به نام خداوند جان و خرد

انتشارات
۷۵۲

ویرایش ژنوم در گیاهان

ویرایش دوم

دکتر علیرضا سیفی
عضو هیئت علمی دانشگاه فردوسی مشهد
دانیال شکوهی
عاطفه قلیزادگان احسان‌آباد
رخشنده ابراهیم‌پور

عنوان و نام پدیدآور: ویرایش ژنوم در گیاهان/ علیرضا سیفی... [و دیگران]؛ ویراستار علمی نسرین مشتاقی؛ ویراستار ادبی هانیه اسدپور فعال مشهد.
مشخصات نشر: مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات، ۱۴۰۴.
مشخصات ظاهری: ۱۲۰ ص. مصوّر، جدول، نمودار.
فروست: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد؛ ۷۵۲.
شابک: ISBN: 978-964-386-671-6
وضعیت فهرست‌نویسی: فیپا.
یادداشت: علیرضا سیفی، دانیال شکوهی، عاطفه قلیزادگان احسان‌آباد، رخشنده ابراهیم‌پور.
یادداشت: پشت جلد به انگلیسی: Seifi, Alireza...[etal]. Plant cenome editing.
یادداشت: کتابنامه. نمایه.
موضوع: ژنتیک گیاهی -- مهندسی
Plant genetic engineering
موضوع: ویرایش ژنوم
Gene editing
موضوع: گیاهان -- مقاومت در برابر بیماری‌ها و آفت‌ها -- ژنتیک
موضوع: Plants -- Disease and pest resistance -- Genetic aspects
موضوع: ژنوم گیاهی
Plant genomes
شناسه افزوده: سیفی، علیرضا، ۱۳۵۶-
شناسه افزوده: مشتاقی، نسرین، ۱۳۵۸- ، ویراستار.
شناسه افزوده: دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات.
رده‌بندی کنگره: QK۹۸۱/۵
رده‌بندی دیویی: ۵۷۲/۸۷۷۲
شماره کتابشناسی ملی: ۱۰۴۰۹۰۲۰

ویرایش ژنوم در گیاهان (ویرایش دوم)

پدیدآورندگان: دکتر علیرضا سیفی؛ دانیال شکوهی؛ عاطفه قلیزادگان احسان‌آباد؛ رخشنده ابراهیم‌پور
ویراستار علمی: دکتر نسرین مشتاقی
ویراستار ادبی: هانیه اسدپور فعال مشهد
مشخصات: وزیری، ۱۵۰ نسخه، چاپ دوم، زمستان ۱۴۰۴ (اوّل، ۱۳۹۹)
چاپ و صحافی: همیار
بها : ۲/۱۵۰/۰۰۰ ریال

حق چاپ برای انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد محفوظ است.

انتشارات
۷۵۲

مراکز پخش:

فروشگاه و نمایشگاه کتاب پردیس: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، جنب سلف یاس
تلفن: ۳۸۸۰۲۶۶۶- ۳۸۸۳۳۷۲۷ (۰۵۱)
مؤسّسهٔ کتاییران: تهران، میدان انقلاب، خیابان کارگر جنوبی، بین روانمهر و وحید نظری، بن‌بست گشتاسب، پلاک ۸ تلفن: ۶۶۴۸۴۷۱۵ (۰۲۱)
مؤسّسهٔ دانشیران: تهران، خیابان انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت) نبش خیابان نظری، شمارهٔ ۱۴۲
تلفکس: ۶۶۴۰۰۲۲۰ – ۶۶۴۰۰۱۴۴ (۰۲۱)

http://press.um.ac.ir Email: press@um.ac.ir

فهرست مطالب

پیشگفتار..... ۷

فصل ۱: اهمیت فنّاوری‌های نوین مهندسی ژنتیک گیاهی..... ۹

گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده..... ۱۰

روش‌های انتقال ژن به گیاهان..... ۱۲

روش‌های انتقال ژن پایدار..... ۱۲

مکانیسم مولکولی انتقال ژن به گیاه توسط اگروباکتریوم..... ۱۳

روش‌های بیان موقّت ژن در گیاهان..... ۱۴

نگرانی‌های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده..... ۱۵

فنّاوری‌های ویرایش ژنوم..... ۱۷

منابع..... ۱۷

فصل ۲: فنّاوری‌های ویرایش ژنوم..... ۱۹

سیر تکاملی روش‌های ویرایش ژنوم..... ۲۰

مگانوکلئازها..... ۲۰

نوکلئازهای متصل به فاکتورهای رونویسی انگشت روی (ZFN)..... ۲۲

آنزیم FokI..... ۲۳

فاکتورهای رونویسی ZFP..... ۲۴

استفاده از فنّاوری ZFN در گیاهان..... ۲۵

نوکلئازهای متصل به پروتئین‌های افکتوری TAL (TALEN)..... ۲۷

پروتئین‌های افکتوری TALE..... ۲۷

استفاده از فنّاوری TALEN برای ویرایش ژنوم در گیاهان..... ۲۹

منابع..... ۳۰

فصل ۳: سیستم کریسپر به‌عنوان سیستم دفاعی باکتریایی ۳۳
تاریخچه ۳۳
ساختار جایگاه‌های کریسپری ۳۴
نقش سیستم کریسپر در پروکاریوت‌ها ۳۵
تنوّع در سیستم‌های کریسپری ۳۸
مکانیسم مولکولی ایمنی اکتسابی به‌واسطهٔ سیستم کریسپر ۳۹
فرایند اکتساب ۴۳
منابع ۴۴

فصل ۴: سیستم کریسپر به‌عنوان ابزار ویرایش ژنوم ۴۷
سیر تحوّلات و پیشرفت‌های سیستم ویرایش ژنوم ۴۷
ساختار و مکانیسم عمل پروتئین Cas9 ..... ۴۹
انواع مختلف پروتئین‌های Cas مورداستفاده در ویرایش ژنوم ۵۱
أ. انواع تغییریافتهٔ آنزیم Cas9 ..... ۵۱
ب. Cas12a ۵۴
ج. Cas13 ..... ۵۶
د. CasX ۵۷
انواع مختلف RNAهای هدایتگر ۵۸
أ. RNAهای راهنمای کوتاه (truRNA) ۵۸
ب. RNA راهنما همراه با رایبوزایم (RGR) ۵۹
ج. tRNA-gRNA پلی‌سیسترونیک (PTG-Cas9) ۵۹
د. استفاده از ریبونوکلئاز Csy4 برای پردازش sgRNA ۵۹
هـ. پیشبرهای دوطرفه ۶۰
منابع ۶۰

فصل ۵: ساخت سازه‌های کریسپر Cas9 براساس روش همسانه‌سازی گلدن‌گیت ۶۵
طراحی sgRNA ۶۵
سیستم همسانه‌سازی گلدن‌گیت ۶۶
استخراج پلاسمید سوپرکویل ۶۷
انتخاب sgRNA برای ژن EPSPS ۶۸
طراحی آغازگر برای ساخت sgRNA ۶۹

ساخت sgRNA ازطریق انجام PCR ۶۹
خالص‌سازی محصول PCR ۷۰
واکنش هضم‌اتصال اوّل برای سرهم کردن سازهٔ AtU6::EPSPS_sgRNA ۷۰
واکنش هضم‌اتصال دوم برای سرهم کردن سازهٔ 35S::Cas9-AtU6::EPSPS_sgRNA ۷۳
منابع ۷۳

فصل ۶: روش‌های انتقال Cas9 و sgRNA به سلول گیاهی ۷۵
روش‌های ارزیابی کارایی سازه/کمپلکس کریسپر ۷۸
أ. بیان در پروتوپلاست ۷۸
ب. تزریق اگروباکتریوم در برگ ۷۹
شناسایی جهش‌های حاصل از بیان سازه‌های کریسپر ۷۹
أ. الکتروفورز محصول PCR ۸۰
ب. تشخیص حذف سایت برشی یک آنزیم برشی ۸۰
ج. روش‌های مبتنی‌بر شناسایی هترودوپلکس‌های ناشی از جفت‌شدگی‌های ناسازگار ۸۰
د. توالی‌یابی ۸۲
منابع ۸۲

فصل ۷: ایجاد مقاومت به علف‌کش در گیاهان ازطریق ویرایش ژنوم ۸۵
علف‌کش گلایفوسیت و مقاومت به آن در موجودات زندهٔ مختلف ۸۵
مسیر شیکیمات و اهمیت آن در گیاهان ۸۶
مکانیسم عمل علف‌کش گلایفوسیت بر مسیر شیکیمات ۸۸
مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در علف‌های هرز ۸۸
مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به گلایفوسیت ۹۰
مقاومت به گلایفوسیت با موتاسیون‌های دوگانه ۹۰
مقاومت به گلایفوسیت ازطریق ویرایش ژنوم ۹۱
ویرایش ژن کدکنندهٔ آنزیم ALS برای ایجاد مقاومت به علف‌کش ۹۲
منابع ۹۳

فصل ۸: استفاده از فنّاوری ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های گیاهی ۹۵
سیستم ایمنی گیاهان ۹۵
مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های گیاهی ۹۸

گیاهان مهندسی ژنتیک‌شدهٔ مقاوم به بیماری‌های ویروسی..... ۹۸
گیاهان مهندسی ژنتیک‌شدهٔ مقاوم به بیماری‌های باکتریایی..... ۹۹
گیاهان مهندسی ژنتیک‌شدهٔ مقاوم به بیماری‌های قارچی..... ۱۰۰
استفاده از ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های گیاهی..... ۱۰۰
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های ویروسی..... ۱۰۱
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های باکتریایی..... ۱۰۲
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی..... ۱۰۳
منابع..... ۱۰۴

فصل ۹: ملاحظات زیست‌ایمنی گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۰۹
قوانین و مقررات مربوط به محصولات مهندسی ژنتیک شده..... ۱۱۰
قوانین و مقررات اتحادیهٔ اروپا درخصوص محصولات مهندسی ژنتیک شده..... ۱۱۰
قوانین و مقررات ایالات‌متحدهٔ امریکا درخصوص محصولات مهندسی ژنتیک‌شده..... ۱۱۱
قوانین و مقررات مربوط به محصولات حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۱۲
سطوح ارزیابی محصولات حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۱۳
أ. سطح تکنیکی..... ۱۱۴
ب. سطح مهار..... ۱۱۴
ج. سطح مدیریت و نظارت..... ۱۱۴
د. استاندارد بین‌المللی..... ۱۱۵
قوانین اتحادیهٔ اروپا درمورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۱۵
قوانین ایالات‌متحدهٔ امریکا و کانادا درمورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۱۷
قوانین چین درمورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم..... ۱۱۸
منابع..... ۱۱۹

نمایه..... ۱۲۰

پیشگفتار

در چند سال اخیر دستاوردهای شگرفی در دست‌ورزی ژنتیکی هدفمند حاصل شده است که تحت‌عنوان مهندسیِ ژنوم یا ویرایشِ ژنوم مطرح می‌شوند. ویرایش ژنوم این امکان را فراهم می‌کند تا بدون اینکه هیچ DNA ناخواسته‌ای وارد ژنوم هدف شود، به‌صورت کاملاً هدفمند بتوان حتّی در سطح تک‌نوکلئوتید ژنوم هدف را به‌نحو دلخواه تغییر داد، و یا یک ژن یا تعدادی ژن را در محل مشخصی از ژنوم اضافه کرد. چنین امکانی می‌تواند بسیاری از نگرانی‌های موجود درمورد گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده را برطرف سازد. درحال‌حاضر طبق قوانین ایالات‌متحدهٔ امریکا گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم همانند گیاهان حاصل از به‌نژادی گیاهی درنظر گرفته می‌شوند و قوانین سخت‌گیرانه مربوط به گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده شامل گیاهان تولیدشده ازطریق ویرایش ژنوم نمی‌شود. بنابراین، امیدهای بسیاری وجود دارد که دست‌ورزی گیاهان ازطریق ویرایش ژنوم راهکار مناسب‌تری برای استفاده از پیشرفت‌های نظری در ژنتیک و بهره‌برداری عملی از آن‌ها در به‌نژادی گیاهی فراهم سازد.

فناوری ویرایش ژنوم یکی از مباحث جذاب و رو به گسترش در ایران است که محققان زیادی در حوزهٔ زیست‌شناسی مولکولی را به خود جلب کرده است و انتظار می‌رود در ۲-۳ سال آینده، فناوری مطرح در مهندسی ژنتیک گیاهی، جانوری و پزشکی باشد. یکی از اهداف سند چشم‌انداز بیست سالهٔ جمهوری اسلامی ایران توسعهٔ فناوری‌های نو ازجمله زیست‌فناوری است. در سند ملّی زیست‌فناوری مصوبهٔ هیئت محترم دولت در تاریخ ۱۳۸۳/۲/۱۶، به‌صراحت بر نقش مهم این فناوری در ارتقای کیفیت و کمّیت تولیدات کشاورزی به‌عنوان یکی از آرمان‌های ملّی در حوزهٔ زیست‌فناوری تأکید شده است. بااین‌حال، توسعهٔ کشت گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده در ایران، باوجود نیاز مبرم به آن، با مشکلاتی مواجه است که بخشی از این مشکلات به‌دلیل وجود نگرانی‌های عمومی درمورد این نوع گیاهان است. بنابراین، امید است با استفاده از فناوری‌های ویرایش ژنوم بتوان بخش عمده‌ای از این نگرانی‌ها را برطرف کرد و درجهت رفع گوشه‌ای از مشکلات حوزهٔ کشاورزی گام برداشت.

این کتاب که حاصل چهار سال پژوهش و مطالعه درزمینهٔ ویرایش ژنوم در گیاهان می‌باشد، مجموعه‌ای است از مباحث نظری و عملی درمورد فناوری CRISPR-Cas (کریسپر)، یکی از روش‌های ویرایش ژنوم، که امید است مورداستفادهٔ پژوهشگران و دانشجویان تحصیلات تکمیلی در رشته‌های

بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولیِ گیاهی قرار گیرد. فصول کتاب به‌نحوی تنظیم شده است که ازیک‌طرف قابلیت استفاده به‌عنوان یکی از منابع آموزشی در دروسی مانند مهندسی ژنتیک را داشته باشد و ازطرف دیگر برای پژوهشگران علاقه‌مند استفاده از این فناوری اطلاعات کاربردی را نیز فراهم آورد. هرچند تلاش شده است تا به‌روزترین مطالب درزمینهٔ فناوری کریسپر جمع‌آوری شود، لیکن با توجه به سرعت زیاد پیشرفت‌ها در این زمینه (تقریباً هر هفته ابداع و دستاوردی جدید در ویرایش ژنوم در دنیا گزارش می‌شود)، تعقیب و پوشش تمام دستاوردها در این حوزه عملاً میسّر نبود و تلاش خواهد شد در چاپ‌های بعدی کتاب مباحث کامل‌تر و جامع‌تری ارائه شود.

تلاش شده است که تاحدّامکان مطالب با دقت کافی ارائه شود و اشکالات محتوایی و یا نگارشی در متن کتاب وجود نداشته باشد. بااین‌حال، از خوانندگان محترم تقاضا دارم اشکالات احتمالی را به‌نحو مقتضی به این‌جانب منعکس کنند تا در ویرایش‌های بعدی، اشکالات و کاستی‌ها رفع شود.

علیرضا سیفی
دی‌ماه ۱۳۹۸

۱

اهمیت فنّاوری‌های نوین مهندسی ژنتیک گیاهی

در سپتامبر سال ۲۰۱۵ م. در نشست عمومی سازمان ملل اهداف توسعهٔ پایدار[1] جهانی مطرح شد و از آن زمان جامعهٔ جهانی خود را متعهّد می‌داند تا تمام تلاش خود را برای تحقّق این اهداف تا سال ۲۰۳۰ بسیج کند. دومین هدف در این برنامهٔ جهانی به‌صفررساندن گرسنگی، تأمین امنیت و کیفیت غذایی و توسعهٔ کشاورزی پایدار در تمام کشورهای دنیاست. بااین‌حال، براساس آمار سازمان خواروبار جهانی (FAO) در سال ۲۰۱۷ حدود ۸۲۱ میلیون نفر در سراسر دنیا از دسترسی به غذای کافی محروم بوده‌اند. با توجه به اینکه برآوردهای این سازمان حاکی از افزایش جمعیت جهان به حدود ۸/۳ میلیارد نفر در سال ۲۰۳۰ است، مشکل کمبود غذا درحال‌حاضر و تشدید این مشکل در آیندهٔ نزدیک بر کسی پوشیده نیست.

جامعهٔ جهانی باید ۴۰ درصد محصولات کشاورزی بیشتری تا سال ۲۰۳۰ تولید کند، درحالی‌که امکان گسترش زمین‌های زراعی و بهره‌برداری بیشتر از منابع آبی در بسیاری از نقاط دنیا امکان‌پذیر نیست. همچنین لازم است تا استفاده از انرژی، آفت‌کش‌ها، کودهای شیمیایی و تولید گازهای گلخانه‌ای تاحدّامکان کاهش یابد. برای همهٔ این چالش‌ها باید با درنظرگرفتن واقعیت اجتناب‌ناپذیری به نام تغییرات اقلیمی، راهکارهای مؤثری پیدا شود. برای تحقّق این امر مهم چاره‌ای نیست به‌جز اینکه از فنّاوری‌های موجود به بهترین وجه استفاده شود و همچنین فنّاوری‌های نوینی ابداع شود تا در کنار فنّاوری‌های موجود ما را به انقلابی سبزتر، انقلابی که علم و فنّاوری در بطن آن قرار داشته باشد، برساند (۱-۳).

زیست‌فنّاوری کشاورزی نویدبخش وقوع انقلاب سبز دومی در تولیدات فراورده‌های کشاورزی است تا بتوان با اتّکا بر این روش‌ها در کنار روش‌های به‌نژادی کلاسیک، بر مشکل کمبود روزافزون موادغذایی

1. Sustainable Development Goals (SDGs)

فائق آمد. تولید گیاهان زراعی با صفات زراعی برتر، غنی از ویتامین‌ها و ریزمغذّی‌ها، تولید کودها و آفت‌کش‌های زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های سودمند و گیاهان دارویی، تولید واکسن‌ها، آنتی‌بادی‌ها و پروتئین‌های صنعتی در گیاهان، دست‌ورزی گیاهان و تبدیل آن‌ها به حسگرهای زیستی و پالایشگرهای زیستی ازجمله دستاوردهای زیست‌فنّاوری در حوزهٔ کشاورزی بوده است.

گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده[1]

شواهد باستان‌شناسی نشان می‌دهد که اهلی‌سازی گیاهان توسط انسان احتمالاً از ۹۰۰۰ سال قبل از میلاد در حاشیهٔ رود دجله در عراق امروزی شروع شده است، و به‌نژادی گیاهان در بابل و آشور در حدود ۷۰۰ سال قبل از میلاد رایج بوده است. شرکت ویلمورین[2]، اوّلین شرکت به‌نژادی گیاهی، در سال ۱۷۲۷ در فرانسه براساس روش انتخاب شجره‌ای شروع به فعالیت کرد. با کشف مجدّد قوانین مندل در ابتدای قرن بیستم و درک مفاهیم ژنتیک جمعیت توسط هاردی و واینبرگ در ۱۹۰۹، به‌نژادی گیاهی وارد دورهٔ جدیدی شد و شال و جونز در ایالات‌متحده توانستند ذرت هیبرید تولید کنند. در سال ۱۹۳۵ واویلوف قواعد علمی به‌نژادی گیاهی را ارائه و هارلن در ۱۹۴۵ روش گزینش بالک را معرفی کرد (۴). در تمام این یازده‌هزار سال گذشته بشر جمعیت‌های گیاهی را دست‌ورزی کرده و به‌طور مصنوعی فراوانی آللی را در این جمعیت‌ها تغییر داده است. همچنین با دورگ‌گیری‌های درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای باعث ایجاد تغییرات ژنومی در گونه‌های مختلف گیاهی نیز شده است. به‌عبارت‌دیگر، دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان سابقهٔ چندین هزار ساله دارد.

با ابداع فنّاوری DNA نوترکیب (۵) امکان مهندسی ژنتیک موجودات زنده به‌صورت هدفمند فراهم شد و در سال ۱۹۷۳ استنلی کوهن و هربرت بویر توانستند اوّلین موجود زنده مهندسی ژنتیک‌شده را تولید کنند. این دانشمندان توانستند یک قطعهٔ DNA را در پلاسمید باکتری درج و پلاسمید را وارد باکتری کنند (۶). در سال ۱۹۷۸ دانشمندان توانستند هورمون رشد انسانی را در باکتری مهندسی‌شده بیان کنند که این موفقیت تأثیر بسزایی در رشد بیوتکنولوژی به‌عنوان یک صنعت داشت و این ابداع به‌سرعت تجاری‌سازی شد. در سال ۱۹۸۳ دو گروه تحقیقاتی به‌طور مستقل گیاهان توتون و اطلسی[3] را مهندسی کردند که ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین در ژنوم آن‌ها وارد و بیان شده بود (۷، ۸). در همان سال انتقال ژن بین دو گونهٔ گیاهیِ مختلف برای اوّلین بار محقّق شد و دانشمندان انتقال یک ژن لوبیا به آفتاب‌گردان را گزارش کردند (۹).

در سال ۱۹۸۷ کارایی ژن‌های *Cry*، شناسایی‌شده در باکتری *Bacillus thuringiensis* (*Bt*)، برای کنترل آفات گیاهی نشان داده شد (۱۰) و سنگ بنای تولید گیاهان *Bt*، که درحال‌حاضر یکی از بزرگ‌ترین

1. Genetically engineered crops
2. Vilmorin
3. *Petunia hybrida*

گروه تولیدات گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده هستند، گذاشته شد. درصورت تغذیهٔ حشرات از گیاهان *Bt*، پروتئین‌های حاصل از بیان ژن‌های *Cry* در دستگاه گوارش آن‌ها کریستاله و باعث مرگ حشرات می‌شود. کشت مزرعه‌ای توتون مقاوم به ویروس در سال ۱۹۹۳ و پس از آن گوجه فرنگی Flavr Savr در سال ۱۹۹۴، شروع کشت تجاری گیاهان زراعی مهندسی ژنتیک‌شده بود که البته درحال‌حاضر هیچ‌کدام از آن‌ها در بازار موجود نیستند (۱۱). در همان سال، ذرت *Bt* و در سال ۱۹۹۶ اوّلین گیاه زراعی مهندسی‌شدهٔ مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت وارد بازار شدند.

در این کتاب به گیاهانی که ازطریق مهندسی ژنتیکی حاصل شده‌اند، «گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده[1]» اطلاق می‌شود. شایان‌ذکر است که در برخی از متون علمی اصطلاح گیاهان دست‌ورزی‌شدهٔ ژنتیکی[2] به‌کار می‌رود که اصطلاح دقیقی نیست؛ چراکه همان‌گونه که در بالا توضیح داده شد، دست‌ورزی ژنتیکی توسط بشر سابقه چندین هزار ساله دارد. برای تفکیک این نوع دستورزی‌ها از آنچه به‌واسطهٔ مهندسی ژنتیک حاصل شده است، توصیه شده است از اصطلاح گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده استفاده شود (۱۲). در متون فارسی از اصطلاح «گیاهان تراریخته» یا «گیاهان تراریخت» استفاده می‌شود که این اصطلاحات اشکال اساسی‌تری دارند. این اصطلاحات معادل کلمهٔ transgenic هستند که یکی از انواع مختلف روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی در گیاهان است و بنابراین جامعیت ندارند. ازاین‌رو، در این کتاب از اصطلاح «گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده» به‌جای گیاهان دست‌ورزی‌شدهٔ ژنتیکی استفاده شده است. اصطلاح «تراریخته» در مواردی استفاده شده است که برای اهداف پژوهشی ژنی به یک گیاه منتقل شده است تا کارکرد آن بررسی شود.

براساس گزارش مؤسسهٔ پایش میزان استفاده از محصولات بیوتکنولوژی کشاورزی (ISAAA[3])، کشت محصولات تراریخته از سال ۱۹۹۶ روند افزایشی داشته و تا سال ۲۰۱۸ به بیش از ۱۹۱/۷ میلیون هکتار رسیده است (۱۳). سود جهانی حاصل از کشت گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده در سال ۲۰۱۶ حدود ۱۸/۲ میلیارد دلار بوده است که ۶۵ درصد از این سود به‌واسطهٔ افزایش عملکرد گیاهان مهندسی‌ژنتیک شده و ۳۵ درصد به‌دلیل کاهش هزینه‌های تولید بوده است (۱۴). مقایسهٔ سال ۲۰۱۶ با سال ۱۹۹۶ (اوّلین سال کشت تجاری گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده) نشان می‌دهد که مصرف سموم آفت‌کش ۸/۲ درصد، آسیب به محیط‌زیست ۱۸/۴ درصد، و انتشار گازهای گلخانه‌ای به‌اندازه‌ای معادل حذف ۱۶/۷ میلیون خودرو کاهش یافته است. برآوردها نشان می‌دهد با افزایش عملکرد محصولات ازطریق مهندسی ژنتیک، از تبدیل ۲۲/۵ میلیون هکتار اراضی مرتعی و جنگلی به زمین‌های کشاورزی جلوگیری شده و از این طریق به حفظ تنوّع زیستی کمک شده است (۱۵).

1. Genetically Engineered (GE)
2. Genetically Modified (GM)
3. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications

روش‌های انتقال ژن به گیاهان

روش‌های انتقال ژن به گیاهان را به دو گروه کلّی انتقال برای بیان پایدار[1] و یا بیان موقّت[2] می‌توان تقسیم کرد. روش‌های انتقال موقّت ژن براین‌اساس استوارند که ژن هدف در کروموزوم گیاه گیرنده درج نمی‌شود و حضور ژن منتقل‌شده در سیتوپلاسم و یا در نوکلئوپلاسم برای بیان موقّت کافی است. در روش‌های انتقال پایدار ژن هدف در ژنوم گیاه گیرنده درج می‌شود و بنابراین قابل‌توارث به نتاج خواهد بود.

روش‌های انتقال ژن پایدار

برای انتقال ژن پایدار در گیاهان دو روش عمده، تفنگ‌ِژنی و انتقال به‌واسطهٔ اگروباکتریوم استفاده می‌شود که در هر دو روش هدف این است که مولکول‌های DNA از سد دیوارهٔ سلولی گیاه عبور داده شوند.

روش انتقال ژن با تفنگ‌ژنی که به‌عنوان روش پرتاب ذره‌ای یا بایولیستیک[3] نیز شناخته می‌شود، به‌این‌صورت است که ژن موردنظر بر روی ذرات ریز طلا یا تنگستن قرار داده می‌شود و با فشار گاز خنثی مانند هلیوم و یا نئون به‌سمت سلول گیرنده گیاهی پرتاب می‌گردد. سلول‌های گیرنده می‌تواند کالوس، سلول‌های اپیدرمی برگ، جنین نابالغ و یا انواع دیگر ریزنمونه باشد. زمانی‌که ذرات طلا یا تنگستن حامل ژن هدف به‌سمت سلول‌های گیاهی پرتاب می‌شوند، تعدادی از سلول‌ها ممکن است براثر آسیب فیزیکی از بین بروند، تعداد زیادی از این ذرات ممکن است در فضای بین‌سلولی باقی بمانند و درنهایت برخی از این ذرات با فراوانی کمی می‌توانند وارد سلول شوند و درنهایت ژنِ قرارداده‌شده روی این ذرات وارد هسته شود. این روش معمولاً در گیاهان تک‌لپه‌ای استفاده می‌شود؛ چراکه در این گیاهان استفاده از اگروباکتریوم کارایی بالایی ندارد.

در روش انتقال ژن به‌واسطهٔ اگروباکتریوم، اساس کار استفاده از مکانیسم طبیعی انتقال ژن توسط این باکتری خاک‌زی است که می‌تواند با دست‌ورزی مسیرهای هورمونی اکسین و سیتوکنینِ سلول میزبان، تقسیم سلولی در میزبان را کنترل کند و درنهایت به ایجاد گال در ناحیهٔ طوقهٔ گیاه منجر شود.

یکی از روش‌های انتقال ژن به‌واسطهٔ اگروباکتریوم غوطه‌وری گل‌آذین[4] است که در گیاهی مانند آرابیدوپسیس تالیانا[5]، که گل‌های زیادی دارد، بسیار کاراست و درواقع روش معمول انتقال ژن در این گیاه محسوب می‌شود (۱۶). اساس کار این است که غنچه‌های بازنشدهٔ آرابیدوپسیس در محلول باکتری که با شرایط خاصی تهیه شده است، برای چند ثانیه غوطه‌ور می‌شود. نتیجهٔ این فرایند ساده این است که نیم تا ۵

1. Stable gene transformation
2. Transient gene transformation
3. Biolistic
4. Floral Dip
5. *Arabidopsis thaliana*

درصد بذرهای حاصل از گیاه غوطه‌ورشده دارای ژن هدف خواهند بود. در این روش ترکیب محلول باکتریایی، سویهٔ باکتریایی و غلظت باکتری مورداستفاده تأثیر زیادی در نرخ انتقال ژن دارند. همچنین وجود سورفاکتانتی به‌نام Silwete L-77 نیز برای حصول بازده بالای انتقال ژن ضروری است؛ به‌طوری‌که سورفاکتانت‌های دیگر آزمون‌شده هیچ‌کدام تأثیر Silwete را نداشته‌اند.

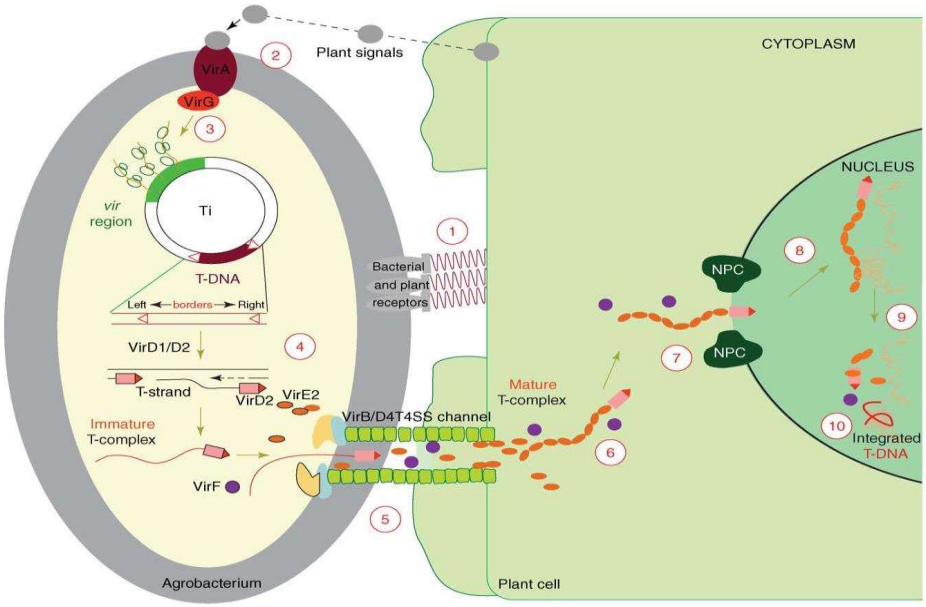
انتقال ژن پایدار ممکن است ازطریق انتقال ژن به هسته و یا به کلروپلاست حاصل شود. به گیاهانی که ژن به کلروپلاست آن‌ها منتقل شده است، «گیاهان ترنس‌پلاستومیک[1]» گفته می‌شود. تعداد کپی بالای ژن انتقال‌یافته در این حالت و عدم انتقال آن ازطریق دانهٔ گرده دو مزیت عمدهٔ گیاهان ترن پلاستومیک محسوب می‌شود.

مکانیسم مولکولی انتقال ژن به گیاه توسط اگروباکتریوم

در اگروباکتریوم پلاسمیدی وجود دارد به‌نام پلاسمید القاکنندهٔ تومور که به‌اختصار به آن «پلاسمید Ti» گفته می‌شود. روی این پلاسمید دو ناحیهٔ کلیدی وجود دارد: یکی ناحیهٔ ژن‌های بیماری‌زا (*vir*) و دیگری ناحیهٔ T-DNA. ژن‌های *vir* ازطریق مکانیسمی که در زیر توضیح داده می‌شود (۱۷)، باعث انتقال T-DNA از باکتری به سلول‌های گیاه میزبان می‌شوند.

انواع مختلفی از ژن‌های *vir* شناسایی شده است که پروتئین‌های Vir را که با نام‌های VirA تا VirG نام‌گذاری شده‌اند، کد می‌کنند. VirA که درواقع یک گیرندهٔ غشایی باکتریایی است، سیگنال‌های مولکولی صادرشده از سلول میزبان را شناسایی می‌کند. این سیگنال‌ها می‌تواند سیگنال‌های حاصل از ایجاد زخم در سلول گیاهی و یا مولکول‌هایی مانند استوسرینگون باشد. شناسایی مولکول سیگنالی توسط VirA باعث فعال شدن VirG در باکتری می‌شود که نتیجهٔ آن افزایش رونویسی از سایر ژن‌های *Vir* در باکتری خواهد بود. دو پروتئین VirD1 و VirD2 یک نسخهٔ تک‌رشته‌ای از T-DNA ایجاد می‌کنند. این قطعهٔ DNA تک‌رشته‌ای که یک مولکول VirD1 به‌صورت کوولانسی به انتهای '۵ آن متصل باقی می‌ماند، توسط پروتئین‌های VirE2 پوشش داده می‌شود تا ساختار مولکولی قابل‌انتقال را داشته باشد و همچنین از تخریب توسط آنزیم‌های نوکلئاز حفظ شود. انتقال T-DNA ازطریق مسیر ترشحی نوع ۴ باکتریایی انجام می‌شود. در این مسیر، انتقال پروتئین‌های دیگری مانند VirF همراه با T-DNA لازم است. VirB و VirD4 نیز به‌عنوان پروتئین کمکی برای انتقال از کانال ترشحی موردنیاز هستند. پس از انتقال به سیتوپلاسم سلول هدف، T-DNA برای انتقال به هسته از منافذ غشای هسته عبور می‌کند. پس از ورود به نوکلئوپلاسم، با کمک پروتئین‌های سلول میزبان امکان درج T-DNA در ژنوم گیاه وجود دارد (شکل ۱-۱).

1. Transplastomic plants



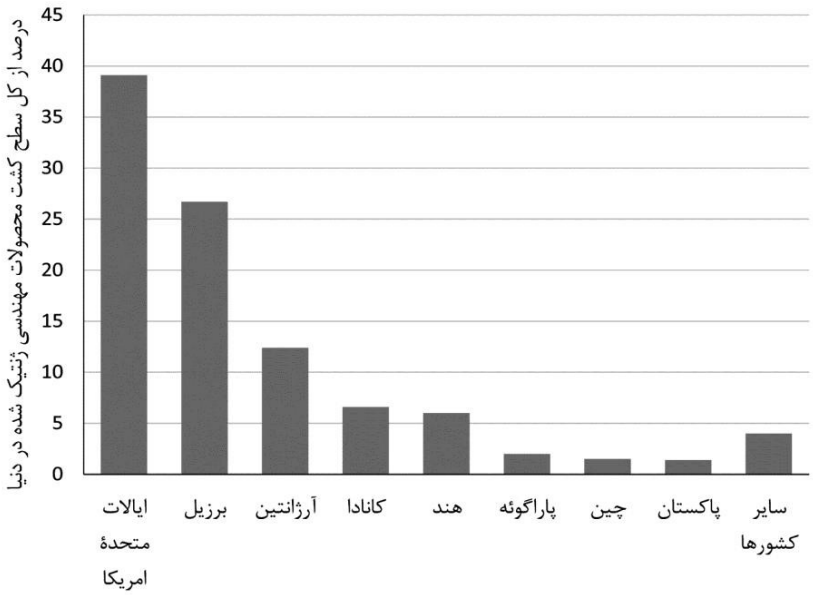
شکل ۱-۱ مکانیسم انتقال ژن به گیاه توسط اگروباکتریوم. پروتئین VirG که یک پروتئین غشایی در باکتری است، سیگنال‌های تولیدشده از باقت‌های گیاهی را درک می‌کند و به رونویسی سایر ژن‌های Vir منجر می‌شود. پروتئین‌های VirD1 و VirD2 بخش T-DNA را برش می‌دهند. این قطعهٔ برش‌خورده، که توسط VirE2 پوشش داده می‌شود تا در دسترس آنزیم‌های نوکلئاز نباشد، همراه با VirF ازطریق سیستم تزریقی نوع ۴ باکتری به سلول گیاهی منتقل می‌شود. در نهایت با کمک پروتئین‌های گیاهی مولکول T-DNA به هسته وارد و در ژنوم گیاه درج می‌شود (۱۷).

روش‌های بیان موقّت ژن در گیاهان

در این روش‌های مولکولی هدف، بیان موقّت ژن است و به درج در کروموزوم و قابلیت توارث آن نیازی نیست. ازآنجاکه به درج در ژنوم نیازی نیست، بازده بیان ژن در این روش‌ها نسبت به روش‌های بیان پایدار خیلی بالاتر است. بیان موقّت به دو روش کلّی انتقال مستقیم (یا فیزیکی) و روش غیرمستقیم (استفاده از یک واسطهٔ بیولوژیکی مانند اگروباکتریوم یا ویروس) انجام می‌شود.

انتقال سازه به پروتوپلاست با واسطهٔ پلی‌اتیلن‌گلایکول (PEG) و یا اعمال پالس الکتریکی (الکتروپوریشن[1]) و انتقال ژن به سلول‌های اپیدرم با استفاده از تفنگ‌ژنی روش‌های معمول انتقال مستقیم سازه برای بیان موقّت هستند. دو روش تزریق اگروباکتریوم به برگ[2] و آلوده کردن برگ به اگروباکتریومِ حاوی سازهٔ ویروسیِ حامل ژن[3] موردنظر روش‌های معمول غیرمستقیم بیان موقّت در گیاهان هستند.

1. Electroporation
2. Agroinfiltration
3. Agroinfection



شکل ۱-۲ مقایسهٔ سطح زیر کشت محصولات مهندسی ژنتیک‌شده در کشورهای مختلف. این نمودار براساس داده‌های منبع شمارهٔ (۱۳) ترسیم شده است.

نگرانی‌های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده

باوجود مزایای ذکرشده در بالا برای گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده، توسعهٔ کشت و تولید این گیاهان با مخالفت‌هایی در سراسر دنیا روبه‌رو بوده است. درواقع بیش از ۹۰ درصد سطح زیر کشت گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده در پنج کشور ایالات‌متحدهٔ امریکا، برزیل، آرژانتین، کانادا و هند است (شکل ۱-۲) و در بین ۱۰ کشور بزرگ تولیدکنندهٔ این محصولات، هیچ‌کدام از کشورهای اروپایی دیده نمی‌شوند (۱۳). نکتهٔ قابل‌توجه دیگر این است که عمدهٔ سطح زیر کشت این گیاهان به چهار گیاه ذرت، سویا، کلزا و پنبه مربوط است. همچنین بیش از ۹۹ درصد گیاهان مهندسیِ ژنتیک تولیدشده در دنیا یا متحمّل به علف‌کش یا مقاوم به آفات و یا دارای هر دو صفت‌اند و برای سایر صفات مهم زراعی مانند تحمل به تنش‌های غیرزیستی و کیفیت محصول، گیاه مهندسی ژنتیک‌شده در سطح تجاری وجود ندارد (۱۳). می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که درحقیقت توسعهٔ کشت و کار گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده محدود به کشورهای خاص، صفات زراعی مشخص و گیاهان زراعی محدودی است.

مخالفت‌ها با گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده را می‌توان در چهار محور کلّی دسته‌بندی کرد:

۱- نگرانی‌های اقتصادی‌اجتماعی: گروهی بر این باورند که شرکت‌های تولیدکنندهٔ بذر گیاهانِ مهندسی ژنتیک‌شده در بازار انحصار ایجاد می‌کنند و درنهایت این خطر وجود دارد که زنجیرهٔ غذاییِ

جوامع انسانی در اختیار تعدادی از شرکت‌های بزرگ مانند مونسانتو[1] قرار گیرد. براساس آمار سال ۲۰۱۶ سه شرکت مونسانتو، دوپونت[2] و سینجنتا[3] بیش از ۸۰ درصد بازار بذر دنیا را در اختیار دارند (۱۸). ازطرفی با توجه به هزینهٔ بالای بذرهای مهندسی ژنتیک‌شده، کشاورزان خرده‌پا توان تهیهٔ این بذور را ندارند و کشاورزان ثروتمند به‌تدریج ثروتمندتر خواهند شد و کشاورزان خرده‌پا از بین خواهند رفت. از طرف دیگر، اتّکای کشاورزان به بذور تولیدی شرکت‌های بزرگ باعث خواهد شد که به‌مرور زمان کشت واریته‌های بومی منسوخ و درنهایت تنوّع ژنتیکی نیز محدودتر شود.

۲- نگرانی‌های اخلاقی: اینکه اساساً انسان حق دست‌ورزی در طبیعت را دارد و اینکه این دست‌ورزی‌ها با اعتقادات مذهبی و معیارهای اخلاقی سازگار است، محل بحث گروهی دیگر از مخالفان است.

۳- نگرانی‌های زیست‌محیطی: احتمال انتقال افقی ژن در طبیعت، اثرات ناخواستهٔ گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده روی سایر موجودات زنده و ایجاد مقاومت در جمعیت آفات یکی دیگر از نگرانی‌هایی است که درمورد کشت گیاهان *Bt* و مقاوم به علف‌کش وجود دارد. برای مثال، شواهدی از اثرات منفی ذرت‌های *Bt* روی جمعیت پروانه‌ها (۱۹) و قارچ‌های خاک‌زی (۲۰) وجود دارد. ایجاد مقاومت به آفات در مزارع ذرت *Bt* نیز گزارش شده است (۲۱).

۴- نگرانی درمورد سلامت انسان: گروهی معتقدند که دست‌ورزی گیاهان ممکن است باعث ایجاد مواد سمّی یا حساسیت‌زا در آن‌ها شود که برای انسان خطرناک باشد. مثال مشهور این گروه تحقیقات انجام‌شده توسط آقای دکتر سرالینی[4] در فرانسه است (۲۲) که البته مورد نقد جدّی سایر محقّقان بوده است.

در کنار ملاحظات جامعه‌شناختی، سیاسی و اخلاقی، یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکنندهٔ کشت‌وکار گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده، خطرات احتمالی ناشی ازدرج قطعات DNA خارجی به‌صورت تصادفی در ژنوم گیاه هدف است. در روش‌های متداول مهندسی ژنتیک به‌همراه ژن هدف، توالی‌هایی مانند پیشبر[5]، خاتمه‌دهنده و ژن‌های انتخابگر (مانند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک یا علف‌کش) نیز وارد ژنوم گیاه هدف می‌شوند. نگرانی‌هایی وجود دارد که ممکن است این ژن‌ها به سایر موجودات زنده و حتّی انسان نیز منتقل شوند و مشکلات غیرقابل‌پیش‌بینی ایجاد کنند. همچنین درج تصادفی ژن ممکن است باعث ازکارافتادن ژن‌های گیاه شود و یا نوترکیبی‌های ناخواسته‌ای ایجاد کند. درحال‌حاضر، عمدهٔ گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده محصول شرکت‌های بزرگ تجاری مانند مونسانتو است؛ چراکه فقط چنین

1. Monsanto
2. DuPont
3. Syngenta
4. Séralini
5. Promoter