

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. به منظور برون رفت از این محدودیت، افزایش تولید محصولات زراعی 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 به منظور 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 TILLING امکان کاربرد آن برای هر گونه، بدون در نظر گرفتن 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.

مقدمه

پایداری کشاورزی می تواند به وضعیتی که افزایش تولیدات غذایی حداقل با نرخ رشد جمعیت متناسب باشند، اطلاق شود. پیش بینی اندازه جمعیت جهان در سال ۲۰۵۰ میلادی، ۹/۲ بیلیون است که اکثریت آن ها در کشورهای در حال توسعه و کشورهای کم توسعه یافته خواهند بود. این نشان می دهد که فشار زیادی بر تولید محصولات زراعی در کشورهای با حداقل منابع موجود برای اصلاح گیاهان زراعی روی خواهد داد (۱). میزان تولید محصولات زراعی عمدتاً تحت تاثیر انواع تنش های زنده و غیرزنده قرار دارد و به طور تقریب ۷۰ درصد پتانسیل عملکرد، به علت این گونه تنش ها از دست می رود (۲). عمده تنش های غیر زنده که تولید غذا را تحت تاثیر قرار می دهند شامل خشکی، شوری و اسیدیته پایین هستند. یک سوم کل مناطق قابل کشت جهانی تحت تاثیر شوری و ۴۰ درصد تحت تاثیر اسیدی شدن قرار دارد. فاکتورهای زنده مانند بیماری، حشرات و علف های هرز نیز به کاهش عملکرد

کمک می کنند. تولید محصولات زراعی با گسترش مناطق قابل کشت یا استفاده از مواردی مانند بذور اصلاح شده، آبیاری و مواد شیمیایی افزایش می یابد. بر اساس این هدف، تولیدکنندگان محصولات زراعی، به سمت دستیابی به ارقام اصلاح شده ای که عملکرد بالاتری دارند و همزمان شرایط خاک و آب و هوای زیر سطح بهینه را تحمل می کنند، متمرکز می شوند. با استفاده از انواع روش های تولید مثل، ارقام اصلاح شده ای از گونه های مختلف در جوامع کشاورزی بدست آمده اند و به افزایش تولید غذای جهانی کمک کرده اند. کاربرد جهش القایی بین سال های ۲۰۰۰-۱۹۴۰ به بیش از ۲۰۰۰ محصول زراعی رسمی ثبت شده منجر شد که ۸۵ درصد آن نتیجه جهش زایی با اشعه گاما و ایکس بوده است. یکی از مستقیم ترین راه های بررسی عملکرد ژن، شناسایی جهش در ژن خاص و ارتباط این جهش به تغییر فنوتیپی در موجود جهش یافته است. در روش ژنتیک مستقیم (به وسیله جهش از طریق فنوتیپ به ژن)، جمعیت های جهش یافته بزرگ،

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

برای تغییر دلخواه صفات یا فرآیند بیولوژیکی، به وجود آمده و غربال می‌شوند. توالی ژن مسئول فنوتیپ تغییر یافته می‌تواند با استفاده از فرآیند همسانه‌سازی مبتنی بر نقشه‌یابی جداسازی شود. علی‌رغم این که این روش زمان‌بر و پرهزینه 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 متعاقباً تجزیه و تحلیل تغییر وابسته به فنوتیپ گیاه است. چندین روش ژنتیک معکوس از جمله جهش‌افزایی 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 پیش‌ویتامین 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

گیاهان زراعی به منظور 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 (۴). 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 معمولاً 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 اتیل‌متان سولفونات (EMS) توسط گرین و همکاران (۵) در ۱۹۲ ژن آرابیدوپسیس، حدود ۱۰ جهش در هر ژن، در میان ۳۰۰۰ گیاه M₂ بررسی شده نشان داد با استفاده از TILLING القاء یک سری

آل‌ها در یک لوکوس هدف مقدور می‌باشد. علاوه بر آل‌های فاقد عملکرد، جهش‌زاهای شیمیایی آل‌های 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 (۶)، 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 غیرشیمی، تهیه یک مخزن ژرم پلاسما، استخراج دی.ان.ا و ادغام نمونه،

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

توالی یابی قطعه ژن هدف به منظور تایید جهش و مشخص کردن نوع تغییر نوکلئوتیدی انجام می شود.

به منظور تهیه یک جمعیت جهش یافته، بذور و نمونه های دی.ان.ا از یک جمعیت M_2 بزرگ تهیه می شود و معمولاً برای تهیه جمعیت بستر TILLING از ۳۰۰۰-۵۰۰۰ فرد M_2 استفاده شده است، هر چند جمعیت های بزرگتری که شامل ۱۰۰۰۰ گیاه باشند نیز گزارش شده است. تقریباً همه جمعیت های TILLING با استفاده از جهش زاهای شیمیایی توسعه یافته اند که در میان آنها عامل آلکیل کننده (EMS) کاربرد گسترده تری دارد. پتانسیل جهشی زیاد عوامل شیمیایی در جمعیت های TILLING ایجاد شده گزارش شده است.

بستر TILLING ایجاد شده می تواند به عنوان منبع دائمی جهش برای هر دو روش ژنتیک مستقیم و معکوس به کار رود. در بسیاری از موارد مشاهدات فنوتیپی در نسل M_2 انجام می شود و نسل های M_3 بزرگ برای غربالگری مستقیم تولید می شوند. یک ارزیابی

غربالگری جمعیت برای جهش های القایی و تایید و ارزیابی جهش ها است. روش عمومی برای ایجاد یک جمعیت TILLING در گیاهان شامل مراحل ذیل می باشد (شکل ۱):

۱- ایجاد جمعیت های جهش یافته

این مرحله شامل جهش زایی شیمیایی، توسعه نسل های M_1 و M_2 ، استخراج دی.ان.ا از گیاهان M_2 منفرد، ایجاد مخزن دی.ان.ا از ۵-۸ گیاه M_2 و ایجاد یک بانک بذر M_3 می باشد.

۲- یافتن جهش ها در یک توالی هدف و تجزیه و تحلیل فنوتیپ جهش یافته ها

در این مرحله از واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR) به منظور تکثیر قطعه دی.ان.ا هدف از دی.ان.ا ادغام شده به عنوان الگو استفاده می شود. شناسایی جهش ها با استفاده از روش های مختلف برای مثال برش توسط اندونوکلاز خاص، واسرشت با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (DHPLC, Denaturing High Liquid Chromatography Performance) یا توالی یابی با توان بالا صورت می گیرد. پس از شناسایی گیاهان M_2 حامل جهش،

فنوتیپی دقیق در نتاج M_2 و M_3 ، امکان غنی ساختن جمعیت برای جهش در یک ژن خاص یا غربال سازی گیاهان حامل یک تغییر فنوتیپی مرتبط با فرآیندهای رشد و نمو یا متابولیکی مورد مطالعه را فراهم می سازد. چنین روشی با موفقیت توسط پری و همکاران (۱۴) برای تجزیه و تحلیل ژن های کنترل کننده همزیستی ریشه *lotus Japonicus* با استفاده از یک جمعیت TILLING که برای جهش های گره ریشه پیش گزینش شدند، مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این تهیه نسل M_3 بزرگ توانست منبعی برای انتخاب مستقیم جهش های تحمل / حساسیت شدید به طیف وسیعی از تنش های زنده و غیر زنده را فراهم کند.

روش کار TILLING

اولین روشی که برای TILLING توسط مک کالوم و همکاران (۱۵) شرح داده شد، شامل تیمار بذور آرابیدوپسیس با ماده جهش زای EMS، جداسازی و ادغام دی.ان.آ، واکنش PCR قطعه دلخواه، تشکیل دو رشته ناهمگن و شناسایی آن ها

با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (DHPLC) بود. از آن زمان به بعد، TILLING برای بسیاری از موجودات زنده مختلف استفاده شد و بهینه سازی های متعددی به منظور خودکار کردن غربالگری جهش ها و کاهش هزینه های آن ها صورت گرفت. با گذشت زمان، روش DHPLC برای تشخیص جهش در روند TILLING در اکثر موارد با هضم دو رشته ناهمگن با استفاده از اندونوکلازهای خاص جایگزین شد (۱۶). متعاقب آن الکتروفورز پلی اکریل آمید و تصویرسازی در سیستم تحلیل گر ژل بسیار حساس LI-COR که ارزان تر و سریع تر از DHPLC است، مورد استفاده قرار گرفت. اندونوکلاز خاص تک رشته ای برای جدا کردن دو رشته ناهمگن دی.ان.ا در موقعیت جفت شدگی ناجور در روش TILLING استفاده شده است (۱۷). متداول ترین روش تشخیص جهش برای TILLING روش برش جفت شدگی ناجور با استفاده از اندونوکلاز CELI بدست آمده از کرفس است. نوکلئازهای شبه CELI نیز در گونه های گیاهی دیگر

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

از جمله یونجه، آسپاراگوس و گوجه فرنگی شناسایی شده است. نوکلئازهای خاص تک رشته‌ای دیگری مانند S1 از *Pencillium* P1، *Aspergillus Oryza* و *Citrinum* و نوکلئاز ماش از *Vigna Radiata* جداسازی شده‌اند که عمدتاً در PH=5 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 مستقیماً 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 تقریباً 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

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.

ژن‌های کوچک یا زمین‌های تک پروتئین که با ژن‌های بزرگ رمز می‌شوند، مناسب می‌سازد.

۱-۱ عوامل آلکیله کننده

۱- جهش‌زاهای شیمیایی

برای تولید جمعیت TILLING معمولاً جهش‌زاهای شیمیایی از اقبال بیشتری برخوردارند. به دلیل این که روش استفاده از آن‌ها در غربالگری ژنتیک مستقیم برای بسیاری از گونه‌ها بهینه شده است (۱۷)، همچنین این جهش‌زاهای 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 نسبتاً 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

عوامل آلکیله کننده متداول‌ترین مواد شیمیایی به کار برده شده در جهش‌زایی گیاهی هستند. آن‌ها دسته‌ای از ترکیبات تغییر دهنده پایه را تشکیل می‌دهند که مستقیماً 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 گوانین و موقعیت ۳ آدنین برای تغییرات مستعدترین هستند. بر اساس یافته‌های مالوسزیسکی و همکاران (۱۹) عوامل آلکیله کننده 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

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

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 حالی که 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 آلی 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 گوانین را آلکیله می‌کند و به جفت شدگی ناجور منجر می‌شود. گوانین آلکیله شده با تیمین جفت می‌شود که عمدتاً 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

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، ۶). فراوانی جهش‌های القایی توسط این جهش‌زا در سویا با فراوانی القایی در این گونه توسط EMS قابل مقایسه بود (۱ جهش/۱۴۰ کیلوباز). فراوانی جهش‌های القایی در برنج با MNU دو برابر بیشتر (۱ جهش/۱۳۵ کیلوباز) از EMS (۱ جهش/۳۰۰ کیلوباز) گزارش شد (۶، ۲۰، ۲۳). این در حالی بود که در مورد تیمار MNU خوشه‌ها در معرض جهش‌زا قرار گرفتند. در حالی که 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 (۶) 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 (۱ جهش/۱۳۵ کیلوباز) از فراوانی بود که از تیمار ترکیبی بذور بدست آمده بود (۱ جهش/۲۶۵ 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)،

"کوهی و رحیمی، القاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

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 نسبتاً 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 به ترتیب 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 قابل قبول، غلظت ۱۰ میلی مولاری سدیم آزید غلظت مناسب در نظر گرفته شد (۲۴). فراوانی جهش بدست آمده در این آزمایش (۱ جهش/۳۷۴KB) بود و حدود سه بار بیشتر از آزمایش کالدول و همکاران (۲۵) گزارش شد که از EMS به عنوان جهش‌زا استفاده شده بود (۱ جهش/۱MB).

۲- جهش‌زاهای فیزیکی

القای جهش با مواد جهش‌زای فیزیکی

تاریخچه طولانی دارد که با تحقیق مولر (۲۶) از طریق در معرض قرار دادن مگس سرکه در برابر اشعه X آغاز شد. گرچه 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.

۱-۲- 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). به منظور ایجاد جمعیت TILLING در برنج JAPONICA، بذور تحت تابش اشعه گاما قرار گرفتند. فراوانی جهش به صورت ۱ جهش/۶/۲MB تعیین شد. چهار تا از جهش‌های شناسایی شده جایگزینی تک نوکلئوتیدی بودند و ۲ تا حذف دو جفت بازی و چهار جفت

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 (عمدتاً 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 صورتی که 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 و همکاران (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 زمانی که 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. به‌هنگام 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

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

دگر معنی 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 غیرشیمیری 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 شیمیر است. برای دستیابی به جهش‌های توارث‌پذیر، گیاه باید برای تولید یک نسل غیر شیمیر تکثیر شود، پیش از این‌که دی.ان.ا برای غربالگری

TILLING جمع‌آوری شود. وقتی که امکان استفاده از خودباروری وجود داشته باشد، جمعیت‌ها نوعاً 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 ژرم پلاسما را تشکیل می‌دهد. در نمونه‌های M_2 ، هتروزیگوت یا هموزیگوت بودن جهش‌ها تعیین می‌شود. اگر گیاهان M_2 انتخاب شده برای جمعیت TILLING به طور 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 شیمیری می‌تواند غربال شود. یک ایراد استراتژی توده‌ای این است که جهش‌های یکسان مشترک خواهر-برادری غربال خواهند شد که

باعث افزایش زمان و هزینه می شود. لذا این روش برای پروژه هایی که روی فنوتیپ های مشخص متمرکز هستند، مناسب تر بوده و می تواند به آسانی به منظور ساخت یک جمعیت غنی فنوتیپی شناسایی و طبقه بندی شود. در شرایط آزمایشگاهی روش هایی با پتانسیل زیاد برای دستیابی سریع به هموزیگوسیتی وجود دارند و نیاز به تفکیک شیمرها در جمعیت جهش یافته را هرچند به طور کامل حذف نمی کند، اما به حداقل می رسانند. کشت سوسپانسیون سلولی باعث تولید لاین های سلولی از کالوس و متعاقب آن باززایی گیاهچه ها از طریق جنین زایی رویشی می شود.

استخراج دی.ان.آ، ادغام و یافتن جهش

به منظور استخراج دی.ان.ا در جمعیت TILLING، باید دی.ان.ا ژنومی با کیفیت مناسب تهیه شود. نمونه های دی.ان.ای ژنومی به طور مشخص از گیاهان تک پایه فراهم و با یک غلظت یکسان به منظور کاهش هزینه غربالگری جهش مخلوط می شوند. برای ادغام تا هشت نمونه نیز

استفاده شده است. چندین استراتژی برای ادغام نمونه ها پیشنهاد شده است. کلبرت و همکاران (۳۰) و تیل و همکاران (۳۱) از هر گیاه در یک مخزن هشت تایی استفاده و ۷۶۸ نمونه منحصر به فرد (۹۶ مخزن) در یک آزمایش مورد غربال سازی قرار گرفت. مخازن جهش ها پس از آن واسازی می شوند و ۸ نمونه درون مخزن به صورت جداگانه غربال می شوند.

روش ادغام دیگری به صورت دو بعدی توسط تیل و همکاران (۲۳) و کوپر و همکاران (۱۱) گزارش شد. در این روش نمونه های منفرد در ردیف های ۸*۸ آرایش می یابند و مخازن از ترکیب نمونه ها به واسطه ستون ها و ردیف ها به دست می آیند. تکرار نمونه ها در روش دو بعدی بدین معنی است که در یک ادغام نمونه پایدار (برای مثال ۸ برابر) تنها نیمی از تعداد نمونه ها در هر آزمایش غربال می شوند، نسبت به زمانی که با یک روش دو بعدی مقایسه شوند (۳۸۴ در برابر ۷۶۸ برای آزمایش ۹۶ چاهکی). مزیت روش دو بعدی این است که جهش ها معتبر هستند و افراد در یک

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

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 کارایی بالا (HPLC) و اسرشت‌کننده 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

EcoTILLING -۱

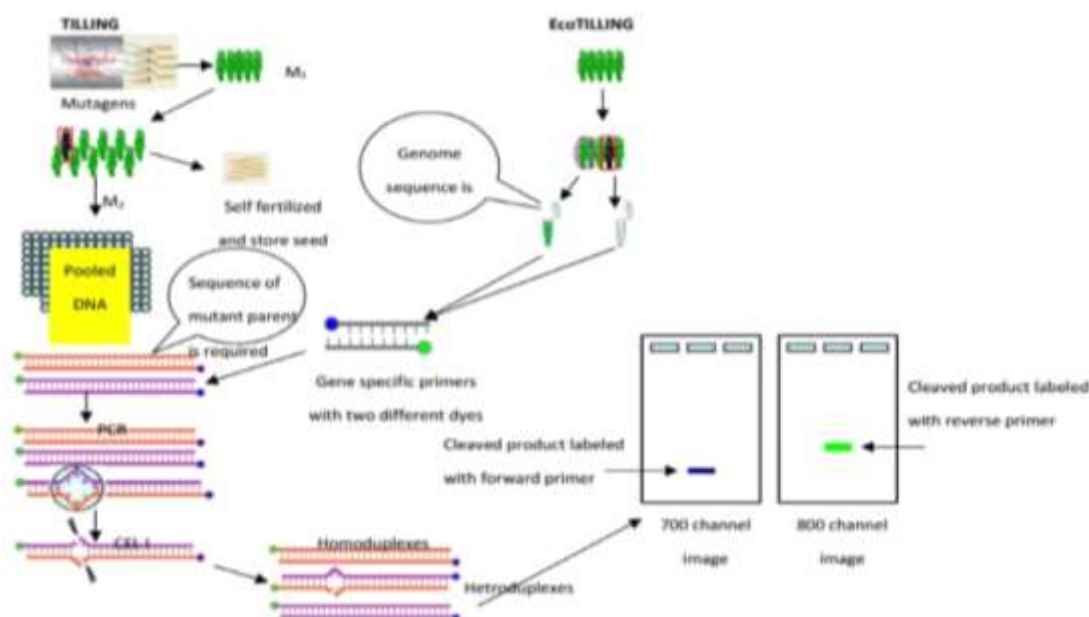
اولین بهینه‌سازی روش TILLING تحت عنوان EcoTILLING توسط کمای و همکاران (۳۲) گزارش شد. بسیاری از گونه‌های محصولات زراعی نمی‌توانند در

معرض جهش‌های القایی قرار گیرند، در حالی که 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 حالی که 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 این که 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 ماهره‌ای به‌کار رفته و به‌طور موثر به عنوان یک

تکنیک سریع و مناسب برای شناسایی چند شکلی دی.ان.ا در جمعیت‌هایی با تشابه ژنتیکی بالا و برای استخراج SNPها در مجموعه‌های ژرم پلاسما گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. روش EcoTILLING اولین بار در آراییدوپسیس به منظور شناسایی چند شکلی‌های طبیعی استفاده شد (۳۲). از پنج ژن مختلفی که به طول تقریباً 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 آلی 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 تقریباً چهار جهش القایی به هنگام جستجوی یک ناحیه ۵/۱ کیلوبازی در ۷۶۸ فرد است. کاربرد EcoTILLING در آراییدوپسیس و انسان صدها چندشکلی را به هنگام غربالگری ۹۶ 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 (۳۴).

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"



شکل ۱- 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 نمونه‌ها استاندارد شده و با هم ترکیب می‌شوند. تعداد افراد در یک مخزن بستگی به سطح پلویدی 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 اندونوکلاز 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 پلی مورف 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.

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 ۴۱ نمونه جمعیتی چوب پنبه سیاه غربی استفاده شد (۳۵). به‌منظور برآورد پیوستگی نامتعادل، هتروزیگوسیتی و تنوع نوکلئوتیدی در برنامه مشترک EcoTILLING، FAO/IAEA 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 (۳۶) استفاده شد. بهره‌برداری از تنوع

نوکلئوتیدی طبیعی مسلماً 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 آراییدوپسیس توسعه داده شد و iTILLING (TILLING منحصر به فرد) 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 ۹۶ چاهکی روی محیط کشت آگار کشت می‌شوند و بافت برای جداسازی دی.ان.ا مستقیماً از گیاهان با استفاده از روش ICE-CAP برداشته می‌شود (۳۸). نام ICE-CAP نشان می‌دهد که برای گرفتن

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

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 تقریباً 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 دست‌نخورده باقی می‌مانند. دی.ان.ا جدا شده مستقیماً 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 به‌منظور 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 کوتاه‌برخوردارند و تنها گیاهانی با جهش‌هایی که قادر است در یک زمان نسبتاً 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

متداول ترین استراتژی ژنتیک معکوس به کار رود.

۳- DE-TILLING (TILLING)

حذفی، (Deletion TILLING)

در این روش از بمباران نوترون سریع به منظور ایجاد جمعیت جهش یافته استفاده می شود. نوترون های سریع نوعی از تابش انرژی بالا هستند که طیف گسترده ای از حذف و جهش های کروموزومی را در گیاهان القا می کند (۲۹). چندین منبع نوترون سریع شامل شتاب دهنده های ذرات و راکتورهای تحقیق هسته ای برای جهش زایی به طور بالقوه در دسترس هستند. نوترون های سریع تولید شده توسط شکافت هسته ای، با تابش اشعه گاما همراه هستند. اما، سهم آن قابل تنظیم است. براساس یافته های روگرز و همکاران (۲۸) برای تولید ذرات ثانویه بُرد کوتاه درون هسته سلول که شکست رشته دی.ان.ا را وساطت می کنند، انرژی نوترون باید در حدود ۵۰۰KEV تا ۵MEV باشد. جهش های DE-TILLING برای بهبود محصولات زراعی مزیت هایی دارند، از این نظر که جهش های زمینه ای

نسبتاً کمی ایجاد می کنند. جهش زایی حذفی می تواند به عنوان بهترین راه خاموشی ژن های تکرار شده پشت سر هم مطرح شود که در ژنوم گیاهان به صورت متداول قابل مشاهده است (۲۹).

نتیجه گیری نهایی

اصلاح از طریق TILLING نقش مهمی را در معرفی اولیه جهش و سپس شناسایی و استفاده از این جهش ها در بهبود محصول ایفا کرده است. روش TILLING این قابلیت را دارد که مجموعه ای از آلل های جدید را برای ژن های مورد نظر در هر گونه گیاهی فراهم نماید، این آلل های تازه شناسایی می توانند به عنوان منبع ارزشمندی در بهبود محصول مورد استفاده قرار گیرد. تعیین ژنوتیپ، بخشی از گیاه که به عنوان نمونه استفاده می شود، نوع و غلظت جهش، اندازه جمعیت مورد بررسی و روش شناسایی جهش از نکات اصلی هستند که در هنگام اجرای TILLING می بایست مد نظر قرار گیرند. در حال حاضر سیستم های متعددی از روش

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

تولید جمعیت TILLING دشوار است، کاربرد EcoTILLING می تواند بهترین راه حل باشد. در تحقیقات اخیر TILLING و تکنیک های مشابه، به منظور بهبود محصول از طریق جهش زدایی تصادفی مورد توجه قرار گرفته اند و کاربرد این روش های امیدوار کننده نظر به حجم انبوه داده های حاصل از توالی ژنومی برای گونه های زراعی از طریق NGS و نرم افزار بسیار پیشرفته، رو به افزایش خواهد بود. استفاده از روش هایی تحت عنوان SEQUETILLING/SEQUEECOTILLING به جای روش های سنتی TILLING/EcoTILLING مبتنی بر CELI در برخی از جمعیت های بزرگ TILLING در آینده نزدیک می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

TILLING برای گیاهان مدل و زراعی گزارش شده است که با استفاده از آن ها، جهش های مطلوب شناسایی شده و در برنامه های اصلاحی مورد استفاده قرار گرفته اند. TILLING روش ژنتیک معکوسی است که می تواند به طور دقیق جهش هایی را در صفات مشخص که نمی توانند به راحتی با استفاده از ژنتیک مستقیم مورد هدف قرار گیرند، ایجاد نماید. به طور کلی، TILLING به دلیل این که می تواند به طور 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 ویژه ای برخوردار شده است و طی سال های اخیر به طور موفقیت آمیزی در گیاهان متعددی مورد استفاده قرار گرفته است. در گونه هایی با تکثیر رویشی و یا با زمان تولید نسل طولانی که امکان

References

فهرست منابع

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.

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

"کوهی و رحیمی، الفاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

- 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

- 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.

"کوهی و رحیمی، القاء جهش از طریق TILLING، روشی مناسب جهت بهبود محصولات زراعی"

Mutation Induction through TILLING: an Appropriate Method to Crop Improvement

Mehrana Koochi Dehkordi^{1*} and Manijeh Rahimi²

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

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

m.koochi@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 silencing 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 TILLING 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.