کاربرد برخی از فنون و روشهای مهندسی ژنتیک در گیاهان

محمدرضا نوری دلوئی*

گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی تهران، تهران، ایران

نفیسه صبری

دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

روشهای سنتی پرورش گیاهان، جهت تولید گیاهان جدید کافی نیستند؛ امروزه روشهای جدیدتری از جمله کلون سازی ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد و استفاده از پلاسمید Ti به عنوان ناقل، یکی از ابزارهای این روش است. این پلاسمید که متعلق به گونهٔ خاصی از باکتری گرم منفی خاک **Agrobacterium tumefaciens** است، قادر می‌باشد بخشی از ملکول DNAی خود را به هستهٔ سلول گیاهی وارد کرده آن را در ژنوم گیاه جای دهد. این DNA که به T-DNA مشهور است، درست مانند سایر ژنهای گیاهی بیان می‌شود. یکی از نتایج بیان این DNA، سنتز پاره‌ای از هورمونهای گیاهی است که سبب می‌شود سلولهای گیاهی مجاور، مستقل از کنترل گیاه، شروع به تکثیر غیر طبیعی نمایند ودر نهایت تومور را بوجودآورند. امروزه ثابت شده است که انتقال DNA و تولید تومور دو پدیده با عملکردهای مستقل هستند؛ به این ترتیب می‌توان T-DNA جهش یافته‌ای را به گیاه منتقل کرد که ضمن دارا بودن ژن مطلوب، بخش تومورزای خود را نیز از دست داده است. ناقلین «درون رونده»و ناقلین «دوتایی»، مهمترین ابزارهای تولید اگروباکتریوم جهش یافته هستند. اگروباکتریوم جهش یافته به سه روش مختلف می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد: در تلقیح اگروباکتریوم به بافت جداشدهٔ گیاهی، درکشت توام پروتوپلاست با اگروباکتریوم، و در تلقیح اگروباکتریوم به دانه گیاهی. هرکدام از این روشها نسبت به دیگری مزایا و معایبی دارند. در صنعت و کشاورزی از روشهای ذکر شده برای تولید گیاهان مقاوم به علف‌کشهاو آفات استفاده می‌کنند. برای این منظور ژنهایی را که مقاومت را افزایش می‌دهند یا ژنهایی را که اجازه تخریب اختصاصی علف‌کش را می‌دهند به هستهٔ گیاه وارد می‌کنند. گر چه T-DNA همواره DNA هستهٔ گیاهی را مورد هدف قرار می‌دهد ولی می‌توان بر اساس تجربیات جدیدی که در گیاهان تنباکو انجام شده است‌به استقرار T-DNA در DNAکلروپلاست نیز خوشبین بود. استفاده از پلاسمید Ti جهت انتقال صفات مطلوب به گیاهان

*- مسئول مکاتبات

در مورد گیاهان دولپه‌ای بسیار موفقیت‌آمیز بوده است ولی از آنجائیکه اگروباکتریوم قادر به واردکردن T-DNA به سلولهای تک لپه‌ای نیست، گیاهان تک لپه‌ای در این روش با مشکلات خاص خود روبرو هستند. بسیاری از این مشکلات در چند سال اخیر برطرف شده‌اند و می‌توان امیدوار بود که در چند سال آینده سرسخت‌ترین تک‌لپه‌ایها نیز روشهای کلون سازی ژن را بپذیرند. در این مقاله، برخی از دستاوردهای پژوهشی در قلمرو زیست‌شناسی مولکولی و کاربرد تعدادی از فنون و روشهای کلون سازی ژن در گیاهان، به اشاره مورد بحث و بررسی قرار گرفته است.

J.of sci. Univ. Tehran, Vol 21 (1995), no 1, p. 52-64

Application of some Genetic Engineering Procedures and Techniques in Plants.

M.R. Noori - Daloii*

Dept. of Biochemistry, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences ,

Tehran , Iran

N. Sabri

Faculty of basic Science, University of Tarbiat Modaress , Tehran , Iran

Abstract

In Plant breeding, classical methods are not sufficient. Today new methods are used to introduce foreign DNA in to plant cells. Gene transfer into plant cells can be achieved by the natural process of gene transfer carried out by the bacterium "Agrobacterium tumefaciens". These bacteria contain a larg plasmid, the Ti plasmid, Which is responsible for the induction of disease in wounded plants. It has become clear that the natural gene products of the T-DNA of Agrobacterium serves to either synthesize auxins and cytokinins or make the host cell more sensitive to auxins; this phenomena are known to be responsible for the production of the tumorous phenotype. T-DNA transfer and growth are encoded by different independent functions. T-DNA is also tranferred and integrated into the plant genome if the region responsible for tumour formation are depleted or inactivated. The most important vectors that have been developed are "cointegrative" and "binary" vectors. Three general procedures have been developed for the production of transgenic plant using Agrobocterium: Explant inoculation, protoplast cocultivation and seedling inoculation. However, the integration of foreign DNA plant cells by

Agrobacterium is random and normally directed at the nucleus. There is evidence that T-DNA mediated gene can target plant chloroplasts. The natural gene vector system of "Agrobacterium tumefaciens" is restricted to the host range of Agrobacterium, Which includes dicotyledonous plants. However, Most monocotyledonous plants are not considered susceptibe and create difficulties. Many of these difficulties are removed and it can be expected that other problems will be overcome sooner or later.

مقدمه

تاچند دههٔ پیش تنها راه برای بدست‌آوردن گیاهان جدید، استفاده از روشهای سنتی بود. این روشها موفقیت‌آمیز بودند و شدت موفقیت در بعضی موارد به حدی‌بود که اصطلاح «انقلاب سبز» به آن اطلاق شد. نمونهٔ آن بدست‌آوردن واریته‌های جدید گندم توسط نورمن بورلاگ (Norman Borlaug) و همکارانش در مکزیک بود [2]. ولی باید در نظر داشت که از این روش، نمی‌توان انتظار زیادی داشت. زیرا اساس آن بر آمیزش گیاهان قرار دارد و طبیعتاً، بین گونه‌هایی که قادر به آمیزش با یکدیگر نیستند، امکان انتقال صفات وجود ندارد.

به این ترتیب نیاز به روشهای جدید برای حل مسأله، روز به روز مشهودتر شد.یکی از مهمترین فنون و روشهایی که امروزه جهت انتقال صفات بین گیاهان مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد، تکنولوژی DNA نوترکیب یا به عبارت دقیق‌تر استفاده از مراحل مربوط به کلون سازی ژن در گیاهان است و یکی از ابزارهای آن در گیاهان، استفاده از پلاسمید Ti به عنوان ناقل ژن است.

در طبیعت، گونهٔ خاصی از باکتری گرم منفی خاک به نام اگروباکتریوم تومافاسینس (Agrobacterium tumefaciens) دارای پلاسمیدی است که به اختصار تحت عنوان "Ti" (Ti plasmid) خوانده می‌شود. وجه تسمیه این پلاسمید، ایجاد تومور بر اثر فعالیت آن است. در طبیعت گونهٔ یاد شده در گیاهان دولپه‌ای جراحت دیده نوعی تومور تحت عنوان «گال تاجی» (crown gall) ایجاد می‌کند. قسمتی از DNA این پلاسمید به نام T-DNA به درون ژنوم هسته‌ای سلولهای گیاهی وارد می‌شود و سپس همانند سایر ژنهای گیاهی بیان می‌گردد. از این خصوصیت می‌توان برای وارد کردن ژنهای مطلوب و موردنظر به درون هستهٔ سلول گیاهی استفاده کرد. به این ترتیب T-DNA نوترکیبی بوجود می‌آید که پس از انتقال به سلول گیاهی در نهایت صفت یا صفات مطلوب را در سلول تغییر یافته (transfomred cell) بوجود می‌آورد. [1,4].

استفاده از روش بالا در مورد گیاهان دولپه‌ای، نتایج موفقیّت‌آمیزی در برداشته است، ولی از آنجائیکه اگروباکتریوم قادر به وارد کردن T-DNA به سلولهای تک‌لپه‌ای نیست، گیاهان تک‌لپه‌ای در این روش، با مشکلات خاص خود روبرو هستند. البته در چند سال اخیر، بخش اعظم این مشکلات بر طرف شده و امروزه چندین گونهٔ گیاهی تک‌لپه‌ای را با استفاده از فنون و روشهای مربوط به کلون سازی به شکل تغییر یافته بدل نموده‌اند.

روشها و فنون

فرایند انتقال T-DNA به سلول گیاهی، مبتنی بر اصول چندی است که فهم آن جهت استفاده از این روش در به نژادی گیاهان ضروری است.

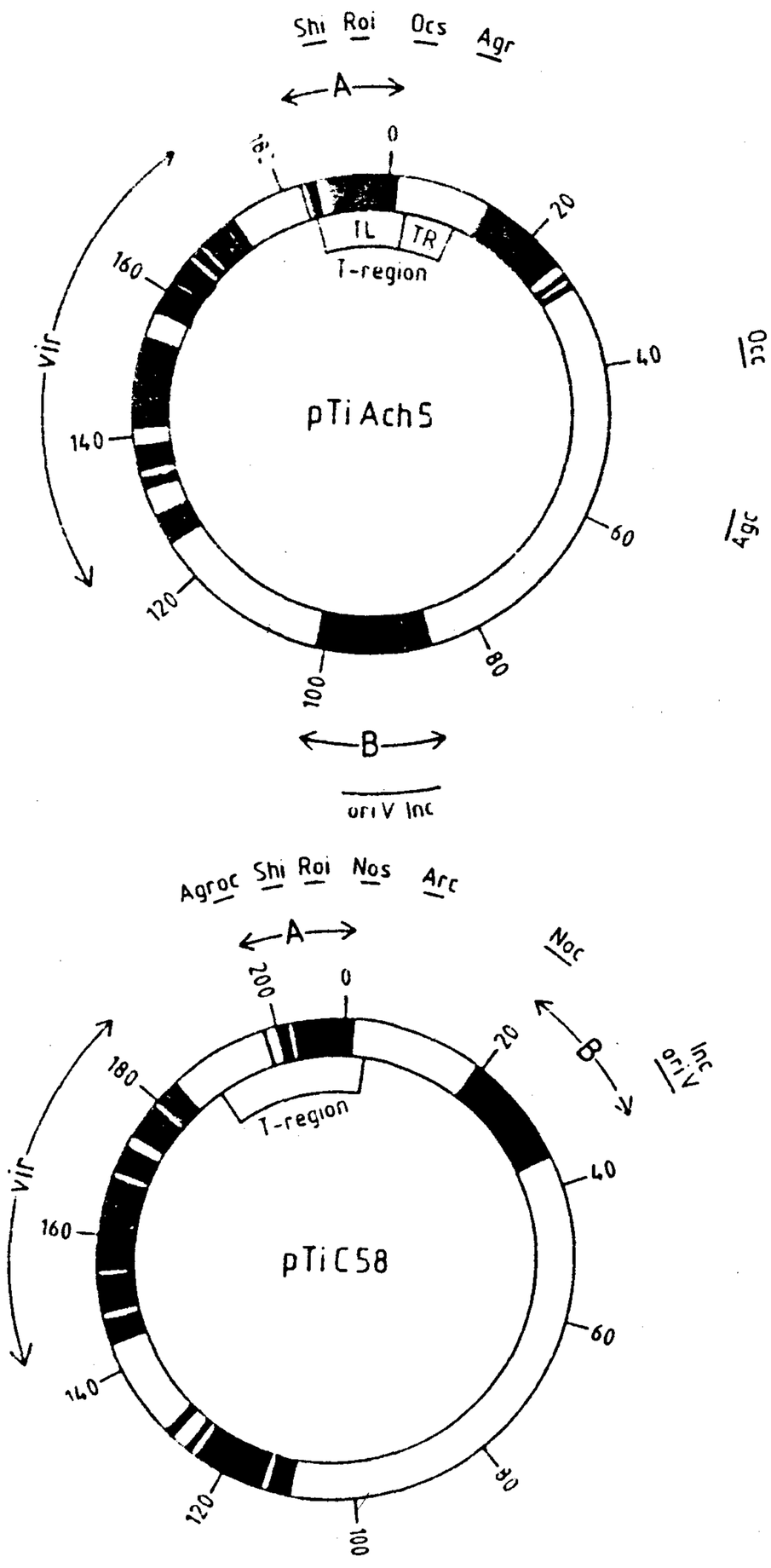
پلاسمید Ti، پلاسمیدی با اندازهٔ بین ۱۵۰ تا ۲۰۰ کیلوباز است و تنها حدود ۱۰ درصد این پلاسمید تحت عنوان T-DNA به سلول گیاهی انتقال می‌یابد. در پلاسمید Ti علاوه بر T-DNA،

بخش دیگری تحت عنوان ناحیهٔ Vir (virulent region) وجـود دارد که در جداشدن T-DNA از پلاسمید Ti، انتقال T-DNA بـه سلول گیاهی و نفوذ آن به درون ژنوم هسته‌ای سلول گیاهی نـقش اساسی دارد [5,6,7] (شکل ۱).

سه گروه اصلی از پلاسمیدهای Ti عبارتند از: پـلاسمیدهای اکتوپین (octopine)، نوپالین (nopaline) و اگروپین (agropine). اکتوپین،نوپالین و اگروپین، نام سه دسته از ترکیبات شیمیایی متعلق به گروه اوپین‌هاست و اوپین‌ها از مشـتقات قـندی-آمـینواسـیدی هستند. به این ترتیب و همان‌طور که پـیداست اسـاس طـبقه‌بندی پلاسمیدها Ti بر نوع اوپین سنتز شده توسط آنها استوار است و این امر طبیعتاً، اهمیت اوپین را در این زمینه به خوبی روشن می‌کند زیراکه اوپین منبع کربن یا منبع نیتروژن اگروباکتریوم است.

پلاسمید Ti واجد ژن ضروری برای سنتز اوپین می‌باشد و این ژن در ناحیهٔ T-DNA جای دارد. با این وجود T-DNA خود را به ژنوم هسته‌ای سلولهای گیاهی منتقل مـی‌نماید و در اثـر بـیان ژن خاص سنتز اوپین، در سلول گیاهی ایـن مشـتق آمـینواسـیدی بـه فراوانی ساخته می‌شود. این مطلب زمانی روشـن شـد کـه مـعلوم گردید علی رغم اینکه پلاسمید Ti، دارای ژن مربوط به سنتز اوپین می‌باشد، فرایند نسخه‌برداری این ژن در باکـتری در سـطح بسـیار پائینی صورت می‌گیرد. همچنین نسخه‌های حاصله ناقص هستند. به همین دلیل در باکتری اوپین سنتز نمی‌شود. اما هنگامی کـه ژن مربوط به سنتز اوپین وارد ژنوم هسته‌ای سـلول گـیاهی مـی‌شود، توانایی سنتز اوپین را آشکار می‌نماید. به این تـرتیب ایـن ژن کـه متعلق به یک موجود ابتدایی است، تنها می‌توانـد در یک سـلول گیاهی که مربوط به یک موجود پیشرفته است نسخه‌هایی از RNA پیک فعال را تولید کند. به همین دلیل نیز اگروباکتریوم انگل گـیاه می‌شود و رابطهٔ بین اگروباکتریوم و سلول گیاهی، از نـوع انگـلی است، زیراکه در نتیجه این رابطه اگروباکتریوم رشد بیشتری کرده و سلول گیاهی تومور را به دست می‌آورد. به این مفهوم جدید انگلی شدن، کلون کردن ژنتیکی (genetic colonization) گفته می‌شود.

پلاسمید Ti دارای چندین خصوصیت می‌باشد کـه تـوانـایی



شکل ۱ـ ساختار علمی پلاسمیدهای Ti. شکل، پلاسمید اکتوپین PTiAch5 و پلاسمیدنوپالین PTiC58 را نشان می‌دهد که به ترتیب ۱۹۰ و ۲۱۰ کیلوباز طول دارند. بخشهای قرمز رنگ شکل، معرف نواحی مشترک دوپلاسمید است. این نواحی عمدتاً در بخشهای Oir،T،Vir واقع هستند. ژنهای مسئول در سنتزاوپین‌هابه صورت اختصاری با Ocs (اکتوپین سنتاز)، Nos (نوپالین سنتاز) و Agr (اگروپین سنتاز) نشان داده شده‌اند. Roi،Shi محل ژنهایی را نشان می‌دهد که تشکیل جوانه و ریشه را به ترتیب مانع می‌شوند.

بیوسنتز اوپین، ایجاد تومور در سلول میزبان گیاهی و کاتابولیسم اوپین از مهمترین آن به حساب می‌آید[1,2,4].

بعد از این‌آشنایی مختصر با پلاسمید Ti، به اصل مطلب باز می‌گردیم. برای انتقال T-DNA به درون ژنوم هستهٔ سلول گیاهی سه عامل زیر ضروری است:

۱ - T-DNA

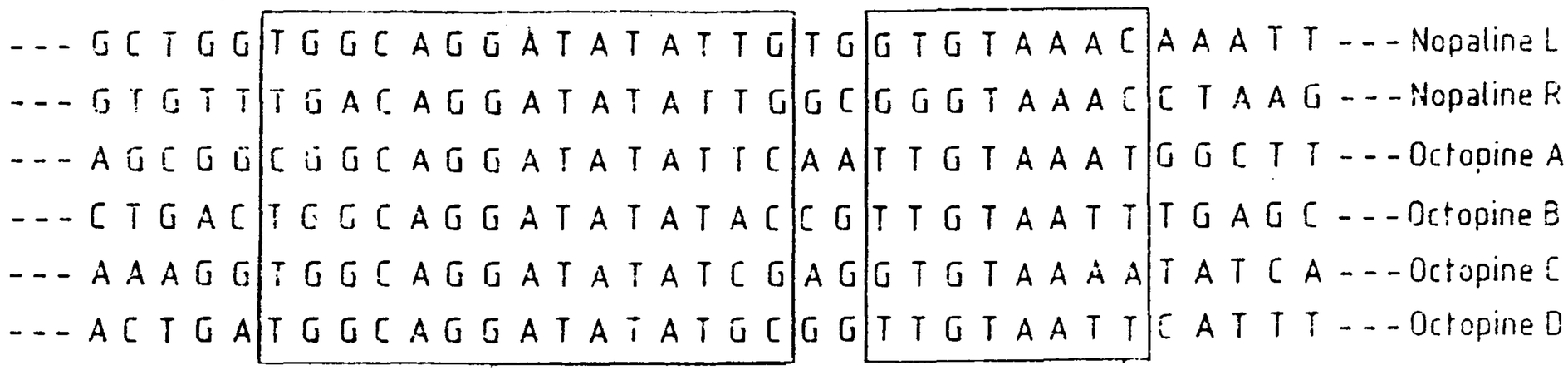
۲ - ناحیه‌ای که به اختصار Vir خوانده می‌شود. این بخش، مجاور قطعهٔ T-DNA، روی پلاسمید Ti واقع است و خود از شش ژن مختلف به نامهای :

Vir A , Vir G , Vir B ,Vir C ,Vir D و Vir E تشکیل یافته است.

۳ - سه لوکوس یا جایگاه ژن واقع در کروموزوم باکتری که به نامهای PSCA, ChVB, ChVA خوانده می‌شوند. محصول این ژنها، سبب تغییرات شیمیائی در سطح خارجی سلول باکتری می‌گردند به نحوی که توانایی اتصال به سلول گیاهی مستعد را در بالاترین حد داشته باشد.

مقایسه T-DNA موجود در پلاسمید Ti با قطعه DNA نفوذ یافته به درون ژنوم هسته‌ای سلولهای گیاهی نشان می‌دهد که درتمامی موارد در انتهای راست و چپ DNAی نفوذ یافته، یک ردیف نوکلئوتیدی تکراری ۲۵ جفت بازی حفظ گردیده است. به این ردیفهای تکراری اصطلاحاً سرحدها یا مرزهای راست و چپ (right and left boundaries) گفته می‌شود. قابل ذکر است که بر خلاف T-DNA که سرحدهای معینی برای خود دارد (شکل۲)، DNA سلول گیاهی ویژگی خاصی را در نقطهٔ ورود T-DNA از خود نشان نمی‌دهد،تنها نکته‌ای که مشخص شده آن است که در این نقاط تراکم نوکلئوتیدهای آدنین و تیمین از سایر نقاط DNA هستهٔ گیاه بیشتر می‌باشد[3,4,8,9].

مطالعات گسترده نشان داده است که در امر انتقال T-DNA به سلول گیاهی، حداقل هفت مرحله وجود دارد که به اختصار عبارتند از: ۱- تشخیص سلول گیاهی مستعد، ۲- فعال کردن و بیان Vir، ۳- فراهم کردن یک نسخه قابل انتقال از T-DNA به نام رشتهٔ T، ۴- انتقال مجموعهٔ T-DNA به غشاء باکتری، ۵- انتقال مجموعهٔ T-DNA ازغشاء باکتری به غشاء سلول گیاهی، ۶- انتقال مجموعه از درون سیتوپلاسم سلول گیاهی و از درون غشاء هسته سلول گیاهی و ۷- نفوذ جزء T-DNA به درون ژنوم هسته‌ای سلول گیاهی.



شکل ۲ ـ ردیف سرحدهای راست و چپ T-DNA پلاسمیدهای Ti اکتوپین و نوپالین. نواحی که بیشترین درجه شباهت را از خود نشان می‌دهند، در داخل کادر قرار داده شده‌اند.

همچنین معلوم شده است که در طبیعت، همواره، تنها سلولهای گیاهی آسیب دیده قادر به پذیرش T-DNA می‌باشند. علت این امر، در ابتدا به نفوذپذیرتر بودن دیواره سلولهای آسیب‌دیده نسبت داده می‌شد. ولی امروزه مشخص شده است که سلولهای آسیب‌دیده گیاهی ترکیبات شیمیائی خاصی را آزاد می‌کنند که بر ژن Vir اثر فعال‌کنندگی دارد. این ترکیبات عبارتند از (acetocybringon) AS (hidroxy acetocybringon)OH-AS که هر دو ترکیب مربوط به متابولیسم فنیل پروپانوئید هستند.

محصولات ژنهای Vir A و Vir G به ترتیب نقش‌گیرنده و فعال‌کننده را بازی می‌کنند. پروتئین Vir A که در غشاء مستقر است نقش یک احساسگر (sensor) را دارد. به محض آزاد شدن ترکیبات فنلی مذکور، احساسگر فعال می‌شود وبرروی ژن Vir G اثر گذاشته و این ژن راکاملاً فعال می‌کند. ژن Vir G در واقع، یک ژن تنظیم‌کنندهٔ فعالیت برای سایر ژنهای Vir است.

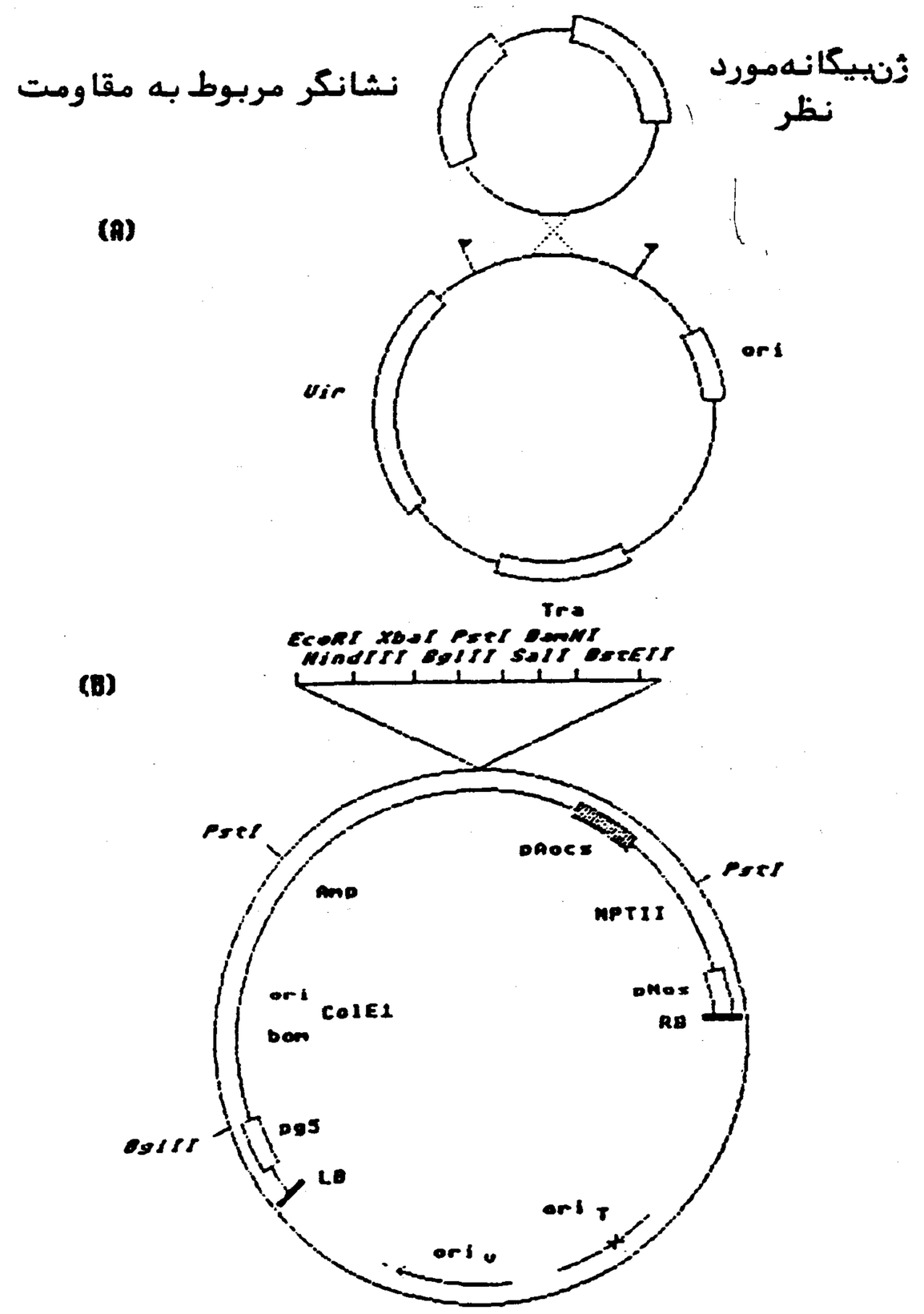
تهیه نسخه‌ای قابل انتقال از T-DNA، مرحله بعدی است. به این منظور مشخص شده است که این نسخه، یک T-DNA تک رشته‌ای بوده و از این رو به آن رشتهٔ T گفته می‌شود. در این مرحله اندونوکلئازهای Vir D1 و Vir D2، ابتدا سرحدهای راست و چپ T-DNA را شناسایی می‌کنند و بدنبال آن، در این نقاط، یک بریدگی تک رشته‌ای - آنهم در رشته سبک پلاسمید Ti- ایجاد می‌کنند. ثابت شده است که این رشتهٔ T همیشه به صورت قطبی و یک جهتی منتقل می‌شود، به این ترتیب که سر حد راست انتهای $5'$ و سرحد چپ انتهای $3'$ را تشکیل می‌دهد. در مرحلهٔ بعد پروتئین Vir E که در واقع به لحاظ عملکرد اختصاصی مولکول DNA تک‌رشته‌ای است به رشتهٔ T متصل می‌شود. بدنبال تحریک باکتری با AS، فراوانترین پلی‌پپتیدهای ناحیهٔ Vir، مربوط به Vir E و Vir B هستند. مطالعات نشان داده است که این پلی‌پپتیدها در هدایت وقایع مربوط به انتقال T-DNA در سطح سلول باکتری نقش مؤثری را ایفا می‌کنند. به این ترتیب مجموعه DNA- پروتئین، از غشاء باکتری به غشاء سلول گیاهی و از آنجا به هسته سلول انتقال می‌یابد.

بعد از مرحله بالا در نقطهٔ هدف واقع در DNA هستهٔ سلول گیاهی و بر روی یکی از رشته‌ها شکاف بوجود می‌آید. پروتئین موجود در سرحد راست رشتهٔ T(یا همان انتهای $5'$ این رشته) به شکاف متصل می‌شود. در اثر این اتصال DNA هسته تاب خورده و در رشتهٔ مقابل نیز شکاف بوجود می‌آید. بعد از اتصال هر دو سرحد رشتهٔ T، تحت تأثیر آنزیمهای سلولی، رشته مکمل ساخته می‌شود. در اثر ترمیم شکاف و همانند سازیهای بعدی، ردیفهای تکراری (repeated sequences) با طولهای متفاوت بدست می‌آید. علاوه براین، DNA وارد شده نیز در نقاطی از توالی خود (نزدیک سرحدهای راست و چپ) نوترتیبی پیدا می‌کند [3,10,11].

پس از آنکه T-DNA در ژنوم هستهٔ سلول گیاهی میزبان نفوذ یافت، همانندسازی کرده و نسخه‌های خود را ضمن تقسیم سلول گیاهی، به سلولهای حاصل از تقسیم می‌فرستد. T-DNA در سلولهای گیاهی میزبان بیان شده و سه مسیر متابولیسمی را بوجود می‌آورد که دو مسیر آن ویژه سنتز هورمونهای گیاهی اکسین و سیتوکینین می‌باشد. این چنین تولید داخلی هورمونی سبب می‌گردد که مستقل از کنترل هورمونی که در کّل گیاه برقرار است، سلولهای مجاور شروع به یک تکثیر غیرطبیعی نمایند، تکثیری که در نهایت در ناحیهٔ آلوده شده به باکتری، موجب پیدایش تومور می‌گردد. ناگفته نماند که مسیر سوم متابولیسمی خاص سنتز اوپین است[12].

پس از بیان اصول پایه‌ای موجود در مسیر انتقال T-DNA به سلول گیاهی، مناسب است که ببینیم چگونه از این اصول می‌توان در جهت انتقال صفات مطلوب به گیاهان بهره برد.

چنانچه که ذکر شد یکی از خصوصیات T-DNA ایجاد تومور در گیاه است. ژنهای مسئول در ایجاد تومور اغلب در سمت چپ T-DNA مستقر هستند. امروزه ثابت شده است که انتقال T-DNA و رشد تومور دو پدیده‌اند که توسط عملکردهای مستقلی هدایت می‌شوند. به این معنی که اگر نواحی مربوط به تشکیل تومور حذف شوند یا غیرفعال گردند، T-DNA باز هم می‌تواند به ژنوم سلول گیاهی نفوذ کند[2,13]. اهمیت این رخداد قابل توجه است زیرا توسط آن می‌توان گیاهان طبیعی به دست آورد که در عین حالیکه



شکل۳- ناقلین مورد استفاده در آگروباکتریوم جهت تولید گیاهان تغییر یافته.

(A) ناقلین درون‌رونده. این ناقلین در نتیجه حذف بخش خاصی از T-DNA و جایگزین کردن آن بخش با یک DNA معین بوجود می‌آیند. DNA بیگانه‌ای که قرار است به ژنوم گیاهی منتقل شود، به یک ناقل بینابینی کلون می‌شود. ردیف این ناقل با بخشی از T-DNA مشترک است. نوترکیبی بین ناقل بینابینی و ناقل درون رونده در آگروباکتریوم سبب می‌شود که یک DNA بیگانه به داخل T-DNA وارد شود. با استفاده از آنتی‌بیوتیک مناسب می‌توان ملکولهای نوترکیب را از سایر ملکولها مشخص کرد. در شکل ردیفهای مربوط به سرحدها با پرچم نشان داده شده است ori*نقطه شروع همانندسازی در آگروباکتریوم و* tra *ناحیه‌ای را که برای انتقال پلاسمید بین باکتریها اهمیت دارد، مشخص می‌کند.*

(B) ناقلین دوتائی. این ناقلین قادرند هم در کل باسیل و هم در آگروباکتریوم همانندسازی کنند. ساختمان پلاسمید pcvoo2 *در شکل نشان داده شده است.* LB *و* RB *به ردیف سرحدهای چپ و راست اشاره می‌کنند.* NPT II *ژن مقاومت کانامایسین (در گیاهان)،* Amp *ژن مقاومت آمپی‌سیلین (در باکتریها)* oriv *و* oriT *نقاط شروع همانندسازی* DNA *در آگروباکتریوم،* ori *و* bom *و* colel *نقاط شروع همانندسازی و متحرک‌سازی* DNA *در کلی باسیل را نشان می‌دهد. در شکل جایگاه بعضی از آنزیمهای محدودگر مشخص شده است.*

خواص سرطانزایی خود را از دست داده‌اند، هنوز بخش معینی از T-DNA را پناه داده‌اند و ژنهای مربوط به آن را بیان می‌کنند.

در عمل با استفاده از آنزیمهای برشگر خاص و محدودگر (restriction endonuclease enzymes)، بخش تومورزای T-DNA را حذف کرده به جای آن ژنی مطلوب و یک نشانگر (marker) مناسب را قرار می‌دهند. برای توضیح بهتر مطلب توضیحات زیر خالی از فایده نیست:

در پژوهشهای عملی، قبل از آنکه سلول گیاهی مستعد در معرض اگروباکتریوم قرار گیرد، تهیه اگروباکتریوم جهش‌یافتهٔ مطلوب ضروری است. منظور از باکتری جهش‌یافته مناسب، اگروباکتریومی است که در بخش T-DNA خود ردیفهای تومورزا را از دست داده و ژن جدیدی را کسب کرده باشد. برای این منظور دو راه حل وجود دارد.

الف - ناقلین درون رونده (cointegrative vectors) و ب- ناقلین دوتایی (binary vectors) (شکل۳).

الف- ناقلین درون رونده

برای ساختن اینگونه ناقلین به ناقلین بینابینی (intermediate vectors) نیازمندیم. ناقل بینابینی حاوی ژن بیگانه و یک نشانگر مقاومتی (resistance marker) است و علاوه بر آن از نظر ردیف نوکلئوتیدی با T-DNA اشتراک دارد و همین ویژگی زمینه مناسب را برای نوترکیبی بین ناقل بینابینی و پلاسمید Ti باکتری فراهم می‌کند. در مرحله بعدی و قبل از زائد قرار دادن این دو پلاسمید در

کنار هم، لازم است که بخش تومورزای پلاسمید Ti باکتری حذف شده و قطعه DNA معینی جایگزین آن شود. آخرین مرحله، در مجاورت قراردادن ناقل بینابینی و پلاسمید Ti جهش‌یافته، درون سلول اگروباکتریوم است که طی آن نوترکیبی رخ می‌دهد، بر اثر آن ناقل جدیدی بوجود می‌آید که از آن نام ناقل درون رونده (cointegrative vector) یاد می‌کنند.

ناقلین دوتایی

برای ساختن این ناقلین به ناقلین بینابینی نیازی نیست و اساس آن بدین قرار است که ناحیهٔ Vir می‌تواند مستقل از T-DNA و در حالیکه هر کدام روی یک ناقل هستند، به مستقر شدن T-DNA در ژنوم سلول گیاهی کمک کند. به این ترتیب از دو ناقل تواماً استفاده می‌شود. یک ناقل جزء Vir را فراهم می‌کند که مثلاً می‌تواند یک پلاسمید Ti طبیعی باشد. ناقل دیگر که به آن ناقل دوتایی گفته می‌شود قادر است هم در اگروباکتریوم وهم در کلی باسیل همانندسازی کند. از اینرو برای بقاء در سلول اگروباکتریوم نیازی به نفوذکردن در پلاسمید Ti ندارد. در حالیکه در حالت ناقلین درون‌رونده، چون تنها ناقل بینابینی قادر به همانندسازی در کلی باسیل است، بعد ازوارد شدن به اگروباکتریوم جهت بقاء خود، ضرورتاً به درون پلاسمید Ti اگروباکتریوم وارد می‌شود [14].

ناقل دوتایی به طور معمول دو بخش اصلی دارد. یک بخش نقاط شروع همانندسازی در اگروباکتریوم و بخش دیگر نقاط شروع همانندسازی در کلی‌باسیل. همچنین ژن بیگانه و نشانگر مقاومت را بین سرحدهای راست و چپ T-DNA جای داده است. معمولاً در تشکیل کتابخانه‌های ژنی از کاسمید به عنوان ناقل دوتایی استفاده می‌کنند. این ناقل علاوه بر بخشهایی که ذکر شد جایگاه COS باکتریوفاژ λ را نیز دارد. اهمیت استفاده از کاسمید به خاطر ظرفیت این ناقل است زیرا که کاسمید قادر است قطعات نسبتاً بزرگی از DNA با اندازهٔ بین ۳۷ تا ۵۲ کیلوباز را در خود حمل کند[2].

بر اساس آنچه ذکر شد، اینک به اگروباکتریوم جهش یافته‌ای دست یافته‌ایم که چه به علت ناقل درون‌رونده و چه به دلیل حضور ناقل دوتایی، واجد ژن مطلوب و موردنظر می‌باشد، علاوه بر آنکه برای ردیابی سلولهای نوترکیب، مجهز به یک نشانگر مقاومت نیز هست.

از این مرحله به بعد به طور کلی سه راه برای فراهم کردن گیاه تغییر یافته وجود دارد:

الف- تلقیح اگروباکتریوم به بافت جدا شدهٔ گیاهی (explant inoculetion)، ب- کشت توام پروتوپلاست با اگروباکتریوم (protoplast Co-cultivation)، و ج- تلقیح اگروباکتریوم به دانه رُست (seedling inoculation) [14,15,16,17,18].

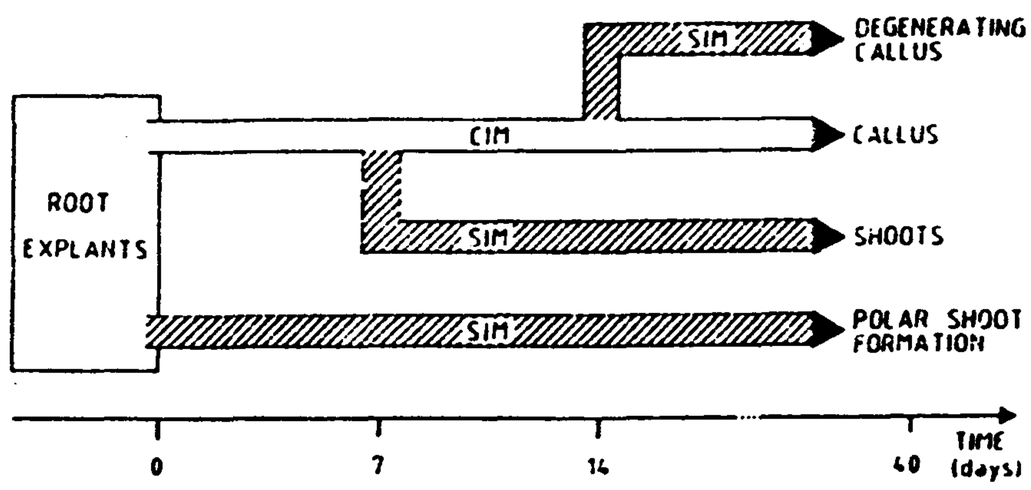
الف- تلقیح اگروباکتریوم به بافت جداشده گیاهی

برای این منظور،اندامی از گیاه مانند ریشه یا برگ را جدا می‌کنند و پس از قطعه قطعه کردن، در مجاورت با اگروباکتریوم در محیط کشت قرار می‌دهند. سپس در جهت تولید کالوس (callus) یا مجموعه سلولهای تمایز نیافته، و جوانه (shoot) به ترتیب جلورانده می‌شود. جوانه ریشه می‌دهد. جوانه‌هایی را که ریشه کرده‌اند در خاک قرار می‌دهند تاگیاهان کامل تغییر یافته‌ای را بوجود آورند. البته در مواردیکه نیاز به تعداد فراوانی گیاه تغییر یافته است، این روش مناسب نیست[14].

با توجه به اینکه در حال حاضر این روش بسیار معمول است، از توضیح بیشتری در این زمینه،پرهیز می‌کنیم.

پژوهشی که بر روی ریشهٔ گونهٔ خاصی از آرابیدوبسیس (Arabidobsis taliana) صورت گرفته است نشان می‌دهد که برای بدست آوردن جوانه از ریشهٔ این گیاه باید از دو محیط کشت جداگانه استفاده کرد که یکی از این محیط‌ها،برای تشکیل کالوس از بافت جداشده و دیگری برای تشکیل جوانه از کالوس، اختصاص یافته است. در این پژوهش ویژه به اختصار، محیط اولی را با نام CIM و دومی را با نام SIM مشخص کرده‌اند.

طول زمانی استفاده از هر محیط کاملاً معین است. شکل ۴ نتایج ناشی از زمانهای متفاوت کشت در هر محیط را نشان می‌دهد. تنها در حالیکه طول زمانی کشت در CIM هفت روز باشد و پس از این مدت کالوس به SIM منتقل شود؛ جوانه پس از چهار هفته بدست می‌آید.



شکل ۴ ـ خلاصه راههای مختلف نگهداری بافتهای ریشه گیاه Arabidopsis c24 در محیطهای CIM و SIM.

جوانه را به محیط GM منتقل می‌کنند. در عرض ۲ تا چهار هفته جوانه شروع به ریشه دادن می‌کند. در این مرحله جوانه را در خاک قرار می‌دهند تا گیاه کامل را بوجود آورد. گیاه گل می‌کند و دانه می‌دهد و در شرایط ایده‌آل، می‌توان از هر گیاه بدست‌آمده از جوانه، بین ۳۰ تا ۱۰۰ عدد دانه بدست آورد[18].

ب- کشت توام پروتوپلاست با آگروباکتریوم

در این روش پروتوپلاست گیاهی را در مجاورت با باکتری قرار می‌دهند. سپس پروتوپلاست آلوده شده را به محیط کشت خاص هدایت می‌کنند تا کالوس تشکیل شود. در ابتدا، از هر پروتوپلاست، یک کالوس و در مرحلهٔ بعد از هر کالوس، یک گیاه کامل بوجود می‌آید. به این ترتیب این روش بر خلاف روش قبلی، امکان فراهم شدن تعداد زیادی از گیاهان تغییر یافته را بوجود می‌آورد[14].

ج- تلقیح آگروباکتریوم به دانه گیاهی

در این روش دانه‌های گیاهی را در سوسپانسیون باکتری خیس می‌کنند. سپس اجازه می‌دهند تا دانه‌ها به گیاهان بالغی تبدیل شوند. این گیاهان خودگشنی می‌کنند و محصولات این خودگشنی بر اساس نشانگر خاصی که در ناقل پیش‌بینی شده، مورد انتخاب قرار می‌گیرد تا به این ترتیب تنها گیاهان تغییر یافته گزینش شوند.

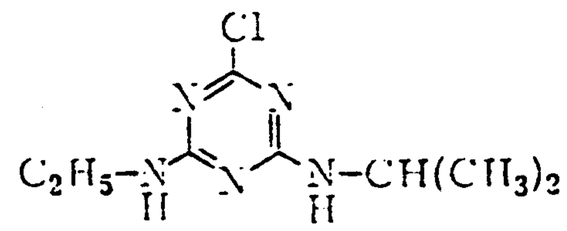
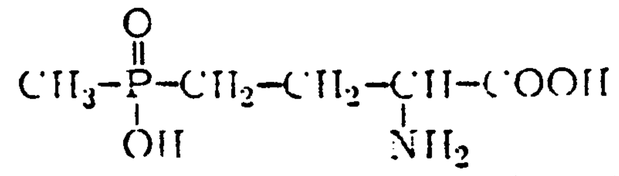
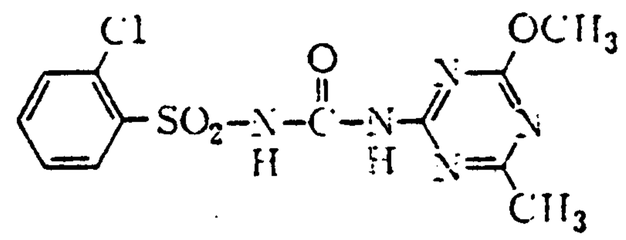
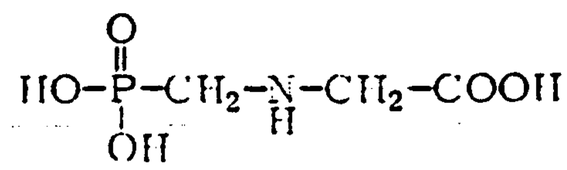
نتایج

یکی از نتایج مهمی که از نظر کاربرد صنعتی به طور گسترده مورد بحث واقع شده است، مهندسی مقاومت به علف‌کشها (herbicides) است. برای این منظور می‌توان یا ژنهایی را که مقاوت را افزایش می‌دهند یا ژنهایی راکه اجازهٔ تخریب اختصاصی علف‌کش خاصی را می‌دهند به ژنوم گیاهی وارد کرد[2,19].

مطلب بیان شده در بالا، بسیار مورد توجه قرار گرفته است زیرا بر خلاف کاربردهای مناسب دیگر نظیر تثبیت نیتروژن (که به عملکرد چندین ژن مختلف بستگی دارد)، با انتقال یک ژن واحد می‌توان در گیاه مقاومت به علف‌کش خاصی را ایجاد نمود. شکل ۵ ساختمان شیمیایی چهار علف‌کش مهم را نشان می‌دهد. این علف‌کشها با آنزیمهای کلیدی موجود در مسیرهای متابولیسمی مهم میان کنش نشان می‌دهند[2].

برای مثال گلیفسات (glyphosate) علف‌کشی با طیف وسیع است. این علف‌کش مانع آنزیم «۵ انول پیرویل- شیکیمات- ۳- فسفات سنتتاز (5-enolpyruvyl-shikimate-3- phosphate synthetase) می‌شود که این آنزیمهای مسئول در بیوسنتز آمینواسیدهای آروماتیک می‌باشد.

در مورد این علف‌کش، بر روی گیاه «گل اطلسی» (Petunia) تجربهٔ موفقیت‌آمیزی صورت گرفته است. در این تجربه هدف، به دست‌آوردن آنزیم مقاوم به علف‌کش در مقیاس وسیع است، یعنی گیاهی که بتواند این آنزیم را در حدی بالاتر از حد طبیعی بیان کند.برای این منظور باید جهش‌یافته‌های مقاوم را جستجو و شناسایی نمود. جهش‌یافته‌ها می‌توانند غلظت بالایی از علف‌کش را تحمل کنند. در محیط سمی حاصل از علف‌کش، کمی بیش از

آنزیم حساس	ساختمان شیمیائی	علف کش
32 K protein from photosystem II		atrazine
glutamine synthetase		L-phosphinotricin
acetolactate synthetase		chlorsulfuron
5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthetase		Glyphosate

شکل ۵ ـ ساختمان آنزیمهای هدف برای علف‌کش‌ها.

بیست برابر حد طبیعی آنزیم مقاوم به علف‌کش تولید شود. محققان توانسته‌اند که در محیط‌های کشت سلولی تعلیقی، این آنزیم را به طور نسبی استخراج کرده وخالص کنند. با تعیین ردیف پروتئین (آنزیم)، RNA پیک و در مرحلهٔ بعد DNA مکمل (complementary یا C-DNA) آن ساخته شده است. این DNA مکمل می‌تواند به عنوان ژن بیگانه با کمک یک ناقل مناسب و از طریق اگروباکتریوم به گیاه دولپه‌ای انتقال یابد و صفت مقاومت به این علف‌کش خاص را به گیاه هدیه کند[20].

آنزیم مقاوم به علف‌کش را می‌توان از منابع گیاهی یا باکتریایی بدست‌آورد. در مورد دو علف‌کش «گلیفسات» و «سولفونیل اوره (sulphonylurea)» چنین روشی موفقیت‌آمیز بوده است.

راه دوم مبارزه با علف‌کشها، واردکردن ژنهایی به گیاهانی است که اجازه تخریب اختصاصی علف‌کش معینی را می‌دهند. کاربرد این سیستم که به سیستم سم‌زدایی (detoxification) معروف است برای علف‌کش‌های برومکسینیل (bromoxynil)، بیستا (basta) کاملاً موفق بوده است[21].

یکی از مهمترین علف‌کشهایی که مورد توجه قرار گرفته است، آترازین (atrazine) نام دارد. آترازین علف‌کشی با طیف وسیع است که مانع یک پروتئین غشایی متعلق به فتوسیستم II می‌شودو به این ترتیب برای ایجاد مقاومت در برابر آترازین باید پروتئین مقاوم را به کلروپلاست گیاه منتقل نمود. هر چند بیشتر پروتئینهای کلروپلاستی را ژنوم هسته‌ای سلول گیاهی رمزخوانی می‌کند، اما این پروتئینها به صورت پیش‌ساز (precursor) از طریق غشاء کلروپلاست، از سیتوپلاسم به کلروپلاست منتقل می‌شوند. به طور طبیعی پروتئینهای پیش‌ساز قبل از ورود به کلروپلاست با یک پروتئین عبوری (transit peptid) متصل می‌شوند و با همراهی این پروتئین به کلروپلاست وارد می‌گردند.

تا چندی پیش مهندسی مستقیم ژنوم کلروپلاستی غیر متحمل به نظر می‌رسید و تنها راه واردکردن پروتئین مقاوم به آترازین، به درون کلروپلاست، تلفیق ژن بیگانه با ژن مربوط به یک پپتید عبوری بود. به این ترتیب پروتئین بیگانه و پپتید عبوری به شکل یک پروتئین الحاقی (fusion protein) در می‌آمدند و از غشاء کلروپلاست عبور می‌نمودند[2].

گر چه T-DNA همواره DNA هستهٔ سلول گیاهی را مورد

هدف قرار می‌دهد. ولی می‌توان به استقرار T-DNA در DNA کلروپلاست نیز خوشبین بود. تجربیات جدید نشان داده‌اند که می‌توان در گیاه با ترکیب دوفن «نوترکیبی همساخت» (homologous recombination) و ناقل دوتایی حاوی T-DNA و با استفاده از DNA ریبوزومی گیاه (مثلاً گیاه سویا Soybean)، T-DNA را در DNA کلروپلاستهای گیاه تنباکو مستقر کرد[22].

یکی دیگر از نتایج مهم دست‌ورزی ژن در سلول گیاهی، ایجاد گیاهان مقاوم به آفات است. تولید این گیاهان با ایجاد گیاهان مقاوم به علف‌کش به طرز حیرت‌آوری متفاوت بوده و به مراتب مشکل‌تر است[20].

ایجاد گیاهان مقاوم به آفات، بویژه از دو نظر قابل توجه است، نخست، امکان استفادهٔ مداوم از ضدآفت،و دوم، استفاده از غلظتهای پائین‌تری از ضدآفت. البته لازم به تاکید است که در مورد مسیر یا مسیرهای متابولیسمی که در این بیماریهای گیاهی مورد حمله قرار می‌گیرند، در مقایسه با مسیرهای آسیب‌دیده بر اثر علف‌کش‌ها، اطلاعات در دسترس بسیار کمتر است. در حال حاضر یکی از متداولترین روشها برای این منظور، استفاده از ویروس‌ها است که شرح تفصیلی آن، فرصت مستقلی را می‌طلبد[20].

بحث و دورنما

یکی از مشکلات روش انتقال ژن با کمک آگروباکتریوم، محدود بودن این روش برای تک‌لپه‌ایهاست، زیرا اگروباکتریوم قادر به وارد کردن T-DNA خود در گیاهان تک‌لپه‌ای نیست. از سوی دیگر و چنانچه می‌دانیم، غلات، حبوبات و بسیاری از دانه‌های دیگر خوراکی که از نظر اقتصادی بسیار باارزشند در دستهٔ گیاهان تک‌لپه‌ای جای دارند. پس باید راه حلی برای رفع مشکل بالا وجود داشته باشد. یکی از راه حلهایی که امروزه در این مورد، استفاده می‌شود انتقال مستقیم مولکول DNA به درون سلول گیاهی است. برای این منظور ژن مورد نظر را به یک پروموتور قوی متصل می‌کنند و با همراهی یک نشانگر مثلاً ژن مقاومت به کانامایسین، در معرض پروتوپلاست قرار می‌دهند. با کمک فنونی نظیر استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول (poly Ethylene-glykole)، یا به اختصار PEG شوک حرارتی یا شوک الکتریکی (electroporation) میزان بازدهی را افزایش می‌دهند و به این ترتیب درصد بالایی از پروتوپلاست‌ها را پذیرای DNA جدید و بیگانه می‌نمایند[15,20,22].

گام بعد به دست‌آوردن گیاه کامل از پروتوپلاست است. تک لپه‌ایها در این مرحله نیز با مشکل روبروهستند[23]. ولی با عنایت به پیشرفتهایی که چندی پیش در موردبرنج بدست آمد و توانست این گیاه را از پروتوپلاست به گیاه کامل تبدیل کند، می‌توان نسبت به رفع موانع موجود خوشبین بود[24,25,26].

در چند سال اخیر فنون و روشهای لازم برای انتقال ژن به گیاهان به صورت شگفت‌انگیزی پیشرفت کرده‌اند[27]. می‌توان امیدوار بود که در چند سال آینده سرسخت‌ترین تک‌لپه‌ایها نیز روش‌های کلون سازی را بپذیرند، به این ترتیب زیست‌شناسی مولکولی گیاهان به سرعت پیش می‌رود تا شکافی را که از سالها قبل با پیشرفتهای موجود در زمینه جانوری داشته است، پرکند.

خلاصه کنیم: پیشرفتهای عظیم به دست آمده در دانش و فن مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، به روشنی بیش از هر عامل دیگری سیمای زیست شناسی را متحوّل ساخته است. و در زمینه‌هایی مانند استخراج ژنهای موردنظر و انتقال آن به درون سلول مناسب، پیشرفته‌ترین روشها و فنون را به دست داده است. و نیز در قلمروهای وسیع مهندسی ژنتیک در گیاهان، جایگاه کنونی آن، محدودیتها و کاربردهای آن پژوهشهای پردامنه‌ای - که به طور روزانه افزایش می‌یابد - در جریان است. نظری گذرا بر انبوه مقالات قابل توجه علمی - پژوهشی و مروری [13,28,29]، گواه آشکاری بر اهمیت حیاتی و استراتژیک آن است.

با اندکی تأمل در دستاوردهای حاصله و نگاهی بر چشم انداز آن، انتظار می‌رود که در چند سال آینده به طور فزاینده‌ای شاهد تولید فراورده‌های بی‌شمار این روش و فن بویژه محصولات غذایی و دارویی - که برای حیات انسانها اهمیّتی تعیین کننده دارند - باشیم. بنابراین، چنین دانش و فنی - البته به شرط استفادهٔ خردمندانه - از امیدهای جدی برای تأمین غذای ساکنان کرهٔ زمین به

حساب می‌آید و این اطمینان حاصل است که با سرمایه‌گذاریهای لازم در این میدان، در میان مدت و درازمدت صدها برابر سرمایه، سود نصیب گردد. امید آن است که به فضل الهی در کشور ما نیز - تا فرصتی باقی است - این پژوهشها، جایگاه واقعی خویش را بازیابد.

References

[1] Stachel, S.E. and zambryski, P.; Agrobacterium tumefaciens and the susceptile plant cell: A novel adaptation of extracellular recognition and DNA Conjugation; Cell, **47** (1986) 155-157.

[2] Winnacker, E.L.;From Genes to clones; Winheim(Germany) VCH Publisher, (1987) 397-418.

[3] Zambryski, P.;Basic processes underlying Agrobacterium Mediated DNA Transter to plant cells; Annu.Rev Genet, **22** (1988) 1-30.

[4] Zambryski, P. and Schell, j.; Transfer and function of T-DNA gene from Agrobacterium Ti and Ri plasmids in plants.; Cell, **56** (1989) 193-201.

[5] Douglas, C, J. et.al. Identification and Genetic analysis of an A.tumefaciens chromosomal virulence region; j. Becteriol, **161** (1985) 850-860.

[6] Stachel, A.D. et.al. Promoters of Agrobecterium tumefaciens Ti-Plasmid virulence genes. Nuc. Aci. Res, **14** (1896) 1355-1364.

[7] Engstrom, P. et.al.; Characterization of A. tumefaciens virulence protein induced by the plant factor Acetosyringone; J.Mol.Biol, **197** (1987) 635-645.

[8] Harven, M.J. et.al.; Overdrive is a T-region transter enhancer which stimulates T-strand production in Agrobcterium tumefaciens; Nuc. Aci Res, **15** (1987) 8983- 8997.

[9] Wang, K. et.al.; Site - specific nick in the T-DNA border sequence as a result of Agrobacterium vir gene expression; Science, **235** (1987) 587-591.

[10] Stachel, S.E. and Zambryski, P.; VirA and virG control the plant-induced activation of the T-DNA transfer process of A.tumefaciens; Cell, **46** (1986) 325-333.

[11] Mantis, N.J. and Winans, S.C.; The Agrobacterium - tumefaciens vir gene transcriptional activator virG is transcriptionally induced by acid PH and other stress stimuli; J. Bacteriol, **174** (1992) 1189-1196.

[12] Heinemann, J.A.; Genetics of gene transfer between species; TIG **7** (1991) 181-185.

[13] Koukolikova-N. and Hohn, B.; How does the T-DNA of Agrobacterium tumefaciens find its way into the plant cell nucleus?; Biochimie **75** (1993) 635-638.

[14] Walden, R. and Schell, J.; Tissue culture and the use of transgenic plants to study plant development; In Vitro Cell. Dev. Biol., **27** (1991) 1-10.

[15] Griesbach, R.J.; Chromosome-mediated transformation via microinjection; plant, Science, **50** (1987) 69-77.

[16] Glimelius, k. et.al.; Gene transfer via somatic hybridization in plant; TIBTECH, **9** (1991) 24-30.

[17] Crossway, A.; Microinjection of cells and protoplasts, springer-verlag; (1989) 228-239.

[18] Valvekens, D., Montagu, M. V., Lijsebettens, M.V.; Agrobacterium Tumefaciens - Mediated tranformation of Arabidopsis thaliana root explants by using Kanamycin Selection; Proc.Natl. acad. Sci. USA., **85** (1988) 5536-5540.

[19] Shah, D.M. et.al.; Engineering herbicide tolerance in transgenic plants; Science **233** (1986) 478-481.

[20] Wenzal, G.; Biotechnology in Agriculture; Biotechology, **6b** (1988) 772-796.

[21] Schuch, W.; Advances in plant Biotechnology and their implication for Forestry research; In Vitro cell. Dev. Bio, **127** (1991) 99-103.

[22] Venkateswarlu, K. and Nazar, R.N.; Evidence for T-DNA mediated Gene targeting to tobacco Chloroplasts; Bio/technology, **9** (1991) 1103-1105.

[23] Hooykaas, P.T.J. et.al.; Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with A. tumefaciens; Nature, **311** (1984) 763-764.

[24] Karcher, S.J.; Getting DNA into a cell: A survey of transformation methods; The Amenican Biology Teacher, **56** (1994), 14-19.

[25] Marx.J.L.; Foreign gene transferred into Maiz; Scienc, **240** (1988).; 145.

[26] Biswas, G.C.G. et.al.; Transgenic India rice (Oryza sativa L.) plant obtained by direct gene transfer to protoplast; J. of Biotechnology, **32** (1994) 1-10.

[27] Christou, P., Ford, T.L. and kofron, M.; The development of a variety-independent gene transfer method for rice (a review); TIBTECH, **10** (1992) 239-246.

[28] Balcellus, L. et.al.; Transposons as tools for the isolation of plant genes; TIBTECH, **9** (1991) 31-38.

[29] Gibson, S. and C.somervill; Isolating plant genes (a review); TIBTECH, **11** (1993) 306-313.