Archive of SID

در
پژوهش و سازندگی
زراعت و باغبانی شماره ۷۹، تابستان ۱۳۸۷

تغییر اسید آمینه آلانین ۱۸۳ به تروئونین در آنزیم ۵–انول پیرویل شیکیمات– ۳ – فسفات سنتاز به منظور ایجاد مقاومت به علفکش گلایفوسیت در گیاه تراریخت کلزا (*Brassica napus* L.)

• دانیال رازی کهریزی
عضو هیأت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه کرمانشاه
• علی هاتف سلمانیان(نویسنده مسئول) و • امیر موسوی
اعضاء هیأت علمی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری ، تهران
• احمد معینی و • قاسم کریم زاده
اعضاء هیأت علمی دانشگاه تربیت مدرس . تهران
تاریخ دریافت: آبان ماه ۱۳۸۳ تاریخ پذیرش: دی ماه ۱۳۸۵
Email:salman@nigeb.ac.ir

چکیده

کلـزا یکی از با اهمیت‌ترین دانه‌های روغنی جهان به شـمار می‌رود. به‌کارگیری روش‌های مهندسـی ژنتیـک در گیاه کلزا باعث تولید ارقامی شـده اسـت که از نظر صفات با ارزش کشـاورزی و اقتصادی حائز اهمیت می‌باشـند. از میان عوامل تهدید کننده کشـت و گسـترش این گیاه، وجود علف‌های هرز و چگونگی کنترل آنها توسـط مواد شـیمیایی می باشـد. از میان علف کشهای مرسوم، گلایفوسیت به عنوان علف کشی عمومی و وسیع‌الطیف که آنزیم EPSPS را مهار می کند، مطرح است. آنزیم EPSPS، یک آنزیم کلیدی در مسـیر بیوسنتز اسـیدهای آمینه حلقوی در میکروارگانیسم‌ها و گیاهان می‌باشد. یکی از مؤثرترین راه‌های ایجاد گیاهان مقاوم به علفکش گلایفوسـیت، دسـت ورزی ژن کد کننده آنزیم ۵-انول پیرویل شـیکیمات- ۳ فسـفات سـنتاز (EPSPS)، بـه منظور کاهش میل ترکیبی گلایفوسـیت به این آنزیم می‌باشـد. در تحقیق حاضر یکـی از مهمترین نقاطی که در تشـکیل مجموعه آنزیم-گلایفوسیت دخالت دارد، یعنی اسـید آمینه آلانین شماره ۱۸۳ در EPSPS باکتری *E. coli* مورد توجه قـرار گرفت. با ایجاد یک جهش نقطه‌ای دقیق به روش طراحی آغازگرهای ویژه و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)، کد ژنتیکی اسـید آمینه فوق به اسـید آمینه تروئونین تبدیل گردید. ژن دست‌ورزی شده، در داخل پلاسمیدهای کلونینگ pUC۱۸ و بیانی گیاهی pBI۱۲۱ همسـانه سـازی شـد. آنالیزهای مولکولی لازم برای اثبات حضور ژن در پلاسـمیدها و تعیین جهت مناسب آنها انجام گرفت. پلاسـمید pBI۱۲۱ حامل ژن مورد نظر، از طریق باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA۴۴۰۴ به گیاه کلزا رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ منتقل گردید. از انتهای بریده شـدهٔ دنبالهٔ کوتیلدون، به عنوان بافت هدف جهت انتقال ژن استفاده گردید. برای ارزیابی اولیه تراریخته بودن گیاه از مقاومت گیاهان دسـت‌ورزی شـده به آنتی بیوتیک کانامایسین استفاده شد. نتایج این تحقیق نشان داد که درصد باززایی نوساقه و درصد تراریخته بودن گیاهچه به ترتیب ۷۴ و ۲۸ درصد بود. با آنالیزهای مولکولی و ارزیابی مقاومت گیاهان نسبت به این علفکش حضور و بیان موثر ژن اثبات گردید.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Pajouhesh & Sazandegi No: 79 pp: 151-159

Substitution of amino acid Ala-183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate 3-phoshpate synthase in order to make tolerance to glyphosate herbicide in transgenic rapeseed plant (*Brassica napus* L.).

By: D. Kahrizi, Razi University, Agronomy and Plant Breeding Department.

A. Hatef Salmanian and A. Mousavi, national Institute for Genetic Engneering and Biotechnology Tehran; A. Moieni and Gh. Karimzadeh, Tarbiat Modares University of Tehran.

Rapeseed (*Brassica napus* L.) is an important oil seed crop in the world. The application of genetic engineering to *B. napus* will lead to the generation of plant varieties possessing more agriculturally and economically viable genetic traits. 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. Glyphosate is a non-selective and broad-spectrum herbicide that inhibits 5-enolpyruvylshikimate 3-phoshpate synthase (EPSPS), a key enzyme in the aromatic amino acid biosynthesis in microorganisms and plants. In this research, we study on alanine183 of *E. coli* (k12) EPSPS enzyme. This amino acid is an important residue for attachment of glyphosate herbicide to EPSPS enzyme. We used site directed mutagenesis method to inducing a point mutation in *E. coli* EPSPS gene to convert alanine 183 to threonine. The manipulated EPSPS gene was cloned in pUC18 as a universal cloning and pBI121 as a plant expression vectors. The results of molecular analyses and sequencing showed that the genes has been changed and cloned in correct orientation in both plasmids. Recombinant pBI121 containing altered EPSPS gene were transferred to rapeseed (*B. napus* L.), PF-7045-91 cv, via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation method. The target tissue for transformation was the cut end of cotyledonery petioles. At the first step the transformed explants were screened in kanamycin containing media. Results showed that plant regeneration and transformation frequency was 74% and 28٪ respectively. Molecular analyses and glyphosate tolerance test, confirm the gene presence and it.s effective function in transgenic plant.

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

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) یکی از منابع عمده برای تولید روغن نباتی و پروتئین و از گیاهان صنعتی با اهمیت در جهان به شمار می‌رود(۲؛ از مهمترین عوامل تهدید کننده کشت و گسترش کلزا، وجود علف‌های هرز در مزارع آن می‌باشد که باعث کاهش عملکرد و نزول کیفیت روغن حاصله می‌گردد (۱۰) بر این اساس مبارزه با علف‌های هرز، یکی از مهم‌ترین اقدامات مرحله داشت این گیاه می‌باشد. امروزه 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؛ به‌کارگیری علفکش‌های عمومی‌الزامی می‌باشد(۸) در زراعت کلزا مشکل اصلی در استفاده از علفکش‌های عمومی، حساسیت گیاه زراعی به آن می‌باشد. برای حل این مشکل، تولید گیاهان کلزای مقاوم به علفکش‌های وسیع‌الطیف نظیر گلایفوسیت (ان فسفونومتیل گلایسین) که غیرانتخابی بوده و اثرات سوء بر روی انسان، دام و محیط‌زیست ندارند، از اهمیت به سزایی برخوردار است(۱۱ ، ۱۲) با توجه به اینکه محل اثر این علفکش آنزیم ۵-انول پیرویل شیکیمات- ۳ فسفات سنتاز (EPSPS) می‌باشد؛ برای ایجاد مقاومت به علفکش گلایفوسیت چهار روش را مطرح می‌نمایند. الف- تکثیر ژن کد کننده آنزیم هدف علفکش (۱۵)، ب- ایجاد تغییر در ژن کد کننده آنزیم هدف(۵، ۱۷)، 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 به 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، ۱۶) در این تحقیق جداسازی ژن مربوط به آنزیم EPSPS از باکتری *E coli* (K۱۲) 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 نسبی نشان دهد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، سویه‌های باکتری، پلاسمیدها و مواد مورد استفاده

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

سویه‌های باکتری *E. coli* مورد استفاده عبارت از سویه DH۵α و k۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

بودند که به ترتیب از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری و انستیتو پاستور ایران، تهیه شدند. باکتری *Agrobacterium tumefaciens*، سویهٔ LBA۴۴۰۴، از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری تهیه گردید. در این تحقیق از دو پلاسمید pUC۱۸ و pBI۱۲۱ جهت همسانه سازی و تهیه ساختارهای انتقال به گیاه، استفاده شد. به منظور دست ورزی‌های ژنتیکی آنزیم‌های محدودگر و آنزیم لیگاز تهیه شدند. برای انجام واکنش PCR آنزیم‌های *Pfu* پلی‌مراز و Expand high fidelity مورد استفاده قرار گرفتند. مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص بیولوژی مولکولی تهیه شد.

خالص سازی DNA ژنومی

در این تحقیق از باکتری *E.coli* سویه k۱۲ جهت جداسازی کروموزم باکتریایی و سپس تکثیر ژن EPSPS استفاده شد. استخراج و خالص‌سازی DNA ژنومیک باکتری به روش استاندارد/ Chloroform + Proteinase K Phenol انجام گرفت(۱۴؛

طراحی آغازگرها و انجام عمل PCR

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

EPS1: 5´-CGGGATCCATGGAATCCCTGACGTTACAA-3´

EPS2: 5´-CGGGATCCTCAGGCTGCCTGGC TAATC-3´

جهت سهولت در مراحل همسانه سازی، در انتهای ۵´ هر دو آغازگر جایگاه برش آنزیم *Bam*HI تعبیه شد. زیر جایگاه‌های مورد نظر خط کشیده شده است.

به منظور ایجاد جهش مورد نظر در قطعه بدست آمده (حدود bp ۱۳۰۰)، یعنی برای تغییر کد آلانین شماره ۱۸۳ به تروئونین، آغازگرهای TM۳ و TM۴ به صورت ذیل طراحی شدند:

TM3: 5´ -GTTATTGACTCGGCCTCTTACCCCGGAAGAT-3´

TM4: 5´ -ATCTTCCGGGGTAAGCGCAGTCATTAAC-3´

این آغازگرها به جز در دو نوکلئوتید (تبدیل کد GCG به ACC که باعث تغییر کد آلانین به تروئونین می‌شود)، مکمل رشته اصلی می‌باشند. محل انجام تغییر اسیدهای نوکلئیک، مشخص شده است. با انجام واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای TM۴ و EPS۱ قطعهٔ حدواسط اول (با طول تقریبی bp ۵۰۰)، و با آغازگرهای TM۳ و EPS۲ قطعهٔ حدواسط دوم (با طول تقریبی bp ۸۰۰) به دست می‌آید. جهت تکثیر قطعات حد واسط از آنزیم *Pfu* پلی‌مراز استفاده شد.

با توجه به همپوشانی مکملی دو قطعه (به طول ۳۱ جفت باز که ناشی از طول آغازگرها است)، با یک واکنش PCR دیگر، با به کارگیری روش توسعه نقاط همپوشان (Overlapping extension) قطعهٔ نهایی که ژن EPSPS جهش یافته است، تولید می‌شود. به منظور تکثیر ژن جهش یافته از آغازگرهای EPS۱ و EPS۲ و آنزیم Expand high fidelity استفاده گردید.

همسانه سازی محصول PCR در ناقل کلونینگ

قطعه ژن جهش یافته و تکثیر شده، با آنزیم *Bam*HI هضم و در پلاسمید pUC۱۸ که با همین آنزیم برش داده شده بود، توسط آنزیم T۴ DNA Ligase همسانه‌سازی گردید. جهت جلوگیری از خودجوشی پلاسمید هضم شده از آنزیم آلکالین فسفاتاز استفاده شد. پلاسمیدهای نوترکیب، به باکتری *E. coli* سویه DH۵α که به روش کلرید کلسیم صلاحیت‌دار[1] شده بودند، منتقل و باکتری‌های حامل پلاسمید نوترکیب بر روی محیط مک کانکی آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، گزینش شدند.

پلاسمیدهای مورد نظر به روش لیز قلیایی استخراج شده و حضور ژن در پلاسمیدهای نوترکیب با هضم به وسیله آنزیم *Bam*HI و واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی EPS۱ و EPS۲ تأیید شد. با هضم توسط آنزیم *Hinc*II، جهت قرارگیری ژن برای مراحل بعدی همسانه سازی تأیید گردید. جهت تأیید نهایی ژن جهش یافته، تعیین توالی ژن به روش ختم زنجیره (روش سنگر[2]) و با استفاده از آغازگرهای استاندارد M۱۳ انجام شد.

همسانه سازی در ناقل بیانی گیاهی

پلاسمید pUC۱۸ حامل قطعه مورد نظر با جهت مناسب، با آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I برش داده شد. هضم با آنزیم‌های فوق روی پلاسمید بیانی pBI۱۲۱ نیز انجام گرفت که موجب حذف ژن *gus* نیز می‌شود. مراحل همسانه سازی و انتقال پلاسمید به باکتری *E. coli* صلاحیت‌دار، طبق روش‌های استاندارد انجام گرفت. حضور پلاسمیدpBI۱۲۱ در باکتری توسط رشد کلنی‌ها در محیط حاوی کانامایسین تأیید شد. وجود ژن در پلاسمید با خالص‌سازی و برش توسط آنزیم*Bam*HI که در دو سرژن تعبیه شده است و PCR قطعه مورد نظر با آغازگرهای اختصاصی تأیید گردید.

پلاسمید بیانی گیاهی pBI۱۲۱ حامل قطعه مورد نظر، به روش استاندارد انجماد و ذوب (استفاده از ۲۰ mm $CaCl_2$ و ازت مایع) به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA۴۴۰۴ منتقل شد(۱۴)

آماده‌سازی مواد گیاهی و انتقال ژن به گیاه

بذور کلزای رقم PF-۷۰۴۵-۹۱ به روش ارائه شده توسط کهریزی و همکاران (۹) ضدعفونی و در شرایط درون شیشه‌ای کشت شدند. برگ‌های لپه‌ای (کوتیلدون‌ها) از گیاهچه‌های ۵ روزه، پس از حذف مریستم انتهایی، جدا شده و روی محیط کشت پیش تیمار (MSحاوی ۴/۵mg/l BAP، ۳۰g/l ساکارز و ۸g/l آگار) کشت شدند. پس از ۲ روز نگهداری در اتاق رشد با شرایط فوق، کوتیلدون‌های پیش تیمار شده جهت هم‌کشتی با اگروباکتریوم و دریافت ژن جهش یافته، مورد استفاده قرار گرفتند.

از کشت شبانه *A.tumefaciens* نوترکیب، رسوب (۱۰ ، ۲۵۰۰rpm دقیقه) تهیه شد. پس از حل مجدد رسوب در محیط تلقیح (MS مایع و ۳۰ g/l ساکارز)، دمبرگ کوتیلدونهای پیش‌تیمار شده، به مدت ۴۰ ثانیه در این محیط قرار داده شدند. سپس کوتیلدون‌های آلوده به اگروباکتریوم، به محیط القاء نوساقه (MSحاوی ۴/۵mg/l BAP، ۳۰g/l ساکارز و ۸g/l آگار) منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.پس از این مدت کوتیلدون‌ها از محیط قبلی خارج و به

www.SID.ir

Archive of SID

محیط گزینشگر القاء نوساقه حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l 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 وتشکیل مریستم فعال، گیاهچه‌ها به محیط القاء ریشه (محیط MSحاوی ۲mg/l IBA، ۲۰g/l ساکارز و ۸g/l آگار) انتقال داده شدند. گیاهچه‌های ریشه‌دار شده با ارتفاع حدود ۱۰ سانتی‌متر، به گلدان‌های کوچک با خاک استریل منتقل شده 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 وگیاهان به شرایط طبیعی خاک منتقل شدند.

اثبات حضور ژن دست ورزی شده در گیاه از طریق PCR و هضم آنزیمی

جهت اثبات حضور ساختارهای انتقال یافته به گیاه (شامل پیشبر S ۳۵، ژن مورد نظر و پایانبر NOS) دو جفت آغازگر طراحی گردید.

۱ - آغازگرهایی که باعث تکثیر بخش‌هایی از ژن و پایانبر NOS می‌شوند (TM۳ و NR):

آغازگر TM۳ از داخل ژن EPSPS به عنوان آغازگر رفتی طراحی شد. این آغازگر تا انتهای ژن حدود ۸۰۰bp را تکثیر می‌کند. آغازگر NR از داخل پایانبر NOS به عنوان آغازگر برگشتی طراحی گردید و تا انتهای پایانبر حدود ۲۳۰bp را تکثیر می‌کند. بنابراین چنانچه از این جفت آغازگر جهت PCR استفاده شود، انتظار می‌رود که اندازه محصول PCR حدود ۱۰۳۰bp شود. هضم این محصول با آنزیم *Bam*HI که جایگاه برش آن در انتهای ژن تعبیه شده است، قطعات ۲۳۰bp و ۸۰۰bp ایجاد می‌کند. توالی TM۳ قبلاً ارایه شده است و توالی آغازگر NR به شرح ذیل می‌باشد:

NR: 5´-CGCGCGATAATTTATCCTAGT-3´

۲ - آغازگرهایی که باعث تکثیر بخش‌هایی از ژن و پیشبر می‌شوند (TM۲ و ۳۵SF):

آغازگر ۳۵SF از داخل پیشبر CaMV به عنوان آغازگر رفتی طراحی گردیدکه تا انتهای پیشبر حدود ۵۰۰bp را تکثیر می‌کند. آغازگر TM۲ از داخل ژن EPSPS به عنوان آغازگر برگشتی طراحی شد که تا ابتدای ژن حدود ۳۰۰bp را تکثیر می‌کند.

بنابراین چنانچه از این جفت آغازگر جهت PCR استفاده شود انتظار داریم که اندازه محصول PCR حدود ۸۰۰bp شود و هضم این محصول با آنزیم *Bam*HI که جایگاه آن در ابتدای ژن تعبیه شده است، قطعات ۳۰۰bp و ۵۰۰bp ایجاد می‌کند. توالی این آغازگرها به شرح ذیل می‌باشد:

TM2: 5´-TGCCGTTGCGGCGTTACCGAGGA-3´

35SF: 5´-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3´

ارزیابی مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته

جهت ارزیابی مقاومت به گلایفوسیت، گیاهان تراریخته با ساختار جهش یافته ژن EPSPS باکتریایی و گیاهان شاهد (غیرتراریخته) با غلظت‌های مختلف گلایفوسیت (۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰میلی‌مولار) دو مرتبه با فاصله زمانی یک هفته محلول پاشی شدند. برای این منظور برای هر سطح غلظت علفکش ۱۵ گیاه تراریخت با گلایفوسیت محلول پاشی شد. این ۱۵ گیاه از طریق تکثیر غیر جنسی (کشت جوانه جانبی) ۳ گیاه تراریخت مستقل تولید شده بودند.

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 تکثیر از نظر غلظت Mg^{2+} و غلظت آغازگرها و الگوی DNA و نیز تعداد چرخه‌های مورد نیاز و غلظت آنزیم پلیمراز صورت گرفت (نتیجه الکتروفورز ارایه نشده است). انجام واکنش‌های PCR با آغازگرهای جهش‌زا و ایجاد قطعات حدواسط با طول حدود ۵۰۰bp و ۸۰۰bp در شکل ۱ (الف و ب) قابل مشاهده است. نتایج این PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵به نمایش درآمده است.

ایجاد قطعه جهش‌دار اول (حدود ۵۰۰bp) توسط آغازگرهای EPS۱ و TM۴ انجام شد. با توجه به اینکه آغازگر TM۴ در وسط ترادف خود دارای دو باز جهش یافته می‌باشد، پس با رشته اصلی در دو نوکلئوتید مکمل نمی‌باشد. اما به علت قرارگیری این نوکلئوتیدها در وسط آغازگر طراحی شده، عملاً مشکلی در مراحل تکثیر قطعه جهش‌زا ایجاد نمی‌کند. همین مسئله برای تکثیر قطعه جهش‌دار دوم (با طول حدود ۸۰۰bp) با آغازگرهای EPS۲ و TM۳ وجود دارد.

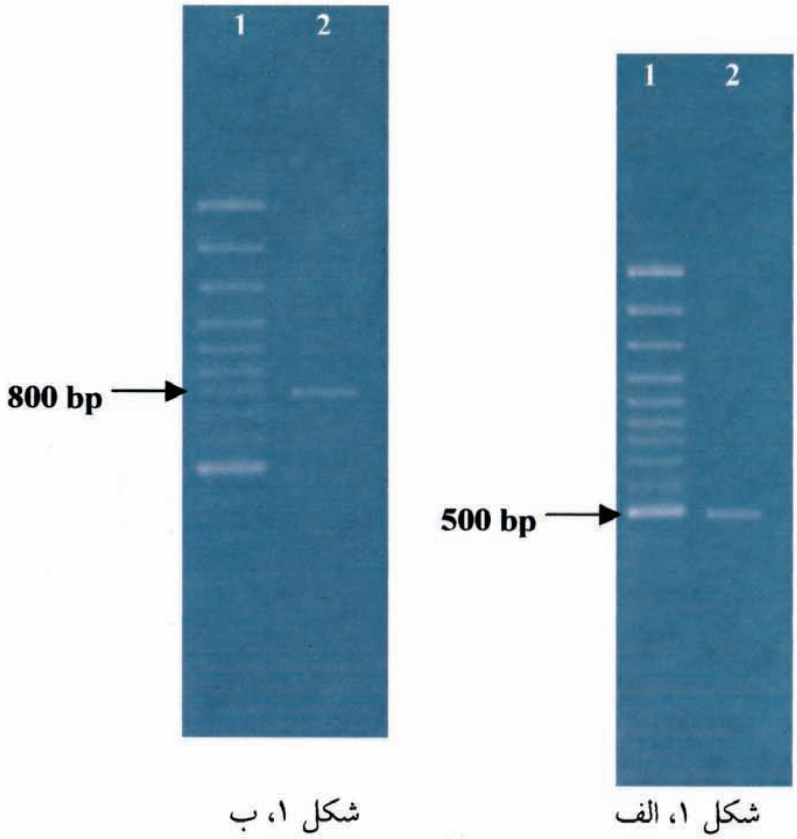
دو قطعه به دست آمده با توجه به ترادف آغازگرهای TM۳ و TM۴ که مکمل یکدیگر می‌باشند، دارای منطقه همپوشان به طول ۳۱bp هستند. قطعات حد واسط به دست آمده با نسبتهای مساوی از نظر مولاریته و بدون آغازگر وارد واکنش PCR جدید گردیدند. در این صورت احتمال اتصال قطعات به چند حالت وجود دارد. اول اینکه پس از دناتوره شدن دو قطعه حد واسط با طول‌های ۵۰۰bp و ۸۰۰bp و هنگام کاهش دما تا رسیدن به دمای اتصال[۳]، هر رشته با رشته مکمل خود به صورت جفت درآید. در این حالت هیچ تکثیری روی نخواهد داد. احتمال دیگر این است که دو رشته متفاوت در محل‌های همپوشان (با طول ۳۱bp) 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 ۳´OH گردد (شکل ۲، الف).

با اتصال این دو قطعه مکمل در ناحیه همپوشان، دو قطعه جهش‌دار بر اساس توسعه نقاط مشترک به یکدیگر متصل شده وپس از تکثیر، ژن جهش یافته EPSPS (با طول تقریبی۱۳۰۰bp) ایجاد می‌گردد. این قطعه جهش یافته می تواند به عنوان الگوی تکثیری عمل کرده و با اضافه کردن آغازگرهای ابتدا و انتهای ژن (EPS۱ و EPS۲) تکثیر کامل ژن روی می‌دهد. نتیجه اتصال و تکثیر این ژن بر روی ژل آگارز ۱٪ نشان داده شده است (شکل ۲، ب).

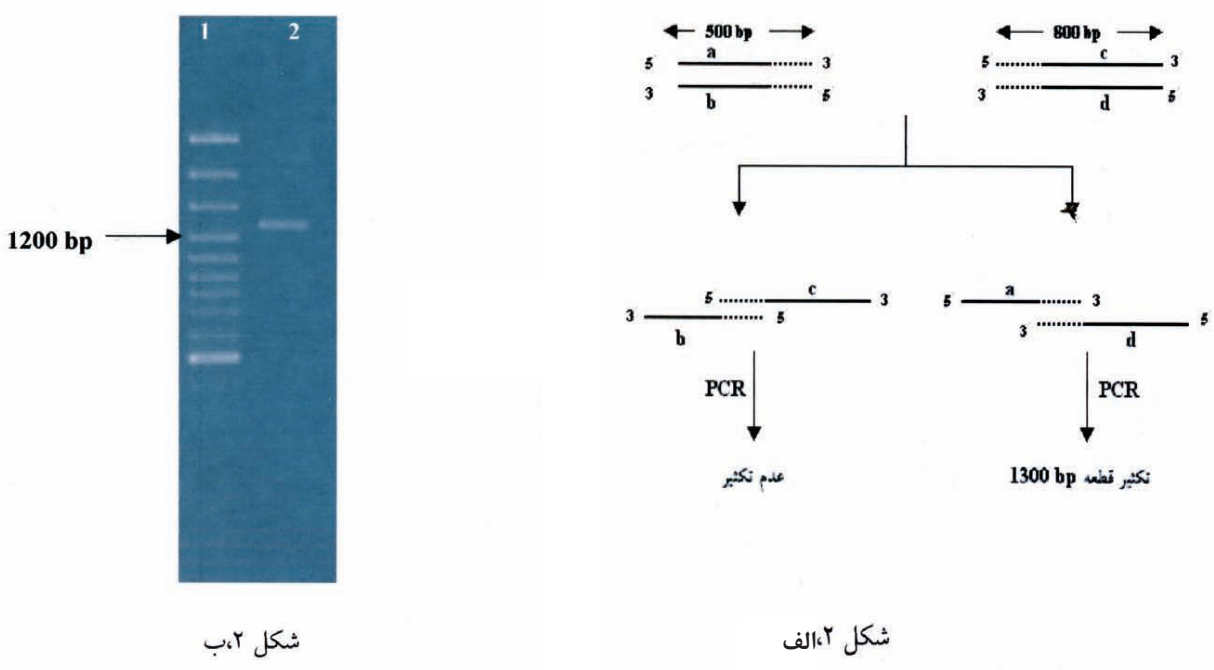
جهت حفظ قطعه تکثیر شده و انجام مراحل بعدی، ژن مورد نظر در پلاسمید pUC۱۸ و در جایگاه *Bam*HI همسانه سازی شده و به باکتری *E. coli* (DH۵α) منتقل گردید. برای اثبات وجود پلاسمید در باکتری، از گزینش کلنی‌های بی‌رنگ بر روی محیط کشت مک کانکی آگار حاوی آمپی‌سیلین (۱۰۰µg/ml) استفاده شد. در این حالت کلنی‌هایی که واجد

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- انجام واکنش‌های PCR با آغازگرهای جهش‌زا و ایجاد قطعات حد واسط.



شکل ۲- اتصالات آنزیم پلیمراز قابل تکثیر(الف)و تکثیر کامل ژن روی آگارز ۱٪(ب)

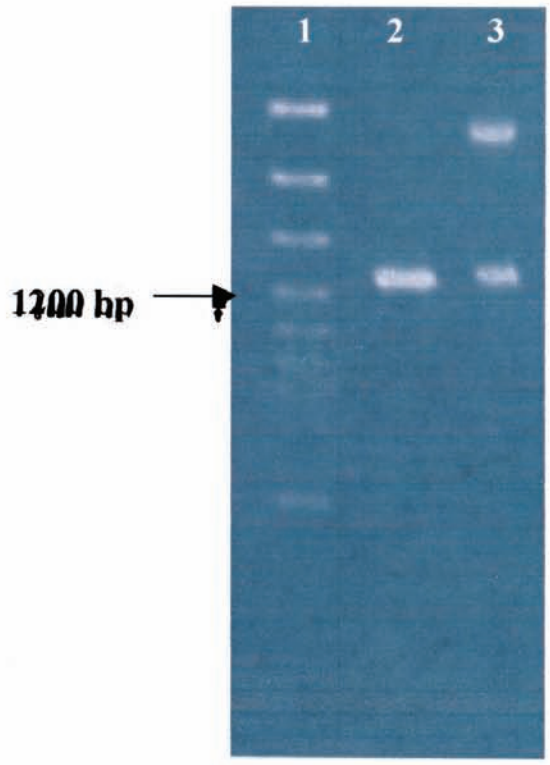
www.SID.ir

Archive of SID

پلاسمید نوترکیب باشند به رنگ سفید ظاهر شده و کلنی‌های واجد پلاسمید غیر نوترکیب به رنگ قرمز مشاهده میشوند.

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

به منظور همسانه سازی ژن مورد نظر در ناقلین بیان ژن گیاهی و با توجه به قرار دادن جایگاه برش یک آنزیم در دو طرف ژن و استفاده از آن در مراحل همسانه سازی، لازم بود که جهت قرار گرفتن ژن در پلاسمید pUC۱۸ تعیین گردد. در این مرحله لازم است از ژن‌هایی که در جهت مستقیم (در مقایسه با ژن lacZ) همسانه سازی شده باشند، استفاده شود. برای این منظور استفاده از هضم آنزیمی‌به عنوان یک روش مناسب مورد توجه قرار گرفت. آنزیم مورد استفاده باید فقط یک جایگاه برش بر روی پلاسمید و یک جایگاه برش هم بر روی قطعه مورد نظر داشته باشد. علاوه بر این، موقعیت این آنزیم بر روی ژن باید به گونه‌ای باشد که به یکی از دو



شکل ۳-نتایج واکنش PCR و هضم آنزیمی

سر ژن نزدیک بوده و هنگام هضم آنزیمی‌جهت مستقیم و معکوس ژن را نمایان سازد. برای تعیین جهت صحیح ژن در پلاسمید pUC۱۸، از هضم بوسیله آنزیم *Hinc*II و مشاهد وزن باند ایجاد شده استفاده گردید. با توجه به جایگاه این آنزیم بر روی پلاسمید (در ناحیه MCS)، مشاهده باند حدود ۵۰۰bp نشانه جهت صحیح ژن برای استفاده‌های بعدی (خط ۲ در شکل ۴) و مشاهده باند حدود ۸۰۰bp قرارگیری ژن در جهت عکس بوده و در این تحقیق کاربردی ندارد (خط ۳ درشکل ۴) معیار مستقیم و معکوس بودن ژن همسانه سازی شده، جهت ژن LacZ در پلاسمید pUC۱۸ در نظر گرفته شد. در این حالت اگر ژن مورد نظر در جهت ژن LacZ همسانه سازی شده باشد، امکان استفاده از دو جایگاه برشی برای آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I که به ترتیب در ابتدا و انتهای ژن قرار دارند، وجود خواهد داشت. ژن مورد نظر با این آنزیم‌ها خارج و در پلاسمید pBI۱۲۱ که با همین آنزیم‌ها بریده شده بود همسانه سازی شد.

هضم پلاسمید pBI۱۲۱ توسط دو آنزیم *Xba*I و *Sac*I موجب حذف ژن *gus* از این پلاسمید می‌شود. با توجه به تعبیه جایگاه آنزیمی*Bam*HI در دو انتهای ژن جهش یافته و جهت اثبات همسانه سازی در پلاسمید pBI۱۲۱، پس از خالص سازی پلاسمید از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط جامد (حاوی آنتی‌بیوتیک کانامایسین) از هضم آنزیمی‌توسط *Bam*HI و مشاهده قطعه‌ای حدود ۱۳۰۰bp استفاده شد. نتیجه این کار در شکل شماره ۵ نشان داده شده است.

چنانچه اشاره شد، برای انتقال ژن به گیاه کلزا از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* استفاده شد. پس از انتقال ژن به گیاه کلزا و با توجه به وجود ژن مقاومت به کانامایسین در قطعه انتقال یافته، تولید نوساقه در بعضی از کوتیلدون‌ها بر روی محیط کشت گیاهی حاوی کانامایسین مشاهده شد. طبق محاسبات انجام شده، نسبت باززایی نوساقه در ریزنمونه‌ها حدود ۷۴ درصد و میزان ریزنمونه‌های باززایی شده تراریخته حدود ۲۸ درصد بود. این نتایج تقریباً با نتایج به دست آمده توسط Moloney و همکاران که از کوتیلدون کلزا به عنوان ریزنمونه استفاده نموده‌اند (۱۳)، یکسان بوده ولی نسبت به نتایج گزارش شده توسط Zhang و همکاران که از هیپوکوتیل استفاده کرده‌اند، افزایش نشان داده است(۱۸) علت پایینی میزان تراریخته بودن نسبت به میزان باززایی این است که درصدی از گیاهچه‌های باززایی شده از سلول‌هایی منشاء گرفته‌اند که ژن مقاومت به کانامایسین را دریافت ننموده‌اند ودر مراحل بعدی و هنگام واکشت بر روی محیط حاوی کانامایسین سفید رنگ می‌شوند. تراریخته نبودن گیاه می‌تواند به عدم توانایی سوش اگروباکتریوم جهت انتقال ساختارهای ژنی یا ژنوتیپ گیاه مورد استفاده و یا بافت هدف مربوط باشد.

می‌توان برای افزایش تراریخته بودن در گیاه کلزا از آزمون‌های مکمل نظیر استفاده 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.

اثبات حضور ژن در گیاه از طریق PCR و هضم آنزیمی

در این تحقیق جهت اثبات حضور ساختارهای مورد نظر در گیاه، دو

www.SID.ir

Archive of SID

جفت آغازگر طراحی گردید. به طوری که هر یک جفت بخشی از ساختار را تکثیر می‌نمود و مجموع دو محصول روی هم حضور کل ژن مورد نظر را در گیاه اثبات می‌نمود. این دو جفت آغازگر به شرح ذیل می‌باشند:

با اســتفاده از آغازگرهای TM۳ و NR که انتهای ژن و خاتمه دهنده را تکثیر می کند، اندازه محصول PCR حدود ۱۰۳۰bp به دست آمد و نتیجه بکارگیری آغازگرهای TM۲ و۳۵SF که ابتدای ژن و ناحیه پیشبر را تکثیر می کند، ایجاد قطعه‌ای ۸۰۰bp بود (شکل ۶).

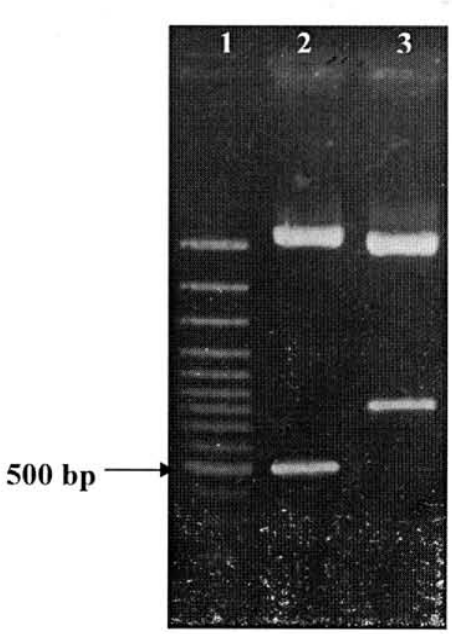
با توجه به اینکه در محل اتصال ژن EPSPS به ســاختارهای پیشــبر و پایانبر جایگاه برش آنزیم *Bam*HI وجود دارد، محصولات PCR با این آنزیم هضم شــدند که در محصول PCR اول قطعات ۸۰۰ و ۲۳۰ جفت‌بازی و در PCR دوم قطعات ۵۰۰ و ۳۰۰ جفت‌بازی مشاهده شد (شکل ۷).

ارزیابی مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته

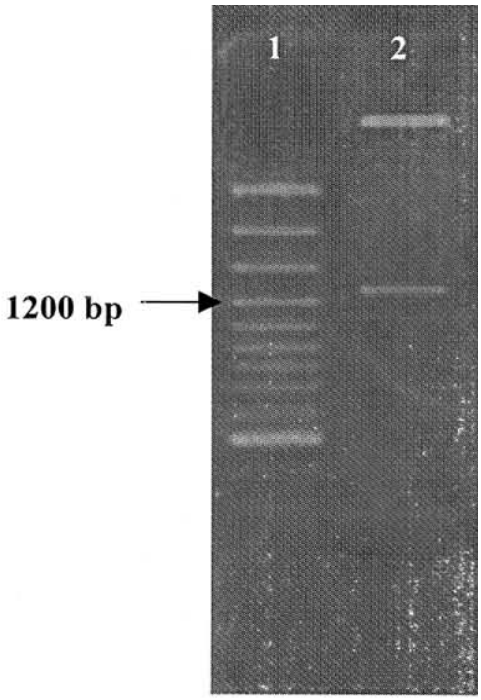
جهــت ارزیابی مقاومت به گلایفوســیت، گیاهــان تراریخته و گیاهان شــاهد (غیرتراریخته) در غلظت‌های مختلف گلایفوســیت و با برنامه اشاره شــده محلول پاشی شدند. گیاهان شــاهد (غیر تراریخت) در مرحله اول از تیمــار با گلایفوســیت و حتی در غلظت ۱mM کامــلاً از بین رفتند. درصد بقاء گیاهان تراریخت پس از مرحله دوم محلول پاشی و با توجه به کیفیت گیاهــان به ترتیب در غلظتهــای ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌مولار به صورت ۲۹، ۲۲، ۱۴، ۷ و صفــر بود. این نتایج نشــان میدهــد که با افزایش غلظت گلایفوســیت درصد گیاهان باقیمانده کاهش میابد. به عبارت دیگر مقاومت ایجاد شــده نسبی بوده و آنچه مشاهده می‌شــود تحمل نسبت به این علف کش است (شکل ۸).

اینکــه چــرا گیاهان تراریخته بــه طور کامل و مطلــق نمی‌توانند در برابر گلایفوســیت مقاومت نشــان دهند می‌تواند به چندین دلیل باشــد. ازجملــه اینکه بعضی گیاهان ممکن اســت ژن را دریافت نموده باشــند و نتیجه PCR برای DNA ژنومی‌مثبت باشــد، ولی این ژن در جای مناسبی برای بیان شدن قرار نگرفته باشد. همچنین یک گیاه ممکن است چندین نســخه از ژن دســتورزی شــده را دریافت کرده باشــد که در این حالت احتمال خاموش شــدن ژن‌ها نیز وجود دارد. جهت بررســی این اثر لازم اســت که آزمون ساترن بلات به منظور تعیین تعداد نسخه‌های ورودی به ژنوم گیاه انجام گیرد.

همچنیــن با توجه بــه اینکه این گیاهان نســل صفــر تراریخت (T0) محســوب می‌شــوند ممکن اســت اکثر ژن‌ها به حالت نهفته باقی مانده و در نســل‌های بعــدی امکان بروز پیــدا کنند. ولی با توجه به اینکــه در این تحقیــق تفاوت گیاهان تراریخته و شــاهد برای تحمل گلایفوســیت کاملاً مشــهود اســت، می‌توان نتیجه گرفت که وجود ژن خارجی دســت کاری شــده در افزایش تحمل به گلایفوســیت کاملا مؤثر بوده اســت. در همین زمینه به نظر می‌رســد که باید تدابیری دیگر نیز اندیشیده شود تا بتوان به میزان تحمل بیشتری نســبت به گلایفوسیت دست یافت. در همین زمینه می‌تــوان از ایجاد یک جهش نقطه‌ای دیگر در جای دیگری از ژن EPSPS باکتریایی استفاده نمود. همچنین چون محل عمل آنزیم EPSPS در داخل کلروپلاســت سلول گیاهی می‌باشــد، افزودن یک پپتید نشانه که محصول ژن را به ســمت کلروپلاست هدایت کند ودر بهترین شرایط تراریختی ژنوم کلروپلاست پیشنهاد می‌شود (۱۷).



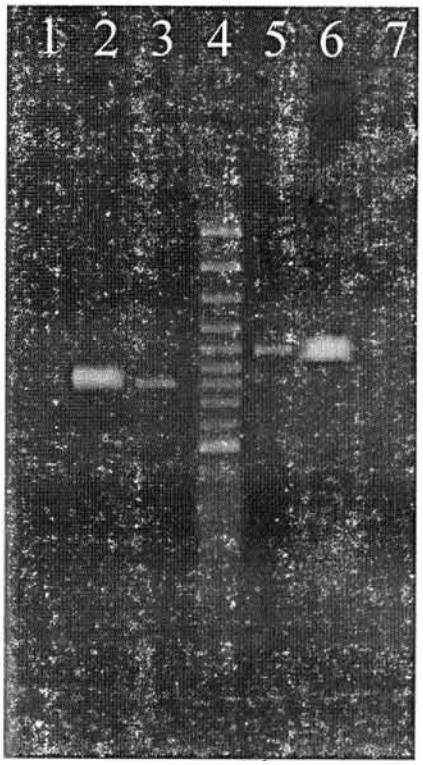
شکل ۴- تعیین جهت صحیح ژن در پلاسمید



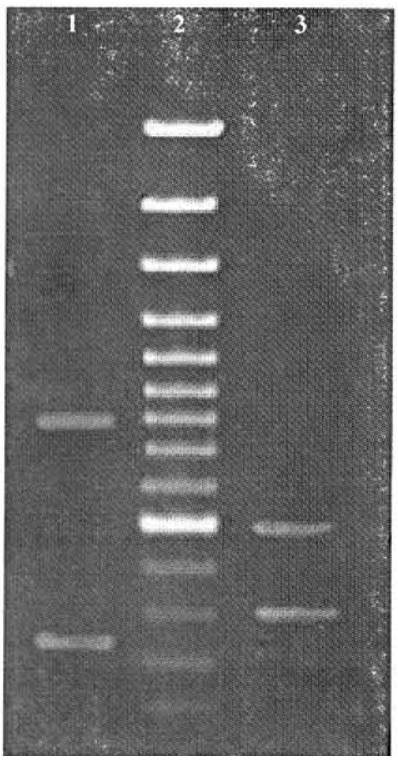
شکل ۵- هضم پلاسمید PBI ۱۲۱ توسط آنزیم

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۶- ایجاد قطعه در ژن با به کارگیری آغازگرهای TM۲, ۳۵۶f



شکل ۷- هضم محصولات PCR توسط آنزیم که در شکل نشان داده شده‌اند

شکل ۸- تحمل گیاه نسبت به علفکش

پاورقی‌ها

1- Competent
2 - Sanger
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 herbicide resistance. Crop Protection, 19: 881-889.

6- Fillatti, J.J., Kiser, J., Rose, R. and Cornai, L. .1987; Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary Agrobacterium tumeifaciens 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

www.SID.ir

Archive of SID

Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44: 203-229.

9- Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Moeini A, Mousavi A .2007; Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E.coli* (k12) and transformation of rapeseed (Brassica napus L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Rep. 26: 95-104

10- 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.

11- 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.

12- 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.

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

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

15- 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.

16- 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.

17- Wang, H. Y., Li, Y. F., Xie, L.X and Xu, P. .2003; Expression of bacterial aroA mutant, aroA-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phoshpate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants. Journal of Plant Research, 116: 455-460.

18- 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.

www.SID.ir