الوراثي، ويمكن أن تتم تلك العملية على مستوى النبات الـ hemizygous، إلاّ أنها تؤخّر – غالبًا – لحين الوصول إلى حالة الأصالة الوراثية homozygosity. كما قد يجرى التقييم على المستوى الجزيئي، أو على مستوى الصفات المرغوب فيها. وعند وجود ارتباط قوى بين التعبير على المستوى الجزيئ ومستوى الصفات، فإن التقييم على المستوى الجزيئي يمكن أن يعطى نتائج سريعة، ويمكّن المربى من إجراء عملية الانتخاب في المراحل المبكرة هذا إلاّ أن مثل هذا الارتباط البسيط قد لا يتوفر فى حالات كثيرة

٢ – الانتخاب للجين المنقول

يعد الانتخاب للجين المنقول transgene selection ضروريًّا لتطوير الصفة المحولة وراثيًا. ولعل أهم عملية انتخاب هى تلك التى يتبين فيها ما إذا كانت النباتات التى أخضعت لعملية التحول الوراثى قد تلقت الجين المرغوب فيه، أم لا

يلى ذلك انتخاب النباتات المحولة وراثيًّا التى تظهر فيها وراثة مندلية للصفة لا تتأثر بالخلفية الوراثية للنبات أو بالعوامل البيئية، ولا تؤثر فيها الصفة المنقولة سلبيًّا على الصفات الأخرى الأصلية بالنبات (عن Zhong ٢٠٠١)

وبعد إنتاج النباتات المعدلة وراثيًّا مباشرة فإنها تُقيَّم أولاً معمليًا وفى حجرات النمو وفى الصوبات الآمنة – المعزولة جيدًا عما يوجد بخارجها – لتحديد طبيعة التعبير للجينات المنقولة، وما إذا كان الشكل المظهرى للنبات المحول وراثيًا فى الاتجاه المرغوب فيه أم لا. تقترن تلك الاختبارات – فى الوقت ذاته – بتحليل جزيئى لتحديد عدد نسخ الجين التى نقلت بالفعل، ومدى سلامة وكمال الدنا المنقول تنتخب – عادة – النباتات التى يثبت تلقيها لنسخة واحدة من الجين المنقول حتى يكون السلوك الوراثى لهذا الجين فى الأجيال التالية بسيطًا ومن الممكن التنبؤ به، كما يسمح ذلك بتجنب أى احتمال لحدوث تفاعلات بين النسخ المختلفة للجين المنقول إلى نفس النبات (عن Dale & Irwin ١٩٩٥)

التحول الوراثى عن طريق بكتيريا الأجروباكتيريم

تعد الأجروباكتيريم *Agrobacterium* من بكتيريا التربة السالبة لصبغة جرام، وهى

تتواجد بصورة طبيعية، ويعرف منها نوعان رئيسيان، هما: *Agrobacterium tumefaciens*، و *A. rhizogenes*، اللذان يعرفان باسم "المهندسون الوراثيون الطبيعيون" natural genetic engineers، نظرًا لقدرتهما على تحويل النباتات وراثيًا.

ونجد فى بيئتها الطبيعية أن *A. tumefacines* تسبب مرض التثأل التاجى crown gall. وتوجد فى الكروموسوم البكتيرى جينات تتحكم فى تعرف البكتيريا على الخلايا القابلة للإصابة فى العائل، وفى الارتباط بتلك الخلايا. هذا .. إلاّ أن قدرة البكتيريا على نقل الدنا الخاص بها - والذى يدمج فى كروموسوم النبات (عملية التحول الوراثى) - والمقاومة للمضادات الحيوية، والقدرة على الإصابة pathogenicity - كل تلك الصفات يُشفَر لها على بلازميد plasmid خاص فى البكتيريا.

ويعد البلازميد قطعة من الدنا تكون مستقلة عن الكروموسوم البكتيرى، ويمكنها الانقسام مستقلة عنه. ويعد بلازميد الطراز البرى للـ *A. tumefacines* هو المسئول عن إحداث التورمات فى النبات العائل، ولذا .. فإنه يعرف باسم tuber inducing (Ti) plasmids.

وعندما تُصيب البكتيريا *A. rhizogenes* النباتات فإنه يتكون بها جذورًا عرضية بكثافة عالية عند موضع الإصابة، الأمر الذى ينظمه الـ Ri plasmid (Ri نسبة إلى root inducing). ولقد طورت نواقل vectors، مثل pRiAu تحتوى على الـ *Ri plasmid*. وتعد الـ Ri vectors مفيدة - خاصة - لدراسة تكوين عقد الرايزوبيم الجذرية، ولأجل الحصول على منتجات الأيض الثانوية من مزارع الجذور، وكذلك فى إنتاج الميكوريزا (الـ Vasicular Arbuscular Mycorrhiza، عن Chahal Gosal ٢٠٠٢).

وكما أسلفنا .. فإن قدرة بكتيريا الـ *A. tumefaciens* على الإصابة وإحداث التثأل تعتمد على وجود بلازميد plasmid كبير بالبكتيريا مسئول عن إحداث التثأل يأخذ الاسم Ti plasmid (من tuber-inducing plasmid). وتوجد بهذا البلازميد قطعة من الدنا محددة بـ 25bp من الـ imperfect direct repeats (أو T-DNA من transfer DNA) هى التى تنتقل إلى النبات. ولا تلزم الجينات التى تقع على الـ T-DNA لانتقاله واندماجه مع دنا النبات الذى ينتقل إليه، ولكنها تلزم لتمثيل حامض أمينى ومشتقات

سكرية له تعرف باسم opines، تستعملها البكتيريا كغذاء لها. كما يوجد بالـ T-DNA جينات مسئولة عن تمثيل الأوكسينات والسيتوكينينات أو تعديلها. يؤدى تمثيل هذه الهرمونات النباتية إلى إحداث نمو جديد فى النبات يقود إلى ظهور أعراض التثأل التاجى. هذا . ويمكن فصل الجينات المسئولة عن تمثيل الهرمونات النباتية والـ opines من الـ T-DNA واستبدالها بجينات جديدة يُرغب فى نقلها وراثيًا، الأمر الذى تحقق بكفاءة عالية فى كثير من الأنواع النباتية، مثل التبغ، والطماطم، والأرز، والذرة، والبيتونيا، والـ *Arabidopsis* (عن Coury & Feldmann ١٩٩٨).

مدى عوائل الأجروبكتيريم

استمر الاعتماد على البكتيريا *A. tumefaciens* لفترة طويلة كطريقة مفضلة لإجراء التحولات الوراثية فى ذوات الفلقتين، التى يعرف جيدًا كيفية تجديد نموها النباتى من مزارع الأنسجة. ويتضمن مدى العوائل لهذه البكتيريا حوالى ٦٠٪ من معراة البذور، وكل ذوات الفلقتين من مغطاة البذور. كذلك أمكن تحقيق التحول الوراثى باستعمال الأجروباكتيريم بنجاح فى بعض أنواع ذوات الفلقة الواحدة، مثل الأسبرجس *Asparagus officinalis*، والنرجس narcissus، واليام *Dioscoria bulbifera* وقد أفاد فى هذا الشأن معاملة الأجروبكتيريم المستعملة بإفرازات الجروح (وهى مركبات فينولية) من درنات البطاطس، أو ببعض المركبات الفينولية المخلقة معمليًا مثل الـ acetosyringone إما أثناء النمو البكتيرى، وإما أثناء زراعتها المشتركة مع النسيج المراد تحويله وراثيًا كذلك أمكن تحويل الأرز وراثيًا باستعمال الأجروباكتيريم، وطبقت الطريقة التى استخدمت معه فى عمليات تحول وراثى ناجحة فى كل من الشعير، والقمح، والذرة، وقصب السكر (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

لا تعد غالبية النباتات الوحيدة الفلقة من العوائل الطبيعية للأجروباكتيريم المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى؛ فلم تثبت القابلية للإصابة بالبكتيريا – فى غير ذوات الفلقتين - سوى فى الأنواع التابعة للرتبتين: Liliales، و Arales. وبالمقارنة ثبتت المقاومة للبكتيريا فى جميع النباتات التى اختبرت من رتبة Poales، إلا أن بعض

النباتات الوحيدة الفلقة التى تستعصى إصابتها بالبكتيريا يمكن – تحت ظروف خاصة – تحويلها وراثيًا بالأجروباكتيريم (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥).

وكما سبق أن أوضحنا .. فقد ثبت إمكان نقل الـ T-DNA من الأجروباكتيريم إلى الخلايا النباتية لعديد من وحيدات الفلقة الهامة، مثل الذرة، والأرز، والقمح. ولقد وجد فى الذرة أن النبات ينتج مركب أيض ثانوى ذات فعل بكتيرى مثبط يمنع حث الـ vir genes، إلا أن هذا المركب ليس ثابتًا، حيث أدت فترة من الزراعة فى مزارع الأنسجة قبل التلقيح بالبكتيريا، أو إطالة فترة مزرعة الأنسجة مع البكتيريا إلى التغلب على هذا التأثير المثبط.

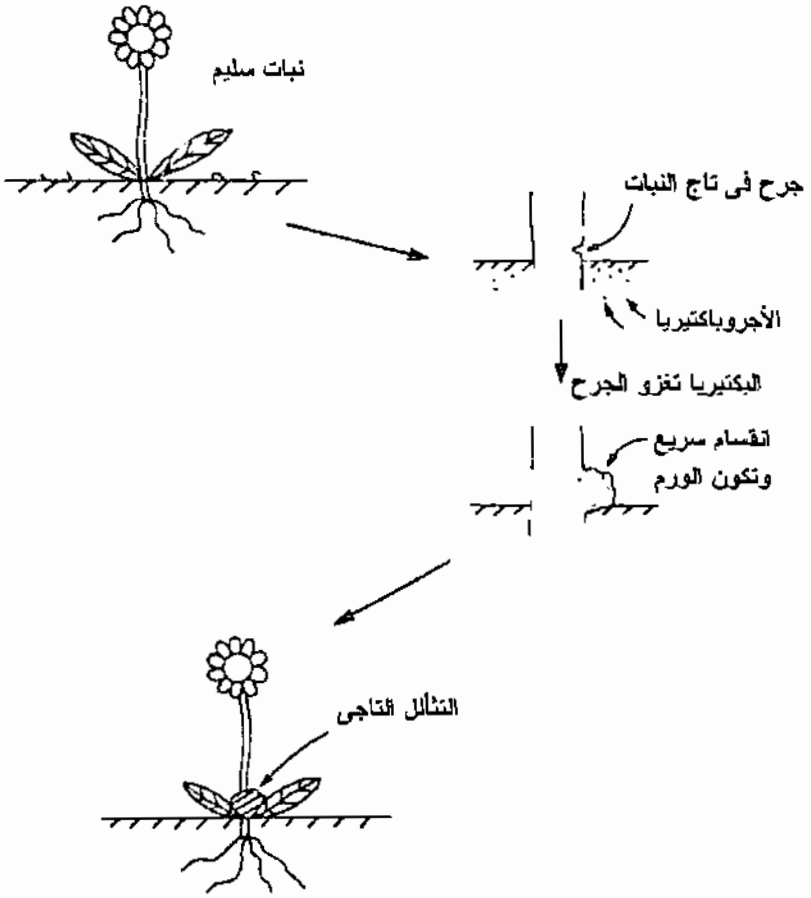
هذا وتنتج سلالات الأجروباكتيريم المختلفة آليلات خاصة من الـ vir A gene، يمكن لبعضها أن يشفر لبروتين vir A غير حساس للمركب الأيضى الثانوى الذى تطلقه النباتات الأحادية الفلقة. ولذا فإنه من الضرورى فى عمليات التحول الوراثى للنباتات الأحادية الفلقة استعمال سلالة أجروباكتيريم تحتوى على جين vir A متوافق معها (عن Block ١٩٩٣).

كذلك أمكن زيادة كفاءة التحويلات الوراثية المعتمدة على بكتيريا الأجروباكتيريم، والتغلب على مشكلة عدم قدرة البكتيريا على إصابة عوائل معينة باللجوء إلى الترددات الصوتية العالية sonication. وفى هذه الطريقة يُعَرَّض النسيج النباتى المستهدف لفترات قصيرة من الموجات الصوتية الفائقة ultrasound فى وجود الأجروباكتيرم. ولقد أمكن بهذه الطريقة الحصول على تحويلات وراثية ثابتة فى فول الصويا. وأوضح التحليل الهستولوجى أن المعاملة أحدثت فى النسيج النباتى تشققات دقيقة ومتجانسة وقنوات، وهى التى ربما تكون قد ساعدت فى تسهيل الإصابة بالبكتيريا (عن Simmond & Smartt ١٩٩٩).

باثولوجى الإصابة بالأجروباكتيريم

عندما تحدث الجروح فى منطقة تاج النبات – أو فى أى مكان آخر منه – فإنه يمكن أن تحدث العدوى بالبكتيريا *A tumefaciens* بسهولة، حيث تبدأ الخلايا النباتية فى

مكان الإصابة فى الانقسام والتضخم لتكون ورمًا tumor، أو ما يعرف بالتثألل التاجى (شكل ١٢-٢)، ثم تبدأ فى تمثيل مشتق من الأرجنين يطلق عليه اسم أوبين opine، يكون - عادة - إما نوبالين nopaline، وإما أوكتابين octapine؛ الأمر الذى يتوقف على سلالة الأجروباكتيريم المستعملة فى العدوى تستخدم هذه الأوبينات كمصادر للطاقة بواسطة البكتيريا وجدير بالذكر أن سلالات بكتيريا الأجروباكتيريم التى تستحث تمثيل النوبالين يمكنها النمو على النوبالين وليس الأوكتابين، والعكس بالعكس. وبينما توجه البكتيريا أيض النبات لإنتاج الأوبينات التى تستفيد منها كمصدر للطاقة، فإن تلك المركبات ليست لها فائدة للنبات (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).



شكل (١٢-٢) كيفية ظهور أعراض التألل التاجى crown gall.

ويعطى جدول (١٢-١) أمثلة لعدد من طرز opines من كل من الـ Ti plasmids والـ Ri plasmids (عن Grant وآخرين ١٩٩١).

جدول (١٢-١): أمثلة لِعدد من طرز الـ **opines** من الـ **Ti plasmids**، والـ **Ri plasmids**.

أمثلة لسلالات الأجروباكتيريم	نوعيات الـ Opines	طراز opine
		Tiplasmids
B6, ACH5	Octopine, octopinic acid, lysopine, histopine, agropine, agropinic acid. Mannopine, mannopinic acid	Octopine
C58, T37	Nopaline, nopalinic acid, agrocinopine A	Nopaline
AT1, AT4	Agropine, agropinic acid, mannopine, mannopinic acid, agrocinopine C	Agropine
Eu6, 181	Succinamopine, succinamopine lactam, succinopine lactam	Succinamopin e
K305, K308	Octopine, cucumopine	Grapevine
		Ri plasmids
A4, TR105	Agropine, agropinic acid, mannopine, mannopinic acid, agrocinopine A	Agropine
TR7, 8196	Mannopine, mannopinic acid, agrocinopine C, agropinic acid	Mannopine
2655, 2657	Cucumopine	Cucumopine

بلازميد الأجروباكتيريم: تركيبه ودوره فى إحداث النمو السرطانى

إن قدرة البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* على إحداث النمو السرطانى فى النباتات التى تصيبها مرده إلى ما يعرف بالـ Ti plasmid (أو الـ tumer inducing plasmid) البكتيرى، وهو بلازميد كبير يحتوى على أكثر من ٢٠٠٠٠٠ زوج من النيكليوتيدات (يزيد طوله عن ٢٠٠ kb ويحمل عديدًا من الجينات ذات العلاقة بعملية الإصابة، (شكل ١٢-٣أ). ومن أبرز خصائص هذا البلازميد أن جزءًا منه يندمج - بعد الإصابة - فى الدنا الكروموسومى للنبات (شكل ١٢-٣ب). ويتراوح حجم هذا الجزء

الذى يطلق عليه اسم T-DNA – بين ١٥، و ٣٠ kb، حسب السلاله البكتيرية يتبقى هذا الجزء ثابتًا فى الخلية النباتية ويمر أثناء انقساماتها كجزء أساسى من كروموسوماتها ومن الخصائص البارزة لهذا الـ Ti plasmid أن الـ T-DNA يحتوى على نحو ٨ جينات تعبر عن ذاتها فى الخلية النباتية التى انتقلت إليها، وهى التى تكون مسئولة عن الخصائص السرطانية للخلايا المحولة وراثيًا، كما أن تلك الجينات توجه النبات إلى تمثيل مركبات غير عادية، يطلق عليها اسم أوبينات opines تستخدمها البكتيريا كمغذيات لها (شكل ١٢-٣جـ) وباختصار فإن *A. tumefaciens* تحول خلايا النبات وراثيًا لأغراضها الخاصة (Brown ١٩٨٦)

يحتوى الـ Ti plasmid على منطقتين رئيسيتين لهما أهمية فى عملية التحول الوراثى، هما الـ T-DNA، و vir تعد منطقة الـ T-DNA من الـ Ti plasmid الخاص بالأجروباكتيريم هى الجزء الذى ينتقل إلى الخلية النباتية ويندمج فى جينوم النواة بالخلايا التى توجد فى جرح مصاب يحمل هذا الـ Ti plasmid الجينات التى تنتج الأوكتين من خلال تنظيمها للهرمونات النباتية، وهى التى يترتب على زيادة إنتاجها فى موقع لإصابة تكاثر الخلايا بشدة فى الخلايا المجروحة لتكون ورمًا يأوى الخلايا لبكتيريه

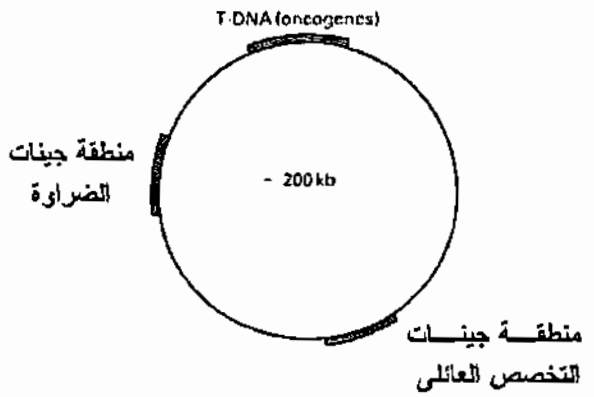
يحاط منطقة الـ T-DNA بخمسة وعشرين زوجًا من النيكليوتيدات غير المكتملة التماثل، وهى التى يلزم تواجدها فى حالة cis لاستئصال الـ T-DNA ودمجه فى الهيئة الكروموسومية للنبات ويؤدى فقد أى من التتابعات الحدودية إلى وقف التحول الوراثى للـ T-DNA إلى الخلايا النباتية كلية

ونجد فى حالة الـ Ti–plasmids التى تستحث إنتاج النوبالين أن الـ T-DNA يتكون من ٢٣٠٠٠ زوج من النيكليوتيدات التى تحمل ١٣ جينا أما فى حالة الـ Ti–plasmids التى تستحث إنتاج الأوكتابين فإنه توجد قطعتان منفصلتان من الـ T-DNA

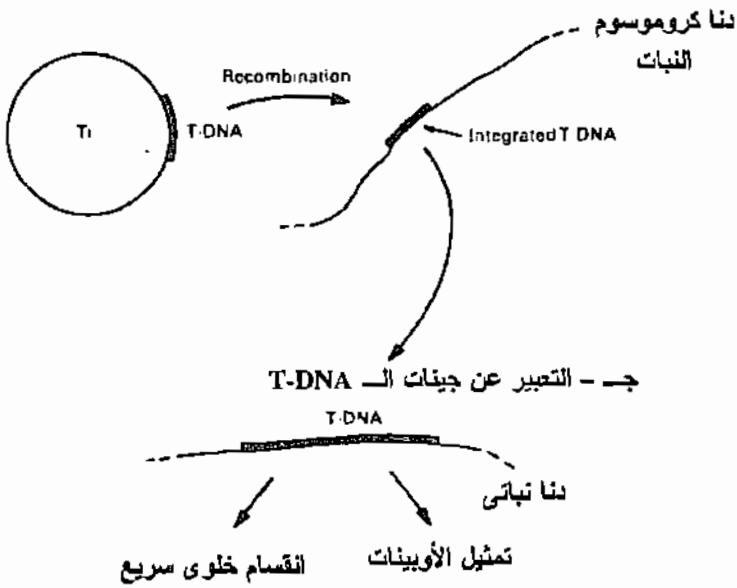
هذا ومن بين الجينات التى يحتويها الـ T-DNA جينات خاصة بتمثيل الهرمونات النباتية مثل الأوكسين. إندول حامض الخليك، والسيتوكينين

isopententenyladenosine، وهما المسئولان عن النمو السرطانى للخلايا فى منطقة الإصابة.

أ – Ti plasmid



ب – اندماج الـ T-DNA فى جينوم النبات



شكل (١٢–٣): الـ Ti plasmid واندماجه فى الدنا الكروموسومى للنبات الـذى يصـاب بالبكتيريا *Agrolacterium tumefaciens*.

أما الـ vir region (نسبة إلى منطقة الضراوة أو القدرة على إحداث الإصابة virulence) فى الـ Ti-plasmid فإنها تحتوى على المورثات المسئولة عن التشفير لتكوين الإنزيمات التى تلزم لعمليات استئصال، ونقل، ودمج قطعة الـ T-DNA ويمكن لهذه الـ vir genes أن توفر الوظائف التى تلزم لنقل T-DNA، وذلك حينما تقع فى حالة cis أو trans بالنسبة للـ T-DNA ولقد سهل ذلك الأمر بناء ما يعرف باسم bipartite Ti vectors تُحمَّل فيها الـ T-DNA segment فى بلازميدة، بينما تُحمَّل الـ vir genes فى بلازميدة أخرى ويعرف البلازميد الذى يحتوى على الـ T-DNA segment دون أى vir genes باسم البلازميد الثنائى binary Ti vector وأهم ما يميز ذلك البلازميد مداة الأوسع من العوائل وحجمه الصغير، الأمر الذى يسهل أمورا كثيرة.

وبينما لا تعبر الـ vir genes عن ذاتها إلاّ بمستوى منخفض للغاية فى البكتيريا الحرة (فى التربة)، فإن تعرض البكتيريا للخلايا النباتية أو لإفرازاتها يجعل تلك الجينات تنشط كثيرًا، ولكنها لا تصل إلى ذروة نشاطها قبل مضى ١٠-١٥ ساعة من تعرضها للخلايا النباتية أو إفرازاتها وقد أمكن فصل المركب acetosyringone، وهو مركب فينولى تبين أنه يعمل على تنشيط فعل الـ vir operons وبذا فإن عملية الحث هذه يمكن الآن دراستها فى البيئة الصناعية باستعمال هذا المركب وأمثاله من المركبات الفينولية ذات التأثير المماثل (عن Gardner وآخرين ١٩٩١)

هذا وإذا ما أزيلت الجينات المسئولة عن ظهور أعراض المرض (المنتجة للهرمونات النباتية) من منطقة الـ T-DNA بالبلازميد (فيما يعرف بنزع سلاح البلازميد disarmament plasmid) فإن البكتيريا لا تسبب المرض وفى المقابل فإنه إذا ما وضع جين آخر فى منطقة الـ T-DNA، فإنه ينتقل إلى النبات. وعلى هذا الأساس يتم تركيب Ti plasmids تخلو من الجينات المسئولة عن حث تكوين الورم، ولكنها تحتوى على الجين المراد نقله وجين آخر معلم يرتبط به بشدة، مثل جين المقاومة لأحد المضادات الحيوية.

بلازميد الأجروباكتيريم: إعداده وتجهيزه لعمليات التحول الوراثى

لقد أوضحت عديد من الدراسات أن أى دنا أولج فى أى موقع بين التتابعات الحدودية للـ T-DNA ينتقل معه إلى الخلايا النباتية ويندمج فى كروموسومات النبات

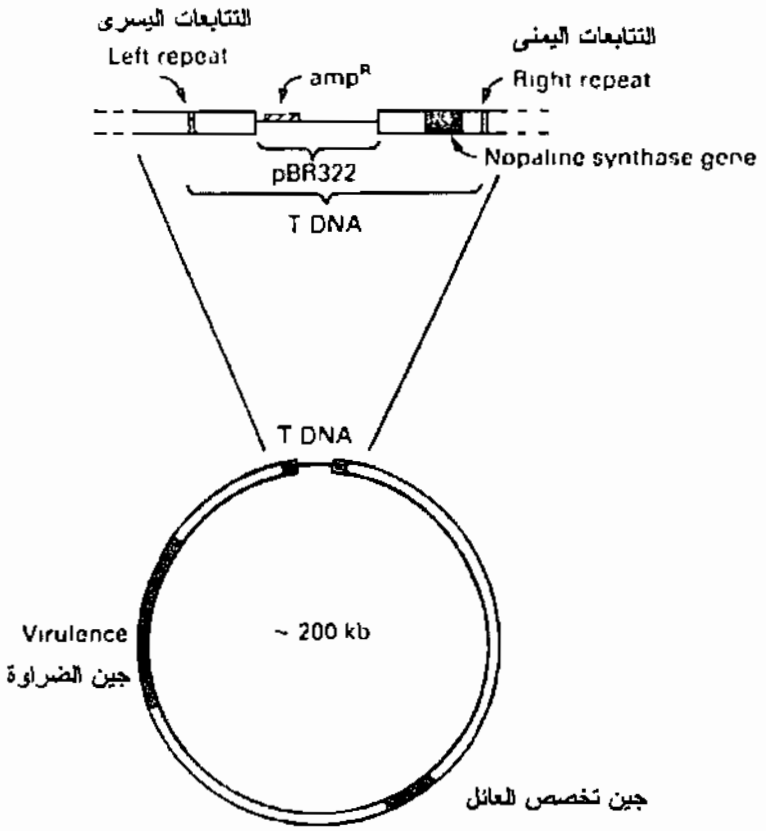
ضمن بقية الـ T-DNA. وقد كانت المشكلة أن الخلايا النباتية المحولة وراثيًا والتى تلقت الـ T-DNA من Ti-plasmid تفقد تحكمها الطبيعى فى الانقسام الخلوى؛ لتكون أورامًا؛ مما يجعلها غير مناسبة لعمليات التحول الوراثى.

وقد أمكن التوصل إلى حل لتلك المشكلة مبكرًا بالتعرف على جينات الـ T-DNA المسئولة عن تكوين الأورام، ووجد أن التخلص من أحد تلك الجينات أو بعضها يؤدى إلى إنتاج ما يعرف باسم moncogenic plasmid، وهو plasmid منزوع السلاح disarmed Ti plasmid (شكل (١٢-٤). وفى مقابل تلك الميزة، فإن وقف خاصية قدرة الـ Ti plasmid على تكوين الورم يجعل من الصعب جدًا التعرف على الخلايا التى تحولت وراثيًا بتلقى الـ disarmed Ti plasmid واندماجه فى هيئتها الكروموسومية. ولذا .. فقد تطلب الأمر الاعتماد على جين مُعلم خاص يولج ضمن منطقة الـ T-DNA فى الـ Ti plasmid المنزوع السلاح (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

وبذا .. فإن الخطوة الأولى فى عملية التحول الوراثى بالاستعانة بالبكتيريا *A. tumefaciens* هى التعامل مع الدنا البكتيرى على المستوى الجزيئى؛ إذ يحتوى البلازميد plasmid البكتيرى على نحو ٧ جينات هى التى تُحدث النمو السرطانى بالنبات، وهى التى يتعين التخلص منها وإحلال الجينات المرغوب فيها مكانها. تتواجد هذه الجينات على الـ Ti plasmid على صورة خيط مستمر من الدنا مطوق من الجانبين الأيمن RB والأيسر LB بحدود واضحة. ويمكن استخدام إنزيمات القطع restriction enzymes فى التخلص من تلك الجينات، ولكن مع الحرص التام على ترك الطوقين الأيمن والأيسر كاملين، إذا إنهما ضروريين لنقل الدنا إلى النبات المرغوب فى تحويله وراثيًا.

ويلى ذلك إدخال الجين المرغوب فيه بعد تجهيزه بمنطقة تنظيمية regulatory region مناسبة، وجين لمقاومة أحد المضادات الحيوية مزود - هو الآخر - بمنطقة تنظيمية خاصة به. يسمح ناتج جين المقاومة للمضاد الحيوى - والذى يكون عادة إنزيمًا مثبطًا لنشاط هذا المثبط احيوى - يسمح للخلايا التى تحتوى على هذا الجين (والتى تكون قد حولت وراثيًا) بالبقاء على بيئة زراعة تحتوى على المضاد الحيوى بتعين

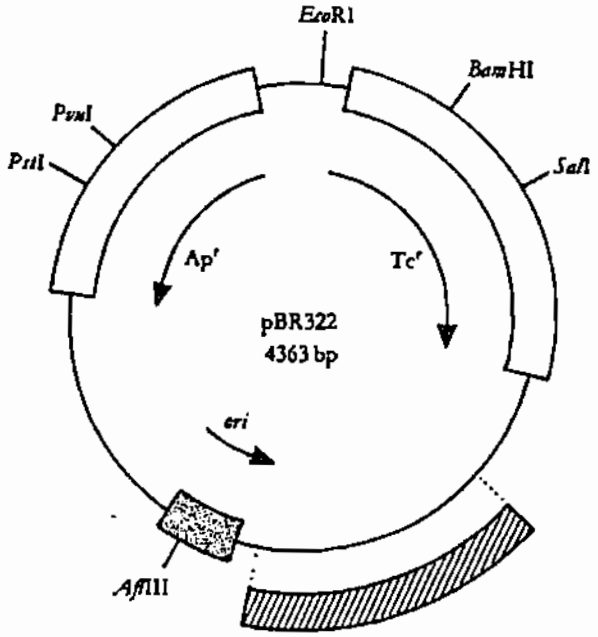
بعد ذلك إدخال هذا الـ Ti plasmid الذى تم إعداده فى سلالة مناسبة من البكتيريا *A tumefaciens* (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).



شكل (١٢-٤): الناقل مزدوج السلاح ***p*GV3850**. تظل تتابعات طرفا الناقل المحيطة بالـــ **T-DNA** قادرة على نقل الـ **T-DNA** إلى الكروموسوم النباتى على الرغم من التخلص من كل الجينات غير المرغوب فيها (الـ **oncogenes**) وإحلالها بدنا الـ ***p*BR322**.

ومن أكثر بلازميدات الأجروباكتيريم المجهزة استخدامًا فى عمليات التحول الوراثى البلازميدين *p*BR322 (شكل ١٢-٥)، و *p*AT153. يتميز البلازميد pBR322 باحتوائه على جينات لمقاومة الأمبسيلين (Ap^r) والتتراسيكلين Tc^r وجين بداية أو أصل origin الانقسام (ori)، كما يظهر بشكل (١٢-٥) مواقع لبعض جينات القطع الهامة.

ومن سلاسل النواقل البلازميدية التى لاقت قبولاً كبيرًا عائلة الـ pUC. تحتوى تلك البلازميدات على منطقة بها عديد من مواقع جينات إنزيمات القص restriction endonuclease sites فى جزء قصير من الدنا، ويعرف ذلك الجزء باسم polylinker أو multiple cloning site (اختصارًا: MCS). وتظهر خريطة لأحد نواقل الـ *p*UC (الناقل *p*UC18) فى شكل (١٢-٦).

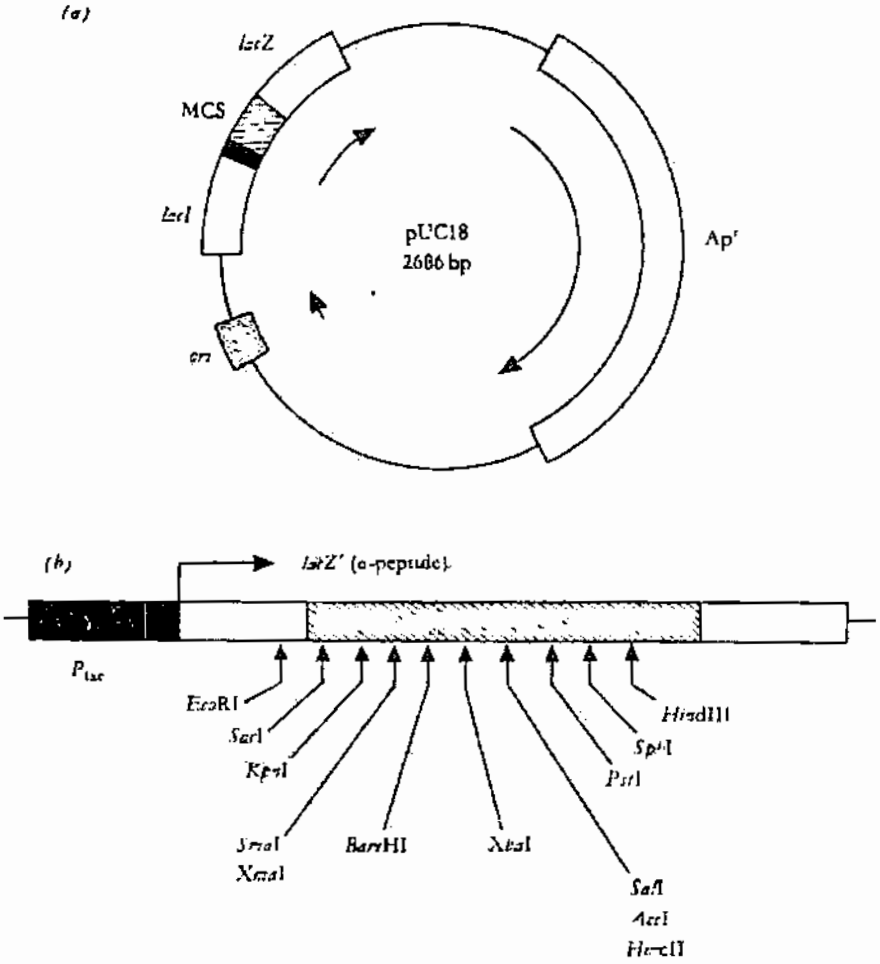


شكل (١٢-٥): خريطة البلازميد *p*BR322.

متطلبات وخطوات عملية التحول الوراثى ببكتيريا الأجروباكتيريم

لكى تتمكن بكتيريا الأجروباكتيريم من إصابة أى explant فإنه يجب أن تفرز مركبات قادرة على حثّ جينات الـ vir فى البكتيريا، وهى التى تأخذ الرموز virA، و virB، و virC ... إلخ، وتقع جميعها على البلازميد Ti بالبكتيريا، وتعد المسئولة عن فصل الـ T-DNA ونقله كخيط مفرد من البكتيريا إلى الخلية النباتية، ومن ثم إلى نواة الخلية. يُحاط هذا الـ T-DNA باثنين من الـ 25-bp direct repeats يعرفان باسم

T-DNA borders، وترجع أهميتها إلى أن أى دنا يقع بينهما ينتقل تلقائيًا إلى الخلية النباتية.



شكل (١٢-٦): خريطة البلازميد *pUC18*. تظهر فى الشكل المواقع التالية:

ori: origin of replication.
Ap^r: ampicillin resistance gene.
LacI: lac repressor gene.
MCS: multiple cloning site (or polylinker).
LacZ': a peptide fragment of β-galactosidase.
P_{lac}: lac promoter
Multiple restriction site in the polylinker sites.

وبهذه الكيفية .. يمكن نقل أى تتابع للدنا (أى جين) إلى النباتات من خلال البلازميدات التى تصبح الأساس فى التحول الوراثى بواسطة الأجروبكتيريم، علمًا بأنه لا ينتقل مع الجين المطلوب نقله أى جين مجاور له؛ كما لا تنقل جينات الضراوة. ونجد أن الطراز البرى للـ Ti plasmid الذى يحمل جينات الهرمونات النباتية فى منطقة الـ T-DNA يتعارض مع عملية إعادة التوالد؛ ولذا .. فإن الـ Ti plasmids التى تستخدم فى عملية التحول الوراثى تكون منزوعة السلاح disarmed (أى منزوعة جينات الهرمونات النباتية).

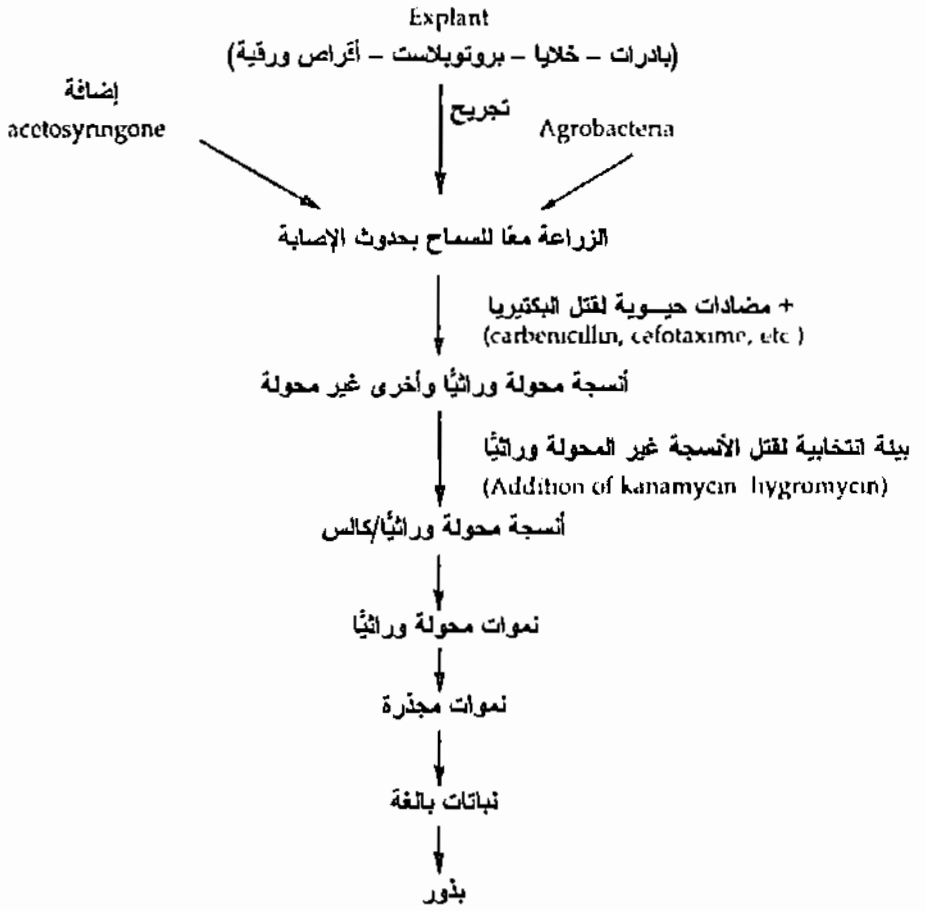
هذا .. وتتم المحافظة على الناقل فى حالة الأجروباكتيريم إما كـ cointegrating vector (حيث يدمج الـ vector فى الـ Ti plasmid)، وإما كـ binary vector (حيث يمتلك الـ vector خاصية التكاثر التلقائى). ويتحقق نقل الجينات بواسطة الأجروباكتيريم إما من خلال الزراعة الموازية للبكتيريا مع الخلايا النباتية، وإما من خلال تلقيح النبات مباشرة بالبكتيريا بعد إحداث جروح به فى مكان التلقيح (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

يعد التحول الوراثى المعتمد على *A. tumfaciens* الذى يجرى باستعمال البذور أثناء إنباتها أقل كفاءة - بكثير - من استعمال مزارع الأنسجة، ولم تستخدم تلك التقنية بنجاح سوى مع النبات الموديل *Arabidopsis thaliana* (عن Block ١٩٩٣).

تُنَمَّى بكتيريا الرايزوباكتيريم المحتوية على البلازميد الذى يوجد به الجين المراد نقله .. تُنَتمَّى مع النباتات الكاملة، أو الأجزاء النباتية explants، مثل: الأوراق الفلقية، والسويقة الجنينية السفلى، والجذور، والكالس، والبروتوبلاست؛ هذا .. إلاّ أن استعمال الأقراص الورقية leaf discs هى الطريقة الأكثر شيوعًا، حيث تعقم سطحيًا، ثم تحقن بسلالة الأجروباكتيريم المناسبة التى تحمل الناقل vector الذى وقع عليه الاختيار، ويزرعا معًا على بيئة تجديد نمو regeneration medium لمدة ٢-٣. أيام فى خلال تلك الفترة تنشط جينات الضراوة فى البكتيريا التى تتلاصق مع خلايا القرص الورقى حول الأجزاء المجروحة، حيث يحدث الانتقال الجينى. ويلى ذلك نقل الأقراص الورقية إلى بيئة تجديد نمو تحتوى على الكارابنسلين carabenicillin بتركيز

٥٠٠ ميكروجرام/مل لأجل قتل البكتيريا، ومضاد حيوى مناسب – مثل الكاناميسين – لتثبيط نمو الخلايا النباتية التى لم تحول وراثيًا. تظهر النموات الجديدة من الخلايا المحولة وراثيًا فى خلال ٤–٥ أسابيع، حيث تُجَذَّر وتنقل للتربة (شكل ١٢–٧)

تأخذ النباتات المحولة وراثيًا التى يتجدد نموها من أى نسيج اسم T_0 plants، بينما تأخذ الأجيال التالية الرموز T_1، و T_2، و T_3 ... إلخ (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)



شكل (١٢–٧): خطوات عملية التحول الوراثى عن طريق البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* (عن Chawla ٢٠٠٠).

مزايا وعيوب التحول الوراثى بطريق الأجروباكتيريم

المزايا

تتميز التحولات الوراثية التى تجرى بطريق الأجروباكتيريم بما يلى:

١ - تعد وسيلة طبيعية لنقل الجينات؛ ومن ثم تعد وسيلة أكثر قبولاً لمن يشعرون بأن الطبيعى هو الأفضل.

٢ - تكون البكتيريا قادرة على إصابة الخلايا الكاملة، والأنسجة، والأعضاء؛ وبذا .. لا تعد محددات مزارع الأنسجة مشكلة، ويمكن تجديد نمو النباتات المحولة وراثيًا بصورة أسرع.

٣ - يمكن للأجروباكتيريم نقل أجزاء كبيرة من الدنا بكفاءة عالية.

٤ - تتم عملية دمج الدنا المنقول بدقة كبيرة.

٥ - يكون ثبات الجينات المنقولة جيدًا.

العيوب

إن من أهم عيوب عمليات التحول الوراثى بالأجروباكتيريم، ما يلى:

١ - تتحدد عملية التحول الوراثى بمدى عوائل البكتيريا؛ علمًا بأن بعض الأنواع المحصولية الهامة لا تصاب بتلك البكتيريا. هذا .. إلا أنه أمكن مؤخرًا تطوير سلالات من الأجروباكتيريم على درجة عالية من الضراوة؛ الأمر الذى حدَّ قليلاً من تلك المشكلة.

٢ - يكون من الصعب أحيانًا إجراء التحول الوراثى على الخلايا التى يكون من السهل تجديد نموها فى مزارع الأنسجة، وربما يرجع ذلك إلى أن الخلايا ذات الخصائص الجنينية تتواجد فى الطبقات العميقة التى قد يصعب للأجروباكتيريم الوصول إليها (عن Chawla ٢٠٠٠).

هذا .. ولقد نجح التحول الوراثى بطريق الأجروباكتيريم فى عديد من المحاصيل، مثل: الكيوى، وبنجر السكر، ولفت الزيت، واللفت، وعدة أنواع من *Brassica oleracea*، والباباظ، والخيار، والقاوون، والأقحوان، والقرنفل، والفراولة، وفول الصويا، والقطن، ودوار الشمس، والجوز، والكتان، والطماطم، والبرسيم الحجازى، والتبغ، والبسلة، والجوز، والبرقوق، والبطاطس، والعنب (عن Dale وآخرين ١٩٩٣).