

رهیافت‌ها و چشم‌انداز زیست‌فناوری در باغبانی با بهره‌گیری از علوم OMICS

سید علیرضا سلامی^{۱*}

^۱دانشیار دانشگاه تهران

*نویسنده مسئول: asalami@ut.ac.ir

چکیده

باغبانی با گستره‌ای از محصولات مختلف همچون میوه‌ها، سبزی‌ها و صیفی‌جات، گل‌ها و گیاهان زینتی، گیاهان دارویی و ادویه‌ای نقش بسزایی در تأمین غذا و دارو و سلامت بشر دارد. بیوتکنولوژی در باغبانی ابزارهایی را فراهم می‌آورد که می‌توان مزیت‌های بی‌شماری را به آن محصولات به لحاظ کمی و کیفی بخشید. در این مطالعه هدف بررسی رهیافت‌ها و چشم‌انداز بیوتکنولوژی در حوزه باغبانی و ابزارهای نوینی است که طی سال‌های اخیر در راستای بهبود کمی و کیفی محصولات کشاورزی توسعه یافته‌اند. فرایندهای سلولی در سطوح مختلف ژنوم، ترانسکریپتوم، پروتئوم و متابولوم تنظیم می‌شوند که برآیند آنها در نهایت یک فنوتیپ با ویژگی‌های منحصر به فرد است. هدف نهایی از مطالعات امیکس شناسایی تمام ژن‌های موجود در یک ارگانیسم و مطالعه ساختار، تنظیم بیان و عملکرد محصول نهایی آنها است. رهیافت‌ها و ابزارهای جدیدی برای مطالعه ساختار و عملکرد ژن‌ها و در نهایت بهبود صفات مهم کمی و کیفی در گیاهان باغبانی طی سال‌های اخیر توسعه یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به روش‌های جدید کلون سازی ژن‌ها و حامل‌های جدید، انواع ریز آرایه‌ها، توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، طیف‌سنجی جرمی (MS)، شیوه‌های خاموش‌سازی ژن‌ها مانند VIGS و RNAi و شیوه‌های جدید ویرایش ژن و ژنوم همچون CRISPR-Cas9 اشاره کرد. حجم زیادی از داده‌های زیستی که توسط روش‌های توالی‌یابی پر بازده ایجاد می‌شوند از یک طرف موجب توسعه داده‌پردازی زیستی و بیولوژی محاسباتی شده است و از طرف دیگر خوراک لازم برای ویرایش ژن‌ها و ژنوم‌ها و درک بهتر از عملکرد ژن‌ها و مسیرهای زیستی را فراهم آورده است. روش‌های مختلف مبتنی بر OMICS امروزه پیشبرد برنامه‌های اصلاحی گیاهان باغبانی را بیش از پیش تسهیل کرده‌اند. از جمله این تحولات شگرف انتشار و دسترسی به توالی‌های ژنوم و ترانسکریپتوم بسیاری از محصولات مهم همچون انگور، انار، پسته، سیب، زیتون، رزها، زعفران، شاهدانه، گوجه‌فرنگی و فلفل، ... است که در پایگاه‌های اطلاعاتی ثبت شده‌اند. پروژه‌های CannOMICS و SaffronOMICS بر همین موضوعات در گیاهان استراتژیک شاهدانه و زعفران تمرکز دارد که شامل ایجاد، تجزیه و تحلیل و آرشیو اطلاعات ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، متابولومیکس و فنومیکس این دو گیاه دارویی - صنعتی ارزشمند می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اصلاح، توالی‌یابی، ویرایش ژنوم، پایگاه اطلاعاتی، دست‌ورزی ژنی

مقدمه

گیاهان باغبانی با تأمین انواع میوه‌ها، سبزی‌ها و صیفی، ترکیبات دارویی، ادویه‌ای، نوشابه‌ای، و گل‌ها و گیاهان زینتی نقش حیاتی در زندگی بشر دارند. این محصولات اهمیت بالایی به لحاظ اقتصادی و تأمین غذا و سلامت انسان دارند. به‌علاوه این محصولات با فرهنگ و سبک زندگی مردم عجین هستند. بر اساس اطلاعات سازمان غذا و کشاورزی (FAO) ارزش ضمنی حبوبات مجموعاً ۱۲۵ واحد (ارزش نرمال شده) می‌باشد در حالی که این مقدار برای سبزی‌ها و میوه‌ها ۱۳۷ واحد است (<http://faostat.fao.org>). به دلیل اهمیت بالا، همواره از دیرباز بهبود کمی و کیفیت محصولات باغبانی از مهم‌ترین برنامه‌ها و اهداف محققین و تولیدکنندگان بوده است (Chen et al., 2019). نیاز مبرم به میوه‌ها و سبزی‌ها و گیاهان دارویی همواره با افزایش روزافزون جمعیت رو به افزایش است و نگرانی در تأمین این محصولات همواره یکی از چالش‌های پیشروی بشر بوده است. اگرچه تکنیک‌های اصلاح کلاسیک موفقیت‌هایی را در معرفی ارقام جدید با ویژگی‌های مطلوب در پی داشته است با این حال ظرفیت آن روش‌ها به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه منطبق با نیاز به سبزی‌ها و میوه‌ها نیست. در این میان بهبود ویژگی‌های مطلوب و توسعه ارقام منحصر به فرد باغبانی با ظهور بیوتکنولوژی و تلفیق روش‌ها و ابزارهای نوین سرعت و کارایی بیشتری یافته‌اند به طوری که امروزه انواع روش‌ها و ابزارهای متنوع بیوتکنولوژی برای مطالعه ساختار و عملکرد ژن‌ها و در نهایت بهبود صفات مهم کمی و کیفی در گیاهان باغبانی توسعه یافته‌اند که از آن جمله می‌توان به

روش‌های جدید کشت سلول و بافت، شیوه‌های نوین کلون سازی ژن‌ها مانند GateWay و TOPO، روش‌های دست‌ورزی ژنتیکی و ایجاد گیاهان ترانس ژن و سیس ژن، انواع ریز آرایه‌ها، توالی‌یابی نسل جدید (NGS)، شیوه‌های نوین طیف‌سنجی جرمی (MS)، شیوه‌های خاموش‌سازی ژن‌ها مانند VIGS و RNAi و RNA مداخله‌گر (RNAi) و شیوه‌های جدید ویرایش ژن و ژنوم همچون CRISPR-Cas9 اشاره کرد. این ابزارها از طریق ایجاد وارپته‌های جدید، تأمین مواد گیاهی منحصربه‌فرد، آفت‌کش‌ها و علف‌کش‌های انتخابی مؤثرتر موجب انقلاب بزرگی در برنامه‌های بهبود محصولات باغبانی شده‌اند. سبزی‌ها و میوه‌های دست‌ورزی شده ژنتیکی بسیاری در بازارهای کشورهای توسعه‌یافته عرضه می‌شوند. حوزه‌های اصلی بیوتکنولوژی که می‌توانند در بهبود محصولات باغبانی مورد بهره‌گیری قرار گیرند شامل روش‌های مختلف کشت سلول و بافت، مهندسی ژنتیک، نشانگرهای مولکولی و توسعه میکروب‌های سودمند هستند. در بین تکنولوژی‌های نوین که به کمک باغبانی و اصلاح محصولات مختلف آمده‌اند توالی‌یابی نسل جدید جایگاه ویژه‌ای دارد. درحالی‌که تا مدتی پیش پروژه‌های ژنوم محدود به آراییدوپسیس، برنج و گندم بود، با توسعه تکنولوژی‌های توالی‌یابی و ظهور توالی‌یابی‌های نسل جدید یا اصطلاحاً Next Generation Sequencing (NGS) تعداد بسیار زیادی از ژنوم‌های گیاهان باغبانی در دهه گذشته توالی‌یابی شده‌اند. ژنوم محصولات باغبانی پیچیده و متنوع هستند و اغلب درجات بالایی از هتروزیگوسیتی و پلی‌پلوئیدی در آنها به دلیل سابقه طولانی و پیچیده تکاملی و اهلی سازی دیده می‌شود. به همین دلیل پلت فرم‌های مختلف توالی‌یابی و الگوریتم‌های مختلف برای افزایش کیفیت توالی‌ها و سرهم کردن آنها همواره در حال بهبود بوده است (Chen et al., 2019; Li et al., 2016). کاربرد این روش‌ها منجر به ایجاد حجم زیادی از داده‌های زیستی‌ها شده است که باید ذخیره، پردازش و تجزیه و تحلیل شوند. از طرفی این چالش‌ها موجب توسعه الگوریتم‌های مختلف بیوانفورماتیک و پررنگ‌تر شدن حوزه‌های بیولوژی محاسباتی و کلان‌داده (Mega Data) شده است. انبوه داده‌های تولید شده توسط روش‌های با توان عملیاتی بالا، درک ما را از ساختار و عملکرد ژن‌ها افزایش خواهند داد و ما را به سمت بهبود صفات کمی و کیفی محصولات باغبانی رهنمون می‌کنند. توالی ژنوم و ترانسکریپتوم بسیاری از محصولات باغبانی مهم همچون انگور، انار، پسته، سیب، زیتون، رزها، زعفران، شاهدانه، گوجه‌فرنگی و فلفل، بادمجان و ... به‌واسطه پیشرفت فناوری توالی‌یابی DNA جدید NGS شناخته شده و در دسترس می‌باشد. این توالی‌ها در واقع داده‌های اولیه برای شناخت عملکرد ژن‌ها و در نهایت فنوتیپ یک موجود در یک بستر محیطی هستند. تا ۳۱ دسامبر ۲۰۱۸، ژنوم ۱۸۱ گونه باغبانی شامل ۱۷۵ نهان‌دانه توالی‌یابی شده است که شامل ۴۷ گونه میوه‌ای، ۴۴ گونه دارویی، ۴۴ گونه زینتی، ۴۲ گونه سبزی و صیفی و ۴ گونه نوشابه‌ای می‌باشند (جدول ۱). اگرچه این گونه‌ها بیشتر نهان‌دانه هستند باین‌حال توالی‌یابی گونه‌های غیر نهان‌دانه نیز در سال‌های اخیر سرعت یافته است (Chen et al., 2019). کاربردهای متعددی با استفاده از توالی‌یابی نسل جدید به‌منظور بهبود محصولات باغبانی قابل‌تصور است که از جمله آنها می‌توان به توالی‌یابی De novo ژنوم، توالی‌یابی مجدد ژنوم، مطالعه تنوع ژنتیکی و ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها، اهلی سازی و مطالعه تکامل، مطالعه ترانسکریپتوم و پروفایل بیان، مطالعه RNAهای غیرکد شونده، مطالعه متیلاسیون و فرایندهای اپی ژنتیک، مطالعه برهم‌کنش DNA-Protein و نقشه‌یابی (mapping)، ... در راستای برنامه‌های اصلاحی اشاره کنیم (شکل ۱)، (Ray and Satya, 2014). حجم عظیمی از داده‌های OMICS به‌ویژه داده‌های ژنومی ناشی از پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم محصولات استراتژیک و بومی ایران همچون زعفران، پسته، انار، شاهدانه، گل محمدی، و گیاهان دارویی مهم می‌تواند زمینه‌ای برای ایجاد و استقرار پایگاه اطلاعاتی بومی تحت عنوان National Database باشد که اهمیت استراتژیک بسیار بالایی برای کشور دارد (شکل ۲).

اغلب محققان بر این باورند که طرح کلی حیات در DNA نگاشته شده است و رمزگشایی آن، خصوصاً در ارتباط با کارکرد ژن‌ها، منجر به درک عالم حیات خواهد شد. تا به امروز روش‌های زیادی برای بررسی و شناخت کارکرد ژن‌ها، ابداع شده‌اند. در این میان، دست‌ورزی ژن از طریق نوترکیبی همولوگ بهترین روش تجزیه و تحلیل دقیق کارکرد ژن‌هاست. اما این روش تنها در بعضی موجودات مانند مخمر و موش کارآمد است و در گیاهان کاربرد موفقیت‌آمیز چندانی نداشته است. اگرچه استراتژی‌های دیگری شامل تلفیق تصادفی عناصر DNA خارجی باهدف بیان RNAهای سنجاقت‌سری کوچک (shRNA) و RNAهای بازدارنده کوچک (siRNA)، جهش‌زایی درجی و بهره‌گیری از ترانسپوزون‌ها و همچنین جهش‌زا‌های شیمیایی باهدف شناخت بیشتر از کارکرد ژن معرفی شده‌اند اما این رهیافت‌ها نیز چالش‌های فراوانی دارند که از جمله می‌توان به تصادفی بودن جهش‌ها، جهش‌ها و در نتیجه فنوتیپ‌های ناخواسته و

سخت و زمان بر بودن اشاره کرد. در اینجا تکنولوژی‌های جدید با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی مانند نوکلئازهای انگشت روی (Urnov *et al.*, 2010)، افکتور نوکلئازهای شبه فعال‌ساز رونویسی (Joung and Sander, 2013) و پروتئین Cas مرتبط با توالی‌های پالیندرومی کوتاه فاصله‌دار منظم خوشه‌ای (Mali *et al.*, 2013) منجر به تحول شگرفی در علوم زیستی از جمله کشاورزی و باغبانی شده است. به‌عنوان مثال بهره‌گیری از روش‌های ویرایش ژنی با استفاده از CRISPR/Cas9 در قارچ خوراکی منجر به ازبین‌رفتن چالش‌های ناشی از قهوه‌ای شدن محصول پس از برداشت شده است (Waltz, 2016).

ویرایش ژنوم با استفاده از نوکلئازهای اختصاصی از دیگر فناوری‌های نوظهوری است که به دست‌ورزی دقیق ژن‌ها و ژنوم موجودات مختلف از باکتری تا گیاهان و جانوران کمک می‌کند. جذابیت این موضوع از اینجاست که تقریباً تغییر اختصاصی ژنوم برای موجودات امکان‌پذیر شده است که در چند سال گذشته دور از ذهن بود. تا به امروز، دست‌ورزی‌های ژنتیکی مختلفی در کشت‌های سلولی و موجودات زنده شامل انتقال و خاموشی ژن از طریق ناقل‌های اختصاصی و ویرایش کروموزوم گزارش شده است. سال‌ها بعد از ابداع تکنیک نوکلئازهای انگشتری، معرفی تکنیک TALEN حدود یک دهه پیش امکان دست‌ورزی ژنوم بسیاری از موجودات غیر مدل را فراهم ساخت. ظهور سامانه CRISPR/Cas9 نیز پس از آن به نوبه خود وقوع دوران جدیدی از تحقیقات ویرایش ژنوم را برای ما مقدور ساخت. در مقایسه با سایر زیست‌فناوری‌ها، ویرایش ژنوم به طرز عجیبی با سرعت پیشرفت کرد. در آینده نزدیک، تغییرات پیچیده و دقیق‌تری مانند جایگزینی‌های تک نوکلئوتیدی در مکان‌های ژنی چندگانه قابل حصول خواهد بود و ویرایش کروموزوم در کشت‌های سلولی و موجودات امکان‌پذیر خواهد شد. ویرایش ژنوم برای دست‌ورزی و دستیابی به صفات سودمند در گیاهان زراعی و باغبانی دیگر یک رؤیا نیست و در مدت‌زمان کوتاهی که این ابزارهای ژنتیکی توسعه‌یافته‌اند در محصولات هم‌چون قارچ خوراکی و زعفران مورد استفاده قرار گرفته‌اند.

Clade	Genomes	Clade	Genomes
Basal		Malpighiales	2
Amborelliales	0	Celastrales	0
Nymphaeales	0	Zygophyllales	0
Austrobaileyales	0	Geraniales	0
Monocots		Myrtales	1
Arecales	2	Crossosomatales	0
Poales	4	Picramniales	0
Commelinales	0	Malvales	6
Zingiberales	4	Brassicales	12
Asparagales	5	Huerteales	0
Liliales	0	Sapindales	10
Dioscoreales	1	Vitales	1
Pandanales	0	Saxifragales	2
Petrosaviales	0	Dilleniales	0
Alismatales	3	Berberidopsidales	0
Acorales	0	Santalales	1
Magnoliids		Caryophyllales	7
Magnoliales	1	Cornales	1
Laurales	0	Ericales	8
Piperales	0	Aquifoliales	0
Canellales	0	Asterales	6
Ceratophyllales	0	Escalloniales	0
Chloranthales	0	Bruniales	0
Eudicots		Apiales	3
Ranunculales	4	Dipsacales	0
Proteales	2	Paracryphiales	0
Trochodendrales	0	Solanales	14
Buxales	0	Lamiales	11
Gunnerales	0	Vahliales	0
Fabales	14	Gentianales	4
Rosales	25	Boraginales	0
Fagales	9	Garryales	1
Cucurbitales	11	Metteniusales	0
Oxalidales	0	Icacinales	0
Total Orders = 64, Orders with sequenced genomes = 30			
Total sequenced Angiosperms genomes = 175			

جدول ۱- لیست گونه‌های باغبانی که ژنوم آنها توالی‌یابی شده است (Chen *et al.*, 2019)



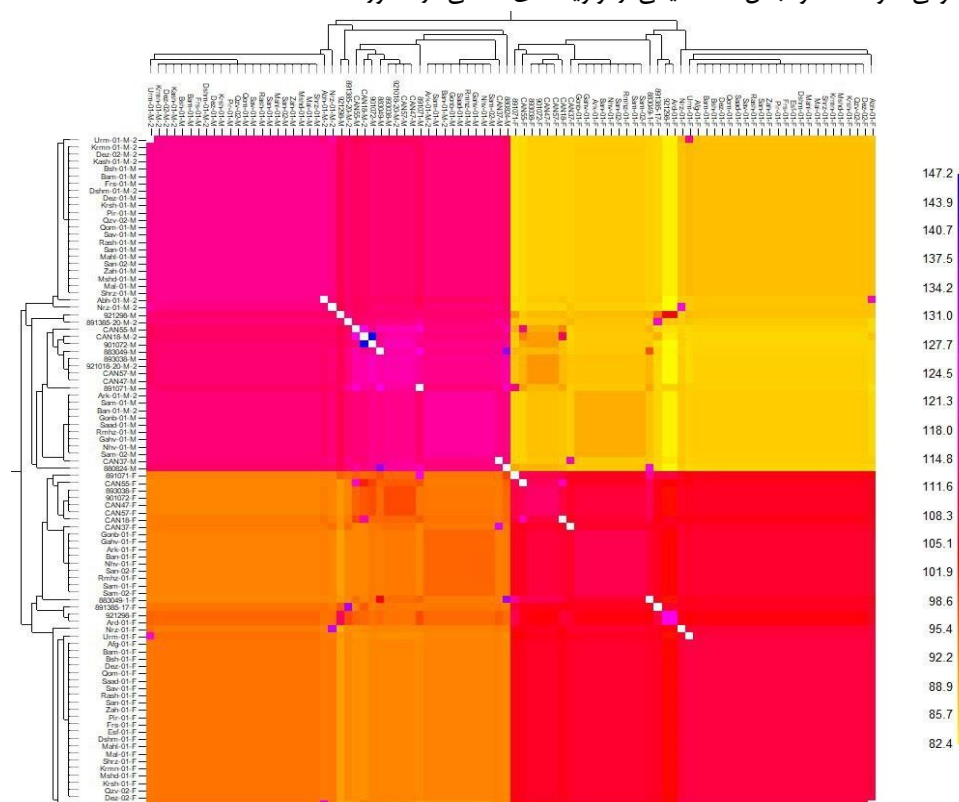
شکل ۱- کاربردهای توالی‌یابی نسل جدید (NGS) در مطالعه و بهبود صفات مهم در گیاهان باغبانی



شکل ۲- پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم پیشنهادی و راه‌اندازی پایگاه اطلاعاتی ملی ژنوم محصولات باغبانی دو پروژه CannOMICS و SaffronOMICS باهدف ایجاد و آرشیو داده‌های omics، و تجزیه و تحلیل اطلاعات ژنومیکس، ترانسکریپتومیکس، متابولومیکس و فنومیکس دو گیاه ارزشمند دارویی - صنعتی شاهدانه و زعفران از سال ۱۳۹۱ در دست اجرا است.

با استفاده از شیوه‌های کلاسیک و نوین از جمله نشانگرهای مولکولی ISSRs و SSRs و GBS در کنار سایر اطلاعات مورفولوژیک، مولکولی و فیتوشیمیایی جمعیت‌های مختلف شاهدانه و زعفران شامل توده‌های بومی و محلی و وحشی که از سراسر ایران جمع‌آوری شده‌اند مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته‌اند و اطلاعات حاصل در پایگاه‌های اختصاصی تحت عنوان www.medcannabase.org و www.saffronOMICS.com آرشیو شده‌اند (Soorni *et al.*, 2017; Vahedi *et al.*, 2018, Salami *et al.*, 2020) (شکل ۳). نتایج تحقیقات مختلف در این دو گونه بیانگر وجود ژرم پلاسم غنی سازگار شده با مناطق جغرافیایی مختلف ایران بود که ضمن ضرورت حفاظت از آن ژرم پلاسم در محل ضرورت نگهداری آنها را در یک کلکسیون جامع فراهم می‌آورد. موضوعی که هم‌راستا با تحقیقات مختلف اصلاحی روی شاهدانه و زعفران محقق شده و کلکسیون جامعی از این دو گیاه شامل چند صد اکشن مختلف با ویژگی‌های منحصر به فرد در دسترس می‌باشد. همچنین دستورالعمل‌های تکثیر و نگهداری درون شیشه‌ای از طریق اندام‌زایی (Organogenesis) و جنین‌زایی (Embryogenesis) در این دو گیاه بهینه شده است که به حفاظت بهتر اکشن‌ها و همچنین پیشبرد اهداف مهندسی ژنتیک و دست‌ورزی‌های ژنتیکی در این دو گیاه کمک می‌کند. توالی‌یابی ژنوم کلروپلاستی گونه‌های وحشی زعفران‌های اندمیک ایران و توالی‌یابی مجدد ژنوم کموتیپ‌های منتخب شاهدانه ایران از دیگر دستاوردهای پروژه‌های فوق‌الذکر می‌باشد.

در جمع‌بندی کلی، حجم زیادی از داده‌های زیستی که توسط روش‌های توالی‌یابی پربازده ایجاد می‌شوند مواد اولیه برای ایجاد پایگاه‌های اطلاعاتی خاص هر محصول و همچنین ویرایش ژن‌ها و ژنوم‌ها و درک بهتر از عملکرد ژن‌ها و مسیرهای زیستی هستند. رهیافت‌های مختلف OMICS این امکان را فراهم آورده‌اند که بتوان دقیق‌تر، عمیق‌تر، سریع‌تر و کارآمدتر برنامه‌های اصلاحی گیاهان باغبانی را پیش برد. اهمیت پروژه‌های توالی‌یابی ژنوم محصولات بومی و ایجاد زیرساخت‌های متناسب با ایجاد توالی، ذخیره و تجمیع توالی‌ها، پردازش توالی‌ها و داده‌ها و تبادل داده‌ها یکی از اولویت‌های اساسی در کشور است.



شکل ۳- نقشه حرارتی مبتنی بر داده‌های GBS و تفکیک جمعیت‌های مختلف شاهدانه بر اساس جنسیت و روابط اجدادی

References

- Chen, F., Song, Y., Li, X. et al. 2019. Genome sequences of horticultural plants: past, present, and future. *Hortic Res* 6, 112.
- Joung JK, Sander JD. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:49–55.
- Li, X. et al. 2016 Improved hybrid de novo genome assembly of domesticated apple (*Malus x domestica*). *Gigascience* 5, 35.
- Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. 2013. RNA guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339:823–826.
- Ray S and Satya P. 2014. Next-generation sequencing technologies for next-generation plant breeding. *Front. Plant Sci.* 5:367.
- Salami, S.A., F. Martinelli, A. Giovino, A. Bachari, N. Arad, N. Mantri. 2020. It Is Our Turn to Get Cannabis High: Put Cannabinoids in Food and Health Baskets. *Molecules* 25, 4036.
- Soorni, A., R. Ftaahi, D. Haak, S.A.Salami, A. Bombarely. 2017. Assesment of genetic diversity and population structure in Iranian Cannabis germplasm. *Nature, Scientific Reports* 7:15668.
- Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC et al. 2010. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 11:636–646.
- Vahedi, M., M. Kabiri, S.A.Salami, H. Rezadoost, M. Mirzaei, M.R.Kanani. 2018. Quantitative HPLC-based metabolomics of some Iranian Saffron (*Crocus sativus* L.) accessions. *Industrial Crops and Products* 118:26-29.
- Waltz E. 2016. Gene-edited CRISPR mushroom escapes US regulation. *Nature* 532:293.

Biotechnology approaches and scope in horticulture using OMICS science

Seyed Alireza Salami^{1*}

¹University of Tehran

**asalami@ut.ac.ir*

Abstract

By providing diverse types of crops such as fruits, vegetables, ornamentals, medicinal herbs, and spices, Horticultural plants play critical roles in supplying foods and medicine for humans. Biotechnology provides tools to improve the quantity and quality of crops. This report aims to introduce approaches, tools, and scope of biotechnology in horticulture, which has been used in recent years to improve horticultural crops. Cellular processes are controlled at various levels, and the consequence of a series of hierarchical processes related to genome, transcriptome, proteome, and metabolome ultimately determines the phenotype of an organism. The ultimate aim of genomics and transcriptomics is to identify the structure and function of all the genes of all organisms. In recent years, new tools and approaches that are available for investigating gene structure and function have been steadily developed, such as new cloning methods and vectors, microarray, high-throughput Next Generation Sequencing, mass spectroscopy (MS), gene silencing using VIGS and RNAi, along with gene and genome editing approaches like CRISPR-Cas9. Huge amounts of data produced by high throughput sequencing approaches led to the development of various bioinformatics algorithms, making computational biology and big data more prominent. On the other hand, the wealth of data generated by high-throughput methodologies will advance our understanding of gene structure and function and biological pathways. Different OMICS approaches facilitate breeding programs. A great revolution has been emerged by publishing genome and transcriptome data of horticultural crops such as grapevine, pomegranate, pistachio, apple, olive, roses, saffron, cannabis, tomato, paper, etc. in databases. CannOMICS and SafronOMICS projects focused on data generation, data analysis and genomics, transcriptomics, metabolomics, and phenomics data archives in cannabis and saffron as two strategic industrial-medicinal plants.

Keywords: Breeding, Sequencing, Genome editing, Database, Gene manipulation