مجله ایمنی زیستی
دوره ششم، شماره اول، بهار ۹۲

کاربرد مهندسی ژنتیک در مقاومت به ریزش دانه در کلزا

سمیرا کهک[۱*] و علی‌محمد شکیب[۲]

۱- دانش‌آموخته دوره کارشناسی‌ارشد اصلاح‌نباتات دانشگاه زنجان
۲- عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران
s.kahak@yahoo.com

چکیده

کلزا یکی از گیاهان مهم روغنی است که در سال‌های گذشته کشت آن در ایران توسعه زیادی پیدا کرده است. گیاهان خانواده براسیکاسه به‌طور معمول دانه‌های خود را به‌وسیله سازوکار شکستن غلاف پراکنده می‌کنند. اگر چه باز شدن غلاف یک سازوکار مفید برای پراکندگی دانه‌ها در طبیعت است، یکی از بزرگترین مشکلات زراعت کلزا محسوب می‌شود. در صورتی‌که برداشت به تأخیر بیافتد ریزش دانه می‌تواند تا ۵۰ درصد عملکرد محصول را کاهش دهد. باز شدن غلاف از نظر مورفولوژیک با شکل منطقه شکوفایی در غلاف در ارتباط است. منطقه شکوفایی از یک لایه‌ی چند سلولی تشکیل شده است که دیواره میانی(replum) را از مرز پریکارپ پوشش غلاف (silique valve) جدا می‌سازد. به‌تازگی تعدادی از ژن‌ها مانند *FUL*، *SHP*، *IND*، *ALC* و *RPL* در آرابیدوپسیس به‌عنوان گیاه مدل و کلزا شناسایی شده‌اند که در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن غلاف شرکت دارند. افزایش بیان برخی از این ژن‌ها مانند *FUL* و *RPL* اثر مثبت بر ایجاد مقاومت به ریزش دارند و افزایش بیان برخی دیگر مانند *SHP1*، *SHP2*، *IND* و *ALC* اثر منفی بر مقاومت به ریزش دانه در کلزا دارند. با استفاده از روش‌های علم مهندسی ژنتیک می‌توان میزان بیان هر یک از این ژن‌ها را تغییر داد و در نهایت گیاهان مقاوم به ریزش تولید کرد. با توجه به اینکه روش‌های زراعی کاهش ریزش دانه در این گیاه تا به حال مؤثر نبوده‌اند و گاهی باعث کاهش کیفیت روغن استحصال شده نیز شده‌اند به نظر می‌رسد مؤثرترین راه مقابله با این مشکل استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک جهت افزایش یا کاهش بیان ژن‌های مؤثر در این صفت است که در این مقاله ابتدا به توضیح اثر هر یک از این ژن‌ها و اثرات متقابل بین آن‌ها پرداخته می‌شود و سپس روش‌های مؤثر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

مهندسی ژنتیک جهت افزایش مقاومت به ریزش دانه در کلزا توضیح داده خواهند شد.
واژه‌های کلیدی: کلزا، ریزش‌دانه، منطقه بازشدن غلاف، ژن‌های مقاومت به ریزش، مهندسی‌ژنتیک.

مقدمه

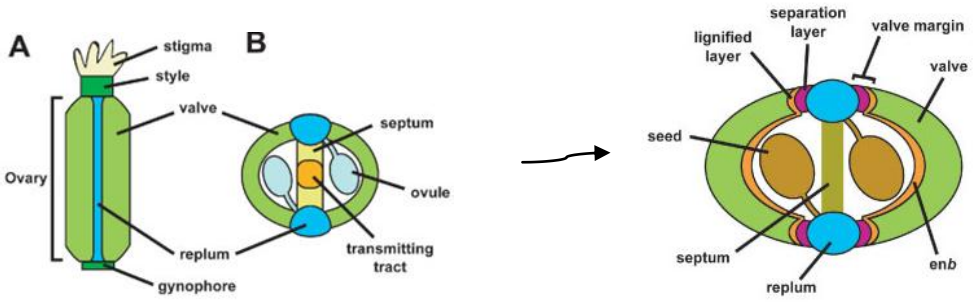
روغن گیاهی یکی از کالاهای مصرفی در سبد غذایی مردم است. کلزا یک گیاه مهم روغنی است و در میان گیاهان روغنی مقام دوم را به خود اختصاص داده است (۱۰).

کلزا (*Brassicanapus* L.) گیاهی متعلق به خانواده براسیکاسه، یکساله و خودگشن با حدود ۳۰ درصد دگرگشنی است. گیاهان خانواده براسیکاسه به‌طور معمول دانه‌های خود را به‌وسیله سازوکار شکستن غلاف پراکنده می‌کنند. اگرچه باز شدن غلاف یک سازوکار مفید برای پراکندگی دانه‌ها در طبیعت است، اما یکی از مشکلات مهم زراعت کلزا است. در صورتی‌که برداشت به تأخیر بیافتد ریزش دانه می‌تواند تا ۵۰ درصد عملکرد محصول را کاهش دهد (۲ و ۱۲). علاوه‌براین، دانه‌های کلزای ریخته شده، برروی زمین باقی می‌مانند و در تناوب با گیاه بعدی به‌عنوان علف‌هرز باعث ایجاد مشکلاتی می‌شوند. باز شدن غلاف از نظر مورفولوژیک به شکل منطقه شکوفایی وابسته است. منطقه شکوفایی شامل یک لایه‌ی چند سلولی است که دیواره میانی (Replum) را از مرز پریکارپ پوشش غلاف (Valve margin) جدا می‌سازد (شکل۱) (۲۰). در گیاه آرابیدوپسیس تعدادی ژن شناسایی شده‌اند که در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن غلاف شرکت دارند (۳، ۷ و ۹). ژن‌های مشابه به احتمال زیاد در نمو غلاف و مقاومت به ریزش دانه در کلزا نیز شرکت دارند زیرا که شباهت‌های زیادی بین نمو و ساختار غلاف در کلزا و آرابیدوپسیس وجود دارد (۱۴ و ۱۹). این ژن‌ها شامل *FUL*، *SHP1*، *SHP2*، *ALC*، *IND* و *RPL* هستند. بعضی از این ژن‌ها با تأثیر برروی منطقه شکوفایی باعث تشدید ریزش دانه می‌شوند. این ژن‌ها شامل *SHP1*، *SHP2*، *IND* و *ALC* هستند. در مقابل ژن‌های *FUL* و *RPL* با تأثیر برروی سلول‌های منطقه شکوفایی باعث کاهش ریزش دانه می‌شوند (۳). بنابراین افزایش و کاهش بیان این ژن‌ها می‌تواند در میزان مقاومت در ریزش دانه در کلزا مؤثر باشد. با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک می‌توان میزان بیان این ژن‌ها را تغییر داد و درنهایت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]
[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

گیاهان مقاوم به ریزش تولید کرد.

از روش‌های مؤثر مهندسی ژنتیک جهت افزایش بیان ژن می‌توان افزایش تعداد نسخه‌های ژن را نام برد و از روش‌های مؤثر جهت کاهش بیان ژن می‌توان از روش‌های خاموشی ژن مثل روش RNAi استفاده کرد.



شکل ۱- شماتیک غلاف و قسمت‌های مختلف آن

A- ساختار بیرونی غلاف. **B**- برش عرضی غلاف. **C**- برش عرضی غلاف بالغ (۳).

اهمیت صفت مقاومت به ریزش دانه

ریزش دانه یکی از مشکلات عمده زراعت کلزا است که باعث کاهش شدید عملکرد محصول می‌شود. گیاهان خانواده براسیکاسه از جمله کلزا و آرابیدوپسیس به‌طور معمول دانه‌های خود را به‌وسیله سازوکار شکستن غلاف پراکنده می‌کنند. اگرچه باز شدن غلاف یک سازوکار مفید برای پراکندگی دانه‌ها در طبیعت است، اما یکی از مشکلات مهم زراعت کلزا است. از آنجا که زمان گلدهی و در نتیجه زمان رسیدگی دانه در مزرعه یکنواخت نیست تعیین زمان مناسب برداشت خیلی مشکل است. از طرفی برداشت محصول قبل از رسیدگی غلاف باعث می‌شود که به دلیل وجود کلروفیل در دانه‌های سبز برداشت شده، روغن دارای ناخالصی شود و بنابراین کیفیت آن به شدت کاهش یابد (۱۷ و ۱۸). از طرف دیگر در صورتی‌که برداشت به تأخیر بیافتد ریزش دانه می‌تواند تا ۵۰ درصد عملکرد محصول را کاهش دهد (۲ و ۱۲). علاوه‌براین دانه‌های کلزای ریخته شده برروی زمین باقی می‌مانند و در تناوب با گیاه بعدی به‌عنوان علف‌هرز باعث ایجاد مشکلاتی می‌شوند. بنابراین استفاده از مهندسی ژنتیک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

جهت افزایش مقاومت به ریزش دانه می‌تواند برای کشاورزان اهمیت جهانی داشته باشد. اگر امکان آن وجود داشته باشد که غلاف گیاهان کلزا تا رسیدگی کامل بذور شکسته نشود، در این صورت علاوه بر افزایش کمیت محصول، کیفیت روغن نیز به دلیل کاهش مقدار آب و کلروفیل بذور افزایش خواهد یافت. بر اساس مطالب گفته شده می‌توان گفت بررسی‌های بافت‌شناسی غلاف و شناسایی ژن‌های مؤثر بر ریزش دانه و تنظیم بیان آن‌ها با استفاده از روش‌های مهندسی ژنتیک از راهکارهای مؤثر در افزایش مقاومت به ریزش دانه در کلزا خواهد بود.

پدیده ریزش دانه در کلزا از دیدگاه بافت‌شناسی

کلزا و آرابیدوپسیس از گیاهان خانواده براسیکاسه هستند که میوه شکوفای آن‌ها غلاف یا خورجین نامیده می‌شود. گل آرابیدوپسیس -که گیاه مدل در خانواده براسیکاسه است- از یک مادگی با دو برچه تشکیل شده است که درست پس از لقاح رشد می‌کند و به یک غلاف که شامل دانه‌هاست تبدیل می‌شود (۵ و ۶). میوه که بذرها را احاطه می‌کند به سه ناحیه بافتی تقسیم می‌شود: پوسته (Valve) ، دیواره میانی و مرز پریکارپ پوشش غلاف یا حاشیه پوسته. به‌طور کلی باز شدن غلاف از نظر مورفولوژیک به شکل منطقه شکوفایی وابسته است. منطقه شکوفایی شامل یک لایه‌ی چند سلولی است که دیواره میانی را از مرز پریکارپ پوشش غلاف جدا می‌سازد (شکل ۱) (۲۰). عوامل مختلفی در زمان رسیدگی دانه منجر به شکستن غلاف و پراکندگی دانه‌ها می‌شوند. در نتیجه شناسایی ژن‌های مؤثر در شکل‌گیری و تنظیم منطقه باز شدن جهت استفاده در مهندسی ژنتیک از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

ژن‌های مؤثر و استفاده از مهندسی ژنتیک در ایجاد مقاومت به ریزش دانه در کلزا

اولین ژن شناخته شده‌ی مؤثر در بازشدن غلاف آرابیدوپسیس ژن *FRUITFULL (FUL)* متعلق به خانواده MADS-box است. ژن *FUL* برای انبساط و تمایز پوسته‌های میوه پس از باروری مورد نیاز است. این ژن با پیشبر 35S به آرابیدوپسیس منتقل شد. مهم‌ترین اثر بیان این ژن تبدیل سلول‌های حد واسط لبه پوسته و لایه بیرونی رپلوم به سلول‌های پوسته بود. در نتیجه ناحیه بازشدن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

که به‌طور طبیعی در لبه پوسته تشکیل می‌شود، در گیاه تراریخته تمایز پیدا نکرد. بنابراین همانند جهش یافته *shp1 shp2* گیاه تراریخته *35S:FUL* نیز میوه ناشکوفا تولید می‌کند. الگوی لیگنینی شدن حاشیه میوه نیز بررسی شد. در حالی‌که در میوه نوع وحشی فقط یک لایه از سلول‌های پوسته لیگنینی شد، در میوه جهش یافته *ful* همه لایه‌های مزوفیل داخل پوسته لیگنینی شدند. در میوه *35S:FUL* سلول‌های مجاور ناحیه‌ی باز شدن خیلی کمتر لیگنینی شدند. بنابراین بیان ژن *FUL* برای جلوگیری از لیگنینی شدن سلول‌های حاشیه پوسته کافی است. هم‌چنین نشان داده شد که گرچه جهش‌های *ful* روی تکامل برگ‌های ساقه‌ای و هویت مریستمی نقش دارند ولی بیشتر اثرهای فنوتیپی در میوه‌ها ظاهر شده است. خورجین‌های جهش یافته *ful* به سبب نقص در تمایز سلول‌های پوسته خیلی کوچک هستند. رشد سلول‌های اگزوکارپ پوسته‌هایشان زودتر از نوع وحشی متوقف شده و روزنه‌ها تمایز نمی‌یابند. سلول‌های اپیدرمی رپلوم به نظر می‌رسد که اندازه مناسبی دارند، ولی به دلیل تطبیق طول کامل رپلوم بین پوسته‌های کوچک الگوی شکل زیگزاگ پیدا می‌کنند. این شکل رپلوم‌ها را به آسانی قابل دیدن می‌کند. تقسیم سلولی در اندوکارپ a از کنترل خارج می‌شود، چون این لایه دارای تعداد زیادی سلول کوچکتر از سلول‌های اندوکارپ a نوع وحشی است. فرآیند بازشدن در جهش یافته‌های *ful* غیرعادی است و اندازه و تعداد بذرها در هر خورجین به میزان کمی کاهش می‌یابد (۵ و ۶). از سوی دیگر کم شدن فعالیت ژن *FUL* تأثیر قابل توجهی برروی توسعه‌ی پس از لقاح میوه‌ها دارد و باعث کاهش شدید در اندازه میوه می‌شود. در مقایسه با میوه تیپ وحشی که فضا برای جا دادن دانه‌های رسیده دارد، دانه‌های میوه‌های موتانت *ful* بسیار فشرده هستند و به‌همین دلیل میوه‌ها کوتاه می‌شوند. کاهش فعالیت *FUL* اثر مهمی برروی انواع سلول‌ها در ناحیه مرز پریکارپ غلاف دارد. در موتانت *ful* سلول‌ها در لایه‌های بافت مزوفیل در طول تکامل میوه دیر چوبی می‌شوند و بسیار کوچکتر از تیپ وحشی هستند. در آلل‌های ضعیف‌تر *ful*، این بافت کمتر چوبی می‌شود و شبیه به لایه جداشدگی رنگ می‌گیرد. علاوه بر این دیننی و یانفسکی (۲۰۰۴) اظهار داشتند*FUL* به‌طور منفی بیان

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

ژن‌های تطابق حاشیه پوسته غلاف را در مرزهای پریکارپ غلاف تنظیم می‌کند و پیشنهاد دادند که این فعالیت می‌تواند باعث تغییر جزئی بافت‌های مرز پریکارپ غلاف به حاشیه پوسته شود (۳). هم‌چنین در آرابیدوپسیس تالیانا دو ژن متعلق به خانواده MADS-box نیز به نام‌های *SHATTERPROOF1,2* (*SHP1*, *SHP2*) شناسایی شد که باعث اختصاصی شدن هویت حاشیه پوسته شده و در شکوفایی غلاف در این گیاه نقش دارند. با غربال کردن یک مجموعه T-DNA insertional به کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز لاینی شناسایی شد که ژن *SHP1* آن از کار افتاده بود. ژن *SHP2* نیز قبلا از طریق نوترکیبی همولوگوس از کار افتاده بود. جهش‌های *shp1* و *shp2* تفاوت چندانی با گیاه وحشی نداشتند ولی جهش‌یافته مضاعف *shp1 shp2* فنوتیپ خاصی ایجاد کردند که میوه‌های بالغ آن شکوفا نمی‌شد، که نشان می‌دهد که این ژن‌ها به‌طور افزایشی عمل می‌کنند. تفاوت فنوتیپی بین میوه *shp1 shp2* و میوه وحشی ابتدا پس از باروری مشخص می‌شود. در این مرحله در نوع وحشی سلول‌های حاشیه پوسته (حدود چهار ردیف سلول) خیلی آهسته‌تر از سلول‌های پوسته منبسط می‌شوند و باعث انقباض قابل ملاحظه‌ای در حاشیه پوسته می‌شود. در مراحل بعدی نمو میوه در گیاهان وحشی نزدیک‌ترین سلول‌های حاشیه پوسته به رپلوم، ناحیه ریزش را تشکیل می‌دهند و در میوه بالغ جداشدن بین سلول‌های ناحیه ریزش شروع می‌شود. تصاویر میکروسکوپ الکترونی حاکی از عدم وجود ناحیه ریزش در جهش‌یافته *shp1 shp2* است. از آن‌جا که لیگنینی شدن ممکن است در بازشدن غلاف نقش داشته باشد، الگوی لیگنینی شدن میوه *shp1 shp2* را با استفاده از فلوروگلوسینول (Phloroglucinol) که یک رنگ بافت‌شناسی فلوروسنت خاص لیگنین است بررسی شد. برخلاف گیاه وحشی که آثار چوبی شدن در سلول‌های حاشیه پوسته نزدیک به ناحیه بازشدن مشاهده شد، در *shp1 shp2* میزان چوبی شدن کاهش یافته بود. این تغییرات در میوه *shp1 shp2* موضعی بود به‌طوری که تا حدی لیگنینی شده بود و در ناحیه قاعده میوه اصلاً مشاهده نشد (۹).

قابل توجه این‌که حذف فعالیت *SHP* در موتانت‌های *ful* نقص‌هایی را که در مرز

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

پریکارپ غلاف‌های *ful* دیده می‌شود به‌طور قابل توجهی رفع نمی‌کند و این وضعیت در موتانت‌های *ful*، *shp1* و *shp2* باقی می‌ماند. در این حالت فقط توسعه روزنه‌ها در اپیدرم مرز پریکارپ غلاف، که در موتانت‌های *ful* وجود ندارد رفع می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که ممکن است فاکتورهای دیگری باعث نقص‌های *ful* شود. هم‌چنین مشاهدات بیشتر نشان می‌دهد که فاکتورهای ناشناخته‌ی دیگری تکامل حاشیه پوسته را کنترل می‌کند. یک دلیل آن این است که موتانت‌های *shp1* و *shp2* هنوز می‌توانند بافت‌های شبیه حاشیه پوسته را در نزدیکی انتهای نوک میوه توسعه دهند و باعث بازشدن جزئی شوند (۳).

هم‌چنین نشان داده شد که ژن *FUL* بر بیان ژن‌های *SHP1* و *SHP2* اثر منفی دارد ولی ژن‌های *SHP1* و *SHP2* بر بیان *FUL* هیچ تأثیری ندارند. بنابراین چنین نتیجه‌گیری شد که ژن‌های *SHP* توسط محصول ژن *AGAMOUS* فعال شده و ژن *FUL* اثر بازدارندگی بر ژن‌های *SHP* دارد (۵ و ۶).

در این ارتباط ژن *ALCATRAZ*(*ALC*) نیز شناسایی و بررسی شد. دلیل نام‌گذاری این ژن این بود که جهش آن منجر به میوه‌های ناشکوفایی که دانه‌ها را در خود محبوس می‌داشتند می‌شد. مشاهده شد که برخلاف جهش‌های *shp1 shp2*، که روی تمایز ناحیه بازشدن تأثیر می‌گذارد، در میوه‌های *alc* مورفولوژی خارجی سلول و الگوی چوبی‌شدن ناحیه بازشدن متأثر نمی‌شود. به‌عبارت دیگر برخلاف جهش‌ها در *shp1* و *shp2* که بیشتر بافت‌های حاشیه پوسته را تحت تأثیر قرار می‌دهند، *alc* فقط بخشی از این بافت‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جهش در *alc* به‌طور اختصاصی در تشکیل لایه جدا شونده اختلال ایجاد می‌کند. به‌طوری که موتانت‌های *alc* یک لایه‌ی چوبی شده‌ی به‌طور کامل تکامل یافته دارند اما فاقد بافت لایه جداشدگی هستند. در خورجین‌های نوع وحشی، این لایه سلولی، بین رپلوم و سلول‌های چوبی شده حاشیه پوسته قرار می‌گیرند و از سلول‌های کوچک لیگنینی نشده تشکیل یافته که جدا شدن آن‌ها باعث باز شدن میوه در هنگام بلوغ می‌شود. در جهش یافته‌های *alc* این سلول‌ها بزرگ‌تر هستند و به نظر می‌رسد فرآیند از هم‌گسیختگی کامل نیست، چون سلول‌های بزرگ حاشیه پوسته درونی به‌صورت خارجی لیگنینی می‌شوند و

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

پوسته‌ها و رپلوم را در کنار هم نگه می‌دارند. این خورجین‌های باز نشده می‌توانند به آسانی با فشار دست و شکسته شدن اتصالات چوبی خارجی، ریزش پیدا کنند. *ALC* کدکننده یک پروتئین با یک ناحیه bHLH است که در حاشیه پوسته و ناحیه بازشدن غلاف بیان می‌شود. این پروتئین متعلق به یک خانواده از فاکتورهای رونویسی است که دارای نواحی اتصال به DNA(basic)و ایجاد دایمر (helix-loop-helix) است و همانند *SHP1*، *SHP2* و *FUL* برای بازداشتن بیان *ALC* در پوسته‌ها لازم است (۱۳). بررسی برروی جهش یافته‌های دوبل *alcful* نشان داد که گرچه میوه‌های این جهش یافته مانند نوع وحشی نبود ولی بلندتر از جهش یافته‌های *ful* بود و بنابراین با حذف فعالیت خارجی *ALC* در پوسته‌های *ful* الگوی رشد و تمایز تا حدی بهبود پیدا کرد (۳ و ۹).

هم‌چنین مشاهده شد که ژن *INDEHISCENT*(*IND*)که جزء ژن‌های فاکتورهای رونویسی از نوع helix-loop-helix است باعث اختصاصی شدن هویت حاشیه پوسته می‌شود، به این ترتیب که نقش مهمی را در تکامل لایه لیگنینی شونده و جدا شونده بازی می‌کند. خورجین‌های جهش یافته ناشکوفای *ind*، مانند *shp1shp2* و *alc*، در باز شدنشان در زمان بلوغ نقص دارند. حواشی پوسته میوه‌های *ind* مانند نوع وحشی بهم فشرده نمی‌شوند. در داخل، سلول‌های ناحیه جدا شونده و لایه‌های سلولی چوبی شده قابل مشاهده نیستند. بنابراین به نظر می‌رسد که *IND* در هر دو پروسه مربوط به باز شدن میوه، تمایز سلول‌های حاشیه پوسته و چوبی‌شدن نقش دارند. *IND*، همانند *ALC*، یک فاکتور رونویسی bHLH را رمز می‌کند که در حاشیه پوسته و لایه اندوکارپ b که در مراحل آخر تکامل، لیگنینی خواهند شد بیان می‌شود. *IND* همانند ژن‌های *SHP*، به‌طور خارجی در پوسته‌های جهش یافته *ful* بیان می‌شود. تکامل پوسته و طویل شدن میوه به میزان زیادی در جهش یافته‌های دوبل *ind ful* بهبود می‌یابد، گرچه تکامل پوسته هنوز به‌طور کامل صورت نگرفته است (۹ و ۱۴). همچنین *IND* برخلاف *SHP1*، *SHP2* و *ALC* به‌صورت بارزی در ناحیه حاشیه پوسته درست قبل از گرده افشانی بیان می‌شود. جهش در *IND* همچنین قادر است به‌طور

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

قابل توجهی کشیدگی میوه، توسعه‌ی سلول‌های اپیدرمی مرز پریکارپ غلاف و تکامل روزنه‌ها را تحت تأثیر قرار دهد (۳).

هم‌چنین نشان داده شد که ژن‌های *SHP1* و *SHP2* در بالادست ژن‌های *IND* و *ALC* هستند، چون در حواشی میوه‌های جهش یافته *shp1shp2* بیان آن دو مشاهده نشده است (۹). گرچه احتمال این‌که بعضی فعال کننده‌های *IND* هنوز شناخته نشده باشند، وجود دارد چون بیان کمی از *IND* در پوسته‌های جهش یافته سه‌گانه *ful shp1 shp2* وجود دارد (۵ و ۶). مشخص شده که اعمال *SHP1* و *SHP2* در تکامل حاشیه پوسته تنها فعال کردن *IND* و *ALC* نیست، چون حاشیه پوسته جهش یافته چهارگانه *indalcshp1shp2* نسبت به جهش یافته *indalc* کمتر مشخص شده است. علاوه براین *SHP1*، *SHP2* و *IND* نقش‌هایی را در تمایز لایه لیگنینی شده و جدا شونده پوسته بازی می‌کنند در حالی‌که به نظر می‌رسد *ALC* به‌طور بسیار اختصاصی تنها در تکامل لایه جدا شونده عمل می‌کند (۱۳).

در این راستا ژن *REPLUMLESS*(*RPL*) که یک پروتئین هومئودومین را رمز می‌کند شناسایی شد که نقش مشابه نقش *FUL* در پوسته‌ها را در رپلوم بازی می‌کند و به‌طور منفی بیان ژن‌های هویت دهنده حاشیه پوسته را در رپلوم تنظیم می‌کند (۱۵). این ژن با غربالگری برای شناسایی جهش‌های مؤثر در تکامل رپلوم شناسایی شد. این جهش‌زایی برروی جهش یافته‌های *ful* به این دلیل که رپلوم میوه‌های آن‌ها قابل دیدن است انجام شد. برخلاف جهش یافته‌های *ful*، *shp1shp2* یا *ind* که در آن‌ها ساختار گیاهی طبیعی است، *rpl* برروی مورفولوژی کل گیاه تأثیر می‌گذارد. در جهش یافته *rpl* ردیف‌هایی از سلول‌های باریک، و از لحاظ مورفولوژی و ملکولی مشابه سلول‌های حاشیه پوسته تشکیل می‌شود. میوه جهش یافته دوبل *rplful* از بیرون توسط سلول‌های کوچک و مشابه حاشیه پوسته احاطه می‌شوند. پژوهش جهش یافته‌های سه‌گانه و چهارگانه مشخص کرد که عمل *RPL* به‌طور مستقیم برای تشکیل رپلوم لازم نیست. هم‌چنین تکامل رپلوم در جهش یافته‌های *rpl shp1 shp2* و *rpl ful shp1 shp2* بهبود پیدا کرد و ثابت کرد که بیان اکتوپیک (Ectopic Expression) (خارج از محل اصلی) ژن‌های *SHP* مسئول تبدیل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

سلول‌های رپلوم به سلول‌های حاشیه پوسته است و عمل *RPL* به‌طور منفی تنظیم کننده ژن‌های *SHP* در رپلوم است و مانع تمایز سلول‌های رپلوم به سلول‌های حاشیه پوسته می‌شود. بنابراین *FUL* و *RPL* بیان *SHP* را به یک نوار باریک از سلول‌ها که به سلول‌های حاشیه پوسته تمایز می‌یابند محدود می‌کنند و بازشدن میوه را میسر می‌کنند (۱۴ و ۱۵).

هم‌چنین مشاهده شد که بیان ژن *SHP* به وسیله ژن *AGAMOUS*(*AG*) به‌طور مثبتی تنظیم می‌شود. این ژن یک فاکتور رونویسی از خانواده MADS است که هویت برچه را کنترل می‌کند (۱۶). این ژن شاید به‌طور افزایشی با دیگر فاکتورها عمل می‌کند، چون فعالیت *SHP* هنوز در جهش یافته‌های *agapetala2* وجود دارد (۱۶).

دیننی و همکاران (۲۰۰۵) نشان دادند که ژن‌های *FILAMENTOUSFLOWER*(*FIL*) و *YABBY3*(*YAB3*)، که تقارن بافت‌ها را در ارگانل‌های جانبی تنظیم می‌کنند به ترتیب برای ترغیب بیان *FUL* و *SHP* در پوسته‌ها و حاشیه آن‌ها لازم هستند. هم‌چنین ژن *JAGGED*(*JAG*) که رشد بافت‌ها را در ارگانل‌های جانبی ترغیب می‌کند با *FIL* و *YAB3* به‌طور افزایشی عمل می‌کند تا بیان *FUL* و *SHP* را ترغیب کند. جهش یافته سه‌گانه *jag fil yab3* فاقد بیان *FUL* و *SHP* در پوسته‌ها و حاشیه آن است. هم‌چنین *RPL* با بازداشتن فعالیت *JAG/FIL* در رپلوم باعث تشکیل دو نوار حاشیه پوسته می‌شود. بنابراین ارتباط اولیه‌ای بین سیستم شکل‌گیری در گیاهان که تقارن و رشد ارگان‌ها را در بر می‌گیرد و سیستم کنترل کننده هویت بافت‌ها پیدا شد (۴).

با استفاده از پیشبر CaMV35S و با ایجاد بیان پایدار *FUL* آرابیدوپسیس از باز شدن میوه *B. juncea* جلوگیری شد و از تشکیل سلول‌های حاشیه پوسته ممانعت به عمل آمد و مشخص شد که بیان اکتوپیک ژن *FRUITFULL* آرابیدوپسیس در *B. juncea* برای تولید میوه براسیکای مقاوم به ریزش بذر کارآمد است و مسیر ژنتیک که منجر به اختصاصی شدن حاشیه پوسته می‌شود بین آرابیدوپسیس و براسیکا حفظ شده است و پیشنهاد شد که این روش می‌تواند به‌طور گسترده‌ای برای سایر گونه‌های مهم زراعی براسیکا مورد استفاده قرار گرفته و مؤثر باشد. میوه‌های تراریخته تولید شده در این پژوهش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

باز نشده بودند و برای برداشت با کمباین نیز به‌طور محکمی بسته بودند (۱۱). فرانـدیز و همکاران (۲۰۰۰) با بررسی گیاهـان تراریختـه حاوی ژن *FUL* بیان داشتند که مهم‌تـرین اثـر بیان این ژن تبدیل سلول‌های حـد واسـط لبـه پوسته و لایه بیرونی رپلوم به سلول‌های پوسته است که در نتیجه باعث مـی‌شـود کـه ناحیـه بازشدن در لبه پوسته تمایز پیدا نکند. بنابرایـن گیاهان با غلاف‌های ناشکوفا تولیـد مـی‌کنـد. آن‌هـا الگـوی چـوبی‌شـدن حاشـیه غـلاف را بررســی و مشــاهده کردنــد کــه در غــلاف تراریخته‌های 35S::*FUL*، سلول‌هـای مجـاور ناحیه‌ای که به‌طور طبیعی ناحیـه بـازشـدن در آن‌جا تشـکیل مـی‌شـود خیلـی کمتـر چـوبی شـده‌انـد. اسـترگارد و همکـاران (۲۰۰۶) بـا بررســی گیاهــان کلــزا تراریختــه حــاوی ژن *BjFUL* بیان داشتند که بیان این ژن در گیاهان تراریخته می‌تواند از تشـکیل سـاختار حاشـیه پوسته جلوگیری کند. به‌طوری که در برخی از گیاهان تراریخته این ساختار وجود نداشـت و در برخـی دیگـر کمتـر مشـخص بـود. آن‌هـا الگوی چوبی‌شدن حاشیه غـلاف را بررسـی و مشاهده کردند که در غلاف گیاهان تراریختـه سلول‌های مجاور ناحیه‌ای که بـه‌طـور طبیعـی ناحیه بازشدن در آن‌جا تشکیل می‌شود خیلـی کمتر چوبی شده‌اند.

اسدی و همکـاران (۱۳۸۶) ژن *BnFUL* را به گیاهان کلـزا منتقـل کردنـد (۱) و کهـک و همکاران (۱۳۹۱) نیز پس از تجزیـه مولکـولی گیاهان تراریخته کلـزا از سـه رقـم متفـاوت و انجــام آزمــون real-time PCR ایــن ژن در گیاهان تراریخته کلزا از سه رقم نشان دادند که بیان این ژن در هر سه رقم افزایش یافته است ولی در ارقام متفاوت میزان بیـان ژن متفـاوت است که این تفاوت را به اثـر محـل ورود ژن در ژنوم و تعـداد نسـخه‌هـای ژن در گیاهـان تراریخته ارتباط داده شد و پژوهشگران اعـلام داشتند که این ارقام تراریخته با افـزایش بیـان این ژن به احتمـال زیـاد در مزرعـه مقاومـت بیشتری در مقابل ریـزش دانـه از خـود نشـان خواهند داد (۸). در نهایـت پیشـنهاد شـد کـه گیاهان تراریخته در مقایسه با گیاهان شاهد در مزرعه و در شرایط طبیعی مورد آزمایش قـرار گیرند تا وجود مقاومت به ریزش در آن‌هـا بـا استفاده از طرح‌های آماری مورد تجزیـه قـرار گیرد.

ایمنی زیستی محصولات تراریخته از جملـه کلزای مقاوم به ریزش دانه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

الحاق جمهوری اسلامی ایران بـه پروتکـل ایمنی زیستی کارتاهنا در سـال ۱۳۸۲ بـه‌طـور رسمی توسط مجلس شورای اسلامی تصویب شد و در سال ۱۳۸۸ قانون ملی ایمنی زیسـتی تـدوین، تصـویب و ابـلاغ شـد. بـا وجـود پیشرفت‌هـای فنـاوری زیسـتی در سـال‌هـای گذشته و افزایش کاربردهای آن در کشاورزی، صنعت، بهداشت و ... و عدم‌وجود هـر گونـه گزارش مبنی بر مضر بـودن ایـن محصـولات برای محیط زیست، انسان، دام و ... بر اسـاس پروتکل ایمنی زیستی کارتاهنـا و قـانون ملـی ایمنی زیستی، لازم است که ارزیابی مخاطرات احتمالی این محصولات توسط تولید کننده آن محصول صورت گیرد و مجوزهای لازم جهت رهاسازی این محصـولات از مراجـع شایسـته کسب شود. در کشور ایران بـر اسـاس قـانون ملی ایمنی زیستی، مرجع شایسته صدور مجوز محصولات کشاورزی تراریخته، وزارت جهـاد کشاورزی مشخص شـده اسـت. ایـن مرجـع شایسته موظف به بررسی مدارک ارزیابی‌هـای احتمال خطر انجام شده توسط متقاضی کسب مجـوز رهاسـازی محصـولات کشـاورزی تراریخته بوده و پس تأییـد ایشـان مجوزهـای لازم صادر شده و محصول موردنظر با اطمینان قابل رهاسازی و کشت در مزرعه خواهد بود.

منابع مورد استفاده References

1. **Asadi, S. (2008).** Studyover-expression of the FUL gene in oilseed rape. M Sc. Thesis, University of Zabol.

2. **Child, R. D. and D. E. Evans. (1989).** Improvement of recoverable yields in oilseed rape (*Brassicanapus*) with growth retardants. Aspect Applied Biology. 23:135-144.

3. **Dinneny, J. R. and M. F. Yanofsky. (2005).** Drawing lines and borders: how dehiscent fruit of *Arabidopsis* is patterned. BioEssays. 27:42-49.

4. **Dinneny, J. R., D. Weigel and M. F. Yanofsky. (2005).** A genetic framework for fruit patterning in *Arabidopsisthaliana*. Development. 132:4687-4696.

5. **Ferrandiz, C., S. Liljegren and M. F. Yanofsky. (2000).** Negative regulation of the *SHATTERPROOF* Genes by *FRUITFULL* during Arabidopsis fruit development. Science. 289:436-438.

6. **Ferrandiz, C., Q. Gu, R. Martienssen and M. F. Yanofsky. (2000).** Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1*

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

and *CAULIFLOWER*. Development. 127:725-734.

7. **Gu, Q., C. Ferrandiz, M. F. Yanofsky and R. Martienssen. (1998).** The *FRUITFULL* MADS-box gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. Development. 125:1509-1517.

8. **Kahak, S., A.M. Shakib, J. Saba, S. Asadi and M. AhmadRaji. (2012).** Study of overexprexpression of the BnFUL gene in transgenic oilseed rape. Genetic Engineering and Biosafety Journal. Vol1, Number2, Fall 2012 and Winter 2013, Bi-seasonal.

9. **Lijegren, S. J., G. S. Ditta, Y. Eshed, B. Savidge, J. L. Bowman and M. F. Yanofsky. (2000).** SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in Arabidopsis. Nature. 404:766-770.

10. **MacLeod, J. and S. Ogilvy. (1982).** Harvesting winter oilseed rape. Journal of Scientific Food Agriculture. 33:1265-1266.

11. **Ostergaard, L., Sh. A. Kempin, D. Bies, H. J. Klee and M. F. Yanofsky. (2006).** Pod shatter-resistant *Brassica*fruit produced by ectopic expression of the *FRUITFULL* gene. Biotechnology Journal. 4:45-51.

12. **Price, J. S., M. A. Neale, R. N. Hobson and D. M. Bruce. (1996).** Seed losses in commercial harvesting of oilseed rape. Journal of AGRICULTURAL Engineering Research. 80:343-350.

13. **Rajani, S. and V. Sundaresan. (2001).** The *Arabidopsis* myc/bHLH gene *ALCATRAZ* enables cell sepration in fruit dehiscence. Current Biology. 11:1914-1922.

14. **Robles, P., and S. Pelaz. (2002).** Flower and fruit development in *Arabidopsisthaliana*. Int. Dev. Biot. 49:633-643.

15. **Roeder, A. H. K., C. Ferrandiz and M. F. Yanofsky. (2003).** The role of the *REPLUMLESS* homeodomain protein in patterning the *Arabidopsis* fruit. Current Biology. 13:1630-1635.

16. **Savidge, B., S. D. Rounsley and M. F. Yanofsky. (1995).** Temporal relationship between the transcription of two *Arabidopsis* MADS-box genes and the floral organ identity genes. Plant Cell. 7:721-733.

17. **Seifi, A. R., Shakib, A. M. (2005).** Construction of a cDNA library and its isolation. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization. 84/1469.

18. **Shakib, A. M., Seifi, A., Ahmad Raji, M, Oroojloo, M. (2007).** Cloning of BnSHP gene on suitable vector and transferring into oilseed rape. Final Reports, Agricultural Research, Education and Training Organization. 86/1199.

19. **Spence, J., Y. Vercher, P. Gates and N. Harris. (1996).** Pod shatter in *Arabidopsisthaliana*, *Brassicanapus* and *B. juncea*. Journal of Microscopy. 2:195-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]

203.
20. **Wang, R., V. L. Ripley and G. Rakow. (2007).** Pod shatter resistance evalution in cultivars and breeding lines of *Brassicanapus*, *B. juncea* and *Sinapisalba*. Plant Breeding. 126:588-595.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-04-18]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1392.6.1.7.8]