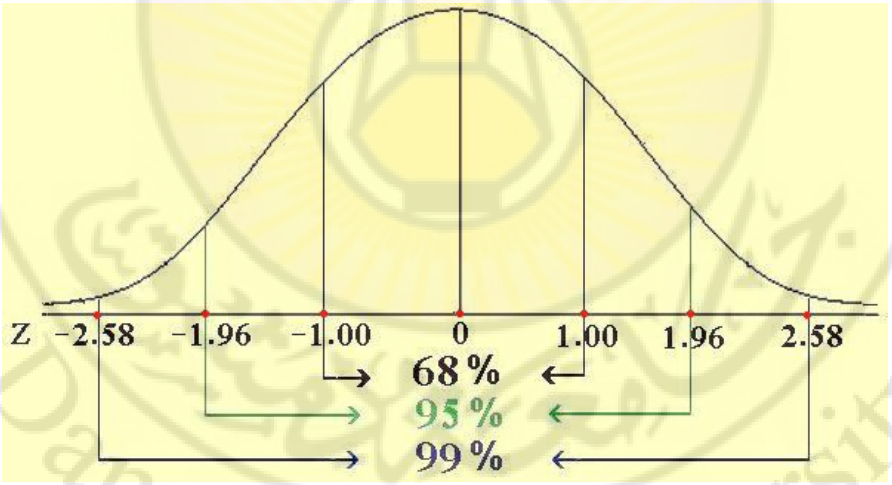
ملاحظة: لا يجوز تقريب قيمة المتوسط الحسابي $\bar{X}$ إلا إذا كانت من رتبة (٠,٩٥) فما فوق.



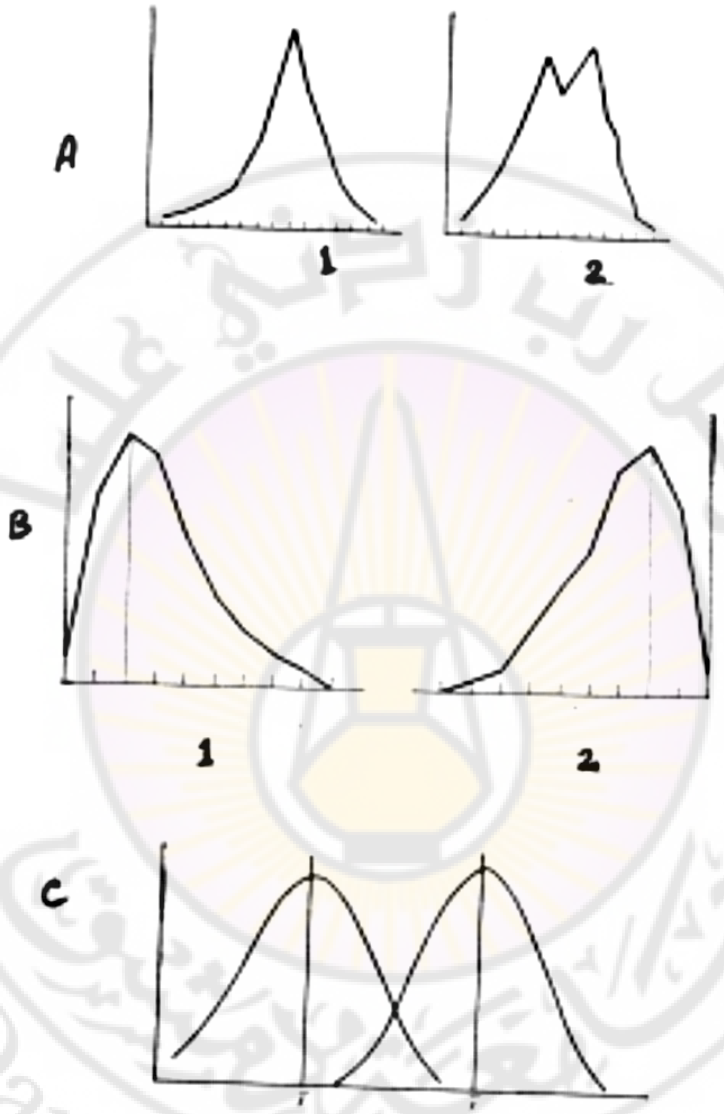
الشكل (115) مُنَسَّج (هيستوغرام Histogram) يوضح منحني التبدلات المتواصلة بطريقة الأعمدة.

يخضع تراوح الصفات في مجمل العينات لآلية إحصائية خاصة تُعرف باسم التوزيع الطبيعي للصفات أو توزيع غاوس ؛ وهكذا تتوزع احتمالات الأطوال بشكل متناظر على طرفي المتوسط الحسابي $\bar{X}$ (بإشارة إيجابية إلى يمين الخط البياني، وبإشارة سلبية إلى يسار الخط البياني(شكل 116).

قد تنحرف المنحنيات البيانية عن التوزيع الطبيعي، وهكذا تكون بعض المنحنيات متطرفة إيجابيا أو سلبياً، أي لها نهايات حادة وتشبه الأهرامات. فإذا كانت القمة واحدة فهي إيجابية، وإذا كان المنحني بقمتين فهو متطرف سلبي. كما قد تكون المنحنيات غير متناظرة، أو متداخلة (شكل 117)، وعلى ما يبدو فإن تبدل أشكال المنحنيات يرجع إلى الجمع الخاطئ للعينات المدروسة، أو أخذ عينات غير متجانسة النمو والبيئة، أو وجود عوامل أخرى غير معروفة.



شكل (116) التوزيع الطبيعي (غاوس) ارتباطاً مع قيمة كل احتمال بأجزاء من سيغما σ



الشكل (117) انحراف منحنيات التبدل عن النظامية

A- قيم متطرفة حادة: ١- قمة واحدة (ايجابية). ٢- قمتان (سلبية).

B- قيم غير متناظرة: ١- يسارية (ايجابية). ٢- يمينية (سلبية).

C- منحنيات متداخلة.

ثانياً – التبدلات المتقطعة لصفة عدد السنيبلات في سنابل القمح:

تبدو الاختلافات بسيطة بين طريقة دراسة التبدلات المتواصلة وطريقة التبدلات المتقطعة. وهكذا تتجلى الفروق بصيغة القوانين وبطريقة رسم الخط البياني. وفيما يلي نحدد خطوات دراسة هذه الطريقة:

١– يتم جمع ١٠٠ سنبلة بشكل عشوائي، ثم يُحصى عدد سنيبلات كل منها وتسجل الأرقام المعبرة عن أعداد السنيبلات لجميع السنابل (جدول21).

٢– يُستخرج مدى التبدل في هذا المثال حيث يبدو صغير القيمة أي:

(lim = 20-13 = 7, Xmin = 14, Xmax = 20) وبذلك فإن عدد المجموعات سبع والفاصلة هو سُنيبلة واحدة فقط (i= 1).

الجدول (21) عدد سنيبلات (١٠٠) سنبلة في القمح (تبلات متقطعة).

18	17	**20**	15	19	16	18	17	15	16
19	15	16	**14**	18	17	19	18	18	17
16	19	17	18	17	15	16	17	17	18
18	17	15	19	16	18	18	17	19	16
17	14	18	17	17	16	19	16	15	18
17	16	14	16	18	17	18	17	18	15
20	16	17	16	15	18	15	18	17	17
18	15	17	14	18	17	17	16	18	16
17	16	19	17	19	16	18	17	15	18
16	18	17	15	18	17	16	18	15	17

٣– يتم تسجيل جدول مماثل لجدول التبدلات المتواصلة الذي يربط الاحتمال بالتواتر (جدول22)

جدول رقم (22) طريقة تسجيل المجموعات والتواتر (f) مع حساب القيم النهائية المناسبة في التبدلات المتقطعة.

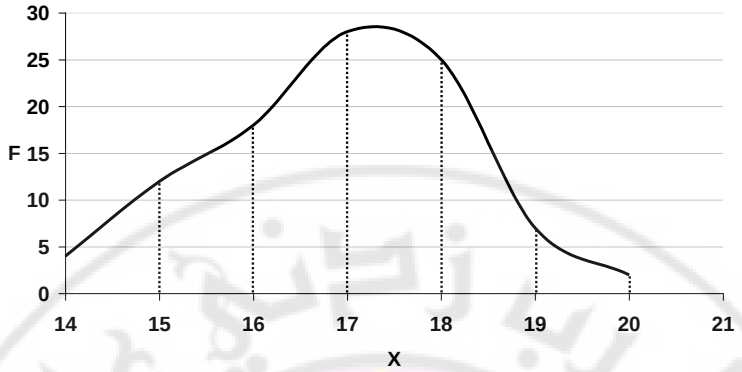
fx	التواتر Frequency		الاحتمالات
	بالأرقام	بالنقاط	X
40	2	• •	20
152	8	□	19
450	25	⊠ ⊠ ⁚ ı	18
493	29	⊠ ⊠ ◪	17
304	19	⊠ ◪	16
195	13	⊠ ˙ ⁚	15
56	4	⁚⁚	14
∑= 1690	∑f = 100		

٤- يتم تحديد المتوسط الحسابي من العلاقة:

$$\bar{X} = \frac{\Sigma fx}{n} = \frac{1690}{10} = 16.9$$

٥- يُرسم الخط البياني بطريقة النقاط المتعددة (شكل118). ثم هنا يجب وضع منحني الخط البياني الخاص بالتبدلات المتقطعة.

Damascus University



الشكل (118) مُنَسَّج (هيستوغرام Histogram) يوضح منحني التبدلات المتقطعة وذلك بطريقة النقاط.

ثالثاً- ربط التبدلات المتكيفة مع المورثات ومنحني غاوس:

كما هو معروف أن عدد المورثات المسيطرة يتوافق مع نسب ظهور الصفة المدروسة في الجيل الثاني تِبعاً لنمط الهجونة. ففي حال وجود شفعين من المورثات التراكمية نجد (الجدول 23) الآتي:

عدد المورثات الغالبة	صفر	1	2	3	4	
نسبة الظهور في F_2	1	4	6	4	1	= ١٦

ولدى وجود ثلاثة أشفاع من المورثات التراكمية نجد الجدول رقم (24) الآتي:

عدد المورثات الغالبة	**صفر**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	
نسبة الظهور في F_2	**1**	**6**	**15**	**20**	**15**	**6**	**1**	= ٦٤

وفي حال وجود أربعة أشفاع من المورثات التراكمية نجد الجدول رقم (25) الآتي:

عدد المورثات الغالبة	صفر	1	2	3	4	5	6	7	8	
نسبة الظهور في F_2	1	8	28	56	70	56	28	8	1	= ٢٥٦

وإذا فرضنا أن أطوال سنابل القمح (فيما يخص التبدلات المتواصلة) تقع تحت إشراف ثلاثة أشفاع من المورثات التراكمية، ومن الجدول رقم (24) نستطيع تسجيل الجدول رقم (26) الآتي:

عدد المورثات المسيطرة بوجود ثلاث أشفاع مورثيه	صفر	1	2	3	4	5	6
نسبة الظهور الطبيعية (النظرية) في F_2	1	6	15	20	15	6	1
نسبة الظهور التجريبية (التواتر) في F_2 (من الجدول رقم ١)	3	10	23	39	17	7	1
اختصار التواتر التجريبي ليتوافق مع النظري (مُستحسن)	2	5	12	20	9	4	1
انحراف الأرقام التجريبية عن الأرقام النظرية (الطبيعية)	1	1	3	0	6	2	0

ملاحظات حول طريقة العمل:

١- يجب توحيد عدد المجموعات المدروسة في جميع الحالات بسبعة مجموعات حصراً في حال دراسة ثلاثة أشفاع تراكمية، لأن عدد توزيع تواتر أرقام F_2 هو سبعة (1:6:15:20:15:6:1).

٢- يجب أن نقوم باختصار أرقام التجربة (التوزيع التجريبي) في حالة الضرورة فقط كي تتماشى مع أرقام التوزيع النظري.

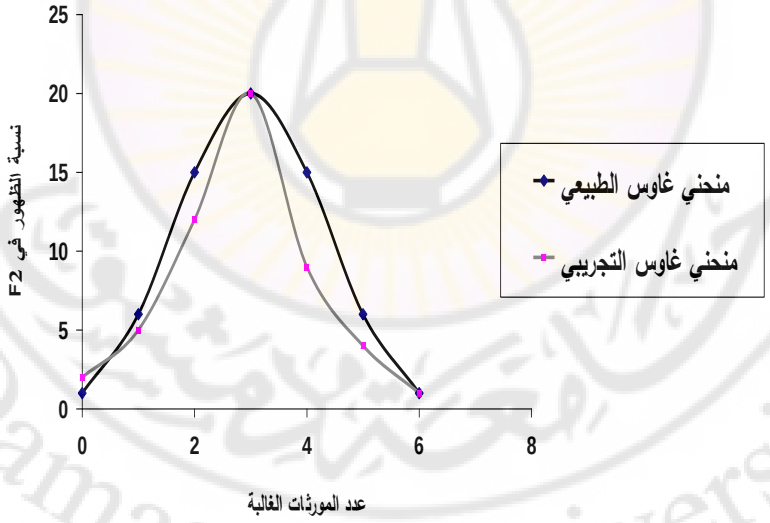
٣- يتم رسم الخط البياني الأصلي وهو الخط النظامي الذي يمثل منحني غاوس بوجود ثلاثة أشفاع تراكمية (على ورق مليمتري)، وذلك بأن نضع عدد المورثات المسيطرة على محور السينات ونسبة الظهور النظرية في F_2 على محور العينات.

٤- يتم رسم الخط البياني التجريبي فوق الخط البياني الأصلي (بخط منقط أو بلون آخر)، حيث تتم مقارنة الخطين معاً، ثم يتم تحديد مدى الانحرافات الموجودة بينهما وتناقش بشكل كامل (شكل119).

٥- يجب تسجيل الأنماط المورثية العائدة لأرقام عدد المورثات المسيطرة (أو بعضها على الأقل) ومناقشة طريقة التسجيل.

٦- لمعرفة طريقة حساب عدد المجموعات السبعة يمكن متابعة الجدول رقم (27) الآتي (جدول ضرب السبعة):

الفاصلة (i) مم		عدد المجموعات			مدى التبدل (lim) مم
١	×	٧	=	٧	(0.7)
٢	×	٧	=	١٤	(1.4)
٣	×	٧	=	٢١	(2.1)
٤	×	٧	=	٢٨	(2.8)
٥	×	٧	=	٣٥	(3.5)
٦	×	٧	=	٤٢	(4.2)
٧	×	٧	=	٤٩	(4.9)
٨	×	٧	=	٥٦	(5.6)
٩	×	٧	=	٦٣	(6.3)



شكل (119) توافق منحني التبدلات الطبيعي مع منحني التبدلات في التجربة بوجود ثلاثة أشفاع من المورثات التراكمية.

ملاحظات حول (الجدول 27):

١ – إذا وافقت قيمة مدى التبدل عدد المجموعات وهي سبعة فلا يوجد إشكال.

٢ – إذا لم توافق قيمة مدى التبدل عدد المجموعات ننظر إلى مكان وجودها عند (i).

٣ – في الحالة السابقة إذا بلغ عدد المجموعات أكثر من سبعة (غالباً ثمانية)، فإننا نحذف المجموعة العليا أو السفلى ذات التواتر الأقل، ونضم ورقتها إلى أقرب مجموعة إليها.

مثال: $X_{ma.} = 3.4 \quad X_{min} = 1.8 \quad lim = 3.4\text{-}1.8 = 1.6$

من (الجدول 27) نجد أن قيمة lim في مثالنا تقع بين1.4 و2.1 ومنه نعتمد القيمة العليا (1.4) من الجدول كي لا يكون لدينا مجموعات أقل من سبعة، والآن لنسجل المجموعات السبعة عند i = 0.2 أو (2) مم (الجدول الآتي28):

3.3 - 3.2	**حذف**	**١ مثلاً**	**هذه ثمانية مجموعات نحذف واحدة إما السفلية (1.8 - 1.9) أو العلوية (3.2 - 3.3) حسب عدد الأوراق (f) أي الأقل عدداً ونضيف أوراقها إلى المجموعة التي تليها مباشرة**
3.1 - 3.0	**3.1**		
2.9 - 2.8	**2.9**		
2.7 - 2.6	**2.7**		
2.5 - 2.4	**2.5**		
2.3 - 2.2	**2.3**		
2.1 - 2.0	**2.1**		
1.9 - 1.8	**1.8 + 2 ÷ 1.9 = 2**	**٢ مثلاً**	
المجموعات	**X_{ν}**	**f التواتر**	

تبقى عملية حذف مجموعة واحدة نظامية لأننا لم نلتقط أوراقها المحذوفة (المجموعة) من الحقل فهي موجودة فعلاً.

المطلوب:

١ – تقوم المجموعة الطلابية بقياس الأوراق النباتية المقدمة إليها (أو إحصاء عدد أسنانها)

٢– تسجل الجدول المناسب وتضع فيه حدود المجموعات والمعطيات (انظر الجدول 20 و 21).

٣– يُستخرج ويُناقش المتوسط الحسابي ويُرسم الخط الباني المناسب على ورقة مليمترية.

٤– تقوم المجموعة الطلابية بإسقاط أرقامها على المورثات بوجود ثلاث أشفاع مورثيه وترسم الخط البياني المناسب بما يشابه (الشكل 118).

٥ – تسجل الأنماط المورثية التي تتوافق مع عدد المورثات المسيطرة عند كل نقطة من الخط البياني .

المراجـع

أولاً–المراجع العربية:

١– عياش غسان، الوراثة النباتية – الجزء العملي جامعة دمشق ١٩٨٠

٢– عياش غسان ، سليمان محمد ، الوراثة النباتية – الجزء النظري ، جامعة دمشق ١٩٩٠.

٣– عياش غسان ، سليمان محمد ، جابر مها، الوراثة النباتية الجزء العملي، جامعة دمشق ١٩٩٠.

٤– العزاوي طلال، دراسات صبغية، الموصل ١٩٠٨.

٥– أبوكشوة محمد أحمد سمية، كمبال أحمد عثمان محمد، دليل التدريبات المعملية في علم الوراثة، جامعة الخرطوم ٢٠٠٧.

٦– حالو بشرى أحمد، عياش غسان، الأعرج بسام. تأثير مستخلص حبوب طلع النخيل Phoenix dactylifera L. في إنتاش وإخصاب حبوب الطلع لأحد أنواع الفصيلة الباذنجانية Solanaceae، رسالة ماجستير، جامعة دمشق، ٢٠١٤ .

٧– عياش غسان، سليمان محمد، تأثير التراكيز المختلفة من المحلول المائي لنواتج التدخين في الانقسام الخلوي وفي التشوهات الصبغية في نهايات جذور البصل " الجزء الأول"، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، المجلد (١٦)، العدد الثاني (٢٠٠٠) .

٨– عياش غسان، سليمان محمد، صليعي محمود الله عبد، دراسة تبدلات قرينة الانقسام والزيغ الصبغي في نهايات جذور البصل Allium cepa المعالجة

بمحلول قطران السجائر وذلك بعد اختبارات الإنعاش" الجزء الثاني" مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية، المجلد (١٦)، العدد الثاني (٢٠٠٠) .

ثانياً– المراجع الأجنبية:

1- Abramova, Z.B.,Kharlinski,D,A. Practical genetics, Leningrad 1979.

2- Ayash,G The effects of colchicine and X-ray on the mitotic index and on the chromosomal aberration in vicia faba. Ph. D.Thesis, Leningrad. 1970

3- Dertiarepa, N.I. Laboratory and field practical genetics ,Kyeve ,1979.

4-Epivanova, O.J. and Tresski, V.V
Metods of autoradiography in the studies of cellular cycles, Moscow. 1969.

5-Nematsova, l.C..
Metaphase method of chromosomal aberration calculation Moscow 1970.
6- Paushepa Z.P. Practical plant cytology. Moscow 1970.
7- Vatte, K,V, and Tekomirova, M.M Guidance to Practical Genetics, Moscow. 1979.
8- Genetics and Cytoembriology of cotton, Tachkent 1979.
9- PausheraZ.P. Practical plant cytology. Moscow. 1980.
10- Larts Evor C.H. Moxuhov M.K
Practical in Genetics , Moscow, 1985.
11- Atabekova A.I. Ostinova E.I plant cytology , Moscow, 1980

12- Romj Singh , Plant cytogenetic London, Tokyo, 1993
13- Joseph Yahier Inro Technique Quest do cytogenetic vegetables. 1992.
14-: Bass, Hank, Birchler, James A. Plant Cytogenetics Genome Structure and Chromosome Function, springer ,2012.

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

وقل رب زدني علما
جامعة دمشق
Damascus University

المصطلحات العلمية وترجمتها

-A-

Acrocentric	طرفي الجزيء المركزي
Activated charcoal	فحم مُنشّط
Algae	طحالب
Allele	أليل (صنوي)
Allium test	اختبار البصل
Allopolyploid= Amphiploid	تعدد خلطي (ناتج تهجين خلطي)
Anaphase	الطور الثالث (الصعود)
Ana-telophase analysis	تحليل أنا– تلوفازي
Arithmetic mean	متوسط حسابي (حقيقي)
Autoradiography	التصوير الشعاعي الذاتي

-B-

Bivalents	ثنائيات التكافؤ (ثنائيات صبغية)
Breakage	انقطاع
Bridge	جسر
Budding	تبرعم
Buffer Solution	محلول الفصل (بوثر)

-C-

C- mitosis	ك – ميتوز (ميتوز مُكلشن)
C-bands	عصابات – س
Cell division	انقسام خلوي
Cell plate	صفيحة خلوية

Centromere	جزيء مركزي
Chiasmata	تصالبات (كيازمات)
Chimera	خيالي كيميرا (نسيج غير متجانس)
Chloroplasts	صانعات خضراء
Chromatid	صُبيغي
Chromatid aberration	زيوغ كروماتيدية
Chromosome- break	تكسر صبغي
Chromosomes aberration	تبدلات (شذوذ صبغي) صبغية
Coefficient of correlation	معامل ارتباط
Coefficient of variability	معامل تبدل (الاختلاف)
Colchicine	كولشيسين
Crossing over	عبور
Cytokinesis	حرائك خلوية (انقسام سيتوبرسمي)

-D-

Degrees of freedom	درجات الحرية
Deoxi ribonuclease	دي أوكسي ريبو نيكلياز (إنزيم)
Deviation	انحراف
Diakinesis	مرحلة التشتت
Diploid	صيغة صبغية مضاعفة (ديبلوئيد)
Diplotene	مرحلة التضاعف
Dominance	سيطرة
Dose	جرعة

-E-

Embryosac	كيس جيني
Euchromatin	كروماتين حقيقي

-F-

Feulgen Reaction	تفاعل فولكن
Fixation	تثبيت
Fixative solution	محلول مثبت
Fixatives	مثبتات
Florescence	الفلورة
Fluorescent in situ hybridization (FISH)	التهجين في الموقع المفلور (فيش)
Fragment	كسره
Freezing	تجميد
Frequency	تواتر (تكرار)
Fulgen reaction	تفاعل فولكن

-G -

Genotype	نمط مورثي
Giemsa technic	تقنية جيمزا
Genome	الجينوم المجين)
Genome in situ hybridization (GISH)	التهجين في الموقع الجينومي (جيش)

-H-

Haematoxylin	هيما توكسيلين (ملون)
Haploid	احادي الصيغة الصبغية (هابلوئيد)
Heterochromatin	كروماتين غير متجانس (مغاير)
Histogram	مُنَسَّج (هيستوغرام)

Homologous chromosomes	صبغيات متماثلة
Hydrolysis	إماهة (حلمهة)

-I-

Idiogram	مخطط صبغي (ايديوغرام)
Induced mutations	طفرة محرضة
Inhibitor	قامع
Interaction	تآثر
Interphase	طور بيني
Irradiation	تشعيع (إشعاع)
Isochromatid aberration	تبدل كروماتيدي (زيغ صُبيغي)
Isochromatid- break	انقطاع متساوي الصبغي

-K-

Karyogram	مخطط نووي (كاريوغرام)
Karyokinesis	حرائك نووية (انقسام نووي)
Karyotype	نمط نووي (كاريوتيب)
Kinetochore	حيز حركي

-L-

Leptotene	مرحلة الخيوط الرفيعة

-M-

Megagmetogenesis	مرحلة تشكل الأعراس الكبيرة
Megaspore	بوغة كبيرة
Megasporocytes	خلايا أم مولدة للكيس الجنيني
Megasporogenesis	مرحلة تشكل الأبواغ الكبيرة
Meiosis	انقسام منصف

Metacentric	وسطي الجزيء المركزي
Metaphase	الطور الاستوائي
Metaphase analysis	تحليل ميتافازي (في الطور الاستوائي)
Microgametogenesis	مرحلة تشكل الأعراس الدقيقة
Microsporobenesis	مرحلة تشكل الأبواغ الدقيقة
Microtom	مقطاع مجهري (مكروتوم)
Mitosis	انقسام خيطي
Mitotic index	قرينة الانقسام
Mutagens	مطفرات
Mutation	طفرات

-N -

Nuclear organizer	منظم نويّي
Nuclease	نوكلياز (إنزيم)
Nucleic acids	حموض نووية
Nucleotides	نوتيدات

-O -

Objective micrometer	محضر مكرومتري
Ocular micrometer	العدسة العينة المكرومترية
Organism	متعضية (كائن حي)
Ovule	بويضة

-P-

Pachytene	مرحلة الثخن
Phenotype	نمط شكلي
Point of mutation = Gene	طفرة نقطية = طفرة مورثية

of mutation	
Pollen fertility	القدرة الاخصابية للطلع
Pollen viability	القدرة الحيوية للطلع
Polyploidy	تعدد صبغي
Probability	احتمال
Prometaphase	طليعة الطور الثاني
Prophase	الطور الأول
Pyroxidas	بيروكسيداز (إنزيم)
-Q-	
Qualitative	نوعي (صفة)
Quantitative	كمي (صفة)
-R-	
Ribonuclease	ريبونيكياز (إنزيم)
Recovery test	اختبار الإنعاش (الإفاقة)
-S-	
Satellite	تابع
Schiff's reagent	كاشف شيف
Secondary constriction	انخماص ثانوي
Segregation	انفصال (انعزال)
Selection	انتخاب
Sori sing .sorus	بقع بوغية مفردها بقعة (في السراخس)
Species	نوع
Spindle fibers	خيوط المغزل
Spontaneous mutation	طفرات تلقائية (طوعية)

Squash preparation	محضرات الهرس
Standard deviation	انحراف معياري
Sticky ends	نهايات لزجة-k-
Sub metacentric	قرب وسطي الجزيء المركزي
Synchronized division	انقسام متزامن

-T-

Telocentric	نهائي الجزيء المركزي
Telomere	جزيء طرفي (تلومير)
Telophase	طور نهائي
Tetrads	رباعيات

-V-

Viability	قابلية الحياة (حيوية)

-Z-

Zygotene	مرحلة التزاوج
Zygotes	بيضة ملقحة (لاقحة)

اللجنة العلمية :

- الأستاذ الدكتور: سليم زيد.

- الأستاذ الدكتور: كمال الأشقر.

- الأستاذ الدكتور: بسام الأعرج.

المدقق اللغوي:

- الدكتورة: نور الهدى حناوي

حقوق الطبع والترجمة والنشر محفوظة لمديرية الكتب والمطبوعات الجامعية