مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۱، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷

القاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی

مهرآنا کوهی دهکردی[۱*]، منیژه رحیمی[۲]

۱- استادیار گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران
۲- کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور اصفهان، اصفهان، ایران

m.koohi@gmail.com

چکیده

جمعیت جهانی در حال رشد، تغییر آب و هوا و محدودیت سوخت‌های فسیلی، انسان را برای تولید غذا، دارو، سوخت و ذخیره غذایی در قرن بیست و یکم تحت فشارهای جدیدی قرار خواهد داد. به‌منظور برون رفت از این محدودیت، افزایش تولید محصولات زراعیِ دارای راندمان بالاتری از کالری، نشاسته، مواد غذایی، ترکیبات دارویی طبیعی و محصولات مهم دیگر، می‌تواند راه‌گشا باشد. به این منظور می‌توان از جهش‌های طبیعی و القایی به‌منظور تولید نسل‌هایی با ویژگی‌های برتر و قابل توارث بهره گرفت. برای درک عملکرد ژن‌ها، روش‌های متعددی از جمله RNA مداخله‌گر، خاموش کردن ژن و جهش‌زایی هدایت شده موضعی استفاده شده‌اند. همه این تکنیک‌ها نیازمند استفاده از تراریختی هستند که همواره در بسیاری از محصولات زراعی مهم تجاری امکان‌پذیر نیست. در این مقاله روشی موثر و غیرتراریخت به نام TILLING مورد بحث قرار می‌گیرد. این روش، روش ژنتیک معکوس با توانایی بالا، سریع و کم‌هزینه است که توالی آللی جهش‌های نقطه‌ای القایی در ژن‌های دلخواه در جمعیت‌های افراد جهش یافته شیمیایی/فیزیکی را تعیین می‌کند. مزیت اصلی TILLLING امکان کاربرد آن برای هر گونه، بدون در نظرگرفتن سطح پلوئیدی و اندازه ژنوم است. کاربردهای وسیع این روش توانمند در تحقیق کاربردی و پایه از طریق بهینه‌سازی استراتژی TILLING اصلی، مانند EcoTILLING و TILLING حذفی نیز انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: ژنتیک معکوس، غیرتراریخت، جهش‌زایی.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

مقدمه

پایداری کشاورزی می‌تواند به وضعیتی که افزایش تولیدات غذایی حداقل با نرخ رشد جمعیت متناسب باشند، اطلاق شود. پیش‌بینی اندازه جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ میلادی، ۲/۹ بیلیون است که اکثریت آن‌ها در کشورهای در حال توسعه و کشورهای کم توسعه یافته خواهند بود. این نشان می‌دهد که فشار زیادی بر تولید محصولات زراعی در کشورهایی با حداقل منابع موجود برای اصلاح گیاهان زراعی روی خواهد داد (۱). میزان تولید محصولات زراعی عمدتا تحت تاثیر انواع تنش‌های زنده و غیرزنده قرار دارد و به‌طور تقریب ۷۰ درصد پتانسیل عملکرد، به‌علت این گونه تنش‌ها از دست می‌رود (۲). عمده تنش‌های غیر زنده که تولید غذا را تحت تاثیر قرار می‌دهند شامل خشکی، شوری و اسیدیته پایین هستند. یک سوم کل مناطق قابل کشت جهانی تحت تاثیر شوری و ٤٠ درصد تحت تاثیر اسیدی شدن قرار دارد. فاکتورهای زنده مانند بیماری، حشرات و علف‌های هرز نیز به کاهش عملکرد کمک می‌کنند. تولید محصولات زراعی با گسترش مناطق قابل کشت یا استفاده از مواردی مانند بذور اصلاح شده، آبیاری و مواد شیمیایی افزایش می‌یابد. بر اساس این هدف، تولیدکنندگان محصولات زراعی، به سمت دستیابی به ارقام اصلاح شده‌ای که عملکرد بالاتری دارند و همزمان شرایط خاک و آب و هوای زیر سطح بهینه را تحمل می‌کنند، متمرکز می‌شوند. با استفاده از انواع روش‌های تولید مثل، ارقام اصلاح شده‌ای از گونه‌های مختلف در جوامع کشاورزی بدست آمده‌اند و به افزایش تولید غذای جهانی کمک کرده‌اند. کاربرد جهش القایی بین سال‌های ۲۰۰۰-۱۹٤٠ به بیش از ۲۰۰۰ محصول زراعی رسمی ثبت شده منجر شد که ۸۵ درصد آن نتیجه جهش‌زایی با اشعه گاما و ایکس بوده است. یکی از مستقیم‌ترین راه‌های بررسی عملکرد ژن، شناسایی جهش در ژن خاص و ارتباط این جهش به تغییر فنوتیپی در موجود جهش یافته است. در روش ژنتیک مستقیم (به‌وسیله جهش از طریق فنوتیپ به ژن)، جمعیت‌های جهش یافته بزرگ،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

برای تغییر دلخواه صفات یا فرآیند بیولوژیکی، به‌وجود آمده و غربال می‌شوند. توالی ژن مسئول فنوتیپ تغییر یافته می‌تواند با استفاده از فرآیند همسانه‌سازی مبتنی بر نقشه‌یابی جداسازی شود. علی‌رغم این‌که این روش زمان‌بر و پرزحمت است، با موفقیت برای همسانه‌سازی چندین ژن حتی در گونه‌هایی با ژنوم بزرگ مانند جو و گندم به کار رفته است. پیشرفت‌های اخیر در پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم با اندازه بزرگ، امکانات جدیدی را برای کاربرد تکنیک‌های جهش در مطالعات پایه و بهبود محصولات زراعی فراهم کرده است. استراتژی ژنتیک معکوس (از توالی ژن به فنوتیپ) به‌طور گسترده در مطالعات مربوط به تشخیص عملکرد ژن، جایگزین روش مستقیم شده است. این روش بر اساس تغییر ساختار ژنی یا فعالیت آن و متعاقبا تجزیه و تحلیل تغییر وابسته به فنوتیپ گیاه است. چندین روش ژنتیک معکوس از جمله جهش افزایشی با T-دی.ان.آ، ترانسپوزون / رتروترانسپوزون یا خاموش کردن ژن با استفاده از آر.ان.آ مداخله‌گر برای ژنومیک کاربردی گیاهان پیشنهاد شده‌اند، اما اکثر این روش‌ها به‌طور کامل تنها برای گیاهان مدل با ژنوم‌های کوچک مانند آرابیدوپسیس یا برنج قابل اجرا هستند و حتی در این گونه‌ها برخی اشکالات وجود دارد که استفاده از آن‌ها را محدود می‌کند. با گسترش آگاهی توالی دی.ان.ا ژنومی بسیاری از گونه‌های گیاهی و افزایش دانش در مورد نقش کاربردی ژن‌هایی با صفات زراعی مهم خاص، در حال حاضر تولید گیاهانی با صفات خاص به روش هدایت شده امکان‌پذیر شده است. یک روش، استفاده از تراریختی به منظور انتقال تک ژن یا چند ژن مورد نظر درون گونه است. با استفاده از این روش یه و همکاران (۳) توانستند بذور برنجی حاوی پیش ویتامین A ایجاد کنند. با وجود توانمندی زیاد، روش تراریختی با مخالفت عمومی گسترده‌ای روبرو شده است و استفاده از این روش نیز برای تولید غذا در بسیاری از کشورها ممنوع شد. برای رفع این محدودیت، روشی هدفمند و غیرتراریخت برای اصلاح

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

گیاهان زراعی به‌منظور روبه رویی با افزایش تقاضای تولید غذا مورد نیاز بود. روش TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) یک روش غیرتراریخت و ژنتیک معکوسی است که از جهش‌زایی کلاسیک و جستجوی با توان بالا برای بررسی چندشکلی‌های نوکلئوتیدی ایجاد شده در یک توالی هدف بهره می‌گیرد (٤). مزیت اصلی TILLING به عنوان یک روش ژنتیک معکوس این است که می‌تواند برای هر گونه گیاهی بدون در نظر گرفتن اندازه ژنوم، سطح پلوئیدی یا روش تکثیر به کار برده شود. جهش‌های شیمیایی، که معمولا در پروتکل‌های TILLING استفاده می‌شوند؛ جهش‌های نقطه‌ای با فراوانی بالایی را که به صورت تصادفی در ژنوم پخش شده‌اند؛ فراهم می‌کند. تجزیه و تحلیل جهش‌های القایی با اتیل متان سولفونات (EMS) توسط گرین و همکاران (۵) در ۱۹۲ ژن آرابیدوپسیس، حدود ۱۰ جهش در هر ژن، در میان ۳۰۰۰ گیاه M_2 بررسی شده نشان داد با استفاده از TILLING القاء یک سری آلل‌ها در یک لوکوس هدف مقدور می‌باشد. علاوه بر آلل‌های فاقد عملکرد، جهش‌زاهای شیمیایی آلل‌های هیپومورفیک با عملکرد افزایشی تولید می‌کنند که می‌تواند طیف وسیعی از فنوتیپ‌ها را فراهم نماید. روش TILLING نیازی به تراریختی ندارد و بنابراین تنها استراتژی ژنتیک معکوس مناسب برای گونه‌هایی است که تراریختی در آنها دشوار بوده یا امکان پذیر نمی‌باشد. این روش در تعداد زیادی از محصولات زراعی مهم کشاورزی شامل گیاهان برنج (٦)، جو (۷)، گندم (۸)، ذرت (۹)، سورگوم (۱۰)، سویا (۱۱)، کلزا (۱۲) و گوجه فرنگی (۱۳) مورد استفاده قرار گرفته است.

مروری بر مراحل تهیه جمعیت TILLING

در روش TILLING از جهش‌زایی مرسوم و متعاقب آن یافتن جهش با توان بالا بهره می‌گیرند. مراحل اصلی در TILLING جهش‌زایی، تکثیر یک جمعیت غیرشیمری، تهیه یک مخزن ژرم پلاسم، استخراج دی.ان.ا و ادغام نمونه،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

غربالگری جمعیت برای جهش‌های القایی و تایید و ارزیابی جهش‌ها است. روش عمومی برای ایجاد یک جمعیت TILLING در گیاهان شامل مراحل ذیل می‌باشد (شکل ۱):

۱- ایجاد جمعیت‌های جهش یافته

این مرحله شامل جهش‌زایی شیمیایی، توسعه نسل‌های M_1 و M_2 ، استخراج دی.ان.ا از گیاهان M_2 منفرد، ایجاد مخزن دی.ان.ا از ۸-۵ گیاه M_2 و ایجاد یک بانک بذر M_3 می‌باشد.

۲- یافتن جهش‌ها در یک توالی هدف و تجزیه و تحلیل فنوتیپ جهش یافته‌ها

در این مرحله از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به منظور تکثیر قطعه دی.ان.ا هدف از دی.ان.ا ادغام شده به عنوان الگو استفاده می‌شود. شناسایی جهش‌ها با استفاده از روش‌های مختلف برای مثال برش توسط اندونوکلئاز خاص، واسرشت با کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (DHPLC, Denaturing High Liquid Chromatography Performance) یا توالی یابی با توان بالا صورت می‌گیرد. پس از شناسایی گیاهان M_2 حامل جهش، توالی یابی قطعه ژن هدف به منظور تایید جهش و مشخص کردن نوع تغییر نوکلئوتیدی انجام می‌شود.

به منظور تهیه یک جمعیت جهش یافته، بذور و نمونه‌های دی.ان.ا از یک جمعیت M_2 بزرگ تهیه می‌شود و معمولاً برای تهیه جمعیت بستر TILLING از ۳۰۰۰-۵۰۰۰ فرد M_2 استفاده شده است، هر چند جمعیت‌های بزرگتری که شامل ۱۰۰۰۰ گیاه باشند نیز گزارش شده است. تقریبا همه جمعیت‌های TILLING با استفاده از جهش‌زاهای شیمیایی توسعه یافته‌اند که در میان آنها عامل آلکیله کننده (EMS) کاربرد گسترده‌تری دارد. پتانسیل جهشی زیاد عوامل شیمیایی در جمعیت‌های TILLING ایجاد شده گزارش شده است.

بستر TILLING ایجاد شده می‌تواند به‌عنوان منبع دائمی جهش برای هر دو روش ژنتیک مستقیم و معکوس به‌کار رود. در بسیاری از موارد مشاهدات فنوتیپی در نسل M_2 انجام می‌شود و نسل‌های M_3 بزرگ برای غربالگری مستقیم تولید می‌شوند. یک ارزیابی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

فنوتیپی دقیق در نتاج M_2 و M_3، امکان غنی ساختن جمعیت برای جهش در یک ژن خاص یا غربال‌سازی گیاهان حامل یک تغییر فنوتیپی مرتبط با فرآیندهای رشد و نمو یا متابولیکی مورد مطالعه را فراهم می‌سازد. چنین روشی با موفقیت توسط پری و همکاران (١٤) برای تجزیه و تحلیل ژن‌های کنترل کننده همزیستی ریشه *lotus Japonicus* با استفاده از یک جمعیت TILLING که برای جهش‌های گره ریشه پیش گزینش شدند، مورد استفاده قرار گرفت. علاوه براین تهیه نسل M_3 بزرگ توانست منبعی برای انتخاب مستقیم جهش‌های تحمل/ حساسیت شدید به طیف وسیعی از تنش‌های زنده و غیر زنده را فراهم کند.

روش کار TILLING

اولین روشی که برای TILLING توسط مک‌کالوم و همکاران (١٥) شرح داده شد، شامل تیمار بذور آرابیدوپسیس با ماده جهش‌زای EMS، جداسازی و ادغام دی.ان.آ، واکنش PCR قطعه دلخواه، تشکیل دو رشته ناهمگن و شناسایی آن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (DHPLC) بود. از آن زمان به بعد، TILLING برای بسیاری از موجودات زنده مختلف استفاده شد و بهینه‌سازی‌های متعددی به‌منظور خودکار کردن غربالگری جهش‌ها و کاهش هزینه‌های آن‌ها صورت گرفت. با گذشت زمان، روش DHPLC برای تشخیص جهش در روند TILLING در اکثر موارد با هضم دو رشته ناهمگن با استفاده از اندونوکلئازهای خاص جایگزین شد (١٦). متعاقب آن الکتروفورز پلی‌اکریل آمید و تصویرسازی در سیستم تحلیل‌گر ژل بسیار حساس LI-COR که ارزان‌تر و سریع‌تر از DHPLC است، مورد استفاده قرار گرفت. اندونوکلئاز خاص تک رشته‌ای برای جدا کردن دو رشته ناهمگن دی.ان.ا در موقعیت جفت شدگی ناجور در روش TILLING استفاده شده است (١٧). متداول‌ترین روش تشخیص جهش برای TILLING روش برش جفت شدگی ناجور با استفاده از اندونوکلئاز CELI بدست آمده از کرفس است. نوکلئازهای شبه CELI نیز در گونه‌های گیاهی دیگر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

از جمله یونجه، آسپاراگوس و گوجه فرنگی شناسایی شده است. نوکلئازهای خاص تک رشته‌ای دیگری مانند S1 از *Aspergillus Oryza*، P1 از *Pencillium Citrinum* و نوکلئاز ماش از جوانه *Vigna Radiata* جداسازی شده‌اند که عمدتا در PH=۵ فعال هستند.

برش دو رشته ناهمگن با استفاده از یک آنزیم خالص در ابتدا، وقت‌گیرترین مرحله این روش بود. چند سال بعد پی برده شد که آب عصاره کرفس خام نیز می‌تواند برای برش جفت شدگی ناجور استفاده شود و همچنین فعالیت اندونوکلئازی آن به همان اندازه یا حتی بالاتر از آنزیم خالص است. از طرف دیگر فرآیند آماده‌سازی آنزیم از کرفس ساده و بسیار ارزان است و کمتر از دو روز وقت می‌گیرد. جداسازی آب عصاره کرفس خام براساس تجزیه‌های عصاره مستقیما پس از آب‌گیری کرفس انجام می‌شود (۱۸). آب عصاره کرفس جدا شده، تا زمانی که در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شود، می‌تواند برای چندین سال مورد استفاده واقع شود. اما باید یادآور شد که تکنیک‌های کاربردی آنزیم‌های برش خاص جفت شدگی ناجور اغلب محدود هستند، مانند برخی آنزیم‌هایی که همه انواع جفت شدگی ناجور را تشخیص نمی‌دهند، حساسیت پایینی در تشخیص یک آلل در یک مخزن دی.ان.ا دارند، یا به یک پس زمینه ژل بالا ناشی از برش غیراختصاصی منجر می‌شوند. برای انجام TILLING به شیوه‌ی مقرون به صرفه، روش فیلتر نیز می‌تواند بهبود یابد. برای نمونه صفحات سفادکس می‌تواند به عنوان موثرترین ابزار برای فیلتر کردن محصولات PCR پس از هضم استفاده شوند. همچنین روش‌های مختلفی از جمله اتانول وجود دارند که خیلی ارزان‌تر بوده و بازده عمل آن تقریبا یکسان است.

انتخاب ماده جهش‌زا برای تهیه جمعیت TILLING

انتخاب نوع و مقدار ماده جهش‌زا برای ایجاد یک جمعیت TILLING، تراکم جهش‌ها را در گیاهان منفرد تعیین می‌کند. بهترین جهش‌زا می‌تواند به این

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

صورت تعریف شود که بتواند طیف و تراکم مطلوبی از آلل‌ها را با کمترین اثرها پلیوتروپی، هزینه کار و ماده کم و حداقل ملاحظات سلامتی ایجاد نماید.

۱- جهش‌زاهای شیمیایی

برای تولید جمعیت TILLING معمولا جهش‌زاهای شیمیایی از اقبال بیشتری برخوردارند. به‌دلیل این‌که روش استفاده از آن‌ها در غربالگری ژنتیک مستقیم برای بسیاری از گونه‌ها بهینه شده است (۱۷) ، همچنین این جهش‌زاها به راحتی در دسترس هستند و تغییرات نوکلئوتیدی توارث پذیر قابل پیش‌بینی با تراکم بالایی تولید می‌کنند. جهش‌زایی شیمیایی می‌تواند منجر به جهش نقطه‌ای شده، که تغییر ناپذیر هستند و با تراکم نسبتا بالا ایجاد می‌شوند و یا منجر به شکستن کروموزوم شوند و انواع بازآرایی کروموزومی را بوجود آورد، که در نتیجه باروری و اثر کشندگی را کاهش دهد. برعکس جهش افزایشی، تراکم بالای جهش‌های نقطه‌ای القایی شیمیایی، TILLING را برای هدف قرار دادن ژن‌های کوچک یا دمین‌های تک پروتئین که با ژن‌های بزرگ رمز می‌شوند، مناسب می‌سازد.

۱-۱ عوامل آلکیله کننده

عوامل آلکیله کننده متداول‌ترین مواد شیمیایی به‌کار برده شده در جهش‌زایی گیاهی هستند. آن‌ها دسته‌ای از ترکیبات تغییر دهنده پایه را تشکیل می‌دهند که مستقیما ساختار و ویژگی‌های بازها را تغییر می‌دهند. بازهای دی.ان.ا در آسیب‌پذیری به تغییرات شیمیایی توسط جهش‌زاهای آلکیله کننده تفاوت دارند. نیتروژن‌های حلقه از اکسیژن‌ها حساس‌تر هستند و نیتروژن موقعیت ۷ گوآنین و موقعیت ۳ آدنین برای تغییرات مستعدترین هستند. بر اساس یافته‌های مالوسزیسکی و همکاران (۱۹) عوامل آلکیله‌کننده هر نوع جهش نقطه‌ای از جمله جایگزینی همجنس، جایگزینی ناهجنس، حذف و تغییر چارچوب و نیز شکستگی کروموزوم را بوجود می‌آورند.

۱-۱-۱ اتیل متان سولفونات EMS: در اکثر آزمایش‌های TILLING انجام شده

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

در آرابیدوپسیس، EMS به عنوان یک ماده جهش‌زا به کار برده شده است. بر اساس یافته‌های گرین و همکاران (۵) و مارتین و همکاران (۲۰) در آرابیدوپسیس، ۵۰ درصد جهش‌های القایی با این جهش‌زا در نواحی کدکننده به خاتمه پیش‌رس فرآورده ژن (جهش‌های بی‌معنی) یا جهش در جایگاه پیرایش منجر شده است در حالی‌که حدود ۵۰ درصد دیگر منجر به جهش‌های دگرمعنی شده است. بسیاری از جهش‌زاهای شیمیایی مانند EMS در درجه اول تغییرات تک نوکلئوتیدی در ژنوم تولید می‌کنند. تغییرات تک نوکلئوتیدی مفید هستند زیرا منجر به تغییرات دگرمعنی و کوتاه‌سازی با ردیف‌های آللی می‌شوند. جهش‌های بی‌معنی که کدون‌های پایان پیش‌رس ایجاد می‌کنند و جهش‌های جایگاه پیرایش که پیرایش اینترونی مناسب را مهار می‌کنند، می‌تواند عملکرد ژن را با ارائه آلل‌های پوچ، خاموش کند (۵ و ۲۱). تغییرات دگرمعنی می‌تواند اثرهای متنوعی روی عملکرد پروتئین داشته باشد و برای بدست آوردن فنوتیپ‌هایی از ژن‌های اصلی که باعث مرگ موجود زنده می‌شود، با ارزش هستند. در صورتی که منجر به خاموشی کامل ژن مورد نظر شوند.

ماده جهش‌زای EMS، نوکلئوتید گوآنین را آلکیله می‌کند و به جفت شدگی ناجور منجر می‌شود. گوآنین آلکیله شده با تیمین جفت می‌شود که عمدتا به جایگزینی همجنس G/C به A/T منجر می‌شود. این نوع جایگزینی همجنس ۹۹ درصد جهش‌های القایی با EMS در آرابیدوپسیس، ذرت و گندم را تشکیل می‌دهد. فراوانی انواع مختلف جهش‌های القایی با EMS در گونه‌های دیگر مانند گوجه‌فرنگی، برنج و جو مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته است و گزارش شد جایگزینی همجنس نوع G/C به A/T بیشتر از ۷۰ درصد را تشکیل می‌دهد (۲۲). بررسی حدود ۲۰۰۰ جهش القایی با EMS توسط گرین و همکاران (۵) در آرابیدوپسیس نشان داد جهش‌ها به‌طور موثر و به‌صورت تصادفی در سراسر ژنوم القا شده‌اند. جهش‌زایی تصادفی بدین معنی است که جهش‌ها در

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

هر جایی از ژنوم می‌توانند یافت شوند. تراکم بالای جهش، اندازه جمعیت مورد نیاز برای ارائه تعداد مطلوب آلل‌ها را کاهش می‌دهد و بنابراین هزینه تهیه و غربالگری نمونه کاهش می‌یابد. بنابراین تراکم جهش عامل کلیدی در تعیین اندازه و هزینه یک پروژه TILLING است.

۱-۱-۲ -N-متیل N-نیتروز اوره: عامل آلکیله‌کننده N-متیل N-نیتروز اوره (MNU، MNH) جایگزینی هم‌جنس G/C به A/T را در تعدادی از آزمایش‌های TILLING در *Glycine Max* و *Oriza Sativa* منجر شده است (۱۱، ٦). فراوانی جهش القایی توسط این جهش‌زا در سویا با فراوانی القایی در این گونه توسط EMS قابل مقایسه بود (۱ جهش/۱٤۰ کیلوباز). فراوانی جهش‌های القایی در برنج با MNU دو برابر بیشتر (۱ جهش/۱۳۵ کیلوباز) از EMS (۱جهش/۳۰۰ کیلوباز) گزارش شد (٦، ۲۰، ۲۳). این در حالی بود که در مورد تیمار MNU خوشه‌ها در معرض جهش‌زا قرار گرفتند. در حالی‌که در آزمایش‌های EMS بذور با مواد جهش‌زا تیمار شدند. در تحقیق دیگری فراوانی‌های جهش بین دو آزمایش TILLING در برنج، هر دو با استفاده از MNU مورد مقایسه قرار گرفت. در یک آزمایش خوشه‌های برنج با یک میلی‌مول MNU تیمار شدند (٦) و در آزمایش دیگر بذور برنج در معرض تیمار ترکیبی یک میلی‌مول سدیم آزید و ۱۵ میلی‌مول MNU قرار گرفتند (۲۳). فراوانی جهش بدست آمده پس از تیمار خوشه‌ها بالاتر (۱جهش/۱۳۵ کیلوباز) از فراوانی بود که از تیمار ترکیبی بذور بدست آمده بود (۱ جهش/۲٦۵ کیلوباز).

۱-۱-۳ سدیم آزید: سدیم آزید، که به‌عنوان ماده جهش‌زا در چندین آزمایش استفاده شده است، یک ترکیب شیمیایی است که تنها در برخی از موجودات زنده برای مثال *Escherchia Coli*، *Sacharomyces Cerevisiae*، *Hordeum Vulgare*، *O.Sativa* و تعداد دیگری از گونه‌های گیاهی استفاده شده است، اما فراوانی جهش در آرابیدوپسیس را افزایش نمی‌دهد و به میزان کم در انسان و جانوران جهش‌زا است. بر اساس یافته‌های مالوسزینسکی و همکاران (۱۹)،

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

سدیم آزید در جو در PH اسیدی (PH=۳) جهش‌زا بوده، جایگزینی همجنس A/T به G/C را القا می‌کند و فراوانی شکست کروموزومی ناشی از سدیم آزید نسبتا کم است. بسته به گونه، غلظت سدیم آزید و زمان‌های تیمار مختلفی استفاده می‌شود. در تحقیقی سدیم آزید در تهیه جمعیت TILLING در جو به کار برده شد. سه غلظت متفاوت (۱MM، ۵MM و ۱۰MM) از آن استفاده و نمونه‌های تیمار شده با این غلظت‌ها به‌ترتیب میزان جوانه‌زنی در سطوح مشابهی ۸۵ درصد، ۵/۸۲ درصد و ۳/۸۱ درصد را نشان دادند. با توجه به تراکم جهش و اثر کشندگی قابل‌قبول، غلظت ۱۰ میلی‌مولاری سدیم آزید غلظت مناسب در نظر گرفته شد (۲٤). فراوانی جهش بدست آمده در این آزمایش (۱جهش/۳۷٤KB) بود و حدود سه بار بیشتر از آزمایش کالدول و همکاران (۲۵) گزارش شد که از EMS به‌عنوان جهش‌زا استفاده شده بود (۱جهش/۱MB).

۲- جهش‌زاهای فیزیکی

القای جهش با مواد جهش‌زای فیزیکی تاریخچه طولانی دارد که با تحقیق مولر (۲٦) از طریق در معرض قرار دادن مگس سرکه در برابر اشعه X آغاز شد. گر چه جهش‌های القا شده توسط جهش‌های فیزیکی تاریخچه طولانی در تحقیقات کاربردی و پایه دارند، در مورد طیف و تراکم خسارت در محصولات زراعی که توسط این گونه تیمارها بوجود آمده است گزارش‌های کمتری وجود دارد. از جهش‌زاهای فیزیکی، تابش اشعه گاما و نوترون سریع در ژنومیک کاربردی در گیاهان به کار برده شده است.

۲-۱ -اشعه گاما: یکی از گسترده‌ترین عوامل فیزیکی مورد استفاده، پرتوتابی گاما است. کاربرد اشعه گاما برای تهیه و غربالگری جمعیت TILLING در برنج منجر به جهش‌های نقطه‌ای و حذف‌های کوتاه شد (۲۷). به‌منظور ایجاد جمعیت TILLING در برنج *JAPONICA*، بذور تحت تابش اشعه گاما قرار گرفتند. فراوانی جهش به صورت ۱جهش ٦/۲MB تعیین شد. چهار تا از جهش‌های شناسایی شده جایگزینی تک نوکلئوتیدی بودند و ۲ تا حذف دو جفت بازی و چهار جفت

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

بازی بودند. در میان جهش‌های نقطه‌ای جایگزینی ناهمجنس (C/G به A/T و C/G به G/C) سه بار فراوان‌تر از جایگزینی همجنس (عمدتا C/G به T/A) گزارش شد. با در نظر گرفتن نتایج آزمایش‌های مختلف با استفاده از تابش گاما، نیمی از جهش‌های نقطه‌ای القا شده با این جهش‌زا، حذفی بودند که می‌تواند یک تغییر چارچوب را در صورتی‌که در اگزون واقع شود، بوجود آورد. بروز میزان جهش‌های خاموش تولید شده توسط این جهش‌زا خیلی بالاتر از میزان آن در یک آزمایش TILLING با استفاده از مواد جهش‌زای شیمیایی برآورد شد.

۲-۲ - نوترون سریع: نوترون‌های سریع نمونه‌ای از تابش انرژی بالا هستند که طیف گسترده‌ای از حذف و جهش‌های کروموزومی در گیاهان را القا می‌کند. چندین منبع نوترون سریع شامل شتاب دهنده‌های ذرات و راکتورهای تحقیق هسته‌ای برای جهش‌زایی در دسترس هستند. نوترون‌های سریع تولید شده توسط شکافت هسته‌ای با تابش اشعه گاما همراه هستند. اما، سهم آن‌ها قابل تنظیم است. براساس یافته‌های روگرز وهمکاران (۲۸) برای تولید ذرات ثانویه بُرد کوتاه درون هسته سلول که شکست رشته دی.ان.ا را وساطت می‌کنند، انرژی نوترون باید در حدود ۵۰۰KEV تا ۵MEV باشد. دستکاری‌های ژنومی بزرگ مانند حذف‌ها برای ایجاد فنوتیپ مفید هستند. به‌ویژه زمانی‌که خاموشی ژن مطلوب باشد. جهش‌زایی حذفی شاید بهترین راه خاموشی ژن‌های تکرار شده پشت سر هم باشد که در ژنوم گیاهان متداول هستند، برای مثال جهش‌زایی نوترون پرسرعت برای ایجاد حذف در آرابیدوپسیس و برنج توسط لی و همکاران (۲۹) مورد استفاده قرار گرفت. به هنگام مقایسه جهش‌زاهای بوجود آورنده SNP (چند شکلی تک نوکلئوتیدی) اولیه، جهش‌زایی نوترون پرسرعت مفید نمی‌باشد، زیرا تراکم جهش‌ها بسیار پایین‌تر هستند و جمعیتی حدود بیش از ده برابر بزرگ‌تر نیاز است تا از ترمیم حذف در هر ژن در ژنوم اطمینان حاصل شود. به‌علاوه جهش‌ها در درجه اول در برابر طیف آللی تغییرات

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

دگرمعنی و خاموش که توسط جهش‌های نقطه‌ای ایجاد شده‌اند، خاموشی ایجاد خواهند کرد.

انتخاب بافت برای جهش‌زایی

بافت مطلوب برای جهش‌زایی در مقیاس بزرگ برای TILLING بافتی است که گیاهان غیرشیمری تولید نماید و تراکم بالایی از جهش‌های القایی داشته باشد. علاوه بر این به کمترین نیروی کار و زمان تکثیر، نیازمند باشد. بافت مطلوب ممکن است از گونه‌ای به گونه دیگر تغییر کند و به منابع و نیازهای محققین بستگی دارد. برای بسیاری از گونه‌های گیاهی، جهش‌زایی بذور مورد توجه قرار دارد. برای جهش‌زایی شیمیایی، بذور در یک ماده جهش‌زا برای یک دوره زمانی خیسانده می‌شوند. جهت از بین بردن ماده جهش‌زا، بذور ابتدا شسته شده و سپس کاشته می‌شوند. اولین نسل (M_1) از لحاظ ژنوتیپی شیمر است. برای دستیابی به جهش‌های توارث‌پذیر، گیاه باید برای تولید یک نسل غیر شیمر تکثیر شود، پیش از این‌که دی.ان.ا برای غربالگری TILLING جمع‌آوری شود. وقتی که امکان استفاده از خودباروری وجود داشته باشد، جمعیت‌ها نوعا با استفاده از روش بالک تک بذر تهیه می‌شوند و نسل M_2 از خودباروری M_1 برای غربالگری TILLING ایجاد می‌شود. از افراد M_2 برای استخراج دی.ان.ا و غربالگری جهش استفاده می‌شود. بذور M_3 از خودگرده افشانی گیاهان M_2 جمع‌آوری می‌شود و مخزن ژرم‌پلاسم را تشکیل می‌دهد. در نمونه‌های M_2 ، هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن جهش‌ها تعیین می‌شود. اگر گیاهان M_2 انتخاب شده برای جمعیت TILLING به‌طور تصادفی انتخاب شوند، به نسبت مندلی ۲:۱ جهش‌های هتروزیگوت به هموزیگوت در غربالگری TILLING مشاهده می‌شود (۵).

جمعیت‌های سازمان نیافته یا توده‌ای نیز می‌توانند برای TILLING استفاده شوند. اگر چه با یک جمعیت سازمان یافته، اولین نسل غیر شیمری می‌تواند غربال شود. یک ایراد استراتژی توده‌ای این است که جهش‌های یکسان مشترک خواهر-برادری غربال خواهند شد که

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

باعث افزایش زمان و هزینه می‌شود. لذا این روش برای پروژه‌هایی که روی فنوتیپ‌های مشخص متمرکز هستند، مناسب‌تر بوده و می‌تواند به آسانی به‌منظور ساخت یک جمعیت غنی فنوتیپی شناسایی و طبقه‌بندی شود. در شرایط آزمایشگاهی روش‌هایی با پتانسیل زیاد برای دستیابی سریع به هموزیگوسیتی وجود دارند و نیاز به تفکیک شیمرها در جمعیت جهش‌یافته را هرچند به‌طور کامل حذف نمی‌کند، اما به حداقل می‌رسانند. کشت سوسپانسیون سلولی باعث تولید لاین‌های سلولی از کالوس و متعاقب آن باززایی گیاهچه‌ها از طریق جنین‌زایی رویشی می‌شود.

استخراج دی.ان.آ، ادغام و یافتن جهش

به‌منظور استخراج دی.ان.ا در جمعیت TILLING، باید دی.ان.ا ژنومی با کیفیت مناسب تهیه شود. نمونه‌های دی.ان.ای ژنومی به‌طور مشخص از گیاهان تک پایه فراهم و با یک غلظت یکسان به‌منظور کاهش هزینه غربالگری جهش مخلوط می‌شوند. برای ادغام تا هشت نمونه نیز استفاده شده است. چندین استراتژی برای ادغام نمونه‌ها پیشنهاد شده است. کلبرت و همکاران (۳۰) و تیل و همکاران (۳۱) از هر گیاه در یک مخزن هشت تایی استفاده و ۷٦۸ نمونه منحصر به فرد (۹٦ مخزن) در یک آزمایش مورد غربال‌سازی قرار گرفت. مخازن جهش‌ها پس از آن واسازی می‌شوند و ۸ نمونه درون مخزن به صورت جداگانه غربال می‌شوند.

روش ادغام دیگری به صورت دو بعدی توسط تیل و همکاران (۲۳) و کوپر و همکاران (۱۱) گزارش شد. در این روش نمونه‌های منفرد در ردیف‌های ۸*۸ آرایش می‌یابند و مخازن از ترکیب نمونه‌ها به‌واسطه ستون‌ها و ردیف‌ها به‌دست می‌آیند. تکرار نمونه‌ها در روش دو بعدی بدین‌معنی است که در یک ادغام نمونه پایدار (برای مثال ۸ برابر) تنها نیمی از تعداد نمونه‌ها در هر آزمایش غربال می‌شوند، نسبت به زمانی که با یک روش دو بعدی مقایسه شوند (۳۸٤ در برابر ۷٦۸ برای آزمایش ۹٦ چاهکی). مزیت روش دو بعدی این است که جهش‌ها معتبر هستند و افراد در یک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

مرحله شناسایی می‌شوند، ساده‌سازی فرآیند و به‌طور بالقوه میزان خطا را به حداقل می‌رساند.

روش‌های مختلفی برای یافتن چند شکلی‌های نوکلئوتیدی نامعلوم پیشنهاد شده است. برای مثال، توالی‌یابی سنتی سانگر، کروماتوگرافی با کارآیی بالا (HPLC) واسرشت‌کننده و جداسازی جفت شدگی ناجور آنزیمی، همگی برای یافتن جهش در ژنتیک معکوس برای غربالگری جمعیت‌های تیمار شده با جهش‌زاهای شیمیایی استفاده شده‌اند. در انتخاب روش به‌منظور یافتن جهش عوامل مهمی از جمله هزینه تجهیزات، هزینه نگهداری، قابل اطمینان بودن و میزان خطای آزمایش نقش دارد.

بهینه‌سازی‌های انجام شده در روش TILLING

۱- EcoTILLING

اولین بهینه‌سازی روش TILLING تحت عنوان EcoTILLING توسط کمای و همکاران (۳۲) گزارش شد. بسیاری از گونه‌های محصولات زراعی نمی‌توانند در معرض جهش‌های القایی قرار گیرند، در حالی‌که EcoTILLING می‌تواند برای یافتن واریته‌های طبیعی و عملکرد ژن خاص آن‌ها در این محصولات زراعی استفاده شود. این روش به غربال‌سازی تمام جمعیت، برای یافتن چندشکلی نیاز ندارد در حالی‌که این موضوع در TILLING پرزحمت و وقت‌گیر به‌شمار می‌رود. در این استراتژی هر اکوتیپ به نسبت استاندارد ۱:۱ مخلوط می‌شود (شکل ۱). در محصولات زراعی با گرده‌افشانی آزاد، EcoTILLING می‌تواند برای یافتن سطح هتروزیگوسیتی در یک قطعه ژن استفاده شود. همچنان‌که CELI می‌تواند قسمت کوچکی از دو رشته‌ای ناهمگن را هضم کند، می‌تواند برای یافتن چند شکلی چندگانه در یک تک ژن دلخواه نیز مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این‌که تنوع فیلوژنتیکی تخمین زده می‌شود، گزینش و عدم تعادل پیوستگی نیز می‌تواند تخمین زده شود. همچنین می‌تواند برای شناسایی چند شکلی دی.ان.ا با تعداد تکرار ماهواره‌ای به‌کار رفته و به‌طور موثر به عنوان یک

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

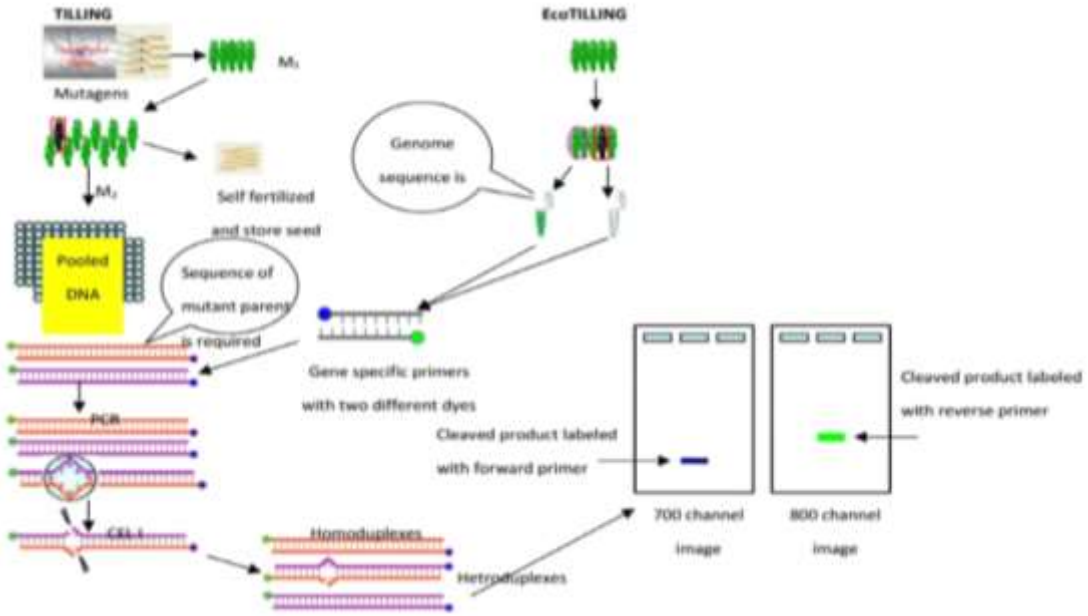
[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

تکنیک سریع و مناسب برای شناسایی چند شکلی دی.ان.ا در جمعیت‌هایی با تشابه ژنتیکی بالا و برای استخراج SNPها در مجموعه‌های ژرم‌پلاسم گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. روش EcoTILLING اولین بار در آرابیدوپسیس به‌منظور شناسایی چند شکلی‌های طبیعی استفاده شد (۳۲). از پنج ژن مختلفی که به طول تقریبا ۱KB بودند، ۵۵ هاپلوتیپ در اینترون‌ها شناسایی شد. این مطالعه نشان داد CELI می‌تواند دو رشته ناهمگن را برای یافتن چند شکلی چندگانه شامل SNPها، حذف و اضافه‌ها و تنوع در تعداد تکرار ریز ماهواره‌ها، برش دهد. کاربرد مهم دیگر، یافتن آلل‌های ژن‌های مقاوم F,N که می‌توانست مصونیت نسبت به بیماری‌های مختلف را فراهم کند. EcoTILLING در ژن‌های مقاوم MLA گیاه جو (*Hordeum Vulgar*) برای بررسی تنوع آللی توسط مژلهد و همکاران (۳۳) استفاده شد. براساس مقایسه با آگاهی جمع‌آوری شده توسط توالی‌یابی سانگر، نتیجه‌گیری شد که میزان خطای پایینی در روش EcoTILLING وجود دارد. حساسیت بالای EcoTILLING ، این روش را یک استراتژی مفید برای یافتن آلل‌های نادر (بالاخص در سرطان) می‌سازد.

یک تفاوت مهم میان TILLING و EcoTILLING میزان اطلاعاتی است که تولید می‌شود. در جمعیت دیپلوئیدی جهش یافته مناسب، آن‌چه که می‌توان انتظار داشت، یافتن تقریبا چهار جهش القایی به هنگام جستجوی یک ناحیه ۵/۱ کیلوبازی در ۷٦۸ فرد است. کاربرد EcoTILLING در آرابیدوپسیس و انسان صدها چندشکلی را به هنگام غربالگری ۹٦ نمونه با یک ژن هدف ۵/۱ کیلو بازی نشان داد. با افزایش بار اطلاعات بیوانفورماتیکی نزدیک به دو برابر، وظیفه شناسایی و مدیریت نوارهای چند شکلی در داده‌های EcoTILLING می‌توانست یک معضل شود که به منظور کمک به تجزیه و تحلیل ژل‌های EcoTILLING برنامه Gelbuddy برای تجزیه تصاویر ژل LI-COR توسعه داده شد (۳٤).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]



شکل۱- شکل شماتیکی از تکنیک TILLING و EcoTILLING . در TILLING بذور با مواد جهش‌زای شیمیایی/فیزیکی تیمار شده تا گیاهان M1 تولید شود. گیاهان M1 برای تولید M2 خودگشن شده که از این گیاهان دی.ان.ا استخراج و برای تجزیه و تحلیل استفاده می‌شود. به گیاهان M2 اجازه داده شده تا بذر تولید کنند که می‌توانند برای تجزیه و تحلیل‌های آتی ذخیره شوند. پس از استخراج دی.ان.ا از جمعیت جهش یافته، غلظت دی.ان.ا تمام نمونه ها استاندارد شده و با هم ترکیب می‌شوند. تعداد افراد در یک مخزن بستگی به سطح پلوییدی گیاه و میزان طبیعی SNP ها دارد. ژن مورد نظر با استفاده از یک پرایمر رو به جلو با برچسب رنگی ۷۰۰ نانومتر و یک پرایمر معکوس با یک برچسب رنگ ۸۰۰ نانومتر متصل شده به انتهای ۵ تکثیر می‌شود. محصولات PCR حرارت داده و خنک می‌شوند تا مخلوطی از همودوپلکس و هتودوپلکس در میان ژنوتیپ‌ها در مخزن ایجاد شود. هر اتصال ناجور (SNPS یا INDELS کوچک) توسط اندونوکلئاز اتصال ناجور (CELI) تشخیص داده می‌شود و به دو محصول جداگانه برش داده می‌شود که در کانال رنگی ۷۰۰ و ۸۰۰ آنالایزر دی.ان.ا LICOR شناسایی می‌شوند. اندازه کلی قطعات برش یافته، باید برابر با طول کل محصول باشد. هنگامی که قطعات برش یافته و محل پلی‌مورف مربوطه شناسایی می‌شود، این افراد برای بررسی جهش القا شده توالی‌یابی می‌شوند. EcoTILLING به روشی مشابه انجام می‌شود، به جز این‌که بذر با مواد جهش‌زا تیمار نشده است. بنابراین، فرآیند با استخراج دی.ان.ا از یک گیاه شاهد و اعضای جمعیت شروع و با مراحل باقی مانده برای تعیین چندشکلی طبیعی ادامه می‌یابد.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

همزمان با TILLING، استفاده از روش EcoTILLING در حال رشد و توسعه می‌باشد. به‌طوری‌که کاربرد آن در موجودات زنده جدید مورد استقبال قرار گرفته است. در واقع جمعیت طبیعی می‌تواند بهترین یا تنها منبع مطالعه و بهره‌برداری از تنوع نوکلئوتیدی در گونه‌هایی باشد که جهش‌زایی در آن‌ها مشکل یا غیرممکن است. برای مثال برای EcoTILLING مشخص کردن تنوع نوکلئوتیدی در ٤١ نمونه جمعیتی چوب پنبه سیاه غربی استفاده شد (۳۵). به‌منظور برآورد پیوستگی نامتعادل، هتروزیگوسیتی و تنوع نوکلئوتیدی در برنامه مشترک FAO/IAEA، EcoTILLING برای نمونه جمعیتی موز، کاساوا و برنج به‌کار برده شد. با این هدف که آلل‌های مهم برای پاسخ به تنش‌های زنده و غیرزنده مورد شناسایی واقع شوند. بهینه‌سازی روش EcoTILLING با استفاده از برش دو رشته‌ای توسط آنزیم CELI و یک بستر بازخوانی ژل آگارز به‌منظور تشخیص ماهی سالمون توسط گاروین گارت (۳٦) استفاده شد. بهره‌برداری از تنوع نوکلئوتیدی طبیعی مسلما نقش مهمی را در بهبود محصولات زراعی در قرن بیست و یکم ایفا خواهد کرد.

۲- iTILLING

روش جدید روند TILLING که زمان لازم و هزینه‌ها را برای انجام غربالگری جهش کاهش می‌دهد، برای آرابیدوپسیس توسعه داده شد و ITILLING (TILLING منحصر به‌فرد) نام گرفت (۳۷). در روش سنتی، گیاهان M_2 در خاک کشت می‌شوند و دی.ان.ا به صورت جداگانه از آن‌ها جداسازی و سپس به‌منظور تکثیر مبتنی بر PCR جهش، با هم مخلوط می‌شوند. با استراتژی ITILLING، بذور به دست آمده از M_1 به صورت در هم جمع‌آوری می‌شوند و نیازی به فهرست کردن گیاهان نیست. گیاهان M_2 به تعداد یک یا دو عدد در هر چاهک روی صفحات چرخشی ۹٦ چاهکی روی محیط کشت آگار کشت می‌شوند و بافت برای جداسازی دی.ان.ا مستقیما از گیاهان با استفاده از روش ICE-CAP برداشته می‌شود (۳۸). نام ICE-CAP نشان می‌دهد که برای گرفتن

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

نمونه‌های بافت، از یخ استفاده می‌شود. ریشه‌های نهال‌ها از میان آگار به سمت صفحه ۹۶ چاهکی دوم که با آب پر شده است، رشد می‌کنند و تقریبا پس از سه هفته به ته صفحه دوم می‌رسند. سپس صفحه پایین‌تر همراه با قطعات ریشه درون آن منجمد و از نهال جدا می‌شود. این صفحه به‌عنوان بستری برای جداسازی دی.ان.ا از بافت ریشه به‌کار می‌رود و نهال گیاهان دست نخورده باقی می‌مانند. دی.ان.ا جدا شده مستقیما به‌عنوان یک الگو برای واکنش PCR استفاده می‌شود و عمل یافتن جهش می‌تواند انجام شود. در مورد ITILLING تجزیه منحنی ذوب با وضوح بالا از قطعات تکثیر یافته به‌منظور آشکار کردن جهش‌ها بدون استفاده از برش آنزیمی و ژل الکتروفورز انجام می‌شود. از آن‌جایی که دو گیاه رشدیافته در هر چاهک وجود دارد، دی.ان.ا جدا شده که در حال حاضر با هم مخلوط شده‌اند، دو تا هستند. بنابراین شناسایی جهش‌ها در هر دو حالت هموزیگوت و هتروزیگوت ممکن است. زمانی که بذور به‌صورت تکی در هر چاهک کاشته می‌شوند، تنها جهش‌های هتروزیگوت می‌توانند شناسایی شوند. پس از این‌که جهش شناسایی شد، نهال‌های مربوطه از صفحه ۹۶ چاهکی به خاک منتقل و به منظور مشخص کردن فنوتیپ و تولید نسل‌های بیشتر کشت می‌شوند (۳۷).

استراتژی ITILLING مکمل روش TILLING سنتی است. اگر چه هزینه مورد نیاز را کاهش می‌دهد، ولی می‌تواند فقط برای تعداد کمی از ژن‌ها انجام شود. زیرا جمعیت مورد استفاده غربالگری، از طبیعت زندگی کوتاه برخوردارند و تنها گیاهانی با جهش‌هایی که قادر است در یک زمان نسبتا کوتاه شناسایی شوند، می‌توانند برای رسیدن به بلوغ و عملکرد دانه برای ذخیره‌سازی کشت شوند. استراتژی ITILLING در حال حاضر به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بسیاری از گونه‌های مختلف در تعدادی از آزمایشگاه‌ها به‌کار برده شده است (۱۷). با توجه به این‌که هزینه این روش با گذشت زمان کاهش یافته است، ITILLING توانسته به خوبی به‌عنوان

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

متداول ترین استراتژی ژنتیک معکوس به کار رود.

۳- DE-TILLING (TILLING حذفی، Deletion TILLING)

در این روش از بمباران نوترون سریع به‌منظور ایجاد جمعیت جهش یافته استفاده می‌شود. نوترون‌های سریع نوعی از تابش انرژی بالا هستند که طیف گسترده‌ای از حذف و جهش‌های کروموزومی را در گیاهان القا می‌کند (۲۹). چندین منبع نوترون سریع شامل شتاب دهنده‌های ذرات و راکتورهای تحقیق هسته‌ای برای جهش‌زایی به‌طور بالقوه در دسترس هستند. نوترون‌های سریع تولید شده توسط شکافت هسته‌ای، با تابش اشعه گاما همراه هستند. اما، سهم آن قابل تنظیم است. براساس یافته‌های روگرز وهمکاران (۲۸) برای تولید ذرات ثانویه بُرد کوتاه درون هسته سلول که شکست رشته دی.ان.ا را وساطت می‌کنند، انرژی نوترون باید در حدود ۵۰۰KEV تا ۵MEV باشد. جهش‌های DE-TILLING برای بهبود محصولات زراعی مزیت‌هایی دارند، از این نظر که جهش‌های زمینه‌ای نسبتا کمی ایجاد می‌کنند. جهش‌زایی حذفی می‌تواند به‌عنوان بهترین راه خاموشی ژن‌های تکرار شده پشت سر هم مطرح شود که در ژنوم گیاهان به صورت متداول قابل مشاهده است (۲۹).

نتیجه‌گیری نهایی

اصلاح از طریق TILLING نقش مهمی را در معرفی اولیه جهش و سپس شناسایی و استفاده از این جهش‌ها در بهبود محصول ایفا کرده است. روش TILLING این قابلیت را دارد که مجموعه‌ای از آلل‌های جدید را برای ژن‌های مورد نظر در هر گونه گیاهی فراهم نماید، این آلل‌های تازه شناسایی می‌توانند به‌عنوان منبع ارزشمندی در بهبود محصول مورد استفاده قرار گیرد. تعیین ژنوتیپ، بخشی از گیاه که به‌عنوان نمونه استفاده می‌شود، نوع و غلظت جهش، اندازه جمعیت مورد بررسی و روش شناسایی جهش از نکات اصلی هستند که در هنگام اجرای TILLING می‌بایست مد نظر قرار گیرند. در حال حاضر سیستم‌های متعددی از روش

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

TILLING برای گیاهان مدل و زراعی گزارش شده است که با استفاده از آن‌ها، جهش‌های مطلوب شناسایی شده و در برنامه‌های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. TILLING روش ژنتیک معکوسی است که می‌تواند به‌طور دقیق جهش‌هایی را در صفات مشخص که نمی‌توانند به راحتی با استفاده از ژنتیک مستقیم مورد هدف قرار گیرند، ایجاد نماید. به‌طور کلی، TILLING به‌دلیل این‌که می‌تواند به‌طور موثری جهش و یا تنوع مورد نظر را در گیاهان زراعی ایجاد کرده و این تغییرات برای بهبود گیاهان زراعی مورد استفاده قرار گیرد، از محبوبیت ویژه‌ای برخوردار شده است و طی سال‌های اخیر به‌طور موفقیت‌آمیزی در گیاهان متعددی مورد استفاده قرار گرفته است. در گونه‌هایی با تکثیر رویشی و یا با زمان تولید نسل طولانی که امکان تولید جمعیت TILLING دشوار است، کاربرد EcoTILLING می‌تواند بهترین راه حل باشد. در تحقیقات اخیر TILLING و تکنیک‌های مشابه، به‌منظور بهبود محصول از طریق جهش‌زدایی تصادفی مورد توجه قرار گرفته‌اند و کاربرد این روش‌های امیدوار کننده نظر به حجم انبوه داده‌های حاصل از توالی ژنومی برای گونه‌های زراعی از طریق NGS و نرم افزار بسیار پیشرفته، رو به افزایش خواهد بود. استفاده از روش‌هایی تحت عناوین SEQUETILLING/SEQUEECOTILLING به‌جای روش‌های سنتی TILLING/EcoTILLING مبتنی بر CELI در برخی از جمعیت‌های بزرگ TILLING در آینده نزدیک می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

فهرست منابع

References

1. Von Braun, J. and Pachauri, R.K., 2006. The promises and challenges of biofuels for the poor in developing countries: IFPRI 2005-2006 Annual Report Essay. Intl Food Policy Res Inst.

2. Gale, M., 2002. Applications of Molecular Biology and Genomics to Genetic Enhancement of Crop Tolerance to Abiotic Stress: A Discussion Document. Isc Secretariat, Food and Agriculture Organization of the United Nation, New York.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

3. Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A. and Zhang, J., 2000. Engineering the provitamin A beta-carotene biosynthetic pathway into carot. Science, 287, p.5451.

4. Tadele, Z., 2016. Mutagenesis and TILLING to dissect gene function in plants. Current genomics, 17(6), pp.499-508.

5. Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R. and Comai, L., 2003. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics, 164(2), pp.731-740.

6. Suzuki, T., Eiguchi, M., Kumamaru, T., Satoh, H., Matsusaka, H., Moriguchi, K., Nagato, Y. and Kurata, N., 2008. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. Molecular Genetics and Genomics, 279(3), pp.213-223.

7. Lababidi, S., Mejlhede, N., Rasmussen, S.K., Backes, G., Al-Said, W., Baum, M. and Jahoor, A., 2009. Identification of barley mutants in the cultivar 'Lux'at the Dhn loci through TILLING. Plant breeding, 128(4), pp.332-336.

8. Dong, C., Vincent, K. and Sharp, P., 2009. Simultaneous mutation detection of three homoeologous genes in wheat by High Resolution Melting analysis and Mutation Surveyor®. BMC Plant Biology, 9(1), p.143.

9. Till, B.J., Reynolds, S.H., Weil, C., Springer, N., Burtner, C., Young, K., Bowers, E., Codomo, C.A., Enns, L.C., Odden, A.R. and Greene, E.A., 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. BMC plant biology, 4(1), p.12.

10. Xin, Z., Wang, M.L., Barkley, N.A., Burow, G., Franks, C., Pederson, G. and Burke, J., 2008. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. BMC Plant Biology, 8(1), p.103.

11. Cooper, J.L., Till, B.J., Laport, R.G., Darlow, M.C., Kleffner, J.M., Jamai, A., El-Mellouki, T., Liu, S., Ritchie, R., Nielsen, N. and Bilyeu, K.D., 2008. TILLING to detect induced mutations in soybean. BMC plant biology, 8(1), p.9.

12. Gilchrist, E.J., Sidebottom, C.H., Koh, C.S., MacInnes, T., Sharpe, A.G. and Haughn, G.W., 2013. A mutant Brassica napus (Canola) population for the identification of new genetic diversity via TILLING and next generation sequencing. PLoS One, 8(12), p. e84303.

13. Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., Bonnet, G., Caranta, C. and Gallois, J.L., 2016. A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy. The Plant Journal, 85(6), pp.717-729.

14. Perry, J.A., Wang, T.L., Welham, T.J., Gardner, S., Pike, J.M., Yoshida, S. and Parniske, M., 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

collection of mutants of the legume Lotus japonicus. Plant physiology, 131(3), pp.866-871.

15. McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A. and Henikoff, S., 2000. Targeted screening for induced mutations. Nature biotechnology, 18(4), p.455.

16. Colasuonno, P., Incerti, O., Lozito, M.L., Simeone, R., Gadaleta, A. and Blanco, A., 2016. DHPLC technology for high-throughput detection of mutations in a durum wheat TILLING population. BMC genetics, 17(1), p.43.

17. Chen, L., Hao, L., Parry, M.A., Phillips, A.L. and Hu, Y.G., 2014. Progress in TILLING as a tool for functional genomics and improvement of crops. Journal of integrative plant biology, 56(5), pp.425-443.

18. Till, B.J., Burtner, C., Comai, L. and Henikoff, S., 2004. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. Nucleic Acids Research, 32(8), pp.2632-2641.

19. Maluszynski, M., Kasha, K.J. and Szarejko, I., 2003. Published doubled haploid protocols in plant species. In Doubled haploid production in crop plants (pp. 309-335). Springer, Dordrecht.

20. Martín, B., Ramiro, M., Martínez-Zapater, J.M. and Alonso-Blanco, C., 2009. A high-density collection of EMS-induced mutations for TILLING in Landsberg erecta genetic background of Arabidopsis. BMC Plant biology, 9(1), p.147.

21. Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E. and Henikoff, J.G., 2003. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. Genome research, 13(3), pp.524-530.

22. Minoia, S., Petrozza, A., D'Onofrio, O., Piron, F., Mosca, G., Sozio, G., Cellini, F., Bendahmane, A. and Carriero, F., 2010. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. BMC research notes, 3(1), p.69.

23. Till, B.J., Cooper, J., Tai, T.H., Colowit, P., Greene, E.A., Henikoff, S. and Comai, L., 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. BMC plant biology, 7(1), p.19.

24. Talamè, V., Bovina, R., Sanguineti, M.C., Tuberosa, R., Lundqvist, U. and Salvi, S., 2008. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. Plant biotechnology journal, 6(5), pp.477-485.

25. Caldwell, D.G., McCallum, N., Shaw, P., Muehlbauer, G.J., Marshall, D.F. and Waugh, R., 2004. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (Hordeum vulgare L.). The Plant Journal, 40(1), pp.143-150.

26. Muller, H.J., 1928. The measurement of gene mutation rate in Drosophila, its high variability, and its dependence upon temperature. Genetics, 13(4), p.279.

27. Sato, Y., Shirasawa, K., Takahashi, Y., Nishimura, M. and Nishio, T., 2006. Mutant selection from progeny of gamma-ray-irradiated rice by DNA heteroduplex

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

cleavage using Brassica petiole extract. Breeding Science, 56(2), pp.179-183.

28. Rogers, C., Wen, J., Chen, R. and Oldroyd, G., 2009. Deletion-based reverse genetics in Medicago truncatula. Plant Physiology, 151(3), pp.1077-1086.

29. Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M.N., Yeung, A.T., McCallum, C.M., Comai, L. and Henikoff, S., 2001. High-throughput screening for induced point mutations. Plant physiology, 126(2), pp.480-484.

30. Li, X., Song, Y., Century, K., Straight, S., Ronald, P., Dong, X., Lassner, M. and Zhang, Y., 2001. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. The Plant Journal, 27(3), pp.235-242.

31. Till, B.J., Zerr, T., Bowers, E., Greene, E.A., Comai, L. and Henikoff, S., 2006. High-throughput discovery of rare human nucleotide polymorphisms by Ecotilling. Nucleic Acids Research, 34(13), pp. e99-e99.

32. Comai, L., Young, K., Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R. and Henikoff, S., 2004. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling. The Plant Journal, 37(5), pp.778-786.

33. Mejlhede, N., Kyjovska, Z., Backes, G., Burhenne, K., Rasmussen, S.K. and Jahoor, A., 2006. EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes mlo and Mla of barley. Plant breeding, 125(5), pp.461-467.

34. Zerr, T. and Henikoff, S., 2005. Automated band mapping in electrophoretic gel images using background information. Nucleic acids research, 33(9), pp.2806-2812.

35. Gilchrist, E.J., Haughn, G.W., Ying, C.C., Otto, S.P., Zhuang, J.U.N., Cheung, D., Hamberger, B., Aboutorabi, F., Kalynyak, T., Johnson, L.E.E. and Bohlmann, J., 2006. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of Populus trichocarpa. Molecular ecology, 15(5), pp.1367-1378.

36. Garvin, M.R. and Gharrett, A.J., 2007. DEco-TILLING: an inexpensive method for single nucleotide polymorphism discovery that reduces ascertainment bias. Molecular ecology notes, 7(5), pp.735-746.

37. Bush, S.M. and Krysan, P.J., 2010. iTILLING: a personalized approach to the identification of induced mutations in Arabidopsis. Plant physiology, 154(1), pp.25-35.

38. Krysan, P., 2004. Ice-cap. A high-throughput method for capturing plant tissue samples for genotype analysis. Plant physiology, 135(3), pp.1162-1169.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]

Mutation Induction through TILLING: an Appropriate Method to Crop Improvement

Mehrana Koohi Dehkordi[1]* and Manijeh Rahimi[2]

1-Assistant Professor, Department of Biotechnology, Payam Noor University, Isfahan, Isfahan, Iran
2- MSc of Biotechnology Department, Payam Noor University, Isfahan, Isfahan, Iran

m.koohi@gmail.com

Abstract

Global human population growth, climate change and the limitation of fossil fuels will put new human pressure on food, medicine, fuel and food supplies in the 21st century. In order to get out of this constraint, increasing the production of higher-yielding crops of calories, starches, foodstuffs, natural pharmaceutical compounds and other important products can be a breakthrough. For this purpose, natural and induced mutations can be used to produce generations with superior and inherited properties. Several methods have been used to understand the function of genes such as RNA interference; gene scilencing and site directed mutagenesis. All these techniques require transgenesis which is not always possible in many important commercial crops. In this paper, an effective and non-transgenic approach called TILLING is discussed. This method is a reverse genetic method with high, fast and low cost ability that determines the allelic series of induced point mutations in the desired genes in the population of the chemically/physically mutated individuals. The main advantage of TILLLING is its applicability to any species, regardless of ploidy level and genome size. The vast applications of this powerful technique in applied and basic research have been done through the optimization of the original TILLING strategy, such as EcoTILLING and De-TILLING.

Keywords: Reverse genetic, non-transgenic, mutagenesis.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2025-05-17]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1397.11.2.2.0]