الفصل الثانى عشر

طرق التحول الوراثى: الاستراتيجيات والوسائل والتحديات

تمهيد

تعتمد عملية التحول الوراثى genetic transormation على كل من الـ recombinant DNA technology (الفصل الحادى عشر)، وطرق التحول الوراثى gene transfer methods (هذا الفصل)، وتقنيات مزارع الأنسجة (الفصول الأولى من الكتاب). ولقد أنتجت نباتات محولة وراثيًا فى أعداد كبيرة جدًا من الأنواع النباتية بهدف تحسينها، فيما أصبح يعرف باسم التربية بالجين الواحد single gene breeding، والتربية بالتحول الوراثى transgenic breeding.

متطلبات التعبير الجينى والتعرف على التحول الوراثى

لقد أظهر تركيب الجينات وطريقة فعلها على المستوى الجزيئ أن الجين الذى يُراد نقله لا يتكون فقط من الجزء الكودى coding region الذى يحدد ترتيب الأحماض الأمينية فى البروتين المنتج، ولكنه يتضمن – كذلك – تتابعات أخرى فى الدنا تحدد جزء النبات الذى يتأثر بهذا الجين، ووقت ومعدل إحداثه لهذا التأثير. تتوفر تلك المعلومات فى منطقة من الجين تعرف باسم الـ promoter region يوجد ضمنها تتابعات الـ enhancer التى تحدد النسيج الذى يظهر فيه تأثير الجين، ومرحلة التكوين الذى يظهر عندها فعله.

وعادة ما تعبر الـ promoters فى الجينات المتحصل عليها من مصادر غير نباتية .. عادة ما تعبر عن ذاتها بصورة ضعيفة للغاية فى النباتات؛ الأمر الذى يتطلب عزل promoters مناسبة لها. ويتوفر حاليًا عدد من تلك الـ promoters، التى أفادت كثيرًا

فى تحقيق التعبير الخاص بالجينات - المتحصل عليها من مصادر غير نباتية - فى النباتات

وحتى بعد إجراء عملية التحول الوراثى فإن الخلايا أو النباتات التى يتجدد نموها يتعين تقييمها وغربلتها للتعرف على النباتات التى تحولت وراثيًا وفصلها عن تلك التى بقيت على حالها. ويعد ارتباط الجين المنقول بمعلم يسهل التعرف عليه (يعرف باسم reporter gene) أمرًا ضروريًا لزيادة كفاءة عملية التقييم والتعرف على النباتات التى تحولت وراثيًا ويعنى ذلك أن التحول الوراثى لا يقتصر على الجين المعنى فقط (الـ structural gene)، وإنما يعتمد على نقل حزمة من تتابعات الدنا تعرف باسم gene construct تشفر لكل من الـ structural gene، وتعبيره الطبيعى، ووسيلة التعرف عليه.

تقنية شفرة الرنا العكسية

إن الفكرة من وراء استخدام تقنية الشفرة العكسية للرنا antisense RNA technology هى وقف فعل الجين وتبعًا لتلك التقنية يتم إنتاج رنا صناعى ذات تتابعات نيكليوتيدية معاكسة للترتيب الطبيعى لها فى الرنا الرسول للجين المراد إيقاف فعله فى النبات وعند تواجد هذا الرنا المعكوس والتحامه - كما هو متوقع - مع الرنا العادى غير المعكوس، فإن البروتين الذى يتحكم الجين فى إنتاجه لا يتم تمثيله. هذا علمًا بأن الهجين بين الرنا المعكوس والرنا الرسول الطبيعى قد يوقف مرور الرنا الرسول إلى السيتوبلازم، أو يزيد من إنتاج الرنا، أو يتعارض مع نقل الرنا الرسول للشفرة الوراثية، وبذا يتوقف فعل الرنا الرسول فى النبات (عن Mount & Berman ١٩٩٤).

ويستفاد من تقنية الرنا ذات الشفرة العكسية فى أمرين هامّين، هما. منع التعبير عن الجين كما أسلفنا بيانه، والتعرف على وظائف الجينات التى لا تعرف وظائفها.

ولقد كانت أولى استخدامات تقنية الرنا ذات الشفرة العكسية إنتاج طماطم يقل فيها التعبير عن الجين الذى يشفر لإنتاج الإنزيم polygalacturonase إلى ١٠٪ من مستواه الطبيعى، وهو الإنزيم المسئول عن فقد الثمار لصلابتها بعد اكتمال نضجها وأعقب ذلك

استخدام هذه التقنية فى إنتاج نباتات مقاومة للفيروسات، وذلك بتحويلها وراثيًا بالشفرة المضادة للجين المسئول عن تكاثر الفيرس المعنى.

إن أبسط طريقة لإنتاج رنا ذات شفرة عكسية anti-sense RNA لجين ما، هى باتباع الخطوات التالية:

١ - عزل الجين المرغوب فيه.

٢ - عزل تتابعات الشفرة الخاصة بالجين عن تلك الخاصة بالـ promoter الخاصة به، باستعمال إنزيمات القصّ restriction enzymes المناسبة.

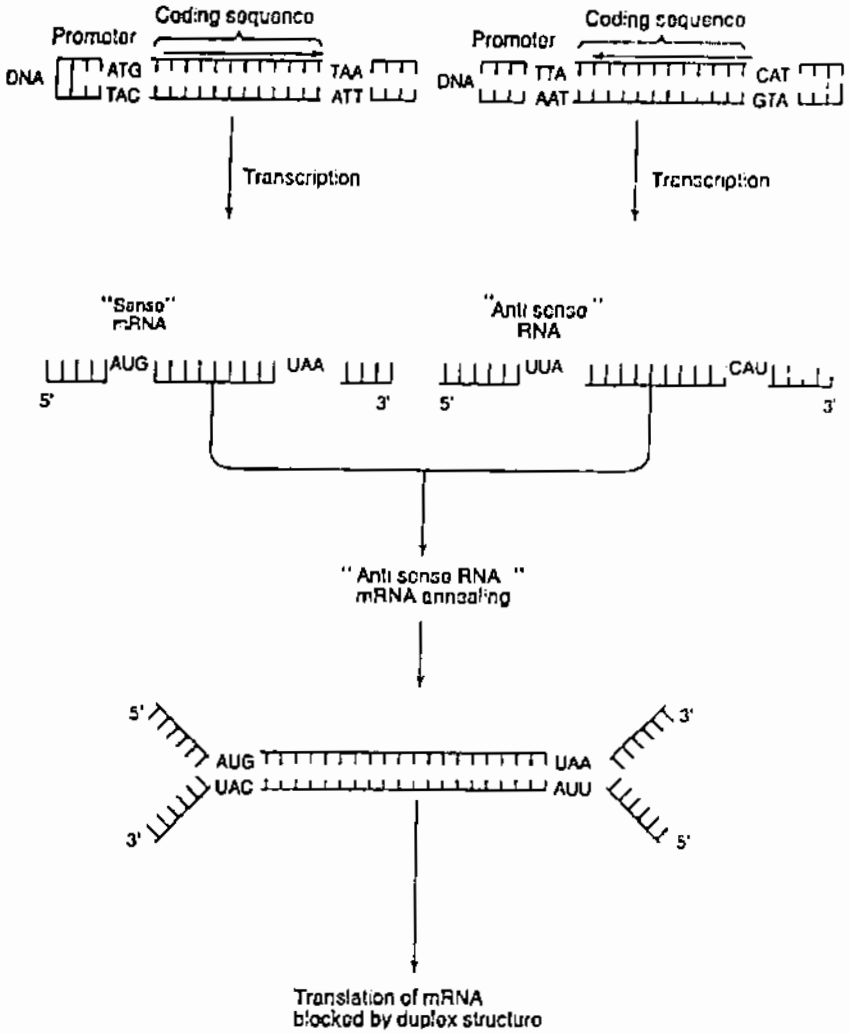
٣ - إعادة تتابعات الشفرة إلى الـ promoter الخاص بالجين فى وضع عكسى.

٤ - إدخال الـ promoter المتصل به الشفرة العكسية promoter/inverted coding sequence construct (وهو الجين ذات الشفرة العكسية antisense gene) فى خلية العائل أو الكائن الحىّ بطريق التحول الوراثى.

تكون نتيجة ذلك أن نسخ الـ promoter/inverted coding sequence يؤدى إلى إنتاج رنا ذات شفرة مضادة anti-sense RNA، تقوم بدورها بالتهجين بالرنا العادى sense RNA فى الخلايا (حيث يتكون خيط مزدوج للرنا RNA double helices)، ومن ثم تمنع ترجمة الرنا الرسول mRNAs (شكل ١٢-١). وتكون النتيجة النهائية لكل ذلك هى إما عدم تمثيل البروتين الخاص بالجين المعنى كلية، وإما تمثيله بكميات قليلة جدًا فى الخلايا المحتوية على الرنا ذات الشفرة المضادة. ولكى يكون وقف تمثيل البروتين الخاص بالجين تامًا يجب إما استعمال promoter قوى للغاية لكى يوجه عملية الاستنساخ فى تتابعات الشفرة المقلوبة، وإما التحويل الوراثى بعدة نسخ من الجين ذات الشفرة العكسية (عن Gardner وآخرين ١٩٩١).

طرق واستراتيجيات التحول الوراثى .. نظرة عامة

تعرف طريقتان رئيسيتان لنقل الجينات، هما: (١) بالاعتماد على ناقل vector-mediated، و(٢) النقل المباشر للجينات direct gene transfer، وتندرج تحت كل طريقة منها عدة وسائل، كما يلى:



شكل (١٢-١): تقنية الشفرة المعكوسة للرنا.

أولاً: الطرق التى تعتمد على ناقل vector

إن أكثر أنواع الناقلات vectors استعمالاً، ما يلى:

أولاً: عندما يكون العائل خلايا نباتية:

١ - ناقل بلازميدى، وفيه الحامض النووى دنا، ومن أمثلته الـ Ti plasmid الخاص بالبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*، وكذلك *A. rhizogens*.

٢ – ناقل فيروسي .. وفيه قد يكون الحامض النووى دنا، كما فى فيرس موزايك القنبيط، أو من الرنا، كما فى فيرس موزايك التبغ.

ثانيًا: عندما يكون العائل خلايا حيوانية:

١ – ناقل بلازميدى، وفيه الحامض النووى دنا، ويتوفر من تلك الناقلات عدة أنواع، الكثير منها هجن تحتوى على الجينوم SV40.

٢ – ناقل فيروسى، وفيه قد يكون الحامض النووى دنا، كما فى كل مما يلى:

Baculoviruses

Papilloma viruses

Simian virus 40(SV40)

Vaccinia virus

وقد يكون الحامض النووى رنا، كما فى الـ Retroviruses.

٣ – ناقل transposon، وفيه الحامض النووى دنا كما فى عناصر P (أو الـ P elements) فى الـ *Drosophila melanogaster*.

تستعمل الناقلات البلازميدية plasmid vectors فى عمليات التحول الوراثى لنقل الدنا الجديد أو الجينات الجديدة إلى العوائل، وتتوفر أنواع كثيرة من هذه البلازميدات فى الطبيعة، وجميعها جزيئات دنا حلقية وصغيرة نسبيًا. وعلى الرغم من أن تلك البلازميدات ليست حتمية لبقاء الكائن وانقسامه، فإنها تحتوى – غالبًا – على صفات قد تكسب الكائن ميزة انتخابية، مثل صفة المقاومة للمضادات الحيوية، وهى التى تستعمل – غالبًا – فى إنشاء الـ vectors فى دراسات الهندسة الوراثية، حيث توفر وسيلة مناسبة لانتخاب الخلايا المحتوية على البلازميد.

وقد تستخدم vectors عبارة عن فاجات بكتيرية bacteriophages للاستعمال مع البكتيريا، مثل *E. coli*، وهى على أنواع كثيرة (عن Nicholl ١٩٩٤).

وترتبط التحولات الوراثية التى تجرى بواسطة الناقلات vectors – بشدة – بقدرة النبات العائل على تجديد نفسه (تعتمد على الـ regeneration capabilities للنبات

المراد تحويله وراثيًا). وتتضمن الأجزاء النباتية explants التى تكون مستهدفة فى عملية التحول الوراثى باستعمال الناقلات كلا من البروتوبلاستات، والخلايا المعلقة، وتكتلات خلايا الكالس، وطبقات الخلايا، وشرائح الأنسجة، وحتى أجزاء من الأعضاء الكاملة. ويجب أن تكون الخلايا المستعملة فى التحول الوراثى قادرة على الدخول فى عملية انقسام الدنا، وهى التى تتوفر فى الخلايا المجروحة أو التى تعاود تميزها، أو البروتوبلاستات

ثانيًا: طرق النقل المباشر للجينات

إن من أهم طرق النقل المباشر للجينات Direct Gene Transfer ، ما يلى

Physico-chemical uptake of DNA

Liposome encapsulation

Electroporation of protoplasts

Microinjection

DNA injection into intact plants

Incubation of seeds with DNA

Pellen tube pathway

Laser microbeam

Electroporation into tissues/embryos

Silicon carbide fiber

Particle bombardment

متطلبات نجاح عملية التحول الوراثى

يتطلب نجاح إجراء عملية التحول الوراثى توفر الـ gene construct المناسب، ونقله إلى الخلايا النباتية، وظهور فعله، وتحديد النباتات التى تحولت وراثيًا

ويجب أن تتوفر فى طريقة التحول الوراثى المثلى لأى محصول الشروط التالية:

١ – أن يكون بالاستطاعة الحصول على أعداد كبيرة من النباتات المحولة وراثيًا، لأجل تقدير المستويات المفيدة للتعبير الجينى، ولأجل تقييم تأثير ظاهرة التأثير الموضعى position effect على التعبير الجينى.

٢ – سرعة الحصول على النباتات المحولة وراثيًا (أى سرعة تجديد نموها من المزارع)؛ لأجل تقليل التأثيرات غير المرغوب فيها لتباينات المزارع فى تلك التى تبقى لفترة طويلة قبل تجديد النمو منها، أو منع تلك التأثيرات كلية.

٣ – أن تكون طريقة التحول الوراثى صالحة لأى تركيب وراثى؛ لأجل استخدامها فى نقل الصفات الهامة إلى أى صنف مرغوب فيه (عن Christou ١٩٩٤)

ولقد أدى تطبيق تقنيات الدنا إلى التوسع فى القاعدة الوراثية للأنواع النباتية، نظرا لأن الجينات المنقولة قد تأتى من أنواع نباتية بعيدة كل البعد عن الأنواع المعنية، أو من فيروسات، أو بكتيريا، أو فطريات، أو حشرات، أو حيوانات أو من الإنسان، أو حتى من عمليات التخليق الكيميائى فى المختبر.

التربية بالتحول الوراثى

نظرًا لأن النباتات المحولة وراثيًا غالبًا ما تحتوى على عديد من نسخ الجين المنقول فى مواضع مختلفة من الهيئة الكروموسومية للنبات المحول – الأمر الذى قد يؤثر على الشكل المظهرى للنبات الناتج – فإنه قد يكون من المرغوب فيه إجراء عملية التحويل الوراثى على سلالات لم تصل بعد إلى نهاية برنامج التربية، وذلك لإتاحة الفرصة لحدوث الانعزالات المرغوب فيها فى نسخ الجين المنقول فيما تبقى من أجيال فى برنامج التربية وعلى الرغم من ذلك . فإن عمليات التحول الوراثى تجرى غالبًا على صفوة السلالات التى تنتج من برامج التربية (عن Block ١٩٩٣).

إن أهم جوانب التربية بالتحول الوراثى transgenic breeding، ما يلى:

١ – تقييم الجين المنقول:

يعد تقييم الجين المنقول transgene evaluation من أهم جوانب التربية بالتحول

الوراثي، ويمكن أن تتم تلك العملية على مستوى النبات الـ hemizygous، إلاّ أنها تؤخّر – غالبًا – لحين الوصول إلى حالة الأصالة الوراثية homozygosity. كما قد يجرى التقييم على المستوى الجزيئي، أو على مستوى الصفات المرغوب فيها. وعند وجود ارتباط قوى بين التعبير على المستوى الجزيئ ومستوى الصفات، فإن التقييم على المستوى الجزيئي يمكن أن يعطى نتائج سريعة، ويمكّن المربى من إجراء عملية الانتخاب في المراحل المبكرة هذا إلاّ أن مثل هذا الارتباط البسيط قد لا يتوفر فى حالات كثيرة

٢ – الانتخاب للجين المنقول

يعد الانتخاب للجين المنقول transgene selection ضروريًّا لتطوير الصفة المحولة وراثيًا. ولعل أهم عملية انتخاب هى تلك التى يتبين فيها ما إذا كانت النباتات التى أخضعت لعملية التحول الوراثى قد تلقت الجين المرغوب فيه، أم لا

يلى ذلك انتخاب النباتات المحولة وراثيًّا التى تظهر فيها وراثة مندلية للصفة لا تتأثر بالخلفية الوراثية للنبات أو بالعوامل البيئية، ولا تؤثر فيها الصفة المنقولة سلبيًّا على الصفات الأخرى الأصلية بالنبات (عن Zhong ٢٠٠١)

وبعد إنتاج النباتات المعدلة وراثيًّا مباشرة فإنها تُقيَّم أولاً معمليًا وفى حجرات النمو وفى الصوبات الآمنة – المعزولة جيدًا عما يوجد بخارجها – لتحديد طبيعة التعبير للجينات المنقولة، وما إذا كان الشكل المظهرى للنبات المحول وراثيًا فى الاتجاه المرغوب فيه أم لا. تقترن تلك الاختبارات – فى الوقت ذاته – بتحليل جزيئى لتحديد عدد نسخ الجين التى نقلت بالفعل، ومدى سلامة وكمال الدنا المنقول تنتخب – عادة – النباتات التى يثبت تلقيها لنسخة واحدة من الجين المنقول حتى يكون السلوك الوراثى لهذا الجين فى الأجيال التالية بسيطًا ومن الممكن التنبؤ به، كما يسمح ذلك بتجنب أى احتمال لحدوث تفاعلات بين النسخ المختلفة للجين المنقول إلى نفس النبات (عن Dale & Irwin ١٩٩٥)

التحول الوراثى عن طريق بكتيريا الأجروباكتيريم

تعد الأجروباكتيريم *Agrobacterium* من بكتيريا التربة السالبة لصبغة جرام، وهى