الوحدة الثانية، الفصل الثالث:

الهندسة الوراثية: مبادئها وتقنياتها

تمهيد:

تمكن علماء الوراثة منذ السبعينات من نقل وتوظيف مورثات متنوعة ضمن خلايا أخرى أجنبية، الشيء الذي يعطي خلايا هجينة لم تكن موجودة من قبل في الطبيعة. بعد ذلك تم الانتقال من التجارب المخبرية إلى المجال الصناعي، حيث تأسست صناعة حقيقية تعتمد على التغيير الوراثي للخلايا الحية بواسطة نقل المورثات. تسمى التقنيات المعتمدة في هذا التغيير الوراثي بالهندسة الوراثية.

- **ما المقصود بالهندسة الوراثية، وما هي مبادئها؟**
- **ما هي التقنيات التي تعتمد عليها الهندسة الوراثية؟**
- **ما هي مجالات تطبيق الهندسة الوراثية؟**

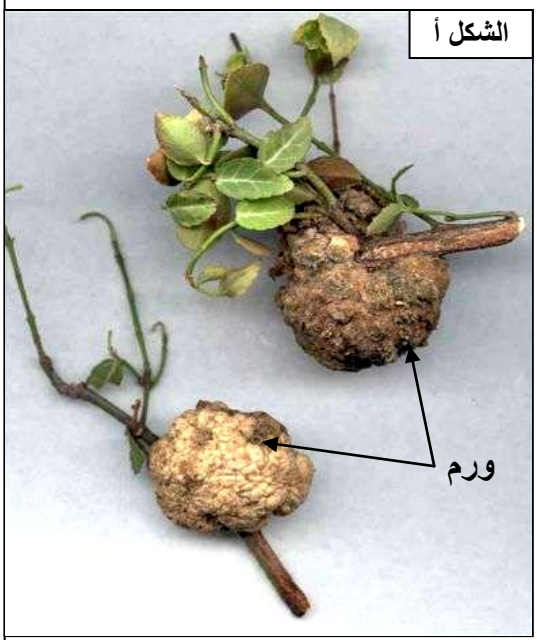
I – مفهوم التغيير الوراثي ؟

① الانتقال الطبيعي لمورثات البكتيريا At إلى نبات:

أ – معطيات تجريبية : أنظر الوثيقة 1.

الوثيقة 1: مفهوم التغيير الوراثي:

مرض جرب السنخ La galle du collet، هو عبارة عن ورم سرطاني ضخم يظهر عند بعض النباتات على مستوى السنخ، وهي منطقة التقاء الساق والجذر (الشكل أ)، ونظرا لأثره الحاسم على الاقتصاد فقد كان موضوع عدة أبحاث وتجارب.



★ التجربة الأولى: (E.Smith et C.Townsend en 1907)

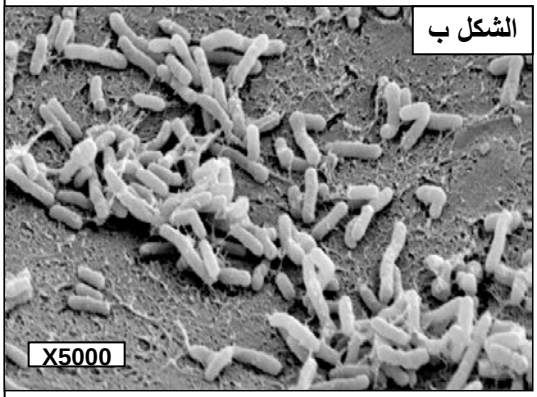
عزل الباحثان من ورم سرطاني في جذر نبات بكتيريا تدعى At = Agrobacterium tumefaciens (الشكل ب). وبعد ذلك تم زرع هذه البكتريا في فتحة حديثة (أقل من يومين) أنجزت على نبات سليم، فلوحظ ظهور الورم السرطاني في النبتة.

1) ماذا يمكنك استنتاجه من معطيات هذه التجربة؟

★ التجربة الثانية: (A.Braun 1972).

لقد استطاع هذا الباحث أن يزرع نسيج جرب السنخ لا يحتوي على بكتيريا في وسط معين بدقة، يتكون فقط من السكروز وأملاح معدنية. فلاحظ أن خلايا النسيج تتكاثر بصورة فوضوية عكس الخلايا العادية التي تتكاثر ببطء متطلبة وجود الهرمونات النباتية.

2) ما التغيير الذي حدث لخلايا السنخ بوجود البكتيريا A.t؟
3) ما الفرضية التي يمكنك إعطاؤها حول التغيير الذي أصاب سلوك الخلايا النباتية؟



★ اكتشفت مجموعة من الباحثين وجود نمطين من بكتيريات At: (A وB) وهذان النمطان يسببان المرض (يؤديان إلى تكون ورم). حيث يؤدي النمط A إلى تكون ورم تركب خلاياه النوبالين Nopaline بينما يؤدي النمط B إلى تكون ورم تركب خلاياه الأكتوبين Octopine (النوبالين والأكتوبين عبارة عن مشتقات من مستقلبات مشتركة تتكون في معظمها من أحماض أمينية وأحماض سيتونية مختلفة أو سكريات).

4) ما مكمل الفرضية الذي يمكنك إعطاؤه حول التغيير الذي أصاب سلوك هذه الخلايا؟

★ التجربة الثالثة:

تمكن باحثون من عزل البكتيريا At وبعد دراسة مكوناتها وجدوا ADN حلقية تدعى البلاسميد Ti. نزرع في درجة حرارة 37°C أصل ذرية لبكتيريا At من النمط A حساسة للحرارة، فنحصل على أصل ذرية A_1. يبين الشكل ج بقية التجربة.

5) فسر النتائج المحصل عليها.

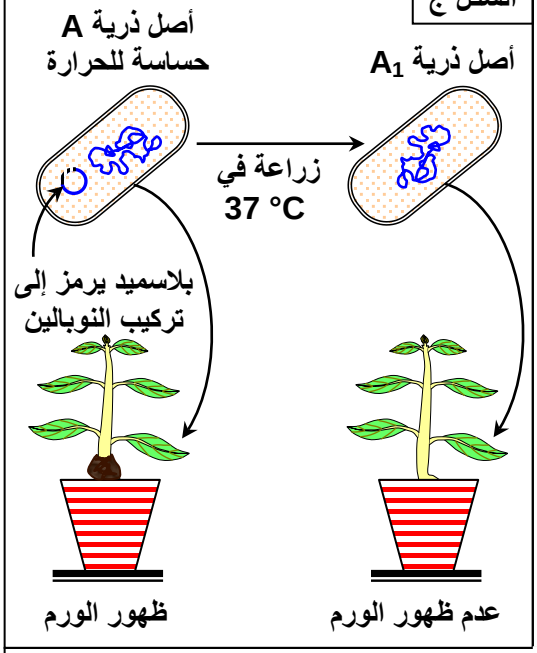
★ التجربة الرابعة:

لتوضيح دور البلاسميد (حلقة صغيرة من ADN تحمل مورثات إضافية)، ننجز التجربة التالية:

ندخل في نبات سليم بكتيريات A_1 لا تسبب المرض ومقاومة للمضادات الحيوية، وبكتيريات B مسببة للمرض وحساسة للمضادات الحيوية، فيتكون ورم (أنظر الجزء ① من الشكل د).

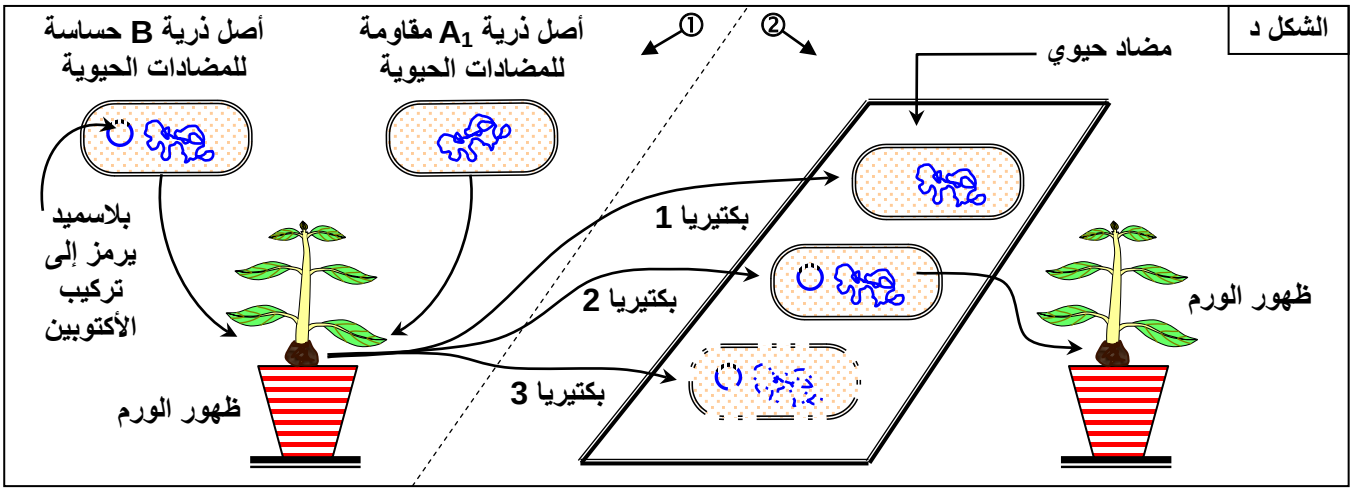
6) ما التفسير الذي تقترحه بالنسبة لنتيجة هذه التجربة؟

الشكل ج



نسحق الورم ونبسطه فوق وسط زرع يحتوي على مضادات حيوية. نتائج هذه التجربة ممثلة على الجزء ② من الشكل د.

الشكل د



7) تعرف على البكتيريات 1 و 2 و 3 المحصل عليها.

8) هل يمكنك تحديد دور البلاسميد؟

9) انطلاقا من نتائج التجارب السابقة وباعتمادك على الوثيقة 2، اشرح كيفية تكون الورم في مستوى السنخ عند النبات.

ب – تحليل المعطيات التجريبية :

1) نستنتج من معطيات هذه التجربة أن البكتيريا Agrobacterium tumefaciens هي المسؤولة عن ظهور الورم السرطاني عند النباتات السليمة.

2) التغيرات التي تطرأ على خلايا السنخ بواسطة البكتيريا At هي التكاثر العشوائي والسريع غير المنتظم لخلايا النبتة دونما حاجة إلى الهرمونات النباتية المسؤولة أصلا عن نمو خلايا السنخ.

3) الفرضية: نقلت الباكتيريا At إلى الخلايا النباتية مادة ما أدت إلى تغيير على مستوى الخبر الوراثي وبالتالي اكتساب الخلايا النباتية صفة التكاثر العشوائي.

4) ربما أن التغير في جينوم الخلايا النباتية ناتج عن إدخال مورثات بكتيرية إلى الخلايا النباتية، هذه المورثات هي التي تتحكم في تركيب النوبالين والأكتوبين.

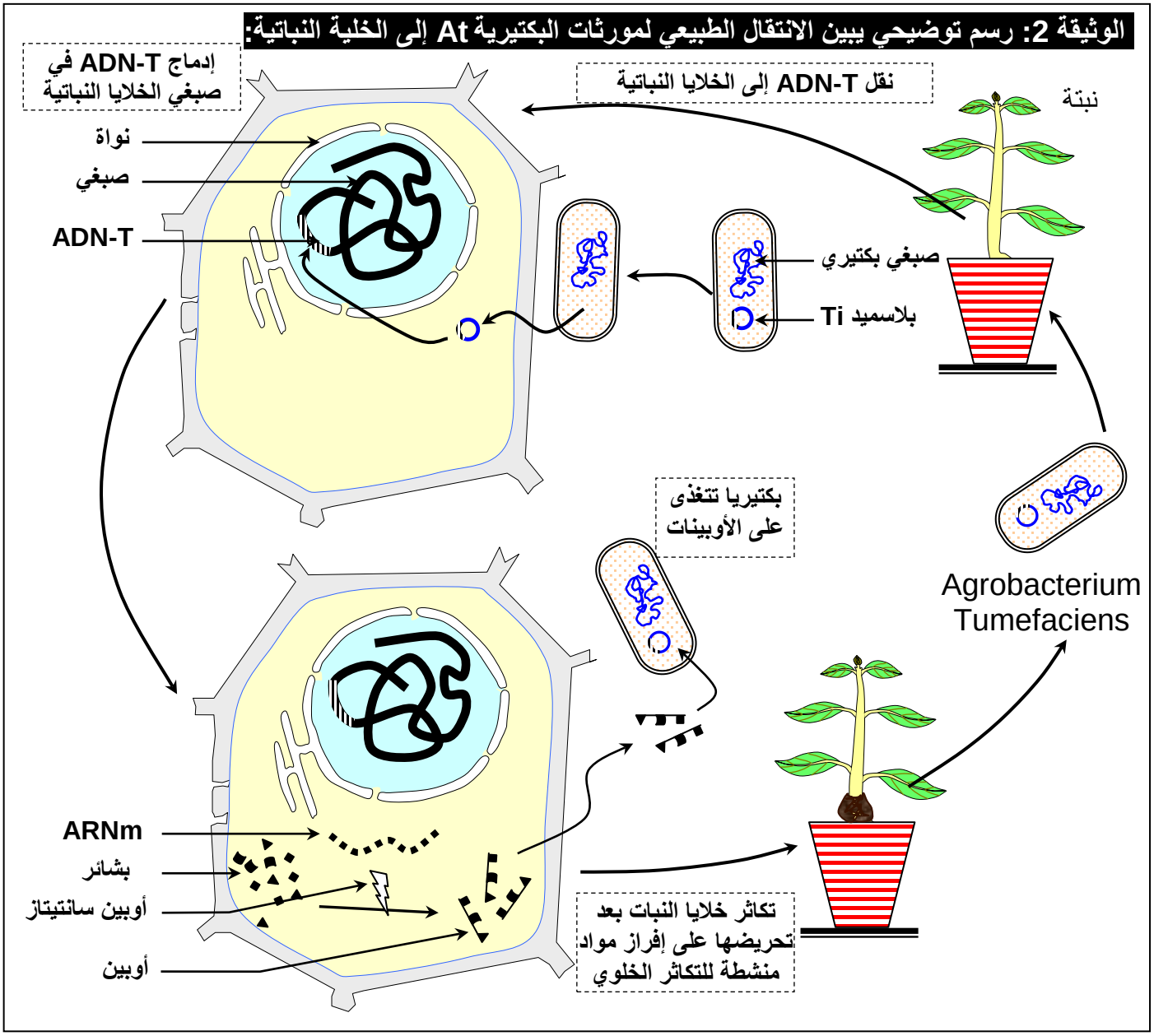
5) نلاحظ أنه تحت تأثير الحرارة، يتم تفكيك البلاسميد المسؤول عن تركيب النوبالين، وينتج عن هذا التفكك عدم إصابة النبتة بالورم، فالبلاسميد ادن هو المسؤول عن القدرة الممرضة للبكتيريا.

6) إن البكتيريا A1 فقدت قدرتها الممرضة لغياب البلاسميد. لذا يمكن تصور أن البكتيريا B المتوفرة على البلاسميد المسؤول عن تركيب الأكتوبين هي التي تؤدي إلى ظهور الورم عند النبتة.

7) البكتيريا 1 غير ممرضة ومقاومة للمضادات الحيوية، ادن هي البكتيريا A1.
البكتيريا 2 تحتوي على بلاسميد ومقاومة للمضادات، ادن هي نمط هجين يحمل صفات A1 و B.
البكتيريا 3 هي حساسة للمضادات الحيوية، ادن هي بكتيريا B.

8) لقد ظهرت بكتيريا جديدة تشبه A1 وتملك بلاسميد البكتيريا B، وتحدث المرض، نستنتج من هذا أن البلاسميد يستطيع الانتقال من خلية بكتيرية إلى أخرى محدثا تغيرا في الصفات، ومن هذا فان البلاسميد مسؤول عن تغيير الخبر الوراثي.

الوثيقة 2: رسم توضيحي يبين الانتقال الطبيعي لمورثات البكتيرية At إلى الخلية النباتية:



9) يظهر جرب السنخ على مراحل هي:

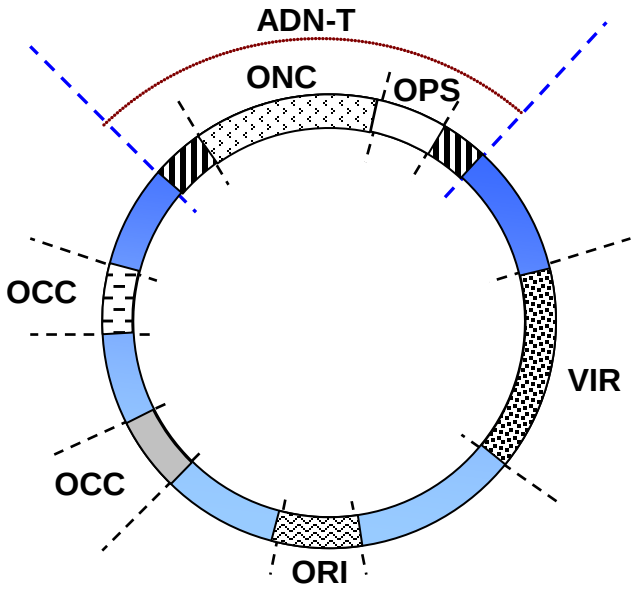
✓ المرحلة الأولى: تنفذ البكتيريا في جرح يكون قريبا من سنخ النبات، فتقوم بحقن بلاسميدها Ti (نسبة إلى Tumor Inducing أي محرض للورم) في الخلية النباتية. هذا البلاسميد يحتوي على قطعة من ADN تدعى ADN-T (نسبة إلى Transferred ADN).

- ✓ المرحلة الثانية: تدمج المورثات ADN-T ضمن ADN الخلية النباتية العائلة، لتدخل تلك القطعة ضمن ذخيرتها الوراثية.
- ✓ المرحلة الثالثة: تستنسخ ARNm من مورثات ADN-T، وتترجم إلى بروتين في سيتوبلازم الخلية النباتية. هذا البروتين هو أنزيم أوبين سانتيتاز الذي يحفز تفاعل تركيب الأوبين من طرف الخلية.
- ✓ المرحلة الرابعة: يؤدي الأوبين المركب إلى تكاثر الخلايا النباتية بإيقاع مرتفع، مما ينتج عنه ورم. كما أن الأوبين المفرز خارج الخلية يؤدي إلى تكاثر البكتيريا At.

② خلاصة:

إن جرب السنخ ناتج عن تغير وراثي لخلايا النبتة. هاته الصفة أصبحت وراثية، ويعتبر بلاسميد البكتيريا عامل نقل المورثة من البكتيريا إلى الخلية النباتية. ولقد مكنت دراسة هذه الظاهرة من وضع الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At. أنظر الوثيقة 3.

الوثيقة 3: الخريطة الوراثية للبلاسميد Ti عند البكتيريا At.



يرمز لهذا البلاسميد بـ Ti، نسبة لـ Tumor inducing أي محرض للورم.

- ADN-T = Transferred ADN الجزء الذي ينتقل إلى الخلايا النباتية ويندمج مع ذخيرتها الوراثية. ويرمز للمورثات المسؤولة عن تركيب الأوبينات (OPS)، والمسؤولة عن التكاثر العشوائي (ONC).
- الوظيفة VIR مسؤولة عن إدماج ADN-T في المادة الوراثية للخلية النباتية.
- الوظيفة OCC مسؤولة عن هدم الأوبينات المحررة من طرف النبتة.
- الوظيفة ORI مسؤولة عن النسخ الذي يمكن البلاسميد من التكاثر.

II – آليات الهندسة الوراثية.

① الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية: أنظر الوثيقة 4

أ – بكتيريا Escherichia coli, :.

الوثيقة 4: الوسائل المستعملة في الهندسة الوراثية:

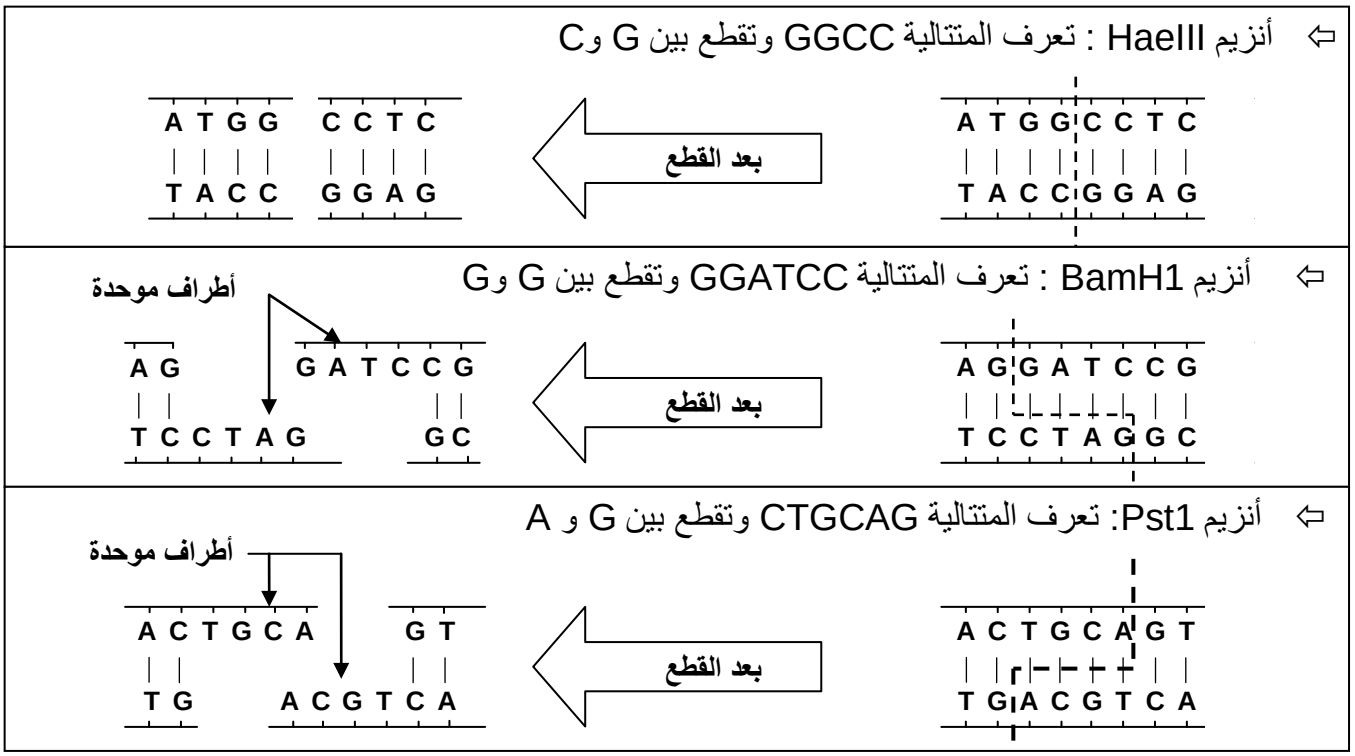
★ أهمية اختيار بكتيريا Escherichia coli في الهندسة الوراثية:

تعتبر العصية الكولونية La Colibacille E.coli، الكائن المفضل عند العلماء المهتمين بميدان الهندسة الوراثية وذلك لعدة اعتبارات، أهمها القدرة الكبيرة لهذا الكائن على التكاثر (تنقسم في الظروف المثلى كل 20 دقيقة)، وكذلك لتوفره بالإضافة للصبغي الأساسي على عدة بلاسميدات يمكن استغلالها كناقلات للمورثات، كما أن سيتوبلازم هذه البكتيريا غني بالجسيمات الريبية (الريبوزومات) والعناصر الضرورية لتركيب البروتينات.

ب – أنزيمات الفصل وأنزيمات الربط :

a - أنزيمات الفصل les enzymes de restriction

★ أنزيمات الفصل وأنزيمات الربط Les enzymes de restriction et les Ligases
في سنة 1965 اكتشف W.arber أن البكتيريات المعفنة بالحمات تستطيع مقاومة هذه الطفيليات بتقطيع ADN الحمة إلى أجزاء صغيرة بفضل أنزيمات نوعية تقطع ADN في مواقع محددة بدقة. بعد ذلك استخلصت مئات الأنواع من هذه الأنزيمات كل واحد يحمل اسم النوع البكتيري الذي استخلص منه متبوع بالرقم الترتيبي لاكتشافه.



أنزيمات الفصل هي أنزيمات نوعية قادرة على التعرف في مستوى جزيئة ADN على تسلسلات دقيقة من القواعد الازوتية، وقطع الجزيئة على مستواها. ويحمل كل أنزيم فصل اسم النوع البكتيري الذي استخلص منه.

b - أنزيمات الربط Les ligases

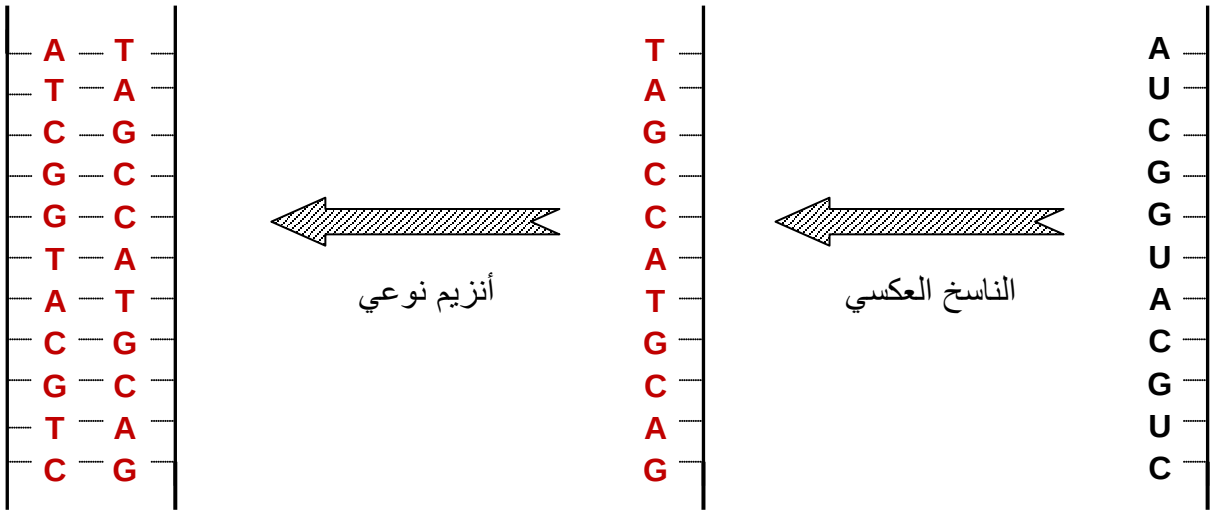
هي أنزيمات نوعية قادرة على ربط أجزاء ADN مقطوعة (بواسطة أنزيمات الفصل)، وذلك بربط الأطراف الموحدة مع بعضها حسب مبدأ تكاملية القواعد الازوتية.

ج – الناسخ العكسي :

★ الناسخ العكسي Transcriptase inverse:

تمكن باحثون من عزل أنزيم عند الحمات قادرة على تركيب جزيئة ADN انطلاقا من جزيئة ARNm، وأطلقوا عليها اسم الناسخ العكسي. وهكذا أصبح بالإمكان تركيب المورثة التي ترمز لبروتين معين انطلاقا من ARNm الذي يرمز له.

انطلاقا من جزيئة ARNm التالية، حدد خيط ADN المنفرد الناتج عن النسخ العكسي، ثم حدد جزيئة ADN المزدوجة والتي تمثل المورثة المرغوبة.

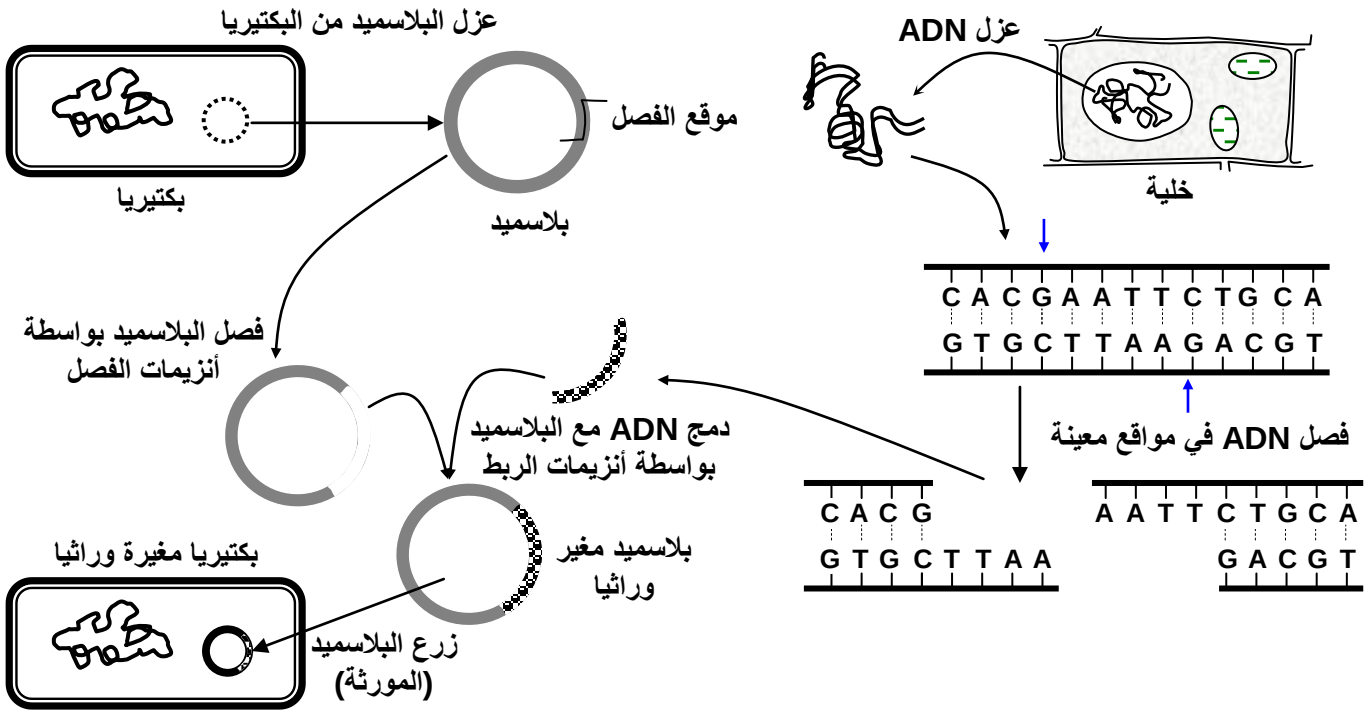


② مراحل عزل ونقل مورثة من خلية إلى بكتيريا : أنظر الوثيقة 4.

الوثيقة 5: مراحل عزل ونقل مورثة من خلية إلى بكتيريا Echérichia-Coli.

بعد عزل المورثة المراد استغلالها، يتم دمجها ضمن الذخيرة الوراثية لكائن حي آخر، سيعمل على ترجمة هذه المورثة إلى بروتينات مرغوبة.
هناك طرق عديدة لدمج المورثة في الذخيرة الوراثية لكائن حي آخر (بكتيريا مثلا)، أهمها الدمج عن طريق بلاسميد يسمى البلاسميد الناقل. توضح الوثيقة التالية، مراحل دمج مورثة معينة في الذخيرة الوراثية لبكتيريا.

صف كيفية عزل ودمج مورثة مرغوبة في الذخيرة الوراثية لبكتيريا.



يتطلب نقل مورثة إلى بكتيريا معينة المرور من المراحل التالية:

أ – عزل المورثة (جزء من ADN).

بعد تحديد الصفة المرغوبة، يتم عزل المورثة التي ترمز لها، وذلك بطريقتين:

- عزل ADN الخلية التي تحتوي على المورثة المراد نقلها، ثم يتم تقطيع جزيئة ADN بواسطة أنزيمات الفصل.
- استخلاص ARNm من الخلية التي تحتوي على المورثة المراد نقلها، وبواسطة الناسخ العكسي يتم تركيب ADNc (Complémentaire) الذي يكون حاملا للمورثة المرغوبة، ثم تضاف لـ ADNc أطراف موحدة.

ب – إدماج المورثة داخل متعضي ناقل.

نستخرج من خلية E.coli ناقل معزول (= بلاسميد). يتم قطع البلاسميد بواسطة أنزيم الفصل. ثم يتم ربط ADN البلاسميد بالجزء من ADN المراد نقله بواسطة أنزيم الربط. فنحصل بذلك على بلاسميد مغير يتم إدخاله داخل متعضي ناقل (خلية E.coli).

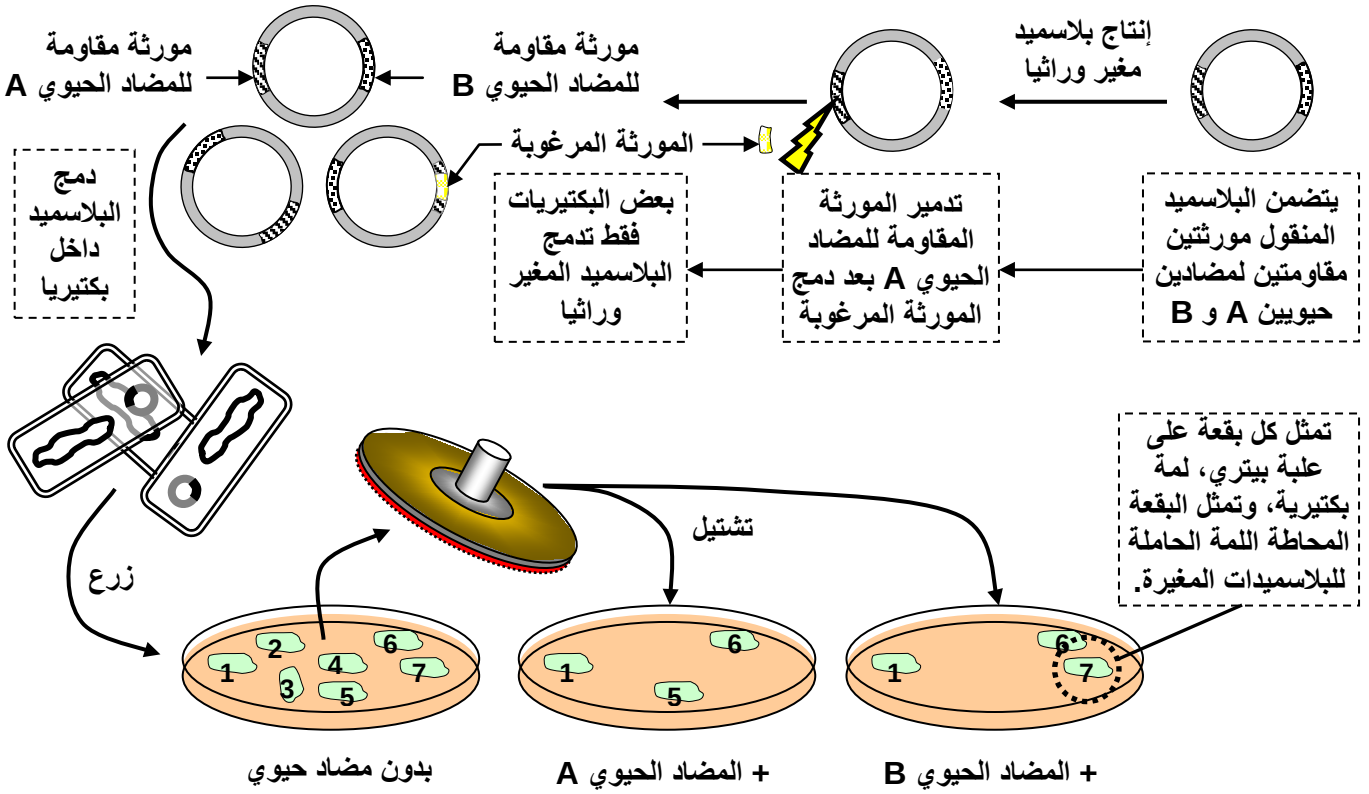
③ تلميم المورثة ورصد البكتيريا المغيرة وراثيا:

أ – **رصد البكتيريات المغيرة وراثيا بواسطة المضادات الحيوية.** أنظر الوثيقة 6.

الوثيقة 6: رصد البكتيريات المغيرة وراثيا من خلال استعمال المضادات الحيوية:

بعد دمج البلاسميد في البكتيريات العائلة، يتم زرعها داخل علبة بيتري في وسط ملائم، بحيث تتكاثر مكونة مستعمرات على شكل لمات. بعد ذلك يتم نقل هذه اللمات إلى علب جديدة، فنحصل بذلك على عدة لمات، فنتكلم بذلك عن التلميم. بعض هذه اللمات يحتوي على البكتيريا المغيرة وراثيا، وبعضها لم تُدمج المورثة.
قصد رصد البكتيريات المغيرة وراثيا، يُعتمد على عدة تقنيات، من بينها استغلال خاصية مقاومة المضادات الحيوية بفعل مورثات تتموضع على مستوى البلاسميد. ويتجلى مبدأ هذه التقنية في زرع البكتيريات في أوساط زرع تضم المضادات الحيوية، ثم تحليل النتائج المحصل عليها في كل وسط زرع لتحديد اللمات التي تحتوي على المورثة المرغوبة. توضح الوثيقة أسفله، ظروف و نتائج هذه التجارب.

ماذا تستخلص من معطيات هذه التجربة؟



نلاحظ أن البلاسميد المستعمل في هذه الحالة يتميز بوجود مورثتين: المورثة A (مقاومة المضاد الحيوي A) والمورثة B (مقاومة المضاد الحيوي B).
يُلاحظ على أن المورثة المُدمجة تتموضع وسط المورثة المسؤولة عن مقاومة المضاد الحيوي A، إذن بعد دمجه للمورثة الجديدة، فقد البلاسميد المورثة A دون أن يفقد المورثة B. ادن البكتيريا الحاملة للبلاسميد المغير ستكون حساسة للمضاد الحيوي A ومقاومة للمضاد الحيوي B. وهكذا يتم رصدها باستعمال هذه المضادات الحيوية كما يلي:

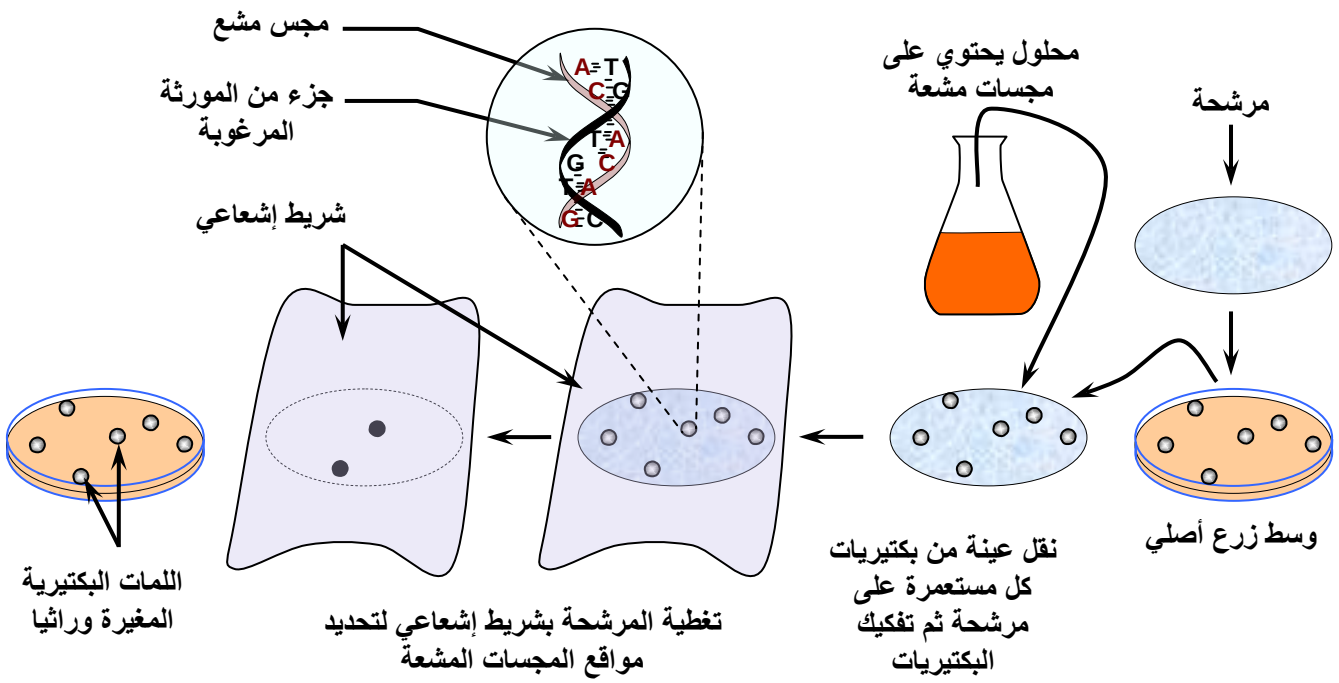
- ⇦ عند زرع البكتيريا في وسط زرع يضم المضاد الحيوي A، ستنمو فقط البكتيريات التي تتوفر على المورثة المقاومة لـ A، وتختفي التي لا تتوفر على مورثة المقاومة لـ A. هذه الأخيرة هي 2، 3، 4، 7.
- ⇦ عند زرع البكتيريا في وسط زرع يضم المضاد الحيوي B، تنمو فقط البكتيريات التي تتوفر على المورثة المقاومة لـ B، وهي 1، 6، 7، وتختفي التي لا تتوفر على مورثة المقاومة لـ B.

إذن البكتيريا المغيرة وراثيا ستكون في نفس الوقت مقاومة للمضاد الحيوي B، وحساسة للمضاد الحيوي A، وبالتالي فهي البكتيريا 7. التي يتم زرعها بعد ذلك حتى يتم تعبير البروتين المرغوب.

ب – رصد البكتيريات المغيرة وراثيا بواسطة المجسات المشعة.

يمكن كذلك رصد البكتيريات المغيرة وراثيا من خلال تقنية أخرى وهي استعمال المجسات المشعة.
تعتمد هذه التقنية على رصد المورثة المرغوبة، باستعمال مجسات مشعة، وهي عبارة عن قطع ADN أو ARNm مشعة ومكملة لمتتالية الـ ADN لجزء مميز من المورثة المستهدفة. يتم بعد ذلك تحديد تموضع الإشعاع باستعمال شريط إشعاعي.
يدل الإشعاع في الشريط، على موقع تواجد المجسات المشعة، وبالتالي موقع تواجد البكتيريات الحاملة للمورثة المرغوبة.
تمثل الوثيقة 7 أهم مراحل هذا التقنية.

الوثيقة 7: رصد البكتيريات المغيرة وراثيا من خلال استعمال المجسات المشعة:



④ تعبير المورثة.

بعد الحصول على اللمات التي تحتوي على المورثة المطلوبة، يتم زرع هذه الخلايا المغيرة في مخمرات صناعية لتتكاثر وتنتج أكبر كمية من المادة الناتجة عن ترجمة المورثة المدمجة في البلاسميد.
لكي تقوم البكتيريا بإنتاج بروتينات لا تحتاجها، تضاف إلى المورثة المرغوبة وحدات وظيفية منظمة.

خلاصة : تعريف الهندسة الوراثية

الهندسة الوراثية هي استخلاص جزء من ADN حامل لمورثة مطلوبة، وزرعه في خلايا أخرى (بكتيريا أو خلايا الخميرة...). وهكذا يتم الحصول اصطناعيا على خلايا هجينة لم تكن موجودة من قبل في الطبيعة، قادرة على إنتاج بروتينات معينة مطلوبة.

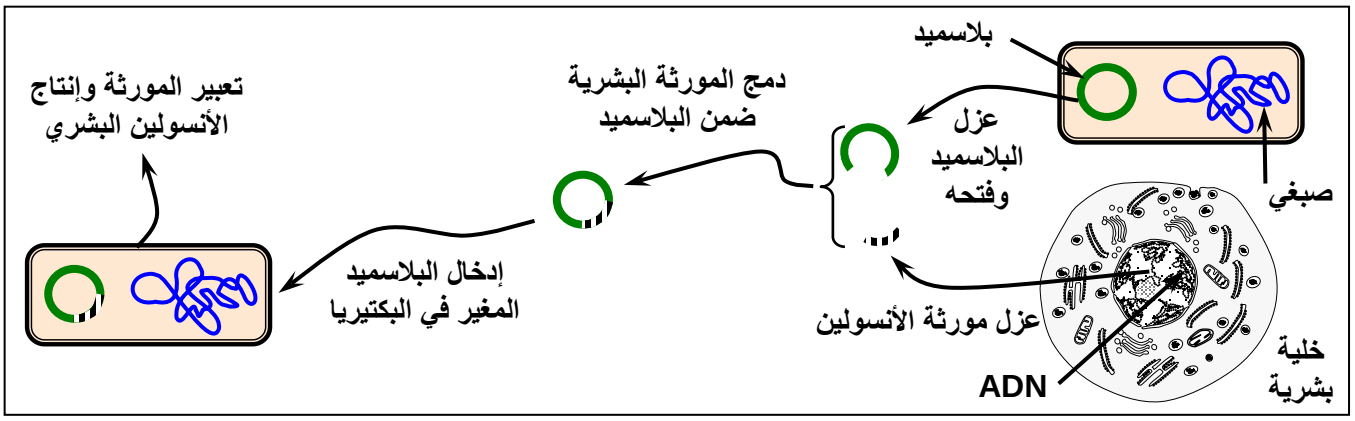
III – أمثلة لتطبيقات الهندسة الوراثية.

① الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline أنظر الوثيقة 8.

الوثيقة 8: الإنتاج الصناعي للأنسولين Insuline .

الأنسولين هرمون مخفض لنسبة السكر في الدم، ويتم إنتاجه من طرف خلايا β لجزيرات Langerhans البنكرياسية. وكل نقص في هذا الهرمون يؤدي إلى مرض السكري. الذي يعالج في هذه الحالة بحقن الشخص بالأنسولين الحيواني، إلا أن استعماله في هذه الحالة يؤدي إلى ظهور حالات أرجية، بحكم اختلاف التركيب الكيميائي بين أنسولين الحيوانات والأنسولين البشري.
بفضل تقنيات الهندسة الوراثية تم إنتاج الأنسولين البشري بكميات صناعية إذ تم تركيب المورثة انطلاقا من ARNm المسؤول عن إفراز هذا الهرمون. ثم بعد ذلك نقلت هذه المورثة إلى متعضيات مجهرية كخميرة البيرة وبعض العصيات التي تقوم بعد ذلك بإنتاج هذا الهرمون وطرحه في الوسط الخارجي مباشرة.

يعطي الرسم التخطيطي أسفله مراحل نقل مورثة الأنسولين لبكتيريا.



انطلاقا من معطيات هذه الوثيقة ومن معارفك حول آليات الهندسة الوراثية:

1) بين أهمية اللجوء إلى الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري.
2) أعط مراحل تطبيق الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري.

1) للأنسولين نفس الدور عند مختلف الثدييات، إلا أنه يظهر بعض الاختلافات في التركيب الكيميائي. ولذلك فاستعمال الأنسولين الحيواني عند الإنسان، يؤدي إلى ظهور حالات أرجية. ومن هنا تظهر أهمية اللجوء إلى الهندسة الوراثية لإنتاج أنسولين مطابق للأنسولين البشري. كما أن هذا الأنسولين يكون بكميات وافرة، وبكلفة أقل.

2) مراحل تطبيق الهندسة الوراثية لإنتاج الأنسولين البشري :

+ عزل الصبغي المتضمن للمورثة المعنية.
+ قطع ADN المراد استعماله بواسطة أنزيم الفصل. (تظهر على ADN المقطوع أطرافا موحدة).
+ استخراج البلاسميد (ناقل) من بكتيريا.
+ قطع ADN البلاسميد بواسطة أنزيم الفصل. (يملك ADN البلاسميد المقطوع أطرافا موحدة، والتي تتكامل مع أطراف ADN البشري المعزول).
+ دمج المورثة على البلاسميد بواسطة أنزيم الربط.
+ نقل البلاسميد إلى داخل البكتيريا.
+ رصد البكتيريات المغيرة وراثيا.
+ تلميم البكتيريات للحصول على لمات تتوفر على المورثة المراد نقلها.
+ حث البكتيريات المغيرة وراثيا على إنتاج الأنسولين.

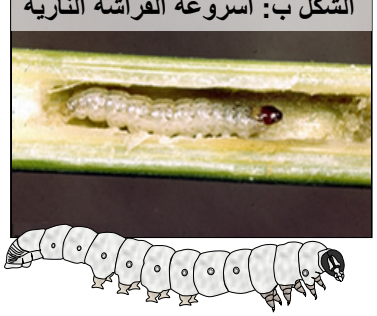
② نقل القدرة على محاربة الحشرات الضارة أنظر وثيقة 9 والوثيقة10.

الوثيقة 9: الإنتاج الصناعي لبروتينات سامة ضد الحشرات الضارة .

تعتبر الذرة من النباتات البالغة الأهمية، إذ تدخل في التغذية البشرية والحيوانية. إلا أن زراعة هذا النبات تعرف خسارات في الكمية والجودة بسبب تطفل أسروعات الفراشات النارية **La pyrale du maïs** (***Ostrinia nubilalis***) (الشكل أ وب)، إذ بعد انفقاس البييضات، تتوغل الأسروعات داخل ساق النبتة لتتغذى على أنسجتها، كما تحدث أضرارا على مستوى السنابل والبذور، فيصبح النبات المصاب ضعيف النمو.

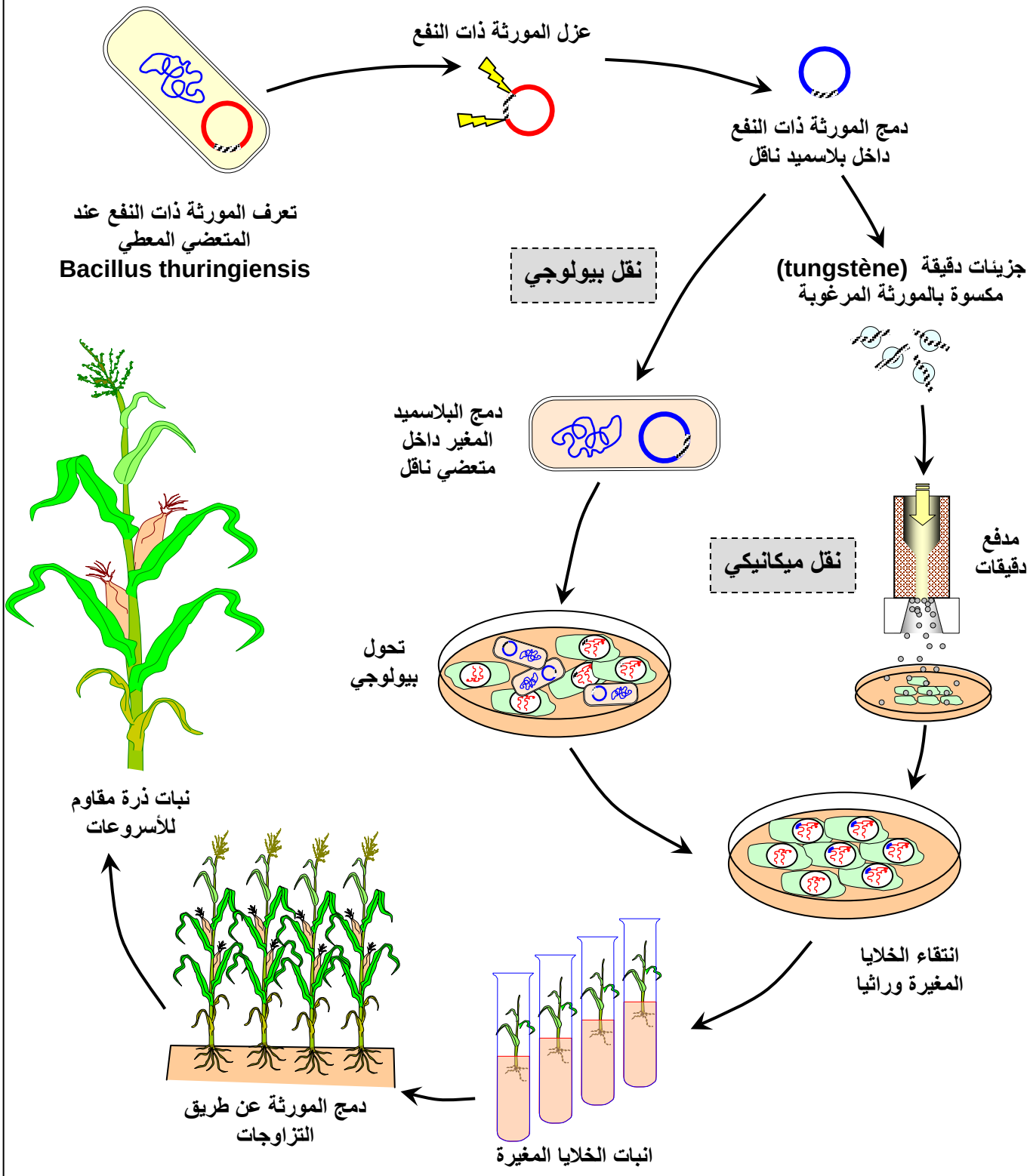
لمقاومة هذه الأسروعات، اكتشف بعض العلماء نوعا من البكتيريات تدعى **Bacillus thuringiensis** (الشكل ج) تستطيع تركيب بروتين سام بالنسبة للأسروعات، وغير ضار بالنسبة للفقريات. وقد استعملت هذه البكتيريا كوسيلة للمقاومة البيولوجية.

الشكل أ: الفراشة النارية


الشكل ب: أسروعة الفراشة النارية

الشكل ج: Bacillus thuringiensis

الوثيقة 10: أشكال ومراحل نقل مورثة البروتين السام لنبات الذرة.



بالاعتماد على معطيات هذه الوثيقة ومعطيات الوثيقة 10، استخرج:

1) تأثير أسروعات الفراشة النارية على نبات الذرة.
2) مراحل التعديل الوراثي لنبات الذرة والهدف من هذا التعديل.

1) لمقاومة أسروعات الفراشات النارية، استعمل المزارعون المبيدات الحشرية، إلا أنها أعطت نتائج جد محدودة. لأنه بعد انفقاس البيض، تتوغل الأسروعات داخل ساق النبتة وبذلك فهي تحتمي من تأثير المبيد. إضافة إلى هذا، للمبيدات انعكاسات سلبية على صحة الإنسان.
2) بفضل الهندسة الوراثية، أمكن الحصول على نبتات مقاومة للأسروعات وذلك عن طريق ادماح مورثة إنتاج البروتين السام المأخوذ من البكتيريا B.t ضمن الذخيرة الوراثية لخلية نباتية تتطور إلى نبات يستطيع أن ينتج البروتين السام الذي يقتل كل أسروع أكل من هذا النبات. ويتم هذا التعديل الوراثي عبر المراحل التالية:

- ✓ تعرف المورثة ذات النفع عند المتعضي المعطي (بكتيريا Agrobacterium turingiensis).
- ✓ عزل المورثة المسؤولة عن تركيب البروتين السام المقاوم للأسروعة من المادة الوراثية للبكتيريا.
- ✓ دمج المورثة المعنية داخل بلاسميد ناقل.
- ✓ نقل البلاسميد المغير وراثيا إلى خلايا نباتية، إما بشكل ميكانيكي أو بشكل بيولوجي.
- ✓ رصد وانتقاء الخلايا المغيرة وراثيا.
- ✓ إنبات نبتات مغيرة وراثيا في وسط ملائم، للحصول على شتلات جديدة مقاومة للأسروعة.