بررسی توارث تحمل به علف کش گلایفوسیت در نسل اول گیاهان تراریخت کلزا (*Brassica napus* L.) با ژن جهش یافته *EPSPS* باکتریایی

مرجان محمدعلی تجریشی[1و2]، علی هاتف سلمانیان[*1]، امیر موسوی[1] و دانیال کهریزی[3]

[1] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[2] تهران، دانشگاه خاتم

[3] کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده کشاورزی، گروه پژوهشی بیوتکنولوژی برای تنشهای محیطی

تاریخ دریافت: 86/4/25 تاریخ پذیرش: 87/4/4

چکیده

پایداری و نحوه توارث ژنهای منتقل شده به گیاهان تراریخت، یکی از جنبه های مهم در بررسی نسلهای بعدی این گیاهان به شمار می رود. بررسی حاضر بر روی گیاهان کلزا تراریخت نسل T1 حاوی ژن جهش یافته *EPSPS* (منشاء باکتری *E. coli*) انجام پذیرفت. برای این منظور و در مرحله اول، با توجه به همراهی و نزدیکی ژن مقاومت به کانامایسین (*npt*II) و *EPSPS*، توانایی بذور حاصل از نسل اول گیاهان تراریخت از نظر رویش بر روی محیط گزینشگر حاوی 15 mg/l آنتی بیوتیک کانامایسین بررسی شد. گیاهچه هایی که در محیط گزینشگر، سبز باقی مانده و ریشه ایجاد کردند، به عنوان گیاهان متحمل و دارای ژن جهش یافته در نظر گرفته شدند. تجزیه آماری و آزمون کای اسکور ($p = ۰/۰۵$) در تفرق نتاج نسل T1 نشان داد که نحوه توارث پذیری تراژنها به صورت تک نسخه ای غالب و مطابق توارث مندلی می باشد. در مرحله بعد آنالیزهای مولکولی بر روی گیاهان متحمل، حضور و بیان ژنهای *EPSPS* جهش یافته با منشاء باکتریایی را به ترتیب از طریق آزمایشات PCR و RT-PCR مورد تأیید قرار داد. نتایج نشان داد که بیان این ژن در گیاه تراریخت توانسته است اثرات سوء گلایفوسیت را کاهش دهد. انتقال و رشد گیاهان نسل اول در شرایط گلخانه ای نشان داد که این گیاهان دارای قدرت زادآوری و فنوتیپ طبیعی هستند.

واژه های کلیدی: کلزا (*Brassica napus* L.)، گلایفوسیت، ، *EPSPS* جهش یافته، ثبات ژن

[*] نویسنده مسئول، تلفن تماس: 021-44580365 ، پست الکترونیکی: Salman@nigeb.ac.ir

مقدمه

دانه کلزا (*Brassica napus* L.) به عنوان یک منبع مناسب در تأمین روغن خوراکی، و کنجاله آن نیز در صنعت و تغذیه دام، از اهمیت بالایی برخوردار است(۸ و ۲۳). در زراعت این گیاه با ارزش محدودیتهایی وجود دارد؛ از جمله اینکه علفهای هرز موجب کاهش کمی و کیفی عملکرد آن می شوند. به همین دلیل کنترل علفهای هرز مزارع کلزا، از مهمترین عملیات زراعی این گیاه به شمار می رود. استفاده از علف کشهای شیمیایی، عمده ترین روش کنترل علفهای هرز می باشد. در بین این علف کشها، انواع وسیع الطیف دارای کارایی بیشتری هستند. اما چنین علف کشهایی در مزارع کلزا، علاوه بر علفهای هرز به گیاه زراعی نیز آسیب می رساند (8). به همین جهت تولید گیاه کلزای متحمل به این نوع علف کشها، از اهمیت فوق العاده ای برخوردار است (3). گلایفوسیت (N-فسفونومتیل گلایسین)، با نام تجاری راندآپ، یک علف کش عمومی و وسیع الطیف بوده و دارای قدرت جذب قوی در خاک و اثرات سمی بسیار ناچیز بر پستانداران، پرندگان و آبزیان می باشد (2). محل اثر این علف کش، آنزیم 5-انول

Archive of SID
www.SID.ir

پیرورویل شیکیمات-3 فسفات سنتاز (EPSPS) (آنزیم کلیدی مسیر شیکیمات) می باشد. مسیر شیکیمات که در پروکاریوت ها و گیاهان وجود دارد، منجر به بیوسنتز اسیدهای امینه حلقوی می شود. لذا نقص در این مسیر منجر به فقر اسیدهای امینه ضروری و مرگ ارگانیسم خواهد شد (7، 10 و 15).

ایجاد تحمل نسبی به علفکش گلایفوست از طریق بیان فراوان آنزیم EPSPS امکان پذیر است (۲۴)، اما در این روش میزان تحمل ایجاد شده در گیاهان تراریخت پایین می باشد (1، 11 و 20). به کارگیری آنزیمهای تخریب کننده علف کش (از جمله آنزیم گلایفوسیت اکسیدو ردوکتاز یا GOX) روش دیگر جهت ایجاد تحمل در گیاهان تراریخت می باشد. اما مؤثرترین روش برای ایجاد تحمل نسبت به علف کش گلایفوسیت، دستورزی ژن کد کننده آنزیم EPSPS ، به منظور کاهش میل ترکیبی آن با علفکش و سپس انتقال آن به داخل ژنوم گیاه است (11، 13 و 17).

در گزارشهای قبلی، ژن مربوط به آنزیم EPSPS از باکتری *E. coli* تکثیر و سپس با استفاده از روش جهش زایی نقطه ای (SDM) دو جهش در ژن مورد نظر ایجاد شد (۲۲). جهش اول تغییر کدون اسیدهای آمینه حفاظت شده گلایسین ردیف ۹۶ به آلانین (Gly96Ala) ، و جهش بعدی تغییر کدون اسید آمینه حفاظت شده آلانین ردیف ۱۸۳ به ترئونین (Ala183Thr) بود. این قطعات ژنی، هر کدام به طور جداگانه تحت پروموتر دائمیCaMV 35S و به همراه ژن گزینشگر مقاومت به کانامایسین(*nptII*) از طریق اگروباکتریوم، به گیاهان کلزا منتقل شدند (16 و 17).

بررسی و آنالیز نسلهای بعد و نحوه توارث تراژن در گیاهان تراریخت، از کارهای ضروری در پروژه های مهندسی ژنتیک و توسعه یک گیاه تراریخت می باشد (12). بسیاری از محققین انتقال تراژنها به نسلهای بعدی را به صورت تک نسخه ای غالب و طبق الگوی مندلی عنوان کرده اند. در این رابطه رادونیک و همکاران (۲۰۰۶) با شمارش تعداد گیاهان مقاوم به کانامایسین، توارث مندلی را برای بیان ژن *gus* در آفتابگردان گزارش کردند (21). همچنین بصری در گندم، و ناگایا و همکاران در آرابیدوپسیس برای ژنهای انتقال یافته، توارث و الگوی مندلی را گزارش کرده اند (۹ و ۱۹). در این تحقیق بررسی نسل اول گیاهان مذکور و ارزیابی آنها با استفاده از روشهای مختلف آنالیز مولکولی و فنوتیپی انجام پذیرفت. به عبارت دیگر، انتقال ساختارهای ژنی حاوی ژن *EPSPS* جهش یافته به گیاهان نسل بعد و پایداری این ساختارها از نظر بیان صفت مورد نظر و در نهایت تفاوتهای موجود در بروز صفت تحمل به علف کش گلایفوسیت، مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

مواد گیاهی، محیطهای کشت و مواد مورد استفاده: بذور گیاهان کلزای تراریخت شده (رقم PF-7045-91) با ساختارهای ژن *EPSPS* باکتریایی حاوی جهش Gly96Ala و جهش Ala183Thr که در مطالعات قبلی (۵، ۶، ۱۷ و ۲۲) و از تراریختی گیاهان کلزا از طریق اگروباکتریوم بدست آمده بود، مورد استفاده قرار گرفت. بذور در محیط کشت MS (18) حاوی نصف غلظت نمکها به همراه 15 g/l ساکاروز و 8 g/l فیتاگار(5/8=pH) کشت شدند. به منظور انتخاب گیاهان تراریخت و با توجه به مطالعات انجام شده (۱ و ۵) آنتی بیوتیک کانامایسین با غلظت 15 mg/l به محیط کشت اضافه گردید. بذور پس از ضد عفونی سطحی توسط هیپو کلریت سدیم 1/5 درصد (به مدت ۱۰ دقیقه) و چندین مرتبه آبکشی با آب مقطر استریل، بر روی محیط گزینشگر کشت شدند. گیاهان سبز پس از 8 هفته برای بررسی فنوتیپی و بذر گیری به گلدان منتقل شدند. برگ گیاهان حاصل به منظور استخراج DNA و RNA مورد استفاده قرارگرفت.

Archive of SID

www.SID.ir

برای استخراج RNA از RNX Extraction Solution (شرکت سیناژن) و برای انجام واکنش PCR از آنزیم *Taq* پلیمراز (شرکت GENET BIO) و جهت ساخت cDNA از آنزیم Reverse Transcriptase (شرکت Roche) استفاده شد.

تعیین آستانه تحمل گیاهچه ها به علف کش: جهت تعیین آستانه تحمل، بذور تراریخت و شاهد در محیط کشت MS (18) حاوی 15 mg/l کانامایسین کاشته شدند. گیاهچه های رشد کرده و سبز که احتمالاً تراریخت هستند، در مرحله سه تا چهار برگی از ناحیه بالای ریشه قطع شده و در محیط MS حاوی مقادیر 0، 0/1 ، 0/2 ، 0/3 و 0/4 میلی مولار گلایفوسیت (شرکت Sigma) قرار داده شدند. پس از گذشت سه هفته، وضعیت گیاهچه های شاهد و تراریخت، تجزیه و تحلیل شد.

استخراج DNA ژنومی گیاهان: استخراج DNA ژنومی از گیاهان نسل اول (T1) به روش CTAB (14) انجام پذیرفت. کیفیت و کمیت DNA حاصل از طریق الکتروفورز ژل آگاروز و همچنین بررسی میزان جذب در طول موج 260 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر صورت گرفت.

طراحی آغازگرها و انجام عمل PCR : برای اثبات حضور ژن *EPSPS* جهش یافته با منشاء باکتریایی در نسل اول گیاهان تراریخت، از یک جفت آغازگر رفتی(EPS1) و برگشتی(EPS2) برای تکثیر ژن انتقال یافته به گیاه استفاده گردید. توالی این آغازگرها به شرح زیر می باشد:

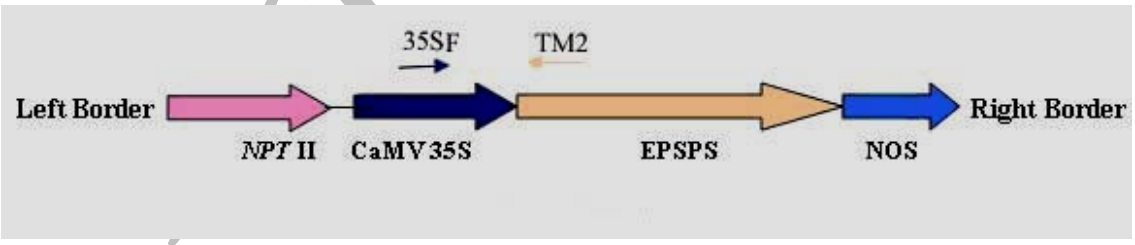
EPS1: 5´-CGGGATCCATGGAATCCCTGACGTTACAA-3´
EPS2: 5´-CGGATCCTCAGGCTGCCTGGCTAATC-3´

واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم نهایی 20 میکرولیتر حاوی 2/5 میلی مولار $MgCl_2$ با دمای اتصال 57/5 درجه سانتی گراد انجام شد. به منظور تأیید نتایج از جفت آغازگر رفتی (35SF) که مکمل قسمتی از پیشبرنده(promoter) در ابتدای ژن *EPSPS* وآغازگربرگشتی (TM2) که مکمل قسمتی از خود ژن است ، استفاده گردید.

توالی این آغازگرها به شرح زیر می باشد:

35SF: 5´-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT
TM2: 5´-TGCCGTTGCGGCGTTACCGAGGA

در شکل 1، ترتیب پیشبرنده، ژن ، خاتمه دهنده و محل اتصال آغازگرها نشان داده شده است. انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، در حجم نهایی25 میکرولیتر حاوی 2/5 میلی مولار $MgCl_2$ و در دمای اتصال 59 درجه سانتی گراد انجام پذیرفت.



شکل 1 – ترتیب پیشبرنده، ژن ، خاتمه دهنده و محل اتصال آغازگرها در ساختارهای منتقل شده به گیاهچه های کلزا

استخراج RNA کل از بافت گیاهی: از بافت برگی هر دو لاین گیاهان تراریخت نسل اول و گیاهان شاهد (غیر تراریخت)، RNA کل با استفاده از محلول اختصاصیRNX در شرایط عاری ازRNase استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و اسپکتروفوتومتری در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر بررسی شد.

www.SID.ir

ساخت cDNA و انجام RT-PCR : ساخت cDNA توسط آنزیم نسخه بردار معکوس (RT) با الگوی RNA کل و آغازگر اختصاصی EPS2 انجام گرفت. از cDNA تک رشته ای به عنوان الگو برای ساخت cDNA های دو رشته ای و تکثیر آنها توسط PCR و تأیید بیان تراژن *EPSPS* در گیاهان تراریخت شده استفاده شد. مقادیر متغیر cDNA به همراه آغازگر های EPS1 وEPS2 با غلظت 2/5 میلی مولار $MgCl_2$ ، دمای اتصال 57/5 درجه سانتی گراد و ۳۰ چرخه، برای انجام واکنش PCR استفاده شد.

ب الف

شکل 2) مقایسه گیاهچه تراریخت شده با ژن *EPSPS* جهش یافته (الف) و گیاهچه حساس (شاهد) (ب).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با قانون اول مندل (نسبت فنوتیپی ۳:۱)، از آزمون کای اسکور (χ^2) با سطح معنی دار۵ درصد و نرم افزار SPSS استفاده شد و بر اساس فرضیه اصل تفرق، افراد مشاهده شده در هر دسته، یعنی نتایج غالب و مغلوب با میزان مورد انتظار الگوی مندلی مقایسه گردید. برای انجام این مقایسه از فرمول کای اسکور به صورت زیر استفاده شد:

$$\chi^2 = \Sigma \frac{(oi - ei)^2}{ei}$$

اجزاء این فرمول عبارتند از:

χ^2 = کای اسکور محاسبه شده

o_i= فراوانی مشاهده شده در هر طبقه (Observed)

e_i= فراوانی مورد انتظار برای هر طبقه (Expected)

شمارش گیاهان مشاهده شده، از گیاهان نسل اول که در محیط گزینشگر حاوی mg/l15 آنتی بیوتیک کانامایسین قادر به رشد و ایجاد گیاهچه های سبز بودند، انجام شد.

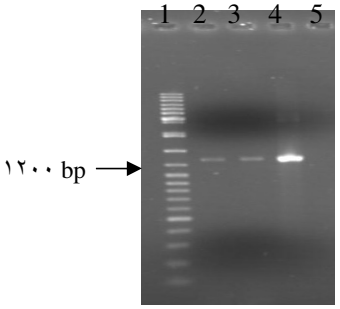
نتایج

پس از استریل سازی و کشت بذور نسل اول گیاهان تراریخت بر روی محیط کشت حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین، گیاهچه هایی که پس از ۳ هفته در محیط گزینشگر سبز باقی مانده و ایجاد ریشه نموده بودند، به عنوان گیاه متحمل و دارای ژن *npt*Π در نظر گرفته شدند و گیاهچه هایی که دارای برگ سفید و فاقد ریشه توسعه یافته بودند به عنوان نمونه های حساس تقسیم بندی شدند (شکل ۲). به منظور بررسی و تعیین آستانه تحمل گیاهچه های تراریخت نسل اول کلزا نسبت به غلظتهای مختلف علف کش گلایفوسیت، گیاهچه های مقاوم به آنتی بیوتیک کانامایسین در محیط کشت MS و در مجاورت غلظتهای

Archive of SID
www.SID.ir

مختلف علف کش گلایفوسیت قرار گرفتند. نتایج آزمایش نشان داد که گیاهچه های شاهد در غلظت کمتر از 0/1 میلی مولار نیز به طور کامل نکروزه می شوند؛ در حالی که در همین شرایط گیاهچه های تراریخت قادر می باشند که غلظتهای بالاتر و حتی تا 0/3 میلی مولار گلایفوسیت را نیز تحمل نمایند. نتیجه این آزمایش برای گیاه تراریخت با ژن جهش یافته Ala183Thr به نمایش در آمده است (شکل ۳).

شکل3- وضعیت گیاهچه های تراریخت در غلظت های مختلف گلایفوسیت، به ترتیب از چپ به راست غلظت های 0/1 ، 0/2 ، 0/3 و 0/4 میلی مولار گلایفوسیت

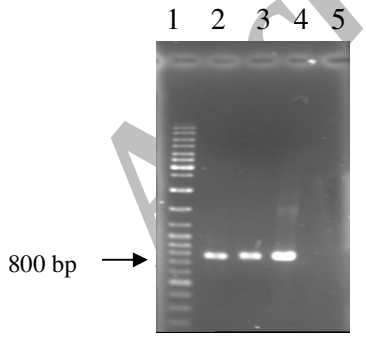


شکل 4- تکثیر ژن *EPSPS* جهش یافته در نسل T1 دو لاین تراریخت Gly96Ala و Ala183Thr با آغازگرهای اختصاصی EPS1 و EPS2

1)مارکر ۱۰۰ جفت بازی 2) لاین تراریخت Gly96Ala 3) لاین تراریخت Aa183Thr 4) پلاسمید pBI121 حاوی ساختار مورد نظر، کنترل مثبت 5) گیاه غیر تراریخت، کنترل منفی

انتقال گیاهان متحمل به آنتی بیوتیک کانامایسین به شرایط گلخانه ای (گلدان) نشان داد که این گیاهان دارای رشد رویشی و زایشی طبیعی هستند. آنالیز DNA ژنومی استخراج شده از برگ گیاهان سبز تراریخت و گیاهان شاهد (غیر تراریخت)، با استفاده از آغازگر های اختصاصی EPS1 و EPS2 (طراحی شده برای ابتدا و انتهای ژن جهش یافته) صورت گرفت. نتیجه واکنش PCR هر دو لاین تراریخت (Gly96Ala) و (Ala183Thr) ، قطعه ای در حدود 1300 bp را بر روی ژل آگاروز 1 درصد نشان داد. نتیجه این آزمایش بر روی DNA حاصل از گیاه غیر تراریخت منفی بود (شکل ۴).

در مرحله بعد، واکنش PCR تکمیلی با جفت آغازگر های اختصاصی 35SF و TM2 بر روی گیاهان تراریخت و شاهد انجام شد. محصول این واکنش که ناحیه ای بین پیشبرنده و بخش میانی ژن را تکثیر می کند، باید محصولی در حدود800 جفت باز را نشان دهد. حضور این باند در گیاه تراریخت و عدم حضور آن در گیاه شاهد در شکل ۵ به نمایش در آمده است. این نتیجه تأییدی بر نتیجه حاصل از واکنش PCR اول است و اختصاصی بودن تکثیر و عدم تداخل آن را با ژن درونی گیاه نشان می دهد. با انجام دو آزمون مختلف PCR ، اثبات گردید که ژن جهش یافته به همراه پیشبرنده CaMV 35S به گیاه نسل بعد منتقل شده و انتظار می رود که چنانچه در ناحیه مناسبی از ژنوم گیاه قرار گرفته باشد، از بیان خوبی نیز برخوردار باشد.

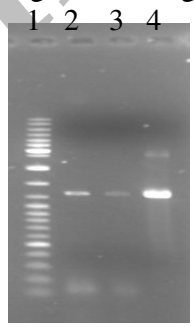


شکل 5- اثبات حضور ژن *EPSPS* جهش یافته در نسل T1 دو لاین تراریخت Gly96Ala و Ala183Thr با آغازگرهای 35SF و TM2

1)مارکر وزن مولکولی 2) لاین تراریخت Gly96Ala 3) لاین تراریخت Ala183Thr 4) پلاسمید pBI121 حاوی ساختار مورد نظر، کنترل مثبت 5) گیاه غیر تراریخت،کنترل منفی

Archive of SID
www.SID.ir

بررسی نسخه برداری از ژن *EPSPS* جهش یافته در گیاهان تراریخت نسل اول با استفاده از روش RT-PCR انجام گرفت (23). پس از استخراج RNA تام و ساخت cDNA ، با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ژن *EPSPS* با منشاء باکتریایی، واکنش PCR انجام گرفت. همانطور که انتظار می رفت در واکنش RT-PCR که بر روی RNA گیاهان تراریخت انجام گرفت، قطعه ای درحدود bp 1300 مشاهده گردید (شکل۶). تکثیر ژن و مشاهده باند مورد نظر در گیاهان تراریخت و عدم مشاهده باند در نمونه گیاه شاهد، اختصاصی بودن این تکثیر و عدم تداخل با ساختار ژن درونی گیاه را نشان می دهد.



شکل 6- نتایج حاصل از RT-PCR 1) مارکر وزن مولکولی 2) لاین تراریخت Gly96Ala 3) لاین تراریخت Ala183Thr 4) پلاسمید pBI121 حاوی ساختار مورد نظر، کنترل مثبت

بررسی نحوه توارث پذیری ژن *EPSPS* جهش یافته در گیاهان تراریخت نسل اول کلزا با شمارش گیاهان مقاوم و حساس به کانامایسین و انجام آزمون کای اسکور انجام شد (جداول 1 و 2). با توجه به مقدار χ^2 جدول با درجه آزادی یک و سطح معنی دار 5 درصد (3/84) و مقایسه آن با χ^2 محاسبه شده برای گیاهان تراریخت (3/027 برای گیاه با جهش Gly96Ala و 0/12 برای گیاه با جهش (Ala183Thr ، با اطمینان 95 درصد می توان قضاوت نمود که بین نتایج مشاهده شده و نتایج مورد انتظار (نسبت مندلی یا نسبت ۳:۱) اختلاف معنی داری وجود ندارد. چون صفت مورد نظر دارای توارث مندلی است (جدول ۳)، می توان انتظار داشت که در گیاهان تراریخت تنها یک نسخه ژن مقاومت به کانامایسین وارد شده باشد. از طرف دیگر، با توجه به پیوستگی ژن مقاومت به کانامایسین با ژن جهش یافته *EPSPS* و فاصله بسیار کوتاه این دو ساختار ژنی، می توان این نتیجه را برای این ژن نیز تعمیم داد.

جدول1- آزمون کای اسکور در گیاه تراریخت نسل اول دارای ژن EPSPS باکتریایی با جهش Gly96Ala

صفت	تعداد مشاهده شده (o)	تعداد مورد انتظار(e)	$\frac{(o-e)^2}{e}$
مقاوم	28	33	0/757
حساس	16	11	2/27
مجموع	44		χ^2=3/027

Archive of SID
www.SID.ir

جدول 2- آزمون کای اسکور در گیاه تراریخت نسل اول دارای ژن EPSPS باکتریایی با جهش Ala183Thr

صفت	تعداد مشاهده شده (o)	تعداد مورد انتظار(e)	$\frac{(o-e)^2}{e}$
مقاوم	32	33	0/03
حساس	12	11	0/09
مجموع	44		χ^2=0/12

جدول 3- نسبت تفرق صفت مقاومت به کانامایسین در گیاهان نسل T1

لاین	مجموع بذور جوانه زده	تعداد گیاهچه های مقاوم	تعداد گیاهچه های حساس	نسبت تفرق
Gly96Ala	44	28	16	1/75 : 1
Ala183Thr	44	32	12	2/6 : 1

بحث

به منظور بررسی پایداری و توارث صفت تحمل به علف کش گلایفوسیت، حضور و بیان ژنهای منتقل شده(*nptII* , *EPSPS*) در گیاهان تراریخت نسل اول (T1) کلزا، در مرحله اول با استفاده از محیط کشت انتخابی حاوی میزان 15 mg/l آنتی بیوتیک کانامایسین، مورد مطالعه قرار گرفت. با توجه به روش انتقال ژن مورد استفاده به ژنوم گیاه کلزا، ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) به همراه ژن *EPSPS* جهش یافته به گیاهان نسل اول کلزا منتقل شده است. باید توجه داشت که غلظت مناسبی از آنتی بیوتیک که قادر به گزینش گیاهان تراریخت باشد، برای هر گونه گیاهی متفاوت بوده و باید به طور تجربی برای هر گیاه تعیین شود (5، 12 و 17). گزارشهای قبلی (۱، ۵ و ۶) و نتایج این بررسی نشان داده که این مقدار برای آنتی بیوتیک کانامایسین، برای گیاه کلزای رقم PF-7045-91، 15 mg/l می باشد. این مقدار بسیار کمتر از مقادیری است که برای انتخاب گیاه تراریخت توتون به عنوان یک گیاه مدل در آزمایشات تراریختی گیاهان (50-100 mg/l) مورد استفاده قرار می گیرد. این تفاوت در حساسیت گیاهان می تواند مربوط به کارآیی ورود آنتی بیوتیک به داخل سلول گیاه یا تفاوت در ساختار یا میزان حساسیت مولکول هدفِ آنتی بیوتیک (در مورد این آنتی بیوتیک، مولکول هدف ریبوزوم های موجود در اندامکهای سلول گیاهی است) باشد.

یکی از روشهای مهم در آنالیز ژنتیکی گیاهان تراریخت استفاده از تکنیک PCR است. در این روش با به کار گیری آغازگر های اختصاصی، ابتدا حضور ژن مورد نظر (*EPSPS* جهش یافته) در گیاه اثبات می شود. در این راستا، ابتدا بوسیله جفت پرایمر EPS1 و EPS2 حضور ژن وارد شده به گیاه مورد بررسی قرار گرفت. از آنجا که گیاه کلزا نیز دارای ژن *EPSPS* در درون ژنوم خود می باشد و با توجه به شباهتهای موجود در ترادف این ژن با ژن پروکاریوتی، احتمال دارد که دو آغازگر EPS1 و EPS2 قادر باشند این ژن یوکاریوتی را نیز تکثیر نمایند. البته طبق پیش بینی که با استفاده از نرم افزار Oligo به عمل آمد، مشخص گردید که احتمال فوق بسیار ضعیف می باشد. بدیهی است که با کنترل شرایط PCR ،بویژه دمای اتصال آغازگر ها و غلظت Mg^{2+} ، می توان با اطمینان زیادی از تکثیر غیر اختصاصی قطعات جلوگیری به عمل آورد. در این آزمایش به علت اختلاف اندازه مشخص بین محصول تکثیر شده از ژن درونی گیاه که بواسطه وجود ساختارهای اگزون و اینترونی، حدود ۲۷۰۰

Archive of SID

www.SID.ir

جفت باز طول دارد (4) و ژن وارد شده از منشاء باکتریایی که حدود ۱۳۰۰ جفت باز می باشد، احتمال تداخل در محصول PCR وجود ندارد. در مراحل بعد و به منظور اطمینان ازحضور ژن مورد نظر تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S واکنش PCR دیگری طراحی شد. در این آزمایش با انتخاب آغازگر رفتی (35SF) که به اواسط پیشبرنده و آغازگر برگشتی که به درون ژن وارد شده به ژنوم گیاه متصل می شود (TM2)، از حضور پیشبرنده CaMV 35S در ابتدای ژن جهش یافته خارجی در گیاه، اطمینان حاصل شده و نتایج حاصل از آزمون اول نیز تأیید می شود.

درخصوص انجام آنالیز با استفاده از بخشی از پیشبرنده CaMV 35S ، باید توجه داشت که این پیشبرنده از نوعی ویروس موزاییک گرفته شده است وگیاه کلزا نیز به طور طبیعی احتمال آلودگی با این ویروس را دارد. به عبارت دیگر بررسی ژنوم گیاه تراریخت برای حضور این پیشبرنده می تواند احتمال آلودگی ویروسی گیاه را مطرح نماید. اما به کار گیری دو آغازگر به گونه ای که آغازگر برگشتی آن از ناحیه داخل ژن *EPSPS* باکتریایی انتخاب شده باشد، احتمال آلودگی و تکثیر غیر اختصاصی حذف می شود. آنالیز انجام شده بر روی محصولات PCR و بررسی طول باندهای به دست آمده از گیاهان تراریخت نشان داد که طول این قطعات به طور دقیق با اندازه های مورد انتظار تطابق دارد و به نظر می رسد که ژن مورد نظر بدون هیچ گونه تغییری از نظر اندازه به گیاهان نسل بعد منتقل شده است.

بدیهی است که حضور ژن در داخل ژنوم ارگانیسم می تواند تراریخت بودن گیاه را اثبات نماید اما تضمینی برای رونویسی مناسب از روی ژن وجود ندارد. بنابراین لازم است که با انجام آزمایش RT-PCR وجود مولکول mRNA را نیز بررسی نمود. نتایج این آزمایش نشان داد که گیاه تراریخت قادر است تا ژن وارد شده را به mRNA مورد نظر رونویسی کند. در آزمایش RT-PCR چنانچه آغازگرهای مورد استفاده به علت تشابه نسبی بین ترادف ژن *EPSPS* گیاه کلزا و باکتری قادر به تکثیر cDNA هر دو ژن باشند، علاوه برتکثیر قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی می بایست محصولی به طول حدود 1600جفت باز نیز مشاهده می شد که این باند مربوط به اندازه مولکول *EPSPS* گیاه پس از عملیات حذف اینترونها و پردازش است (4). در حالی که عمل تکثیر کاملاً اختصاصی بوده و اندازه تک باند به دست آمده 1300 جفت باز می باشد. این نتیجه می تواند اختصاصی بودن آغازگر های طراحی شده و همچنین شرایط تکثیر را نشان دهد. نتایج بدست آمده با نتایج کهریزی و همکاران (6) که آنالیزهای مولکولی بر روی نسل صفر (T0) این گیاهان انجام داده بودند، مطابقت داشت. به منظور بررسی نحوه توارث پذیری، نوع فعالیت ژن (از نظر غالب و مغلوبی) و با در نظر گرفتن نسبتهای مندلی آنالیزهای آماری انجام پذیرفت. طبق قوانین موجود، هنگامی که در والد یک نسخه وجود داشته باشد، این ژن به حالت غالب اثر می کند و اگر این والد وادار به خود گشنی شود، نتایج حاصل از این خود گشنی باید به نسبت 3:1 تفرق یابند.

برای انجام آزمون فوق و به هنگام تولید بذور، گیاهان به طور کامل جداسازی شده بودند. نتایج حاصل از میزان تفرق نشان داد که این نسبت با نسبت مندلی مورد انتظار (3:1) مطابقت دارد. به عبارت دیگر باید تعداد ژن وارد شده به ژنوم گیاه، در مورد گیاه مورد بررسی، تنها یک نسخه و به صورت غالب باشد. از آنجا که بررسی های اولیه برروی صفت مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین انجام گرفت و با توجه به پیوستگی ژنتیکی این ژن با ژن مقاومت به گلایفوسیت، منطقی است که نتایج این آنالیز در مورد صفت تحمل نسبت به علف کش نیز صادق باشد.

گرچه در مواردی ممکن است اتصال بین ژن مقاومت به کانامایسین(*npt*Π) و *EPSPS* شکسته شده و به این

Archive of SID

www.SID.ir

ترتیب تنها ژن *npt*Π به گیاه منتقل شده باشد. اما با توجه به سایر آزمایشهای مولکولی انجام شده و اثبات حضور ژن *EPSPS* جهش یافته (با انجام واکنشPCR و RT-PCR)، همراهی *npt*Π و *EPSPS* اثبات می گردد. این نتایج با نتایج Wang و همکاران (25) که در گزارشات قبلی اثبات کردند وراثت پذیری صفت مقاومت به گلایفوسیت در نسل اول به طور عمده از نسبت 3:1 پیروی می کند، مطابقت دارد.

با در نظر گرفتن نتایج به دست آمده می توان ابراز نمود که صفت تحمل درگیاهان کلزای تراریخت شده با ژن *EPSPS* جهش یافته که منجر به کاهش اثرات تخریبی علف کش گلایفوسیت می شود، با یک نسبت منطقی به نسل اول منتقل می گردد.

گیاهان تراریخت نسل صفر (T0) از نظر ساختار ژنتیکی برای ژن انتقالی همانند نسل اول (F1) گیاهان معمولی در یک تلاقی هستند و تنوعی در این نسل مشاهده نمی شود. به همین ترتیب نسل T1 گیاهان تراریخت همانند نسل F2 گیاهان معمولی هستند که تنوع در آنها وجود دارد. چنانچه صفتی توسط یک ژن کنترل شود (بدون اثرات متقابل، اپیستاتیک و یا پلیوتروپی)، در مطالعه ژن در گیاهان نسل T1 ، انتظار می رود نسبت مندلی برای آن صفت مشاهده گردد (همانند نسبت فنوتیپها در نسل F2 در تلاقی منوهیبریدیسم).

منابع

1. جنوبی، پ. (1383). بهینه سازی رشد در شیشه و انتقال ژن *EPSPS* به گیاه کلزا از طریق اگروباکتریوم. رساله دکتری. دانشگاه تربیت معلم تهران.۱۹۴ ص

2. راشد محصل، م، رحیمیان، ح، و بنایان، م. (1371). علف های هرز و کنترل آنها. (تألیف Ross, M.A. and Lembi, C.A). چاپ اول. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.۵۷۵ ص

3. شیخانی، ر. (1384). آنالیز گیاهان نسل اول و دوم کلزای تراریخت با ژنهای *EPSPS* . پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران. ۱۷۶ ص

4. غیاثی، س. م. (1380). جداسازی، تعیین ترادف و کلون سازی *EPSPS* گیاه کلزا از دو منبع ژنوم و cDNA . پایان نامه کارشناسی ارشد. موسسه آموزش عالی خاتم.

5. کهریزی، د، سلمانیان، ع.ه، افشاری، ا، موسوی، ا، معینی، ا، و کریم زاده، ق. (1383). جداسازی، آنالیز مولکولی و ایجاد جهش نقطه ای در ژن *EPSPS* باکتریایی به منظور ایجاد مقاومت به علف کش گلایفوسیت در گیاه کلزا. پژوهش و سازندگی (در زراعت و باغبانی). جلد 17 شماره 3: صفحات103-94

6. کهریزی، د، سلمانیان، ع.ه، موسوی، ا، معینی، ا. کریم زاده، ق. (1387). تغییر اسید آمینه آلانین 183 به تروئونین در آنزیم 5-انول پیرویل شیکیمات- 3 فسفات سنتاز (*E. coli* k12) و تأثیر این ژن جهش یافته در مقاومت به گلایفوسیت در گیاه کلزا (*Brassica napus* L). پژوهش و سازندگی (در زراعت و باغبانی) شماره 79: صفحات 151-159

7. 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.

8. Anonymous (2001). Food Derived from Glyphosate –Tolerant canola GT73. A safety assessment. technical report series No.8. Australia New Zealand Food Authority. In: http://www.anzfa.gov.au.

9. Basri, Z. (2005). Trangene Inheritance in Transgenic Wheat. JMS Journal, 10: 1-9.

10. Becerril, J.M., S.O. Duke, and J. Lydon. (1989). Glyphosate effects on shikimate pathway products in leaves and flowers of velvetleaf. Phytochemistry 28:695-699.

11. Comai L.,Facciotti D., Hiatt W.R. and Stalker D.M. (1985). Expression in plants of amutant aro A gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate. Nature 317(24):741-744.

12. Daniell H. (1999). The next generation of genetically engineered crops for herbicide and insect resistance: containment of gene pollution and resistant insects. AgBiotechNet , Vol. 1 August, ABN 024

Archive of SID
www.SID.ir

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

14. Doyle, J. J. and Doyle, J. L.(1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13-15

15. Franz J.E., Mao M.K. and Siroski J.A. (1997). Glyphosate, molecular mode of action. In Glyphosate: A unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington DC. P 521-642.

16. Jonoubi, P., Mousavi,A., Majd,A., Salmanian A.H., Jalali Javaran, ,M., Daneshian, J. (2005) Efficient regeneration of Brassica napus L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens* -Biologia Plantarum, 49(2),pp:175-180

17. Kahrizi, D., Salmanian, A.H., Afshari A., Mousavi, A., Moeini, A., (2007) Simultaneous Substitution of Glycin-96 to Alanine and Alanine-183 to Threonine in 5-enolpyruvylshikimste 3-phoshpate synthase Gene of *E. coli* (k12) and Transformation of Rapeseed (*Brassica napus*) in Order to Make tolerance to Glyphosate . Plant Cell Reports 26(1): 94-105

18. Murashig, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497

19. Nagaya, S. Kato, K., Ninomiya, Y., Horie, R., Sekine, M., Yoshida, K. and Shinmyo, A. (2005). Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. Plant and Cell Physiology, 2: 1-25.

20. Powles, S.B. and Holtum, J.A.M.,(Eds.).(1994). Herbicide Resistance in Plants: Biology and Biochemistry. Lewis, Boca Raton, 353 pages

21. Radonic, L.M., Zimmermann, J.M., Zavallo, D., López, N. and Bilbao, M. L. (2006). Rooting in Km selective media as efficient *in vitro* selection method for sunflower genetic transformation. Journal of Biotechnology, 9: 315- 319.

22 Salmanian, A.H., Zakikhan, K., Afshari, A., Moshashaie, M., Jafari, M., and Mousavi, A. (2006). Site-directed mutagenesis, expression and biological activity of *E. coli* 5- Enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase gene. Iranian J. Biotechnology, 4(4), 224-229

23. 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

24. Thomas E. Clementea, Bradley J. LaValleeb, Arlene R. Howeb, Dannette Conner-Wardb, (2000) . Progeny Analysis of Glyphosate Selected Transgenic Soybeans Derived from Agrobacterium-Mediated Transformation. Cell Bio & Mol Genetics. 40:797-803

25. Wang, YX. Jones, JD. Weller, SC. Goldsbrough, PB. (1995). Expression and stability of amplified genes encoding 5-enolpyrovilshikimate-3-phosphate synthase in glyphosate- tolerant tobacco cells. Plant Mol Biol. 17(6):1127-1138.

Archive of SID

www.SID.ir

Investigation on Inheritance of Glyphosate tolerance in T1 Generation of Transgenic Rapeseed (*Brassica napus* L.) with the mutated bacterial *EPSPS* gene

Tajrishi M.M.[1, 2] ,Salmanian A.H.[1*], Mousavi A.[1], and Kahrizi D.[3]

[1] National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

[2] Khatam University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Biotechnology for Abiotic Stresses Research Dept., Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, I.R. of Iran

Abstract

In transgenic plants, the faithful inheritance and expression of transgenes are particularly important properties. In this study analyses were performed on seeds that produced by T0 glyphosate-tolerant rapeseed plants. The T0 generation plants contains a mutated EPSPS gene that has a highly linked with *npt*II gene. These seed screened on MS medium containing 15 mgL^{-1} kanamycin and explants with green leaves and expanded roots considered as tolerant plants. Results showed that mutated *EPSPS* gene expresses in T1 canola plants decrease the harmful consequences of glyphosate. The statistical χ^2 analysis (p-value 0.05) revealed that the segregation of the transgenes to T1 progeny suggested a Mendelian pattern as single dominant locus. In molecular analysis, the presence and transcription of *EPSPS* genes studied by PCR and RT-PCR, respectively. The T1 plants were fully fertile, with no apparent phenotypic abnormalities .

Keywords: Rapeseed, Glyphosate, mutated EPSPS, transgene stability

Archive of SID

www.SID.ir