علم الوراثة العملي

كلية التربية للعلوم الصرفة - ابن الهيثم

قسم علوم الحياة

المرحلة الثالثة

اعداد

ا.د. احسان عرفان حسين

الوراثة العملي/ا.د احسان عرفان حسين

((المختبر الأول))

مميزات حشرة الدروسوفيلا ميلانوجاستر *Drosophila melanogaster*

مقدمة:

حشرة الدروسوفيلا ميلانوجاستر من الحشرات المنتشرة في جميع انحاء العالم وهي تتبع رتبة ثنائية الأجنحة Diptera وتنتمي الى عائلة Drosophilidae، وتعرف هذه الحشرة احيانا بأسم ذبابة الخل Vinegar fly او ذبابة الفاكهة Fruit fly. تتغذى الحشرات الكاملة وكذلك اليرقات في الطبيعة على ثمار الفاكهة التالفة المتخمرة، إذ تتكاثر بأعداد كبيرة، لذلك يمكن جمعها بوفرة من على الثمار المتساقطة في بساتين العنب والموز.

اهمية ومميزات الحشرات في الدراسات الوراثية

كان اول من استخدم هذه الحشرات في الدراسات الوراثية في اوائل هذا القرن (حوالي عام 1906م) هو العالم موركان Morgan ومنذ ذلك الوقت اصبح لهذه الحشرة اهمية كبيرة في الدراسات الوراثية والخلوية والنشوئية، وقد كان لأستخدامها كمادة للبحث اكبر الأثر في تقدم هذه الأبحاث ولازالت الى الآن تعتبر من افضل الكائنات الحية التي تستعمل في هذه الميادين وللأسباب التالية:

1. سهولة الحصول عليها من الطبيعة بتكاليف قليلة جداً.
2. صغر حجمها مما يساعد على سهولة تربيتها على بيئات غذائية صناعية في حيز صغير داخل المختبر، وهذا بالتالي يساعد على سهولة التحكم في الظروف البيئية من حرارة وتغذية وغيرها.
3. سرعة تكاثرها، إذ ان دورة حياتها قصيرة ومدة الجيل من البيضة إلى الحشرة الكاملة يتراوح بين 9-12 يوما إذا ما ربيت على درجة 25م° ومن الممكن تحت الظروف الملائمة الحصول على عدد من الأجيال يتراوح بين 25-30 جيلاً في العام الواحد.

4. كثرة اعداد البيض الذي تضعه الأنثى الواحدة مما يساعد على الحصول على اعداد وفيرة من النسل وهذه ميزة كبيرة الى الدراسات الوراثية لا يمكن توفرها إلا في الكائنات المجهرية وعدد قليل من الكائنات الراقية كنبات الذرة الصفراء.

5. قلة تكاليف تربيتها وعدم احتياجاتها إلى مكان واسع وهذه ميزة عامة في التجارب المختبرية.

6. قلة عدد الكروموسومات ووجود انواع عديدة في هذا الجنس مختلفة الهيئة الكروموسومية من حيث عدد وشكل الكروموسومات. فالعدد الأحادي Haploid number اربعة في الدروسوفيلا ميلانوجاستر وخمسة في الدروسوفيلا ايسكيورا*Drosophila pseudoobscura* وهذا يساعد ويسهل دراسة كثير من النظريات الوراثية والخلوية والنشؤية.

7. كان لأكتشاف الكروموسومات العملاقة Giant chromosomes في الغدد اللعابية Salivary chromosomes ليرقات هذه الحشرة اكثر الأثر في التقدم الكبير في العلوم الوراثية الخلوية Cytogenetics والنشؤية Evolution وتفهم نظرياتها.

ولم يقتصر استخدام هذه الحشرة في التجارب الوراثية التقليدية بل تعدتها الى الدراسات الوراثية الفسيولوجية Physiological genetics والوراثة البايوكيميائية Biochemical genetics، وقد استخدمت وما زالت تستخدم في دراسة استحداث الطفرات صناعياً بواسطة الأشعاعات والمواد الكيميائية المختلفة، وحديثا استخدمت في دراسة وراثة المقاومة والمناعة لبعض المبيدات الحشرية.

تربية الحشرة *Drosophila* breeding

يتوقف عمر الحشرة الى حد كبير على طريقة معاملتها وظروف تربيتها ونوع سلالتها، فقد وجد ان الحشرات البرية العادية الصفات Wild type قد تطول حياتها الى حوالي 100 يوماً في حين تعيش سلالات الحشرات الطافرة مدد تختلف بأختلاف السلالة كما ثبت ان قدرة الحشرات على التناسل تستمر معظم عمرها إلا انها تضعف مع تقدم العمر وخاصة الأناث. لا تلقح الأناث عادة من خلال الساعات الأولى (6-8 ساعات) من حياتها (حياة الحشرة الكاملة). وتبدأ الأنثى في وضع البيض سواء لقحت او لم تلقح، وفي الحالة الأخيرة لا يفقس البيض. يوضع البيض بكميات وفيرة في اليوم الثاني من عمر الأنثى الكاملة، وتزداد كمية البيض يوميا، إذ يبلغ اقصاه من اليوم الخامس الى

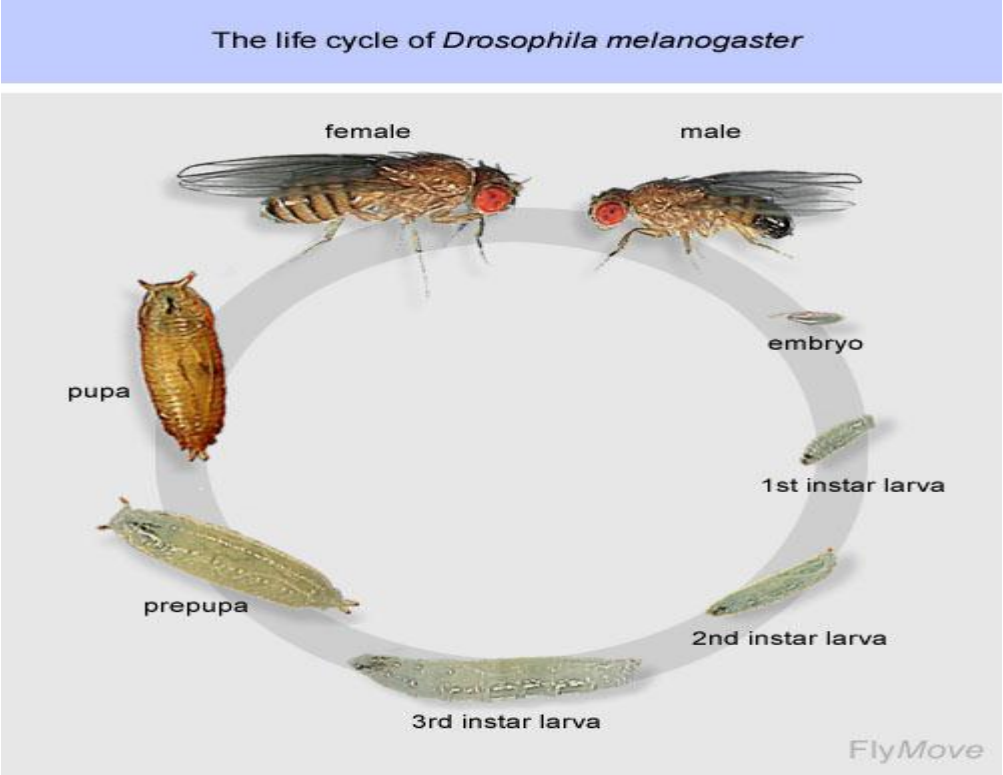
اليوم العاشر ثم يبدأ بالأنخفاض تدريجيا حتى نهاية عمر الأنثى، إذ أنها لاتضع بيضا على الأطلاق في الأيام الأخيرة من عمرها، فضلاً عن ماذكر، يختلف عدد البيض الذي تضعه الأنثى في اليوم الواحد تبعا لنوع الغذاء وحالته وغير ذلك من العوامل، ويبلغ في المتوسط من 20-30 بيضة في اليوم الواحد. وتبلغ كمية البيض الذي تضعه الأنثى طول فترة حياتها 1000-1500 بيضة. وللحصول على عدد وفير من البيض وبحالة منتظمة يجب ان يعتنى عناية كبيرة بتغذية الحشرات (الأناث).

دورة حياة الحشرة Life cycle

يمكن تلخيص دورة حياة حشرة الدروسوفيلا في الخطوات التالية: البيضة Egg, اليرقة Larva، العذراء Pupa ثم الحشرة الكاملة Adult. يختلف مدة كل طور بأختلاف درجة الحرارة كم يتبين من الجدول التالي:

الطور	المدة بالأيام	
	على درجة 20مº	على درجة 25مº
البيضة واليرقة	8	5
العذراء	8.5	4.5

وعلى ذلك فأن دورة حياتها الى فترة النضوج Maturity تتم في المتوسط في حوالي 10 ايام في درجة حرارة 25مº وحوالي 15-16 يوما في درجة حرارة 20مº. ويجب حفظ الحشرات في مفرخات Incubators في درجة حرارة معينة (23-25مº) بحيث لاتتغير كثيرا لأن تعويض الحشرات لمدة طويلة لدرجة مئوية وأن كانت منخفضة يؤدي الى انخفاض حيويتها واطالة دورة حياتها، بينما يترتب على تعويضها لدرجة حرارة 30مº او اعلى ولمدة طويلة الى عقم او موت الحشرات ويجب ملاحظة ان درجة الحرارة داخل زجاجات التربية تزيد قليلا (حوالي درجة واحدة) عن درجة المفرخ وذلك بسبب الحرارة الناتجة عن عمليات التخمر.



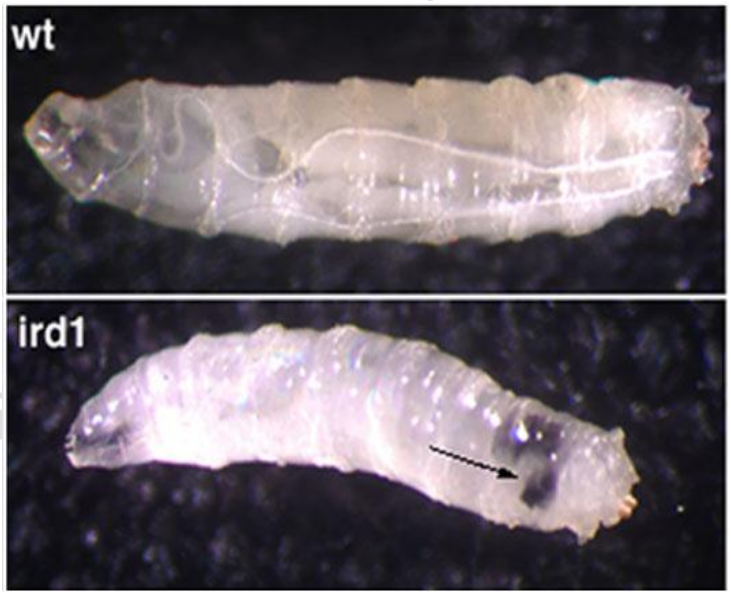
دورة حياة ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*

وصف أطوار الحشرة

البيضة (Egg): يبلغ طولها عند الوضع حوالي 2/1 ملم والسطح الظاهري Dorsal اكثر انبساطا من السطح البطني Ventral الذي هو اكثر استدارة. ويمتد من الجزء الأمامي للسطح الخلفي زوج من الزوائد Filaments يساعد على حفظ البيضة من الأنغماز في الغذاء في حالة ميوعته. وقد لاتضع الأنثى بيضها عقب الأخصاب مباشرة، إذ قد تحتفظ بالبيضة المخصبة داخل المجمع لبعض الوقت حيث تبدأ خلال الأطوار الأولى لنمو الجنين. وعلى العموم فأن مدة هذا الطور من بدءالأخصاب إلى الفقس تتراوح بين 22-26 ساعة.

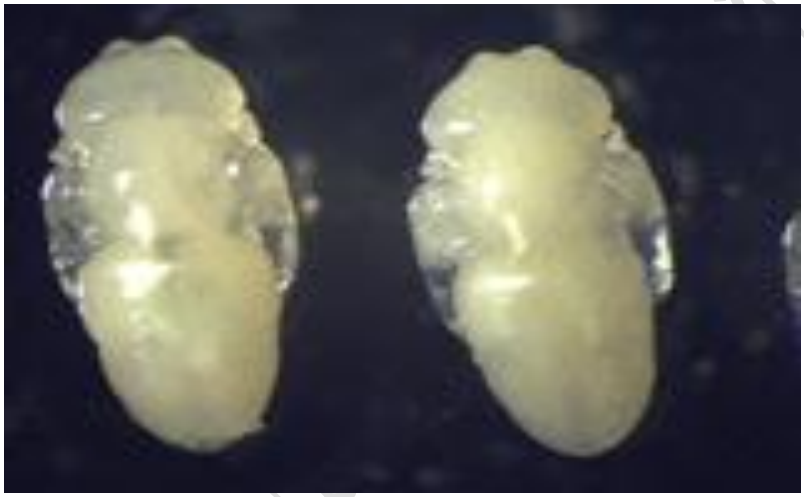
البيضة Egg

اليرقة (Larva): عند فقس البيض تخرج منه يرقات صغيرة وتكون اليرقة عادة شرهة وتنسلخ مرتين وعلى ذلك يقسم هذا الطور الى ثلاثة اطوار Instars. ويبلغ طول اليرقة اقصاه في الدور الأخير او الثالث حيث يبلغ 25X5-4.5 ملم، وفي هذا الطور تشغل الغدد اللعابية Salivary glands الثلث الأمامي لجسم اليرقة بينما توجد الغدد التناسلية مطمورة في الأجسام الدهنية على الجانبين في الثلث الأخير من الجسم.



اليرقة Larva

العذراء داخل شرنقة (Pupa): عندما تتهيأ اليرقة للدخول في طور العذراء فأنها تزحف خاج الغذاء باحثة عن سطح جاف تلتصق عليه (كجدران زجاجات التربية او الورق الموضوع داخلها). ويكون ذلك الجلد اليرقي الأخير الذي تزداد صلابته ويعنم لونه تدريجيا مكونة شرنقة Cocoon بداخله العذراء وبعد انتهاء جميع التغيرات التي تحدد في طور العذراء تأخذ الحشرة الكاملة طريقها الى الخارج خلال الطرف الأمامي للشرنقة.



عذراء Pupa

الحشرة الكاملة (Adult): عند خروج الحشرة الكاملة من الشرنقة يكون جسمها في البداية في حالة استطالة فاتحة اللون كما تكون اجنحتها منطبقة (غير منفردة) ويستمر ذلك لفترة قصيرة يأخذ الجسم بعدها الى الأستدارة واللون الى الغمق كما تنبسط الأجنحة ويتم ذلك خلال بضع ساعات من خروجها من الشرنقة وقد لوحظ ان الحشرات الأناث تنطلق من الشرنقة قبل الذكور بفترة تتراوح بين 3-5 ساعات. وعادة يبدأ النشاط الجنسي للذكور بعد حوالي 5 ساعات من خروجها في حين تستمر الأناث عذارى Virgins مابين 6-8 ساعات.

حشرة ذبابة الفاكهة بالغة Adult *Drosophila melanogaster*

التميز بين الجنسين

يعتبر تمييز الذكور عن الأناث في جميع الأطوار في حشرة الدروسوفيلا ضروريا عند اجراء التجارب الوراثية حتى يمكن التحكم في عملية التلقيح، وعلى درجة حرارة 25م^{o} وهي الدرجة المثلى لنمو وتربية هذه الحشرة تكون النسبة الجنسية 1:1 وفيما بيان بالأختلافات الوصفية بين الجنسين في كل طور:

1. الحشرة الكاملة Adult

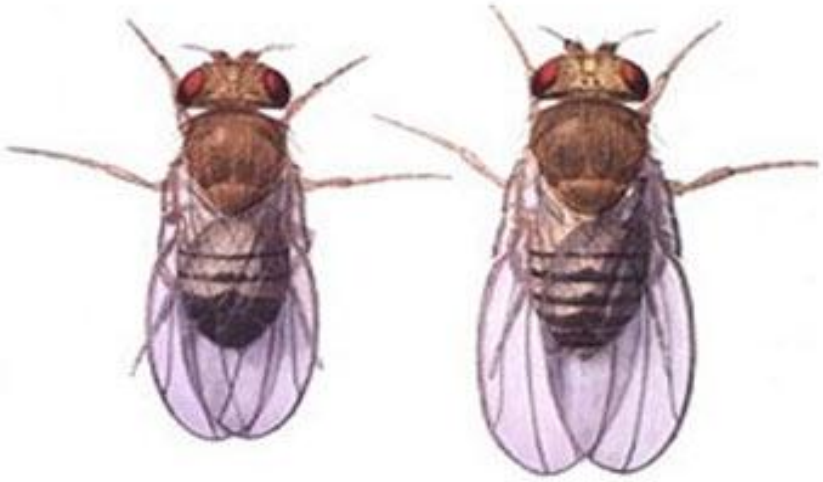
أ. **الحجم:** الأنثى اكبر حجما من الذكر للعمر الواحد والهيئة الواحدة.

ب. **الشكل:** بطن الأنثى ممتلئة ومؤخرتها بيضوية مدببة لظهور آلة وضع البيض وبطن الذكر اسطوانية ومؤخرتها مندمجة.

ت. **اللون:** يمكن تمييز ستة خطوط سود على السطح العلوي لبطن الأنثى وذلك ان هذه الخطوط لاتلتف حول البطن. في حين تنتهي بطن الذكر بمنطقة سوداء كبيرة تلتف تماما حول مؤخرة البطن من سطحها. ويعتبر هذا الفرق الأخير من اهم الفروق التي يعتمد عليها في تمييز

الجنسين، ويلاحظ انه عند خروج الحشرات من طور العذراء مباشرة يصعب احيانا تمييز هذه الصفة وينصح في هذه الحالة بترك الحشرات قليلا حتى تتضح الفروق ثم يجرى الفحص.

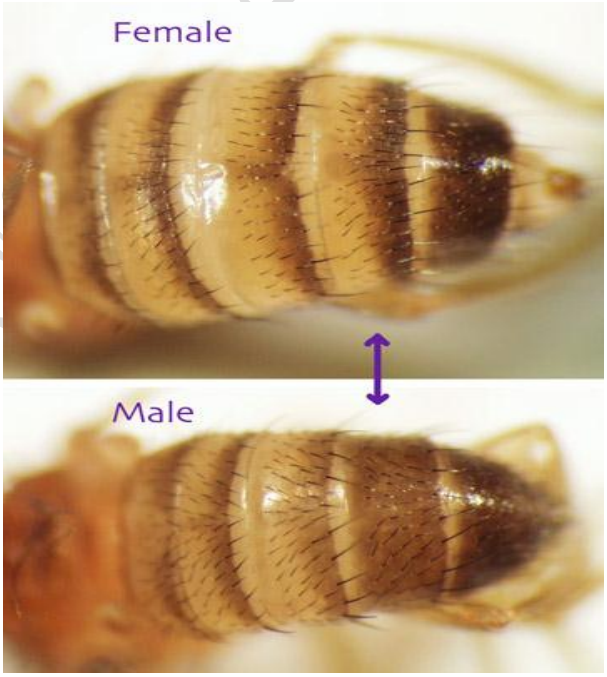
ث. **الأمشاط الجنسية (Sex comb):** يوجد في كل رجل امامية من ارجل الذكر على القطعة الأولى First segment من الرسغ بقعة سوداء ليس لها نظير في الأنثى وتعرف هذه البقعة بأسم المشط الجنسي Sex comb وهو مكون من عشر اشواك سميكة سوداء.



أنثى ذكر

حشرة ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*

المشط الجنسي Sex comb



النهاية الخلفية للذكر والأنثى

النهاية الخلفية للأنثى والذكر

2. اليرقة Larva

عند فحص اليرقات عقب فقس البيضة بفترة قصيرة تحت العدسات العينية Binocular يمكن تمييز الغدد الجنسية ملتصقة بالجسم الدهني في الثلث الأخير الخلفي من تجويف الجسم بين الشعبتين الثالثة والرابعة من مؤخرة القصبة الهوائية وهما مستديرتان في الشكل. وفي الذكر يكون حجمها اكبر، اما في الأنثى فتكون الغدتان الجنسيتان صغيرتين في الحجم وشكلهما بيضويا وأكثر شفافية عنهما في الذكر ودرجة ألتصاقها بالجسم الدهني أقل.

3. العذراء Pupa

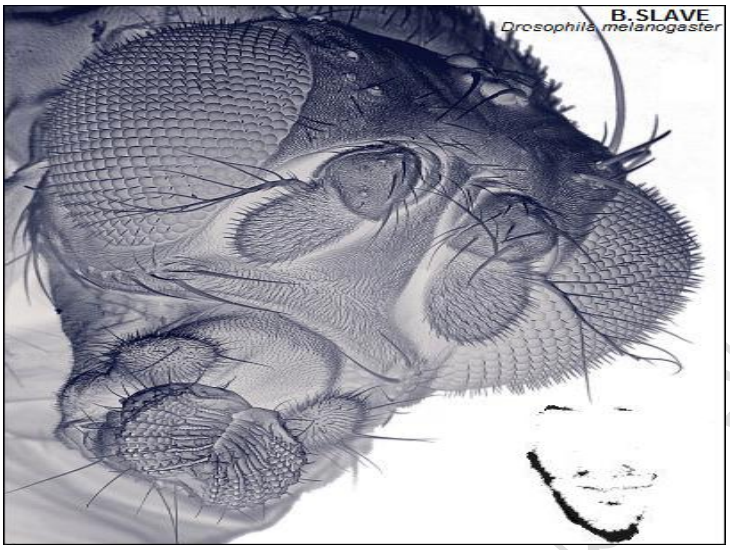
بدخول اليرقة في طور العذراء تبدأ جميع اجهزتها في التطور لتكوين اجهزة الحشرة الكاملة، ويلاحظ ان حجم الغدتان الجنسيتان في الذكر اكبر منهما في الأنثى في جميع مراحل نمو العذراء. وعند خروج الحشرة الكاملة مباشرة تكون خصيتا كل ذكر تامتي النمو وتحتوي كل منها على اسبرمات Sperms كاملة النمو ايضا، اما في حالة الأناث فيستمر نمو المبيضين بسرعة عقب خروج الحشرة الكاملة مباشرة.

الطراز البري (القياسي) Wild type

مما يسهل وصف وتحديد الفروق والأختلافات الموجودة بين الأفراد المكونة لأي نوع من الكائنات الحية هو اختيار طراز قياسي او نموذجي Standard type لكل نوع تقارن به الأفراد الناتجة لهذا النوع لمعرفة الفروق التي ينحرف فيها كل فرد من هذا الطراز القياسي، وبذلك يمكن وصف اي فرد يذكر الأنحرافات التي يفترق فيها من الطراز القياسي دون حاجة لذكر باقي الأوصاف، إذ انه من المفهوم انها تتفق مع اوصاف الطراز القياسي المعروفة.

وفي حشرة الدروسوفيلا ميلانوجاستر نجد ان الحشرات الموجودة في الطبيعة تسود فيها اوصاف خاصة تتعلق بشكل ولون وحجم ونظام الأجزاء المختلفة للجسم، فمثلا نجدها ذات عيون حمر مستديرة واجسام رمادية واجنحة طويلة مكتملة الحافة وتعرقا ذا نظام خاص ويغطي الجسم شعيرات بترتيب وقدر معين كما توجد اشواك Bristles في مواضع محددة وبقدر معروف ثابت ... الخ من الأوصاف المميزة. ولقد كان الوصف الشامل للطراز البري Wild type لحشرة الدروسوفيلا عظيم الفائدة للمنشغلين بدراسة الوراثة في هذه الحشرة. ان اختيار الطراز القياسي ليس بهذه السهولة في جميع الكائنات، فأن بعض الأنواع لايعرف لها طراز بري حتى يتخذ اساسا للمقارنة، وفي هذه الحالة يجب الأتفاق على اختيار صنف معين كأساس للمقارنة وجعله طرازا قياسيا كما اتبع في الذرة التي لايعرف لها اصناف برية لذلك اتفق على خذ الصنف المنتشر زراعته بأمريكا وجعله طرازا قياسيا.

التعرق في جناح ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*



رأس ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* تحت المجهر

المطلوب:

1. فحص ورسم الأدوار المختلفة لدورة حياة الحشرة.
2. فحص ورسم حشرة كاملة ذكر وأخرى انثى من ناحية البطن مع توضيح التخطيط ونوعه.
3. فحص حشرة كاملة من الطراز البري وملاحظة لون العين وشكلها وطول الجناح ونظام التعرق فيه وحافته وطريقة وضعه على الجسم ثم دون ملاحظاتك مع الرسم الواضح.
4. فحص الرجل الأمامية لذكر ومعرفة مكان وماهية المشط الجنسي وهل يمكن رؤيته في رجل الأنثى؟ ولماذا ؟

((المختبر الثاني))

تربية حشرة الدروسوفيلا في المختبر Breeding of *Drosophila* flies

الأدوات المستخدمة في التربية هي:

1. **زجاجات التربية Breeding bottles:** تعتبر زجاجات الحليب سعة 4/1 لتر من افضل زجاجات التربية الخاصة غير انه قد يستخدم زجاجات اكبر من ذلك ولذا يتوقف حجم الزجاجات المستعملة على عدد الحشرات المراد تربيتها وعادة يوضع في الزجاجة الواحدة سعة 4/1 لتر من 5-50 زوج من الذبات كما يمكن زرع حوالي 300 بيضة في كل زجاجة، ويجب تعقيم الزجاجات قبل الأستعمال.
2. **انابيب التربية Breeding vials:** وهي انابيب مستوية القاعدة مصنوعة من الزجاج الذي يتحمل الحرارة بأرتفاع 8 سم وقطر 2.5 سم تقريبا وهي تستعمل عند اجراء التلقيحات بين ازواج قليلة من الحشرات (حوالي 2-3 ازواج) او عند زرع عدد قليل من البيض لا يزيد عن 70 بيضة.
3. **الحاضنات Incubators:** الحاضنة هي دولاب كبير او صغير ذو رفوف توضع عليها زجاجات او انابيب التربية، وفي هذه الحاضنات لابد من ايجاد وسيلة لضبط درجة الحرارة، وتوجد في معظم المختبرات التي تشتغل بهذه الحشرة حجرات كاملة مضبوطة الحرارة تستعمل للتربية والعناية بهذه الحشرة.

التغذية Feeding

تستدعي طبيعة التجارب الوراثية تعدد عمليات نقل الحشرات من زجاجة الى اخرى، ولذا فأنه من الضروري لأن تكون البيئة الغذائية المستعملة ذات صلابة مناسبة ويتم ذلك بأضافة مادة الأكار Agar وتشمل البيئة الغذائية المستعملة في تربية الحشرات بالمختبر عادة مواد مختلفة كالموز والعنب او المشمش واضافة مادة سكرية كالعسل الأسود Molasses او الدبس او السكر وهي ضرورية لنمو وتكاثر الخميرة التي تعتبر من اهم المواد الأساسية في تغذية الحشرات، وهناك

مخاليط مختلفة ونسب متغايرة تستعمل في المختبرات الوراثية المختلفة إلا ان البيئة الغذائية المستعملة حاليا في مختبرنا هذا مكونة من خليط المواد التالية:

المادة	الوزن (غم) اوالحجم (مل)
خميرة جافة	10
طحين ذرة	10
دبس او سكر	10
آكار	2
ماء اعتيادي	100

زجاجات التربية لحشرة ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster*

ان طريقة تجهيز البيئة الغذائية هو ان يوضع الآكار في الماء البارد ويقلب ثم يوضع على النار وعند ارتفاع درجة حرارة المخلوط يضاف الدبس او السكر ويقلب جيدا وبأستمرار ثم تضاف الخميرة وبعدها الطحين وتستمر في التقليب الى ان يتم الغليان الذي يجب ان يستمر لمدة 5-10 دقائق

لضمان تعقيم البيئة الغذائية وبعدها ترفع من على النار وتعبأ لأرتفاع 2-3 سم تقريبا وهي ساخنة في زجاجات التربية او الأنابيب السابق تعقيمها في الفرن Oven وتترك حتى تبرد وهي مغطاة بقطعة من القماش النظيف وبعدها يضاف الى كل منها نقطة او نقطتين من معلق الخميرة الحية في الماء بقطارة نظيفة، ثم يوضع بداخل كل منها ورقة ترشيح معقمة تغمس قليلا لتبيتها في البيئة الغذائية لتجد الحشرات الكاملة مكانا للوقوف وتجد اليرقات مكانا جافا تتحول فيه الى عذارى. بعدها تغطى الزجاجات بسدادة من القطن المعقم وبذا تكون الزجاجات والأنابيب بعدها معدة للأستعمال لكن يستحسن ترك الزجاجات بضع ساعات او الى اليوم التالي قبل استعمالها لتتمكن خلايا الخميرة من النمو والتكاثر.

طريقة نقل الحشرات البالغة Adult transfer

عند نقل الحشرات من زجاجات التربية القديمة الى زجاجات جديدة يجب ان تستبعد الزجاجات القديمة الملوثة بالفطر او البكتيريا لضمان عدم تلوث البيئة الجديدة، ثم تنزع السدادة القطنية لكل من الزجاجتين وتنكس الزجاجة المراد نقل الحشرات منها فوق الزجاجة الجديدة وتمسك الزجاجتان عند موضع اتصالها بأحدى اليدين وتطرق طرقات خفيفة على راحة اليد او فوق قطعة من الفلين الى ان يتم انتقال جميع الحشرات الى الزجاجة الجديدة ثم تحفظ الزجاجات في حاضنات خاصة على درجة حرارة ثابتة حوالي 25مº وهي انسب درجة حرارة لتربية هذه الحشرة، كما تستخدم نفس هذه الطريقة عند نقل الحشرات من انبوبة الى أخرى.

عملية تخدير والفحص

حتى يمكن فحص الحشرات، يجب اولا شل حركتها ويتم ذلك عن طريق التخدير Etherization ويستعمل لذلك الأيثر Ether. تتكون ادوات التخدير من طرز مختلفة ابسطها يتكون من زجاجة تربية عادية يوضع في قاعها قطعة من القطن الطبي المشبعة بالأيثر وتغطى فوهة هذه الزجاجة بقمع من البلاستك فوهته العليا بأتساع فوهة زجاجة التربية ومركب بالنهاية السفلى للقمع قطعة من قماش الشاش. ولأجراء عملية التخدير يطرق قاع زجاجة او انبوبة التربية وهي رأسية طرقا خفيفا على راحة اليد لتنزيل الحشرات التي هي بالعنق الى القاع، ثم تنزع السدادة من فوق

زجاجة التربية وتنكسس فوق قمع التخدير وتمسك بأحدى اليدين وتطرق طرقا خفيفا فوق قطعة من الفلين حيث تسقط جميع الحشرات إلى قاع القمع الممتلئ ببخار الأيثر خلال ثقوب القماش. وتترك الحشرات بضع ثوان حتى يتم تخديرها ثم تنقل بعدها الحشرات الى لوحة الفحص (ورق سميك ابيض). يجب عدم ترك الحشرات في المخدر فترة اطول من اللازم حتى لاتموت من تأثير الأيثر الزائد، ويلاحظ ان اجنحة الحشرات المخدرة تكون في وضعها الطبيعي اي في اتجاه الجسم، اما اذا كانت الأجنحة عمودية على الجسم فهذ يدل على موت الحشرات نتيجة التخدير الزائد.

تفحص الحشرات المخدرة بواسطة العين المجردة او بعدسة يدوية، ويجب استعمال فرشاة ناعمة صغيرة الحجم لتحريك الحشرات دون تشويه، وبعد انتهاء الفحص تعاد الحشرات إلى زجاجات او انابيب التربية الجديدة اذا اريد الأحتفاظ بها او تعدم برميها الى اناء يحتوي على كحول مستعمل في حالة الأستغناء عنها. وعند اعادة الحشرات الى زجاجات التربية يراعى ان توضع في وضع افقي او رأسي مقلوب الى ان يزول اثر التخدير وتنبيه الحشرات خوفا من التصاق الحشرات المخدرة بسطح البيئة الغذائية اللزجة.

طريقة الحصول على اناث غير ملقحة Virgin females

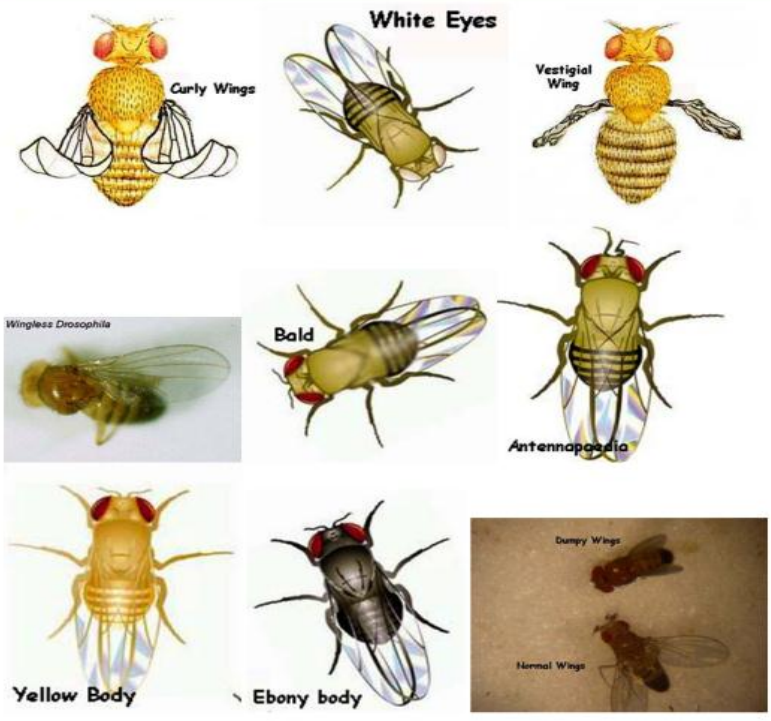
تتطلب طبيعة التجارب الوراثية التحكم في عملية التلقيح، لذلك فأنه من الضروري الحصول على اناث عذارى Virgins ويتم ذلك بعدة طرق:

1. تفرغ زجاجات التربية المراد الحصول على اناث عذارى منها من جميع الحشرات التي بها. وبعد حوالي 5-8 ساعات تعزل الأناث الحديثة الفقس في انابيب او الزجاجات تربية وهذه تكون عذارى وهذه الطريقة هي الأكثر شيوعا لكثرة عدد العذارى المتحصل عليها.
2. تنقل الحشرات من زجاجات التربية الى زجاجة اخرى نظيفة ثم يؤخذ مجموعة من اليرقات والعذارى داخل الشرنقة لمعرفة جنسها كما سبق شرحه. وتنقل كل يرقة او عذراء انثى تم فحصها بواسطة مبتلة الى انبوبة تربية جديدة، إذ توضع على سطح المادة الغذائية، إلا ان هذه الطريقة غير عملية لقلة عدد الأناث المتحصل عليها.

3. يمكن الحصول على أناث عذارى من أي زجاجة تربية وذلك بفحص الحشرات حديثة الفقس حيث يمكن تميزها بجسمها المستطيل.

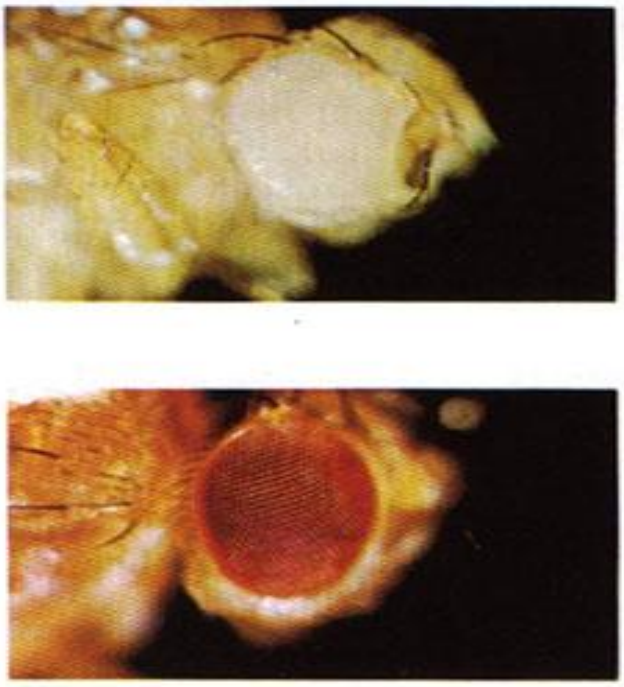
الطفرات في الدروسوفيلا Mutations in *Drosophila*

تظهر احيانا بين الأفراد البرية لهذه الحشرة افرادا ذات صفة جديدة تورث من جيل لآخر تعرف بأسم الطفرات الذاتية Spontaneous mutations، فلون العين الأبيض White وشكل العين العصوية Bar والجناح المقضوم Dumby او المختزل Vestigial ولون الجسم الأصفر Yellow او الأسود Black او الأبنوسي Ebony وغيرها من الطفرات المعروفة والتي لها سلوك وراثي ثابت، وتختلف هذه الحشرات الطافرة في درجة الحيوية والخصوبة، ولذا فأنها احيانا تربى تحت ظروف خاصة في المختبر. الجدول التالي يبين بعض الطفرات المعروفة في حشرة الدروسوفيلا والرموز الدالة عليها ودرجة سيادتها والكروموسوم الذي يحملها.



أنواع مختلفة من الطفرات في ذبابة الفاكهة

الصفة (الطفرة)	الرمز	السيادة	الكروموسوم الحامل للطفرة
طافرات المفردة (Single mutants)			
لون الجسم الأصفر	y	متنحي	الأول (الجنسي X)
لون الجسم الأسود	b	متنحي	الثاني (الجسمي)
لون الجسم الأبنوسي	e	متنحي	الثالث (الجسمي)
شكل العين العصوية	B	سائد	الأول
لون العين البيضاء	w	متنحي	الأول
لون العين القرمزية	st	متنحي	الثالث
لون العين البني	bw	متنحي	الثاني
الجناح المختزل	vg	متنحي	الثاني
الجناح المقضوم	dp	متنحي	الثاني
طافرات متعددة (Multiple mutants)			
مختزل أبنوسي	v ge	متنحي	الثاني والثالث
مقضوم أبنوسي	dp e	متنحي	الثاني والثالث
مشمشي عصوي العين	wa B	متنحي سائد	الأول
أصفر بني	y bw	متنحي	الأول والثاني
أصفر قرمزي	y st	متنحي	الأول والثالث
أصفر بني قرمزي	y bw st	متنحي	الأول والثاني والثالث
عصوي مقوس الجناح	B Cy	سائد	الأول والثاني



لون العين الأبيض في حشرة ذبابة الفاكهة

شكل الجناح المقضوم في حشرة ذبابة الفاكهة

شكل الجناح المختزل في حشرة ذبابة الفاكهة

لون الجسم الأسمر Epony في حشرة ذبابة الفاكهة

((المختبر الثالث))

بعض الرموز المستخدمه في التجارب الوراثية:

♂ ذكر

♀ انثى

P: الجيل الأبوي Parental generation

F: الجيل البنوي Filial generation

G: الكميتات الأمشاج الذكريه والأنثويه Gametes

X: تشير الى التضريب او التزاوج.

بعض المصطلحات الوراثية:

الكرموسوم : هو تركيب و شكل معين يتكون من اشرطة الدنا DNA التي تحمل المعلومات الوراثية على الجينات ولكل كائن حي عدد من الكرموسومات ومنها كروموسومات جسميه ومنها جنسية .

الجين Gene: هو مادة ذات تسلسل جزيئي كيميائي يقع على الكرموسوم ويحمل صفه من صفات الكائن الحي ولكل جين موقع محدد على الكرموسوم ويشغل مسافه معينة عن الجينات المجاورة.

الاليل Allele: هو صورة الجين اومايشفر عنه الجين من صفه يمكن دراستها او ملاحظتها وهنالك الليل سائد وهو الذي يستطيع التعبير عن نفسه واليل متنحي لايعبر عن نفسه الا في حالة غياب اللاليل السائد.

متماثل الزيجة : وهي الصفه التي تتكون من الليلين متماثلين اما سائدين او متنحيين وهنا يكون الفرد نقي للصفه

متباين الزيجة: وهي الصفه التي تتكون من اليلين مختلفين احدهما سائد والاخر متنحي ويسمى الفرد هنا هجين الصفة المظهرية رغم كونه يظهر الصفه السائدة حسب قانون مندل الأول.

النمط المظهري: وهو مايمكن ملاحظته او دراسته من صفات على الافراد وتكون نسبته 1:3 في افراد الجيل الثاني حسب قانون مندل الأول وتختلف هذه النسبة حسب نوع الدراسة الوراثية.

النمط الجيني: وهو مايؤدي الى ظهور الصفات الهجينة والنقية التي يمكن دراستها او ملاحظتها على الفرد من خلاله يمكن توقع ما سيحصل وتكون النسبه 1:2:1 حسب قانون مندل الأول وتختلف هذه النسب حسب نوع الدراسة الوراثية.

الصفه السائدة: هي قدرة الجين على التعبير عن نفسه بقوة.

الصفه المتنحية: هي عدم قدرة الجين على التعبير عن نفسه بسبب وجود الأليل السائد.

التضريب الاختباري: وهو تضريب الكائن الحامل للصفة السائدة مجهوله النقاوة مع كائن حامل للصفه المتنحية وتكون النسبه الناتجة من التضريب هي 1 سائد و 1 متنحي ويستخدم هذا التضريب في الكشف عن نقاوة الفرد الحامل للصفه السائدة.

استخدام الرموز في التجارب الوراثيه:

غالبا ماتستخدم الحروف اللاتينية للاشارة الى الجين او الأليل وصفاته ونوعه ويستخدم عادة الحرف الكبير للأشارة الى الأليل السائد والحرف الصغير للمتنحي او قد تستخدم العلامة + فوق الحرف الصغير كما في الأشارة الى الصفات المظهرية لحشرة ذبابة الفاكهة وهناك رموز اخرى سيتم الأشارة اليها في حينه.

مثال: اجري تضريب بين نباتي بزاليا احدهما طويل الساق والآخر قصير الساق وكان ناتج التضريب بنسبه 50% طويل و 50% قصير من افراد الجيل الأول. اجري التضريب اللازم وتأكد من نقاوة الآباء:

P1 Aa X aa

G1 A a a

F1 Aa 50% aa 50%

امثلة الحل :-

1. كان ناتج تضريب نباتي بزاليا نبات احمر اللون كيف يمكن معرف لون الازهار للأبوين؟ اذكر الأحتمالات بالتفصيل (اللون الأحمر هو السائد).

P1 RR X rr

G1 R r

F1 Rr 100%

احمر هجين 100%

P2 RR X Rr

G2 R R r

F2 50% RR 50% Rr

الوراثة العملي/ احسان عرفان حسين

((المختبر الرابع))

الأسس المندلية Mendelism

قانون مندل الأول:

ينص قانون مندل الأول على ان اذا اختلف فردان في زوج من الصفات فانهما ينتجان جيلا فيه صفة احد الفردين فقط وهي الصفة السائدة وتنعزل الصفات لتعاود الظهور في الجيل الثاني بنسبة عددية ثابتة. لقد تركزت تجارب مندل على نبات البزاليا بسبب وضوح صفاته المظهرية، سهولة تنميتها وتلقيحها، ازهارها ثنائية الجنس اي ان التلقيح ذاتي ويمكن الحصول منها على نباتات نقية الصفة. ان صفات نبات البزاليا المتضادة والمهمة والتي درسها مندل كان عددها سبعة مما جعله يستفاد منها اثناء تجاربه في قانونه الثاني:

ت	الصفة	السائد	المتنحي
1	ارتفاع الساق	طويل	قصير
2	لون القرنة (غير الناضجة)	خضراء	صفراء
3	شكل القرنة (غير الناضجة)	منفوخة	مضغوطة
4	موقع الزهرة	ابطية	قمية
5	لون البذرة	صفراء	خضراء
6	شكل سطح البذرة	املس	مجعد
7	لون الازهار	احمر	ابيض

ونظرا لأهمية التجارب الوراثية، فأنه من المفروض من هذا الجزء والذي يليه تكوين فكرة عن كيفية اجراء التجارب الوراثية وتجميع البيانات المشاهدة وتحليلها تحليلاً احصائيا ومن ثم تفسيرها وراثيا، وعموما تجري التجارب كالآتي:

1. دراسة السلوك الوراثي للأنعزال المندلي Mendelian segregation

اولاً: تجارب على البازلاء والأذرة

سيجري الطالب تجاربه على بذور البازلاء *Pisum sativum* والأذرة *Zea mays* فعلى كل طالب فحص العينات التي امامه جيدا وملاحظة الأختلاف بين اشكال والوان البذور.

أ. تجارب البازلاء

المطلوب:

1. تمييز وفصل واحصاء عدد البذور في كل فئة مظهرية.
2. اقتراح النسبة المندلية المحتملة اي النظرية الفرضية Null Hypothesis لمجاميع الشكل المظهري المتحصل عليه.
3. تحديد موافقة القيم المشاهدة للقيم المتوقعة تبعا للنظرية الفرضية بأستخدام طريقة مربع كاي Chi-square الأحصائية.
4. تفسير هذه النتائج مع تحديد الجيل الذي قد تمثله كل عينة.
5. تحليل النتائج تحليلا وراثيا كاملا.

ملاحظات عامة:

1. لون البذور اما اصفر او اخضر.
2. شكل البذور اما مستدير او مجعد.
3. نتوقع في هذه الحالة ان تكون النسبة المطلوبة مطابقة للنسب المندلية 1:3 او 1:1 وهي النظرية الفرضية.
4. بأستخدام الطريقة الأحصائية (مربع كاي) للتأكد من صحة النظرية الفرضية.

الوراثة العملي/ د. احسان عرفان حسين

ب. تجارب الأذرة

المطلوب:

1. **فحص وعرانيص Combs:** الأذرة الموجودة والناتجة من تلقيحات معينة ثم تقسيم الحبوب على العرنوص (بدون تفريط الحبوب) الى المجاميع المظهرية المختلفة. ولتقسيم الفئات المختلفة على الكيزان. يبدأ الفرد من مؤخرة الكوز بوضع نقطة من الحبر على حبة في أي صف ثم أبتدأ منها إلى اعلى بطول الصف ثم يبدأ العد ثم الأنتقال الى الصف المجاور من اعلى الى اسفل وهكذا حتى نصل الى نقطة الأبتداء.
2. اقتراح النسبة المندلية المحتملة (النظرية الفرضية) لمجاميع الشكل المظهري المتحصل عليها.
3. تحديد موافقة القيم المشاهدة للقيم المتوقعة تبعا للنظرية الفرضية مستخدما طريقة مربع كاي الأحصائية.
4. تفسير وتحليل هذه النتائج وراثيا مع تحديد الجيل الذي قد تمثله كل عينة.

ثانيا: تجارب على حشرة الدروسوفيلا

1. تجارب تشمل زوجا واحدا من الصفات المتضادة Contrasting characters ، اي تشمل السلوك الوراثي لصفات الجناح (بري - مختزل - مقضوم) وكذلك صفات لون الجسم (بري - ابنوسي).

أ. تجري التجارب بوضع ذكرين بريين Wild type مع ثلاث اناث غير ملقحة Virgins بها صفات متنحية (واحدة من الصفات السابق ذكرها والمحمولة بالكروموسوم الثاني او الثالث) او التلقيح العكسي لهذه الأفراد في انابيب تربية ويدون عليها التركيب الوراثي للأفراد المتزاوجة وتأريخ التلقيح ويسمى هذا الجيل بالجيل الأبوي Parental generation (P1) .

ب. تنقل انابيب التربية بالحشرات الموجودة بها الى الحاضنة على درجة حرارة 25مº وتترك لمدة 4-5 ايام لكي يتم تغذية وتزاوج الحشرات وتضع الأناث عددا كافيا من البيض ويجب عندئذ التخلص من حشرات الجيل الأبوي بتخديرها ثم القائها في كحول مستعمل.

ت. بعد التخلص من حشرات جيل الآباء تعاد الأنابيب الى الحاضنة وتترك هناك الى ان تظهر الحشرات الكاملة الممثلة للجيل الأول First filial generation (F1) وذلك بعد حوالي 5-7 ايام أخرى.

ث. تخدير افراد الجيل الأول لفحصها من ناحية الشكل المظهري لكل من الجنسين.

ج. ينتقل عدد محدود (حوالي 5-10 أزواج) من ذكور واناث الجيل الأول الى زجاجة تربية جديدة تحتوي على غذاء طازج وتحضن حتى تظهر اليرقات ويتخلص من افراد الجيل الأول كما سبق ذكره او توضع (2-3 ازواج) في انبوبة تربية.

ح. بعد ظهور الحشرات الكاملة (افراد الجيل الثاني F2) تخدر وتفحص وتعزل الى فئاتها المظهرية المختلفة وبدون عدد الأفراد في كل فئة مظهرية ثم تحلل البيانات المتحصل عليها تحليلا احصائيا ثم تفسر وراثيا.

التحليلات الأحصائية Statistical analysis

1. الأحتمال التجريبي Experimental probability

هو الأحتمال الذي نحصل عليه من البيانات المتجمعة من عينات مأخوذة من تجارب معينة، وغالبا ما تكون هذه العينات عرضة للأخطاء التجريبية التي ترجع إلى عامل الصدفة، وتكون القيم المتحصل عليها من هذه العينات منحرفة عن القيم المتوقعة على اساس نظريات فرضية معينة.

لقد اصبحت المقارنة بين القيم المشاهدة Observed والمتوقعة Expected عاملا مهما في تقدم العلوم وخاصة علم الوراثة، ففيه تحسب مجاميع الشكل المظهري المحتمل الحصول عليها

بواسطة القوانين الوراثية ثم تقارن هذه القيم المتوقعة بالقيم المشاهدة ثم تقدر درجة احتمال حدوثها ويعرف هذا الأختبار بأسم اختبار مربع كاي Chi-square test.

2. أختبار مربع كاي (X^2) لتقدير درجة التطابق

Chi-square test for determination goodness of fit

القانون العام لمربع كاي:

$$\text{قيمة مربع كاي} = \text{مجموع} \frac{(\text{المشاهد} - \text{المتوقع})^2}{\text{المتوقع}}$$

$$X^2 = \sum \frac{(o - e)^2}{e}$$

ويمكن وضع معادلة مربع كاي في صورة مبسطة كالآتي:

$$\text{قيمة مربع كاي} = \text{مجموع} \frac{\text{مربع الأنحرافات}}{\text{المتوقع}}$$

$$X^2 = \sum \frac{(d)^2}{e}$$

حيث ان d هو الأنحراف Deviation او الفرق بين القيمة المشاهدة والقيمة المتوقعة لكل فئة من الفئات على حدة. وعلى هذا فأنه يمكن حساب قيمة مربع كاي في اي تجربة من التجارب التي يجريها الطالب وذلك بتربيع الأنحراف لكل فئة ثم تقسيم مربع الأنحراف على القيمة المتوقعة لهذه الفئة والتي يمكن حسابها من النظرية الفرضية Null hypothesis ثم يجمع الناتج لجميع الفئات.

الوراثة العملي/ د. احسان عرفان حسين

فعلى سبيل المثال إذا كان عدد البذور البنية والبيضاء في عينة من الفاصوليا هو 156 وكان عدد البذور البنية 87 وفي الفئة البيضاء 69 بذرة وعلى اساس النظرية الفرضية (النسبة 1:1) فأننا نتوقع ان تكون عدد البذور في كل فئة هو

78 بذرة، وبأحلال هذه القيم في معادلة مربع كاي نحصل على الآتي:

$$\text{قيمة مربع كاي} = \frac{(78-87)^2}{78} + \frac{(78-69)^2}{78} = \frac{9^2}{78} + \frac{9^2}{78} = \frac{81}{78} + \frac{81}{78} = \frac{162}{78} = 2.08$$

ولأتمام اجراء اختبار مربع كاي يجدر بنا حساب عدد درجات الحرية Degree of freedom وهي تساوي عدد الفئات المظهرية مطروحا منها واحدا اي انها في المثال السابق تساوي 2-1=1 درجة حرية واحدة. وبالرجوع الى جدول الأحتمالية Probability table لمربع كاي وامام درجات الحرية المناسبة ومن قيمة مربع كاي المحسوبة وهي 2.08 يمكن تحديد درجة الأحتمالية للأنحراف الموجود في هذه التجربة وهذه القيمة 2.08 عند درجة حرية (تقع بين درجتي أحتمال 0.02 و 0.05 ويمكن تفسير ذلك على ان انحرافها مثل الموجود في المثال السابق وهو ± 9. يمكن حدوث بعض الصدفة من 5-20% من عينات مماثلة لو ان عددا كبيرا من هذه العينات آخذ من نفس العشيرة او بمعنى آخر فأنه إذا كررت نفس التجربة مرات عديدة تحت نفس الظروف فأنه من المحتمل وبمحض الصدفة ان نحصل على قيمة مماثلة لقيمة الأنحراف الموجود في 5-20% من المرات.

ومن المتفق عليه:

1. لو كانت درجة الأحتمال اكبر من 0.05 تعتبر النتائج المشاهدة متفقة مع النتائج المتوقعة على اساس النظرية الفرضية وأن الأنحرافات غير معنوية Insignificance وتعزى للصدفة.

2. لو كانت درجة الأحتمال اقل من 0.05 واكبر من 0.01 يقال ان الأنحرافات معنوية Significance او لا ترجع الى الصدفة بل الى عوامل اخرى سببت هذا الأنحراف.

3. لو كانت درجة الأحتمال اقل من 0.01 يقال ان الأنحرافات ذات معنوية عالية Highly significance، وبذلك يكون من غير المحتمل ان ترجع الأختلافات بين المشاهد والمتوقع الى الصدفة وحدها.

ويتضح من ذلك أنه كلما كبرت قيمة الأحتمالية كلما دل ذلك على وجود توافق جيد Good agreement بين النتائج المشاهدة والمتوقعة على اساس النظرية الفرضية.

الوراثة العملي/ا.د. احسان عرفان حسين

((المختبر الخامس))

تجارب تشتمل على زوجين من الصفات المتضادة

اولا: تجارب على البازلاء والأذرة:

المطلوب:

1. فحص البذور الموجودة والناتجة من تلقيحات معينة ثم تقسيمها الى مجاميع الشكل المظهري Phenotypic classes (ولتقييم الفئات المختلفة يبدأ الفرد في التقسيم آخذا في الأعتبار احدى الصفتين أولاً ثم تقسيم كل فئة الى اثنتين طبقا للصفة الأولى).
2. تحصى عدد البذور في كل فئة مظهرية، ثم نقترح النظرية الفرضية طبقا للنسب المندلية المتوقعة.
3. تحلل النتائج التي نحصل عليها احصائيا باستخدام الطريقة الأحصائية لمربع كاي.
4. يحدد الجيل الذي تمثله هذه العينة ثم تحلل هذه النتائج تحليلاً وراثيا كاملاً.

ملاحظات عامة:

1. يدخل شكل البذرة ولونها ضمن التباين الموجود.
2. عدد الفئات المظهرية اربع ودرجات الحرية 4-1=3.
3. النسبة المندلية المتوقعة في هذه الحالة هي 1:3:3:9 او 1:1:1:1.
4. بأستخدام طريقة مربع كاي تأكد من صحة النظرية الفرضية.

ثانيا: تجارب على حشرة الدروسوفيلا:

تشتمل هذه التجارب تلقيح ذكرين يحملان صفة متنحية (مختزل او مقضوم الجناح) بثلاث اناث عذارى حاملة لصفة متنحية اخرى (مختلفة عن الموجودة في الذكر) او محمولة في كروموسوم

آخر مثل صفة ابنوسية لون الجسم، او تلقيح ذكور برية بأناث عذارى متنحية مزدوجة Double recessive ثم يستمر العمل في هذا التلقيح متبعا نفس الخطوات السابق ذكرها في الأنعزال المندلي للحصول على افراد الجيلين الأول والثاني.

كما تجرى التلقيحات العكسية للتلقيحات السابقة، مع ملاحظة ان يجري التلقيح الأختباري Test cross لأفراد الجيل الأول الخليطة Double heterozygous.

والمطلوب تدوين البيانات التالية:

1. الشكل المظهري والتركيب الجيني للآباء في كل حالة.
2. الشكل المظهري والتركيب الجيني لأفراد الجيل الأول.
3. الفئات المظهرية لأفراد الجيل الثاني وعدد الأفراد في كل فئة مظهرية.
4. تحليل بيانات الجيل الثاني ونتائج التلقيح الأختباري احصائيا باستعمال مربع كاي.
5. تحليل كل تجربة تحليلا وراثيا كاملا.
6. رتب البيانات التي تحصل عليها على هيئة جداول.

الوراثة العملي / احسان عرفان حسين

((المختبر السادس))

الصفات المرتبطة بالجنس Sex linked characters

يطلق على الجينات الموجودة في كروموسوم الجنس Sex chromosome بأنها جينات مرتبطة بالجنس وتبعا لذلك فأن سلوك هذه الجينات تسلك سلوكا مختلفا في التهجينات المختلفة تبعا لوجودها في اي من الجنسين. وتعتبر حشرات الدروسوفيلا ميلانوجاستر من افضل الكائنات الحية لدراسة السلوك الوراثي للصفات المرتبطة بالجنس وغيرها.

تجرى تجارب الأرتباط بالجنس بنفس الخطوات السابق شرحها في الصفات الجسمية في تلقيحات الأنعزال المندلي كما يلي:

1. تلقح ذكور بيض العيون او صفراء الجسم مع اناث غير ملقحة حمر العيون او رمادية الجسم ويجري التلقيح العكسي Reciprocal cross .
2. ذكور عصوية العيون Bar eyes مع اناث عذارى مستديرة العين و التلقيح العكسي.
3. تؤخذ ذكور واناث الجيل الأول F1 الناتجة من احدى التلقيحات السابقة بعد تخديرها وتسجل الصفات المظهرية للذكور والأناث ثم تهجن مع بعضها للحصول على افراد الجيل الثاني F2.
4. بعد ظهور اعداد وفيرة من افراد الجيل الثاني، تخدر وتعزل الى فئاتها المظهرية لكل من الذكور والأناث على حدة.
5. تحلل هذه البيانات احصائيا بأستعمال مربع كاي بعد اقتراح النظرية الفرضية ثم تحلل بعدها تحليلا وراثيا كاملا وتدون البيانات المتحصل عليها في الجدول.
6. تقارن نتائج كل تلقيح بنتائج تلقيحه العكسي وتدون الملاحظات الضرورية.

P1	♀ W+ | | W+	**X**	♂ W |⌈
	حمراء العيون		**بيضاء العيون**
G1	W+ |		W | ⌈
F1	♀ W+ | | W		♂ W+ |⌈
	حمراء العيون (هجينة)		**حمراء العيون**

P2	♀ W+ | | W	**X**	♂ W+ |⌈
	حمراء العيون (هجينة)		**حمراء العيون**
G2	W+ | W |		W+ | ⌈

F2	♀ W+ | | W+	♂ W+ |⌈	W+ | | W	♂ W |⌈
	حمراء العيون	**حمراء العيون**	**حمراء العيون(هجينة)**	**بيضاء العيون**

P1	♀ W | | W	**X**	♂ W+ |⌈
	بيضاء العيون		**حمراء العيون**
G1	W |		W+ | ⌈
F1	♀ W+ | | W		♂ W |⌈
	حمراء العيون (هجينة)		**بيضاء العيون**

الوراثة العملي/أ.د. احسان عرفان حسين

P2	♀ W+ | | W	X	♂ W | Γ	
	حمراء العيون (هجينة)		بيضاء العيون	
G2	W+ | , W |		W | , Γ	
F2	♀ W+ | | W	♂ W+ | Γ	♀ W | | W	♂ W | Γ
	حمراء العيون (هجينة)	حمراء العيون	بيضاء العيون	بيضاء العيون

الوراثة العملي/أ.د. احسان عرفان حسين

((المختبر السابع))

الأرتباط والعبور Linkage and crossing over

لقد سبق ان درسنا تجربة التوزيع الحر للجينات ولاحظنا من نتائج التجربة ان الجينين المختلفين يقعان على كروموسومين مختلفين ولهذا السبب اصبح انفصال الجينين المختلفين عن بعضهما عند تكوين الكميتات في عملية الأنقسام الأختزالي حرا وبدون تقيد. وعند دراسة سلوك جينات اخرى في كائنات حية مختلفة قد تظهر نتائج التلقيحات ان توزيع مثل هذه الجينات عند تكوين الكميتات يصبح مقيدا ومحددا، وبعبارة اخرى تميل هذه الجينات ان ترقد في نفس الكميت، ويرجع سبب ذلك الى وقوعها على نفس الكروموسوم، واطلقوا على ظاهرة وقوع الجينات على نفس الكروموسوم بالأرتباط Linkage. ونتيجة لتجارب موركان Morgan وجماعته على الأرتباط في حشرة الدروسوفيلا ميلانوجاستر فأنه وضع نظرية الكروموسوم Chromosome theory التي تنص على ان الكروموسومات هي التي تحمل الجينات بترتيب طولي ويشغل كل جين مكانا ثابتا ومعينا على الكروموسوم، وتكون جميع الجينات التي تقع على نفس الكروموسوم مجموعة ارتباطية واحدة Linkage group. ولهذا نتوقع ان يكون عدد المجاميع الجينية المرتبطة في اي كائن حي مساويا للعدد الأحادي للكروموسومات. فنجد مثلا اربع مجاميع ارتباطية في حشرة الدروسوفيلا ميلانوجاستر، إذ ان هذه الذبابة تحتوي على اربعة ازواج من الكروموسومات. ان الجينات المرتبطة لا تنتقل دائما إلى نفس الكميت بل انما يمكن ان تنفصل عن بعضهما عن طريق التبادل بين الكروموسومات المماثلة في الدور التمهيدي الأول للأنقسام الأختزالي، وقد اطلق على هذا التبادل بالعبور Crossing over.

العبور المفرد Single crossing over في نبات الذرة

وهو حصول عبور واحد بين جينين مرتبطين. فعند تلقيح نبات ذرة حبوبه غير منكمشة FF وملونة CC بآخر يحتوي على حبوب منكمشة ff وغير ملونة cc. بعد الحصول على الجيل الأول CcFf تم تلقيحه ختباريا Test cross وكانت الحبوب الناتجة من هذا التلقيح على اربع انواع وهي:

1. ملونة غير منكمشة CcFf.
2. ملونة منكمشة Ccff.
3. غير ملونة غير منكمشة ccFf.
4. غير ملونة منكمشة ccff.

ويتم حساب النسبة المئوية لتكرار العبور كما يلي:

$$\text{تكرار العبور} = \frac{\text{الأتحادات الجديدة}}{\text{المجموع الكلي}} \times 100$$

P1   (c f / c f) غير ملونة منكمشة   X   (C F / C F) ملونة غير منكمشة

G1   c f   C F

F1   (C F / c f) ملونة غير منكمشة (هجينة)

P2   (C F / c f) ملونة غير منكمشة (هجينة)   X   (c f / c f) غير ملونة منكمشة

الوراثة العملي/أ.د. احسان عرفان حسين

G2 C F c f c f

c F C f

F2 C F c f

c f c f

غير ملونة منكمشة **ملونة غير منكمشة (هجينة)**

c F C f

c f c f

ملونة منكمشة **غير ملونة غيرمنكمشة**

العبور المزدوج Double crossing over في حشرة ذبابة الفاكهة

1. لقح حشرات عذارى صفراوات الجسم (y) وذات أجنحة عديمة العروق العرضية Cross vain less cv وشعر ثنائي التشعب Forked (f) بذكور برية. ابعد الآباء بعد 7 الى 8 أيام. لاحظ مظهر حشرات الجيل الأول (F1) بالنسبة لهذه الصفات الثلاث من الذكور والآناث.

2. انقل عدة ازواج من افراد الجيل الأول الى زجاجة تربية جديدة وليس من الضروري ان تكون الأناث عذارى. ابعد الاباء بعد 7 او 8 أيام. صنف حشرات الجيل الثاني (F2) بالنسبة إلى لون الجسم والعروق العرضية للأجنحة وشكل الشعر. عين عدد كل نوع ويتوقع ان تجد ثمانية انواع وهي:

1. حشرات صفراء الجسم، عديمة العروق العرضية، وشعر ثنائي التشعب.
2. حشرات رمادية اللون، ذات عروق عرضية، وشعرها طبيعي.
3. حشرات صفراء الجسم، عديمة العروق العرضية، وشعر طبيعي.

4. حشرات رمادية اللون، ذات عروق عرضية، وشعر ثنائي التشعب.

5. حشرات رمادية اللون، عديمة العروق العرضية، شعر ثنائي التشعب.

6. حشرات صفراء الجسم، ذات عروق عرضية، وشعر طبيعي.

7. حشرات صفراء الجسم، ذات عروق عرضية، وشعر ثنائي التشعب.

8. حشرات رمادية اللون، عديمة العروق العرضية، وشعر طبيعي.

عين من النتائج اعلاه مايلي:

1. الأنواع الأبوية (غير العبورية).

2. الأنواع الناتجة عن العبور المفرد.

3. الأنواع الناتجة عن العبور المزدوج.

احسب تكرار العبورين المفردين وتكرار العبور المزدوج الملاحظ.

P1 $\frac{y^+ \ cv^+ \ f^+}{y^+ \ cv^+ \ f^+}$ X $\frac{y \ cv \ f}{y \ cv \ f}$

رمادية الجسم، جناح ذو عروق، شعر طبيعي **صفراء الجسم،جناح عديم العروق، شعر ثنائي التشعب**

G1 $\frac{y^+ \ cv^+ \ f^+}{}$ $\frac{y \ cv \ f}{}$

F1 $\frac{y^+ \ cv^+ \ f^+}{y \ cv \ f}$

رمادية الجسم، جناح ذو عروق، شعر طبيعي (هجينة)

P2 $\frac{y^+ \ cv^+ \ f^+}{y \ cv \ f}$ X $\frac{y \ cv \ f}{y \ cv \ f}$

صفراء الجسم،جناح عديم، شعر ثنائي التشعب العروق رمادية الجسم، جناح ذو عروق، شعر طبيعي (هجينة)

G2 $\underline{y\ cv\ f}$ $\underline{y^{+}\ cv^{+}\ f^{+}}$ $\underline{y\ cv\ f}$

$\underline{y\ cv\ f^{+}}$ $\underline{y^{+}\ cv^{+}\ f}$

$\underline{y^{+}\ cv\ f}$ $\underline{y\ cv^{+}\ f^{+}}$

$\underline{y\ cv^{+}\ f}$ $\underline{y^{+}\ cv\ f^{+}}$

الصنوف	الأنماط الظاهرية	الأنماط الوراثية (F2)
1	صفراء الجسم ،جناح عديم العروق ، شعر ثنائي التشعب	$\frac{y\ cv\ f}{y\ cv\ f}$
2	رمادية الجسم ،جناح ذو عروق ، شعر طبيعي	$\frac{y^{+}\ cv^{+}\ f^{+}}{y\ cv\ f}$
3	صفراء الجسم ،جناح عديم العروق ، شعر طبيعي	$\frac{y\ cv\ f^{+}}{y\ cv\ f}$
4	رمادية الجسم ،جناح ذو عروق ، شعر ثنائي التشعب	$\frac{y^{+}\ cv^{+}\ f}{y\ cv\ f}$
5	رمادية الجسم ،جناح عديم العروق ، شعر ثنائي التشعب	$\frac{y^{+}\ cv\ f}{y\ cv\ f}$
6	صفراء الجسم ،جناح ذو عروق ، شعر طبيعي	$\frac{y\ cv^{+}\ f^{+}}{y\ cv\ f}$
7	صفراء الجسم ،جناح ذو عروق ، شعر ثنائي التشعب	$\frac{y\ cv^{+}\ f}{y\ cv\ f}$
8	رمادية الجسم ،جناح عديم العروق ، شعر طبيعي	$\frac{y^{+}\ cv\ f^{+}}{y\ cv\ f}$

الوراثة العملي أ.د. احسان عرفان حبيب

((المختبر الثامن))

الخريطة الكروموسومية Chromosome map

من دراسة نتائج العبور المفرد في نبات الذرة والعبور المزدوج في حشرة ذبابة الفاكهة اصبح بالأمكان تعيين عدد الوحدات التي تفصل الجينات المرتبطة، فأذا كانت النسبة المئوية لتكرار العبور المفرد بين الجينين F و C في نبات الذرة هي 4% (وتدعى هذه بقيمة العبور) فأن ذلك يدل على ان المسافة بين هذين الجينين المرتبطين هي (4) وحدات، اما في حالة دراسة نتائج العبور المزدوج في حشرة ذبابة الفاكهة وفي كائنات اخرى اصبح بالأمكان ايضا تعيين ترتيب متسلسل للجينات الواقعة على نفس الكروموسوم والمسافة بالوحدات بين هذه الجينات المرتبطة وتستعمل النسبة المئوية لتكرار العبور في تعيين المسافة بين الجينات الواقعة على الكروموسوم الواحد.

ومن تحليل نتائج العبور المزدوج بين ثلاث جينات مرتبطة علينا اولا ان نعين الجين الذي يقع في الوسط وثانيا حساب النسبة لتكرار العبور المفرد بين الجينين الوسطى والجينين اللذين يقعان على جانبيه وثالثا رسم الخريطة الكروموسومية وبمعنى آخر وضع الجينات الثلاثة على الكروموسوم الواحد حسب تسلسلها والمسافة بالوحدات بين هذه الجينات.

التوافق والتداخل Coincidence and Interference

بالرجوع إلى تجربة العبور المزدوج بين الجينات (y, cv, f) المرتبطة على الكروموسوم الجنسي نجد من تحليل النتائج ان الجين (cv) يقع في الوسط، وبعد تقدير قيمة العبور المفرد بين الجين الوسطي (cv) والجينين (y , f) يمكننا ان نحسب قيمة احتمال العبور المزدوج المتوقع، وتساوي قيمة هذا الأحتمال الى حاصل ضرب نسبة العبورين في المنطقتين (cv , y) و (cv , f). واذا قارنا قيمة العبور المزدوج المشاهد مع قيمة العبور المزدوج المتوقع نجد قد حدث نقص في نسبة العبور المزدوج المشاهد من المتوقع، وبعبارة اخرى هو ان حصول العبور المفرد في المنطقة (y , cv) قلل من حدوث العبور المفرد في المنطقة (f , cv) او ان العبور في المنطقة (f ,cv) قلل من وقوع العبور في المنطقة (y , cv)، وقد اطلق على هذه الظاهرة بالتداخل Interference

ويتوقف التداخل على المسافة بين الجينات المرتبطة. وتعرف شدة التداخل بمعامل التوافق Coefficient of coincidence وتستخرج قيمة معامل التوافق من المعادلة التالية:

$$\textbf{معامل التوافق} = \frac{\textbf{قيمة العبور المزدوج المشاهد}}{\textbf{قيمة العبور المزدوج المتوقع}}$$

وبعد تقدير قيمة معامل التوافق يمكننا أن نعين قيمة التداخل في المعادلة:

قيمة التداخل = 1 – قيمة معامل التوافق

((المختبر التاسع))

تداخل فعل الجينات (Gene interaction)

علمنا عند دراستنا لقانون انعزال العوامل (الجينات) Law of segregation ان ازواج العوامل المتضادة Contrasted factors بوجودها سوية في هجين واحد لا تمتزج Blend ولا يلوث Contaminate بعضها البعض او ان العاملين (الجينين) المتضادين لايؤثر احدهما على الآخر ولايتأثر احدهما بالآخر وهما هذا السبب ينعزلان عن بعضهما عند تكوين الكميتات ويزدوجان مع بعضهما عند تكوين الزايكوت وفي كلتا الحالتين يبقى كل منهما محافظا على هويته الخاصة Identity وفي حالة وجود زوج من العوامل المضادة في هجين ما فأن الصفة التي تظهر تمثل احد العاملين ويسمى بالعامل المتغلب Dominant factor بينما يتنحى العامل الآخر ويسمى بالعامل المتنحي Recessive factor، لكن العامل المتنحي يبقى محافظا على هويته، إذ يظهر تأثيره في الجيل الثاني عندما تتهيأ له فرصة بغياب العامل المتغلب، وعلى اعتبار ان جاذبية معينة بين كاميت يحمل عاملا (معينا) وكاميت آخر يحمل نفس العامل او عامل مضاد غير موجود فأن نسبة الصفات المظهرية في الجيل الثاني تورث بنسبة 4/3 متغلب إلى 4/1 متنحي.

كما اظهرت الدراسات التي تلت اعمال مندل صحة تلك الأعمال والأستنتاجات فقد ظهرت ان المسألة ليست كذلك دائما خصوصا من ناحية استقلالية فعل العامل (الجين) عن الجين المقابل له، إذ وجد أن كثيرا من العوامل المتضادة يؤثر ويتأثر فعل بعضها بالبعض الآخر وكمثال على ذلك وراثة لون الأزهار في نبات حلق السبع Snap dragon ولون الأزهار في نبات الساعة الرابعة (لالة عباس) واللون في بعض الأبقار واللون في الدجاج الأندلسي. وحيث ان زوج العوامل المتضادة عندما تجتمع في الجيل الأول فأن الصفة التي تظهر تكون وسطا بين صفتي الأبوين او صفة وسط بين فعل كل من العاملين المتضادين وأن الصفات المظهرية لا تظهر في الجيل الثاني بنسبة 1:3 وانما بنسبة 1:2:1 وهذا يعني بصورة واضحة ان هذه العوامل ليست مستقلة عن بعضها البعض في تعبيرها بل تتداخل مع بعضها لأظهار صفة ما.

وكما قد قيل عن تداخل زوج العوامل المتضادة في تعبيرها كذلك يقال عن امكانية تداخل ازواج الجينات المختلفة التي تحتل مواقع مختلفة على الكروموسوم او التي توجد على كروموسومات

مختلفة بحيث يؤثر بعضها في البعض الآخر ويتأثر به مما يخالف ما جاء في قانون مندل الثاني (الأنعزال الحر للعوامل) والذي كان يفترض ان انعزال زوج من الجينات مستقل عن انعزال الأزواج الأخرى لايؤثر او يتأثر بأنعزال بقية ازواج الجينات، ولهذا نجد ان نسبة الفئات المظهرية التي كانت حسب قانون الأنعزال الحر للعوامل هي 1:3:3:9 في الجيل الثاني تتغير بشكل او بآخر حسب نوعية التداخل في تعبير الجينات. وقد دلت تجارب وراثية كثيرة على صحة وجود تداخل في تعبير الجينات وكأمثلة على ذلك شكل العرف في الدجاج، لون البصلة في البصل، لون الثمرة في القرع، لون الشعر في القوارض، لون الريش في الدجاج، لون الأوراق في الذرة الصفراء، لون الأليرون في الذرة الصفراء والتبقع في جلد الأنسان ....إلخ.

تداخل فعل الجينات في تكوين لون الأليرون في نبات الذرة

Gene interaction in Aleurone color formation of *Zea mays*

لقد كان نبات الذرة الصفراء من النباتات التي استعملت وتستعمل الآن لدراسة كثير من القضايا والمشاكل الوراثية، ويعود سبب اختيار الوراثيين لهذا النبات دون غيره من النباتات الآخرى إلى مايأتي:

1. **نبات الذرة احادي المسكن Monoecious:** حيث تقع اعضاء التذكير واعضاء التأنيث في نورات مختلفة على نفس النبات، ولهذا السبب فمن السهولة بدرجة كبيرة اجراء التلقيحات في مثل هذا النبات.

2. توجد اعضاء التأنيث في هذا النبات على هيئة زهيرات خصبة في نورة واحدة ولهذا السبب فأن التلقيح الواحد يؤدي الى تكوين عدد كبير من الحبوب واقعة على عرنوص (كوز) واحد مما يسهل كثيرا التعرف على الصفات الوراثية تحت الدراسة.

3. تتميز كروموسومات هذا النبات بطولها الكبير ووضوحها خصوصا في الدور الضام Pachytene من الدور التمهيدي الأول Prophase I للأنقسام الخيطي الأختزالي Meiosis مما يساعد على دراسة السلوك الكروموسومي وخصوصا مما يتعلق منه بالتغيرات المجهرية.

4. ان نوع Species هذا النبات يضم سلالات Strains مختلفة تتميز عن بعضها البعض وراثيا ومورفولوجيا.

أليرون حبة الذرة **Aleurone of *Zea mays* grains**

يمثل الأليرون طبقة الخلايا الخارجية من اندوديرم حبة الذرة، وقد تكون خلايا الأليرون خالية من الصفات او قد تحتوي على صفات تختلف من اللون الأحمرإلى اللون الأرجواني الغامق Dark purple. وتقوم خلايا الأليرون بحفظ واختزان الغذاء على هيئة بروتين، ويظهر اللون الأحمر للأليرون نتيجة لوجود جينات متغلبة معينة اولا ولوجود جين اللون الأحمر للأليرون (Prr) ثانيا، وإذا وجد اليل هذا الجين بدلا منه (Pr) فيصبح لون الأليرون عند ذلك ارجوانيا، وإذا وجد احد الجينات الممهدة لظهور اللون بصورة متنحية فأن اللون لايمكن ان يتكون وفي حالات اخرى قد يوجد احد الجينات المتغلبة المانعة لتكوين اللون وبذلك يمتنع التلون على الرغم من وجود جين تكوين اللون.

((المختبر العاشر))

النسخة المظهرية (Phenocopy)

هي نسخة او صفة مظهرية اكتسبها الكائن الحي بسبب تغيير الظروف البيئية وهذه الصفة تشابه الصفة المظهرية المسؤول عنها تركيب جيني معين. عند اضافة نترات الفضة $AgNO_3$ الى الوسط الغذائي الذي تتغذى عليه ذبابة الفاكهة *Drosophila* فأنها تسبب في تغير صفة لون الجسم الرمادي الى اللون الأصفر الفاتح. ان عمل نترات الفضة هو تثبيط انزيم التايروسينيز Tyrosinase الذي يحول مادة التايروسين Tyrosine الى الميلانين Melanine.

$$\textbf{Tyrosine} \xrightarrow{\textbf{Tyrosinase}} \textbf{Melanine}$$

ان تثبيط عمل هذا الأنزيم سوف يزيد من مادة التايروسين في الغدد اللعابية لعدم تحولها إلى الميلانين وبالتالي سوف يكتسب لون جسم الحشرة اللون الأصفر المشابة للون الجسم الأصفر التي هي الصفة المتنحية (yy) الناتجة عن طفرة وراثية والواقعة على الكروموسوم الجنسي الأول (X).

طريقة العمل:

1. يتم تضريب زوجين من ذبابة الفاكهة *Drosophila melanogaster* وتنمى على الوسط الغذائي الحاوي على 0.25-0.5غم/لتر من مادة نترات الفضة وتوضع الأنابيب في الحاضنة المخصصة.
2. يتم قتل الآباء بعد اسبوع من تاريخ التضريب.
3. يتم ملاحظة حشرات الجيل الأول والتي يكون لون جسمها اصفراً بسبب وجود نترات الفضة.
4. يتم تضريب زوجين من افراد الجيل الأول وتنمى على الوسط الغذائي الخالي من نترات الفضة.
5. يتم قتل الآباء بعد اسبوع من تاريخ التضريب.

6. يتم ملاحظة حشرات الجيل الثاني والتي يكون لون جسمها رمادياً بسبب ظهور صفة اللون البري بعد زوال العامل البيئي المؤثر والذي هو نترات الفضة $AgNO_3$.

Media + $AgNO_3$

Wild Type insects (♂+♀) ⟶ Yellow body (♂+♀)

0.25-0.5 g/l

Normal Media

Yellow body (♂+♀) ⟶ Wild Type insects (♂+♀)

الوراثة العملي/أ.د احسان عرفان حسين

((المختبر الحادي عشر))

عزل سلالات بكتريا الرايزوبيوم *Rhizobium* من العقد الجذرية للنباتات البقولية

يتم عزل بكتيريا الرايزوبيوم من جذور النباتات البقولية التي تجمع من مناطق زراعية حسب طريقة (Vincent, 1970 , 1982) وكما في ادناه:

1. يقتلع النبات الكامل من التربة ويغسل بماء الحنفية الجاري لأزالة التربة العالقة بالجذور.
2. تأخذ من ثلاثة الى اربعة عقد جذرية وردية اللون من الجذور وتغسل بالماء المقطر المعقم.
3. تغمس العقد الجذرية في كحول الأيثانول تركيز 95% ولمدة من 2-4 دقائق.
4. تغسل العقد الجذرية بعد ذلك بالماء المقطر المعقم.
5. تغمس العقد الجذرية بمحلول كلوريد الزئبق $HgCl_2$ المحمض بتركيز 0.1% لمدة 3-6 دقائق (يحضر هذا المحلول من اذابة 1 غم من $HgCl_2$ في 5 مل من حامض HCl المركز ويكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر).
6. تغسل العقد الجذرية من 5-7 مرات بالماء المقطر المعقم لأزالة بقايا محلول كلوريد الزئبق المحمض والكحول.
7. تسحق العقد الجذرية بأستخدام قضيب زجاجي في انبوبة اختبار حاوية على 1.0 مل من محلول السلاين المعقم Sterile Saline الذي يكون بتركيز 0.85% (يحضر من اذابة 0.85 غم من NaCl في 100 مل من الماء المقطر ويعقم بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/انج^2).
8. يفرش 0.1 مل من العالق على اطباق حاوية على اوساط غذائية MSY صلبة، وتحضن الأطباق في حاضنة كهربائية تحت درجة حرارية 28±2ºC ولمدة من 2-4 أيام.
9. المستعمرات اللزجة البيضاء اللون تختار وتنقى ومن ثم تفحص لغرض التأكد منها.
10. تحفظ السلالات المنقاة في ثلاجة كهربائية وتحت درجة حرارة 4ºC.

((المختبر الثاني عشر))

تحضير الأوساط الزرعية الخاصة ببكتريا الرايزوبيوم

1. تحضير الوسط الغذائي الكامل Yeast extract mannitol (YEM) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (YEM) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Vincent, 1970) من اذابة المواد المذكورة في الجدول أدناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Mannitol	10
Yeast extract	10
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4.7H_2O$	0.2
NaCl	0.1
$CaCO_3$*	3
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

*= يضاف عند الحاجة إلى معادلة pH.

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 6.8 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5–2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على أوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121°C لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

2. تحضير الوسط الغذائي الكامل Mannitol salt extract (MSY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (MSY) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1989) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Mannitol	10
Yeast extract	0.2
K_2HPO_4	0.2
KH_2PO_4	0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$CaCl_2.2H_2O$	0.05
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه الى 6.8 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1N، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5–2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

3. تحضير الوسط الغذائي الكامل Tryptone-yeast extract (TY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (TY) حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1988) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Tryptone	5
Yeast extract	3
$CaCl_2.2H_2O$	0.12
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5–2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

4. تحضير الوسط الغذائي الناقص *Rhizobium* minimal medium (RMM) لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الناقص (RMM) لبكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Singh *et al*., 1984) من اذابة المواد المذكورة في الجدول ادناه:

المحلول A:

المادة	الكمية غم / لتر
$Na_2HPO_4.12H_2O$	0.45
$(NH_4)_2SO_4$	2
$FeCl_3$	0.002
$MgSO_4.7H_2O$	0.1
$CaCl_2.2H_2O$	0.040
Distilled water	يكمل الحجم إلى 990 مل بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الآكار Agar بتركيز 1.5–2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

المحلول B:

يحتوي هذا المحلول على 20% من الكلوكوز الذي يعقم بواسطة الفلتر (يحضر هذا المحلول من اذابة 20 غم من الكلوكوز في 100 مل من الماء المقطر المعقم ويرشح بأستخدام الفلتر). ولتحضير 1 لتر من الوسط الغذائي الناقص يتم اضافة 10 مل من المحلول B الى 990 مل من المحلول A.

5. تحضير الوسط الغذائي الكامل Tryptone-yeast extract (TY) medium لبكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium*

يتم تحضير الوسط الغذائي الكامل (TY) حسب طريقة (Khanja and Kumar, 1988) من اذابة المواد المذكورة في الجدول أدناه:

المادة	الكمية غم / لتر
Tryptone	5
Yeast extract	3
$CaCl_2.2H_2O$	0.12
Distilled water	يكمل الحجم إلى 1 لتر بالماء المقطر

ينظم pH للوسط الغذائي اعلاه إلى 7 بأستخدام NaOH بتركيز 0.1 عياري، ويضاف الأكار Agar بتركيز 1.5–2.0 غم لكل 100 مل من الوسط الغذائي لغرض الحصول على اوساط غذائية صلبة، ومن ثم يعقم الوسط الغذائي بالمؤصدة تحت درجة حرارة 121ºC لمدة 15 دقيقة وتحت ضغط جوي 15 بار/أنج^2.

((المختبر الثالث عشر))

تطفير بكتيريا الرايزوبيوم بأستخدام حامض النايتروز (HNO_2) Nitrous acid
لغرض الحصول على طافرات العوز الغذائي Auxotrophic mutants

يتم تطفير بكتيريا الرايزوبيوم بحامض النايتروز حسب طريقة (Kerppola and Kahn, 1988) وكما في الخطوات التالية:

1. يتم تحضير حامض النايتروز (HNO_2) Nitrous acid في المختبر قبل البدء بعملية التطفير بأذابة 0.035 غم من نترات الصوديوم ($NaNO_2$) Sodium nitrite في 5 مل من بفر استيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز (pH4.6) 0.1 مولاري.
2. يتم تحضر بفر استيت الصوديوم Sodium acetate buffer بتركيز مولاري في دورق حجمي بحجم 100 مل وذلك بخلط 25.5 مل من حامض الأسيتك Acetic acid بتركيز 0.2 مولاري مع 24.5 مل من الصوديوم استيت Sodium acetate بتركيز 0.2 مولاري. يكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر ومن ثم يعقم بالمؤصدة.
3. يوضع 10 مل من الوسط الغذائي السائل TY المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم في حاضنة هزازة لمدة 24 ساعة ويؤخذ منه بعد ذلك 0.1 مل ويعمل له تخافيف متسلسلة وتنمى على وسط غذائي صلب لغرض حساب عدد المستعمرات النامية CFU.
4. يؤخذ 1.5 مل ايضاً من نفس الوسط الغذائي المزروع ببكتيريا الرايزوبيوم وتنقل الى انبوبة Eppendorf ويتم ترسيب الخلايا بأستخدام الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق ومن ثم يتم التخلص من الجزء الطافي ويعلق الراسب بأستخدام Vortex ببفر Sodium acetate (0.1 M) .
5. يتم ترسيب الخلايا مرة أخرى بأستخدام الطرد المركزي بسرعة 6000 دورة/دقيقة ولمدة 10 دقائق ويتم التخلص من الجزء الطافي ويتم تعليق الراسب بـ 1 مل من حامض النايتروز Nitrous acid المحضر حديثاً.

6. يسحب من العينة بعد 10 و 15 و 20 دقيقة من بعد البدء بعملية التطفير ويغسل بالسلاين (0.85% NaCl) لأزالة حامض النايتروز المتبقي ومن ثم تزرع الخلايا في الوسط الغذائي TY السائل وتحضن لمدة 8 ساعات لعزل الطفرات الراجعة.
7. تغسل الخلايا بعد ذلك بمحلول السلاين (0.85% NaCl) وتنمى الخلايا لمدة 6 ساعات على الوسط الغائي السائل الناقص RMM.
8. يضاف Penicillin بتركيز 300 µg/ml إلى الوسط الغذائي السائل الناقص RMM وتحضن لمدة ساعتين لقتل الخلايا التي لاتحتوى على طفرات غذائية.
9. تغسل الخلايا مرتين بمحلول السلاين (0.85% NaCl) ويعمل لها تخافيف متسلسلة وتزرع على الوسط الغذائي TY الصلب وتحضن في الحاضنة الكهربائية لمدة 24-48 ساعة وتحت درجة حرارة 28ºC±2 وبعد ذلك تحسب عدد المستعمرات النامية ومن ثم تخضع لأختبارات الكشف عن طافرات العوز الغذائي.
10. يتم حساب النسبة المئوية لعدد المستعمرات المتبقية وذلك بتقسيم عدد المستعمرات النامية والمحسوبة في الخطوة رقم 9 على عدد المستعمرات النامية والمحسوبة في الخطوة رقم 3 مضروباً في 100.

((المختبر الرابع عشر))

استخلاص الدنا من بكتيريا الرايزوبيوم *Rhizobium* بطريقة Sambrook

يتم عزل دنا بكتيريا الرايزوبيوم حسب طريقة (Sambrook *et al*., 1989) وكما في ادناه:

1. تنمى بكتيريا الرايزوبيوم على الوسط الغذائي TY الصلب لمدة يومين وتحت درجة حرارة 28ºC.
2. تؤخذ كمية من المزروع البكتيري بواسطة الـ Loop ويتم تعليقها بـ 25 µl من الماء المقطر المعقم في انبوبة Eppendorf.
3. يتم اضافة 25 µl من بفر التحلل Lysis buffer المحضر حديثاً المكون من NaOH (0.1N) و SDS بتركيز 0.5%.
4. توضع انابيب Eppendorf الحاوية على الخليط في حمام مائي لمدة 15 min.
5. يتم اضافة 200 µl من بفر TE المكون من (10 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA) ويتم طردها مركزياً لمدة 15 min وبسرعة 13000 rpm.
6. ينقل الجزء الطافي المتكون والحاوي على الدنا إلى انبوبة Eppendorf جديدة ومعقمة.
7. يتم تعيين تركيز ونقاوة الدنا بأستخدام الـ UV-Spectrophotometer أو Nanodrop بأستخراج نسبة A_{260}/A_{280} وأن الدنا النقي تكون قيمة نسبة الأمتصاص هي 1.8±0.1 (Clarck, 1997), وتحفظ العينة تحت درجة حرارة -20ºC.
8. يستخدم 100 ng من الدنا كقالب لغرض أجراء اختبار الـ PCR.

((المختبر الخامس عشر))

استخلاص الدنا من النباتات بطريقة Edwards

DNA extraction from plants by Edwards's procedure

طريقة عمل الطريقة حسب الخطوات التالية:

1. يتم وضع انسجة أوراق النبات (بضع ملغرامات تكون كافية) في انبوبة Eppendorf بحجم 1.5 مل.
2. تطحن العينة في درجة حرارة الغرفة بدون بفر لمدة 15-20 ثانية او لغاية خروج السائل من الخلايا.
3. يضاف 400µl من بفر الأستخلاص Extraction buffer ويخلط مع العينة بالـ Vortex لمدة 5 ثواني. في هذه اللحظة تترك العينة تحت درجة حرارة الغرفة ولغاية استخلاص المحتويات من العينة. يتكون بفر الأستخلاص من (200mM Tris-HCl (pH 7.5) ; 25mM EDTA ; 250mM NaCl ; 0.5% SDS).
4. يتم طرد العينة مركزياً وبدرجة دوران 13000 rpm ولمدة دقيقة واحدة تحت درجة حرارة الغرفة.
5. يزال 300 µl الجزء الطافي وينقل إلى انبوبة Eppendorf جديدة ويضاف لها 300µl من Isopropanol وتترك تحت درجة حرارة الغرفة لمدة دقيقتين.
6. يتم طرد العينة مركزياً بسرعة 13000 rpm ولمدة 5 دقائق.
7. يزال جميع الجزء الطافي من الجزء الراسب وتترك لتجف لمدة 20 دقيقة.
8. يذاب الجزء الراسب في 100µl في بفر 1X TE. يتكون TE buffer من (10mM Tris-HCl (pH 8.0 ; 1mM EDTA). في هذه الحالة يمكن خزن العينة لمدة تزيد عن عام واحد تحت درجة حرارة 4ºC.
9. يستخدم 2.5µl من الجزء الراسب المذاب في البفر TE لغرض استخدامه في تحليل الـ PCR لحجم 50µl من محلول التفاعل.