



دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی

جلد بیست و ششم، شماره اول، ۱۳۹۸

<http://jopp.gau.ac.ir>

DOI: 10.22069/jopp.2019.13945.2252

۳۵-۴۳

استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 برای دستکاری ژن *SGR* فستوکای بلند بر اساس بیان موقت

*مصطفی خوشحال سرمست

استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۶/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۵

چکیده

سابقه و هدف: یکی از فناوری‌های پیشرفته در ویرایش ژنوم، مربوط به فناوری تکرارهای کوتاه پالیندرومی فاصله‌دار منظم خوشه‌ای است. این فناوری یک سامانه ایمنی تطبیقی در پروکاریوت‌ها می‌باشد که باعث القاء مقاومت در برابر ویروس‌های خارجی می‌شود. توالی فاصله‌انداز مشتق شده از ویروس در موجود میزبان به یک آنزیم نوکلئازی ویژه برای شناسایی و شکست DNA ویروس کمک می‌کند. در این پژوهش RNA راهنمای مربوط به ژن *SGR* درگیر در تجزیه کلروفیل، در تماس نزدیک با پروتئین Cas9 در سازه CRISPR برای هدف قراردادی این ژن در برگ‌های فستوکای بلند قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در راستای ساخت سازه CRISPR/Cas9 قابل برنامه‌ریزی برای هدف‌گیری ژن *SGR*، ابتدا یک توالی ۲۰ نوکلئوتیدی روی اگزون ژن *SGR* فستوکای بلند انتخاب گردید. این توالی ابتدا در سازه pEnChimera جاسازی و سپس به وسیله فناوری Gateway به حامل بیان منتقل گردید. حامل مدنظر پس از تأیید به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و توالی‌یابی، به *Agrobacterium tumefaciens* برای آزمایش‌های بیان موقت منتقل گردید. در گام دوم سازه CRISPR و سازه تشدید بیان (pB2WG7) دارای ناحیه رمزکننده ژن *SGR* به‌طور هم‌زمان به برگ‌های توتون به وسیله روش Agroinfiltration منتقل گردید. ناحیه آلوده شده پس از استخراج DNA توالی‌یابی شد. در آزمایشی دیگر سازه CRISPR طراحی شده به‌طور مستقیم و به‌صورت موقت در برگ‌های بالغ جوان فستوکای بلند تحت تنش، بیان گردید.

یافته‌ها: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و توالی‌یابی، جایگیری درست RNA راهنما را در دو حامل به‌کار رفته در این آزمایش تأیید می‌نماید. بیان موقت هم‌زمان دو سازه در برگ‌های توتون که با استفاده از استخراج DNA و توالی‌یابی از محل آلوده ارزیابی شد، نشان می‌دهد که با وجود قرارگیری درست توالی در این سازه در عمل قادر به برش ژن *SGR* فستوکای بلند بیان شده در گیاه توتون نمی‌باشد. ولی در آزمایش دوم بیان موقت سازه CRISPR/Cas9 در برگ‌های فستوکای بلند دارای ژن طبیعی *SGR* بیانگر این است که این سازه به شکل جالبی قادر به توقف بیان ژن *SGR* و در نتیجه توقف تجزیه کلروفیل برگ‌های فستوکای بلند در مقایسه با شاهد می‌باشد.

نتیجه‌گیری: استفاده از فناوری Gateway به‌میزان چشم‌گیری در مقایسه با روش آنزیم‌های برشی سرعت و دقت در ساخت سازه نهایی CRISPR/Cas9 را بالا برد. فناوری CRISPR/Cas9 زمانی که روی برگ‌های توتون برای هدف قراردادی ژن *SGR* فستوکای بلند استفاده شد موفقیت‌آمیز نبود که به احتمال به‌دلیل بیان غیر هدفمند در موجودی است که ژن *SGR* به‌طور طبیعی

* مسئول مکاتبه: mkhsarmast@gau.ac.ir

در آن وجود ندارد ولی زمانی که سازه به صورت موقت در برگ‌های دارای ژن اصلی *SGR* (فستوکای بلند) بیان شد نتایج مشاهده شده به‌طور آشکاری بیانگر این بود که ژن *SGR* فستوکای بلند به‌وسیله *CRISPR* غیرفعال گردیده و در نتیجه آن در شرایط تنش برگ‌های فستوکای بلند سبزرتر باقی ماندند.

واژه‌های کلیدی: ژن *SGR*، فستوکای بلند، ویرایش ژنوم، *CRISPR/Cas9* Gateway.

مقدمه

طی چند سال گذشته نوکلئازهای مهندسی شده شامل نوکلئازهای ^۱ZFNs یا به اصطلاح انگشت روی و نوکلئازهای مؤثر شبه‌فعال‌کننده رونویسی ^۲به صورت گسترده‌ای برای دستکاری هدفمند ژنوم موجودات مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این نوکلئازهای مهندسی شده می‌توانند برای تغییر ژنوم در یک مکان ژنی ویژه به‌کار گرفته شوند و آن‌ها قادرند که با استفاده از یک روش هدفمند، پروتئین یک توالی ژنی ویژه را شناسایی و سپس تغییر دهند. به هر حال این سامانه‌ها نیازمند نوکلئازهای سنتز شده و طراحی شده جدید برای هر توالی DNA هدف جدید دارد. بنابراین سر هم کردن فناوری ZFN و TALEN زمانبر، هزینه‌بر و نیازمند مهارت تجربی است (۶). اخیراً یک فناوری نوکلئاز وابسته به توالی هدف، انقلابی بر اساس ^۳CRISPR ایجاد نموده است. این سامانه از پروتئین نوکلئاز Cas9 و یک RNA رهنما^۴ استفاده می‌کند که به‌طور ویژه‌ای به توالی هدف اتصال یافته و پروتئین Cas9 را برای برش مکان هدف فرا می‌خواند. تنها یک تک‌رشته RNA برای هدف قرار دادن توالی ویژه کافی است و لزومی ندارد که Cas9 برای هر هدف جدید دوباره مهندسی شود (۳).

Cas9 یک سامانه ایمنی تطبیقی یا سازوارپذیر در آرکه‌آ^۵ و باکتری‌ها بر علیه حمله ویروس‌ها و

پلاسمیدها می‌باشد. بر اساس عناصر اصلی و توالی، سه نوع *CRISPR/Cas9* شناسایی شده است. سامانه‌های نوع I و III نیازمند پروتئین‌های متعدد برای تشکیل یک کمپلکس بزرگ دارای چند پروتئین Cas فعال است در حالی که سامانه نوع II به آسانی قابل استفاده عملی در دیگر موجودات می‌باشد. مکان ژنی *CRISPR* نوع II باکتری *Streptococcus pyogenes* SF370 شامل گروهی از ژن‌های Cas و همچنین دارای دو عنصر RNA غیررمزشونده به نام ^۶tracrRNA و آرایه کریسپر^۷ است. به محض حمله ویروس یا پلاسمید به سلول میزبان، سلول میزبان با استفاده از وارد کردن قطعات کوتاه DNA بیگانه به درون مکان ژنی *CRISPR* پاسخ می‌دهد. در ادامه RNAهای Tracr و توالی‌های pre-crRNA منشاء گرفته از آرایه تکرار و فاصله‌انداز^۸ رونویسی می‌گردند. سپس tracrRNA به هر یک از توالی‌های تکراری (هیبرید) درون pre-crRNA برای ایجاد یک RNA دو رشته‌ای متصل می‌شود. پس از آن این RNAهای دو رشته‌ای به‌وسیله یک اندونوکلئاز RNAase III و یک نوکلئاز مرتبط با CAS9 ناشناخته دیگر بریده شده و در نهایت crRNAs بالغ رها می‌شود. crRNA با tracrRNA و پروتئین Cas9 مرتبط باقی مانده تا تشکیل یک کمپلکس ریبونوکلئوپروتئین دهند. پس از شناسایی رشته مکمل به‌وسیله crRNA، دومین نوکلئاز HNH پروتئین Cas9 ابتدا رشته مکمل و دومین شبه RuvC، رشته

- 1- Zinc-finger
- 2- Transcription activator-like effector nucleases (TALENs)
- 3- Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)
- 4- Single guide RNA (sgRNA)
- 5- Archaea

- 6- Trans activating CRISPR RNA
- 7- CRISPR array or crRNA
- 8- Spacer

تست نمودن قابلیت کاربرد CRISPR در دوپله‌ای‌ها مورد هدف قرار دادند (۲). نتایج نشان داد که گیاهان جهش‌یافته در مقایسه با شاهد برگ‌های سوزنی و سیم مانندی پیدا کرده بودند که بیانگر موفقیت‌آمیز بودن کاربرد این سامانه در دوپله‌ای‌ها دارد. در گزارشی دیگر سامانه CRISPR/Cas9 در یک گونه صنوبر (*Populus tomentosa*) آزمایش شد. خاموشی ژن *PtoPDS* به میزان ۵۱/۷ درصد در صنوبر موفقیت‌آمیز بود و از ۵۹ نمونه تست شده ۳۰ مورد جهش‌یافته‌ها هموزیگوت بودند (۴).

گزارشی از کاربرد این فناوری در گیاهان زینتی تا این تاریخ در دسترس نیست. برای آزمایش این فناوری ابتدا از گیاه مدل توتون و سپس گیاه فستوکای بلند^۳ که یک گونه چمن فصل سرد مقاوم به خشکی می‌باشد استفاده شد. یکی از ژن‌هایی که در گیاهان در تجزیه کلروفیل در زمان تنش و پیری نقش دارد، ژن *SGR*^۴ می‌باشد که به ژن سبزمان مشهور شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که غیرفعال شدن این ژن روند تجزیه کلروفیل برگ را کند خواهد نمود. در گیاه آرابیدوپسیس که ژن *(SGR) mye1-1* آن غیرفعال شده بود طی ۶ روز تاریکی توانست تا ۵۰ درصد کلروفیل برگ خود را در مقایسه با گیاه شاهد حفظ نماید. در حالی که افزایش بیان همین ژن منجر به تولید برگ‌های رنگ‌پریده و زال در مقایسه با شاهد شد.

در این پژوهش چندین هدف دنبال شد که شامل ۱. جداسازی ناحیه رمزکننده ژن *SGR* از رقم Jaguar فستوکای بلند و ساخت یک سازه برای بیان نمودن این ژن ۲. ساخت سازه CRISPR/Cas9 برای هدف‌گیری و خاموشی ژن *SGR* و ۳. بررسی تراریختی هم‌زمان این دو سازه در برگ‌های توتون و یا بیان سازه CRISPR/Cas9 به صورت موقت در برگ‌های فستوکای بلند.

غیرمکمل DNA را می‌برد. برش دقیق نوکلئوتید ۳ جفت باز بالا دست موتیف مجاور protospacer که به اصطلاح PAM^۱ نامیده می‌شود رخ می‌دهد که منجر به یک انتهای صاف خواهد شد (۱). در نتیجه این برش و تغییر نوکلئوتیدها پس از ترمیم دوباره ژن هدف، ژن غیرفعال خواهد شد. در سال ۲۰۱۲ ماشین مولکولی سامانه CRISPR/Cas نوع II مشتق شده از *Streptococcus pyogenes* به شکل قابل برنامه‌ریزی در آمد. از همه مهم‌تر یکی از ویژگی‌های جالب سامانه کریسپر این است که قابلیت ویرایش چندین مکان ژنی در یک زمان به وسیله وارد کردن چندین RNA هدایتگر روی یک سازه به صورت هم‌زمان فراهم می‌شود. تاکنون ژنوم آرابیدوپسیس، توتون، گوجه‌فرنگی، برنج، گندم، ذرت و سورگوم با استفاده از این فناوری دستکاری شده‌اند و در رابطه با محصولات باغی بیش‌تر دستکاری‌ها در گوجه‌فرنگی و در گونه‌های چوبی تنها صنوبر و پرتقال (۷) مورد دستکاری ژنتیکی با استفاده از این سامانه قرار گرفته‌اند. Feng و همکاران (۵) جهش‌یافته‌هایی با ژن‌های غیرفعال شده^۲ *OsROC5*، *OsSPP* و *OsYSA* در برنج با واسطه‌گری آگروباکتریوم دارای HspCas9 و سازه ProOsU6-sgrRNA به دست آوردند. در نسل T₀ (نسل اول) ۱۰ درصد جهش‌یافته‌های *ysa*؛ فنوتیپ برگ زال پیش‌بینی شده را دارا بودند. در آزمایش‌های دیگر با استفاده از این فناوری نواحی پرموتوری ژن‌های دارای حساسیت به بلایت باکتریایی (۸)، جهش در ژن‌های *OsCAOI* یا *OsLAZYI* (۱۱) و جهش در ژن *OsMPK* که در مقاوم به بیماری نقش دارد (۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. Brooks و همکاران (۲۰۱۴) ژن *SIGO7* که در تنظیم فرایند قطبیت اندام‌ها (برگ) نقش دارد را در گوجه‌فرنگی برای

3- *Festuca arundinacea* Schreb.

4- Stay-Green (SGR)

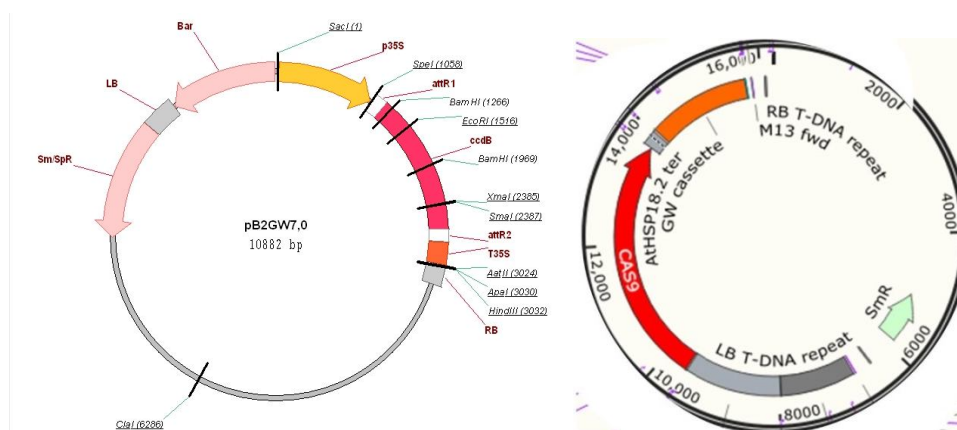
1- Protospacer adjacent motif

2- Knockout

مواد و روش‌ها

جداسازی و ساخت سازه تشدید بیان ژن *SGR*:
توالی رمزکننده ژن *SGR* (مکان ژنی HQ676611) از پایگاه داده NCBI^۱ تهیه و یک جفت آغازگر برای جداسازی آن از روی cDNA تهیه شده از برگ‌های جوان بالغ فستوکای بلند (*Festuca arundinacea* 'Jaguar') طراحی شد (جدول ۱). cDNA بر اساس روش کار مربوط به رفرنس (۱۳) تهیه گردید. پس از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از cDNA و پرایمرهای اختصاصی، قطعه ۸۳۴ جفت بازی مورد انتظار به دست آمد که پس از جداسازی از ژل (Zygmoclean gel DNA recovery Kit, ZYMO RESEARCH, USA) برای تأیید درست بودن این قطعه توالی‌یابی شد و صحت توالی به دست آمده با استفاده از گزینه BLAST در پایگاه NCBI تأیید شد. محصول PCR به دست آمده در مرحله قبل با استفاده از کیت PENTR/D-TOPO (Invitrogen, USA) در حامل همانندسازی اولیه با استفاده از فناوری Gateway^۲ ادغام شد (مراحل

بر اساس دستور شرکت سازنده انجام شد). حامل نو ترکیب مورد نظر به باکتری *E. coli* به وسیله شوک حرارتی منتقل و پس از کشت یک شبانه‌روزی در محیط کشت LB با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و توالی‌یابی تأیید شد. برای انتقال ژن همانندسازی شده به حامل بیان (حامل نهایی) ابتدا پلاسمید نو ترکیب از باکتری *E. coli* استخراج و با استفاده از کیت LR (واکنش LR باعث تسهیل نو ترکیبی ناحیه attL (در کلون ابتدایی) با ناحیه attR (در حامل نهایی) برای تولید کلون بیان دارای ناحیه attB در حضور آنزیم Integrase می‌شود) به وسیله روش Gateway، ژن *SGR* همسانه‌سازی شده وارد حامل بیان pB2GW7-ccdB گردید (شکل ۱). این مراحل بر اساس دستور شرکت Invitrogen انجام شد. دوباره پس از ادغام ژن در حامل، حامل برای همانندسازی وارد *E. coli* GV 3101 پس از تأیید، حامل مدنظر به نژاد *Agrobacterium tumefaciens* منتقل شد.



شکل ۱- حامل‌های بیان استفاده شده در این پژوهش. سمت چپ: حامل تشدید بیان pB2GW7 برای افزایش بیان ژن *SGR* فستوکای بلند. سمت راست: سازه CRISPR/Cas9 نهایی برای خاموشی ژن *SGR* فستوکای بلند. هر دو حامل بر اساس جایگزینی Gateway طراحی شده‌اند.

Fig. 1. Expression vectors that are used in present experiments. Left: representing overexpression vector (pB2GW7) for expression of tall fescue *SGR* gene. Right: representing CRISPR/Cas9 vector to knockout tall fescue *SGR* gene. Both vectors were Gateway compatible.

1- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

2- <http://www.lifetechnologies.com/us/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning.html>

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی برای آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

Table 1. Gene specific primers for PCR experiment.

نام آغازگر Primer name	5'-3'
<i>FaSGR</i>	Fw: atggcactgccgcttcacatgtc Rev: tactggggcggcactggcggcatcg
(sgRNA)	Fw: 5' ATTGAGCAGCTTCAGCAGCAGCGC Rev: 5' AAACGCGCTGCTGCTGAAGCTGCT

باکتری‌های دارای دو سازه تشدید بیان pB2WG7 دارای توالی ژن *SGR* و سازه CRISPR/Cas9 دارای RNA راهنما برای هدف‌گیری ژن *SGR* به‌طور جداگانه در محیط LB مایع کشت شدند. یک تک کلونی از کشت جدید باکتری به ۳-۵ میلی‌لیتر از محیط LB دارای آنتی‌بیوتیک اختصاصی برای پلاسمید مورد نظر افزوده شد و اجازه داده شد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای یک شب با سرعت ۲۲۰ آر پی ام رشد کنند تا به غلظت ۰/۵ (مرحله رشد لگاریتمی برسند). سپس محلول باکتری با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و چگالی چشمی (OD) رسوب حاصل باکتری با استفاده از بافر اینفیلتريشن (۲ میلی‌مولار Na_3PO_4 ، ۵۰ میلی‌مولار MES، ۰/۵ درصد گلوکز و ۱۰۰ میلی‌مولار استوسرینگون) به غلظت ۰/۲ رسانیده شد. به گیاهان شاهد فقط سازه بیش بیان *SGR* تزریق شد. هر کدام از این دو باکتری با حجم و غلظت برابر (غلظت نهایی ۰/۱ بود) با هم مخلوط و با استفاده از سرنگ‌های انسولین به برگ تزریق گردید (۱۰). دو تا سه روز پس از تزریق، بافت ناحیه تزریق شده جدا و پس از استخراج DNA برای توالی‌یابی فرستاده شد. از پرایمرهای *SGR* در جدول ۱ برای توالی‌یابی استفاده شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی به شکل هم‌ردیف با استفاده از نرم‌افزار Vector NTI Advance™ 10 درآمده تا نواحی که نوکلئوتید آن‌ها حذف شده‌اند در دو سازه مقایسه شوند (شکل ۲).

ساخت سازه CRISPR برای غیرفعال کردن ژن *SGR*: توالی رمزکننده ژن *SGR* از پایگاه داده NCBI تهیه شد. برای طراحی RNA راهنما، ۲۰ نوکلئوتید از اگزون اول این ژن، در بالا دست توالی PAM (NGG) برای طراحی آغازگر مورد استفاده قرار گرفت. توالی مربوط به RNA راهنمای ژن *SGR* فستوکای بلند در جدول ۱ آورده شده است. به‌طور خلاصه حامل همسانه‌سازی pEnChimera (شکل ۱) با استفاده از آنزیم برشی *BbsI* بریده شده و با RNA راهنما به‌صورت دورشته‌ای در آمده و با استفاده از آنزیم لیگاز T4 در حامل جاسازی شد. پس از تأیید درست بودن قرارگیری قطعه به‌وسيله آغازگرهای اختصاصی و توالی‌یابی RNA راهنمای ادغام شده در حامل اولیه، این قطعه به‌وسيله آنزیم LR در حامل بیان pDE-Kan-Cas9 ادغام گردید (مراحل بر اساس دستور کار شرکت Invitrogen انجام شد). پس از تأیید توالی، حامل نهایی به روش انجماد و ذوب به درون نژاد GV 3101 از باکتری *A. tumefaciens* منتقل شد.

آزمایش اگرواینفیلتريشن در برگ توتون: بذور توتون در آمیخته خاکی دارای کوکوپیت و پرلایت کشت (با نسبت ۱/۱) و در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از اینکه ارتفاع بوته‌ها به ۳۵-۴۰ سانتی‌متر رسید، حداقل ۶ برگ سالم و یکنواخت برای آزمایش بیان موقت در نظر گرفته شد. چهار تزریق به درون هر برگ انجام شد. برای این منظور

بیان موقت CRISPR/Cas9 در برگ‌های بالغ جوان

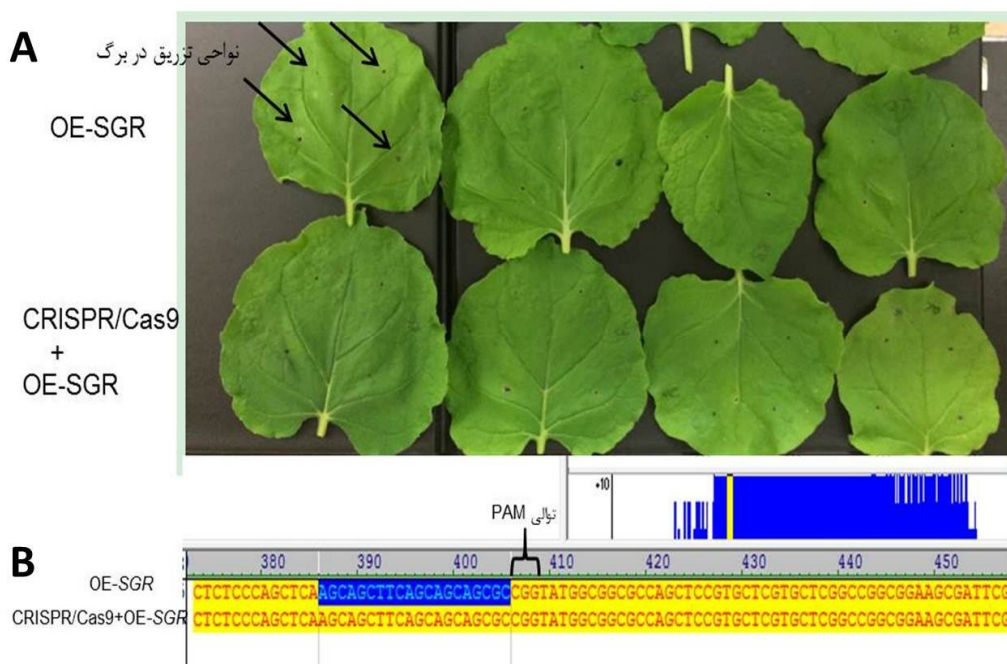
فستوکای بلند: در این آزمایش از برگ‌های جوان بالغ فستوکای بلند رقم Jaguar که در گلدان‌های پلاستیکی طی مدت دو سال مستقر شده بود استفاده شد. طول برگ‌های استفاده شده حدود ۴ سانتی‌متر بود. ابتدا باکتری دارای سازه CRISPR/Cas9 در محیط کشت LB رشد داده شد تا به مرحله رشد لگاریتمی برسد ($OD=0.5$). سپس محلول باکتری با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصله در محیط نیم غلظت MS با pH حدود ۵/۸ دوباره حل شده و غلظت آن‌ها به ۰/۲ رسانده شد. به این محلول استوسرینگون به غلظت ۱۰۰ میکرومولار افزوده شد. در تیمار شاهد قطعات برگ در محیط MS نیم غلظت قرار داده شدند و در تیمار دیگر برگ‌ها در محیط نیم غلظت دارای باکتری حمل‌کننده سازه CRISPR/Cas9 قرار داده شدند. هر دو تیمار در شرایط خلاء (۳۰۰ mm Hg) به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه انجام شد. پس از تیمار برگ‌های تیمار شده به محیط جامد نیم غلظت MS فاقد سوکروز و دارای نیم مولار NaCl منتقل و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (تنش گرمایی) برای ۶ روز در شرایط روشنایی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

توالی‌یابی حامل بیان pB2WG7 دارای توالی کدکننده ژن *SGR* با استفاده از آغازگرهای عمومی M₁₃ انجام شد. نتایج بیانگر درست قرار گرفتن توالی نوکلئوتیدی این ژن برای ترجمه پروتئین *SGR* بود. این سازه تشدید بیان ژن *SGR* به‌عنوان کنترل مناسب برای سازه CRISPR/Cas9 انتخاب شد. زیرا افزایش بیان ژن *SGR* در بافت برگ منجر به پیری و تجزیه کلروفیل برگ می‌شود و خاموشی و غیرفعال شدن این ژن در شرایط تنش سبب تاخیر در فرایند تجزیه سریع

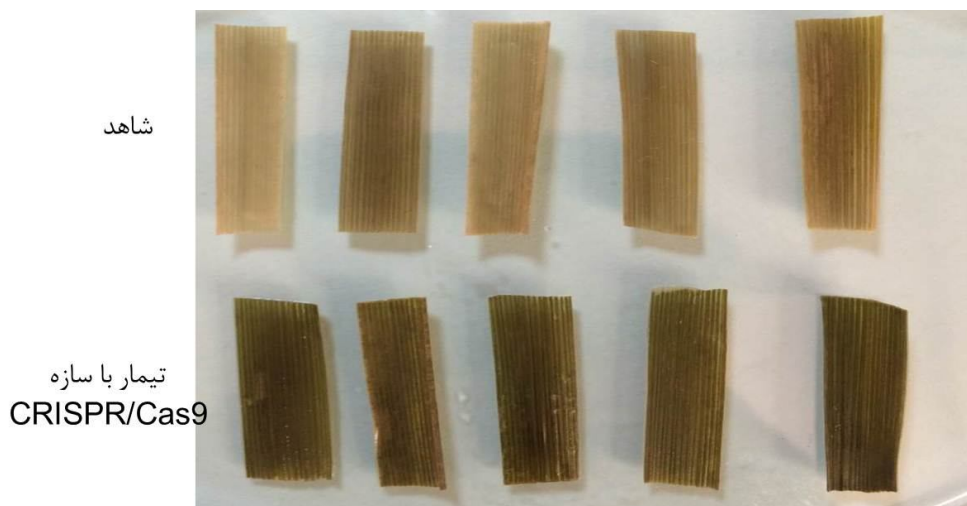
کلروفیل می‌گردد. مشخص شده که طی فرایند پیری بیان *SGR* به‌شدت افزایش بیان پیدا می‌کند. در آرابیدوپسیس که ژن *SGR* آن به‌صورت غیرفعال در آمده طی ۶ روز قرارگیری در تنش تاریکی ۵۰ درصد کلروفیل خود را حفظ نمود در حالی‌که گیاه شاهد غیرجهدش‌یافته تنها ۱۰ درصد کلروفیل خود را در شرایط تاریکی حفظ نمود (۱۲). به این دلیل تصمیم گرفته شد که ژن *FaSGR* فستوکای بلند با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 غیرفعال شود. این عمل به احتمال مانع از تجزیه سریع کلروفیل و پیری این سبز فرش به‌ویژه در شرایط تنش غیر زیستی خواهد شد.

پس از ساخت سازه CRISPR/Cas9، در ابتدا این سازه به همراه سازه تشدید بیان *SGR* در یک سامانه مدل مانند برگ‌های توتون مورد ارزیابی اولیه قرار گرفت (شکل ۲). پس از انتقال هم‌زمان هر دو سازه در برگ توتون، سازه CRISPR/Cas9 قادر به شناسایی ژن *SGR* به‌وسیله RNA راهنما مکمل ژن در برگ توتون و برش آن نبود. نتایج توالی‌یابی DNA در محل تزریق تأییدکننده این است که هیچ از دست‌دهی نوکلئوتید در بالا دست توالی PAM رخ نداده است (شکل ۲). این پدیده می‌تواند چندین دلیل داشته باشد. اول این‌که زمان بیان موقت دو سازه با توجه به متفاوت بودن پیشبر طراحی شده در سازه‌ها می‌تواند متفاوت باشد. از طرفی بیان هترولوگوس یک ژن در برگ یک گیاه غیرهدف با توجه به سامانه بیان گیاه می‌تواند تا حدی متفاوت عمل کند و این موضوع سبب شده که RNA راهنما قادر به شناسایی ژن سبز مان در زمان مشخص نباشد. بنابراین در آزمایش جداگانه‌ای سازه CRISPR/Cas9 به‌طور مستقیم به درون برگ‌های فستوکای بلند که ژن *FaSGR* به‌صورت طبیعی در آن وجود دارد وارد شد.



شکل ۲- آزمایش آگروانفیلتریشن دو سازه *OE-SGR* و *CRISPR/Cas9* روی برگ‌های توتون. A: برگ‌های توتون که ۴ نقطه در هر برگ با استفاده از سازه بیش بیان *SGR* به تنهایی مورد تزریق قرار گرفت و/یا انتقال هم‌زمان دو سازه بیش بیان *SGR* و *CRISPR/Cas9*. B: نتایج توالی‌یابی ژن *SGR* در دو آزمایش.

Fig. 2. Agrobacterium infiltration experiment of overexpression-*SGR* (*OE-SGR*) and *CRISPR/Cas9* constructs on tobacco leaves. A: Tobacco leaves injected in four area with *OE-SGR* construct alone and cotransformation of *OE-SGR* and *CRISPR/Cas9*. B: Sequencing results of *SGR* gene in two experiments.



شکل ۳- قطعات برگ فستوکای بلند تیمار شده با سازه *CRISPR/Cas9* (پایین) و تیمار شاهد (بالا) پس از گذشت ۶ روز در محیط دارای نیم مولار NaCl و تنش گرمایی.

Fig. 3. Agrobacterium infiltrated leaf segments of tall fescue with *CRISPR* construct (down) and control (up) subjected to 0.5 M NaCl and heat stress after 6 days.

نشان داده شده است. در گزارش دیگری به وسیله Zhang و همکاران (۲۰۱۶) ژن *TaGASR7* که باعث کنترل طول و وزن دانه گندم می‌شود به وسیله CRISPR/Cas9 مورد هدف قرار گرفت. رویان‌های نابالغ گندم که به وسیله تفنگ ژنی تراریخته شده بودند پس از تولید پینه و باززایی به طور موقت قادر به بیان سازه CRISPR/Cas9 بودند. این پژوهشگران مدعی شده‌اند که این روش برای تولید گیاهان هموزیگوت فاقد تراژن بسیار کارا و مفید خواهد بود (۱۶).

نتایج مثبت به دست آمده از تأثیر این فناوری در آزمایش بیان موقت در فستوکای بلند لزوم بیان پایدار این سازه در ژنوم این گیاه را در آینده نشان می‌دهد. روش‌های پیشین انتقال RNA راهنما در سازه CRISPR به درون سلول‌های گیاهی و جانوری به وسیله انتقال هم‌زمان بیش از یک حامل بود که به احتمال سبب کاهش کارایی این سامانه می‌شد (۲، ۹ و ۱۵) ولی در این گزارش با استفاده از فناوری Gateway در یک حامل، هم RNA راهنما و هم پروتئین Cas9 برای برش قطعه هدف جاسازی شده است که به میزان زیادی حجم کار و هزینه‌ها را کاهش خواهد داد. یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد استفاده از این سامانه ویرایشگری ژنوم در مقایسه با دیگر روش‌های خاموشی ژن رسیدن سریع‌تر به گیاهان هموزیگوت خواهد بود که به‌ویژه در رابطه با پژوهش‌های به‌نژادی گیاهان زینتی و به‌ویژه گیاهان چوبی که دارای چرخه تولیدمثل طولانی می‌باشند روند گزینش را تسریع می‌بخشد.

به‌طور خلاصه این سامانه ویرایش ژنوم با سهولت و قدرت بالا طی مدت زمان بسیار کوتاه قادر به تولید جهش‌یافته‌های دلخواه خواهد بود و حتی نویدبخش تولید کتابخانه‌هایی از ژن‌های جهش‌یافته شناسایی شده در فستوکای بلند و دیگر گونه‌های گیاهی می‌باشد.

به نظر می‌رسد پس از بیان شدن ژن *SGR* تحت شرایط تنش‌زا، RNA راهنمای طراحی شده در سازه CRISPR/cas9 به توالی ۲۰ نوکلئوتیدی مکمل خود بر روی دو رشته DNA ژن *SGR* چسبیده و پس از شناسایی درست، این ناحیه به وسیله پروتئین Cas9 بریده شده و ژن مدنظر غیرفعال می‌شود. تخریب ژن *SGR* از تجزیه بیش‌تر کلروفیل برگ فستوکای بلند جلوگیری می‌کند. این در حالی است که برگ‌های شاهد که تنها با بافر اینفیلتریشن تیمار شده بودند پس از ۶ روز کلروفیل خود را به‌میزان زیادی از دست داده‌اند. در گزارشی انتقال پایدار سازه CRISPR/Cas9 در گیاه چوبی *Populus tomentosa* منجر به غیرفعال کردن ژن *PtoPDS* شد و گیاهان باززایی شده فنوتیپ زال از خود نشان دادند (۴). همچنین CRISPR به‌طور موقت به گیاه چوبی پرتقال با واسطه *A. rhizogenes* نیز منتقل شده است (۷). نتایج این آزمایش مقدماتی بیان موقت سازه CRISPR/Cas9 در برگ‌های فستوکای بلند در شرایط غیرتنش‌زا طی ۶ روز بی نتیجه بود (داده‌ها نشان داده نشده است). اما در شرایط تنش غیرزیستی، سازه CRISPR/Cas9 به واسطه توقف فعالیت ژن *SGR* از تجزیه بیش‌تر کلروفیل جلوگیری نمود. استفاده از سامانه تزریق که در مورد توتون انجام شد در برگ‌های فستوکای بلند مؤثر نبود بنابراین محلول باکتری با استفاده از سامانه خلاء و به‌طور مؤثری وارد برگ فستوکای بلند شد. تجزیه کلروفیل برگ به وسیله ژن *SGR* در گزارش‌های پیشین در گیاه آرابیدوپسیس به خوبی به تأیید رسیده است (۱۲). در رابطه با مؤثر بودن سامانه CRISPR/Cas9 در گیاه گزارش‌های بسیاری مؤثر بودن این سامانه دستکاری دقیق ژنوم‌های گیاهی را بیان نموده‌اند. به‌عنوان مثال در آزمایشی به وسیله Brooks و همکاران (۲۰۱۷) قدرت سازه CRISPR/Cas9 در خاموشی ژن *SIAGO7* که در تنظیم تولید هورمون اکسین نقش دارد به خوبی

علوم باغبانی) و دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی
گرگان که امکان انجام این پژوهش را فراهم نمودند
سپاسگزاری می‌گردد.

سپاسگزاری

نویسنده لازم می‌داند که از پروفسور Katie Dehesh و دکتر M. Ron (از دانشگاه ایالتی کالیفرنیا) به دلیل در اختیار نهادن پلاسمیدها قدردانی نماید. همچنین از همکاری آقای پروفسور صالحی (دانشگاه شیراز، گروه

منابع

- Barrangou, R. 2013. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdiscip Rev. RNA*. 4: 267-278.
- Brooks, C., Nekrasov, V., Lippman, Z.B. and Van Eck, J. 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated Cas9 system. *Plant Physiol*. 166: 1292-1297.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471: 602-607.
- Fan, D., Liu, T., Li, C., Jiao, B., Li, S., Hou, Y. and Luo, K. 2017. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Populus* in the first generation. *Nature*. 5: 12217.
- Feng, Z., Zhang, B., Ding, W., Liu, X., Yang, D.L., Wei, P., Cao, F., Zhu, S., Zhang, F., Mao, Y., and Zhu, J.K. 2013. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell Res*. 23: 1229-1232.
- Gaj, T., Gersbach, C.A. and Barbas, CF. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol*. 31: 397-405.
- Jia, H. and Wang, N. 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One* 9: e93806.
- Jiang, W., Zhou, H., Bi, H., Fromm, M., Yang, B. and Weeks, D.P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Res*. 41:e188.
- Li, J.F., Norville, J.E., Acch, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M. and Sheen, J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol*. 31: 688-691.
- Lu, J., Bai, M., Ren, M., Liu, J. and Wang, C. 2017. An efficient transient expression system for gene function analysis in rose. *Plant Methods*. 13: 116.
- Miao, J., Guo, D., Zhang, J., Huang, Q., Qin, G., Zhang, X., Wan, J., Gu, H. and Qu, L.J. 2013. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system. *Cell Res*. 23: 1233-1236.
- Ren, G., An, K., Liao, Y., Zhou, X., Cao, Y., Zhao, H., Ge, X. and Kuai, B. 2007. Identification of novel chloroplast protein *AtNYE1* regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 144: 1429-1441.
- Sarmast, M.K., Niazi, A., Salehi, H. and Abolmoghadam, A. 2015. Silver nanoparticles affect ACS expression in *Tecomella undulata* in vitro culture. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 121: 227-236.
- Xie, K. and Yang, Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Mol. Plant*. 6: 1975-1983.
- Zhang, H., Zhang, J., Wei, P., Zhang, B., Gou, F., Feng, Z., Mao, Y., Yang, L., Zhang, H., Xu, N. and Zhu, J.K. 2014. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol. J*. 12: 797-807.
- Zhang, Y., Liang, Z., Zong, Y., Wang, Y., Liu, J., Chen, K., Qiu, J.L. and Gao, C. 2016. Efficient and transgene-free genome editing in wheat through transient expression of CRISPR/Cas9 DNA or RNA. *Nature Commun*. 7: 12617

