سارا کبیرنتاج
s.nataj@takato.ir
کارشناس تحقیقات مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

بهبودهای حاصل در دانه‌های روغنی به کمک بیوتکنولوژی مدرن

(گیاه کلزا-قسمت دوم)

Oilseed crops improvement with the help of modern biotechnology (canola seed, part ۲)

مقاومت به علف کش

مدیریت علف‌های هرز، یک از مشکلات اصلی در زراعت کلزا است. از اینرو ارقام تغییر یافته کلزا که برای تحمل به علف کش و برای حل معضل کنترل علف‌های هرز طراحی شده است، بیشترین سهم ارقام تجاری مورد استفاده از مساحت زمین‌های زراعی کلزا را به خود اختصاص می دهد. محصولات زراعی مقاوم به علف‌کش می‌توانند با استفاده از روش‌های سنتی اصلاح نباتات، از طریق انتقال ژن و اخیراً با استفاده از فناوری ویرایش ژنوم گیاهان، ایجاد می شوند. با این وجود در استفاده از روش‌های اصلاح نباتات سنتی و مهندسی ژنتیک گیاهی، نکات منفی از قبیل وقت‌گیر بودن، احتمال موفقیت پایین و مسائل مربوط به پذیرش عمومی و مقررات ایمنی زیستی وجود دارد. بنابراین برای نیل به این هدف، استفاده از فناوری‌های ویرایش ژنوم دقیق‌تر و موثرتری مورد نیاز است. در حال حاضر روش‌های ویرایش ژن مبتنی بر CRISPR/Cas به طور گسترده برای توسعه محصولات زراعی با صفات بهبود یافته مانند مقاومت به علف کش استفاده می‌شود. به طور کلی تا به امروز، گیاهان مقاوم به علف کش در دو دسته جای گرفته‌اند: دسته‌ی اول گیاهانی هستند که بواسطه‌ی انتقال ژن‌هایی با منشا باکتریایی و با قابلیت تجزیه سم و یا غیرفعال کردن آنزیم هدف، ایجاد شده‌اند (جدول ۱). بر اساس اطلاعات پایگاه داده ISAAA[۱] خلاصه‌ای از کلزاهای تراریخت مقاوم به علف‌کش که تجاری-سازی شده‌اند، جمع‌آوری و در جدول ۱ درج شده‌است. این گیاهان تراریخت، با استفاده از ژن‌هایی که می‌توانند مقاومت خاصی در برابر انواع مختلف علف کش‌ها به وجود آورند، تولید شده اند. برخی از این ژن‌ها مانند *bxn*، *bar*، *pat* و *GAT۴۶۰۱* از باکتری‌ها منشا گرفته‌اند و هیچگونه همولوگی از آنها در گیاهان گزارش نشده است، بنابراین فقط می‌توانند جهت فناوری انتقال ژن یعنی تغییر ژنتیکی بواسطه‌ی بیان ژن‌های خارجی مورد استفاده قرار گیرند (جدول ۱).

جدول ۱- لیست کلزاهای تجاری تراریخت مقاوم به علف کش بر اساس اطلاعات وبسایت ISAAA تا سال ۲۰۱۹

نام علف‌کش	ژن	منبع ژن	محصول ژن	عملکرد محصول ژن
Glufosinate (گلوفوزینات-باستا)	*bar*	*Streptomyces hygroscopicus*	آنزیم فسفینوتریسین-ان-استیل ترنسفراز	علف‌کش گلوفوزینات را با استیله کردن آن غیرفعال می‌کند
	pat	*Streptomyces viridochromogenes*		
Oxynil	*bxn*	*Klebsiella pneumoniae* subsp. ozaenae	آنزیم بروموکسینیل نیتریلاز	سمیت سموم اوکسینیل مانند بروموکسینیل را از بین می‌برد

[۱] (https://www.isaaa.org/gmapprovaldatabase)

Glyphosate (گلیفوزات)	*GAT٤٦٠١*	*Bacillus licheniformis*	آنزیم گلایفوزیت استیل ترنسفراز	با غیر فعال کردن گلایفوزیت، منجر به مقاومت گیاه می‌شود
	goxv٢٤٧	*Agrobacterium tumefaciens* strain CP٤	آنزیم گلایفوزیت اکسیداز	با تخریب گلیفوزات به آمینومتیل فسفونیک اسید و گلیوکسیلات منجر به تحمل به علف کش می‌شود
	cp٤epsps	*Ochrobactrum anthropi* strain LBAA	فرم متحمل به علف کش آنزیم EPSPS	با کاهش میل ترکیبی گلیفوزات، منجر به افزایش تحمل گیاه به سم می‌شود

دسته‌ی دوم گیاهانی تغییریافته با آنزیم‌های موتانت هستند. این آنزیم‌ها نقش حیاتی در مسیرهای بیوسنتزی داشته و بنابراین اغلب توسط سموم علف‌کش مورد هدف قرار می‌گیرند. در این روش، القای جهش در توالی آمینواسیدی آنزیم‌ها موجب می‌شود که آنزیم علی رغم حفظ عملکرد خود، در برابر سم مورد نظر غیرحساس شود. در گذشته، القای جهش به کمک عوامل جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی صورت می‌گرفت، بنابراین جهش‌ها تصادفی بوده و بذور جهش‌یافته بر اساس صفت مورد نظر غربال می‌شدند. امروزه با پیدایش تکنیک کریسپر و با توجه به توانمندی این تکنیک در تغییر توالی ژن و در نتیجه آمینواسیدها، موتاسیون در آنزیم‌ها، کاملا هدفمند و برنامه‌ریزی شده انجام می‌شود. برای مثال در مطالعات متعددی گزارش شده است که جهش در آنزیم ALS (acetolactate synthase) در ایجاد مقاومت در دسته‌ی بسیار بزرگی از سموم که این آنزیم را مورد هدف قرار می‌دهند به کار رفته است. در گیاه کلزا نیز در گزارشات متعددی اشاره شده است که تغییر در آمینواسید شماره ۱۸۲ آنزیم ALS و تبدیل آن از پرولین به سرین، منجر به ایجاد مقاومت مطلوبی در برابر علف‌کش‌های دسته‌ی سولفونیل اوره خواهد شد (Wu ۲۰۲۰, Fartyal et al. ۲۰۱۸).

مقاومت به تنش‌های زیستی و غیر زیستی

تنش‌های زیستی و غیرزیستی با تحریک مسیرهای سیگنالینگ، منجر به فعال شدن شبکه‌های مولکولی درگیر در بیان ژن‌ها و متابولیت‌های مرتبط با استرس خواهند شد که در نهایت جهت ایجاد تغییرات مورد نیاز برای سازگاری و پاسخ به استرس مورد استفاده قرار می‌گیرند. در دسترس بودن توالی ژنوم *B. napus* از سال ۲۰۱۴، منجر به شناسایی و توصیف چندین خانواده ژن پاسخگو به استرس در این گیاه شده است. این خانواده‌ها شامل فاکتورهای رونویسی، ناقل‌ها، کینازها و بسیاری از آنزیمهای دیگر می‌باشد. پنج تا هفت درصد از ژنوم گیاهان را فاکتورهای رونویسی تشکیل می‌دهند که در میان انواع مختلف آنها، WRKY، NAC و AP۲/ERF تنها مختص گیاهان هستند. دستکاری ژنتیکی بیان فاکتورهای رونویسی، بر کاهش یا افزایش تحمل استرس‌های غیرزیستی، تاثیر بالایی دارد زیرا بیشتر آنها در پاسخ زودهنگام به استرس نقش داشته و بیان ژنهای پاسخگو به استرس را کنترل می‌کنند. فاکتورهای رونویسی AP۲/ERF می‌توانند پاسخ به محرک‌های مختلف را ادغام کرده و در شبکه‌های پاسخگو به استرس شرکت کنند. نتایج برخی تحقیقات نشان می‌دهد انتقال فاکتور رونویسی *AtDREB۲C* (از خانواده‌ی بزرگ AP۲/ERF) از گیاه

آرابیدوپسیس به کلزا منجر به افزایش مقاومت این گیاه به تنش شوری به وسیله‌ی حفظ بیشتر آب، تجمع بیشتر یون سدیم و رشد بهتر گیاه شد.گروه بعدی ناقل‌ها هستند. ناقل‌ها دسته‌ایی از پروتئین‌های غشایی هستند که جابجایی انتخابی مولکول‌ها در غشای سلولی را بر عهده دارند. ناقل‌ها نقش مهمی در پاسخ به استرس‌های غیرزیستی ایفا می‌کنند زیرا کنترل ترافیک یون‌ها و سایر مولکول‌های زیستی مانند هورمون‌ها و املاح سازگار در هنگام استرس برای حفظ فرآیندهای حیاتی سلولی مانند هموستاز یونی، تنظیم اسمزی، انتقال سیگنال و سم زدایی بسیار مهم است. تا کنون خانواده‌های متعددی از ناقل‌ها در کلزا شناسایی شده‌اند که اغلب آنها در مواجه با خشکی، شوری، دمای بالا و پایین، فلزات سنگین و تیمارهای هورمونی شرکت دارند. برای مثال مطالعات نشان می‌دهند کلزای تراریخت دارای ژن بیش بیان شده‌ی *AtNHX1* از خانواده‌ی NHX، می‌تواند شرایط شوری بالا را تحمل کرده و رشد کند. این اطلاعات نشان دهنده‌ی اهمیت استفاده از ژن‌های آنتی‌پورتر در ایجاد گیاه کلزا مقاوم به شوری می‌باشد (Lohani et al. ۲۰۲۰).

مسیرهای سیگنالینگ آبشاری MAPK[۲] و کانال‌های انتقال سیگنال برای بیان ژن‌های پاسخگو به تنش، از طریق فسفریلاسیون کنترل می‌شوند. درواقع کینازهای MAPK به واسطه‌ی فسفریلاسیون، با خاموش و روشن کردن ژن‌ها، مسیرهای پایین دستی را کنترل می‌کنند. ژن‌های سنتز کننده‌ی این آنزیم ها نقش بسیار مهمی در افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های غیر زیستی دارند. برای مثال ونگ و همکارانش در سال ۲۰۱۴ گزارش کردند که بیش بیان ژن *MAPK1* در گیاه کلزا منجر به افزایش مقاومت به تنش خشکی شد. این مقاومت از طریق گسترش و بهبود رشد ریشه در تنش خشکی صورت گرفت (Weng et al, ۲۰۱۴). ایجاد مقاومت به تنش‌های زیستی در گیاه کلزا نسبت به تنش‌های غیر زیستی، کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است. برای مثال مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۶ در زمینه‌ی پوسیدگی ساقه اسکلروتینیا ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* انجام شده است، نشان می‌دهد انتقال ژن *defensin* از منبع *Raphanus sativus* و ژن سنتز کننده آنزیم کیتیناز از منبع *Trichoderma atroviride* به گیاه کلزا منجر به مهار رشد قارچ به میزان ۴۹٪ شد. defensin دسته‌ای از پپتیدها با وزن مولکولی پایین و غنی از سیستئین هستند که در بخش‌های مختلف گیاهان شناسایی شده‌اند. این پپتیدها با نفوذ به دیواره سلولی قارچ‌ها، مانع از رشد و گسترش آنها می‌شوند و در عین حال هیچ سمیتی برای پستانداران و گیاهان ندارند. آنزیم‌های کیتیناز نیز پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین و مقاوم به پروتئاز هستند که با فعالت کیتینازی خود منجر به تخریب دیواره سلولی قارچ‌ها و درنتیجه مرگ آنها می‌شوند. انتقال همزمان این دو ژن منجر به ایجاد مقاومت گیاه کلزا به بیماری قارچی اسکلروتینیا شد (Zarinpanjeh et al, ۲۰۱۶).

نرعقیمی

نرعقیمی از جمله صفاتی است که در گیاه کلزا به صورت تجاری درآمده است. بسیاری از کلزاهای تجاری مقاوم به علف‌کش، دارای سیستم نرعقیمی نیز هستند. سیستم *Barnase / Barstar* اولین سیستم ایجاد نرعقیمی بر پایه بیوتکنولوژی است که در کلزا توسعه یافت. Barnase یک پروتئین باکتریایی است که از ۱۱۰ اسید آمینه تشکیل شده و فعالیت ریبونوکلئازی دارد. این پروتئین در

[۲] Mitogen-Activated Protein Kinase

باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* سنتز و ترشح می‌شود، اما بدون بیان مهارکننده آن (*Barstar*)، در سلول کشنده است. مهارکننده به محل اتصال ریبونوکلئاز متصل شده و از اتصال و فعالیت آن و در نتیجه آسیب رساندن به سلول جلوگیری می‌کند. از این تکنیک جهت ایجاد نرعقیمی در گیاهان استفاده می‌شود. جهت رسیدن به این مقصود، ژنهای *barnase* و *barstar* با پروموتر اختصاصی TA۲۹ بر روی وکتور مستقر می‌شوند و سپس بصورت جداگانه به گیاهان منتقل می‌شوند. پروموتر TA۲۹ یک پروموتر اختصاصی بساک است که جهت ایجاد نرعقیمی در گیاهان به کار می‌رود. اصولا یک ژن سیتوتوکسیک (مانند *barnase*) را تحت این پیشبر قرار می‌دهند تا گیاه قادر به تولید دانه گرده نباشد. گیاهان تغییر یافته با توالی *barnase*-TA۲۹ کاملاً نرعقیم هستند ولی در صورت تلاقی با گیاهان بارور دارای توالی *barstar*-TA۲۹، با بیان همزمان ژن‌های *barnase* و *barstar*، باروری اتفاق می‌افتد، در واقع غیرفعال شدن *barnase* توسط *barstar*، منجر به احیای باروری در گیاهان هیبرید F۱ می‌شود (Xiangyuan and Suowei ۲۰۱۹).

منابع

Fartyal, D., A. Agarwal, D. James, B. Borphukan, B. Ram, V. Sheri, P. K. Agrawal, V. M. M. Achary, and M. K. Reddy. ۲۰۱۸. Developing dual herbicide tolerant transgenic rice plants for sustainable weed management. Scientific Reports ۸:۱–۱۲.

Lohani, N., D. Jain, M. B. Singh, and P. L. Bhalla. ۲۰۲۰. Engineering Multiple Abiotic Stress Tolerance in Canola, Brassica napus. Frontiers in Plant Science ۱۱:۱–۲٦.

Wu, J., C. Chen, G. Xian, D. Liu, L. Lin, S. Yin, Q. Sun, Y. Fang, H. Zhang, and Y. Wang. ۲۰۲۰. Engineering herbicide-resistant oilseed rape by CRISPR/Cas۹-mediated cytosine base-editing. Plant Biotechnology Journal:۱–۳.

zarinpanjeh N, Motallebi۱ M, Zamani MR, Ziae M. ۲۰۱٦. Enhanced resistance to Sclerotinia sclerotiorum in Brassica napus by co-expression of defensin and chimeric chitinase genes. J Appl Genetics. ٥٧:٤١٧-٤٢٥.

Xiangyuan W and Suowei W. ۲۰۱۹. Molecular Cloning of Genic Male-Sterility Genes and Their Applications for Plant Heterosis via Biotechnology-based Male-sterility Systems. DOI: http://dx.doi.org/۱۰,٥٧٧۲/intechopen.٨٦٩٧٦