مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 online الکترونیکی
دوره ۱۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳
صفحه ۹-۱

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 13, Number 1, Pages: 1-9

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61186/gebsj.13.1.12

ویرایش ژن *DAD1* در آرابیدوپسیس و کلزا با هدف القای نرعقیمی

DAD1 gene editing in *Arabidopsis* and rapeseed towards inducing sterility

راحیل دولت آبادی[۱]، عبدالرضا باقری[۲]، سید حسن مرعشی[۲]، سعید ملک زاده شفارودی[۲]

Rahil Dolatabadi[1], Abdolreza Bagheri[2], Seyyed Hasan Marashi[2], Saied Malekzadeh Shafaroudi[2]

۱- دانشجوی دکتری، ۲- استادان

گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ ایران

1. PhD Student, 2. Professors, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

Corresponding Author, Email: نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی
bagheriyazd@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۹- تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۶/۷)
Received: 2024/01/21 | Accepted: 2024/04/29 | Published: 2024/08/28

Abstract

Hybrid seed production, which is one of the effective strategies to increase crop yield, relies on production of male sterile lines. The objective of this study was to investigate the possibility of producing male sterile lines in rapeseed using CRISPR technology. Different genes involved in the development of pollen and anthers were analyzed and the *DAD1* gene, which encodes a chloroplast phospholipase and has two copies in the rapeseed genome, was selected as the target gene. After designing the CRISPR construct for this gene, the efficacy of this construct was investigated in Arabidopsis and rapeseed plants. In total, 18 *Arabidopsis* plants and 8 transgenic rapeseed plants containing the CRISPR construct were obtained, but none of the putative transgenic rapeseed plants reached the stage of seed production, and the putative transgenic *Arabidopsis* plants produced empty capsules. To check the effect of the CRISPR construct, DNA from three putative transgenic rapeseed plants was extracted and the sequence in the desired region of the *DAD1* gene was analyzed. Sequencing results showed that deletions and additions have occurred in the target site of the CRISPR construct in the genomes of these 3 lines, and the lack of seed production in transgenic plants may be due to the failure of the *DAD1* gene. The results of this study indicate that it is possible to achieve sterility using site-directed mutagenesis in *DAD1* gene. To confirm the results and restore fertility to these lines, more investigations using inducible promoters for driving the CRISPR construct are required.

Keywords: Anther, CRISPR, Hybrid seed

رفرانس دهی این مقاله Citation

Dolatabadi R, Bagheri A, Marashi S H, Malekzadeh Shafaroudi S. (2024). DAD1 gene editing in Arabidopsis and rapeseed towards inducing sterility. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (1) : 1-9. Doi: 10.61186/gebsj.13.1.12
URL: http://gebsj.ir/article-1-482-en.html

دولت آبادی ر، باقری ع، مرعشی ح، ملک زاده شفارودی س. (۱۴۰۳). ویرایش ژنDAD1 در آرابیدوپسیس و کلزا با هدف القای نرعقیمی. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی.; ۱۳ (۱): ۱- ۹

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 1, 2024

خلاصه

این پژوهش با هدف بررسی امکان تولید لاین نرعقیم در گیاه روغنی کلزا با استفاده از فناوری کریسپر انجام شده است. در این راستا ژن‌های مختلف دخیل در نمو دانه گرده و بساک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و ژن *DAD1*، که یک فسفولیپاز کلروپلاستی را کد می‌کند و در ژنوم کلزا دو نسخه از آن وجود دارد، به عنوان ژن هدف انتخاب شد. پس از طراحی سازه کریسپری برای این ژن، کارکرد این سازه در گیاهان آرابیدوپسیس و کلزا مورد بررسی قرار گرفت. انتقال این سازه با موفقیت انجام شد و در مجموع، ۱۸ گیاه آرابیدوپسیس و ۸ گیاه کلزای تراریخته با سازه کریسپری حاصل شد، ولی هیچکدام از گیاهان کلزای تراریخته به مرحله تولید بذر نرسیدند و گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته نیز کپسول‌های خالی از بذر تولید کردند. برای بررسی کارکرد سازه کریسپری، DNA حاصل از سه گیاه کلزای تراریخته استخراج شد و ایجاد جهش در ناحیه مورد نظر ژن *DAD1* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج توالی‌یابی نشان داد که در محل هدف سازه کریسپر، حذف و اضافه‌هایی در توالی ژن *DAD1* در این ۳ لاین اتفاق افتاده است که عدم تولید بذر در گیاهان تراریخته ممکن است به دلیل از کار افتادن ژن *DAD1* باشد. فارغ از این مسأله، نتایج این بررسی بیانگر این است که امکان دستیابی به نرعقیمی با استفاده از این روش امکانپذیر است. در عین حال برای تایید نتایج و بازگرداندن باروری به این لاین‌ها بررسی‌های بیشتری با استفاده از پروموترهای القایی در این سازه کریسپری مورد نظر است.

کلمات کلیدی: بذر هیبرید، بساک، کریسپر، CRISPR

مقدمه

Introduction

تولید بذر هیبرید به عنوان روشی کارا برای افزایش عملکرد گیاهان زراعی از اهمّیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر بیش از نیمی از تولید بذر محصولات زراعی اصلی اعم از خودگشن و دگرگشن، مثل ذرت، برنج، سورگوم، کلزا و آفتابگردان از ارقام هیبرید حاصل می‌شود (Li *et al.* 2007). کلزا (*Brassica napus* L.) مهمترین گونه‌ی زراعی جنس براسیکا می‌باشد و یک دانه روغنی مهم به سبب کیفیت بالای روغن خوراکی است (Ghodarati *et al.*, 2020). با توجه به اینکه عملکرد ارقام هیبرید کلزا بیشتر از ارقام غیرهیبرید است، تولید بذر هیبرید یکی از اولویت‌های تحقیقاتی کلزا می‌باشد.

چالش اصلی در تولید بذر هیبرید جلوگیری از خودگشنی است که می‌تواند با روش‌های مکانیکی، استفاده از گامت‌کش‌های شیمیایی ویژه گامت نر، و یا با استفاده از لاین‌های نرعقیم، که نتیجه جهش در ژن‌های هسته‌ای و یا میتوکندریایی هستند، انجام شود. دانشمندان از روش‌های مهندسی ژنتیک نیز برای تولید لاین‌های نر عقیم استفاده کرده‌اند. برای مثال بیان ژن‌های *Barnase* باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* تحت کنترل پروموترهای ویژه بساک در توتون منجر به نرعقیمی شد (Zhan *et al.* 1996; Denise *et al.* 1993). گروهی دیگر از پژوهشگران با بیان ژن بتاکتوتیولیاز (*phA*) در کلروپلاست توتون، گیاهانی تولید کردند که کاملا طبیعی بودند و فقط دانه گرده تولید نمی‌کردند (Ruiz and Daniell 2005). بیان هدفمند پروتئازها یا آنزیم‌های برشی در بساک راهکارهای موفق دیگر در ایجاد نرعقیمی بوده است (Millwood *et al.* 2016; Konagaya *et al.* 2008). خاموشی ژن *DAD1*، که کدکننده یک فسفولیپاز دخیل در مسیر بیوسنتزی اسید جاسمونیک است، در *B. rapa* باعث نرعقیمی شد که با اعمال جاسمونیک اسید باروی قابل بازگرداندن بود (Hatakeyama *et al.* 2003). ژن *Bcp1* یک ژن ویژه بساک در آرابیدوپسیس (Xu *et al.* 1995) و *B. campestris* (Theerakulpisut *et al.* 1991) است که خاموشی آن منجر به نرعقیمی در آرابیدوپسیس (Xu *et al.* 1995) و کلزا (Zhang *et al.* 2005) می‌شود.

معرفی فناوری‌های ویرایش ژنوم در دهه اخیر سبب شد تا قابلیت‌های بی سابقه‌ای در اختیار به‌نژادگران قرار گیرد. با استفاده از این فناوری‌ها می‌توان به صورت کاملا هدفمند و بدون اینکه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

هیچ DNA ناخواسته‌ای وارد گیاه شود حتی در سطح تک نوکلئوتید ژن هدف را به صورت دلخواه تغییر داد، و یا ژنی را در محل مشخصی از ژنوم اضافه کرد (Tuncel *et al.* 2023; Lassoued *et al.* 2019; Pixley *et al.* 2022). فناوری ویرایش ژنوم این حُسن را دارد که می تواند بخشی از نگرانی‌های موجود در مورد مهندسی ژنتیکی گیاهان را برطرف کند (Zhang *et al.* 2020). در میان روش‌های مختلف ویرایش ژنوم، سیستم کریسپر (CRISPR) دارای مزایایی است که باعث شده این فناوری در عرصه‌های مختلف زیست‌شناسی مولکولی مورد توجه محققان قرار گیرد ((Amini *et al.*2023). سیستم کریسپر ساده و نسبتاً ارزان است و می‌توان با آن بیش از یک ناحیه از ژنوم را به‌طور هم‌زمان ویرایش کرد (Langner *et al.* 2018; Zhang *et al.* 2020).

موتاسیون‌زایی هدفمند در ژن‌های کلیدی نمو دانه گرده از طریق روش‌های ویرایش ژنوم از جدیدترین فناوری‌های مورد استفاده برای القای نرعقیمی در گیاهان است که اخیرا نتایج امیدبخشی در این زمینه حاصل شده‌است. برای مثال پژوهشگران از طریق موتاسیون‌زائی هدفمند در ژن کدکننده آنزیم منوکسیژناز P450 در برنج و سورگوم، موفق به تولید لاین‌های نرعقیم در این گیاهان شده‌اند (Cigan *et al.* 2017). این پژوهش باهدف بررسی امکان تولید لاین‌های نرعقیم کلزا با استفاده از روش کریسپر انجام‌شده است. در این تحقیق تولید لاین نرعقیم کلزا از طریق موتاسیون‌زایی هدفمند در یک ژن کلیدی مسیر رشد و نمو دانهٔ گرده بررسی شد.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

مواد گیاهی و آنالیزهای بیوانفورماتیکی برای انتخاب ژن: در این پژوهش از آرابیدوپسیس تالیانا رقم کلمبیا و کلزا، رقم مودنا، که بذور آن از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه شده بود، استفاده شد.

ابتدا با بررسی منابع، ژن‌های کلیدی دخیل در نمو دانه گرده و بساک در آرابیدوپسیس شناسایی شد. سپس توالی mRNA این ژن-ها در آرابیدوپسیس برای BLASTn بر روی توالی‌های CDS کلزا، در پایگاه اطلاعاتی ژنوم کلزا (http://brassicadb.cn)، استفاده شد. با این روش تعداد نسخه‌های هر کدام از ژن‌های آرابیدوپسیس در ژنوم کلزا مشخص شد و در نهایت ژن مهم *DAD1* که فقط ۲ نسخه از آن در ژنوم کلزا وجود داشت برای ادامه کار انتخاب شد.

آنالیزهای مولکولی: پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق، از شرکت ماکروژن کره جنوبی تهیه شد و آماده‌سازی آن‌ها طبق دستورالعمل ارائه شده توسط این شرکت انجام گرفت. جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده شده در این پژوهش را نشان می‌دهد.

جدول۱- توالی پرایمرهای استفاده شده برای ساخت سازه‌های کریسپری ژن *DAD1*.

Table 1.Sequence of the primers used for assembly of the *DAD1* CRISPR construct.

Sequence (5'→ 3')	Primer Name
GTGGTCTCAATTGACGTTTAAACGTGCGCCGATGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG	sgDAD1
CGGACGTTTTTAATGTACTG	LB
ATCCTGTCAAACACTGATAG	RB
TGTGGTCTCAAGCGTAATGCCAACTTTGTAC	PDS_R
AGATTGAATCCTGTTGCCGG	Det_F
CAAGATGGATTGCACGCAGG	NPTII-F
GGCCACAGTCGATGAATCCA	NPTII-R
GAATCGACCTCTCTCAGC	Cas9
TGATCAAAAGTCCCACATCG	AtU6

برای طراحی sgRNA اختصاصی و کارا برای ژن *DAD1* از ابزار آنلاین CRISPR Direct (Naito *et al.* 2015) استفاده شد. از بین sgRNA های پیشنهادی نرم افزار، sgRNAیی انتخاب شد که بر اساس نواحی حفاظت شده این ژن در آرابیدوپسیس و کلزا طراحی شده بود، و لذا در تئوری در هر دو گونه گیاهی قابل استفاده بود. برای اطمینان بیشتر از اختصاصی بودن این sgRNAها در کلزا، توالی ۲۰ نوکلئوتیدی sgRNAها برای BLAST روی ژنوم کلزا استفاده شد تا اطمینان حاصل شود که sgRNAها فقط با ناحیه ژنومی هدف همردیف می‌شوند.

پلاسمیدهای لازم برای طراحی سازه کریسپری مورد استفاده در این تحقیق، از مرکز تحقیقات جان اینز (John Innes) انگلستان

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

تهیه شد (Belhaj *et al.* 2013) و کلونینگ بر اساس روش گلدن گیت اجرا شد (Weber *et al.* 2011). از آنجا که در کلونینگ با روش گلدن گیت باید از پلاسمیدهای با کیفیت عالی و در فرم سوپرکویل استفاده شود، در این پژوهش پلاسمیدها با استفاده از روش سیلیکا (Grimm and Voß-Neudecker 2003) تخلیص شدند.

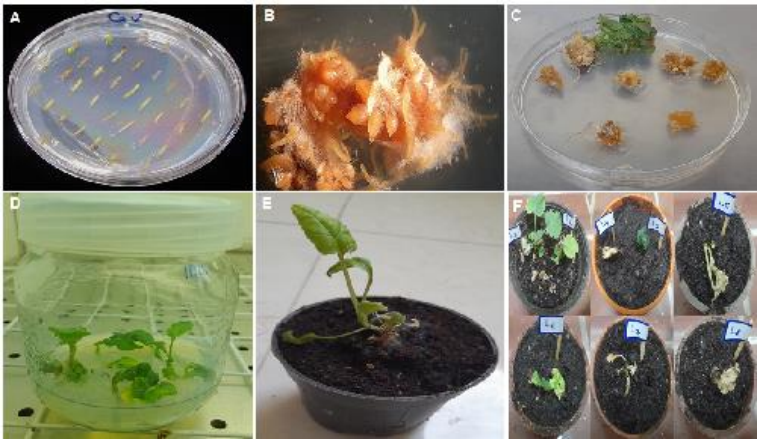
بطور خلاصه ابتدا واکنش PCR با پرایمرهای PDS_R و sg_DAD1بر روی پلاسمید pICH86966 (Addgene #46966) انجام شد تا قطعه sgRNA حاصل شود. واکنش در حجم ۵۰ میکرولیتر شامل ۱۰۰ نانوگرم پلاسمید، ۰/۵ میکرومولار از هر پرایمر، ۲۰۰ میکرومولار dNTPs، و با استفاده از آنزیم پلیمراز *Q5* (NEB #M0493) که دارای خاصیت اگزونوکلئازی ′۳ به ′۵ است، انجام شد. برای تخلیص محصول PCR از روش ارائه شده توسط لی و همکاران (Li et al. 2013) استفاده شد. سپس با روش گلدن-گیت و با استفاده از آنزیم‌های *Bsa*I (NEB #R0535) و T_4 لیگاز (NEB #M0202)، مولکول sgRNA در پلاسمید plCH47751 (Addgene #48002) درج شد. واکنش لیگاسیون به باکتری *E. coli* سویه Top10 با روش شوک حرارتی (Sambrook and Russel, 2001) انتقال یافت و پس از انجام تست سفید-آبی، کلونی‌های سفید انتخاب شدند. پس از تایید کلونی‌ها با PCR و توالی‌یابی، یکی از کلونی‌ها برای ادامه کار استفاده شد. در نهایت قطعه sgRNA با روش گلدن‌گیت و با استفاده از آنزیم‌های *Bpi*I (NEB #R0539) و T_4 لیگاز در پلاسمید pICH47742 (Addgene #48001) درج شد. پس از تایید کلونی‌ها با PCR و توالی‌یابی، یکی از کلونی‌ها برای ادامه کار استفاده شد. جهت توالی‌یابی پلاسمیدها به شرکت نیاژن نور در تهران ارسال شدند.

انتقال سازه کریسپری به آرابیدوپسیس و کلزا: سازه کریسپری نهایی به آگروباکتریوم سویه GV3301 با روش الکتروپوریشن منتقل شد. قبل از انتقال سازه به کلزا، از آنجا که sgRNA طراحی شده ژن *DAD1* آرابیدوپسیس را نیز می‌توانست هدف قرار دهد، سازه کریسپری ابتدا به آرابیدوپسیس انتقال داده شد. برای انتقال ژن به آرابیدوپسیس از روش غوطه‌وری گل‌آذین (Zhang *et al.* 2006) استفاده شد.

برای انتقال ژن به کلزا از روش ارائه شده توسط ماهشواری و همکاران (Maheshwari *et al.* 2011) استفاده شد. برای انجام این کار ابتدا بذور ضد عفونی شده رقم مودنا روی محیط 1/2MS کشت شدند و پس از ۷ روز از هیپوکوتیل گیاهچه‌های حاصل ریزنمونه‌هایی به طول تقریبی نیم سانتیمتر تهیه شد و برای ۴۸ ساعت روی محیط آماده‌سازی (محیط MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۱ میلی‌گرم در لیتر 2,4-D، ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره، و ۰/۰۲۵ درصد MES) قرار داده شد. آگروباکتریوم حاوی سازه کریسپری در ۵۰ میلی لیتر محیط LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین رشد داده شد. پس از سانتریفیوز و رسوب‌دهی، باکتری در محیط MS مایع حاوی ۲ درصد ساکارز و ۲۰۰ میکرومولار استوسرینگون حل شد تا OD_{600} سوسپانسیون باکتری به ۱ برسد. ریزنمونه‌های هیپوکوتیل به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری قرار داده شدند و سپس ریزنمونه‌ها به همان محیط کشت قبلی برگردانده شدند. پلیت‌ها در شرایط تاریکی در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد برای ۴۸ ساعت نگهداری شدند. سپس ریزنمونه‌ها به محیط کالوس‌زایی منتقل شدند. محیط کالوس‌زایی همان محیط هم‌کشتی بود با این تفاوت که ۲۵ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک مروپنم نیز به آن اضافه شد. پلیت‌ها برای ۲ هفته در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت ۲۰۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه نگهداری شدند. سپس کالوس‌های تشکیل شده به محیط کشت باززایی MS حاوی ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۵ میلی گرم در لیتر BAP، ۵ میلی‌گرم در لیتر نیترات نقره، ۲۵ میلی‌گرم در لیتر مروپنم، و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتقال داده شدند. هر زمان گیاهچه‌های باززا شده به محیط ریشه‌زایی شامل MS دارای ۳۰ گرم در لیتر ساکارز، ۰/۱ میلی گرم در لیتر NAA، و ۲۵ میلی گرم در لیتر مروپنم انتقال داده شدند. پس از مشاهده ریشه‌زایی، گیاهچه‌ها به پیت‌ماس استریل منتقل شدند. برای ۲ روز گلدان‌ها در نور کم و داخل اتاقک رشد (کانوایرون مدل TC16)، با رطوبت ۱۰۰ درصد، شدت نور ۵۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، و دمای ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. مراحل انتقال ژن به کلزا در شکل ۱ خلاصه شده است. DNA ژنومی از لاین‌های کلزای تراریخته با

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

روش CTAB (Doyle 1991) استخراج شد. با استفاده از پرایمرهای ژن *DAD1* واکنش PCR به شرحی که قبلا توضیح داده شد انجام شد. محصول PCR برای توالی‌یابی ارسال گردید.



شکل ۱- مراحل انتقال ژن به کلزا. ابتدا هم‌کشتی ریزنمونه‌های هیپوکوتیل با باکتری حاوی سازه کریسپری انجام شد (A). پس از قراردادن ریزنمونه‌ها روی محیط کالوس‌زایی (B) به مدت ۱٤ روز، کالوس‌ها به محیط باززایی انتقال یافتند (C). گیاهچه‌های حاصل روی محیط باززایی به محیط ریشه‌زایی انتقال داده شدند (D) و در نهایت گیاهچه‌های تراریخته احتمالی ریشه‌دار به پیت‌ماس استریل انتقال داده شدند (E و F).

Fig.1. Summary of rapeseed transformation. Hypocotyl explants were co-cultivated with *Agrobacterium* harboring the CRISPR construct (A). After incubation of the explants on callogenesis media (B), calli were transferred onto regeneration media for 14 days (C). Regenerated shoots were transferred onto rooting media (D), and finally the putative transgenic plants were transferred to sterile peat moss (E and F).

نتایج و بحث Results and Discussion

شناسایی ژن کاندید

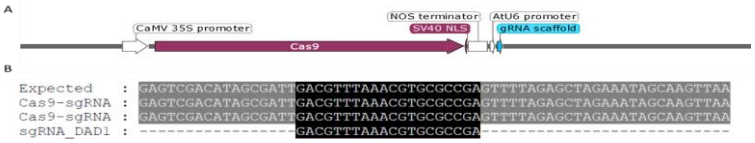
برای پیدا کردن ژن مناسب در ایجاد نرعقیمی در کلزا، اورتولوگ تمام ژن‌های کاندید دخیل در نر عقیمی، که در آرابیدوپسیس گزارش شده بودند (Shi *et al.* 2015)، در ژنوم کلزا جستجو شد و تعداد نسخه‌های این ژن‌ها در کلزا نیز مشخص شد. نتایج این آنالیزها در جدول ۲ خلاصه شده است. از آنجا که در این تحقیق، هدف خاموش کردن ژن بود، هر چه نقش ژن تخصصی‌تر و تعداد کپی آن کمتر باشد مناسب تر خواهد بود. از این رو ژن *DAD1* که دو کپی از آن در ژنوم کلزا وجود داشت برای ادامه کار انتخاب شد.

جدول ۲- ژن‌های کاندید دخیل در نر عقیمی در آرابیدوپسیس و کلزا.

Table 2. Key genes involved in male sterility in *Arabidopsis* and rapeseed.

Gene	*Arabidopsis* Orthologue	Gene Description	Copy Number in *B. napus*
MYB80	AT5g56110	R2R3 MYB Transcription factor	8
MYB26	AT3G13890	MYB26 Transcription factor	4
CDM1	AT1G68200	Zinc finger Transcription factor	5
TDF1	AT3G28470	R2R3 MYB Transcription factor	3
MEE48	AT4G14080	bHLH Transcription factor	11
DYT1	AT4G21330	bHLH Transcription factor	3
MS1	AT5G22260	PHD Transcription factor	2
CEP1	AT5G50260	Cysteine protease	6
DAD1	AT2G44810	Chloroplastic phospholipase	2
AMS	AT2G16910	HLH Transcription factor	4
CYP704B1	AT1G69500	P450 cytochrome	2

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]



شکل۲- موتاسیون‌زایی هدفمند در ژن *DAD1*. طرح شماتیک سازه کریسپری (A) و نتیجه توالی‌یابی ۲ کلون حاوی این سازه (B) نشان داده شده است.

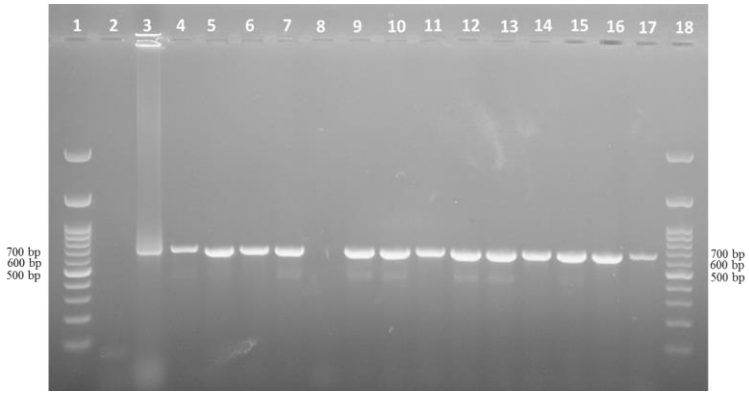
Fig. 2. Site-directed mutagenesis in *Dad1* gene. The scheme of the CRISPR construct (A), and the results of sequencing of 2 clones harboring this construct (B) are shown.

طراحی و ساخت سازهٔ کریسپری ویرایش‌گر برای ژن *DAD1*

از بین sgRNAهای پیشنهادی نرم افزار CRISPR Direct، یکی از sgRNAها انتخاب شد (sgDAD1 در جدول ۱) که قابل استفاده در هر دو گونه گیاهی آرابیدوپسیس و کلزا بود. سازه کریسپری نهایی با روش گلدن‌گیت سرهم‌بندی شد. شکل ۲ طرح شماتیک سازه کریسپری نهایی و نتیجه توالی‌یابی جهت تایید صحت توالی sgRNA در سازه ساخته شده را نشان می‌دهد.

بررسی کارکرد سازه کریسپری در آرابیدوپسیس

در مرحله اول برای ارزیابی کارایی سازه کریسپری، و با توجه به سهولت نسبی انتقال ژن به آرابیدوپسیس، ابتدا سازه کریسپری ساخته شده به آرابیدوپسیس منتقل شد. طی دو دور انتقال ژن به روش غوطه‌وری گل آذین در مجموع ۱۸ گیاه آرابیدوپسیس تراریخته احتمالی نسل T_1، بر اساس مقاومت کانامایسین به عنوان مارکر انتخابگر، به دست آمد. گیاهان شماره ۱، ۲، ۳، و ۱۷در اواسط مراحل رشد از بین رفتند. از ١٤ گیاه باقی‌مانده استخراج DNA انجام شده و حضور تراژن در آنها با استفاده از PCR برای ژن مقاومت به کانامایسین بررسی شد. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در ۱۳ تا از این گیاهان باند مورد انتظار مشاهده شد که نشان می‌دهد احتمالا این گیاهان سازه کریسپری را دریافت کرده‌اند.



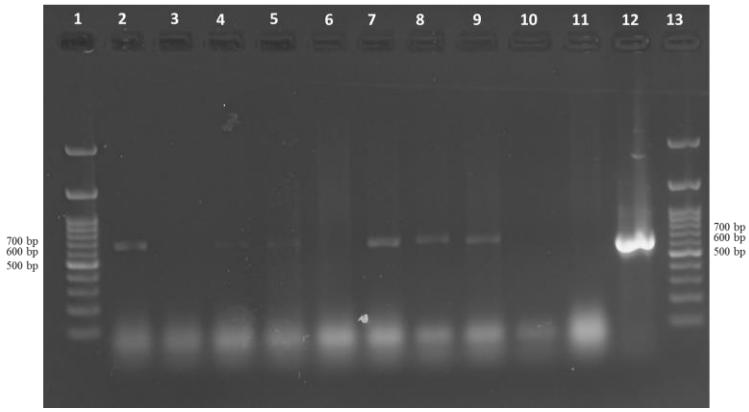
شکل ۳- نتیجه PCR روی گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته احتمالی با استفاده از پرایمرهای ژن *nptII*. از چپ به راست چاهک ۱ و ۱۸ حاوی مارکر اندازه (GeneRuler 100bp DNA Ladder)، چاهک ۲ کنترل منفی (آب)، چاهک ۳ کنترل مثبت (پلاسمید Cas9-sgRNA_Dad1) و از چاهک ٤ تا ۱۷ روی نمونه‌های DNA از لاین های ٤، ٥، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ١٤، ۱۵، ١٦، و ۱۸. اندازه باند مورد نظر حدود ۷۰۰ جفت باز است که در شکل مشخص شده است.

Fig. 3. Results of PCR amplification of *nptII* gene in putative transgenic *Arabidopsis* lines. From left to right: 1 and 18 are GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 2: negative control (water), 3: positive control (Cas9-sgRNA_Dad1 plasmid), and 4 to 17: DNA samples extracted from *Arabidopsis* lines 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, and 17, The size of the expected band is 700 bp.

بررسی کارکرد سازه کریسپری در کلزا

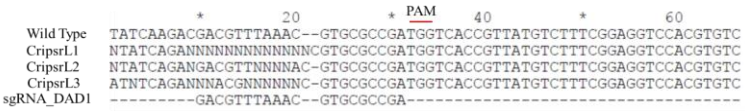
با توجه به اینکه هدف اصلی این پژوهش بررسی کارکرد سازه کریسپری در گیاه زراعی کلزا بود، این سازه به کلزا رقم مودنا نیز انتقال داده شد. در مجموع ۸ گیاه کلزای تراریخته احتمالی که توانایی تولید ریشه داشتند حاصل شد و به پیت ماس منتقل شد (شکل ۱ قسمت F). آنالیز PCR برای ژن انتخابگر *nptII* نشان داد که در گیاهان شماره ۱، ۳، ٤، ٦، ۷، و ۸ سازه کریسپری درج شده-است (شکل ٤).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]



شکل ٤- نتیجه PCR روی گیاهان کلزا تراریخته احتمالی با استفاده از پرایمرهای ژن *nptII*. از چپ به راست چاهک ۱ و ۱۳ حاوی مارکر اندازه (GeneRuler 100bp DNA Ladder)، چاهک‌های ۲ تا ۹ روی نمونه‌های DNA از گیاهان تراریخته احتمالی کلزا، چاهک ۱۰ کنترل منفی (آب)، چاهک ۱۱ کنترل منفی (کلزای غیر تراریخته)، و چاهک ۱۲ کنترل مثبت (پلاسمید Cas9-sgRNA_Dad1). اندازه باند مورد نظر حدود ۷۰۰ جفت باز است که در شکل مشخص شده است.

Fig. 4. Results of PCR amplification of *nptII* gene in putative transgenic rapeseed lines. From left to right: 1 and 13 are GeneRuler 100 bp DNA Ladder, 2 to 9: DNA samples extracted from putative transgenic rapeseed lines, 10: negative control (water), 11: negative control (non-transgenic rapeseed), and 12: positive control (Cas9-sgRNA_Dad1 plasmid), and. The size of the expected band is 700 bp.



شکل ٥- توالی‌یابی ناحیه هدف سازه کریسپری. توالی ناحیه هدف sgDAD1 روی ژن *DAD1* در گیاه غیرتراریخته (Wild Type) و ۳ لاین کریسپری (CrisprL1-L3) نشان داده شده است. توالی و محل sgDAD1 نیز در ردیف پایین مشخص شده است. توالی PAM (TGG) نیز نشان داده شده است.

Fig.5. Results of sequencing of the target region of the CRISPR construct. Sequence of the sgDAD1 sequence on *DAD1* gene in non-transgenic rapeseed plants and 3 putative crispered lines (CrisprL1-L3). Sequence and the position of the sgDAD1 are shown. The PAM sequence (TGG) is indicated on the sequences.

گیاهان کلزای تراریخته یا رشد بسیار بطئی و کندی داشتند، یا خشک شده و از بین رفتند، و یا در یک مرحله رشدی (مرحله ۲ برگ حقیقی) متوقف ماندند. برای بررسی کارکرد سازه کریسپری، DNA ژنومی از ۳ تا از لاین‌های کلزای تراریخته استخراج و ناحیه هدف سازه کریسپری روی ژن *DAD1* تکثیر و توالی‌یابی شد. نتیجه توالی‌یابی نشان داد که دقیقا در ناحیه مورد انتظار برای ایجاد برش دورشته‌ای DNA در ناحیه هدف sgRNA، توالی در ۳ لاین تراریخته کلزا با توالی گیاه غیرتراریخته متفاوت است. هدف این پژوهش امکان سنجی بکارگیری روش کریسپر برای ازکار انداختن ژن *DAD1*، که یک ژن کلیدی در نمو بساک است، برای تولید لاین نرعقیم در کلزا بود. مطالعات قبلی در آرابیدوپسیس نشان داده بود که این ژن بطور اختصاصی در میله پرچم بیان می‌شود و موتاسیون در این ژن باعث نرعقیمی می‌شود (Ishiguro *et al.* 2001). تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که در ژنوم کلزا فقط ۲ نسخه از این ژن وجود دارد (جدول ۲)، بنابراین ژن *DAD1* به عنوان یک گزینه مناسب برای دستورزی ژنتیکی انتخاب شد.

با توجه به سهولت نسبی انتقال ژن به آرابیدوپسیس تالیانا، سازه کریسپری بر اساس یک ناحیه حفاظت‌شده ژن *DAD1* در کلزا و آرابیدوپسیس طراحی شد تا جهش‌زایی هدفمند در هر دو گونه میسر باشد. صحت سازه سرهم‌بندی شده از طریق PCR تایید شد (شکل ۲) و با استفاده از آگروباکتریوم انتقال سازه کریسپری به کلزا و آرابیدوپسیس انجام شد.

در مجموع ۱۸ لاین تراریخته احتمالی آرابیدوپسیس نسل T_1 و ۸ لاین کلزای تراریخته احتمالی نسل T_0 به دست آمد که وجود سازه انتقال یافته در ژنوم آن‌ها با PCR تایید شد (شکل ۳ و ٤). گیاهان آرابیدوپسیس تراریخته به مرحله گلدهی رسیدند، ولیکن هیچکدام

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

بذر تولید نکردند. لذا امکان بررسی کارکرد سازه در نسل T_2 فراهم نشد. گیاهان کلزای تراریخته نیز هیچکدام به مرحله گلدهی نرسیدند و در واقع رشد آن‌ها در یک مرحله اولیه رشد متوقف ماند و در نهایت از بین رفتند (شکل 1F).

جهت بررسی کارکرد سازه کریسپری در گیاهان تراریخته، ناحیه هدف سازه در کلزا در ۳ تا از لاین‌های تراریخته تکثیر و توالی‌یابی شد. در ناحیه مورد انتظار برای ایجاد جهش‌زایی هدفمند، که ۳ نوکلئوتید بعد از توالی PAM (TGG) است (Nishimasu *et al.* 2014)، توالی لاین‌های تراریخته با توالی در لاین وحشی متفاوت بود که نشان می‌دهد احتمالا سازه کریسپری کارایی داشته و جهش‌زائی هدفمند اتفاق افتاده است. تفاوت در لاین‌های ویرایش شده با N مشخص شده است که احتمالا به دلیل این است که برای هر نوکلئوتید بیش از یک باز خوانده شده است. احتمالا در نسل T_0 لاین‌ها یا ناخالص هستند، یا موتاسیون در هر دو نسخه اتفاق نیفتاده است، و یا اینکه موتاسیون از نوع دوآللی بوده است.

در این مطالعه گیاهان تراریخته آرابیدوپسیس با قابلیت تولید بذر و یا گیاهان کلزا با قابلیت رشد طبیعی حاصل نشد که نشان می‌دهد نیاز است تمهیداتی برای بازگرداندن باروری به گیاهان ویرایش شده و همچنین برای بازگرداندن رشد طبیعی به گیاه اندیشیده شود. در موتانت طبیعی *dad1* آرابیدوپسیس اثرات منفی بر روی رشد گیاه گزارش نشده است (Ishiguro *et al.* 2001)، با این حال با توجه به اینکه ژن *DAD1* در مسیر بیوستنز هورمون جاسمونیک اسید فعال است، و جاسمونیک اسید هورمونی است که در پاسخ‌های گیاه به تنش‌های زیستی و غیرزیستی اهمیت دارد و همچنین فرآیندهای نموی مانند رشد ریشه و اندام‌های جنسی را کنترل می‌کند (Zander *et al.* 2020)، این احتمال وجود دارد که از کار افتادن آن باعث بروز اثرات جانبی دیگری در گیاهی مثل کلزا شود. یکی از بهترین راهکارها می‌تواند استفاده از پروموترهای القا شونده برای ژن Cas9 باشد (Liu *et al.* 2016)، بنحوی که فعال شدن سازه کریسپری فقط در زمان گلدهی رخ دهد، و لذا اثرات مخرب در سایر مراحل رشدی بروز نکند. همچنین نیاز است گیاهان تراریخته با این سازه کریسپری با متیل جاسمونات تیمار شوند تا امکان بازگرداندن باروری بررسی گردد.

با توجه به اینکه گیاهان حاصل از ویرایش ژنوم در بسیاری از کشورهای دنیا، از جمله ایالات متحده، به عنوان گیاه تراریخته در نظر گرفته نمی‌شوند و از نظر ماهوی مانند گیاهان حاصل از به‌نژادی گیاهی کلاسیک در نظر گرفته می‌شوند (Tuncel *et al.* 2023)، تولید لاین‌های نرعقیم با روش ویرایش ژنوم با چالش‌های مربوط به گیاهان تراریخته مواجه نخواهند شد. بنابراین امید است در صورت به کارگیری پروموترهای القایی برای بیان هدفمند آنزیم Cas9، و همچنین استفاده از ترکیباتی مانند متیل جاسمونات برای بازگرداندن باروری به لاین‌های ویرایش شده، امکان دستیابی به روشی کارا برای تولید لاین نرعقیم در کلزا فراهم شود.

منابع

References

Amini Neisiani, A., Saidi, A., & Tohidfar, M. (2023). CRISPR and biosafety considerations. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 12(1), 0-0. DOR:20.1001.1.25885073.1402.12.1.10.4. In Persian.

Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., Nekrasov, V. (2013) Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. Plant Methods 9 (1):39. https://doi.org/10.1186/1746-4811-9-39.

Cigan, A.M., Singh, M., Benn, G., Feigenbutz, L., Kumar, M., Cho, M.J., Svitashev, S., Young, J. (2017) Targeted mutagenesis of a conserved anther-expressed P450 gene confers male sterility in monocots. Plant Biotechnology Journal 15 (3):379-389. https://doi.org/ 10.1111/pbi.12633.

Denise, M., Gourret, J., Pellan-Delourne, R., Renard, M., Mariani, C. (1993) Expression of engineered nuclear male sterility in *Brassica napus*. Plant Physiology 101:1295-1304. https://doi.org/10.1104/pp.101.4.1295.

Doyle, J. (1991) DNA protocols for plants. In: Molecular Techniques in Taxonomy. Springer, pp 283-293. https://doi.org/ 10.1007/978-3-642-83962-7_18.

Ghodrati, G., Mohammadi, V., Khanghah, H. Z., & Shafeinia, A. R. (2021). Fertility restoring potential of rapeseed (*Brassica napus*) genotypes in Ogura and Polima CMS systems. Iranian Journal of Field Crop Science, 52(1). DOI: 10.22059/ijfcs.2020.289508.654644. In Persian

Grimm, S., Voß-Neudecker, F. (2003) High-purity plasmid isolation using silica oxide. E coli Plasmid Vectors: Methods

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]

and Applications:83-87. https://doi.org/ 10.1385/1-59259-409-3:83.

Hatakeyama, K., Ishiguro, S., Okada, K., Takasaki, T., Hinata, K. (2003) Antisense inhibition of a nuclear gene, *BrDAD1*, in *Brassica* causes male sterility that is restorable with jasmonic acid treatment. Molecular Breeding 11 (4):325-336. https://doi.org/ 10.1023/A:1023429700668.

Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., Okada, K. (2001) The *DEFECTIVE IN ANTHER DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in Arabidopsis. The Plant Cell 13 (10):2191-2209. https://doi.org/10.1105/tpc.010192.

Konagaya, K.I., Ando, S., Kamachi, S., Tsuda, M., Tabei, Y. (2008) Efficient production of genetically engineered, male-sterile *Arabidopsis thaliana* using anther-specific promoters and genes derived from *Brassica oleracea* and *B. rapa*. Plant Cell Reports 27 (11):1741-1754. https://doi.org/ 10.1007/s00299-008-0598-6.

Langner, T., Kamoun, S., Belhaj, K. (2018) CRISPR crops: plant genome editing toward disease resistance. Annual Review of Phytopathology 56:479-512. https://doi.org/ 10.1146/annurev-phyto-080417-050158.

Lassoued, R., Macall, D.M., Hesseln, H., Phillips, P.W., Smyth, S.J. (2019) Benefits of genome-edited crops: expert opinion. Transgenic Research 28 (2):247-256. https://doi.org/ 10.1007/s11248-019-00118-5.

Li, J.F., Norville, J.E., Aach, J., McCormack, M., Zhang, D., Bush, J., Church, G.M., Sheen, J. (2013) Multiplex and homologous recombination–mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. Nature Biotechnology 31 (8):688-691. https://doi.org/ 10.1038/nbt.2654.

Li, S., Yang, D., Zhu, Y. (2007) Characterization and use of male sterility in hybrid rice breeding. Journal of Integrative Plant Biology 49 (6):791-804. https://doi.org/ 10.1111/j.1744-7909.2007.00513.x.

Liu, K.I., Ramli, M.N.B., Woo, C.W.A., Wang, Y., Zhao, T., Zhang, X., Yim, G.R.D., Chong, B.Y., Gowher, A., Chua, M.Z.H. (2016) A chemical-inducible CRISPR–Cas9 system for rapid control of genome editing. Nature Chemical Biology 12 (11):980-987. https://doi.org/ 10.1038/nchembio.2179.

Maheshwari, P., Selvaraj, G., Kovalchuk, I. (2011) Optimization of *Brassica napus* (canola) explant regeneration for genetic transformation. New Biotechnology 29 (1):144-155. https://doi.org/ 10.1016/j.nbt.2011.06.014.

Millwood, R.J., Moon, H.S., Poovaiah, C.R., Muthukumar, B., Rice, J.H., Abercrombie, J.M., Abercrombie, L.L., Green, W.D., Stewart, C.N. (2016) Engineered selective plant male sterility through pollen-specific expression of the *Eco*RI restriction endonuclease. Plant Biotechnology Journal 14 (5):1281-1290. https://doi.org/ 10.1111/pbi.12493.

Naito, Y., Hino, K., Bono, H., Ui-Tei, K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites. Bioinformatics 31 (7):1120-1123. https://doi.org/ 10.1093/bioinformatics/btu743.

Nishimasu, H., Ran, F.A., Hsu, P.D., Konermann, S., Shehata, S.I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., Nureki, O. (2014) Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. Cell 156 (5):935-949. https://doi.org/ 10.1016/j.cell.2014.02.001.

Pixley, K.V., Falck-Zepeda, J.B., Paarlberg, R.L., Phillips, P.W., Slamet-Loedin, I.H., Dhugga, K.S., Campos, H., Gutterson, N. (2022) Genome-edited crops for improved food security of smallholder farmers. Nature Genetics 54 (4):364-367. https://doi.org/ 10.1038/s41588-022-01046-7.

Ruiz, O.N., Daniell, H. (2005) Engineering cytoplasmic male sterility via the chloroplast genome by expression of β-ketothiolase. Plant Physiology 138 (3):1232-1246. 10.1104/pp.104.057729.

Sambrook, J., & Russell, D.W. (2001). Cloning and transformation with plasmid vectors. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 157-258. https://doi.org/10.1101/pdb.top101170

Shi, J., Cui, M., Yang, L., Kim, Y.J., Zhang, D. (2015) Genetic and biochemical mechanisms of pollen wall development. Trends in Plant Science 20 (11):741-753. https://doi.org/ 10.1016/j.tplants.2015.07.010.

Theerakulpisut, P., Xu, H., Singh, M.B., Pettitt, J.M., Knox, R.B. (1991) Isolation and developmental expression of *Bcp1*, an anther-specific cDNA clone in *Brassica campestris*. The Plant Cell 3 (10):1073-1084. https://doi.org/ 10.1105/tpc.3.10.1073.

Tuncel, A., Pan, C., Sprink, T., Wilhelm, R., Barrangou, R., Li, L., Shih, P.M., Varshney, R.K., Tripathi, L., Van Eck, J. (2023) Genome-edited foods. Nature Reviews Bioengineering:1-18. https://doi.org/ 10.1038/s44222-023-00115-8.

Weber, E., Gruetzner, R., Werner, S., Engler, C., Marillonnet, S. (2011) Assembly of designer TAL effectors by Golden Gate cloning. PloS One 6 (5):e19722. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0019722.

Xu, H., Knox, R.B., Taylor, P.E., Singh, M.B. (1995) *Bcp1*, a gene required for male fertility in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 92 (6):2106-2110. https://doi.org/ 10.1073/pnas.92.6.2106.

Zander, M., Lewsey, M.G., Clark, N.M., Yin, L., Bartlett, A., Saldierna Guzmán, J. P., ... & Ecker, J. R. (2020). Integrated multi-omics framework of the plant response to jasmonic acid. Nature Plants, 6(3), 290-302. https://doi.org/10.1038/s41477-020-0605-7.

Zhan, X.Y., Wu, H.M., Cheung, A.Y. (1996) Nuclear male sterility induced by pollen-specific expression of a ribonuclease. Sexual Plant Reproduction 9 (1):35-43. https://doi.org/ 10.1007/BF00230364.

Zhang, X., Henriques, R., Lin, S.S., Niu, Q.W., Chua, N.H. (2006) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. Nature Protocols 1 (2):641-646. https://doi.org/ 10.1038/nprot.2006.97.

Zhang, Y., Pribil, M., Palmgren. M., Gao, C. (2020) A CRISPR way for accelerating improvement of food crops. Nature Food 1 (4):200-205. https://doi.org/ 10.1038/s43016-020-0051-8.

Zhang, Y., Singh, M.B., Swoboda, I., Bhalla, P.L. (2005) Agrobacterium-mediated transformation and generation of male sterile lines of Australian canola. Crop and Pasture Science 56 (4):353-361. https://doi.org/ 10.1071/AR04175.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-11-17]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.12]