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

الحشائش، حيث تموت كل الخلايا غير المحولة وراثيًا بفعل مبيد الحشائش، بينما تبقى فقط الخلايا المحولة وراثيًا.

تعرف الجينات التى يتم تضمينها فى الـ gene construct – بهدف التعرف على الخلايا والبروتوبلاستات المحولة وراثيًا – باسم الجينات الدالة أو المُعَلِّمة أو المُخبرة marker genes، وهى على نوعين:

١ – معلمات انتخابية selectable markers.

٢ – معلمات غربلة screenble (scorable) markers.

كذلك توجد فئة ثالثة من الجينات التى يتم تضمينها فى الـ gene construct – تعرف باسم الجينات المؤسسة أو المعززة promoter genes – وهى التى تؤسس للتعبير الجينى (للجين المعنى بعملية التحول الوراثى)، أو تعزز ظهوره فى أنسجة أو أعضاء معنية أو فى مراحل عمرية معينة دون غيرها.

أولاً: المعلمات الانتخابية

إن الجين المعلم الانتخابى selectable marker gene الجيد هو ذلك الذى يوفر مقاومة ضد عقار drug ما، أو مضاد حيوى؛ بحيث يوقف نمو الخلايا النباتية الطبيعية (تلك التى لا تحمل الجين المعلم). ويجب أن يقوم المركب المستعمل فى وقف النمو النباتى أو قتله بعمله ببطء؛ ذلك لأن القتل السريع للخلايا النباتية غالبًا ما يكون مصاحبًا بانطلاق لمركبات فينولية ومركبات أخرى من الخلايا الميتة، تكون سامة للخلايا المتبقية المقاومة أصلاً للمركب المستعمل.

ومن أكثر الجينات المعلمة استعمالاً وأكثرها شيوعًا فى دراسات الهندسة الوراثية، تلك التى توفر مقاومة ضد المضادات الحيوية التالية:

١ – الكاناميسين kanamycin، والجلوكوسيد الأمينى القريب منه G418 (والأخير هو الأكثر فاعلية فى تثبيط النمو فى الـ eukaryotes) وهما الأكثر استعمالاً.

٢ – الجنتاميسين gentamicin

٣ – الجنتاميسين gentamicin

٤ – الهيجروميسين hygromycin

٥ – الكلورامفينيكول chloramphenicol.

٦ – الترای میثوبریم trimethoprim.

ومن أكثر الجينات المعلمة استعمالاً الجين Kan^r من *E. coli*، وهو يشفر لتكوين الإنزيم neomycin phosphotransferase type II (اختصارا : NPTII)، ويطلق على هذا الجين – وأمثاله من جينات وحيدات الخلية procaryotes – عند استعمالها فى النباتات المحولة وراثيًا اسم chimeric selectable marker genes نظرًا لحتمية إجراء تعديلات عليها لكى يمكنها التشفير للإنزيم المطلوب فى النباتات. وأكثر تتابعات الـ promoters استخدامًا هى تلك المتحصل عليها من كل من جين الـ nopaline synthase (يأخذ الرمز nos) من الـ Ti plasmid، والـ 35S transcript الخاص بفيرس موزايك القنبيط.

ومن أكثر الجينات الانتخابية الكيميرية chimeric selectable marker genes استخدامًا ذلك الذى يحمل التركيب:

CaMV 35S promoter/NPTII coding sequence/Ti nos termination sequence

يأخذ هذا الجين الكيميرى – عادة – الرمز 35S/NPTII/nos.

وبالاستعانة بتقنيات الدنا أمكن بجهد جهيد إحلال هذا الجين محل الجين المسئول عن تكوين الورم السرطانى فى الـ T-DNA للـ Ti plasmid (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

وعلى الرغم من عدم توفر أى دليل على إمكانية انتقال جينات المقاومة للمضادات الحيوية تلك من النباتات المحولة وراثيًا إلى الكائنات الدقيقة، فإنه يوجد تخوف لدى البعض من المعترضين على تطبيقات الهندسة الوارثية من أن وجود تلك الجنيات فى النباتات التى يستهلكها الإنسان قد يشكل خطورة عليه، ولذا . يتم حاليًا التخلص منها بعد الانتهاء من عملية التحول الوراثى

ويبين جدول (١٢-٢) تفاصيل عدد من المعلمات الانتخابية (من كل من مضادات الحيوية ومبيدات الحشائش) والإنزيمات التي تعمل عليها، والجينات التي تتحكم فيها.

جدول (١٢-٢): بعض معلمات الغربلة screenable markers، والمعلمات الانتخابية selectable markers الشائعة الاستعمال في دراسات التحول الوراثي النباتي (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

نوع المعلم	الجين	الإنزيم	العامل الانتخابي
غربلة	gus	Beta-Glucuronidase	
	lux	Luciferase (بكتيري)	
	nos	Nopaline synthase	
	cat	Chloramphenicol acetyl transferase	
	luc	Luciferase (حشرة يراعة)	
	m_2fpu	Green Fluoresent protein	
انتخاب	npt II	Neomycin phosphotransferase II	Kanamycin, G 418
	hmr	Aminoglycoside phosphotransferase IV	Hygromycin
	bar	Phosphinothricin acetyl transferase	Phosphinothricin (PPT)
	dhfr	Dihydrofolate reductase	Methotrexate
	epsps	5-enolpyruvyl- shikimate-3 phosphate synthase	Glyphosate
	cat	Chloramphenicol acetyl transferase	Chloramphenicol
	aad A	3″-Adenyly-transferase	Spectinomycin Streptomycin
	ahas	Acetylhydroxy acid synthase	Sulfonyl ureas, Imidazolinones
	hps	Hygromycinphospho-transferase	hygromycin

كذلك نقدم فى جدولى (١٢-٣، و ١٢-٤) قوائم أخرى - نقلاً عن مصادر مختلفة - تظهر بها جينات معلمة انتخابية إضافية، فضلا عن بعض من تلك التى أسلفنا بيانها، ولكن بمزيد من المعلومات حول خصائصها ومصادرها.

ثانياً: معلمات الغربلة

تعرف معلمات الغربلة screenble (scorable) markers (وهى أحد أنواع الجينات المُخبرة أو الدالة على حدوث التحول الوراثى reporter genes) بأنها الجينات التى يمكن تقدير البروتينات التى تتحكم فى إنتاجها بطريقة مناسبة، حيث تستعمل فى إقامة الدليل على أن الجينات المنقولة قد تم التعبير عنها من عدمه، أى إنها تفيد فى غربلة الخلايا المحولة وراثيًا من خلال تعبيرها عن إنزيمات خاصة تنتج شكلاً مظهريًا مميزا

لا يقتصر استعمال تلك الجينات على التأكد من حدوث التحول الوراثى فقط، ولكنها يمكن أن تفيد - كذلك - فى عمل تقدير كمى تقريبى لدرجة التعبير عن الجين المنقول وبينما قد تميز تلك الجينات تمثيل الأوبين المحمول على الـ Ti plasmid، فإن معظمها تشفر لإنزيمات يسهل التعرف عليها وتقدير شدة نشاطها ولا تكون من بين الإنزيمات التى تنتجها طبيعيًا النباتات المتلقية للجينات الدالة.

يتضمن التحليل - عادة - إضافة المادة التى يعمل عليها الإنزيم، بما يسمح للإنزيم المنتج بواسطة الجين الدال للعمل عليها، ثم تقدير المنتج النهائى كميًا

ومن الناحية المثالية يجب أن يكون من السهل التعرف على الجينات المخبرة أو الدالة وتقيمها، ويفضل أن يجرى ذلك باختبار لا يقضى على الأجزاء أو الأنسجة النباتية المستعملة، وألا يتواجد أى نشاط سابق مماثل لنشاط الـ reporter gene فى النبات الذى يُراد تحويله وراثيًا.

جدول (١٢-٣): بعض جينات المعلمات الانتخابية المستعملة فى التحولات الوراثية النباتية، ومصادرها، وطريقة فعلها (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين المعلم الانتخابى	رمز الجين	مصدر الجين	فعل الجين	العامل الانتخابى
Antibiotic resistance				
Aminoglycoside adenyltransferase	*aad A*	*Shigella flexneri*	Antibiotic resistance	Streptomycin
Bleomycin resistance	*ble*	*E. coli*	Antibiotic resistance	Bleomycin
Dihydropteroate synthase	*sul/dhps*	*E. coli*	Antibiotic resistance	Sulphonamides
Dihydrofolate reductase	*dhfr*	Mouse	Antihiotic resistance	Methotrexate
Hygromycin phosphotransferase	*hpt/aph*IV/hyg	*E. coli*	Antibiotic resistance	Hygromycin Geneticin (G418)
Neomycin phosphotransferase II	*npt* II/*nco*	*E. coli*	Antihiotic resistance	Kanamycin
Neomycin phosphotransferase III	*npt* III	*Streptococcus faecalis*	Antibiotic resistance	Kanamycin Genticin (G418)
Herbicide resistance				
Acetolactate synthase	*als*	*Arabidopsis* spp./ maize/tobacco	Herbicide resistance	Sulphonylureas
Enolpyruvylshikimate phosphate synthase	*epsps/aro*A	Petunia hybrida/ *Agrobacterium* spp.	Herbicide resistance	Glyphosate
Glyphosate oxidoreductase	*gox*	*Achromobacter LBAA*	Herbicide resistance	Glyphosate
Phosphinothricin acetyltransferase	*bar/pat*	*Streptomyces hygroscopicus/ S. viridochromogenes*	Herbicide resistance	Biclophos Glufosinate L-phosphinothricin
Cyanamide hydratase	*cah*	*Myrothecium verrucaria*	Herbicide resistance	Cyanamide

جدول (١٢-٤): بعض الجينات المعلمة الانتخابية المستعملة فى التحولات الوراثية النباتية ومصادرها، ونوع المقاومة التى تكسبها للنبات، وملاحظات أخرى بشأن الاختبارات المستعملة معها (عن Rathus & Birch ١٩٩١).

الجين	مصدره	المقاومة التى يوفرها	ملاحظات
Neomycin phosphotransferase II (NPT II)	*Tn5*	Kanamycin Neomycin G418 Paromomycin	المقاومة للكانامايسين فى بعض وحيدات الفلقة يمكن استعماله أيضًا كجين كمؤسس reporter gene
Hygromycin phosphotransferase (Hpt)	*E. coli*	Hygromycin B	لا يتوفر له اختبار إنزيمى
Mouse dihydrofolate reductase (DHFR)	*Mouse*	Methotrexate	لا يتوفر له اختبار إنزيمى
Bleomycin resistance	*Tn5*	Bleomycin	لا يعرف نشاطه الإنزيمى
Phosphinotricin acetytransferase (PAT)	*S. hygroscopicus* bar gene	Bialaphos	يتيسر الاختبار له
Acetolactate synthase (ALS)	*Mutant Arabidopsis ALS* gege	Sulphonylurea herbicides	يتيسر الاختبار له

ومع تلك المعلمات لا يكون هناك أى ضغط انتخابى على الخلايا أو النموات المتجدد تكوينها، حيث تؤخذ فقط أجزاء صغيرة من النسيج النباتى لأجل ملاحظة تعبير الجين المعلم فيها فمثلاً ينتج الجين gus إنزيمًا يعمل على مواد أولية داخل الخلايا لينتج راسبا أزرق اللون يمكن رؤيته بالعين المجردة وبالاعتماد على الجين المسئول عن إنتاج البروتين الفلورى الأخضر يظهر النسيج المحول وراثيًا بلون أخضر لدى تعريضه للأشعة فوق البنفسجية (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

ولعل أكثر معلمات الغربلة استعمالاً وشيوعًا من بين تلك المشار إليها أعلاه الجين GUS، الذى يمكن تقدير نشاطه كميًّا باستعمال إما التحاليل الفلورومترية fluorometric، وإما التحاليل الاسبكتروميترية spectrophotometric، وكلاهما رخيص وبسيط (عن Rathus & Birch ١٩٩١).

تعد أكثر الجينات الدالّة أو المخبرة استعمالاً الجين β-glucuronidase (اختصارًا: GUS) الذى حُصل عليه من *Escherichia coli*، كما يستخدم كثيرًا أيضًا الجينات neomycin phosphotransferase (اختصارًا: NPT II)، و Chloramphenicol acetyltransferase (اختصارًا: CAT)، و luciferase. وتوجد مجموعة أخرى من الجينات الدالّة أقل قبولاً، مثل: phosphinothricin acetyltransferase، و Catechol oxydase، و gentamycin acetyltransferase، و Cytosine deaminase، و β-galactosidase.

يسمح الجين GUS ليس فقط بتقدير قوة الجين المؤسس أو المعزز promoter gene، ولكنه يسمح – كذلك – بإجراء تحليل هستولوجى للتعبير الجينى فى أنواع خاصة من الخلايا أو الأنسجة فى النباتات المحولة وراثيًا.

ومن عيوب الجينات الدالّة التى سبقت الإشارة إليها – باستثناء جين الـ luciferase – أن المواد التى تعمل عليها الإنزيمات التى تنتجها تلك الجينات يجب أن تخترق الأنسجة؛ بما يعنى استبعاد التحليل الهستولوجى فى الكائن الحىّ in vivo (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨).

ويعد الجين cat أقلها استخدامًا فى مجال التحولات الوراثية النباتية، ولكنه يستعمل على نطاق واسع فى مجال الدراسات على الحيوانات (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

الجين بيتا جلوكورونيريز (gus)

ربما كان الجين بيتا جلوكورونيديز β-glucoronidase أكثر الجينات المُخبرة reporter genes استعمالاً فى نواقل vectors التحولات الوراثية، ويرجع ذلك إلى مزاياه العديدة؛ إذ يمكن تقييمه بدرجة عالية من الحساسية والدقة باستعمال طرق سريعة، وسهلة، ولا تتطلب أية إشعاعات. كما يمكن استعماله للحصول على نتائج كمية (عن مستوى التعبير الجينى)، ونوعيته (عن مكان التعبير الجينى). كذلك لا يوجد أى نشاط طبيعى لهذا الإنزيم – أو ربما قد يوجد له نشاط منخفض للغاية – فى مختلف الأنسجة النباتية، ربما باستثناء الأنسجة المتخصصة فى التكاثر الجنسى.

عُزل الجين GUS (وهو الخاص بالإنزيم β-glucuronidase) من *E. coli*، وهو الإنزيم الذى يحول مادة بادئة عديمة اللون (هى 5-bromo-4-chloro-3-indolylglucuronide) إلى مادة ذات لون أزرق قاتم وبذا فإن الخلايا التى يُعبَّر فيها عن الـ GUS تصبح زرقاء إذا ما تعرضت للمادة البادئة، بما يجعل التعرف على الجين أمرًا غاية فى البساطة. ليس هذا فقط، بل إن النباتات الكاملة المحولة وراثيًا تصبح بلون أزرق قاتم إذا ما غمست فى المادة البادئة هذا . إلاّ أن هذا الاختبار يعد مدمرًا للأنسجة النباتية التى نُخضع له، بما يعنى عدم استمرارية الخلية أو النسيج النباتى الذى يتم التحقق من تحوله وراثيًا (عن Gray وآخرين ٢٠٠٥)

جين اللوسيفيريز

يشفر جين اللوسيفيريز luciferase (اختصارًا luc) – المتحصل عليه من ذبابة اليراعة، أو الحُباحب firefly (*Photinus pyralis*) – لإنزيم يعمل على أكسدة الـ D-luciferin بطريقة تعتمد على الـ ATP، يترتب عليها انطلاق الضوء بصورة سريعة للغاية، واكتساب النسيج لونا أصفر لدى معاملته بالـ luciferin

كذلك تتوفر جينات لوسيفيريز أخرى من مصادر بكيترية، مثل الجينين luxA، و luxB بالبكتيريا *Vibrio harveyi*، وتستعمل بالفعل فى بعض حالات التحولات الوراثية، وهى تعمل على أكسدة الألدهيدات الدهنية ذات السلاسل الطويلة، مما يؤدى إلى انطلاق الضوء كذلك

جين الكلورمفينيكول أسيتيل ترانسفيريز

يستعمل جين الكلورمفينيكول أسيتيل ترانسفيريز chloramphenicol acetyltrans-ferase كـ reporter gene فى خلايا الثدييات، وبدرجة أقل فى حالات التحول الوراثى النباتى

جين البروتين ذو الفلورة الخضراء

يعد اختبار الـ gus مدمرًا للخلايا والأنسجة النباتية التى تستعمل فى الاختبار، كما أن مركب الـ luciferin المستعمل فى اختبار الـ luciferase يعد باهظ الثمن

ولهذه الأسباب .. فإن البروتين ذو الفلورة الخضراء green-fluoresent protein (اختصارًا: GFP) المتحصل عليه من قنديل البحر jellyfish (واسمه العلمي *Aequorea victoria*) يحظى باهتمام متزايد، فنظرًا لأنه لا يتطلب سوى أشعة زرقاء أو فوق بنفسجية عند طول موجى ٤٨٠ نانوميتر وأكسجين – ولا يحتاج لأى مواد أولية أخرى إضافية – فإنه يفضل كثيرًا استعماله كمعلم حيوى أثناء النمو النباتى، حيث يظهر البروتين باستشعاع أخضر اللون. ولقد أظهرت الدراسات أن الـ GFP كان مراسلاً جيدًا للإصابة الفيروسية عندما استعمل اندماج بين فيرس إكس البطاطس والـ GFP أثناء تجارب عدوى النباتات. وبسبب التركيزات العالية للفيرس .. فقد أمكن بالـ epifluoresence التعرف – ميكرسكوبيًا – على الخلايا المفردة التى أصيبت بالفيرس (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨، و Gray وآخرين ٢٠٠٥).

هذا .. ويلخص جدولا (١٢–٥)، و(١٢–٦) أكثر جينات الغربلة استعمالاً، ومصادرها، وخصائصها.

وتجدر الإشارة إلى أن المعلمات الجزيئية – التى قدمنا لها بالتفصيل فى فصل سابق – تستعمل – كذلك – كوسيلة فعالة للغربلة؛ حيث يدل تواجدها على تواجد الجين أو الجينات المرغوب فيها المرتبطة بها. ونقدم فى جدول (١٢–٧) مزيدًا من تلك المعلمات الجزيئية التى ترتبط بعدد من جينات المقاومة لأمثلة متنوعة من الفطريات، والنيماتودا، والفيروسات، والبكتيريا المرضة لبعض المحاصيل الزراعية.

الجينات المؤسسة أو المعززة

يستعمل مصطلح الجين المؤسس أو المعزز promoter gene فى وصف الجينات التى تؤسس للتعبير الجينى (للجين المعنى بعملية التحول الوراثى) أو تعزز ظهوره فى أنسجة معينة، أو فى مراحل عمرية معنية دون غيرها.

إن أكثر الجينات المؤسسة أو المعززة شيوعًا هى تلك التى حصل عليها من الـ T-DNA الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium*، ومن الفيروسات النباتية، وترجع أهميتها إلى قدرتها على قصر التعبير الجينى على أى نسيج نباتى معين دون أن يظهر فى أى

نسيج آخر، وإلى قوتها وإمكان استعمالها مع عديد من الأنواع التى يُرغب فى تحويلها وراثيًا

جدول (١٢-٥) بعض جينات الغربلة المستعملة فى عمليات التحول الوراثى النباتى (عن Rathus & Birch ١٩٩١)

الجين	المصدر	نوع الاختبار	ملاحظات
Nopaline synthase (NOS)	T-DNA	Paper ohromatography	لا يقدر كميًا
Octopine synthase (OCS)	T-DNA	Paper chromatography	لا يقدر كميًا
Neomycin	Tn5	Phosphorylation (^{32}P)	يمكن استخدامه كذلك كمعلم انتخابى
Phosphotrans-ferase II (NPT II)		Autoradiography	يصعب تقديره كميًا
		ELISA	يقدر كميًا
Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)	Tn9	Acetylation (^{14}C) (autoradiography scintillation counting)	يقدر كميًا يوجد نشاط طبيعى للجين فى بعض الأنواع
B-glucuronidase (GUS)	*E. coli*	Fluorometric	يقدر كميًا بسهولة
		Spectrophotometic Histochemical	يمكن تحديده موضعيًا
Firelly luciferase (LUC)	*Photinus*	Light emission	من السهل تقديره كميًا
	pyralis	Luminometer	يمكن تحديده موضعيًا
Bacterial luciferase (LUX)	*Vibrio*	Light emission	من السهل تقديره كميًا
	harveyi	Luminometer	
LacZ	E. coli	β-galactosidase activity	لا يمكن تقديره فى بعض الأنواع بسبب وجود نشاط عال للـ gus فيها
		Fluorometic Histochemical	
Anthocyanin biosynthesis (Lc)	Maize	Cell pigmentation (visual)	يمكن تحديد الخلايا المحولة وراثيًا كميًا
Plant viral genomes	Tobacco mosaic virus	Inclusion bodies Coat protein	تشكل الإصابة بالفيرس عائقا أمام الاستدلال على التحول الوراثى

جدول (١٢-٦): بعض جينات الفربلة المستعملة فى عمليات التحول الوراثى (عن Slater وآخرين ٢٠٠٣).

جين الفربلة	رمز الجين	مصدر الجين	اختبار التعرف والتقدير
β-Glucuronidase	*Gus/uidA*	*E. coli*	Fluorimetric (quantitative) or histochemical (*in situ*), non-radioactive
Green fluorescent protein	*gfp*	*Aequorea victoria* (jellyfish)	Fluorescence, non-destructive
Chloramphenicol acetyltransferase	*cat*	*E. coli*	Radioactive assay of plant extract, sensitive, semi-quantitative
Luciferase	*luc*	*Photinus pyralis* (firefly)	Luminescence
Luciferase	*luxA, luxB*	*Vibrio harveyi*	Luminescence

وأكثر الجينات المؤسسة استعمالها هى التى تمكن من حدوث التعبير الجينى فى معظم الأنسجة النباتية، وهى التى يُشار بأنها قوامية أو تكوينية constitutive، ويتحصل على أهمها من فيرس موزايك القنبيط cauliflower mosaic virus (اختصارًا: CaMV) وهو فيرس مزدوج الخيط النووى، ويعرف باسم CaMV 35S promoter (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨)، وهو الذى أسلفنا الإشارة إليه كجين انتخابى كيميرى نقلاً عن Gardner وآخرين (١٩٩١)

ومن أهم المبنيات المؤسسة والأنسجة التى تعزز التعبير فيها عن الجينات المنقولة، ما يلى:

الجين المؤسس أو المعزز promoter	النسيج التى يُعَزز التعبير الجينى فيه
CaMV 35S (من فيرس موزايك القنبيط)	قوامى أو تكوينى constitutive (جميع الأنسجة)
rolC (من الأجروباكتيريم)	خاص بنسيج اللحاء والبرانشيمية الوعائية
ST-LS1	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء
(B33) Patatin Class I	خاص بالدرنات
ADP pyrophosphorylase	الجهاز الثغرى stomata
rbcS	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء
cab	الخلايا المحتوية على البلاستيدات الخضراء

جدول (١٢-٧): أمثلة لعدد من المعلمات الجزيئية التى وجد أنها ترتبط بجينات معينة لمقاومة الأمراض فى عدد من المحاصيل الزراعية (عن Swarup & Swarup ١٩٩٣)

النوع المحصولى	المسبب المرضى	جين المقاومة	المعلم الجزيئى المرتبط
فطريات			
الطماطم	*Stemphylium* sp.	*Sm*	RFLP
	Fusarium oxysporum race 1	*I1*	RFLP
	F. o. race 2	*I2*	RFLP
	F. o. race 3	*I3*	*Got-2*
الذرة	*Puccinia sorghi*	*Rp1*	RFLP
	Helminthosporium	*Hm1*	Cloned
	Carbonum race 1		gene
	H. turcicum race 1	*Ht1*	RFLP
الخس	*Bremia lactucae*	*Dm3*	RFLP
		Dm5/8	
النيماتودا			
الطماطم	*Mcloidogyne incognita*	*Mi*	Aps-1
			RFLP
البطاطس	*Globodcra rostochiensis*	*Gro-1*	RFLP
بنجر السكر	*Heterodera schachtii*		RFLP
الفيروسات			
البطاطس	PVX	*Rx1*	RFLP
		Rx2	
الذرة	MDMV-A	*Mdm1*	RFLP
الطماطم	TMV	*Tm-1*	RFLP
		Tm-2a	RFLP
البكتيريا			
الطماطم	*Pseudomonas syringoe* pv. Tomato	*Pto*	RFLP
الأرز	*Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*	*Xa21*	RFLP

ومن بين قوائم الجينات المؤصفة promoters الأخرى، ما يلى (عن Prg. Bot. - المجلد ٦٢ لعام ٢٠٠١ - صفحة ١١٩):

اسم الـ promoter أو الجين	المصدر	الخلايا أو الأنسجة التى يُعَزز التعبير الجينى فيها
Itpl	التبغ	البشرة
CHS15	الفاصوليا	الأزهار والقمة النامية الجذرية
0.3 kb fragment of AGPase	البطاطس	الخلايا الحارسة
PCNA	الأرز	الميرستيم
Sh	الذرة	اللحاء
fragment of RTBV	الأرز	اللحاء
LAT52	الطماطم	حبوب اللقاح
Puroindolin-b	القمح	البذور
TA29	التبغ	الخلايا الطلائية tapetum

اختبارات التأكد من حدوث التحول الوراثى

يتم التأكد من حدوث عملية التحول الوراثى فى النباتات المتلقية للجينات الغريبة بعديد من الطرق التى تعتمد على الناقل المستعمل فى عملية التحول الوراثى.

ومن بين الطرق المستعملة فى التحقق من حدوث التحول الوراثى من عدمه، ما يلى:

١ - ملاحظة الشكل المظهرى.

تعد طريقة ملاحظة الشكل المظهرى أبسط طرق التحقق من التحول الوراثى إذا ما أظهرت النباتات المحولة وراثيًا الشكل المظهرى المتوقع للجين المنقول. كما يُعد النبات محولاً وراثيًا إذا أمكنه النمو فى وجود تركيز عالٍ من مركب انتخابى، مثل مضادات الحيوية ومبيدات الحشائش. وإذا ما استعمل فى عملية التحول الطراز البرى من *Agrobacterium rhizogenes* فإن النباتات المحولة وراثيًا تنتج جذورًا دقيقة بكثرة، ولا تظهر استجابة للجاذبية الأرضية، وتكون أوراقها مجعدة.

٢ - التحاليل الإنزيمية:

تستخدم بعض التحاليل الإنزيمية لمعلمات جينية (مثل nos، و cat) لاختبار تعبير

دنا غريب فى النسيج المحول وراثيًا، وتستخدم فى هذا الاختبار الأنسجة النباتية النشطة فى النمو .

٣ - تحليل الـ PCR:

يقوم الـ Polymerase Chain Reaction بتضخيم (إكثار) تتابعات الدنا بين بادئات مخلقة محددة. تستعمل مجموعة من البادئات primers (بادئات تقدمية forward primers وأخرى عكسية reverse primers) الخاصة بالجين المنقول لتضخيم (إكثار) تتابعات هذا الجين - بصورة خاصة - من بين كل الدنا الجينومى المعزول من نسيج النبات المحول وراثيًا ويمكن أن يدل ناتج الـ PCR على وجود أو غياب الجين المراد نقله، إلا أن الـ PCR يُضَخِّم جزءًا فقط من هذا الجين، ولذا .. فإن هذا الاختبار يعد مناسبًا كاختبار مبدئى للتحول الوراثى، ولكنه قد يعطى نتائج موجبة تكون خاطئة بسبب احتمالات وجود تلوث بالدنا. هذا .. ولا يعطى اختبار الـ PCR أى نتائج تتعلق بعدد نسخ الجين التى تم نقلها transgene copy number، ومواقع اندماجها فى جينوم النسيج المحول وراثيًا، أو مستوى تعبير هذا الجين.

٤ - تحليل الـ Southern Blot:

يعد تهجين الـ Southern blot طريقة عالية الكفاءة لنقل الدنا من جل الأجاروز إلى الأغشية قبل تهجينها (باستعمال مجسات نشطة إشعاعيًا أو غير نشطة). تعتبر هذه التقنية حساسة وتستعمل فى التعرف على الجين المنقول فى الدنا الجينومى دون الحاجة إلى أى تضخيم لهذا الجين.

ويعطى تحليل الـ Southern Analysis بيانات عما يلى:

أ - الاندماج الثابت للجين المنقول فى الجينوم.

ب - عدد نسخ الجين التى تم نقلها.

جـ - عدد مواقع الاندماج.

هذا إلاّ أن هذه الطريقة لا تعطى أى نتائج بخصوص مدى تعبير الجين المنقول.

٥ - تحليل الـ Western Blot:

يتضمن هذا الاختبار التعرف على البروتينات التى تنتجها الجينات المنقولة فى

النباتات المحولة وراثيًّا، وهو يعد اختبارًا يمكن الاعتماد عليه فى تحديد درجة التعبير الجينى للجين المنقول، حيث يكون من السهل تقدير مستوى التعبير الجينى بحساب كمية البروتين التى ينتجها الجين المنقول كنسبة من البروتين الذائب الكلى بالنبات.

٦ – تحليل النسل Progeny Analysis:

يمكن التعرف على وراثة الجين المنقول بسهولة بتلقيحه مع نبات لم يحول وراثيًّا ودراسة الانعزالات فى الأجيال الانعزالية وكذلك فى عشائر التلقيحات الرجعية (Chahal & Gosal ٢٠٠٢).

الخصائص التى تختلف فيها النباتات المحولة وراثيًّا عن غيرها

إن أهم مما تتميز به النباتات المحولة وراثيًّا من خصائص تختلف بها عن سواها، ما يلى:

١ – المقاومة للمضادات الحيوية:

تعتمد معظم طرق التحول الوراثى على إدماج جين انتخابى معلم ضمن الـ gene construct المستعمل فى نقل الجين المرغوب فيه. ولعل أكثر الجينات المعلمة استعمالاً الجين neomycin phosphotransferase (اختصارًا: nptII)، الذى يكسب الخلايا الحاملة له مقاومة للمضاد الحيوى كاناميسين kanamycin. ويعد الجين الانتخابى المعلم ضروريًّا لأن نسبة ضئيلة فقط من الخلايا التى تخضع لإجراءات التحول الوراثى هى التى تصبح محولة. ويكسب الانتخاب على بيئة زراعة تحتوى على الكاناميسين ميزة انتخابية لتلك الخلايا التى حدث فيها التحول الوراثى بالـ gene construct، والتى تكون – بالتالى – مقاومة للكاناميسين.

يستمر جين المقاومة للكاناميسين فى التعبير عن ذاته فى النباتات المحولة وراثيًّا، ويظل متواجدًا فى أى صنف يتم تطويره منها. ويتوفر حاليًا عديد من الأدلة على أن تواجد جين المقاومة للكاناميسين فى المحاصيل المحولة وراثيًّا لا يحمل معه أية مخاطر على صحة الإنسان أو البيئة. وعلى الرغم من ذلك، فقد حاول العلماء التخلص من هذا الجين بطرق متنوعة، منها إجراء تحويلان وراثيان فى آن واحد باستعمال اثنان من