الفصل التاسع عشر

الهندسة الوراثية للتحكم فى نمو وتطور النباتات ولأهــداف أخــرى زراعية وبيئية و ـبية وصناعية

نستعرض فى هذا الفصل جهود الهندسة الوراثية التى بذلت لأجل تحقيق أهداف زراعية أخرى - غير تلك التى أسلفنا بيانها فى الفصول السابقة - مثل التحكم فى نمو وتطور النباتات، وكذلك الجهود التى استهدفت تحويل بعض النباتات والكائنات الدقيقة وراثيًا لخدمة أغراض بيئية، وطبية، وصناعية.

التحول الوراثى لأجل التحكم فى نمو وتطور النباتات

التحكم فى تمثيل الهرمونات النباتية

غنى عن البيان أن الهرمونات النباتية الطبيعية هى المسئول الأول عن تنظيم عمليات النمو والتطور الطبيعية، وأن أى تحولات وراثية تؤدى إلى زيادة تمثيل أى منها - أو الحد منها - يترتب عليها تغيرات كبيرة فى النمو والتطور النباتى الطبيعيين.

ولقد تمكن الباحثون من تحديد هوية عديد من الجينات التى تؤثر فى إنتاج الهرمونات النباتية وعزلها واستخدامها فى عمليات التحول الوراثى. ويبين جدول (١٩-١) قائمة بتلك الجينات، ومصادرها، ونشاطها الإنزيمى، وتأثيراتها على مختلف الهرمونات سلبًا أو إيجابًا.

وقد قدمنا فى الفصل الثامن عشر عديدًا من الأمثلة على التحكم فى إنتاج الإثيلين بهدف زيادة قدرة الثمار والأزهار على الاحتفاظ بجودتها بعد القطف.

ونقدم فيما يلى - مزيدًا من الأمثلة على التحكم فى تمثيل الهرمونات، وما يستتبع ذلك من تغيرات:

● قام الباحثون بتعديل نظام التعبير عن السيتوكينين فى النبات، وهو الهرمون الذى

جدول (١٩–١) الجينات التي استخدمت في عمليات التحول الوراثي للتحكم في إنتاج الهرمونات النباتية الطبيعية (عن Herbers & Sonnewald ١٩٩٨)

الهرمون	الجين	تأثير الجين على الهرمون	النشاط الإنزيمي
ABA	Anti-ABA antibodies	تثبيط فعل الهرمون	Binding of single chain antibodies to ABA
Auxin	*Pseudomonas syringae iaa*L	وقف نشاط الهرمون	Conjugates IAA to Lys
	Arabidopsis nitrilase II	زيادة تمثيل الهرمون	Converts indole-3-acetonitrile to IAA
	*A. tumefaciens iaa*M	زيادة تمثيل الهرمون	Converts Trp to IAM
	*A. tumefaciens iaa*M + *iaa*H	زيادة تمثيل الهرمون	Converts Trp to IAM
	*A. rhizogenes rol*B	زيادة الحساسية للهرمون	Hydrolyses indoxyl glucosides (in vitro)
Cytokinin	*A. tumefaciens ipt*	وقف نشاط الهرمون	Condensates IP-PP to AMP
	*A. rhizogenes rol*C	تغيير شامل في الهرمون	Hydrolyses cytokinin glucosides (in vitro)
Ethylene	*Pseudomonas* ACC deaminase	تثبيط تمثيل الهرمون بتغيير المسار	Converts ACC to a-ketobutyric acid
	Tomato ACC oxidase	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Blocks conversion of ACC to ethylene
	Tomato ACC synthase	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Blocks conversion from SAM to ACC
	T3 SAM hydrolase	تثبيط فعل الهرمون	Converts SAM to MTA and homoserine
Jasmonic acid	Flax aos	زيادة تمثيل الهرمون	Converts hydroperoxide to allene epoxide
	Arabidopsis LOX II	التثبيط المشترك Co-suppression	Reduced formation of jasmonic acid
Salicylic acid	*Pseudomonas putida nah*G	وقف نشاط الهرمون	Hydroxylates salicylic acid to catechol
systemin	Tomato prosystemin	منع تمثيل الهرمون بالشفرة العكسية	Reduced formation of systemin
	Tomato prosystemin	زيادة التعبير عن الهرمون	Increased formation of systemin

ABA, abscisic acid; ACC, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid; AMP, adenosine monophosphate; aos, allene oxide synthase; IAA, indole-3-acetic acid, iaaH, indoleacetamide hydrolase; iaaL, indoleacetic acid-lysine synthetase; iaaM, tryptophan monooxygenase; IAM, indoleacetamide; IP-PP, isopentenyl pyrophosphate; ipt, isopentenyltransferase; LOX, lipoxygenase; Lys, lysine; MTA, methylthioadenosine; SAM, S-adenosyl methionine; Trp, tryptophan.

يعتقد بأنه يلعب دورًا فى تحفيز تجميع المركبات الأيضية فى الأنسجة الحديثة التى لها صلة بعملية التكاثر الجنسى، مثل الثمار. ومن المعروف أن الإنزيم isopentenyl transferase يقوم بتكوين بادئ السيتوكينين isopentemyl AMP من سلسلة فرعية فى المسار الكاروتينى ولقد قام الباحثون بربط جين الـ isopentenyl transferase (الذى يعطى الرمز ipt) مع promoter خاص بمبيض الزهرة فى الطماطم، مما أدى إلى زيادة مستويات السيتوكينين فى مبايض الأزهار، ومن ثم زيادة جاذبية الثمرة لنواتج البناء الضوئى من مواد كلية صلبة ذائبة، وزيادة فى نسبة ما تحتويه من سكريات إلى أحماض، إلاّ أن ذلك كان على حساب المحصول الكلى للثمار الحمراء، ومتوسط وزن الثمرة (Martineau وآخرون ١٩٩٥، وعن Wehling ٢٠٠٠).

• أمكن نقل جين الذرة UDPG-transferase إلى البطاطس، وأدت عملية التحول الوراثى تلك إلى زيادة تمثيل إندول حامض الخليك عما فى نباتات البطاطس غير المحولة وراثيًا، وإلى زيادة معدل استطالة النباتات وإنتاجيتها. ويبدو أن نقل الجينات التى تحسن من وضع الأوكسين فى النبات يؤدى إلى زيادة المستوى الطبيعى الأمثل من الأوكسين إلى حدٍ أعلى (Rekolavskaya وآخرون ١٩٩٩)

• أدى تحويل الطماطم وراثيًا بالشفرة المعاكسة لجين الـ ACC oxidase إلى تثبيط فعل هذا الإنزيم ووقف إنتاج الإثيلين، مما أدى إلى تأخير شيخوخة الأوراق لبعض الوقت، ولكنها لم تبق خضراء اللون بصورة دائمة، فما أن بدأت فيها مرحلة الشيخوخة حتى استمرت بصورة طبيعية (John وآخرون ١٩٩٥)

تحسين القدرة على البناء الضوئى

اتخذت جهود التحولات الوراثية لتحسين القدرة على البناء الضوئى اتجاهين، هما التأثير فى مسارات البناء الضوئى ذاتها، وتأخير شيخوخة الأوراق التى تقوم بعملية البناء الضوئى

التأثير فى مسارات البناء الضوئى

أمكن تحويل الطماطم وراثيًا بجين الذرة sucrose-phosphate synthase (اختصارًا SPS)، وأدى هذا التحول الوراثى إلى زيادة تمثيل الكربون إلى سكروز بنسبة ٥٠٪، وقلل من محددات عملية البناء الضوئى التى تحدث بفعل تراكم نواتج تلك العملية كذلك كانت النباتات المحولة وراثيًا أبكر فى الإزهار، وازداد عدد العناقيد الزهرية فيها جوهريًا عما كان عليه الحال فى النباتات العادية غير المحولة وراثيًا، عندما كان نموها فى تركيز ٣٥ أو ٦٥ باسكال من ثانى أكسيد الكربون وفى تركيز ٣٥ باسكال كان عدد الثمار الكلى فى النباتات المحولة وراثيًا ١,٥ مثل عدد الثمار فى نباتات الكنترول، وكان نضج ثمارها أسرع وازداد الوزن الجاف الكلى لثمارها بنسبة ٣٢٪ كذلك انخفض معدل إصابة ثمار النباتات المحولة وراثيًا بتعفن الطرف الزهرى (Micallef وآخرون ١٩٩٥)

وأمكن زيادة القدرة على البناء الضوئى فى الأرز (وهو نبات ذو مسار C3 فى البناء الضوئى) بتحويله وراثيًا بجينى الذرة (وهو نبات ذو مسار C4 فى البناء الضوئى). phosphoenolpyruvate carboxylase (اختصارًا PEPC)، و pyruvate orthophosphate dikinase (اختصارا PPDK) ولقد أظهرت النباتات المحولة وراثيًا – كذلك – مستوى أقل من التنفس الضوئى photorespiration، وتركيزًا أعلى من ثانى أكسيد الكربون بالأوراق (عن Zeigler ٢٠٠١)

تأخير شيخوخة الأوراق وسقوطها

اتجه تفكير الباحثين نحو إنتاج نباتات محولة وراثيًا تحتوى على الـ SAG12 promoter (وهو جين لا ينشط إلاّ مع بدء مرحلة الشيخوخة) مع جين الأجروباكتيريم ipt المسئول عن تمثيل السيتوكينين فمع بدء وصول الأوراق إلى مرحلة الشيخوخة يبدأ عمل الجين ipt، مما يؤدى إلى زيادة مستوى السيتوكينين بها، الأمر الذى يؤخر اكتمال الشيخوخة، فيستمر احتفاظ الأوراق بمحتواها الكلوروفيلّى، ومن ثم تستمر عملية البناء الضوئى هذا إلاّ أنه لا يعرف على وجه التحديد مدى نجاح تلك الاستراتيجية، إذ

إن النيتروجين الذى ينطلق من الأوراق التى تدخل فى مرحلة الشيخوخة يلزم فى عمليات حيوية أخرى، مما يجعل من غير المحتمل أن يكون بقاءه فى الأوراق مفيدًا

وفى منحىً آخر اتجه الباحثون نحو تأخير سقوط الأوراق؛ بهدف تمديد فترة الاستفادة منها. إن تكوين طبقة الانفصال التى تؤدى إلى سقوط الأعضاء النباتية تكون مصاحبة بتحلل للجدر الخلوية فى طبقة الخلايا التى يحدث عندها الانفصال. وفى الطماطم .. يرتبط الانفصال المستحث بواسطة الإثيلين بزيادة فى نشاط إنزيمى البولى جالاكتورونيز، والسليوليز (وهو: endo-β-1,4-D-glucanase). ولقد أمكن عزل جين من الطماطم يفترض أنه بولى جالاكتورونيز يُعبر عن ذاته أثناء عملية الانفصال، وأعطى الرمز pTAPGI. ويعتقد أن التعرف على هذا الجين وعزله يمثل أداة إضافية تساعد فى دراسة عملية الانفصال وما يحدث فيها بصورة أفضل (Kalaitzis وآخرون ١٩٩٥)

التحكم فى إنتاج الفيتوكروم

تتجه النباتات تحت تأثير الأشعة تحت الحمراء (الأمر الذى يحدث عندما تتعرض النباتات للتظليل من النباتات المجاورة لها) . تتجه نحو الاستطالة الكبيرة لتجنب التظليل ولقد تمكن العلماء من إنتاج نباتات تبغ محولة وراثيًّا يزداد فيها كثيرًا التعبير عن الجين المسئول عن تكوين الفيتوكروم أ phytochrome A الذى يقوم بتثبيط عملية تجنب الظل، أى يقوم بتثبيط استطالة النباتات فى ظروف الإضاءة الضعيفة. ولا شك أن هذا الجين يمكن أن يكون له دور كبير فى تطوير شتلات لا تستطيل سيقانها سريعًا فى المشاتل (وهو الأمر الذى يستلزم – أحيانًا – الحد من استطالتها بمعاملتها بمثبطات النمو)، وكذلك فى تطوير نباتات للزراعات المحمية – كالطماطم والخيار والفاصوليا – لا تستطيل سلامياتها بسرعة كبيرة؛ الأمر ذات الأهمية الاقتصادية الكبيرة فى الزراعات المحمية (عن Woodson ١٩٩٧).

وقد أثبت Jackson وآخرون (١٩٩٦) أن الفيتوكروم بى phytochrome B ينظم عملية تحكم فترة الإضاءة فى تكوين الدرنات فى البطاطس، وذلك من خلال تحويل البطاطس *Solanum tuberosum* subsp. *andigena* – التى تحتاج إلى نهار قصير لتكوين الدرنات

- تحويلها وراثيًا بالشفرة المضادة لجين الفيتوكروم بى antisense PHYB cDNA. أدى ذلك التحول الوراثى إلى إلغاء عملية تحكم الإضاءة فى تكوين الدرنات؛ حيث تكونت الدرنات فى النباتات التى حولت وراثيًا فى كل من النهار القصير، والنهار الطويل، والنهار القصير الذى قطع فيه الليل الطويل بإضاءة لفترة قصيرة. وتعنى تلك النتائج أن فيتوكروم بى يلزم لعملية تحكم فترة الإضاءة فى تكوين الدرنات فى *S. tuberosum* subsp. *andigena*، وأنه ينظم تلك العملية بمنع تكوين الدرنات فى الفترات الضوئية غير الحاثة لتكوين الدرنات، وليس بتحفيز تكوين الدرنات فى الفترات الضوئية الحاثة لذلك.

وأدى تحويل البطاطس وراثيًا بجين phytochrome B المتحصل عليه من نبات *Arabidopsis thaliana* إلى زيادة التعبير عن الفيتوكروم بى، الذى أحدث - بدوره - عدة تأثيرات، مثل قصر النمو إلى درجة قريبة من التقزم، وضعف السيادة القمية، وزيادة عدد الأوراق الصغيرة السميكة، وزيادة تواجد الصبغات. وبسبب زيادة الكلوروبلاستيدات الخضراء فى خلايا النسيج العمادى للنباتات المحولة وراثيًا ازداد البناء الضوئى فى وحدة المساحة من الورقة وفى النبات ككل. كما كانت عملية البناء الضوئى أقل حساسية للتثبيط الضوئى فى ظروف الشدّ الضوئى لفترة طويلة. وبينما لم تتأخر بداية مرحلة الشيخوخة فى النباتات المحولة وراثيًا، فإن إبطاء تحلل الكلوروفيل أدى إلى إطالة فترة حياة النباتات النشطة فى عملية البناء الضوئى. وقد أدى كلا الأمرين (زيادة القدرة على البناء الضوئى وطول فترة حياة النبات) إلى زيادة إنتاج المادة العضوية؛ مما أحدث زيادة فى نمو الأجزاء تحت الأرضية والمحصول (Thiele وآخرون ١٩٩٩).

منع التلون البنى الإنزيمى

يعد التلون البنى الإنزيمى فى درنات البطاطس بعد الحصاد مشكلة هامّة. ولقد وجد أن تثبيط إنزيم البولى فينول أوكسيديز (الـ catechol oxidase) بالتحول الوراثى بالشفرة المعاكسة للإنزيم يوقف عملية التلون البنى الإنزيمى تلك فى سلالات البطاطس المحولة

وراثيًا (Bachem وآخرون ١٩٩٤) ومن المعتقد أن هذا الاكتشاف يمكن أن يفتح الطريق أمام عمليات تحول وراثي مماثلة في عديد من المحاصيل الغذائية التي يحدث بها تلون بني إنزيمي مماثل لدى تعرضها للتجريح

العقد البكرى للثمار

أمكن تحويل التبغ والباذنجان وراثيًا بالجين *iaa*M من البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi*، مع استخدام الجين المنظم DefH9 الخاص بالبويضات والمتحصل عليه من *Antirrhinum majus*، وذلك لأجل إنتاج ثمار بكرية العقد ولقد أدى خصى أزهار النباتات التى حولت وراثيًا إلى إنتاجها لثمار بكرية، كما أنتجت ثمارًا بكربة لدى تلقيحها. وفى الباذنجان . سمحت عملية التحول الوراثى بإنتاج النباتات لثمار فى ظروف بيئية لا تناسب عقد الثمار فى النباتات غير المحولة وراثيًا، والتى لم تثمر إطلاقًا فى تلك الظروف والجدير بالذكر أنه بينما أنتجت كلا من النباتات المحولة وراثيًا وغير المحولة وراثيًا ثمارًا بحجم مناسب للتسويق فى الظروف البيئية المناسبة للعقد، فإن النباتات غير المحولة وراثيًا لم تنتج ثمارًا بحجم صالح للتسويق إلا بعد تلقيحها (Rotino وآخرون ١٩٩٧، وعن Bhat ٢٠٠٠)

العقم الذكرى

إن لظاهرة العقم الذكرى أهمية كبيرة فى إنتاج الهجن التجارية وقد أمكن التخلص من حبوب اللقاح بالتعبير عن إنزيمات الـ ribonucleases فى المتوك فقط، واستعمل لتحقيق ذلك إنزيم البارنيز Barnase – وهو جين يتحكم فى إنتاج أحد الـ ribonucleases خارج الخلية extracellular Rnase – من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens*. تستعمل هذه البكتيريا إنزيم البارنيز كنظام دفاعى ضد البكتيريا المنافسة لها كذلك تنتج البكتيريا ذاتها إنزيم البارستار Barstar الذى يعد مثبطًا خاصًا للبارنيز، والذى يمكن استعماله فى إنتاج نباتات جيل أول خصبة (عن Kempken ٢٠٠١)

وكما أسلفنا يوجد فى هذه البكتيريا (*Bacillus amyloliquifaciens*) جينًا يقوم بتحليل الرنا، يعرف باسم barnase، ولقد أمكن تحويل خلايا النسيج المغذى tapetal cells فى متوك لفت الزيت بهذا الجين؛ مما أدى إلى موتها وبغياب تلك الخلايا انعدم مصدر الغذاء الذى كان يمد الخلايا الجرثومية الصغيرة microspores باحتياجاتها منه؛ مما أدى إلى موتها وعدم تكون حبوب اللقاح. وبمعنى آخر فإن عملية التحول الوراثى تلك أحدثت عقمًا ذكريًا فى النبات. ومن ناحية أخرى فإن تلك النباتات أنتجت بذورًا حينما لُقحُت بحبوب لقاح خصبة ولكن نظرًا لأنه فى الحالات التى يكون فيها المنتج التجارى هو البذور يتعين أن يكون الجيل الأول خصبًا، لذا استعمل جين استعادة الخصوبة barstar الذى حُصِلّ عليه من البكتيريا ذاتها. يلتحم البروتين الذى ينتجه الجين barstar مع إنزيم الـ barnase ويوقف نشاطه، وبذا تكون الخلايا المغذية فى نباتات الجيل الأول عادية وتقوم بتغذية الخلايا الجرثومية الصغيرة بصورة طبيعية

ولأجل الإنتاج التجارى لبذور الجيل الأول الهجين تم عمل ارتباط بين جين يعرف باسم bar يكسب النباتات مقاومة لمبيد الحشائش phosphinothricin والجين barnase، وبذا أمكن بالرش بالمبيد التخلص من النسل الخصب الذكر (٥٠٪)، الذى ينتج من تلقيح السلالات العقيمة الذكر الـ hemizygous (الـ barnase) مع سلالات عادية غير محولة وراثيًا (-/-) أما الـ ٥٠٪ المتبقية من النباتات فإنها يمكن أن تستعمل فى إنتاج بذور الجيل الأول الهجين (عن Bhat ٢٠٠٠).

كذلك أمكن بنجاح تحويل بعض النباتات وراثيًا بنقل جينات (نووية) سائدة لاستعادة الخصوبة يعتمد هذا النظام فى الهندسة الوراثية على جين التبغ TA29 الذى يقتصر نشاطه النسخى على طبقة الخلايا المغذية Tapetal layer بالمتوك، والـ Rnase (barnase)/Rnase-inhibitor (barstar) من البكتيريا *Bacillus amyloliquefaciens* يؤدى إدخال الـ gene construct المعروف باسم -Ta29, tapetum specific promoter barnase الخاص بالـ cytotoxic protein .. يؤدى إدخال هذا الـ construct والتعبير عنه إلى إتلاف خلايا النسيج المغذى tapetum بالمتك، مما يمنع تكوين حبوب اللقاح

ويسبب حالة من العقم الذكرى ويؤدى إدخال الـ gene construct الخاص باستعادة الخصوبة – المعروف باسم T29, tapetum specific promototer-baraster – يؤدى إدخال هذا الـ construct فى نبات آخر إلى استعادته لخصوبته، أى يؤدى إلى إنتاج ما يعرف بالـ restorer line يُعد الـ barstar هو المثبط الخاص بالـ barnase، ويتضمن التثبيط تكوين معقد ثابت من البروتين بنسبة ١ ١ وليس لتعبير barstar فى الأب المذكر (الخصب الذكر) أى تأثير على تطور تكوين طبقة الـ tapetum، ومن ثم يكون النبات خصبًا ويعد العقم الذكرى الذى يسببه الـ barnase صفة سائدة

يحافظ على السلالات عقيمة الذكر التى تحتوى على الـ barnase السائد (والتى يكون تركيبها الوراثى –/barnase) بتلقيحها بحبوب لقاح من نبات طبيعى خصب غير محول وراثيًا (أى يكون –/– وبدون barnase). هذا إلاّ أن نسل التلقيح بين النباتات العقيمة (-/barnase) والنباتات الخصبة (–/–) يكون ٥٠٪ عقيمًا (–/barnase)، و ٥٠٪ خصبًا (–/–)، وتتعين إزالة النباتات الخصبة قبل إزهارها ويتم التعرف على النباتات الخصبة بربط الجين barnase بالجين bar، الذى يكسب النباتات مقاومة للمبيد الفطرى phosphinothricin، وذلك على صورة gene-construct هو barnase-bar. ومن ثم تكون النباتات العقبمة الذكر (barnase-bar) مقاونة لبيد الحشائش، بينما تكون النباتات الخصبة الذكر (–/–) حساسة للمبيد، وتموت عندما ترش به

وعندما تلقح النباتات عقيمة الذكر بنباتات بها جين استعادة الخصوبة (barstar) فإن النسل الهجين الناتج يكون حاملا لكلا الجينين، ويشكل البروتينان اللذان يعبر عنهما الجينين مركبًا معقدًا خاملاً، ومن ثم يتكون الـ tapetum بصورة طبيعية، ويكون الهجين كامل الخصوبة

وقد أنتجت بهذه الطريقة سلالات مهندسة وراثيًا من لفت الزيت والذرة لأجل الإنتاج التجارى للهجن

هذا وتعرف جينات أخرى للعقم الذكرى والخصوبة، مثل E، و BcPI، إلاّ أنها لم تلق لنجاح الذى لاقاه نظام الـ barnase-barstar (عن Chahal & Gosal ٢٠٠٢)