مجله بوم شناسی آبزیان

Journal homepage: http://jae.hormozgan.ac.ir

نگرانی‌ها از نشانگرهای مقاومت در گیاهان تراریخته اکوسیستم دریایی

غلامرضا شریفی سیرچی*

گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس

نوع مقاله:
مروری

تاریخچه مقاله:
دریافت: ۹۳/۰۱/۱۸
اصلاح: ۹۳/۰۳/۲۰
پذیرش: ۹۳/۰۳/۲۵

کلمات کلیدی:
ایمنی زیستی
ژن نشانگر
کوترانسفورماسیون
تراریخت
نوترکیبی

چکیده

روند افزایش جمعیت جهان و نیاز روز افزون دنیا به تأمین امنیت غذا، کاربرد علم مهندسی ژنتیک و استفاده از ارگانیسم های تراریخت را پر اهمیت تر نموده است. بهره گیری از این علم بدون در نظر گرفتن خطرات احتمالی موجب آثار زیانبار بر طبیعت خواهد شد. یکی از نگرانی های تولید موجودات تراریخت، سیستم انتخاب می باشد که منجر به رشد انتخابی سلول‌های تراریخت می گردد. ژن‌های کد کننده آنتی‌بیوتیک در شناسایی سریع سلول‌های تراریخت بسیار کارآمد هستند. به علت انتشار ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک در طبیعت یا فرار ژن‌های مقاوم به سموم شیمیایی به گونه‌های وحشی، دانشمندان به دنبال راه حل‌هایی برای تولید ارگانیسم‌های تراریخت عاری از نشانگر یا دارای ژن های نشانگر مناسب برای محیط زیست هستند. ارگانیسم‌های نوع اول در ابتدا بر مبنای مقاومت به آنتی بیوتیک و سموم شیمیایی انتخاب می گردند. ولی در مراحل بعدی دستورزی و رشد، نشانگر گزینشگر برداشته خواهد شد. در حالت دوم از ژن های نشانگر ایمن برای محیط زیست استفاده می گردد. در این تحقیق روش‌های مختلفی برای حذف نشانگر گزینشگر از ارگانیسم‌های تراریخت اولیه و تعدادی از ژن‌های مارکر گزینشگر مناسب برای محیط زیست پیشنهاد شده است که می توان از آنها برای تولید ارگانیسم های تراریخت استفاده نمود.

مقدمه

با توجه به اعلام سازمان خواربار جهانی[1] در سال ۲۰۱۳ مبنی بر افزایش جمعیت جهان به بیش از ۹ میلیارد نفر در سال ۲۰۵۰ و نیاز به محصولات غذایی ٪۱۷۰ وضعیت کنونی، استفاده از علم مهندسی ژنتیک حائز اهمیت بیشتری می گردد. این علم در طی تقریباً چهار دهه توانسته است تحولات بزرگی در زمینه‌های مختلف ایجاد نماید که از آن جمله می توان به کمک به ایجاد امنیت غذایی با افزایش فراورده‌های غذایی، تولید دارو با استفاده از جلبک‌ها، حیوانات و گیاهان تراریخت، تولید محصولات غذایی حاوی مواد مغذی و ویتامین ها، تولید گیاهان مقاوم به آفات، تولید ارگانیسم تراریخت به منظور پالایش محیط و تولید رنگدانه های خاص مثل بتاکارتن، لوتین، آستاکسانتین[2]، کانتاکسانتین[3] و غیره در جلبک ها، گیاهان، حیواناتی نظیر ماهی‌های آکواریومی اشاره نمود (Hawkins and Nakamura, 1999; Chaogang *et al*., 2010; Carstens *et al*., 2012; Enzing *et al*., 2012). بهره گیری از این علم بدون در نظر گرفتن خطرات احتمالی موجب آثار زیانبار و در بعضی موارد جبران ناپذیر بر سلامت

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sharifisirchi@yahoo.com

1. FAO
2. Astaxanthin
3. Cantaxanthin

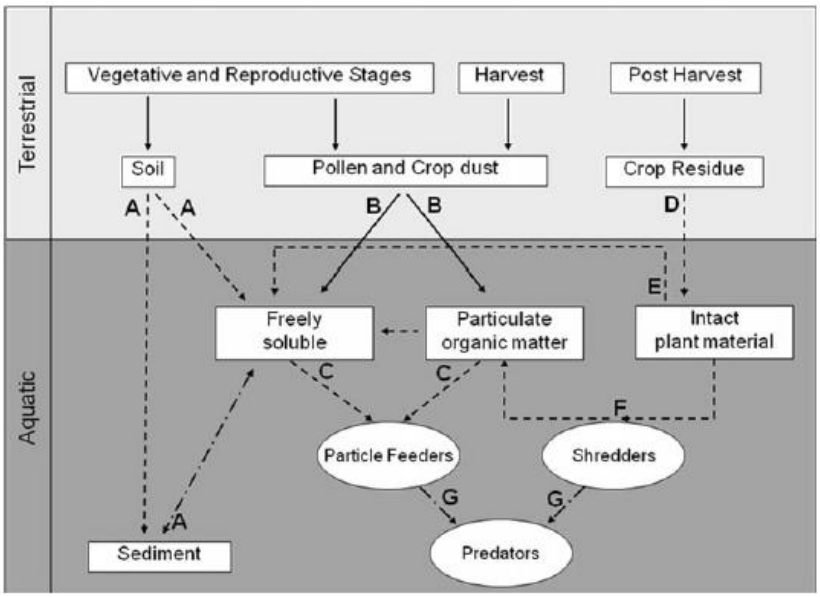
[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

انسان و طبیعت خواهد گردید که از جمله آنها می‌توان به خطر انتقال افقی ژن‌های گزینشگر مقاوم به آنتی بیوتیک ها، ژن های پروتئین های سمی به کار گرفته شده در مبارزه با آفات و پروموتورهای ویروسی اشاره نمود.

گیاهان تراریخت و اجزای آنها به چندین طریق می توانند به اکوسیستم دریایی وارد شوند. در مسیر اول، پروتئین های نوترکیب ممکن است در طول فصل رشد با مولکول های خاک پیوند دهند و یا اینکه به صورت محلول در آب در خاک قرار گیرند (مسیر A ، شکل ۱). اما آنچه که مشخص است پروتئین های نوترکیب جذب شده توسط ذرات خاک سریعاً تجزیه می شوند و آن دسته که به آب‌های آزاد راه می‌یابند رسوب می کنند. لذا، خطرات زیست محیطی از این مسیر بسیار کم است. مسیر بعدی انتقال هوایی ذرات معلق در هوا و دانه گرده آنها می باشد. به طور کلی به دلیل فاصله مزارع با دریاها، مقدار ورود این گروه نیز کم می باشد. آن دسته ای هم که وارد آب دریاها می شوند پس از مدت زمان کوتاهی تخریب شده و قسمتی از مواد تشکیل دهنده آنها به محیط اطراف منتقل می شود (مسیر E). البته پایدار باقی ماندن پروتئین‌های آزاد شده در محیط آبی نیز غیر محتمل است. اما همانگونه که در مسیر احتمالی B از شکل ۱ نمایش داده شده، ممکن است پروتئین های دانه گرده یا ذرات گیاهی معلق در هوا، به صورت ذرات آلی خاص در محیط دریایی باقی بمانند. در این صورت به طور بالقوه موجودات دریایی تغذیه کننده از آن ها در معرض قرار می گیرند (مسیر C، شکل ۱).

مسیر دیگر آلودگی اکوسیستم دریایی، انتقال و ریخته شدن تصادفی محصولات تراریخت و اجزای آنها در اثر حوادثی نظیر غرق شدن کشتی ها می باشد. در این صورت نه تنها موجودات دریایی تغذیه کننده از محصولات تراریخت بلکه موجودات دریایی شکارچی در چرخه دوم نیز در معرض قرار می گیرند (مسیرG، شکل ۱) (Carstens *et al*., 2012).



شکل ۱. مدل پیشنهادی برای ورود احتمالی محصولات تراریخت و پروتئین های ترانسژن آنها به اکوسیستم آبی. فلش های ممتد مسیر های احتمالی را نشان می دهند. فلش های منقطع، مسیرهای احتمالی تجزیه پروتئین های ترانسژن ها را نشان می دهد.

علاوه بر خطرات موجودات تراریخته خشکی، نگرانی های زیادی نیز در مورد موجودات دریایی تراریخته و رهاسازی بعدی آنها در محیط وجود دارد. امروزه، جلبک‌ها به منظور بهبود ظرفیت فتوسنتزی، بهبود تولید محصولات با منشا طبیعی نظیر رنگدانه‌ها و تولید محصولات جدید، تراریخته می‌گردند (Enzing *et al*., 2012). تکنیک های مهندسی ژنتیک در ماهی ها نیز استفاده شده اند و در اولین قدم سبب تولید ماهی های سالمون دارای ترانسژن هورمون رشد شدند که وزن این ماهی را به بیش از دو برابر رساند (Hallerman *et al*., 2007). از دیگر ماهی‌های تراریخت می توان به ماهی‌های سالمون دارای ژن مقاوم به سرما، گربه ماهی دارای ژن مقاوم به بیماری ها، زبرا ماهی دارای ژن موثر در متابولیسم فسفر و ماهی‌های آکواریومی با

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

رنگدانه های خاص اشاره نمود (Eenenaan and Olin, 2006). محصولات موجودات آبزی تراریخت به دلیل نگرانی های زیاد پیرامونی تجاری نشده اند.

به کارگیری نگرش محتاطانه (ایمنی زیستی) در تمام زمینه های به کارگیری علم مهندسی ژنتیک ضروری می باشد. در ارتباط با مهندسی ژنتیک و سازوارهای دست ورزی شده ژنتیکی و بهره گیری قطعی از محصولات آنها، ایمنی زیستی، شامل یک سری تدابیر، معیارها، سیاست ها و روش هایی است که خطرات احتمالی ناشی از انتقال ژن را به حداقل مقدار برساند. یکی از نگرانی ها در ارتباط با موجودات تراریخته، وجود ژن های نشانگر گزینشگر می باشد که همراه با ژن مورد نظر وارد ژنوم میزبان می گردد. از دیگر نگرانی ها پیرامون ژن های گزارشگر مقاومت به آنتی بیوتیک ها می توان به احتمال انتقال آن ها به باکتری های بیماریزا اشاره نمود. به طوریکه در یک مطالعه که در هلند انجام گرفت پیش بینی شد که حداقل ٪۶ از ژن های محصول تراریخته گوجه فرنگی بتوانند سالم باقی مانده، وارد روده بزرگ شده و در آنجا توسط باکتری ها به دام بیفتند که در نتیجه آن ژن از باکتری به باکتری های بیماریزا منتقل و سبب مقاومت آن ها به آنتی بیوتیک ها گردد (van der Vossen *et al*., 1998).

درا ین مقاله روش های به حداقل رساندن نگرانی ها در ارتباط با ژن های نشانگر مورد بررسی قرار می گیرند.

روش‌های برطرف نمودن نگرانی‌های ناشی از ژن‌های نشانگر

برای تولید ارگانیسم های تراریخت از سیستمی انتخاب استفاده می‌شود که منجر به رشد انتخابی سلول‌های تراریخت می‌گردد. ژن‌های کد کننده آنتی بیوتیک در شناسایی سریع سلول‌های تراریخت بسیار کارآمد هستند (شریفی سیرچی و کاظمی پور، ۱۳۸۸). در فرآیند انتخاب در محیط کشت فقط سلول‌های تراریخت دارای ژن‌های نشانگر انتخابی می توانند زنده بمانند درحالی که سلول‌های غیر تراریخت از بین می‌روند. روش‌های غربالگری برای شناسایی گیاهان تراریخت در بین تعداد بسیار زیاد ارگانیسم های باززایی شده غیر تراریخت وقت گیر می باشند، چرا که در عدم حضور نشانگر انتخابی، میزان باززآیی گیاه تا ده برابر افزایش می‌یابد (De Vetten *et al*., 2003). از آنجا که نشانگر گزینشگر وارد ژنوم میزبان می‌شوند نگرانی‌هایی درباره‌ی رهاسازی آن توسط ارگانیسم های تراریخت در اکوسیستم وجود دارد. تولید محصولات تراریخت بدون نشانگر آنتی بیوتیک باعث حذف خطر انتقال عمودی و افقی می‌شود (Kay *et al*., 2002). به طور کلی چهار راه برای جلوگیری و یا برطرف نمودن خطرات ناشی از به کارگیری ژن های نشانگر وجود دارد.

الف) عدم استفاده از ژن‌های نشانگر: به این مفهوم که فقط ژن مورد نظر به ارگانیسم منتقل گردد و برای اطمینان از تراریخته گردیدن ارگانیسم مورد نظر از آنالیزهای ملکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمراز و غیره استفاده نمود. هرچند که این امر از نظر تئوری مناسب به نظر می آید اما در عمل بسیار وقت گیر، پر هزینه و در مواردی که نیاز به کشت و بررسی فنوتیپی داشته باشد، به مزارع بزرگ نیاز است. اما در حال حاضر دانشمندان سعی بر ایجاد روش های ساده و ارزان برای تشخیص ارگانیسم های تراریخت دارند و انتظار می رود در سال های آتی این روش ها کاربردی گردند (Aziz and Machray, 2003).

ب) استفاده از ژن‌های نشانگر که اثرات مضر زیستی نداشته باشند. ژن های نشانگر به دست آمده از میکروارگانیسم ها که معمولاً سبب مقاومت به آنتی بیوتیک ها و سموم شیمیایی می شوند از نظر مقبولیت عمومی دچار مشکل می باشند و لذا موجودات تراریخت حاوی این ژن‌ها مرحله تجاری سازی بسیار سختی را طی خواهند کرد بنابراین دانشمندان با کشف یکسری از ژن‌های مارکری که دارای جنبه های زیست محیطی مثبتی باشند در صدد رفع این مشکل برآمده اند. استراتژی های انتخاب این نوع از نشانگرها به چهار گروه: انتخاب مثبت، انتخاب بصری، انتخاب منفی و انتخاب بر اساس پاتوژن طبقه بندی می شوند (Wei *et al*., 2012).

۱- انتخاب مثبت. ژن های مارکر گزینشگر مثبت، سلول های تراریخته شده را بدون اثر کشندگی بر روی سلول های غیر تراریخت مشخص می نمایند. چنین ژن‌هایی در فرآیندهای متابولیکی همچون بیوسنتز هورمون، متابولیسم ساکارید و

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

متابولیسم اسید آمینه مشارکت دارند. از ژن های مارکر مسیر بیوسنتز هورمون ها می توان به ژن *kn1* از ذرت و همولگ‌های آن در سایر گونه های گیاهی اشاره نمود. این ژن ها به طور نرمال در مریستم شاخه بیان می شوند. استفاده از این ژن، فراوانی تراریخت ها را تا چهار برابر استفاده از ژن مارکر *nptII* افزایش داد (Luo *et al*., 2006).

ژن *AtTPS1* از گیاه آرابیدوپسیس، آنزیم ترهالوز-۶- فسفات سنتاز را به رمز در می آورد از ژن های مارکر مسیر متابولیسمی ساکارید می باشد. سلول های گیاهی تراریخته حاوی این ژن قادر به رشد و جوانه زنی نرمال در محیط های با فشار اسمزی بالا می باشند. اما سلول های غیر تراریخته گیاهچه های آلبینو و کوچک تشکیل می دهند (Gómez *et al*., 2010).

از ژن های مارکر مسیر متابولیکی اسید آمینه می توان به ژن *TSB1* از آرابیدوپسیس اشاره نمود که تریپتوفان سنتاز بتا ۱ را به رمز در می آورد. گیاه گوجه فرنگی تراریخته حاوی این ژن مارکر، تجمع بیشتری از تریپتوفان داشتند. به علاوه تحمل بیشتری را به کادمیم نشان داد (Sanjaya *et al*., 2008).

۲- انتخاب بصری[4]. در اینجا ژن های مارکر، پروتئین هایی را به رمز در می آورند که یا به طور مستقیم نور فلورسنت ساطع می نمایند مثل پروتئین فلورسنت سبز یا آنزیم هایی را به رمز در می آورند که سوبستراهای خاصی را کاتالیز می کنند که این واکنش سبب ساطع شدن نور فلورسنت می شود مثل luc و یا واکنش های رنگی را کاتالیز می کنند مثل lac Z (Wei *et al*., 2012).

۳- انتخاب منفی. در اینجا ژن مارکر گزینشگر اثر کشندگی بر روی سلول ها و بافت های غیر تراریخته دارد. که از این گروه می توان ژن *badh* را نام برد که آنزیم بتائین آلدهید دهیدروژناز[5] را به رمز در می آورد. این آنزیم ماده شیمیایی سمی بتائین آلدهید را به گلیسین بتائین غیر سمی تبدیل می نماید. بعد از واکنش ترانسفورماسیون و استفاده از ماده بتائین آلدهید به عنوان معرف گزینش، سلول های غیر تراریخته از بین می روند (Chen and Murata, 2011).

۴- انتخاب بر پایه پاتوژن. در اینجا از ژن های مقاوم به پاتوژن به عنوان مارکر گزینشگر و از پاتوژن ها به عنوان معرف گزینش استفاده می شود. در سالیان اخیر دانشمندان در تلاش هستند تا ژن های مقاومت را شناسی نموده (Baharlouei *et al*., 2010; Koch *et al*., 2006) تا از آن ها برای گزینش استفاده نمایند. از این گروه می توان به ژنی که پروتئین شبه فردوکسین گیاهیPFLP[6] را در فلفل شیرین تولید می نماید، اشاره نمود که سبب مقاومت به باکتری *Erwinia carotovora* عامل بیماری پوسیدگی نرم می شود (Yip *et al*., 2007).

ج) کوترانسفورماسیون دو ترانسژن[7] (یکی ژن مربوط به صفت مورد نظر و دومی ژن مربوط به مارکر گزینشگر) که در ادامه در نتیجه تفرق از یکدیگر جدا می گردند.

د) جداسازی و برش ژن مارکر گزینشگر از ژن مورد نظر، بعد از انتخاب موفق ارگانیسم تراریخت با استفاده از نوترکیبی جایگاه ویژه، ترانسپوزیشن و نوترکیبی همولوگ ژن مارکر گزینشگر برداشته می شود.

فرآیندهای موثر در حذف مارکرهای گزینشگر

هر کدام از روش های فوق الذکر برای حذف ژن های مارکر گزینشگر نیازمند به اطلاع دقیق از ژنتیک مولکولی ارگانیسم ها و فرآیندهایی همچون کوترانسفورماسیون، نوترکیبی همولگ، نوترکیبی جایگاه ویژه و تراسپوزیشن دارد که در ذیل به نقش کاربردی این فرآیندها، معایب، مزایای و مثال هایی از استفاده از آنها در روش های مختلف حذف ژن های مارکر گزینشگر می‌پردازیم.

4. Visual selection
5. BADH
6. Plant fredoxin like protein
7. Co-transformation of two transgenes

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

الف) کوترانسفورماسیون

یکی از روش‌های تولید تراریخت‌های بدون نشانگر است که بر پایه آگروباکتریوم یا بیولیستیک می باشد که در آن مارکر گزینشگر و ژن مورد نظر در ساختارهای جدا هستند. سه روش برای کوترانسفورماسیون استفاده می شود.

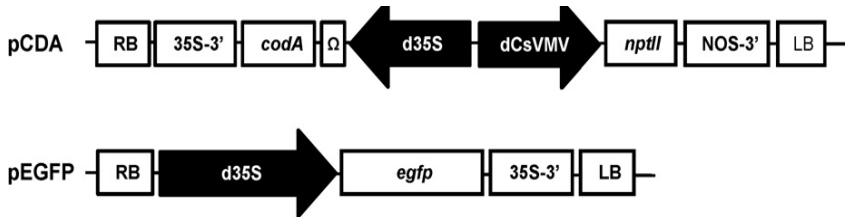
۱- وارد نمودن دو نسخه تی-دی ان ای[8] در استرین‌های جدای آگروباکتریوم

۲- وارد کردن دو پلاسمید به یک بافت توسط روش تفنگ ژنی[9]

۳- وارد نمودن دو نسخه تی-دی ان ای در یک استرین آگروباکتریوم که در رپلیکون های متفاوت حمل میشوند.

۴- وارد نمودن دو نسخه تی-دی ان ای در یک اگروباکتریوم که در یک رپلیکون قرار گرفته اند.

در همه‌ی این روش‌ها مارکر گزینشگر، هنگام نوترکیبی و تفکیک در طی تولید مثل جنسی، حذف می شود (Scutt *et al*., 2002). کوترانسفورماسیون را نمی توان برای گیاهانی با تولید مثل رویشی به کار برد. این روش نه تنها به گیاه بارور نیاز دارد بلکه بسیار وقت گیر است. کوترانسفورماسیون برای درختان با زمان تولید مثلی طولانی قابل اجرا نیست (Rommens *et al*., 2004). در سال ۲۰۰۸ یک سیستم کوترانسفورماسیون با استفاده از دو استرین آگروباکتریوم برای تولید انگور تراریخت حاوی ژن تولید کننده پروتئین فلورسنت سبز[10] فاقد ژن های نشانگر گزینشگر مورد استفاده قرار گرفت. در این سیستم از جنین های سوماتیکی انگور بدون بذر رقم تامپسون استفاده گردید. در نتیجه آن ۱۸ گیاه تراریخت فاقد ژن مقاومت به کانامایسن حاصل گردید (شکل ۲) (Dutt *et al*., 2008). تحقیقات نشان می دهد کوترانسفورماسیون در یک استرین بسیار کارآمدتر از کوترانسفورماسیون در دو استرین متفاوت است، گرچه فرآیند کلی این روش‌ها هنوز مشخص نیست (Gelvin *et al*., 2003).



شکل ۲. نقشه فیزیکی ناحیه تی-دی ان ای پلاسمیدهای دو تایی استفاده شده کوترانسفورماسیون. D35S، پروموتور 35S ویروس موزاییک کلم که دو دفعه در کاست قرار گرفته است: dCsVMW، پروموتور CsVMV، 35S-30 و NOS-30 رونوشت های 35S و NOS از ویروس موزاییک کلم : RB و LB، مرز های راست و چپ (Dutt *et al*., 2008).

یک روش جایگزین و بسیار کارآمد برای تولید تراریخت بدون نشانگر بر اساس به کارگیری یک مرحله‌ی انتخاب منفی است. استفاده از نشانگرهای انتخابی منفی بعد از نشانگر مثبت در یک ساختار، یک روش بسیار قوی برای ایجاد گیاهان تراریخت بدون نشانگر است. در این روش، نتاج تراریخت فاقد نشانگر انتخابی منفی تحت فشار انتخاب ژن نشانگر منفی و حضور ژن مورد نظر، انتخاب می شوند. انتخاب منفی به محققین اجازه می دهد تا تحقیقات خود را برای گیاهان تراریخت بدون نیاز به تعداد زیادی از آنالیزهای مولکولی کاهش دهند (یعنی هزاران واکنش زنجیره ای پلیمراز[11]). اخیراً یک ژن نشانگر جدید به نام *dao*1 مشخص شده است که آنزیم D- آمینواسید اکسیدآز را کد می کند که هم برای انتخاب مثبت و هم برای انتخاب منفی بسته به نوع سوبسترا به کار می رود. بنابراین این امکان وجود دارد که انتخاب منفی را بعد از انتخاب مثبت از طریق تغییر D-alanine یا D-serine به D-isoleucine یا D-valine به کار برد (Erikson *et al*., 2004).

ب) نوترکیبی جایگاه ویژه

8. T-DNA
9. Gengun
10. GFP
11. PCR

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

نوترکیبی یک پدیده عمومی است که ممکن است در هر جای دو مولکول دی ان ای همولگ اتفاق افتد. در باکتریوفاژهای معتدل نوع دومی از نوترکیبی جایگاه ویژه وجود دارد که بین سایت‌های برشی خاصی در کروموزوم باکتری و فاژ رخ می دهد. مکان‌های نوترکیبی جایگاه ویژه در باکتری و فاژ سایت پیوستگی باکتری و فاژ نامیده می شود. هر سایت پیوستگی شامل سه قطعه است. قطعه مرکزی که توالی حفاظت شده دارد در آن نوترکیبی رخ می دهد. یکی از پروتئین‌های فاژ، یک اینتگراز است که نوترکیبی جایگاه ویژه را کاتالیز می کند و منجر به مبادله فیزیکی دی ان ای می‌شود. برش در جایگاه ویژه نیازمند آنزیم اینتگراز فاژ به نام excisionase است. سه سیستم نوترکیبی جایگاه ویژه وجود دارد که برای تولید گیاهان تراریخت بدون نشانگر کارآمد هستند:

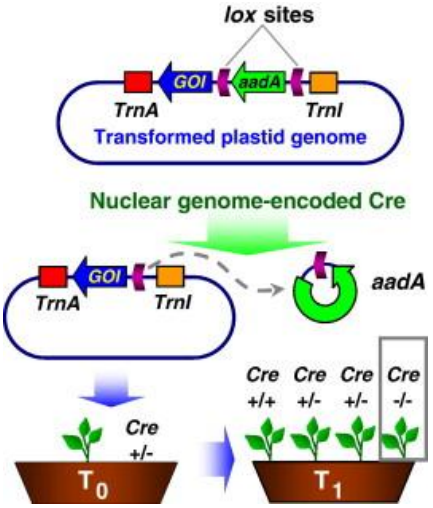
۱- سیستم نوترکیبی Cre/loxP از باکتریوفاژ P1، که در آن آنزیم Cre جایگاه ویژه هدف خود را شناسایی می کند.

۲- سیستم نوترکیبی FLP/FRT از ساکارومایسز سریویزیه، که در آن ریکامبیناز FLP بر روی سایت‌های FRT فعالیت می‌کند.

۳- سیستم نوترکیبی R/RT از زایگوساکارومایسز روکسی، که در آن R و RS به ترتیب ریکامبیناز و سایت‌های نوترکیبی هستند.

بر خلاف سایر ریکامبینازها Cre, Flp و R برای عمل مناسب در گیاهان نیازمند تغییرات و فاکتورهای اختصاصی میزبان نمی‌باشند. سایت‌های شناسایی برای ریکامبیناز توالی‌های پالیندرمی هستند که در کنار یک توالی هسته‌ای هفت تا دوازده نوکلئوتیدی واقع شده‌اند. شکست سایت در نواحی بین المنت‌های پیوند دهنده ریکامبیناز و توالی هسته صورت می گیرد (Zuo *et al*., 2001).

در این سیستم، حذف نشانگرهای انتخابی نیازمند بیان ریکامبیناز در گیاهان تراریخت است. کاست ژن ریکامبیناز را می توان به گیاهان ترانسفورم شده دارای نشانگرهای گزینشگر احاطه شده در بین دو ناحیه شناسایی، قرار داد. در صورتی که یک گیاه تراریخت مورد نظر با یک گیاه بیان کننده ژن ریکامبیناز تلاقی یابد، در نسل تفکیک گیاهان تراریخت بدون نشانگر قابل شناسایی هستند (شکل ۳)(Meyers *et al*., 2010). برای حذف مرحله‌ی اصلاحی، یک کوترانسفورماسیون بر پایه‌ی بیان گذرای سیستم نوترکیبی جایگاه ویژه در ترکیب با یک ژن غالب کشنده شرطی به نام coda طراحی شده است (Dale and Owe 1993; Perera *et al*., 1993).



شکل ۳. روش دو مرحله ای حذف ژن نشانگر گزینشگر از طریق نوترکیبی جایگاه ویژه Cre/Lox (Meyers *et al*., 2010).

علاوه بر این، استفاده از پروموترهای القایی سیستم وکتور CLX و سیستم وکتورGST-MAT شامل ژن‌های سرطانی برای ازدیاد سلولی و باززایی گیاهان تراریخت که ژن‌های ریکامبیناز را بیان می کنند سودمند است. پس از استفاده از عوامل القایی، ریکامبیناز برای برش القا شده نشانگر گزینشگر و همه‌ی توالی‌های بین دو جایگاه نوترکیبی، بیان می‌شود

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

(Sugita *et al*., 2000; Zuo *et al*., 2001). پروموتورهای ویژه بافت گیاهی برای تولید تراریخت‌های بدون نشانگر گزینشگر می‌توانند در الگوهای برشی مفید باشند. وکتورهای ویروسی گیاهی Cre (TMV-Cre and PVX-Cre) برای بیان گذرا ریکامبیناز Cre به عنوان یک روش جایگزین در تولید گیاهان تنباکو تراریخت بدون نشانگر انتخابی توسعه یافته‌اند. در این روش گیاهان تراریخت دارای جایگاه‌های lox و نشانگرگزینشگر مقاومت به علف کش به وسیله ویروس‌های نوترکیب PVX-Cre و TMV-Cre آلوده شده‌اند. PVX-Cre و TMV-Cre به صورت سیستماتیک برگ‌ها را آلوده می کنند و اجازه می دهند که باززایی بدون فشار انتخاب، صورت گیرد. این استراتژی برای گونه‌های گیاهی که برای باززایی خود وابسته به اندام زایی و جنین زایی سوماتیکی هستند، به ویژه در سویا، سیب زمینی و گونه‌های گیاهان چوبی می تواند به کار گرفته شود (Kopertekh and Schiemann, 2004). استراتژی دیگر، استفاده از دو سیستم نوترکیبی جایگاه ویژه است. یکی برای الحاق دی ان ای به جایگاه نوترکیبی درون ژنوم میزبان که به عنوان سایت هدف طراحی شده است و دیگری برای حذف توالی‌هایی است که بعد از انتقال دی ان ای مورد نیاز نیستند. این راهکار بر پایه استفاده‌ی همزمان FLP/FRT و Cre/lox و سیستم القایی R/Rs است (Srivastava and Ow, 2004). در سیستمی دیگر حذف ژن مارکر گزینشگر در دانه گرده تنباکو صورت پذیرفت. در این سیستم از پروموتور اختصاصی میکروسپور و یک سیستم نوترکیبی جایگاه ویژه کارآمد استفاده گردید (Mlynarova *et al*., 2006).

ج) ترانسپوزون

ترانسپوزون ها در فاژها، باکتری ها، قارچ ها، گیاهان عالی، ویروس ها و حشرات وجود دارند. این عناصر برای اولین بار توسط باربارا مک کلینتوک و مارکوس رودس[۱۲] در یوکاریوت ها (ذرت) پیدا شدند. ترانسپوزون‌ها توالی‌های دی ان ای هستند که صدها تا هزار باز درازا دارند، حداقل یک پروتئین را کد می کنند که به آنها توانایی همانندسازی را می دهد.

از ترانسپوزون‌ها می توان برای حذف نشانگر گزینشگر طی چند مرحله استفاده کرد (شکل ۴) (Ow, 2001).

i) وارد کردن ژن نشانگر به درون یک ترانسپوزون

ii) کوترانسفورماسیون همراه با ژن مورد نظر

iii) تفکیک ژن نشانگر

سیستم وکتورMAT دارای ژن *ipt* وAc المنت‌ها، طراحی شده است، با استفاده از این سیستم، قطعات برگ تنباکو ترانسفورم و انتخاب شدند. برش Ac تغییر یافته باعث تولید تنباکوی تراریخت بدون نشانگر گزینشگر، بدون نیاز به تلاقی‌های جنسی یا تولید بذر گردید.

اما استفاده از سیستم ترانسپوزون اشکالات متعددی دارد که از آن جمله می توان به موارد ذیل اشاره نمود.

۱- گونه‌های متفاوت کارایی ترانسپوزیشن متفاوتی دارند.

۲- این روش پر هزینه و وقت گیر است.

۳- کارایی باززایی گیاهان تراریخت بدون نشانگر، به دلیل تمایل وارد شدن مجدد المنت‌های ترانسپوزون در جای دیگر از ژنوم، پایین است.

۴- برش غیر دقیق

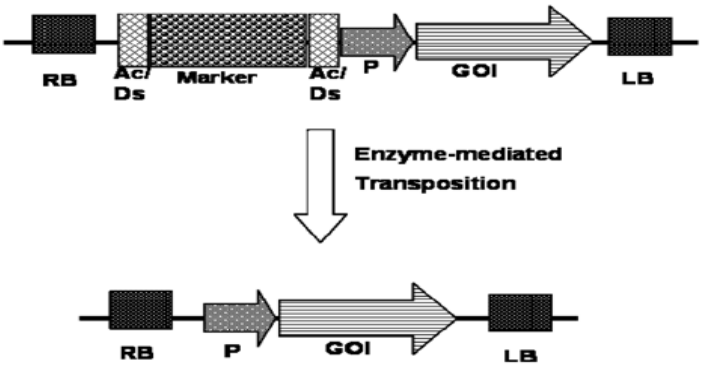
۵- تولید موتاسیون‌ها به علت سیکل‌های برش و الحاق

۶- بی ثباتی ژنتیکی گیاهان تراریخت، زیرا حضور پیوسته ترانسپوزون‌های هترولوگوس کارایی را کاهش می دهند.

12. Barbara Mc Clintock و Marcus Rhoades

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

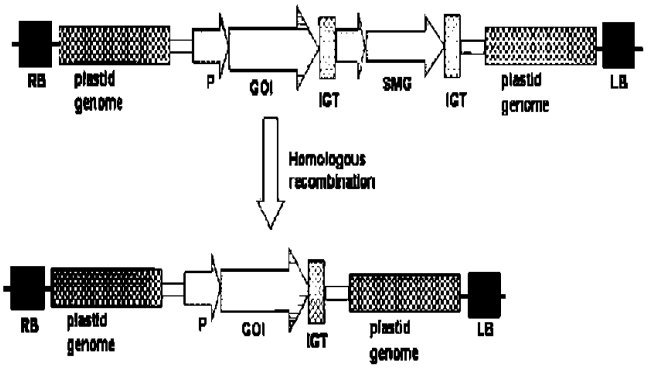


شکل ۴. یک روش بر مبنای ترانسپوزون Ac/Ds برای حذف ژن مارکی از ژنوم هسته ای گیاهان تراریخت. روش روی جایگزین مجدد درون ژنومی ژن GOI و تفکیک ژن نشانگر گزینشگر در نسل نتاج استوار است. GOI: ژن مورد نظر (Upadahyaya *et al*., 2010).

.

د) نوترکیبی همولگ

هرگاه عمل تبادل قطعه بین دو قطعه دی ان ای که دارای توالی یکسان یا تقریباً یکسانی هستند، رخ دهد سبب ایجاد نوترکیبی همولوگ می شود که معمولاً چنین قطعاتی در نواحی همتراز کروموزوم های همولوگ وجود دارند (شریفی سیرچی، ۱۳۹۳). حذف توالی های قرار گرفته در بین دو توالی تکراری هم جهت در ژنوم در فراوانی پایینی در سلول های سوماتیکی گزارش شده است. بنابراین استفاده از چنین سیستم هایی آسان نمی باشد و نیاز به مطالعات بیشتری دارد (شکل ۵). اما در سال ۲۰۰۰ در نتیجه تحقیقات گروه تحقیقاتی دکتر مایر ژن نشانگر مقاومت به کانامایسن و یک ژن نشانگر گزینشگر منفی که توسط دو جایگاه attP دارای ۳۵۲ bp طول احاطه گردیده بودند با کارایی بالا در طول رشد حذف گردیدند (Zubko *et al*., 2000). لازم به یادآوری است که در این سیستم نیازی به بیان ژن ریکامبیناز با جایگاه ویژه نمی باشد. نوترکیبی همولگ توسط حوادثی همچون برش تک و یا دو رشته ای دی ان ای تحریک می شود. همچنین تحقیقات نشان داده است با بیان ژن های مرتبط با نوترکیبی باکتریایی RecA وRuvC نوترکیبی همولگ در سلول های سوماتیکی گیاهان افزایش یافته است (Reiss *et al*., 1996, 2000). اما باستفاده از این ژن ها، بر خلاف القای برش دو رشته ای اختصاصی دی ان ای، همه توالی های همولگ ژنوم در معرض نوترکیبی قرار خواهند گرفت. بنابراین استفاده از آن ها با محدودیت روبه روست.



شکل ۵. نمایش شماتیک مکانیسم حذف ژن نشانگر از کلروپلاست بوسیله نوترکیبی همولگ. ژن نشانگر گزینشگر از طریق نوترکیبی. GOI، ژن نشانگر: IGT، ژن مورد نظر: SMG، ژن مارکر گزینشگر (Upadahyaya *et al*., 2010).

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

نتیجه گیری

هر چند گزارش هایی مبنی بر حضور دی ان ای فاژی و پلاسمیدی در سلول های موش های آزمایشگاهی بعد از خوراندن مقدار زیادی از این مواد وجود دارد ولی هیچ مدرکی وجود ندارد که ثابت کند دی ان ای گیاهی بتواند به سلول های جانوران منتقل و بیان شود و یا اینکه، نشانگرهای ترانسژنیک مورد استفاده متحمل خطر سلامتی برای انسان یا حیوانات خانگی می‌شوند. اما، دلایل زیادی برای تولید گیاهان تراریخت با حداقل دی ان ای خارجی وجود دارد. به طور مثال نگرانی‌های زیادی در مورد انتقال ژن های مارکر از گیاهان تراریخت به باکتری های خاکزی وجود دارد. ژن های ساخته شده از DNA می توانند در محیط برای مدت طولانی زنده بمانند. به طور مثال ژن مقاومت به آنتی بیوتیک از گیاه تنباکو تراریخته توانست در خاک برای چهار ماه باقی بماند (Widmer *et al*., 1996). در سال ۱۹۹۸ محققین در شرایط آزمایشگاهی مشاهده نمودند که یک باکتری خاکزی ژن مقاومت به آنتی بیوتیک را از گیاه چغندر قند تراریخت به دست آورد (Gebhard and Smalla, 1998). با توجه به نگرانی‌های موجود بسیاری از اتحادیه ها و انجمن های بین المللی خواستار حذف این ژن ها در جریان تولید موجودات تراریخت شده اند. روش های ترانسفورماسیون مناسب جهت تولید موجودات تراریخت دارای ژن هدف و فاقد ژن های مارکر گزینشگر امروزه در حال توسعه سریع می باشند. انتخاب سیستم ترانسفورماسیون بستگی به گونه ارگانیسم و ژن هدف دارد. موفقیت در روش کوترانسفورماسیون به درجه لینکاژ بین مناطق جایگزینی و فراوانی ترانسفورماسیون دارد. روش های مبتنی بر نوترکیبی جایگاه ویژه و ترانسپوزیشن در سیستم های ترانسفورماسیون مستقیم (بیولیستیک) و غیر مستقیم (آگروباکتریوم) که از سیستم های آنزیمی فعال در ارگانیسم هدف استفاده می نمایند مناسب می باشند. امتیاز ویژه استفاده از ترانسپوزیشن‌ها این است که به لحاظ قابلیت آنها در حرکت و انتقال ژن از محلی به محل دیگر، می توان پدیده اثر مکان ژن را نیز بررسی نمود.

بسیاری از شرکت‌های تولید کننده محصولات تراریخت از روش‌های فوق الذکر در تحقیقات خود استفاده می کنند که سبب کم شدن نگرانی‌های عمومی نسبت به این محصولات می‌شود. در مورد ماهی های تراریخت نیز، شرکت ها برای ایمنی هر چه بیشتر از تکنیک عقیم سازی ماهی های تراریخت استفاده می نمایند که منجر به جلوگیری از انتشار ژن های نوترکیب می‌گردد. به علاوه استفاده از پروموتورهای ماهی نیز در دستور کار این شرکت ها می باشد (Zbikowska, 2003; Zhong *et al*., 2012). تحقیقات بیشتر در این زمینه باعث یافتن راه‌های بیشتر، سریع و مطمئن تری خواهد شد.

منابـع

شریفی سیرچی، غ. ر. ۱۳۹۳. ژنتیک مولکولی. چاپ دوم. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۵۰ ص.

شریفی سیرچی، غ. ر. و کاضمی پور، ع. ۱۳۸۸. بیوتکنولوژی اصول و مبانی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه شهید باهنر کرمان. ۳۱۱ ص.

Aziz, N., Machray, G.C. 2003. Efficient male germ line transformation for transgenic tobacco without selection. Plant Molecular Biology. 23: 203-211.

Baharlouei, A., Sharifi-Sirchi, G.R., Shahidi Bonjar, G.H. 2010. Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent *Streptomyces plicatus* strain 101 and its new antagonistic specterum of activity. The Philippine Agricultural Scientist. 93(4): 369-375.

Carstens, k., Bachman, P., Schriver, A.D., Dively, G., Federici, B., Hamer, M., Gielkens, M., Jensen, P., Lamp, W. Rauschen, S., Ridley, G., Romeis, J., Waggoner, A. 2012. Genetically modified crops and aquatic ecosystems: considerations for environmental risk assessment and non-target organism testing. Transgenic Research. 21:813–842.

Chaogang, W., Zhangli, H., Anping, L., Baohui, J. 2010. Biosynthesis of Poly-3-hydroxybutyrate (PHB) in the transgenic green alga Chlamydomonas reinhardtii. Journal of Phycology. 46(2): 396-402.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

Chen, T.H., Murata, N. 2011. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. Plant Cell and Environment. 34: 1-20.

Dale, E.C., Ow, D.W. 1993. Intra-and intermolecular site-specific recombination in plant cells mediated by bacteriophage P1 recombinase. Gene. 91: 79-85.

De Vetten, N., Wolters., A.M., Raemakers, K., Van der Meer, I. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a crosspollinating and vegetatively propagated crop. Nature Biotechnology. 21: 439-442.

Dutt, M., Li., Z.T., Dhekney, S.A., Gray, D.J. 2008. A cotranformation system to product transgenic Grapevine free of marker gene. Plant Science. 175: 423-430.

Eenenaan, A.L., Olin, P.G. 2006. Careful risk assessment needed to evaluate transgenic fish. Califonia Agriculture. 60: 124-129.

Enzing, C., Nooijen, A., Eggink, G., Spriner, J., Wijffels, R. 2012. Algae and genetic modification research, production and risks. COGEM Report. 63 p.

Erikson, O., Hertzberg, M., Nasholm, T. 2004. A conditional marker gene allowing both positive and negative selection in plants. Nature Biotechnology. 22: 455–458.

FAO. 2013. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available: athttp://www.fao.org/fileadmin/user_upload/esag/docs/AT2050_revision_summary.pdf

Gebhard, F., Smalla, K. 1998. Transformation of Acinetobacter sp. Strain BD413 by Transgenic Sugar Beet DNA. Applied Environmental Microbiolo*gy*. 64(4): 1550-1554.

Gelvin, S.B. 2003. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the "Gene-Jockeying" tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 67: 16–37.

Gómez, L.D., A. Gilday, A., Feil., R., Lunn, J.E., Graham, I.A. 2010. AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. Plant Journal. 64: 1-13.

Hallerman, E.M., McLean, E., Fleming, L.A. 2007. Effects of growth hormone transgenes on the behavior and welfare of aqua-cultured fishes: A review identifying research needs. Applied Animal Behavior Science. 104(34): 265-294.

Hawkins, R.L., Nakamura, M. 1999. Expression of Human Growth Hormone by the Eukaryotic Alga, Chlorella. Current Microbiology. 38(6): 335-341.

Kay, E., Vogel, T.M., Bertolla, F., Nalin, R. 2002. In situ transfer of antibiotic resistance genes from transgenic (transplastomic) tobacco plants to bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3345–3351.

Koch, M., Vorwerk, S., Masur, C., Sharifi-Sirchi, G.R., Olivieri, N., Schlaich, N.L. 2006. A role for a flavin-containing monooxygenase in basal pathogen resistance of Arabidopsis thaliana. The Plant Journal. 47: 629–639.

Kopertekh, L., Schiemann, J. 2004. Marker gene elimination mediated by transient expression of bacteriophage P1 Cre recombinase in plants. Status Seminar" Sicherheitsforschung und monitoring". Berlin. Germany.

Luo, K.M., Zheng., X.L., Chen, Y.Q., Xiao, Y.H., Zhao., D.G., McAvoy, R., Pei, Y., Li, Y. 2006. The maize Knotted1 gene is an effective positive selection marker gene for Agrobacerium-mediated tobacco transformation. Plant Cell Reports. 25: 403-409.

Meyers, B., Zaltsman, A., Lacroix, B., Kozlovsky, S.V., Krichevsky, A. 2010. Nuclear and plastid genetic engineering in plants: comparison of opportunities and challenges. Biotechnology Advances. 28(6): 747-756.

Mlynarova, L., Conner, A.J., Nap, J.P. 2006. Directed microspore-specific recombination of transgenic alleles to prevent pollen-mediated transmission of transgenes. Plant Biotechnology Journal. 4: 445–452.

Ow, D.W. 2001. The right chemistry for marker gene removal? Nature Biotechnology. 19: 115–116.

Perera, R.J., Linard, C.G., Singer, E.R. 1993. Cytosine deaminase as a negative selective marker for Arabidopsis. Plant Molecular Biology. 23: 793-799.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]

Reiss, B., Klemm, M., Kosak, H., Schell, J. 1996. RecA protein stimulates homologues recombination in plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America. 93: 3094-3098.

Reiss, B., Schubert, I., Kopchen, K., Wendeler, H., Schell, J., Puchta, H. 2000. Rec A stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by Agrobacterium. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United State of America. 97: 3358-3363.

Rommens, C.M., Humara, J.M., Ye, J., Yan, H. 2004. Crop improvement through modification of the plant's own genome. Plant Physiology. 135: 421–431.

Sanjaya Hsiao, P.Y., Su, R.C., KO, S.S., Tong, C.G., Yang, R.Y., Chan, M.T. 2008. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* tryptophan synthase beta 1 (*AtTSB1*) in Arabidopsis and tomato confers tolerance to cadmium stress. Plant Cell and Environment. 31: 1074-1085.

Scutt, C.P., Zubko, E., Meyer, P. 2002. Techniques for the removal marker genes from transgenic plants. Biochimie. 84: 1119-1126.

Srivastava, L, Ow, D.W. 2004. Marker-free site-specific gene integration in plants. Trends Biotechnology. 22: 627-629.

Sugita, K., Kasahara, T., Matsunaga, E., Ebinuma, E. 2000. A transformation vector for the production of marker free plants containing of a singlr copy transgene at high frequency. Plant Journal. 22: 461-469.

Upadahyaya, C.P., Nookaraju, A., Gururani, M.A., Upadahyaya, D.C., Kim, D.H., Park, SW. 2010. An up-to-date on the progress towards the development of marker free transgenic plants. Botanical Studies. 51: 277-292.

Van der Vossen, J., Havekes W.A.L.M., Koster D.S. 1998. Development and application of an in vitro intestinal tract model for safety evaluation of genetically modified foods. In *Food Safety Evaluation of Genetically Modified Foods as a Basis for Market Introduction*, The Hague: Ministry of Economic Affairs. pp. 81-99.

Wei, Z., Wang, X., Xing, S. 2012. Current progress of biosafe selectable markers in plant transformation. Journal of Plant Breeding and Crope Science. 4(1): 1-8.

Widmer, R., Seidler, J., Watrud, L.S. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. Molecular Ecology. 5: 603-613.

Yip, M.K., Huang, H.F., Ger, M.J., Chiu, S.H., Tsai, Y.C., Lin, C.L., Feng, T.Y. 2007. Production of soft rot resistant calla lily by expressing a ferredoxin-like protein gene (pflp) in transgenic plants. Plant Cell Reports. 26: 449-457.

Zbikowska, H.M. 2003. Fish can be first – advances in fish transgenesis for commercial applications. *Transgenic Research.* 12: 379–389

Zubko, E., Scutt, C., Meyer, P. 2000. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes. Nature Biotechnology. 18: 442-445.

Zhong, C., Song, Y., Wang, Y., Li, Y., Liao, L., Xie, S., Zhu, Z., Hu, W. 2012. Growth hormone transgene effects on growth performance are inconsistent among offspring derived from different homozygous transgenic common carp (Cyprinus carpio L.). Aquaculture. 356–357: 404–411.

Zuo, J.R., Niu, Q.W., Moller, S.G., Chua, N.H. 2001. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. Nature Biotechnology. 19: 157–161.

[Downloaded from jae.hormozgan.ac.ir on 2026-10-30]

[DOR: 20.1001.1.23222751.1393.4.2.1.7]