doi: 10.22124/c.2019.11925.1443

(مقاله مروری)

تحقیقات غلات

دوره هشتم/ شماره چهارم/ زمستان ۱۳۹۸ (۵۱۵-۴۹۵)

آشنایی با ناقل‌های سیس‌ژنیک و اینتراژنیک و کاربرد آن‌ها در به‌نژادی غلات

محمد مهدی سوهانی[1*]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۶

چکیده

امروزه پیشرفت‌های زیادی در به‌نژادی گیاهان زراعی با استفاده از ابزار مهندسی ژنتیک به دست آمده به‌طوری‌که سطح زیرکشت گیاهان تغییریافته ژنتیکی (Genetically modified = GM) در ۲۰ سال گذشته در نقاط مختلف دنیا افزایش قابل توجه‌ای یافته است. با وجود مزایای زراعی و اقتصادی و تاثیرات مفید غیرقابل انکار آنها بر محیط و سلامتی انسان، شک و تردید جامعه و مصرف کنندگان نسبت به گیاهان GM سبب شده است تا اجرا، بهره‌برداری و تجاری‌سازی آن‌ها و به عبارتی کاربرد تکنیک‌های مولکولی در بسیاری از گیاهان زراعی متوقف شود. این امر عمدتاً به‌سبب ورود ژن‌های نشانگر انتخابی با منشا باکتریایی به ژنوم گیاه میزبان و نیز مرتبط با آثار سوء احتمالی انتقال عناصر ژنتیکی بین گیاهانی است که در طبیعت معمولاً غیرقابل تلاقی هستند. اولین مرحله در اجرای این هدف، طراحی یک ناقل DNA ویژه برای هر گیاه زراعی است به گونه‌ای که منطقه T-DNA آن فقط از عناصر ژنتیکی همان گیاه و یا خویشاوندان نزدیک ژنتیکی آن به‌دست آمده باشد. که در این صورت می‌تواند پذیرش مصرف‌کنندگان را به‌همراه داشته باشد. از مهم‌ترین عناصر، پروموتر، ترمیناتور، مرزهای تکراری چپ و راست T-DNA و غیره است که باید با انواع گیاهی جایگزین شود. در اغلب موارد استفاده از ژن‌های نشانگر که منشا باکتریایی دارند باید اجتناب شود یاپس از تولید و ایزوله کردن گیاه تراریخت، از گیاه هدف به روش‌های مختلف حذف شوند. در این مقاله، مفهوم رهیافت‌های سیس‌ژنیک یا اینتراژنیک برای به‌نژادی گیاهان و نکات علمی و فنی برای طراحی وکتورهای گیاهی به‌طور خلاصه بررسی و ارایه شده است.

واژه‌های کلیدی: انتقال ژن، بدنه ناقل، حذف نشانگر انتخابی، گیاهان تغییریافته ژنتیکی

۱- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

* نویسنده مسئول: msohani@guilan.ac.ir

مقدمه

نسل اول گیاهان زراعی تغییر یافته ژنتیکی (GM) شامل سویا، ذرت و پنبه مقاوم به علف‌کش و لارو حشرات بودند که برخی از آن‌ها به‌سرعت مورد استقبال کشاورزان و صنعت قرار گرفتند. برای مثال، گیاهان مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت (GR) در سال ۱۹۹۶ معرفی شدند که انقلابی در زمینه مدیریت علف‌های هرز بود، به‌طوری‌که در مدت ده سال بیش از ۹۰ درصد ارقام کشت شده سویا در آمریکا مقاوم به این علف‌کش بودند و سپس بیش از ۹۰ درصد پنبه و ذرت کشت شده در این کشور نیز از ارقام GR بوده‌اند. در نهایت تا سال ۲۰۱۴ سطح زیر کشت گیاهان مقاوم به این علف‌کش در هر سه محصول به حداکثر مقدار (۹۰ درصد) رسید و تقریباً در همان سطح باقی ماند (Duke, 2018). پذیرش سویای GR در آرژانتین (Duke and Powles, 2009) و برزیل (Carrer *et al.*, 2010) حتی سریع‌تر بوده است. سرعت پذیرش دیگر گیاهان زراعی GR مانند یونجه، کانولا و چغندرقند نیز در آمریکا بالا بوده است و برای مثال در مورد چغندرقند، سرعت پذیرش این ارقام توسط کشاورزی و صنعت در مدت تنها سه سال به بیش از ۹۵ درصد رسید. امروزه گلایفوسیت پرکاربردترین علف‌کش در سطح جهان است (James, 2016) و سطح زیرکشت گیاهان GR به ۱۸۱ میلیون هکتار در جهان رسیده است (Duke, 2018).

در حال حاضر تولید نسل دوم گیاهان زراعی تراریخته با صفات کیفی برتر برای افزایش سلامتی و نیز مقاومت به خشکی و کارایی استفاده از نیتروژن بیش‌تر و بالاتر و ویژگی‌های دیگری در حال اجرا است (James, 2014). صفات هدف همچنین شامل ترکیب اسید چرب (اسید چرب امگا-۳، کاهش محتویات اسید چرب اشباع و افزایش انواع غیراشباع، حذف چربی‌های ترانس) بهبود طعم و مزه، کیفیت فیبر و بهبود صفات کیفی است که عمدتاً تحت تاثیر شبکه متابولیک گیاهی هستند و اغلب با آنزیم‌ها کنترل می‌شوند. دستکاری آنزیم‌های اصلی - مثلاً با تغییر فعالیت پروموتور آن‌ها، موتاسیون در یک یا دو اسید آمینه- برای فعال کردن آنزیم و تغییر کارکرد و غیره انجام می‌شود.

علی‌رغم موفقیت‌های گسترده به‌نظر می‌رسد فقط بخش کوچکی از استعداد بالقوه تنوع ژنتیکی گیاهان زراعی استفاده شده است. بر اساس اعلام سازمان همکاری‌های اقتصادی و توسعه (OECD) و سازمان خوار و بار جهانی (FAO)، گیاهان زراعی اصلی همچنان پایین‌تر از پتانسیل بالقوه محصول‌دهی خود در بسیاری از مناطق هستند که در بسیاری از کشورهای در حال توسعه این فاصله به بالای پنجاه درصد می‌رسد (FAO, 2009; OECD, 2016). فقدان تکنولوژی‌های کارآمد و درک ناکافی از مکانیسم ژنتیکی صفات مورد مطالعه، برخی از دلایل برای عدم دستاوردهای مناسب است. از طرف دیگر، هزینه بسیار بالا و مراحل طولانی دریافت مجوز و تایید قانونی گیاهان GM به‌ویژه در منطقه اروپا برای استفاده‌های غذایی و نیز کشت و کار، مانع اصلی برای اجرای پروژه‌های تحقیقاتی مولکولی مربوطه در کشورهای توسعه یافته است و بنابراین، تولید این قبیل گیاهان اغلب در برنامه‌های به‌نژادی وارد نمی‌شوند. دیدگاه مردم دنیا به بیوتکنولوژی همراه با شک و تردید است که متعاقب آن، کشاورزان، بخش صنعت غذایی و خرده‌فروش هم از ورود به عرصه کشت و تجارت آن‌ها اجتناب می‌کنند (Holme *et al.*, 2013). گاهی اوقات برخی شرکت‌های خصوصی به‌نژادی که روی محصولات سبزی و صیفی تمرکز دارند حتی از قرار دادن نام ارقام برتر تراریخت تولیدی خود در فهرست فروش و تبلیغات خودداری می‌کنند تا شک مصرف کنندگان نسبت به سایر محصولات آن‌ها برانگیخته نشود.

بررسی دقیق و موشکافانه نوع نگرانی‌های مصرف کنندگان، کمک زیادی به رفع مشکل خواهد کرد، به‌گونه‌ای که محققین روش‌هایی را ابداع و به‌کار خواهند گرفت تا ضمن دستیابی به اهداف کلان یک کشور، نگرانی‌های مصرف کنندگان رفع شود. یکی از نگرانی‌ها در خصوص گیاهان GM، ترکیب مصنوعی عناصر ژنتیکی حاصل از موجوداتی است که نمی‌توانند به طریق طبیعی با یکدیگر تلاقی و آمیزش یابند (Lassen *et al.*, 2002; Bauer, 2005). منشأ اصلی این نگرانی‌ها، احترام به طبیعت، ترس و ریسک بالقوه این محصولات برای سلامتی انسان و پراکنش ترکیبات ژنتیکی (Gene combinations) جدید ناشناخته در محیط‌زیست است.

نیلسن (Nielsen, 2003) شاید اولین محققی بود که گیاهان تغییریافته ژنتیکی را بر اساس فاصله فیلوژنی بین منبع بخشنده و گیاه پذیرنده DNA دسته‌بندی کرد. وی پیشنهاد کرد که تکامل اکولوژیک گیاهان GM باید در نظر گرفته شود. بر اساس این طبقه‌بندی (جدول ۱)، کوتاه‌ترین فاصله بین گیاهانی است که بخشنده و دریافت کننده DNA هر دو از یک گروه "سازگار جنسی"(Sexualy compatible) یکسان باشند که آن را اینتراژنیک

(Intragenic) نامید (Holme *et al.*, 2013). به اعتقاد وی، نگرانی‌های اکولوژیک در خصوص گیاهان اینتراژنیک فراتر از مقداری نیست که در گیاهان تولید شده از طریق به‌نژادی کلاسیک وجود دارد. در اینتراژنیک موانع طبیعی در تلاقی بین‌گونه‌ها (که به‌منظور حفظ هویت آن‌ها وجود دارد) مورد احترام است و اصولاً با ترانس‌ژنیک متفاوت است. توضیح اینکه ذخایر ژنی اولیه شامل گونه‌های گیاهی یکسان و خویشاوند هستند که از تلاقی آن‌ها جفت‌شدگی کامل کروموزومی اتفاق می‌افتد و اینترگرسیون به آسانی انجام می‌شود. ذخایر ژنی دوم و سوم شامل گونه‌های دورتر است که از تلاقی آن‌ها به‌ترتیب عقیمی نسبی و عقیمی شدید در F_1 مشاهده می‌شود. ذخیره ژنی چهارم شامل همه موجودات از قبیل میکروب‌ها و تمام آلل‌ها است که امکان تبادل ژنی (تلاقی) با ذخایر قبلی را ندارند و با آن‌ها ناسازگار جنسی هستند (Michelmore, 2003). بر این اساس، برای پاسخگویی به نگرانی‌های مصرف‌کنندگان و هم‌زمان اطمینان از تولید گیاهان دوستدار محیط‌زیست و تولید کارآمد، دو مفهوم تراریزش تحت عنوان تولید گیاهان اینتراژنیک (Intragenesis) و تولید گیاهان سیس‌ژنیک (Cisgenesis) ابداع شد که در مقابل تولید گیاهان تراریخت (Transgenesis) قرار دارند.

جدول ۱- طبقات پیشنهادی برای موجوداتی که اخیراً ترانس‌ژنیک یا تغییریافته ژنتیکی نامیده می‌شوند (به نقل از: Nielsen, 2003)

Table 1. Suggested classes for organisms that are recently called transgenic or genetically modified (Nielsen, 2003)

Class	Source of Genetic variation	Genetic variabilition via conventional breeding	Genetic distance
Intragenic	Intra-genome	Possible	Low
Famigenic	Species in the same family	Possible	↓
Linegenic	Species in the same lineage	Impossible	↓
Transgenic	Unrelated species	Impossible	↓
Zenogenic	Laboratory designed genes	Impossible	High

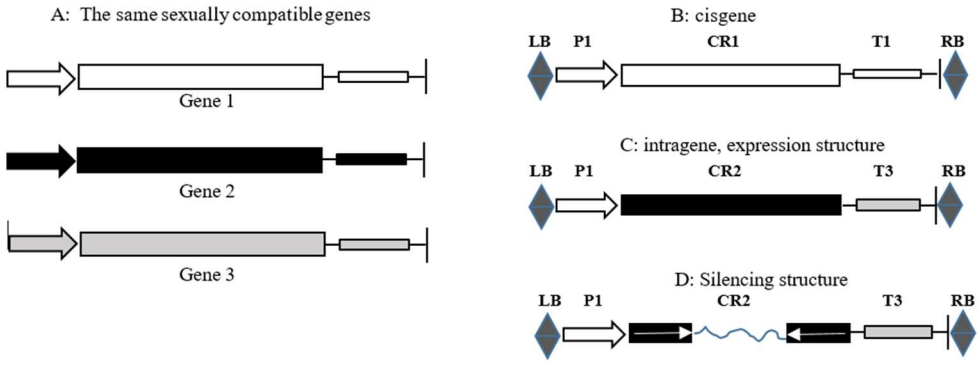
تعریف سیس‌ژنیک و اینتراژنیک

سیس‌ژنیک (Cisgenic) به مفهوم بهبود و اصلاح یک گونه با استفاده از عناصر ژنتیکی از داخل همان گونه است در حالی که اینتراژنیک (Intragenic) شامل استفاده از مواد ژنتیکی گونه‌های نزدیک یا خویشاوند است که به‌طور طبیعی قابلیت تلاقی با ژنوتیپ هدف را دارند (Holme *et al.*, 2013). منبع ژنی که در این دو تکنیک استفاده می‌شود، مشابه منبع ژنی است که در به‌نژادی کلاسیک استفاده می‌شود. علاوه بر این، ژن‌های خارجی از قبیل ژن‌های مارکر ژنتیکی و ژن‌های بدنه ناقل نباید در گیاه پذیرنده حضور داشته باشند یا به‌طریقی از تراریخت‌های اینترا و سیس‌ژنی اولیه حذف شوند. در رهیافت ترانس‌ژنیک، ژن‌ها و توالی‌های DNA بین‌گونه‌های دور و حتی از پروکاریوت‌ها به اصطلاح انتقال عمودی (Vertical transfer) می‌یابند (Gao *et al.*, 2014).

از دیدگاه رومنز (Rommens, 2004) مفهوم اینتراژنیک جداسازی عناصر ژنتیکی خاص از یک گیاه، نوترکیبی این عناصر در شرایط *in vitro* و تلفیق و امتزاج کاست‌های بیان حاصل به داخل گیاه متعلق به همان گروه سازگاری جنسی است. علاوه بر این، در تراریزش با اگروباکتریوم ترجیحاً باید از توالی‌های مرزهای T-DNA گیاهی (مرزهای P-DNA) استفاده شود که از مخزن ژنی سازگار جنسی به‌دست آمده باشند. گرچه برخی دانشمندان بدون P-DNA هم گیاهان را اینتراژنیک قلمداد کرده‌اند (Joshi *et al.*, 2011). بر اساس تعریف دیگر (Jochemsen, 2008) منشا سیس‌ژن خزانه ژنی گونه‌های سازگار جنسی، مشابه نسخه ژن داخلی و شامل پروموتر، اینترون‌ها و پایان‌دهنده در جهت طبیعی سنس آن‌ها است و استفاده از توالی مرزی T-DNA بدون اشکال است. برخی از دانشمندان مفهوم اینتراژنیک را محدود به استفاده از ناقل‌هایی می‌دانند که توالی‌های بدنه ناقل، از منشا گیاهی و از خزانه DNA سازگار جنسی به‌دست آمده باشد (Conner *et al.*, 2007).

دو تفاوت اصلی بین دو مفهوم تولید گیاهان سیس‌ژنی و تولید گیاهان اینتراژنی وجود دارد: در گیاهان اینتراژنی امکان استفاده از ترکیبات ژنی جدید وجود دارد که با

نوترکیبی عناصر ژنتیکی کارکردی مانند منطقه پروموتر، منطقه رمزکننده ژن (با اینترون یا بدون اینترون) و منطقه پایان‌دهنده در شرایط *in vitro* همراه است. پروموترهای قوی و دائمی برای این اهداف استفاده می‌شوند. پروموترهایی مانند اکتین و اوبی‌کوئیتین به‌طور گسترده در تحقیقات گیاهی استفاده شده است و به اندازه کافی تعیین خصوصیت شده‌اند. در تولید گیاهان سیس‌ژنی اجازه چنین تغییراتی وجود ندارد و سیس‌ژنی یک نسخه کامل ژن داخلی به‌همراه پروموتر، اینترون‌ها و پایان‌دهنده‌های اصلی و اولیه در جهت سنس طبیعی خود هستند (شکل ۱). بر اساس تعریف، در سیس‌ژنسیس هیچ تغییری در حالت طبیعی ژن‌های گیاهی امکان‌پذیر نیست. ضمن اینکه، وقتی که از تراریزش با *Agrobacterium* استفاده می‌شود، توالی‌های مرز T-DNA از مخزن ژنی سازگاری جنسی (مرز P-DNA) جداسازی می‌شوند. در روش سیس‌ژنیک، خاموشی در مورد یک ژن هدف ویژه عملی نیست. سیس‌ژن باید به‌طور تغییر نیافته در جهت سنس طبیعی وارد و در ژنوم گیاه تلفیق شود. بنابراین، روش‌های آنتی‌سنس یا تداخل RNA (RNAi) قابل استفاده نیست، اگرچه خاموشی رهیافت اینتراژنسیس عملی است.



شکل ۱- ساختار یک سیس‌ژن و اینتراژن. عناصر ژنتیکی از قبیل پروموتر (P)، توالی رمزکننده (CR) و پایان‌دهنده (T)، مرزهای راست و چپ T-DNA (RB و LB) ممکن است از یک ژن منفرد (سیس‌ژنی) یا ترکیبی از عناصر مختلف ژن‌های مختلف از داخل یک منبع ژنی سازگار جنسی (اینتراژنی) به‌دست آمده باشند (Holme *et al.*, 2013 با تغییرات).

Figure 1. Structure of a cisgene and intragene. Genetic elements such as promoter (P), coding region (CR) and terminator (T), right and left borders of T-DNA (RB and LB) may be isolated from a single gene (cisgenesis) or different genes from an intra-sexually compatible gene pool (intragenesis) (Holme *et al.*, 2013 with modification).

از معایب رهیافت‌های سیس‌ژنی در مقایسه با ترانس‌ژن آن است که فقط صفات موجود در خود گیاه، قابل تراریزش مجدد هستند، در حالی‌که در رهیافت اینتراژنی، ژن‌های موجود در خزانه ژنی سازگار جنسی (Sexually compatible gene pool) می‌توانند ترکیب و به گیاه زراعی انتقال یابند. منابع ژنی بخشنده فقط شامل ژنوتیپ‌هایی است که به‌طور طبیعی با ژنوتیپ‌های دریافت کننده ژن، تلاقی‌پذیر و در به‌نژادی کلاسیک نیز والد پدری یا مادری هستند. اگرچه گونه‌های نزدیک که به‌طور طبیعی تلاقی‌پذیر نیستند نیز در برنامه‌های به‌نژادی استفاده می‌شوند و تکنیک‌هایی نظیر کشت جنین، کشت تخمک و غیره ... کمک می‌کنند تا موانع فیزیولوژیک برطرف و نتاج هیبرید تولید شوند (Van Tuyl and De Jeu, 1997; Alix *et al.*, 2017). عیب دیگر اینکه، ایزولاسیون کلون ژنومیک شامل پروموترها و پایان‌دهنده‌های داخلی و در مراحل بعد تولید گیاهان عاری از نشانگر و بدنه ناقل نیاز به زمان و تخصص بالایی دارد. مقاومت به تنش‌های غیرزیستی به‌دلیل چندژنی بودن آن معمولاً پیچیده است. افزودن یک ژن یا QTL برای مهندسی لاین‌های مقاوم به تنش ناکافی است و اغلب تجمع ژنی (Pyramiding) لازم است و بنابراین سیس‌ژنسیس کارآیی مناسب را ندارد (Varsheney, *et al.*, 2011).

مزیت این رهیافت‌ها آن است که ابزارهای سریع برای انتقال ژن‌ها بین گیاهان خویشاوند هستند. در اصلاح کلاسیک، همان ژن‌ها منتقل می‌شوند اما به‌مدت زمان انجام طولانی‌تری نیاز است و موفقیت به سیستم تکثیر گیاه زراعی بستگی دارد. انتقال ژن در گیاهان خودگشن نسبتاً آسان‌تر و در مقابل گیاهان هتروزیگوس با تکثیر رویشی

مشکل‌ترین است. به‌سبب همبستگی پیوستگی (Linkage drag)، تلاقی‌های برگشتی مکرر لازم و ضروری است که سال‌های متمادی به‌طول می‌انجامد و نیازمند هزینه و صرف وقت است. با توجه به اینکه در مواردی که پیوستگی ژن نامطلوب زیاد باشد، تلاقی‌های برگشتی مکرر هم چاره‌ساز نیست (Allard, 1960). البته مزایای اشاره شده فقط مختص این دو رهیافت نیست و از ویژگی‌های کلیدی و مهم بسیاری از روش‌های مهندسی ژنتیک در مقایسه با به‌نژادی کلاسیک است. به‌هرحال، تاثیر سیس‌ژنسیس در بهبود صفات مقاومت مونوژنیک یا تک‌ژنی است. مزیت مهم در به‌نژادی گیاهان با طول عمر طولانی از قبیل درختان است. از دیگر مزایای این رهیافت این است که پس از تولید گیاهان سیس‌ژنیک به تثبیت ژنوم نیاز نیست که صرفه جویی در زمان و استفاده از ارقام استاندارد فعلی را به‌همراه دارد. فرایند تولید گیاهان سیس‌ژنیک مشابه تراریخت است (تلفیق تصادفی DNA)، اما محصول، مشابه گیاهان به‌دست آمده از طریق به‌نژادی کلاسیک است.

در مورد صفات با تغییرات آللی کم و محدود در مخزن ژنی سازگار جنسی، اینتراژنسیس بر محدودیت اصلاح کلاسیک غلبه می‌کند. فرابیان (Overexpression) با ورود مجدد ژن یک صفت با پروموتر و پایان‌دهنده خود (سیس‌ژن) یا پروموتر و پایان‌دهنده از خزانه ژنی سازگار جنسی (اینتراژنی) انجام شدنی است. خاموشی (Silencing) یا بیان‌پایین نیز با استفاده از ساختارهای خاموشی (اینتراژنی) کاربرد دارد. در این خصوص، فرابیان با ورود مجدد ژن فیتاز و رهیافت سیس‌ژنیک سبب افزایش فعالیت فیتاز در گیاه جو شد (Holme *et al.*, 2012). این تحقیق از آن جهت اهمیت داشت که به‌سبب فقدان تنوع آللی، به‌نژادی از روش‌های کلاسیک امکان‌پذیر نبود. همچنین این فرضیه مطالعه شد که آیا می‌شود یک صفت کیفی خاص را با ورود و تلفیق نسخه‌های اضافی از خود گونه بهبود بخشید. ژن فیتاز از یک کلون ژنومی جو (Barley genomic clone) به‌همراه حدود ۲۰۰۰ جفت نوکلئوتید از ناحیه پروموتر و ۸۰۰ باز از پایان‌دهنده مجاور ژن جداسازی و به گیاه منفقل شد. سه نسل خودگشنی انجام و گیاه سیس‌ژن هموزیگوس تک‌نسخه‌ای ژن فیتاز تولید شد. فعالیت آنزیم در بذر ۲/۶ تا ۲/۸ برابر گیاه شاهد بود که نشان دهنده یک همبستگی مثبت بین "دز ژنی" و "بیان ژن" داخلی بود (Holme *et al.*, 2012).

مرجع سلامت غذایی اروپا (EFSA) میزگردِ "موجودات تغییریافته ژنتیکی" را در سال ۲۰۱۲ برگزار کرد و خطرات مرتبط با سیس‌ژنیک، اینتراژنیک و گیاهان اصلاح شده از روش‌های کلاسیک و سنتی را مقایسه و نتیجه‌گیری کرد که خطرات مرتبط با گیاهان سیس‌ژنیک مشابه انواع گیاهانی است که از راه به‌نژادی کلاسیک تولید می‌شوند (EFSA, 2012). در استرالیا، گیاهان سیس‌ژنیک با ژن‌هایی که از همان‌گونه منتقل شده‌اند و مرزهای T-DNA و دیگر DNA خارجی را ندارند، از گروه گیاهان GMO تلقی نمی‌شوند، اگرچه تا سال ۲۰۱۲ چنین گیاهانی بررسی نشده‌اند (Lusser and Davies, 2013; Seyran and Craig, 2018). کمیته توصیه در رهاسازی به محیط انگلستان (ACRE, 2013) اشاره کرد که محصولات سیس‌ژنیک و اینتراژنیک باید GMO تلقی شوند، اما به اعتقاد کمیته تغییرات ژنتیکی هلند (COGEM, 2010) گیاهان سیس‌ژنیک باید از قانون‌گذاری GMO معاف شوند، زیرا عناصر ژنتیکی فقط از همان‌گونه یا گونه‌های قابل تلاقی وارد می شوند. اینکه آیا سیس‌ژنسیس مخاطرات ایمنی زیستی را به‌دنبال دارد یا خیر، به کارکرد و سطح بیان پروتئین حاصل بستگی دارد و شاید بتوان آن‌را معادل تاثیرات پلیوتروپیک دانست که در به‌نژادی و ترانس‌ژنسیس وجود دارد (Uauy *et al.*, 2006).

تنوع ژنتیکی در مخزن ژنی سازگار جنسی

پیشرفت‌های اخیر در توالی‌یابی سبب شده است که ژنوم تعداد بیش از ۱۰۰ گیاه زراعی و غیرزراعی شناسایی و هر ماهه نیز ژنوم تعداد جدیدی رونمایی شود که اغلب آن‌ها در بانک‌های اطلاعاتی در دسترس محققین قرار دارند (Stiekema and Pereira, 2018). این امر شناسایی و جداسازی عناصر ژنتیکی از داخل مخزن ژنی گیاهان زراعی و گونه‌های وحشی و به‌دست آوردن نتاج مطلوب را تسهیل کرده است. در این صورت نه فقط تعداد ژن‌های در دسترس برای تغییرات سیس‌ژنی و اینتراژنی گسترده شده است، بلکه امکان شناسایی نسخه‌های واریانت یک ژن مطلوب که همان نسخه‌های آللی متفاوت یا پارالوگ‌ها هستند، بیش‌تر می‌شود. این تنوع برای شناسایی واریانت‌های با سطوح بیان مختلف بسیار مفید است. در این رابطه، امکان شناسایی پروموترهای مناسب در سیس‌ژنی وجود دارد، زیرا کل مخزن ژنی سازگار جنسی می‌تواند شناسایی و استفاده شود.

در مورد مخزن ژنی سازگار جنسی شاید به‌نظر برسد که محدودیت در انتقال ژن وجود دارد، اما در بسیاری از موارد محقق دسترسی قابل قبولی به منابع ژنی خواهد داشت. برای مثال، گیاهان زراعی از قبیل جو، گندم و چاودار همگی جزو خانواده (Tribe) گندمیان (Triticea) هستند. در جنس تریتیکوم از تلاقی بین چاودار و گندم، یک گیاه هیبرید بارور (علفی) ابتدا اکتاپلویید و بعد هگزاپلویید به نام تریتیکاله (Triticale) تولید شد (McGoverin *et al.*, 2011). به‌طور مشابه، آمفی‌پلوئید Tritordeum از تلاقی بین جو و گندم هیبرید به‌دست آمد (Vaquero *et al.*, 2017). این امر امکان استفاده و ترکیب دو مخزن ژنی سازگار جنسی کاملاً متفاوت از هم (*Triticu–Hordeum*) را فراهم کرده است. به‌علاوه در داخل جنس تریتیکوم گونه‌های متنوعی وجود دارند که تبادل ژنی بین آن‌ها از طریق سیس‌ژنی و اینتراژنی امکان‌پذیر است. برای مثال، انتقال زیرواحد با وزن مولکولی بالای گلوتنین (HMW) گندم نان هگزاپلوئید به گندم دروم تتراپلوئید یکی از مواردی است که با روش اینتراژنیک انجام شده است (Gadaleta *et al.*, 2008). مثال‌هایی از صفات تغییریافته به‌روش سیس‌ژنی یا اینتراژنی در گیاهان مختلف در جدول ۲ ارایه شده است. تغییرات توالی‌های کوتاه می‌تواند سبب تغییرات مطلوب در سطح و الگوی بیان شود. چنین تغییرات ژنی می‌توانند در داخل مخزن ژنی سازگار جنسی شناسایی شود.

مزیت استفاده از اگروباکتریوم در تراریزش گیاهان

Agrobacterium tumefaciens یک ناقل طبیعی است و توانایی انتقال دائمی تراژن به گیاهان را دارد که در آنجا به‌طور دائم بیان می‌شوند. تراریزش گیاهان زراعی با *Agrobacterium* دارای مزایای زیادی در مقایسه با سایر روش‌های تراریزش است. توانایی در انتقال قطعه بزرگ DNA در یک لوکوس با حداقل به‌هم‌ریختگی (Rearrangement) کروموزومی (Gheysen *et al.*, 1998)، تلفیق تعداد کم نسخه تراژن، حوادث خاموشی کم ژن، استقرار و تلفیق در داخل مناطق فعال رونوشت‌برداری ژنوم، بهبود پایداری بیان در نسل‌های متمادی، هزینه کم‌تر، توارث ساده مندلی DNA تلفیق‌شده از مزایای باارزش استفاده از *Agrobacterium* است (Gould 1996; Hamilton *et al.*, 1996; Hiei *et al.*, 1997; Travella *et al.*, 2005; Gelvin, 2006).

ایده کلی این است که تراریزش گیاهی مانند گندم به واسطه *Agrobacterium* یک انتخاب بهتر در مقایسه با بمباران ذره‌ای است، به‌ویژه وقتی‌که تایید مرجع رسمی دولتی (Regulatory) برای آزمون‌های مزرعه‌ای نیاز است (Wang *et al.*, 2016). دو سیستم تراریزش با بمباران ذره‌ای و اگروباکتریوم در گیاه جو مقایسه شد که کارایی تراریزش با اگروباکتریوم دو برابر مقدار آن در بمباران ذره‌ای بود (Travella *et al.*, 2005). لاین‌های تراریخته با اگروباکتریوم حاوی یک تا سه نسخه تراژن با حداقل به‌هم‌ریختگی بودند، در حالی‌که ۶۰ درصد جو تراریزش‌شده با بمباران ذره‌ای بیش از هشت نسخه تراژن داشتند و در همه لاین‌ها به‌هم‌ریختگی DNA متنابهی همراه با حوادث تلفیق چندگانه مشاهده شد. در نهایت، خاموشی ژن نشانگر *BAR* (ایجاد مقاومت به علف‌کش بیالافوز، Bialaphos) در نسل T_1 حاصل از اگروباکتریوم مشاهده نشد و T-DNA تلفیق‌شده تفرق ساده مندلی داشت. این نتایج مشابه نتایج آزمایشی در برنج بود (Khanna and Raina, 2002)، اگرچه در برنج نتایج معکوس هم مشاهده شده است.

تکرارهای مرزی چپ و راست T-DNA

تراریزش به‌وسیله اگروباکتریوم یک روش برتر در ورود ژن‌ها به‌داخل تعداد زیادی از گیاهان دولپه و تک‌لپه است (Komari *et al.*, 2004). در اغلب موارد فقط بخش کوچکی از پلاسمید باکتری که DNA انتقالی (T-DNA) نامیده می‌شود به داخل ژنوم گیاه تلفیق می‌شود (Travela *et al.*, 2005). برای تلفیق T-DNA توالی‌های *cis* مورد نیاز است که شامل تکرارهای مرزی ناقص هستند و در دو انتهای این مولکول قرار دارند و تکرار مرز چپ (LB) و راست (RB) نامیده می‌شوند. هر دو تکرار را کمپلکس پروتئینی بیماری‌زای VirD1/VirD2 شناسایی می‌کند. در یک مدل پذیرفته‌شده عمومی، تکرارهای مرزی در مکان‌های دقیق و مشخص با پروتئین‌های بیماری‌زا (Vir) اگروباکتریوم برش خورده و شکل‌گیری DNA انتقالی حد واسط (رشته-T) از RB آغاز و به LB ختم می‌شود. VirD2 یک شکاف در تک‌رشته زیرین و معمولاً بین بازهای سوم و چهارم (شکل ۲) ایجاد می‌کند (Hooykaas and Beijersbergen, 1994; Gheysen *et al.*, 1998). سنتز T-DNA تک‌رشته‌ای (رشته-T) با جداشدن رشته زیرین به‌طور یک‌طرفه و از سوی پایانه $3'$ با شکاف در RB آغاز می‌شود (Miranda *et al.*, 1992). پروتئین VirD2 با

اتصال به پایانه ′5 در T-DNA در نقش مولکول هدایت‌گر عمل می‌کند تا رشته-T را از باکتری به سلول گیاه هدایت کند (Gelvin, 2000; Tzfira and Sitovsky, 2002).

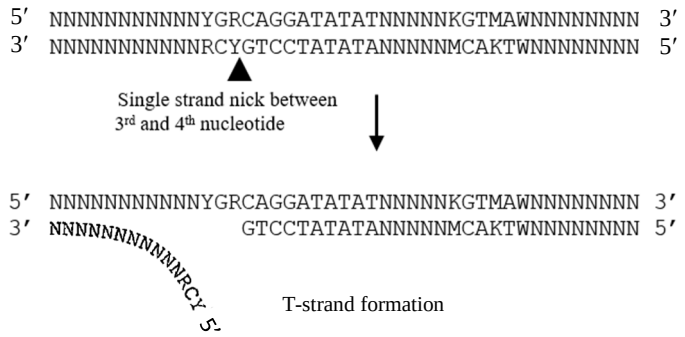
یکی از ضروریات تراریزش با DNA کاملاً گیاهی، جایگزینی T-DNA باکتریایی با T-DNA گیاهی (Plant-derived T-DNA; P-DNA) است. طراحی ناقل‌های گیاهی و P-DNA نیازمند شناخت کامل و دقیق از ساختار توالی‌های مرزی T-DNA است. لازمه سنتز و استفاده از توالی‌های شبه-T-DNA گیاهی، شناخت کامل از تاثیر هر نوکلئوتید منفرد موجود در توالی‌های RB و LB در کارایی تراریزش است. در مرحله بعد پاسخ به این پرسش است که چه میزان تفاوت و جایگزینی فقط یک نوکلئوتید حفاظت شده باکتریایی با توالی‌های گیاهی، کارایی تراریزش را حفظ می‌کند (Rommens *et al.*, 2004). نتایج هم‌ردیف‌سازی توالی‌های RB و LB در T-DNA نژادهای مختلف *Agrobacterium* نشان داد که دو موتیف به‌شدت حفاظت‌شده bp ۱۳ و bp ۷-۶ در هر یک از آن‌ها وجود دارد که در دو طرف یک منطقه متغیر bp ۵ قرار دارند (جدول ۳، قسمت‌هایی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است). آنالیزهای موتاسیونی نیز اهمیت مناطق حفاظت‌شده را مشخص کرد (Rommens *et al.*, 2005).

جدول ۲- مثال‌هایی از صفات زراعی تغییریافته در رهیافت تولید گیاهان اینتراژنیک و تولید گیاهان سیس‌ژنیک

Table 2. Examples of modified agronomic traits used in cisgenesis or intragenesis approaches.

Crop	Aim	Gene	Approach	Reference
C. clementina	General citrus vector	-	-	An *et al.*, 2013
Apple	Scab resistance gene	*HcrVf2*	Cis (over), Flp/FRT	Vanblaere *et al.*, 2011 Chizzali *et al.*, 2016
	Scab resistance gene	*Rvi6*	Cis, Marker free	Krens *et al.*, 2015
	Scab resistance gene	*Rvi6*	Cis, Flp/FRT	Wurdig *et al.*, 2015
Grapevine	Fungal disease resistance	*VVTL-1*	Cis	Dhekney *et al.*, 2011, Dalla Costa *et al.*, 2016
Barley	Phytase gene	*HvPAPhy_a*	Cis (over.)	Holme *et al.*, 2012
	glutamine synthetase	(*GS1*)	Cis (over.)	Gao *et al.*, 2019
Chile	Glyphosate resistant plants	Mutagenized chile *EPSPS* gene	Intra (over.)	Ortega *et al.*, 2018
Alfalfa	Lignin content	*Comt*	Intra, (silenc.)	Weeks *et al.*, 2008
Perennial ryegrass	Drought tolerance	*Lpvp1*	Intra, (over.)	Bajaj *et al.*, 2008, 2010
Poplar	Plant growth and stature, wood properties	*PtGA20ox7, PtGA2ox2, PtRGL1_1, PtRGL1_2, PtGAI1,*	Cis, (over.)	Han *et al.*, 2011
	Late blight resistance	- *Rpi-sto1, Rpi-vnt1.1 GBSS*	Cis	Jo *et al.*, 2014
	High amylopectin		Intra, (silenc.)	de Vetten *et al.*, 2003
	Prevention of black spot bruise	- *Ppo*	Intra, (silenc.)	Rommens *et al.*, 2004
Potato	Accumulation of reducing sugars after cold storage and acrylamide after high-temperature processing	- *R1, PhL, StAs1, StAS2*	Intra (silenc.)	Rommens *et al.*, 2006, 2008
	Limiting acrylamide formation	*StAs1*	Intra (silenc.)	Chawla *et al.*, 2012
	Durable resistance against *Phytophthora*	- *R1, R3a, Rpi-blb1* and *Rpi-blb2*	Cis, (over.)	Haverkort *et al.*, 2016
Strawberry	Grey mold resistance	*PGIP*	Intra, (over.)	Schaart, 2004
Wheat	Fungal pathogen resistance	Wheat class 1 chitinase	Cis	Maltseva *et al.*, 2014
Durum wheat (*Triticum turgidum)*	Improved baking quality	*1Dy10*	Cis	Gadaleta *et al.*, 2008
Melon (*C. melo* L.)	Downy mildew resistance	*At1/At2* glyoxylate aminotransferase	Cis	Benjamin *et al.*, 2009
Maize	CO2 fixation in the plant	*Rca*	Intra, (over.)	Almeraya and Sánchez-de-Jiménez, 2016

*: Updated scientific name *Rhizobium radiobacter;* Cis, cisgenesis; Intra, intragenesis; Silenc, silencing; Over, overexpression.



شکل ۲- آغاز شکل‌گیری رشته-T از تکرارهای مرزی راست T-DNA. برش در یک رشته از توالی‌های دورشته‌ای T-DNA بین نوکلئوتیدهای سوم و چهارم مرز راست اتفاق می‌افتد که نتیجه آن شکل‌گیری رشته-T تک‌رشته‌ای است که به سلول گیاه منتقل می‌شود (Barrel *et al.*, 2011).

Figure 2. Early events in T-strand formation from right border T-DNA. A nick occurs between third and fourth nucleotides of right border resulting in formation of a single starnd T-strand (Barrel *et al.*, 2011).

جدول ۳- توالی‌های مرزی T-DNA در *Agrobacterium* و توالی حفاظت‌شده در آن‌ها. توالی‌های مرزی با حروف بزرگ نشان داده شده است و موتیف‌هایی که زیر آن‌ها خط کشیده شده است، حفاظت‌شده هستند. RB مرز راست T-DNA، LB مرز چپ T-DNA.

Table 3. Border sequences of T-DNA in *Agrobacterium*. Border sequences are in capital letters and conserved regions are underlined; RB: T-DNA right border, LB: T-DNA left border.

T-DNA border sequence	Source	Reference/Accession number
5’-ttTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACct-3’	pTiC58 (RB)	AJ237588
5’-ggTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACaa-3’	pTiC58 (LB)	AJ237588
5’-gaTGGCAGGATATATGCGGTTGTAATTca-3’	pTi15955 (RB)	Barker *et al.*, 1983; X00493
5’-ggTGGCAGGATATATCGAGGTGTAAAAta-3’	pTi15955 (RB LB)	Barker *et al.*, 1983; X00493
5’-acTGGCAGGATATATACCGTTGTAATTtg-3’	pTi15955 (LB RB)	Barker *et al.*, 1983; X00493
5’-ggCGGCAGGATATATTCAATTGTAAATgg-3’	pTi15955 (LB)	Barker *et al.*, 1983; X00493
5’-ttTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACct-3’	pTiT37 (RB)	Yadav *et al.*, 1982
5’-ggTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACaa-3’	pTiT37 (LB)	Yadav *et al.*, 1982
5’-acTGGCAGGATATATACCGTTGTAATTtg-3’	pTiAch5 (LB RB)	Holsters *et al.*, 1983
5’-ggCGGCAGGATATATTCAATTGTAAATgg-3	pTiAch5 (LB)	Holsters *et al.*, 1983
5’-ggCGGCAGGATATATTCAATTGTAAATgg-3’	pTiA6 (LB)	Simpson *et al.*, 1982
5’-ttTGACAGGATATATTGGCGGGTAAACct-3’	pTiA6 (LB)	Simpson *et al.*, 1982
5’-ggTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACaa-3’	pTi-SAKURA (RB)	Suzuki *et al.*, 2000; AB016260
5’-ggTGGCAGGATATATTGTGGTGTAAACaa-3’	pTi-SAKURA (LB)	Suzuki *et al.*, 2000; AB016260

به‌منظور تعیین انعطاف‌پذیری و تاثیر RB تغییریافته در کارایی تراریزش، تعدادی عناصر مصنوعی سنتز و آزمون شدند که در هر یک از آن‌ها، یک تغییر و غیریکسانی در دو نوکلئوتید در مقایسه با توالی حفاظت‌شده وجود داشت. سپس توانایی آن‌ها در انجام تراریزش مطالعه شد. این عناصر با یک توالی بالادست از *Agrobacterium* به‌نام pTi5955 همراه و در یک پلاسمید حاوی کاست بیان *nptII* وارد شدند. توانایی بیماری‌زایی ساختار ناقل‌ها یعنی میزان و کارایی آن‌ها در تراریزش گیاهان تلقیح شده ارزیابی شد. علی‌رغم یک تا سه ناهمخوانی یا غیریکسانی، سیزده

Rb متغیر از گیاهان مختلف بین ۵۰ و ۱۰۰ درصد فعالیت در مقایسه با توالی‌های شاهد نشان دادند. با مقایسه توالی‌ها، دو گروه توالی‌های حفاظت‌شده برای RB تعیین شد. این مطالعه نشان داد که می‌توان توالی‌های با منشاء گیاهی را جایگزین توالی‌های مرزی باکتریایی کرد، به‌شرطی که تفاوت نوکلئوتیدها اندک و در محدوده توالی‌های حفاظت شده مرزها باشد (Rommens *et al.*, 2004; Rommens *et al.*, 2005). برای مثال، اگر نوکلئوتید شماره ۳ شامل توالی‌های حفاظت شده T/C است (جدول ۳)، موضع شماره ۳ در توالی‌های گیاهی همان دو نوکلئوتیدهای T یا C است. چنانچه قبلاً اشاره شد، فقط ۴-۳ جفت باز از توالی RB باکتریایی به ژنوم گیاه منتقل می‌شود (شکل ۲). بنابراین، از دیدگاه بسیاری از محققین لازم نیست RB ناقل باینری منشاء گیاهی داشته باشند تا ناقل داخل ژنی تلقی شود و می‌توان از توالی‌های اولیه باکتری استفاده کرد (Barrell *et al.*, 2010). برعکس، کل توالی LB باید شبه-T-DNA گیاهی یا P-DNA و منشاء ژنوم گیاهی داشته باشد.

طراحی مرزهای چپ و راست گیاهی

یکی از وظایف مهم در استفاده از ناقل‌های گیاهی طراحی مرزهای چپ و راست گیاهی برای T-DNA است. بدین منظور از دو روش می‌توان استفاده کرد. نخست اینکه با بلاست توالی حفاظت‌شده از مرزهای راست و چپ در بانک اطلاعاتی ژنوم گیاه مورد نظر، توالی‌های با حداکثر تشابه به‌ویژه در بخش‌های حفاظت‌شده را پیدا کرد. یک رهیافت دیگر برای ساخت منطقه شبه-T-DNA گیاهی، اتصال دو یا بیش‌تر قطعات DNA از گونه‌های یکسان ژنوم‌های گیاهی است. به‌عبارتی، توالی‌های مرزی تکراری می‌توانند منشا کایمری داشته باشند، به‌گونه‌ای که مجموع نوکلئوتیدها مشابه مرزهای اصلی *Agrobacterium* باشد (Conner and Jacobs, 2006). جستجوی مقایسه‌ای Non-exhaustive بانک اطلاعاتی EST گیاهی وجود موتیف‌های حفاظت‌شده بلند 5’-GRCAGGATATAT-3’ را در ۸۰ گونه گیاهی از خانواده‌های مختلف تایید کرد (Conner *et al.*, 2007). قطعاً موتیف‌های کوتاه (5’-KSTMAWS-3’) فراوانی بیش‌تری خواهند داشت. بعد از اینکه توالی‌های DNA مشابه این موتیف‌ها در میان توالی‌های ژنوم گیاهی شناسایی شد، مناطق شبه T-DNA می‌توانند با اتصال این توالی‌ها مونتاژ و تولید شوند. با این روش ناقلهای باینری *in-silico* با مناطق شبه T-DNA با منشاء گیاهی برای طیف وسیعی از گیاهان طراحی شد (Barrell *et al.*, 2010). مناطق شبه-T-DNA مرکبات با جستجوی مقایسه‌ای (Blast search) یا بلاست با استفاده از توالی‌های LB حفاظت‌شده در مقابل توالی ژنوم در *C. clementina* و در بانک اطلاعاتی به‌دست آمد. بدین صورت که Scaffold-89 انتخاب شد که شامل هفت نوکلئوتید ابتدایی مرز چپ، مکان کلون‌سازی و هفت نوکلئوتید آخری مرز راست بود. باقی‌مانده توالی مرز چپ از Scaffold-2 به‌دست آمد و با استفاده از PCR به توالی بالا امتزاج یافت (An *et al.*, 2013).

حذف نشانگرهای ژنتیکی

مرحله مهم در تولید گیاهان اینتراژنیک یا سیس‌ژنیک فقدان و یا حذف نشانگر از ژنوم گیاه تولید شده است. رهیافت‌های مختلفی به‌منظور تولید گیاهان عاری از ژن نشانگر یا اصطلاحاً ژن پاکیزه (clean gene) وجود دارند (Bryant and Leather, 1992). روش‌های استاندارد برای حذف نشانگرها در همه موارد و برای هر گیاهی عملی نیست. علاوه بر این، اغلب این روش‌ها با پتنت محافظت و آزادی استفاده از آن‌ها در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته محدود است. از این‌رو، برای بسیاری از گیاهان سیس‌ژنیک تلاش‌های زیادی انجام شد تا روش‌های جدید برای تولید گیاهان عاری از نشانگر و توالی‌های خارجی ایجاد شود.

انتخاب روش تولید گیاهان عاری از نشانگر به سیستم ازدیاد گیاه هدف و کارایی روش تراریزش بستگی دارد (Schaart, *et al.*, 2011). کارایی نسبتاً بالای تراریزش با *Agrobacterium* و نیز کارآیی بالای باززایی در کشت بافت در گیاهانی از قبیل سیب‌زمینی (de Vetten *et al.*, 2003)، تنباکو (Jia *et al.*, 2007) و آرابیدوبسیس (Francis and Spiker, 2005) تراریزش بدون استفاده از نشانگر ژنتیکی را در آن‌ها امکان‌پذیر کرده است. معمولاً کارایی تراریزش بدون نشانگر به‌شدت پایین است و تقریباً اغلب گیاهان غیرتراریخت هستند و کار غربالگری برای محقق سخت و وقت‌گیر است. بعلاوه، یکی از چالش‌ها در مورد این رهیافت وقوع تراریخت‌های کایمر است. انتظار می‌رود در گیاهان تراریخت شناسایی‌شده با PCR گیاهان کایمر (بخشی تراریخت‌شده) در فراوانی بالا وجود داشته باشند که به‌سبب فقدان انتخاب و گزینش علیه بافت‌های غیرتراریخت اتفاق می‌افتد (Schaart, *et al.*, 2011).

در مورد گیاهان با تکثیر جنسی و سیکل کوتاهِ تولید مثل، روش ترایزش هم‌زمان (Co-transformation) پیشنهاد می‌شود (Tuteja *et al.*, 2012). از آنجا که نشانگر گزینشی و ژن هدف هر یک با ناقل‌های مختلف انتقال می‌یابند و دارای توالی‌های مرزی T-DNA جداگانه هستند، بنابراین شانس تفرق صفت در نسل‌های بعد و عدم پیوستگی ژن‌های گزینش‌گر و هدف در ترایزش با *Agrobacterium* بالا است.

در گیاهان با تکثیر رویشی و با کارایی کم‌تر ترایزش مانند بسیاری از گیاهان باغی، حذف نشانگر مشکل و نیازمند تکنیک‌های پیچیده‌تر و زمان‌بر است. یک استراتژی استفاده از سیستم برش نشانگر بر اساس ری‌کامبیناز مختص مکان (SSR; Site-Specific Recombinase) از قبیل Cre/lox (Hoess and Abremski, 1985) به‌منظور حذف ژن نشانگر است. این سیستم برای حذف نشانگر از گیاهان مختلف مانند توت فرنگی، سیب درختی، گندم و برنج به‌کارگرفته شده است (Gidoni *et al.*, 2008). سیستم نوترکیبی Cre-lox از باکتریوفاژ P1 به‌دست آمده است و عضوی از خانواده بزرگ خانواده ری‌کامبیناز تایروزین است که ری‌کامبینازهای متعدد از قبیل FLP و Int را هم شامل می‌شود. سیستم Cre-lox شامل آنزیم ری‌کامبیناز Cre به جرم مولکولی ۳۸,۵ کیلودالتون و مکان *lox* به‌طول ۳۴ جفت باز است (Gilbertson, 2003). مکان برش *lox* وحشی loxP نامیده می‌شود. همانند سایر آنزیم‌های برشی، Cre به توالی‌های معکوس ۱۳ جفت بازی در مکان‌های *lox* (در دو طرف منطقه هدف که باید برش بخورد) متصل می‌شود و در توالی ۸ جفت باز منطقه جداکننده (Spacer) دو مکان *loxP* کراسینگ‌اور اتفاق می‌افتد. همولوژی کامل در منطقه جداکننده برای کارایی نوترکیب ضروری است (Darbani *et al.*, 2007).

در این سیستم، ترایزش ابتدایی و گزینش گیاهان تراریخت با حضور ژن نشانگر انجام و سپس گیاهان تراریخت کلون‌سازی و تکثیر می‌شوند تا گیاهان متعدد تولید شوند. در مرحله نهایی، فعالیت ژن ری‌کامبیناز-R القا می‌شود. این امر شانس به‌دست آوردن حداقل یک کلون از هر ترایزش با برش کامل نشانگر را فراهم می‌کند (Tuteja *et al.*, 2012). یکی از روش‌های جالب توجه در حذف نشانگر و القای ری‌کامبیناز در گیاه برنج و بر اساس سیستم SSR، استفاده از تیمار گرمایی بوده است (Nandy and Srivastava, 2012). چهار لاین تک‌نسخه‌ای (Single copy; SC) تراریخت برای برش ژن نشانگر با تیمار گرمایی انتخاب شدند. القای ژن *Cre* تحت تاثیر یک پروموتر ژن شوک حرارتی و القاشدنی با گرما بوده است. شاخساره‌های دو تا سه هفته‌ای تراریخت که در محیط 1/2 MS (محیط ریشه‌زایی) در لوله‌های آزمایش شیشه‌ای رشد کرده بودند، به انکوباتور با دمای ۴۲ °C برای سه تا چهار ساعت منتقل شدند تا فعالیت Cre القا شود. سپس لوله‌های آزمایش به دمای اتاق منتقل شدند. دو تا سه هفته بعد، برای بررسی برش ژن نشانگر PCR انجام و نیز شکل‌گیری تلفیق مختص مکان (Site-specific integration; SSI) عاری از نشانگر مشخص، بررسی شد. لاین‌های SC برای برش نشانگر مختص مکان انتخاب شدند، زیرا نوترکیبی *loxP*×*loxP* مورد انتظار فقط در این لاین‌ها، به‌طور صحیح و در جهت قابل پیش‌بینی اتفاق می‌افتد. از طرف دیگر، لاین‌های چندنسخه‌ای شامل دو یا سه نسخه از ساختار تراژن هستند و بنابراین، نوترکیبی با استفاده از Cre در این لاین‌ها می‌تواند با نوترکیبی بین نسخه‌های تراژن چندگانه به‌هم‌ریختگی کروموزومی را به دنبال داشته باشد. استراتژی مشابه در خصوص گیاه سیب درختی استفاده شد (Herzog *et al.*, 2012). ژن *Cre* همراه با پروموتر شوک حرارتی گزارش شده است که به‌طور کامل و مناسب در ذرت، برنج و موز عمل کرده است (Zhang *et al.*, 2003; Khattri *et al.*, 2011; Chong-Pe´rez *et al.*, 2012).

پروموتر گلوتاتیون S-ترانسفراز ذرت قابلیت القای شیمیایی با علف‌کش سافنر (Safener) را دارد. این پروموتر برای القای بیان ژن ری‌کامبیناز *R* قابل استفاده است. بعد از انتخاب بافت‌های تراریخت یا فنوتیپ‌های شاخساره‌ای، برش جایگاه‌های RS که سبب حذف ژن‌های ری‌کامبیناز و نشانگر می‌شود، با تیمار علف‌کش القا می‌شود (Ebinuma and Komamine, 2001). نتیجه این تحقیقات تایید یک روش کارا برای تلفیق تراژن عاری از نشانگر مختص مکان در گیاهان بوده است که در آن‌ها مزیت مهندسی ژنتیک دقیق با برش ژن نشانگر در یک راهکار واحد فناوری ترکیب شده است.

ژن سایتوزین دی‌آمیناز (Cytosine deaminase, *Cod*A) از *E. coli* یک نشانگر گزینشی منفی است که به‌طور موفقیت‌آمیزی در ترایزش گیاهان به‌ویژه در مرحله باززایی ساقه استفاده شده است. محصول این ژن در گیاه تراریخت، ترکیب غیرسمی اولیه ۵-فلورو سایتوزین (5-flurocytosine; 5-FC) موجود در محیط کشت را به

ترکیب سمی ۵-فلورو اوراسیل (5-flurouracil; 5-FU) در داخل سلول تبدیل می‌کند (Gleave *et al.*, 1999). بر اساس این سیستم، فقط سلول‌هایی باقی می‌مانند که حاوی تراژن و فاقد ژن نشانگر هستند. یکی از سیستم‌های ارایه شده برای حذف ژن نشانگر، ترکیب تلفیقی نشانگرهای گزینشی مثبت و منفی بدون نیاز به تراریزش هم‌زمان است. در خصوص گزینش مثبت بافت تراریخت، ژن *nptII* استفاده شد که مقاومت به کانامایسین را در سلول‌های تراریخت ایجاد می‌کند (Schaart *et al.*, 2004).

موضوع بدنه ناقل

تا اواسط دهه نود میلادی اعتقاد بر این بود که فقط توالی‌های بین تکرارهای RB و LB به‌داخل ژنوم گیاه منتقل و تلفیق می‌شوند، اما مارتینو و همکاران (Martineau *et al.*, 1994) مشاهده کردند که در تراریزش به‌واسطه *Agrobacterium* توالی‌های ناقل دوتایی یا بایناری که منشا خارج از T-DNA دارند به‌دفعات به داخل ژنوم گیاه تراریخت منتقل می‌شوند. به‌عبارت دیگر، انتقال قطعات خارج از T-DNA که "بدنه ناقل (vector backbone) نامیده می‌شوند، از ناقل انتقالی به داخل ژنوم گیاهان، غیرمعمول نیست (Martineau *et al.*, 1994). این گزارش دانشمندان را ترغیب کرد که الحاق T-DNA به داخل ژنوم گیاه را با دقت بیش‌تری مطالعه کنند. مطالعه گیاهان تراریخت نشان داد که توالی‌های بدنه ناقل در بسیاری از موارد به T-DNA در سمت RB یا LB یا هر دو متصل است و حتی در موارد خاص، کل توالی‌های ناقل به داخل گیاه تراریخت الحاق می‌شود (Yin and Wang, 2000). مطالعات بعدی، توالی‌های بدنه ناقل را در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی تراریزش‌شده با *Agrobacterium* از جمله آرابیدوپسیس، تنباکو، پتونیا، سیب‌زمینی و ذرت نشان داد (Lange *et al.*, 2006; Almeraya and Sánchez-de-Jiménez, 2016). آنالیز تراریزش‌های مختلف با PCR و بلاتینگ ژل DNA برای وجود محل اتصال LB و RB نشان داد که درصد بالایی از گیاهان، حاوی توالی‌های بدنه ناقل هستند (De Buck *et al.*, 2000). در موارد آزمون‌شده، فراوانی گیاهان حامل بدنه ناقل تا ۷۵ درصد هم بود که نشان می‌دهد تلفیق بدنه ناقل یکی از جنبه‌های معمول تراریزش با *Agrobacterium* است (Kuraya *et al.*, 2004). در تلاقی ارقام سیب‌زمینی (Desiree × Deio × Katahdin) نشان داده شد که تلفیق T-DNA در ۲۸ مورد از ۱۲۸ گیاه تراریخت در LB متوقف نشد، بلکه طول متفاوت از توالی‌های بدنه ناقل در مجاورت و نزدیک LB در ژنوم رقم Desiree تلفیق شده بود (Zhu *et al.*, 2013). در تحقیق دیگری مشخص شد که فراوانی اتصال بدنه ناقل به مرز چپ T-DNA بسیار بیش‌تر از فراوانی اتصال آن به مرز راست بود، اما نسبت معنی‌داری از گیاهان تراریزش‌شده شامل ناقل DNA با پایانه مرزهای چپ و نیز راست بوده‌اند (De Buck *et al.*, 2000).

عوامل تعیین‌کننده در فراوانی تلفیق توالی‌های بدنه ناقل تحت تاثیر گونه‌های گیاهی یا روش تراریزش با *Agrobacterium* نیست، بلکه به عوامل داخل سلولی بستگی دارد (Kononov *et al.*, 1997). پتی و همکاران (Petti *et al.*, 2009) با در نظر گرفتن تلفیق هر دو مرز راست و چپ T-DNA، نتیجه‌گیری کردند که پتانسیل تلفیق برای بدنه ناقل در LBA4404 در تراریزش سیب زمینی در مقایسه با AGL1 دو برابر بود که دومی یک سویه ابربیماری‌زا (Hypervirulence) است. به‌هر حال، این مطالعه فقط شامل یک یا تعداد کمی از ژن‌های بدنه ناقل و بخش کوچکی از آن بوده است. مطالعات در مورد الگوی تلفیق بدنه ناقل- شامل تمام بدنه آن- نیازمند تحقیق بیش‌تری است.

دو مکانیسم برای انتقال توالی‌های بدنه ناقل به داخل ژنوم گیاهان پیشنهاد شده است. در مدل اول، شکل‌گیری رشته-T از RB آغاز می‌شود، اما در LB خاتمه نمی‌یابد که این پدیده "ازمیان‌خوانی (Read-through) LB" نامیده می‌شود (van der Graaff *et al.*, 1996). این حالت می‌تواند نتیجه شناسایی ناکارآمد توالی‌های LB توسط پروتئین‌های بیماری‌زای Vir باشد. در مدل دوم، پروتئین VirD2 اشتباهاً تکرار LB را مکان آغاز تولید رشته-T شناسایی می‌کند، زیرا مشخص شده است که VirD2 قابلیت پیوند کووالانسی به هر دو تکرارهای مرزی LB و RB را دارد. بر اساس این مدل، ابتدا بدنه ناقل منتقل می‌شود (Yin and Wang, 2000).

وجود توالی‌های بدنه ناقل در گیاه تراریخت نهایی نامطلوب و به‌دلایل مختلف قابل قبول نیست. دلیل اجتناب از انتقال بدنه ناقل به داخل ژنوم گیاه تراریخت و تاکید بر اینکه این گیاهان فقط شامل ژن‌های هدف باشند، وجود منشا تکثیر باکتریایی، یک یا دو ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک و در نهایت ژن‌های بیماریزایی *Agrobacterium* در بدنه

ناقل است که این ژنها قابلیت انتقال به گیاه را دارند (De Buck *et al.*, 2000). گزارش شده است که DNA ناقل می‌تواند سبب بیان ناپایدار تراژن شود که احتمالاً در نتیجه شناسایی DNA ناقل پروکاریوت به‌عنوان توالی‌های بیگانه و متعاقباً از کار انداختن آن و ژن‌های پیرامونی از طریق متیلاسیون توسط گیاه است (Iglesias *et al.*, 1997; Jakowitsch *et al.*, 1999). برای مقاصد تحقیقاتی از قبیل نشان‌گذاری T-DNA (T-DNA tagging) و پروموتر، تلفیق توالی‌های بدنه ناقل نیز نامطلوب است (Smith *et al.*, 2001; Eamens *et al.*, 2004). بر اساس مقررات ایمنی‌زیستی مانند قانون کمیسیون اروپایی، ارقام GMO وارد شده به محیط باید عاری از توالی‌های بدنه ناقل باشند. به این ترتیب، با استفاده از تکنیک‌های PCR و سادرن‌بلات، منطقه مجاور تلفیق T-DNA آنالیز و گیاهانی که حامل توالی‌های بدنه ناقل باشند، حذف می‌شوند (EFSA, 2012).

نکات فنی در طراحی ناقل‌های سیس‌ژنیک و اینتراژنیک

استفاده از توالی‌های بافر: یکی از راه‌ها برای اجتناب از تلفیق بدنه ناقل به داخل ژنوم گیاه هدف و در ورای مرزهای T-DNA اتصال و اضافه کردن قسمتی از توالی یک ژن داخلی گیاه هدف به ناقل در مجاورت LB است. هدف از اضافه کردن این توالی‌ها که توالی بافر (Buffer sequence) نامیده می‌شود، این است که هر چند شناسایی ناکارای توالی‌های LB با کمپلکس پروتئین VirD1/VirD2 ممکن است سبب تولید یک رشته-T شود که در ورای مرز LB ادامه دارد، اما انتظار می‌رود تولید رشته-T در داخل توالی‌های بافر متوقف شود و به بدنه ناقل نرسد (Petti *et al.*, 2009). در یک تحقیق، طول قابل توجهی (۲-۱ kb) از DNA اینتراژنیک در خارج از LB طراحی شد، با این هدف که اگر طی انتقال T-DNA برش در ورای مرز اتفاق بیفتد، همچنان اخلالی در مفهوم انتقال ژن بدون DNA خارجی اتفاق نمی‌افتد (An *et al.*, 2013).

اصولاً زمانی که ناقل‌های اینتراژنیک بر اساس توالی‌های ژنوم گیاهی طراحی می‌شوند، مهم است که توجه داشته باشیم چه توالی‌هایی برای استفاده به‌عنوان بافر اولویت دارند و چه توالی‌هایی نباید انتخاب شوند. قطعه DNA که در طراحی T-DNA استفاده می‌شود، نباید از مناطق هتروکروماتین غیررمزشونده، غیربیان شوند و DNA متراکم شده انتخاب شود، زیرا این مناطق ممکن است فعالیت ژن انتقالی را سرکوب کنند (Conner *et al.*, 2007). توالی‌های بافر از مناطق غنی از GC انتخاب می‌شوند زیرا، سایر مناطق ژنوم ممکن است حاوی عناصر تنظیم کننده بالادستی و یا پایین‌دستی باشند که بر بیان ژن هدف تاثیر بگذارند (An *et al.*, 2013). در این خصوص می‌توان از توالی‌های EST یا اکسون‌ها (مناطق رمزشونده) استفاده کرد که خوشبختانه، گروه گسترده‌ای از توالی‌های DNA با منشا EST برای اغلب گیاهان زراعی در دسترس است. در صورت کوتاهی طول آن‌ها حتی می‌توان دو توالی EST داخلی را به‌صورت کایمر استفاده کرد. به‌منظور ساخت یک ناقل سیس‌ژنیک مرکبات، قسمتی از یک ژن به‌طول ۳~ kb به‌عنوان توالی بافر از گیاه *C. clementina* ایزوله و بین LB و بدنه ناقل دوتایی وارد و جهت قطعه وارد شده با PCR مشخص شد (An *et al.*, 2013). بررسی گیاهان سیس‌ژنیک نشان داد که توالی‌های خارج مرزها در ژنوم گیاه وارد شده، اما از توالی بافر خارج نبوده است. بنابراین، DNA بدنه باکتریایی به داخل گیاهان بازیابی‌شده پس از تراریزش منتقل نشد.

ناقلهایی با نسخه‌های چندتایی از LB: یکی از رهیافت‌های پیشنهادی در مورد اجتناب از انتقال توالی‌های بدنه ناقل به ژنوم گیاهان تراریخت، طراحی چند LB برای یک ناقل دوتایی است. از نظر تئوری، وجود چند LB سبب می‌شود تا Vir D1/VirD2 سرانجام یکی را شناسایی و عمل هضم آنزیمی و تولید رشته-T انجام شود. در تحقیقی نشان داده شد که وقتی ناقل دوتایی حامل نسخه‌های اضافی از توالی‌های LB بود، انتقال توالی‌های بدنه ناقل به‌طور موثر و معنی‌داری کاهش یافت. در یک آزمایش تراریزش هم‌زمان، نسبت گیاهان تراریخته که *gusA* موجود در بدنه ناقل را بیان می‌کردند، از ۹۲ درصد به حدود ۴ درصد کاهش یافت (Kuraya *et al.*, 2004). در مطالعه دیگری شواهدی دال بر شکل‌گیری T-DNA از LBهای اضافی به‌دست نیامد. توالی‌های تکرار LB می‌توانند نقطه آغاز و شکل‌گیری رشته-T باشند. شاید آغاز رشته-T از هر کدام از LBها اتفاق افتد و سبب شکل‌گیری رشته-T میکرو (Micro T-strand) از LB نزدیک به LB دورتر شود که تقریباً در گیاهان مورد مطالعه ردیابی نشده‌اند (Kuraya *et al.*, 2004).

در تحقیق دیگری، ساختار T-DNA که مناطق LB نوپالین یا اکتوپین را به‌صورت پشت‌سرهم داشتند، کاراترین در ممانعت از انتقال توالی‌های بدنه ناقل به ژنوم گیاه بودند. حضور سه تکرار LB تاثیرات مثبت بر پایان رشته-T در مقایسه با وجود یک تکرار LB نداشت (Podevin *et al.*, 2006). آن‌ها نتیجه گرفتند که پایان کارآ در تکرارهای LB چندگانه نمی‌تواند عمومیت داده شود و احتمالاً بستگی به نوع ناقل دوتایی، نژاد *Agrobacterium* و شرایط هم‌کشتی (Co-cultivation) دارد (Kuraya *et al.*, 2004).

انتقال بدنه ناقل در گیاهان تراریخت تک‌نسخه با LB منفرد دو برابر بیش‌تر از نسبت گیاهان تراریخت تک‌نسخه با LB چندگانه بوده است. ناقل‌های با LB چندگانه در خصوص بیان، تفاوت معنی‌داری نداشتند. تفاوت معنی‌داری بین عملکرد ناقل‌های با دو، سه و چهار LB در انتقال بدنه ناقل به ژنوم گیاه مشاهده نشد که بر این اساس، دو تکرار LB ارجحیت دارد، زیرا توالی‌های تکراری، بهم‌ریختگی کروموزومی و پیچیدگی‌هایی را ایجاد می‌کنند که با افزایش تعداد LB ریسک اختلال‌ها نیز بیش‌تر می‌شود (Kuraya *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2016,). روش دیگر در جلوگیری از انتقال بدنه ناقل، استفاده از یک ژن کشنده در خارج T-DNA است. قراردادن LB چندگانه نسبت به استقرار ژن کشنده در خارج T-DNA ارجحیت دارد، از آن جهت که فقط اضافه کردن یک توالی حدود ۴۰ باز به منطقه LB ناقل دردسر کم‌تری دارد و تقریباً به‌طور رضایت‌بخشی مانع انتقال بدنه ناقل می‌شود.

منطقه‌های مرزی LB و RB: توالی‌های تکرارهای ۲۴ بازی LB و RB بسیار شبیه هم هستند (جدول ۲)، در حالی‌که نقش‌های مختلفی در انتقال رشته-T بر عهده دارند. بر این اساس، شناسایی آن‌ها به‌عنوان جایگاه آغاز یا پایان سنتز رشته-T به توالی‌های اطراف یا زمینه بستگی دارد و ترکیب توالی مناطق مرزی (Border region) یا مجاور مرزهای T-DNA در شناسایی و کاربری آن‌ها نقش مهمی بازی می‌کند (Wang *et al.*, 1987; Podevin *et al.*, 2006).

شناسایی تکرار LB با کمپلکس پروتئین VirD1/VirD2 تحت تاثیر توالی‌های مجاور است و تکرارهای ۲۴-تایی LB به‌تنهایی برای پایان سنتز رشته-T کافی نیست (Wang *et al.*, 1987). اضافه کردن مناطق مرزی طبیعی داخل و خارج تکرار LB - حتی زمانی که در مسافت دورتری قرار داشته باشد - شناسایی تکرار LB را بهبود می‌بخشد و تعداد گیاهان حاوی توالی‌های بدنه ناقل را کاهش می‌دهد. زمانی که گیاهان با ناقل T-DNA تراریزش شدند که تکرار LB در داخل منطقه مرزی طبیعی وارد شده بود، فراوانی تراریزش‌شده‌های دارای توالی بدنه ناقل کاهش یافت، اما فراوانی ناقل‌های فاقد منطقه مرزی بالاتر بود (Podevin *et al.*, 2006). از طرفی، مشخص شده است که منطقه داخلی LB تاثیر عکس بر شناسایی تکرار مرزی به‌عنوان سیگنال برای آغاز سنتز T-DNA دارد. در مقابل، وقتی ناقل‌های T-DNA استفاده شده برای تراریزش، فاقد مناطق LB در کنار تکرارهای مرزی بودند، فراوانی تلفیق ناقل کاهش یافت. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که حضور یک منطقه LB- صرف‌نظر از داخلی و یا خارجی- دارای تاثیرات مثبت بر شناسایی صحیح تکرارهای LB به‌عنوان مکان پایان‌دهنده است (Fu *et al.*, 2006).

توالی‌های مجاور RB نقش مهمی در انتقال DNA به گیاه ایفا می‌کنند. یکی از این توالی‌ها، دمین ACR بالادستی (دمین غنی از AC) است که تکرارهای دی‌نوکلئوتیدی غنی از AC (ACR) بالادستی شامل حداقل شش جزء پیرامیدین در جایگاه‌های حفاظت‌شده هست و دیگری، دمین‌های پایین‌دستی RB (DR) هستند (Rommens *et al.*, 2005). مطالعات دقیق مولکولی نشان داده است که RB جایگزین می‌تواند به‌جای LB استفاده شود، به‌شرطی که به دمین UL بالادست و خوشه-C پایین‌دست متصل شود. حتی تغییرات کوچک می‌تواند تاثیرات مهمی بر فراوانی تولید گیاهان تراریخت عاری از بدنه ناقل داشته باشد.

نقش توالی‌های محرک: در پلاسمیدهای اکتوپین یک توالی محرک (Overdrive sequence; OD) سیس (*cis*) در منطقه RB خارجی به‌طول ۲۴ باز وجود دارد که سبب افزایش تولید رشته-T و بیماری‌زایی می‌شود (Peralta *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1987). انتقال کارای T-DNA نیازمند این توالی‌های محرک مجاور است. اگر محرک در نزدیکی LB قرارگیرد، این تکرار مرزی جای کارکرد RB را می‌گیرد. ۲۴ باز از نوکلئوتیدهای اشاره شده در این تحقیق، شامل همه توالی‌های مورد نیاز برای فعالیت OD نوع وحشی است، اما برای فعالیت کامل فقط به بخشی از توالی‌های bp ۲۴ نیاز است. تعداد bp ۸ از توالی OD مرکزی (TGTTTGTT) در جایگاه‌های با تفاوت اندک نسبت به تکرارهای RB شناسایی شدند (Peralta *et al.*, 1986). انتقال کارا فقط نیازمند تکرار RB در جهت طبیعی

و توالی OD در حالت *cis* است. OD به مقدار زیادی انتقال را تقویت و تحریک می‌کند (Peralta *et al.*, 1986).

از آنجا که تکرارهای LB و RB (بدون OD) فعالیت RB یک جهته ضعیفی را نشان می‌دهند، پیشنهاد شد که OD باید بتواند کنش متقابل بین RB و پروتئین‌های بیماری‌زای مربوط را تقویت کند. بنابراین، اغلب حوادث انتقال T-DNA از RB آغاز می‌شود و از طریق T-DNA به LB می‌رود (Peralta *et al.*, 1986). زمانی که ژن‌های *vir* از پلاسمید Ti نوع اکتوپین منشا گرفته باشند (و نه در شرایطی که این ژن‌ها از پلاسمید Ti نوع نوپالین باشند)، انتقال کارای T-DNA نیازمند توالی محرک خواهد بود.

ارایه یک مطالعه موردی

ژن‌های *Rpi* عامل مقاومت به بادزدگی در سیب‌زمینی (Late blight) هستند. ژن‌های شناسایی‌شده و در دسترس، پیش‌برنده‌ها (Promoter) و پایان‌دهنده‌های (Terminator) طبیعی یا اولیه به‌طول ۵ تا حدود ۱۰ kb دارند. کلون‌سازی و ترکیب ژن‌های *Rpi* چندگانه در یک ناقل به‌دلیل اندازه قطعه وارد شده، اغلب مشکل است. مکان‌های کلون‌سازی چندگانه مفید نیستند، زیرا مکان‌های برشی منحصر به فرد کافی وجود ندارد. استفاده از مکان‌های نوترکیبی حاصل از فاژ، ردپای غیرسیس‌ژنیک در مجاور ژن‌های *Rpi* به‌جای می‌گذارند. بر این اساس، یک رهیافت کلون‌سازی اختصاصی طراحی شد. یک گروه ناقل شامل pUC-PPASSA، pBIN AW-PASSA، PASSA، pBINPLUS، pCC-PPASSA با مکان‌های برشی چندگانه مشابه و اغلب شامل مکان‌های برشی هشت نوکلئوتیدی طراحی شد. مزیت هشت نوکلئوتیدی بودن مکان برشی آن است که تقریباً در ژن هدف وجود ندارد، اما ردپای هشت نوکلئوتیدی که در مجاور ژن‌های *Rpi* به‌جای می‌ماند، در فراوانی بالا در ژنوم دریافت‌کننده وجود داشت و هیچ DNA خارجی اضافه نشد. به‌منظور کلون‌سازی ژن *Rpi* در داخل یک ناقل مناسب، واکنش‌های طولانی PCR با آنزیم‌های پلیمراز با کارایی بالا اجرا شد. آغازگرهایی استفاده شد که مکان‌های برشی خاص در سمت '۵ آن‌ها وجود داشت. محصولات PCR حاصل با آنزیم‌های برشی هضم و در ناقل‌های pUC-PPASSA یا pCC-PPASSA کلون شدند که قبلاً هضم دوگانه آنزیمی و دی‌فسفریله شده بودند. از این ناقل‌های اولیه، ژن‌های *Rpi* چندگانه با کارایی بالایی به ناقل دوتایی گیاهی pBINPLUS-PPASSA انتقال یافتند (Jo *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نگرانی‌های (خواه منطقی یا غیرمنطقی) مصرف‌کنندگان در زمینه محصولات گیاهان تراریخت، استفاده از تکنیک‌های مولکولی در انتقال ژن مزایای بسیاری دارد که نمی‌توان از آن چشم‌پوشی کرد. رهیافت اینتراژنیک و سیس‌ژنیک، راه را برای استفاده از تکنیک‌های مولکولی در به‌نژادی گیاهان باز نگاه می‌دارد و نگرانی‌های مصرف‌کنندگان را به حداقل می‌رساند. یکی از ضروریات اولیه، تولید و سنتز ناقل اینتراژنیک و سیس‌ژنیک برای هر گیاه زراعی است، زیرا می‌تواند در حل سریع‌تر و مطمئن‌تر نقاط ضعف ارقام زراعی موجود کمک شایانی کند. فرابیان ژن‌های داخلی یک گیاه زراعی یا ناقل‌های با ویژگی و توانایی خاموشی ژن هدف و ایجاد جهش در یک ژن داخلی با هدف تغییر کارکرد یا کارکرد دوگانه و انتقال مجدد آن به گیاه هدف، ابزارهای مهمی است که در دست متخصصین به‌نژادی گیاهی است، اگرچه این ناقل‌ها جواب قطعی برای رفع تمام کمبودهای یک رقم زراعی نیستند. علاوه بر این، استفاده از سیستم القاشدنی ژن ری‌کامبیناز می‌تواند کمک مهمی در حذف ژن مارکر از گیاهان تراریخت تولیدی با ناقل‌های اینتراژیک باشد. همه این نکات می‌تواند متخصصین را در معرفی نسل دوم گیاهان زراعی تغییریافته ژنتیکی کمک کند. عملی‌شدن این رهیافت کمک می‌کند تا بدون کنار گذاشتن ارقام زراعی برتر و مقبول زارعین و مصرف‌کنندگان، به‌نژادی آن‌ها را انجام داد و نیازهای رو به رشد آینده‌گان را در کوتاه‌ترین زمان ممکن برطرف کرد.

References

ACRE. 2013. ACRE advice: New techniques used in plant breeding. London. Available on the world wide web: https://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/239542/new-techniques-used-in-plant-breeding.

Alix, K., Gérard, P. R., Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison, J. S. 2017. Polyploidy and interspecific hybridization: Partners for adaptation, speciation and evolution in plants. **Annals of Botany** 120: 183-194.

Allard, R. A. W. 1960. Principles of plant breeding. John Wiley and Sons.

Almeraya, E. V. and Sánchez-de-Jiménez, E. 2016. Intragenic modification of maize. **Journal of Biotechnology** 238: 35-41.

An, C., Orbović, V. and Mou, Z. 2013. An efficient intragenic vector for generating intragenic and cisgenic plants in *Citrus*. **American Journal of Plant Sciences** 4: 2131-2137.

Bajaj, S., Puthigae, S., Bryant, C., Whittaker, D., Elborough, K. and Hanley, Z. 2010. Ryegrass genes- a potential source for improving rice and grass species. **Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology** 18: 71-73.

Bajaj, S., Puthigae, S., Templeton, K., Bryant, C., Gill, G., Lomba, P., Zhang, H., Altpeter, F. and Hanley, Z. 2008. Towards engineering drought tolerance in perennial ryegrass using its own genome. Proceedings of the 6th Canadian Plant Genomics Workshop, June 23-26, 2008, Toronto.

Barker, R. F., Idler, K. B., Thompson, D. V. and Kemp, J. D. 1983. Nucleotide sequence of the T-DNA region from the *Agrobacterium tumefaciens* octopine Ti plasmid pTi15955. **Plant Molecular Biology** 2: 335-350.

Barrell, P. J., Jacobs, J. M. E., Baldwin, S. J. and Conner, A. J. 2010. lntragenic vectors for plant transformation within gene pools. In: Hamming, D., (Ed.). Plant sciences reviews. CABI, Oxford, UK. pp: 11-24.

Bauer, M. W. 2005. Public perceptions and mass media in the biotechnology controversy. **International Journal of Public Opinion Research** 17: 5-22.

Benjamin, I., Kenigsbuch, D., Galperin, M., Abrameto, J. A. and Cohen, Y. 2009. Cisgenic melons over expressing glyoxylate-aminotransferase are resistant to downy mildew. **European Journal of Plant Pathology** 125: 355-365.

Bryant, J. and Leather, S. 1992. Removal of selectable marker genes from transgenic plants: Needless sophistication or social necessity. **Trends in Biotechnology** 10: 274-275.

Carrer, H., Barbosa, A. L. and Ramiro, D. A. 2010. Biotechnology in agriculture. **Estudos Avançados** 24: 149-163.

Chawla, R., Shakya, R. and Rommens, C. M. 2012. Tuber-specific silencing of *asparagine synthetase-1* reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. **Plant Biotechnol Journal** 10: 913-924.

Chizzali, C., Gusberti, M., Schouten, H. J., Gessler, C. and Broggini, G. A. L. 2016. Cisgenic *Rvi6* scab-resistant apple lines show no differences in *Rvi6* transcription when compared with conventionally bred cultivars. **Planta** 243: 635-644.

Chong-Pe´rez, B., Kosky, R. G., Reyes, M., Rojas, L., Ocan, B., Tejeda, M., Pe´rez, B. and Angenon, G. 2012. Heat shock induced excision of selectable marker genes in transgenic banana by the Cre-lox site-specific recombination system. **Journal of Biotechnology** 159: 265-273.

COGEM, 2010. The status of oligonucleotides within the context of site-directed mutagenesis. Advice Report CGM/100701-03. Bilthoven, The Netherlands.

Conner, A. J., Barrell, P. J., Baldwin, S. J., Lokerse, A. S., Cooper, P. A., Erasmuson, A. K., Nap J. and Jacobs, J. M. E. 2007. Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. **Euphytica** 154: 341-353.

Conner, A. J. and Jacobs, J. M. E. 2006. GM plants without foreign DNA. Implications from new approaches in vector development, biosafety research and environmental risk assessment. Proceedings of the 9th International Symposium on Biosafety of Genetically Modified Organisms. September 24-29, 2006, Jeju Island, Korea.

Dalla Costa, L., Piazza, S., Campa, M., Flachowsky, H., Hanke, M. V. and Malnoy, M. 2016. Efficient heat-shock removal of the selectable marker gene in genetically modified grapevine. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 124: 471-481.

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C. N. and Camargo, W. N. 2007. Methods to produce marker-free transgenic plants. **Biotechnology Journal** 2: 83-90.

De Buck, S., De Wilde, C., Van Montagu, M. and Depicker, A. 2000. T-DNA vector backbone sequences are frequently integrated into the genome of transgenic plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. **Molecular Breeding** 6: 459-468.

de Vetten, N., Wolters, A., Raemakers, K., van der Meer, I., ter Stege, R., Heeres, E., Heeres, P. and Visser, R. 2003. A transformation method for obtaining marker-free plants of a cross-pollinating and vegetatively propagated crop. **Nature Biotechnology** 21: 439-442.

Dhekney, S. A., Li, Z. T. and Gray, D. J. 2011. Grapevines engineered to express cisgenic Vitis Vinifera thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. **In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant Journal** 47: 458-466.

Duke, S. O. 2018. The history and current status of glyphosate. **Pest Management Science** 74: 1027-1034.

Duke, S. O. and Powles, S. B. 2009. Glyphosate-resistant crops and weeds: Now and in the future. **AgBioForum** 12: 346-357.

Eamens, A. L., Blanchard, C. L., Dennis, E. S. and Upadhyaya, N. M. 2004. A bidirectional gene trap construct suitable for T-DNA and DS-mediated insertional mutagenesis in rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Biotechnology Journal** 2: 367-380.

Ebinuma, H. and Komamine, A. 2001. MAT (multi-auto-transformation) vector system. The oncogenes of *Agrobacterium* as positive markers for regeneration and selection of marker-free transgenic plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 37: 103-113.

EFSA. 2012. Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed through cisgenesis and intragenesis. Panel on genetically modified organisms (GMO). **European Food Safety Authority Journal** 10 (2): 2561.

FAO. 2009. How to feed the world in 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/how_to_feed_the_world_in_2050.pdf.

Francis, K. E. and Spiker, S. 2005. Identification of *Arabidopsis thaliana* transformants without selection reveals a high occurrence of silenced T-DNA integrations. **The Plant Journal** 41: 464-477.

Fu, D., Amand, P. C., Xiao, Y., Muthukrishnan, S. and Liang, G. H. 2006. Characterization of T-DNA integration in creeping bentgrass. **Plant Science** 170: 225-237.

Gadaleta, A., Giancaspro, A., Blechl, A. E. and Blanco, A. 2008. A transgenic durum wheat line that is free of marker genes and expresses 1DY10. **Journal of Cereal Science** 48: 439-445.

Gao, C., Ren, X., Mason, A. S., Liu, H., Xiao, M., Li, J. and Fu, D. 2014. Horizontal gene transfer in plants. **Functional and Integrative Genomics** 14: 23-29.

Gao, Y., de Bang, T. C. and Schjoerring, J. K. 2019. Cisgenic overexpression of cytosolic glutamine synthetase improves nitrogen utilization efficiency in barley and prevents grain protein decline under elevated CO2. **Plant Biotechnology Journal** 17: 1209-1221.

Gelvin, S. B. 2000. *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** 51: 223-256.

Gelvin, S. B. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. **Journal of Molecular Biology** 343: 77-84.

Gheysen, G., Angenon, G. and Van Montague, M. 1998. *Agrobacterium* mediated plant transformation: A scientifically intriguing story with significant application. In: Lindsey, K. (Ed.). Transgenic plant research. Harwood Academic Press, The Netherlands. pp: 1-33.

Gidoni, D., Srivastava, V. and Carmi, N. 2008. Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. **In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant** 44: 457-467.

Gilbertson, L. 2003. Cre–lox recombination: Cre-ative tools for plant biotechnology. **Trends in Biotechnology** 21: 550-555.

Gleave, A. P., Mitra, D. S., Mudge, S. R. and Morris, B. A. M. 1999. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: Transient expression of Cre-recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. **Plant Molecular Biology** 40: 223-235.

Gould, J. 1996. Transformation of the cereals using *Agrobacterium*. **Journal of Molecular Biology** 62: 491-501.

Hamilton, C. M., Frary, A., Lewis, C. and Tanksley, S. D. 1996. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 93: 9975-9979.

Han, K. M., Dharmawardhana, P., Arias, R. S., Ma, C., Busov, V. and Strauss, S. H. 2010. Gibberellin-associated cisgenes modify growth, stature and wood properties in Populus. **Plant Biotechnology Journal** 9 (2): 162-178.

Haverkort, A. H., Boonekamp, P. M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz L. A., Kessel, G. J. T. Vossen, J. H. and Visser, R. G. F. 2016. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: Scientific and societal advances in the DuRPh project. **Potato Research** 59: 35-66.

Herzog, K., Flachowsky, H., Deising, H. B. and Hanke, M. 2012. Heat-shock-mediated elimination of the nptII marker gene in transgenic apple (Malus×domestica Borkh.). **Gene** 498: 41-49.

Hiei, Y., Komari, T. and Kubo T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Molecular Biology** 35: 205-218.

Hoess, R. H. and Abremski, K. 1985. Mechanism of strand cleavage and exchange in the *Cre-lox* site-specific recombination system. **Journal of Molecular Biology** 181: 351-362.

Holme, I. B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C. K., Vincze, E. and Holm, P. B. 2012. Cisgenic barley with improved phytase activity. **Plant Biotechnology Journal** 10: 237-247.

Holme, I. B., Wendt, T. and Holm, P. B. 2013. Intragenesis and cisgenesis as alternatives to transgenic crop development. **Plant Biotechnology Journal** 11: 395-407.

Holsters, M., Villarroel, R., Gileen, J., Seurinck, J., de Greve, H., van Montagu, M. and Schell, J. 1983. An analysis of the boundaries of the octopine TL-DNA in tumours induced by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular and General Genetics** 1990: 35-41.

Hooykaas, P. J. J. and Beijersbergen A. G. M. 1994. The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. **Annual Review of Phytopathology** 32: 157-179.

Iglesias, V. A., Moscone, E. D., Papp, I., Neuhuberya, F., Michalowski, S., Phelan, T., Spikery, S., Matzke, M. and Matzkeas, A. J. M. 1997. Molecular and cytogenetic analyses of stably and unstably expressed transgene loci in tobacco. **The Plant Cell** 9: 1251-1264.

Jakowitsch, J., Papp, I., Moscone, E. A., van der Winden, J., Matzke, M. and Matzke, A. J. M. 1999. Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters *in trans*. **Plant Journal** 17: 131-140.

James, C. 2014. Global status of commercialized biotech/GM crops. International Service for the Acquisition of the Agri-Biotech Applications (ISAAA), Ithaca, NY, USA.

James C. 2016. Executive summary of global status of commercialized biotech/GM crops. International Service for the Acquisition of the Agri-Biotech Applications (ISAAA), Ithaca, NY, USA.

Jia, H., Liao, M., Verbelen, J. P. and Vissenberg, K. 2007. Direct creation of marker-free tobacco plants from agroinfiltrated leaf discs. **Plant Cell Report** 26: 1961-1965.

Jo, K. R., Kim, C. J., Kim, S. J., Kim, T. Y., Bergervoet, M., Jongsma, M. A., Visser, R. G. F., Jacobsen, E. and Vossen, J. H. 2014. Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. **BMC Biotechnology** 14: 50.

Jo, K. R., Zhu, S., Bai, Y., Hutten, R. C. B., Kessel, G. J. T., Vleeshouwers, V. G. A. A., Jacobsen, E., Visser, R. G. F. and Vossen, J. H. 2016. Problematic crops. 1. Potatoes: Towards sustainable potato late blight resistance by cisgenic R gene pyramiding. In: Collinge, D. B. (Ed.). Plant pathogen resistance biotechnology. John Wiley and Sons, Inc. pp: 171-192.

Joshi, S. G., Schaart, J. G., Groenwold, R., Jacobsen, E., Schouten, H. J. and Krens, F. A. 2011. Functional analysis and expression profiling of *HcrVf1* and *HcrVf2* for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. **Plant Molecular Biology** 75: 579-591.

Jochemsen, H. 2008. An ethical assessment of cisgenesis in breeding late blight resistant potato. **Potato Research** 51: 59-73.

Khanna, H. K. and Raina, S. K. 2002. Elite *Indica* transgenic rice plants expressing modified *Cry1Ac* endotoxin of *Bacillus Thuringiensis* show enhanced resistance to yellow stem borer (*Scirpophaga Incertulas*). **Transgenic Research** 11: 411-423.

Khattri, A., Nandy, S. and Srivastava, V. 2011. Heat-inducible Cre-lox system for marker excision in transgenic rice. **Journal of Biosciences** 36: 37-42.

Komari, T., Ishida, U. and Hiei, Y. 2004. Plant transformation technology: *Agrobacterium*-mediated transformation. In: Christou, P. and Klee, H. (Eds.). Handbook of plant biotechnology. Wiley, Hoboken.

Kononov, M. E., Bassuner, B. and Gelvin, S. B. 1997. Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. **Plant Journal** 11: 945-957.

Krens, F. A., Schaart, J. G., Van der Burgh, A. M., Tinnenbroek-Capel, I. E. M., Groenwold, R., Kodde, L. P., Broggini, G. A. L., Gessler, C. and Schouten, H. J. 2015. Cisgenic apple trees; Development, characterization, and performance. **Frontiers in Plant Sciences** 6: 286.

Kuraya, Y., Ohta, S., Fukuda, M., Hiei, Y., Murai, N., Hamada, K., Ueki, J., Imaseki, H. and Komari, T. 2004. Suppression of transfer of non-T-DNA 'vector backbone' sequences by multiple left border repeats in vectors for transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. **Molecular Breeding** 14: 309-320.

Lange, M., Vincze, E., Moller, M. G. and Holm, P. B. 2006. Molecular analysis of transgene and vector backbone integration into the barley genome following *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Cell Report** 25 (8): 815-820.

Lassen, J., Madsen, K. H. and Sandøe, P. 2002. Ethics and genetic engineering lessons to be learned from GM foods. **Bioprocess and Biosystem Engineering** 24: 263-271.

Lusser, M. and Davies, H. V. 2013. Comparative regulatory approaches for new plant breeding techniques. **New Biotechnology** 30 (5): 437-446.

Maltseva, E., Ismagul, A., Iskakova, G., Chirkin, A., Skiba, Y., Ismagulova, G., Eliby, S. and Aitkhozhina, N. 2014. Wheat cisgenic transformation with class I chitinase gene. **Journal of Biotechnology** 185: S116-S117.

Martineau, B., Voelker, T. A. and Sanders, R. A. 1994. On defining T-DNA. (Letter to the editor). **Plant Cell** 6: 1032-1033.

McGoverin, C. M., Snyders, F., Muller, N., Botes, W., Fox, G. and Manley, M. 2011. A review of triticale uses and the effect of growth environment on grain quality. **The Journal of the Science of Food and Agriculture** 91: 1155-1165.

Michelmore, R. W. 2003. The impact zone: Genomics and breeding for durable disease resistance. **Current Opinion in Plant Biology** 6 (4): 397-404.

Miranda, A., Janssen, G., Hodges, L., Peralta, E. G. and Ream, W. 1992. *Agrobacterium tumefaciens* transfers extremely long T-DNAs by a unidirectional mechanism. **Journal of Bacteriology** 174: 2288-2297.

Nandy, S. and Srivastava, V. 2012. Marker-free site-specific gene integration in rice based on the use of two recombination systems. **Plant Biotechnology Journal** 10: 904-912.

Nielsen, K. M. 2003. Transgenic organisms-time for conceptual diversification? **Nature Biotechnology** 21 (3): 227-228.

OECD. 2016. Organization for Economic Cooperation and Development. Report of the OECD workshop on environmental risk assessment for products derived from new plant breeding techniques. Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology. No. 61.

Ortega, J. L., Rajapakse, W., Bagga, S., Apodaca, K., Lucero, Y. and Sengupta-Gopalan, C. 2018. An intragenic approach to confer glyphosate resistance in chile (*Capsicum annuum*) by introducing an *in vitro* mutagenized chile *EPSPS* gene encoding for a glyphosate resistant EPSPS protein. **PLoS ONE** 13 (4): e0194666.

Peralta, E. G., Hellmiss, R. and Ream, W. 1986. Overdrive, a T-DNA transmission enhancer on the *A. tumefaciens* tumor-inducing plasmid. **EMBO Journal** 5 (6): 1137-1142.

Petti, C. Wendt, T., Meade, C. and Mullins, E. 2009. Evidence of genotype dependency within *Agrobacterium tumefaciens* in relation to the integration of vector backbone sequence in transgenic *Phytophthora infestans*-tolerant potato. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 107: 301-306.

Podevin, N., De Buck, S., De Wilde, C. and Depicker, A. 2006. Insights into recognition of the T-DNA border repeats as termination sites for T-strand synthesis by *Agrobacterium tumefaciens*. **Transgenic Research** 15 (5): 557-571.

Rommens, C. M. 2004. All-native DNA transformation: A new approach to plant genetic engineering. **Trends in Plant Science** 12: 397-403.

Rommens, C. M., Bougri, O., Yan, H., Humara, J. M., Owen, J., Swords, K. and Ye, J. 2005. Plant-derived transfer DNAs. **Plant Physiology** 139 (3): 1338-1349.

Rommens, C. M., Humara, J. M., Ye, J., Yan, H., Richael, C., Zhang, L., Perry, R. and Swords, K. 2004. Crop improvement through modification of the plant's own genome. **Plant Physiology** 135 (1): 421-431.

Rommens, C. M., Yan, H. and Swords, K. 2008. Low-acrylamide french fries and potato chips. **Plant Biotechnology Journal** 6 (8): 843-853.

Rommens C. M., Ye, J. and Richael, C. 2006. Improving potato storage and processing characteristics through all-native DNA transformation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 54 (26): 9882-9887.

Schaart, J. G., Krens, F. A., Pelgrom, K. T. B., Mendes, O. and Rouwendal, G. J. A. 2004. Effective production of marker-free transgenic strawberry plants using inducible site-specific recombination and a bifunctional selectable marker gene. **Plant Biotechnology Journal** 2 (3): 233-240.

Schaart, J. G., Krens, F. A., Wolters, A. A. and Visser, R. G. F. 2011. Transformation methods for obtaining marker-free genetically modified plants. In: Stewart, N. C., Touraev, A., Citovsky V. and Tzfira, T. (Eds.). Plant Transformation Technologies. Blackwell Publishing Ltd. pp: 229-243.

Seyran E. and Craig, W. 2018. New breeding techniques and their possible regulation. **AgBioForum** 21 (1): 1-12.

Simpson, R. B., O'Hara, P. J., Kwok, W., Montoya, A. L., Lichtenstein, C., Gordon, M. P. and Nester, E. W. 1982. DNA from the A6S/2 crown gall tumor contains scrambled Ti-plasmid sequences near its junctions with plant DNA. **Cell** 29 (3): 1005-1014.

Smith, N., Kilpatrick, J. B. and Whitelam, G. C. 2001. Superfluous transgene integration in plants. **Critical Review in Plant Sciences** 20 (3): 215-249.

Stiekema, W. J. and Pereira, A. 2018. Unravelling the genome by genome sequencing and gene function analysis. In: Anderson, M. and Roberts, J. A. (Eds.). Annual Plant Reviews Book Series, Vol. 1. *Arabidopsis*. Wiley Online Library. pp: 31-61.

Suzuki, K., Hattori, Y., Uraji, M., Ohta, N., Iwata, K., Murata, K., Kato, A. and Yoshida, K. 2000. Complete nucleotide sequence of a plant tumour-inducing Ti plasmid. **Gene** 242: 331-336.

Tuteja, N., Verma, S., Sahoo, R. K., Raveendar, S. and Reddy, B. L. 2012. Recent advances in development of marker-free transgenic plants: Regulation and biosafety concern**. Journal of Biosciences** 37: 167-197.

Travella, S., Ross, S. M., Harden, J., Everett, E., Snape, J. W. and Harwood, W. A. 2005. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. **Plant Cell Reports** 23: 780-789.

Tzfira, T., Citovsky, V. 2002. Partners-in-infection: Host proteins involved in the transformation of plant cells by Agrobacterium. **Trends in Cell Biology** 12: 121-129.

Uauy, C., Brevis, J. C. and Dubcovsky, J. 2006. The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. **Journal of Experimental Botany** 57: 2785-2794.

van der Graaff, E., den Dulk-Ras, A. and Hooykaas, P. J. J. 1996. Deviating T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plants. **Plant Molecular Biology** 31: 677-681.

Van Tuyl, J. M. and De Jeu, M. J. 1997. Methods for overcoming interspecific crossing barriers. In: Sawhney, V. K. and Shivanna, K. R. (Eds.). Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press. pp: 273-292.

Varshney, R. K., Bansal, K. C., Aggarwal, P. K., Datta, S. K. and Craufurd, P. Q. 2011. Agricultural biotechnology for crop improvement in a variable climate: Hope or hype? **Trends in Plant Science** 16 (7): 363-371.

Vanblaere, T., Szankowski, I., Schaart, J., Schouten, H., Flachowsky, H., Broggini, G. A. L. and Gessler, C. 2011. The development of a cisgenic apple plant. **Journal of Biotechnology** 154 (4): 304-311.

Vaquero, L., Comino, I., Vivas, S., Rodríguez-Martín, L., Giménez, M. J., Pastor, J., Sousa, C. and Barro, F. 2017. Tritordeum: A novel cereal for food processing with good acceptability and significant reduction in gluten immunogenic peptides in comparison with wheat. **Science of Food and Agriculture** 98: 2201-2209.

Wang, G., Yu, X., Sun, Y., Jones, H. D. and Xia, L. 2016. Generation of marker- and/or backbone-free transgenic wheat plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. **Frontiers in Plant Science** 7: 1324.

Wang, K., Genetello, C., Van Montagu, M. and Zambryski, P. C. 1987. Sequence context of the T-DNA border repeat element determines its relative activity during T-DNA transfer to plant cells. **Molecular and General Genetics** 210 (2): 338-346.

Weeks, J. T., Ye, J. and Rommens, C. M. 2008. Development of an in-planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). **Transgenic Reserch** 17: 587-597.

Wenck, A., Czak´o, M., Kanevski, I. and M´arton, L. 1997. Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during *Agrobacterium*-mediated transformation. **Plant Molecular Biology** 34: 913-922.

Wurdig, J., Flachowsky, H., Sab, A., Peil, A. and Hanke, M. V. 2015. Improving resistance of different apple cultivars using the *Rvi6* scab resistance gene in a cisgenic approach based on the Flp/*FRT* recombinase system. **Molecular Breeding** 35 (3): 95. https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11032-015-0291-8.

Yadav, N. S., Vanderleyden, J., Bennett, D. R., Barnes, W. M. and Chilton, M. D. 1982. Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 79: 6322-6326.

Yin, Z. and Wang, G.- L. 2000. Evidence of multiple complex patterns of T-DNA integration into the rice genome. **Theoretical and Applied Genetics** 100: 461-470.

Zhang, W., Subbarao, S., Addae, P., Shen, A., Armstrong, C., Peschke, V. and Gilbertson, L. 2003. Cre/lox-mediated marker gene excision in transgenic maize (*Zea mays* L.) plants. **Theoretical and Applied Genetics** 107: 1157-1168.

Zhu, S., Duwal, A., Su, Q., Vossen, J. H., Visser, R. G. F. and Jacobsen, E. 2013. Vector integration in triple R gene transformants and the clustered inheritance of resistance against potato late blight**. Transgenic Research** 22: 315-325.

doi: 10.22124/c.2019.11925.1443

University of Guilan
Faculty of Agricultural Sciences

(Review Article)

Cereal Research
Vol. 8, No. 4, Winter 2019 (495-515)

Introduction to cisgenic and intragenic vectors and their application in cereal breeding

Mohammad Mehdi Sohani[1*]

Received: August 11, 2018 Accepted: January 6, 2019

Abstract

The area under cultivation of genetically modified (GM) crops has increased dramatically within the last 20 years. In spite of the economic/agronomic benefits, and their undeniable effects on the environment and human health, social rejection towards GM food, has hindered implementation, exploitation, and commercialization of the molecular techniques. It is chiefly due to the introduction of prokaryotic genes as a selectable marker and transgene from sources that are not naturally crossable with target crop. Using a plant-derived DNA transformation vectors specially designed for each crop with genetic elements from its own genome should rise less environmental concern and may increase consumer's acceptance. The promoter, terminator, T-DNA borders, etc. remain the prime genetic elements within T-DNA region that need to be replaced with plant-derived types. In addition, putative right border should be designed and selectable marker gene need to be avoided or removed following production of a transgenic plant. In the current paper, the concept of cisgenic and intragenic approaches for plant improvement and the essential technical points need to be considered when designing a plant-derived vector are briefly reviewed.

Keywords: Gene transfer, Selectable marker removal, Transgenic plants, Vector backbone

1. Assoc. Prof., Dept. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
* Corresponding author: msohani@guilan.ac.ir