

کاربرد روش‌های زیست‌فناوری در بهنژادی و تولید رقم‌های بوم سازگار^۱

مصطفی ولیزاده^۲ و رضا حیدری چابلقی^۳

چکیده

تولید غذای کافی و سالم همواره یکی از دشواری‌های مهم در هر کشوری به شمار می‌آید. پیشرفت‌های سده گذشته و کنونی در زیست‌فناوری به پژوهشگران علوم کشاورزی امکان داده است که از یک سو، در گیاهان زراعی رقم‌های سازگار با محیط‌زیست و پرمحصول تولید کنند و از سوی دیگر، با شناخت فراورده‌های ژنی سودمند در موجودهای مختلف و چیرگی بر چگونگی کنش ژن‌ها و یاخسته‌ها در گیاهان، ابزار لازم برای انتقال ژن‌های سودمند به این رقم‌ها را فراهم کنند. در نتیجه، ابزار اجتناب‌ناپذیری در بهنژادی به وجود آمده است که گیاهان متحمل‌تر در برابر تنش‌های زیوا و نازیوا با محصول بیشتر تولید شوند. در حال حاضر، استفاده از این راهبرد در کمینه کردن اثر سم‌های شیمیایی در آلوده‌سازی محیط‌زیست و غذا سودمند تشخیص داده شده است. از این رو، با وجود چالش‌های مهم علمی و اجتماعی در تمام زمینه‌های زیست‌فناوری، مقاله حاضر، نخست مرور اندکی دارد بر پیشرفت‌های زیست‌فناورانه اولیه مانند استفاده از جهش‌زایی در بهنژادی که کاربرد آن از نیمه اول سده بیستم شروع شده است. سپس، کاربردهای روش‌های مهندسی ژنتیک تشریح می‌شوند و در پایان، روش‌های مولکولی جدیدتر مانند فناوری کریسپر^۴-کاس ۹ که در تخریب یا ایجاد جهش هدفمند، تصحیح یا تنظیم بیان ژن در رقم‌های زراعی و باغبانی کاربردی است، واکاوی خواهند شد. سودمندی‌ها و کاستی‌های هر کدام از این روش‌ها در متن مقاله بحث شده‌اند. از مهمترین سودمندی‌های جهش‌زایی، افزایش تنوع ژنتیکی، از روش‌های مهندسی ژنتیک، افزودن ژن‌های سودمند و کاهش زمان بهنژادی رقم‌ها و از روش کریسپر، تغییر یا تصحیح ژنگان^۵ با هزینه کمتر را می‌توان نام برد. به هر حال، این روش‌ها محدودیت‌هایی نیز دارند که به ترتیب می‌توان به احتمال بی‌ثباتی ژنگانی و زمان‌بر بودن، حذف نشدن ژن‌های گزینشگر و گزارشگر باکتریایی و فرار تراژن و محدودشدن کریسپر به یاخسته‌های بدنی اشاره کرد.

واژه‌های کلیدی: ژنتیک مستقیم، ژنتیک معکوس، مهندسی ژنتیک، ویرایش ژنگانی.

مقدمه

با وجود افزایش سریع جمعیت دنیا و نیاز به غذای سالم و کافی، در بیشتر کشورها، نه به‌خاطر کاهش زمین‌های کشت‌پذیر، بلکه به‌خاطر کاهش منابع آب-بارندگی در شرایط خشک و نیمه خشک و افزایش تبخیر-تعرق که موجب

۱- تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۴/۱۹

۲- نویسنده مسئول: پست الکترونیک: mvalizadeh@tabrizu.ac.ir

۳- به ترتیب، استاد دانشگاه تبریز، تبریز (عضو پیوسته فرهنگستان علوم ج.ا. ایران) و کارشناس دانشگاه بین‌المللی امام خمینی (ره)، قزوین.

4. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

5. Genome

کاهش محصول شده است. از سوی دیگر، تغییر اقلیم و گرم شدن کره زمین بر این دشواری افزوده و موجب شده است که تولیدهای کشاورزی کاهش چشمگیری نشان دهند. در نتیجه، لازم است برای جبران بخشی از این فرایند، از فناوری‌های جدید که بتوانند تولیدهای کشاورزی را به صورت پایدار زیاد کنند، استفاده شود (Timmusk et al., 2017). یکی از راه‌های مهم افزایش پایدار تولیدهای زراعی و باغبانی، به‌نژادی سنتی است که امروزه همزمان با توسعه دانشگاه‌ها و مراکزهای پژوهشی در دنیا، تلاش‌های معنی‌داری در زمینه زیست‌فناوری گیاهی و انتقال ژن‌های سودمند به آن‌ها، امکان تولید رقم‌های زراعی متحمل به خشکی و سایر تنش‌های محیطی زیوا و نازیوا فراهم شده است. در واقع تنش‌های زیوا و نازیوا از اصلی‌ترین مانع تولید کمی و کیفی غذا و امنیت غذایی هستند و با تغییر اقلیم نقش آن‌ها بیشتر نیز می‌شود. تنش‌های زیوا توسط برخی از موجودهای زنده روی گیاهان ایجاد می‌شوند. از جمله این موجودها می‌توان به عامل‌های بیماری‌زای ویروسی، باکتریایی و قارچی و همچنین آفت‌های مختلف اشاره کرد که پاسخ دفاعی گیاه به آن‌ها اغلب با ترشح هورمون‌ها، آنزیم‌ها و برخی متابولیت‌های اختصاصی می‌باشد. البته برخی از میکروارگانیسم‌ها مانند باکتری‌های موجود در فضای پیرامون ریشه گیاهان (مانند رایزوباکترها^۱) نقش سودمند و مثبتی در مقاومت گیاه دارند (Vacheron et al., 2013). از سوی دیگر، استفاده از سم‌های حشره‌کش یا قارچ‌کش نیز راهکاری برای رویارویی با این عامل‌های تنش‌زا است، اما باید در نظر داشت که کاربرد این ترکیب‌ها نه تنها هزینه‌بردار است، بلکه برای سلامت انسان و سلامت بوم‌نظام نیز زیانبار می‌باشند.

تنش‌های خشکی، گرما، شوری و فلزهای سنگین از مهمترین تنش‌های نازیوا می‌باشند. مساحت زمین‌های درگیر در تنش خشکی در دنیا به سرعت در حال افزایش است (Burke et al., 2006) و انتظار بر این است که با زیاد شدن دمای کره زمین توسعه پیدا کند. پژوهشگران بر این باورند که حدود ۹۰٪ زمین‌های کشت‌پذیر زیر تأثیر یکی از عامل‌های تنش‌های نازیوا قرار دارند (dos Reis et al., 2012) و موجب کاهش تولید گیاهان زراعی مهم و تأمین‌کننده غذا برای انسان تا میزان ۷۰٪ می‌شود (Mantri et al., 2012; Tigchelaar et al., 2018). بنابراین، از یک‌سو، با توجه به هزینه زیاد مبارزه شیمیایی با آفت‌ها و عامل‌های بیماری‌زای گیاهی و نیز زیان‌های آن‌ها برای انسان و محیط زیست و از سوی دیگر، کنترل دشوار یا حتی ناممکن تنش‌های نازیوا مانند خشکی، گرما یا سرما و نیاز به هزینه‌های باز هم بیشتر، پژوهشگران کشاورزی از روش‌های مولکولی و زیست‌فناوری برای کاهش اثر تنش‌های زیوا و نازیوا استفاده کرده‌اند.

روش‌های زیست‌فناوری گیاهی

۱- استفاده از جهش‌زایی در به‌نژادی (تولید رقم‌های جهش‌یافته)

پس از کشف پرتو ایکس به عنوان اولین عامل جهش‌زا توسط هرمان مولر^۲ در مگس سرکه در سال ۱۹۲۷ و شناسایی مواد جهش‌زای شیمیایی و فیزیکی گوناگون در ادامه، پژوهشگران به‌نژادی به این فکر افتادند که با استفاده از جهش‌زایی مصنوعی، تنوع ژنتیکی رقم‌های زراعی موجود را افزایش داده و رقم‌های سازگارتر با محیط زیست و بازارپسندتر را تولید کنند. در حقیقت، جهش فرایند ژنتیکی است که به‌طور طبیعی در مکان‌های ژنی هر موجود زنده رخ می‌دهد و عامل آغازین تکامل است، به گونه‌ای که در صورت سازگاری بهتر با محیط از نظر گزینش طبیعی امتیازی به فرد دارنده خود می‌بخشد و حتی اگر خنثی هم باشد به احتمال زیاد در جمعیت باقی می‌ماند. فراوانی

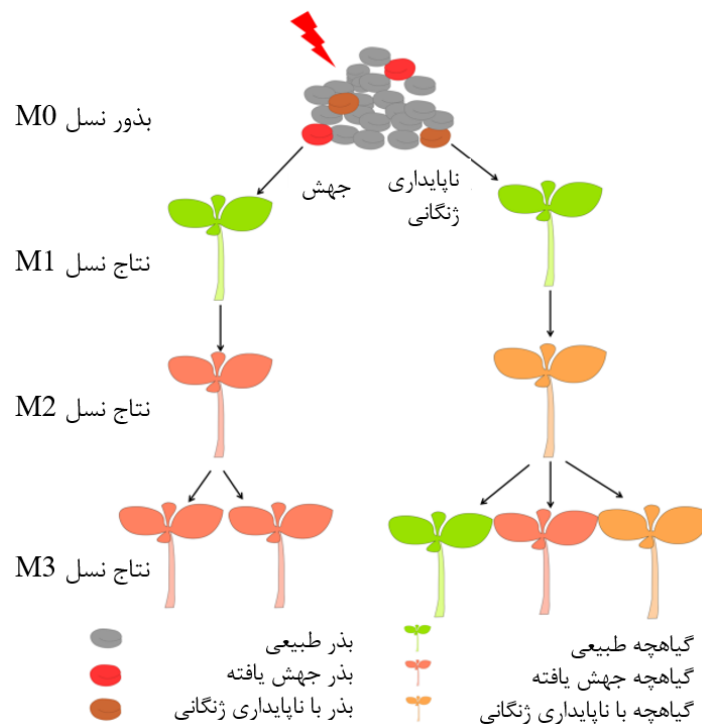
جهش‌های طبیعی در هر ژن حدود چند مورد در یک میلیون تقسیم است و از هر ۸۰۰ جهش، یک جهش سودمند (بی‌زیان) می‌تواند در گیاه به وجود آید و بهنژادگران از این جهش‌های سودمند در بهنژادی و معرفی رقم جدید استفاده می‌کنند. از این رو، برای دسترسی به جهش‌های سودمند بیشتر، می‌توان از جهش‌زایی مصنوعی استفاده کرد (Crow & Kimura, 2009).

تیمار بذرهای گیاهان زراعی با یک جهش‌زای شیمیایی کم‌خطر برای پژوهشگر (مانند ۳۰ میلی‌مولار اتیل متان سولفونات^۱) یا پرتوتابی بذر با ۱ پرتو یونیزه‌کننده (مانند پرتو ایکس یا گاما) با مقدار حدود ۱۵۰ گری^۲ (در مورد غلات) و کشت و بررسی‌های بعدی بذر را می‌توان رایج‌ترین روش جهش‌زایی مصنوعی دانست. هر گری به تقریب معادل ۱۰۰ راد^۳ است و هر راد معادل مقدار پرتوی است که بتواند دو یون را در یک میکرون مکعب از حجم یاخته گیاهی ایجاد کند. با مقدارهای زیاد حدود ۵۰٪ یاخته‌های هدف از بین می‌روند (LD₅₀) و در ۵۰٪ یاخته‌های زنده فراوانی جهش‌ها صدها برابر افزایش خواهد یافت. پس از کاشت بذرهای تیمار شده در نسل‌های مختلف گیاه (M₁, ... M₂)، جهش‌های مغلوب یا غالب سودمند به خلوص رسانده می‌شوند و با روش‌های سنتی بهنژادی مورد آزمون نتاج، گزینش و آزمایش‌های مقایسه‌ای در سال‌ها و مکان‌های مختلف قرار گرفته و تا رسیدن به معرفی رقم جدید ادامه می‌یابد (Ma et al., 2021) (شکل ۱). با وجود این، همان گونه که در شکل ۱ دیده می‌شود، امکان دارد که بی‌ثباتی ژنگانی به وجود آید یا افزون بر جهش مطلوب مورد گزینش، اثرهای ثانویه (جهش‌های سایه^۴) وجود داشته باشند و اغلب لازم باشد که جهش مطلوب به یک رقم پایدار از نظر ژنتیکی انتقال یابد (Acquaah, 2012).

با این روش، بیش از ۱۰۰۰ رقم جدید در گیاهان زراعی و بیش از ۳۰۰۰ رقم جهش‌یافته در ۲۰ گونه گیاهی تولید و ثبت شده است (Bado et al., 2015). با وجود افزایش گوناگونی ژنتیکی، از کاستی‌های این روش می‌توان به احتمال بی‌ثباتی ژنگانی، زمان بر بودن و پرهزینه بودن آن اشاره نمود. برای نمونه، به منظور استفاده از جهش‌زایی در تولید رقم‌های با کیفیت بادام زمینی، حدود ۷۵۰۰۰ بذر با پرتو ایکس پرتوتابی و سپس ۸۲۰۰۰ بذر M₂ و ۲۵۰۰۰ بذر M₃ کشت و بررسی شدند. این کار حدود ۲۰ سال ادامه یافت و رقم‌های بهنژادی‌شده‌ای معرفی شدند که از جمله آن‌ها می‌توان به 'TAG73' در هند و 'NC4X' در کالیفرنیا با عملکرد و کیفیت خوب اشاره کرد (Badigannavar & Mondal, 2023). تاریخچه جهش و استفاده از جهش‌زایی در بهنژادی گیاهان و حتی تلفیق این روش با زیست‌فناوری و ژنومیکس، در بازه زمانی بیش از ۱۰۰ سال، در قالب جدولی گردآوری شده است (Yali & Mitiku, 2022).

۲- استفاده از ژنتیک معکوس

در ژنتیک سنتی یا مستقیم، هدف این است که اساس ژنتیکی یک پدیدگان^۵ (یا صفت) مرتبط با یک جهش طبیعی یا حاصل از جهش‌زایی مصنوعی در گیاهان شناسایی شود، در حالی که در ژنتیک معکوس با تعیین توالی ژنگان یک موجود، ترتیب نوکلئوتیدی یک ژن به دست می‌آید و با تغییر یا نابسامانی در این توالی، پدیدگان یا صفت متأثر از این نابسامانی‌ها شناسایی یا بررسی می‌شود. در حقیقت، با روش ژنتیک معکوس می‌توان به کنش حقیقی یک ژن در تولید یک فرآورده پروتئینی و ایجاد یک صفت یا عملکرد در یک موجود زنده پی برد (Griffith et al., 2000).



شکل ۱- دو منبع جهش در نتاج. ۱- سمت چپ نشان می‌دهد که جهش به طور مستقیم از بذورهای پرتوتابی شده منشاء می‌گیرد. ۲- سمت راست نشان می‌دهد که جهش از بی‌ثباتی ژنگانی ناشی می‌شود (Ma et al., 2021).

یکی از کاربردهای بذر تیمار شده با اتیل متان سولفونات (EMS)، جستجوی جهش‌های نقطه‌ای در ژن‌های مورد بررسی (هدف) در نسل M₂ و تشخیص جهش‌یافته‌ها با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراس^۱ و شناسایی گیاه با پدیدگان جهش‌یافته است که (McCallum et al., 2000) این روش را تیلینگ^۲ یا هدف قرار دادن ضایعه‌های موضعی انگیخته‌شده در ژنگان نامگذاری کردند (شکل ۲). ابتدا بذرها با یک جهش‌زای شیمیایی (مانند EMS) مورد جهش‌زایی قرار گرفته و برای تولید گیاهان M₁ کشت می‌شوند. سپس، عمل خودگردافشانی در گیاهان M₁ برای تولید نسل M₂ انجام می‌شود و DNA گیاهان نسل دوم استخراج و مقداری از بذر آن‌ها برای واکاوی‌های بعدی ذخیره می‌شود. پس از این که DNA از جمعیت جهش‌یافته استخراج شد، DNA چند گیاه M₂ مخلوط شده تا گروه‌های مخلوط^۳ به دست آیند. شمار افراد در یک گروه مخلوط به سطح چندگانی^۴ گیاه و مقدار تنوع تک نوکلئوتیدی یا انواع SNP طبیعی بستگی دارد که ممکن است نیاز به کاهش شمار آن‌ها باشد. ژن مورد نظر که توالی مشخصی دارد با استفاده از یک آغازگر مستقیم با برچسب فلورسنت ۷۰۰ نانومتر و یک آغازگر معکوس با برچسب ۸۰۰ نانومتری متصل به انتهای ۵' با واکنش زنجیره‌ای پلیمراس تکثیر می‌شود. فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراس گرم و سرد می‌شوند تا در صورت وجود جهش نقطه‌ای هترو دوپلکس‌هایی بین همه DNA موجود در مخلوط ایجاد کنند و به این ترتیب آمیخته‌ای از همودوپلکس‌ها و هترو دوپلکس‌ها ایجاد می‌شود. یک اندونوکلاز نامنطبق (CEL I) محل جفت‌شدگی ناجور یا محل جهش را تشخیص داده و هترو دوپلکس را به دو قطعه جداگانه برش می‌دهد که در طول موج‌های ۷۰۰ و ۸۰۰ نانومتر توسط یک آشکارساز

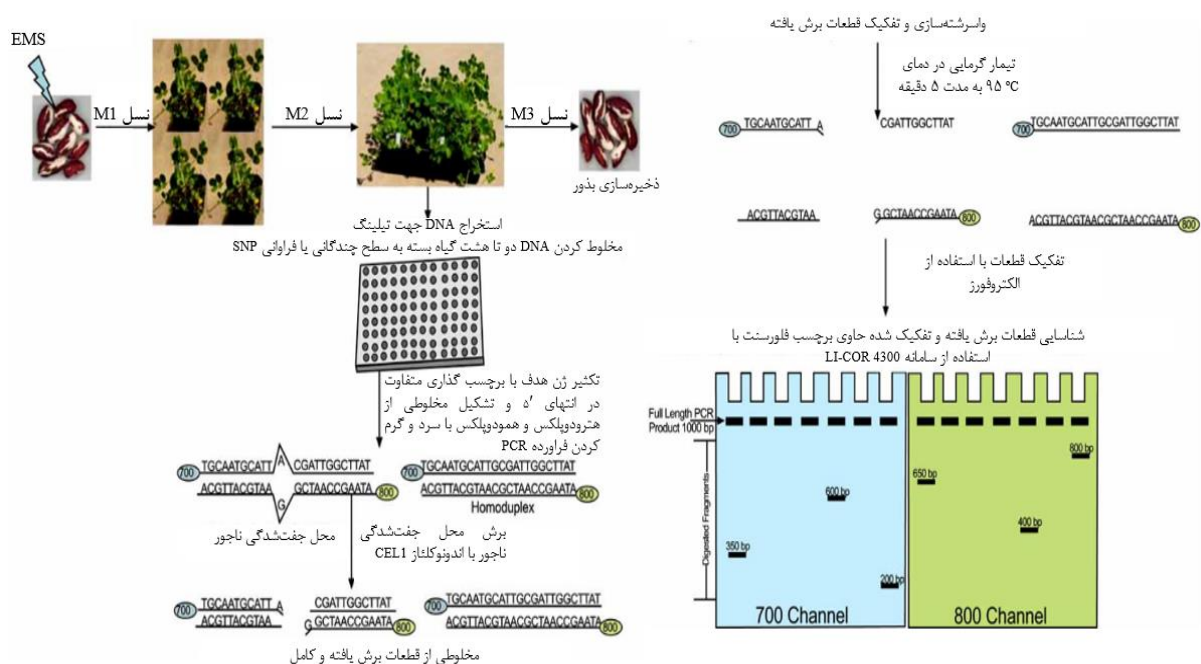
1. Polymerase chain reaction (PCR)

2. Targeting induced local lesions in genome (TILLING)

3. Pools

4. Polyploidy

شناسایی می‌شوند. اندازه قطعه‌های برش‌یافته باید با اندازه کل فرآورده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برابر باشد. هنگامی که قطعه‌ها برش داده شدند و محل چندشکلی مربوط به آن‌ها شناسایی شد، این قطعه‌ها برای تأیید جهش انگیخته‌شده، توالی‌یابی می‌شوند. همچنین، EcoTILLING با این روش انجام می‌شود با این تفاوت که جهش‌زایی در بذرها انجام نمی‌شود. این روش با استخراج DNA از یک گیاه مرجع و اعضای جمعیت آغاز شده و تعیین چندشکلی‌های طبیعی مشابه با روش TILLING انجام می‌شود (Barkley & Wang, 2008). بدین ترتیب، گروه مخلوطی که دارای جهش است مورد بررسی بیشتر قرار می‌گیرد تا ارتباط جهش با صفت گیاه جهش‌یافته روشن شود و به‌عبارتی کنش ژن در کنترل یک صفت مشخص شود. با این روش ژنتیک معکوس می‌توان نه تنها به‌عنوان ابزاری برای ژنومیکس عملکردی و شناسایی نقش تقریبی ژن‌ها در گیاهان استفاده کرد، بلکه می‌توان ژن‌های مقاوم به عامل‌های بیماری‌زا را گزینش کرد، تغییرهای اعمال شده در این ژن‌ها را مورد شناسایی قرار داد و در معرفی رقم‌های مقاوم، بدون نیاز به انتقال ژن، به کار برد (شکل ۲) (Singh et al., 2019, Ibiza et al., 2010). این روش دو محدودیت بزرگ دارد. نخست پرهزینه بودن و دوم قابلیت اجرایی محدود به گیاهان با ژنگان کوچک، مانند آرابیدوپسیس^۱ و برنج، با کارایی زیادی به کار برده می‌شود.



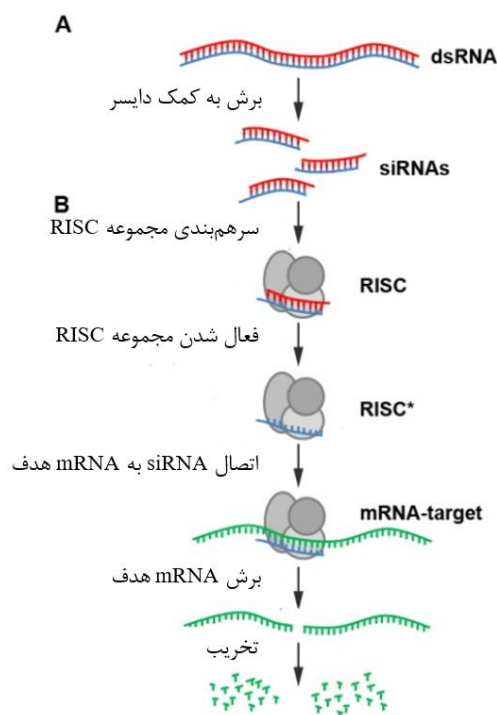
شکل ۲- در روش TILLING، ابتدا بذرها با EMS مورد جهش‌زایی قرار گرفته و DNA گیاهان نسل دوم استخراج و مخلوط می‌شود. با انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و سرد و گرم کردن فرآورده آن، تشکیل هترودوپلکس نشان‌دهنده وجود ژن جهش‌یافته در یک بوته M₂ در یک گروه مخلوط خواهد بود که با کمک هضم آنزیمی، تجزیه‌های تکمیلی بوته M₂ جهش‌یافته برای ژن مورد نظر و صفت مربوطه شناسایی می‌شود (Barkley & Wang, 2008).

۳- فرایند خاموش‌سازی ژن به کمک RNA دو رشته‌ای

یکی از مهمترین روش‌های شناخته‌شده در یوکاریوت‌ها، چگونگی فرایند خاموش‌سازی ژن‌ها به منظور تنظیم بیان ژن در سطح پیش از رونویسی یعنی تولید mRNA و پس از رونویسی یعنی ساخت پروتئین است. در این فرایند، پس از ورود یک مولکول RNA دو رشته‌ای خارجی^۱ به داخل یاخته یا تشکیل این نوع مولکول درون یاخته، این مولکول توسط آنزیم‌هایی به نام دایسر^۲ به قطعه‌هایی با طول ۲۱ تا ۲۳ جفت نوکلئوتید بریده می‌شود. این آنزیم‌ها ماهیت اندوریبونوکلئازی دارند و به قطعه‌های حاصل از این برش‌ها، بسته به اندازه و محل اتصال به مولکول mRNA هدف، RNA کوچک مداخله‌گر (siRNA) یا میکرو RNA (miRNA) گفته می‌شود. این قطعه‌های کوتاه دو رشته‌ای، سازوکاری را برمی‌انگیزند که در آن، مولکول mRNA تولید شده از ژن هدف (و ژن‌های هم ساختار) تجزیه شده و این ژن‌ها از فعالیت باز می‌مانند و یا پروتئین تولیدشده از روی mRNA مهار شده و در حقیقت فعالیت ژن(های) هدف به سرانجام نمی‌رسد. در این سازوکار افزون بر آنزیم‌های دایسر، آنزیم‌های دیگری مانند پلیمراز RNA وابسته به RNA (RdRP)، هلیکازها و مجموعه RNase به نام مجموعه خاموشی انگیخته‌شده به کمک RNA (RISC)^۳ دخالت دارند (شکل ۳). با توجه به شکل ۳، در مرحله شروع (A)، ریبونوکلئاز ویژه‌ای به نام دایسر به همه dsRNA متصل شده و آن‌ها را برش می‌دهد و دوبلکس‌های کوتاهی (۲۱-۲۳ جفت باز) با دو نوکلئوتید آویزان در انتهای ۳' (یا همه siRNA) ایجاد می‌کند. در مرحله دوم، یعنی B، مولکول‌های siRNA به مجموعه RISC اضافه می‌شوند. یکی از رشته‌های siRNA (Passenger strand) پس از فعال‌سازی RISC برش یافته و از مجموعه پروتئینی جدا می‌شود و رشته دیگر (Guide) در مجموعه باقی می‌ماند. * RISC فعال شده به طور اختصاصی به RNA هدف متصل شده و آن را برش می‌دهد. افزون بر این، در رهیافت RNA و miRNA، ژنگان یاخته دستخوش تغییر در متیل‌گذاری DNA و تشکیل هتروکروماتین می‌شود تا در پایان از یک سو ژن‌های عامل‌های بیماری‌زای وارد شده به یاخته گیاهی (مانند ویروس‌های گیاهی) خاموش شوند و از سوی دیگر ژن‌هایی که فعالیت آن‌ها برای یاخته لازم نیست در خود یاخته از فعالیت باز بمانند. در اصل، این سازوکار خاموش‌سازی، فرایند طبیعی تنظیم بیان ژن و جلوگیری از گسترش فعالیت انواع توالی‌های تکراری در ژنگان یوکاریوت‌ها^۴ است. برای نمونه، از حدود ۲۵۰۰۰ ژن موجود در ژنگان انسان، تنها ۳۰۰۰ ژن در همه بافت‌های تشکیل‌دهنده بدن فعالیت دائمی دارند و بقیه بسته به نوع بافت و شرایط فیزیولوژیک، زیر تنظیم و خاموشی هستند و تنها در برخی از یاخته‌های ویژه یا در زمان لازم می‌توانند فعالیت داشته باشند (Brown, 2012).

فناوری خاموش‌سازی ژن در زمینه‌های زیادی مورد استفاده پژوهشگران قرار گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به این موردها اشاره کرد. با استفاده از این فناوری به منظور خاموش کردن برخی از ژن‌ها در گیاهان، درک بهتری از کنش آن‌ها به دست آمده است (Brodersen & Voinnet, 2006). با تولید رونوشت دو رشته‌ای (dsRNA) از یک ژن مهم ویروسی یا دیگر عامل‌های بیماری‌زای گیاهی (باکتری، قارچ و مانند این‌ها) و به طور کلی با کاربرد خاموش‌سازی در برخی از گیاهان، رقم‌های گیاهی مقاوم به عامل‌های بیماری‌زا تولید شده است (Escobar et al., 2001; Baulcombe, 2004; Abdel-Hadi et al., 2011, Karthikeyan et al., 2013). یکی از مهمترین جنبه‌های مسمومیت فرآورده‌های غذایی چه پیش از برداشت محصول و چه پس از آن، آلودگی محصول با متابولیت‌های ثانویه از جمله میکوتوکسین تولید شده توسط قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان است. متابولیت‌های سمی می‌توانند هم در محصول‌های زراعی مورد تغذیه انسان و

هم در گیاهان علوفه‌ای مورد تغذیه دام وجود داشته باشند. هر چند که تلاش شده است از ژن‌های مقاوم به بیماری‌های قارچی در گیاهان چه از راه بهنژادی سنتی و چه با تهیه نژادگان‌های^۱ تراژن^۲ یا تراریخت (واجد ژن مقاومت)، رقم‌های مقاومی تولید شود، اما چون عامل‌های بیماری‌زا در طول زمان مقاومت پیدا می‌کنند (دستکم به خاطر جمعیت بسیار بیشتر از گیاه میزبان)، بنابراین پژوهشگران کاربرد خاموش‌سازی ژن توسط گیاه زراعی میزبان را در محافظت از آلودگی فرآورده‌های زراعی توسط مایکوتوکسین، ابزار مهمتری می‌پندارند (Ismail & Papenbrok, 2015; Majumdar *et al.*, 2017).



شکل ۳- سازوکار RNAi. در مرحله اول (A)، ریبونوکلئاز دایسر، dsRNA را برش می‌دهد و siRNAها را ایجاد می‌کند. در مرحله دوم (B)، مولکول‌های siRNA به مجموعه RISC اضافه شده و پس از فعال‌سازی مجموعه RISC، RISC* فعال شده به طور اختصاصی به RNA هدف متصل شده و آن را برش می‌دهد (Petrova *et al.*, 2013).

با این وجود، این روش محدودیت‌هایی دارد، از جمله ناپایداری همه siRNA، اثرهای خارج از هدف^۳، چالش‌ها در انتقال و تنوع در کارایی مهار ژن. اثرهای خارج از هدف زمانی رخ می‌دهد که همه siRNA به هدف‌های RNA ناخواسته متصل می‌شوند و به خاموش کردن ژن غیرهدف و بروز پدیده‌گان‌های ناخواسته می‌انجامند. انتقال همه siRNA به یاخته‌ها و بافت‌های ویژه به دلیل اندازه و ویژگی‌های شکل‌شناسی و فیزیولوژیکی آن‌ها می‌تواند دشوار باشد و همچنین روش‌های مختلف انتقال، کارایی متفاوتی دارند. افزون بر این، کارایی RNAi می‌تواند بین انواع مختلف یاخته متفاوت بوده و حتی در یک نوع یاخته، سطح‌های مهار ژن می‌تواند متفاوت باشد (Touzdzian Pinheiro Kohlrausch Távora *et al.*, 2022).

پس از کشف و استخراج نخستین آنزیم‌های برشی در سال ۱۹۷۰، ژنتیک‌دانان، فناوری جدیدی به نام DNA نوترکیب^۱ را به منظور بررسی ژن‌ها به شکل انفرادی ایجاد کردند و توانستند با تهیه مولکول‌های DNA نوترکیب (ناقل‌ها یا وکتورها)، ژن‌ها یا قطعه‌هایی از DNA را همسانه‌سازی^۲ و تکثیر کنند و برای هدف‌های مختلف آن‌ها را مورد واکاوی قرار بدهند و یا به یک موجود دیگر انتقال دهند. به سرعت صدها و هزاران آنزیم برشی از باکتری‌های مختلف کشف و استخراج شدند و صدها نوع ناقل نوترکیب براساس پلاسمیدهای باکتریایی، ژنگان فاژی لاند، پلاسمید F، کروموزوم‌های مصنوعی مخمر و پلاسمید مبتنی بر T-DNA باکتری *Agrobacterium tumefaciens* ایجاد شد. به این ترتیب، دانشمندان با انجام مرحله‌های تهیه ناقل نوترکیب دارای یک یا چند ژن و انتقال این ژن‌ها به یاخته‌ها یا موجودهای زنده، موجودهایی با یک یا چند ژن اضافی و خارجی به وجود آوردند که ویژگی ژن دلخواه را داشته باشند. این فناوری، مهندسی ژنتیک نامیده می‌شود. به گیاهان یا موجودهایی که دارای ژن اضافی انتقال داده شده هستند، تراژن یا موجود دستکاری شده ژنتیکی^۳ می‌گویند (یزدی صمدی و ولیزاده، ۱۳۹۰) و از ژن انتقال یافته به گیاه تراژن به‌عنوان تراژن یاد می‌شود. در طراحی و تهیه یک ناقل نوترکیب به گونه‌ای عمل می‌شود که آن را به‌توان در یاخته میزبان گزینش و تکثیر کرد. برای نمونه، ناقل پلاسمیدی در باکتری *Escherichia coli*، ناقل کروموزوم مصنوعی مخمر در یاخته مخمر و ناقل مبتنی بر T-DNA در *E. coli* و اگروباکتریوم همسانه‌سازی می‌شوند و بسته به هدف استفاده می‌شوند.

هدف‌های دستکاری ژنتیکی بسیار گوناگون هستند. یکی از نخستین هدف‌ها تشکیل کتابخانه ژنگانی برای همه موجودهای زنده بوده است؛ به گونه‌ای که تمام ژن‌های موجود گیاه، جانور یا انسان را بتوان در آزمایشگاه نگهداری کرد و هرگاه لازم بود ژن‌ها را با روش دورگه‌سازی شناسایی و به‌طور جداگانه مورد بررسی و استفاده قرار داد. برای نمونه، با توالی‌یابی DNA، می‌توان ساختار ژن را مشخص کرد تا به ویژگی‌ها و نقش پروتئین تولیدی آن پی برد. هدف دیگر از همسانه‌سازی ژن، تولید مقدار زیادی از فراورده‌های ژنی طبیعی از میکروب‌ها مانند آنتی‌بیوتیک‌ها یا مواد دارویی از منشأ هر موجود دیگر در داخل باکتری، مخمر نانوائی، قارچ‌های میله‌ای یا یاخته حیوانی است. در حقیقت، یک تا دو دهه پس از معرفی مهندسی ژنتیک، شمار زیادی از پروتئین‌های انسانی مهم در درمان بیماری‌های انسانی در داخل *E. coli* یا یاخته‌های یوکاریوتی ساخته شدند (Brown, 2012). یکی از مهمترین هدف‌های مهندسی ژنتیک، استفاده از آن در گیاهان زراعی بوده است. در انتهای سده بیستم با استفاده از ناقل‌های مبتنی بر پلاسمید Ti موجود در نژادهای بیماریزای اگروباکتریوم (که در گیاهان دو لبه، سرطانی به‌نام گال طوقه ایجاد می‌کند)، انتقال ژن به گیاهان زراعی شروع شد و نخستین مورد گیاهی تراژن، انتقال ژن مقاومت به علف‌کش به گیاه توتون در سال ۱۹۸۳ بود که در پایان به کشت این گیاهان در سطح مزرعه در فرانسه و ایالات متحده آمریکا انجامید (Fraleigh et al., 1983).

در ۲۰ تا ۳۰ سال گذشته، تولید گیاهان زراعی تراژن افزایش معنی‌داری پیدا کرد و رقم‌های زراعی گوناگون با سرعت چشمگیری به‌نژادی و معرفی شده‌اند و مهندسی ژنتیک به ابزار مهمی در به‌نژادی تبدیل شده‌است؛ به‌طوری که سطح زیر کشت گیاهان تراژن در دنیا از ۱/۷ میلیون هکتار در سال ۱۹۹۶ به ۲۰۶/۳ میلیون هکتار در سال ۲۰۲۳ یعنی بیش از ۱۲۰ برابر رسیده است. مهمترین گیاهان تراژن زیر کشت عبارتند از سویا، کلزا، پنبه، ذرت، پاپایا، سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی (و در پژوهش‌ها، توتون و آرابیدوپسیس). مهمترین کشورهای تولیدکننده این گیاهان در سال ۲۰۲۳ به

ترتیب ایالات متحده آمریکا (با ۷۴/۴۰ میلیون هکتار)، برزیل (۶۶/۹۰ میلیون هکتار)، آرژانتین (۲۳/۱۰ میلیون هکتار)، هندوستان (۱۲/۱۰ میلیون هکتار)، کانادا (۱۱/۵۰ میلیون هکتار) و چین (۲/۸۰ میلیون هکتار) گزارش شده‌است. از سال ۲۰۱۰ به بعد ۷۶ کشور شروع به کشت و تولید گیاهان تراژن کرده‌اند (Cheng et al., 2024).

در بیشتر موردها، برای انتقال ژن‌های دلخواه به گیاهان زراعی از ناقل‌های همسانه‌سازی مبتنی بر پلاسمید Ti از اگروباکتریوم استفاده می‌شود. در حقیقت این باکتری خاک‌زی با انتقال ژن به گیاهان دو لپه‌ای به‌طور طبیعی از راه زخم موجب بیماری گال طوقه و رشد سرطانی در یاخته‌های گیاه می‌شود و با وادار کردن یاخته‌های گیاهی برای تولید متابولیت‌های لازم برای مصرف خود (آپین‌ها^۱)، به زندگی ادامه می‌دهد. انتقال ژن از باکتری به یاخته‌های گیاهی توسط قسمتی از پلاسمیدش به نام T-DNA انجام می‌شود که دارای دو تکرار مستقیم ۲۴ جفت نوکلئوتیدی در دو انتهاست. طراحی ناقل به گونه‌ای انجام می‌شود که به‌جای ژن‌های تولیدکننده بیماری گال طوقه موجود در T-DNA، ژن‌ها و اجزای مورد نظر در بین دو تکرار مستقیم قرار داده می‌شوند. پس از انتقال ناقل به درون اگروباکتریوم، بافت گیاهی زخمی در حضور باکتری‌های واجد ناقل (ها) کشت می‌شود تا ناقل مهندسی شده وارد یاخته‌های گیاهی شود و پس از قرار گرفتن در کروموزوم، ژن‌های موجود در ناقل به جای ژن‌های بیماری‌زای باکتریایی فعالیت خود را شروع کنند. در گام بعدی، هر یاخته دریافت‌کننده ناقل نو ترکیب با فناوری کشت بافت به گیاه کامل تبدیل می‌شود. گیاهان به‌دست آمده (T₀) در نسل‌های مختلف به خلوص رسانده شده و پایداری آن‌ها ارزیابی و مورد مقایسه قرار می‌گیرد و در پایان مرحله‌های ثبت و معرفی رقم جدید با روش به‌هزادی مرسوم انجام می‌شود (Heidari Japelaghi et al., 2020; Heidari Japelaghi et al., 2024). برای انتقال ژن با هر منشأ به گیاهان به‌جای استفاده از اگروباکتریوم به‌ویژه در گیاهان تک‌لپه‌ای، روش‌های دیگری نیز معرفی شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به روش تفنگ ژنی یا بیولیستیک^۲ اشاره کرد.

۴-۱- سودمندی‌های مهندسی ژنتیک گیاهی

با انتقال ژن به رقم‌های پرمحصول و برتر^۳ گیاهان زراعی ویژگی‌های سودمندی به آن‌ها افزوده شده است که به برخی از آن‌ها می‌توان اشاره کرد:

- ❖ مقاومت گیاهی در برابر علفکش گلایفوسیت^۴ (با ژنی از منشأ باکتری *Salmonella typhimurium*) یا علفکش آترازین^۵ که موجب کاهش هزینه برای وجین دستی یا مکانیکی در کشتزارهای بزرگ شده است.
- ❖ مقاومت گیاهی در برابر حشره‌ها یا برخی از آفت‌ها (با ژنی از منشأ *Bacillus thuringiensis*) با مخفف Bt که موجب کاهش هزینه سمپاشی در کشتزارها و آلودگی کمتر محیط زیست شده است.
- ❖ مقاومت گیاهی در برابر برخی از ویروس‌ها (برای نمونه با ژن رمزگردان پروتئین پوششی ویروس موزایک توتون) و عامل‌های بیماری‌زای دیگر.
- ❖ افزایش کیفیت غذایی مانند تولید بتا-کاروتن (پیش‌ساز ویتامین A) در برنج که از کم‌بینایی در کودکان برخی جامعه‌های فقیر جلوگیری کرده است (Ye et al., 2000).
- ❖ تحمل بیشتر گیاهان زراعی در زمین‌های شور و حتی کم آب (Cook, 2000).
- ❖ توانایی تولید پروتئین‌های درمانی (پادتن‌ها، پروتئین‌های دارویی و صنعتی و واکسن) (Heidari Japelaghi et al., 2019).

۲-۴- کاستی‌های استفاده از گیاهان تراژن

یکی از کاستی‌های بزرگ انتقال ژن به گیاهان وارد شدن اجباری یک یا چند ژن به عنوان گزینشگر و یا گزارشگر با منشأ باکتریایی همراه با ژن دلخواه در ناقل نو ترکیب است. وجود این ژن‌های اضافی می‌تواند برای سلامت انسان زیانبار باشد و به احتمال در برخی از افراد حساسیت ایجاد کند. همچنین وجود قطعه‌های ژنی اضافی باکتریایی (یا حتی ویروسی) به کار رفته در ناقل‌ها می‌تواند از راه دانه گرده گیاهان تراژن در محیط زیست منتشر شده و موجب مرگ پروانه‌ها، زنبورها و در کل مسمومیت گیاهخواران در طبیعت شود. برای رفع این دشواری‌ها، پژوهشگران از راهکارهایی استفاده کرده‌اند. برای نمونه، به جای انتقال ژن به ژنگان هسته، می‌توان ژن را به ژنگان کلروپلاست انتقال داد تا عکس دانه گرده، ژن‌ها در محیط زیست انتشار نیابند یا در حالت انتقال به هسته، فرایندهایی پیش‌بینی شوند تا ژن‌های نامطلوب اضافی از راه کراسینگ‌اور^۱ در چند نسل و پیش از معرفی رقم حذف شوند (حیدری چاپلوقی و دورانی، ۱۳۹۵؛ Ferber, 1999).

۵- فناوری ویرایش ژنگان کریسپر^۲

کریسپر (خوشه‌ای از تکرارهای پالیندرومی کوتاه با فاصله‌های منظم) سازوکار دفاعی در پروکاریوت‌ها^۳ (باکتری‌ها و آرکی‌ها^۴) در برابر باکتریوفاژها^۵ (ویروس‌های آلوده‌کننده باکتری‌ها) یا پلاسمیدهای باکتریایی است. پس از پژوهش‌های زیاد، دو دانشمند به نام‌های شارپانتیه و دادنا^۶ در سال ۲۰۱۲ (Jinek et al., 2012) به خاطر شناخت کامل این سازوکار دفاعی و کارا بودن آن در ویرایش ژنگانی، موفق به اخذ جایزه نوبل شدند. در واقع فناوری ویرایش ژنگانی، حالت ساده‌تر شده‌ای از سیستم دفاع ضد ویروسی برخی از باکتری‌ها به نام CRISPR-Cas 9 است؛ به گونه‌ای که با فراهم کردن یا انتقال مجموعه‌ای متشکل از یک آنزیم ریبونوکلاز به نام Cas 9 و یک RNA قابل برنامه‌ریزی به نام RNA راهنما^۷ (gRNA) در یک یاخته، می‌توان در ژنگان یاخته، قطعه‌ای از یک ژن هدف را حذف کرد یا قطعه جدیدی را به آن اضافه کرد یا نقص موجود در آن ژن را ترمیم و بهنژادی کرد که به مجموعه این کارها ویرایش ژنگانی گفته می‌شود. از نظر مولکولی، سازوکار CRISPR/Cas9 شامل سه مرحله است: ۱- شناسایی، ۲- برش و ۳- ترمیم. ابتدا، gRNA قطعه یا توالی ژن هدف را شناسایی می‌کند، یعنی بخش کوچکی از این RNA در حدود ۲۰ تا ۲۲ جفت نوکلئوتید با توالی ژن هدف بازجفتی تشکیل می‌دهد. gRNA خود از دو قسمت RNA فعال‌کننده ترانس (tracer RNA) و RNA کریسپر (crRNA) تشکیل شده است. قسمت crRNA به یک ناحیه ۲۰ تا ۲۲ نوکلئوتیدی از DNA میزبان متصل می‌شود. موتیف مجاور پروتواسپیسر^۸ (PAM) یک توالی کوچک ۶-۲ bp (NGG) است که به فعالیت نوکلئازی Cas9 نیاز دارد و سه تا چهار نوکلئوتید در پایین دست محل برش قرار دارد. توالی Seed یا جایگاه برش، ۵ نوکلئوتید در بالادست PAM است. برای این که gRNA جهت برش DNA، به DNA هدف و Cas9 متصل شود، باید بین جایگاه برش و PAM با DNA هدف شباهت کافی وجود داشته باشد. در این صورت، نوکلئاز Cas 9 در جایگاه برش، یک برش تک رشته‌ای یا دو رشته‌ای در DNA ایجاد می‌کند (شکل ۴). در نهایت، یاخته می‌کوشد این آسیب وارد شده به DNA را با سازوکارهای مختلف از جمله جوش دادن دو انتهای بریده شده یا ترمیم هم‌تا جبران کند. در حقیقت در باکتری‌ها، آرایه کریسپر، RNA راهنما و تکرارهای مستقیم کوتاه از راه تجزیه ژنگان ویروسی،

1. Crossing over

3. Prokaryotes

6. Charpentier and Doudna

2. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)

4. Archaea

7. Guide RNA

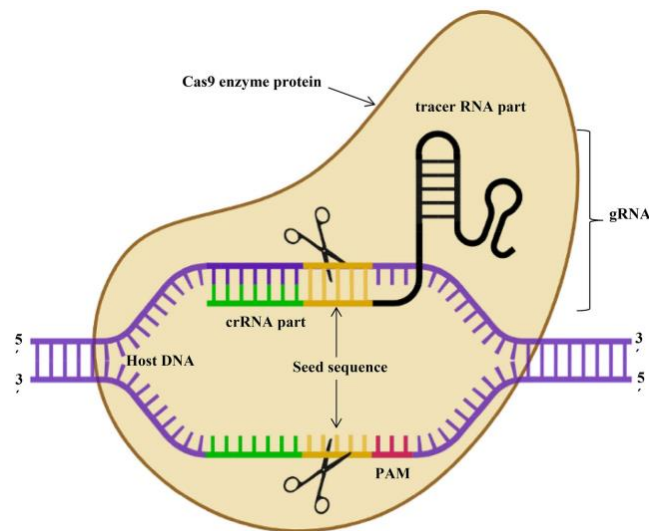
5. Bacteriophage

8. Protospacer adjacent motif (PAM)

فعال و تولید می‌شوند و در صورت آلودگی مجدد با همان ویروس، آنزیم Cas 9 با اتصال به RNA راهنما به ژنگان ویروس چسبیده و آن را برش داده و تخریب می‌کند (Asmamaw & Zawdie, 2021).

امروزه فناوری CRISPR-Cas 9 کاربردهای بسیار هیجان‌انگیزی پیدا کرده است. این کاربردها از ژن درمانی و رفع ناهنجاری‌های ژنتیکی و سرطان در انسان تا کمک به بهنژادی رقم‌های خوراکی برای تولید غذای با کیفیت بهتر در کشاورزی و حتی استفاده در تنظیم بیان برخی از ژن‌ها و فرایند خاموش‌سازی ژن گسترش پیدا کرده است. پژوهش‌ها در ارتباط با کاربرد این فناوری همچنان ادامه دارد و در مورد دو مشکل شامل: ۱- دخالت احتمالی این روش در مورد سایر قسمت‌های ژنگان و نه تنها ژن هدف و ۲- تداخل مجموعه CRISPR-Cas 9 با سیستم ایمنی بدن در انسان و پستانداران و سلامت فرد تراژن، بررسی‌های بیشتری لازم است. در مورد گیاهان هم مشکل‌هایی می‌تواند وجود داشته باشد، اما امروزه ساده‌ترین و سریع‌ترین راه برای بهبود کیفیت و کمیت غذای مورد نیاز و نیز بررسی نقش ژن‌ها در گیاهان زراعی، کاربرد این روش، کم هزینه‌تر از دیگر روش‌ها است (Hsu et al., 2014; Song et al., 2016; Adhikari & Poudel, 2020). کاربرد این فناوری در گیاهانی مانند آرابیدوپسیس، توتون، سورگوم و برنج از راه جهش‌زایی هدفمند برخی از ژن‌ها با موفقیت انجام شده و روشن شده است که جهش‌ها اغلب با کارایی زیاد (از حدود چند درصد تا ۸۰٪) توسط این فناوری به دست می‌آیند و با فراوانی زیاد (تا ۸۰٪) به نسل‌های بعدی به ارث می‌رسند (Jiang et al., 2013; Gao et al., 2015). با ایجاد تغییرهای مثبت از نظر کارکردی، ایجاد جهش در ژن‌های مورد نظر (نه به صورت تصادفی) در گیاهان بهبود یافته و برای نمونه موفقیت‌های زیادی در ویرایش ژنگان برنج حتی به صورت حذف توالی‌های زیادی از ژنگان این گیاه و گیاهان دیگر به دست آمده‌است (Zhou et al., 2014; Ma et al., 2015). گزارش‌هایی نیز مبنی بر جهش‌زایی هدفمند در برخی از ژن‌های سویا و ذرت با کارایی زیاد وجود دارد، اما در گندم به خاطر شش‌گان^۱ بودن و وجود یک ژن به تقریب مشابه در سه ژنگان A، B و D، ایجاد تغییر در یک ژن با کارایی کمتری همراه بوده‌است. برای نمونه، فراوانی جهش‌زایی در ژن *mlo* گندم، عامل مقاومت به قارچ بیماری‌زای سفیدک پودری تنها ۵/۶٪ برآورد شده‌است (Wang et al., 2014).

فناوری CRISPR-Cas 9 به‌عنوان سیستمی دقیق، کارا و قابل برنامه‌ریزی در ویرایش ژنگانی را می‌توان در بهنژادی گیاهان زراعی و باغبانی مورد استفاده قرار داد. با انتقال این سیستم به رقم‌های برتر و یا برترهای مورد دسترس گیاهان می‌توان تغییرهای دقیق و قابل پیش‌بینی در ژنگان آن‌ها ایجاد کرد و از تلاقی‌های برگشتی چندساله در بهنژادی و معرفی یک رقم چشم‌پوشی کرد. گاهی نیز می‌توان چندین ویرایش (تغییر مثبت یا منفی) را به طور همزمان در یک نژادگان ایجاد نمود و در حقیقت بهنژادی هرمی انجام داد (Bortesi & Fischer, 2017). با نمونه‌های زیاد می‌توان به این نتیجه رسید که ساده‌ترین کاربرد CRISPR-Cas 9 تخریب ساختار یک ژن (جهش‌زایی هدفمند) است. بنابراین، با تخریب کنش ژن‌های تنظیم‌گر منفی درگیر در فرایندهای رشد و نمو دانه و مقاومت به عامل‌های بیماری‌زا در گیاهان با استفاده از ژن Cas 9 و آرایه کریسپر زیر کنترل راه‌اندازهای بافت-ویژه و انتقال آن‌ها به رقم‌های زراعی، می‌توان فعالیت این ژن‌ها را در برابر تنش‌های زیوا و نازیوا (از جمله تغییر اقلیم) بهبود بخشید. خاطر نشان می‌شود که برخی از پیشروان فناوری CRISPR-Cas 9، آینده مهندسی ژنتیک در گیاهان و موجودهای دیگر را در این فناوری می‌بینند (Knott & Doudna, 2018).



شکل ۴- سیستم CRISPR/Cas9 مجموعه‌ای است متشکل از یک پروتئین مونومر آنزیمی بنام Cas9 و یک RNA راهنما (gRNA). آنزیم Cas9 و gRNA را می‌توان به یاخته‌ها انتقال داد و به این ترتیب، همسانه‌سازی مجموعه ضروری نیست. این سیستم دارای راندمان تشخیص هدف یاد شده، نرخ جهش و سمیت یاخته‌ای اندک است (Kashtwari *et al.*, 2022).

نتیجه‌گیری

به‌نژادی اغلب با تغییر در ژنگان گیاه همراه است. در به‌نژادی سنتی بیشتر تلاش بر این است که ژن‌های مرتبط با ویژگی مورد به‌نژادی در یک گیاه زراعی (بهبود عملکرد، زودرسی، کیفیت غذایی و مانند این‌ها) در یک رقم جمع شوند. در حقیقت، همزمان با این کار شماری از ژن‌های کنترل‌کننده ویژگی‌های دیگر نیز به این رقم منتقل می‌شوند. در روش‌های به‌نژادی به کمک جهش‌زایی نیز این واقعیت وجود دارد که افزون بر ژن یا ژن‌های مرتبط با جهش مطلوب، ژن‌های جهش‌یافته دیگری نیز به رقم مورد گزینش منتقل می‌شوند. درحالی‌که در روش مهندسی ژنتیک و ویرایش ژنگانی تنها چند ژن شناخته شده به رقم مورد نظر منتقل می‌شوند و تغییر در ژنگان گیاهی به کمینه می‌رسد. پژوهشگران امیدوارند که با کاربرد این فناوری افزون بر شناسایی ژن‌های مقاومت به تنش‌های زیوا و نازیوا، در آینده بتوان با تولید داروهایی مانند اریتروپوئین‌ها^۱ برای مبارزه با کم‌خونی یا تولید انسولین برای درمان دیابت از راه مهندسی ژنتیک، عمل واکسیناسیون یا درمان بسیاری از ناهنجاری‌های انسانی را با تولید مواد دارویی توسط گیاهان و با هزینه‌ای کمتر از داروهای شیمیایی امکان‌پذیر ساخت. همچنین، کشف فناوری ویرایش ژنگانی، سودمندی روش مهندسی ژنتیک را ارتقاء داده است. به گونه‌ای که انتظار می‌رود بسیاری از مسیرهای متابولیکی در گیاهان را بتوان به سوی تولید متابولیت‌های دارویی یا سازگاری بهتر با تغییر شرایط اقلیمی هدایت کرد.

منابع

- حیدری جابلقی، رضا؛ دورانی، ابراهیم. (۱۳۹۵). گیاهان اصلاح شده ژنتیکی: نگرانی‌ها و واقعیت‌ها. *مجله /یمنی زیستی*، ۹(۴)، ۱۰۳-۱۲۶.
- یزدی صمدی، بهمن؛ ولیزاده، مصطفی. (۱۳۹۰). ژنتیک از دیدگاه ملکولی (ترجمه). چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران.
- Abdel-Hadi, A.M., Caley, D.P., Carter, D.R. & Magan, N. (2011). Control of aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* using RNA silencing technology by targeting aflD (nor-1) gene. *Toxins*, 3(6), 647-659.
- Acquaah, G. (2012). Principles of Plant Genetics and Breeding (Sec.ed.). Wiley –Blackwell, USA. Pp 442.
- Adhikari, P. & Poudel, M. (2020). CRISPR-Cas9 in agriculture: Approaches, applications, future perspectives, and associated challenges. *Malaysian Journal of Halal Research*, 3(1), 6-16.
- Asmamaw, M. & Zawdie, B. (2021). Mechanism and applications of CRISPR/Cas-9-mediated genome editing. *Biologics: Targets and Therapy*, 353-361.
- Badigannavar, A. M. & Mondal, S. (2023). Advances in mutation breeding of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). In: Mutation breeding for sustainable food production and climate resilience (pp. 487-519). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Bado, S., Forster, B.P. Nielen, S., Ali, A.M., Lagoda, P.J., Till, B.J. & Laimer, M. (2015). Plant mutation breeding: current progress and future assessment. *Plant Breeding Reviews*, 39, 23-88.
- Barkley, N.A. & Wang, M.L. (2008). Application of TILLING and EcoTILLING as reverse genetic approaches to elucidate the function of genes in plants and animals. *Current Genomics*, 9(4), 212-226.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature*, 431, 365-363.
- Bortesi, L. & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33(1), 41-52.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. (2006). The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genetics*, 22(5), 268-280.
- Brown, T.A. (2012). Introduction to genetics: A molecular approach. Garland Science. USA, N.Y.
- Burke, E.J., Brown, S.J. & Christidis, N. (2006). Modeling the recent evolution of global drought and projections for the twenty-first century with the Hadley Centre climate model. *Journal of Hydrometeorology*, 7(5), 1113-1125.
- Cheng, X., Li, H., Tang, Q., Zhang, H., Liu, T. & Wang, Y. (2024). Trends in the global commercialization of genetically modified crops in 2023. *Journal of Integrative Agriculture*, 23(12), 3943-3952.
- Cook, R.J. (2000). Agricultural biotechnology and the poor: *Proceeding of an international conference*, Washington D.C. 21-22 Oct. 1999. Science based risk assessment for the approval and use of plants in agricultural and other environments.
- Crow J.F. & Kimura M. (2009). *An introduction to population Genetics theory*. Blackburn Press.
- Escobar, M.A., Civerolo, E.L., Summerfelt, K.R. & Dandekar, A.M. (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(23), 13437-13442.
- Ferber, D. (1999). Risks and benefits: GM crops in the cross hairs. *Science* 286, 1662-1666.
- Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S. *et al.* (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80(15), 4803-4807.
- Gao, J., Wang, G., Ma, S., Xie, X., Wu, X. *et al.* (2015). CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 87, 99-110.
- Griffith, A. F., Miller, J. H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C., Gelbart, W.M. *et al.* (2000). An introduction to genetic analysis. W.H. Freeman and Company. N.Y.
- Heidari-Japelaghi, R., Haddad, R., Valizadeh, M., Dorani-Uliaie, E. & Jalali-Javaran, M. (2024). Measurement of transgene copy number in transgenic tobacco plants producing human interferon- γ (hIFN- γ) using quantitative real-time PCR. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 33, 129-143.

- Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E. & Jalali-Javaran, M. (2019). Elastin-like polypeptide fusions enhance transient expression of human IFN- γ in tobacco leaves. *South African Journal of Botany*, 125, 321-328.
- Heidari-Japelaghi, R., Valizadeh, M., Haddad, R., Dorani-Uliaie, E. & Jalali-Javaran, M. (2020). Fusion to elastin-like polypeptide increases production of bioactive human IFN- γ in tobacco. *Transgenic Research*, 29, 381-394.
- Hsu, P.D., Lander, E.S. & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Ibiza, V.P., Cañizares, J. & Nuez, F. (2010). EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics*, 11, 1-15.
- Ismail, A.A. & Papenbrock, J. (2015). Mycotoxins: producing fungi and mechanisms of phytotoxicity. *Agriculture*, 5(3), 492-537.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. & Weeks, D.P. (2013). Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41, 1-12.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Karthikeyan, A., Deivamani, M., Shobhana, V.G., Sudha, M. & Anandhan, T. (2013). RNA interference: evolutions and applications in plant disease management. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46(12), 1430-1441.
- Kashtwari, M., Mansoor, S., Wani, A.A., Najar, M.A., Deshmukh, R.K. *et al.* (2022). Random mutagenesis in vegetatively propagated crops: opportunities, challenges and genome editing prospects. *Molecular Biology Reports*, 49(6), 5729-5749.
- Knott, G.J. & Doudna, J.A. (2018). CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 361, 866-869.
- Ma, L., Kong, F., Sun, K., Wang, T. & Guo, T. (2021) From classical radiation to modern radiation: past, present, and future of radiation mutation breeding. *Frontiers Public Health*, 9:768071.
- Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y. *et al.* (2015). A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Molecular Plant*, 8(8), 1274-1284.
- Majumdar, R., Rajasekaran, K. & Cary, J.W. (2017). RNA interference (RNAi) as a potential tool for control of mycotoxin contamination in crop plants: concepts and considerations. *Frontiers in Plant Science*, 8, 200.
- Mantri, N., Patade, V., Penna, S., Ford, R. & Pang, E. (2012). Abiotic stress responses in plants: present and future. *Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability*, 1-19.
- McCallum, C.M., Comai, L. & Greene, E.A. (2000). Targeted screening for induced mutation. *Nature Biotechnology* 18(4), 455-457.
- Petrova, N.S., Zenkova, M.A. & Chernolovskaya, E.L. (2013). Structure-functions relations in small interfering RNAs. *Practical Applications in Biomedical Engineering*.
- Reis, S.P.D., Lima, A.M. & De Souza, C.R.B. (2012). Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8628-8647.
- Singh, L., Schoen, A., Mahlandt, A., Chhabra, B., Steadham, J. *et al.* (2019). Development of targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) populations in small grain crops by ethyl methanesulfonate mutagenesis. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (149), e59743.
- Song, G., Jia, M., Chen, K., Kong, X., Khattak, B., Xie, C., Li, A. & Lang, M. (2016). CRISPR/Cas9: a powerful tool for crop genome editing. *The Crop Journal*, 4(2), 75-82.
- Tigchelaar, M., Battisti, D.S., Naylor, R.L. & Ray, D.K. (2018). Future warming increases probability of globally synchronized maize production shocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 115(26), 6644-6649.
- Timmusk, S., Behers, L., Muthoni, J., Muraya, A. & Aronsson, A.C. (2017). Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement. *Frontiers in Plant Science*, 8, 49.

- Touzdjian Pinheiro Kohlrausch Távora, F., de Assis dos Santos Diniz, F., de Moraes Rêgo-Machado, C., Chagas Freitas, N., Barbosa Monteiro Arraes, F. *et al.* (2022). CRISPR/Cas-and topical RNAi-based technologies for crop management and improvement: Reviewing the risk assessment and challenges towards a more sustainable agriculture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 913728.
- Vacheron, J., Desbrosses, G., Bouffaud, M.L., Touraine, B., Moënné-Loccoz, Y. *et al.* (2013). Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontiers in Plant Science*, 4, 356.
- Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J. *et al.* (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology*, 32(9), 947-951.
- Yali, W. & Mitiku, T. (2022). Mutation breeding and its importance in modern plant breeding. *Journal of Plant Science*, 10(2): 64-70.
- Ye, X., Al-Babili, S., Kloti, A., Zhang, J., Lucca, P. *et al.* (2000). Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287(5451), 303-305.
- Zhou, H., Liu, B., Weeks, D.P., Spalding, M.H. & Yang, B. (2014). Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Research*, 42(17), 10903-10914.

Application of Biotechnology Methods in Plant Breeding and Sustainable Agricultural Production

M. Valizadeh¹ and R. Heidari-Japelaghi²

Producing sufficient and healthy food has always been an important issue in every country. Advances of biotechnology in the past and present centuries have enabled agricultural researchers to produce environmentally friendly and high-yielding crops and by understanding the beneficial products in different organisms and mastering how gene and cell function in plants, they have provided the necessary tools to transfer beneficial genes to these crops. As a result, an inevitable tool has emerged in plant breeding to produce plants that are more tolerant to biotic and abiotic stresses with higher yields. Currently, biotechnology has also been recognized as a useful technology in minimizing the effect of chemical toxins in contaminating the environment and food. Therefore, despite the important scientific and social challenges in all fields of biotechnology, this review briefly discusses early biotechnology advances such as the use of mutagenesis in plant breeding, which its application began in the first half of the twentieth century, followed by a brief look at the application of genetic engineering methods developed in the second half of the century and finally, newer molecular methods such as CRISPR-Cas9 technology, which can be used to disrupt, correct, or regulate gene expression in agricultural and horticultural cultivars. The advantages and disadvantages of each of these methods are also discussed. The most important advantages of application of mutagenesis in plant breeding, genetic engineering, and CRISPR-Cas9 technology are increasing genetic diversity, inserting useful genes and reducing the time to breed cultivars, and editing a genome at a low cost, respectively. However, these methods also have limitations, which include the possibility of genomic instability and time-consuming, the retention of bacterial selectable markers and reporter genes and gene escape and the applicability of genome editing for somatic cells, respectively.

Key Words: Forward genetics, Genetic engineering, Genome editing, Reverse genetics.

1. Corresponding Author Email: mvalizadeh@tabrizu.ac.ir

2. Professor of University of Tabriz, Tabriz (Fellow Member of I.R. Academy of Sciences) and Instructor of Imam Khomeini International University, Qazvin, respectively.