

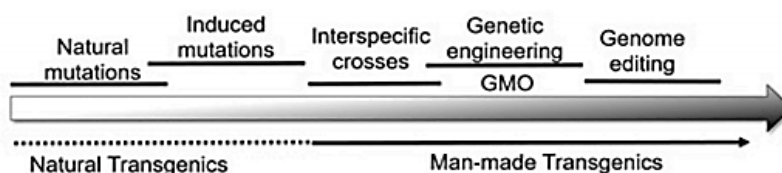
بهبودهای حاصل در دانه‌های روغنی به کمک بیوتکنولوژی مدرن

(گیاه کلزا-قسمت اول)

Oilseed crops improvement with the help of modern biotechnology (canola seed, part 1)

مقدمه:

گیاه کلزا (*Brassica napus* L.) سومین محصول مهم روغنی جهان بوده و در بین آن دسته از محصولات زراعی که هدف اصلاح ژنتیکی بوده‌اند، تاریخچه بی‌نظیری دارد بطوریکه یکی از اولین و پرشتاب‌ترین محصولات اصلاح شده بیوتکنولوژیکی است. کلزا توسط تمدن‌های باستانی در آسیا و مدیترانه کشت و از روغن آن برای روشنایی استفاده می‌شد. این گیاه اولین بار ۲۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح در کشور هند کشف و در قرن ۱۳ در اروپا کشت گردید. ارقام اولیه این گیاه کانادایی بوده و به عنوان روان‌کننده در کشتی‌های نیروی دریایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. کلزا تا پایان جنگ جهانی دوم، در کشورهای غربی جهت مقاصد خوراکی مورد بهره‌برداری قرار نمی‌گرفت ولیکن در آن زمان، کمبود چربی و روغن، منجر به بررسی چندین گونه از جمله گل آفتابگردان، گلرنگ، سویا و کلزا به عنوان منبع روغن خوراکی شد. در نتیجه‌ی این بررسی، گیاه کلزا در مناطق وسیعی از غرب کانادا توسط محققین سازگار شد. این سلسله رویدادها نهایتاً منجر به پیشرفت محصول کلزا دانه روغنی و اصلاح آن گردید (Beszterda & Nogala-Kaľucka 2019). کنوانسیون تنوع زیستی (CBD)، "بیوتکنولوژی" را به عنوان هر گونه کاربرد تکنولوژیکی از سیستم‌های زیستی، موجودات زنده یا مشتقات آن جهت ساخت و اصلاح محصولات یا فرایندها برای منظور خاص، تعریف کرده است. در حقیقت، بیوتکنولوژی شامل چندین ابزار و تکنیک تولید مواد غذایی و کشاورزی است. با این حال، هنگامی که از تکنیک‌های جدید DNA و زیست‌شناسی مولکولی اعم از انتقال ژن خاص به ژنوم و یا کلون‌سازی گیاهان و حیوانات استفاده می‌شود، بیوتکنولوژی مدرن نامیده می‌شود. بیوتکنولوژی مدرن استفاده از فناوری DNA نو ترکیب جهت تولید میکروارگانیسم‌های اصلاح شده، گیاهان و حیوانات را فراهم می‌کند تا آنها را برای چندین کاربرد، سازگارتر کند (Villanueva-Mejia & Alvarez 2017).



طیف گسترده‌ای از فرآیندهای طبیعی و مصنوعی در راستای تغییر ژنوم گیاه (Duensing et al, 2018)

¹ Convention on Biological Diversity

با وجود اینکه ویژگی‌های مطلوب روغن و پروتئین دانه کلزا مانند کاهش اروسیک اسید و گلوکوزینولات، به کمک روش‌های کلاسیک در طی سال‌های ۱۹۷۰ الی ۱۹۸۰ ایجاد شدند، ولیکن اصلاح کلاسیک بسیار زمانبرتر، غیرهدفمندتر و غیرقابل پیشگویی‌تر از مهندسی ژنتیک مدرن و هدایت شده است. مهندسی ژنتیک گیاه کلزا به دلیل منابع اطلاعاتی ارزشمندی که در سالهای اخیر از خانواده براسیکا ایجاد شده است، بسیار پیشرفت کرده‌است، از این پایگاه‌ها می‌توان به کلکسیون ESTها (www.brassicagenomics.ca/ests)، جمعیت‌هایی که از نظر ژنتیکی نقشه‌یابی شده‌اند (www.brassica.ca) و توالی‌های ژنومی کلزا (www.jic.ac.uk) اشاره کرد. علاوه بر این، *B. napus* ویژگی منحصر به فردی نسبت به سایر گیاهان دارد، این گیاه تطابق ژنتیکی بالایی با گیاه *Arabidopsis thaliana* دارد. آراییدوپسیس گیاهی مدل است که توالی آن به طور کامل شناسایی شده است، تعداد زیادی موتانت و همچنین اطلاعات بسیار وسیعی از آن موجود است. مجموعه‌ی این اطلاعات به همراه کاربرد آسان روش اگروباکتريوم در انتقال ژن به کلزا، موجب گردیده پیشرفت‌های بسیاری در مهندسی متابولیک این گیاه حاصل شود. تاکنون صفات متعددی بواسطه‌ی بیوتکنولوژی مدرن در کلزا اصلاح شده‌اند که در این بخش به برخی از آنها اشاره می‌شود:

۱- کیفیت روغن دانه

روغن کلزا (پس از حذف موفقیت آمیز اسید اروسیک)، به طور عمده شامل پنج اسید چرب، یعنی اسید پالمیتیک (۱۶:۰)، اسید استئاریک (۱۸:۰)، اسید اولئیک (۱۸:۱)، اسید لینولئیک (۱۸:۲) و لینولنیک اسید (۱۸:۳) می‌باشد. در طی دو دهه گذشته، تلاش‌های زیادی برای افزایش محتوای اسید اولئیک انجام شده‌است، زیرا سطح بالاتر اسید اولئیک در دانه‌ها و نتیجتاً روغن، می‌تواند موجب افزایش پایداری اکسیداسیونی شده و مدت زمان ماندگاری را طولانی‌تر کند، علاوه بر این اسید اولئیک دارای اثرات مثبتی چون کاهش کلسترول، سرکوب تشکیل تومور و جلوگیری از بیماری‌های عفونی شریانی است. تاکنون، موفق‌ترین کاربردهای جهش در اصلاح ژن *FAD2* حاصل شده است، این ژن آنزیم اصلی اسید چرب *Desaturase* را کاتالیز می‌کند که منجر به غیراشباع سازی اسید اولئیک می‌شود. گیاه کلزا تتراپلوئید، ۴ نسخه از این ژن بر روی ژنوم خود دارد (Huang et al, 2020). اخیراً، Okuzaki و همکاران (۲۰۱۸) دو گیاه جهش یافته در ژن *BnaFAD2.A5* را با ویرایش ژنوم و به کمک تکنیک CRISPR/Cas9 به دست آوردند که در آن یک گیاه با حذف ۴ جفت باز در ژن مذکور، منجر به افزایش معنی داری در میزان اسید اولئیک نسبت به آن در نوع وحشی شد. در مطالعه‌ی دیگری ویرایش ژنوم با تکنیک CRISPR/Cas9 با هدف ایجاد جهش در هر چهار ژن، منجر به تولید گیاهانی با جهش در دو جایگاه شد. گیاهان حاصل از این تحقیق، افزایش چشمگیری در میزان اسید اولئیک خود نشان دادند (Huang et al, 2020). علاوه بر این دانه‌های گیاه کلزا مدتهاست که به عنوان بستری جهت تولید اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیره بلند ($\geq C20$) مانند ایکوزاپنتانوئیک اسید (EPA) و دکوزاهگزانوئیک اسید (DHA) که معمولاً در روغن ماهی یافت می‌شوند، مورد بررسی قرار می‌گیرند. در مطالعه‌ای که اخیراً به چاپ رسیده است محققین گیاه کلزای تراریخت با خاصیت تولید اسید چرب امگا تری به میزان موجود در ماهی، معرفی کرده‌اند. این گیاه با انتقال یک مسیر تراریخته میکروجلبک/مخمر متشکل از هفت مرحله آنزیمی متوالی که اسید اولئیک موجود در گیاه را به اسید لینولنیک و متعاقباً به EPA، اسید دوکوزا پنتانوئیک (DPA) و DHA

تبدیل می‌کند، حاصل شد. این مطالعه همچنین بالاترین سطح DHA دانه را که تاکنون گزارش شده است، توصیف می‌کند و یکی از اولین نمونه‌های یک محصول اصلاح شده ژنتیکی در جهت سلامتی مصرف کننده است (Petrie et al, 2020).

۲- کمیت روغن دانه

بر اساس پیش‌بینی‌های به عمل آمده، نیاز جهانی به روغن گیاهی تا سال ۲۰۳۰ دو برابر خواهد شد، از اینرو افزایش میزان روغن دانه یکی از بزرگترین اهداف اصلاحی دانه‌های روغنی از جمله کلزا است. اسیدهای چرب که جهت بیوسنتز چربی مورد نیاز هستند، از منابع متعددی از جمله تجزیه بیولوژیکی نشاسته، گلیکولیز و تثبیت مستقیم کربن فتوسنتزی به دست می‌آیند، علاوه بر این، این صفت از جمله صفات کمی است که توسط چندین ژن کوچک اثر کنترل می‌شود. از آنجا که استفاده از کربن در گیاهان نه تنها یک کاتابولیسم هماهنگ است، بلکه یک سری مقررات فیزیولوژیکی نیز دارد، ژن‌هایی که بصورت جداگانه دستکاری می‌شوند ممکن است برای تحقق تغییر در کل بیوسنتز TAG کمتر مؤثر واقع شوند، بنابراین بیش بیان تنها یک ژن که کدکننده یک آنزیم در مسیر بیوسنتز اسیدهای چرب و یا TAG است، نمی‌تواند بر افزایش میزان چربی دانه تاثیر چشمگیری داشته باشد. در سال‌های اخیر فعالیت آنزیم‌هایی که توسط فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors) در مسیر سنتز اسیدهای چرب کنترل می‌شوند مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته است. در بسیاری از گیاهان عالی تجمع روغن دانه به واسطه‌ی شبکه‌ی تنظیمی بسیار پیچیده‌ای کنترل می‌شود که در میان آنها تنظیمات رونویسی بیشترین تاثیر را بر میزان روغن دارند (Zafar et al, 2019). برای مثال در بررسی بیش بیان فاکتور تنظیمی BnLEC1 در *B. napus*، نتایج نشان داد بیان زیاد این ژن باعث افزایش ۱۶-۷٪ افزایش روغن دانه می‌شود درحالی‌که کاهش بیان این فاکتور، عملکرد روغن دانه را حدود ۱۲-۹٪ کاهش می‌دهد (Elahi et al, 2016). همچنین برخی مطالعات نشان می‌دهد دستکاری تک ژن *WR1* از فاکتور رونویسی *WRINKLED1*، می‌تواند یک استراتژی در تنظیم بیوسنتز اسید چرب باشد. *WR1* با تنظیم کردن بیان ژن‌های پایین دست بیوسنتز اسید چرب، نقش اساسی در رشد جنین ایفا می‌کند. تحقیقات نشان داده است که *WR1* به طور مستقیم به پروموتورهای تعدادی از ژن‌های دخیل در بیوسنتز اسیدهای چرب، از جمله زیرواحد پروتئینی حامل بیوتین کربوکسیل آنزیم ACCase، ACP، enoyl-ACP reductase، پیروات دهیدروژناز و FAD2 متصل می‌شود. بیش بیان *WR1* در کلزا منجر به افزایش مقدار قابل توجه روغن موجود در دانه شده است (Li et al, 2015; Wu et al, 2014). در تحقیقی دیگر مشخص شده است Wax Inducer1/Shine1 (*WIN1*) (متعلق به خانواده فاکتور رونویسی AP2/EREBP)، نقش مهمی در تجمع موم و چربی در کلزا ایفا می‌کند. همچنین مطالعات نشان می‌دهد بیش بیان *BnWIN1* منجر به تاثیر دوگانه تجمع موم و رشد گیاه بدون تاثیر جانبی منفی در سنتز چربی در شرایط تنش شوری می‌شود که این موضوع نشان دهنده اینست که *BnWIN1* یک فعال کننده رونویسی برای تنظیم بیوسنتز چربی‌های خارج سلولی و داخل سلولی است (Liu et al, 2019).

۳- کیفیت پروتئین دانه

محتوی پروتئین دانه عموماً همبستگی منفی با محتوی روغن دارد و در نتیجه بهبود روغن دانه منجر به کاهش پروتئین آن می‌شود. کروسیفرین (12S globulins)، ناپین (2S albumins) و اولئوسین اصلی‌ترین پروتئین‌های دانه کلزا هستند. کروسیفرین و ناپین مجموعاً حدود ۷۰٪ از پروتئین دانه کلزا را تشکیل می‌دهند. ناپین‌ها میزان بالاتری از گوگرد و ریشه‌های آروماتیک (اسید آمینه‌های

ضروری) را دارند و بنابراین هدف مهمتری در بهبود پروتئین کلزا هستند. تلاش‌های زیادی جهت مهندسی ژنتیک آلومین 2S از طریق بیان ژن 2S از گیاه Brazil nut در گیاه کلزا و یا بیان آنتی‌سنس کروسیفرین صورت گرفته است. در تمامی موارد گیاهان تراریخت حاصل، ناپین بالاتری در دانه‌هایشان داشتند که منجر به افزایش محتوی سیستین، متیونین و لیزین شد. علاوه بر آن افزایش ناپین سبب کاهش محتوی کروسیفرین شد که می‌تواند نشان دهنده‌ی ارتباط و کنترل تنگاتنگ 12S/2S باشد (Nesi et al, 2008). علاوه بر این، تجاری سازی گیاه کلزا به عنوان منبع پروتئین، از لحاظ داشتن توازن اسیدهای آمینه و محتوی پروتئینی نیز، توجه زیادی را به خود جلب می‌کند. اسید فیتیک (PA) منبع اصلی فسفر در گیاهان است ولیکن به دلیل اثرات منفی آن بر جذب مواد معدنی ضروری، برای انسان به عنوان ماده غیر مغذی محسوب می‌شود. PA هضم نشده باعث اتروکسیکاسیون (غنی شدن آب از مواد غذایی) می‌شود که به طور بالقوه زندگی آبزیان را تهدید می‌کند. PA حدود ۲-۵ درصد در دانه کلزا دانه روغنی و توسط مسیرهای پیچیده‌ای که شامل چندین آنزیم هستند سنتز می‌شود. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۲۰ انجام شده، جهش‌زایی و در پی آن خاموش کردن سه پارالوگ *BnITPK* به کمک CRISPR/Cas9، منجر به ایجاد رقم کلزا بهاره با افزایش میزان فسفر و کاهش PA شد. این جهش‌ها می‌توانند با افزایش کیفیت پروتئین، بدون ایجاد تأثیر منفی بر محتوای روغن، نقطه عطف مهمی در اصلاح کلزا باشند (Sashidhar et al, 2020).

منابع

1. Beszterda, M. & Nogala-Kalucka, M. (2019). Current Research Developments on the Processing and Improvement of the Nutritional Quality of Rapeseed (*Brassica napus* L.). Eur. J. Lipid Sci. Technol. 121, 1–18.
2. Duensing, N. et al. (2018). Novel features and considerations for ERA and regulation of crops produced by genome editing. Front. Bioeng. Biotechnol. 9, 1–16.
3. Elahi, N. et al. (2016). Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1. Plant Physiol. Biochem. 100, 52–63.
4. Huang, H. et al. (2020). Modifications of fatty acid profile through targeted mutation at *BnaFAD2* gene with CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. doi:10.1007/s00122-020-03607-y
5. Li, Q. et al. (2015). Wrinkled1 accelerates flowering and regulates lipid homeostasis between oil accumulation and membrane lipid anabolism in *Brassica napus*. Front Plant Sci. 6:1015.
6. Liu, N. et al. (2019). Overexpression of WAX INDUCER1/SHINE1 gene enhances wax accumulation under osmotic stress and oil synthesis in *Brassica napus*. Int. J. Mol. Sci. 20, 1–16.
7. Nesi, N. et al. (2008). Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed. Comptes Rendus - Biol. 331, 763–771.
8. Okuzaki, A. et al. (2018) CRISPR/Cas9-mediated genome editing of the fatty acid desaturase 2 gene in *Brassica napus*. Plant Physiol Biochem 131:63–69.
9. Petrie, J.R. et al. (2020). Development of a *Brassica napus* (Canola) Crop Containing Fish Oil-Like Levels of DHA in the Seed Oil. Front. Plant Sci. 11, 1–15.
10. Sashidhar, N. et al. (2020). Gene editing of three *BnITPK* genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds. Plant Biotechnol. J. 1, 1–10.
11. Villanueva-Mejia, D. & Alvarez, J.C. (2017). Genetic Improvement of Oilseed Crops Using Modern Biotechnology. Adv. Seed Biol. doi:10.5772/intechopen.70743.
12. Wu, XL. et al. (2014). *BnWR11* coordinates fatty acid biosynthesis and photosynthesis pathways during oil accumulation in rapeseed. J Integr Plant Biol. 56(6):582–93.
13. Zafar, S. et al. (2019). Recent advances in enhancement of oil content in oilseed crops. J. Biotechnol. 301, 35–44.