تکنولوژی CRISPR-CAS و کاربرد آن در مرحله پس از برداشت گیاهان باغبانی

محمد فضلی*

تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۴

چکیده

امروزه توجه به مرحله پس از برداشت گیاهان باغبانی مورد توجه است. اصلاح ژنتیکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل این مرحله می‌باشد که می‌تواند ضایعات پس از برداشت را در محصولات باغبانی به صورت چشمگیری کاهش دهد. روش CRISPR-Cas یک روش ویرایش ژنوم است که از سیستم پروکاریوتی الگوبرداری شده است. این فناوری از مهم‌ترین و جدیدترین روش‌های اصلاح ژنتیک گیاهی است که می‌تواند در فناوری پس از برداشت کاربرد گسترده ای داشته باشد. از مهم‌ترین ویژگی این روش، عدم تاریخت کردن محصول است که اقبال بیشتری برای بازاریابی خواهد داشت. این فناوری امروزه در گستره‌ای از گیاهان باغبانی و زراعی و به‌ویژه سبزیجات با اهداف خاص مورد استفاده قرار گرفته است. اولین مطالعات این فناوری در گیاهان باغبانی، بر روی گوجه‌فرنگی انجام پذیرفت که تا به امروز نیز بیشترین مطالعات آن در گیاهان باغبانی، در همین گیاه بوده است. تا به امروز مهم‌ترین کاربردهای این روش در گوجه‌فرنگی، دستکاری ژن‌های مربوط به انواع مقاومت‌ها و همچنین افزایش عمر پس از برداشت آن بوده است.

واژه های کلیدی: اصلاح گیاهان، کریسپر، گیاهان باغبانی، ویرایش ژنوم

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: fazlimd@hotmail.com

مقدمه

افزایش ضایعات پس از برداشت پایداری محیط زیست را تهدید می‌کند؛ مخصوصا اینکه دو پدیده مهم در جهان درحال وقوع است؛ تغییرات آب و هوایی و رشد جمعیت. وجود این ضایعات به معنی استفاده ناکارآمد از سرمایه‌گذاری‌ها در بخش باغبانی است. اینگونه بیان می-شود که در ایالات متحده، ۷٪ از ضایعات پس از برداشت در میوه ها و سبزیجات، در مزرعه ایجاد می‌شود. همچنین ۱۷٪ آن در حین توزیع و ۱۸٪ آن در دست مصرف کننده تلف می‌شود (Shipman et al., 2021).

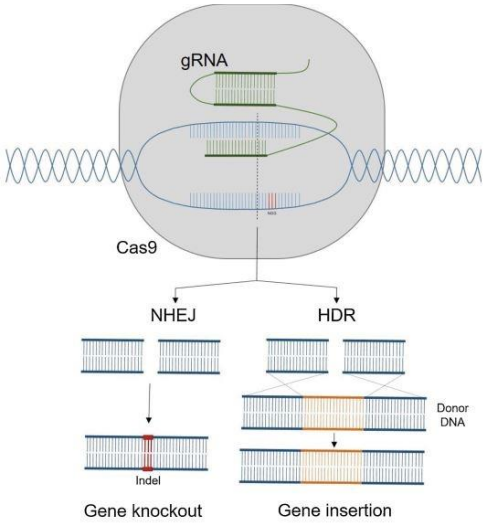
یکی از روش‌های کاهش ضایعات و بهبود ویژگی‌های پس از برداشت محصولات، اصلاح ژنتیکی آن‌هاست. این فرایند اصلاح می‌تواند توسط روش‌های مختلفی انجام شود که یکی از این روش‌ها، ویرایش ژنوم است (Genome editing). تکنولوژی ویرایش ژن می‌تواند بزرگ ترین نوآوری در اصلاح گیاهان پس از انقلاب سبز باشد (Shipman et al., 2021). سه روش کلی ویرایش ژن وجود دارد: ZFNs (zinc-finger nucleases)، TALENs (transcription activator-like effector nucleases) و CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats- CRISPR asistant). از بین این روش‌ها CRISPR-Cas اخیرا مورد توجه زیادی قرار گرفته است. از دلایل آن می‌توان به حساسیت و دقت زیاد در ویرایش ژن هدف، هزینه‌های پایین و سادگی طراحی اشاره نمود (Xu et al., 2019). اما مهم‌ترین ویژگی های تکنولوژی CRISPR-Cas، این است که این سیستم محصولاتی تولید می‌کند که GMO (Genetically modified organism) محسوب نمی-شوند و درنتیجه استفاده از آن‌ها نسبت به محصولات GMO، مورد اقبال بیشتری قرار دارد (Sánchez-León et al., 2018).

تکنولوژی CRISPR-Cas

جدیدترین ابزار ویرایش ژن، تکنولوژی CRISPR-Cas است. CRISPR یک سیستم پروکاریوتی است که موجود را در مقابل حمله ویروسی محافظت می‌کند. دانشمندان با الگوبرداری از این مکانیسم طبیعی باکتری، به دنبال حذف نوکلئوتیدهای نامطلوب و یا قرار دادن نوکلئوتید جدید و مطلوب هستند تا صفات مورد نظر را در موجود ایجاد کنند (Shipman et al., 2021). این سیستم به ۳ دسته کلی نوع۱،

نوع ۲ و نوع۳ تقسیم می‌شود. CRISPR نوع ۲، به CRISPR-CAS9 معروف است. سیستم CRISPR-CAS9 شامل سه بخش می باشد: رشته crRNA، رشته tracrRNA و پروتئین اندونوکلئاز Cas9. توالی crRNA بخشی از توالی ژنوم مهاجم است که در آرایه های تکراری جایگاه ژنی CRISPR در باکتری‌ها ذخیره می‌شود. زمانی که باکتری مجدداً در معرض عنصر مهاجم قرار می‌گیرد، این قطعه بیان شده و با اتصال به رشته مکملش در ژنوم مهاجم و در ادامه با هیبرید شدن tracrRNA با crRNA موجب فراخوانی Cas9 به جایگاه هدف می‌شود. در نهایت Cas9 با ایجاد برش دو رشته ای در ژنوم عنصر مهاجم، موجب غیرفعال شدن آن می‌شود. در تحقیقات مهندسی ژنوم، دو قطعه crRNA و tracrRNA به هم متصل شده اند و مولکول حاصل تحت عنوان sgRNA یا به صورت خلاصه gRNA جایگزین این دو قطعه شده است. تغییرات ساده توالی مولکول sgRNA کافیست تا اندونوکلئاز Cas9 را برای هدف قرار دادن هر بخش از ژنوم مستعد سازد. توالی هایی که نقش اندونوکلئاز Cas را ایفا می‌کنند، نیازمند به یک توالی به نام PAM (Protospacer-Adjacent Motif) برای اتصال می‌باشد. PAM که یک توالی کوتاه DNA است که بلافاصله پایین دست ناحیه ′3 عنصر protospacer واقع شده است (Sánchez-León et al., 2018).

در این سیستم مولکول دو رشته ای DNA در محل هدف در بالادست توالی PAM در داخل ژنوم، توسط پروتئین CAS می‌شکند. این فرایند توسط توالی gRNA مدیریت می‌شود. پس از تولید مولکول دورشته ای شکافته شده توسط پروتئین CAS، این قطعه ترمیم می‌شود که معمولا با توالی قبلی متفاوت است و درنتیجه ممکن است جهش هایی ایجاد گردد. مکانیسم ترمیم شامل HR (homologous recombination) و یا NHEJ (non-homologous end-joining) است. مکانیسم HR موجب بازسازی دقیق تری می‌شود؛ به شرطی که توالی همولوگ غیرآسیب دیده و یا الگوی DNA خارجی برای ترمیم دو رشته، وجود داشته باشد. مکانیسم NHEJ بدون نیاز به رشته الگو، رشته DNA را ترمیم می-کند. در سلول های یوکاریوت رشته DNA شکسته شده ترجیحا با استفاده از NHEJ ترمیم می‌شود (Xu et al., 2019). در NHEJ مولکول های DNA با انتهای صاف به هم متصل می‌شوند و معمولا با ارور و خطا همراه است و نتیجه آن اتصال و یا حذف جفت باز می‌باشد و منجر به indels شدن (insertion or deletion of bases) و جهش frame shift می‌شود (جهشی که موجب تغییر قالب خوانش ۳ نوکلئوتیدی می‌شود). این جهش می‌تواند موجب حذف ژن موردنظر شود (Rodgers and Mcvey, 2016) (شکل ۱).



شکل ۱- مکانیسم های ترمیم مولکول DNA در تکنولوژی CRISPR-Cas

کاربردهای CRISPR-Cas در گیاهان

اخیرا تکنولوژی CRISPR به عنوان یک ابزار ویرایش ژن در مهندسی ژنتیک محصولات باغبانی به خوبی کارایی خود را نشان داده است. تاثیر این تکنولوژی برای اولین بار در گیاهان مدل *Arabidopsis* و *Nicotiana benthamiana* مشاهده گردید (Li et al., 2013).

درمیان محصولات باغبانی، گوجه‌فرنگی اولین گیاهی است که با تکنولوژی CRISPR-Cas مورد بررسی قرار گرفت. در این بررسی برگ های این گیاه دستخوش تغییراتی شده بود (Brooks et al., 2014). در بازه زمانی کوتاه از پیدایش تکنولوژی CRISPR-Cas تا به امروز، مطالعات زیای بر روی کاربردهای آن در گیاهان انجام شده است؛ کلم یکی از گیاهان باغبانی است که توسط این تکنولوژی مورد مطالعه قرار گرفته است و ضمن مطالعه آن، ویرایش ژن هدف *BoIC.GA4.a* موجب پیدایش فنوتیپ پاکوتاه گردید (Lawrenson et al., 2015). در هویج، ژن *DcF3H* (Flavanone-3-hydroxylase) مورد بررسی قرار گرفت که نتیجه آن بلاک شدن بیوسنتز آنتوسیانین در هویج بنفش رنگ بود (Klimek-Chodacka et al., 2018). در خیار ژن

eIF4E (Eukaryotic translation initiation factor 4E) بررسی شده است که نتیجه آن ایجاد مقاومت در برابر دامنه ای از ویروس ها مثل موزاییک Potyviruses Zucchini بود (Chandrasekaran et al., 2016). در توت فرنگی، ویرایش ژن‌های دخیل در هورمون اکسین (Auxin Response Factor 8 و Auxin biosynthesis gene) موجب افزایش بیوسنتز اکسین شده و رشد سریع در نهال را نشان داده است (Zhou et al., 2018). در جدول ۱ به برخی دیگر از این مطالعات اشاره شده است (Wang et al., 2019).

جدول ۱- برخی مطالعات انجام شده در محصولات مختلف باغبانی توسط تکنولوژی CRISPR-Cas

گیاه	ژن هدف	ویژگی هدف
گوجه‌فرنگی	*DMR6*	مقاومت به سفیدک درونی
گوجه‌فرنگی	*MLO1*	مقاومت به سفیدک پودری
گوجه‌فرنگی	*MAPK3*	حساسیت به بیماری پوسیدگی خاکستری
موز	*ORF region of virus*	مقاومت به ویروس streak موز
انگور	*MLO7*	مقاومت به سفیدک پودری
انگور	*WRKY52*	مقاومت به بیماری پوسیدگی خاکستری
سیب	*DIPM1, 2, 4*	مقاومت به بیماری آتشک
گوجه‌فرنگی	*PL*	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	*ALC*	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	*SGR1, LCY-E, Blc, LCY-B1, LCY-B2*	افزایش مقدار لیکوپن
گوجه‌فرنگی	*AGL6*	تولید میوه پارتنوکارپ
گوجه‌فرنگی	*IAA9*	تولید میوه پارتنوکارپ
گوجه‌فرنگی	*BOP1, BOP2, BOP3*	گلدهی زودرس با گل آذین ساده شده
گوجه‌فرنگی	*SP, SP5G, CLV3, WUS, GGP1*	معرفی صفات مرتبط با مورفولوژی، تعداد گل، اندازه و تعداد گوجه‌فرنگی و سنتز لیکوپن
گوجه‌فرنگی	*SP5G*	تولید گوجه‌فرنگی روز خنثی
خیار	*WIP1*	تولید گیاه ماده
کیوی	*CEN4, CEN*	تولید گیاه پاکوتاه با گل انتهایی رشد سریع
هندوانه	*ALS*	مقاومت به علف کش
گوجه‌فرنگی	*MAPK3*	کاهش تحمل به تنش خشکی
گوجه‌فرنگی	*CBF1*	کاهش تحمل به تنش یخ زدگی

تکنولوژی CRISPR-Cas در پس از برداشت

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین محصولات باغبانی در دنیا است که ارزش اقتصادی زیادی در صنعت مواد غذایی دارد و عمر کوتاه پس از برداشت یکی از مهم‌ترین ویژگی های این محصول است. پکتین ها نقش مهمی در دیواره سلول و ویژگی های فیزیکی محصول دارند که بیشترین حضور آن‌ها در دیواره اولیه و تیغه میانی است. ژن‌های مرتبط با آنزیم‌های تخریب کننده پکتین در گوجه‌فرنگی شامل *pectate lyase* (*PL*)، *polygalacturonase 2a* (*PG2a*) و *β-galactanase* (*TBG4*) می‌باشد. برای بررسی جداگانه نقش هرکدام از این ژن‌ها در گوجه‌فرنگی، مطالعه ای با کمک تکنولوژی CRISPR-Cas انجام شد. نتیجه این مطالعه این بود که هرکدام از این ژن‌ها، در دامنه ای خاص از دیواره سلولی فعالیت خود را انجام می‌دهند؛ جهش در ژن *PL* منجر به تولید میوه‌های با قوام بیشتر گردید؛ در حالی که جهش در *PG2a* و *TBG4* در رنگ و وزن میوه موثر بود (Wang et al., 2019).

با وجود اهمیت فراوان و ارزش اقتصادی بالای گیاهان زینتی، گفته می‌شود تکنولوژی CRISPR-Cas تاکنون کاربرد اندکی در این گیاهان داشته است (Xu et al., 2020). یکی از

اندک مطالعات، بر روی پتونیا می‌باشد. یکی از آنزیم‌های دخیل در تولید اتیلن و پیری اندام ها، ACC اکسیداز (1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase-) می‌باشد. گل-های پتونیا حساسیت زیادی به اتیلن نشان می‌دهند. در پتونیا ژن‌هایی که در تولید این آنزیم نقش دارند شامل *PhACO1*، *PhACO3*، *PhACO4* هستند. این ژن‌ها در گلبرگ و مادگی پتونیا بیان می‌شود. اخیرا ژن *PhACO1* در گیاه پتونیا توسط فناوری CRISPR-Cas9 ویرایش شده است. موتانت‌های ویرایش شده، تولید اتیلن کمتری داشته و عمر گلجای و کیفیت گل‌ها افزایش یافته بود (Xu et al., 2020).

در جدول ۲ برخی دیگر از کاربردهای تکنولوژی CRISPR-Cas در پس از برداشت محصولات باغبانی اشاره شده است (Shipman et al., 2021).

جدول ۲- برخی مطالعات انجام شده در پس از برداشت گیاهان باغبانی توسط تکنولوژی CRISPR-Cas

گیاه	ویژگی	ژن هدف	تغییر	فنوتیپ
گوجه‌فرنگی	عمر پس از برداشت	*SlALC*	↓	افزایش عمر پس از برداشت
گوجه‌فرنگی	رسیدگی	*SlPL*	↓	افزایش قوام، عدم تغییر رنگ، رسیدگی کندتر
گوجه‌فرنگی	رسیدگی	*RIN*	↓	رسیدگی کندتر
پتونیا	حساسیت/ عمر گلجای	*PhACO1*	↓	افزایش عمر گلجای به مقدار ۵۰٪
سیب‌زمینی	افزایش فیبر	*StSBEI, II*	↓	افزایش مقاومت نشاسته
سیب‌زمینی	ظاهری	*StPPO2*	↓	کاهش Browning

توصیه ترویجی

با توجه به پتانسیل بالای کاربرد تکنولوژی CRISPR-Cas در محصولات مختلف و همچنین امکان کاربرد آن با اهداف گوناگون، گسترش این فناوری در محصولات مختلف و مخصوصا سبزیجات توصیه می‌گردد. این روش می‌تواند ضایعات پس از برداشت در محصولات مختلف را کاهش داده و در بهبود بازار رسانی موثر باشد. با توجه به وضعیت آبی کشور و خشکسالی‌های اخیر، کاهش ضایعات پس از برداشت یک راه موثر در کاهش مصرف آب خواهد بود.

منابع

Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B., Van Eck, J., (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated9 system. Plant Physiol. 166, 12921297.

Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., Galon, A. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPRCas9 technology. Molecular Plant Pathology 17: 1140-1153.

Klimek-chodacka, M., Oleszkiewicz, T., Lowder, Lg., Qi, Y., Baranski, R. (2018). Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells. Plant Cell Reports 37: 575-586.

Lawrenson, T., Shorinola, O., Stacey, N., Li, C., Østergaard, L., Patron, N., Uauy, C., Harwood, W. (2015). Induction of targeted, heritable mutations in barley and Brassica oleracea using RNA guided Cas9 nuclease.Genome Biology 6: 258.

Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., et al. (2013). Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotechnol*. 31, 688-691

Rodgers, K., Mcvey, M. (2016). Error-prone repair of DNA double-strand breaks. *J. Cell. Physiol*. 231, 15–24

Sánchez-León, S., Gil-Humanes, J., Ozuna, C.V., Giménez, M.J., Sousa, C., Voytas, D. F., et al. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat

engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J*. 16 (4), 902-910

Shipman, E.N., Yu, J., Zhou, J., Albornoz, K., Beckles, D.M. (2021). Can gene editing reduce postharvest waste and loss of fruit , vegetables , and ornamentals ? *Hortic. Res.* 1–21.

Wang, D., Samsulrizal, N.H., Yan, C., Allcock, N.S., Craigon, J., Blanco-Ulate, B., Ortega-Salazar, I., Marcus, S.E., Bagheri, H.M., Perez-Fons, L., Fraser, P.D., Foster, T., Fray, R., Paul Knox, J., Seymour, G.B. (2019). Characterization of CRISPR mutants targeting genes modulating pectin degradation in ripening tomato 1[OPEN]. *Plant Physiol*. 179, 544–557.

Xu, J., Kang, B., Naing, A.H., Kim, C.K., Bae, S., Kim, J., Kim, H. (2020). CRISPR / Cas9-mediated editing of 1-aminocyclopropane-1- carboxylate oxidase1 enhances Petunia flower longevity. *Plant Biotechnol. J.* 18, 287–297.

Zhou, J., Wang, G., Liu, Z. (2018). Efficient genome-editing of wild strawberry genes, vector development, and validation. Plant Biotechnology Journal 12922.

CRISPR-CAS technology and its application in post-harvest of horticultural plants

Fazli M.

Dept. of Biological Science., Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays, post-harvest stage of horticultural plants is under spotlight. Genetic modification is one of the most important methods of controlling this stage, which can significantly reduce post-harvest waste in horticultural crops. The CRISPR-Cas is a genome editing method modeled on the prokaryotic systems. This technology is one of the most important and newest methods of plant genetic modification that can be widely used in post-harvest technology. One of the most important features of this method is that it does not result in GMO, and therefore, will be more successful for marketing. This technology is now widely used in horticultural and agricultural plants, especially vegetables, for different purposes. Tomatoes were among the first and most frequent subjects of CRISPR-Cas technology in horticulture to date. Up until now, the most important applications of this method in tomatoes were the manipulation of genes related to various types of resistance, as well as increasing its postharvest life.

Keywords: Plants breeding, Crisper, Horticultural plants, Genome editing