التحول الوراثى عن طريق الفيروسات

نظرًا لقدرة الفيروسات على إحداث إصابات جهازية فى النباتات، فقد دُرست إمكانية استخدامها كناقلات فى عمليات التحول الوراثى هذا .. إلاّ أنه تبين أن الغالبية العظمى من الفيروسات التى تصيب النباتات لا تصلح كناقلات للجينات cloning vectors فى عمليات التحول الوراثى، ويرجع ذلك إلى أن حامضها النووى هو من نوع الرنا وليس الدنا.

ولا يوجد من بين جميع الفيروسات التى تصيب النباتات الراقية سوى مجموعتين فقط يوجد فيهما الحامض النووى على صورة دنا، وهما. فيروسات الجمنى geminiviruses، وفيروسات الكوليمو وبينما لم تثبت فيروسات المجموعة الأولى جدواها - كثيرا - فى عمليات التحول الوراثى، فإن فيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus (اختصارًا: CaMV) - الذى يعد من أهم فيروسات مجوعة الكوليمو - استخدم بالفعل فى عديد من عمليات التحول الوراثى.

تعد جينومات كل فيروسات مجموعة الكوليمو صغيرة ولا تتعدى فى حجمها ٨ kb ولقد أمكن التعرف على جميع تتابعات دنا فيرس موزايك القنبيط، وأمكن تمييز ما لا يقل عن ستة جينات به، بالإضافة إلى منطقة واحدة بين جينية (شكل ١٢-٨) ويمكن إيلاج دنا غريب فى تلك المنطقة البين جينية دون أى تأثير على قدرة الفيرس على إحداث الإصابة. وتتميز فيروسات الكوليمو - كذلك - بقدرتها على الانتشار الجهازى فى النباتات من إصابة أولية سطحية بإحدى الأوراق. وبذا .. يمكن الحصول على نباتات محولة وراثيًا دونما حاجة إلى اللجوء إلى مزارع الأنسجة (عن Brown ١٩٨٦)

ولقد تبين بعد محاولات عديدة - غير ناجحة - مع عديد من الفيروسات - ومنها فيرس موزايك القنبيط - لاستعمالها كوسيلة للتحويل الوراثى لأجل إدخال جينات أجنبية فى الهيئة الكروموسومية للنباتات التى يرغب فى تحويلها وراثيًا .. تبين بعد تلك المحاولات أن منطقة التنشيط promoter region المسماة 35S لفيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus يمكن التعبير عنها بنجاح فى أنواع نباتية متباينة، وأمكن

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 التثألل 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 يُشفَّر 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 جذورا 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 التثألل تعتمد على وجود بلازميد plasmid كبير بالبكتيريا مسئول عن إحداث التثألل 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 *Discorea bulbifera* وقد أفاد فى هذا التأن 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

ومن الطبيعي أن التحول الوراثي لبعض خلايا الميرستيم يمكن أن يؤدى إلى إنتاج كيميرا بها نسيج محول وراثيًا وآخر غير محول؛ إلاّ أن الأجزاء المحولة وراثيًا يمكن أن تشتمل على نموات منتجة للجاميطات، وبذا ينتقل الجين المعنى بعملية التحول الوراثي إلى النسل، الذى يكون متجانسًا ومشتملاً على نسيج واحد محول وراثيًا.

ولأجل توصيل الجينات المعنية بعملية التحول الوراثي إلى الخلايا القادرة على النمو المباشر الطبيعي اتجه الباحثون نحو الطرق الكيميائية والفيزيائية (طرق النقل المباشر)، حيث نجحوا فى التوصل إلى عديد من تلك الطرق (شكل ١٢-٩).

ولقد أمكن بنجاح كبير استخدام طرق النقل المباشر للجينات فى التغلب على مشكلة عدم قدرة الأجروباكتيريم والفيروسات على إصابة بعض الأنواع النباتية. وهنا .. يصل الدنا المراد إدخاله فى الخلايا المعنية بالتحول الوراثي إما بامتصاص الخلايا له مباشرة، وإما من خلال عمليات فيزيائية أو كيميائية معينة، وتتنوع كثيرًا الطرق المستخدمة فى هذا الشأن، كما تتباين معها الأجزاء النباتية التى يتعين استخدامها فى عملية التحول الوراثي، كما يأتى بيانه.

هذا .. وتعد حبوب اللقاح مثالية كمتلق للجينات الجديدة فى دراسات الهندسة الوراثية؛ فهى ليست فقط صالحة لتلقى الدنا بطريقتى القذف الدقيق microinjection، والتثقيب الكهربائى electroporation (حيث تكون الأنابيب اللقاحية لحبوب اللقاح خالية من الجدر الخلوية)، ولكنها أيضًا - وعلى خلاف البروتوبلاستات - ليست بحاجة إلى أن يُجدد النمو منها؛ فهى ذاتها الوسيلة الطبيعية لتوصيل الدنا من جيل لآخر. ولا يُعد جمع حبوب اللقاح وتخزينها أمرًا صعبًا أو مكلفًا مقارنة بمزارع الأنسجة. هذا إلاّ أن حبوب لقاح بعض الأنواع النباتية لا تحتفظ بحيويتها لفترات طويلة، وقد تفقد حيويتها بعد فترة قصيرة من تحويلها وراثيًا.

ومن بين الطرق التى اتبعت فى التحويل الوراثي للحبوب النجيلية الصغيرة (والتى سنتناولها وغيرها من الطرق بالشرح)، ما يلى (عن Jahne وآخرين ١٩٩٥)،

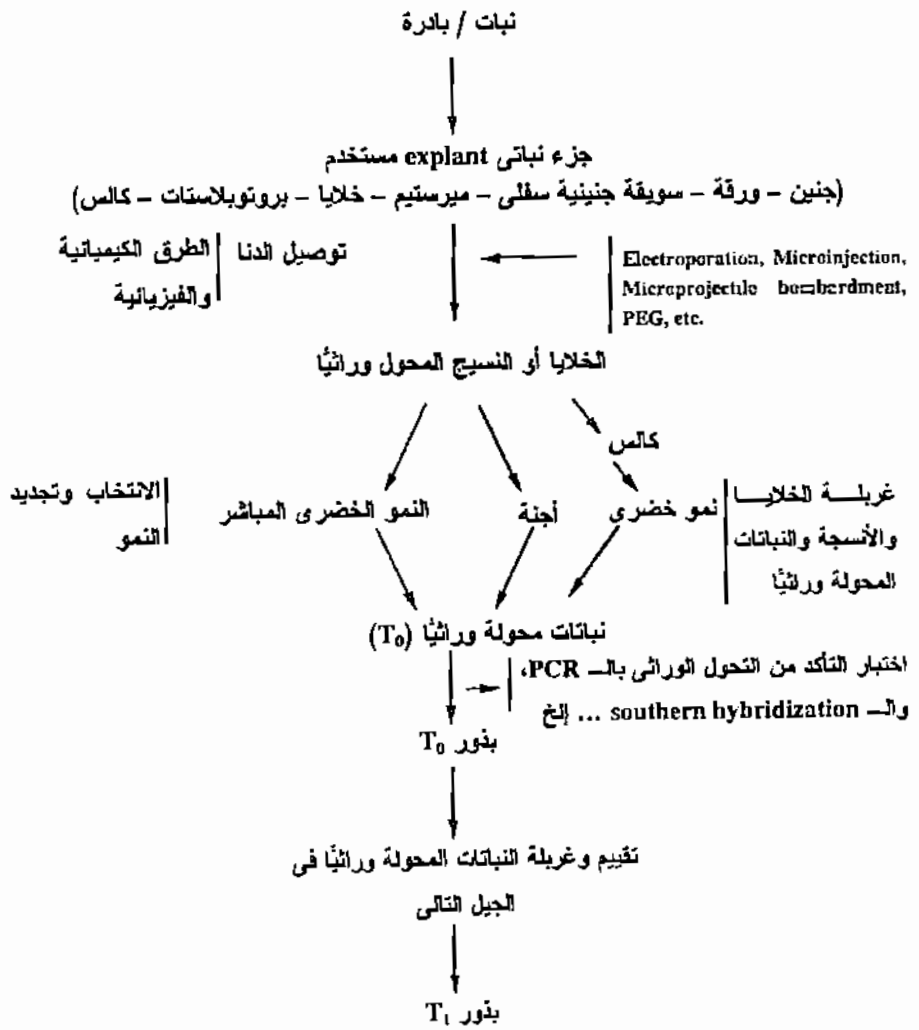
١ - الحث الكيميائى لالتقاط البروتوبلاستات للدنا.

٢ – الحث الكهربائى لالتقاط البروتوبلاستات للدنا.

٣ – قذف الخلايا والأنسجة بأجسام صغيرة مغلفة بالدنا.

٤ – التثقيب الكهربائى للأنسجة بما يسمح بدخول الدنا.

٥ – الحقن الدقيق للدنا فى الأجزاء الزهرية للخلفات.



شكل (١٢–٩): المخطط العام لإنتاج نباتات محولة وراثيًا بطرق النقل المباشر للجينات.

٦ – الحقن الدقيق للدنا فى الخلايا الأمية لحبوب اللقاح، والخلايا الناتجة منها، ومبادئ الأجنة، باستعمال أجسام صغيرة مغلفة بالدنا.

٧ – التقاط حبوب اللقاح - النابتة – للدنا.

٨ – تثريب الأجنة بالدنا

حصول البروتوبلاست على الدنا بطريقة فيزيائية/كيميائية

تعرف عملية حصول البروتوبلاست على الدنا بطريقة فيزيائية/كيميائية باسم physico chemical uptake of DNA، وفيها يخلط plasmid DNA (أى vector) مع بروتوبلاستات النبات المرغوب فى تحويله وراثيًا فى وجود البوليثيلين جليكول PEG، وكحول البولى فينيل polyvinyl alcohol، وفوسفات الكالسيوم التى تحفز التقاط البروتوبلاست للدنا وبعد نحو ١٥–٢٠ دقيقة من التحضين يزرع البروتوبلاست فى وجود عامل انتخابى مناسب، حيث تجدد البروتوبلاستات المحولة وراثيًا - فقط – نموها

يعتمد نجاح هذه الطريقة على قدرة البروتوبلاست على تجديد النمو منه، وقد نجحت مع كل من الصليبيات، والفراولة، والخس، والأرز، والقمح، والذرة

التحول الوراثى بطريقة تحوصل الليبوسومات

إن الليبوسومات lyposomes عبارة عن أكياس دهنية دقيقة تحتوى على عدد كبير من البلازميدات وقد طورت طريقة تحوصل الليبوسومات lyposome encapsulation لأجل حماية الدنا الغريب أثناء عملية نقله إلى عائله الجديد ولقد وجد أنه عند خلط الدنا المحصور داخل تلك الحويصلات الدهنية مع البروتوبلاستات تحت ظروف مناسبة فإنه يخترق البروتوبلاستات، حيث يؤدى نشاط إنزيم الليبيز lipase بالبروتوبلاست إلى إذابة الحويصلات الدهنية، لينطلق منها الدنا، لكى يجد طريقه إلى الإندماج فى جينوم العائل

هذا ولم يشع استعمال هذه الطريقة، بسبب صعوبة تركيب الحويصلات الدهنية

مع اعتمادها على مدى نجاح تجديد النمو من البروتوبلاست (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى باستخدام أشعة الليزر

تستخدم أشعة الليزر فى عمل فتحات دقيقة فى الخلايا، التى تُدفع - بدورها لالتقاط الدنا الذى يوفَّر فى البيئة المحيطة بها (عن Bhat ٢٠٠٠).

التحول الوراثى بالاستعانة بألياف كاربيد السيليكون

يتم تعريض الخلايا المراد تحويلها وراثيًّا مع ألياف كاربيد السيليكون silicon carbide (٠,٦ ميكروميتر × ١٠-٨٠ ميكروميتر) لدوامّة من اللف الدورانى vortexing فى محلول منظم يحتوى على الدنا. تقوم الألياف باختراق الخلايا، ويتم - ربما من خلايا الدوامّة - دخول الدنا فى تلك الخلايا. وقد أمكن بتلك الطريقة إنتاج نباتات ذرة وتبغ محولة وراثيًّا ورغم بساطة هذه الطريقة، فإن ألياف كاربيد الكالسيوم تعد مسرطنة (عن Chopra ٢٠٠٠).

طريقة تحضين البذور مع الدنا

أمكن الحصول على بعض حالات التحول الوراثى عندما وضعت البذور النابتة فى محلول الدنا كذلك فإن البذور الجافة المنزوعة الغلاف البذرى يمكنها التقاط الدنا عندما تستنبت فى محلول من الدنا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

طريقة التثقيب الكهربائى

تستخدم طريقة التثقيب الكهربائى electroporation مع كل من البروتوبلاستات، والأجنة، والقمم الميرستيمية المهضومة جزئيًّا بواسطة إنزيمات محللة للجدر الخلوية. تتضمن الطريقة إطلاق شحنة كهربائية فجائية - بين قطبين من البلاتين - فى إناء صغير جدًّا يحتوى على البروتوبلاستات النباتية وجزيئات الدنا فى محلول ملحى منظم. يؤدى إطلاق الشحنة إلى إحداث ثقوب عديدة فى آن واحد فى مواضع مختلفة من

الأغشية البلازمية، بما يسمح لجزيئات الدنا بالمرور إلى داخل الخلايا. وتكون الخطوة التالية محاولة تجديد النمو النباتى من تلك البروتوبلاستات، وهو أمر يصعب تحقيقه من بروتوبلاستات مفردة فى عديد من الأنواع النباتية. ولقد أمكن باتباع هذه الطريقة الحصول على نباتات محولة وراثيًا من كل من التبغ، والذرة والأرز.

وعند استخدام الميرستيمات القمية بعد هضمها جزئيًا، فإنها تغسل أولاً من تلك الإنزيمات ثم تنقل إلى بيئة زراعة مناسبة، لتخلط بجزيئات الدنا قبل تعريضهما معًا للشحنة الكهربائية، ثم يسمح لها بالنمو مباشرة إلى نباتات كاملة، وبذا .. يمكن تجنب مشكلة صعوبة تجديد النمو التى تحدث عند استخدام البروتوبلاستات (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣، و Jahne وآخرين ١٩٩٥).

كذلك نجح استعمال هذه الطريقة فى الحصول على نباتات محولة وراثيًا بإدخال الدنا فى الأجنة غير المكتملة التكوين، والكالس الجنينى، وشرائح الأجنة المكتملة النمو من الأرز بعد تجريحها إنزيميًا أو ميكانيكيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى بطريق الحقن الدقيق

إن من أهم مشاكل الحقن الدقيق microinjection لأجل عمليات التحول الوراثى ضرورة أن يتم الحقن دون الإضرار بالأغشية البروتوبلازمية الداخلية tonoplasts التى تحيط بالفجوات العصارية، لأن حدوث ذلك يعنى انطلاق أنواع عديدة من المركبات السامة من الفجوات إلى السيتوبلازم. ولقد طورت لأجل عملية الحقن ما يعرف بتقنية الماصة الماسكة holding pipette. وفى هذه الطريقة يتم الإمساك بالبروتوبلاستات فى ماصات بقطر ٥–١٠ ميكروميتر بالشفط الهادئ. ويلى ذلك حقن حوالى ٢ بيكوليتر من الدنا الغريب فى أنوية البروتوبلاستات باستعمال ماصات سعة ٠,٢ ميكروليتر، ومن ثم يجدد النمو من البروتوبلاستات.

ورغم صعوبة طريقة الحقن الدقيق فإنها يمكن أن تستخدم فى حقن كروموسومات كاملة أو حتى بلاستيدات خضراء وميتوكوندريات. ولقد نجح استعمال هذه الطريقة فى

إجراء التحول الوراثى فى كل من التبغ، والبرسيم الحجازى، وجنس *Brassica* (عن Chahal Gosal ٢٠٠٢).

التحول الوراثى بطريقة الحقن فى النباتات ذاتها، وخاصة فى مبايض الأزهار.

أجريت عمليات تحول وراثى بحقن الدنا - مباشرة - فى نباتات كاملة من الراى rye (الجاودار) يجرى الحقن العادى هذا (الـ macroinjection) باستعمال حجم كبير نسبيًا من الدنا الغريب فى نورة النبات - قبل ١٤ يومًا من بدء الانقسام الاختزالى فيها - أى وهى مازالت بعد فى مرحلة التكوين، وذلك باستعمال محقنة (سرنجة)

وقد تحقق ذلك بحقن خلفات الراى بدنا بلازميدى plasmid DNA يحتوى على جين NPT II يرتبط بـ nos promoter. يقع داخل تلك الخلفات الخلايا الـ archesporial التى تنتج حبوب اللقاح بعد مرورها بعملية انقسام ميوزى فى الكيس اللقاحى المتكون ولقد أوضحت الدراسات أن الخلايا الـ orchesporial تكون منفذة للكافيين والكولشيسين قبل أسبوعين من الطور الاستوائى للانقسام الميوزى الأولى؛ الأمر الذى أثار السؤال حول ما إن كانت تلك الخلايا قادرة - كذلك - على استقبال الجزيئات الأكبر مثل الدنا.

لقحت النباتات التى حقنت بالدنا البلازميدى معًا، واختبرت البذور الناتجة لقدرتها على الإنبات فى وجود الكاناميسين ومن بين ٣٠٢٣ بادرة تم اختبارها عاشت سبع واحتوت اثنتان منها - فقط - على نشاط الـ NPT II (عن Walden ١٩٨٨)

كذلك قام Chen وآخرون (١٩٩٨) باستخلاص الدنا الكلى من أوراق صنف الكوسة Pai Chu Tso المقاوم للذبول الفيوزارى الذى يسببه الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*، ثم قاموا بهضمه بواسطة EcoRI، و HindIII وأعقب ذلك حقن ٢ ميكروليتر من الدنا المهضوم فى مبايض أزهار صنف البطيخ الهجين Pink Orchid بعد ٢٤، و ٤٨، و ٧٢ ساعة من التلقيح أدت تلك العملية إلى الحصول على ١٠ نباتات محولة

وراثيًا ومقاومة لفطر الذبول الفيوزارى، ويذكر الباحثون أن ذلك التحول الوراثى حدث من خلال مسار أنبوبة اللقاح. وأوضح تحليل RAPD أن النباتات المحولة وراثيًا ظهر بها شرائط bands مماثلة لتلك التى تظهر فى تحليل الـ RAPD للكوسة.

النقل المباشر للجينات من خلال مسار الأنابيب اللقاحية

أمكن إنتاج نباتات أرز محولة وراثيًا بإدخال الدنا فى الأنابيب اللقاحية. ولتحقيق ذلك تم قطع مياسم الأزهار بعد التلقيح، مما أدى إلى قطع الأنابيب اللقاحية وظهورها عند الجزء المقطوع، وبوضع الدنا على هذا السطح المقطوع .. فإنه يتسرب إلى داخل الأنابيب اللقاحية – التى تكون مازالت فى القلم – ومن ثم إلى البويضات.

طريقة القذف المدفعى الدقيق

تعرف طريقة القذف المدفعى الدقيق باسم microprojectille bombardment، وهى تعتمد على خاصية الـ porticle acceleration باستعمال biolistics خاصة تعمل على دفع الدنا داخل الخلايا بقوة تكفى لأن يندمج جزءًا منه فى دنا تلك الخلايا وذلك بعد اختراقها للجدر والأغشية الخلوية. وتجرى العملية بتغليف جزيئات دقيقة (٠,٢–٠,٧ ميكروجرام) من الذهب أو التنجستين بالدنا الغريب لدفعها فى الخلايا النباتية المراد تحويلها وراثيًا.

وقد اتبعت طريقتان لإسراع دفع تلك الجزيئات الدقيقة، هما: استعمال غاز هيليوم تحت ضغط، أو بطاقة كهروستاتيكية تنطلق من قطرة ماء تعرض إلى تيار كهربائى ذات فولت عال.

وكانت أولى الأجهزة التى استخدمت فى هذه الطريقة تعتمد على وضع بارود gunpowder خلف خرطوشة cartridge لإسراع قذف الجزيئات الدقيقة، ودفعها عميقًا داخل النسيج النباتى، ولذا فإنها عرفت باسم particle gun. وقد شاع استعمال هذه الطريقة نظرًا لإمكان استعمالها مع أى نسيج أو عضو نباتى ومع أى نوع من النباتات، كما يمكن معها قذف أى كمية من الدنا الغريب. وهى طريقة يمكن استعمالها مع النمو

القمى الخضرى، وأنصال الأوراق، وحبوب اللقاح، والخلايا المزروعة، والجذور، وأجزاء النموات الخضرية، وقد طبقت على عديد من الأنواع النباتية مثل السعير، والقطن، والذرة، والأرز، وفول الصويا، وقصب السكر، ودوار الشمس، والقمح (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

وتعرض عدة أنواع من أجهزة القذف المدفعى الدقيق المستخدمة فى عمليات التحول الوراثى، منها ما يلى:

١ - جهاز Biolistic PDS-1000/He (Kikkert ١٩٩٣)

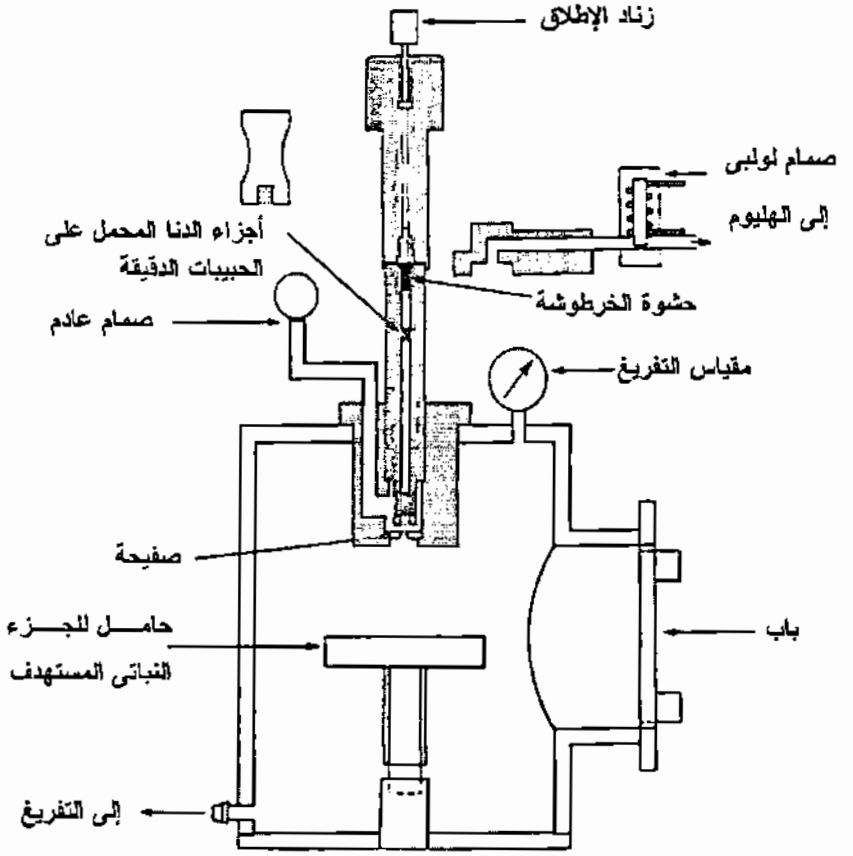
٢ - جهاز Particle Inflow Gun (Vain وآخرون ١٩٩٣).

٣ - جهاز توجيه دقيق microtargeting device للقذف المدفعى قادر على توجيه ٨٠٪ من الجزيئات المقذوفة إلى مساحة يبلغ قطرها ١٥٠ ميكروميتر - وهى تعادل مساحة ميرستيم - مع وصول الجينات المحمولة على الجزيئات المقذوفة إلى ٣٪ من الخلايا المعرضة للقذف المدفعى الموجه إليها (Sautter ١٩٩٣)

ويعد التهديف الدقيق microtargeting هو الطريقة المثلى لتوصيل الدنا إلى القمة النامية الخضرية للنبات يسمح الجهاز المستخدم (الـ microtargeter) بتوجيه قدر من القذائف الدقيقة microprojectiles إلى النسيج الميرستيمى القمى وتجمع هذه الطريقة بين مزايا الحقن الدقيق microinjection (وهو الذى يسمح بالتنبؤ بالموقع الذى يصله الدنا) ومزايا القذف البيولوجى (الذى يتحقق بواسطته عدة طلقات فى كل مرة؛ عن Agrawal ١٩٩٨)

هذا . ويبين شكل (١٢-١٠) تخطيطا لجهاز يستعمل فى القذف الدقيق particle bombardment ويعطى شكل (١٢-١١) مزيدًا من التفاصيل لأجزاء الجهاز المستخدم أما شكل (١٢-١٢) فإنه يوضح مقارنة بين التحول الوراثى بطريقتى القذف المدفعى الدقيق والأجروباكتيريم

تكون جزيئات الذهب أو التنجستون المستعملة فى عملية القذف الدقيق بقطر ٤ ميكروميتر

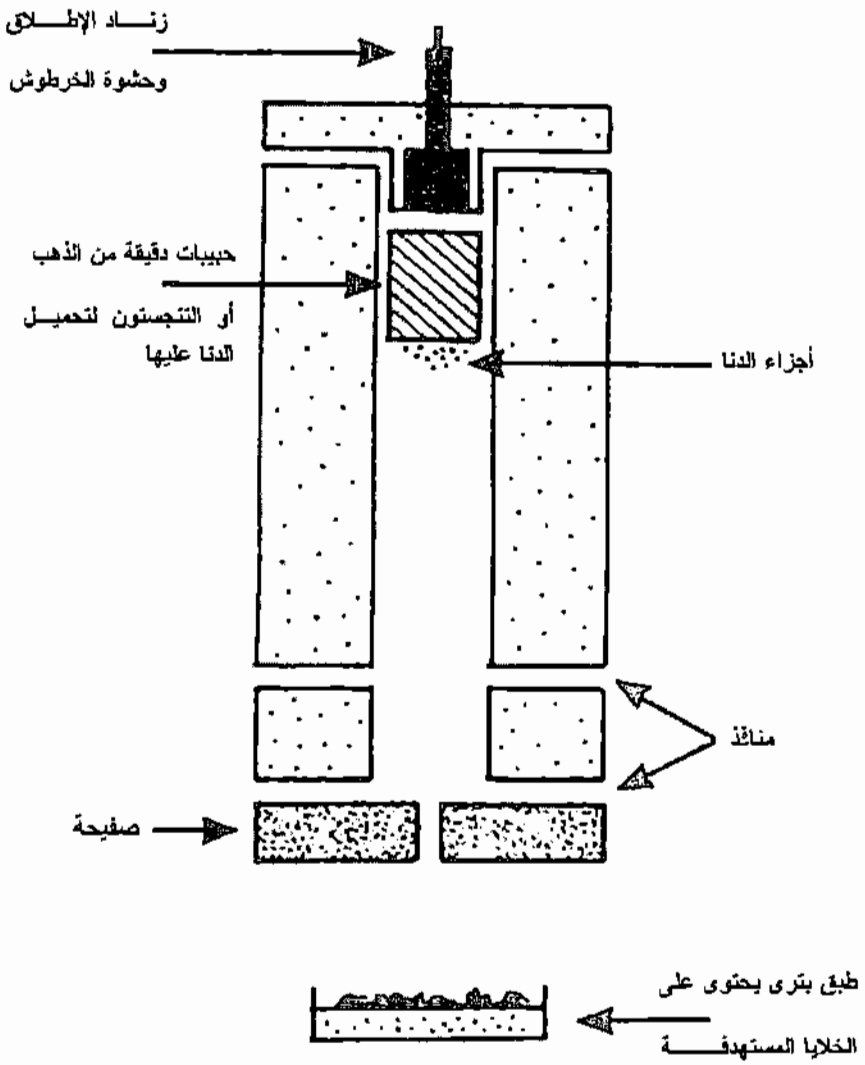


شكل (١٢-١٠): تخطيط لجهاز يستعمل فى القذف الدقيق (عن Franks & Birch ١٩٩١).

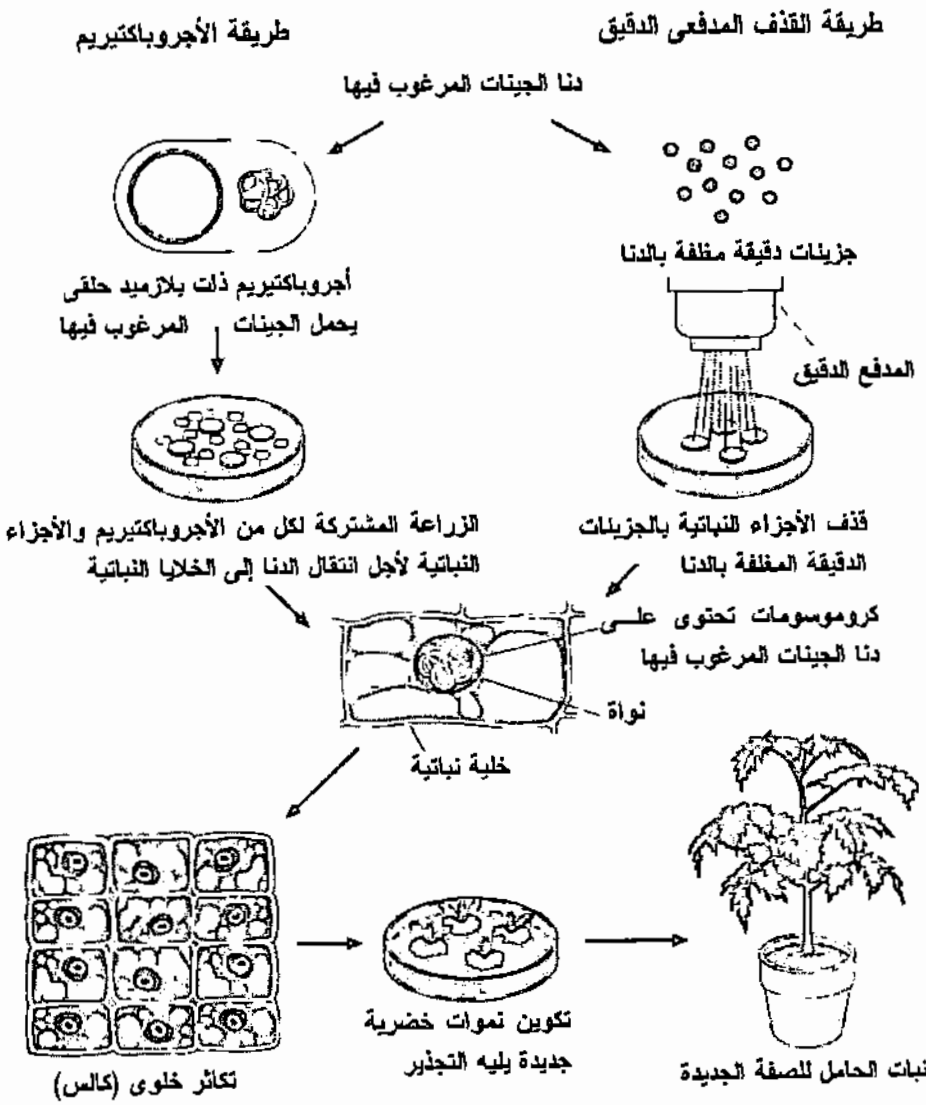
بعد وصول الدنا المحمل على هذه الجزيئات إلى داخل الخلايا فإنه يُستنسخ فى صورة رنا، وهو الذى يترجم - بدوره - إلى بروتين.

عندما تحول الأجنة وراثيًا بطريقة القذف الدقيق، فإن بعض خلايا الجنين فقط هى التى يحدث فيها التحول الوراثى، وعند زراعة هذه الأجنة فى بيئات صناعية والحصول على نباتات كاملة منها فإن أجزاء كاملة منها قد تكون محولة وراثيًا إذا ما نما كل منها من خلية مفردة حدث فيها التحول الوراثى، ولكن تبقى أجزاء أخرى من تلك النباتات غير محولة وراثيًا. ونظرًا لأن الأزهار الكاملة يمكن أن تنمو من عدد محدود

من الخلايا المحولة وراثيًا التى قد تنتج من انقسامات متتالية لخلية واحدة محولة وراثيًا . لذا فإنه من الممكن الحصول على بذور محولة وراثيًا من أجزاء النبات التى حدث فيها التحول الوراثى (عن Chrispeel & Sadava ٢٠٠٣)



شكل (١٢-١١): تخطيط يظهر تفاصيل جهاز القذف المدفعى الدقيق.



شكل (١٢-١٢): مقارنة بين التحول الوراثى بطريقتى القذف المدفعى الدقيق والأجروباكتيريم (عن Chrispeels & Sadava ٢٠٠٣).

هذا .. إلاّ أن معدل حدوث التحولات الوراثية بتلك الطريقة يعد منخفضًا، ويتطلب الأمر الاختيار الدقيق للنسيج المستعمل فى التحويل الوراثى، والتحكم فى الظروف البيئية قبل القذف الدقيق وبعده، وحسن اختيار المعلم الانتخابى. وعلى الرغم من نجاح

إجراء التحول الوراثى باستعمال المزارع غير المتميزة undifferentiated cultures، إلا أنه يفضل توصيل الدنا إلى الـ explants ذاتها، والتى يكون لها قدرة كبيرة على استعادة النمو ولقد استخدمت فى النجيليات - بنجاح - كلاً من الـ scutellar tissues، والميرستيمات

ولقد استخدمت تلك الطريقة فى نحو ٢٠٠ بحث منشور حتى نهاية عام ١٩٩٥ فقط، وذلك منذ بداية اكتشافها فى عام ١٩٨٧، وهى تعد - حاليًا - ثانى أكثر طرق التحول الوراثى استعمالاً بعد طريقة الأجروباكتيريم.

ولقد نجح استعمال طريقة القذف المدفعى الدقيق فى تحقيق ما يلى:

١ - التحول الوراثى للميرستيمات والأنسجة مع درجة عالية من القدرة على استعادة النمو.

٢ - توصيل الدنا المرغوب فيه إلى الخلايا الكاملة، والأنسجة، والأعضاء دونما محددات كتلك التى ترتبط بقدرة الأجروباكتيريم على إصابة النبات المراد تحويله وراثيًا، أو القدرة على استعادة النمو عند اللجوء إلى مزارع الأنسجة.

٣ - التحول الوراثى لعضيات الخلية مثل الكلوروبلاستيدات. وكذلك حبوب اللقاح

٤ - التحول الوراثى للنجيليات، والبقوليات، والأنواع الخشبية التى يصعب تحويلها بالطرق الأخرى.

٥ - تسمح باستعادة النمو من عديد من الأصناف التجارية التى يمكن تحويلها وراثيًا

٦ - تسمح بزيادة كفاءة التحول الوراثى بواسطة *Agrobacterium tumefaciens* بسبق قذف الأنسجة - التى تعرض للبكتيريا - بالدنا (عن Rajesh Luthra وآخرين ١٩٩٧).

وقد استعرض Rajesh Luthra وآخرون (١٩٩٧) - فى جدول - جميع دراسات الـ microprojectile bombardment التى نشرت حتى ديسمبر ١٩٩٥. والتى تضمنت أنواعًا من ثلاثين عائلة نباتية، وتضمن الحصر - كذلك - نوع النسيج أو العضو النباتى

المستخدم فى الدراسة، وكذلك الـ plasmid construct (أى الـ reporter/selectable gene) المقذوف به ويتبين من استعراض الجدول أن أكثر تطبيق لتلك التقنية كان على أنواع اقتصادية هامّة من العائلات النجيلية، فالباذنجانية، فالبقولية، فالصنوبرية Pinaceae، فالقرعية، إلا أن الحصر تضمن - كذلك - عائلات هامة، مثل العليقية، والصليبية، والزئبقية، والخبازية .. وغيرها كثير.

وفى فول الصويا يجرى التحول الوراثى باستخدام محاور الأجنة embryonic axes المكتملة النمو أو غير المكتملة، فبعد فصلها من البذور تعرض للقذف الدقيق بالجين المرغوب فيه، ثم تزرع هذه الـ explants على بيئة موراشيج وسكوج مزودة بمستويات عالية من السيتوكينين. تعطى هذه الـ explants نموات جديدة بسهولة فى خلال أسبوعين من زراعتها، وهى نموات أوضحت الدراسات الهستولوجية نشأتها من كل من الميرستيمات الأولية والجانبية وبعد مرور ٦-١٠ أسابيع تكون النموات قد استطالت بالقدر الذى يكفى لنقلها إلى بيت محمى، إما بعد تجذيرها على بيئة خالية من الهرومونات، وإما بتطعيمها على بادرات فول صويا ويمكن - عادة - الحصول بهذه الطريقة على حوالى ٥-٢٠ نموًّا من كل explant معامل

ولقد تبين أن عددًا من النباتات التى حُصل عليها بهذه الطريقة احتوت على الجين المنقول فى جميع خلاياها، مما يدل على نشأتها من خلايا مفردة (عن Christou ١٩٩٤)

هذا وقد نجحت هذه الطريقة - كذلك - مع الفاصوليا، واستخدمت بالفعل فى تحويلها وراثيًّا بجينات الـ β-glucuronidase، والمقاومة لمبيدات الحشائش والمقاومة للفيروسات

لقد نجحت تقنية القذف الدقيق للجينات فى عديد من عمليات التحول الوراثى للنباتات، كما فى الشعير، والقطن، والخيار، والباذنجان، والذرة، والبصل، والأرز، وفول الصويا، والتبغ، والقمح، كما نجحت - كذلك - مع عديد من الطحالب والفطريات واستخدمت هذه الطريقة فى معاملة كلا من البادرات، ومزارع المتوك،

ومزارع الكالس، والأجنة غير المكتملة التكوين، ومزارع معلقات الخلايا. والسويقة الجنينية السفلى، وطبقة الأليرون (كما فى الذرة)، وحبوب اللقاح، وغيرها من الأنسجة والأعضاء النباتية (عن Franks & Birch ١٩٩١، و Jansson & Maenpa ١٩٩٩) ويعد القمح أكثر المحاصيل الزراعية التى استعملت معها طريقة القذف المدفعى الدقيق للفمة الخضرية الميرستيمية (عن Sautter وآخرين ١٩٩٥).

ويفيد القذف المدفعى الدقيق ليس فقط فى إجراء عمليات التحول الوراثى للنباتات التى يصعب إصابتها ببكتيريا الأجروباكتيريم، ولكن كذلك فى التحول الوراثى لكل من عضيات الخلية (مثل الميتوكوندريا، والكلوروبلاستيدات)، والميكروبات (مثل *Bacillus megabacterium*، و *Magnoportha grisea*)، والخلايا والأنسجة الحيوانية (عن Klein وآخرين ١٩٩٢).

انتخاب الخلايا المحولة وراثيًّا ووسائل تأكيد التحول الوراثى

لا ينتقل الدنا فى عمليات التحول الوراثى إلاّ إلى نسبة ضئيلة جدًّا من الخلايا فى التجربة الواحدة. ولا يندمج بثبات فى كروموسومات النوع المتلقى إلا فى نسبة ضئيلة جدًّا من تلك الخلايا التى تلقت الدنا، هذا بالإضافة إلى أن الدنا المنقول والمندمج بثبات فى الخلايا لا يعبر عن ذاته سوى فى أعداد قليلة من تلك الخلايا ولذا فإن التوصل إلى طريقة سهلة للتعرف على البروتوبلاستات أو الخلايا المحولة وراثيًا يعد أمرًا حاسمًا بالنسبة لنجاح برنامج التحول الوراثى من عدمه.

إن الخلايا أو النباتات المحولة وراثيًّا يمكن التعرف عليها عادة بصورة غير مباشرة من خلال الجينات المعلمة التى تكون على ارتباط شديد بالجينات المنقولة وفى غياب الانتخاب فإن الخلايا غير المحولة وراثيًّا تطغى فى نموها وتكاثرها على الخلايا المحولة ويمكن إعطاء الخلايا المحولة وراثيًّا قدرة تنافسية على البقاء بتضمين الـ gene construct المنقول جينًا يسمح لتلك الخلايا بالنمو فى ظروف تعد مثبطة لنمو الخلايا غير المحولة وراثيًّا كذلك فإن الخلايا المحولة وراثيًا قد يمكن التعرف عليها إذا أمكن ملاحظة التعبير الجينى للجين المنقول بصورة مباشرة، كما فى حالة المقاومة لمبيدات