

عوامل بیولوژیک تغییر یافته ژنتیکی و خطرات و پیامدهای سوء آنها

رضا رنجبر M.Sc.

آدرس مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی بقیه...^ع پژوهشکده طب رزمی - مرکز تحقیقات بیولوژی - تهران - ایران

خلاصه

در دهه ۱۹۷۰ با ابداع و به کارگیری مجموعه‌ای از فن‌آوری‌ها تحت عناوین DNA نوترکیب و مهندسی ژنتیک، انقلابی جدید در عرصه بیولوژی ایجاد گردید. سپس توسعه فن‌آوری ردیف‌یابی سریع DNA دنبال شد. این فن‌آوری‌ها کاربری‌های دوگانه پیدا کرده‌اند. از یک طرف در ابعاد مختلف تولید انواع فرآورده‌های بیولوژیک (محصولات غذایی و دارویی، واکسن‌ها، واکنش‌گرها و غیره) حایز اهمیت می‌باشند. لیکن از جانب دیگر نگرانی‌هایی نیز در مورد ایجاد عوامل بیولوژیک جدید و نوظهور و ارگانسیم‌های ترانس ژن شده، به وجود آورده‌اند. انواع بالقوه‌ای از عوامل جدید بیولوژیک از طریق مهندسی ژنتیک ایجاد شده است. ایجاد میکروارگانسیم‌هایی که در طبیعت هرگز وجود نداشته‌اند، تبدیل میکروارگانسیم‌های غیربیماری‌زا به بیماری‌زا، ایجاد میکروارگانسیم‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بالا، به وجود آوردن میکروارگانسیم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و همچنین مقاوم به عمل واکسن‌ها، ایجاد میکروارگانسیم‌های تغییر یافته ایمونولوژیک که نتوان آنها را به طریق روش‌های استاندارد تشخیص و تعیین هویت نمود، تهیه میکروارگانسیم‌های با ساختار آنتی‌ژنیک تغییر یافته، به وجود آوردن میکروارگانسیم‌هایی که دوام و پایداری مناسبی را در شرایط محیطی داشته باشند و سرانجام ایجاد میکروارگانسیم‌هایی که گروه‌های خاصی را هدف خود قرار دهند (سلاح‌های نژادی)، از مهمترین موارد قابل ذکر هستند.

مهندسی ژنتیک جهت ایجاد ارگانسیم‌های ترانس ژن شده از انتقال افقی (Horizontal Transfer) ژن بهره می‌برد. بدین منظور انواعی از ساختارهای ژنی صناعی را برای عبور از سد‌های گونه‌ای طبیعی (Natural species barriers) موجودات و هجوم به ژنوم آنها استفاده می‌کنند. این ساختارهای صناعی یا DNA ترانس ژن شده نوعاً واجد مواد ژنتیکی مربوط به باکتری‌ها یا ویروس‌ها می‌باشند.

از آنجایی که این عناصر ژنتیکی مانند DNA غیر ترانس ژنیک پایداری و دوام را در سلول میزبان ندارند، کل جمعیت بیوسفر را در معرض خطر حمله خود قرار داده‌اند

واژه‌های کلیدی: عوامل بیولوژیک تغییر یافته ژنتیکی، DNA نوترکیب، انتقال افقی ژن

عوامل میکروبی تغییر یافته ژنتیکی

افزایش دانش بشر از علوم بیولوژی به ویژه علم مهندسی ژنتیک در سه دهه گذشته او را قادر ساخته است که ارگانیسم‌های زنده‌ای با ماهیت متفاوت، ایجاد نماید. این توانایی به حدی رسیده است که هم اکنون با توسل به فن‌آوری‌های جدید همچون DNA نوترکیب و علم ترادف‌یابی اسیدهای نوکلئیک، امکان ایجاد ارگانیسم‌های کاملاً جدید و صنعتی در محیط آزمایشگاهی فراهم گردیده است که در ادامه به مواردی از آن اشاره می‌گردد. در خصوص توسعه سلاح‌های بیولوژیک گفتنی است. انسان توانست با به خدمت گرفتن این فن‌آوری‌ها، تا حدی بر مشکلات و نواقص موجود بر سر راه تولید، ذخیره‌سازی و انتشار عوامل میکروبی کلاسیک فایق آید. در ایجاد و توسعه سلاح‌های میکروبی با کمک علم مهندسی ژنتیک اهداف زیر دنبال می‌گردد.

الف) ایجاد میکرو ارگانیسم‌هایی که در طبیعت هرگز وجود نداشته‌اند

اطلاعات مربوط به ترادف ژنی بیشتر میکروارگانیسم‌ها به صورت آزاد و قابل استفاده در شبکه جهانی اینترنت موجود می‌باشد. سهولت دستیابی به اطلاعات ژنی و ترادف آنها این امکان را فراهم آورده است که با توسل به فن‌آوری DNA نوترکیب بتوان ساختارهای ژنی جدیدی را برای ایجاد میکروارگانیسم‌هایی که در طبیعت هرگز وجود نداشته‌اند، طراحی کرد. مثلاً، ویروس کشنده (Killer Virus) یک ویروس موشی مهندسی ژنتیک شده است و ارتباط نزدیکی با ویروس آبله انسانی دارد. مهندسی ژنتیک با وارد کردن ژن کدکننده سایتوکاین (IL-4) به ویروس آبله موشی این ویروس جدید را حاصل آورده‌اند [۱].

به علاوه عقیده بر آن است که در دهه ۱۹۸۰ منشاء ایجاد و انتشار ویروس HIV از آزمایشگاه‌های مهندسی ژنتیک ارتش آمریکا بوده است [۲]. امروزه ویروس‌هایی که در طبیعت وجود دارند مثل ویروس پولیو (عامل فلج اطفال)، ویروس ابولا و ویروس آنفلونزا

(سویه ۱۹۱۸) را توانسته‌اند به طور صنعتی در آزمایشگاه بسازند [۳].

ب) تبدیل میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا به عواملی که بتوانند به طور مؤثر و کارا توکسین‌ها یا مواد تنظیم‌کننده بیولوژیک (بیورگولاتورها) را تولید کنند

با به کارگیری فن‌آوری کلون‌نمودن ژن می‌توان قطعه ژن کدکننده یک توکسین و یا هر خصوصیت دیگر را به یک میکروارگانیسم بی‌خطر ولی با قدرت تکثیر بالا وارد نمود و آن را در جهت اهداف خصمانه به کارگیری کرد.

فرقه افراطی آنوم شینری کوی که عامل آزادسازی گاز شیمیایی سارین در متروی ژاپن در سال ۱۹۹۵ بودند، توانستند به طور موفقیت‌آمیزی ژن توکسین بوتولین را در باکتری اشریشیا کولی کلون نمایند [۴].

سازمان تحقیقات دفاعی بریتانیا در طی سال‌های ۹۷ - ۱۹۸۷ روی ۲۰ پروژه تحقیقاتی سرمایه‌گذاری کرده است. که در آنها دستکاری‌های ژنتیکی عوامل میکروبی همچون اشریشیا کلی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس برویس، سالمونلا تیفی موریوم، کلستریدیوم پرفرنجنسس، فرانسیسلا تولارنسیس، یرسینیا پستیس و ویروس واکسینیا مدنظر بوده است. هیچ اطلاعاتی از نتایج این پروژه‌ها منتشر نگردیده و مؤسسان این تحقیقات هدف از انجام این پروژه‌ها را مقاصد دفاعی مثل توسعه واکسن‌ها عنوان نمودند [۵].

ج) ایجاد میکروارگانیسم‌های واجد شدت بیماری‌زایی بالا

با در کنار هم قراردادن ژن‌های مختلف که هر کدام یک خصوصیت ویروالانس را رمزدهی نموده و مربوط به میکروارگانیسم خاصی می‌باشند، عوامل میکروبی با توان بیماری‌زایی بالایی ایجاد کرده‌اند. گزارش‌هایی در دست است که نشان می‌دهد یک کمپانی سیبریایی، ویروسی نوترکیب به نام Brain Pox ایجاد نموده که از تلفیق ویروس آبله و ویروس انسفالیت اسبی و نزوتلایی حاصل شده است

[۶]

د) ایجاد میکروارگانسیم‌های مقاوم به عمل آنتی‌بیوتیک‌ها و داروها

با تغییر ژن‌های رمزدهنده پروتئین‌های هدف آنتی‌بیوتیک‌ها، می‌توان از عمل بازدارندگی آنتی‌بیوتیک‌ها بر میکروب‌ها جلوگیری نمود.

روسیه به نوعی از باکتری باسیلوس آنتراسیس (عامل آنتراکس) دست یافته است که واکنش‌ها در ایجاد ایمنی در مقابل آن عاجز هستند [۷].

ه) ایجاد میکروارگانسیم‌های با ساختار آنتی ژنیک تغییر یافته

هر میکروارگانسیمی در طبیعت واجد خصوصیات منحصر به فردی است که به واسطه آن مورد شناسایی سیستم ایمنی میزبان قرار می‌گیرد. مسلماً تغییر در سطح مارکرهای سطحی آنتی ژنیک تمام اقدامات پیشگیرانه همچون کاربرد واکنش‌ها را بی‌حاصل می‌کند.

مثالی که جالب است در این خصوص به آن اشاره گردد، این است که با مقایسه‌ای که از ترادف کامل ژنومی باسیلوس آنتراسیس جدا شده از یکی از قربانیان حوادث اخیر آنتراکس در ایالات متحده آمریکا به عمل آمد، حدود ۶۰ مارکر ژنتیکی جدید شناسایی گردید که بعید نیست دستکاری‌های ژنتیکی باعث حاصل آمدن این باکتری با این خصوصیت شده باشد [۸].

و) ایجاد میکروارگانسیم‌هایی که دوام و پایداری مناسبی را در شرایط محیطی داشته باشند

به غیر از بعضی عوامل همچون باسیلوس آنتراسیس که واجد اسپور مقاوم می‌باشد، بیشتر عوامل میکروبی دوام و پایداری لازمه را جهت تأثیر در شرایط محیطی ندارند. یکی از اهداف در این زمینه، توکسین‌های بیولوژیک می‌باشند که حساسیت زیادی به ویژه در مواقعی که به صورت آئروسول استفاده می‌شوند به عوامل محیطی دارند.

یک مثال با کاربرد صنعتی در این خصوص مربوط به کلون نمودن ژن کدکننده توکسین کریستالین باسیلوس تورنجنسیس داخل

باکتری سودوموناس فلورسانس است. توکسین تولید شده به این روش ثبات بیشتری را در شرایط محیطی از خود نشان داد. مطالعات مختلفی جهت بالابردن پتانسیل استفاده به شکل آئروسول برای توکسین‌های بوتولین، آنروتوکسین B استفیلوکوکوس اورئوس و غیره در شرایط محیطی انجام گردیده است [۲].

ز) ایجاد میکروارگانسیم‌هایی که گروه‌های خاصی را هدف خود قرار می‌دهند (سلاح‌های نژادی)

نسل جدیدی از سلاح‌های میکروبی تحت عنوان سلاح‌های نژادی، نگرانی‌هایی را برای جوامع و نژادهای خاص ایجاد نموده‌اند. این امکان وجود دارد که تصور کنیم یک ویروس دستکاری شده و یا یک ژن در یک باکتری به واسطه وجود یک محصول ژنی خاص (مثلاً پیگمان مربوط به پوست یا رنگ چشم که مشخصه بعضی نژادها می‌باشد) القاء گردد. فرض دیگر این است که تصور نماییم این محصول ژنی خاص به عنوان یک گیرنده برای یک میکروارگانسیم عمل نماید. مثلاً در پاییز ۱۹۹۸ گزارش شد که دولت روسیه سفید دستور ایجاد و توسعه سلاح بیولوژیک مهندسی ژنتیک شده‌ای که به‌طور ویژه‌ای سیاهان را از پای در آورد صادر نموده است. همچنین گزارش‌هایی در دست است که نشان می‌دهد در فلسطین اشغالی روی سلاح‌های بیولوژیکی که به‌طور ویژه اعراب را هدف حمله خود قرار دهند، کار کرده‌اند [۸].

تکنولوژی‌های انتقال ژن و خطرات نهفته در وجود ارگانسیم‌های ترانس ژنیک

مهندسی ژنتیک مجموعه‌ای از تکنیک‌های آزمایشگاهی مورد استفاده برای جداسازی و ترکیب مواد ژنتیکی از گونه‌های مختلف موجودات زنده و سپس تکثیر ساختارهای ایجاد شده در کشت‌های مرسوم باکتری‌ها و ویروس‌ها در آزمایشگاه است. این تکنیک‌ها زمینه انتقال مواد ژنتیکی در بین گونه‌هایی که هرگز در طبیعت با هم آمیزش ژنتیکی ندارند را فراهم می‌آورد. این فن‌آوری، ترکیبات صناعی را برای عبور از سد‌های گونه‌ای و هجوم به ژنوم به کار می‌گیرد. به عبارت دیگر مهندسی ژنتیک، انتقال افقی ژن‌ها (انتقال

ویروس‌ها هم به‌عنوان واسطه‌های داد و ستد ژن و هم به‌عنوان مخازنی برای تکثیر و نوترکیبی به‌کار گرفته می‌شوند. روش‌های بالقوه بسیاری برای انتقال افقی ژن‌ها به گیاهان و حیوانات وجود دارد. به‌نظر می‌رسد ترانسداکسیون شیوه اصلی باشد. چرا که ویروس‌های بسیاری وجود دارند که گیاهان و حیوانات را آلوده می‌کنند. تحقیقات اخیر در ژن درمانی دلالت بر این دارند که ترانسفورماسیون به‌طور بالقوه شیوه مهمی برای سلول‌های پستانداران از جمله انسان است [۹، ۱۱].

خطرات بالقوه انتقال افقی ژن حاصل از مهندسی ژنتیک

الف) انتشار و پخش ژن‌ها و ساختارهای ژنی جدید که تاکنون وجود نداشته‌اند
ب) ورود تصادفی ساختارهای ژنی به‌داخل ژنوم سلول‌های موجودات که این خود منتج به اثرات سوء از جمله ایجاد سرطان می‌گردد
ج) ایجاد ویروس‌هایی که قادرند از سدهای گونه‌ای عبور نمایند و باعث بیماری گردند
د) ایجاد باکتری‌های جدیدی که می‌توانند باعث بیماری شوند
ه) انتشار مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دارویی در میان پاتوژن‌های میکروبی که سبب غیرقابل درمان شدن عفونت‌ها می‌شود
و) پدیده دوباره فعال شدن ویروس‌های خفته (که در تمام سلول‌ها و ژنوم حضور دارند)، ممکن است سبب ایجاد بیماری شود [۹].

دلایلی که نشان می‌دهد DNA ترانس ژنیک ممکن است نسبت به DNA غیرترانس ژنیک قدرت انتشار بیشتری داشته باشد

۱- تمام ساختارها و ژن‌های صناعی از نظر ساختمانی ناپایدارند و در نتیجه مهبای نوترکیبی و انتقال افقی می‌باشند
۲- به‌طور کلی ساختارهای صناعی و ناقلینی که به‌کار گرفته می‌شوند، طوری طراحی شده‌اند که به ژنوم‌های بیگانه هجوم برده و

مستقیم مواد ژنتیکی به‌گونه غیر متجانس و نامربوط را افزایش می‌دهد. به‌منظور غلبه بر سدهای گونه‌ای طبیعی که عمل انتقال و پایداری ژن را محدود می‌کنند، مهندسان ژنتیک انواع مختلفی از ناقلین صناعی (ناقلین ژن‌ها) را از طریق ترکیب قسمت‌هایی از بیشتر ناقلین عفونی‌کننده طبیعی (ویروس‌ها، پلاسمیدها و ترانسپوزون‌ها) از منابع مختلف ایجاد کرده‌اند. این ناقلین صناعی معمولاً عملکرد ایجاد بیماری نداشته، ولی قادرند تا از سدهای گونه‌ای عبور نمایند. ساختارهای صناعی یا DNA ترانس ژنیک، نوعاً متشکل از مواد ژنتیکی مربوط به باکتری‌ها، ویروس‌ها و دیگر پارازیت‌های ژنتیکی می‌باشند. این‌ها دارای ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و یا مقاومت آنتی‌بیوتیکی هستند. انتقال افقی DNA ترانس ژنیک، باعث ایجاد ویروس‌ها و باکتری‌های جدید می‌گردد. ارگانیسم‌های نوظهور توانایی و انتشار ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و دارویی بین عوامل بیماری‌زا را دارا می‌باشند [۹].

انتقال افقی ژن‌ها (مفاهیم و روش‌ها)

انتقال افقی ژن عبارت از انتقال مواد ژنتیکی از طریق فرآیندهایی غیر از تکثیر معمولی بین سلول‌ها یا ژنوم متعلق به گونه‌های غیروابسته و نامربوط می‌باشد. در فرآیندهای معمولی تکثیر، ژن‌ها از طریق عمودی (Vertically) از والد به فرزندان منتقل می‌شوند و این فرآیند فقط داخل یک گونه و یا گونه‌های نزدیک بهم رخ می‌دهد. مثلاً در باکتری‌ها مشخص شده است که ۳ شیوه جهت این عمل در طبیعت وجود دارد. در کانژوگاسیون، مواد ژنتیکی از طریق تماس بین سلول‌ها با کمک پیلی‌های جنسی منتقل می‌شوند. در ترانسداکسیون، مواد ژنتیکی از یک سلول به سلول دیگر از طریق ویروس‌های عفونی منتقل می‌شوند و در ترانسفورماسیون، مواد ژنتیکی مستقیماً از طریق سلول از محیط اطرافش جذب می‌گردد. با وجودی که انتقال افقی ژن یک موضوع کاملاً شناخته شده‌ای در میان باکتری‌ها است، ولی کمتر از ده سال است که این مسئله در میان گیاهان و حیوانات تشخیص داده شده است. حوضه انتقال ژن اساساً کل بیوسفر را شامل می‌گردد و در این میان باکتری‌ها و

کل جمعیت بیوسفر را در معرض هجوم ژنتیکی خود قرار می‌دهند. به خدمت گرفتن این فن‌آوری جهت اهداف خصمانه دغدغه دیگری است. ایجاد میکرو ارگانیسم‌هایی که در طبیعت هرگز وجود نداشته‌اند، تبدیل میکرو ارگانیسم‌های غیربیماری‌زا به عواملی که بتوانند به‌طور مؤثر و کارا توکسین‌ها یا مواد تنظیم‌کننده بیولوژیک (بیورگولاتورها) را تولید نمایند، ایجاد میکرو ارگانیسم‌های واجد شدت بیماری‌زایی بالا، به‌وجود آوردن میکرو ارگانیسم‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، داروها و همچنین مقاوم به عمل واکسن‌ها، ایجاد میکرو ارگانیسم‌های تغییر یافته ایمونولوژیک که نتوان آنها را به طریق روش‌های استاندارد تشخیص و تعیین هویت نمود، تهیه میکرو ارگانیسم‌هایی با ساختار آنتی‌ژنیک تغییر یافته، به‌وجود آوردن میکرو ارگانیسم‌هایی که دوام و پایداری مناسبی را در شرایط محیطی داشته باشند و سرانجام ایجاد میکرو ارگانیسم‌هایی که گروه‌های خاصی را هدف خود قرار دهند (سلاح‌های نژادی)، از عمده نگرانی‌ها در این زمینه به حساب می‌آیند. اکنون باید خطر و عواقب سوء ناشی از این پیشرفت‌ها به‌ویژه در عرصه تولید، تکثیر و توسعه سلاح‌های بیولوژیک را مدنظر قرار داد.

محورهای آمادگی در مورد تهدیدهای حاصله از عوامل میکروبی تغییر یافته ژنتیکی به‌طور عمده شامل موارد زیر می‌باشند: لیست‌بندی عواملی که بالاترین خطر تهدید دستکاری ژنتیکی را دارند و اعلام آنها به مراجع ذیربط (مسئولین بهداشتی، اپیدمیولوژیست‌ها و متخصصین عفونی)، انگشت‌نگاری ژنتیکی عواملی که بالاترین خطر تهدید استفاده را به‌عنوان یک جنگ‌افزار بیولوژیک دارند، به‌کارگیری و توسعه روش‌هایی که به‌توان به سرعت انواع عوامل موتان یافته را شناسایی و غربال کرد، از اهمیت فراوان برخوردار است. به‌علاوه انجام مطالعات و آزمایشات تهیه و تولید واکسن‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهایی که در پیشگیری و درمان احتمالی عوامل موتان یافته مؤثر و کارا باشند، ضروری است.

بر سدهای گونه‌ای فائق آیند

۳- مکانیسم‌هایی که ژن‌های بیگانه را قادر می‌سازد به‌داخل ژنوم وارد شوند، همچنین قادر می‌سازد تا آنها برای ورود دوباره در مکان دیگر یا به ژنوم دیگر مجدداً از آن خارج شوند

۴- ژن‌های ترانس ژنیک واجد نقاط نوترکیبی هستند و بنابراین، پتانسیل بالقوه را جهت انتقال افقی دارا می‌باشند

۵- پروموتورهای ویروسی که به‌طور گسترده‌ای برای بیان ژن‌های انتقالی استفاده می‌گردند واجد نقاط نوترکیبی هستند و از این‌رو، انتقال افقی ژن را افزایش می‌دهند

۶- فشار متابولیکی ارگانیسم میزبان که ناشی از بیان بیش از اندازه ژن وارد شده می‌باشد، ممکن است در ناپایداری ژن انتقالی دخیل باشد.

۷- ساختارهای ژنی بیگانه و ناقصین که داخل آنها پردازش صورت گرفته است، نوعاً موزائیک‌هایی از توالی‌های DNA از گونه‌های متعدد و پارازیت‌های ژنی مربوط به آنها می‌باشند که بدین معنا است که آنها هومولوژی‌هایی از نظر توالی با مواد ژنتیکی گونه‌ها و پارازیت‌های آنها را دارند و بنابراین انتقال افقی ژن و نوترکیبی را در طیف وسیعی از موجودات تسهیل می‌نماید [۱۲، ۱۳].

بحث و نتیجه‌گیری

پیشرفت‌هایی که در عرصه بیولوژی به‌ویژه علم مهندسی ژنتیک در طی بیست سال گذشته حاصل گردیده از طرفی در برطرف‌سازی بعضی نیازهای بشر در ابعاد مختلف مؤثر بوده است. از جانب دیگر دست‌ورزی‌های بشر در محتوی ژنتیکی موجودات زنده و حتی ایجاد ساختارهای ژنی و ارگانیسم‌های کاملاً جدید، نگرانی‌های زیادی را به‌دنبال داشته است. مهندسی ژنتیک از ساختارهای ژنی صنایع برای غلبه بر سدهای طبیعی گونه‌ای بهره‌می‌برد و از آنجایی که این ساختارها و محصولات حاصله (گیاه، باکتری، ویروس و سایر موجودات ترانس ژن شده) محتوی ژنتیکی ناپایداری پیدا می‌کنند،

منابع

- 1- Nowak R(2001). Killer virus:An engineering mouse virus leaves us one step away from the ultimate bioweapon.News. Jane 10.
- ۲- حسینی دوست ر، حاجیا م، حسینی م، سلیمی ح، رنجبر ر و ابوالقاسمی ح (۱۳۸۱). بیوتروریسم و سلاح‌های بیولوژیک. فصل ۶، انتشارات اندیشمند، تهران، ایران، صفحات: ۱۶۷-۱۵۷.
- 3- <http://www.newscientist.com/news/news.jsp?id=ns99992555>
- 4- Genetic engineering and biological weapons(1999). Genewatch. Briefing number 6 June, P: 1 – 4.
- 5- Written Answers, Hansard(1997). number 27 Col: 601 – 602.
- 6- Rhichard Preston in genetic engineering new march 1(1998), p.6
- 7- <http://www.geocities.com/micro2052000/warfare.htm>
- 8- Read TD, Salzberg SI, etal (2002). Coparative genome. sequencing for discovery of novel polymorfism in Bacillus anthracis, Science; 296:1976 –9
- 9- <http://www.i-sis.org.uk/horizontal.php>
- 10- Lorenz MG, and Wackernagel W(1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. Microbiol Rev; 58: 563 - 602.
- 11- Ho MW, Ryan A, Cummins J, and Traavik T(2000a). Unregulated Hazards: Naked and Free Nucleic Acids, ISIS & TWN Report, London and Penang. www.i-sis.org.uk.
- 12- Old R W, and Primrose S B(1994). Principles of Gene Manipulation, 5th ed. Blackwell Science, Oxford, Kumpatla, S P, Chandrasekharan, M.B., Iuer LM, Li, G, and Hall, TC(1998). Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. Trends in Plant Sciences; 3: 96 - 104.
- 13- Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DASSS and Christou P(1999). Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. The Plant Journal; 17: 591 - 601