مجله ایمنی زیستی
دوره ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶

کاربرد، جایگزینی و ایمنی زیستی نشانگرها در گیاهان تراریخته

مسعود توحیدفر*، محسن حسینی
***دانشیار دانشکده فناوری‌های نوین، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران**
دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی انرژی و فناوری‌های نوین، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

mh.hosseini68@yahoo.com

چکیده

سیستم نشانگرهای قابل انتخاب، به‌منظور دستیابی به نرخ بالایی از گیاهان تراریخته ضروری می‌باشد. این سیستم امکان انتخاب و شناسایی ساده گیاهانی که ژن‌های نشانگر و مورد نظر در آن به طور پایدر ادغام شده را فراهم می‌کند. از زمان ایجاد اولین نسل گیاهان تراریخته، ژن‌های کد کننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و علف‌کش‌ها برای انتخاب و شناسایی سریع سلول‌های ترانسفورم شده، مورد استفاده قرار گرفته‌اند. در بیشتر موارد، پس از باززایی گیاه تراریخته، دیگر نیازی به وجود ژن نشانگر در ژنوم گیاهی نیست و اگرچه تاکنون هیچ اثر مخرب ایمنی زیستی برای ژن‌های نشانگر گزارش نشده است، اما دوام و پایداری ژن نشانگر در ژنوم گیاهی باعث نگرانی‌های عمومی شده است. ژن‌های نشانگر را می‌توان با ژن‌های گزارشگر جایگزین کرد. فعالیت پروتئین‌های حاصل از ژن‌های گزارشگر به سادگی قابل تشخیص بوده و به‌صورت چشمی امکان تشخیص گیاهان تراریخته را فراهم می‌کند. علاوه بر جایگزینی ژن‌های نشانگر با ژن‌های گزارشگر، با استفاده از روش‌های دیگری مانند ترانسفورماسیون همراه، نوترکیبی جایگاه خاص FLP/FRT، Cre/lox، R/RS و عدم استفاده از نشانگر در تولید گیاهان تراریخته، می‌توان اقدام به حذف ژن‌های نشانگر کرد. در این مقاله مروری نشانگرهای قابل انتخاب که جهت تولید گیاهان تراریخته بیشترین استفاده را داشته‌اند، جایگزینی، روش‌های حذف و ایمنی زیستی آن‌ها ارایه می‌شود.

کلمات کلیدی: نشانگرهای قابل انتخاب، تراریخته، ایمنی زیستی، گزارشگر، ترانسفورماسیون

مقدمه

تمام سیستم‌های ترانسفورماسیون گیاهان، نیازمند فرآیندهای جداگانه جهت انتقال ژن به داخل سلول‌های گیاهی، انتخاب سلول‌های ترانسفورم شده و در نهایت باززایی گیاه کامل از سلول‌های ترانسفورم شده است. ژن نشانگرهای قابل انتخاب (Selectable marker) به پژوهشگران این امکان را می‌دهند که سلول‌های که DNA خارجی در آن‌ها بیان شده را انتخاب و جدا کنند. به این دلیل نقش اساسی در توسعه تکنولوژی ترانسفورماسیون گیاهی داشته است. سیستم ژن نشانگرهای قابل انتخاب، برای توسعه گیاهان تراریخته بسیار حیاتی است و از زمان تولید اولین گیاهان تراریخته در اوایل دهه‌ی ۱۹۸۰ تا زمان تجاری شده این گیاهان، سیستم نشانگرهای قابل

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

انتخاب یک عضو جدایی‌ناپذیر سیستم‌های اصلاح ژنتیکی گیاهان بوده است. این سیستم امکان انتخاب و شناسایی مستقیم گیاهانی که ژن مورد نظر به آن منتقل شده است را فراهم می‌کند (۲۵ و ۳۳). روش‌های ترانسفورماسیون گیاهی که تاکنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند، دارای الگو و راندمان بسیار متغیر بوده و الگوهای بیان متفاوتی از ژن مورد نظر را نشان داده‌اند. بنابراین از میان تعداد بسیار زیاد ایونت‌های غیر مستقل (Independent event)، ایونت‌های داری پروفایل بیانی مناسب باید شناسایی و انتخاب شوند (٤). در حدود ۵۰ ژن نشانگر از نظر کارآیی و ایمنی زیستی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند و برای انتقال ژن به هسته و پلاستید در برنامه‌های پژوهشی و توسعه محصولات کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۵). ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک و علف‌کش، نشانگرهای مرسومی هستند که به طور موثری برای تولید گیاهان تراریخته از آن‌ها استفاده شده است. این ژن‌ها در گیاهان تراریخته و غذای حاصل از آن‌ها از نظر ایمنی زیستی به دقت مورد بررسی قرار گرفته و تاکنون شواهدی مبنی بر اثرات سوء آن‌ها برای انسان، حیوان و محیط زیست گزارش نشده است. با این وجود نگرانی‌های کلی در ارتباط با وجود آن‌ها در گیاهان تراریخته و ایمنی آن‌ها وجود دارد، از این رو جایگزین‌ها و روش‌های مختلف حذف ژن مارکر گسترش پیدا کرده است (۳٤ و ٤۲).

نشانگرهای قابل انتخاب

ژن نشانگرهای قابل انتخاب بر اساس این‌که آیا باعث اعطای انتخاب مثبت یا منفی می‌شوند و یا این‌که آیا انتخاب مشروط به وجود یک ماده خارجی باشد، به چندین دسته تقسیم‌بندی می‌شوند. ژن‌های نشانگر قابل انتخاب مثبت (Positive selectable marker genes) تنها اجازه رشد به بافت‌های ترانسفورم شده را می‌دهد، در حالی که ژن‌های نشانگر قابل انتخاب منفی (Negative selectable marker genes) باعث مرگ تنها بافت‌های ترانسفورم شده می‌شوند (۳۷). سیستم انتخاب مثبت به دو دسته سیستم انتخاب مثبت مشروط و غیرمشروط (Conditional and non-conditional) تقسیم‌بندی می‌شود. سیستم انتخاب مثبت مشروط، شامل ژن‌های کد کننده پروتئین هستند. این پروتئین‌ها معمولا آنزیم‌های هستند که باعث اعطای مقاومت به یک سوبسترات خاص می‌شوند، برای سلول‌های گیاهی ترانسفورم نشده سمی بوده یا باعث تسهیل رشد بافت‌های ترانسفورم شده می‌شود. این سیستم شامل آنتی‌بیوتیک‌ها (جدول۱)، علف‌کش‌ها (جدول۲)، داروهای سمی و غیرسمی، آنالوگ متابولیت و منابع کربن است. سیستم انتخاب غیرشرطی مثبت، مستلزم وجود سوبسترای خارجی نیست، ولی رشد و تمایز انتخابی سلول‌های ترانسفورم شده را ارتقاء می‌بخشد (۲۵). تقریبا تمامی ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها که در تولید گیاهان ترانسژن استفاده شده است، منشاء باکتریایی دارند. بیشتر متون علمی منتشر شده مرتبط با تولید گیاهان تراریخته، نشان دهنده استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها (کانامایسین و هیگرومایسین) و علف‌کش‌ها به عنوان نشانگرهای قابل انتخاب بوده است (۱۱ و ۳۷).

بیشتر گیاهان تراریخته تولید شده حاوی ژن‌های نشانگر قابل انتخاب *nptII*، *hpt* و *bar* هستند که تا سال ۲۰۰٤ در حدود ۹۵ درصد از گیاهان تراریخته تولید شده، حاوی یکی از این ژن‌ها بوده‌اند. علاوه بر

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

این، ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک (ژن‌های *nptII*، *hpt* و *bar*)، دیگر ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک ممکن است در بعضی از گیاهان تراریخته جهت انتخاب باکتری‌های حاوی ژن مورد نظر، قبل از انتقال به داخل سلول‌های گیاهی استفاده شود و از آن‌جایی که حاوی المنت‌های باکتریایی هستند، در سلول‌های گیاهی بیان نمی‌شوند (۲٤، ۲۷، ۲۹ و ۳۳). در ادامه سه ژن *nptII*، *hpt* و *bar* که بیشترین کاربرد را در مهندسی ژنتیک داشته‌اند، به طور مفصل‌تری توضیح داده می‌شود.

جدول۱- آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده به عنوان عامل انتخاب در ترانسفورماسیون گیاهان (۳۷)

عامل انتخاب	ژن	آنزیم	منبع
Neomycin, Kanamycin	*neo nptII*	Neomycin	*Escherichia coli* Tn5
Kanamycin	*(aphA2), Atwbc19*	Phosphotransferases ATP-binding cassette	*Escherichia coli* Tn601 *Arabidopsis thaliana*
Paramomycin, G418 Aminoglycosides (kanamycin, neomycin, geneticin, paramomycin, gentamycin, tobramycin, apramycin)	*nptI, (aphA1) aaC3*	Aminoglycoside-N-acetyltransferase	*Serratia marcesens*
Spectinomycin	*aaC4 gat aadA*	Aminoglycoside-3´´ Adenyl transferase	*Klebsiella pneumoniae Shigella sp. Shigella sp*
Streptomycin	*SPT*	Streptomycin phosphotransferase	Tn5
Hygromycin B	*hph, (aphlV)*	Hygromycin phosphotransferase	*Escherichia coli*
Bleomycin Phleomycin	*Ble*	Bleomycin resistance	*Escherichia coli* Tn5 *Streptoalloteichus hindustanus*
Sulphonamides	*sulI*	Dihydropteroate synthas	*Escherichia colipR46*
Streptothricin	*Sat3*	Acetyl transferase	*Streptomyces sp.*
Chloramphenicol	*cat*	Chloramphenicol acetyl transferase	*Escherichia coli Tn5*, Phage p1cm

جدول۲- علف‌کش‌های مورد استفاده به عنوان عامل انتخاب در ترانسفورماسیون گیاهان (۳۷

عامل انتخاب	ژن	آنزیم	منبع
Phosphinothricin	*pat, bar*	Phosphinothricin acetyl transferase	*Streptomyces hygroscopicus*
Methionine sulfoximine	*pat, bar*	Phosphinothricin acetyl transferase	*Streptomyces hygroscopicus*
Glyphosate	*EPSP* synthase *aro*A Cp4 epsps *gox*	Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase Glyphosate oxidoreductase	*Petunia hybrida* *Zea mays* *Salmonella typhimurium* *Escherichia coli* *Agrobacterium tumefaciens* *Ochrobactrum anthropi*
Sulfonylueras	*Csr1-1*	Acetolactate synthase	*Arabidopsis thaliana*
Imidazolinones	*Csr2-1*	Acetolactate synthase	*Arabidopsis thaliana*
Oxynils	*bnx*	Bromoxynil nitrilase	*Klebsiella pneumonia sub sp.Ozanaenae*
Gabaculine	*hemL*	Glutamate-1- semialdehyde aminotransferase	*Synechococcus PCC6301*
Cyanamide	*cah*	Cyanamide hydratase	*Myrothecium verrucaria*
Acetochlor, chlorpropham amiprophos-methyl, chlorsulfuon, norflurazon and pendimethalin	*P450*	Cytochrome P450	*Human*
Norflurazon and fluridone	*pds*	Phytoene desaturase	*Hydrilla verticillata*
Trifluralin	*TUAm*	α-Tubulin	*Eleusine indica*
Butafenacil		Protoporphyrinogen oxidase	*Myxococcus xanthus*

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

نئومایسین فسفوتراسفراز (Neomycin phosphotransferase)

نتایج نشان داده که آنزیم گلیکوزید ۳-فسفوترانسفراز۲ (Aminoglycoside 3' phosphotransferase II) (APH II, E.C 2.7.1.95 [3´]) که با نام نئومایسین فسفوتراسفراز۲ نیز شناخته می‌شود، می‌توان از آن به‌صورت موثری در سلول‌های پستاندارن و مخمر به‌عنوان نشانگر قابل انتخاب استفاده کرد (۲٤). از این‌رو این نشانگر اولین نشانگری بود که در سلول‌های گیاهی از آن بهره گرفته شد. آنزیم گلیکوزید ۳-فسفوترانسفرازII توسط ژن *nptII* که از باکتری *E.coli* استرین K12 مشتق شده است، کد می‌شود (۲). این آنزیم فسفریلاسیون وابسته به ATP گروه ۳-هیدروکسیل برخی از آمینوگلیکوزیدها مانند نئومایسین، کانامایسن، جنتامایسین (G418) و پارامایسین را کاتالیز کرده و باعث غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی مانند کانامایسن و نئومایسین می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی فعال، با اتصال به زیرواحد 30S ریبوزوم و جلوگیری از تشکیل کمپلکس شروع باعث مهار سنتز پروتئین در سلول‌های پروکاریوتی می‌شوند. بنابراین ژن *nptII* مقاومت به سطح بالایی از این آنتی‌بیوتیک‌ها را در سلول‌های ترانسفورم شده القا می‌کند (۲٤، ۲۹ و ۳۷). تنظیم بیان ژن *nptII* به‌منظور تغییر شرایط انتخاب به روش‌های مختلفی قابل تغییر است. افزایش رونویسی این ژن توسط پروموتورهای قوی مانند پروموتر 35S ویروس موزایک گل کلم و یا پروموتر 35S ارتقاء یافته (Enhanced 35S promoter) امکان‌پذیر است. افزایش بیان این ژن باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم NPTII و افزایش تحمل به سطح بالای آنتی‌بیوتیک کانامایسن می‌شود. در ساختار برخی از سازه‌های نشانگرهای انتخابی، جهت کاهش بیان از یک ژن *nptII* که در ناحیه کد کننده خود دارای یک موتاسیون است، استفاده می‌کنند، این موتاسیون باعث کاهش بیان این ژن می‌شود (۲٤).

هیگرومایسین فسفوترانسفراز

آنزیم هیگرومایسین فسفوترانسفراز (HPT) توسط ژن *hpt* (*aph* IV) که از باکتری *E.Coli* W677 منشاء گرفته است، کد می‌شود. دو ژن اصلی کد کننده این پروتئین یکی از *Streptomyces hygroscopicus* و دیگری از *E.Coli* و *Klebsiella pneumonia* مشتق شده است. آنزیم HPT (E.C. 2.7.1.119) باعث ایجاد مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین B در سلول‌های باکتریایی، قارچ، حیوان و گیاهی می‌شود (۳۳). هیگرومایسین B یک آنتی‌بیوتیک آمینوسیکلیتول (Aminocyclitol)، بازدارنده سنتز پروتئین در طیف وسیعی از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها است. این آنتی‌بیوتیک در یوکاریوت‌ها جایگاه اتصال به ریبوزوم را اشغال کرده و در پروکاریوت‌ها از اتصال فاکتور طویل کننده۲ به ریبوزوم جلوگیری کرده و در طویل‌سازی و سنتز زنجیره پلی‌پپتید اختلال ایجاد می‌کند. در اثر فعالیت مهارکنندگی این آنتی‌بیوتیک علایم مشابه با علایم ایجاد شده توسط دیگر آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی ایجاد می‌شود. این آنتی‌بیوتیک برای سلول‌های گیاهی بسیار سمی است و اثر مهارکنندگی خود را بر میتوکندری و کلروپلاست، با اختلال در سنتز پروتئین اعمال می‌کند. این اندامک‌ها دارای ریبوزوم‌های مشابه ریبوزوم‌های باکتریایی هستند، بنابراین نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی حساس هستند (۳۷). در حضور این آنتی‌بیوتیک‌ها بافت‌های گیاهی علایمی مانند کلروزیز را به دلیل اختلال در سنتز کلروفیل و مهار سنتز پروتئین از خود نشان می‌دهند. آنزیم هیگرومایسین فسفوترانسفراز (HPT)، با فعالیت فسفریلاسیون وابسته به ATP در گروه‌های ۷-هیدروکسیل، باعث سمیت‌زدایی اثر آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین B می‌شود. این آنزیم به عنوان یک نشانگر قابل انتخاب در طیف وسیعی از گیاهان تک لپه‌ای و دو لپه‌ای بعد از نشانگر *nptII* موثر بوده است (۲۵).

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

فسفینوتریسین N– استیل‌ترانسفراز (Phosphinothricin N-acetyltransferase)

از سال ۱۹۸۷ از ژن‌های *bar* که از *Streptomyces hygroscopicus* و *pat* که از *Streptomyces viridochromogenes* مشتق شده‌اند و باعث ایجاد مقاومت به علف‌کش‌های بیالافوس می‌شوند، به‌عنوان نشانگرهای قابل انتخاب در تولید گیاهان ترانسژن استفاده شده است. این ژن‌ها آنزیم فسفینوتریسین N– استیل ترانسفراز (PAT) را کد می‌کنند و در ۸۷ درصد از توالی نوکلئوتیدی مشابه یکدیگر هستند (۲۵). این آنزیم از استیل CoA به‌عنوان کوفاکتور برای استیلاسیون گروه آزاد آمینواسید در فسفینوتریسن (PPT: گلوفوسینات آمونیوم) استفاده می‌کند. PPT جزء فعال طیف وسیعی از علف‌کش‌های تجاری است که باعث مهار آنزیم گلوتامین سینتاز (GS) که یکی از آنزیم‌های کلیدی مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه است، می‌شود. GS تنها آنزیم موجود در گیاهان است که باعث آسیمیلاسیون آمونیوم به گلوتامیک اسید می‌شود. مهارآنزیم GS باعث تجمع آمونیوم سمی در سلول می‌شود و متعاقب آن کلروپلاست تخریب شده و فتوسنتز مهار می‌شود، که نهایتا منجر به مرگ سلول‌های گیاهی می‌شود. آنزیم PAT با استیله کردن PPT مانع اتصال و مهار آنزیم GS می‌شود. از ژن‌های *bar* و *pat* که تحت هدایت پروموترهای گیاهی قرار گرفته بودند، به‌عنوان نشانگرهای قابل انتخاب در تولید گیاهان تراریخته *Brassica napus* و *Brassica oleracea* استفاده کرده‌اند (۳۳ و ۳۷).

روش‌های جایگزین نشانگرهای انتخابی

استفاده از ژن‌های گزارشگر (Reporter gene)

ژن‌های گزارشگر، جزء نشانگرهای گیاهی هستند که باعث کد شدن پروتئین‌های می‌شود که فعالیت این پروتئین‌ها به سادگی قابل تشخیص بوده و به‌صورت چشمی امکان تشخیص گیاهان تراریخته را فراهم می‌کنند (۹). از این ژن‌ها به‌صورت گسترده در مطالعات بیولوژی سلولی استفاده شده و جهت بهبود کارآیی بازیابی گیاهان تراریخته می‌تواند بکار گرفته شود. استفاده از ژن‌های گزارشگر در مواردی که امکان رشد سلول‌های ترانسفورم نشده در مجاورت سلول‌های ترانسفورم شده وجود دارد، بسیار سودمند است و امکان گزینش بافت‌های ترانسفورم شده را بدون استفاده از ژن‌های نشانگر فراهم می‌کند. ژن‌های گزارشگر بسته به نوع ژن و تکنیکی که جهت تشخیص آن‌ها بکار گرفته می‌شود، می‌توانند ضروری (فنوتیپ حاصل از این ژن‌ها در سلول‌های زنده قابل رویت است)، غیرضروری (رویت اثر این ژن‌ها مستلزم کشته شدن سلول است)، مشروط (نیازمند یک سوبسترای خارجی) و غیرمشروط باشد (٤). حساسیت ژن‌های گزارشگر به رنگدانه‌های گیاهی، مولکول‌های فلئوروسنت، آنزیم‌های داخلی که ممکن است با پروتئین‌های گزارشگر رقابت کنند، و انتشار نور از واکنش‌های درونی وابسته است و انتخاب آن‌ها به شدت به‌میزان حساسیت حاصل از گونه میزبان و شرایط آزمایشی وابسته است. برخی از ژن‌های نشانگرهای قابل انتخاب مانند *cat*، *nptII* و *lacZ* نیز می‌توانند به عنوان ژن گزارشگر ایفای نقش کنند، ولی با ژن‌های گزارشگری که حساس‌تر و سنجش آن‌ها

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

راحت‌تر بوده، جایگزین شدند. در جدول۳ ژن‌های گزارشگری که در گیاهان استفاده شده آورده شده است (۳٤) و در ادامه ژن‌های گزارشگر که برای تولید گیاهان ترانسژن بیشترین کاربرد را داشته‌اند، به طور مفصل‌تری معرفی می‌شوند.

جدول۳- ژن‌های گزارشگر مورد استفاده در ترانسفورماسیون گیاهان (۳۴)

ژن	منبع	غربال‌گری	سوبسترات
aadA^{au} and *bar*^{au}	*E. coli, Streptomyces Viridochromogenes*	Aurea phenotype of leaves	None
ALS	*A. thaliana* Rice	Colorimetric reaction (pink color) in the presence of ALS-inhibiting	Creatine + 1-Naphthol
β-glucuronidas	Rat	Histochemical reaction Blue precipitate	X-Gluc
CHS	Petunia	Disappearance of anthocyanin	None
C1 + Bp	Maize	Anthocyanin pigmentation	None
elila+Rosea$D$	Snapdragon	Disappearance of anthocyanin pigmentation	None
GFP and derivatives (*YFP, BFP, CFP*)	*Aequorea victoria*	Fluorescence	None
GusA (*uidA*)	*E. coli*	Histochemical reaction - Blue precipitate	X-gluc, MUG
HaloTag	Procariotic	Fluorescence	Different fluorophores
LacZ	*E. coli*	Histochemical reaction - Blue precipitate	X-Gal
Lc1	Maize	Anthocyanin pigmentation	None
licB	*Clostridium thermocellum*	Detection of reducing sugars	Lichenan
LUC	*Photynus pyralis (ffLUC)*	Histochemical reaction - light emission	Luciferin
uxA, B, FL	*Vibrio harveyi*	Histochemical reaction - light emission	Decanal
Mutant plastid genes *rpoA, petA, ycf3*	Tobacco	Recovery of photoautotrophy	Requires rpoA, petA, ycf3 deficient genotype
MYBA1	Grape	Anthocyanin pigmentation	None
MYB1	Sweet potato	Anthocyanin pigmentation	None
MYB10	Apple	Anthocyanin pigmentation	None
nanH	*Clostridium perfringens*	Histochemical reaction - Blue precipitate	X-NeuNAc
oph	*Pseudomonas diminuta*	Fluorescence	Coumaphos, Coroxon, Haloxon
OxO	Bread wheat	Histochemical reaction - Blue-purple precipitate	4-chloro-1-naphtol
pmi	*E. coli*	in vitropH indicator color shift	Mannose+chlorophenol red
RFP and related Fluorescent proteins	*Anemonia sulcata, Anemonia majano, Discosomasp, Heteractis crispa, Zoanthussp*	Red to green fluorescence	None
xynA	*Neocallimastix patriciarum*	Colorimetric reaction (blue color)	Azurine-crosslinked xylan

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

پروتئین فلورسنت سبز (GFP: Green fluorescent protein)

پروتئین فلورسنت سبز از عروس دریایی *Aequorea Victoria* مشتق شده و به‌خوبی ساختار و خصوصیات آن مشخص شده است. این پروتئین توسط ژن *gfp* کد شده و نور سبز را در شریط فلورسنت از خود ساطع می‌کند. GFP توانایی بالایی در تبدیل نور آبی و UV به نور سبز (۵۷۰ نانومتر) دارد، بنابراین به راحتی می‌توان GFP فلورسنس را با تابش نور روشن ماوراء بنفش بر روی برگ گیاهان تراریخته در یک محیط تاریک مشاهده کرد. GFP به هیچ کوفاکتور و یا پیش ماده‌ای جهت فلورسنس نیاز ندارد و بیان موقت و پایدار آن در ارگان‌های گیاهی و گیاه کامل به سادگی قابل رویت است (۳۶). سنجش این پروتئین غیرتخریبی بوده و روش سنجش آن بسیار ساده و ارزان قیمت است، بنابراین از این پروتئین برای تایید انتقال ژن مورد نظر در پروسه انتقال ژن و مانیتور کردن جریان ژنی در آزمایش‌های مزرعه‌ای استفاده شده است. ژن *gfp* را می‌توان به ژن مورد نظر متصل و یا ادغام کرد و در ترانسفورماسیون هسته و کلروپلاست از آن استفاده کرد. حضور فلورسنس سبز، تایید کننده وجود و بیان ژن مورد نظر است. این نتایج در انتقال ژن مورد نظر همراه با *gfp* به برنج و *Hevea brasiliensis* تایید شده است (۱۵ و ۳۵). در طول چند سال گذشته، چندین ژن دیگر کد کننده پروتئین فلورسنت شناسایی شده است که در میان آن‌ها پروتئین فلورسنت زرد (YFP: Yellow fluorescent protein) که از یک نوع مرجان صخره‌ای مشتق شده است، دارای بلوغ زودرس، پایداری و بیان بهتر در اندامک‌ها بوده و رنگ زرد را از خود ساطع می‌کند (٤).

بتا گالاکتوزیداز (β-Galactosidase)

یکی دیگر از ژن‌های گزارشگر که به‌طور گسترده‌ای در مهندسی ژنتیک جهت تایید انتقال ژن به داخل سلول‌های گیاهی و کلون کردن ژن در باکتری‌ها از آن استفاده می‌شود، ژن باکتریایی *lacZ* است (٤ و ٣٤) که آنزیم بتاگالاکتوزیداز (E.C.3.2.1.23) را کد می‌کند. این ژن به‌طور موثری در بسیاری از سیستم‌های سلولی به‌خاطر سنجش ساده و امکان اتصال پروتئین مربوط به ژن‌های مختلف به N- ترمینال پروتئین حاصل از آن، به‌کار گرفته می‌شود. اگرچه بسیاری از گیاهان دارای فعالیت آنزیم بتاگالاکتوزیداز هستند، اما آزمایش‌های انجام شده در تنباکو و آفتاب‌گردان نشان داد که فعالیت این آنزیم خارجی با سوبسترات سنتتیک *O*- نیترو فنیل β-D-گالاکتو پیرانوزید (O-nitro-phenyl-β-D-galacto pyranoside) قابل سنجش بوده و در بافت‌های که این ژن را در خود بیان می‌کنند، فعالیت این آنزیم در حضور پیش‌ماده ٥-برومو-٤-کلرو-٣-ایندول-β-D-گالاکتوزیل‌پیرانوزید (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D- galactosyl pyranoside) (X-gal) باعث ایجاد رنگ می‌شود. بنابراین ژن *lacZ* یک ژن گزارشگر مشروط به وجود سوبسترای خارجی است (٤، ٢٤ و ٣٤).

گلوکورونیداز (Glucuronidase)

ژن باکتریایی *uidA* (*gusA*) از *E.coli* به عنوان یک ژن گزارشگر در آزمایش‌های مهندسی ژنتیک گیاهی بسیار پرطرفدار است و در چندین گیاه تراریخته که تجاری‌سازی شده‌اند، حضور دارد. این ژن گزارشگر از اپران باکتریایی *gus* مشتق شده و آنزیم بتا-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

گالاکترونیداز (GUS) را کد می‌کند. این آنزیم شکستن طیف وسیعی از بتاگلوکورونیدها و بتاگالاکتورونیدها را کاتالیز می‌کند و امکان آنالیزهای اسپکتروفتومتریک و فلورومتریک را فراهم می‌کند (٤). GUS مشتق شده از *Bacillus sp.* و *Staphylococcus sp.* از نظر کدون بهینه شده و در گیاهان از آن‌ها بهره گرفته می‌شود. پیش‌ماده‌های مورد استفاده در این سیستم گزارشگر ٤–متیل آمبلی‌فریل بتا–D–گلوکورونید (MUT: methyl umbelliferyl β-D-glucuronide) و ٤–کلرو۳–ایندولیل بتا–D–گلوکورونید (X-gluc: 4-chloro-3-indolylβ-D-glucuronide) هستند، بنابراین یک گزارشگر مشروط به وجود سوبسترای خارجی است (٣٤). فعالیت این آنزیم در شرایط غیرمخرب بر اساس سنجش فلوروسنس ٤–متیل آمبلی‌فرون (4-Methyltryptophan) نیز می‌تواند اندازه‌گیری شود که برای سنجش پایداری بیان ژن در ریزازدیادی درخت کائوچو از آن بهره گرفته شده است (١٩).

لوسیفراز (Luciferases)

به‌طور کلی تمام پروتئین‌های که دارای فعالیت بیولومینسانس هستند، لوسیفراز نامیده می‌شوند و به سوبسترای آن‌ها لوسیفرین می‌گویند، در حالی‌که ماهیت و سوبسترای همه‌ی آن‌ها متفاوت است. لوسیفراز مشتق شده از کرم شب‌تاب (ff-LUC) *Photynus pyralis* بیشتر در گیاهان استفاده می‌شود، اما لوسیفراز *Pyrophorus plagiophthalamus* (CBLUS)، *Vibrio harveyi* (lux) و مرجان (RLUC) *Renilla* نیز در گیاهان از آن‌ها استفاده می‌شود. ژن *ff-LUC* آنزیم لوسیفراز کرم شب‌تاب را که فعالیت دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو وابسته به ATP را در حضور اکسیژن کاتالیز می‌کند، کد می‌کند. ناحیه کدکننده این ژن جهت بیان در سلول‌های گیاهی بهینه شده و از این ژن بهینه شده در برنج و دیگر گونه‌های گیاهی استفاده شده است (٩ و ٣٤). ژن کد کننده آنزیم لوسیفراز (LUS, E.C. 1.13.12.7) نسبت به دیگر گزارشگرها قابلیت دقیق‌تری در مانیتور کردن الگوی بیان ژن در زمان واقعی را دارد و امکان مشاهده مداوم بیان ژن در طول رشد و توسعه گیاهان را امکان‌پذیر می‌کند، به گونه‌ای که بعد از اتمام واکنش دکربوکسیلاسیون اکسیداتیو، آنزیم لوسیفراز غیرفعال می‌شود و تا زمانی که اکسی‌لوسیفراز از کمپلکس آنزیمی رها نشود، آنزیم همچنان غیرفعال باقی می‌ماند. این پروسه به آهستگی انجام می‌شود و از آن‌جایی که نیمه عمر آنزیم LUS بسیار کوتاه است، پس میزان فعالیت این آنزیم، نشان دهنده میزان رونویسی است (٩ و ٣٤).

حذف نشانگرهای قابل انتخاب و تولید گیاهان تراریخته عاری از نشانگر (Marker-free transgenic plants)

اگرچه ایمنی استفاده از بسیاری از نشانگرها از نظر علمی تایید شده، اما حذف نشانگرها به‌منظور تجاری‌سازی گیاهان تراریخته، فرآیندهای نظارتی را ساده‌تر کرده و میزان اعتماد و پذیرش مصرف کنندگان را بهبود می‌بخشد (١٠). بیان پایدار ژن‌های نشانگر ممکن است در فرآیندهای عادی مربوط به رشد و توسعه محصول نهایی اختلال ایجاد کند. انتقال چندین ژن با نشانگرهای مختلف، منجر به دوبرابر شدن پروموتورها و سیگنال‌های پلی‌آدنیلاسیونی

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

می‌شود که ممکن است باعث خاموشی ناخواسته ژن شود، و در مواردی که بیان ژن تحت کنترل دقیق نباشد، حذف ژن نشانگر ضروری به نظر می‌رسد. از طرف دیگر جهت تغییر چندین صفت در یک لاین، نیازمند فرآیندهای جداگانه ترانسفورماسیون و نشانگرهای جدید در هر فرآیند هستیم. تعداد ژن‌های نشانگرهای قابل انتخاب مناسب هر گونه (بخصوص گونه‌های که به محیط کشت سخت پاسخ می‌دهند)، معمولا محدود بوده و در این‌جا لزوم حذف ژن‌های نشانگر پررنگ‌تر می‌شود. در این موارد حذف ژن‌های نشانگر بعد از هر فرآیند ترانسفورماسیون، امکان استفاده مجدد از همان نشانگر را فراهم می‌کند. بنابراین حذف ژن‌های نشانگر، نه تنها برخی از نگرانی‌های ایمنی زیستی را برطرف کرده، بلکه موانع فنی ترانسفورماسیون گیاهی را نیز برطرف می‌کند. حذف نشانگر گیاهان تراریخته را می‌توان از طریق نوترکیبی جایگاه خاص FLP/FRT، ترانسفورماسیون همراه (Co-transformation)، ترانسفورماسیون چندگانه خودکار (Multi-auto-transformation)، نوترکیبی جایگاه خاص Cre/lox و وکتور دوگانه بدون نشانگر (Marker-free binary vector) انجام داد. در بین این روش‌ها، ترانسفورماسیون همراه، ساده‌تر و دارای کارآیی بیشتری بوده و به‌طور موفقیت آمیزی در تولید گیاهان تراریخته از آن استفاده شده است (۱۳، ۳۸ و ٤٠).

ترانسفورماسیون همراه

سیستم ترانسفورماسیون همراه یک روش ساده حذف ژن نشانگر از ژنوم هسته است که ترانسفورماسیون با دو پلاسمید و با هدف قرار دادن در دو جایگاه مختلف در ژنوم گیاهی انجام می‌گیرد. یکی از پلاسمیدها ژن مربوط به نشانگر و دیگری ژن مورد نظر را حمل می‌کند. سه روش مختلف در سیستم ترانسفورماسیون همراه مورد استفاده قرار می‌گیرد. (i) دو وکتور متفاوت با دو سویه مختلف آگروباکتریوم حمل می‌شوند، (ii) دو وکتور مختلف توسط یک سویه آگروباکتریوم حمل می‌شود و (iii) دو T-DNA توسط یک وکتور دوگانه حمل می‌شود. در این روش‌های سیستم ترانسفورماسیون همراه، ژن نشانگر قابل انتخاب و ژن مورد نظر بین دو لبه یکسان از T-DNA قرار داده نمی‌شوند و در عوض در دو T-DNA مختلف قرار داده می‌شوند و انتظار بر این است به صورت مستقل تفرق پیدا کنند. مزیت استفاده از ترانسفورماسیون همراه، سازگاری بالای انتقال ژن به واسطه‌ی آگروباکتریوم و آسان بودن کار با وکتور دوگانه است. از آن‌جایی که دو T-DNA از یکدیگر جدا هستند، T-DNA حاوی ژن مورد نظر، مستقل از T-DNA حاوی ژن نشانگر مورد دست‌ورزی قرار می‌گیرد. در زمان تفرق و نوترکیبی که در طول تولید مثل جنسی رخ می‌دهد، ژن نشانگر از ژن مورد نظر جدا می‌شود و با انتخاب تراریخته‌های مورد نظر در نتاج که فاقد ژن نشانگر هستند، می‌توان ژن نشانگر را حذف کرد. این روش حذف ژن نشانگر، وابسته به کارآیی ترانسفورماسیون همراه و ادغام مستقل T-DNA به داخل ژنوم گیاه است. به‌طور کلی کارآیی ترانسفورماسیون همراه، در حدود ۵۰-۳۰ درصد است که برای کاربردهای عملی قابل قبول است. در این روش حذف نشانگر، از تفنگ ژنی نیز می‌توان به منظور بالا بردن کارآیی ترانسفورماسیون همراه استفاده کرد. اگرچه از تفنگ ژنی برای ترانسفورماسیون همراه

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

گزارش‌های زیادی در دسترس نیست، اما به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید برنج تراریخته مقاوم به خشکی مورد استفاده قرار گرفته است (۱۰ و ۳۸).

سیستم ترانسفورماسیون همراه، یک روش مقتدر جهت حذف نشانگرهای قابل انتخاب است، اما زمانی که پیوستگی ژنتیکی شدید بین نشانگر و ژن مورد نظر وجود داشته باشد، از این روش نمی‌توان استفاده کرد و از آنجایی که مبتنی بر تولید مثل جنسی است، دامنه استفاده از آن محدود به گیاهان گل‌دار و یک ساله است. در این سیستم حتی اگر از چندین پلاسمید جهت حمل ژن نشانگر و ژن مورد نظر استفاده کنیم، امکان ادغام شدن T-DNAها در یک جایگاه از کروموزوم گیاهی وجود داشته که نهایتا منجر به پیوستگی ژنتیکی بین نشانگر و ژن مورد نظر خواهد شد. از طرف دیگر یکی از روش‌های بالا بردن فراوانی ترانسفورماسیون همراه، وجود پیوستگی ژنتیکی بین ژن نشانگر و ژن مورد نظر است که در بیشتر موارد بیان ژن نشانگر تایید کننده وجود و بیان ژن مورد نظر است. بنابراین برای رفع این محدودیت‌ها از روش‌های دیگر حذف نشانگر، مانند سیستم برش DNA در جایگاه خاص می‌توان استفاده کرد (۱۷).

نوترکیبی جایگاه خاص (Site-specific recombination)

نوترکیبی جایگاه خاص، یک نوع از نوترکیبی ژنتیکی است که بین دو جایگاه مشخص از توالی DNA که دارای همولوژی هستند، انجام می‌گیرد و آنزیم رکامبیناز فرآیند نوترکیبی را کاتالیز می‌کند. پروتئین رکامبیناز توالی‌های کوتاه پالیندروم را شناسایی و به آن متصل می‌شود و در این ناحیه DNA را برش می‌دهد. بسته به جهت‌گیری نسبی و موقعیت جایگاه‌های هدف نوترکیبی، برش و ادغام قطعات DNA اتفاق می‌افتد (٤). سه سیستم نوترکیبی جایگاه خاص که شامل سیستم Cre/loxP از باکتریوفاژP، FLP/FRT از *saccharomyces cerevisiae* و R/RS از *Zygosaccharomyces rouxii* است، جهت تولید گیاهان تراریخته‌ی عاری از نشانگر مورد استفاده قرار گرفته است (۷). سیستم Cre/loxP از دو جزء تشکیلی شده است: ۱- دو جایگاه loxP که هر کدام دارای ۳٦ جفت باز (توالی پالیندروم) هستند و ژن نشانگر بین این دو توالی قرار می‌گیرد، ۲- ژن *cre* که پروتئین رکامبیناز ۳۸ کیلودالتونی را کد می‌کند. این پروتئین به‌طور اختصاصی به جایگاه loxP متصل شده و با برش در یکی از توالی‌های LoxP، نوترکیبی بین این دو توالی پالیندروم را کاتالیز می‌کند. این برش اختصاصی، ویژگی مهم این سیستم است، با برش و نوترکیبی بین دو توالی پالیندروم توسط پروتئین رکامبیناز ژن نشانگر حذف خواهد شد (۳۸). در سیستم FLP/FRT آنزیم FLP به‌طور موثری نوترکیبی بین جایگاه‌های هدف FLP یعنی توالی frt را کاتالیز کرده و ژن مارکر بین این دو توالی را حذف می‌کند. با کنترل بیان رکامبیناز FLP با پروموتورهای القایی و معین کردن جایگاه‌های frt در سازه تراریخته می‌توان پس از انتخاب سلول‌های تراریخته، اقدام به حذف ژن نشانگر کنیم. در سیستم نوترکیبی R/RS، به‌ترتیب R و RS پروتئین رکامبیناز و جایگاه نوترکیبی هستند. از این روش حذف ژن مارکر در سیستم ترانسفورماسیون خودکار چندگانه (MAT: Multi-auto-

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

transformation) استفاده می‌شود. در این سیستم MAT–وکتور حاوی ژن‌های نشانگر قابل انتخاب، مانند *ipt* که باعث کد شدن ایزوپنتیل ترانسفراز و غیرنرمال شدن مورفولوژی بافت‌های تراریخته می‌شود، هستند. این ژن نشانگر بین دو توالی RS قرار می‌گیرند. بیان ژن نشانگر *ipt* در مرحله اول باعث غیرنرمال شدن بافت‌های گیاهی می‌شود و این بافت‌های تراریخته انتخاب می‌شوند. بیان ژن R در این بافت‌های تراریخته باعث حذف ژن مارکر و تولید بافت‌های نرمال حاوی ژن مورد نظر ما می‌شود (٤، ٧ و ٣٨). از سیستم نوترکیبی جایگاه خاص و دیگر سیستم‌های حذف ژن مارکر جهت تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن‌های نشانگر به‌طور موفقیت‌آمیزی استفاده شده است و در این مقاله، پژوهش‌های انجام شده در فواصل بین سال‌های ٢٠١٢ تا ٢٠١٧ که در آن‌ها ژن نشانگر به طور موفقیت‌آمیزی از گیاهان تراریخته حذف شده، در جدول٤ آورده شده است.

جدول ۴- گیاهان تراریخته تولید شده عاری از نشانگر در فواصل بین سال‌های ۲۰۱۲ تا ۲۰۱۷ و روش حذف نشانگر از آن‌ها

منبع	گیاه	ژن نشانگر	روش حذف ژن نشانگر
(٣٢)	*Jatropha curcas*	Hygromycin phosphotransferase (*hph*)	Cre/lox site-specific recombination
(٥)	banana (*Musa Cavendish*)	Hygromycin phosphotransferase (*hph*)	Cre/lox site-specific recombination
(٢٦)	Rice (*Oryza sativa L.*)	Neomycin phosphotransferase gene (*npt*) and β-glucuronidase (*GUS*)	Heat inducible Cre/lox site-specific recombination system
(٣١)	Apricot (*Prunus armeniacaL .*)	Neomycin phosphotransferase gene (*npt*) and green fluorescent protein (*gfp*) reporter gene	Cre/lox site-specific recombination
(٣٩)	Rice (*Oryza sativa L.*)	Neomycin phosphotransferase gene (*npt*) and β-glucuronidase (*gus*)	co-transformation
(١٦)	barley (*Hordeum vulgare L.*)	Hygromycin phosphotransferase (*hph*) and β-glucuronidase (*gus*)	co-transformation
(١)	mustard (*Brassica juncea*)	Hygromycin phosphotransferase (*hph*)	Cre/lox site-specific recombination
(٨)	*Solanum melongena L.*	Isopentenylt ransferase (ipt) gene and β-glucuronidase (*gus*)	R/RS site-specific recombination system
(١٢)	Tobacco (*Nicotiana benthamiana*)	Neomycin phosphotransferase gene (*npt*) and green fluorescent protein (*gfp*) reporter gene	Cre/lox site-specific recombination
(٢٨)	Rice (*Oryza sativa L.*)	Hygromycin phosphotransferase (hph) and β-glucuronidase (*gus*)	co-transformation
(٢٣)	Wheat (*Triticum aestivum L.*)	Bar gene	Cre/lox site-specific recombination
(٣٠)	Orange (Citrus sinensis Osbeck)	Isopentenyl transferase (*ipt*)	Cre/lox site-specific recombination
(٤٢)	Rice (*Oryza sativa L.*)	Hygromycin phosphotransferase (*hph*)	FLP/*FRT*-Mediated Spontaneous Auto-Excision
(٦)	Grapevine (*Vitis vinifera L.*)	Neomycin phosphotransferase gene (*nptII*)	Lp/FRT site-specific recombination
(١٨)	Lettuce (*Lactuca sativa*)	Neomycin phosphotransferase gene (*nptII*)	co-transformation
(١٤)	Potato (*Solanum tuberosum L.*)	Neomycin phosphotransferase gene (*nptII*)	co-transformation
(١٠)	Rice (*Oryza sativa L.*)	Hygromycin phosphotransferase (*hph*)	co-transformation
(٤٠)	Wheat (*Triticum aestivum L.*)	*bar* gene and β-glucuronidase (*gus*)	co-transformation

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

ترانسفورماسیون گیاهی بدون استفاده از نشانگر

پس از بازززایی گیاه تراریخته، دیگر نیازی به وجود ژن نشانگر در ژنوم گیاهی نیست و گیاه تراریخته ممکن است در فرآیندهای بعدی ترانسفورماسیون جهت انتقال ژن‌های دیگر مورد استفاده قرار بگیرد. بنابراین وجود ژن نشانگر موجب اختلال در فرآیندهای بعدی ترانسفورماسیون می‌شود. ژن نشانگر *nptII* در گیاهان تراریخته که تجاری‌سازی شده‌اند، وجود دارد. از این گیاهان جهت تولید غذا و علوفه استفاده می‌شود و تا به حال هیچ نوع خطر احتمالی را برای سلامتی انسان، حیوانات و محیط زیست نداشته‌اند. اما به‌طور کلی اتحادیه اروپا بر به حداقل رساندن توالی‌های خارجی در محصولات تراریخته تاکید داشته و از تولید گیاهان بدون نشانگر حمایت می‌کند. از روش‌های توضیح داده شده، جهت حذف ژن نشانگر در تعداد زیادی از گیاهان استفاده شده است. اما این روش‌ها به دلیل زمان‌بر بودن و وجود مشکلات کایمریک در برخی گونه‌ها، باعث ایجاد محدودیت می‌شود. بنابران تولید مستقیم گیاه تراریخته بدون استفاده از نشانگر باعث رفع محدودیت‌ها و نگرانی‌های ایمنی زیستی می‌شود. ترانسفورماسیون با وکتور فاقد ژن نشانگر جهت تولید گیاهان تراریخته با کارآیی ۰/۷۵ تا ۱۵ درصد موفقیت‌آمیز بوده است. در این حالت بر روی تمامی گیاهانی که باززا شده‌اند، آنالیز PCR، به منظور شناسایی گیاهان ترانسفورم شده انجام می‌شود. در این روش دیگر نیازی به نسل‌های تفرق و فرآیندهای پیچده حذف نشانگر نیست (۲۲ و ٤١).

ایمنی زیستی

حضور نشانگرهای قابل انتخاب در گیاهان تراریخته باعث افزایش نگرانی‌های در خصوص خطرهای احتمالی آن‌ها برای سلامتی انسان، حیوانات و محیط زیست شده است. این نگرانی‌ها در ارتباط با **(الف)** ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک شامل ۱- انتقال توالی سمی DNA به داخل ژنوم گیاهی، ۲- انتقال افقی ژن‌های نشانگر از گیاه تراریخته به داخل میکروارگانیسم‌های خاک و روده انسان و به دنبال آن خنثی کردن اثر درمانی آنتی‌بیوتیک‌های که کاربرد درمانی دارند و ۳- تولید RNA یا پروتئین سمی با بیان ژن باکتریایی در گیاه است (۲۵ و ۳۳).

هر فرد در طول روز مقدار بسیار زیادی از DNA را همراه با رژیم غذایی مصرف می‌کند، ولی در طول تاریخ گزارشی مبنی بر سمی بودن یک قطعه از DNA برای انسان گزارش نشده است و از آن‌جایی که تمام توالی‌های DNA از نظر شیمیایی به‌طور کاملا یکسانی عمل می‌کنند، این نگرانی یک فرضیه بی‌اساس به نظر می‌رسد. DNA تمام موجودات زنده از نظر ساختاری مشابه بوده و به همین دلایل وجود ژن نشاگر در غذا و گیاهان تراریخته هیچ نوع مشکل سلامتی را برای مصرف کننده ایجاد نمی‌کند. از طرف دیگر تمامی ژن‌های نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک داری منشاء باکتریایی بوده و در طبیعت شایع هستند. انسان، گیاهان و حیوانات به‌طور مستقیم و یا از طریق رژیم غذایی، به‌طور مداوم در تماس با آن‌ها هستند. از دو ژن *nptII* و *hpt* جهت تولید گیاهان تراریخته استفاده شده است. ژن مقاومت به کانامایسن (*npt*II) از ترانسپوزون T5 باکتری *E.Coli* مشتق شده و باعث

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

غیرفعال شدن آنتی‌بیوتیک کانامایسن می‌شود. آنتی‌بیوتیک کانامایسین به‌دلیل عوارض جانبی قابل توجه آن، به‌ندرت کاربرد پزشکی داشته و توسط آنتی‌بیوتیک‌های موثرتر آمینوگلیکوزیدی که سوبسترای ژن *nptII* نیستند، جایگزین شده است. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین که جهت تولید گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد، از باکتری *E.coli* مشتق شده و هیچ نوع کاربرد پزشکی ندارد (۳).

انتقال افقی ژن از گیاه تراریخته به میکروارگانیسم‌ها

انتقال افقی ژن بین باکتری‌ها از طریق سه مکانیسم ترانس‌داکشن (Transduction)، ترانسفورماسیون و هم‌یوغی (Conjugation) انجام می‌گیرد. محتمل‌ترین مکانیسم برای انتقال ژن از گیاه تراریخته به باکتری‌های داخل خاک و روده حیوانات، ترانسفورماسیون طبیعی (Nature transformation) نامیده می‌شود که برای انجام آن موانعی وجود دارد: ۱- ژن مربوطه باید از هضم توسط نوکلئازهای داخل خاک و روده در امان بماند، ۲- باکتری‌های داخل خاک و روده باید مستعد دریافت DNA خارجی باشد، ۳- به محض عبور از این موانع DNA باید از هضم توسط آنزیم‌های محدود کننده باکتری در امان مانده و به داخل ژنوم باکتری از طریق مکانیسم تصحیح DNA یا نوترکیبی ادغام شود. با فرض عبور از همه این موانع، باید DNA خارجی تحت فشار انتخاب مثبت جهت پایدار شدن قرار بگیرد. مطالعات مختلفی جهت جستجو کردن انتقال افقی ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها از گیاهان تراریخته با باکتری‌ها انجام شده است، اما در هیچ‌کدم از این پژوهش‌ها انتقال ژن از گیاه تراریخته به باکتری رخ نداده است (٤ و ۳۳).

تعداد زیادی از پروتئین‌ها مختلف با ساختار و عملکردهای مختلف در رژیم غذایی انسان و دیگر حیوانات وجود دارد که به‌طور ایمنی در طول هزاران سال از آن‌ها استفاده کرده است. به‌طور کلی این پروتئین‌ها از طریق فرآیندهای گوارشی تخریب می‌شوند. در طبیعت تعداد بسیار کمی پروتئین سمی وجود دارد، اما این پروتئین‌ها از اجزای ترکیباب غذایی نیستند. ویژگی این پروتئین‌ها بخوبی توصیف شده است. اما پروتیئن‌های کد شده توسط نشانگرهای مولکولی که در بیوتکنولوژی از آن‌ها استفاده می‌شود، جزء این پروتئین‌های سمی نیستند (۲۰).

(ب) نگرانی‌های مرتبط با حضور ژن‌های نشانگر مقاومت به علف‌کش شامل ۱- جریان ژنی از طریق دگرگشنی و انتقال ژن‌های نشانگر به داخل علف‌های هرز و غالب شدن علف‌های هرز در منطقه، ۲- گسترش علف‌های هرز از طریق انتقال ژن نشانگر مقاومت به علف‌کش به داخل گونه‌های که با گیاه تراریخته از نظر جنسی سازگاری دارند، ۳- سمیت و حساسیت‌زایی پروتئین تولید شده توسط ژن نشانگر مقاومت به علف‌کش بر روی انسان و دیگر موجودات غیرهدف (۳).

برخی از ژن‌های نشانگر مقاومت به علف‌کش، تنها به‌عنوان عامل انتخاب جهت شناسایی سلول‌های ترانسفورم شده به‌کار می‌رود و در محصول نهایی حضور ندارد. در این موارد محصول غذایی حاصل از گیاه تراریخته، در معرض علف‌کش قرار نخواهد گرفت. بنابراین هیچ نوع نگرانی ایمنی‌زیستی مرتبط با متابولیت یا توالی پروتئین علف‌کش به‌وجود

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

نخواهد آمد. انتقال ژن از یک گونه به گونه‌های خویشاوند، تنها در مواردی که ژن انتقال یافته باعث افزایش سازگازی گیاه گیرنده شود، امکان‌پذیر خواهد بود. برای جلوگیری از جریان ژنی از گیاهان تراریخته به گونه‌های وحشی، توسعه فناوری انتقال ژن به کلروپلاست یک راه‌کار امیدبخش است. در گونه‌های که انتقال ژن به کلروپلاست محدود باشد، حذف ژن نشانگر با استفاده از روش‌های ذکر شده و یا تولید گیاه تراریخته بدون استفاده از ژن نشانگر نگرانی‌های مرتبط با جریان ژنی و انتقال ژن نشانگر مقاومت به علف‌کش را از بین می‌برد (۲٤، ۲۵ و ۳۳).

نتیجه‌گیری

دلایل زیادی برای تولید گیاهان تراریخته با مقدار بسیار کمی از DNA خارجی وجود دارد. تاثیر واریته‌های اصلاح شده از طریق روش‌های اصلاح سنتی تا حدودی نامعلوم بوده و نمونه‌های زیادی وجود دارد که نشان دهنده ایمن نبودن و مشکل‌آفرین بودن محصولات حاصل از این گیاهان است. مهندسی ژنتیک به‌عنوان بهترین ابزار برای انتقال ژن‌ها از منابع مختلف به داخل محصولات کشاورزی، جهت بهبود صفات مهم زراعی شناخته شده است. از مزایای این روش می‌توان به دقیق، سریع و سازگار بودن آن با گونه‌های گیاهی در مقایسه با اصلاح سنتی اشاره کرد. انتقال ژن از طریق مهندسی ژنتیک، نیازمند مراحل مختلفی بوده که در یکی از این مراحل سلول‌های ترانسفورم شده از میان تعداد بسیار زیاد سلول‌های ترانسفورم نشده باید شناسایی و جدا شود. ژن‌های نشانگر قابل انتخاب همراه با ژن مورد نظر به داخل سلول‌های گیاهی به‌منظور شناسایی سلول‌های که DNA در ژنوم آن‌ها ادغام شده است، فرستاده می‌شود. از اولین نسل ژن‌های نشانگر، ژن‌های *nptII*، *hpt* و *ppt* به‌طور موفقیت‌آمیزی در تولید گیاهان تراریخت که تجاری‌سازی شده‌اند، استفاده شده است. از این گیاهان به‌مدت زیادی جهت تولید غذای انسان و دام استفاده شده و هیچ نوع خطر برای سلامتی انسان، حیوان و محیط زیست نداشته است. با افزایش کشت گیاهان تراریخته که در سال ۲۰۱۰ به بیشتر از ۱ بیلیون هکتار رسید، اتحادیه اروپا جهت برطرف کردن نگرانی‌های عمومی مرتبط با حضور ژن‌های نشانگر در گیاهان تراریخته، پیشنهاد کرد که ژن‌های نشانگر از گیاهان تراریخته حذف شود. روش‌های مختلفی مانند سیستم ترانسفورماسیون همراه، نوترکیبی جایگاه خاص و ترانسفورماسیون گیاهان بدون استفاده از نشانگرها جهت حذف و تولید گیاهان تراریخته به‌طور موفقیت‌آمیزی در گونه‌های مختلف استفاده شده است.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

References فهرست منابع

1- **Bala A, Roy A, Das A, Chakraborti D, Das S. 2013.** Development of selectable marker free, insect resistant, transgenic mustard (Brassica juncea) plants using Cre/lox mediated recombination. BMC biotechnology, 13(1), p.88.

2- **Beck E, Ludwig G, Auerswald EA, Reiss B, Schaller H. 1982**. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. Gene, 19(3), pp.327-336.

3- **Bennett M, Livesey CT, Nathwani D, Reeves DS, Saunders JR, Wise R, 2004.** An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53(3), pp.418-431.

4- **Breyer D, Kopertekh L, Reheul D. 2014.** Alternatives to Antibiotic Resistance Marker Genes for In Vitro Selection of Genetically Modified Plants–Scientific Developments, Current Use, Operational Access and Biosafety Considerations. Critical reviews in plant sciences, 33(4), pp.286-330.

5- **Chong-Pérez B, Kosky RG, Reyes M, Rojas L, Ocaña B, Tejeda M, Pérez B, Angenon G. 2012**. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. Journal of biotechnology, 159(4), pp.265-273.

6- **Dalla Costa L, Piazza S, Campa M, Flachowsky H, Hanke MV, Malnoy M. 2016**. Efficient heat-shock removal of the selectable marker gene in genetically modified grapevine. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 124(3), pp.471-481.

7- **Darbani B, Eimanifar A, Stewart CN, Camargo WN. 2007.** Methods to produce marker-free transgenic plants. Biotechnology Journal, 2(1), pp.83-90.

8- **Darwish NA, Khan RS, Ntui VO, Nakamura I, Mii M. 2014**. Generation of selectable marker-free transgenic eggplant resistant to Alternaria solani using the R/RS site-specific recombination system. Plant cell reports, 33(3), pp.411-421.

9- **De Ruijter NCA, Verhees J, Van Leeuwen W, Van der Krol AR. 2003.** Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants. Plant Biology, 5(02), pp.103-115.

10- **Feng D, Wang Y, Wu J, Lu T, Zhang Z. 2017**. Development and drought tolerance assay of marker-free transgenic rice with OsAPX2 using biolistic particle-mediated co-transformation. The Crop Journal.

11- **Fraley RT, Rogers SG, Horsch RB, Sanders PR, Flick JS, Adams SP, Bittner ML, Brand LA, Fink CL, Fry JS, Galluppi GR. 1983.** Expression of bacterial genes in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences, 80(15), pp.4803-4807.

12- **García-Almodóvar RC, Petri C, Padilla IMG, Burgos L. 2014.** Combination of site-specific recombination and a conditional selective marker gene allows for the production of marker-free tobacco plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 116(2), pp.205-215.

13- **Gayen S, Mandal CC, Samanta MK, Dey A, Sen SK. 2016.** Expression of an engineered synthetic cry2Aa (D42/K63F/K64P) gene of Bacillus thuringiensis in marker free transgenic tobacco facilitated full-protection from cotton leaf worm (S. littoralis) at very low concentration. World Journal of Microbiology and Biotechnology 32(4), pp.1-12.

14- **Guo WC, Wang ZA, Luo XL, Jin X, Chang J, He J, Tu EX, Tian YC, Si HJ, Wu JH. 2016.** Development of selectable marker-free transgenic potato plants expressing cry3A against the Colorado potato beetle (Leptinotarsa decemlineata Say). Pest management science, 72(3), pp.497-504.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

15- Jung M, Shin SH, Park JM, Lee SN, Lee MY, Ryu KH, Paek KY, Harn CH. 2011. Detection of transgene in early developmental stage by GFP monitoring enhances the efficiency of genetic transformation of pepper. Plant biotechnology reports, 5(2), pp.157-167.

16- Kapusi E, Hensel G, Coronado MJ, Broeders S, Marthe C, Otto I, Kumlehn J. 2013. The elimination of a selectable marker gene in the doubled haploid progeny of co-transformed barley plants. Plant molecular biology, 81(1-2), pp.149-160.

17- Kasai Y, Harayama S. 2016. Construction of Marker-Free Transgenic Strains of Chlamydomonas reinhardtii Using a Cre/loxP-Mediated Recombinase System. PloS one, 11(8), p.e0161733.

18- Kawazu Y, Fujiyama R, Imanishi S, Fukuoka H, Yamaguchi H, Matsumoto S. 2016. Development of marker-free transgenic lettuce resistant to Mirafiori lettuce big-vein virus. Transgenic research, 25(5), pp.711-719.

19- Lardet L, Leclercq J, Bénistan E, Dessailly F, Oliver G, Martin F, Montoro P. 2011. Variation in GUS activity in vegetatively propagated Hevea brasiliensis transgenic plants. Plant cell reports, 30(10), pp.1847-1856.

20- Li Y, Peng, Y, Hallerman EM, Wu K. 2014. Biosafety management and commercial use of genetically modified crops in China. Plant cell reports, 33(4), pp.565-573.

21- Lucht JM. 2015. Public acceptance of plant biotechnology and GM crops. Viruses, 7(8), pp.4254-4281.

22- Manimaran P, Ramkumar G, Sakthivel K, Sundaram RM, Madhav MS, Balachandran SM. 2011. Suitability of non-lethal marker and marker-free systems for development of transgenic crop plants: present status and future prospects. Biotechnology advances 29(6), pp.703-714.

23- Mészáros K, Éva C, Kiss T, Bányai J, Kiss E, Téglás F, Láng L, Karsai I, Tamás L. 2015. Generating marker-free transgenic wheat using minimal gene cassette and cold-inducible Cre/Lox System. Plant Molecular Biology Reporter, 33(5), pp.1221-1231.

24- Miki B, Abdeen A, Manabe Y, MacDonald P. 2009. Selectable marker genes and unintended changes to the plant transcriptome. Plant Biotechnology Journal, 7(3), pp.211-218.

25- Miki B, McHugh S. 2004. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. Journal of Biotechnology, 107(3), pp.193-232.

26- Nandy S, Srivastava V. 2012. Marker-free site-specific gene integration in rice based on the use of two recombination systems. Plant biotechnology journal, 10(8), pp.904-912.

27- Nap JP, Bijvoet J, Stiekema WJ. 1992. Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants. Transgenic research, 1(6), pp.239-249.

28- Oliva N, Chadha-Mohanty P, Poletti S, Abrigo E, Atienza G, Torrizo L, Garcia R, Dueñas C, Poncio MA, Balindong J, Manzanilla M. 2014. Large-scale production and evaluation of marker-free indica rice IR64 expressing phytoferritin genes. Molecular Breeding, 33(1), pp.23-37.

29- Pedersen C. 2016. Prevalence of Antibiotic Resistance Marker Genes (ARMG) in Selected Environments in Norway M-675| 2016.

30- Peng A, Xu L, He Y, Lei T, Yao L, Chen S, Zou X. 2015. Efficient production of marker-free transgenic 'Tarocco'blood orange (Citrus sinensis Osbeck) with enhanced resistance to citrus canker using a Cre/loxP site-recombination system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 123(1), pp.1-13.

31- Petri C, López-Noguera S, Wang H, García-Almodóvar C, Alburquerque N, Burgos L. 2012. A chemical-inducible Cre-LoxP system allows for elimination of selection marker genes in transgenic apricot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 110(3), pp.337-346.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

32- Qu J, Mao HZ, Chen W, Gao SQ, Bai YN, Sun YW, Geng YF, Ye J. 2012. Development of marker-free transgenic Jatropha plants with increased levels of seed oleic acid. Biotechnology for biofuels, 5(1), p.10.

33- Ramessar K, Peremarti A, Gómez-Galera S, Naqvi S, Moralejo M, Munoz P, Capell T, Christou P. 2007. Biosafety and risk assessment framework for selectable marker genes in transgenic crop plants: a case of the science not supporting the politics. Transgenic research, 16(3), pp.261-280.

34- Rosellini D. 2012. Selectable markers and reporter genes: a well-furnished toolbox for plant science and genetic engineering. Critical reviews in plant sciences, 31(5), pp.401-453.

35- Saika H, Sakamoto W, Maekawa M, Toki S. 2011. Highly efficient visual selection of transgenic rice plants using green fluorescent protein or anthocyanin synthetic genes. Plant biotechnology, 28(1), pp.107-110.

36- Stewart CN, 2005. Monitoring the presence and expression of transgenes in living plants. Trends in plant science, 10(8), pp.390-396.

37- Sundar IK, Sakthivel N. 2008. Advances in selectable marker genes for plant transformation. Journal of plant physiology, 165(16), pp.1698-1716.

38- Tuteja N, Verma S, Sahoo RK, Raveendar S, Reddy IBL. 2012. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: regulation and biosafety concern. Journal of biosciences, 37(1), pp.167-197.

39- Wakasa Y, Ozawa K, Takaiwa F. 2012. Agrobacterium-mediated co-transformation of rice using two selectable marker genes derived from rice genome components. Plant cell reports, 31(11), pp.2075-2084.

40- Wang K, Liu H, Du L, Ye X. 2016. Generation of marker-free transgenic hexaploid wheat via an Agrobacterium-mediated co-transformation strategy in commercial Chinese wheat varieties. Plant Biotechnology Journal.

41- Woo HJ, Lee SB, Qin Y, Lim MH, Lee JH, Shin KS, Cho HS, Park SK. 2015. Generation and molecular characterization of marker-free Bt transgenic rice plants by selectable marker-less transformation. Plant Biotechnology Reports 9(6), pp.351-360.

42- Woo HJ, Qin Y, Park SY, Park SK, Cho YG, Shin KS, Lim MH, Cho HS. 2015. Development of selectable marker-free transgenic rice plants with enhanced seed tocopherol content through FLP/FRT-mediated spontaneous auto-excision. PloS one, 10(7), p.e 0132667.

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]

Applications, alternatives and biosafety of markers in transgenic plants

Masoud Tohidfar*, Mohssen Hosseini
*Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and New Technologies, Shahid Behesgti University, Teharn, Iran
PhD student, Department of Biotechnology, Faculty of Engineering and New Technologies, Shahid Behesgti University, Teharn, Iran

mh.hosseini68@yahoo.com

Abstract
Selectable marker (SM) systems have been considered necessary to achieve acceptable rates in the generation of Genetic Modified (GM) plants. These systems allow the relatively straightforward identification and selection of plants that have stably incorporated not only the marker genes but also genes of interest. Since the creation of the first generation of GM, genes encoding resistance to specific antibiotics and herbicide have been largely used for selection and rapid identification of transformed cells. In most cases, once transgenic plants have been regenerated, permanence of SM genes in the plant genome is no longer necessary, and it becomes a matter of public concern, although no evidence of adverse biosafety effects has been found associated with marker genes. A valuable substitute to the SM genes are the reporter genes, which encode proteins whose activity can be easily identifiable, or make it possible to easily screen GM plant. In addition to replacement of marker genes with reporter, other methods such as co-transformation, site-specific recombination of FLP / FRT, Cre / lox, R / RS and loss-marker can be used to remove marker genes from transgenic plant. In the current paper, we present a list of SM that are widely used for the production of transgenic plants, their replacement, elimination strategies and biosafety are presented.
Keywords: Selectable marker**,** Genetic Modified**,** Biosafety**,** Reporter**,** Transformation

[Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2024-11-23]

[DOR: 20.1001.1.27170632.1396.10.3.7.0]