



نگرانی‌ها از نشانگرهای مقاومت در گیاهان تراریخته اکوسیستم دریایی

غلامرضا شریفی سیرچی*

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

نوع مقاله:	چکیده
مروری	روند افزایش جمعیت جهان و نیاز روز افزون دنیا به تأمین امنیت غذا، کاربرد علم مهندسی ژنتیک و استفاده از ارگانیسم‌های تراریخت را پر اهمیت تر نموده است. بهره‌گیری از این علم بدون در نظر گرفتن خطرات احتمالی موجب آثار زیانبار بر طبیعت خواهد شد. یکی از نگرانی‌های تولید موجودات تراریخت، سیستم انتخاب می باشد که منجر به رشد انتخابی سلول‌های تراریخت می‌گردد. ژن‌های کد کننده آنتی‌بیوتیک در شناسایی سریع سلول‌های تراریخت بسیار کارآمد هستند. به علت انتشار ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در طبیعت یا فرار ژن‌های مقاوم به سموم شیمیایی به گونه‌های وحشی، دانشمندان به دنبال راه‌حلی برای تولید ارگانیسم‌های تراریخت عاری از نشانگر یا دارای ژن‌های نشانگر مناسب برای محیط زیست هستند. ارگانیسم‌های نوع اول در ابتدا بر مبنای مقاومت به آنتی‌بیوتیک و سموم شیمیایی انتخاب می‌گردند. ولی در مراحل بعدی دست‌ورزی و رشد، نشانگر گزینشگر برداشته خواهد شد. در حالت دوم از ژن‌های نشانگر ایمن برای محیط زیست استفاده می‌گردد. 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 می‌توان از آنها برای تولید ارگانیسم‌های تراریخت استفاده نمود.
تاریخچه مقاله:	
دریافت: ۹۳/۰۱/۱۸	
اصلاح: ۹۳/۰۳/۲۰	
پذیرش: ۹۳/۰۳/۲۵	
کلمات کلیدی:	
ایمنی زیستی	
ژن نشانگر	
کوترانسفورماسیون	
تراریخت	
نوترکیبی	

مقدمه

با توجه به اعلام سازمان خواربار جهانی^۱ 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 می‌گردد. این علم در طی تقریباً چهار دهه توانسته است تحولات بزرگی در زمینه‌های مختلف ایجاد نماید که از آن جمله می‌توان به کمک به ایجاد امنیت غذایی با افزایش فرآورده‌های غذایی، تولید دارو با استفاده از جلبک‌ها، حیوانات و گیاهان تراریخت، تولید محصولات غذایی حاوی مواد مغذی و ویتامین‌ها، تولید گیاهان مقاوم به آفات، تولید ارگانیسم تراریخت به منظور پالایش محیط و تولید رنگدانه‌های خاص مثل بتاکارتن، لوتین، آستاکسانتین^۲، کانتاکسانتین^۳ و غیره در جلبک‌ها، گیاهان، حیواناتی نظیر ماهی‌های آکواریومی اشاره نمود (Hawkins and Nakamura, 1999; Chaogang *et al.*, 2010; Carstens *et al.*, 2012; Enzing *et al.*, 2012). بهره‌گیری از این علم بدون در نظر گرفتن خطرات احتمالی موجب آثار زیانبار و در بعضی موارد جبران ناپذیر بر سلامت

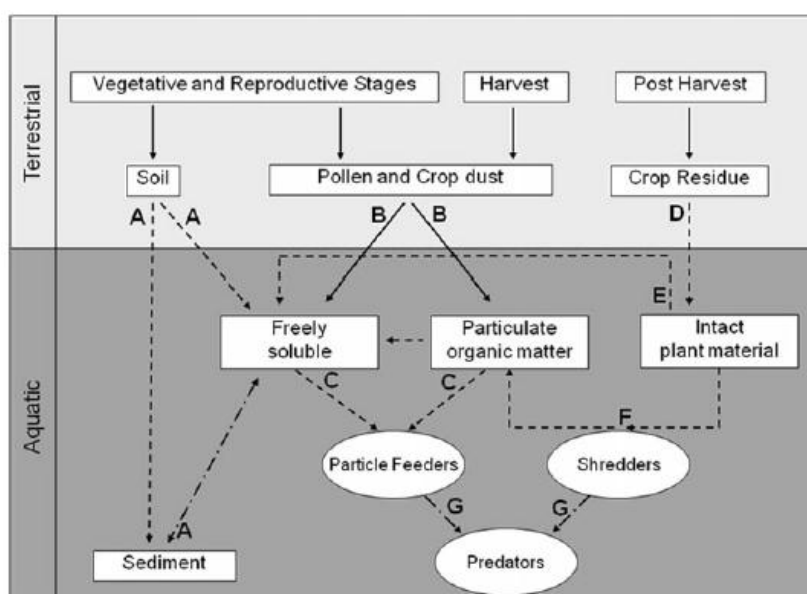
* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: sharifisirchi@yahoo.com

1. FAO
2. Astaxanthin
3. Cantaxanthin

انسان و طبیعت خواهد گردید که از جمله آنها می‌توان به خطر انتقال افقی ژن‌های گزینشگر مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های پروتئین‌های سمی به کار گرفته شده در مبارزه با آفات و پروموتورهای ویروسی اشاره نمود.

گیاهان تراریخت و اجزای آنها به چندین طریق می‌توانند به اکوسیستم دریایی وارد شوند. در مسیر اول، پروتئین‌های نوترکیب ممکن است در طول فصل رشد با مولکول‌های خاک پیوند دهند و یا اینکه به صورت محلول در آب در خاک قرار گیرند (مسیر A، شکل ۱). اما آنچه که مشخص است پروتئین‌های نوترکیب جذب شده توسط ذرات خاک سریعاً تجزیه می‌شوند و آن دسته که به آب‌های آزاد راه می‌یابند رسوب می‌کنند. لذا، خطرات زیست محیطی از این مسیر بسیار کم است. مسیر بعدی انتقال هوایی ذرات معلق در هوا و دانه‌گرده آنها می‌باشد. به طور کلی به دلیل فاصله مزارع با دریاها، مقدار ورود این گروه نیز کم می‌باشد. آن دسته‌ای هم که وارد آب دریاها می‌شوند پس از مدت زمان کوتاهی تخریب شده و قسمتی از مواد تشکیل دهنده آنها به محیط اطراف منتقل می‌شود (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 پروتئین‌های دانه‌گرده یا ذرات گیاهی معلق در هوا، به صورت ذرات آلی خاص در محیط دریایی باقی بمانند. در این صورت به طور بالقوه موجودات دریایی تغذیه‌کننده از آنها در معرض قرار می‌گیرند (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 کشتی‌ها می‌باشد. در این صورت نه تنها موجودات دریایی تغذیه‌کننده از محصولات تراریخت بلکه موجودات دریایی شکارچی در چرخه دوم نیز در معرض قرار می‌گیرند (مسیر G، شکل ۱) (Carstens *et al.*, 2012).



شکل ۱. مدل پیشنهادی برای ورود احتمالی محصولات تراریخت و پروتئین‌های ترانسژن آنها به اکوسیستم آبی. فلش‌های ممتد مسیرهای احتمالی را نشان می‌دهند. فلش‌های منقطع، مسیرهای احتمالی تجزیه پروتئین‌های ترانسژن‌ها را نشان می‌دهد.

علاوه بر خطرات موجودات تراریخته خشکی، نگرانی‌های 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 منشأ طبیعی نظیر رنگدانه‌ها و تولید محصولات جدید، تراریخته می‌گردند (Enzing *et al.*, 2012). تکنیک‌های مهندسی ژنتیک در ماهی‌ها نیز استفاده شده‌اند و در اولین قدم سبب تولید ماهی‌های سالمون دارای ترانسژن هورمون رشد شدند که وزن این ماهی‌ها را به بیش از دو برابر رساند (Hallerman *et al.*, 2007). از دیگر ماهی‌های تراریخت می‌توان به ماهی‌های سالمون دارای ژن مقاوم به سرما، گربه ماهی دارای ژن مقاوم به بیماری‌ها، زیرا ماهی دارای ژن موثر در متابولیسم فسفر و ماهی‌های آکواریومی با

رنگدانه های خاص اشاره نمود (Eenenaan and Olin, 2006). محصولات موجودات آبی 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 سازوکارهای 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 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).

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

روش های برطرف نمودن نگرانی های ناشی از ژن های نشانگر

برای تولید ارگانسیم های تراریخت از سیستمی انتخاب استفاده می شود که منجر به رشد انتخابی سلول های تراریخت می گردد. ژن های کد کننده آنتی بیوتیک در شناسایی سریع سلول های تراریخت بسیار کارآمد هستند (شریفی سیرچی و کاظمی پور، ۱۳۸۸). در فرآیند انتخاب در محیط کشت فقط سلول های تراریخت دارای ژن های نشانگر انتخابی می توانند زنده بمانند درحالی که سلول های غیر تراریخت از بین می روند. روش های غربالگری برای شناسایی گیاهان تراریخت در بین تعداد بسیار زیاد ارگانسیم های باززایی شده غیر تراریخت وقت گیر می باشند، چرا که در عدم حضور نشانگر انتخابی، میزان باززایی گیاه تا ده برابر افزایش می یابد (De Vetten *et al.*, 2003). از آنجا که نشانگر گزینشگر وارد ژنوم میزبان می شوند نگرانی هایی درباره ی رهاسازی آن توسط ارگانسیم های تراریخت در اکوسیستم وجود دارد. تولید محصولات تراریخت بدون نشانگر آنتی بیوتیک باعث حذف خطر انتقال عمودی و افقی می شود (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 ژن های نشانگر: به این مفهوم که فقط ژن مورد نظر به ارگانسیم منتقل گردد و برای اطمینان از تراریخته گردیدن ارگانسیم مورد نظر از آنالیزهای ملکولی نظیر واکنش زنجیره ای پلیمرز و غیره استفاده نمود. هرچند که این امر از نظر تئوری مناسب به نظر می آید اما در عمل بسیار وقت گیر، پرهزینه و در مواردی که نیاز به کشت و بررسی فنوتیپی داشته باشد، به مزایای بزرگ نیاز است. اما در حال حاضر دانشمندان سعی بر ایجاد روش های ساده و ارزان برای تشخیص ارگانسیم های تراریخت دارند و انتظار می رود در سال های آتی این روش ها کاربردی گردند (Aziz and Machray, 2003).

ب) استفاده از ژن های نشانگر که اثرات مضر زیستی نداشته باشند. ژن های نشانگر به دست آمده از میکروارگانسیم 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 ژن ها مرحله تجاری سازی بسیار سختی را طی خواهند کرد بنابراین دانشمندان با کشف یکسری از ژن های 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 پاتوزن 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 ژن هایی در فرآیندهای متابولیکی همچون بیوسنتز هورمون، متابولیسم ساکارید و

متابولیسم اسید آمینه مشارکت دارند. از ژن های مارکر مسیر بیوسنتز هورمون ها می توان به ژن *knI* از ذرت و همولگ های 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 آراییدوپسیس، 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 متابولیسمی اسید آمینه می توان به ژن *TSBI* از آراییدوپسیس 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^۴ 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^۵ 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 آلدئید دهیدروژناز^۵ را به رمز در می آورد. این آنزیم ماده شیمیایی سمی بتائین آلدئید را به گلیسین بتائین غیر سمی تبدیل می نماید. بعد از واکنش ترانسفورماسیون و استفاده از ماده بتائین آلدئید به عنوان معرف گزینش، سلول های غیر تراریخته از بین می روند (Chen and Murata, 2011).

۴- انتخاب بر پایه پاتوژن^۶ 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 گیاهی PFLP^۶ را در لفل 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^۷ (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^۷، بعد از انتخاب موفق ارگانسیم 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 ارگانسیم ها و فرآیندهایی همچون کوترانسفورماسیون، نوترکیبی همولوگ، نوترکیبی جایگاه ویژه و ترانسپوزیشن 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 می پردازیم.

4. Visual selection

5. BADH

6. Plant fredoxin like protein

7. Co-transformation of two transgenes

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.

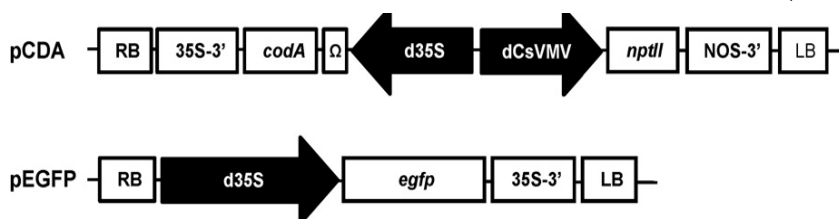
۱- وارد نمودن دو نسخه تی-دی ان ای^۸ در استرین‌های جدای آگروباکتریوم

۲- وارد کردن دو پلاسمید به یک بافت توسط روش تفنگ ژنی^۹

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 آگروباکتریوم 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^{۱۰} 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، پرموتور 35S ویروس موزاییک کلم که دو دفعه در کاست قرار گرفته است: dCsVMV، پرموتور 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 پلیمرز^{۱۱}). اخیراً یک ژن نشانگر جدید به نام *dao1* مشخص شده است که آنزیم D-aminooxylase 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

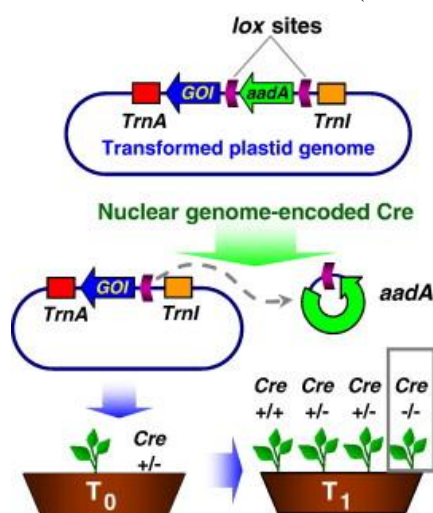
¹¹ PCR

نوترکیبی یک پدیده عمومی است که ممکن است در هر جای دو مولکول دی ان ای همولگ اتفاق افتد. در باکتریوفازهای معتدل نوع دومی از نوترکیبی جایگاه ویژه وجود دارد که بین سایت‌های برشی خاصی در کروموزوم باکتری و فاز رخ می‌دهد. مکان‌های نوترکیبی جایگاه ویژه در باکتری و فاز سایت پیوستگی باکتری و فاز نامیده می‌شود. هر سایت پیوستگی شامل سه قطعه است. قطعه مرکزی که توالی حفاظت شده دارد در آن نوترکیبی رخ می‌دهد. یکی از پروتئین‌های فاز، یک اینتگرز است که نوترکیبی جایگاه ویژه را کاتالیز می‌کند و منجر به مبادله فیزیکی دی ان ای می‌شود. برش در جایگاه ویژه نیازمند آنزیم اینتگرز فاز 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 باکتریوفاز P1، که در آن آنزیم Cre جایگاه ویژه هدف خود را شناسایی می‌کند.
- 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 هسته‌ای صورت می‌گیرد (Zuo *et al.*, 2001).

در این سیستم، حذف نشانگرهای انتخابی نیازمند بیان ریکامبیناز در گیاهان تراریخت است. کاست ژن ریکامبیناز را می‌توان 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 مرحله‌ای حذف ژن نشانگر گزینشگر از طریق نوترکیبی جایگاه ویژه Cre/Lox (Meyers *et al.*, 2010).

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

(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 نشانگر گزینشگر 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 می‌کنند و اجازه می‌دهند 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 می‌تواند 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 استفاده از 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

ترانسپوزون‌ها در فاژها، باکتری‌ها، قارچ‌ها، گیاهان عالی، ویروس‌ها و حشرات وجود دارند. این عناصر برای اولین بار توسط باربارا مک کلینتوک و مارکوس رودس¹² در یوکاریوت‌ها (ذرت) پیدا شدند. ترانسپوزون‌ها توالی‌های دی ان ای هستند که صدها تا هزار باز درازا دارند، حداقل یک پروتئین را کد می‌کنند که به آنها توانایی همانندسازی را می‌دهد.

از ترانسپوزون‌ها می‌توان 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 وکتور MAT دارای ژن *ipt* و Ac 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 می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود.

۱- گونه‌های متفاوت کارایی ترانسپوزیشن متفاوتی دارند.

۲- این روش پرهزینه و وقت‌گیر است.

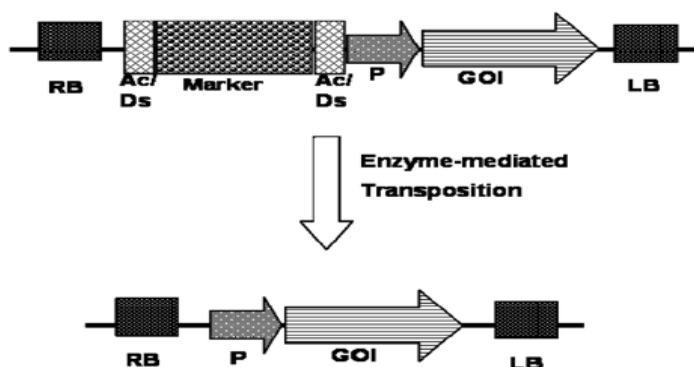
۳- کارایی باززایی گیاهان تراریخت بدون نشانگر، به دلیل تمایل وارد شدن مجدد المنت‌های ترانسپوزون در جای دیگر از ژنوم، پایین است.

۴- برش غیر دقیق

۵- تولید موتاسیون‌ها به علت سیکل‌های برش و الحاق

۶- بی‌ثباتی ژنتیکی گیاهان تراریخت، زیرا حضور پیوسته ترانسپوزون‌های هترولوگوس کارایی را کاهش می‌دهند.

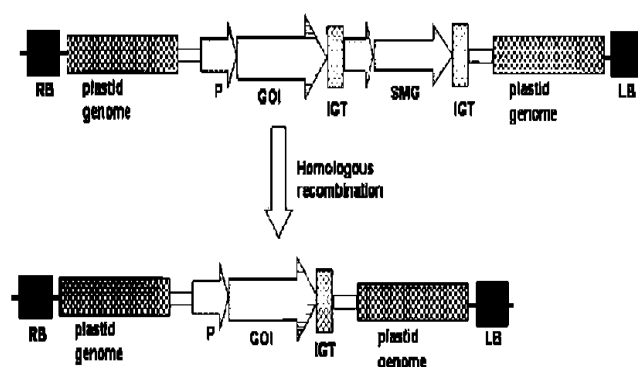
¹² Barbara Mc Clintock و Marcus Rhoades



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 (Upadhyaya *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 می‌شود 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 نمی‌باشد 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 ریکامیناز با جایگاه ویژه نمی‌باشد. نوترکیبی همولوگ توسط حوادثی همچون برش تک و یا دو رشته ای دی ان ای تحریک می‌شود. همچنین تحقیقات نشان داده است با بیان ژن های مرتبط با نوترکیبی باکتریایی RecA و RuvC نوترکیبی همولوگ در سلول های سوماتیکی گیاهان افزایش یافته است (Reiss *et al.*, 1996, 2000). اما با استفاده از این ژن ها، بر خلاف القای برش دو رشته ای اختصاصی دی ان ای، همه توالی های همولوگ 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 همولوگ. ژن نشانگر گزینشگر از طریق نوترکیبی، GOI، ژن نشانگر: IGT، ژن مورد نظر: SMG، ژن مارکر گزینشگر (Upadhyaya *et al.*, 2010).

نتیجه‌گیری

هر چند گزارش‌هایی مبنی بر حضور دی‌ان‌ای فازی و پلاسمیدی در سلول‌های موش‌های آزمایشگاهی بعد از خوردن مقدار زیادی از این مواد وجود دارد ولی هیچ مدرکی وجود ندارد که ثابت کند دی‌ان‌ای گیاهی بتواند به سلول‌های 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 دی‌ان‌ای خارجی وجود دارد. به طور مثال نگرانی‌های زیادی در مورد انتقال ژن‌های مارکر از گیاهان تراریخت به باکتری‌های خاکزی وجود دارد. ژن‌های ساخته شده از DNA می‌توانند در محیط برای مدت طولانی زنده بمانند. به طور مثال ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک 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 آنتی‌بیوتیک را از گیاه چغندر قند تراریخت به دست آورد (Gebhard and Smalla, 1998). با توجه به نگرانی‌های موجود بسیاری از اتحادیه‌ها و انجمن‌های بین‌المللی خواستار حذف این ژن‌ها در جریان تولید موجودات تراریخت شده‌اند. روش‌های ترانسفورماسیون مناسب جهت تولید موجودات تراریخت دارای ژن هدف و فاقد ژن‌های مارکر گزینشگر امروزه در حال توسعه سریع می‌باشند. انتخاب سیستم ترانسفورماسیون بستگی به گونه ارگانسیم و ژن هدف دارد. موفقیت در روش کوترانسفورماسیون به درجه لینکاژ بین مناطق جایگزینی و فراوانی ترانسفورماسیون دارد. روش‌های مبتنی بر نوترکیبی جایگاه ویژه و ترانسپوزیشن در سیستم‌های ترانسفورماسیون مستقیم (بیولیسیتیک) و غیر مستقیم (آگروباکتریوم) که از سیستم‌های آنزیمی فعال در ارگانسیم هدف استفاده می‌نمایند مناسب می‌باشند. امتیاز ویژه استفاده از ترانسپوزیشن‌ها این است که به لحاظ قابلیت آنها در حرکت و انتقال ژن از محلی به محل دیگر، می‌توان پدیده اثر مکان ژن را نیز بررسی نمود.

بسیاری از شرکت‌های تولیدکننده محصولات تراریخت از روش‌های فوق‌الذکر در تحقیقات خود استفاده می‌کنند که سبب کم شدن نگرانی‌های عمومی نسبت به این محصولات می‌شود. در مورد ماهی‌های تراریخت نیز، شرکت‌ها برای ایمنی هر چه بیشتر از تکنیک عقیم‌سازی ماهی‌های تراریخت استفاده می‌نمایند که منجر به جلوگیری از انتشار ژن‌های نوترکیب می‌گردد. به علاوه استفاده از پروموتورهای ماهی نیز در دستور کار این شرکت‌ها می‌باشد (Zbikowska, 2003; Zhong *et al.*, 2012). تحقیقات بیشتر در این زمینه باعث یافتن راه‌های بیشتر، سریع و مطمئن تری خواهد شد.

منابع

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

- 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 cotransformation 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. *California 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: http://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 Microbiology*. 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 *Agrobacterium*-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.

- Reiss, B., Klemm, M., Kosak, H., Schell, J. 1996. RecA protein stimulates homologous 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 (*AtTSBI*) 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 single copy transgene at high frequency. *Plant Journal*. 22: 461-469.
- Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Gururani, M.A., Upadhyaya, D.C., Kim, D.H., Park, S.W. 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 Crop 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.