## تحديات التحول الوراثي والتعبير الجيني في النباتات المحولة وراثيًا

إن المتطلب الأساسي لنجاح أي عملية تحول وراثي هو ثبات التعبير عن الجين المنقول، الأمر الذي يعتمد على عديد من العوامل، منها ما يلي:

١ – عدد نسخ الجين المنقول وتركيبها.

٢ – المنطقة الكروموسومية التي حدث فيها اندماج للجين المنقول.

٣ – التركيب الكروماتيني لتلك المناطق الكروموسومية وحالة الـ methylation بها

٤ – قوة وخصوصية الـ promoter المصاحب للجين

٥ – أجزاء الدنا المنقول التي يمكن أن تصبح تتابعات ممكنة لحدوث الـ methylation، أو لزيادة تحلل الرنا الرسول (عن Meyer ١٩٩٥).

إن الجينات المنقولة بطرق الهندسة الوراثية قد تُظهر انعزالات مندلية وقد لا تُظهر، وقد يتأثر التعبير الخاص بها بموقع اندماجها في جينوم النبات المحول وراثيًا، وبتركيب الدنا المنقول. وقد تصبح الجينات المنقولة غير ثابتة عبر الأجيال، وحسب الخلفية الوراثية للنبات المحول وراثيًا، والظروف البيئية، وقد يكون لها تأثيرات سلبية معنوية على الجينات الأخرى الأصلية في النبات (عن Zhong ٢٠٠١).

هذا .. ولا تتوفر إلى الآن وسيلة لضبط عملية التحول الوراثي في أجزاء معينة من الهيئة الكروموسومية للنبات المحول؛ فالمسألة كلها اعتباطية، حيث ينتهي الجين المنقول في أي موضع من أي كروموسوم؛ الأمر الذي يترتب عليه ظهور حالات عديدة للتأثير الموضعي position offect.

فمثلاً . إذا حدث اندماج للجين المنقول في موضع لا يسمح فيه تركيب الكروماتين بعملية الاستنساخ فإنه يبقى دونما تعبير، أي يبقى silent.

كذلك قد تسمح الاختلافات الموضعية في تركيب الكروماتين للـ reporter gene بالتعبير عن ذاته بينما لا تسمح بذلك للجينات الخرى المجاورة له في الـ gene construct، بما في ذلك الجين المنقول (عن Kahl وآخرين ١٩٩٤).

وقد تناول Finnegan & McElroy (١٩٩٤) بالشرح الوسائل التي "تحارب" بها

النباتات الجينات الدخيلة المنقولة إليها بطرق الهندسة الوراثية وتوقف نشاطها – الأمر الذى يحدث فى أحيان كثيرة – مع التركيز على كل من حالات: الـ DNA methylation، والـ trans-inactivation، والـ co-suppression.

## التعبير الجينى المؤقت والتعبير الدائم فى النباتات المحولة وراثياً

بعد النقل الناجح لجين غريب إلى النوع المراد تحويله وراثيًا، فإنه ليس من الضرورى أن يندمج هذا الجين دائمًا مع جينوم الخلايا المتلقية له. وفى تلك الحالات فإن الجين المنقول لا يعبر عن ذاته إلاّ بصورة مؤقتة، حيث تتناقص قدرته على التعبير بصورة تدريجية إلى أن تختفى فى نهاية الأمر. وبطبيعة الحال فإن تلك الحالة لا يكون مرغوبًا فيها فى عمليات التحول الوراثى. وتفيد الاختبارات التى تجرى بعد ٢٤–٤٨ ساعة من نقل الدنا الخاص بالـ reporter genes فى التقييم السريع لعملية التحول ومدى ملاءمة الـ plasmid constructs وقد أثبتت تلك الاختبارات – كذلك – أنها ذات فائدة كبيرة فى الحصول على معلومات بشأن وظائف الجينات ونظام عملها.

وعندما يندمج الجين المنقول بصورة ثابتة مع جينوم النوع المتلقى له وتعبيره عن ذاته بصورة دائمة وثابتة، فإن ذلك يطلق عليه اسم stable gene expression.

## توقف التعبير الجينى فى النباتات المحولة وراثياً

تُوَرَّث الجينات المنقولة – التى تدخل فى إندماج ثابت بجينوم النباتات المحولة وراثيًا – تُوَرَّث كأى صفة مندلية، ولكن يحدث فى كثير من الأحيان أن يضعف ظهور الصفة الجديدة المكتسبة بصورة تدريجية فى نسل النباتات المحولة وراثيًا جيلاً بعد جيل، علمًا بأن هذا الفقد فى التعبير الجينى – والذى يطلق عليه اسم gene silencing – لا يتضمن فقدًا لهذا الجين، وإنما مجرد حدوث وقف لنشاطه.

**ومن أهم مسببات توقف نشاط الجينات المنقولة، ما يلى:**

١ – حدوث مثلمة methylation لتتابعات الدنا.

٢ – العوامل البيئية.

٣ – التثبيط الناشئ عن نقل عدة نسخ من الجين المنقول.

٤ – تلف الكروموبلاستيدات، فيما يعرف باسم transinactivation.

هذا . وقد يحدث التوقف للتعبير الجيني أثناء الاستنساخ transcriptional silencing، أو بعده post-transcriptional silencing

يحدث التوقف أثناء الاستنساخ نتيجة لحدوث مثلمة methylation للـ promotor region الخاصة بالجين ويؤدى إدخال عدة نسخ من الجين أثناء عملية التحول الوراثى إلى حدوث مثلمة زائدة. وقد يحدث الاندماج للجين المنقول فى مناطق من الكروموسوم تكثر فيها المثلمة بشدة

أما توقف الفعل الجيني الذى يحدث بعد الاستنساخ فإنه يحدث نتيجة للمثلمة فى منطقة الشفرة الوراثية، ولكنه لا يؤثر مباشرة على عملية الاستنساخ.

ويمكن الحصول على تعبير ثابت وعند المستوى المرغوب فيه من خلال برنامج للتربية تنتخب فيه عشائر جديدة بالصفات المرغوبة بعد تهجين عدة سلالات محولة وراثيًا (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)

يبدو أن التباينات المظهرية ووقف الفعل الجيني gene silencing – للجين المنقول – فى النباتات المحولة وراثيًا . يبدو أنها تُحَفَّز بظروف مزارع الأنسجة التى تجرى فيها عمليات التحول الوراثى، كما يبدو أنها تعتمد – جزئيًا على الأقل – على كل من المحفز (الـ promoter)، والـ coding region وقد يؤدى التماثل homology بين أجزاء من الجين المنقول وجينات أخرى فى الهيئة الوراثية للنبات الذى يُراد تحويله وراثيًا .. قد يؤدى إلى وقف فعل الجين المنقول وحده أو حتى – كذلك – وقف فعل الجين المماثل له جزئيًا فى النبات. ويمكن أن يتغير وقف الفعل الجينى خلال مختلف مراحل النمو بعد الإنبات. كما يمكن أن يتحور بعوامل بيئية غير محددة وجدير بالذكر أن كثيرًا من حالات وقف الفعل الجينى يمكن أن تنعكس، مما يؤدى إلى حدوث الفعل الجينى.

وكما أسلفنا بيانه .. فإنه يميز بين نوعين من وقف الفعل الجينى أثناء النسخ الجينى transcriptional، وبعد النسخ post-transcriptional ويفترض أن وقف الفعل

الجينى أثناء النسخ يرتبط بقرب الجين المنقول من منطقة غير نشطة أصلاً من الكروموسوم، وليس مع مقدار الرنا الذى يتم تجهيزه، حيث قد تمتد عمليات المثلمة من تلك الجينات الموقوف عملها أصلاً إلى الجينات المنقولة ضمن منطقتها. أما فى حالات وقف الفعل الجينى بعد النسخ فإن الرنا يُنتج بالمستويات المتوقعة، ولكنه لا ينتقل إلى حيث يؤدى عمله، أو قد ينتقل ولكنه يتحلل سريعًا فى السيتوبلازم (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

إن من أهم الظواهر التى ترتبط بتعطيل عمل الجينات gene silencing هى أن هذا التعطيل يرتبط بدرجة التغير فى موقع الجين من الكروموسوم؛ فنجد أن الجينات التى توجد فى مواقعها الأصلية تكون أقل عرضة للتعطيل عن تلك التى تكون قد دمجت عشوائيًا فى عائل جديد، أو انتقلت إلى جوار منطقة كروماتين خامل heterochromatin، أو إلى منطقة يوجد بها مثلمة شديدة (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

تنتج الجينات المعطلة عن العمل (الصامتة) silent genes قدرًا من الرنا أقل من المتوقع، أو لا تنتجه على الإطلاق، وقد تنتجه فى بعض الخلايا دون غيرها. وفى بعض الأحيان يتوقف النسخ حينما تدمج فى الجينوم نسخة أخرى من الجين أو جزءًا منه.

وفى حالات أخرى يرتبط مستوى النسخ - أو يُفترض ارتباطه - مع قرب الجين المنقول من منطقة من الكروموسوم تكون صامتة بطبيعتها.

كذلك يعتقد على نطاق واسع أن دمج الجين المنقول فى منطقة من الكروموسوم ممثلمة methylated بشدة - أو قريبًا منها - يؤدى إلى ضعف الاستنساخ الجينى.

وفى أحيان كثيرة يبدأ الجين المنقول فى التعبير عن ذاته بصورة عادية، ثم يتوقف التعبير بعد نحو ٢-٧ أسابيع من إنبات البذور، كما لو كانت كميات الرنا الرسول أو البروتين المخلق المسئول عنهما الجين المنقول .. كما لو كانت قد تجاوزت حدود قدرات النمو الطبيعى. وفى أحيان أخرى كثيرة يستمر استنساخ تلك الجينات - التى تكون صامتة مظهريًا (أى لا تعبر عن ذاتها) - يستمر استنساخها فى النواة، ولكن لا يصل إلى السيتوبلازم سوى القليل جدًا من الرنا الرسول (عن Caplan وآخرين ١٩٩٨).

## الدنا المتحرك ودوره فى وقف التعبير الجينى

تحدث بعض التغيرات الكروموسومية وعدم الثبات الوراثى فى الهيئة الكروموسومية بفعل عديد من حالات إعادة التوزيع وإعادة الترتيب الكروموسومى وكذلك حالات الطفرات وتحدث تلك التغيرات الطفرية وإعادة الترتيب للدنا - خاصة - بواسطة دنا متحرك يورث مع الجينوم، مثل البلازميدات plasmids (فى البكتيريا وعضيات الخلية)، والفيرونات virons، والترانسبوزونات transposons، وتشترك جميع نوعيات الدنا المتحرك فى بعض الصفات المشتركة

يُطلق على الترانسبوزونات transposons (وهى الـ transposable elements) - كذلك - اسم الجينات القافزة jumping genes، وهى قطع دنا محددة قادرة على الانتقال مباشرة إلى مواضع أخرى من الهيئة الكروموسومية وتعد تلك التغيرات فى المواقع - بطبيعتها - حالات نادرة ولكن يمكن أن يزداد معدل الانتقالات بصورة درامية، وخاصة حينما يتعرض النبات لعوامل مطفرة أو لعوامل الشدِّ البيئى. وعلى خلاف الطفرات العادية .. فإن نشاط الترانسبوزونات يؤثر على جزء كبير من الجينوم

تقود حركة العناصر المتحركة إلى إحداث نوعيات مختلفة من الطفرات، منها الإيلاج أو الإقحام insertion، والاقتضابات deletions، والازدواجات duplications، والانقلابات inversions، والانتقالات translocations، وإعادة الترتيب rearrangements فى التسلسل الجينى

ويمكن للترانسبوزونات أن تعدل من نشاط الجينات أو تتحكم فى وظائفها بالسماح لها بالتعبير أو بوقف نشاطها، كما يمكن لها أن تغير من وظائف الجينات نتيجة لوضعها فى مواضع تنظيمية جديدة

ولقد أمكن التعرف على العناصر المتنقلة تلك فى كل الكائنات الحية التى بحث فيها عنها، وهى يمكن أن تحتل ما بين ٥٪، و ٢٠٪ من الهيئة الوراثية للفرد، وكان أول ملاحظة لها فى الذرة بواسطة باربرا ماكلنتوك Barbara McClintock فى عام ١٩٤٨، وأطلقت عليها حينئذ - اسم العناصر المتحكمة controlling elements بسبب تأثيرها الواضح فى التعبير الجينى

وبعد نحو ٤٠ عامًا من اكتشاف ماكلينتوك لتلك العناصر أمكن عزل أول عنصر منها من نبات الذرة، وأطلق عليه اسم المُنشِّط activator، وتم تعريفه على المستوى الجزيئ. وكانت عناصر مماثلة قد اكتشفت فى البكتيريا فى الستينيات من القرن الماضى، وتتابع بعد ذلك اكتشاف العناصر المتنقلة فى عدد من الكائنات مثل الفطريات (الخميرة) وحشرة الدروسوفيلا، والإنسان. ويعتقد الآن - على نطاق واسع - أن هذه العناصر المتنقلة تلعب دورًا أساسيًّا فى التطور الجينومى.

تعرف أبسط أنواع الترانسبوزونات transposones باسم insertion sequences، ورغم توفرها فى كل الكائنات الحية، فإنها درست جيدًا - خاصة - فى البكتيريا. وكل واحدة من الـ insertion sequences تختلف فى ترتيب الدنا فيها (تختلف فى الـ sequence) عن غيرها، إلاّ أنها تشترك جميعها فى صفات تركيبية مشتركة.

وتنتشر الترانسبوزونات فى البكتيريا، والحيوانات، والنباتات.

أما النوع الثالث من الترانسبوزونات فإنها تسمى transposable virons، وهى تصيب العائل القابل للإصابة بحقن ما بها من دنا فيروسى مكتمل التكوين وما يرتبط به من بروتينات داخل الخلية.

إن الترانسبوززنات تتواجد فى كثير من الأنواع النباتية، لكن الجينات القافزة لم تعرف بالتفصيل سوى فى أنواع نباتية قليلة، منها: الذرة، وحنك السبع، والتبغ، والشعير.

ومن بين عائلات العناصر المتحركة التى دُرست تفصيليًّا فى الذرة ما يلى:

Activator / Dissociation (Ac/Ds)

Suppressor/Mutator (Enhancer/Inhibitor, En/Spm)

Mutator (Mu)

وتعد العائلة الأولى (Ac/Ds) هى الأكثر تعريفًا ودراسة.

وقد استخدمت تلك الترانسبوزونات فى تعليم عديد من جينات الذرة، وحدث الأمر ذاته بالنسبة للأنواع الأخرى التى درست فيها الترانسبوزونات.

وترجع أهمية الترانسبوزونات بالنسبة للهندسة الوراثية إلى أنها تفيد فى تعليم وتحديد الجينات التى يرغب فى عزلها ونقلها من الكائن الحىّ الذى توجد فيه إلى كائن آخر بطرق الهندسة الوراثية، وكذلك فى تعليمها للجينات الهامة فى أنواع نباتية أخرى لم تُعَرَّف فيها - بعد - جيدًا - عناصر متنقلة.

ومن بين الجينات التى أمكن تعليمها تلك المبينة فى جداول (١٢-٨، و ١٢-٩، و ١٢-١٠).

تعرف الرتروترانسبوزونات retrotransposon بأنها دنا متحرك ينتشر فى كل الهيئة الكروموسومية للنبات من خلال وسائط من الرنا، وهى أكثر العناصر المتحركة انتشارًا فى النباتات. وربما يكون لها دور فى نقل المادة الوراثية من موقع لآخر، فيما يعرف باسم transduction (عن Frahm وآخرين ١٩٩٨).

جدول (١٢-٨): عينة من العناصر المتحركة **transposable elements** التى تعرف فى عدد من المحاصيل الهامة.

| النوع النباتى | العنصر المتحرك |
|---|---|
| *Antirrhinum majus* | *Tam1* |
| | *Tam2* |
| | *Tam3* |
| | *Tam7, Tam9* |
| *Arabidopsis thaliana* | *Ta1* |
| | *Ta1, Ta2, Ta3* |
| | *Tag1* |
| | *Tat1* |
| *Nicotiana alata* | *Tna1* |
| *Nicotiana plumbaginifolia* | *Tnp1* |
| *Nicotiana tabacum* | *Tnt1* |
| | *Tto1* |
| | *Npg1* |
| *Petunia hybrida* | *Act1* |
| | *dTph1* |
| | *dTph1-3; dTph4* |

تابع جدول (١٢-٨).

| النوع النباتى | العنصر المتحرك |
|---|---|
| *Zea mays* | *Ac/Ds* |
| | *Bg/rbg* |
| | *Bs17* |
| | *B5* |
| | *Cin1* |
| | *Cin4* |
| | *Cy* |
| | *Dt* |
| | *En/Spm* |
| | *Mu, Mu1* |
| | *retro* |
| | *rDt* |
| | *Stonor* |
| | *Uq* |
| | *Tourist-Zm1* |

جدول (١٢-٩): جينات الذرة التى تم تعليمها بالعناصر المتحركة transposable elements.

| رمز الجين | اسم الجين | العنصر المتحرك |
|---|---|---|
| *a 1* | Anthocyaninless 1 | *dSpm* |
| | | *Dt/rDr* |
| | | *En* |
| *a 2* | Anthocyaninless 2 | *cy/rcy: Mu7* |
| | | *dSpm* |
| | | *En* |
| | | *Mu 1* |
| *adh 1* | alcohol dehydrogrogenase 1 | *BS 1* |
| | | *Ds* |
| | | *Mu* |
| *ae 1* | amylose extender 1 | *Mu 1* |
| *an 1* | anther ear 1 | *Mu 2* |
| *b 1* | coloured plant 1 | *Ds* |
| *bt 1* | brittle endosperm 1 | *dSpm* |

تابع جدول (١٢-٩).

| رمز الجين | اسم الجين | العنصر المتحرك |
|---|---|---|
| | | *Mu* |
| *bz 1* | bronze 1 | *Ac* |
| | | *Ds* |
| | | *dSpm* |
| | | *Mu1* |
| *bz 2* | bronze 2 | *Ds* |
| | | *Mu* |
| | | *Mu1 Mu9* |
| *c 1* | coloured aleurone 1 | *Ds* |
| | | *dSpm* |
| | | *En* |
| *c 2* | colourless 2 | *En/Spm* |
| | | *En* |
| | | *Mu 1* |
| | | *Mp 1* |
| *cps 1* | chloroplast protein synthesis 1 | *Mu* |
| *cps 2* | chloroplast protein synthesis 2 | *Mu* |
| *d 3* | dwarf plant 3 | *Mu 8* |
| *g 2* | golden plant 2 | *dSpm* |
| *gl 1* | glossy 1 | *Mu 1* |
| *gl 8* | glossy 8 | *Mu 8* |
| *gl 15* | glossy 15 | *dSpm* |
| *hcf 106* | High chlorophyll fluorescence | *Mu 1* |
| *hm 1* | helminthosporium carbonum | *dHbr* |
| | susceptibility 1 | *Mu 1* |
| | | *Mu 3* |
| | | *dSpm* |
| *id* | indeterminate growth 1 | *Ds* |
| *ij 1* | iojap striping 1 | *Ds* |
| | | *Mu 1* |
| *Les -j2552* | Lesion -j2552 | *Mu 1* |
| *kn 1* | knotted 1 | *Ds* |
| | | *Mu 1* |
| *lg 2* | ligule-less 2 | *Mu 8* |
| *lg 3* | ligule-less 3 | *Mu* |
| *lls 1* | lethal leaf spot 1 | *Mu 1* |

تابع جدول (١٢-٩).

| رمز الجين | اسم الجين | العنصر المتحرك |
|---|---|---|
| *ms 45* | male sterile 45 | *Ac* |
| *o 2* | opaque endosperm 2 | *Ac* |
| | | *Bg* |
| | | *Ds* |
| | | *En/Spm* |
| *p 1* | pericarp colour 1 | *Ac* |
| *pr 1* | red aleurone 1 | *Ac* |
| *ps 1* | pink scutellum 1 | *Ac* |
| *Py1-tan* | pigmy plant 1 | *Mu* |
| *r 1* | coloured 1 | *Ds* |
| *ren 2* | reduced endosperm | *Mu* |
| *ren 3* | reduced endosperm 3 | *Mu* |
| *rf 2* | restorer of fertility 2 | *Mu* |
| | | *Spm/En* |
| *rs 1* | rough sheath 1 | *Mu 6/7* |
| *sh 1* | shrunken 1 | *Ds* |
| | | *Tourist A* |
| *sh 2* | shrunken 2 | *Ds* |
| | | *Ils 1* |
| *su 1* | sugary 1 | *Mu 1* |
| *te 1* | terminal ear 1 | *Mu 8* |
| *ts* | tassel seed 2 | *Ac* |
| *vp 1* | viviparous | *Mu* |
| *wx 1* | waxy 1 | *Ac* |
| | | *Bg* |
| | | *Ds* |
| | | *En/Spm* |
| | | *dSon* |
| | | *Mu 8* |
| | | *magellan* |
| | | *Retro trans* |
| | | *Hopscotch* |
| | | *Tourist A* |
| | | *Stonor* |
| *y 1* | white 1 | *Mu* |

جدول (١٢-١٠): جينات أمكن التعرف عليها بواسطة العناصر المتحركة transposable element فى نباتات متنوعة (عن Frahm وآخرين ١٩٩٨).

| العنصر المتحرك | الجين | النوع النباتى |
|---|---|---|
| *DS* | *dlb 3* | *Arabidopsis thaliana* |
| *Ac* | *dif, b-p2-1, eleAc* | |
| *Ds* | *drl1* | |
| *Ac* | *fae1* | |
| *Ds* | *lrp1* | |
| *En* | *ms2* | |
| *Ac/Ds* | *prl* | |
| *Ds* | *ssr16* | |
| *Ds* | *tiny* | |
| *Ac/Ds* | | |
| *Ac* | *l6* | *Linum usitatissimum* |
| *Ds* | *cf-9* | *Lycopersicon esculentum* |
| *Ac/Ds* | *fcebly* | |
| *Ac* | *aba2* | *Nicotiana plumbaginifolia* |
| *Ac* | *n* | *Nicotiana tabacum* |
| *Ac* | *ph6* | *Petunia hybrida* |