گیاهان تراریخته (قسمت دوم)

روش های تولید گیاهان تراریخته

مهندس حجت فتحی
معاون مدیر امور تحقیقات شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

روش های متعددی برای تولید گیاهان تراریخت وجود دارد. ابتدا ژن کاندید برای انتقال، شناسایی و جدا می شود و سپس آن را توسط یکی از روش های زیر به گونه مورد نظر وارد می کنند.

انتقال ژن توسط آگروباکتریوم

اگروباکتریوم (*Agrobacterium tumefaciens*) یک باکتری خاکزی است که بیش از یک قرن به عنوان بیمارگر ایجاد کننده بیماری گال طوقه شناخته شده است. برخلاف دیگر عوامل بیمارگر، اگروباکتریوم توانایی فرستادن DNA خود به درون سلول های گیاهی و ایجاد تغیرات دائمی در ژنوم آنها را داراست. کشف این ویژگی منحصر به فرد در ۳۰ سال پیش، ابزار قدرتمندی برای دانشمندان علم ژنتیک به منظور تغییر ژنتیکی گیاهان برای پژوهش های بنیادی و پیشرفت های کشاورزی فراهم نمود. اگروباکتریوم حاوی یک پلاسمید است که به آن Ti (Tumor Inducing) پلاسمید می گویند که القاء کننده تومور می باشد، بنابراین تبدیل درونی یک گونه اگروباکتریوم به گونه دیگر به سادگی با جایگزینی Ti پلاسمید امکانپذیر است. آلودگی گیاه به اگروباکتریوم با زخم بافت گیاهی آغاز می شود و در محل زخم مخلوطی از چندین ترکیب از جانب گیاه آزاد می شود که ساختار این مواد در بین گیاهان متفاوت است و اغلب ماهیتی فنلی دارند (استوسرینگون). این ترکیبات که از زخم انتشار می یابند برای باکتری جذاب بوده و باعث می شود باکتری به طرف آن ترکیبات شنا کند، سلول زخمی را پیدا کرده و قسمتی از DNA خودش را به داخل سلول زخمی تزریق کرده و آن را وادار می کند که تکثیر شود، و این سلول های تشکیل دهنده غده شروع به سنتز یک اسید آمینه غیر طبیعی به نام اپین (opin) می کنند. این اپین ها اسید آمینه های غنی از نیتروژن و قند هستند و غذای باکتری را تشکیل می دهند. محققان برای انتقال ژن مورد نظر، ژن های بیماری زایی پلاسمید را خارج کرده و ژن خارجی مورد انتقال، در آن جاسازی و چندین نسخه از این ژن از راه همانند سازی پلاسمید، تولید و تکثیر می شود. فرآیند انتقال ژن شامل وارد کردن و بیان ژن خارجی در سلول میزبان است. برای این منظور باکتری حامل ژن کلون شده در کشت سلولی یا پروتوپلاستی گیاه میزبان مخلوط می شود (به مدت ۱ تا ۳ روز). برای تسهیل تشخیص سلول های ترانسفورم شده، یک ژن مارکر همراه با ژن مورد نظر وارد سلول می شود (ژن مقاوم به آنتی بیوتیک). باکتری با کشت سلولی گیاه هدف مخلوط و در یک محیط کشت حاوی مقادیر خاصی از کانامایسین کشت داده می شوند و سلول های غیر ترانسفورم در چنین محیطی از بین می روند. در سال ۲۰۰۱ جورسیو یک سیستم سلکسیون سه جانبه با استفاده از گلوکورونیک، مانوز و گزیلوز را به جای روش کانامایسین پیشنهاد کرد. آخرین مرحله از پروسه انتقال ژن، باززایی سلول های ترانسفورم شده و تبدیل آنها به گیاه کامل است که برای این منظور، سلول های ترانسفورم شده به محیط کشت باززایی منتقل می شوند (شکل شماره۱).

روش بمباران ذره ای

در این روش از ریز پرتابه های پرشتاب استفاده می کنند. ذرات طلا یاتنگستن ناقل DNA (۳-۱میکرومتر) معروف به ریز پرتابه ها که توسط یک درشت پرتابه یا درشت ناقل حمل می شوند، به سمت سلول های گیاهی زنده پرتاب می شوند. ذرات حامل DNA (ریز پرتابه) بر سطح جلویی درشت پرتابه قرار داده شده و پس از برخورد درشت پرتابه به یک صفحه یا غربال متوقف کننده، از آن رها می شوند. صفحه مانع به نحوی قرار گرفته شده است که حرکت پیش رونده درشت پرتابه را متوقف می نماید، اما به ریزپرتابه ها اجازه عبور می دهد. در این روش هنگامی که گاز هلیوم از تانک آزاد می شود، یک صفحه بازدارنده از ورود آن به اتاقک ممانعت می کند. پس از آن که صفحه بازدارنده گاز هلیوم را متراکم می کند این گاز به طور ناگهانی رها می شود و ورقه پلاستیکی نازکی را که حامل ریز پرتابه ها است به سمت یک غربال فلزی شتاب می دهد. سپس ریزپرتابه ها یک مسیر با خلاء ناقص را طی می کنند تا به هدف برسند. خلاء ناقص برای کاهش کشش آیرودینامیک وارده بر ریز پرتابه و کاهش موج تلاطم ایجاد شده در زمان برخورد درشت پرتابه به صفحه بازدارنده مورد استفاده قرار می گیرد (شکل شماره۲).

روش الکتروپوراسیون

فرآیندی است که در طی آن از پالس های یک میدان الکتریکی قوی برای نفوذپذیری قابل برگشت غشای سلول ها، به منظور تسهیل در جذب مولکول های بزرگی همچون DNA، استفاده می شود. در این روش از یک شدت میدان اولیه نسبتا زیاد با کاپاسیته کم و بنابراین یک مدت زمان تخریب کوتاه استفاده می شود. در این روش، نمونه ای از پروتوپلاست ها در اتاقک الکتروپوراتور در معرض پالس هایی با ولتاژ کم و زیاد قرار می گیرند. مدت ها است که از این روش برای تراریختی پروتوپلاست ها استفاده می شود.

ریز تزریقی

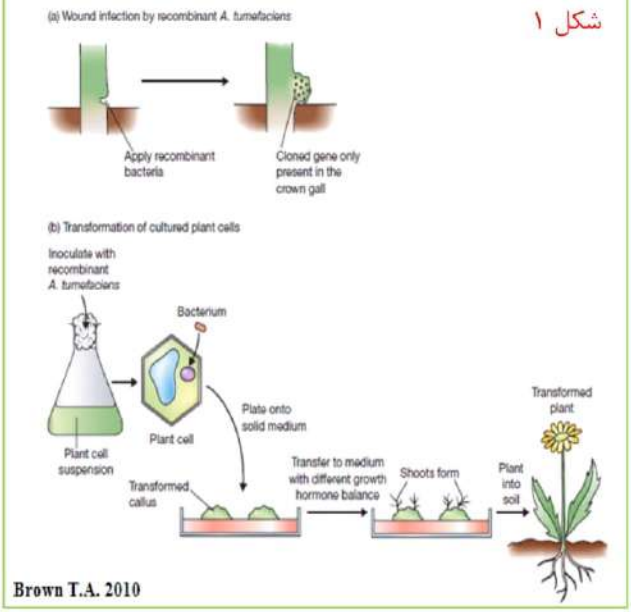
در این روش DNA به طور مستقیم و به صورت مکانیکی و از طریق کنترل میکروسکوپی به درون سلول هدف وارد می شود. هدف می تواند یک سلول معین در درون یک ساختار چندسلولی نظیر جنین، تخمک و ... باشد. این روش به عنوان یک روش فیزیکی مستقیم قادر به نفوذ از دیواره های سلولی سالم می باشد. این روش وابسته به میزبان نبوده و ضرورتا به سیستم های باززایی از پروتوپلاست نیاز ندارد. این روش برای انتقال اندامک های سلولی و دست ورزی کروموزوم های جداسازی شده، پیشنهاد شده است. زمانی که از سلول ها یا پروتوپلاست به عنوان هدف در این تکنیک استفاده می شود میکروپیپت های شیشه ای برای انتقال ریز مولکول ها به درون سیتوپلاسم یا هسته یک سلول یا پروتوپلاست استفاده می شود. سلول پذیرنده را می توان با استفاده از روش هایی نظیر غوطه ور کردن در آگار، سطوح شیشه ای آغشته به پلی لیزین و بوسیله ی پیپت های نگهدارنده مکشیبی حرکت داد. پس از انجام تزریق، سلول تزریق شده بایستی به نحو مقتضی کشت شود تا تداوم رشد و نمو آن تضمین شود (شکل شماره۳).

پلی اتیلن گلیکول

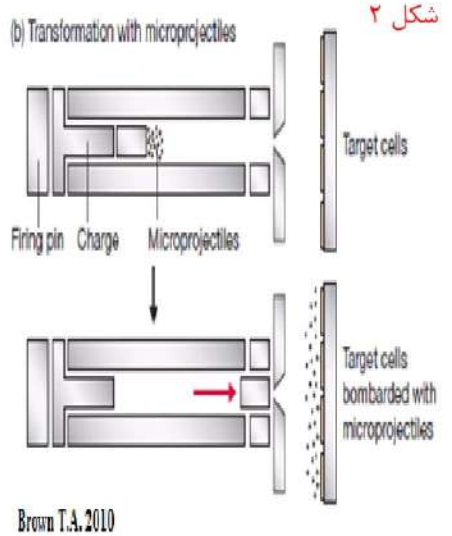
پلی اتیلن گلیکول باعث سست و ناپایدار شدن غشاء پروتوپلاست ها می شود که در نتیجه آن سوراخ هایی در غشا پروتوپلاسم ایجاد شده و پلاسمید از طریق این سوراخ ها به درون پروتوپلاست نفوذ می کند. در این روش، پروتوپلاست را درمجاورت DNA خارجی قرار داده و با اضافه کردن مقدار معینی از PEG و سوراخ شدن دیواره پروتوپلاسم وارد هسته می شود.

در بین انواع روش های شناخته شده برای انتقال ژن از روش اگروباکتریوم و بمباران ذره ای استفاده بیشتری به عمل آمده است. توسعه روش شناختی انتقال ژن، وابسته به نوع محصول است. هین چی و تیمش با موفقیت سویای تراریخت متحمل به علف کش گلای فوسیت را با استفاده از سیستم انتقال ژن اگروباکتریوم تولید کردند و امروزه این محصول با نام تجاری Roundup ready در سطح وسیعی از جهان تولید می شود. پنبه تراریخت با نام تجاری Bollgard، ذرت تراریخت با نام تجاری Yield Gard، گوجه فرنگی Flavrsavr و برنج تراریخته با نام تجاری Golden rice از جمله مهمترین محصولات تجاری می باشند که که از طریق مهندسی ژنتیک و انتقال ژن ایجاد شده اند.

شکل ۱



شکل ۲



شکل ۳