Archive of SID

Crop Biotech.
Spring (2018) 21: 71-79.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیست‌ویکم، بهار ۱۳۹۷ (۷۹-۷۱)

مقاله علمی-مروری

ویرایش ژنوم در راستای تغییر رنگ گل با استفاده از تکنولوژی کریسپر

معصومه فلاح‌زیارانی[۱]، مسعود توحیدفر[۲*]

۱. دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده علوم زیستی و زیست‌فناوری دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم زیستی و زیست‌فناوری دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۱۲)

Genome editing for Change the color of the flower using crispr technology

Masoumeh Fallah Ziarani[1], Masoud Tohidfar[2*]
1. Ph.D. student of Plant Biotechnology, Department of Plant Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
2. Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, College of Life Science and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
(Received: Jan. 13, 2018 - Accepted: Jun. 2, 2018)

چکیده

امروزه تغییر رنگ گل به دلیل اهمیت تجاری آن یکی از اهداف محققان است. با ایجاد تنوع در رنگ گلبرگ گیاهان زینتی می‌توان درآمدزایی بالایی برای کشور ایجاد کرد و راه را برای صادرات آن به سایر نقاط دنیا هموار کرد. در گذشته به روش سنتی و مهندسی ژنتیک تلاش‌هایی در راستای تغییر رنگ صورت گرفته است، اما با کندی همراه بوده است. با کشف سیستم کریسپر امکان ایجاد تغییرات هدفمند در سطح ژنوم سرعت بیشتری بخود گرفت. برای ایجاد تغییر بوسیله‌ی کریسپر باید ژن مورد نظر و ناحیه هدف شناسایی شود که اینکار بوسیله‌ی ابزار بیوانفورماتیک قابل انجام است. تغییر مورد نظر از طریق طراحی gRNA اعمال می‌شود. در ادامه پروتئین طبیعی و پروتئین جهش یافته عملکردشان بررسی خواهد شد. امروزه به منظور افزایش کارایی سیستم کریسپر از روش donor DNA استفاده می‌شود. در این سیستم با عمل نوترکیبی همولوگ می‌توان کارایی کریسپر را در راستای جایگزینی ژن سالم و یا خاموشی آن افزایش داد و از ایجاد تغییرات غیر اختصاصی در ژنوم جلوگیری کرد.

واژه‌های کلیدی: تغییر رنگ گل، کریسپر، مهندسی ژنتیک.

Abstract

Today, Change the color of the flower due to its commercial importance is one of the goals of the researchers. Creation of the variation in flower color of ornamental plants can be highly profitable for the country and facilitate the way for export to other parts of the world. In the past, efforts have been do in the traditional way and genetic engineering for change the color of the flower, but with slowdown. With the discovery of Crispr's system, the ability to make targeted changes at the genome level took less time. In order to target change by Crispr, the target gene and area must be identified, that is done by bioinformatic tools. The desired change through the design of gRNA is done. In following, the normal protein and mutated protein were checked for the function. Today, donor DNA is used to enhance the performance of the Crispr system. In this system, by homologous recombination can be enhanced Crisper's performance by replaces a prevented the creation healthy gene or knocked out and .of non-specific changes in the genome

Keywords: Chang the color of flower, CRISPR, genetic engineering.

* نویسنده مسئول:
E-mail: m_tohidfar@sbu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

مصرف جهانی گل و گیاهان زینتی بالغ بر ۲۰۰ میلیارد دلار است. از آنجا که ایجاد صفات جدید موتور محرک صنعت گل و گیاهان زینتی محسوب می‌شود، تلاش‌های زیادی جهت استفاده از روش‌های نوین بیوتکنولوژی جهت تولید ارقام جدید انجام گرفته است. رنگ گل یکی از ویژگی‌های مهم در صنعت گل و گیاهان زینتی است. در این میان ایجاد رنگ‌هایی که در حالت طبیعی در گل‌ها وجود ندارد از اهمیت خاصی برخوردار است. تولید رنگ‌های منحصر به فرد که از طریق روش‌های مرسوم اصلاحی سنتی قابل دستیابی نبوده، همیشه آرزوی محققان بوده است. تولید ارقام با رنگ جدید منجر به افزایش ۱۰ تا ۳۰ برابری قیمت هر شاخه یا گلدان گل خواهد شد (Adnani, 2015; Alvani, 2004).

ارزش میزان مصرف کل گل و گیاهان زینتی تولید شده در ایران بیش از ۵۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود (Jafari, 1998; Pakzad, 2000). آمار واردات گل‌های شاخه‌بریده به‌طور رسمی وجود ندارد. اما میزان واردات انواع گیاهچه‌ها، پیاز گل، بذر، بونسای، ارکیده و بامبوها در سال ۲۰۱۴ بیش از ۱۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود (Adnani, 2015). لذا معرفی ارقام جدید با رنگ‌های منحصر بفرد ضمن کاهش میزان واردات و صرفه‌جویی ارزی، راه را برای آغاز صادرات این محصولات مهم هموار خواهد نمود (Rahmatizade, 1999). با تغییر رنگ گل می‌توان به سودآوری بالایی دست یافت. تاکنون در دنیا تلاش‌هایی برای ایجاد تنوع در رنگ گل‌هایی مانند رز، نیلوفر پیچ، ژربرا، داوودی و لیلیوم انجام شده است که بعضی از آنها موفقیت‌آمیز بوده‌اند، اما با کندی همراه بوده است (Rahmatizade, 1999). در ابتدا محققان با استفاده از جهش سعی در ایجاد رنگ‌های جدید برآمدند که چندان موفقیت آمیز نبود. علت آنرا می‌توان به تغییرات تصادفی و غیر هدفمند بودن آن نسبت داد، به‌عنوان مثال با استفاده از اشعه‌ی فرابنفش جهش‌هایی در گیاهان ایجاد کردند، اما نتایج قابل توجهی به‌دست نیامد (Cong, 2013). در ادامه با پیشرفت‌هایی درحوزه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک این تغییرات هدفمندتر شد، به‌طوری‌که با استفاده از مهندسی ژنتیک به موفقیت‌هایی دست یافتند. به عنوان نمونه انتقال ژن *DFR* از ذرت، ژبرا و رز به اطلسی باعث تولید رنگ قرمز در اطلسی شده است. از نمونه‌های دیگر می‌توان به تولید رنگ قرمز در یاس زرد، تولید رنگ قرمز در گیاه جنتیانا با خاموش‌سازی ژن *F3H* اشاره کرد. بعلاوه گیاهان تراریخته‌ی تورنیا حاوی کاهش بیان ژن *F3H* و افزایش بیان ژن *DFR* نیز گل‌هایی به رنگ صورتی تولید کردند. چالکون‌ها از طریق آنزیم آئروسیدین سنتاز منجر به تولید رنگ‌های زرد در گیاه تورنیا شدند. از طریق ورود *CHR* گیاه یونجه به اطلسی گل سفید، رنگ گل از سفید به زرد کمرنگ تغییر پیدا کرد. بیان ژن‌های *AMAS1* و *AM4CTG* گیاه گل میمون و خاموشی ژن‌های *F3H* و *DFR* منجر به تولید گل‌های زرد در گیاهان تورنیای تراریخته شدند. بیان ژن بتاکاروتن کتولاز باکتریایی باعث تولید گل‌های نارنجی به جای زرد شد. خاموشی ژن *dfr* رز و بیان مشترک ژن *F3H* اطلسی و *DFR* زنبق باعث تولید رز گل آبی شد و همین ترکیب ژنی باعث تولید میخک گل آبی، لیلیوم و بفشه شد. در گیاه تورنیا و جنتیانا، خاموشی ژن *CHS* و *ASN* باعث تولید گل‌هایی با رنگ سفید شدند. به‌علاوه خاموشی ژن *CHS* منجر به تولید گل‌هایی به رنگ سفید شد (Jafari, 1998).

اما وجود چالش‌های از جمله جایگیری تصادفی قطعات وارد شده و عدم کنترل تعداد نسخه‌های ژنی در حوزه مهندسی ژنتیک باعث شد تا دانشمندان از روش‌های جدیدی همچون کریسپر استفاده کنند. در این روش نه تنها مشکلات قبلی وجود نداشت بلکه می‌توان به‌طور اختصاصی در محل مورد نظر در روی

www.SID.ir

Archive of SID

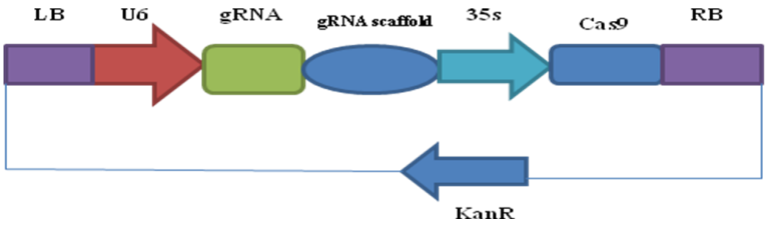
ژنوم تغییر هدفمند را اعمال کرد و همین موضوع باعث شد تا این سیستم جایگاه خاصی در دستکاری ژنتیکی اصلاح گل‌های زینتی به‌ویژه تغییر رنگ گل پیدا کند (Chen, 2017).

طراحی وکتور برای ویرایش ژنوم

سیستم کریسپر از سال ۲۰۱۲ به منظور تغییر در صفات مورد نظر مورد استفاده قرار گرفته است. این سیستم بدون دخالت DNA خارجی و با هدف قرار دادن ناحیه‌ی کوتاه هدف در ژنوم باعث تغییر در ناحیه‌ی مورد نظر و در نتیجه تغییر در صفت هدف می‌شود. این سیستم در سال ۱۹۸۷ کشف شد بعدها مشخص شد که نقش سیستم ایمنی در باکتری‌ها را بر علیه ویروس به عهده دارد. بعدها دانشمندان به این نتیجه رسیدند که از این سیستم می‌توان در ویرایش ژنوم استفاده کرد (Cong, 2013).

در مرحله اول به منظور تغییر ژنوم از طریق کریسپر، لازم است وکتور مناسب طراحی شود. این وکتور باید حاوی سه قسمت tracrRNA، Cas9 و gRNA (توالی هدف ۲۳-۱۷ نوکلئوتیدی) باشد. این ناحیه بر اساس منطقه‌ای از ژنوم که می‌خواهیم در آن تغییر ایجاد شود، طراحی می‌شود. جزء دیگر در وکتور، پروتئین Cas9 است که به‌وسیله‌ی دو دومین برشی‌اش و توانایی شناسایی PAM، به منظور برش در ناحیه‌ی مورد نظر عمل می‌کند. این ناحیه نقش کلیدی در ویرایش و تغییرات مورد نظر دارد. Casها بر اساس موجودی که از آن جدا شده است PAMهای مختلف را شناسایی می‌کنند. PAMهای قابل شناسایی توسط Cas9، توالی سه نوکلئوتیدی NGG و NAG می‌باشند. در ابتدای gRNA پروموتر U3 یا U6 قرار می‌دهند که معمولاً از آرابیدوپسیس تالیانا گرفته شده است (شکل ۱) (Iwasaki, 2006).

یکی از راه‌هایی که به منظور افزایش بیان gRNA استفاده می‌شود، پروموتورها است. اگر از پروموتر U3 استفاده شود قبل از gRNA، باید نوکلئوتید A و اگر از پروموتر U6 استفاده شود، نوکلئوتید G اضافه شود. انجام این تغییر موجب افزایش بیان gRNA و بالا رفتن کارایی سیستم می‌شود. پروموترهایی هم که برای Cas9 مورد استفاده قرار می‌گیرند معمولاً شامل پروموترهای یوبیکوئیتین یا پروموتر 35s CaMV هستند (Imai, 1938). gRNA طراحی شده در فاصله‌ی بین پروموتر U3 یا U6 و scaffold gRNA قرار می‌گردد که این فاصله معمولاً بین ۱۲ تا ۲۷ نوکلئوتید است. علاوه بر کلون‌سازی این سه قسمت، قسمت‌های دیگری هم وجود دارد که در کارایی وکتور نقش دارند که در زیر به آن اشاره شده است (شکل ۲) (Inagaki, 1994; Iwasaki, 2006).



شکل ۱. اجزای کلی وکتورکریسپر به منظور ویرایش ژنوم

شکل ۲. اجزای به کار برده شده در وکتور به منظور افزایش کارایی وکتور

www.SID.ir

Archive of SID

عناصر SV40، 3xFLAG و intron از اجزای دیگری هستند که به منظور افزایش کارایی سیستم و بیان در وکتور در نظر گرفته می‌شوند. 3xFLAG از ترکیب سه اپی‌توپ FLAG از ۲۲ اسید آمینه‌ی مشخص به منظور افزایش کارایی تشکیل شده و ترکیبی آب‌دوست است. FLAG یک سیستم بیانی در وکتور است که باعث تشخیص فوق حساس پروتئین‌های نوترکیب می‌شود. SV40[1] یک پلیموویروس است که درمیمون‌ها، انسان‌ها و پرندگان شناسایی شده است و به منظور القای بیان ژن استفاده می‌شود (Jinek, 2012).

همچنین از نشانگرهایی مانند هیگرومایسین و مقاومت به کانامایسین بر حسب نوع گیاه می‌توان به عنوان نشانگر استفاده کرد. از اجزای دیگر که باعث افزایش کارایی وکتور مورد نظر می‌شود می‌توان به فسفومانوز ایزومراز (PMI)[2] اشاره کرد. PMI به منظور تسهیل در کارایی وکتور به منظور بهبود ویرایش ژنوم و باززایی گیاهان استفاده می‌شود (Hoshino, 2016). فسفومانوز ایزومراز باعث تسهیل تغییر فروکتوز -۶- فسفات و مانوز -۶- فسفات در داخل سلول می‌شوند که این عمل باعث بهبود تقسیم سلول‌ها و رشد بهتر گیاه می‌شود. به منظور بهبود تقسیم سلولی در گیاهان، پروتئین توسعه‌دهنده‌ی تخمدان (ODP2) و WUSCHEL (WUS) که پروتئین مورد نیاز در گسترش مریستم ساقه است، نیز استفاده می‌شود (Kenta, 2017).

در بعضی تحقیقات مشخص شده است قرار دادن دو پروموتر 35S پشت سر هم قبل از Cas9 باعث افزایش بیان و افزایش کارایی ویرایش می‌شود (Kikuchi, 2005). هنگام استفاده از پروموتر U3 و U6 در ابتدای gRNA باید به این نکته توجه شود که در توالی gRNA نباید بیشتر از دو نوکلئوتید T به‌طور متوالی وجود داشته باشد. زیرا اگر بیش از دو نوکلئوتید T به‌طور متوالی باشد، ممکن RNA پلی‌مراز از روی آن لیز بخورد و باعث نسخه‌برداری ناقص شود (Kitazawa, 2005).

نکته‌ی دیگری که باید به آن توجه شود هنگام استفاده از پروموتر U6 باید به ابتدای gRNA طراحی شده نوکلئوتید G و برای پروموتر U3 به اول gRNA، نوکلئوتید A اضافه شود. تحقیقات ثابت کرده است که این کار باعث باعث افزایش کارایی رونویسی توالی راهنما و ویرایش می‌شود (Li, 2016).

ویرایش ژنوم در راستای تغییر رنگ گل

به منظور تغییر در صفت خاص، در مرحله اول، باید ژن کنترل‌کننده صفت را در ژنوم هدف شناسایی کرد. این شناسایی به‌وسیله‌ی ابزار بیوانفورماتیکی صورت می‌گیرد. پس از شناسایی ژن مربوطه باید مشخص کرد که با تغییر چه نوکلئوتید و بدنبال آن چه اسیدآمینه‌هایی صفت مورد نظر حاصل می‌شود. برای این منظور می‌توان با ایجاد جهش در ژن مورد نظر و بررسی پروتئین‌های تولید شده به این نتیجه رسید که کدام تغییر باعث ایجاد صفت مورد نظر می‌شود. در ادامه، عملکرد پروتئین مورد نظر بعد از جهش بررسی می‌شود. سپس از ناحیه‌ی مورد نظر که تغییر باید در آن ناحیه صورت گیرد، gRNA طراحی می‌شود و داخل وکتور حاوی Cas9 کلون شده و بوسیله‌ی اگروباکتریوم یا تفنگ ژنی به بافت مورد نظر منتقل می‌شود. بعد از انتقال، ناحیه‌ی مورد نظر، به منظور بررسی تغییرات صورت گرفته آنالیز می‌شود. برای تغییر رنگ گل، معمولاً ژن تولیدکننده‌ی آنتی‌سیانین در گیاه به عنوان هدف انتخاب می‌شود. این ژن در بیوسنتز آنتوسیانین نقش دارد که در حالت معمولی، منجر به رنگ ارغوانی می‌شود (Morita, 2014). آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن دارای ۶ اگزون است و جهش در

1. Simian vacuolating virus 40
2. Phosphomannose isomerase

www.SID.ir

Archive of SID

اگزون چهارم باعث تغییر رنگ گل ارغوانی به سفید می‌شود. gRNA با طول ۲۰ نوکلئوتید باید به نحوی در اگزون چهارم طراحی شود که منجر به تغییر هدفمند شود. در ادامه آنالیزها، مشخص شد که حفظ پرولین ۱۹۰ و ۱۹۵ و حذف لوسین ۱۹۷ در این آگزون منجر به تغییر مورد نظر خواهد شد (Nitasaka, 2003). نتایج آنالیز کریستالوگرافی آشکار کرد که حفظ پرولین ۱۹۰ و پرولین ۱۹۵ و همچنین حذف لوسین ۱۹۷ برای برهمکنش flavonol با nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP+) ضروری است که نتیجه آن منجر به تولید پروتئینی می‌شود که در نهایت باعث تغییر رنگ گلبرگ می‌شود (شکل‌های ۳ و ۴).

به منظور بررسی اینکه آیا با حذف اسید آمینه‌ی لیزین در موقعیت ۱۹۷ تغییری در پروتئین تولید شده بوسیله‌ی ژن هدف ایجاد می‌شود یا نه، عملکرد دو پروتئین اولیه و پروتئین تغییر یافته بررسی شد و نتایج نشان داد که با حذف لیزین هیچ تغییری در عملکرد پروتئین تولید شده ایجاد نخواهد شد، اما این حذف باعث تغییر در رنگدانه‌ی آنتی‌سیانین و در نتیجه تغییر در رنگ گلبرگ می‌شود ولی باعث تغییر در کارکرد کلی پروتئین نمی‌شود. این آنالیز بوسیله‌ی سایت blocks (http://blocks.fhcrc.org/blocks) انجام شد (شکل‌های ۵ و ۶) (Ono, 2000).

atgtattttgcatccaagacactggcggagaaggaagcatggaaagcagccaaagaaaa
gcagattgagttcatcagcatcataccaccactagtcattggcccattcctcataccaacatt
cccactcagccttgtcactgcactctcaccaataatgg

شکل ۳. اگزون چهارم ژن هدف، قسمتی از توالی نوکلئوتیدی که باید تغییر کند در کادر به رنگ آبی مشخص شده است. سه نوکلئوتید ctc (کد کننده‌ی لوسین) حذف (رنگ آبی) و دو سری از نوکلئوتید cca (کدکننده‌پرولین) (رنگ بنفش) موجود در توالی حفظ شود.

```
>BAA59332.1 dihydroflavonol 4-reductase [Ipomoea nil]
MVGGNHTPASPAPTVCVTGAAGFVGSWLVMKLLQRGYIVHATVRDPGNAQKVKHLLELPKGEGKLKVWKG
VLEEEGSFDEAIAGCEGVFHVAAAVNFASKDPENEVIKPAVKGILSIINSCAKAKTVKKLVFTSSTAAVH
IKETQQLEYDESSWSDLDFIYANKMGGWMYFASKTLAEKEAWKAAKEKQIEFISIIPPLVIGPFLIPTFP
LSLVTALSPIMGNGLHHNIIKQGKFVHLDDLCEAQIFLYQHPKAGGRFICSSHHATIHDVAKMIRHNWPE
YYVPSEFKGIEKELPIVSFSSKKLQEMGFQFKYTLEDMYKGAIETLRKKGLLPYSTKEPADIEQEQHSGK
EPKS
```

شکل ۴. پروتئین تولید شده توسط ژن هدف، دو پرولین ۱۹۰ و ۱۹۵ که باید حفظ شوند و لوسین ۱۹۷ که باید حذف شود در کادر سبز رنگ مشخص شده است.

Family		Strand	Blocks	Combined E-value
IPB001509	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1	4 of 5	4e-19
IPB002225	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	1	2 of 5	2.6e-13

شکل ۵. نتایج blocks بدون حذف سه نوکلئوتید مورد نظر

Family		Strand	Blocks	Combined E-value
IPB001509	NAD-dependent epimerase/dehydratase	1	4 of 5	4e-19
IPB002225	3-beta hydroxysteroid dehydrogenase	1	2 of 5	2.6e-13

شکل ۶. نتایج blocks با حذف سه نوکلئوتید مورد نظر

www.SID.ir

Archive of SID

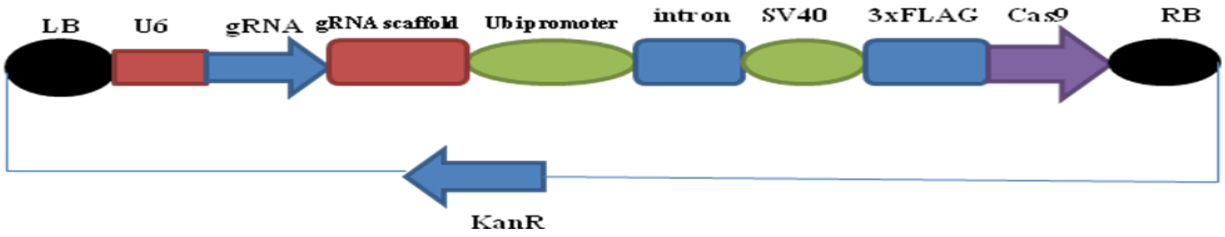
همان‌طورکه در شکل‌های ۵ و ۶ آورده شده است، حذف لیزین هیچ تغییری در کارکرد اصلی پروتئین ایجاد نکرده است و دومین‌های هر دو پروتئین وظیفه‌ی اپیمرازی/ دهیدراتازی دارند.

مرحله بعد طراحی gRNA از منطقه مورد نظر ژن هدف است (Puchta, 2014). gRNAی مناسب در ناحیه‌ای که باید در آن قسمت تغییر مورد نظر صورت گیرد طراحی می‌شود (She, 2017). به منظور بررسی اختصاصیت gRNA طراحی شده، لازم است gRNA بر روی ژنوم کامل گیاه هدف بلاست شود (Shibuya, 2014). چنانچه gRNA طراحی شده به‌طور کاملاً اختصاصی فقط به ناحیه‌ی مورد نظر متصل شود می‌توان نتیجه گرفت احتمال تغییر در سایر قسمت‌های ژنوم بعید است در غیر این‌صورت محل طراحی gRNA باید تغییر کند. در ادامه، کلون‌سازی gRNA طراحی‌شده در وکتور مناسب، بین پروموتر U6 و gRNA scaffold صورت می‌گیرد (شکل ۷) (Suzuki, 2003).

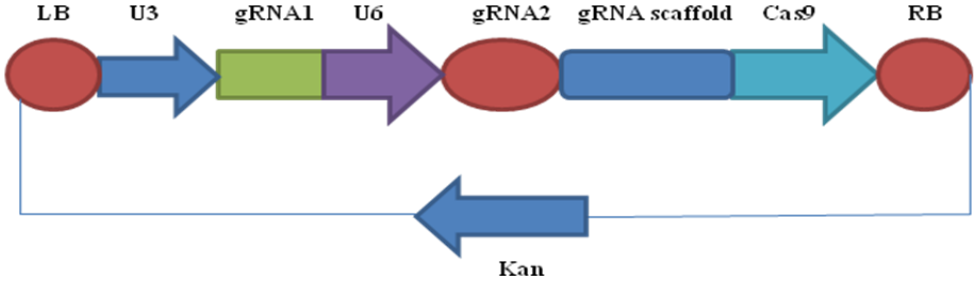
وکتور نوترکیب به‌وسیله‌ی اگروباکتریوم به گیاه هدف منتقل می‌شود تا تغییر مورد نظر را در قسمتی از توالی که تغییر باید در آن صورت گیرد ایجاد کند و پس از باززایی گیاه، آنالیزهای مورد نظر انجام می‌شود.

علاوه بر موارد اشاره شده، به منظور کارایی بالا در ویرایش ژنوم، می‌توان سیستم را به سمت نوترکیبی همولوگ سوق داد تا بتوان فراوانی جهش‌های هدفمند را افزایش داد (Wiedenhefi, 2012). این سیستم که نیاز به طراحی DNA donor دارد، برای انجام آن، از دو طرف محل ویرایش، دو gRNA طراحی می‌شود و این دو gRNA درون وکتوری که حاوی Cas9 و gRNA scaffold است کلون‌سازی می‌شوند (شکل ۸).

مرحله بعد که طراحی donor DNA است، ابتدا توالی هدف با تغییرات لازم به همراه دو gRNA طراحی شده در وکتور donor کلون می‌شود (شکل ۹). در نهایت دو وکتور حاوی gRNA و Cas9 و donor وکتور طراحی شده به گیاه هدف به منظور ویرایش هدفمند منتقل می‌شوند. این سیستم باعث می‌شود تا در نتیجه عمل نوترکیبی قطعه‌ی هدفمند با قطعه روی کروموزوم جایگزین شود و تغییر مورد نظر با کارایی بالا اتفاق افتد.



شکل ۷. کلون‌سازی gRNA طراحی شده بین پروموتر و gRNA scaffold

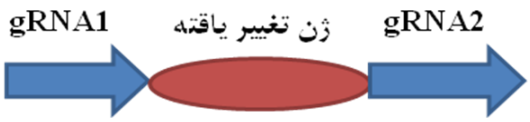


شکل ۸. وکتور حامل دو

www.SID.ir

Archive of SID

gRNA



شکل ۹. Donor وکتور حامل ژن تغییر یافته

کارایی استفاده از سیستم donor بیشتر از سیستم اول است (Yamazaki, 2009). سیستم donor به عنوان تکنیک جدید می‌تواند در افزایش بهره‌وری سیستم کریسپر مؤثر باشد. مطالعات انجام شده نشان داد که کارایی سیستم donor به طور چشمگیری بیشتر از کارایی سیستم بدون donor می‌باشد (Zhang, 2016).

بحث

امروزه از سیستم کریسپر می‌توان برای تغییر در هر صفتی به طور دقیق استفاده نمود که البته این مستلزم پیشرفت در کشت بافت نیز می‌باشد. یکی از صفاتی که به تازگی مورد توجه قرار گرفته است، صفت تغییر رنگ گل می‌باشد. تنوع در رنگ گل به جهت زیبایی و جلب توجه به منظور صادرات و اهمیت اقتصادی آن قابل توجه می‌باشد (Kenta, 2017).

تنوع رنگ گل‌ها در طبیعت زیاد نیست، چون تنوع در حالت طبیعی به‌وسیله‌ی جهش ایجاد می‌شود که این بسیار محدود است و بعید است که صفت مورد نظر در اثر جهش ایجاد شود. با پیشرفت علم و کشف مهندسی ژنتیک و آنزیم‌های برشی، محققان به فکر تغییر رنگ گل با استفاده از مهندسی ژنتیک افتادند، اما این روش به علت تغییرات غیر هدفمند نیز موفقیت زیادی در پی نداشت (Fukada, 2000).

به منظور رفع معایب گفته‌شده روش نوین کریسپر استفاده شد. در این روش دقیقا در ناحیه‌ای که هدف مورد نظر است تغییر ایجاد می‌شود، مشکلات روش قبلی را ندارد و کارایی این روش بالاتر از روش‌های پیشین است و معایب روش‌های پیشین را ندارد. در روش کریسپر به منظور تغییر رنگ گل، باید توجه کرد که ژن تولید کننده آنتو سیانین DFR-B در لایه–های مریستمی قرار دارد. بافت مریستم از سه لایه شامل ۱. لایه‌ی اپیدرمی، ۲. لایه‌ی زیراپیدرمی و ۳. بافت‌های داخلی تشکیل شده است. نتایج نشان داد که تغییر در لایه‌ی اپیدرمی تغییر رنگ در گلبرگ و ساقه را ایجاد می‌کند، اما جهش در لایه‌ی زیراپیدرمی باعث تغییر رنگ در ساقه و گلبرگ نمی‌شود (Puchta, 2017).

یکی از عوامل مهم در کارایی سیستم کریسپر وکتور و اجزاء آن است، به طوری که Jinrui Shi و همکاران در سال ۲۰۱۷ به منظور افزایش کارایی سیستم، در وکتور مورد استفاده از اجزای SV40 و اینترون بین پروموتر یوبی‌کوئیتین و Cas9 استفاده کردند. علاوه بر این Shi و همکاران از فسفومانوز ایزومراز که باعث تسهیل تغییر فروکتوز–۶– فسفات و مانوز –۶– فسفات در داخل سلول می‌شوند و همچنین از ODP2 و WUSCHEL در اجزاء وکتور به منظور افزایش توسعه رشد سلول و بهبود باززایی گیاهان می‌شوند، استفاده کردند که باعث افزایش کارایی سیستم به منظور تغییر در صفت مورد نظر شد (Shi, 2017). Xiugui Chen و همکاران (2017) نیز از همین اجزا در وکتور pRGEB32 به منظور انتقال به گیاه پنبه استفاده کردند که باعث شد کارایی سیستم بطور معنی‌داری افزایش یابد (Li, 2016). استفاده از دو پروموتر CaMV 35s قبل از Cas9 توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۶ بررسی شد. نتایج نشان داد استفاده از دو پروموتر 35s CaMV به جای یک پروموتر باعث افزایش کارایی ویرایش در Cas9 می‌شود (Chen, 2017).

Li و همکاران (2016) از سیستم donor DNA و همچنین طراحی gRNA از اینترون‌های سمت راست و چپ اگزون مورد نظر به منظور تولید گیاه

www.SID.ir

Archive of SID

مقاوم به علف‌کش استفاده کردند. آن‌ها اعلام کردند که کارایی استفاده از سیستم donor بالاتر از سیستم بدون donor می‌باشد (Li, 2016).

وقتی شکستگی در ژنوم رخ می‌دهد، سلول به صورت طبیعی به سمت ترمیم NHEJ هدایت می‌شود که باعث ایجاد خطا، حذف و اضافه شدن و ترمیم تصادفی در ژنوم سلول می‌شود. اما سیستم ترمیم دیگری نیز وجود دارد که به HR معروف است و بر اساس همولوژی با توالی آسیب دیده شروع به ترمیم می‌کند که همان نوترکیبی همولوگ است. در سیستم کریسپر سعی می‌شود به منظور افزایش دقت در کار از سیستم HR به وسیله‌ی طراحی donor DNA استفاده شود. به تازگی donor DNA به جای طراحی از نواحی اگزون، از نواحی اینترون طراحی می‌گردد که نتایج خوبی در پی داشته است (Li, 2016). نتایج تحقیقات اثبات کرده است کارایی استفاده از سیستم donor بالاتر از سیستم NHEJ می‌باشد (Morita, 2014).

به‌طورکلی، کارایی عملکرد سیستم کریسپر تا حد زیادی به طراحی وکتور و استفاده از اجزایی دارد که در وکتور بکار رفته است. هر کدام از این اجزا به نحوی باعث بالا رفتن عملکرد وکتور طراحی شده می‌شوند (Jinek, 2012). علاوه بر این، طراحی دقیق gRNA با هدف تغییر هدفمند، نیز می‌تواند در این کارایی مؤثر باشد (Kenta, 2017).

REFERENCES

Adnani S. M (2015) Ecological areas recognition scheme of the country, Qom and Arak area plant type. Research Institute of Forests and Rangelands, Iran.

Alvani SM, Rahmati MH (2008) Economic evaluation of the field creating business in the industry of flower and ornamental plant. The development of entrepreneurship. 1: 11–49.

Pakzad F (2000). The basic of measurement and Selection of Investment Projects. Publishing the Organization's program and budget, Iran.

Jafari SA (1998) Fundamentals of Engineering Economics. Publications University of Mazandaran, Iran.

Rahmatizade A (2001). Identification of saline region and saline plants of Qom areas. Iran's rangeland and desertification research. 21: 580-590.

Chen X, Lu X, Shu S, Wang S, Wang J, Wang D, Guo L, Ye W (2017) Targeted mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using the CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports. 109: 1105- 1114.

Cong L, Ran A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P, Wu X (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339**:** 819–823.

Fukada-Tanaka S, Inagaki Y, Yamaguchi T, Saito N, Iida S (2000) Color-enhancing protein in blue petals. Nature. 407: 569-581.

Iida S, Hoshino A, Johzuka-Hisatomi Y, Habu Y, Inagaki Y (1999). Floricultural traits and transposable elements in the Japanese and common morning glories. Ann. New York Acad. Sci. 870: 265–274.

Imai Y (2003) Analysis of flower colour in. Pharbitis Nil. J. Genet. 24: 203–224.

Imai Y (2001) Genetic literature of the Japanese morning glory. Jap. J. Genet. 14: 91–96.

Inagaki Y, Hisatomi Y, Suzuki T, Kasahara K, Iida S (1994) Isolation of a *Suppressor-mutator*/*Enhancer*-like transposable element, *Tpn1*, from Japanese morning glory bearing variegated flowers. Plant Cell. 6: 375-383.

Iwasaki S, Nitasaka E (2006) The *FEATHERED* gene is required for polarity establishment in lateral organs

www.SID.ir

Archive of SID

especially flowers of the Japanese morning glory (*Ipomoea nil*). Plant Mol. Biol. 62: 913–925.

Jinek M (2012) A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 337: 816–821.

Hoshino A (2016) Genome sequence and analysis of the Japanese morning glory *Ipomoea nil*. Nat. Commun. **7**, 13295-13295.

Kenta W, Anna K, Masaki E, Kimiyo S, Seiichi T, Michiyuki O (2017) CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis of the *dihydroflavonol-4-reductase-B (DFR-B)* locus in the Japanese morning glory *Ipomoea (Pharbitis) nil.* Scientific Reports. 10028: 10715- 729.

Kikuchi R, Sage-Ono K, Kamada H, Ono M (2005) Efficient transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* with a ternary plasmid in *Pharbitis nil*. Plant Biotechnol. 22: 295–302.

Kitazawa D (2005) Shoot circumnutation and winding movements require gravisensing cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 18742–18747.

Li J, Xiangbing M, Yuan Z, Kunling C, Huawei Z, Jinxing L, Jiayang L, Caixia G (2016) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR–Cas9. Nature Plants.139: 200- 207.

Morita Y (2014) A chalcone isomerase-like protein enhances flavonoid production and flower pigmentation. Plant J. 78: 294–304.

Nitasaka E (2003) Insertion of an *En/Spm*-related transposable element into a floral homeotic gene *DUPLICATED* causes a double flower phenotype in the Japanese morning glory. Plant J. 36: 522–531.

Ono M (2000) *Agrobacterium*-mediated regeneration and transformation of *Pharbitis nil*. Plant Biotechnol. 17: 211–216.

Puchta H (2017) Applying CRISPR/Cas for genome engineering in plants: the best is yet to come. Curr. Opin. Plant Biol. 36: 1–8.

Puchta H, Fauser F (2014) Synthetic nucleases for genome engineering in plants: prospects for a bright future. Plant J. 78: 727–741.

She J (2017) ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. Plant Biotechnology Journal. 15: 207–216.

Shibuya K, Shimizu K, Niki T, Ichimkura K (2014) Identification of a NAC transcription factor, EPHEMERAL1, that controls petal senescence in Japanese morning glory. Plant J. 79: 1044–1051.

Suzuki Y (2003) A dwarf mutant strain of *Pharbitis nil*, Uzukobito (*kobito*), has defective brassinosteroid biosynthesis. Plant J. 36: 401– 410.

Wiedenheft B, Sternberg S. H, Doudna J. A (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. Nature. 482: 331- 338.

Yamazaki Y (2009) NBRP databases: Databases of biological resources in Japan. Nucleic Acids Res. 38: D26-D32.

Zhang D, Li Z, Li JF (2016) Targeted gene manipulation in plants using the CRISPR/Cas technology. J. Genet. Genomics 43: 251–262.

www.SID.ir