

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



انتشارات
۷۵۲

ویرایش ژنوم در گیاهان

www.ketab.ir

دکتر علیرضا سیفی

عضو هیئت علمی دانشگاه فردوسی مشهد

دانیال شکوهی

عاطفه قلیزادگان احسان آباد

رخشنده ابراهیم پور

عنوان و نام پدیدآور: ویرایش ژنوم در گیاهان/ علیرضا سیفی...؛ او دیگران؛ ویراستار علمی نسرین مشتاقی؛ ویراستار ادبی مصطفی قندهاری.
 مشخصات نشر: مشهد: دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات، ۱۳۹۹.
 مشخصات ظاهری: ۱۲۰ ص. مصور.
 فروست: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد؛ ۷۵۲.

شابک: ISBN: 978-964-386-444-6
 یادداشت: علیرضا سیفی، دانیال شکوهی، عاطفه قلیزادگان احسان آباد، رخشنده ابراهیم پور.
 یادداشت: کتابنامه: ص. ۱۱۹.
 یادداشت: نمایه.

وضعیت فهرست نویسی: فیفا.
 موضوع: ژنتیک گیاهی — مهندسی
 موضوع: ویرایش ژنوم
 موضوع: گیاهان — مقاومت در برابر بیماری ها و آفت ها — ژنتیک
 Plants -- Disease and pest resistance -- Genetic aspects
 Plant genomes

شناسه افزوده: ژنوم گیاهی
 شناسه افزوده: سیفی، علیرضا، ۱۳۵۶-
 شناسه افزوده: مشتاقی، نسرین، ۱۳۵۸-، ویراستار.
 شناسه افزوده: دانشگاه فردوسی مشهد، انتشارات.
 رده بندی کنگره: QK۹۸۱
 رده بندی دیویی: ۷۲۱.۷۷۲
 شماره کتابشناسی ملی: ۶۱۰۸۳

ویرایش ژنوم در گیاهان

پدیدآورندگان: دکتر علیرضا سیفی؛ دانیال شکوهی؛ عاطفه قلیزادگان احسان آباد؛ رخشنده ابراهیم پور
 ویراستار علمی: دکتر نسرین مشتاقی
 ویراستار ادبی: مصطفی قندهاری
 مشخصات: وزیری، ۲۰۰ نسخه، چاپ اول، تابستان ۱۳۹۹
 چاپ و صحافی: چاپخانه دقت
 بها: ۲۵۰/۰۰۰ ریال
 حق چاپ برای انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد محفوظ است.

مراکز پخش:

فروشگاه و نمایشگاه کتاب پردیس: مشهد، میدان آزادی، دانشگاه فردوسی مشهد، جنب سلف یاس
 تلفن: ۳۸۸۳۳۷۲۷-۳۸۸۰۲۶۶۶ (۰۵۱)
 مؤسسه کتابیران: تهران، خیابان کارگر جنوبی، خیابان لبافی نژاد، بین خیابان فروردین و اردیبهشت،
 شماره ۲۳۸، تلفن: ۶۶۴۹۴۴۰۹-۶۶۴۸۴۷۱۵ (۰۲۱)
 مؤسسه دانشپیران: تهران، خیابان انقلاب، خیابان منیری جاوید (اردیبهشت) نش خیابان نظری، شماره ۱۴۲
 تلفکس: ۶۶۴۰۰۲۲۰-۶۶۴۰۰۱۴۴ (۰۲۱)



فهرست مطالب

۷	 بیشگفتار
۹	 فصل ۱: اهمیت فناوری های نوین مهندسی ژنتیک گیاهی
۱۰	 گیاهان مهندسی ژنتیک شد
۱۲	 روش های انتقال ژن به گیاهان
۱۲	 روش های انتقال ژن پایدار
۱۳	 مکانیسم مولکولی انتقال ژن به گیاهان توسط دربر اکتیریوم
۱۴	 روش های بیان موقت ژن در گیاهان
۱۵	 نگرانی های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک
۱۷	 فناوری های ویرایش ژنوم
۱۷	 منابع
۱۹	 فصل ۲: فناوری های ویرایش ژنوم
۲۰	 سیر تکاملی روش های ویرایش ژنوم
۲۰	 مگانو کلازها
۲۲	 نوکلئازهای متصل به فاکتورهای رونویسی انگشت روی (ZFN)
۲۳	 آئزیم FokI
۲۴	 فاکتورهای رونویسی ZFP
۲۵	 استفاده از فناوری ZFN در گیاهان
۲۷	 نوکلئازهای متصل به پروتئین های افکتوری TAL (TALEN)
۲۷	 پروتئین های افکتوری TALE
۲۹	 استفاده از فناوری TALEN برای ویرایش ژنوم در گیاهان
۳۰	 منابع

فصل ۳: سیستم کریسپر به عنوان سیستم دفاعی باکتریایی.....	۳۳
تاریخچه.....	۳۳
ساختار جایگاه های کریسپری.....	۳۴
نقش سیستم کریسپر در پروکاریوت ها.....	۳۵
تنوع در سیستم های کریسپری.....	۳۸
مکانیسم مولکولی ایمنی اکتسابی به واسطه سیستم کریسپر.....	۳۹
فرایند اکتساب.....	۴۳
منابع.....	۴۴
فصل ۴: سیستم کریسپر به عنوان ابزار ویرایش ژنوم.....	۴۷
سیر تحولات و پیشرفت های سیستم ویرایش ژنوم.....	۴۷
ساختار و مکانیسم عمل پروتئین Cas9.....	۴۹
انواع مختلف پروتئین های Cas در ویرایش ژنوم.....	۵۱
ا. انواع تغییر یافته آنزیم Cas9.....	۵۱
ب. Cas12a.....	۵۴
ج. Cas13.....	۵۶
د. CasX.....	۵۷
انواع مختلف RNA های هدایتگر.....	۵۸
ا. RNA های راهنمای کوتاه (truRNA).....	۵۸
ب. RNA راهنما همراه با رایوزایم (RGR).....	۵۹
ج. trRNA-gRNA پلی سیستمونیک (PTG-Cas9).....	۵۹
د. استفاده از ریونوکلئاز Csy4 برای پردازش sgRNA.....	۵۹
ه. پیشبر های دو طرفه.....	۶۰
منابع.....	۶۰
فصل ۵: ساخت سازه های کریسپر Cas9 بر اساس روش همسانه سازی گلدن گیت.....	۶۵
طراحی sgRNA.....	۶۵
سیستم همسانه سازی گلدن گیت.....	۶۶
استخراج پلاسمید سوپرکویل.....	۶۷
انتخاب sgRNA برای ژن EPSPS.....	۶۸
طراحی آغازگر برای ساخت sgRNA.....	۶۹

۶۹	 ساخت sgRNA از طریق انجام PCR
۷۰	 خالص سازی محصول PCR
۷۰	 واکنش هضم اتصال اول برای سرهم کردن سازه AtU6::EPSPS_sgRNA
۷۳	 واکنش هضم اتصال دوم برای سرهم کردن سازه S::Cas9-AtU6::EPSPS_sgRNA
۷۳	 منابع

۷۵	 فصل ۶: روش های انتقال Cas9 و sgRNA به سلول گیاهی
۷۸	 روش های آرایه، تارایی سازه/کمپلکس کریسپر
۷۸	 ا. بیان پروتوپلاست
۷۹	 ب. تریز اگره ستریم در برگ
۷۹	 شناسایی جهش ها حاصل از سان سازه های کریسپر
۸۰	 ا. الکتروفورز محصول PCR
۸۰	 ب. تشخیص حذف سایه برشی، کت آنزیم برشی
۸۰	 ج. روش های مبتنی بر شناسایی هترودر لکم های ناشی از جفت شدگی های ناسازگار
۸۲	 د. توالی یابی
۸۲	 منابع

۸۵	 فصل ۷: ایجاد مقاومت به علف کش در گیاهان از طریق ویرایش ژنوم
۸۵	 علف کش گلایفوسیت و مقاومت به آن در موجودات زنده
۸۶	 مسیر شیکیمات و اهمیت آن در گیاهان
۸۸	 مکانیسم عمل علف کش گلایفوسیت بر مسیر شیکیمات
۸۸	 مقاومت به علف کش گلایفوسیت در علف های هرز
۹۰	 مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به گلایفوسیت
۹۰	 مقاومت به گلایفوسیت با موتاسیون های دو گانه
۹۱	 مقاومت به گلایفوسیت از طریق ویرایش ژنوم
۹۲	 ویرایش ژن کدکننده آنزیم ALS برای ایجاد مقاومت به علف کش
۹۳	 منابع

۹۵	 فصل ۸: استفاده از فناوری ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی
۹۵	 سیستم ایمنی گیاهان
۹۸	 مهندسی ژنتیک برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی

گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های ویروسی	۹۸
گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های باکتریایی	۹۹
گیاهان مهندسی ژنتیک شده مقاوم به بیماری های قارچی	۱۰۰
استفاده از ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های گیاهی	۱۰۰
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های ویروسی	۱۰۱
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های باکتریایی	۱۰۲
ویرایش ژنوم برای ایجاد مقاومت به بیماری های قارچی	۱۰۳
منابع	۱۰۴

فصل ۹: ملاحظات زیست ایمنی گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم

قوانین و مقررات مربوط به محصولات مهندسی ژنتیک شده	۱۱۰
قوانین و مقررات اتحادیه اروپا در خصوص محصولات مهندسی ژنتیک شده	۱۱۰
قوانین و مقررات ایالات متحده آمریکا در خصوص محصولات مهندسی ژنتیک شده	۱۱۱
قوانین و مقررات مربوط به محصولات حاصل از ویرایش ژنوم	۱۱۲
سطوح ارزیابی محصولات حاصل از ویرایش ژنوم	۱۱۳
ا. سطح تکنیکی	۱۱۴
ب. سطح مهار	۱۱۴
ج. سطح مدیریت و نظارت	۱۱۴
د. استاندارد بین المللی	۱۱۵
قوانین اتحادیه اروپا در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم	۱۱۵
قوانین ایالات متحده آمریکا و کانادا در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم	۱۱۷
قوانین چین در مورد گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم	۱۱۸
منابع	۱۱۹
نمابه	۱۲۰

پیشگفتار

در چند سال اخیر دستاوردهای شگرفی در دست‌ورزی ژنتیکی هدفمند حاصل شده است که تحت عنوان مهندسی ژنوم یا ویرایش ژنوم مطرح می‌شوند. ویرایش ژنوم این امکان را فراهم می‌کند تا بدون اینکه هیچ DNA اضافی وارد ژنوم هدف شود، به صورت کاملاً هدفمند بتوان حتی در سطح تک‌نوکلئوتید ژنوم هدف را به نحو دلخواه تغییر داد و یا یک ژن یا تعدادی ژن را در محل مشخصی از ژنوم اضافه کرد. چنین امکانی می‌تواند بسیاری از نگرانی‌های موجود در مورد گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده را برطرف سازد. در حال حاضر طبق آیین‌نامه‌های ایالات متحده آمریکا گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم همانند گیاهان حاصل از به‌نژادی گیاهی در نظر گرفته می‌شوند. و قوانین سخت‌گیرانه به گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده شامل گیاهان تولیدشده از طریق ویرایش ژنوم مربوط نمی‌شود. بنابراین، امیدهای بسیاری وجود دارد که دست‌ورزی گیاهان از طریق ویرایش ژنوم راهکار مناسب‌تری برای استفاده از پیشرفت‌های نظری در ژنتیک و بهره‌برداری عملی از آن‌ها در به‌نژادی گیاهی فراهم سازد.

فناوری ویرایش ژنوم یکی از مباحث جذاب و رو به گسترش در ایران است که محققان زیادی در حوزه زیست‌شناسی مولکولی را به خود جلب کرده است و انتظار می‌رود در ۲-۳ سال آینده، فناوری مطرح در مهندسی ژنتیک گیاهی، جانوری و پزشکی باشد. یکی از اهداف بلند چشم‌انداز زیست‌سازمانده جمهوری اسلامی ایران توسعه فناوری‌های نو از جمله زیست‌فناوری است. در سند ملی زیست‌فناوری مصوبه هیئت محترم دولت در تاریخ ۱۳۸۳/۲/۱۶، به صراحت بر نقش مهم این فناوری در ارتقای کیفیت و کمیت تولیدات کشاورزی به عنوان یکی از آرمان‌های ملی در حوزه زیست‌فناوری تأکید شده است. با این حال، توسعه کشت گیاهان مهندسی ژنتیک‌شده در ایران، با وجود نیاز مبرم به آن، با مشکلاتی مواجه است که بخشی از این مشکلات به دلیل وجود نگرانی‌های عمومی در مورد این نوع گیاهان است. بنابراین، امید است با استفاده از فناوری‌های ویرایش ژنوم بتوان بخش عمده‌ای از این نگرانی‌ها را برطرف کرد و در جهت رفع گوشه‌ای از مشکلات حوزه کشاورزی گام برداشت.

این کتاب که حاصل چهار سال پژوهش و مطالعه در زمینه ویرایش ژنوم در گیاهان می‌باشد، مجموعه‌ای است از مباحث نظری و عملی در مورد فناوری CRISPR-Cas (کریسپر)، یکی از روش‌های ویرایش

ژنوم، که امید است مورد استفاده پژوهشگران و دانشجویان تحصیلات تکمیلی در رشته‌های بیوتکنولوژی و زیست‌شناسی مولکولی گیاهی قرار گیرد. فصول کتاب به نحوی تنظیم شده است که از یک طرف قابلیت استفاده به عنوان یکی از منابع آموزشی در دروسی مانند مهندسی ژنتیک را داشته باشد و از طرف دیگر برای پژوهشگران علاقه مند استفاده از این فناوری اطلاعات کاربردی را نیز فراهم آورد. هرچند تلاش شده است تا به روزترین مطالب در زمینه فناوری کریسپر جمع آوری شود، لیکن با توجه به سرعت زیاد پیشرفت‌ها در این زمینه (تقریباً هر هفته ابداع و دستاوردی جدید در مورد ویرایش ژنوم در دنیا گزارش می‌شود)، تعقیب و پوشش تمام دستاوردها در این حوزه عملاً میسر نبود و تلاش خواهد شد در چاپ‌های بعدی کتاب مباحث کامل‌تر و جامع‌تری ارائه شود.

تلاش شده است که تا حد امکان مطالب با دقت کافی ارائه شود و اشکالات محتوایی و یا نگارشی در متن کتاب وجود نداشته باشد. با این حال، از خوانندگان محترم تقاضا دارم اشکالات احتمالی را به نحو مقتضی به این جانب منعکس کنند و در ویرایش‌های بعدی، اشکالات و کاستی‌ها رفع شود.

علیرضا سیفی

دی ماه ۱۳۹۸