کاربرد نوترکیبی DNA در کشاورزی

اسلام مجیدی هروان

عضو هیأت علمی، بخش تحقیقات فیزیولوژی و بیوشیمی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر ، کرج .

چکیده

کاربرد نوترکیبی DNA در کشاورزی از اولویت خاصی در تحقیقات برخوردار است لذا در این مقاله، موضوع مورد بحث قرار گرفته است.

انتقال ژن در موجودات زنده توسط عاملهای مختلفی مانند پلاسمیدها ترانسپوزونهاو فاژها انجام می گیرد. همچنین اخیرا" روش جدیدی برای انتقال ژن تحت عنوان بمباران ذره ای ارائه گردیده و در گیاهان سویا، برنج و گندم مورد استفاده قرار گرفته است.

نمونه هائی از کاربرد این تکنولوژی در کشاورزی وجود دارد که از این میان می توان به مبارزه بیولوژیکی برعلیه بیماری گال سرطانی و آفات گیاهی بترتیب با استفاده از باکتریهای آگروباکتریوم رادیوباکتر و باسیلوس ترنژینزسیس،ایجاد ارقام مقاوم به علف کشها یا اصلاح کیفیت تولیدات گیاهی اشاره نمود.

در سال ۱۹۸۳ سین هایمر[1] در بحثی در ارتباط با تکنولوژی اظهار داشت که در سه میلیون سال گذشته تغییرات طبیعی در تعداد، ساختمان و سازمان ژنها عصر تکامل را مشخص ساختند و ما حالا به انتهای این عصر و جاده آن رسیده ایم. ما اکنون قادریم ژنها را دستکاری‌کنیم و مسیر تکامل را در آینده هدایت و مشخص سازیم. ما با استفاده از کامپیوتر می توانیم نقشه آینده و مسیر زندگی را تنظیم کنیم هرچند که موتاسیون و انتخاب طبیعی ادامه خواهند داشت. با این همه جاده قدیمی تکامل با بهره گیری از هوش و آگاهی انسان کوتاه خواهد شد و با توجه به مهندسی ژنتیك زندگی بیش ازحد معمول مهیج خواهد بود.

سخن در ارتباط با مهندسی ژنتیك و یا باصطلاح علم نوترکیبی DNA[2] است و اینکه این علم جدید چه کاربردی در کشاورزی آینده ودر تغذیه انسان خواهد داشت. هرچند که امروز نتایج هنوز جنبه آزمایشی دارد. موانع موجود در تلاقی گیاهان و انباشتن مواد ژنتیکی متفاوت در فرد معین باعث می شود محققان نتوانند به برداشت حداکثر محصول در واحد سطح دست یابند. لذا تلاش برای محو این

1- Sinsheimer

2- Recombinant DNA

موانع مستلزم روشهای جدید در سطح مولکولی است. این روشها از سال ۱۹۷۰ که محققان توانستند ثابت کنند پروتوپلاسم سلول گیاهی قادر به بازسازی دیواره سلولی است، پایه گذاری شدند و از آن زمان مکمل مناسبی برای روشهای به نژادی گیاهی محسوب می شوند.

در این روشها از اجزاء وراثتی کروموزومی و غیرکروموزومی سلول مانند پلاسمیدها[1]، ترانسپوزونها[2] ویروسها و فاژها استفاده می شود. تا بتوان تغییرات بنیادی در پروتئینهای ساختمانی و آنزیمی که در نهایت نتیجه مستقیم فعالیت یك ژن هستند و بروز صفات را کنترل می کنند به وجود آورد. این پدیده تحت عنوان نوترکیبی DNA نامیده می شود.

در سال ۱۹۷۳ در کنفرانسی در ارتباط با اسیدهای نوکلئیك، تعداد کثیری از شرکت کنندگان پیشنهاد کردند که هیأت رئیسه کنگره طی قطعنامه ای امکان بروز اتفاقی مولکولهای نوترکیب DNA در آزمایشگاهها را مطرح ساخته و کمیته بررسی بمنظور راهنمائی و انجام توصیه های عملی برای محققان تأسیس گردد. متعاقب بحثهای دنباله دار، درسال۱۹۷۴ لزوم تشکیل کمیته برنامه ریزی تحقیقات نوترکیبی DNA پیشنهاد شد و پس از تشکیل آن، در سال ۱۹۷۵ اولین کنفرانس بین المللی مولکولهای نوترکیب در شهر آزیلومار[3] کالیفرنیا تشکیل گردید (Day , 1985) سپس اصول تئوریك آن‌که مبتنی برمشاهدات پراکنده محققان درگذشته بود تنظیم گردید. بطورمثال لیدربرگ در سال ۱۹۵۱ نوترکیبی بین موتانها و تیپهای وحشی سالمونلا[4] که از طریق فاژ P22 ایجاد شد، بدست آورد.

در اواخر دهه ۱۹۷۰ تحقیقات اولیه بر روی باکتریها به دلیل سادگی ساختمان، چرخه حیاتی و امکان دسترسی آسان صفات شروع شد و از میان گونه های باکتری اشریشیاکولی[5] اروینیا[6]، پزودوموناز[7]، ریزوبیوم[8] وآگروباکتریوم[9] هر کدام به دلیلی مورد توجه قرار گرفتند. مطالعات اولیه در روی باکتریها به محققان آموخت که :

۱ـ چگونه مقر یك ژن را از میان کلیه ژنها در روی کروموزوم مشخص سازند.

۲ـ چگونه می توان قطعه ای از DNA را به سلول زنده دیگری انتقال داد تا رشد چنین سلولی به تولید توده سلولی نو که دارای DNA جدیدی هستند منجر گردد. این روش بعدها کلونه کردن ژن نام گرفت (شکل ۱) .

این آموخته ها و موفقیت ها مولود مولکولهائی بنام آنزیمهای تخصصی است که از آن میان لیگازها، کینازها، نوکلئازها،نقش عمده را بازی می کنند.

این آنزیمها از پتانسیل اختصاصی بسیار بالائی برای قطع و وصل مولکولهای DNA برخوردار هستند.

انتقال طبیعی و یا مصنوعی ژن با استفاده از

1- Plasmids
2- Transposons
3- Asilomar
4- Salmonella
5- E.Coli
6- Erwinia
7- Pseudomonas
8- Rhizobium
9- Agrobacterium

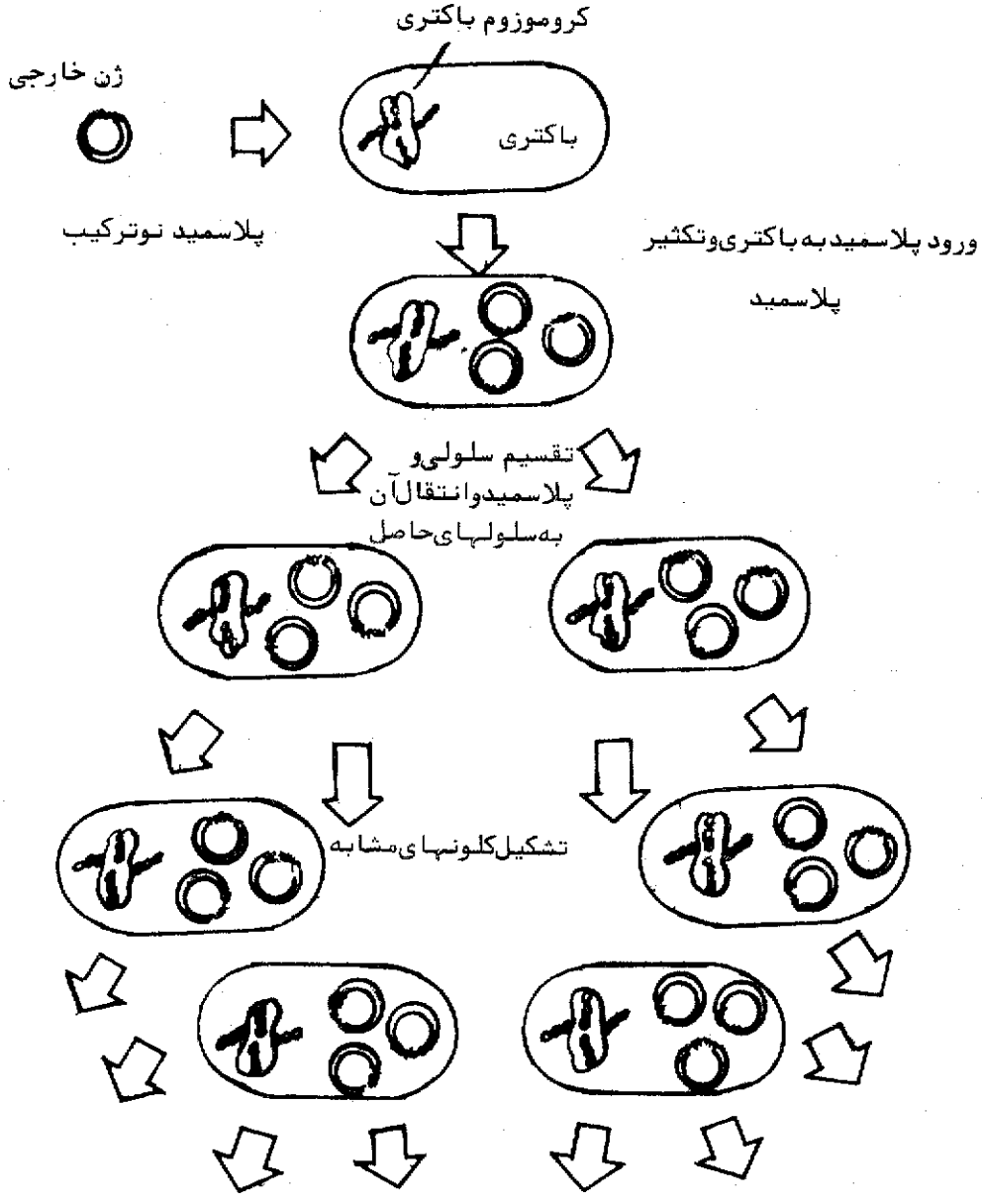
یکی از حاملهای زیر انجام می گیرد:

۱ـ پلاسمیدها .

۲ـ ترانسپوزونها.

۳ـ ویروسها و فاژها (ویروس موزائیک گل کلم و فاژ لامبدا و پی) .

۴ـ بمباران ذره ای .[1]



شکل ۱ ـ انتقال و کلونه کردن ژن در باکتریها

1- Particle Bombardement or Microprojectile

۱ـ پلاسمیدها

پلاسمیدها مولکولهائی از DNA هستند که به حالت حلقوی یا بسته در سیتوپلاسم باکتریها موجود بوده و حاوی ژنهای سنتز کننده پروتئینهای آنزیمی یا ساختمانی می باشند. بطور مثال مطالعات نشان داده است که گونه هائی از ریزوبیوم یك یا چند پلاسمید دارند که تعدادی از ژنهای کنترل کننده همزیستی روی آنها قرار گرفته اند.

این پلاسمیدها حامل ژنهای مؤثردر تثبیت بیولوژیکی ازت می باشند. مطالعات براساس پلاسمیدها نشان داده که اختلاف در نوع پلاسمیدهای این باکتری باعث بوجود آمدن گونه های مختلف شده است که بر اساس میزبان طبقه بندی می شوند. بعبارت دیگر پلاسمیدهای متفاوتی باعث بوجودآمدن تغییراتی در میزان آلودگی گیاهان متفاوت ونتیجتا" تفکیك میزبانهای مختلف شده است. براین اساس گونه های ریزوبیوم تری فولی[1]، ریزوبیوم لگومینوزارم[2]، ریزوبیوم فازئولی[3] که پلاسمیدهای متفاوت دارند،تحت گونهٔ ریزوبیوم لگومینوزارم طبقه بندی می شوند. اخیرا" پلاسمید ها و ژنهای کروموزومی مؤثردرتثبیت بیولوژیکی ازت راتوانسته اندبه آگروباکتریوم واشرشیاکولی منتقل نمایند. باکتریهای حاصله ایجادغده نموده وقدرت تثبیت ازت رابدست اورده است. ازطرف دیگرامکان تجمع ژنها و پلاسمیدهای گونه های مختلف در یك گونه وجود دارد. همچنین مطالعات نشان داده است که از نقطه نظرکروموزومی دوقطعه DNA تثبیت بیولوژیکی ازت راکنترل می نمایند که یکی از ۱۲بارتکرار۱۱۲۶جفت باز[4] ودیگری از۶ بارتکرار ۹۵۰ جفت باز بوجود آمده اند.

مطالعات دیگری روی باکتری آگروباکتریوم تومفاسینز بمنظور انتقال ژنها انجام گرفته است. این باکتری در گیاهان دولپه از طریق داخل نمودن قطعه ای از پلاسمید آن به نام Ti بدرون DNA سلول گیاه ایجاد غده سرطانی می نماید.

در پلاسمید باکتری فوق جهت ایجاد غده دوسری ژن وجود دارد که یك سری از آنهاپس از ورود باکتری بداخل سلول گیاهی ۱۰ تا۱۰۰ برابر بیشتر از حالت عادی نسخه برداری می شوند که تعیین کننده شدت بیماری زائی می باشند. حاصل این عمل سنتز تعداد زیادی مولکولهای پروتئینی است که در انتقال وتداخل T-DNA به سطح کروموزوم سلول گیاهی دخالت دارند و سری دیگر مشتمل بر ژنهائی هستند که القاء تولید غده را انجام می دهند. این ژنها با استفاده از فنوتیپ غدد حاصله از همدیگر قابل تشخیص هستند.

غدد از طریق فعالیت هورمونی دربافتهای آلوده ایجاد می شوند که در تولید آن دو ژن از طریق ایجاد آنزیم دخالت دارند. برای بوجود آمدن هورمون اسید اندل استیك یکی از ژنها با تولید آنزیم تریپتوفان مونواکسیژناز،

1- Rhizobium trifolii

2- R.leguminosarum

3- R.phaseoli

4- Pair base

تریپتوفان را به اندل استامید و دیگری با تشکیل آنزیم اندل استامید هیدرولاز، اندل استامید را به اسید اندل استیك تبدیل می نماید.

در صورتیکه تغییر در ژنهای سنتز کننده آنزیمها در جهت تولید سیتوکینین انجام گیرد از تشکیل غده جلوگیری بعمل می آیدوبافتهای آلوده گیاهی رشد ریشه ای به خود می گیرند. در هر دو حالت تشکیل غده و یا بافت ریشه ای از طریق تغییر در ساختمان DNA سلول و وارد شدن ژنهای سنتز کننده هورمونهای گیاهی اسید اندل استیك و سیتوکینین انجام می گیرد از طریق کشت بافتهای گیاهی سالم و آلوده در محیط کشت این مکانیزم ثابت شده است.

در روش کشت بافت،بافتهای سالم در محیط کشت بدون هورمون رشد نمی کنند در صورتیکه بافت غده به دلیل سنتز هورمونها در محیط کشت بدون هورمون رشد کرده وتولید کالوس می نماید.

T-DNA همچنین دارای ژنهائی است که سنتز مواد غیرمعمول به نام اپین ها را که فقط در سلولهای غده گیاه میزبان یافت می شود عملی می سازد. این مواد در باکتری و سلول گیاهی آلوده وجود دارد و احتمال می رود که بعنوان منبع ماده کربن برای تولید انرژی توسط باکتری مصرف شود. تعدادی از اپینها مانند نوپالین، اوکتوپین ها واگروپین ها شناسائی شده اند.

۲ـ ترانسپوزونها

ترانسپوزونها قطعات کوچکی از DNA هستند که در کروموزوم موجودات زنده و یا پلاسمیدهای میکروارگانیسم ها جای دارند و ویژگی و تخصص جابجائی در ژنوم موجودات را دارا می باشند.

فدروف[1] در سال ۱۹۸۵ در بحث جابجائی ژنها در ذرت اظهار می داردکه ترانسپوزونها نخستین بار در ۴۰ سال پیش توسط مك ـ کلینتوك[2] در ذرت تشخیص داده شدند، در انتقال طبیعی اطلاعات ژنتیکی نقش ایفا می کنند و موجب ناپایداری ساختمان ژنتیکی و تکامل گونه ها می گردند.

مطالعات سالهای اخیر نشان داده است که برداشتن ژن و انتقال آن به کمك ترانسپوزون در باکتریها صورت می گیرد.

محققان توانسته اند DNA های مصنوعی را از طریق ترانسپوزونها در ژنوم مگس سرکه وارد نمایند.

در ذرت موتاسیونهائی روی می دهد که باعث تغییر رنگ بذر به سفید، زرد یابنفش می گردد.

در مورد موتان بنفش که در اکثر حالات دارای ناپایداری ژنتیکی است ژنهای سنتز کننده آنتوسیانین از طریق نفوذ ترانسپوزونها عمل می کنند، بدین طریق که DNA نفوذی، ژنها مسئول رنگ دانه را از کار باز

1- Fedoroff

2- Mc.Clintock

می دارند، در نتیجه این تغییرات گیاه سبز باقی مانده و تنها دانه تغییر رنگ می دهد.

مك کلینتوك دلیل بروز چنین موتانها را در نفوذ قطعات ترانسپوزون در ژن و بروز انواع فنوتیپهای بذر می دانست . به نظر وی فنوتیپهای متفاوت منتج از فرکانس قطعات نفوذی در ژن هستند. ترانسپوزونها برای جداسازی ، کلونه کردن و انتقال ژنها بکار می روند، حال اگر ژن یا قطعه کروموزومی مسئول بروز صفتی شناخته شود با استفاده از ترانسپوزون امکان انتقال و جدا سازی ژن مورد نظر موجود دارد. در ذرت تعداد زیادی از ترانسپوزونها مطالعه و جهت شناسائی ژنها بکار برده شده اند.

امروزه محققان ذرت امیدوارند باانتقال ژنهای مقاوم به بیماریهابه کمك ترانسپوزونها بتوانندمکانیسم دفاع گیاه درمقابل عامل بیماری رابهترشناخته ودرتهیه ژنهای مقاومت دراین - ویترو[1] وانتقال آنهابه ارقام استفاده نمایند.

۳- ویروسها و فاژها

محققان ژن سنتز کننده قند ذرت را شناسائی و سکانس کردند و سپس DNA آنرا تهیه و از طریق فاژ لاندا به باکتری انتقال داده و بروز آنرا بررسی نمودند.

از میان ویروسها ، ویروس موزائیك گل کلم که دارای DNA دو رشته و سکانس شده است مورد بررسی قرار گرفته است. DNA ویروس ظرفیت تداخل و گرفتن DNA خارجی و انتقال آنرا دارا می باشد و DNA انتقال یافته در سلول میزبان ازقابلیت همانندسازی برخوردار است.

در این روش انتقال ژن و بروز DNA انتقال یافته در داخل سیتوپلاسم انجام می گیرد و انتقال DNA خارجی در سطح کروموزوم سلول میزبان همانند سایر روشها صورت نمی پذیرد. لذا استفاده از این روش در گیاهانی که تکثیر آنها از طریق کشت بافت و اندامهای رویشی انجام گیرد کاربرد عملی خواهد داشت.

۴- بمباران ذره ای

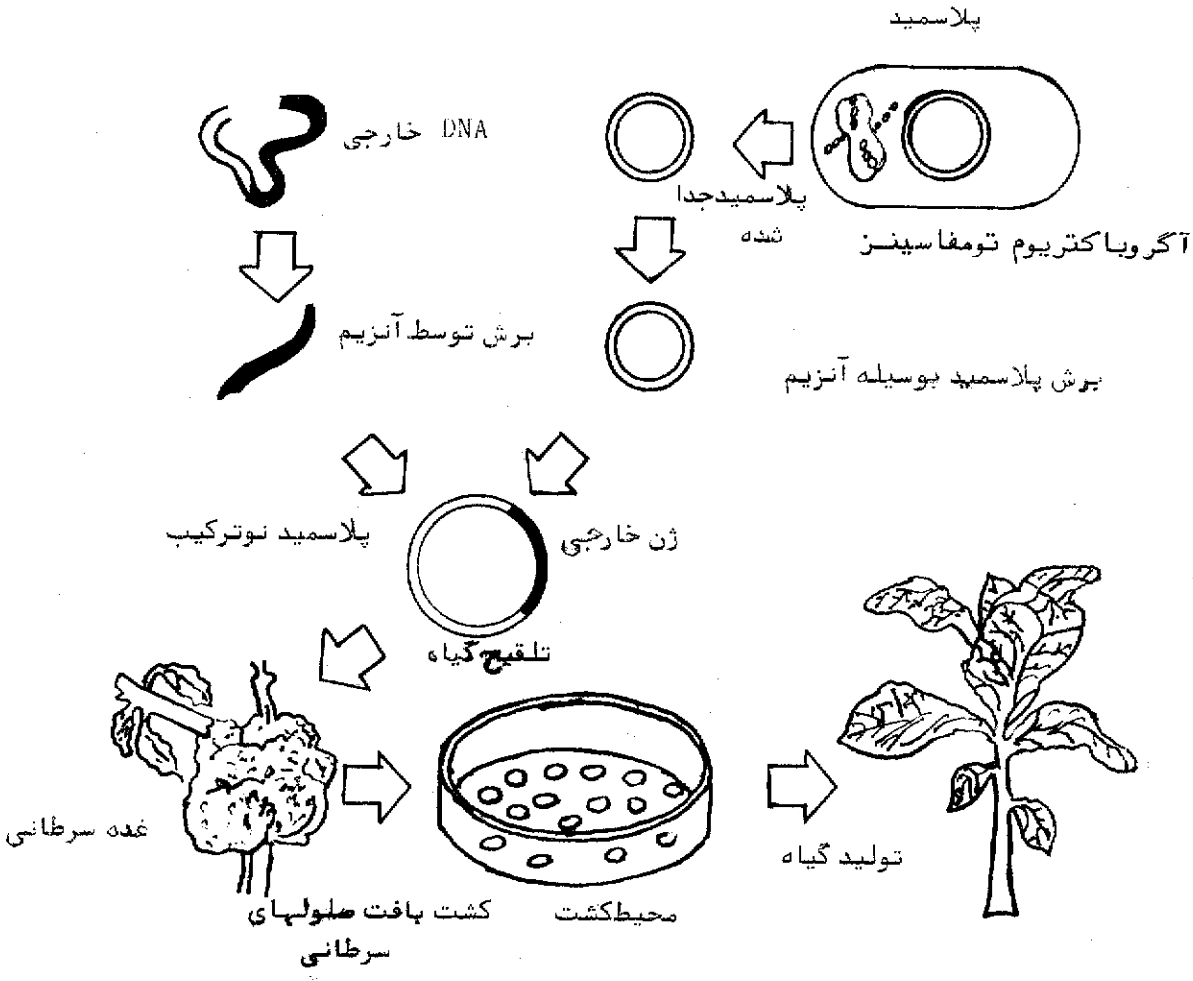
تحقیقات انجام گرفته توسط گروههای تحقیقاتی کلین[2]، سان فورد[3] و شانگ وانگ[4] در سالهای ۹۰ - ۱۹۸۹ امکان استفاده از روش بمباران ذره ای برای انتقال ژن را عملی ساخته است. در این روش DNA مورد نظر به پلاسمید کوچکی انتقال داده شده و سپس پلاسمید را به حامل متصل ساخته و جهت حفاظت آن از فلزات تنگستن یا طلا استفاده می کنند.

ترکیب حاصله که از قطری حدود ۱/۲ میکرومتر برخوردار است جهت بمباران سلولی بکار برده می شود. این ترکیب بدون صدمه زدن به دیواره و غشاء سیتوپلاسمی وارد سلول شده و سپس DNA موجود درآن در ساختمان DNA سلول گیاهی جای می گیرد .

1- In - Vitro
2- Klein
3- Sanford
4- Chang Wang

کاربرد نوترکیبی DNA درکشاورزی

تا اینجا بحث بر سر انتقال ژن در باکتریها بود. اما در گیاهان تصور می رود که انتقال ژن صرفا" با استفاده ازآگروباکتریوم تومفاسینز صورت می گیرد. چون این باکتری پاتوژن گیاهان دولپه ای می باشد و با توجه به مکانیزم بیماریزائی آن که کاملا" شناخته شده است در انتقال ژن به گیاهان مورد استفاده قرار می گیرد (شکل ۲).



شکل ۲: مراحل انتقال ژن درگیاهان بااستفاده از حامل پلاسمید Tip[1] باکتری آگروباکتریوم تومفاسینز

1- Tumer inducing plasmid

حال اگر بخواهیم ژنی را وارد سلول گیاهی نماییم ابتدا ، آنرا از طریق هیبریداسیون با پلاسمید این باکتری،وارد سلول باکتری می کنیم . سپس این باکتری را در محیط کشت مصنوعی تکثیر کرده و گیاه میزبان را آلوده می سازیم. گیاه پس ازآلودگی ایجاد غده سرطانی می کند . از کشت این غده ها با روش کشت بافت گیاهان جدیدی بوجود می آیند که حامل ژن انتقال یافته هستند.

از کاربردهای علمی این روش در کشاورزی،امروزه می توان موارد زیر رانام برد : ۱ـ با استفاده از این کشفیات، مبارزه بیولوژیك علیه بیماری غدد سرطانی گیاهان با استفاده از آگروباکتریوم رادیو باکتر[1] K 84 شروع شده است. این باکتری فاقد قدرت ایجاد غده یا بیماری در گیاهان است باکتری نژاد K 84 آنتی بیوتیکی بنام اگروسین سنتز می کند که اثر کشندگی برای آگروباکتریوم تومفاسینز دارد وبوسیله پلاسمید (PAG K84) سنتز می شود.

با استفاده از تکثیر آگروباکتریوم رادیوباکتر و وارد کردن آن درخاك در موقع نشاء نهالها توانسته اند از بروزبیماری گال، در گلابی و گیلاس جلوگیری نمایند. ولی بعدها متوجه شدند که پلاسمید K84 قابلیت انتقال به آگروباکتریوم تومفاسینز را داشت و باعث مصونیت سرشهائی از این باکتری می شود.

این مسأله مبارزه رابا شکست روبرو می ساخته، لذا تحقیقات در انتقال پلاسمید PAG K84به باکتری خاکزی پزودوموناس ـ آئروژینوزا[2] که بیماریزا نیست شروع شد. اهمیت این باکتری بدین دلیل است که پلاسمید K84 مستقر شده در آن امکان انتقال به آگروباکتریوم تومفاسینز راندارد به علاوه اینکه این باکتری خودآنتی بیوتیك دیگری هم سنتز می کند که اثر سمی روی آگروباکتریوم تومفاسینز دارد.

۲ـ در سال ۱۹۸۲ لیندوموتانهای باکتریهای پزودوموناس سیرنگه[3] و اروینیاهربی کولا[4] را در مزرعه مورد آزمایش قرار داد. این موتانها فاقد هسته تشکیل دهندهٔ یخ[5] بودند. ولی تیپهای وحشی این باکتریها این قدرت را دارند و می توانند در آب سردیخ زدن را شروع نمایند . بدین صورت که آب را در آزمایشگاه تا ۴۰ ـ درجه سانتی گراد سرد کردند، بدون اینکه یخ بزند، ولی افزودن تیپهای وحشی این باکتریهادر۱ـدرجه سانتی گراد یخ زدن آب را شروع کرده و کلیه آب را به یخ تبدیل می نماید.

علل مولکولی این پدیده که در طبیعت صورت می گیرد ناشناخته می باشد ولی آنچه که معلوم است عامل این پدیده درون سلولی بوده که با پروتئین ها و لیپیدهای دیواره سلول باکتری ارتباط دارد.

1- Agrobacterium radiobacter K84
2- P.aeroginosa
3- P.syringae
4- E.herbicola
5- Ice Nucleation center

با توجه به اینکه سرماردگی به محصولات کشاورزی سالانه در حد یک بیلیون دلار در آمریکا خسارت می زند(لیندو، ۱۹۸۳)واین باکتریهای عامل سرماردگی در سطح خارجی اندامهای گیاهی بصورت اپی فیت زندگی می کنند و جمعیت آنها بسته به نوع گیاه و فصل از ۱۰ الی 10^7 باکتری در یک گرم وزن تر اندامها وجود دارند. این باکتریها بصورت هسته تشکیل یخ فعالیت خود راشروع کرده و سرماردگی اندامهای گیاهی را فراهم می سازد. لذا لیندو در سال ۱۹۸۳ تحقیقات خود را روی گیاهان سیب زمینی ، گلابی ، بادام ، گوجه فرنگی و مرکبات با بهره گیری از آنتاگونیسم موجود بین این باکتریها وسایر باکتریهای اپی فیت که فاقد قدرت تشکیل یخ هستند شروع کرد. وی توانست با مبارزه علیه این باکتریها از طریق سموم و یا پاشیدن باکتریهای آنتاگونیست به سطح اندامهای در حال رشد گیاهی و جایگزین کردن باکتریها میزان خسارت سرما زدگی را در گلخانه و مزرعه بین ۲۰ تا ۹۰ درصد کاهش دهد که این مقدار کاهش خسارت ارتباط مستقیم با کاهش جمعیت باکتریهای تشکیل دهندهٔ یخ داشته است.

لیندو در ادامه تحقیقات کاربردی خود متوجه شد که این آنتاگونیسم پایدار نیست. لذا مسیر دیگری را در تحقیقات خود پیش گرفت و آن ایجاد موتانهای فاقد قدرت تشکیل یخ بود. شناسائی ژنهای کنترل کننده تشکیل یخ توانست راهنمای خوبی در انتقال این ژنها به پلاسمیدهای اشریشیاکولی گردد و سپس انتقال پلاسمیدهای هیبرید به باکتری پزدومونا رسیرنگه منجر به شناسائی ساختمان ژنتیکی و ایجاد موتانهای فاقد قدرت تشکیل یخ گردید. موتانهای حاصله از قدرت رقابت بیشتری نسبت به اجداد وحشی خود برخوردار بودند و زمانیکه موتانها وارد مزارع گردیدند، گونه وحشی دیگر نتوانست مستقر شده و ایجاد خسارت نماید.

هسته تشکیل یخ از ۴ تا ۴/۵ کیلو بار تشکیل یافته است که بصورت پشت سرهم روی کروموزوم باکتری قرار دارد ،وزمانیکه قطعه DNA مزبور به اشریشیاکولی منتقل شود ، باکتری کلون شده فنوتیپ تشکیل یخ رابروز می دهد. در این باکتری با استفاده از آنزیمهای اندونوکلئاز، ایجاد تخریب در مولکول DNA در منطقه کنترل کننده هسته تشکیل یخ انجام می گیرد.

باکتری اشریشیاکولی که عمل تخریب در آن انجام پذیرفته، تکثیر می گردد،وسپس قطعه باقیمانده DNA از این باکتری (بنام PBR 325) وارد باکتری پزدومونا ر ـ سیرنگه می شود. قطعه DNA مربوطه با کرموزوم باکتری در منطقه همولوگ ایجاد نوترکیبی می کند و بدین طریق آن قطعه وارد کروموزوم می شود و در اثر کشت ایجاد

مجموعه ای از هاپلوئیدهای موتان و وحشی پزدوموناز سیرنگه را که فاقد هسته تشکیل یخ هستند، می نماید.

۳ـ باکتری باسیلوس تورینژینزیس[1] بمنظور مبارزه با انواع پروانه های آفت محصولات زراعی در طول ۲۰ سال گذشته مورد استفاده قرار گرفته است که مزایائی نسبت به کاربرد سموم دارد. ولی این باکتری نمی تواند در محیط، بطور مؤثر و با جمعیت بالا ادامه نسل داده و سالهای بعد فعال باشد. لذا با استفاده از روش نوترکیبی، ژنهای مسئول را به باکتری خاکزی پزدوموناز فلورسانس[2] انتقال دادند تا از طریق آغشته کردن بذور قبل از کشت با این باکتری بتوانند گیاهان را علیه امراض خاکزی و آفات نباتی محافظت نمایند.

باکتری باسیل سمی بنام دلتااندوتوکسین[3] ترشح می نماید که موجب مرگ آفات می گردد. پلاسمیدهای این باکتری دارای ژنهای سنتز کننده ترکیبی پروتئین هستند. DNA سنتز کننده سم دلتااندوتوکسین با استفاده از آنزیمها جدا گردیده و به پلاسمید باکتری اشریشیاکولی انتقال داده شده است. سپس پلاسمید اشریشیاکولی به باکتری پزدوموناز ـ فلورسانس منتقل شده است. باکتری حاصله دارای فعالیت سنتز دلتااندوتوکسین بوده که در روی بعضی از پروانه ها مانندهلیوتیس ذرت اثر کشندگی قویتر از باسیلوس تورینژینزیس را دارا است همچنین این باکتری هیچگونه اثری روی پروانه های بی زیان نداشته است.

آزمایشهای گلخانه ای و صحرائی نشان می دهد که هیچگونه اثر نامطلوبی در موردبقای باکتری تیمار شده دیده نمی شود و باکتری تیمار شده براحتی می تواند در خاك و آب ادامه حیات دهد و ضعفی در رقابت با سایر میکروبها ندارد. همچنین قطعه وارد شده از پایداری ژنتیکی خوبی در باکتری برخوردار است.

۴ـ امروزه استفاده از علف کشها در مزارع متداول گردیده و تحیقات وسیعی در ارتباط با تحمل یا مقاومت گیاهان در مقابل این ترکیبات بعمل آمده است. با توجه باینکه مقداری از علف کشها در خاك باقی مانده و وارد گیاهان کشت شده در سال بعد می گردد و اثرات سوء و نامطلوب روی آنها می گذارد، لذا تحقیقات در جهت ایجاد ارقام متحمل یا مقاوم نسبت به علف کشها از طریق تلاقی آغاز گردیده ولی بدلیل عدم وجود ژنهای مقاوم در گونه های دیگر گیاهی انتقال این صفت از این طریق غیرممکن می باشد. لذا متخصصین با استفاده از روش نوترکیبی درحل این مسأله به موفقیت دست یافته اند.

مقاومت به علف کشها می تواند نتیجه عدم جذب آنهابوسیله یك بافت بوده و یا سم به روش هیدرولیز و یا سایر واکنشهای متابولیکی خاصیت سمی بودن خود را ازدست بدهد.

1- Bacillus thuringiensis 2- P.fluorescens 3- Delta endotoxin

امروزه بدلیل محدودیتهای موجود در روش انتخاب از طریق تلاقی توانسته اند از طریق کشت سلول در گیاهان زراعی مقاومت در مقابل علف کشهائی مانند پی کلرام، سلفونیل - اوره ، گلی فسات و غیره را بدست آورند، که از طریق انتخاب سلولهای زنده مانده در محیط کشت حاوی علف کشها حاصل می شود.

مطالعات نشان داده است که علف کش گلی فسات از سنتز آنزیم[1] جلوگیری می نماید که نتیجه سنتز این آنزیم اسیدآمینه های فراری هستند که در سنتز پروتئین های آنزیمی نقش دارند. در حالت تحمل یا مقاومت گیاه به علف کش ، مکانیزم مقاومت یا تحمل از طریق تقویت ژنها و سنتز آنزیمی ظاهر می شود. مطالعات انجام گرفته نشان داده است که واریانتهای کنترل کننده مقاومت ، قابلیت انتخاب و انتقال با استفاده از روش نوترکیبی DNA داشته و ایجاد ارقام گیاهی مقاوم را میسر می سازد(گودمن و نیوول۱۹۸۵).

مکانیزم مشابهی به گلی فسات در باکتری سالمونلاتیفی ماریوم[2] نیز وجود دارد. این مکانیزم در باکتری توسط گروه لوکاکومای[3] مطالعه شده است و واریانت ژنتیکی مقاومت توسط این گروه پس از شناسائی به گیاه توتون انتقال داده شده و گیاه حاصله درمقایسه با شاهد، مقاومت به علف کش را بروزمی دهد.

۵- از کاربردهای دیگر این روش مبارزه بر علیه مواد سمی آلوده کننده محیط را می توان نام برد بطور مثال باکتری پزدوموناز پوتیدا[4] دارای سوشهائی است که قادر است هر کدام یکی از ترکیبات روغنی گیزیلن، نفتالین، آکتانها و کامفورها را تجزیه کرده و از اثرات سمی آنها در محیط جلوگیری نمایند. ژنهای کد کننده تجزیه این ترکیبات روی پلاسمیدهای متفاوتی قرار دارند و هدف انتقال این ژنها به یك سوش باکتری است که دارای قدرت تجزیه این چهار نوع کربو هیدرات باشد.

۶- کیفیت پروتئینهای محصولات عمده زراعی که در تغذیه انسان و دام اهمیت زیادی دارند. برخی از این پروتئینها بدلیل کمبود و یا فقدان تعدادی از اسیدهای آمینه اساسی (مانند لیزین تریپتوفان، میتونین و سیستین) از ارزش غذائی خوبی برخوردار نیستند. ساختمان ژنتیکی که بتواند کلیه پروتئینهای مناسب تغذیه را سنتز کند در منابع گیاهی موجود نیست . لذا تغییر در ساختمان DNA ژنهای مسئول پروتئینهای ذخیره دانه از اهداف نوترکیبی DNA است. در این ارتباط مطالعات اولیه در شناسائی پروتئینهای دانه ذرت (زئین) و دانه سویا شروع گردیده و با استفاده از m RNA این پروتئینها و ساختمان DNA آنها توانسته اند ردیفهای[5] اسیدهای آمینه این پروتئینها و ژنهای کد کننده آنها را تا سال ۱۹۸۶ -

1- Enolpyruvyl Phosphoshikimate synthase.
2- S.typhimarium
3- Luca comai
4- P.putida
5- Sequences

تعیین نمایند.

۷ـ انتقال ژنهای سنتزکننده آنزیمهای بتاگلوکرونیدار و نئومایسین فسفوترانسفرار از تك سلولی ها به سلولهای گیاهی ذرت، گندم، برنج و سویا با روش بمباران ذره ای انجام گرفته است و گیاهان حاصله اثرات این ژنها را بروز داده اند.

References:

Chang wang,Y.,T.M.,Klein,J.,Cao, J.C., Sanford, and R.WU,1989. Transient Expression of Foreign Genes in Rice, wheat and Soybean Cells Following Particle Bombardment. Plant Molecular Biol.11:433-439.

Comai,L. D.M.,Stalker , and W.R.,Hiatt,1985.A single Amino Acid Substitution in The Enzyme 5 - Enolpyruvyl 3- Phosphoshikimate Synthase Confers Resistance to The Herbicide Glyphosate. J.Biol. Chem.260 : 4724 - 4728.

Day,P.R., 1985. Engineered Organisms in The Environment, A Perspective on The problem. P.1. In : Proceeding , Engineered Organisms in the Environment. O.,Harlyn (eds.), American Society for Microbiology washington, DC.

Goodman, R.M., N., Newell, 1985.Genetic Engineering of Plants for Herbicide Resistance : Status and Prospects. P: 47-54.In : Proceeding, Engineered Organisms in The Environment.O.,Harlyn (eds.), American Society for Microbiology washington, DC.

Klein.T.M., L.,Kornstein, J.C., Sanford,M.E., and Fromm,1989.Genetic Transformation of Maize Cells by Particle Bombardment. Plant Physiol. 91 : 440 - 444.

B.MC. Clintock,N.V., Fedoroff, 1985.Moving Genes in Maize.P: 70 - 76 In:Proceeding, Engineered Organisms in the Environment.O., Harlyn (eds,), American Society for Microbiology Washington, DC.

Lindow,S.E.,1983.Methods of Preventing Frost Injury Through Control of Epiphytic Ice Nucleation Bacteria. Plant . Dis . 67 : 327 - 333.

Lindow, S.E., 1985.Ecology of Pseudomonas Syringae Relevant to the Field Use of Ice Deletion Mutants Constructed in - vitro for Plant Frost Control. P: 23 - 36. In Proceeding, Engineered Organisms in the Environment. O.,Harlyn (eds.),American Society for Microbiology Washington,DC.

Sanford,J.C., 1990.Biolistic Plant Transformation,Physiologia 79:206-209.

Sinsheimer,R.L.,Technology Review,14 April 1983.In: Proceeding ,The Ecology of Evolution,by, Regal,P.J.,1985,P.11-20 ,Engineered Organisms in the Environment.O., Harlyn(eds.),American Society for Microbiology Washington,DC.