



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 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 سلول های تراریخت می گردد. ژن های کد کننده آنتی بیوتیک در شناسایی سریع سلول های تراریخت بسیار کارآمد هستند. به علت انتشار ژن های مقاوم به آنتی بیوتیک در طبیعت یا فرار ژن های مقاوم به سموم شیمیایی به گونه های وحشی، دانشمندان به دنبال راه حل هایی برای تولید ارگانیسم های تراریخت عاری از نشانگر یا دارای ژن های نشانگر مناسب برای محیط زیست هستند. ارگانیسم های 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 روش های مختلفی برای حذف نشانگر گزینشگر از ارگانیسم های تراریخت اولیه و تعدادی از ژن های مارکر گزینشگر مناسب برای محیط زیست پیشنهاد شده است که می توان از آنها برای تولید ارگانیسم های تراریخت استفاده نمود.
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 می گردد. این علم در طی تقریباً چهار دهه توانسته است تحولات بزرگی در زمینه های مختلف ایجاد نماید که از آن جمله می توان به کمک به ایجاد امنیت غذایی با افزایش فراورده های غذایی، تولید دارو با استفاده از جلبک ها، 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، آستاگسانتین^۲، کانتاکسانتین^۳ و غیره در جلبک ها، گیاهان، حیواناتی نظیر ماهی های 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

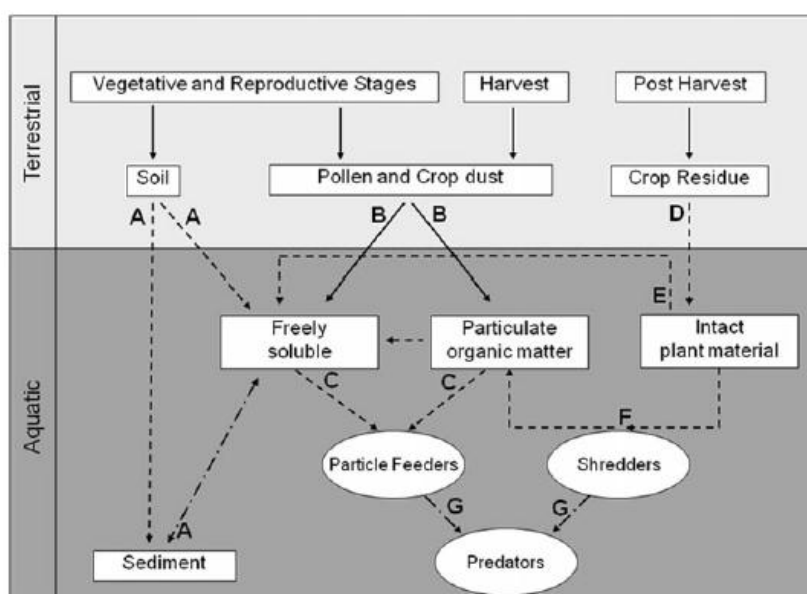
2. Astaxanthin

3. Cantaxanthin

انسان و طبیعت خواهد گردید که از جمله آنها می‌توان به خطر انتقال افقی ژن‌های گزینشگر مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، 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 تغذیه کننده 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 تغذیه کننده 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 منشا 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، زبرا ماهی دارای ژن موثر در متابولیسم فسفر و ماهی‌های آکواریومی با

رنگدانه‌های خاص اشاره نمود (Eenenaan and Olin, 2006). محصولات موجودات آبی تراریخت به دلیل نگرانی‌های زیاد پیرامونی تجاری نشده‌اند.

به کارگیری نگرش محتاطانه (ایمنی زیستی) در تمام زمینه‌های به کارگیری علم مهندسی ژنتیک ضروری می‌باشد. در ارتباط با مهندسی ژنتیک و سازوکارهای دست‌ورزی شده ژنتیکی و بهره‌گیری قطعی از محصولات آنها، ایمنی زیستی، شامل یک سری تدابیر، معیارها، سیاست‌ها و روش‌هایی است که خطرات احتمالی ناشی از انتقال ژن را به حداقل مقدار برساند. یکی از نگرانی‌ها در ارتباط با موجودات تراریخته، وجود ژن‌های نشانگر گزینشگر می‌باشد که همراه با ژن مورد نظر وارد ژنوم میزبان می‌گردد. از دیگر نگرانی‌ها پیرامون ژن‌های گزارشگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان به احتمال انتقال آن‌ها به باکتری‌های بیماریزا اشاره نمود. به طوریکه در یک مطالعه که در هلند انجام گرفت پیش‌بینی شد که حداقل ۶٪ از ژن‌های محصول تراریخته گوجه‌فرنگی بتوانند سالم باقی‌مانده، وارد روده بزرگ شده و در آنجا توسط باکتری‌ها به دام بیفتند که در نتیجه آن ژن از باکتری به باکتری‌های بیماریزا منتقل و سبب مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها گردد (van der Vossen et al., 1998).

در این مقاله روش‌های به حداقل رساندن نگرانی‌ها در ارتباط با ژن‌های نشانگر مورد بررسی قرار می‌گیرند.

روش‌های برطرف نمودن نگرانی‌های ناشی از ژن‌های نشانگر

برای تولید ارگانسیم‌های تراریخت از سیستمی انتخاب استفاده می‌شود که منجر به رشد انتخابی سلول‌های تراریخت می‌گردد. ژن‌های کدکننده آنتی‌بیوتیک 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 می‌توانند زنده بمانند درحالی‌که سلول‌های غیر تراریخت از بین می‌روند. روش‌های غربالگری برای شناسایی گیاهان تراریخت در بین تعداد بسیار زیاد ارگانسیم‌های باززایی شده غیر تراریخت وقت‌گیر می‌باشند، چرا که در عدم حضور نشانگر انتخابی، میزان باززایی 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 ارگانسیم‌های تراریخت در اکوسیستم وجود دارد. تولید محصولات تراریخت بدون نشانگر آنتی‌بیوتیک 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 ژن‌های نشانگر وجود دارد.

الف) عدم استفاده از ژن‌های نشانگر: به این مفهوم که فقط ژن مورد نظر به ارگانسیم منتقل گردد و برای اطمینان از تراریخته‌گردیدن ارگانسیم مورد نظر از آنالیزهای ملکولی نظیر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و غیره استفاده نمود. هرچند که این امر از نظر تئوری مناسب به نظر می‌آید اما در عمل بسیار وقت‌گیر، پرهزینه 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 روش‌های ساده و ارزان برای تشخیص ارگانسیم‌های تراریخت دارند و انتظار می‌رود در سال‌های آتی این روش‌ها کاربردی گردند (Aziz and Machray, 2003).

ب) استفاده از ژن‌های نشانگر که اثرات مضر زیستی نداشته باشند. ژن‌های نشانگر به دست آمده از میکروارگانسیم‌ها که معمولاً سبب مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و سموم شیمیایی می‌شوند از نظر مقبولیت عمومی دچار مشکل می‌باشند و لذا موجودات تراریخت حاوی این ژن‌ها مرحله تجاری‌سازی بسیار سختی را طی خواهند کرد بنابراین دانشمندان با کشف یکسری از ژن‌های مارکری که دارای جنبه‌های زیست‌محیطی مثبتی باشند در صدد رفع این مشکل برآمده‌اند. استراتژی‌های انتخاب این نوع از نشانگرها به چهار گروه: انتخاب مثبت، انتخاب بصری، انتخاب منفی و انتخاب بر اساس پاتوژن طبقه‌بندی می‌شوند (Wei et al., 2012).

۱- انتخاب مثبت. ژن‌های مارکر گزینشگر مثبت، سلول‌های تراریخته شده را بدون اثر کشندگی بر روی سلول‌های غیر تراریخت مشخص می‌نمایند. چنین ژن‌هایی 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 *kn1* 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 *TSB1* 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. 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^۵ 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 گیاهی PFLP^۶ 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) کو ترانسفورماسیون 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، بعد از انتخاب موفق ارگانسیم تراریخت با استفاده از نو ترکیبی جایگاه ویژه، ترانسپوزیشن و نو ترکیبی 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 کو ترانسفورماسیون، نو ترکیبی همولوگ، نو ترکیبی 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.

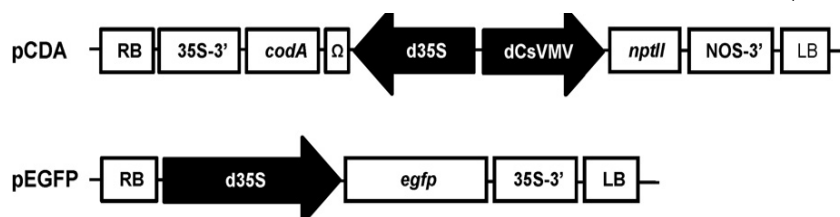
۱- وارد نمودن دو نسخه تی-دی ان ای^۸ در استرین‌های جدای آگروباکتریوم

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-آمینواسید اکسیداز 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

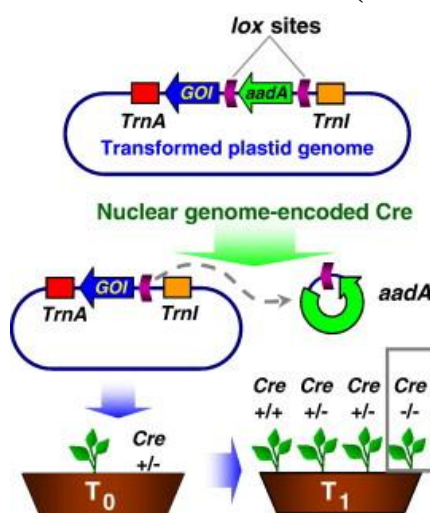
¹¹. PCR

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 هسته 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 مرحله‌ای 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 رودس^{۱۲} 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

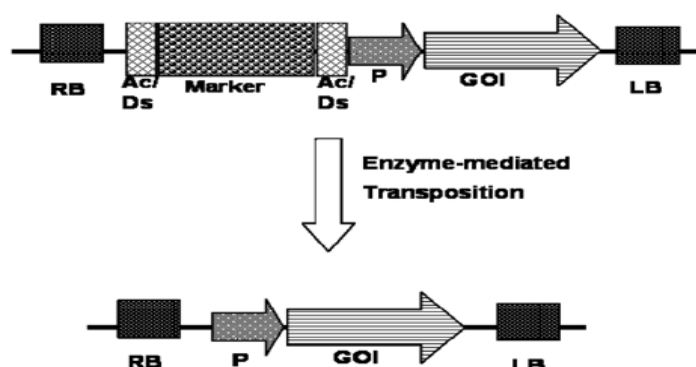
(iii) تفکیک ژن نشانگر

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 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 می‌دهند.

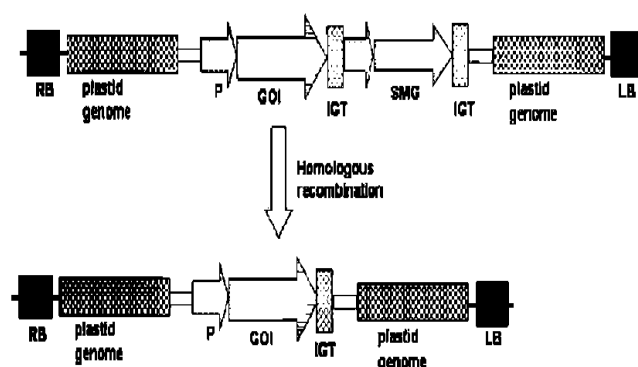
¹² Barbara Mc Clintock و Marcus Rhoades



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) نو ترکیبی همولگ

هرگاه عمل تبادل قطعه بین دو قطعه دی ان ای که دارای توالی یکسان یا تقریباً یکسانی هستند، رخ دهد سبب ایجاد نو ترکیبی همولگ می شود که معمولاً چنین قطعاتی در نواحی همتراز کروموزوم های همولگ 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 ریکامیناز با جایگاه ویژه نمی باشد. نو ترکیبی 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 نو ترکیبی باکتریایی RecA و RuvC نو ترکیبی همولگ 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 همولگ ژنوم در معرض نو ترکیبی قرار خواهند گرفت. بنابراین استفاده از آن ها با محدودیت روبه روست.



شکل ۵. نمایش شماتیک مکانیسم حذف ژن نشانگر از کلروپلاست بوسیله نو ترکیبی همولگ. ژن نشانگر گزینشگر از طریق نو ترکیبی. 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 ارگانیسم 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 (بیولیستیک) و غیر مستقیم (آگروباکتریوم) که از سیستم‌های آنزیمی فعال در ارگانیسم 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 عقیم سازی 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 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.
- Upadhyaya, C.P., Nookaraju, A., Gururani, M.A., Upadhyaya, 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 Crops 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.