راهکارهای نوین دستورزی ژنوم برای اصلاح صفات مهم زراعی برنج

علی پاکدین پاریزی *

استادیار، پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران

*Email: a.pakdin@sanru.ac.ir

چکیده

برنج بعد از گندم نقش مهمی در تأمین غذا و کالری مورد نیاز مردم ایران دارد. انجام تحقیقات بمنظور رفع چالش‌های موجود در افزایش و تولید پایدار برنج جزو اهداف راهبردی کشور در جهت حصول به امنیت غذایی و سلامت جامعه می‌باشد. اصلاح ارقام موجود و معرفی رقم‌های جدید با خصوصیات بهبود یافته نیازمند وجود تنوع ژنتیکی در مواد اصلاحی و سازگاری آنها با یکدیگر است. با توجه به فعالیت‌های به‌زراعی، این تنوع در حال کاهش بوده و نیازمند بکارگیری روش‌هایی مانند استفاده از مواد شیمیایی و یا پرتوتابی برای ایجاد تغییرات ژنتیکی (تنوع) جدید می‌باشد. این روش‌ها غیراختصاص بوده و تغییرات بصورت تصادفی در ژنوم ایجاد می‌شوند که ممکن است حتی زمان برنامه‌های اصلاحی را افزایش دهند. استفاده از تکنولوژی‌های زیستی جدید برای دستورزی هدفمند ژنوم فارغ از نگرانی‌های گیاهان تغییریافته ژنتیکی مرسوم نویدبخش کاهش مدت زمان لازم برای تولید ارقام جدید و مهیا کردن استراتژی‌های انتخابی برای دستیابی به امنیت غذایی پایدار را به همراه دارد. در مقاله حاضر انواع روش‌های نوین دستورزی ژنوم به اختصار تعریف شده و مثال‌هایی از کاربرد هر کدام در اصلاح برنج آورده شده است.

واژه‌های کلیدی: ویرایش ژنوم، دستورزی هدفمند ژن، برنج، TALEN، CRISPR/Cas9

مقدمه

برنج (*Oryza sativa*) یکی از مهمترین گیاهان زراعی است که تغذیه حدود نیمی از مردم جهان به آن وابسته می‌باشد. از این گیاه بعنوان مدل گیاهان تک لپه برای مطالعه و تجزیه و تحلیل نحوه عملکرد ژن بطور گسترده استفاده می‌شود. ژنوم برنج در زیرگونه‌های ژاپونیکا و ایندیکا بطور کامل توالی‌یابی شده و اطلاعات بسیاری برای روش ساختن عملکرد ژن در سطح ژنوم مهیا کرده است. برای ایجاد تنوع و تهیه موتانت‌های جدید برنج از مواد جهش‌زای شیمیایی و جهش زایی با اشعه بطور گسترده استفاده شده است. با استفاده از این روش‌ها نمی‌توان یک ژن خاص را هدف قرار داد و نیازمند کار زیاد برای شناسایی و انتخاب فنوتیپ موردنظر می‌باشد (الیور، ۲۰۱۴).

ویرایش ژنوم (تغییر هدفمند یک ژن)، امکان تولید ترکیبات آللی جدید در ژنوم گونه‌های زراعی را فراهم می‌کند، که می‌تواند جایگزین روش‌های اصلاحی استاندارد مبتنی بر نوترکیبی و همچنین ترانسفورماسیون باشد (آنیلی و همکاران، ۲۰۱۳). تکنولوژی‌های ZFNها (Zinc finger nucleases)، TALENها(Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)) و CRISPRها (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs)) از توانایی منحصر به فرد نوکلئازهای اختصاصی توالی برای ویرایش بسیار دقیق و موثر مولکول DNA یا ژن‌ها استفاده می‌کنند (بالتس و ویتاس، ۲۰۱۵). این تکنیک‌ها نوید دهنده

جهش بزرگ در فرایند تولید و معرفی ژنوتیپ‌های گیاهان زراعی با صفات ارزشمند جدید که دستیابی به آنها در یک بازه زمانی معقول توسط تکنیک‌های مرسوم اصلاحی امکانپذیر نیست، می‌باشند.

نوکلئازهای انگشت روی (ZFNها)

ZFNها در سال ۱۹۹۶ کشف شدند و بدنبال آن در آزمایشات مهندسی ژنتیک مگس سرکه و سلول‌های پستانداران در سال ۲۰۰۲ مورد استفاده قرار گرفتند (بیبیکووا و همکاران، ۲۰۰۳). ZFNها متشکل از دمین برش غیراختصاصی DNA از اندونوکلئاز *Fok*I همراه با پروتئین‌های "انگشت روی" می‌باشند. دایمرهای ZFN برش هدفمند در DNA دو رشته‌ای را القا کرده که منجر به تحریک مسیرهای پاسخ ترمیم DNA می‌گردد. خاصیت اختصاصی بودن اتصال دمین "انگشت روی" طراحی شده، ZFN را به سمت جایگاه ژنومی مورد نظر هدایت می‌کند (اورنف و همکاران، ۲۰۱۰). ZFNها نخستین نسل از نوکلئازهای اختصاصی جایگاه می‌باشند که برای ویرایش ژنوم گیاهان استفاده شده‌اند. تحقیقات بسیاری با استفاده از ZFNها در زمینه ویرایش ژنوم انجام گرفته است، با این‌وجود بدلیل مشکل و هزینه‌بر بودن دستورزی ساختارهای ZFN گسترش کاربرد آنها به کندی انجام می‌شود (سانجانا و همکاران، ۲۰۱۲).

TALENها

پاتوژن گیاهی زانتوموناس می‌تواند در حین آلوده کردن گونه‌های میزبان مختلف، عوامل شبه فعال‌کننده رونویسی (TALEها) را ترشح کند که سبب تسهیل آلودگی باکتریایی می‌شوند. TALE ها دارای چندین دمین تکراری ۳۳ تا ۳۵ اسید آمینه‌ای می‌باشند که هر کدام از آنها یک باز را تشخیص می‌دهند. TALENها از ادغام دمین هضمی آنزیم *Fok*I و دمین‌های متصل شونده به DNA حاصل از پروتئین‌های TALE بوجود می‌آیند. همانند ZFNها، TALENها برش هدفمند در DNA دو رشته‌ای را القا کرده که پاسخ‌های ترمیمی سلول را در پی خواهد داشت. استفاده از سیستم TALEN امکان ایجاد تغییرات هدفمند در ژنوم را فراهم می‌کند (کرماک و همکاران، ۲۰۱۱).

CRISPRها

CRISPRها جایگاه‌هایی هستند که دارای چندین توالی تکراری مستقیم کوتاه بوده و سبب ایمنی اکتسابی باکتری‌ها و آرکی‌ها در برابر ویروس‌ها یا اسیدهای نوکلئیک خارجی می‌شوند (بارانگو و همکاران، ۲۰۰۷). سیستم‌های CRISPR مبتنی بر crRNA (CRISPR RNA) و tracrRNA (trans-activating chimeric RNA) برای خاموش کردن اختصاصی DNA خارجی مهاجم می‌باشند. سه نوع سیستم CRISPR/Cas وجود دارد که در نوع دوم Cas9 بعنوان یک اندونوکلئاز DNA هدایت شونده با RNA که DNA را با واسطه شناسایی توالی هدف با crRNA-tracrRNA برش می‌دهد، عمل می‌کند (کنگ و همکاران، ۲۰۱۳).

توانایی سیستم CRISPR/Cas9 در دستورزی هدفمند ژنوم بسیاری از گونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است (جیانگ و همکاران، ۲۰۱۳؛ جیا و همکاران، ۲۰۱۴). کاربردهای این سیستم در کشاورزی مشکلات نظارتی کمتری نسبت به کاربردهای پزشکی داشته و انتظار می‌رود در برخی از بازارها، برگشت بودجه سرمایه‌گذاری شده به سرعت انجام شود. کمپانی داو آگروساینسز همراه با سانگامو بایوساینسز حقوق مالکیت معنوی توسعه گیاهان زراعی تراریخته با استفاده از Cas9 را در اختیار گرفته‌اند. در حالیکه USDA هنوز در زمینه چگونگی رفتار با ژنوم‌های ویرایش شده با استفاده از Cas9 تصمیمی اتخاذ نکرده اما در حال حاضر ZFNها و TALENها نیازی به نظارت USDA ندارند (گلوریکیان، ۲۰۱۵).

استفاده از تکنولوژی‌های نوین دستورزی ژنوم در برنج

بمنظور تبدیل تکنولوژی‌های ویرایش ژنوم به راهکارهای روتین برای تغییر هدفمند ژن در برنج تحقیقات متعددی انجام گرفته است. چن و همکاران در سال ۲۰۱۴ دستورالعمل‌های لازم برای ایجاد جهش هدفمند در ژنوم برنج با استفاده از سیستم TALEN را ارائه کردند. این دستورالعمل‌ها شامل سرهمبندی TALENها با استفاده از سیستم Golden Gate و ساخت ناقل‌های بیان گیاهی، تایید فعالیت TALEN در پروتوپلاست برنج، ترانسفورماسیون TALEN در برنج و غربالگری گیاهانی که ژن مورد نظردر آنها خاموش شده، می‌باشد (چن و همکاران، ۲۰۱۴). با استفاده از سیستم‌های مبتنی بر TALEN می‌توان طیف گسترده‌ای از جهش‌های قابل توارث در برنج بمنظور بهبود صفات مهم زراعی تولید کرد (ژانگ و همکاران، ۲۰۱۶).

در حین انبارداری برنج، دانه‌ها به تدریج زنده‌مانی خود را از دست داده و طعم کهنه‌گی بخود می‌گیرند که سبب خسارت اقتصادی به کشاورزان می‌شود. لیپوکسی‌ژنازها با دای‌اکسیژناسیون اسیدهای چرب چند زنجیره‌ای غیر اشباع در برنج یکی از مهمترین عوامل ایجاد این تغییر می‌باشند. آنزیم LOX3 نقش مهمی در ماندگاری دانه برنج ایفا می‌کند. عملکرد بیوشیمیایی، مکان‌یابی درون سلولی و الگوی بیان ژن *lox3* مورد بررسی قرار گرفته و نقش آن در ماندگاری دانه ارزیابی شده است. ممانعت از بیان ژن *lox3* با استفاده از تکنیک آنتی‌سنس (RNAi) مطالعه شده و افزایش زمان انبارداری دانه‌های برنج را نشان داده است. در تحقیقات اخیر، ژن *lox3* با استفاده از سیستم TALEN خاموش شده و بذرهایی که دارای ژن خاموش شده بودند از قابلیت انبارداری بهتری برخوردار بودند. مزایای سیستم TALEN در مقایسه با روش‌های مرسوم تولید گیاهان تراریخته و همچنین اصلاح با هیبریداسیون، توانایی تغییر دقیق و اختصاصی ژن مورد نظر می‌باشد. در مقایسه با دستورزی ژن با RNAi که ناقص و ناپایدار است، تغییرات اعمال شده توسط سیستم TALEN به نسل‌های آتی بصورت پایدار به ارث می‌رسند. گیاهان حاصل از دستورزی هدفمند با استفاده از سیستم TALEN فاقد ترانس‌ژن‌های خارجی بوده و مشابه موتانت‌های طبیعی می‌باشند و از آنجائیکه لاین‌های اصلاح شده با TALEN نیاز به چندین نسل غربالگری ندارند به میزان زیادی در زمان صرفه‌جویی می‌شود (ما و همکاران، ۲۰۱۵).

عطر برنج باسماتی و جاسمین بدلیل حضور ترکیب ۲- استیل – ۱- پیرولین می‌باشد. واریته‌های برنج بدون عطر برخلاف واریته‌های معطر دارای مقادیر بسیار اندکی از این ترکیب هستند. یک ژن مغلوب روی کروموزوم شماره ۸ برنج به میزان زیادی میزان ۲- استیل -۱- پیرولین را کنترل می‌کند. نشانگرهای ژنتیکی برای انتخاب این صفات در برنامه‌های اصلاحی توسعه یافته است (بردبوری و همکاران، ۲۰۰۵). تولید برنج معطر با خاموش کردن هدفمند ژن *OsBADH2* توسط سیستم TALEN مورد بررسی قرار گرفته است. لاین‌های برنج تراریخته بدست آمده پس از تفرق در نسل‌های اول و دوم تنها دارای توالی DNA مورد نظر بوده و ترانسژن TALEN در آنها حضور نداشت. میزان تولید ۲- استیل -۱- پیرولین در لاین‌های تراریخته نسل اول دارای جهش‌های هموزیگوس از ۰ به ۰/۳۵ تا ۰/۷۵ میلی‌گرم در کیلوگرم افزایش یافت که برابر با محتوای آن در لاین کنترل معطر می‌باشد (شان و همکاران، ۲۰۱۵).

با استفاده از سیستم TALEN با تغییر هدفمند باز در توالی DNA و نوترکیبی همولوگ، برنج مقاوم به علف‌کش تولید شده است. با این سیستم، دو جهش نقطه‌ای در ژن استولاکتات سنتاز برنج برای تولید لاین‌های برنج مقاوم به علف‌کش ایجاد شده است. گیاهان ویرایش شده نسل اول از نظر شکل ظاهری طبیعی بوده و تفاوتی با گیاهان کنترل نداشتند درحالیکه مقاومت بالایی به علف کش بیس‌پیریباک سدیم نشان دادند (لی و همکاران، ۲۰۱۶).

بلایت باکتریایی که توسط زانتوموناس ارایزا ایجاد می‌شود یکی از شایع‌ترین بیماری‌های گیاه برنج می‌باشد. با استفاده از TALENها مقاومت به این بیماری در برنج ایجاد شده است. برای بیماری‌زایی این باکتری بیان ژن ترانسپورتر قند (*Os11N3*) که ژن حساسیت شناخته می‌شود، ضروری است. برای فعال کردن *OS11N3* باکتری مولکول‌های تاثیرگذاری که به پروموتور ژن

متصل می‌شوند را ترشح می‌کند. حذف جزئی (۵ تا ۱۰ جفت باز) از یک ناحیه اختصاصی در پروموتور *OS11N3* با استفاده از TALENها مانع از القای بیان این ژن توسط باکتری و در نتیجه مقاومت بالا به آلودگی توسط این پاتوژن می‌گردد. با وجود تغییر در پروموتور، عملکرد اساسی ژن *OS11N3* بدون تغییر باقی می‌ماند. دقت بالای این روش وجه تمایز آن با روش‌های القای جهش تصادفی می‌باشد که باید وارینت‌های مختلف پروموتور برای موثر بودن در برابر باکتری جداگانه مورد بررسی قرار گیرند (لی و همکاران، ۲۰۱۲).

خاموش کردن چندین ژن با ایجاد موتاسیون خارج از ژن هدف با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 در برنج انجام گرفته است. گیاهان دارای چندین کیناز وابسته به سایکلین (CDK) می‌باشند که در ۶ نوع، CDKA تا CDKF، گروه بندی می‌شوند. در برنج توالی‌های اسیدآمینه (CDKA1 و CDKA2) CDKA و CDKB2 با هم دارای مشابهت می‌باشند که خاموشی همزمان آنها با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 مورد بررسی قرار گرفته است. با استفاده از این تکنیک می‌توان ژن‌های مضاعف شده را حتی اگر اطلاعات ژنومی ناقص و یا جزئی در دسترس باشد را بطور همزمان مورد دستورزی قرار داد (اندو و همکاران، ۲۰۱۴).

حذف قطعات بزرگ کروموزومی (۱۱۵ تا ۲۴۵ کیلو باز) و تغییرات ژنتیکی کوچک وراثت‌پذیر در برنج با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و همچنین توارت پذیری تغییرات در نسل‌های بعد مورد مطالعه قرار گرفته است. کارایی سیستم‌های طراحی شده برای تغییر چهار ژن دخیل در انتقال قند (SWEET genes) در گیاهان تراریخته نسل صفر، ۸۷ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده و توارث صفات به نسل‌های دوم و سوم مورد تایید قرار گرفته است. بر اساس نتایج بدست آمده، سهولت استفاده از این سیستم برای ایجاد حذف‌های کروموزومی بزرگ و همچنین حذف همزمان کلاسترهای ژنی مجزا نشان داده شده است. از این سیستم می‌توان برای مهندسی کروموزوم و تولید لاین‌های تحقیقاتی دارای کروموزوم‌های جایگزین‌شده، دارای جابجایی، با کروموزوم اضافه و یا حذف شده استفاده کرد (ژو و همکاران، ۲۰۱۴).

با اینکه قابلیت برنامه‌ریزی و تطابق بالای Cas9، سیستم CRISPR را به روشی منحصر به فرد و عالی برای دستورزی و ویرایش ژنوم تبدیل کرده است، اما انتخاب هر کدام از تکنیک‌های ویرایش ژنوم (ZFNها، TALENها و CRISPR/Cas9) به عواملی مانند مشخص بودن توالی مورد نظر، نوع تغییر در ژنوم، هزینه، امکانات و سهولت آزمایش بستگی خواهد داشت (بوتچر و مکمانوس، ۲۰۱۵).

بطور کلی توسعه تجاری تکنیک های نوین اصلاح نبات را می‌توان با توجه به مزیت‌های تکنولوژیکی (توانایی تولید واریته‌هایی که تولید آنها با سایر تکنولوژی‌ها امکانپذیر نیست) یا اقتصادی (هزینه‌های تولید کمتر بدلیل فرایند اصلاح سریعتر) آنها توجیه نمود. هرچند وجود موانع تکنیکی (کارایی کم) یا اقتصادی (هزینه‌هایی که صرف نظارت و کنترل آنها می‌شود) از عوامل بازدارنده این تکنیک‌ها می‌باشند. علاوه براین حقوق مالکیت معنوی که بطور گسترده در کشورهای اروپایی و آمریکا با به ثبت رساندن اختراعات متعدد زمینه استفاده عمومی از این تکنیک ها را محدود می‌کند و همچنین عدم قطعیت قوانین نظارتی و عدم اطمینان از میزان پذیرش محصولات توسط مصرف کنندگان از دیگر موانع استفاده از این تکنولوژی‌ها می‌باشند.

منابع مورد استفاده

1. Ainley, W.M., Sastry-Dent, L., Welter, M.E., Murray, M.G., Zeitler, B., Amora, R. and Simpson, M.A. 2013. Trait stacking via targeted genome editing. Plant biotechnology journal, 11(9): 1126-1134.
2. Baltes, N., and Voytas, D. 2015. Enabling plant synthetic biology through genome engineering. Trends Biotechnol. 33:120–131.

3. Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S. and Horvath, P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science, 315(5819): 1709-1712.
4. Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K. and Carroll, D. 2003. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. Science, 300(5620): 764-764.
5. Boettcher, M., and McManus, M.T. 2015. Choosing the right tool for the job: RNAi, TALEN, or CRISPR. Molecular cell, 58(4): 575-585.
6. Cermak, T., Doyle, E.L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C. and Voytas, D.F. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic acids research, gkr218.
7. Chen, K., Shan, Q. and Gao, C. 2014. An efficient TALEN mutagenesis system in rice. Methods, 69(1): 2-8.
8. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N. and Zhang, F. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science, 339(6121): 819-823.
9. Endo, M., Mikami, M. and Toki, S. 2014. Multi-gene knockout utilizing off-target mutations of the CRISPR/Cas9 system in rice. Plant and Cell Physiology, pcu154.
10. Gaj, T., Gersbach, C. A. and Barbas, C.F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends in biotechnology, 31(7): 397-405.
11. Glorikian, H. 2015. Gene Editing Will Change Everything—Just Not All at One Time. [ONLINE] Available at: http://www.genengnews.com/insight-and-intelligence/gene-editing-will changeeverything-just-not-all-at-one-time/77900351/.
12. Jia, H. and Wang, N. 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. PLoS ONE 9(4): e93806.
13. Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. and Weeks, D.P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic acids research, gkt780.
14. Li, T., Liu, B., Chen, C. Y. and Yang, B. 2016. TALEN-mediated homologous recombination produces site-directed DNA base change and herbicide-resistant rice. Journal of Genetics and Genomics, 43(5): 297-305.
15. Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D.P. and Yang, B. 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. Nature biotechnology, 30(5): 390-392.
16. Ma, L., Zhu, F., Li, Z., Zhang, J., Li, X., Dong, J. and Wang, T. 2015. TALEN-based mutagenesis of lipoxygenase LOX3 enhances the storage tolerance of rice (*Oryza sativa*) seeds. PloS one, 10(12): e0143877.
17. Oliver, M.J. 2014. Why we need GMO crops in agriculture, MO Med. 111(6): 492–507.
18. Sanjana, N.E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M.M., Feng, G. and Zhang, F. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. Nature protocols, 7(1): 171-192.
19. Shan, Q., Zhang, Y., Chen, K., Zhang, K. and Gao, C. 2015. Creation of fragrant rice by targeted knockout of the *OsBADH2* gene using TALEN technology. Plant biotechnology journal, 13(6): 791-800.
20. Shan, Q., Wang, Y., Li, J. and Gao, C. 2014. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. Nature protocols, 9(10): 2395-2410.
21. Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S. and Gregory, P.D. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. Nature Reviews Genetics, 11(9): 636-646.
22. Zhang, H., Gou, F., Zhang, J., Liu, W., Li, Q., Mao, Y. and Zhu, J.K. 2016. TALEN-mediated targeted mutagenesis produces a large variety of heritable mutations in rice. Plant biotechnology journal, 14(1): 186-194.