پژوهش و سازندگی

شماره ۶۴، پاییز ۱۳۸۳

در زراعت و باغبانی

جداسازی، آنالیز مولکولی و ایجاد جهش نقطه‌ای در ژن EPSPS باکتریایی به منظور ایجاد مقاومت به علفکش گلایفوسیت در گیاه کلزا (*Brassica napus* L.)

• **دانیال کهریزی**، دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه تربیت مدرس
• **علی هاتف سلمانیان و امیر موسوی**، اعضاء هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری – تهران
• **افسون افشاری**، دانش‌آموخته دانشگاه خاتم – تهران

تاریخ دریافت: مرداد ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: آذر ماه ۱۳۸۳

چکیده

یکی از مؤثرترین راه‌های ایجاد گیاهان مقاوم به علفکش گلایفوسیت، دستورزی ژن کد کننده آنزیم EPSPS ، به منظور کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت به این آنزیم می‌باشد. در این تحقیق یکی از کلیدی‌ترین نقاط اتصال آنزیم EPSPS که اسید آمینه گلایسین شماره ۹۶ است، مورد توجه قرار گرفت. با ایجاد یک جهش نقطه‌ای به روش طراحی پرایمر ویژه و واکنش PCR، کد ژنتیکی اسید آمینه فوق به اسید آمینه آلانین تبدیل گردید.ژن دستورزی شده، در داخل پلاسمیدهای کلونینگ pUC۱۸ و بیانی گیاهی pBI121 کلون شد. آنالیزهای مولکولی لازم برای اثبات حضور ژن در پلاسمیدها و تعیین جهت مناسب آنها انجام گرفت. پلاسمید pBI121 حامل ژن مورد نظر، از طریق باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA۴۴۰۴ به گیاه کلزا رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ منتقل گردید. ازانتهای بریده شدهٔ دنبالهٔ کوتیلدون، به عنوان بافت هدف جهت انتقال ژن استفاده گردید. برای ارزیابی اولیه تراریختی گیاه از مقاومت گیاهان به کانامایسین استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که درصد باززایی نوساقه و درصد تراریختی گیاهچه به ترتیب ۷۳ و ۳۰ درصد بود. آنالیزهای مولکولی و ارزیابی مقاومت به این علفکش در دست انجام است.

کلمات کلیدی: کلزا (*Brassica napus* L.) ، مقاومت به علفکش، گلایفوسیت، EPSPS دستورزی شده، انتقال ژن

Pajouhesh & Sazandegi No:64 pp: 94-103

Isolation,molecular analysis and site directed mutagenesis in *E. coli* EPSPS gene in order to make glyphosate tolerant rapeseed (*Brassica napus* L.)

By: Danial Kahrizi,Tarbiat Modarres University,Ali Hatef Salmanian, National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology,Afsoon Afshari ,Khatam University, Amir Mousavi National Institute for Genetic Engineering and

Archive of SID

www.SID.ir

Biotechnology, Ahmad Moieni and Ghasem Karimzadeh,Tarbiat Modarres University

The manipulation of bacterial EPSPS gene in order to reduce its affinity to glyphosate, is one of the most effective methods for production of glyphosate tolerant plants. In this research, we study on glycine 96 of *E. coli* EPSPS enzyme. This amino acid is an important residue for EPSPS-Glyphosate binding.We used site directed mutagenesis method to inducing a point mutation in *E. coli* EPSPS gene to convert glycine 96 to alanine. The manipulated EPSPS gene was cloned in pUC18 as an universal cloning and pBI121 as a plant expression vectors. The results of molecular analysis and sequencing showed that the manipulated genes has been changed and cloned in correct orientation in both plasmids. Recombinant pBI121 containing altered EPSPS gene were transferred to rapeseed (*B. napus*), PF-7045-91 cv, via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method. The target tissue for transformation was the cut end of cotyledonary petiols. At the first step the transformed explants were screened in kanamycin containing media. Result showed that plant regeneration and transformation frequency was 73 and 30% respectively.Glyphosate tolerance will be assayed in next generation.

Key words: Rapeseed (*Brassica napus* L.),Herbicide resistance, Glyphosate, Manipulated EPSPS and Gene transformation

مقدمه

کلزا (*Brassica napus*) یکی از دانه‌های روغنی خوراکی و صنعتی با اهمیت در جهان به شمار می‌رود(۲). وجود علف‌های هرز در مزارع کلزا، از مهمترین عوامل تهدید کننده کشت و گسترش آن می‌باشد که باعث کاهش عملکرد و نزول کیفیت روغن حاصله می‌گردد(۹). لذا مبارزه با علف‌های هرز، یکی از مهم‌ترین مراحل داشت این گیاه روغنی است. محور اصلی مبارزه با علف‌های هرز، به کارگیری علفکش‌های شیمیایی می‌باشد(۷). به علت طیف وسیعی از علف‌های هرز که مزارع این گیاه را تهدید می‌کنند؛ به کارگیری علفکش‌های وسیع‌الطیف الزامی است(۸). مشکل اصلی در استفاده از این علفکش‌ها، حساسیت گیاه کلزا به آن می‌باشد. برای حل این مشکل، تولید گیاهان کلزای مقاوم به علفکش‌های وسیع‌الطیفی نظیر گلایفوسیت که غیرانتخابی بوده و اثرات سوء بر روی انسان ، دام و محیط زیست ندارند، از اهمیت به سزایی برخوردار است(۱۱،۱۰). با توجه به اینکه محل اثر این علفکش آنزیم ۵-انول پیرویل شیکیمات- ۳ فسفات سنتاز (EPSPS) می‌باشد؛ برای ایجاد مقاومت به علفکش گلایفوسیت ۴ روش را مطرح می‌نمایند. الف- تکثیر ژن هدف علفکش(۱۴)، ب- ایجاد تغییر در ژن هدف(۵)، ج- به کارگیری آنزیم‌های تخریب کننده علفکش(۳)، د- ترکیبی از روش‌های ذکر شده. اما مؤثرترین راه ایجاد گیاهان مقاوم به علفکش گلایفوسیت، دستورزی ژن کد کننده آنزیم EPSPS ،به منظور کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت با این آنزیم می‌باشد(۴، ۵، ۶). آنزیم EPSPS ، ششمین و تخصصی‌ترین مرحلهٔ مسیر شیکیمات را که مختص باکتریها، قارچها و گیاهان است، کاتالیز می‌کند. این مسیر باعث بیوسنتز اسیدهای آمینه حلقوی و بسیاری از ترکیبات حلقوی دیگر می‌شود (۱، ۱۵). در این تحقیق جداسازی ژن مربوط به آنزیم EPSPS از باکتری (۱۲)K *E. coli*، آنالیز مولکولی آن، ایجاد یک جهش نقطه‌ای در ژن مورد نظر و انتقال این ژن جهش یافته به گیاه کلزا، رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ گزارش می‌شود. انتظار می‌رود که با این جهش، میل ترکیبی گلایفوسیت به آنزیم فوق کاهش یابد و گیاه کلزا به این علفکش مقاومت نشان دهد. مراحل ارزیابی مقاومت گیاه در دست انجام می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و مواد مورد استفاده

بـذور یک رقم کلزای تجاری و بهاره به نـام PF-۷۰۴۵-۹۱ از بخش تحقیقات دانه‌های روغنی مؤسسـه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید و تا زمان استفاده در درجه حرارت ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

سـویه‌های باکتـری *E. coli* مورد اسـتفاده عبارت از سـویه DH5α و k۱۲ بودنـد کـه هر دو از انسـتیتو پاسـتور ایران، تهیه شـدند. باکتری *Agrobacterium tumefaciens* ، سـویهٔ LBA۴۴۰۴ ، از پژوهشـگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه گردید.

در ایـن تحقیق از دو پلاسـمید pUC18 (از شـرکت Fermentas) و PBI۱۲۱ (از شـرکت Novagen) جهت کلون‌سـازی و تهیه ساختارهای انتقال به گیاه، اسـتفاده شـد. آنزیم‌های محدود کننده داخلی (از شـرکت Roche) و آنزیـم لیگاز (از شـرکت Fermentas)تهیه شـدند. برای انجام واکنـش PCR از آنزیمهـای pfu پلی‌مـراز (از شـرکت Fermentas) و Expand high fedility (از شرکت Roche) مورد استفاده قرار گرفتند.

مواد شـیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بیولوژی مولکولی (از شرکت Roche) ، مـواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشـت گیاهـی و باکتریایی و تنظیم کننده‌های رشـد گیاهی BAP (از شـرکت Merck) و IBA (از شرکت ICN) تهیه گردید.

خالص‌سازی DNA ژنومیک

در ایـن تحقیـق از باکتری *E. coli* سـویه k۱۲ جهت جداسـازی ژن EPSPS اسـتفاده شـد. استخراج و خالص‌سـازی DNA ژنومیک باکتری بـه روش اسـتاندارد Chloroform وProteinase K/Phenol انجـام گرفت(۱۳).

طراحی پرایمرها و انجام عمل PCR

برای جداسـازی ژن مورد نظر، از روش PCR و یک جفت پرایمر رفتی (EPS۱) و برگشتی (EPS۲) استفاده گردید که توالی این پرایمرها به شرح ذیل می‌باشد:

EPS۱:۵′-CGGGATCcATGGAATCCCTGACGTTACAA-۳′

EPS۲: ۵′-CGGATCCTCAGGCTGCCTGGC TAATC-۳′

جهت سـهولت در مراحل کلونینگ، در انتهای ۵′ هر دو پرایمر جایگاه برش آنزیم *Bam*HI تعبیه شد. زیر جایگاه‌های مورد نظر خط کشیده شده است.

بـه منظور ایجاد جهش مورد نظر در قطعه بدسـت آمـده (حدود bp ۱۳۰۰)، یعنی برای تغییر کد گلایسـین شـماره ۹۶ به آلانین، پرایمرهای TM۱ (۵′TCCTCGGTAACGCCGCAACGGC-۳′) و TM۲ (۵′-TGCCGTTGCGGCGTTACCGAGGA-۳′)

طراحی گردید. این پرایمرها به جزء در یک نوکلئوتید (تبدیل گوانین شماره ۲۸۷ به سـیتوزین که باعث تغییر کد گلایسین به آلانین می‌شود)، مکمل رشته اصلی می‌باشند. محل انجام تغییر کد، مشخص شده است.

بـا انجام واکنش PCR و با اسـتفاده از پرایمرهـای TM۲ و EPS۱ قطعهٔ حدواسـط اول (با طول تقریبـی bp ۳۰۰)، و با پرایمرهای TM۱ و EPS۲ قطعهٔ حدواسـط دوم (با طول تقریبی bp ۱۰۰۰) به دست می‌آید. جهت تکثیر قطعات حد واسـط از آنزیم pfu پلی‌مراز استفاده شد. با توجه به همپوشـانی مکملی دو قطعه (به طول bp ۲۲ که ناشی از طول پرایمرها اسـت)، با یک واکنـش PCR دیگر، با به کارگیـری روش Overlapping extention قطعهٔ نهایی که ژن EPSPS جهش یافته است، تولید می‌شود. بـه منظور تکثیـر ژن جهش یافته از پرایمرهـای EPS۱ و EPS۲ و آنزیم Expand high fedility استفاده گردید.

کلون سازی در ناقل pUC۱۸ و تأیید آن

قطعـه ژن جهـش یافته و تکثیر یافته، با آنزیم *Bam*HI هضم شـد و در پلاسـمید pUC۱۸ که با همین آنزیم برش داده شده بود، توسط آنزیم T۴ DNA ligase کلون گردید. جهت جلوگیری از خودجوشـی پلاسمید از آنزیم آلکالین فسـفاتاز استفاده شد. پلاسـمیدهای نوترکیب، به باکتری *E. coli* سـویه DH۵α که به روش کلرید کلسیم صلاحیت‌دار[۱] شده بودند، منتقل و باکتری‌های حامل پلاسـمید نوترکیب بر روی محیط مک کانکی حاوی آمپی سیلین، گزینش شدند.

پلاسـمیدهای مورد نظر به روش لیز قلیایی اسـتخراج شـده و جهت اثبات حضور ژن در پلاسمید مورد نظر، از هضم به وسیله آنزیم *Bam*HI و واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی استفاده شد. با هضم توسط HincII ، جهت مناسـب ژن برای مراحل بعدی کلونینگ تأیید گردید. جهت تأیید نهایی ژن جهش یافته، تعیین توالی ژن به روش ختم زنجیره (روش سنگر[۲]) انجام شد.

کلون کردن در ناقل بیانی گیاهی

پلاسمید pUC۱۸ حامل قطعه مورد نظر با جهت مناسب، با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I برش داده شـد. هضم با آنزیم‌های فوق روی پلاسمید بیانی pBI۱۲۱ نیز انجام گرفت که موجب حذف ژن GUS هم می‌شـود. مراحل کلون‌سـازی و انتقـال پلاسـمید به باکتـری *E. coli* صلاحیـت‌دار، طبق روش‌های اسـتاندارد انجام گرفت. حضور پلاسـمید در باکتری توسط رشد کلنی‌ها در محیط حاوی کانامایسـین تأیید شـد. وجود ژن در پلاسمید با خالص‌سـازی و برش توسـط آنزیـم *Bam*HI و PCR قطعه مـورد نظر با پرایمرهای اختصاصی تأیید گردید.

پلاسـمید بیانـی گیاهی pBI۱۲۱ حامـل قطعه مورد نظـر، به روش استاندارد انجماد و ذوب (استفاده از ۲۰mm $CaCl_2$ و ازت مایع) به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA۴۴۰۴ منتقل شد(۱۳).

آماده‌سازی مواد گیاهی و انتقال ژن به گیاه

بذور کلزای رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ به روش ارائه شده توسط Moloney و همکاران (۱۲) ضدعفونی شـده و در شرایط درون شیشه‌ای کشت شدند. برگهای لپه‌ای (کوتیلدونها) از گیاهچه‌های ۵ روزه، پس از حذف مریسـتم انتهایی، جدا شده و روی محیط کشت پیش تیمار (MS + BAP ۵/۴ mg/l مایع، ۳۰g/l ساکارز و g/l ۸ آگار) کشت شدند. پس از ۲ روز نگهداری در اتاق رشـد با شرایط فوق، کوتیلدونهای پیش تیمار شده جهت هم‌کشتی با اگروباکتریوم و دریافت ژن مورد نظر، مورد استفاده قرار گرفتند.

محصـول کشـت شـبانه *A.tumefaciens* نوترکیب، رسـوب (rpm ۱۰،۲۵۰۰ دقیقه) داده شـد. پس از حل مجدد رسـوب در محیط تلقیح (MS مایع و g/l ۳۰ سـاکارز)، دمبرگ کوتیلدونهای پیش‌تیمار شـده، بـه مدت ۴۰ ثانیه در این محیط قرار داده شـدند. سـپس کوتیلدونهای

Archive of SID
www.SID.ir

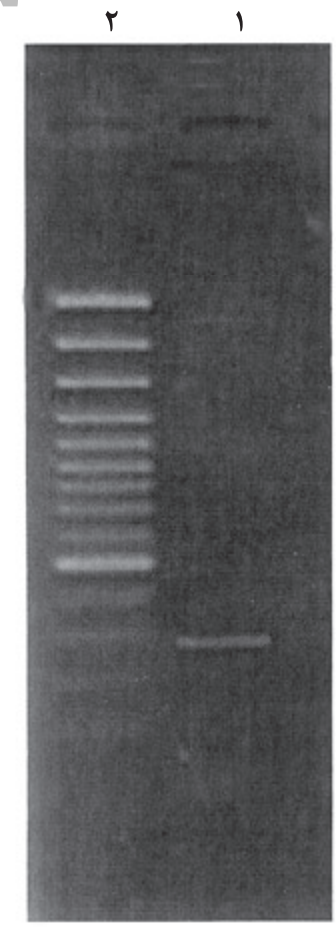
آلوده به اگروباکتریوم، به محیط کشت القاء نوساقه (BAP ۵mg/l g/l ۳۰ ساکارز و g/l ۸آگار) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. کوتیلدونها را از محیط قبلی خارج و به محیط گزینشگر القاء نوساقه (مشابه محیط قبلی به علاوه mg/l ۱۵ کانامایسین و mg/l ۲۰۰ سفوتاکسیم) منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر ۱۰ روز به محیط مشابه واکشت شدند. نوساقه‌های سبز باززایی شده بر روی محیط گزینشگر را جدا نموده و به محیط طویل شدن (همان محیط کشت قبلی بدون تنظیم کننده رشد) منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مریستم فعال، به محیط القاء ریشه (IBA۲mg/l+ Ms، g/l ۲۰ ساکارز و g/l ۸آگار) انتقال داده شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با ارتفاع حدود ۱۰ سانتیمتر، به گلدانهای کوچک با خاک استریل منتقل شدند و برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی (حفظ رطوبت نسبی بالا و کنترل آلودگی) از سرپوشهای شفاف استفاده گردید. پس از سازگاری، سرپوش‌ها حذف گردید و به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند.

نتایج و بحث

تکثیر و خالص سازی ژن EPSPS از ژنوم باکتری *E. coli* سویه k۱۲ ، با استفاده از روش PCR و به کارگیری شرایط بهینه صورت گرفت (نتیجه الکتروفورز ژل نشان داده نشده است). انجام واکنش‌های PCR با پرایمرهای جهش‌زا و ایجاد قطعات حدواسط با طول حدود ۳۰۰ bp و ۱۰۰۰ bp در شکل ۱ (الف و ب) قابل مشاهده است. نتایج این PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ به نمایش درآمده است.

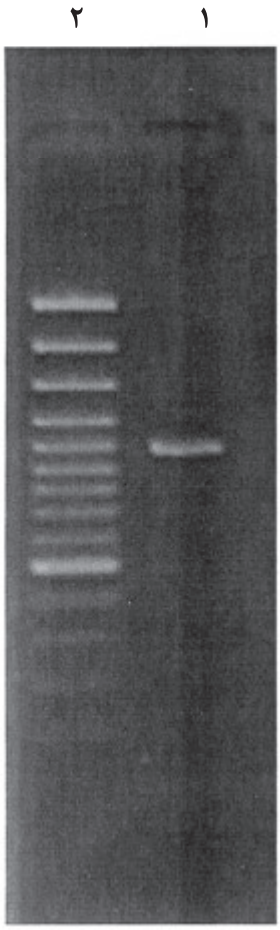
ایجاد قطعه جهش‌دار اول (حدود ۳۰۰ bp) توسط پرایمرهای EPS۱ و TM۲ انجام می‌شود. با توجه به اینکه پرایمر TM۲ در وسط ترادف خود دارای یک باز جهش یافته می‌باشد، پس با رشته اصلی در یک نوکلئوتید مکمل نمی‌باشد. اما به علت قرارگیری این نوکلئوتید در وسط پرایمر طراحی شده، عملاً مشکلی در مراحل تکثیر قطعه جهش‌زا ایجاد نمی‌کند. همین مسئله برای تکثیر قطعه جهش‌دار دوم (با طول حدود ۱۰۰۰ bp) با پرایمرهای EPS۲ و TM۱ وجود دارد.

دو قطعه به دست آمده با توجه به ترادف پرایمرهای TM۱ و TM۲ که



شکل ۱، الف- قطعه ۳۰۰ bp ایجاد شده توسط پرایمرهای EPS۱ و TM۲

خط ۱ : قطعه ۳۰۰ bp خط ۲ : ماکر ۱۰۰ bp



شکل ۱، ب- قطعه ۱۰۰۰ bp ایجاد شده توسط پرایمرهای EPS۲ و TM۱

خط ۱ : قطعه ۱۰۰۰ bp خط ۲ : ماکر ۱۰۰ bp

Archive of SID
www.SID.ir

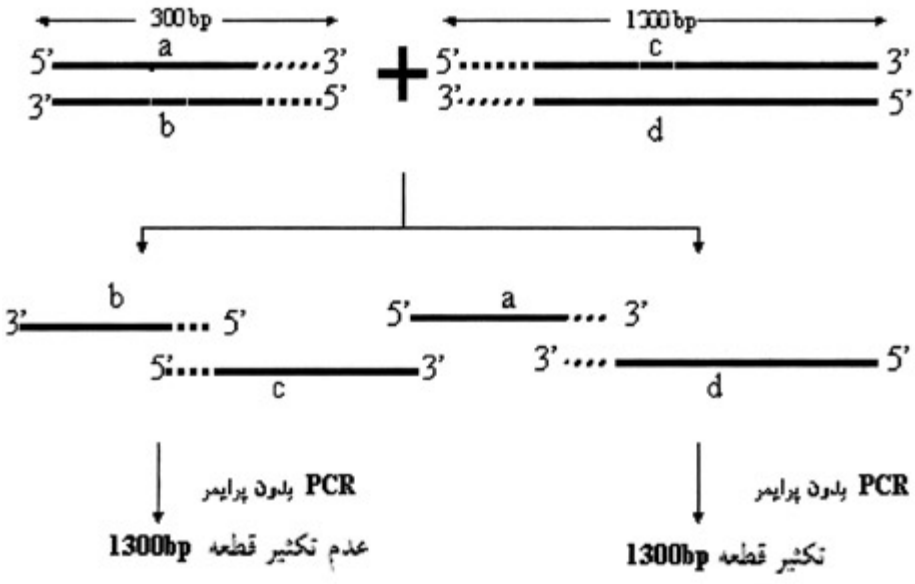
مکمل یکدیگر می‌باشند، دارای منطقه همپوشان به طول ۲۲ bp هستند. قطعات حدواسط به دست آمده با نسبت‌های مساوی از نظر مولاریته وارد واکنش PCR جدید گردیدند. در این صورت احتمال اتصال قطعات به چند حالت وجود دارد. اول اینکه پس از دناتوره شدن دو رشته ۳۰۰bp و ۱۰۰۰bp و هنگام دمای اتصال[۳]، ممکن است هر رشته با رشته مکمل خود به صورت مکمل درآید. در این حالت هیچ تکثیری روی نخواهد داد. احتمال دیگر این است که دو رشته متفاوت در محل‌های همپوشان با یکدیگر به صورت مکمل درآمده و با هم پیوند بخورند. در این حالت تنها اتصالاتی توسط آنزیم پلیمراز قابل تکثیر خواهد شد که مکمل شدن دو رشته منجر به تولید دو انتهای آزاد $3'OH$ گردد(شکل ۲، الف).

با اتصال این دو قطعه و انجام یک واکنش PCR دیگر، دو قطعه جهش‌دار بر اساس توسعه محل‌های همپوشان، به یکدیگر متصل شده و ژن EPSPS(۱۳۰۰bp)جهش یافته ایجاد می‌گردد. نتیجه اتصال و تکثیر این ژن بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داده شده است(شکل ۲، ب).

جهت حفظ قطعه تکثیر شده ژن مورد نظر در پلاسمید pUC۱۸ و در جایگاه *Bam*HI کلون شده و به باکتری(DH۵α) *E. coli* منتقل گردید. برای اثبات وجود پلاسمید در باکتری، از گزینش کلنی‌های بی‌رنگ بر روی محیط کشت مک کانکی آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰ µg/ml) استفاده شد. این روش جایگزین استفاده از IPTG و X-Gal است.

جهت اثبات وجود ژن در پلاسمید pUC۱۸، پس از خالص‌سازی پلاسمید از کلنی‌های انتخاب شده، از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی (EPS۱ و EPS۲) و هضم آنزیمی با آنزیم *Bam*HI انجام شد. نتایج هر دو آزمون در شکل شماره ۳ مشاهده می‌شود. در این شکل باند حاصل از PCR و هضم آنزیمی یکی از کلون‌های مورد نظر به نمایش درآمده است. اندازه یکسان دو باند ایجاد شده قابل توجه است. جهت اطمینان از توالی ژن و ایجاد جهش مورد نظر تعیین توالی ژن صورت گرفت. تعیین توالی ژن توسط شرکت MWG آلمان انجام شد و مشخص گردید که با حفظ توالی ژن، جهش نقطه‌ای مورد نظر در آن ایجاد شده بود.

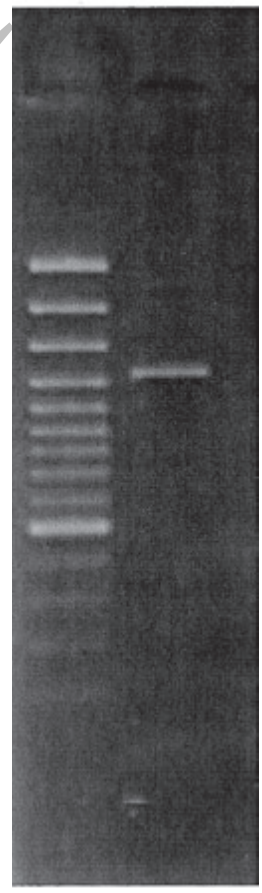
به منظور کلون کردن ژن مورد نظر در ناقلین بیان ژن گیاهی و با توجه به استفاده از یک آنزیم در کلون کردن ژن مورد نظر، لازم بود که جهت ژن در پلاسمید pUC۱۸ تعیین گردد. در این مرحله از ژنهایی که در جهت مستقیم کلون شده باشند، استفاده می‌شود. برای این منظور از هضم آنزیمی استفاده شد. آنزیم مورد استفاده باید فقط یک جایگاه برش بر روی پلاسمید و یک جایگاه برش هم بر روی قطعه مورد نظر داشته باشد. علاوه



شکل ۲، الف- نحوه ایجاد قطعه ۱۳۰۰ bp جهش یافته با استفاده از PCR و توسعه نواحی همپوشان

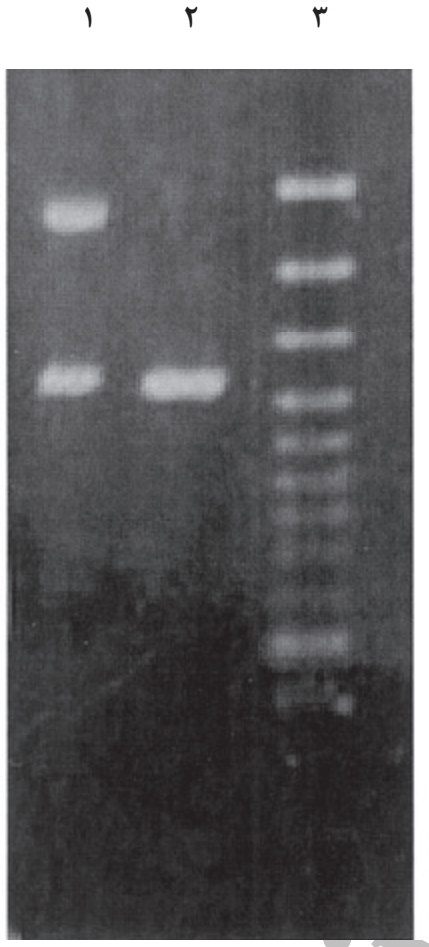
www.SID.ir

بر این، موقعیت محل این آنزیم بر روی ژن باید به گونه‌ای باشد که به یکی از دو سـر ژن نزدیک بوده و هنگام هضم آنزیمی جهت مستقیم و معکوس ژن را نمایان سازد. برای تعیین جهت صحیح ژن در پلاسمید PUC۱۸ ، از هضم آنزیمی بوسیله *Hinc*II و مشاهد وزن باند ایجاد شده استفاده گردید. با توجه به جایگاه این آنزیم بر روی پلاسمید (در MCS قرار دارد)، مشاهده باند حدود ۵۰۰bp نشـانه جهت صحیح ژن برای استفاده‌های بعدی (خط ۲ در شـکل ۴) و مشـاهده باند حدود ۸۰۰ bp نشـانه کلون شدن ژن در جهـت عکس بوده که در این تحقیق کاربردی ندارد (خط ۱ درشـکل ۴). معیار مسقیم و معکوس بودن ژن کلون شده، جهت ژن LacZ در پلاسمید



شکل ۲، ب- قطعه ایجاد شده ژن EPSPS (حدودbp و۱۳۰۰) با اتصال قطعات bp ۳۰۰ و bp ۱۰۰۰

خط ۱ : قطعه bp ۱۳۰۰ خط ۲ : ماکر bp ۱۰۰



شکل ۳- اثبات وجود ژن با PCR و هضم با *Bam*HI

خط ۱ : محصول هضم آنزیمی

خط ۲: محصول PCR با پرایمرهای اختصاصی

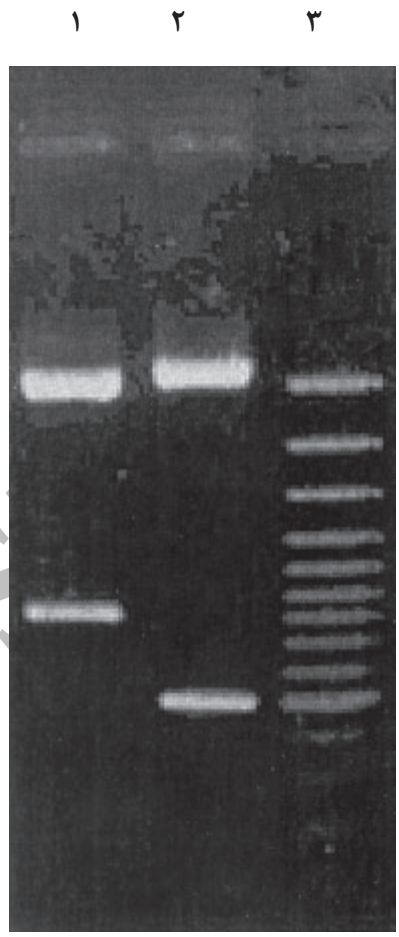
خط ۳ : ماکر bp ۱۰۰

pUC۱۸ در نظر گرفته شـد. در این حالت اگر ژن مورد نظر در جهت ژن LacZ کلون شده باشد، امکان استفاده از دو جایگاه برشی برای آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I که در دو طرف ژن قرار دارند، وجود خواهد داشت. ژن مورد نظر با همین دو آنزیم خارج و در پلاسـمید pBI۱۲۱ که با همین آنزیم‌ها بریده شده بود کلون گردید.

هضم پلاسـمید pBI۱۲۱ توسط دو آنزیم *Xba*I و *Sac*I موجب حذف ژن GUS از ایـن پلاسـمید می‌گـردد. قطعـه ژنی مورد نظر و پلاسـمید pBI۱۲۱ از روی ژل آگارز بازیافـت شـدند و بـرای آنهـا واکنش اتصال و تراریختی به سـلول‌های صلاحیت‌دار شـده انجام گرفت. با توجه به تعبیه جایـگاه آنزیمی *Bam*HI در دو انتهای ژن و جهت اثبات کلونینگ، پس از خالص سازی پلاسمید از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط جامد (حاوی کانامایسـین) از هضم آنزیمی توسـط *Bam*HI و مشـاهده قطعه‌ای حدود

Archive of SID

www.SID.ir

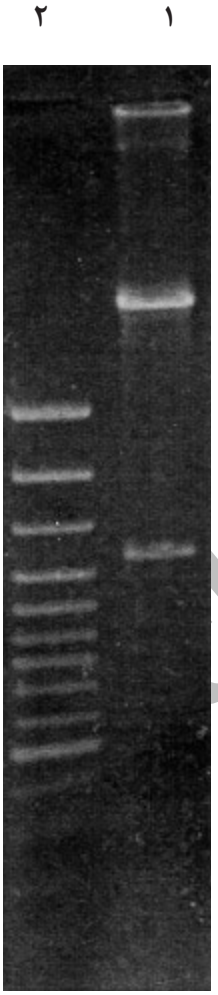


شکل ۴- تعیین جهت ژن در پلاسمید PUC۱۸ به طریق هضم آنزیمی
خط ۱ : ژن کلون شده در جهت عکس (۸۰۰ bp)
خط ۲ : ژن کلون شده در جهت مستقیم (۵۰۰ bp)
خط ۳ : ماکر ۱۰۰ bp

۱۳۰۰bp استفاده شد. نتیجه این کار در شکل شماره ۵ نشان داده شده است.

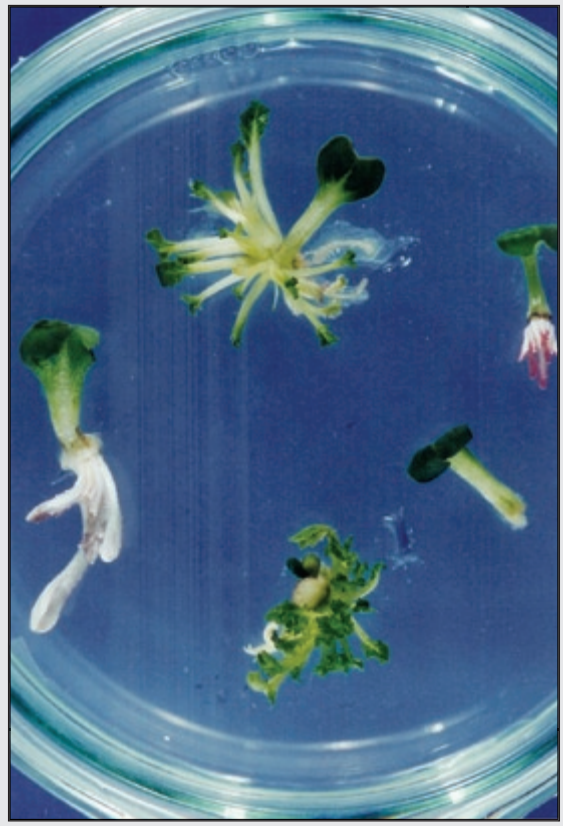
چنانچه قبلاً نیز بیان گردید، برای انتقال ژن به گیاه کلزا از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شد. پس از انتقال ژن به گیاه کلزا و با توجه وجود ژن مقاومت به کانامایسین بر قطعه انتقال یافته، تولید نوساقه در بعضی از کوتیلدونها بر روی محیط کشت گیاهی حاوی کانامایسین و ریفامپیسین مشاهده گردید. نتایج اولیه در شکل شماره ۶ نشان داده شده است. طبق محاسبات انجام شده، نسبت باززایی نوساقه در ریزنمونه‌ها حدود ۷۳ درصد و میزان ریزنمونه‌های باززایی شده تراریخت حدود ۳۰ درصد بود. این نتایج تقریباً با نتایج به دست آمده توسط Moloney و همکاران (۱۲) که از کوتیلدون کلزا به عنوان ریزنمونه استفاده نموده‌اند(۱۲)، یکسان بوده ولی نسبت به نتایج گزارش شده توسط Zhang و همکاران که از هیپوکوتیل استفاده کرده‌اند، افزایش نشان داده است(۱۷). علت پایین‌تر بودن میزان تراریختی نسبت به میزان باززایی این است که درصدی از گیاهچه‌های باززایی شده از سلول‌هایی منشاء گرفته‌اند که ژن مقاومت به کانامایسین را دریافت ننموده‌اند و بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین سفید رنگ می‌شوند. عدم تراریختی گیاه می‌تواند مربوط به توانایی پایین سوش اگروباکتریوم جهت انتقال ساختارهای ژنی، ژنوتیپ گیاه و ... باشد.

می‌توان برای افزایش تراریختی در گیاه کلزا از آزمون‌هایی نظیر استفاده

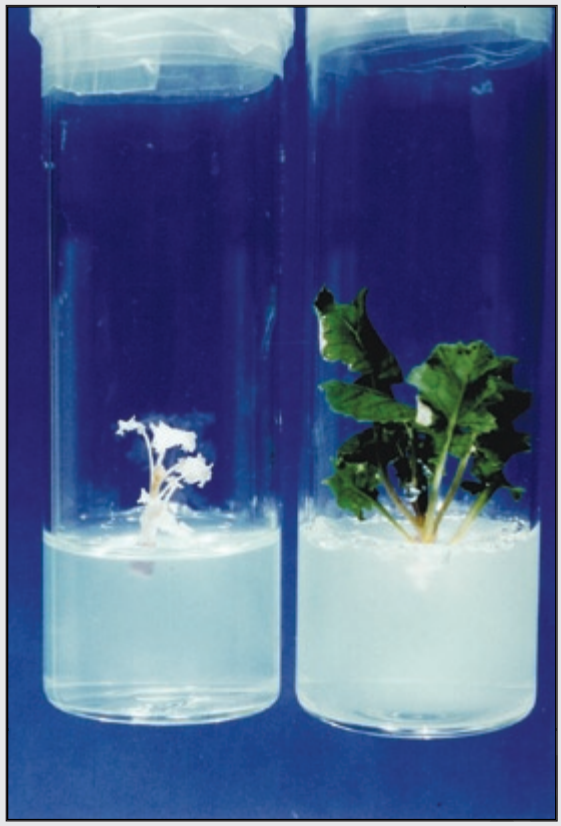


شکل ۵ – تأیید حضور ژن در PBI۱۲۱ با هضم به وسیله BamHI
خط ۱ : محصول هضم خط ۲ : ماکر ۱۰۰ bp

www.SID.ir



شکل ۶- باززایی چندین نوساقه از یک کوتیلدن (۱)، باززایی نوساقه‌های سفید غیر راریخت(۲) و عدم باززایی نوساقه از کوتیلدون (۳) بر روی محیط حاوی کانامایسین



۲ ۱

شکل ۷- مقایسه گیاه تراریخت و غیرتراریخت کلزا بر روی محیط کشت حاوی کانامایسن

از سایر ژنوتیپ‌های کلزا، سایر سویه‌های اگروباکتریوم، افزایش مدت زمان نگهداری انتهای کوتیلدون در محلول اگروباکتریوم و به کارگیری سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی برای باززایی بیشتر و نگهداری گیاهان مادری در شرایط مناسبتر برای تشکیل کوتیلدونهای قوی اشاره کرد.

نکاتی در ارتباط با امکان تولید نوساقه (معمولی و تراریخت) و گزینش نوساقه‌های تراریخت بر روی محیط حاوی کانامایسین وجود دارد که باید به آنها توجه نمود. قبل از اینکه به انتقال ژن به ریزنمونه‌ها پرداخته شود، باید روی گیاهان شاهد (گرفته شده از بذور غیرتراریخت)، عملیات کشت بافت را انجام داد تا میزان تولید نوساقه از ریزنمونه‌ها مشخص شود. طبق گزارش‌های موجود این صفت بسیار وابسته به ژنوتیپ و نوع ریزنمونه است (۱۶). چنانچه ریزنمونه‌ای از ژنوتیپ خاص برای این صفت به میزان مناسب کارایی نداشته باشد، باید از ریزنمونه دیگر و یا از ژنوتیپ دیگری استفاده شود. جهت تولید نوساقه در گیاه کلزا، برخی از محققین کوتیلدون و عده‌ای هیپوکوتیل (محور زیر لپه) را مناسب دانسته‌اند(۱۲،۱۶).

پس از شناسایی مناسب‌ترین ژنوتیپ و ریزنمونه و بهینه‌سازی مراحل کشت بافت لازم است که مقدار مناسب کانامایسین جهت گزینش نوساقه‌های تراریخت مشخص گردد. چون ممکن است گیاه شاهد غلظت مشخصی از کانامایسن را تحمل کند، لذا میزان کانامایسین باید به حدی باشد که گیاهان شاهد و غیرتراریخت را از بین برده و گیاهان تراریخت قابلیت زنده ماندن داشته باشند. در این تحقیق مقدار مناسب کانامایسین برای رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ کلزا mg/l ۱۵مشخص گردید(شکل شماره۷).

علاوه بر آن هنگام انتقال گیاهچه‌ها به خاک باید حداقل تنش به گیاهچه وارد شود. کمترین باقیماندهای آگار می‌تواند منبع آلودگی باشد. حفظ رطوبت، شدت نور کم و درجه حرارت مناسب هم باعث کاهش تلفات می‌شود. در این تحقیق میزان تلفات هنگام انتقال به خاک در حدود ۱۰ درصد مشاهده گردید. مراحل سازگاری تدریجی در

www.SID.ir

شکل ۸- سازگاری تدریجی گیاهچه‌های کلزا به دست آمده جهت کاهش تلفات

شکل شماره ۸ نشان داده شده است.

پاورقی‌ها

1- Competent
2- Sanger method
3- Annealing

منابع مورد استفاده

1-Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. and Steinruken, H.C.1980.,The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Plant Physiology, 65: 830-834.

2-Australia New Zealand Food Authority (ANZFA). 1999.,Guidelines for the safety assessment of foods to be included in Standard A18 – Food Produced Using Gene Technology.

3-Barry, G., Kishore., G., Padgette, S., Taylor, M., Kolacz, K., Weldon, M., Re, D., Eichholtz, D., Fincher, K. and Hallas, L. .1992: In: Biosynthesis and molecular recognition of amino acid in plants. eds. Singh, B.K., Flores, H.E. and Shannon, J.C. American Society of Plant Physiology. Rockville. MD. P. 139-145.

4-Comai, L.D., Facciotti, D., Hiatt, W.R., Thompson, G., Rose, R.E. and Stalker, D.M.1985.,Expression in plants of a mutant aroA gene from *Solmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. Nature, 317: 741-744.

5-Devine, M.D. and Shukla, A.2000.,Altered target sites as a mechanism of herbiside resistance. Crop Protection, 19: 881-889.

6-Fillatti, J.J., Kiser, J., Rose, R. and Cornai, L. 1987., Efficient

www.SID.ir

transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. Bio-Technology, 5: 726-730.

7-Gressel, J. 2000., Molecular biology of weed control. Transgenic Research, 9: 355-382.

8-Holt, J.S., Poweles, S.B and Holtum, A.M.1993., Mechanisms and organic aspects of herbicide resistance. Annual Reveiws of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44: 203-229.

9-Kishore, G. M., S. R. Padgette, and R. T. Fraley.1992.,History of herbicide-tolerant crops, methods of development and current state of the art-emphasis on glyphosate tolerance. Weed Technoogy 6: 626-634.

10-Kuiper, H.A. Kleter, G.A. Noordam, M.Y.2000., Risks of the release of transgenic herbicide-resistant plants with respect to humans, animals, and the environment. Crop Protection 19: 773-778.

11-Kwon, Y.W., Kim, D.S. and Yim, K.O.2001.,Herbicide-resistant genetically-modified crop: assessment and management of gene flow. Weed Biology and Management, 2: 1-17.

12-Moloney, M. M., Walker, J. M. and Sharma, K. K.1989.,High efficiency transformation of *Brassica napus* using agrobacterium vectors. Plant Cell Reports. 8: 238-242.

13-Sambrook, J. and Russel, D. W. 2001., Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. pp 12.1-12.114.

14-Shah, D.M., Horsch, R.B., Klee, H.J., Kishore, G.M., Winten, J.A., Turner, N.E., Hironaka, C.M., Sanders, P.R., Gasser, C.S., Aykent, S.A., Siegel, N.R., Rogers, S.G. and Fraley, R.T. 1986., Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science, 233: 474-481.

15-Steinruken, H.C. and Amrhein, N.1980.,The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase. Biochemestry and Biophysics Research Communication, 94: 1207-1212.

16-Zhang, Y. and Bhalla, P. L.1999., Shoot regeneration potential from seedling explants of Australian cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). New Horizos for an old crop. Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

17-Zhang, Y., Singh, M. B. and Bhalla, P. L.1999.,Genetic transformation of Australian cultivars of oil seed rape (*Brassica napus* L.). New Horizon for an old crop. Proceeding of 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia.

Archive of SID

www.SID.ir