

Unit-2



மரபணுமாற்றத் தாவரங்கள் (Transgenic plants)

Agrobacterium

சந்த
பெ
அல

1. ஆக்ரோபாக்டீரியம் (Agrobacterium)

மரபு சார்ந்த பயிர் பெருக்க நுட்பங்கள் பல உணவுப் பயிர்களின் மேம்பாட்டில் குறிப்பிடத்தக்க சாதனை புரிந்துள்ளதை அறிவோம். இது ஒரு பழமைப்பட்ட ஒழுங்குமுறை, பாலியில் மற்றும் உடல இனப்பெருக்க முறையில் ஜீன் மாறியமைவதை அறிவோம். இந்நுட்பத்தை செய்து முடிக்க நெடுங்காலம் பிடிக்கும். எடுத்துக்காட்டாக, ஒரு புதிய நெற் அல்லது கோதுமை ரகத்தை தோற்றுவிப்பதற்கு 6-8 வருடங்கள் தேவைப்படும். ஜீன் கட்டமைப்பு மற்றும் பணிகளின் துரிதமான முன்னேற்றம், மரபுப் பொறியியல் நுட்பங்களுடன் சேர்க்கப்பட்டுள்ளது. இந்நுட்ப மூலம் குறுகிய காலத்தில் விரும்பப்படும்/வேண்டத்தக்க பண்புகளைக் கொண்ட பயிர் உற்பத்தியை மேம்படுத்திக் காட்ட முடியும்.

மர
கி

மரபு மாற்றமைவு நுட்பவியலில் வேண்டப்படும் ஜீன், ஒரு தாவர இனத்திலிருந்து இன்னொரு தாவர இனத்திற்கு மாற்றியமைக்கப்படுகிறது. மரபணுமாற்றம் (transgene) என்பது மாற்றியமைக்கப்பட்ட ஜீனை குறிப்பதற்காக பயன்படுத்தப்படுகிறது. தாவரவியலில் மரபியற் மாற்றமைவு என்பது தாவர மாற்றுத்தோற்றம் (transgenesis) என பொருள்படுகிறது. மரபியற் மாற்றுருவாக்கிய புதிய தாவரங்கள் மரபணு மாற்றுத் தாவரங்கள் (transgenic plants) என கருதப்படுகின்றன.

மரபணு மாற்றுத் தாவரங்களின் வளர்ச்சி மீள்சேர்க்கை DNA (rDNA) நுட்பவியலின் ஒருமைப்பாட்டு உபயோகிப்பின் பலன் ஆகும். மேலும், ஜீன் மாற்றமைவு முறைகளும், திகவளர்ப்பு நுட்பங்களும் இம்மரபணு மாற்றுத் தாவரங்கள் தோற்றுவிக்கப் பயன்பட்டு வருகின்றன.

மரபணு மாற்றுத் தாவரங்களைத் தோற்றுவிப்பதற்கான காரணங்கள்

☞ வேளாண், தோட்டக்கலை, அலங்காரத் தாவரங்களை மேம்படுத்துவதற்கு

☞ புரதங்கள், மருந்து வகைகள், மருந்தாக்கப் பொருட்கள் போன்ற வியாபார முக்கியத்துவம் வாய்ந்த பொருட்களை செலவீனம் இல்லாமல் தாவர உயிரிய உலைகள் (plant bioreactors) வழியே உற்பத்தி செய்தல்.

☞ உயிரிய செயல்முறைகளின் பொழுது பயிர்களில் ஜீன்களின் செயல்பாட்டினைப் பற்றி அறிதல்.

மரபியற் பண்புக்கூறுகளை மரபணு மாற்றுத் தாவரங்களில் அறிமுகப்படுத்துதல்

தாவர செல்கள் என்பவை சர்வ வல்லமை பொருந்தியவை என்பதை அறிவோம். ஓர் ஒற்றைத் தாவர செல்வே முழுத்தாவரமாக அவதரிக்கும் வல்லமை பொருந்தியது. புதிய ஜீன்களுடன் கூடிய மரபுப் பொறியியல் செல்கள், ஒரு மரபணு மாற்றத் தாவரத்தையே தோற்றுவிக்க முடியும். வேண்டப்பட்ட பண்புக்கூறினை தாங்கியிருக்கும் தாவரம், அடுத்தடுத்த

சந்ததிகளைத் தோற்றுவிக்கும். பல மரபியற் பண்புகள் (traits) மரபுப் பொறியியல் மூலம் தாவரங்களில் அறிமுகப்படுத்தப்பட்டுள்ளன. அவைகளாவன,

1. களைக்கொல்லிகளுக்கு எதிர்ப்புத்திறன்
2. வைரல் நோய்க்கு எதிரான காப்புத்திறன்
3. பூச்சியினச் செயல்பாடு
4. ஊட்டத்தர மேம்பாடு
5. பூவின் நிறமிகள் திருத்தியமைத்தல்
6. சுற்றுச்சூழல் வதைப்புகளுக்குச் சகிப்புத் தன்மை
7. சுய பொருத்தமின்மை

மரபியற் மாற்றமைவு தாவரங்களின் பெருமளவு வியாபார உபயோகிப்புக்காக, கீழ்க்கண்ட தேவைப்பாடுகள் திருப்தி பெறும்.

- அனைத்து தாவரவகை செல்களுக்கும் விரும்பிய ஜீனினை அறிமுகப்படுத்துதல்.
- சரியான பொழுதில் பொருத்தமான செல்களில் போத்து ஜீன்களின் வெளிப்பாடு.
- செருகிய புதிய ஜீனின் நிலைப்பாடான பராமரிப்பு
- அடுத்தடுத்த சந்ததிகளுக்கு புதிய மரபியற் தகவல் கடத்தப்படுதல்

ஜீன் மாற்றமைவு முறைகள் (Gene transfer methods)

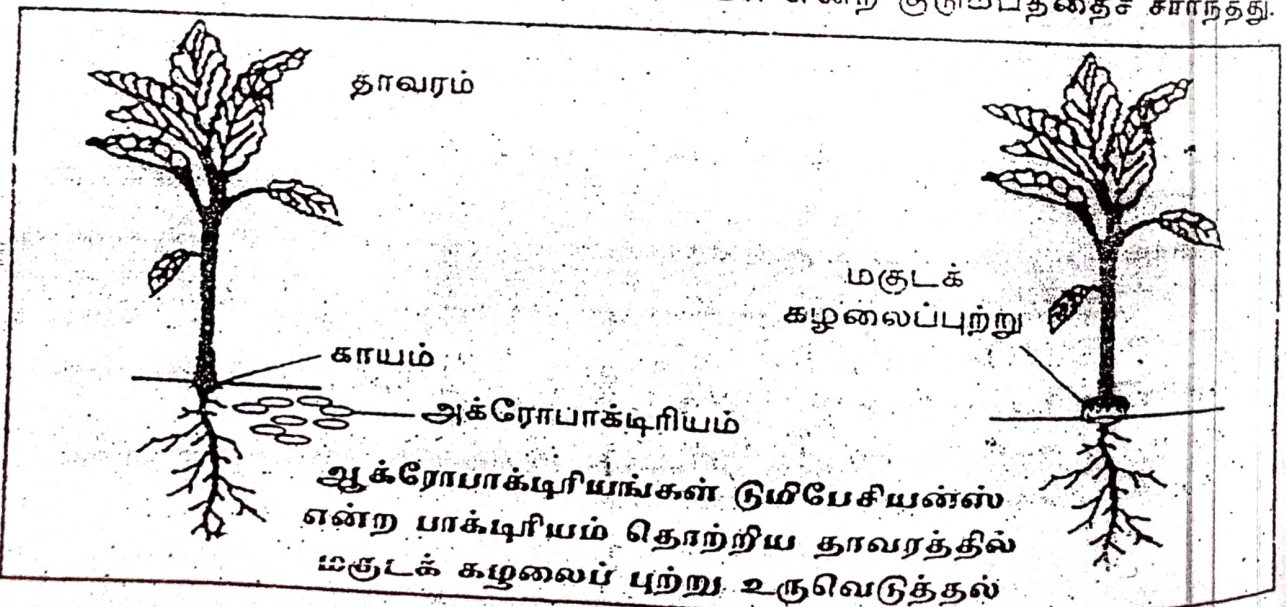
தாவர மரபியற் மாற்றமைவில் ஜீன் மாற்ற நுட்பங்கள் இரு தொகுதிகளாகப் பிரிக்கப்பட்டுள்ளன. அவைகளாவன,

1. நுண்மங்கடத்தி - இடையீட்டு ஜீன் மாற்றமைவு
2. நேரடி/நுண்மங்கடத்தியற்ற DNA மாற்றமைவு

இங்கு நுண்மங் கடத்தும் இடையீட்டு ஜீன் மாற்றம் பற்றி அறிவோம். ஆக்ரோபாக்டிரியம் - இடையீட்டு மாற்றமைவு அல்லது தாவர வைரளை நுண்மங் கடத்தியாகப் பயன்படுத்தி கொண்டுசெலுத்தப்படுதல்.

ஆக்ரோபாக்டிரியம் இடையீட்டு ஜீன் மாற்றமைவு

ஆக்ரோபாக்டிரியம் டிமி.பேசியன்ஸ் என்பது மண்ணில் தோன்றும், க்ராம்சாயம் ஏற்கா பாக்டிரியம். இது கோல் வடிவத்தில் இயங்கும் இயல்பு கொண்டது. இப்பாக்டிரியம் ரைசோபியேசி என்ற குடும்பத்தைச் சார்ந்தது.



இது ஒரு தாவர பிளாபூதகம். இப்பாக்கடியத்தை இயற்கையின் விளையுயன்மிக்கத்தாவர மரபியற் பொறியாளர் (Nature's effective plant genetic engineer) என அழைப்பார். சில வல்லுநர்கள் பெருபிரிவக ஜீன் மாற்றமைவின் இயற்கை கைதேர்ந்த நிபுணர் (Natural expert of inter kingdom gene transfer) என இப்பாக்கடியத்தைக் கருதுகின்றனர். உண்மையில், தாவர மாற்றுருவாக்க நுட்பங்களின் மேம்பாட்டிற்கான முக்கிய வெகுமதி (Credit), ஆ.டுமிபேசியென்ஸ் பாக்கடியத்தின் தனித்துவத் திறனைச் சென்றடைகிறது. ஏனெனில், தாவரவியற் வல்லுநர்கள் மிகவும் நேசிக்கத்தக்க பாக்கடியமாகத் திகழ்வது ஆ.டுமிபேசியென்ஸ் ஆக்ரோபாக்கடியத்தில் ஆ.டுமிபேசியென்ஸ், ஆ.ரைஷோஜீன்ஸ் என்ற இரு இனங்கள் உள்ளன.

மகுடக் கழலை நோய் மற்றும் Ti பிளாஸ்மிடு (Crown gall disease and Ti plasmid)

சுமார் 100 ஆண்டுகளுக்கு முன்னர் ஸ்மித் மற்றும் டவுன்ஸென்டு (1907) ஆகியோர் மகுடக் கழலைப் புற்றுநோய்க்கு காரணியாக பாக்கடியம் திகழ்கிறது என்பதை முதன் முதலில் முன் வைத்தனர். ஆனால், இதன் முக்கியத்துவத்தை இவர்கள் வெளிப்படுத்தவில்லை.

தாவர உறுப்பில் காயம்பட்ட பகுதியில் காணப்படும் திக வழியே ஆ.டுமிபேசியென்ஸ் என்ற பாக்கடியங்கள் முதற்படியாகத் தொற்றிக் கொண்டு மகுடக் கழலை எனும் தாவரப் புற்றினைத் தோற்றுவிக்கின்றன.

காயம்பட்ட இலக்கில் அசிட்டோஸிரிங்கான், ஹைட்ராக்ஸி அசிட்டோஸிரிங்கான் போன்ற பீனாலிக் கூட்டுப்பொருட்களின் விடுவிப்பு, தாவரத் திகவினுள் பாக்கடியம் நுழைவதற்கு வழிவகையாகிறது.

புற்று தூண்டும் பிளாஸ்மிடு எனும் S1 பிளாஸ்மிடு பாக்கடியத்திலிருந்து விடுவிக்கப்படும் பொழுது மகுடக் கழலை உருவாக்கம் தோன்றுகிறது. இவ்விதமாக பிளாஸ்மிடின் ஒரு கண்டம்/துண்டம் (fragment/segment), T-DNA என அழைக்கப்படுகிறது. உண்மையிலேயே T-DNA, பாக்கடியத்திலிருந்து ஒம்புயிர்த் தாவரத்தினுள் மாறியமைந்து அங்கு செவ்வின் குரோமசோமுடன் ஒம்புயிர்த் மரபகத்துடன் ஒருமைப்பாடுற்றுக் கொள்கிறது.

இவ்விதமாக, மகுடக்கழலை நோய் இயற்கையாகத் தோன்றும் மரபுப் பொறியியல் செயல்முறையாக உள்ளது.

வளர்ச்சி ஊடகங்களின் ஆக்ஸின், சைட்டோகைனின் போன்ற உயிரிய உற்பத்தியில் பங்குபெறும் புரதங்களுக்கான குறியீட்டு ஜீனினையும், ஒப்பின்கள் - அமினோ அமில இடைவிளைபொருள்கள், அக்ரோபின்கள் - சர்க்கரை விளைபொருட்கள் போன்ற புதினத் தாவர வளர்ச்சிதை மாற்றப் பொருட்களுக்கான குறியீட்டு ஜீன்களையும் இந்த T-DNA சுமந்து செல்கிறது.

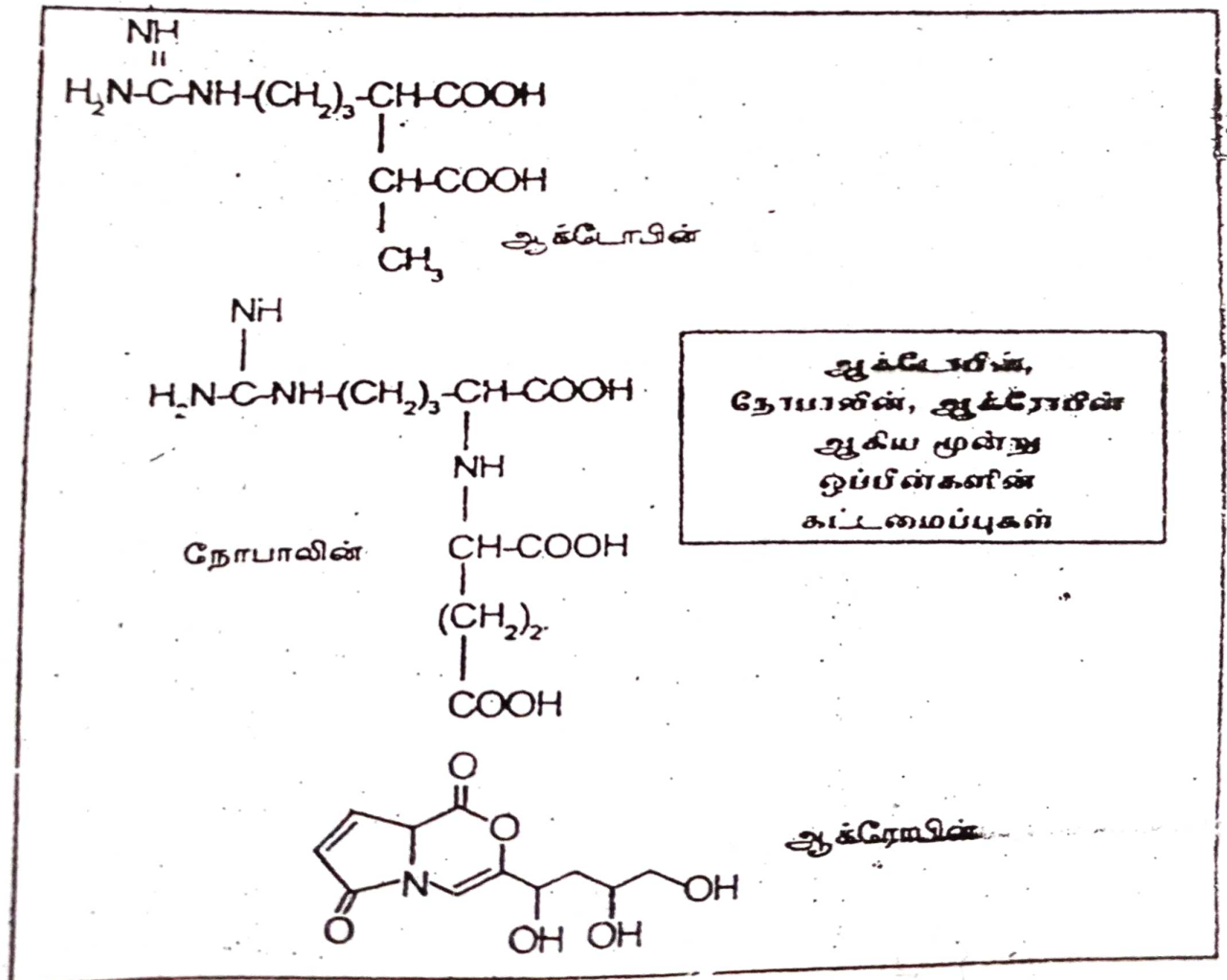
ஆ.டுமிபேசியென்ஸ் காப்பன் மூலத்திற்காகவும் ஆற்றலுக்காகவும் ஒப்பின்கள், அக்ரோபின்களைப் பயன்படுத்திக் கொள்ளும்பொழுது வளர்ச்சி ஊக்கிகள், தாவர செல்கள் பெருக்கமடைவதற்கு ஏதுவாகின்றன. இந்த முறையில் பார்க்கும் பொழுது ஒப்பின்களும் அக்ரோபின்களும் தாவர வளர்ச்சிதை மாற்றத்தின் ஒருபாகம் அல்ல. உற்பத்தியாக்குவதுமில்லை வளர்ச்சிதை மாற்றம் ஆக்குவதும் இல்லை. இப்படி, ஆக்ரோபாக்கடியம், டுமிபேசியென்ஸ் தமது பயனுக்காக ஊட்டப்பொருள்

உற்பத்திக்கு ஒரு உயராய உற்பத்தி இயந்திரத்தை ஏற்படுத்துவதுடன் தாவர செல்களை மரபு மாற்றமும் செய்கிறது.

தொடர்ந்து நோய் தொற்றியப் பாக்டீரியங்கள் பன்மடங்காகப் பெருக்கம் அடையும் பொழுது மகுடக் கழலை வளர்ச்சி பெறுகிறது. மகுடக் கழலை என்பது ஒன்றுகூவிந்த பாக்டீரியங்களும் தாவரப் பொருட்களும் கொண்ட வெளிப்படையான பொருண்மை (பிண்டம்) (mass) ஆகும். T-DNAயின் ஜீன்களின் மாற்றம், ஒருமைப்பாடு, குறியறிவிப்பு ஆகியவற்றின் பின்விளைவாக மகுடக் கழலை உருவாக்கம் உள்ளது. மகுடக் கழலின் பற்றுகளின் உருவாக்கத்திற்கு மரபிய மாற்றுவாக்கம் வழிகோலுகிறது. இப்புற்றுக்கள் தாவரத்தின் இயல்பான வளர்ச்சியுடன் இடையூறு செய்கின்றன. திராட்சை, ரோஸ், கற்கனி (Stone fruit) போன்ற இருவித்திலைத் தாவரங்கள் மகுடக்கழலை நோயினால் பாதிக்கப்படுகின்றன.

Ti பிளாஸ்மிடின் உறுப்பாக்கம் (Organization of Ti Plasmid)

ஒவ்வொரு Ti பிளாமிடின் உருவளவு சுமார் 200kb இருக்கக்கூடும். ஆக்ரோபாக்டீரியச் செல்லினுள்ளே தன்னிச்சையாக, இரட்டிப்படையும் வட்டவடிவ DNAவாக இந்த Ti பிளாஸ்மிடு உள்ளது. T-DNA என்பது மாற்றமைவுற்ற (transformed) DNA ஆகும். இதன் நீளம் மாறுபடத்தக்கது. இதனளவு 12-24kb இருக்கக்கூடும். T-DNA பாக்டீரியாவைச் சார்ந்துள்ளது.



இதிலிருந்தே Ti பிளாஸ்மிடு வெளிவருகிறது. Ti பிளாஸ்மிடின் நோப்போலின் மரபுக்கூறு (nopaline strain), 20 kb நீளங் கொண்ட ஒரு T-DNAவைக் கொண்டுள்ளது. ஆக்டோபின் மரபுக்கூறு T_L மற்றும் T_R ஆகிய இவற்றின் நீளம் 14kb மற்றும் 7kb என இருக்கக்கூடும். ஆக்டோபின் மரபுக்கூறு கொண்டுள்ள இந்த இரு T-DNA பகுதிகள் T_L , T_R என குறிக்கப்படுகின்றன.

Ti பிளாஸ்மிடின் அமைப்பினைப் படத்தின் மூலம் அறியலாம்.

Ti பிளாஸ்மிடு மூன்று முக்கியப் பகுதிகளைக் கொண்டுள்ளது.

1. T-DNA பகுதி

ஆக்ஸின் (aux), சைட்டோகைனின் (cyt), ஒப்பின் (ocs) ஆகியவற்றின் உயிரிய உற்பத்திக்கான ஜீன்களை இப்பகுதி கொண்டிருப்பதுடன் இடது மற்றும் வலது எல்லைகளால் பக்கப்பகுதியாகவும் உள்ளது. இம்மூன்று ஜீன்களும் சேர்த்து அன்கோஜீன்கள் எனக் குறிக்கப்படுகின்றன. ஏனெனில் இவையே புற்று உருவத்தைத் தீர்மானிப்பதாக உள்ளன.

T-DNA எல்லைகள் (Borders)

T-DNAயின் இடது, வலது என இருபக்கத்திலும் இருக்கும் 24kb தொடர்வரிசைகளின் ஒரு குவை (seb) தாவர செல்விற்குள் மாறியமைகிறது. T-DNA மாற்றமைவு, புற்றுத்தோற்றம் போன்றவற்றிற்கு வலது எல்லை மிகவும் இடராக உள்ளது.

2. வீரியப் (நச்சுப்) பகுதி (Virulence region)

தாவர செல்விற்குள் T-DNAவை மாற்றுவதற்கு பொறுப்பாகும் ஜீன்கள், T-DNAயின் வெளிப் பகுதியில் அமைந்துள்ளன. இப்பகுதியினை 'விர்' (vir) அல்லது வீரியப் (நச்சு) பகுதி என அழைப்பர். T-DNA மாற்றமைவில் ஈடுபடும் புரதங்களுக்கு 'விர்' பகுதி குறியீடுகிறது. குறைந்தபட்சம் 9 விர் - ஜீன் ஒப்பிரான்கள் அடையாளம் காணப்பட்டுள்ளன. அவைகளாவன Vir A, Vir G, Vir B₁, Vir C₁, Vir D₁, D₂, D₄ மற்றும் Vir E₁, E₂.

3. ஒப்பின் சிதைமாற்றப்பகுதி (opine catabolism region)

ஒப்பின்களின் உள்ளெடுப்பு மற்றும் வளர்சிதை மாற்றங்களில் பங்கு பெரும் புரதங்களுக்கு இப்பகுதி குறியீடு தருகிறது.

மேற்கண்ட மூன்று பகுதிகள் மட்டுமின்றி 'ஒரி' பகுதி (ori region) என்ற ஒன்றும் உண்டு. இப்பகுதி DNA இரட்டிப்புத் தோன்றுவதற்கு பொறுப்பாகிறது. இந்த இரட்டிப்பு Ti பிளாஸ்மிடு ஆடுமிபேசியென்ஸில் நிலைப்பாடாக பராமரிக்க அனுமதிக்கிறது.

T-DNA மாற்றமைவும் ஒருமைப்பாடும்

(T-DNA transfer and integration)

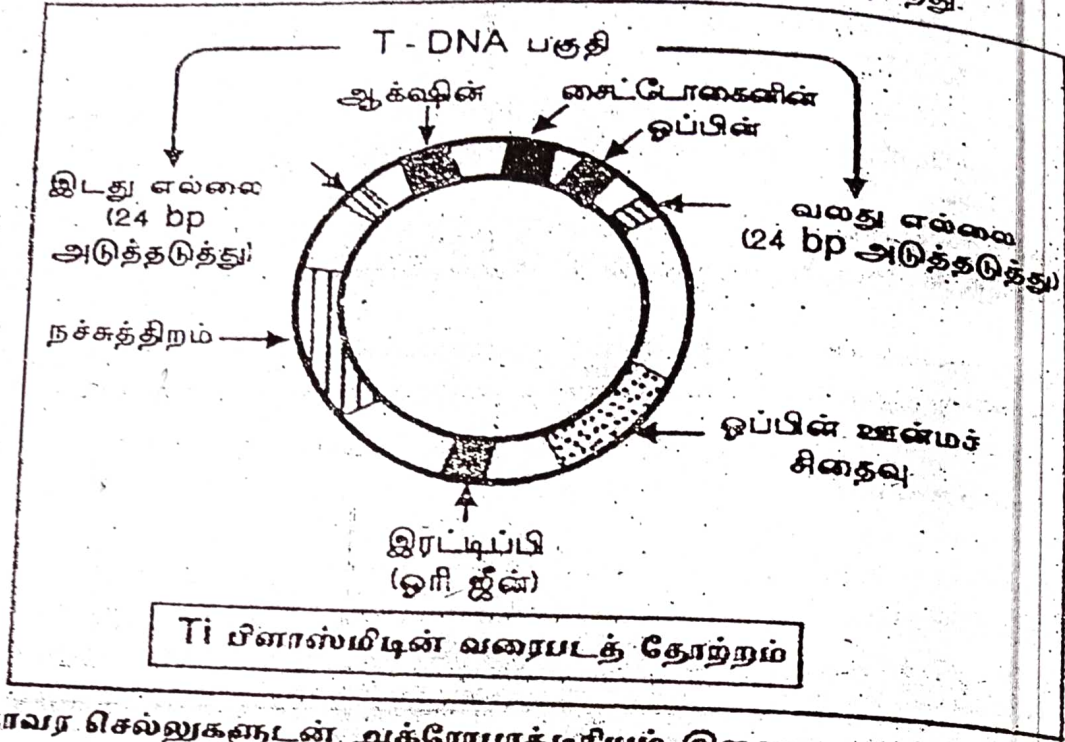
ஒம்புயிர் தாவர மரபகத்தினுள் T-DNA மாற்றமைவும் அதன் ஒருமைப்பாட்டின் செயல்முறையும் படத்தின் மூலம் விளக்கி விவரிக்கப்பட்டுள்ளன.

1. அக்ரோபாக்டீரியத்திற்கான சமிக்கை தூண்டல்

(Signal induction to agrobacterium)

காயம்பட்ட தாவர செல்கள் பீனாலிக் கூட்டுப் பொருட்கள், சர்க்கரை ஆகியவற்றை விடுவிக்கின்றன. இப்பொருட்களைச் சமிக்கைகளாக அக்ரோபாக்டீரியம் அறிந்து கொள்கிறது. அக்ரோபாக்டீரியத்தின் உயிர்வேதி

நிகழ்வுகளின் தொடர்வரிசையில் சமிக்கைகள் தூண்டிய விளைவு
Ti பிளாஸ்மிடின் T-DNA மாற்றமைவில் இறுதியாக உதவுகிறது.



2. தாவர செல்லுகளுடன் அக்ரோபாக்டீரியம் இணைவு (Attachment of Agrobacterium to plant cells)

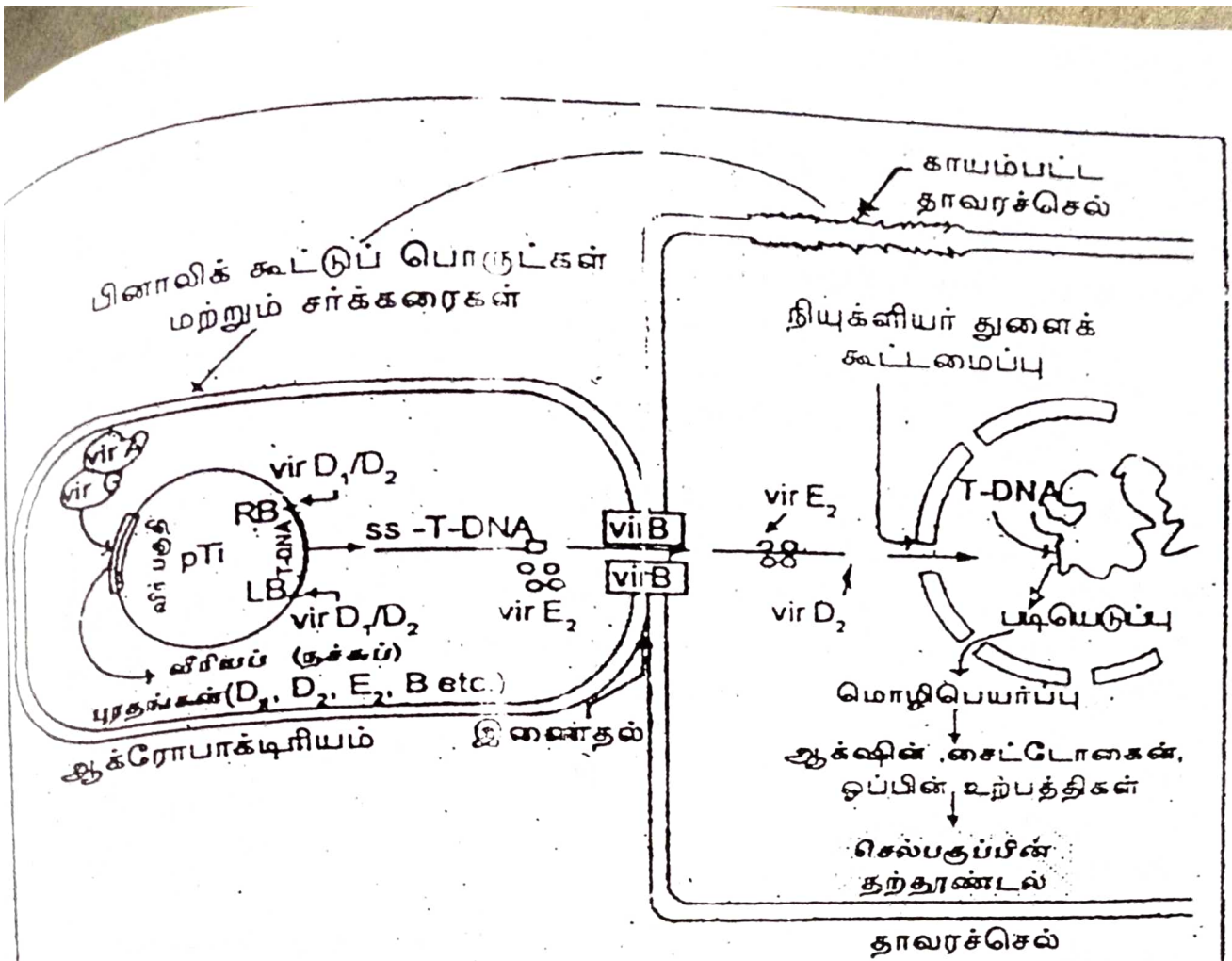
பாக்டீரியத்தில் உற்பத்தியான பாலிலாக்கரைடுகள், குறிப்பாக செல்லுலோஸ் நார்கள் மூலமாக ஆக்ரோபாக்டீரியம் தாவர செல்களுடன் இணைந்து கொள்கின்றன. பாக்டீரியம் மற்றும் தாவர செல் இணைப்பில் பல குரோமோசோமல் நச்சு (virulence) (chv) ஜீன்கள் பொறுப்பு வகிப்பது அறியப்பட்டுள்ளது.

3. நச்சுப் புரத உற்பத்தி (Production of virulence protein)

ஆக்ரோபாக்டீரியத்தில் சமிக்கை (signal) தூண்டும் பொழுது அது தாவர செல்லுடன் இணைந்து கொள்கிறது. இதற்காக, வரிசைப்படியான நிகழ்வுகள் ஏற்படுகின்றன. இதன் விளைவாக நச்சுப்புரதங்களின் உற்பத்தி நிகழ்கிறது. பின்னால் பொருளின் சமிக்கை விர் A ஜீனினைத் தூண்டுகிறது. இந்த ஜீன் மாறாக விர் G ஜீனினைச் செயல்படுத்துகிறது. D₁, D₂, E₂, B போன்ற தொடர்புடைய நச்சுப்புரதங்களை உற்பத்தி செய்வதற்கு Ti பிளாஸ்மிடின் நச்சு ஜீனின் வெளிப்பாட்டினை இந்த ஜீன் தூண்டுகிறது. குளுகோஸ், கேல்க்டோஸ், சைலோஸ் போன்ற சர்க்கரைகள் நச்சு ஜீன்களைத் தூண்டுவது அறியப்பட்டுள்ளது.

4. T-DNA இழைம உற்பத்தி (Production of T-DNA Strand)

T-DNAயின் இடது, வலது எல்லைகள் விர்D₁/விர்D₂ புரதங்களால் கண்டறியப்பட்டுள்ளன. இப்புரதங்கள் ஒற்றை இழைம T-DNA (Single stranded T-DNA) (SS T-DNA) உற்பத்தியில் பங்கு பெறுகின்றன. இது பாதுகாப்பாக தாவர செல்விற்கு ஏற்றுமதியாகிறது. பின்பு இது விர் D₂ புரதத்துடன் இணைவற்றுக் கொள்கிறது.



T-DNA மாற்றமையும் தாவர செல் மரபகத்துடன் இதன் ஒருமைப்பாடும் (pTi - Ti சீளாஸ்மிடு, RB -வலது எல்லை LB- இடது எல்லை, SS ஒற்றை இழைமம்

- ஆக்ரோபாக்டிரியத்தின் வெளியே T-DNAயின் மாற்றம்
ssT-DNA - விர் D₂ கூட்டமைவு, விர் Gயுடன் சேர்ந்து பாக்டிரிய செவ்விலிருந்து ஏற்றுமதியாகிறது. இதற்கு விர் B உற்பத்திகள் போக்குவரத்து சாதனமாக (transport apparatus) அமைகின்றன.
- தாவர செல்லினுள் T-DNA மாற்றமையும் ஒருமைப்பாடும் (Transfer of T-DNA into plant cells and integration)
T-DNA - விர் D₂ கூட்டமைவு complex செவ்வின் பிளாஸ்மா சவ்வின் குறுக்காகக் கடந்து செல்கிறது. தாவர செவ்வில் T-DNAவானது விர் E₂வுடன் அடைக்கப்படுகிறது. இவ்வடைப்பு நியுக்ளியேஸஸ் நொதியின் சிதைவிருந்து பாதுகாக்கிறது. பல்வகைத் தாவரப்புரதங்களுடன் கூடிய விர் D மற்றும் விர் E ஒன்றுக்கொன்று செயல்பாடு T-DNA போக்குவரத்தையும் மேம்பாட்டையும் ஊக்கிவிக்கின்றன. T-DNA - விர் D₂ - விர் E₂ தாவரப் புரத கூட்டமைவு, நியுக்ளியர் துளை வழியே நியுக்ளியினுள் நுழைகிறது. இந்நியுக்ளியினுள்ளே முறைகேடான மீள்சேர்க்கை (illegitimate recombination) என அழைக்கப்படும் செயல்முறை மூலம் தாவரக் குரோமோசோமினுள் T-DNA ஒருமைப்பாடடைந்து கொள்கிறது. இம்மீள்சேர்க்கை ஹோமோலோகஸ் மீள்சேர்க்கையிலிருந்து (recombination) மாறுபட்டது. ஏனெனில் இது தொடர்வரிசை ஒப்புமையச் சார்ந்திருப்பதில்லை.

அ. ரைஹோஜீன்ஸ் - Ri பிளாஸ்மிடுகளின் வேர்த்தூவி நோய் (Hairy root disease of A. Rhizogenes - Ri plasmids)

அக்ரோபாக்டிரியம் ரைஹோஜீன்ஸ்கூட தாவரத்தில் நோய் தொற்றுவிக்கக்கூடும். இந்நோய் வேர்த்தூவியில் மட்டும் காணப்படும். அ. டிமிபேசியென்ஸ் போல் மருடக் கழலை நோயினரைக் தோற்றுவிப்பதில்லை. இந்த அ. ரைஹோஜீன்ஸ் தனிமைப்படுத்தி பண்பாக்கப்பட்டது. இப்பிளாஸ்மிடிகளை Ri பிளாஸ்மிடு என அழைப்பர். இதில் Ri என்பது வேர்த்தூண்டல் (Root inducing) என்பதைக் குறிக்கிறது. Ri பிளாஸ்மிடுகள் பல்வகைப்படுகின்றன. சில Ri பிளாஸ்மிடுகள் Ti பிளாஸ்மிடிகளை ஒத்துள்ளது. எ.கா. ஆக்ஸின் உயிரிய உற்பத்தி ஜீன்கள். நச்சு ஜீன்களுக்கு பதிலாக T-DNA மீது திறந்த பயில்வுச் சட்டங்களின் வரிசை Ri பிளாஸ்மிடுகளில் உள்ளது. இந்த ஜீன்களின் உற்பத்திகள் வளர்ச்சி ஒழுங்கியக்கிகளின் வளர்சிதை மாற்றத்தில் பங்கு பெறுகின்றன. இப்பிளாஸ்மிடு ஆக்ஸின்க்கு வசிந்து வேர் உருவாக்கத்திற்கு வழிவகுக்கிறது.

அ. ரைஹோஜீன்ஸின் நுண்மங்கடத்திகள்

அ. டிமிபேசியென்ஸினில் நுண்மங்கடத்தி உற்பத்தியானது போல இங்கும் ஆ. ரைஹோஜீன்ஸ் பிளாஸ்மிடிகளைப் பயன்படுத்தி நுண்மங்கடத்தி தயாரித்துக் கொள்ளும். ஜீன் மாற்றமைவில், இந்த நுண்மங் கடத்திகள் மாற்றுவழிக் கலைநுட்பமாக உள்ளன.

இருப்பினும் அ. ரைஹோஜீன்ஸ் பாக்கியத்தை நுண்மங்கடத்தியாக பயன்படுத்துவது இல்லை. ஏனெனில், அ. டிமிபேசியென்ஸ் திறன்மிக்க நுண்மங்கடத்தியாக உதவுவது குறிப்பிடத்தக்கது.

வேர்த்தூவிகளின் முக்கியத்துவம் (Importance of hairy roots)

ஆய்வகத்தில் கண்ணாடிக் கலனகச்சூழலில் வேர்த்தூவிகளை வளர்க்க முடியும். உயிர்தொழில் நுட்பவியலில் வேர் தூவிகள் முக்கியப் பங்கு வகிக்கின்றன. செகண்டரி வளர்சிதை மாற்ற பொருட்களின் (குறிப்பாக மருந்தியல் சார்ந்த புரதங்கள்) உற்பத்திக்கு பயன்மிக்கதக்க வேர்த்தூவிகள் விளங்குகின்றன.

Ti பிளாஸ்மிடு - வருவிக்கப்பட்ட நுண்மங்கடத்து முறைமைகள் Ti plasmid - Derived vector systems)

மரபியற் மாற்றமைவுத் தாவரங்களுக்கு அக்ரோபாக்டிரியல் Ti பிளாஸ்மிடின் திறன் விவரிக்கப்பட்டுள்ளது. வேண்டப்படும் DNA தொடர்வரிசையை (ஜீன்களை) T-DNA பகுதியின் (Ti பிளாஸ்மிடின்) உள்ளே செருகுவது சாத்தியமாகிறது. இதன்பின், அ. டிமிபேசியென்ஸ் இந்த ஜீன்களை தாவர செவ்வின் மரபகத்தினுள் விடுவிக்கிறது. இச்செயல் முறையில் இயற்கை நுண்மங் கடத்திகளாக Ti பிளாஸ்மிடுகள் பயன்படுகின்றன. இருப்பினும், போத்தாக்க நுண்மங்கடத்திகளாக நேரடியாக Ti பிளாஸ்மிடுகளைப் பயன்படுத்துவதற்குப் பல வரம்பீடுகள் வகுக்கப்பட்டுள்ளன.

○ Ti பிளாஸ்மிடுகள் பெரிய உருவளவு கொண்டவை. (200-800kb) மீள்சேர்க்கை ஆய்வுகளுக்கு சிறிய நுண்மங்கடத்திகள் தேர்வு

செய்யப்படுகின்றன. ஏனெனில், Ti பிளாஸ்மிடின் DNA பெருக்கல்கள்கள் Coaத்தாக்கத்திற்கு தேவைப்படுவதில்லை.

○ Ti பிளாஸ்மிடில் தனிப்பட்ட வளையறை நொதி இலக்குகள் இருப்பதில்லை.

○ உற்பத்தியான ஆக்ஸிஜன், எசுட்டோகைனின் ஆகியவை தாவரம் மீளவும் தழைப்பிக்க தாவரச் செல்களைத் தடுத்துவிடுகின்றன. எனவே, இந்த இரு ஊர்மோன்களுக்கான இரு ஜீன்கள் அகற்றப்படுகின்றன.

○ மாற்றுவாகிய தாவர செல்களில் ஓப்பின் உற்பத்தி, தாவர விளைச்சலைத் தாழ்த்தி விடுகிறது. எனவே, ஓப்பின் உற்பத்தி செய்யும் ஜீன்கள் தாவரத்திற்கு தேவையில்லை என்பதால் அதனையும் நீக்க வேண்டும்.

○ Ti பிளாஸ்மிடிகள் இ.கோலையில் இரட்டிப்படைவதில்லை. மீன்சேர்க்கை ஆய்வுகளில் பரவலாக இ.கோலை பயன்படுகிறது. இரட்டிப்புத் தோற்றத்திற்கு மாற்றுவழி ஏற்பாடு சேர்க்கப்படுவதால் இ.கோலையில் பிளாஸ்மிடு இரட்டிப்பு அடைய அனுமதிக்கப்படுகிறது.

○ மேற்கண்ட வரம்புகளை அடிப்படையாகக் கொண்டு Ti பிளாஸ்மிடு தழுவிடக் கடத்திகள், தக்க மாற்றமைவுக்கு உட்படுத்தி கட்டுமானம் ஆக்கப்படுகின்றன. இத்துண்மங்கடத்திகள் கீழ்க்கண்ட அங்கங்களை உள்ளடக்கியுள்ளன.

அ) T-DNAயின் வலது எல்லைத் தொடர்வரிசை தாவர செல் DNAயினால் ஒருமைப்பாடு அடைவதற்கு அடிப்படைத் தேவையாகிறது.

ஆ) T-DNA-ன் வலக்கன்களுக்கு இடையே உள்ள பகுதிகளுள் போத்து ஜீன் செருகவை பன்மடங்கு போத்தாக்க இலக்கு (பலகண்ணி DNA) மேம்படுத்துகிறது.

இ) DNA இரட்டிப்பின் தோற்றம்: இ.கோலையில் பிளாஸ்மிடுகள் பெருகப் பண்ணுகிறது.

ஈ) மாற்றமைவுற்ற செல்களின் பொருத்தமான தேர்வுக்காக, நியோமைசின், பால்போட்ரான்ஸ்பிரெஸ் போன்ற தேர்ந்தெடுக்கத்தக்க குறியீட்டு ஜீன் வேண்டியதாகிறது.

உ) தாவரங்களில் மரபியல் மாற்றமைவுக்கு Ti பிளாஸ்மிடு பெறப்பட்ட நுண்மங்கடத்திகளின் இருவகைகள் பயன்படுத்தப்படுகின்றன. அவைகளாவன, கூட்டொருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்திகள் (Cointegrate vectors) மற்றும் இருசம நுண்மங்கடத்திகள் (Binary vectors)

1. கூட்டொருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்திகள் கூட்டொருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்து முறைமையில் வலிமை நீக்கி மாற்றியமைத்த Ti பிளாஸ்மிடு, இடைநிலை போத்து நுண்மங்கடத்தியுடன் சேர்ந்து மீன்சேர்க்கை Ti பிளாஸ்மிடிகளை உற்பத்தி செய்கிறது.

வலிமை நீக்கிய Ti பிளாஸ்மிடின் உற்பத்தி ஊர்மோன் உயிரிய உற்பத்திக்கான T-DNA ஜீன்கள் நீக்கப்படுகின்றன (வலிமையகற்றப்படுகின்றன). நீக்கிய DNA இலக்கில் pBR322 எனும் பாக்க்டிரியல் பிளாஸ்மிடு DNA தொடர்வரிசை சேர்ந்து கொள்கிறது. இவ்வலிமையகற்றிய பிளாஸ்மிடிகளை ஏற்பர் பிளாஸ்மிடு (Receptor plasmid) எனவும் அழைப்பர். இப்பிளாஸ்மிடு T-DNAயின் அடிப்படைக் கூட்டமைப்பைப் பெற்றுள்ளது. அதாவது, இப்பிளாஸ்மிடில் இடது, வலது எல்லைகள் மற்றும்

நக்க ஜீன்கள் உள்ளன. தாவர செல்களின் மாற்றமைவுக்கு இப்பிளாஸ்மிடு தேவைப்படுகிறது.

இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியின் கட்டுமானம் (Construction of intermediate vector)

கீழ்க்கண்ட அங்கங்கள் மூலம் இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி கட்டுமானமாக்கப்படுகிறது.

○ pBR322 தொடர்வரிசை, Ti நொதுமோலோகஸ் ஏற்பர் Ti பிளாஸ்மிடில் காணப்படுகிறது.

தாவர மாற்றமைவு குறியீடு (PTM) நியோமைசின் பால்போட்ரேன்ஸ்பிரெஸ்ஸுக்கு (npt II) ஒரு ஜீன் குறியீடுகிறது. தாவர செல்களில் காணாமலின்பு எதிர்ப்புத்திறமை இது ஜீன் அளிப்பதுடன் அதனைத் தனிமைப்படுத்தவும் இது அனுமதிக்கிறது.

பாக்க்டிரியல் எதிர்ப்புத்திற குறியீடு ஸ்பெக்டினோமைசின் எதிர்ப்புத்திறனுக்கு ஜீன் உறியீடுகிறது. ஏற்பர் பாக்க்டிரியல் செல்களுக்கு உரிய ஸ்பெக்டினோமைசின் எதிர்ப்புத்திறமை இது ஜீன் அளிப்பதுடன் இதனைத் தெரிந்து கொண்டு தனிமைப்படுத்துவதற்கு அனுமதிக்கிறது.

பன்மடங்கு போத்து இலக்கான (MCS) இங்கு அயல் ஜீன்கள் செருகு முடியும்.

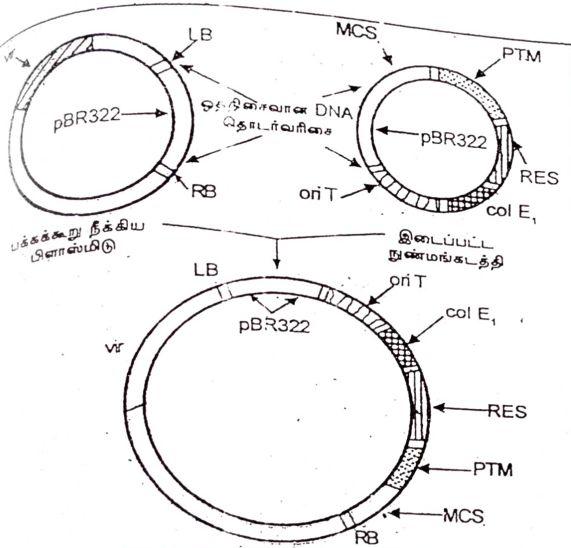
○ இரட்டிப்பின் Co/E, தோற்றம், இ.கோலையிலுள்ள பிளாஸ்மிடு இரட்டிப்பினை அனுமதிப்பதுடன் ஆக்ரோபரக்டிரியத்திலும் அனுமதிப்பதில்லை.

○ இ.கோலையிலிருந்து அக்ரோபாக்க்டிரியத்திற்கு இடைநிலை நுண்மங்கடத்து மாற்றமைவுக்காக இடம்பெயரா இலக்கினைப் (Bam) பொறுத்து OriT தொடர்வரிசை உள்ளது. அக்ரோபாக்க்டிரியத்திற்கு இ.கோலையிலிருந்து இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியின் மாற்றத்திற்கு இது OriT தொடர்வரிசை ஏதுவாகிறது.

கூட்டொருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்திகளின் உற்பத்தியும் பயன்பாடும் இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியின் பன்மடங்கு போத்தாக்க இலக்கில் உள்ள வேண்டப்பட்ட குறியிலக்கு/அந்நிய ஜீன் முதலாவதாக போத்தாக்கப்படுகிறது. போத்துச் செயல்முறையில் இ.கோலை மேற்கொள்ளப்படுகிறது. போத்தாக்கும் பாக்க்டிரியல் திறன்மிக்கதாக உள்ள இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி (intermediate vector) ஆக்ரோபாக்க்டிரியத்துடன் இணைக்கப்படுகிறது. எனவே, அந்நிய ஜீன் ஆக்ரோபாக்க்டிரியத்தில் இடம்பெய்கிறது. ஏற்பர் Ti பிளாஸ்மிடு மற்றும் இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியை மாறியமைந்த ஆக்ரோபாக்க்டிரியச் செல்கள், ஸ்பெக்டினோமைசின் அடங்கிய மிளிமல் ஊடகத்தில் வளர்க்கும் பொழுது, அவை தெரிந்தெடுத்த தனிமைப்படுத்தப்படுகின்றன.

ஆக்ரோபாக்க்டிரியல் வளரும் மிளிமல் ஊடகத்தில் இ.கோலை வளர்வதில்லை என்பதால் தெரிந்தெடுப்பு செயல்முறை எளிதாகிறது.

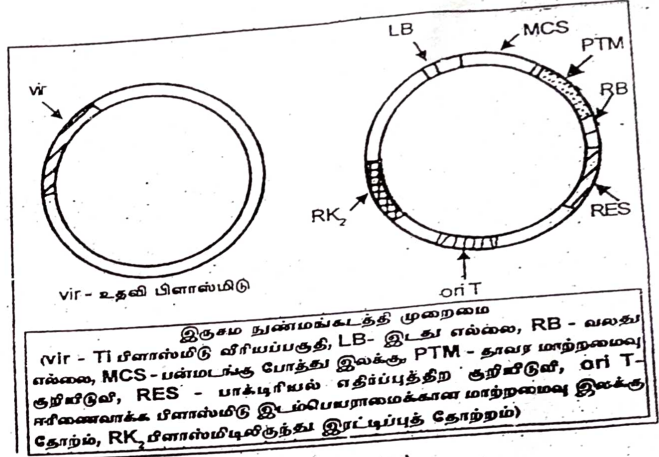
ஆக்ரோபாக்க்டிரியச் செல்களினுள்ளே, இடைநிலை பிளாஸ்மிடு, ஏற்பர் Ti பிளாஸ்மிடிகளுள்ளே ஒருமைப்பாட்டுற கூட்டொருமைப்பாட்டு பிளாஸ்மிடிகளைத் தோற்றுவிக்கிறது. இப்பிளாஸ்மிடில் தாவர மாற்றமைவு



கூட்டு ஒருமைப்பாடு நுண்மங்கடத்தி முறைமை, (vir - Ti பீளாஸ்மிடு வீரியப் பகுதி, pBR322 - பாக்கிரியல் பீளாஸ்மிடு 322; LB- இடது எல்லை, RB - வலது எல்லை MCS - பன்மடங்கு போத்தாக்கும் இலக்கு PTM - தாவர மாற்றமைவு குறியீடு, RES - பாக்கிரியல் எதிர்ப்புத்திற குறியீடு, col E₁ - பீளாஸ்மிடிலிருந்து இரட்டிப்பின் E₁ - தோற்றம், ori T - ஈரிணைவாக்க பீளாஸ்மிடு இடம் பெயராமைக்கான மாற்றமைவு இலக்கு தோற்றம்).

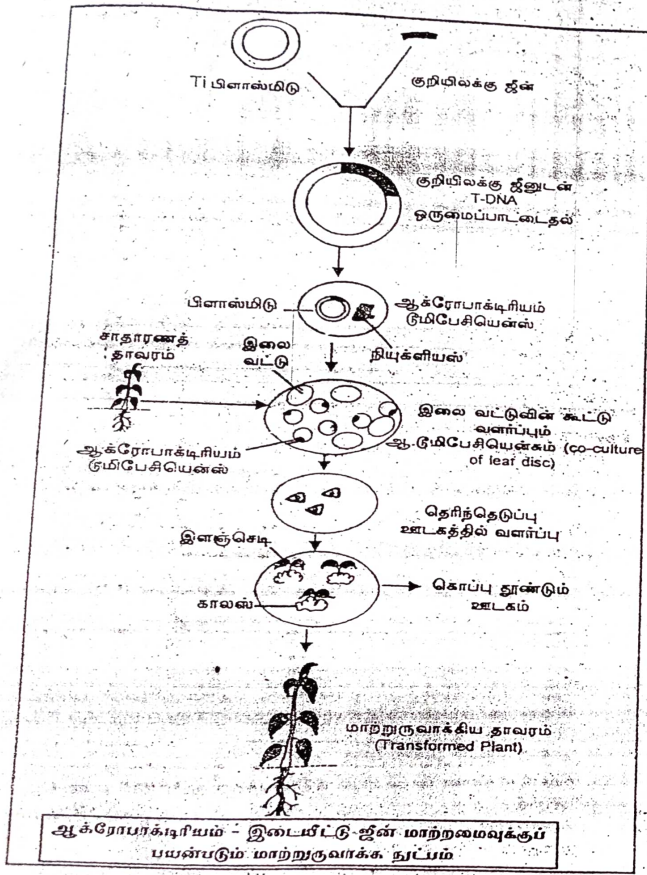
குறியீட்டு ஜீன் (npt II) அடங்கியிருப்பதுடன் T-DNA எல்லைகளுக்கு இடையே போத்தாக்கிய ஜீன் தாவர செயலிற்குள் மாறியமைகிறது. கேனாமசின் உள் ஊடகத்தில் தாவர செல்லும் ஆக்ரோபாக்கிரியல் செல்லும் ஒன்றாகச் சேர்த்து வளர்க்கும் பொழுது மாறியமைக்கப்பட்ட தாவர செல்களைத் தெரிந்தெடுக்க முடியும்.

- கூட்டு ஒருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்தியின் அணுசூலங்கள்
- குறியிலக்கு ஜீன்களை எளிதாகப் போத்தாக்க முடியும்.
 - பல வரையறை இலக்குகளுடன் சற்று சிறியதான பிளாஸ்மிடு உள்ளது.
 - இ.கோலையினுள் செளகரியமாக போத்தாக்கிய இடையிலை பிளாஸ்மிடு ஆக்ரோபாக்கிரியத்தில் மாறியமைந்து கொள்கிறது.



இருசம நுண்மங்கடத்தி முறைமை (vir - Ti பீளாஸ்மிடு வீரியப்பகுதி, LB- இடது எல்லை, RB - வலது எல்லை, MCS - பன்மடங்கு போத்து இலக்கு PTM - தாவர மாற்றமைவு குறியீடு, RES - பாக்கிரியல் எதிர்ப்புத்திற குறியீடு, ori T - ஈரிணைவாக்க பீளாஸ்மிடு இடம்பெயராமைக்கான மாற்றமைவு இலக்கு தோற்றம், RK₂ பீளாஸ்மிடிலிருந்து இரட்டிப்புத் தோற்றம்)

- 2) இருசம நுண்மங்கடத்தி (Binary vector)
- இருசம நுண்மங்கடத்தி முறைமை என்பது விரி உதவரி (vir helper) பிளாஸ்மிடு என அழைக்கப்படும் வலிமை குறைக்கப்பட்ட Ti பிளாஸ்மிடுடன் கூடிய ஒரு ஆக்ரோபாக்கிரியல் உள் ஊடகப்பட்டுள்ளது. விரி உதவரி பிளாஸ்மிடு என்பது விரி ஜீன் அப்படியே இருக்கும் பொழுது எல்லைகள் நீங்கிய முழுமைப்பாடான T-DNA பகுதி ஆகும். இவை இரண்டும் இயற்பொருளாக இணையாமல் இருப்பது குறிப்பிடத்தக்கது. இ.கோலையிலும் ஆக்ரோபாக்கிரியத்திலும் இரட்டிப்பு அடைய முடியும்.
- இருசம நுண்மங்கடத்தி முறை, வரைபடம் மூலம் விளக்கப்பட்டுள்ளது. இருசம நுண்மங்கடத்து முறையில் கீழ்க்கண்ட அங்கங்கள் (components) உள்ளன.
1. இடது மற்றும் வலது எல்லைகள் T-DNA பகுதியை வரம்பிற்கு உட்படுத்துகின்றன.
 2. npt II - Guான்ற தாவர மாற்றுருவாக்க குறியீடு, (marker) (PTM) தாவரமாற்றமைவுற்ற செல்களில் கானாமசின் எதிர்ப்புத்திறனை அளிக்கிறது.
 3. குறியிலக்கு / அயல் ஜீன்கள் புகுத்துவதற்கான பன்மடங்கு போத்து இலக்கு (multiple cloning).
 4. இ.கோலை, ஆக்ரோபாக்கிரியத்தினுள்ளே இருசம நுண்மங்கடத்து கூட்டமைவுகளுக்கான பாக்கிரியல் எதிர்ப்புத்திற குறியீடு, எ.கா. டெட்ராசைக்ளின் ஜீன்.
 5. இ.கோலை மற்றும் ஆக்ரோபாக்கிரியத்திலிருந்து இருசம நுண்மங்கடத்தியின் ஈரிணைவு இடம் பெயராமைக்கான Ori T தொடர்வரிசை.



6. RK₂ போன்ற இரட்டிப்பின் ஒம்புயிர் அகற்ற எல்லை தோற்றம் ஆக்ரோபாக்டிரியத்தில் இருசம நுண்மங்கடத்தியின் இரட்டிப்பை அனுமதிக்கிறது.

இருசம நுண்மங்கடத்தியின் உற்பத்தியும் பயன்பாடும் அக்கறைகொண்ட குறியிலக்கு/அயம் ஜீன்களை இருசம நுண்மங்கடத்தியின் பன்மடங்கு போத்தாக்கும் இலக்கில் செருகப்படுகிறது. இவ்வழியே, இடது மற்றும் வலது எல்லைகளுக்கு இடையே இந்த ஜீன்களை வைத்து இ.கோலை பாக்கிரியத்தில் திரும்பத்திரும்ப நிகழ்த்தி போத்தாக்கப்படுகிறது. இணைப்பு செயல்முறை மூலம் இ.கோலை பாக்கிரியத்திலிருந்து ஆக்ரோபாக்டிரியத்திற்கு இருசம நுண்மங்கடத்தி இடம்பெயர்கிறது. இப்பொழுது, T-DNAயின் நச்சு ஜீன் புரதங்கள், பிளாஸ்மிடு செல்களுக்குள் நுண்மங்கடத்தியின் T-DNA மாறியமைய எளிதாக்குகின்றன.

இருசம நுண்மங்கடத்திகளின் அனுசலங்கள்
இருசம நுண்மங்கடத்தி முறையையில் இருசம பிளாஸ்மிட்களை ஆக்ரோபாக்டிரியத்திற்கு மாற்றுவதில் மட்டும் பங்குகாற்றுகிறது. இது கூட்டொருமைப்பாட்டு நுண்மங்கடத்தி முறைக்கு எதிரிடையாக உள்ளது. இங்கு வலிமை குறைந்த Ti பிளாஸ்மிடுடன் இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி மாற்றமடைந்து ஒருமைப்பாடு அடைகிறது.

கூட்டொருமைப்பாடு நுண்மங்கடத்திகளைக் காட்டிலும் இருசம நுண்மங்கடத்திகள் அடிக்கடிப் பயன்படுகின்றன. எனவே இது சௌகரியமானதாக உள்ளது.

ஆக்ரோபாக்டிரியத்தைப் பயன்படுத்தி தாவர மாற்றமைவு நுட்பம் (Plant transformation technique using agrobacterium)

தாவர உற்பத்திக்கும் மரபணு மாற்றத் தாவர உற்பத்திக்கும் ஆக்ரோபாக்டிரியம் இடையீட்டு நுட்பம் மிகவும் பரவலாகப் பயன்பட்டுவருகிறது. ஆக்ரோபாக்டிரியம் இடையீடு மூலம் உயர்நிலைத் தாவரங்களில் ஜீன் மாற்றத்திற்கான முக்கியத் தேவைப்பாடுகள் பட்டியலிடப்பட்டுள்ளன. நச்சு ஜீன் செயல்பாட்டிற்கான தாவரத்தின் துண்டு (explant) பிளாஸ்டிக் கூட்டுப் பொருளை உற்பத்தி செய்கிறது. எ.கா. ஆட்டோலிங்கான். முழுத்தாலரமாக தழைப்பிக்க, மாற்றமுற்ற செல்கள் திறல் பெற்றதாக இருக்க வேண்டும்.

பொதுவாக, பெரும்பாலான ஆக்ரோபாக்டிரியம் இடையீட்டு தாவர மாற்றுவாக்கிகள் கீழ்க்கண்ட அடிப்படை முன்னேற்பாட்டினைப் பெற்றிருக்க வேண்டும்.

- 1) வேண்டப்பட்ட ஜீனுடன் இருசம நுண்மங்கடத்தி அவ்வது கூட்டொருமைப்பாட்டினை கமக்கும் ஆக்ரோபாக்டிரியத்தின் மேம்பாடு.
- 2) பொருத்தமான தாவரத்துணுக்கினைக் கண்டறிதல் எ.கா. செல்கள், காலங்கள், உறுப்புகள்.
- 3) ஆக்ரோபாக்டிரியத்துடன் தாவரத்துணுக்குகளின் கூட்டுவளர்ப்பு.
- 4) தாவரத்திசுக்கு தீங்கு ஏற்படாமல் தகுதிவாய்ந்த எதிர்பொருட்களுடன் ஆக்ரோபாக்டிரியத்தைக் கொல்லுதல்.
- 5) மாற்றுவருவமுற்ற தாவர செல்களைத் தேர்வு செய்தல்.
- 6) முழுமைப்பாடான தாவரத்தை திரும்பவும் வளர்த்தல்.

ஆக்ரோபாக்டிரிய இடைமீட்டு மாற்றுவாக்கிக்குத் தினுசலங்கள்

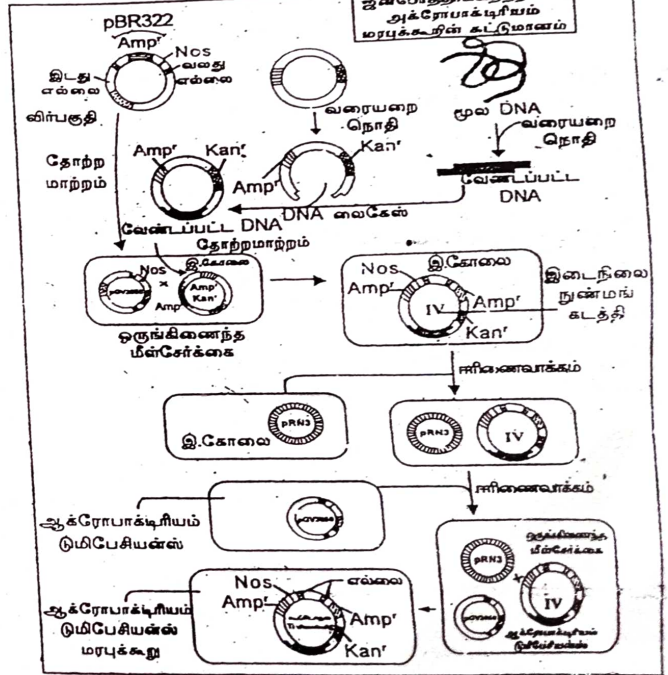
1. ஜீன் மாற்றத்திற்கான ஒரு இயற்கை முறையாக இது கருதப்படுகிறது.

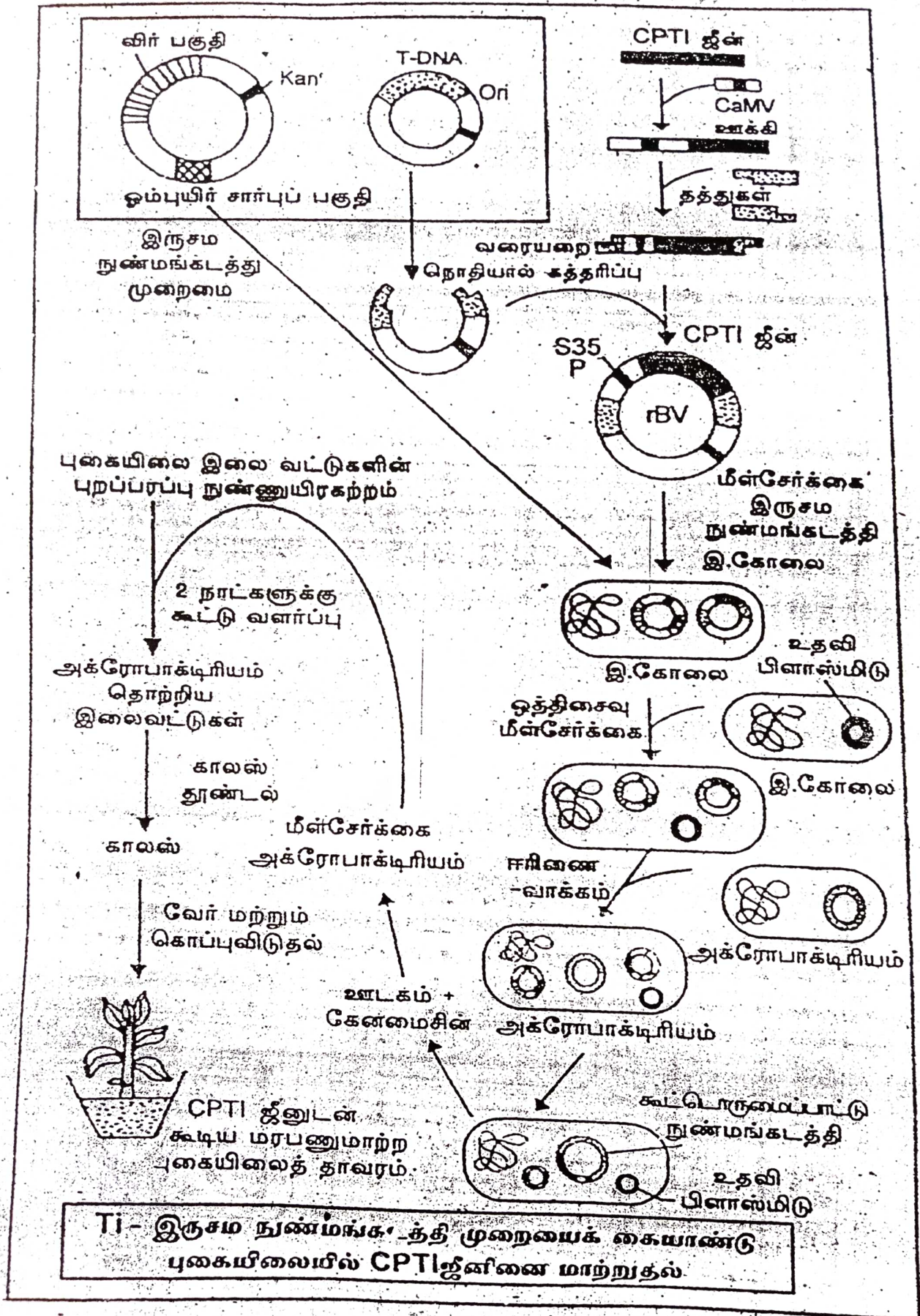
2. எந்தவொரு செவ்விக/உறுப்பு என்ற தாவரத் திணுக்குகளையும் அக்ரோபாக்டீரியம் இடரின்றி தொழில் கொள்ள முடியும்.
 3. DNAயின் பெருங்கண்டலாக இருந்தால்கூட அக்கண்டத்தை திறமாக மாற்றியமைக்க முடியும்.
 4. DNA மாற்றமைவின் நிலைத்தன்மை நன்றாக இருக்கும்.
 5. மாற்றமைவுற்ற தாவரங்களை விளைபயன் மிக்கதாக வளர்க்க முடியும்.
 அக்ரோபாக்டீரியத்திற்கென ஒம்புயிர் தாவரங்களின் வரம்பு உள்ளது. தாவிய வகை சார்ந்த ஒருவித்திலைத் தாவரங்களை அக்ரோபாக்டீரியம் தொற்றுவுதலில்லை மிகவும் விளை பயன்மிக்கதாக வளரும் செல்கள் மாற்றுருவாக்கத்திற்கு உடனாக உள்ளன. எ.கா. ஆழ்ந்த அடுக்குகளில் அமைந்த கரு செல்கள். இச்செல்கள் அக்ரோபாக்டீரியத்திற்கு எளிதான இலக்கு அல்ல. கவனம் தீக்கிய பீனாஸ்மிடு மூலம் மரபு பொறிப்பீயம் (Genetic Engineering through disarmed Ti plasmids) பொதுவாக அக்ரோபாக்டீரியம் ஓம்பெசியன்ஸ் மூலம் உயர்நிலைத் தாவரங்களில் ஜீன் கையாளுகா என்பது மிக எளிதான காரியம் அம்ம. பெரிதாக இருப்பதுடன் இது அந்நிய DNA செருகளுக்கு ஒரு தனிப்பட்ட வரையறை விளக்கத்தினைக் கண்டறிவதற்கு கடினமாக உள்ளது. அக்ரோபாக்டீரியம் இடையீட்டு ஜீன் மாற்றம் மூன்று தெளிவான நிலைகளை உள்ளடக்குகிறது.

- 1) மீன்சேர்க்கை Ti பிளாஸ்மிடுடன் அக்ரோபாக்டீரியத்தின் கட்டுமானம்.
- 2) அக்ரோபாக்டீரியத்தின் கட்டுவளர்ப்பும் மாறியமைக்கப்படும் தாவரத்திக்கடனும்.
- 3) அக்ரோபாக்டீரியம் தாவரத்திக்கடனிலிருந்து இளஞ்செடிகளின் உற்பத்தி. அக்ரோபாக்டீரியம் மரபுக்கூறின் கட்டுமானம்

இம்மரபுக்கூறு மீன்சேர்க்கை கவசநீக்கிய Ti பிளாஸ்மிடுவை கொண்டுள்ளது. இது கீழ்க்கண்ட வழிகளில் கட்டுமானம் ஆக்கப்படுகிறது.
 1) தொப்பாளின் Ti-பிளாஸ்மிடு, pTi C58, pBR322 ஆகியவற்றிலிருந்து கவசம் தீக்கிய Ti-பிளாஸ்மிடு pGV3850 கட்டுமானம் செய்யப்படுகிறது. பின்பு, இது மாற்றுருவாக்கம் மூலம் இ.கோவை பாக்டீரியத்தினால் செலுத்தப்படுகிறது. 2) அந்நிய ஜீன் (DNA) ஒரு தாவரத்தினால்தான் போத்தாக்கப்பட்டு அது மூல உயிரினத்திலிருந்து தனிமைப்படுத்தப்படுகிறது. இதற்காக வரையறை தொதி பயன்படுத்தப்படுகிறது. இதே தொதியைக் கையாண்டு pBR322 பிளாஸ்மிடு இளக்கப்பட்டு அது அந்நிய DNA செருகப்படுகிறது. இவ்வினைக்கு வகைகள் என்ற தொதி உதவுகிறது. இதன் விளைவாக மீன்சேர்க்கை pBR322 பிளாஸ்மிடு உருவாகிறது.
 3) இந்த மீன்சேர்க்கை pBR322 பிளாஸ்மிடு, pGV3850யைக் கொண்டுள்ள இ.கோவை பாக்டீரியத்தினால்தான் செலுத்தப்படுகிறது. இவ்விரு பிளாஸ்மிடுகளும் இ.கோவையின் ஒத்திசைவான மீன்சேர்க்கைக்கு உள்ளாவதால் ஒரு இடைநிலைப்பட்ட நுண்மங்கடத்தி IV தோன்றுகிறது.
 4) இ.கோவையின் உள்ள இந்த இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி.

சரிணைவாக்கம் மூலம் அக்ரோபாக்டீரியம் ஓம்பெசியனுக்கு மாற்றப்படுகிறது. 5) இந்த இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி தானாகவே அக்ரோபாக்டீரியத்தினால் கடக்க முடிவதில்லை. இதற்குக் காரணம், சரிணைவாக்கப் பற்றாக்குறை ஆகும். இதற்கு உதவி பிளாஸ்மிடு தேவைப்படுகிறது. இந்த பிளாஸ்மிடு அக்ரோபாக்டீரியத்திற்கு இ.கோவையிலிருந்து இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியை இடம் பெயர வைக்கிறது. pRK2013 மற்றும் pRN3 ஆகியன உதவி பிளாஸ்மிடுகள் ஆகும். இடைநிலை நுண்மங்கடத்தியைக் கொண்ட இ.கோவையும் pRN3யைக் கொண்ட இ.கோவையும் ஒன்றாகச் சேர்த்து வளர்க்கப்படுகின்றன. இவ்வகையின் பொழுது, இ.கோவையின் இரு மரபுக்கூறுகளுக்கு இடையே சரிணைவாக்க வழி மூலம் IVகை கொண்டுள்ள இ.கோவையின் pRN3 நுழைகிறது.





TI - இருசம நுண்மங்கடத்தி முறையைக் கையாண்டு புகையிலையில் CPTI ஜீனின் மாற்றுதல்.

பின்பு, இ.கோலை வளரியுடன் அக்ரோபாக்டிரியம் வளரி சேர்க்கப்படுகிறது. இப்பொழுது IV-அடங்கிய இ.கோலை மரபுக்கூறுவும் pRN3ம் அக்ரோபாக்டிரியத்துடன் ஈரிணைவடைகின்றன. ஈரிணைவாக்கத்தின்பொழுது, IV மற்றும் pRN3 இந்த அக்ரோபாக்டிரியத்திற்கு மாற்றம் அடைகின்றன. pRN3 இரண்டும் அக்ரோபாக்டிரியத்தினுள்ளே இரட்டிப்பு அடையமுடிவதில்லை. என்பது இதனுள்ளே இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி IV இரட்டிப்பு அடைகிறது. 5) அக்ரோபாக்டிரியம் டுமிபேசியன்ஸ்ஸின் உள்ளே, இடைநிலை நுண்மங்கடத்தி pGV3850 என்ற செல்லுலர் பிளாஸ்மிடுடன் ஒருமைப்பாடுற்று, கூட்டுடொருமைப்பாடு (co-integrate) என அழைக்கப்படும். ஒரு பெரும் பிளாஸ்மிடுவை தருகிறது. இதன் காரணமாக தாவர மரபக கையாளுகைக்கு அக்ரோபாக்டிரியம் மரபுக்கூறு பயன்படுத்தப்படுகிறது.

தட்டைப்பயறு (காராமணி) ட்ரிப்ஸின் தடுப்பனத்தூடன் மரபணுமாற்றத்தாவரங்கள்

(Trangenic plants with Cowpea Trypsin Inhibitor)

தானியக்களஞ்சியங்களில் சேமிக்கப்படும் தட்டைப்பயறுகள் மிகு வளவில் நோய்எதிர்ப்புத்திறன் கொண்டிருப்பதை அறிவோம். இதற்குக்காரணம், இப்பயறில் ட்ரிப்ஸின் எனும் தடுப்பனம் (CPTI) இருப்பதாகும். ட்ரிப்ஸின் என்பது ஒரு வகைப்புரதம். T1 பிளாஸ்மிடிலிருந்து தயாரிக்கப்பட்ட ஒரு இருசம நுண்மங்கடத்தி முறை மூலம். புகையிலைத் தாவரத்திற்கு இந்தப் பயிரில் உள்ள CPTIஜீன் மாற்றியமைக்கப்படுகிறது. இதனால், தோற்றுவிக்கப்பட்ட மரபணுமாற்றப்புகையிலை மொட்டுப்புழுவையும் உள்ளடக்கிய பல தீங்குயிர் பூச்சிகளுக்கு எதிர்ப்புத்திறன் பெற்றத் தாவரமாக உருவெடுக்கிறது. இந்த ஜீன் ஒரு மில்லிகிராம் CPTIயின் 2µg (மைக்ரோகிராம்) ட்ரிப்ஸினை உற்பத்தி செய்கிறது. தீங்குயிர் பூச்சிகளுக்கு இந்த அளவு நச்சாக இருந்தாலும் மானூட மற்றும் விலங்கினங்களுக்கு இந்த அளவு, நச்சற்றதாக உள்ளது.