مهندسی برنج C4

حمید بیات[1]، دانشجوی دکتری اصلاح نباتات

چکیده

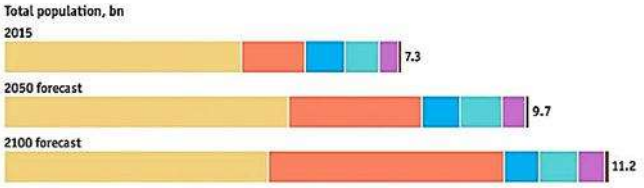
برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان است .در سال ۱۹۶۰ که انقلاب سبز رخ داد شاخص برداشت برنج به شدت افزایش یافت ولی از سال ۱۹۹۰ اصلاح نباتات در تامین نیاز غذایی با چالش‌های زیادی مواجه شده که در کنار تغییرات آب و هوایی و تنش‌های محیطی به لزوم توجه به استراتژی جدید اصلاحی را بیش از پیش ضروری می‌سازد یکی از این روش‌ها تغییر میزان فتوسنتز یا ثبات در میزان آن تحت شرایط جدید است.

برنج C4، برنجی است که بدون مصرف بیشتر نهاده‌های کشاورزی نسبت به برنج C3 حداقل ۵۰ درصد افزایش در عملکرد را دارد. برنج C دارای راندمان بالایی در مصرف آب و نیتروژن بوده به طوری که می تواند در مناطق گرمسیری بدون افت محصول رشد کند. در مهندسی برنج C4 دو جز اساسی مطرح بوده: ۱ مسیر بیوشیمیایی؛ ۲- ساختار آناتومی برگ. هماهنگی بین سلول‌های مزوفیلی و غلاف آوندی در برگ بسیار مهم و حیاتی است.

مقدمه

افزایش جمعیت جهان و رسیدن آن به ۹ میلیارد تا سال ۲۰۵۰، وضعیت تغذیه را نیز در کنار مشکلات دیگر با چالش رو به رو می‌سازد. برنج غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت جهان از جمله آسیا است. تامین غذا و تغذیه مناسب نیازمند حداقل افزایش ۶۰ درصد محصول برنج است. نود درصد از برنج جهان در آسیا رشد و مصرف می‌شود. در حال حاضر هر هکتار از زمین می‌تواند ۲۷ نفر را تامین کند ولی تا سال ۲۰۵۰ به دلیل رشد جمعیت افزایش شهرنشینی هر هکتار باید تغذیه حداقل ۴۳ نفر را تامین کند. با افزایش جمعیت، تقاضا برای مواد غذایی، آب و زمین افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد که با واریته‌های حاضر برنج نمی‌توان نیاز جمعیت را با اصلاح نباتات معمولی تامین کرد. دانشمندان در موسسه بین المللی تحقیقات برنج[2] (IRRI) اشاره داشتند تنها راه افزایش بهره‌وری برنج برای پاسخگویی به نیازهای مواد غذایی درآسیا تغییر ژنتیکی برنج از فتوسنتز C3 به C4 است[۵].

برنج C4، برنجی است که بدون افزودن ورودی اضافه به زمین نسبت به برنج C3 حداقل ۵۰ درصد افزایش در عملکرد را دارد. برنج C4 دارای راندمان بالایی در میزان مصرف آب و نیتروژن بوده و در مناطق گرمسیری بدون افت عملکرد رشد می‌کند [۱۴].



شکل ۱: میزان افزایش جمعیت تا سال ۲۱۰۰ میلادی

۱.گیاهان C۳

بیشترین گیاهان موجود در زمین دارای مکانیسم فتوسنتزی C۳ هستند. فتوسنتز در این گیاهان در سلول‌های مزوفیلی اتفاق می‌افتد. ابتدا CO2 از طریق روزنه‌ها وارد کلروپلاست شده و بلافاصله وارد چرخه کالوین می‌شود. در اولین مرحله از چرخه کالوین، Co2 با یک گیرنده ۵ کربنه به نام ریبولوز ۱، ۵ بیس فسفات[3] (روبیسکو) ترکیب شده و تولید ۲ ملکول ۳- فسفو گلیسرات می‌کند. اما نکته مهم این است که برای تولید و خروج یک قند ۳ کربنه از چرخه لازم است ۳ ملکول CO2 با ۳ مولکول ریبولوز ۱-۵ بیس فسفات (RuBP) ترکیب شود که در این صورت ۶ملکول ۳- فسفوگلیسرات ایجاد می‌شود و این ۶ملکول در فرایند دیگری به ۶ ملکول گلیسر آلدئید ۳- فسفات تبدیل می‌شوند حال یک مولکول گلیسرالدئید ۳- فسفات می‌تواند از چرخه خارج شده و ۵ ملکول باقی مانده مجددا چرخه را

1. Bayat.h@ut.ac.ir

2. International Rice Research Institute

3. Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase

ادامه داده و مجددا تبدیل به ۳ ملکول RuBP شوند. آنزیم کاتالیز کننده اولین مرحله از این چرخه، روبیسکو نام دارد که در استرومای کلروپلاست واقع است [۱].

۲. گیاهان C4

این گیاهان حدود سه درصد کل گیاهان را شامل می‌شوند. در این گیاهان به جای ترکیب ۳ کربنی PGA در مراحل اولیه واکنش‌های تاریکی ترکیب ۴ کربنی به نام اگزالواستات را ایجاد می‌کنند. اگزالواستات هنگامی ایجاد می‌شود که ترکیب PEP و CO2 با کمک یک آنزیم به نام فسفو انول پیروات کربوکسیلاز (PEPC) در سلول مزوفیل ترکیب می‌شود. این اسیدهای ۴ کربنی که جایگزین برای PGA نیستند به سلول‌های غلاف آوندی، اطراف دستجات آوندی (رگبرگ‌ها) مهاجرت کرده و در آنجا به اسید پیرووییک و CO2 تبدیل می‌شوند. اسید پیرووییک به سلول‌های مزوفیل بر می‌گردد، CO2 با RuBP در سلول‌های غلاف آوندی ترکیب شده و به PGA و مولکول‌های مرتبط با چرخه کالوین تبدیل می‌شود. [۴]

۳. مزایایی گیاهان C4 نسبت به گیاهان C3

۱- در گیاهان C4 کارایی مصرف آب بیش از گیاهان C3 است. میانگین ماده خشک تولید شده به ازای هر ۱۰۰۰ گرم آب مصرفی، ۳/۲۹ گرم برای C4 و ۱/۵۴ گرم برای C3 می‌باشد.

۲- گیاهان C4 با کارایی بیشتری از CO2 استفاده می‌کنند و در شدت نور ثابت و نسبتا زیاد قادرند نقطه جبران[۱] پایین‌تری نسبت به گیاهان C3 داشته باشند. نقطه جبران پایین نشان دهنده کارایی زیاد فتوسنتز است .

۳- راندمان مصرفی نیتروژن گیاهان C4 بیشتر از گیاهان C3 است[۲].

۴. فرضیه تکامل C4

دو فرضیه متضاد برای تکامل فتوسنتز C4 وجود دارد: فرضیه اول که "افزایش تدریجی" نام دارد که بیان می‌دارد فتوسنتز C4 به صورت تدریجی تکامل یافته است، یعنی گیاهان C4 از C3 به وجود آمده‌اند یعنی ویژگی‌های اختصاصی فتوسنتز C4 را یک به یک دریافت کردند و در نهایت فتوسنتز C4 تشکیل شده است. این فرضیه گونه‌های بینابین C3-C4 را حمایت می‌کند. به عنوان مثال، کاهش فاصله آوندها و افزایش سلول‌های غلاف آوندی اغلب در گونه‌های سازگار با مناطق خشک مشاهده و به ویژه در گونه های C4 دیده شده است[۱۴].

فرضیه متضاد دوم که مستر سوئیچ (master switch) نام دارد. این فرضیه بیان می‌دارد که فتوسنتز C۴ از طریق یک رویداد جهش متداول ایجاد شده است. این فرضیه به سهولت تکامل همگرا فتوسنتز C4 را تایید می‌کند، یعنی فتوسنتز C4 به طور مستقل بیش از ۵۰ بار در ۱۹ خانواده تکامل یافته است[۱۴].

حال برای ایجاد برنج C4 باید براساس یکی از استراتژی‌ها پیش برویم. اگر فرضیه "افزایش تدریجی" مد نظر باشد، ساخت یک برنج C4 نیازمند عناصر ضروری از فتوسنتز C4 که عمدتا مسیرهای متابولیکی C4، دستکاری آناتومی برگ و انتقال متابولیت مورد نیاز برای بهره‌وری بالا از فتوسنتز C4 هستیم.این روش به دلیل دانش کم ما در مورد کنترل ژنتیکی اناتومی کرانز و کلروپلاست های دوشکلی همچنین اطلاعات جزئی در مورد تنظیم متابولیت سلولی و ارتباط متابولیتی بین سلولی محدود شده است [۱۴].

حال اگر فرضیه مستر سوئیچ برای ساخت یک برنج C4 مد نظر باشد، نیازمند شناخت یک کلید اصلی برای فعال کردن یک آبشاری از فعالیت ها هستیم که منتهی به تمایز C4 می شود[۱۴].

شکل ۲: انواع فرضیه تکامل گیاهان C۳ به گیاهان C۴

۵. برنج، گیاهی به عنوان هدف

با توجه به هزینه بسیار زیاد (سالانه ۵ میلیون دلار) که صرف ایجاد برنج C4 می‌شود، ضروری است که بدانیم چرا برنج

۱. وقتی در یک شدت نور ثابت میزان فتوسنتز و تنفس برابر باشد به این نقطه، نقطه جبران گفته می شود و فتوسنتز خالص در این نقطه صفر است.

به‌عنوان گیاه هدف قرار گرفته است [۵]. با توجه به افزایش دمای جهانی نیازمند گیاهانی هستیم که بتواند با شرایط آینده عملکرد خوب و قابل توجهی داشته باشد.

برنج گیاهی است که در مناطق گرمسیری به خوبی رشد می‌کنند و همچنین طبق تحقیقات انجام شده درگیاه برنج تمامی ژن های فتوسنتز C4 در این گیاه وجود دارد ولی به علت بیان کم و نامناسب در گیاه وجو دارد ، پس می‌توان با تغییر در بیان این ژنها در برنج میزان عملکرد را افزایش داد. مکانسیم فتوسنتز C4 بسیار پیچیده است پس برای شروع کار آن نیازمند گیاهی هستیم که تعداد کروموزومی‌های کمی داشته باشد و همچنین به علت هزینه زیاد باید گیاهی راهبردی باشد [۱۵].

۶. مهندسی برنج C4

اگرچه تولید برنج C4 بسیار بلند پروازانه است، ولی تکامل نژادهای فتوسنتز C4 دلیلی برای خوشبینی فراهم میکند. چالش این است که چگونه میتوان این تکامل را در یک بازه زمانی معقول طی کرد. اگرچه ممکن است در نگاه اول یک سیستم ساده به نظر برسد ولی برای انجام این فرایند نیازمند ابتکار و خلاقیت و تجربه و تخصص دانشمندان درگیر در رشته‌های مختلف مانند مهندسی ژنتیک، بیوشیمی، بیوانفورماتیک، زیست شناسی مولکولی، فتوسنتز، سیستم‌های زیست شناسی، فیزیولوژی، اصلاح نباتات، متابولومیک و غیره است[۷، ۹].

برای تبدیل برنج C3 به برنج C4، ویژگی های زیر باید وجود داشته باشد.

الف - یک محفظه برای تمرکز CO2 در اطراف روبیسکو. تمام گیاهان C4 شناخته شده با استفاده از بهره‌وری از سیستم آناتومی کرانز محفظه را ایجاد می‌کنند.

ب - یک سیستم تثبیت CO2 فعال که به اکسیژن حساس نباشد همه C4 شناخته شده از آنزیم PEPC برای تثبیت CO2 و PEP به عنوان پذیرنده CO2 استفاده می‌کنند.

ج- تامین انرژی فتوسنتز، ATP برای بازسازی PEP پذیرنده.

د- استخری از ترکیبات برای جذب CO2 و یک استخر از ترکیبات کربن، انتقال از سلول غلاف آوندی به سلول مزوفیل برای بازسازی PEP.

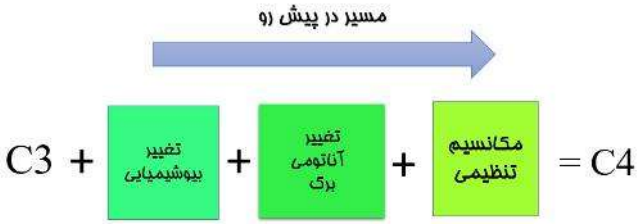
ه- یک مکانسیم برای انتشار CO2 از استخر متابولیت میانی است و سه زیرگروه فتوسنتز C4 استفاده از سه آنزیم دکربوکسیلاسیون مختلف.

خ- یک مکانیسم برای محدود کردن انتشار CO2 از غلاف آوندی به بیرون سلول.

و- ظرفیت بالا برای انتقال از متابولیت‌های بین غلاف آوندی و سلول‌های مزوفیل.

ح- در گیاهان C4، نسبت‌های استوکیومتری سلول های مزوفیل به سلول‌های غلاف آوندی، معمولا یک به یک است[۱۰و ۱۳].

در مهندسی برنج C4 سه جز خیلی مهم موجود دارد: ۱- مسیر بیوشیمیایی؛ ۲- ساختار آناتومی برگ. ۳- مکانسیم تنظیمی. هماهنگی بین سلول‌های مزوفیلی و غلاف آوندی در برگ بسیار مهم و حیاتی است. آنزیم‌ها و ژن‌های دخیل در مسیر C4 مشخص شده‌اند ولی با این حال مکانیسم‌های مولکولی بسیار کمی در کنترل تمایز آناتومی برگ گیاهان شناخته شده است. بنابراین هدف اولیه دستیابی به آنزیم‌های کلیدی در فتوسنتز C4 در برنج بدون وجود آناتومی کرانز است. افزایش کربن به نفع واکنش کربوکسیلاز و در نتیجه افزایش فتوسنتز خالص، در حالی که افزایش اکسیژن باعث ترویج اکسیزناز و منجر به تنفس نوری می شود [۶].



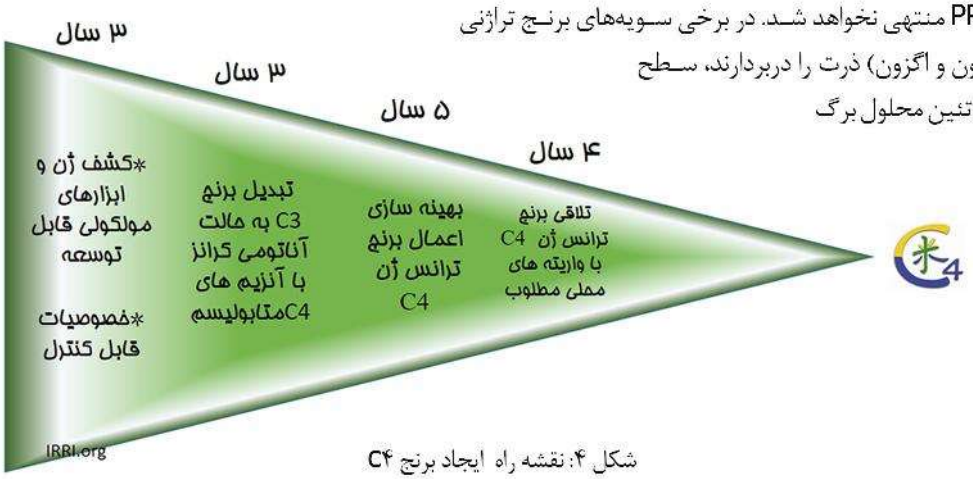
شکل ۳: مسیر در پیش رو برای تبدیل برنج C۳ به برنج C۴

۷.مهندسی ژنتیک

اگرچه سال‌هاست که پژوهشگران بر روی پروژه برنج C4 تحقیق می‌کنند ولی نتوانستهاند به طور کامل به مکانیسم‌های مختلف بیان ژنی و آناتومی دست یابد ولی موفقیت‌های حاصله نشان می دهد که می توان برنج C4 را تولید کرد. با کمک روش‌های مهندسی ژنتیک امروزه مطالعه مکانیسم های بیوشیمیایی سلول امکان پذیر بوده به طوری که گام های مثبتی در تبدیل گیاهان C3 به C4 در حال انجام است.

تولیـد گیاهـان C4 بـه فرایندهـای متعـدد سـلولی نیـاز داشـته بـه طـوری کـه بخش‌هـای مختلـف سـلولی شـامل هسـته، سیتوپلاسـم، غشـا و اندامک‌هـای مختلفـی سـلولی را در بـر می‌گیـرد. بنابرایـن بـه نظـر می‌رسـد بـا چالش‌هـای مختلفـی همـراه باشـد زیـرا کـه دسـتکاری ژن‌هـا ممکـن اسـت باعـث اثـرات سـو بـر روی بخش‌هـای دیگـر سـلولی باشـد کـه امـروزه بـه عنـوان یـک چالش مهم در نظر گرفته می‌شود.

بـه طـور مثـال بـا انتقـال ژن PDK از گیـاه ذرت بـه گیاه برنج. فعالیـت انزیم هـای PEPC و PPDK تا بـه ترتیب ۲۰۰ و ۴۲ برابر نسـبت به سـویه هـای غیرتراژنـی افزایـش یافتـه اسـت. بیـان وسـیع آنزیم‌هـای C4 بـه تنهـای از فعالیـت بیـان وسـیع ژن ذرت حاصـل نمی‌شـود، از آن جایـی کـه ورود PPDK cDNA ذرت کـه بـه پروموتـور PDK ذرت یـا به پروموتـور Cab[1] برنج ملحـق شـده بـه بیان وسـیع PPDK منتهی نخواهد شـد. در برخی سـویه‌های برنـج تراژنی که ژن کامل(پروموتور PDK، اینترون و اگزون) ذرت را دربردارند، سـطح پروتئین PPDK تا ۴۰درصد کل پروتئین محلول برگ افزایـش می‌یابـد. بیـان وسـیع هر آنزیم C4 اندکی متابولیسم را دچـار تغییـر و تحـول کـرده، امـا راندمـان و خروجی فتوسـنتزی برگ‌هـای برنـج تراژنـی نظـر می‌رسـد کـه نتواند ارتقاء بخشد.



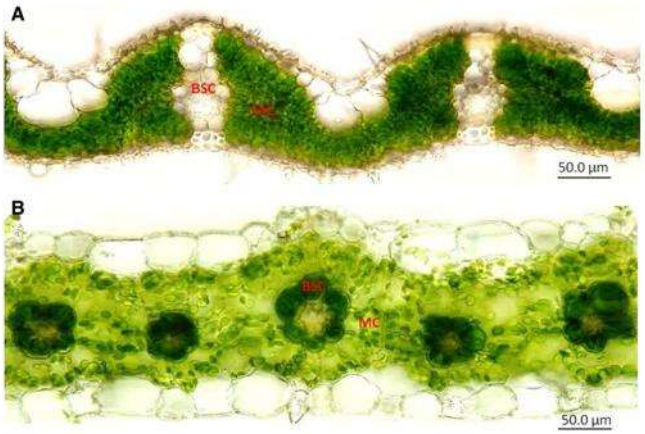
شکل ۴: نقشه راه ایجاد برنج C۴

۸. مهندسی آناتومی برگ C4

اگرچه بیوشـیمی اصلی فتوسـنتز C4 در طی چهل سـال گذشـته شناسایی شده است، بسیاری از دیگر جنبه‌های فتوسنتز C4 بدون توضیح باقـی مانـده اسـت. تحقیقـات نشـان داده‌انـد کـه، تعـداد کمـی از ژن‌هایـی کـه آناتومـی بـرگ C4 را کنتـرل می‌نمایـد شناسـایی شـده اسـت، اگرچـه تغییـرات در آناتومـی بـرگ بـه خوبـی مـورد شناسـایی قـرار گرفتـه و مرتبـط بـا مکانیسـم آناتومـی کرانـز فتوسـنتز C4 اسـت. مشـابه مـوارد ناشـناخته، عوامـل تعییـن کننده ژنتیکی مستلزم شناسایی بیولوژی مکانیسم C4 و ساختار میکروسکوپی کـه شـامل ژن‌هـای کنتـرل کننـده چـوب پنبه ای شـدن سـلول های غـلاف آونـدی، فاصلـه بیـن رگبرگـی و تراکـم رگبرگـی و ایجـاد کلروپلاست دو فرمی و موقعیت درون سلولی آنها می‌شود.

جهـت مهندسـی ایـن تغییـرات C4 سـاختاری بـه برنـج، عوامـل تعییـن کننـده ژنتیکـی بایسـتی کـه مـورد شناسـایی قـرار گیـرد. الگوهـای سیسـتم آونـدی بـرگ در هـر دو گونـه C3 و C4 بسـیار متنوع‌انـد. بـرگ های سیسـتم دو سـلولی C۴تراکم پیشـرفته آونـدی را بـه نمایـش می‌گـذارد، کـه فاصلـه انتشـار اسیدهای C4 از مزوفیل به سلول‌های غلاف آوندی و فاصله انتقال فوتوسـنتاز بـه سیسـتم‌های آونـدی را کاهـش می‌دهـد. پیشـنهاد شـده کـه آوندهـای گونـه هـای C۴ در تعییـن تمایـز بافـت و بیـان ژن ایفـای نقـش می‌کننـد. مقایسـه بیـن تراکـم هـای آونـدی بـرگ هـای C3، حدواسـط هـای C3-C4، و گونـه هـای C4 Flaveria دلالـت بر آن دارد کـه تراکم آوندی مقدم بر تکامل بیوشیمی C4 ظهور یافت [۸و۶].

1. chlorophyll A/B-binding protein



شکل ۵: شکل ۵) تفاوت آناتومی برگ بین گیاهان C۳ و C۴. شکل A اناتومی گیاهان C۳ (برگ برنج)و شکل B آناتومی برگ گیاهان C۴ (برگ ذرت) را نشان می دهد.در گیاهان C۳ حدود ۹۰ درصد برگ را سلول های مزوفیل در بر دارد. ولی در گیاهان C۴ نسبت سلول‌های مزوفیل به غلاف آوندی ۱:۱ است. [۷].

منابع:

۱- تایز، ل، زایگر، الف. ۱۳۸۹. فیزیولوژی گیاهی جلد اول. جهاد دانشگاهی مشهد .

۲- معاونی، پ و چنگیزی، م. ۱۳۸۶. فتوسنتز. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی اراک.

3- Agarie S, Miura A, Sumikura R, Tsukamoto S, Nose A, Arima S, Matsuoka M, Miyao M.2002. Overexpression of C4 PEPC caused O2-insensitive photosynthesis in transgenic rice plants . Plant Science 162 . 257–265

4- Ben P. W, Aubry S and. Hibberd J.2012. Molecular evolution of genes recruited into C4 photosynthesis. Trends in Plant Science, 101-107

5- Rizal G. Thakur V, Wanchana B. Quic W P .2012.Towards a C4 Rice. ASIAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY·112-118

6- Caemmerer, S .2003. C4 photosynthesis in a single C3 cell is theoretically inefficient but may ameliorate internal CO 2 diffusion limitations of C3 Leaves Plant, Cell and Environment. 1191–1197

7- Hibberd J, Sheehy J.E and Langdale j.2008. Using C4 photosynthesis to increase the yield of rice rationale and feasibility. Plant Biology., 228–231

8-Kajala K, Covshoff S, Karki S, Woodfield H,. Tolley B, Jaqueline M ,Reychelle M. Mogul T, Mabilangan A,. Danila F R,. Hibberd J M and. Quick W P . 2011. Strategies for engineering a two-celled C4 photosynthetic pathway into rice. Journal of Experimental Botany. 3001–3010

9-Karki SH, Rizal G and Paul Quick W. 2013. Improvement of photosynthesis in rice (Oryza sativa L.) by inserting the C4 pathway. licensee Springer. 201-210

10- Maureen R. Hanson, Benjamin N. Gray and Beth A. Ahne.. 2013. Chloroplast transformation for engineering of photosynthesis. Experimental Botany. 731–742

11- C4 rice project [https://c4rice.com]

12- Taleuchi, y. akagi, h, kamasawa, n,osumi,m and honda,h. 2000. Aberrant chloroplast in transgenic rice plants expressing a high level of maize NADP-dependent malic enzyme. Planta 211:265-274

13- Tolley B,. Sage T,. Langdale J, and. Hibberd J. 2012. Individual Maize Chromosomes in the C3 Plant Oat Can Increase Bundle Sheath Cell Size and Vein Density . Plant Physiology. 1418–1427

14- Zhu X, Shan L, Wang Y and Paul Quick W. 2010. C4 Rice an Ideal Arena for Systems Biology Research . Plant Biology. 762–770

15- Why c4 rice? [http://c4rice.irri.org/index.php/component/content/article/19-about/55-why-c4-rice]