مقاله مروری

ژنتیک معکوس در بیماری‌شناسی گیاهی: روش‌ها، مزایا و چالش‌ها

Reverse genetics in plant pathology: methods, benefits and challenges

جلال غلام نژاد*

دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۳

چکیده

با ظهور دانش زیست‌شناسی مولکولی، عملکرد بسیاری از ژن‌ها با مطالعه فنوتیپ ژن‌های جهش‌یافته (Forward genetics) تا حدی مشخص شد و سر نخی از عملکرد ژن مورد نظر به‌دست آمد. سپس با اختراع روش تعیین توالی DNA در مقیاس گسترده، هزاران ژن در موجودات گوناگون بدون این‌که عملکردشان مشخص باشد، شناسایی شدند. امروزه با استفاده از دانش ژنتیک معکوس، به‌عنوان کارآمدترین روش ارزیابی نقش و عملکرد ژن‌ها در حال حاضر، عملکرد بسیاری از ژن‌های تعیین توالی شده، مشخص شده است. امروزه توالی بسیاری از ژن‌های موجودات زنده شناخته شده است، اما فنوتیپ این توالی‌ها اغلب ناشناخته مانده‌اند. بنابراین استراتژی‌های ژنتیک معکوس مورد توجه بسیاری از محققین ژنتیک قرار گرفته است؛ البته این استراتژی‌ها کاربرد مشابهی در همه موجودات ندارند. Reverse genetics تکنیکی است برای کشف عملکرد ژن‌هایی که به‌وسیلهٔ تکنولوژی DNA sequencing تعیین توالی شده‌اند. در واقع در این روش، عملکرد ژن‌ها به‌وسیلهٔ مطالعهٔ موجوداتی که عملکرد ژن‌های آن‌ها تغییر داده شده است، تعیین می‌شود. در گذشته تحقیقات به این‌صورت بود که مطالعات ژنتیکی با مطالعهٔ فنوتیپ‌های جهش یافته صورت می‌گرفت؛ ولی امروزه با پیشرفت در علوم زیستی، پژوهشگران قادرند ویژگی‌های فنوتیپی منسوب به یک ژن خاص را تعیین نمایند.

واژگان کلیدی: ژنتیک معکوس، ژنومیکس، بیمارگر گیاهی

دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: jalal.gholamnejad@gmail.com

مقدمه

علم ژنتیک معکوس دقیقاً بر خلاف مسیر ژنتیک سنتی (forward genetic) حرکت می‌کند. دانشمندان عملکرد یک ژن ناشناخته را با استفاده از آنالیزهای مولکولی شناسایی می‌کنند. ژنتیک سنتی به دنبال کشف اساس ژنتیکی فنوتیپ است. در حالی‌که ژنتیک معکوس به دنبال فنوتیپ‌های مورد انتظاری است که ممکن است از توالی ژنتیکی خاصی حاصل شوند. از آنجا که تکنیک‌های مدرن توالی‌یابی DNA اطلاعات زیادی در مورد توالی‌های ژنومی خاص را در اختیار محققین قرار می‌دهد و داده‌های زیادی در زمینهٔ ژن و ارتباط آنها با فنوتیپ در دسترس است، ژنتیک معکوس در واقع تلاشی برای ایجاد ارتباط بین توالی‌های ژنتیکی با اثرات خاص فنوتیپی در موجودات زنده است (Soanes *et al*., 2007).

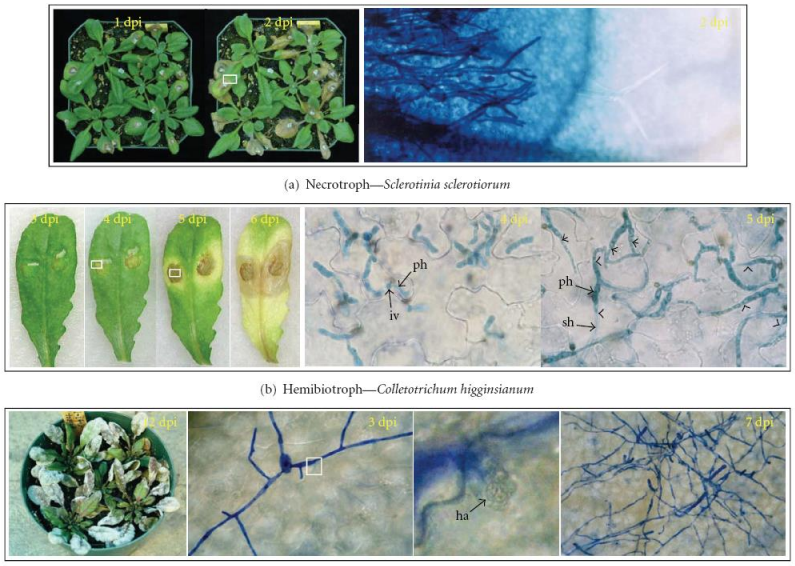
محققین در جستجوی یافتن راهی برای بررسی تأثیر توالی خاص بر روی فنوتیپ و همین‌طور عملکرد بیولوژیکی ژن‌ها بوده‌اند. به این منظور، DNA را تحت اعمال تخریب، تغییر و مهندسی قرار دادند. تکنیک تعیین خودکار توالی DNA اطلاعات زیادی از توالی‌های ژنتیکی فراهم آورده است. ژنتیک معکوس تلاش می‌کند ارتباط میان توالی‌های ژنتیکی به‌دست آمده در مورد موجودات زنده را با اثرات اختصاصی ژن‌ها بر روی فنوتیپ موجود زنده کشف کند. ژنتیک معکوس، فناوری شناسایی توالی یک قطعه ژنی ناشناخته و یافتن فنوتیپ‌های مرتبط با آن توالی است (Simpson and Roger, 2002).

تاکنون توالی‌یابی بیش از چهل ژنوم قارچی و اامیست‌ها به اتمام رسیده است. چالش بزرگ بعدی در زیست‌شناسی مدرن قارچ‌ها و اامیست‌ها، ترجمه حجم انبوه اطلاعات حاصل از توالی‌یابی ژنوم و کاربردی کردن آن در زیست‌شناسی است. ژنتیک معکوس به‌عنوان ابزاری برای کاربردی کردن ژنومیکس به‌کار گرفته می‌شود. تکنیک‌های مختلفی برای ژنتیک معکوس به‌کار گرفته می‌شوند؛ نظیر جایگزینی یا انفصال ژن‌های هدف (Targeted gene disruption/replacement)، خاموشی ژن (Gene silencing) جهش‌سازی الحاقی (Insertional mutagenesis) و ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم (Tageting Induced Local Lesions in Genomes=TILLING). همه موارد ذکر شده کمک بسیار زیادی در درک عمل ژن در مورد قارچ‌ها و اامیست‌ها و موجودات دیگر می‌کند (Wendland, 2003).

از آنجا که قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و اامیست‌ها باعث از بین رفتن محصولات گیاهی در سطح وسیع می‌شوند، یکی از مهم‌ترین محدودیت‌ها در تولید غذا در دنیا محسوب می‌شوند. این بیمارگرها به سه دسته تقسیم می‌شوند: گروه اول سلول گیاهی را می‌کشند و از محتویات آن تغذیه می‌کنند (نکروتروف)، و گروه دوم به میزبان زنده برای تکمیل چرخه زندگی خود نیاز دارند (بیوتروف)، و گروه سوم در مراحل مختلف بسته به شرایط ممکن است به‌صورت هتروتروف و بیوتروف عمل کنند. شکل ۱، سه نوع رابطه گیاه-بیمارگر (Phytopathosystem) را نشان می‌دهد؛ پاتوسیستم نکروتروفیک مانند Arabidopsis و *Sclerotinia sclerotiorum*، پاتوسیستم بیوتروف مانند گیاه Arabidopsis و *Erysiphe cichoracearum* و همی‌بیوتروف مانند Arabidopsis و *Colletotrichum higginsianum*. در این موارد تحقیقات زیادی برای درک مکانیسم‌های مولکولی بیماری و توسعه بیماری انجام گرفته است (Cho *et al*., 2006).

با ظهور تکنیک‌های توالی‌یابی با ظرفیت بالا، شمار ژنوم قارچ‌های توالی‌یابی شده به سرعت افزایش یافت. همان‌طوری که ذکر شد تا به حال بیش از ۴۰ ژنوم قارچی تعیین توالی شده است، که از این تعداد ۱۲ عدد مربوط به قارچ‌های بیمارگر گیاهی است، مانند: *Botrytis cinerea* (نکروتروفیک، عامل کپک خاکستری انگور، و دیگر میزبان‌های گیاهی). *Sclerotinia sclerotiorum* (نکروترفیک، عامل کپک سفید بسیاری از میزبان‌ها)، *Fusarium graminearum* (همی‌بیوتروف، عامل head blight غلات) و *Fusarium oxysporum* (همی‌بیوتروف، عامل پژمردگی گونه‌های گیاهی) (Xu *et al*., 1998).

در اینجا دو واژه تعریف می‌گردند: ژنومیکس ساختاری و عملکردی. در ژنومیکس ساختاری، توالی‌یابی کل ژنوم یک موجود مشخص می‌گردد؛ و ژنومیکس کاربردی شامل داده‌های تجربی است که در بررسی عملکرد ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ این اطلاعات به‌وسیله ژنومیکس ساختاری فراهم آورده می‌شود. با پیشرفت‌های سریع در زمینه ژنومیکس ساختاری، مهمترین مسئله در زمینهٔ ژنومیکس قارچ‌ها و اامیست‌ها مشخص کردن عملکرد تعداد زیاد ژن‌هایی است که طی پیشرفت‌هایی در زمینه *In silico* مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. همان‌طور که ذکر شد ژنتیک معکوس، یک روش برای کشف عملکرد ژن‌ها و تأثیر آن بر فنوتیپ است. این دستاورد علمی بسیاری از مکانیسم‌های مولکولی در قارچ‌ها و اامیست‌ها و چگونگی توسعه آنها را رمزگشایی می‌کند، مانند اسپورزایی، فعالیت جوانه‌زنی، تشکیل ساختار آلوده کننده یا آپرسوریوم، مورفولوژی آپروسوریوم و نحوه نفوذ، تغذیه قارچ‌ها (درک مواد مغذی و تجمع آهن و فسفر در اجتماع میزبان‌ها) و اثر متقابل بین قارچ‌ها و اامیست‌ها و میزبان‌های گیاهی آنها (اثر متقابل سازگار و ناسازگار). در گذشته، به خاطر شباهت‌های مورفولوژیکی، اامیست‌ها جزء سلسلهٔ قارچ‌ها در نظر گرفته می‌شدند. اامیست‌ها و قارچ‌ها در صفاتی مانند رشد رویشی، تولید میسلیوم، تولید اسپورهای فراوان و فرایندهای تولید مثل جنسی و غیرجنسی مشابه هستند (Barr, 1992).



شکل ۱- اثرات متقابل قارچ با گیاه آرابیدوپسیس، (a) اثرات متقابل نکروتروفیک *Sclerotinia sclerotiorum* که بافت میزبان را با کلنیزه کردن از بین می‌برد. رنگ‌آمیزی بافت مرده با تریپان بلو. (b) اثرات متقابل همی‌بیوتروفیک، قارچ *Colletotrichum higginsianum* فرایند آلودگی را از طریق یک فاز بیوتروف سه تا چهار روز بعد از آلودگی شروع می‌کند (dpi) تعداد زیادی از هیف‌های قارچ (ph) وارد آوندها می‌شود. (iv) هیف‌های ثانویه در فاز نکروترفیک ۵ روز بعد از آلودگی. (c) اثرات متقابل بیوتروفیک، کلنی‌های *Erysiphe cichoracearum* که روی سطح گیاه کلنیزه می‌شوند و به‌وسیله تولید هوستوریوم (ha) در روی سلول‌های اپیدرمی مواد غذایی را می‌مکد و میزبان را زنده نگه می‌دارد تا چرخه زیستی خود را با تولید کنیدی کامل کند.

Fig. 1. Fungus-Aravbidopsis interaction, a) necrotrophic interaction-*Sclerotinia sclerotiorum* that destroy its host tissue by colonizing. Dying dead tissue by Tripan blue. B) Hemibiotrophic interaction-*Colletotichum higginsianum* initiates infection process by a biotrophic phase in 3-4 days after inoculation (dpi). Several hypha of the fungus inject into vessels. (iv) secondary hypha (sh) in the necrotrophic phase at 5 dpi. c) biotrophic interaction-*Erysiphe cichoracearum* colonizes the plant surface by producing haustarium (ha) into epidermal cells for nutrient uptake and keeps the host cell in survival till the pathogen completes its life cycle by conidiation.

شباهت‌هایی بین ساختارهای آلوده‌کننده و فرایند آلوده‌سازی میزبان در قارچ‌ها و اامیست‌ها وجود دارد. به هر حال، دیواره سلولی اامیست‌ها از سلولز تشکیل شده است و مقدار آن بیشتر از کیتین است، در حالی‌که کیتین مهمترین

ترکیب در دیوارهٔ سلولی قارچ‌های حقیقی است. علاوه بر این، هیف اامیست‌ها بدون دیواره است و در فرم رویشی به‌صورت دیپلوئید است و این صفات آن‌ها را از قارچ‌های حقیقی متمایز می‌سازد. بر اساس تفاوت‌های مورفولوژیکی و شواهد مولکولی، این‌طور استنباط می‌شود که اامیست‌ها با جلبک‌های هتروکونت در ارتباط هستند و بنابراین در گروه Stramenopile قرار گرفتند. در بین اامیست‌ها، *Phytophthora*, *Pythium* و *Peronospora* به‌عنوان معروف‌ترین بیمارگرهای گیاهی دارای خسارت اقتصادی بسیار زیاد شناخته می‌شوند. این اامیست‌های بیمارگر گیاهی به اندازهٔ قارچ‌های بیمارگر گیاهی مخرب هستند. پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک معکوس استراتژی‌های آلودگی مربوط به بیمارگرهای نکروتیک و همی‌بیوتروفیک را در سطح مولکولی به‌طور وسیع آشکار کرده است. در مورد پارازیت‌های اجباری، ژنتیک معکوس به‌علت فقدان روش‌های مناسب مانند عدم کشت این بیمارگرها در محیط آزمایشگاه، ترانسفورمیشن و روش‌های انفصال ژن برای آنالیزهای مولکولی قابل کاربرد نیست. این چالش‌ها مانع از تشخیص ژن‌های مسئول در گونه‌ها شده است.

در این تحقیق مروری بر پیشرفت‌های اخیر در زمینه ژنتیک معکوس نظیر جابه‌جایی و انفصال ژن‌های هدف (از بین بردن)، خاموش‌کردن ژن‌ها (Gene silencing)، موتاسیون‌های وارداتی (Insertional mutagenesis)، ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم (TILLING) شده است. این روش‌ها برای تشخیص و تعیین عملکرد ژن‌ها به‌کار می‌روند.

دستاوردها و روش‌های ژنتیک معکوس

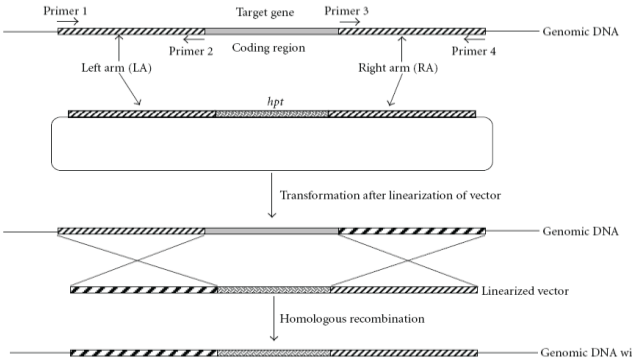
جابه‌جایی و انفصال ژن‌های هدف (Targeted gene disruption/replacement)

یکی از روش‌های بسیار مهم برای پی بردن به عمل ژن‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی، مطالعه در مورد فنوتیپ‌های جهش یافته‌ای است که لوکوس ژنومی آن‌ها به‌وسیله فرایند انفصال (Gene disruption) یا جایگزینی (Gene replacement) به‌وسیلهٔ Heterologous DNA نوترکیب تغییر کرده است. دستاوردها در زمینه ژنتیک معکوس با افزایش اطلاعات در مورد ژنوم توالی‌یابی شدهٔ موجودات بیشتر شده است و به‌تدریج به تعداد گونه‌های بیماگر توالی‌یابی شده افزوده می‌گردد (Timberlake and Marshall, 1989).

ساختمان DNA وارد شدهٔ هدف، به‌وسیله نوترکیبی همولوگ می‌تواند ژن‌ها را با عمل انفصال (تخریب)، پاک کردن یا جابه‌جایی از بین ببرد. نوترکیبی همولوگ عبارتست از تبادل متقابل توالی DNA بین دو کروموزمی که لوکوس مشابهی را حمل می‌کنند. نوترکیبی همولوگ بین ژن هدف و DNAیی که وارد شده و حاوی آلل موتانت است، باعث knock-out کردن ژن هدف می‌شوند. این روش اولین بار برای مخمر *Saccharomyces cerevisiae* استفاده شد و برای کشف عمل ژن‌ها مورد استفاده قرار گرفت و از آن زمان به بعد برای چندین بیمارگر گیاهی استفاده شد. چهار روشی که در زمینه knock-out کردن ژن‌ها بیشتر استفاده می‌شود و برای نشان دادن عمل ژن‌ها معمول‌ترند عبارتند از انفصال (تخریب) ژن مورد نظر به‌وسیلهٔ یک کاست مقاومت، تغییر بیان ژن‌های مورد نظر به جای پاک کردن آنها، کم و زیاد کردن بیان ژن‌ها، جایگزینی ژن که مخلوطی از دومین و سومین روش است. استراتژی جایگزینی ژن‌های هدف در شکل ۲ نشان داده شده است (Scherer and Davis, 1979).

Gene knockout تکنیکی در زمینه ژنتیک معکوس است که در یک موجود زنده مهندسی شده باعث ناکارآمد شدن ژن‌ها می‌گردد. همچنین از موجودات زنده‌ای که ژن‌های آنها به‌صورت ساده knockout شده است، برای درک ژن‌های توالی‌یابی شده‌ای که عمل آن‌ها به‌صورت کامل شناسایی نشده است استفاده می‌شود. محققین از تفاوت بین موجودات زنده knockout شده و افراد طبیعی برای پی بردن به این تفاوت‌ها استفاده می‌کنند (Brachmann *et al*., 2004). این واژه همچنین به فرایندی اشاره می‌کند که باعث تولید این موجودات زنده می‌گردد، به این فرایند knocking out کردن ژن‌ها گفته می‌شود. این تکنیک ضرورتاً در تقابل با تکنیک Gene Knock-in است. تکنیک Knockout به‌طور اختصار KO نامیده می‌شود. Knockout کردن هم‌زمان دو ژن در یک ارگانیسم

double knockout (DKO) نامـیده می‌شود. همین‌طور واژه‌های triple knockout (TKO) و quadruple knockouts (QKO) برای ژن‌های knockouts شده سه‌تایی و چهارتایی به‌کار می‌رود (Choi and Dean, 1997).



شکل ۲- شکل شماتیک از استراتژی جابه‌جایی ژن‌ها. مناطق ۳ و ۵ (بازوهای راست و چپ) از ژن‌های هدف از DNA ژنومی که از استرین تیپ‌های طبیعی گرفته شده است در PCR تکثیر می‌شود و به وکتور چسبانده می‌شود، این وکتور حاوی ژن‌های فسفوترانسفراز هیگرومیسن است (*hpt*). وکتور با استفاده از آنزیم‌های برنده به صورت خطی در می‌آید و به‌وسیله عمل ترانسفورمیشن به پروتوپلاست گونه‌های طبیعی (وحشی) وارد می‌شوند. نوترکیبی همولوگ با ورود ژن *hpt* به‌وجود می‌آید (Wendland, 2003).

Fig. 2. Schematic representation of a gene replacement strategy, 5` and 3` flanking regions (right and left arms) of the target genes are PCR amplified from genomic DNA of wild-type strain and ligated into vector containing hygromycin phosphotransferase (*hpt*) gene. The vector is then linearized using restriction enzyme and introduced into the protoplast of the wild-type strain through transformation. Homologous recombination replaces the gene of interest with *hpt* gene (Wendland, 2003).

تکنیک PCR برای تولید موتانت‌های *Ustilago maydis* با جابه‌جایی ژن‌های به‌وسیله Kamper توسعه داده شد. در این روش، ابتدا مناطق '۳ و '۵ از ژن هدف به‌وسیله PCR تکثیر می‌شوند، و سپس به‌صورت مستقیم به یک کاست مارکری از طریق دو جایگاه برشی مشخص SfiI چسبانده می‌شود. سپس محصول چسبانده شده به‌عنوان یک الگو برای تکثیر ساختمان جایگزین مورد استفاده قـرار می‌گیـرد، که این الگـو می‌توانـد به‌طور مسـتقیم برای ترانسـفورمیشن *U. maydis* استفاده شود. Brachmann و همکاران بر اساس تکنیـکی که به‌وسیله Kamper برای تولیـد موتانـت‌های *U. maydis* شرح داده شد، یک تکنیک تطبیقی در ژنتیک مولکولی را توصیف کردند. آنـها مجمـوعهٔ جامـعی از کاست‌های وارداتی با ساختارهای پایه‌ای برای ژن گزارشگر انتخابی (ژن پروتئین فلوروسنت سبز، *gfp*)، یک کاست مقاومت (ژن *hpt*)، و یک کاست پروموتور انتخابی که به‌وسیله دو جایگاه تشخیص SfiI برای ورود قطعات ژن تکثیر شده به وسیله PCR داشت، را ساختند. با استفاده از این تکنولوژی دانشمندان دو موتانت جایگزین تولید کردند؛ در هر دو موتانت، پروموتورهای داخلی، ژن‌های تولید فرومون (*mfa1*) را برای بیان ژن *gfp* هدایت می‌کرد. به‌طور هم‌زمان، بیان mfa1 ORF به‌وسیله پروموتور منبع کربن crg1 و یا پروموتور منبع نیتروژن nar1 تنظیـم می‌گردد. بیـان ژن‌ها به‌وسیلهٔ فرومون القا می‌گردد و بیان فرمون تنها زمانی مشاهده می‌گردد که پروموتورهای هترولوگ فعال شوند (Brachmann *et al.*, 2004).

Cho و همـکاران یک روش بـرای حـداکثـر کـردن ظـرفیـت انـفصـال ژن‌هـای هـدف در مـورد قـارچ *Alternaria brassicicola* با استفاده از ساختمان‌های خطی حداقل Linear Minimal Element (LME) توسعه دادند. قارچ *A. brassicicola* باعث ایجاد بیماری لکه سیاه بر روی گونه‌های *Brassicaceae* می‌گردد و به‌عنوان یک بیمارگر نکروتروفیک قارچی در مطالعات بر روی گیاه Arabidopsis مورد استفاده قرارگرفته است. دانشمندان به منظور بهبود بخشیدن به راندمان انفصال ژن‌های هدف و همین‌طور سرعت بخشیدن به تولید ساختمان‌های تخریب ژن، از ساختمان‌های کوچک خطی با عناصر حداقل، یک ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک با قابلیت شناسایی و یک ژن هدف جزئی

استفاده کردند. استفاده از ساختمان‌های LME، اساساً راندمان knock-out ژن‌های هدف را در مقایسه با ساختمان پلاسمید استاندارد بهبود بخشید (Cho *et al.*, 2004).

انفصال (تخریب) ژن‌های هدف در بسیاری از پاتوژن‌های گیاهی کاربرد دارد، مانند *Colletotrichum gloeosporioides*, *M. oryzae*، *U. maydis* (عامل بیماری آنتراکنوز)، *A. brassicicola*، *Cochliobolus carbonum* (عامل لکه‌برگی شمالی ذرت) و *F. graminearum*. در طول دهه گذشته از *M. oryzae* (نام قبلی *Magnaporthe grisea*) به‌عنوان یک مدل ابتدایی برای روشن ساختن مکانیسم‌های توسعه‌ای قارچ‌ها، رابطه متقابل گیاهان و قارچ‌ها، و بیماری‌زایی و ویرولانس این موجودات استفاده شده است. از تکنیک انفصال ژن‌های هدف، برای شرح تعدادی زیادی از ژن‌هایی که در ویرولانس و بیماری‌زایی قارچ عامل بلاست گیاه برنج دخالت می‌کنند، استفاده شد. بعضی از این ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی عبارتند از *MPG1* (کلاس یک هیدروفوبین)، *PMK1* (که با ژن‌های مخمری Fus3/Kss1 MAP همولوگ است) ژن *MAC1* (Adenylate cyclase)، ژن *Mps1* (homologue of yeast Slt7 MAP kinase kinase) (Wei *et al.*, 2004).

وارد کردن یک ژن مارکر قابل شناسایی نظیر *hpt* به ژن مورد مطالعه، به چندین آنزیم برشی، چسباننده، مراحل cloning وsubcloning نیاز دارد و زمان‌بر می‌باشد. این مسئله تکنولوژی DNA نوترکیب را برای آنالیز ژن‌ها در مقیاس بزرگ ناکارآمد می‌سازد. برای از بین بردن این محدودیت‌ها، تکنولوژی Invitrogen، به‌عنوان یک روش خوب برای cloning در آزمایشگاه معرفی شده است. با استفاده از این تکنولوژی، عملکرد بالای cloning ژن‌های هدف، برای knock-out و knock-down (که در مبحث بعدی آورده شده است) حاصل می‌شود. سیستم Gateway cloning به‌صورت دقیق عبارتست از سیستم‌های نوترکیبی دارای سایت اختصاصی با استفاده از باکتریوفاژ lambda به جای استفاده از قطعات shuttle DNA. به این‌صورت که این باکتریوفاژها قطعات DNA را وارد مقصد خاص می‌کنند؛ به‌صورتی‌که سایت‌های نوترکیب سازگار به‌وجود آیند و ORFها هم آسیبی نبینند (Abe *et al.*, 2006).

از سال ۱۹۹۰ روش Gateway cloning پایه‌گذاری شد. محققین در زیست‌شناسی مولکولی با استفاده از این روش قطعات DNA را به پلاسمید وارد می‌کنند و این کار به‌وسیلهٔ یک ست اختصاصی از توالی‌های نوترکیب، سایت‌های *att* Gateway، و دو مخلوط آنزیمی اختصاصی به نام LR Clonase و BP Clonase انجام می‌شود. تکنیک Gateway Cloning به قطعات DNA اجازه می‌دهد که به وکتورهای کلونینگ مختلف وارد شوند؛ در حالی‌که به ساختمان ORF آسیبی وارد نشود. این روش به‌طور کارآمد با آنزیم‌های برشی و لیگاز جایگزین شده است. با استفاده از این روش هر قطعه از DNA برای آنالیزهای کاربردی می‌تواند مورد عمل کلون‌سازی قرار بگیرد. در ابتدا در این روش قطعهٔ DNA با استفاده از دو توالی نوترکیب چسبنده وارد قطعهٔ پلاسمید می‌گردد، این دو توالی نوترکیب به نام‌های *att* L1 و *att* L2 هستند (Shafran *et al.*, 2008). دستاوردهای زیادی به‌وسیلهٔ این روش کلون‌سازی به‌دست آمده است، ORFهای زیادی از انسان، موش و دیگر جانوران کلون شده و یا به‌وسیلهٔ روش‌های شیمیایی ساخته شده است. وجود این کاست‌های ژنی در یک پلاسمید استاندارد برای Gateway cloning کمک زیادی در امر انتقال سریع این کاست‌ها به درون پلاسمیدها و آنالیز عملکردی آنها کرده است. نسبت به روش‌های دیگر، Gateway cloning بسیار در وقت صرفه جویی می‌کند و دارای اختصاصیت زیادی است. این روش سازگاری عجیبی با انواع علوم زیستی دارد؛ به‌خصوص برای محققینی که نیاز به انتقال هزاران قطعه از DNA به درون یک پلاسمید خاص دارند، مفید واقع می‌شود. اولین مرحله در Gateway cloning آماده‌سازی کلون‌های Gateway Entry است. کلون‌های Entry اغلب در دو مرحله ساخته می‌شوند (Shafran *et al.*, 2008):

الف: توالی‌های Gateway attB1 و attB2 به انتهای '۳ و '۵ قطعهٔ مورد نظر وارد می‌شوند و این کار با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PCR و تکثیر در آن انجام می‌گیرد.

ب: سپس محصولات حاصل از تکثیر در PCR با پلاسمیدهای اختصاصی (Gateway Donor Vectors) و آنزیم‌های اختصاصی به نام BP Clonase ترکیب می‌شوند. مخلوط آنزیمی ورود توالی *att*B که شامل محصولات PCR است را به

داخل سایت‌های نوترکیبی *att*P در Gateway Donor vector و ایجاد نوترکیب را کاتالیز می‌کند. این تکنولوژی به محققین اجازه می‌دهد که وکتورهای مختلفی برای اهداف متفاوت بسازند، نظیر بیان ژن‌ها در *Escherichia coli* یا *S. cerevisiae*، که از یک ناقل برای واردسازی ژن مورد نظر استفاده می‌شود. از زمان شروع آنالیزهای ژنومی، تکنولوژی Gateway به‌طور بسیار وسیعی مشخصات ژن‌ها را آشکار کرده است. اخیراً Shafran و همکاران دو ابزار برای ژنومیکس کاربردی با راندمان بسیار بالا را در مورد قارچ‌های رشته‌ای بر اساس تکنولوژی Gateway به نام pTroya برای (Knock-down) و Gene Blast برای (Knock-out) توسعه داده‌اند. از هر دو روش برای آنالیز کاربردی بر روی خسارت قارچ *Colletotrichum gloeosporioides* استفاده شده است (Shafran *et al*., 2008).

مهم‌ترین فایده knock-out تمایل آن به مناطق ژنتیکی اختصاصی هدف است. به هر حال، این تکنولوژی با تکیه بر تولید استرین‌های دارای ژن‌های knock-out شده، به‌خاطر کاهش تولید نوترکیب‌های همولوگ ارزشمند است (در این حالت گونه‌های بیمارگر به‌طور قابل توجهی متفاوتند) و در نتیجه DNAهای ترانسفورمه شده به‌علت همولوگ نبودن (Ectopic) به هم پیوسته و به ساختن وکتورهای جایگزین نیاز دارند. کارایی نوترکیبی زمانی بالاتر می‌رود که طول قطعات همولوگ DNA افزایش یابد، که البته این فرایند به زمان قابل توجهی نیاز دارد. اکثریت قارچ‌ها از چندین سلول و یا هیف‌های چند هسته‌ای تشکیل شده‌اند و بعضی از آنها دارای هسته‌هایی هستند که از نظر ژنتیکی با بقیه متفاوت هستند (Waterhouse *et al*., 1998).

RNA مداخله‌گر (Knock-Down)

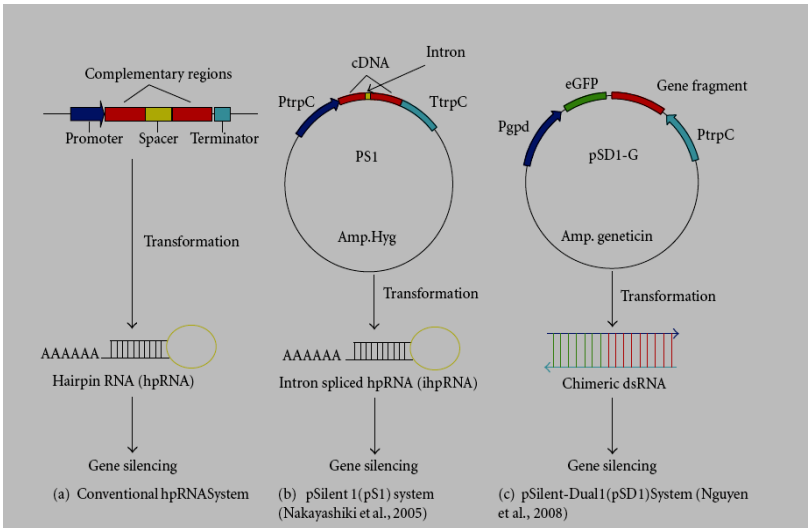
تکنولوژی RNA مداخله‌گر (RNAi) در خاموشی ژن‌ها (که در گیاهان post-transcriptional gene silencing و در حیوانات RNAi خوانده می‌شود)، یک استراتژی جالب برای ژنتیک معکوس است. خاموش کردن اختصاصی بیان ژن‌ها توسط فرآیند تداخل interference RNA (RNA) یا RNAi یک مکانیسم تنظیم بیان ژن‌ها است که در سطح پس از نسخه‌برداری در سلول‌های یوکاریوتی اعمال می‌شود. این پدیده توسط مولکول‌های دو رشته‌ای RNA به‌نام مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک (small interfering RNA) یا siRNA واسطه‌گری می‌شود. RNAi تکنیکی است که با استفاده از RNA دو رشته‌ای و با از بین بردن mRNA همولوگ خود باعث کاهش و یا افزایش بیان ژن‌ها می‌شود. این siRNA از لحاظ تکاملی در میان موجودات یوکاریوت حفظ شده است و به نظر می‌رسد که جهت حفاظت ژنوم در مقابل تهدیدات ژن‌ها با منشاء خارجی (اگزوژن) نظیر ژن‌های ویروسی، ترانسژن‌ها و همچنین ژن‌ها با منشاء داخلی نظیر عناصر ژنتیکی متحرک مثل ترانسپوزون‌ها به‌کار می‌رود. علاوه بر این، فرآیند تداخل RNA در برنامه‌های سلولی جهت تنظیم بیان ژن‌ها و کنترل رشد و نمو سلولی نقش دارد (Fire *et al*., 1998).

RNAi اثر knockout اختصاصی به‌وجود می‌آورد که باعث موتاسیون واقعی DNA مورد نظر نمی‌شود. این موضوع اولین بار در نماتود *Caenorhabditis elegans* در واکنش به dsRNA کشف شد. دراین نماتد، RNAi به‌طور سیستمیک در بیان اغلب ژن‌های موجود در ژنوم دخالت می‌کند. طرز عمل RNAi در درون سلول به این‌صورت است که باعث تخریب messenger RNA می‌شود. با شناخت فرآیند RNA interference و آگاهی کامل از اجزای داخل سلولی مانند پروتئین‌های Dicer و کمپلکس RISC، این روش به مناسب‌ترین روش برای knockdown کردن ژن‌ها تبدیل گشت (Whisson *et al*., 2005).

تاکنون سه شکل از فرآیند تداخل RNA (RNA interference) که از لحاظ فنوتیپی متفاوت ولی از جهت مکانیسم عمل یکسان و مشابه‌اند، در یوکاریوت‌ها شناسایی شده است. این اشکال عبارتند از هم‌سرکوبی (Cosuppression) یا خاموش شدن ژن پس از نسخه‌برداری (Post-Transcriptional Gene Silencing) یا PTGS در گیاهان، فرونشانی ژن‌ها (Quelling) در قارچ‌ها و تداخل (RNA interference) یا RNAi در سلسلهٔ جانوری. کشف قطعی پدیده تداخل RNA زمانی صورت گرفت که Andrew Fire و Craig Mello سرگرم توجیه خاموشی غیر منتظره ناشی از حضور رشتهٔ RNA (sense RNA) بودند و در پی آن در سال ۱۹۹۸ نقش حیاتی مولکول RNA دو رشته‌ای در خاموش شدن اختصاصی

توالی ژن‌ها در نماتد *Caenorhabditis elegans* تشخیص داده شد. فایر و همکاران اثبات نمودند که به هنگام هدف قرار دادن اختصاصی نسخه mRNA یک ژن در نماتد *C. elegans*، با تزریق مولکول‌های dsRNA می‌توان حداقل تا ده برابر اثر خاموشی قوی‌تری در مقایسه با مولکول‌های senseRNA و یا antisenseRNA به تنهایی القا نمود. این مشاهده منجر به حصول این نتیجه شد که تزریق dsRNA اختصاصی با منشاء خارجی به بدن نماتد به گونه‌ای بسیار کارآمد سبب پاسخ خاموشی اختصاصی ژن هدف در بدن این موجود می‌شود. این پدیده نوظهور، تداخل (RNA interference) RNA یا همان RNAi نامیده شد. این پدیده در دیگر موجودات یوکاریوتی اعم از جانوران، گیاهان و انسان به خوبی مورد مطالعه قرار گرفت و سازوکارهای آن شناخته شده است. هم اکنون، تکنیک تداخل RNA به‌عنوان ابزاری توانمند و کاملاً شناخته شده مورد توجه زیست‌شناسان و محققان رشته پزشکی می‌باشد. در سال ۲۰۰۲، با انتشار کشف پدیده تداخل RNA به‌عنوان بزرگ‌ترین پیشرفت علمی سال در مجله Science، محققان دریافتند که این کشف ارزشمند علمی طی سال‌های آینده چهره تحقیقات حوزه زیست‌پزشکی (Biomedical research) را متحول خواهد ساخت (Nguyen *et al.*, 2008). این تکنیک بر اساس تولید مولکول‌های dsRNA بنا شده است. این مولکول دو رشته‌ای به‌عنوان الگو برای آنزیم Dicer ریبونوکلئاز ۳ عمل می‌کند و یک RNA کوتاه مداخله‌گر siRNAs تولید می‌کند. این siRNAها در کمپلکس RNA القاءکننده خاموشی ژن (RISC, RNA-inducing silencing complex) و یک توالی اختصاصی راهنما را به‌وجود می‌آورند که mRNAهای مسئول را تخریب می‌کند. روش‌های خاموش‌کننده ژن‌های RNA که بیان ژن‌ها در سطوح بعد از نسخه‌برداری شناخته شده بودند، در بیمارگرهای اقتصادی مانند *M. oryzae* و *P. infestans* مطالعه شده‌اند (Kadotani *et al.*, 2003). RNAi نه تنها یک ابزار مهم برای روشن ساختن عمل بسیاری از ژن‌های ناشناخته است، بلکه برای شناسایی ژن‌های ضروری در توسعه بیمارگرهای گیاهی و فرآیند بیماری‌زایی هم استفاده می‌شود. البته استفاده از این RNAi در بیماری‌زایی گیاهی به تعداد محدودی از گونه‌ها خلاصه می‌شود. شکل ۳، سه راهکار که امروزه در آنالیزهای کاربردی برای بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده قرار می‌گیرند را نشان می‌دهد که شامل RNAi سنجاق‌سری معمولی، RNAi سنجاق‌سری چسبنده اینترون و خاموش کننده دو رشته‌ای شیمریک است. Kadotani و همکاران آنالیزی سیستماتیک از RNA silencing در قارچ عامل بلاست *M. oryzae* با استفاده از بیان ژن پروتئین فلورسنس سبز افزایشی (eGFP) به‌عنوان یک گزارشگر انجام دادند. آنها دریافتند که تجمع eGFP mRNA در ترانسفورمانت‌های خاموش شده به‌طور مستقیم کاهش داده شده است. علاوه بر این، باید به این نکته توجه نمود که siRNAهای کوچک مداخله‌گر (siRNAs) فقط در ترانسفورمنت‌های خاموش شده حاضر بودند. این نتایج نشان داد که RNA silencing در *M. oryzae* عمل می‌کند، که یک ابزار آنالیز کاربردی برای کل ژنوم این قارچ فراهم آورده بود. Akihiro و همکاران کاربرد این ژنوم هدف را در خاموشی ژن به‌عنوان یک دستاورد مفید در ژنتیک معکوس برای *Bipolaris oryzae* عامل بیماری لکه قهوه‌ای در برنج معرفی نمودند (Kadotani *et al.*, 2003).

ژن Polyketide synthase (PKS1) باعث ساخته شدن ملانین در قارچ‌ها می‌گردد، این ژن برای silencing gene به‌عنوان یک مارکر هدف قرار داده شد. RNA سنجاق‌سری کدکننده ناقل خاموشی (hpRNA) از قطعه PKS1 ساخته شده است و وارد DNA ژنومی *B. oryzae* می‌شود (شکل ۳a). خاموشی ژن PKS1 باعث کاهش بیان mRNA PKS1 و فنوتیپ آلبینو می‌شود. اخیراً، Nguyen و همکاران یک تکنولوژی با عملکرد بالا برای آنالیز عملکرد ژن با استفاده از RNAi توصیف کردند که این تکنولوژی باعث جایگزین کردن knock-out ژن به‌وسیله نوترکیبی هـمولوگ می‌شود. آنها یک ناقل برای RNA silencing توسعه دادند؛ pSilent-Dual1 (pSD1) دو پروموتور دوبله همگرا را حمل می‌کند که شامل پروموتور تریپتوفان *Aspergillus nidulans* (PtrpC) و پروموتور glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Pgpd) برای همان قارچ می‌شود. یک جایگاه multicloning (MCS) بین دو پروموتور وارد شده است. مهمترین مزیت سیستم pSD1 نسبت به بقیه، نظیر hpRNA یا RNA (ihpRNA) اینترون hair-pin (شکل ۳b) سیستم خاموش کننده، این است که این روش اجازه یک کلونینگ تک مرحلهٔ برای تولید ساختمان RNAi را می‌دهد (Bohnert *et al.*, 2004).



شکل ۳- استراتژی‌های RNAi: (a) RNAi سنجاق‌سری متداول، با یک توالی وارونه مکمل یا نیمه‌مکمل از RNA (dsRNA) hairpins در حدود ۲۰ تا ۵۰ bp نسخه‌برداری می‌شود. این dsRNAs در داخل micro-RNAs که باعث تخریب mRNA می‌شوند، قرار می‌گیرند. (b) pSilent1 (سیستم ناقل بیان کننده RNA هسته‌ای هتروژن)، pSilent1، کاست مقاومت به hygromycin و یک واحد نسخه‌برداری برای بیان hairpin RNA با جایگاه‌های cloning متفاوت و یک spacer برای یک توالی اینترون را حمل می‌کند. (c) سیستم pSilent-Dual1 (بر خلاف سیستم پروموتور دوتایی)، پروموتورهای trpC و gpdA با یک شیوه همگرا با سایت‌های multicloning جدا شده کلون می‌شوند. برای co-silencing ابتدا یک قطعه به اندازه ۰/۴۱kb از eGFP در pSD1 وارد شد، در نتیجه pSD1-G به‌وجود آمد. قطعات ژن در حدود ۵۰۰ bp می‌تواند به ناقل pSD1 وارد شود، که باعث بیان double-stranded RNA شیمری مسئول می‌گردد و به‌عنوان یک الگو برای تخریب وابسته به همولوژی برای mRNA هدف محسوب می‌شود.

Fig. 3. RNAi strategies: a) conventional hpRNAi, transcripts with complementary or near-complementary 20- to 50-base pair inverted repeats form double-stranded RNA (dsRNA) hairpins. These dsRNAs are processed into micro-RNAs that mediate mRNA degradation. B) pSilent1 (heterogeneous nuclear RNA expressing vector system), it carries a hygromycin resistance cassette and a transcriptional unit for hairpin RNA expression with multiple cloning sites and a spacer of an intron sequence. C) pSilent-Dial1 system (Opposing dual promotor system), trpC and gpdA promotors were cloned in a convergenr manner separated by multicloning site. For co-silencing, s 0.41 kb sGFP fragment was first inserted in pSD1 resulting in pSD1-G. gene fragments of ~500 bp can be inserted into pSD1 vector, which will express corresponding chimeric double-stranded RNA, a template for homology-dependent degradation of the target mRNA.

Nguyen و همکاران، جهت غربال مؤثر ترانس فورمانت‌های خاموش شده، ژن gfp را به سیستم pSD1 وارد کردند. این موضوع باعث بیان شدن chimeric RNA و تشخیص اثر بخشی خاموشی ژن به‌وسیلهٔ استفاده از استرین‌های گیرنده مولد GFP شد و بنابراین نور فلوروسنس در زمان استفاده از میکروسکوپ epifluorescence وجود داشت. مهمترین چالشی که در این سیستم وجود داشت، راندمان پایین خاموشی ژن در مقایسه با hpRNA یا بیان‌کننده ihpRNA و ناقل‌های RNA-silencing بود. تفاوت در تشکیل dsRNA می‌تواند یک دلیل مهم در راندمان خاموشی ژن‌ها برای تفاوت بین سیستم‌ها باشد. دانشمندان یک‌سری از موتانت‌های knock-down حامل ژن‌های مرتبط با کلسیم در *M. oryzae* شناسایی کرده و از این موتانت‌ها برای مطالعه نواقص فنوتیپی استفاده کردند (Waterhouse *et al.*, 1998). مزیت روش Knock-down کردن ژن‌ها این است که به اطلاعات نسبتاً کمی از توالی ژن‌ها نیاز دارد. این یک مزیت مهم برای بیمارگرهای گیاهی است که اطلاعات کمی از توالی ژنوم آنها در اختیار است. از آنجایی که RNAi در سطح mRNA مؤثر واقع می‌شود، در نتیجه راندمان آن به‌وسیله حضور نوکلئوتیدهای ترانسفورمه شده یا ژن‌های multicopy مربوط به آنیوپلوئیدی به خطر نمی‌افتد. RNAi باعث کاهش اندکی در بیان

ژن‌ها می گردد. جلوگیری از ژن‌ها به‌صورت جزئی به‌عنوان یک نقص جزئی مطرح شده است (Michielse *et al.*, 2004). به هر حال، این‌که بتوان اثر یک ژن ضروری را بر روی فنوتیپ همان ژن بررسی نمود، یک مزیت بزرگ محسوب می‌شود. knock-down کردن ژن در ترکیب با پروموتوری که بیان ژن را در مراحل خاصی از توسعه کم کند، به یک روش بسیار کارآمد و در عین حال کم نظیر تبدیل می‌شود. یکی دیگر از مضرات knock-down این است که نظر به کوتاه بودن توالی مورد نیاز ممکن است ژن‌های غیرهدف را خاموش کند و لذا نسبتاً غیراختصاصی است. آزمون برای امکان اثرات خاموش کردن ژن هدف برای گونه‌های بیمارگر گیاهی که توالی کل ژنوم آنها موجود است، ساده‌تر است؛ اما برای آنهایی که توالی آن مشخص نیست، مشکل‌تر است.

موتاژن‌های وارداتی *Insertional Mutagenesis*

موتاسیون‌زایی عبارتست از وارد کردن یک باز و یا تعداد بیشتر در DNA که باعث جهش در آن می‌شود. این پدیده ممکن است به‌صورت طبیعی رخ دهد، که در آن صورت با کمک ویروس‌ها و ترانسپوزون‌ها اتفاق می‌افتد و یا به‌صورت مصنوعی در آزمایشگاه به‌وقوع می‌پیوندد. این تکنیک نیز برای مطالعهٔ عمل ژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. یک ترانسپوزون مانند P-element در *Drosophilla Melanogaster* می‌تواند به جاهای مختلف در طول ژنوم موجود مورد مطالعه بچسبد. موتانت‌هایی که با این روش تولید می‌شوند از طریق فنوتیپ غیر معمولشان شناسایی می‌شوند. در صورت مشاهده چنین فنوتیپی، این‌طور فرض می‌شود که وارد شدن ترانسپوزون به آن ژنی بوده است که مسئول به وجود آوردن فنوتیپ مذکور است و از آنجایی که توالی ترانسپوزون‌ها شناخته شده است، این ژن را می‌توان شناسایی نموده و سپس با توالی‌یابی کل ژنوم و جستجوی توالی مورد نظر و همچنین با استفاده از PCR می‌توان قطعه مورد نظر را تکثیر نمود. موتاژن‌های وارداتی (Insertional Mutagenesis) یک ابزار بسیار قوی برای تشریح مکانیسم‌های مولکولی فرآیندهای ژنتیکی به‌خصوص در بیمارگرهای گیاهی هستند. مهمترین فایده این روش این است که نیازی به اطلاعات قبلی از ژنوم ندارد. بنابراین، می‌توان این روش را برای بیمارگرهای گیاهی با توالی ژنوم ناشناخته به‌کار برد. تکنولوژی تعیین توالی به‌صورت سنتی با استفاده از موتاژن‌هایی که با مواد شیمیایی و همین‌طور اشعه مافوق بنفش به‌دست می‌آمدند، اطلاعات زیادی را در مورد توسعه بیمارگر و همین‌طور بیماری‌زایی آن‌ها فراهم نمی‌کرد. این موتاژن‌ها (جهش‌زاها) به‌صورت عادی باعث حذف و یا جانشینی در نوکلئوتیدها می‌شوند که این عمل می‌تواند باعث فقدان کارایی یا تغییر در عمل ژن شود و اختصاصی نبودن این روش‌ها باعث ایجاد موتاسیون‌های متعدد در ژنوم می‌گردد (Balhadere *et al*., 1999).

در روش موتاژن‌های واردانی می‌توان آنالیزهای بیشتر ژنتیکی بر روی استرین‌های موتانت انجام داد؛ در این روش ژن‌های موتانت جداسازی شده با استفاده از کتابخانه ژنومی DNA با استرین‌های طبیعی مقایسه می‌گردد. در این صورت امکان کاربرد جهش‌زاها با استفاده از به هم چسباندن DNAهای ترانسفورمه افزایش می‌یابد. وجود مارکرهای قابل انتخاب در DNA ترانسفورمه می‌تواند برای پیدا کردن رابطه بین وارد کردن یک ژن و فنوتیپ مورد استفاده قرار گرفته و باعث کشف جایگاه حضور DNA و آلل‌های موتانت برای cloning و آنالیزهای بعدی شود. آنالیزهای الگورتیمی برای ژنوم‌های تعیین توالی شده فقط برای تعدادی از ژن‌ها انجام شده است. بر این اساس، چالشی که در این راه وجود دارد، تبدیل اطلاعات بسیار زیاد در مورد ژنوم‌های تعیین توالی شده به اطلاعات بیولوژیکی بسیار ارزشمند بوده و به اطلاعات بسیار زیاد از کتابخانه‌های موتانت نیاز دارد. بنابراین، تکنیک‌های Insertional mutagenesis نظیر ترانسفوماسیون به‌وسیلهٔ (ATMT) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation و چسبانیدن به‌وسیلهٔ آنزیم‌های محدودکننده (REMI) و توسعه داده شد (Bolker *et al*., 1995).

Insertional mutagenesis به‌وسیله ATMT در سال‌های اخیر بنیان‌گذاری شده است. در قارچ‌های رشته‌ای، ترانسفورمیشن با DNA هترولوگ با ژنوم قارچی و وارد کردن یک DNA هترولوگوس به ژنوم قارچی، این امکان را می‌دهد که از transforming DNA به‌عنوان یک ابزار برای Insertional mutagenesis و تخریب ژن استفاده کرده و

سرانجام به مطالعهٔ بیماری‌ها در گیاه کمک می‌کند. *Agrobacterium tumefaciens* یک باکتری بیماری‌زای گیاهی است که باعث ایجاد تومورهایی در گیاهان به‌وسیلهٔ انتقال قسمتی از DNA می‌گردد که T- DNA (Transfer DNA) نامیده می‌شود. این قطعه بر روی پلاسمید tumor inducing واقع شده است و این کار به واسطهٔ سیستم ترشحی نوع چهار انجام می‌گیرد (Balhadere *et al.*, 1999). در درون میزبان، T-DNA هسته سلول میزبان را مورد هدف قرار داده و به‌صورت تصادفی با ژنوم میزبان اختلاط پیدا می‌کند. توصیف کامل از ATMT از دامنه این تحقیق خارج است، و برای توضیح دقیق‌تر در مورد ATMT خوانندگان به مقاله Michielse و همکاران (Michielse *et al.*, 2008) ارجاع داده می‌شوند. ATMT به‌طور گسترده برای transforming و تراریختگی تعداد زیادی از بیمارگرهای گیاهی نظیر *F. circinatu*، *Fusarium spp.*، *C. gloeosporiodes*، *C. langenarium*، *C. trifolii*، *Colletotrichum* spp.، *Botrytis cinerea*، *Mycosphaerella graminicola*، *L. biglobosa*، *L. maculans*، *Leptosphaeria spp.*، *F. oxysporum*، *Ventura inaequalis*، *Pythium ultimum*، *Phytophthora spp.*، *P. palmivora* و *P. infestans* مورد استفاده قرار می‌گیرد. اخیراً، ATMT آزمایشی با روش insertional mutagenesis در مقیاس بزرگ بر روی *M. oryzae* strain KJ201 و برای شناسایی ژن‌های بیماری‌زایی انجام شده است. در این بررسی‌ها تعداد ۲۱۰۷۰ موتانت واجد TDNA به‌دست آمد که در مقابل hygromycin مقاوم بودند. این‌طور تخمین زده شد که بیش از ۸۰ درصد از موتانت‌ها یک تک کپی از T-DNA وارد شده به ژنوم وجود داشته باشد. سپس این موتانت‌ها بر اساس از دست دادن هفت صفت فنوتیپی مورد غربال‌گری قرار گرفتند، این صفات شامل رشد قارچ، رنگدانه‌سازی، کنیدی‌زایی، مورفولوژی کنیدیوم، جوانه‌زنی کنیدیایی، تشکیل آپروسوریوم و بیماری‌زایی. ATMT چندین مزیت نسبت به روش‌های قدیمی دارد، نظیر ترانسفورمیشن CaCl2/PEG-mediated، ترانسفورمیشن به‌واسطهٔ استات لیتیم، بمباران ذرات و الکتروپروتئین. مزیت اصلی روش ATMT بر دیگر روش‌های ترانسفورمیشن سنتی، تنوع آن در انتخاب نوع موجود زنده برای شروع عمل ترانسفورماسیون است. سلول‌های سالم، نظیر کنیدیوم و میسلیوم، می‌توانند به‌عنوان موجودات مختلف مورد بررسی قرار گیرند. در نتیجه حذف کردن دیواره باعث تولید protoplasts می‌گردد. ATMT نسبت به روش‌هایی که در بالا ذکر شد، دارای کارایی بیشتر است. T-DNA یک وسیلهٔ کارآمد برای نوترکیبی همولوگ است، که باعث تکرار بالای knock-out ژن می‌گردد. مزیت کلیدی دیگر آن تولید درصد بالایی از ترانسفورمانت‌ها با یک نسخه از DNA وارد شده در ژنوم است که باعث تسهیل در جداسازی ژن‌های چسبیده (tagged genes) به هم می‌گردد. این مزیت در روش ATMT آن را به‌عنوان ابزاری قوی برای بررسی موتاسیون‌های سیستماتیک به‌صورت جهانی در بیمارگرهای گیاهی تبدیل کرده است، که این کار به‌وسیله targeted or insertional mutagenesis انجام می‌گیرد. ATMT برای ایجاد استرین‌ها با تولید میزان زیادی پروتئین به‌خاطر تک نسخه‌های زیاد از T-DNA integration کارایی کمتری دارد؛ در حالی‌که ژن‌های چند نسخه برای سطوح بیانی بیشتر مورد نیاز هستند. REMI روشی دیگری برای insertional mutagenesis است، این روش می‌تواند برای تولید موتاسیون‌های targeted insertional و تصادفی در بیمارگرهای بیماری‌زای گیاهی مورد استفاده قرار بگیرد. در REMI mutagenesis، پلاسمید DNA وارد پروتوپلاست قارچی می‌گردد و در حضور آنزیم‌های محدودکننده باعث خطی شدن ناقل‌ها می‌گردد. آنزیم‌های محدودکننده هسته سلول را هدف قرار می‌دهند و شکستن دو رشته‌ای در ژنوم را القا می‌کنند. که این کار از طریق نوترکیبی انتهای این شکستگی‌ها به‌وسیله پلاسمید خطی انجام می‌گیرد و تکنیک REMI اولین بار برای مخمر *S. cerevisiae* استفاده شد (Khang *et al*., 2005).

اگرچه REMI یک ابزار کارآمد برای ضمیمه شدن و ژن‌های بیماری‌زایی برای cloning در بیمارگرهای بیماری‌زای گیاهی است، به نظر می‌رسد که مقدار زیادی از موتانت‌های تولیدی (۲۰ تا ۱۰۰درصد) به‌وسیلهٔ DNA جهش یافته به هم نچسبیده‌اند. علی‌رغم آن، REMI در ۱۵ سال گذشته به‌عنوان یک ابزار ژنتیکی قدرتمند عمل نموده و برای جهش دادن در ژن‌های پیوسته در چندین بیمارگر گیاهی مورد استفاده قرار داده شده است. بیمارگرهایی شامل

(*C. lindemuthianum and C. Colletotrichum spp.* ،*U. maydis* ،*M. oryzae* ،*Cochliobolus heterostrophus* *graminicola*) و *Pyrenophora teres* (Rho *et al*., 2001).

مهم‌ترین مزیت این تکنیک این است که ورود تک نسخه‌ها ممکن است سطوح بالاتری از معنی‌داری را ارائه نماید. به‌هر حال، REMI محدودیت‌هایی دارد. این روش نیاز به آماده‌سازی پروتوپلاست قارچی دارد که روشی زمان‌بر و دشوار است. قدرت و قابلیت پروتوپلاست‌ها بستگی به آنزیم‌های تجزیه‌کننده مورد استفاده برای هضم دیواره سلولی داشته و این توانایی را دارد که برای بیمارگرهای گیاهی مختلف به‌کار رود. REMI تنوع قابل ملاحظه‌ای از integrationهای مختلف ایجاد می‌کند مانند واردسازی با سایت‌های برشی و پاک‌کننده، nonhomologous integration در غیاب جایگاه‌های برشی مناسب، insertionهای پشت سر هم، وارونگی یا پاک شدن ژنوم بزرگ (Eckerta *et al*., 2005).

Tilling (ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم)

تعیین توالی ژنوم پنج Oomycete شامل *Phytophthora sojae* ،*P. ramorum* ،*P. infestans* و *P. capsici* و *Hyaloperonospora parasitica* به پایان رسیده است. پروژهٔ بعدی در حال انجام، استفاده از اطلاعات این توالی‌ها در تعیین عملکردهای زیستی است. یک استراتژی جدید برای ژنتیک معکوس برای گیاهان به‌عنوان ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم که کارایی ethyl methanesulfonate (EMS) القا می‌کند و مواد موتاسیون‌زا (موتاسیون‌زا شیمیایی) با توانایی برای دناتوره کردن کروماتوگرافی مایع با performance بالا (DHPLC) برای پاک کردن تغییرات بیس پیر (G/C to A/T transition) برای آنالیزهای heteroduplex را مورد شناسایی قرار گرفته است. Tilling ردیابی تغییرات موضعی القا شده در ژنوم است. این روش به‌صورت غیرتراریخته (Nontransgenic) در زمینه ژنتیک معکوس انجام می‌شود و با کمک یک آنزیم اندونوکلئاز مخصوص موتاسیون‌های نقطه‌ای القا شده در ژنوم را شناسایی می‌کنند. در حقیقت این روش مبتنی بر کاوش ژنوم موجود جهش یافته به منظور شناسایی موتاسیون در ژن خاص جهت شناسایی جایگزینی‌های تک جفت بازی می‌باشد (Tyler *et al*., 2006). TILLING یک تکنولوژی قدرتمند برای به‌کارگیری آنالیزهایی برای شناسایی ارگانیسم‌هایی در یک جمعیت است که موتاسیون‌هایی با تغییر در یک نوکلئوتید را با خود حمل می‌کنند. TILLING می‌تواند روش کارآمدی در ژنتیک معکوس باشد در صورتی‌که برای شناسایی جمعیتی موتاسیون داده شده با استفاده از مواد شیمیایی نظیر ethyl methane sulfonate (EMS) باشد. از آنجایی‌که موتاژن‌ها آرایش متفاوت از آلل‌های موتانت با تکرار بالا در موجودات زنده بدون نیاز به تکنولوژی ترانسژنیک به‌وجود می‌آورند، این روش بسیار کارآمد است و نیاز به جمعیت جهش یافتهٔ کمتری نسبت به دیگر روش‌های ژنتیک معکوس دارد. TILLING برای شناسایی پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیید (SNP's) که به‌صورت طبیعی در ژنوم رخ می‌دهد، استفاده می‌شود (McCallum *et al*., 2000). TILLING یک ابزار قوی برای مطالعات ژنومیک در بیمارگرهای گیاهی است. Lamour و همکاران از روش TILLING برای جداسازی جهش‌ها با ژن‌های اختصاصی در *Phytophthora* spp. استفاده کردند. آن‌ها یک کتابخانه با ۲۴۰۰ موتانت به‌وسیلهٔ ethylnitrosourea (ENU) برای *P. sojae* ایجاد کردند و برای موتاسیون نقطه‌ای القا شده در ژن‌هایی که کدکننده پروتئین‌های نکروز (PsojNIP) و یک phospholipase که اختصاصی برای *Phytophthora* (PsPXTMPLD) غربال کردند. موتانت هموزیگوس که یک موتاسیون missense با پتانسیل آسیب‌رسان در PsojNIP و یک استاپ کدون در PsPXTM-PLD مورد شناسایی قرار گرفت. هیچ نوع تغییرات فنوتیپی در موتانت‌های PsojNIP مورد مشاهده قرار نگرفت. به‌هر حال، موتانت‌های PsPXTM-PLD باعث کاهش رشد قارچ‌ها شدند. اسپورهای تک‌سلولی نظیر زئوسپورهای *Phytophthora* spp. برای موتاژنسیس مطلوبند. این اسپورها به‌وسیلهٔ ENU یا EMS موتانت شده است و سپس در پلیت‌های ۳۸۴ سوراخه به‌صورت منظم قرار گرفتند. یک کتابخانه ژنومیک DNA با استفاده DNA استخراج شده از کلنی‌های موتانت‌های اختصاصی، با استفاده از پرایمرهای فوارد اختصاصی P1 و پرایمرهای reverse P2 با استفاده از PCR تکثیر شدند. محصولات خالص PCR ابتدا

گرما داده می‌شوند و سپس سرد می‌شوند تا heteroduplexes بین تیپ‌های طبیعی (WT) و از موتانت رشته‌های DNA(Δ) شکل بگیرد. این heteroduplexes با آنزیم اندونوکلئاز اختصاصی تک‌رشتهٔ به نام Cel1 بریده می‌شود، که از انتهای ۳ نوکلئوتید تنهای mismatch می‌برد و قطعات DNA جدید تولید می‌کند. این قطعات بر روی ژل پلی‌اکریلامید ران می‌شوند (PAGE). سپس باندها از روی ژل برداشته شده، خالص‌سازی و تعیین توالی می‌شوند تا بتوان موتانتی را که دارای موتاسیون نقطه‌ای را مورد شناسایی قرار داد. موتانت‌های تأیید شده تعیین خصوصیات می‌شوند تا بتوان مدت اثر موتاسیون را در فنوتیپ مشخص کرد (Lindsay *et al*., 1995).

مهمترین مشکل Insertional mutagenesis نرخ نسبتاً پایین جهش است، که باعث ایجاد مشکل در چسباندن ژن‌های اختصاصی می‌گردد. بر خلاف Insertional mutagenesis، مواد شیمیایی موتاسیون‌زا مانند تیمار EMS باعث تکرار موتاسیون بالا بدون برتری آشکار برای مناطق ژنومی اختصاصی می‌گردد. این روش‌ها می‌تواند باعث تولید آلل‌های زیادی گردد که باعث سهولت در کشف فنوتیپ‌های خنثی می‌شود. اگرچه توسعهٔ تکنیک‌های Mutagenesis عاقبت باعث منسوخ شدن TILLING می‌شود، در حال حاضر، این روش به‌عنوان تکنیکی با حداکثر عملکرد برای تجزیه و تحلیل‌های ژنتیکی در بسیاری از پاتوژن‌های گیاهی باقی می‌ماند (Gilchrist and Haughn, 2005).

جمع‌بندی

با توسعه دانش در بانک‌های اطلاعاتی در مورد توالی‌یابی ژنوم بیمارگرهای گیاهی، ابزارهای ژنتیک معکوس از لوکوس تا فنوتیپ یا ژنوتیپ، مانند knock-out، RNAi، ATMT، REMI و TILLING. این‌ها روش‌هایی بسیار جذاب و مناسب برای مشخص ساختن اساس مولکولی اثرات متقابل بیمارگر و گیاه هستند (سازگار و ناسازگار)، توسعه بیمارگرهای گیاهی و ویرولانس و بیماری‌زایی. در دورهٔ post-genomic، gene targeting مانند knock-out به‌وسیلهٔ نوترکیبی homologous یکی از تأثیرگذارترین ابزارهای ژنتیکی برای شناسایی اعمال ژن است. به‌هر حال، تکنیک knock-out کردن ژن در بیمارگرهای گیاهی که نوترکیبی همولوگ پایینی دارند هنوز به‌صورت مبهم باقیمانده است. علاوه بر این، خاصیت چند هسته‌ای بودن قارچ‌های بیماری‌زای گیاهان یکی دیگر از چالش‌هایی است که در تکنیک knock-out و insertional mutagenesis وجود دارد، که به جداسازی transformantsهای هوموکاریوت که از single transformation برای مطالعه موتانت‌های خنثی/ کاربردی مشتق شده‌اند، استناد می‌کند (Weld *et al*., 2006).

RNAi، که باعث منقطع کردن بیان ژن‌ها به‌وسیله هدف قرار دادن mRNA نسبت به بقیه ژن‌ها می‌گردد، ممکن است یک راه حل پیشنهادی برای هر دو مسئله باشد. به‌هر حال، کاربرد RNAi در قارچ‌های رشته‌ای بیمارگر گیاهی در حال توسعه است و هنوز به‌صورت کاربردی برای بیمارگرهای گیاهی به‌کار نمی‌رود. چالش‌های بعدی در RNAi برای توسعه اثرات off-target در بیمارگرهای بیماری‌زای گیاهی مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت و توسعه سیستم RNAi قابل القا با پروموتور دقیق کنترل شونده چفت می‌شود و یک القاگر معمول برای طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی به‌کار می‌رود به‌کار گرفته می‌شود. Gene tagging از ابزار insertional mutagenesis برای ایجاد تکرار بالای transformation استفاده می‌کند و insertion تصادفی را به‌عنوان تک نسخه وارد می‌کند. از این بابت، ATMT یک مزیت آشکار نسبت به REMI دارد به‌خاطر این‌که transformation فراوان را نشان می‌دهد و نیاز به آماده‌سازی پروتوپلاست ندارد. TILLING ابزارهای زیادی را برای ژنتیک معکوس فراهم می‌کند، اما ممکن است با پیشرفت روش‌های دیگر سریع به‌عنوان منسوخ قلمداد گردد. همه ابزارهای ذکر شده در بالا در مورد ژنتیک معکوس مزایا و اشکالاتی دارند، و ممکن است یکی از این روش‌ها برای یک بیمارگر گیاهی و روش دیگر برای بیمارگر دیگر مفید باشد. بنابراین، یک برنامه‌ریزی دقیق برای دسته‌بندی مزیت‌های ژنتیک معکوس برای آنالیزهای کاربردی نیاز است (Nakayashiki *et al*., 2008).

References **منابع**

Abe, A., Elegado, E. B. and Sone, T. 2006. Construction of pDESTR, a GATEWAY vector for gene disruption in filamentous fungi. Current Microbiology 52(3): 210–215.

Balhadere, P. V., Foster, A. J. and Talbot, N. J. 1999. Identification of pathogenicity mutants of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* by insertional mutagenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions 12(2): 129–142.

Barr, D. J. S. 1992. Evolution and kingdoms from the perspective of a mycologist. Mycologia 84: 1–11.

Bohnert, H. U., Fudal, I., Dioh, W., Tharreau, D., Notteghem, J. L. and Lebrun, M. H. 2004. A putative polyketide synthase/peptide synthetase from *Magnaporthe grisea* signals pathogen attack to resistant rice. The Plant Cell 16(9): 2499–2513.

Bolker, M., Bohnert, H. U., Braun, H. K., Gorl, J. and Kahmann, R. 1995. Tagging pathogenicity genes in *Ustilago maydis* by restriction enzyme-mediated integration (REMI). Molecular and General Genetics 248(5): 547–552.

Brachmann, A., Konig, J., Julius, C. and Feldbr, M. 2004. A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Molecular Genetics and Genomics 272(2): 216–226.

Cho, Y., Davis, J., Kim, K. H., Wang, J., Sun, Q. H., Cramer Jr., R. A. and Lawrence, C. B. 2006. A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. Molecular Plant Microbe Interaction 19(1): 7–15.

Choi, W. and Dean, R. A. 1997. The adenylate cyclase gene MAC1 of *Magnaporthe grisea* controls appressorium formation and other aspects of growth and development. The Plant Cell 9(11): 1973-1983.

Eckerta, E., Maguirea, K., Urban, M., Foster, S., Fitt, B., Lucas, J. and Hammond-Kosack, K. 2005. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Leptosphaeria* spp. and *Oculimacula* spp. with the reef coral gene DsRed and the jellyfish gene gfp. FEMS Microbiology Letters 253(1): 67-74.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669): 806–811.

Gilchrist, E. J. and Haughn, G. W. 2005. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. Current Opinion in Plant Biology 8(2): 211–215.

Kadotani, N., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. 2003. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interactions 16(9): 769–776.

Khang, C. H., Park, S. Y., Lee, Y. H. and Kang, S. 2005. A dual selection based, targeted disruption tool for *Magnaporthe grisea* and *Fusarium oxysporum.* Funagl Genetics and Biology 42(6): 483-492.

Lamour, K. H., Finley, L., Hurtado-Gonzales, O., Gobena, D., Tierney, M. and Meijer, H. J. G. 2006. Targeted gene mutation in *Phytophthora* spp.. Molecular Plant-Microbe Interactions 19(12): 1359-1367.

Lindsay, D. S., Lenz, S. D., Cole, R. A., Dubey, J. P. and Blagburn, B. L. 1995. Mouse model for central nervous system *Neospora caninum* infections. Journal of Parasitology 81(2): 313–315.

McCallum, C. M., Comai, L., Greene, E. A. and Heniko, S. 2000. Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. Plant Physiology 123(2): 439–442.

Michielse, C. B., Hooykaas, P. J., van den Hondel, C. A. and Ram, A. F. 2008. *Agrobacterium*-mediated transformation of the filamentous fungus *Aspergillus awamori*. Nature Protocols 3(10): 1671-1678.

Michielse, C. B., Ram, A. F. and van den Hondel, C. A. 2004. The amds gene as a marker for the identification of multicopy T-DNA integration events in *Agrobacterium*-mediated transformation of *Aspergillus awamori*. Current Genetics 45(6): 399–403.

Nakayashiki, H. and Nguyen, Q. B. 2008. RNA interference: roles in fungal biology. Current Opinion in Microbiology 11(6): 1–9.

Nguyen, Q. B., Kadotani, N., Kasahara, S., Tosa, Y., Mayama, S. and Nakayashiki, H. 2008. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA silencing system. Molecular Microbiology 68(6): 1348–1365.

Rho, H. S., Kang, S. and Lee, Y. H. 2001. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. Molecules and Cells 12(3): 407–411.

Soanes, D. M., Richards, T. A. and Talbot, N. J. 2007. Insights from sequencing fungal and oomycete genomes: what can we learn about plant disease and the evolution of pathogenicity? The Plant Cell 19(11): 3318–3326.

Simpson, A. G. B. and Roger, A. J. 2002. Eukaryotic evolution: getting to the root of the problem. Current Biology 12(20): 691–693.

Scherer, S. and Davis, R. W. 1979. Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 76(10): 4951–4955.

Shafran, H., Miyara, I., Eshed, R., Prusky, D. and Sherman, A. 2008. Development of new tools for studying gene function in fungi based on the Gateway system. Fungal Genetics and Biology 45(8): 1147-1154.

Timberlake, W. E. and Marshall, M. A. 1989. Genetic engineering of filamentous fungi. Science 244: 1313-1317.

Tyler, B. M., Tripathy, B., Zhang, X., et al. 2006. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. Science 313: 1261-1266.

Waterhouse, P. M., Graham, M. W. and Wang, M. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(23): 13959-13964.

Wei, Y. D. Shen, W., Dauk, M., Wang, F., Selvaraj, G. and Zou, J. 2004. Targeted gene disruption of glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. The Journal of Biological Chemistry 279(1): 429–435.

Weld, R. J., Plummer, K. M., Carpenter, M. A. and Ridgway, H. J. 2006. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Research 16(1): 31–44.

Wendland, J. 2003. PCR-based methods facilitate targeted gene manipulations and cloning procedures. Current Genetics 44: 115–123.

Whisson, S. C., Avrova, A. O., West, P. V. and Jones, J. T. 2005. A method for double-stranded RNA-mediated transient gene silencing in *Phytophthora infestans*. Molecular Plant Pathology 6(2): 153-163.

Xu, J. R., Staiger, C. J and Hamer, J. H. 1998. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host ceils but allows activation of plant defence responses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 95: 12713–12718.

Review Article
Reverse genetics in plant pathology: methods, benefits and challenges

J. Gholamnejad*

Received: 22 Nov., 2021 Accepted: 22 Feb., 2022

ABSTRACT

With the advent of molecular biology knowledge, the function of many genes was determined to some extent by studying the phenotype of mutated genes (forward genetics) and a hint of the function of the desired gene was obtained. But with the invention of large-scale DNA sequencing, thousands of genes were identified in various organisms without their function being known. Today, by using the knowledge of reverse genetics, which is currently the most efficient method of evaluating the role and function of genes, the function of many sequenced genes has been determined. Nowadays, the sequence of many genes of living organisms is known, but the phenotype of these sequences often remains unknown. Therefore, reverse genetic strategies have attracted the attention of many genetic researchers, although these strategies do not have the same application in all organisms. Reverse genetics is a technique to discover the function of genes that have been sequenced by DNA sequencing technology. In fact, it is a study method in genetics in which the function of genes is done by studying organisms whose function of genes has been changed. In the past, genetic studies were carried out by studying mutant phenotypes, but now with the progress in biological sciences, researchers are able to attribute phenotypic characteristics to a specific gene.

Key words: Reverse genetics, Genomics, Plant pathogen

Associated professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran.

Corresponding author: jalal.gholamnejad@gmail.com