Archive OF SID

مجله علمی – پژوهشی دانشگاه اصفهان (علوم پایه)
جلد سی و پنجم، شماره ٦، سال ١٣٨٧
صص ٧٤-٥٩

تراریختی کلزا(*Brassica napus*) با ژن ۵- انول پیرووِیل شیکیمات -۳- فسفات سنتاز (EPSPS) با منشأ آرابیدوپسیس در راستای ایجاد مقاومت به علف‌کش گلیفوسیت

پریسا جنوبی*، امیر موسوی، روژان شیخانی** و علی هاتف سلمانیان****

* دانشگاه تربیت معلم، دانشکده علوم

** پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

یک راهکار نوین برای مقابله با علف‌های هرز، تولید گیاهان مقاوم به علف کش است. گلیفوسیت به عنوان یک علف کش وسیع الطیف با مهار آنزیم ۵- انول پیرووِیل شیکیمات-۳- فسفات سنتاز (EPSPS) باعث مسدود شدن مسیر شیکیمات در گیاهان می گردد. با افزایش میزان تولید آنزیم EPSPS در گیاهان زراعی، می توان مقاومت به این علف کش را ایجاد نمود. برای این منظور cDNA ژن EPSPS از منشأ گیاه *Arabidopsis thaliana* در ناقل دوگانه pBI121 تحت کنترل پروموتر فعال CaMV35S همسانه سازی شد. قطعات T-DNA حاوی ژن‌های At EPSPS و *NPT II* از طریق *Agrobacterium tumefaciens* به جداکشت‌های برگ های لپه ای گیاه کلزا(*B. napuss*) منتقل شدند. گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین به منظور بررسی انتقال و بیان ژن At EPSPS مورد ارزیابی مولکولی از طریق PCR، DNA Dot Blotting و RT-PCR قرار گرفتند. بذور حاصل از گیاهان تراریخت کشت شد و حضور و بیان ژن At EPSPS در گیاهان نسل T1تایید گردید. گیاهان شاهد و تراریخت شده T0 و T1 توسط غلظت های ۰ ، ۲/۵و۵ میلی مولار گلیفوسیت دوبار به فاصله یک هفته تیمار شده، پس از دوهفته مورد ارزیابی فنوتیپی و آزمون بیوشیمیایی قرار گرفتند. نتایج حاکی از انتقال، بیان و ایجاد مقاومت به گلیفوسیت در گیاهان تراریخت شده T0و T1 بود.

واژه‌های کلیدی: برگهای لپه‌ای، اگروباکتریوم، شیکیمات

www.SID.ir

Archive OF SID

مقدمه:

به کارگیری راهکارهای مهندسی ژنتیک و زیست فناوری مدرن امکان جدیدی را در اختیار محققان قرار داده است تا بتوانند موجبات ارتقای کمی و کیفی محصولات کشاورزی و بهبود ویژگی های زراعی آنها را فراهم آورند. در میان گیاهان زراعی مهم، کلزا (*Brassica napus* L.) پس از سویا، دومین گیاه روغنی جهان به شمار می رود. با توجه به واردات بیش از ۸۰٪ روغن مورد نیاز کشور، بهبود و توسعه گیاهان روغنی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. تولید گیاهان تراریخت شده با ایجاد صفات جدیدی، مانند: مقاومت در برابر آفات و بیماری ها، علف کش ها، تنشهای غیر زیستی و بهبود کیفیت محصول گام موثری در اصلاح گیاهان زراعی برداشته است.

وجود علف های هرز که در کنترل های نامناسب ۲۵ تا ۵۰ درصد عملکرد را کاهش می دهد، یکی از معضلات کشت کلزا است. تولید گیاهان کلزای مقاوم به علف کش گلیفوسیت که علاوه بر طیف گسترده عملکرد، تأثیرات زیان بار اندک زیست-محیطی به دنبال دارد، فواید مدیریتی و زراعی، از جمله حفاظت بهتر از خاک، نگهداری آب در خاک، کنترل مناسب علف های هرز و تسهیل در شخم را به دنبال خواهد داشت . گلیفوسیت با تأثیر بر مسیر شیکیمات و هدف قرار دادن آنزیم ۵- انول پیرویل شیکیمات-۳- فسفات سنتاز (EPSPS) باعث متوقف شدن مسیر متابولیکی شیکیمات و اختلال در ساخته شدن آمینواسید های حلقوی و ترکیبات آروماتیک می گردد. این آنزیم در گیاهان عالی، جلبکها، قارچ ها و باکتری ها فعال بوده، در پستانداران، ماهی‌ها، پرندگان، خزندگان و حشرات وجود ندارد (Jakeman *et al*.,1998) و در نتیجه استفاده از ژن‌های خارجی EPSPS برای مقاوم سازی گیاهان زراعی به این علف‌کش موجب اختلال در مسیرهای بیوشیمیایی جانوران نمی‌گردد.

روشهای کلاسیک به نژادی و به زراعی در تولید گیاهان مقاوم به گلیفوسیت موفق نبوده اند. مطالعه مکانیسم مقاومت به گلیفوسیت در برخی بیوتیپ‌های گیاهی مقاوم به این علف کش، نشان دهندهٔ افزایش سطح بیان این آنزیم در گیاهان مقاوم است (Powles *et al*., 1998; Lee and Nigm, 2000). همچنین وجود انواع آنزیم های جهش یافته دراین گیاهان نیز گزارش شده است که میل ترکیبی کمتری با گلیفوسیت را نشان می‌دهند (Baerson *et al*., 2002). از این رو می‌توان با ایجاد جهش های نقطه ای باعث ایجاد مقاومت در گیاهان گردید (Chen *et al*., 1999; Kahrizi *et al*. 2005). باتوجه به وجود مشکلات تکنیکی در ایجاد جهش نقطه ای، به نظر می رسد با افزایش سطح بیان ژن با استفاده از قرار دهی پروموترهای فعال بتوان موجب افزایش بیان آنزیم EPSPS شد (Shah *et al*., 1986; Morgan *et al*.,2002). در تحقیق حاضر، cDNA ژن EPSPS جدا شده از گیاه *Arabidopsis thaliana* که تحت کنترل پروموتر فعال 35S ویروس موزاییک گل کلم قرار داده شده بود، توسط آگروباکتریوم به جداکشت های برگهای لپه ای گیاه کلزا منتقل شد. گیاهان سبز مقاوم به کانامایسین در شرایط گلخانه تولید گل و بذر نمودند و به منظور تایید انتقال و بیان ژن خارجی At EPSPS مورد ارزیابی مولکولی قرار گرفتند.

www.SID.ir

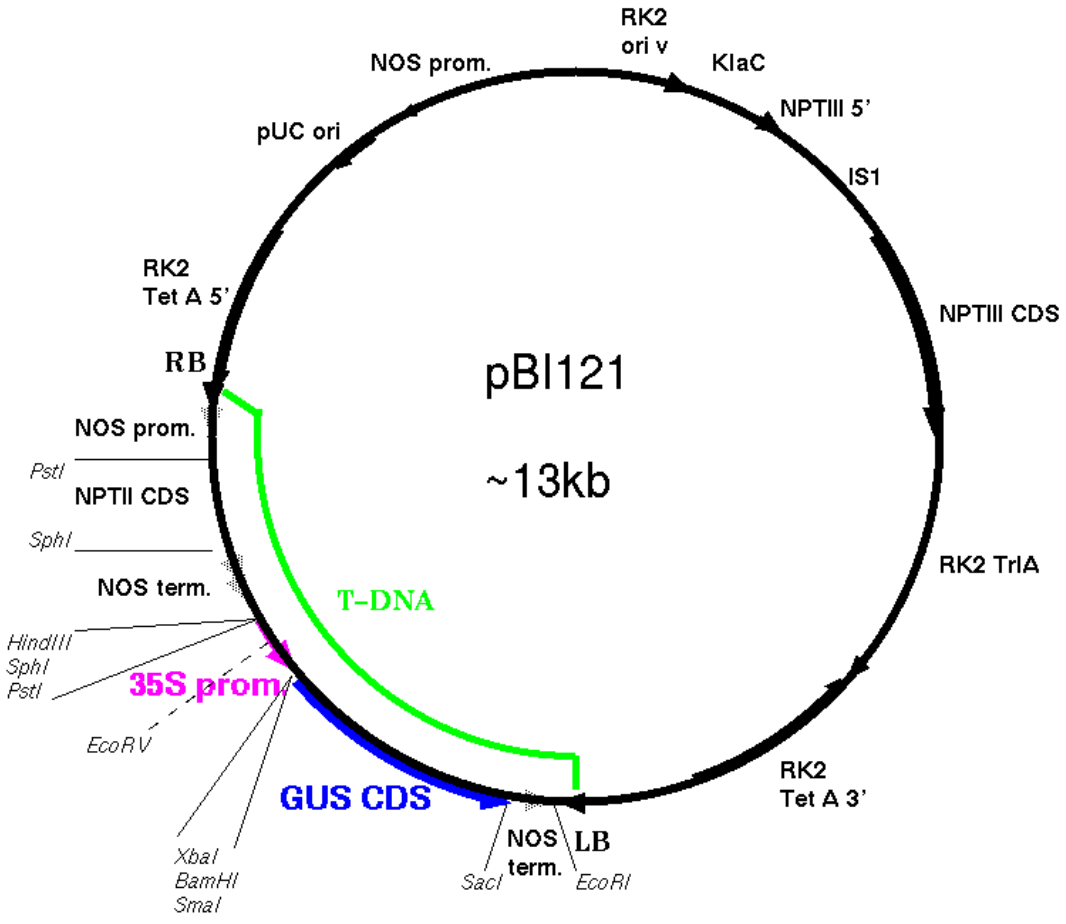
Archive OF SID

مواد و روش ها

۱-۲: تراریختی توسط اگروباکتریوم

۱-۱-۲: همسانه سازی قطعه ژنی **At EPSPS در اگروباکتریوم**

از cDNA ژن At EPSPS که از ژنوم گیاه *Arabidopsis thaliana* استخراج شده بود و در پلاسمید pBluescripte(pSK+) همسانه سازی گردیده بود (سلمانیان و مشعشعی، ۱۳۷۹) استفاده شد. برای انتقال ژن به گیاه، قطعه ژنی مورد نظر به ناقل pBI121 (Clontech) منتقل گردید. برای این منظور، هر دو پلاسمید تحت هضم دوگانه با آنزیمهای *Sma*I و *Sac*I قرار گرفتند. به این ترتیب ژن *GUS* از وکتور حذف گردید. اتصال ناقل و قطعه ژن توسط آنزیم DNA T4 Ligase صورت گرفت. سپس ناقل نوترکیب به دست آمده به سلول‌های مستعد شده *E. coli* از طریق روش شوک گرمایی (Sambrook and Russell, 2001) منتقل شد. از کلنی‌های مقاوم به کانامایسین کشت شبانه داده شد و استخراج پلاسمید انجام گرفت.



GUS fusion junction:

Sma1 Xba1 BamH1

AAG CTT GCA TGC CTG CAG GTC GAC TCT AGA GGA TCC CCG GGT
GGT CAG TCC CTT ATG TTA...

ساختمان و جایگاههای برش آنزیمهای محدودگر پلاسمید pBI121
(http://www.umanitoba.ca/faculties/afs/plant.htm)

www.SID.ir

Archive OF SID

برای تأیید ورود قطعه ژن At EPSPS به درون ناقل، هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر *Xba*I انجام شد. برای تعیین جهت یابی صحیح ورود قطعه ژن مورد نظر و ناقل، هضم آنزیمی با آنزیم *Bam*HI صورت پذیرفت. در ادامه این ناقل به روش انجماد و ذوب کردن (Sambrook and Russell, 2001) به سلولهای مستعد شده اگروباکتریوم سویه‌های LBA4404 و C58pGV3101 منتقل شد. از باکتریهای مقاوم به کانامایسین که حاوی پلاسمید نوترکیب بودند، کشت شبانه تهیه شد و از آنها برای تراریخت کردن گیاهان استفاده شد.

۲-۱-۲: تراریختی جداکشتهای برگهای لپه ای با اگروباکتریوم

در این تحقیق از دانه های کلزا (*Brassica napus* L.) رقم PF 7045/91 استفاده شد. بذور سترون سازی شده در محیط جوانه زنی (GM)[1] که دارای محیط کشت MS (Murashige and Skoog, 1962) با غلظت ۵۰ درصد و بدون هورمونهای گیاهی بود، کشت شدند و در گلخانه با طول روز ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۰-۵۰ $\mu Em^{-2}s^{-1}$ در دمای ۲ درجه‌سانتیگراد ۲۵ نگهداری شدند.

از آگروباکتریوم های دارای ناقل pBI121 حاوی ژنهای *NPTII* و EPSPS At کشت شبانه در محیط LB[2] مایع دارای ۵۰mg/l کانامایسین در دمای ۲۸ درجه‌سانتیگراد بر روی شیکر ۱۸۰ rpm انجام شد. زمانی که تعداد سلولهای باکتری در حدود $۱/۲ \times ۱۰^{۹}$ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت بود (OD_{650}=۱)، محیط LB با سانتریفوژ ۳۰۰۰ rpm در دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه حذف گردید. ته‌نشست سلولهای باکتری در محیط آغشتگی آگروباکتریوم[3] که شامل نمکهای MS همراه با ۵٪ گلوکز و pH: ۵/۲ بود، به صورت سوسپانسیون درآمد و در تراریختی جداکشتها استفاده گردید. از دانه رستهای هفت روزه با حذف جوانه انتهایی جداکشت‌های برگ‌های لپه‌ای با طول دمبرگ ۵ تا ۷ mm جدا شدند. قاعده دمبرگهای لپه‌ای به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه به سوسپانسیون سلول باکتری آغشته شدند؛ به گونه ای که پهنک برگها آلوده نگردد. پس از خشک کردن برگها بر روی کاغذ خشک کن سترون، قاعده دمبرگها در محیط MS با pH= ۵/۲ فاقد هورمون به مدت ٤٨ ساعت در شرایط تاریکی و دمای حدود ۲۸ درجه سانتیگراد در گلخانه قرار گرفت. پس از مرحله هم‌کشتی، جداکشتها مستقیماً یا پس از شستشو با محلول دارای آنتی بیوتیک سفوتاکسیم با غلظت ۲۰۰ به محیط القای شاخه زایی(SIM)[4] حاوی محیط کشت MS، ۱/۵ mg/L بنزیل آدنین، $g\ l^{-1}$ ۳۰ ساکارز، ۷ g/l آگار، pH=۸ حاوی ۱۵mg/l کانامایسین منتقل شدند و هر دو هفته به محیط جدید مشابه واکشت شدند. پس از شش هفته شاخه های سبز مقاوم به کانامایسین از جداکشت‌های برگ های لپه‌ای جدا شدند و به محیط بلوغ شاخه(SMM)[5] دارای نمکهای محیط MS، ۲۰g/l ساکارز، ۷ g/l آگار، pH=۵/۸ دارای سفوتاکسیم و ۱۵ mg/l کانامایسین واکشت گردیدند. پس از ١٤ روز شاخه‌های سبز به محیط القای ریشه زایی(RIM)[6] حاوی محیط کشت MS، ۲ mg/l ایندول بوتیویک اسید، ۲۰g/l

1. Germination Medium
2. Luria Bertani
3.Agrobacterium infection medium
4.Shoot Induction Medium
5. Shoot Maturation Medium
6.Root Induction Medium

www.SID.ir

Archive OF SID

ساکارز، ٦ g/l آگار و pH= ۵/۸ غنی شده با سفوتاکسیم و ۱۵ mg/l کانامایسین منتقل شدند. شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین که قادر بودند در محیط ریشه زایی تولید ریشه نمایند، پس از رشد و توسعه ریشه به گلدان‌های حاوی ورمیکولیت و سپس به مخلوط ورمیکولیت و خاک منتقل شدند و پس از بهاره سازی در ٤ درجه سانتیگراد به مدت یک ماه، به گلخانه ۲۵ درجه سانتیگراد منتقل و تا زمان بذردهی در آنجا نگهداری شدند و تولید گل و بذر نمودند. از کشت بذور حاصل از گیاهان T0 برای تولید گیاهان نسل T1 استفاده شد. گیاهان حاصل در شرایط گلخانه تولید گل و بذر نمودند.

۲-۲: بررسی مولکولی گیاهان تراریخت شده

۲-۲-۱: تأیید حضور تراژن با واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

از گیاهان سبز شاهد و تراریخت شده استخراج DNA ژنومی به روش (Murray CTAB and Thaompson,1980) صورت گرفت. برای حصول اطمینان از انتقال ژن مورد نظر به درون ژنوم گیاهان تراریخت شده، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مورد نظر

EPS3

5′ - GTTTCTAGAATGGGCGCAAGTTAGCAGA - 3′
(Xba I, start)

و EPS4

5′ - GAGTTTCTAGATTAGTGCTTTGTGATTCT - 3′
(Xba I, stop)

PCR

انجام گرفت. دمای Tm آغازگرها برابر با ٦٢/٩و ۵۵/۵ درجه سانتیگراد بود که بر این اساس دماهای ۵۷، ۵۹، ٦١، ٦٣ و ٦۵ درجه سانتیگراد مورد بررسی گردید و دمای ٦٣ درجه سانتیگراد به عنوان دمای اتصال بهینه انتخاب شد. همچنین از روش Touch up که به ازای هر دور ۰/۵ درجه سانتیگراد به دمای ۵۸ درجه سانتیگراد اضافه می‌شد نیز استفاده شد و دمای ٦٣ درجه سانتیگراد به عنوان دمای بهینه به دست آمد.

۲-۲-۲: لکه گذاری نقطه ای DNA

به منظور حصول اطمینان از حضور ژن خارجی At EPSPS در گیاهان تراریخت شده، پس از استخراج DNA ژنومی، مبادرت به انجام لکه گذاری نقطه‌ای DNA شد. برای تهیه کاوشگر، با کمک آغازگرهای اختصاصی ژن At EPSPS، واکنش PCR در شرایط بهینه انجام گرفت. پس از تهیه قطعه مورد نظر، با استفاده از کیت DIG DNA Labeling (Cat.No. 1093657, Roche) کاوشگر نشاندار شد و اقدام به انجام لکه گذاری نقطه‌ای به روش معمول (Sambrook and Russell , 2001) گردید. مقدار ۵۰ µg از DNA ژنومی گیاهان شاهد و تراریخت شده در هر لکه استفاده شد. از ناقل پلاسمیدی حاوی ژن به عنوان کنترل مثبت و از گیاهان تراریخت نشده به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

۲-۲-۳: انجام RT- PCR

به منظور تأیید بیان ژن EPSPS خارجی در گیاهان تراریخت شده از آزمون RT-PCR استفاده شد. بدین منظور، از گیاهان تراریخت شده با ژن At EPSPS موجود در گلدان، بافت تازه برگی برداشت شد و RNA تام به کمک کیت RNeasy Mini Kit (QIAGEN)، استخراج گردید.

www.SID.ir

Archive OF SID

در ابتدا با استفاده از Oligo dT مبادرت به ساخت cDNA تک رشته‌ای شد؛ به این ترتیب که به ازای ۱ µg از RNA استخراج شده، ۵۰ پیکومول Oligo dT استفاده شد و با آب DEPC حجم واکنش به ۷µl رسید. محلول ۱۰ دقیقه در دمای ٦۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت. پس از زمان مذکور، محلول سریعاً بر روی یخ سرد شد. سپس محلول زیر ٤µl بافر(۵x)، (۱dNTP mM)، dTT (۱۰µM)، آنزیم Reverse (RT) Transcriptase (1U) تهیه شد و حجم نهایی با آب DEPC به ۱۰µl رسید. محلول فوق به مدت ٦۰ دقیقه در دمای ٤۲ درجه سانتیگراد قرار گرفت تا آنزیم RT از روی کل mRNA ها مبادرت به ساختن cDNA نماید.

پس از ساخت cDNAهای تک رشته‌ای، از این زنجیره به عنوان الگو برای ساخت cDNA دو رشته‌ای و تکثیر آنها توسط PCR و تایید بیان ژن At EPSPS خارجی در گیاهان تراریخت شده استفاده شد. شرایط PCR برای ساخت cDNA دو رشته ای به صورت زیر بهینه سازی شد . غلظت $MgCl_2$ برابر ۳mM به کار رفت . زمان مرحله طویل شدن یک دقیقه و سی ثانیه در نظر گرفته شد. با توجه به T_mپرایمر EPS4 ، شیب دمایی از ۵۸ تا ٦۵°C با دستگاه PCR Gradient ارزیابی شد و بهترین دمای اتصال، ٦۳°C به دست آمد.

٤-۲-۲:آزمون فنوتیپی و بیوشیمیایی گیاهان تراریخت شده در حضور گلیفوسیت

به منظور بررسی پاسخ گیاهان در یافت کننده ژن At EPSPS وارزیابی میزان مقاومت به گلیفوسیت، اقدام به اعمال تیمار گلیفوسیت به گیاهان تراریخت شده T0 , T1 و شاهد گردید. برای این منظور، محلول های با غلظت ۰، ۵/۲، ۵ میلی مولار گلایفوسیت تهیه و با مه پاش دستی به صورت یکنواخت و به میزان معادل به گیاهان شاهد و تراریخت شده هم سن و ایزوله هر کدام پنج گلدان ، محلول پاشی شد. یک هفته پس از اولین تیمار، به همین صورت دوباره محلول پاشی انجام شد. دو هفته بعد ارزیابی های فنوتیپی و بیوشیمیایی صورت گرفت.

برای انجام آزمون بیوشیمیایی ابتدا منحنی کالیبراسیون با استفاده از جذب مقادیر ۲۰، ۵۰، ۸۰، ۱٤۰، ۲۰۰ میکرولیتر شیکیمات استاندارد در ۳۸۲ نانومتر تهیه شد. سپس به دنبال محلول پاشی گلیفوسیت گیاهان تراریخت اقدام به جداسازی سوبسترای شیکیمات با روش استاندارد (Cromartic and Polge, 2002) از طریق اکسیداسیون با مواد اسید پریدیک و نمک پریدات سدیم ، تثبیت عصاره توسط محلول :NaOH $NaSO_3$ و در نهایت، کمی سنجی آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۳۸۲ نانومتر گردید.

نتایج

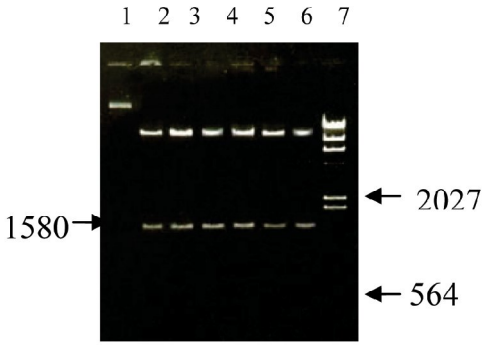
۳-۱: همسانه سازی ساختار ژنی At EPSPS و تراریختی گیاهان با اگروباکتریوم

پس از انتقال ژن At EPSPS از پلاسمید pSK+ به ناقل دوتایی pBI121 برای اطمینان از ورود قطعه ژن At EPSPS به ناقل، هضم آنزیمی با آنزیم محدودگر *Xba*I انجام شد (شکل-۱). از ناقلهایی که دارای قطعه مورد نظر بودند، برای تایید جهت یابی صحیح ژن، هضم آنزیمی با آنزیم

www.SID.ir

Archive OF SID

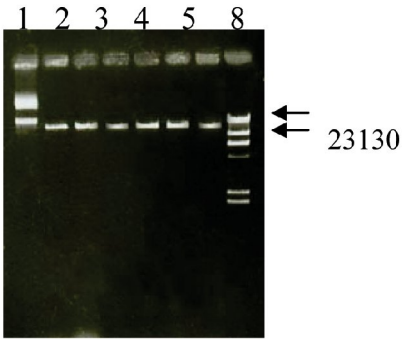
محدودگر *Xba*I انجام شد (شکل-۱). از ناقلهایی که دارای قطعه مورد نظر بودند، برای تایید جهت یابی صحیح ژن، هضم آنزیمی با آنزیم *Bam*HI انجام گرفت. درصورتی که قطعه به صورت مستقیم[1] در ناقل کلون شده باشد، تولید دو قطعه با اندازه های حدود ۱۲۳۰۰ bp و ٤۰۰ bp انتظار می‌رفت و اگر قطعه به صورت معکوس[2] در ناقل قرار گرفته بود، قطعاتی با اندازه های bp ۱۱۲۰۰، ۱۲۰۰ bp و ۳۲۰ bp قابل پیش‌بینی بود. پس از هضم آنزیمی در الکتروفورز محصول واکنش ۱۲۰۰bp قطعه µl مشاهده نشد که این امر نشان دهندهٔ استقرار مستقیم ژن در جایگاه آنزیمی بود (شکل-۲). از ناقلهایی که نحوه جهت یابی مستقیم آنها تأیید شده بود، برای تراریختی اگروباکتریوم استفاده شد. از باکتریهایی که در محیط انتخاب رشد یافته و دارای ناقل pBI121 بودند و ژن *NPT II* آنها بیان شده بود و مقاومت به کانامایسین را نشان داده بودند، برای تراریخت کردن گیاهان استفاده شد.



شکل- ۱: هضم آنزیمی ناقل pBI 121 دارای ژن At EPSPS با آنزیم محدودگر *Xba*I.

چاهک ۱:ناقل هضم و چاهک ۸: نشانگر مولکولی Roche II

چاهکهای۲تا۷: ناقلهای هضم شده،حضور قطعه حدود ۱۵۰۰bp نشانگر ورود ژن At EPSPS ناقلها است.



شکل – ۲: جهت یابی استقرار ژن At EPSPS در ناقل pBI 121 با هضم آنزیمی توسط آنزیم محدودگر *Bam*HI .

چاهک۱: ناقل هضم نشده و چاهک ۸: نشانگر مولکولیRoche II

چاهکهای ۲ تا٦: عدم ظهور قطعه bp ۱۲۰۰ نشانگر استقرار مستقیم قطعه ژن At EPSPS در ناقل است.

1. Right
2. Reverse

www.SID.ir

Archive OF SID

۲-۳: تراریختی جداکشت های برگهای لپه ای

جداکشت های برگ های لپه ای از برش قاعده دمبرگ برگهای لپه ای و حذف مریستم انتهایی به دست آمدند. در تهیه این جداکشت ها نیاز به دقت فراوان بود تا بخشی از توده مریستم انتهایی در قاعده دمبرگ باقی نماند، چرا که پس از چند روز رشد یافته، شاخه هایی را به وجود خواهد آورد که تراریخت نبوده، در حضور کانامایسین محیط حذف می‌شدند. از سوی دیگر، حذف سلول های قاعده دمبرگ که از توان باززایی بالایی برخوردار بودند نیز باعث عدم شاخه زایی و کاهش تراریختی می گردید. پس آغشتگی جداکشت ها توسط آگروباکتریوم، سلولهای زخمی قاعده دمبرگ هایی که با دریافت T-DNA ژن *NPT II* در آنها بیان شده بود، در محیط SIM دارای ۱۵mg/l کانامایسین مقاومت کرده، سبز باقی ماندند، در حالی که شاخه های غیر تراریخت با شکل غیر طبیعی به رنگ سفید و یا ارغوانی درآمدند(شکل۳). شاخه‌های سبز مقاوم به کانامایسین از جداکشت های برگهای لپه ای جدا گردید، به محیط SMM منتقل شدند که پس از رشد و توسعه شاخه‌ها، نمونه‌ها به محیط RIM حاوی ۱۵mg/l کانامایسین واکشت شدند و تولید ریشه نمودند(شکل ٤).

گیاهان تراریخت شده مقاوم به کانامایسین که در محیط RIM قادر به تولید ریشه بودند، به گلدان منتقل شدند و پس از بهاره شدن تولید گل نمودند. گیاهان گلدار تا زمان رسیدگی بذرها در شرایط گلخانه نگهداری شدند و پس از انجام خودگشنی تولید بذر نمودند(شکل۵). بذرهای حاصل در شرایط گلخانه کشت گردید و گیاهان تولید شده قادر به تشکیل گل و بذر بودند.

شکل-۳: باززایی گیاهچه از جداکشت‌های برگ لپه‌ای تلقیح شده با اگروباکتریوم حاوی ژن At EPSPS در محیط انتخاب حاوی کانامایسین. گیاهان تراریخت نشده در حضور کانامایسین به رنگ سفید یا ارغوانی در آمدند، در حالی که گیاهان تراریخت شده در حضور کانامایسن به رنگ سبز باقی می مانند.

www.SID.ir

Archive OF SID

شکل-٤: گیاه تراریخت شده با ژنهای At EPSPS و *NPT II* مقاوم به کانامایسین در محیط ریشه زایی.

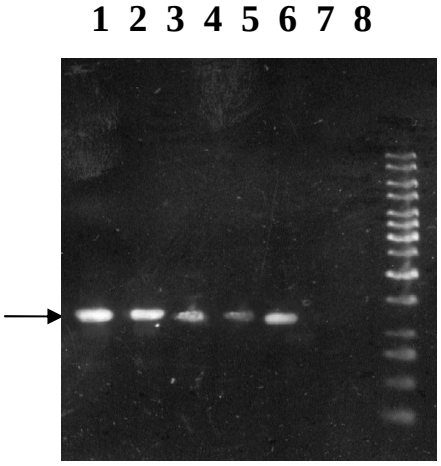
شکل - ٥: تشکیل گل و خورجین در گیاهان کلزای تراریخت شده با ژن At EPSPS در شرایط گلخانه

۳-۳: تایید انتقال ژن At EPSPS با استفاده از PCR و لکه گذاری نقطه ای

ژن At EPSPS با اندازه ۱۵۸٤bp توسط اگروباکتریوم به ژنوم گیاه کلزا منتقل شد. برای تایید حضور قطعه ژنی در گیاهان تراریخت شده استخراج DNA ژنومی صورت گرفت و فرآیند PCR با آغازگر اختصاصی EPS3 و EPS4 انجام شد. الکتروفورز محصول PCR، قطعه ۱۵۰۰ bp مربوط به At EPSPS را نشان داد(شکل-٦).

www.SID.ir

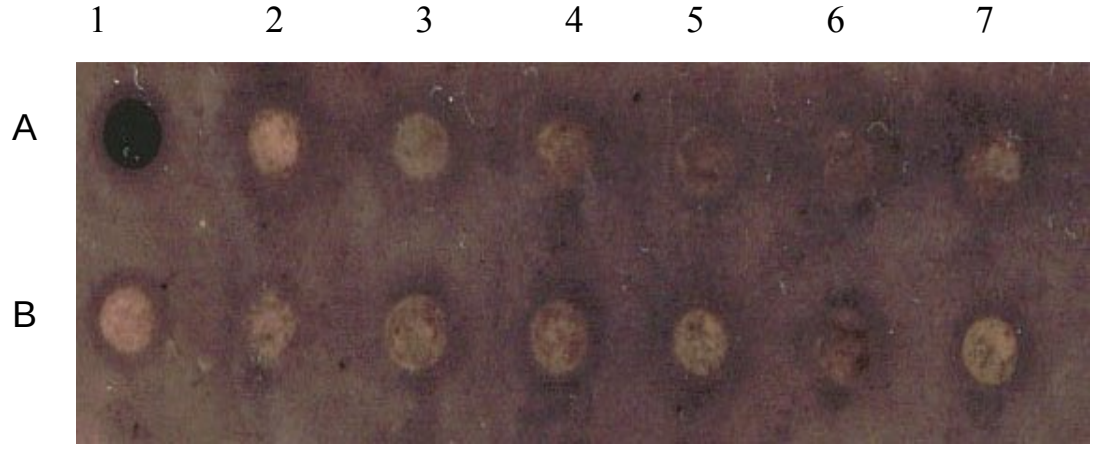
Archive OF SID



شکل- ٦: الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR. حضور قطعه حدود ۱۵۰۰bp نشانگر ورود ژن At EPSPS در ژنوم گیاهان تراریخت شده است.

چاهک ۱: کنترل مثبت، ناقل pBI121 دارای ژنAt EPSPS، چاهک‌های ۲ تا ۵: گیاهان تراریخت شده، چاهک ٦: گیاه شاهدغیرتراریخت، چاهک۷: کنترل منفی، نمونه بدون DNA و چاهک ۸: نشانگر مولکولی Gene Ruler 1kb (Fermentas)

برای اطمینان از ورود قطعه ژنی At EPSPS به گیاهان مقاوم به کانامایسین، اقدام به انجام لکه گذاری نقطه ای DNA شد. تهیه کاوشگر با محصول PCR ژن هدف انجام شد. انجام لکه‌گذاری نقطه‌ای با این کاوشگر به آشکار شدن لکه های مربوط به ژن At EPSPS در گیاهان تراریخت شده منجر گردید(شکل ۷).



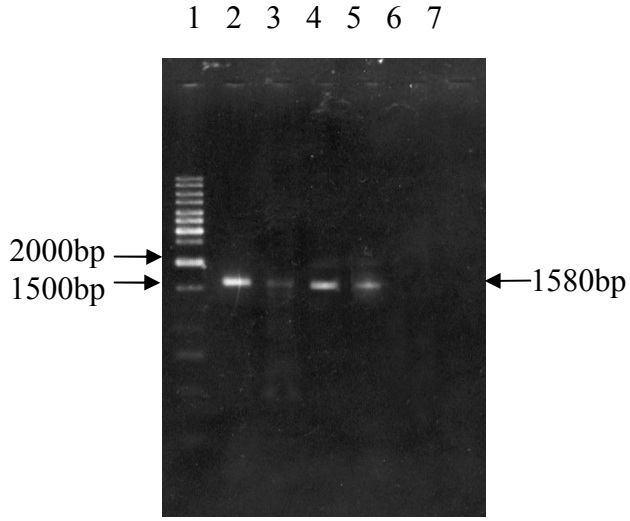
شکل-۷: لکه گذاری نقطه‌ای ژن At EPSPS. نقطه A1 : کنترل مثبت شامل ناقل pBI121 دارای ژن At EPSPS، نقطه‌های A_4، A_5، A_6 و B_6: DNA ژنومی گیاهان تراریخت شده، نقطه B_7: کنترل منفی(گیاه شاهدغیرتراریخت).

www.SID.ir

Archive OF SID

٤-۳: بررسی بیان ژن At EPSPS با RT – PCR

ساختار ژنی At EPSPS که از گیاه آرابیدوپسیس استخراج شده و به گیاه کلزا منتقل شده بود، در ژنوم کلزا وجود ندارد. از این رو حضور mRNA مربوط به آن نشان دهندهٔ بیان ژن خارجی At EPSPS در گیاهان تراریخت است. ظهور باند 1850bp در گیاهان تراریخت شده نشان دهندهٔ بیان ژن At EPSPS در این گیاهان بود(شکل-۸).



شکل- ۸: الکتروفورز ژل آگارز محصول RT- PCR ژن At EPSPS ظهور باند حدود ۱۵۸۰bp نشانگر بیان ژن در گیاهان تراریخت شده است.

چاهک ۲: کنترل مثبت، pBI121 دارای ژنAt EPSPS، چاهک ۳تا۵: گیاهان تراریخت شده، چاهک ٦: گیاه شاهدغیرتراریخت، چاهک۷: کنترل منفی، نمونه بدون DNA، چاهک۱: نشانگر مولکولی Gene Ruler 1kb (Fermentas)

۵-۳: بررسی فنوتیپی گیاهان تراریخت شده پس از تیمار گلیفوسیت

برای بررسی مقاومت به علف کش گلیفوسیت در شرایط گلخانه ای، پس از محلول پاشی با غلظت‌های مختلف گلیفوسیت در دو مرحله، میزان پژمردگی و وضعیت ظاهری گیاهان ارزیابی گردید. گیاهان شاهد همگی پس از اعمال تیمار اولیه گلیفوسیت زرد و پژمرده شده، در نهایت از بین رفتند، در حالی که گیاهان تراریخت شده پس از مراحل محلول پاشی، گرچه متحمل خساراتی شدند، اما در نهایت زنده مانده و قادر به ادامه رشد بودند(شکل-۹). همان گونه که در جدول -۱ مشاهده می گردد،گیاهانT1 تیمار شده با غلظت ۵ میلی مولار متحمل خسارات شدید تری شدند، با وجود این، توانستند با حفظ برگ های جوان و مریستم انتهایی خسارت وارده را تحمل کنند و ضمن تولید برگ های جدید، به رشد خود ادامه دهند.

www.SID.ir

Archive OF SID

b a

شکل ۹- وضعیت گیاهان تراریخت کلزا حاوی تراژن At EPSPS (***a***) و گیاه شاهد (***b***) پس از اسپری با ۵ میلی مولار گلیفوسیت.

جدول۱- نتایج حاصل از آزمون زیستی گیاهان نسل اول(T0)، نسل دوم(T1) و شاهد (Wt) توسط غلظت های مختلف علف کش گلایفوسیت.

لاین	تعداد گیاه حساس (۰mM)	تعداد گیاه مقاوم (۰mM)	تعدادگیاه حساس (۲/۵mM)	تعدادگیاه مقاوم (۲/۵mM)	تعدادگیاه حساس (۵mM)	تعدادگیاه مقاوم (۵mM)
T_1 (At)	صفر	۵	۲	۳	٤	۱
T_0 (At)	صفر	۵	٤	۱	۵	صفر
Wt	صفر	۵	۵	صفر	۵	صفر

٦-۳: آنالیز بیوشیمیایی گیاهان تراریخت شده پس از تیمار گلیفوسیت

یکی از روشهای ارزیابی میزان فعالیت آنزیم، بررسی مقدار سوبسترا پس از عملکرد آنزیم است (Zelaya *et al.* , 2004). بر این اساس، انتظار می رود که در نمونه های تراریخت شده، از آنجایی که میزان بیان آنزیم EPSPS در آنها افزایش یافته است ، سطح سوبسترای شیکیمات پس از اعمال تیمار گلیفوسیت نسبت به شاهد کاهش یابد، در حالی که در نمونه های شاهد به علت بازدارندگی آنزیم توسط گلیفوسیت، شیکیمات تجمع می یابد. به منظور ارزیابی مقدار شیکیمات ، در ابتدا پس از اکسیداسیون مقادیر مختلف شیکیمات استاندارد و قرائت جذب شیکیمات در طول موج ۳۸۰ نانومتر ، اقدام به تهیه منحنی استندارد جذب شیکیمات گردید. در گام بعدی، پس از استخراج شیکیمات از نمونه‌های گیاهان شاهد و تراریخت شده T0و T1 جذب عصاره‌های اکسید شده در۳۸۰ نانومتر

www.SID.ir

Archive OF SID

خوانده شد و بر اساس منحنی استاندارد و معادله حاصل مقدار شیکیمات در کلیه نمونه ها ارزیابی شد. نتایج نشان داد که میزان سوبسترای شیکیمات در گیاهان شاهد که آنزیم EPSPS موجود در آنها توسط علف کش گلیفوسیت مهار گردیده است ۳۵۵/٤۷ میکرو مولار بود، در حالی که سطح این ترکیب در گیاهان تراریخت شده نسل اول برابر ۵۷/۲ میکرو مولار و در گیاهان نسل دوم برابر با ۲۱/۷۳ میکرو مولار بود که نسبت به شاهد کاهش یافته بود و نشان دهنده افزایش سطح آنزیم EPSPS در این گیاهان بود.

بحث:

از میان جداکشتهای متعدد به کار رفته در گزارشهای مختلف، از جمله: قطعات ساقه[1]، میانگره های گل دهنده[2]، میانگره ها لایه های سلولی نازک[3]، رویانهای میکروسپوری، برگهای لپه ای و محورهای زیر لپه، جداکشتهای بر لپه ای مناسبترین جداکشت برای تراریختی معرفی شده است (جنوبی و همکاران ، ۱۳۸۳ ;Moloney *et al*., 1989 Cardoza *et al*., 2003 ; Jonoubi *et al*., 2004, Jonoubi *et al*., 2005). برگهای لپه‌ای از دانه رستهای جوانی تهیه شدند که قدرت باززایی زیادی داشتند و به علت باززایی مستقیم در اغلب موارد احتمال رخداد تنوع پیکری در شاخه های نوپدید حاصل از آنها کمتر بود. جداکشت های برگهای لپه ای، اغلب بدون گذر از مرحله کالوس مشخصی، اندام زایی یافته، تولید شاخه نمودند. شاخه های غیر تراریخت تشکیل شده از باقیمانده توده مریستم انتهایی در کنار دمبرگ های قطع شده خیلی سریع آشکار شدند و با حضور عامل انتخابگر کانامایسین به رنگ سفید یا ارغوانی درآمده و تا دو هفته پس از کشت، حذف گردیدند؛ درصورتی که شاخه های نوپدید حاصل از سلولهای تراریخت شده با T-DNA پس از سه تا چهار هفته ظاهر می‌شدند و به علت دریافت ژن *NPT II* در مقابل کانامایسین محیط مقاومت کرده، به رنگ سبز باقی می ماندند. شاخه های سبز مقاوم به کانامایسین حاصل از جداکشت های برگ های لپه‌ای سبز و با فتوتیپ طبیعی بوده، کمتر حالت شیشه‌ای شده به خود می‌گرفتند و شانس زیادی برای ریشه زایی و استقرار در خاک داشتند. جداکشت های برگ های لپه‌ای در سطح بریده انتهای دمبرگ خود سلول های مریستمی دارند که از قدرت باززایی بالایی برخوردار بوده، این سطح بریده شده هدف ایده‌آلی برای آگرو باکتریوم است. در صورت تهیه مناسب این جداکشت ها به گونه ای جوانه انتهایی حذف گردد، ولی قاعده دمبرگ ها که دارای سلولهای جوان فعال و با پرتوانی[4] زیاد هستند، باقی بماند، امکان دستیابی به شاخه‌های تراریخت شده افزایش می یابد. گلیفوسیت یک علف کش غیر انتخابی با دامنه گسترده است که پس از کشت استفاده گردد و برای بیش از ۵۰ گونه زراعی کاربرد دارد. گلیفوسیت به علت شباهت ساختاری با PEP به صورت رقابتی با این ترکیب وارد مسیر شیکیمات شده، به مهار عمل آنزیم EPSPS منجر می گردد (Marzabadi *et al*,1996).

1. Stem segment
2. Flowering internode
3. Thin cell layer
4. Totipotancy

www.SID.ir

Archive OF SID

مطالعه بیوتیپ های طبیعی مقاوم به گلیفوسیت در برخی گونه های گیاهی نشان داده است که ایجاد جهش های نقطه ای به افزایش مقاومت در این جهش یافته ها منجر شده است .(Baerson *et al*. 2002) بر اساس این یافته ها، برخی محققان مبادرت به ایجاد جهش های نقطه ای در ژن *EPSPS* باکتریایی نموده، به این ترتیب از اتصال علف کش با جایگاه فعال آنزیم EPSPS کاسته‌اند که منجر به تولید باکتری ها و نهایتا گیاهان مقاوم به گلیفوسیت شده است (Padgette *et al*., 1991; Marazabadi *et al*., 1996; He *et al*., 2001; Shuttleworth *et al*., 1999; Chen *et al*., 1999; Kahrizi *et al*., 2005) از آنجایی که ایجاد جهش های نقطه ای با مشکلات تکنیکی مواجه است و همچنین بررسی های انجام شده بر روی برخی علف های هرز مقاوم به گلیفوسیت حاکی از افزایش سطح بیان ژن *EPSPS* بود (Lee and Nigm, 2000; Powles *et al*, 1998)، به نظر می‌رسد که افزایش سطح بیان ژن At EPSPS راهکار مناسب و آسانی برای دست یابی به گیاهان مقاوم به گلیفوسیت باشد. از طرفی، به دلیل آنکه بیان فراوان این ژن با جهش زایی مصنوعی همراه نبود و نیز خود ژن دارای منشأ گیاهی و از گیاه هم خانواده کلزا بوده، از اینرو از دید ایمنی- زیستی امنیت بیشتری نسبت به سایر تراژن ها داشته، در صورت افزایش مقاومت راهکار مناسبتری می تواند باشد. در گزارش های متعدد مشاهده می شود که محققان توانسته اند به لاین های مقاوم به گلیفوسیتی دست یابند که در این گیاهان سطح بیان ژن *EPSPS* افزایش یافته است (Goldsbrough *et al*. 1990; Shyr *et al*., 1993; Suh *et al*., 1993 ; Jones *et al*. 1993 and Widholm *et al*. 2001). بنا به گزارش Yuan و همکاران (۲۰۰۲) در علف هرز یک ساله *Dicliptera chinensis* مقاوم به گلیفوسیت سه مکانیسم عمده برای ایجاد مقاومت به این علف کش وجود دارد که عبارتند از: وجود EPSPS که به طور ذاتی مقاومتر است؛ فعالیت اختصاصی بیشتر EPSPS، حتی قبل از تیمار با گلیفوسیت و بیان بیشتر mRNA مربوط به ژن *EPSPS* از مجموع یافته های حاصل می توان به این نتیجه رسید که به منظور ایجاد مقاومت به گلیفوسیت در گیاهان می توان به گونه ای سطح بیان این ژن را در گیاه افزایش داد . یک راهکار عملی به کار گیری از پرومتر های بسیار فعال، مانند پروموتر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV 35S) است که پس از تراریختی در حضور این پروموتر سطح بیان ژن افزایش می یابد (Shah *et al*., 1986; Morgan *et al*., 2002). در پروژه حاضر نیز به منظور تولید گیاهان کلزای مقاوم به گلیفوسیت اقدام به طراحی کاست ژنی شد که ژن At EPSPS تحت این پرومتر قرار گیرد تا پس از انتقال به گیاه، افزایش بیان ژن *EPSPS* باعث ایجاد مقاومت به گلیفوسیت گردد. بررسی های فنوتیپی، بیوشیمیایی و مولکولی در سطح DNA و RNA موید انتقال ژن *EPSPS* و افزایش سطح بیان این ژن در گیاهان تراریخت شده بود. همچنین توارث این صفت به نسل دوم صورت گرفته،گیاهان T1 نیز به گلیفوسیت مقاومت نشان دادند. بااستفاده از روش ارئه شده در این تحقیق می توان به گیاهان کلزای مقاوم به گلیفوسیت دست یافت. البته، قضاوت در مورد کارایی آنها مستلزم مقایسه ای جامع با سایر گیاهان جهش دار و طی بررسی های مزرعه ای و ارزیابی مخاطرات امکان پذیر است.

سپاسگذاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و فناوری زیستی (طرح ١٤٤) برای در اختیار گذاشتن اعتبارات و کلیه امکانات لازم قدر دانی می نمایند.

www.SID.ir

Archive OF SID

منابع

سلمانیان.ع.ه.، مشعشعی .م. (۱۳۷۹). «جداسازی و تعیین خصوصیات ژن EPSPS از منابع باکتری و گیاه»، نهمین کنفرانس زیست شناسی ایران، تهران.

جنوبی، پ.، موسوی، ا.، مجد، ا. و دانشیان ، ج. (۱۳۸۳). «باززایی شاخه القا شده با تدیازورون و تراریختی ژنی با *Agrobacterium* در گیاه کلزا»، مجله علمی پژوهشی علوم پایه دانشگاه تربیت معلم، ج ۳، شماره های ۱و۲، صص ۳۷ – ٤٨.

Baerson S.R., Rodriguez D.J., Tran M., Feng Y., Biest N.A. and Dill M. 2002. Glyphosate – resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiol. 129:1265-1275.

Cardoza V.Y. and Stewart C.N. 2003. Increased *Agrobacterium*- mediated transformation and root efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep. 21 (6) : 599-604.

Chen L. H. , Wang X. W. and Liu G. T. 1999. Transformation of common wheat (Triticum aestivum L.) hrrbicide – resistant EPSPS gene. Yi Chuan Xue. 26(3) 239-243.

Cromatie T. and Polge H. 2002. method of detecting shikimc acid . United States Patent.6:482-654.

Goldsbrough P.B. , Hatch E. M. , :Huang B. and Weller S.C. 1990. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. Plant Science 72(1):53-62.

He M. ,Yang Z. Y., Nie Y. F. and Xu P. 2001. Anew type of class I bacterial 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthsae mutants with enhanced tolerance to glyphosate.Biochemica et Biophysica Acta General subjects 1568(1): 1-6.

Jakeman D.L. , Mitchell D.J. ; Shuttleworth W.A. and Evans J.N.S. 1988. Mechanism of 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate synthase. Biochem. 37:12012-12019.

Jones J.D., Goldsbrough P.B., Weller S.C. 1996. Stability and expression of amplified EPSPS genes in glyphosate resistant tobacco cell and plants. Plant Cell Rep. 15(6): 431-436.

Jonoubi P., Mousavi A., Majd A., Jalali Javaran M. and Daneshian J.2005. Efficient regeneration of *Brassica napus* L. hypocotyls and genetic transformation by *Agrobacterium tumefaciens*. Biologia Plantarum 49(2): 308-320.

Jonoubi P. , Mousavi A., Majd A. and Daneshian J. 2004. Improved *Brassica napus* L. regeneration from hypocotyls using thidiazuron and benzyladenine as cytokinin sources. Pakistan Journal of Botany 36(2): 321-329.

Kahrizi D., Salmanian A. H. , Afshari A. , Moieni A. and Mousavi A. 2007. Simultaneous substitution of Gly 96 to Ala and Ala 183 to Thr in 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (K12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to mak tolerance to glyphosate. Plant Cell Report 26(1):94-104.

Lee L. J. and Ngim J.2000. A first report of glyphosate – resistant goosergrass (*Eleusine indica* L.) in Malaysia. Pest Management Science 56(4): 336-339.

Marzabadi M.R. , Gruys K. J., Yuen H. K. and Sikorski J. A. 1996. An EPSPS synthase inhibitor joining shikimat 3-phosphate with glyphosate: Synthesis and ligand binding studies. Biochemistry 35(13): 4199-4210.

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

Morgan A. , Baker C. M. Crandlall B. A. and Jose L. 2002. Production of herbicide tolerant strawberry throygh genetic engineering. IV International Strawberry Symposium, Tampere,

www.SID.ir

Archive OF SID

Finland.

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

Murray M.G. and Thampson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nuc. Acid Res. 8: 4321-4325.

Padgette S. R. , Re D. B. , Gasser C. S. and Kishore . 1991. Site – directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruylshikimate-3-phosphate synthase active site. J. Biological chemistry 266(33): 22364-22369.

Powles S. B. , Lorraine – Colwill D. F. , Dellow J. J. and Preston C. 1998. Evolved resistance to glyphosate in rigid ryegrass(*Lolium rigidum*) in australia. Weed Science 46(5): 604-607.

Sambrook J. and Russell D.W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory manual.3rd Edition. Cold Spring Harhor Press. New York.

Shah D.M. , Horsch R.B. , Klee H.J. , Kishore G.M , Winter J.A. , Tumer N.E. , Hironaka G.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 plant. Sci. 233: 478-481.

Shuttleworth W. A. , Pohl M. E., Helms G. L. and Evans J. N. S. 1999. Site directed mutagenesis of putative site residues of 5- enol- pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthsae. Biochemistry 38 (1): 296-302.

Shyr Y.J. , Caretto S. and Widholm J. M. 1993. Characterization of the glyphosate selection of carrot suspension cultures resulting in gene amplification. Plant Science 88(2): 219-228.

Suh H. , Hepburn A. G. , Kriz A. L. and Widholm J. M. 1993. Structure of the amplified 5- enol- pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthsae gene in glyphosate- resistant carrot cells. Plant Mol. Biol. 22(2): 195-205.

Widholm J. M. , Chinnala A. R. , Eggett T. and Brotherton A. 2001. Glyphosate selection of gene amplification in suspension culture of 3 plant species. Physiol. Plant 112(4):540-545.

Yuan C.L. , Chaing M. Y. and Chen Y. M. 2002. Triple mecanism of glyphosate resistance in a naturally occurring glyphosate- resistant plant *Dicliptera chinensis*. Plant Science 163(3): 543-554.

Zelaya I.A., Owen M. D. and Van Gessel M. J. 2004. Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Conyza canadensis* L. Theor. Appl. Genet. 110: 58-70.

www.SID.ir