Simultaneous expression of 5-enol pyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (epsps) and glyphosate oxidoreductase (gox) in transgenic canola plants towards enhancing resistance to glyphosate herbicide

Amir Mousavi *, Ali Hatef Salmanian, Mohammad Reza Eftekharian Ghamsari, Sepideh Parvanian

Plant Molecular Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Abstract

Canola (*Brassica napus* L.) is known as one of the most important oil-producing plants worldwide that has a high food value. Today, expansion of planting area of this plant has been highly considered. The presence of weeds in canola fields causes a significant loss in crop yield and quality .So far, the most widely herbicide used to manage weeds is the broad spectrum glyphosate that targets 5 enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) enzyme. In this study, with the aim of identification of new strategies to develop herbicides-resistant plants, Glyphosate Oxidoreductase (*gox*) and *epsps* genes under the control of CaMV 35S promoter were transferred to canola seedlings with pBI121 expression vector, to develop new plants with higher herbicide resistance level. Acquired seedlings were screened and then subjected to herbicide resistance bioassay. Molecular analysis of transgenic lines through PCR and RT-PCR showed successful integration and expression of the transgene, respectively. Result showed the higher relative resistance of the transgenic lines expressing two gene cassettes compared to single gene cassette lines. This study suggests that simultaneous application of two different strategies can lead to more glyphosate-resistance to develop new genetically modified crops specifically in oilseed plants such as canola.

Keywords: Transgenic, epsps, *Brassica napus*, glyphosate, gox

* Corresponding Author: m-amir@nigeb.ac.ir

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال نهم، شمارهٔ سی و پنجم، بهار ۱۳۹۷، صفحهٔ ۶۶-۵۷
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۷/۰۲/۰۱
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۷/۰۲/۲۹

بیان هم‌زمان ژن‌های ۵-انول‌پیروویل‌شیکیمیت-۳-فسفات‌سنتاز (*epsps*) و گلایفوسیت‌اکسیدوردوکتاز (*gox*) با هدف ارتقای مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در گیاهچه‌های تراریختهٔ کلزا

امیر موسوی *، علی هاتف سلمانیان، محمدرضا افتخاریان قمصری، سپیده پروانیان
گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی،پژوهشکدهٔ زیست‌فناوری کشاورزی،پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک وزیست فناوری،تهران،ایران

چکیده

باتوجه‌به اهمیت غذایی کلزا (*Brassica napus* L.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان تولیدکنندهٔ روغن در جهان، امروزه در بسیاری از کشورها به گسترش سطح زیرکشت این گیاه توجه شده است. حضور علف‌های هرز در مزارع کلزا سبب کاهش درخور توجه میزان تولید و کیفیت محصول این گیاه می‌شود. تاکنون از علف‌کش با طیف گستردهٔ گلایفوسیت به‌طور وسیعی استفاده شده است که آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمیت-۳-فسفات سنتاز (EPSPS) را هدف قرار می‌دهد. در پژوهش حاضر با هدف ارزیابی راهبردهای جدید توسعهٔ گیاهان مقاوم به علف‌کش یادشده و به‌منظور توسعهٔ گیاهان جدید دارای مقاومت بیشتر، ناقل بیانی pBI121 حامل کاست‌های ژنی گلایفوسیت‌اکسیدوردوکتاز (gox) و epsps جهش‌یافتهٔ تحت کنترل پروموتر CaMV 35S به گیاهچه‌های کلزا منتقل شد. پس از غربال‌گری گیاهچه‌های حاصل، گیاهان منتخب به‌منظور تأیید الحاق و رونویسی ژن هدف تجزیه‌وتحلیل مولکولی شدند و ازنظر مقایسهٔ سطح تحمل به علف‌کش ارزیابی زیستی شدند. نتایج بررسی لاین‌های تراریخت حاصل از راه gPCR و RT-PCR نشان‌دهندهٔ انتقال و بیان موفق تراژن‌های یادشده بودند. آزمون زیستی نیز بروز مقاومت نسبی در لاین‌های بیان‌کنندهٔ هم‌زمان دو سازهٔ ژنی در مقایسه با نمونه‌های غیرتراریخت و لاین‌های تراریخت تک‌ژنی را نشان داد. مطالعهٔ حاضر نشان می‌دهد دو راهبرد مختلف یعنی جلوگیری از اتصال علف‌کش به جایگاه هدف و سم‌زدایی آن به‌طور هم‌زمان به مقاومت بیشتر و پایدارتری نسبت به گلایفوسیت به‌ویژه در گیاهان دانه‌روغنی نظیر کلزا منجر می‌شود.

واژه‌های کلیدی: کلزا، تراریخت، EPSPS، GOX، گلایفوسیت

* نگارندهٔ مسؤول: نشانی پست الکترونیک: m-amir@nigeb.ac.ir، شمارهٔ تماس: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۴۷

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گیاه دانه‌روغنی کلزا (*Brassica napus* L.) از گیاهان مهم زراعی متعلق به تیرهٔ کلمیان (Brassicaceae) است (Elahi *et al*., 2016)؛ علاوه بر مصرف گستردهٔ کلزا برای تهیهٔ روغن‌های خوراکی، این گیاه منبع مهمی برای تغذیهٔ حیوانات است و روغن آن در صنعت و سوخت‌های زیستی استفاده می‌شود. گسترش سطح زیرکشت و تولید کلزا به علت وجود تنش‌های زیستی و غیرزیستی در ایران محدود شده است. مصرف جهانی کلزا طی چهاردهٔ اخیر ۸ برابر شده و طبق آمار فائو، تولید این محصول در سال ۲۰۱۴ به ۷۳/۸ میلیون تن رسیده است؛ این افزایش روبه‌رشد مصرف، نیاز به بهبود ویژگی‌های ژنتیکی این گیاه از راه زیست‌فناوری مدرن را مطرح می‌کند (Ziaei *et al*., 2016). نخستین گیاهان تراریخت تجاری مقاوم به علف‌کش در سال ۱۹۹۶ تولید شدند و پس‌ازآن، محصولات زیادی ازجمله سویا، ذرت، پنبه و کلزای تراریخته مجوز سازمان غذا و داروی امریکا را دریافت کردند (Zhang *et al*., 2016)؛ در سال‌های اخیر، ارقام کلزای تراریخت مقاوم به علف‌کش توسعه و محصولات تراریخت مقاوم به علف‌کش به‌سرعت در سراسر جهان گسترش یافته‌اند و فواید کشت آنها مدنظر قرار گرفته‌اند؛ به‌طوری‌که طی ۲۱ سالی که از کشت انبوه و تجاری محصولات تراریخت می‌گذرد، صفت مقاومت به علف‌کش با عنوان صفت غالب بیشترین درصد سطح کشت این محصولات را به خود اختصاص داده است (Duke, 2015; Shaner, 2014).

دو رقم کلزای مقاوم به گلوفوسینیت- آمونیوم و گلایفوسیت و همچنین محصولات هیبرید مقاوم به این دو علف‌کش تولید شده‌اند (Oliver *et al*., 2016). علف‌کش با طیف گستردهٔ گلایفوسیت آنزیم ۵-انول‌پیروویل‌شیکیمیت-۳-فسفات‌سنتاز (EPSPS) در مسیر شیکیمات را مهار می‌کند. این آنزیم واکنش تبدیل شیکیمیت-۳-فسفات (S3P) و فسفوانول‌پیرووات (PEP) به ۵-انول‌پیروویل‌شیکیمیت-۳-فسفات را کاتالیز می‌کند که مرحلهٔ مهمی در بیوسنتز اسیدهای آمینهٔ آروماتیک در گیاهان است. ابتدا گلایفوسیت علف‌کشی غیرانتخابی و درنهایت علف‌کشی انتخابی با سازگاری محیطی زیاد برای محصولات تراریخت مقاوم به گلایفوسیت و پرمصرف‌ترین علف‌کش استفاده‌شده در جهان مطرح شد. محل هدف مشخص، توانایی رفتن به بافت‌های گیاه، خطر سمیت کم برای انسان و سایر جانوران از دیگر ویژگی‌های این علف‌کش هستند که از راه فناوری محصولات تراریخته، روش کارآمدی برای مبارزه با علف‌های هرز در اختیار کشاورزان قرار داده‌اند (Chhapekar *et al*., 2015; Han *et al*., 2016). به‌کارگیری آنزیم هدف EPSPS و سمیت‌زدایی مولکول گلایفوسیت دو راهبرد اساسی برای توسعهٔ موفقیت‌آمیز محصولات مقاوم به گلایفوسیت هستند. راهبرد اول در بیشتر محصولات تجاری مقاوم به گلایفوسیت با به‌کارگیری دو شکل جهش‌یافته و مقاوم ذاتی آنزیم EPSPS استفاده شده است. این روش ازنظر تئوری معایبی مانند باقی‌ماندن گلایفوسیت و تجمع آن در مناطق مریستمی گیاه دارد که ممکن است به بروز برخی

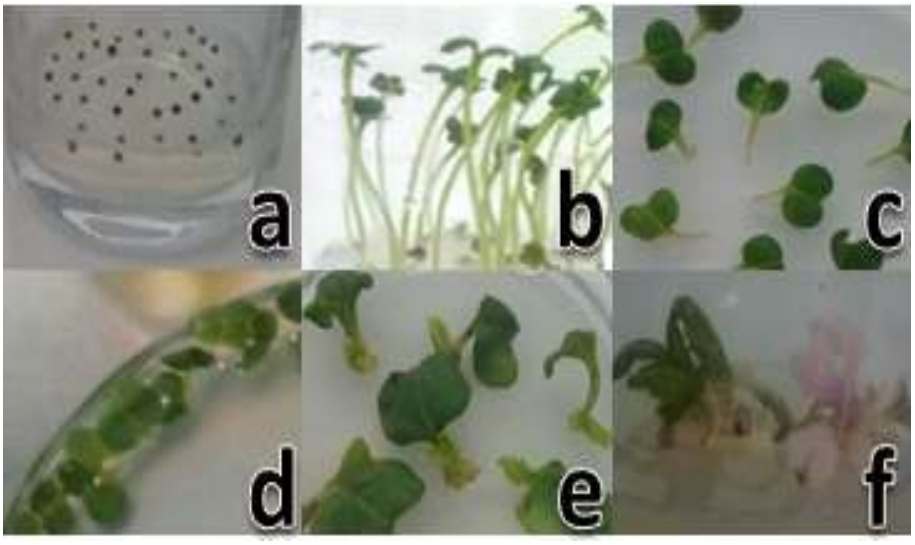
ویژگی‌های نامطلوب مانند جلوگیری از توسعهٔ اندام‌های تولیدمثلی و در نتیجه بازدهٔ کمتر محصول منجر شود. روش دوم به علت به‌کارگیری سازوکاری کاربردی برای حذف باقیمانده‌های علف‌کش، راهکار مکملی برای روش اول است (Dun *et al*., 2014; Sammons and Gaines, 2014). سمیت‌زدایی گلایفوسیت از دو مسیر انجام می‌شود: مسیر اول به تولید فسفات و سارکوزین منجر می‌شود و روش دیگر با استفاده از آنزیم گلایفوسیت‌اکسیداز (GOX) سبب تولید آمینومتیل‌فسفونیک‌اسید (AMPA) و گلی‌اکسیلات می‌شود. در برخی رخدادهای تراریخت کلزا از GOX در ترکیب با EPSPS به‌طور تجاری استفاده شده است (Dill, 2005)؛ درحالی‌که در کشور ما، بهره‌برداری از ژن‌های به‌کاررفته و برخی عوامل کنترل‌کنندهٔ بیان در این رخدادهای تجاری به علت وجود حقوق مالکیت فکری شرکت‌های تولیدکنندهٔ آنها ممکن نیست. در مطالعهٔ حاضر با هدف رسیدن به سطوح مقاومت مطلوب‌تر، دو ژن *gox* با توالی سنتز و بهینه‌شده و *epsps* جهش‌یافته به‌طور هم‌زمان وارد گیاهچه‌های کلزا شدند. تاکنون ترکیب این دو ژن ویژه و عوامل کنترل‌کنندهٔ بیان آنها به‌طور هم‌زمان ارزیابی نشده است. تجزیه‌وتحلیل میزان مقاومت به گلایفوسیت نشان داد بیان هم‌زمان ژن‌های *gox* و *epsps* در لاین‌های کلزای تراریخت به تغییراتی در سطوح مقاومت آنها در برابر علف‌کش نسبت به گیاهان تراریخت حاوی یکی از دو ژن منجر می‌شود. یافته‌های حاضر می‌توانند به استفاده از ایده‌های برتر برای توسعهٔ محصولات تراریخت نسل جدید به‌ویژه در گیاهان دانه‌روغنی منتج شوند؛ این مهم با در نظر گرفتن واردات بیش از ۹۰ درصدی روغن‌های خوراکی کشور و ضرورت توسعهٔ سطح زیرکشت این محصولات از راه مدیریت بهینهٔ علف‌های هرز بیش‌ازپیش اهمیت می‌یابد.

مواد و روش‌ها

ساخت سازه‌های ژنی: ساخت سازهٔ حاوی دو کاست ژنی با استفاده از سازه‌های تک‌ژنی حاوی ژن‌های *epsps* و *gox* انجام شد که در گذشته به‌تنهایی برای تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری استفاده شده بودند (Kahrizi *et al*., 2007; Hadi *et al*., 2012). یکی از ژن‌های استفاده‌شده در پژوهش حاضر، ژن آنزیم EPSPS باکتری *E. coli* (با شماره توالی X00557 در بانک‌های ژنی) بود. این ژن دارای دو جهش گلایسین ۹۶ به آلانین (GAA به CAA) و آلانین ۱۸۳ به ترئونین (GCG به ACC) است و mutII نام دارد که پیش‌ازاین، Kahrizi و همکاران (۲۰۰۷) آن را همسانه‌سازی کرده‌اند. ژن *gox* دارای منشأ پروکاریوت و غنی از آدنین و تیمین (AT) است و رمزهای آن برای بیان زیاد در سیستم گیاهی مناسب نیستند. Hadi و همکاران در سال ۲۰۱۲ رمزهای دارای بیشترین بیان در گیاه کلزا را انتخاب و با هدف ساخت ژن مصنوعی *gox* جایگزین رمزهای نادر موجود در ترادف ژنی کردند.

یک جفت آغازگر اختصاصی برای تکثیر توالی ژن *gox*، پروموتر CaMV 35S و پایان‌دهندهٔ Nos از روی ناقل pBI121 طراحی و جایگاه آنزیم

برشی *Eco*RI در دو سر آن تعبیه شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر قطعهٔ مدنظر از روی ناقل pBI121 حاوی ژن مصنوعی استفاده شد. محصول در جایگاه *Eco*RI در پایین‌دست کاست ژنی CaMV 35S-epsps-Nos روی ناقل pBI121 قرار داده شد. سازهٔ بیانی نوترکیب حاصل با روش شوک گرمایی به آگروباکتری سویهٔ LBA4404 منتقل شد. تمام مراحل انتقال ژن به گیاه کلزا (شکل ۱) و باززایی گیاهچه‌ها بر اساس روش آلوده‌سازی قطعه‌های دمبرگ لپه‌ای با سوسپانسیون آگروباکتری انجام شدند (Moloney *et al.*, 1989).



شکل ۱- مراحل انتقال سازهٔ ژن هدف به گیاه کلزا و غربال گیاهان تراریخت از غیرتراریخت. a. کشت بذر گیاه کلزا در محیط جوانه‌زنی، b. دانهال‌های رشدیافته در وضعیت چهارروزه، c. کشت دمبرگ‌های لپه‌ای جداشده از گیاه در محیط پیش‌کشت، d. آلوده‌سازی ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون آگروباکتری (OD=۰/۵-۱)، e. جوانه‌زنی دمبرگ‌های لپه‌ای در محیط انتخابی حاوی کانامایسین، f. باززایی نوساقه‌های سبز تراریخت احتمالی در محیط طویل‌سازی نوساقه

ارزیابی مولکولی گیاهان تراریخت: DNA ژنومی با بافر CTAB از برگ‌های جوان گیاهچه‌های باززایی‌شده استخراج و گیاهچه‌های تراریخت احتمالی با PCR و آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها (جدول ۱) غربال‌گری شدند (Murray and Thompson, 1980). به‌منظور تأیید بیان تراژن‌ها در سطح رونویسی در گیاهان تراریخت، بافت تازهٔ برگی برداشت و RNA تام با بافر RNX-Plus (SinaClon) استخراج شد. پس از تأیید کیفیت RNA با الکتروفورز و اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر، ۲ میکروگرم RNA به‌عنوان الگو در ساخت cDNA با استفاده از آنزیم نسخه‌بردار معکوس (RT) استفاده شد (Hadi *et al.*, 2012)؛ پس از ساخت cDNA و تعیین رقت مناسب، از آن به‌عنوان الگو برای تکثیر ژن‌های *gox* و *epsps* در واکنش PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن برای تأیید بیان ژن‌ها در گیاهچه‌های تراریخت استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای به‌کاررفته در مطالعهٔ حاضر

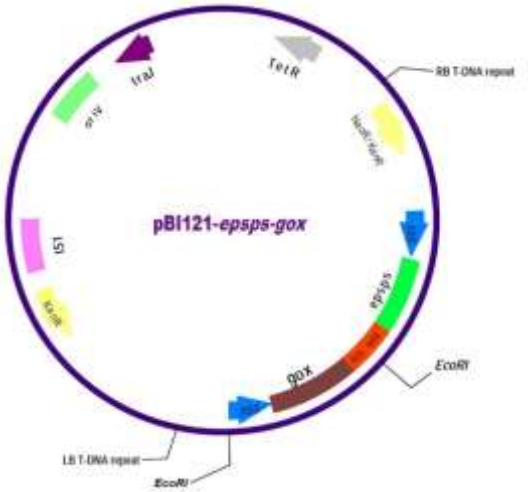
نام آغازگر	توالی (5'-→3')	دمای ذوب	اندازهٔ قطعهٔ تکثیرشده (جفت باز)
Synth gox F	GGATCCACCACCATGTCG	59°C	1314
Synth gox R	AGCTCTCAGGAGGCAGGAC	59°C	
EPSPS F	ATGGAATCCCTGACGTTACA	60°C	1350
EPSPS R	TCAGGCTGCCTGGCTAATC	60°C	

آستانهٔ مقاومت لاین‌های تراریخت در محیط حاوی علف‌کش: بذرهای حاصل از گیاهان T_0 در شیب غلظت صفر تا ۱ میلی‌مولار علف‌کش گلایفوسیت (اضافه‌شده به محیط کشت MS استریل پیش از اتوکلاو) در شرایط *درون‌شیشه* (*in vitro*) کشت داده شدند. برای هر بذر ۵ تکرار در نظر گرفته شد. حد مقاومت گیاهچه‌های دوژنی ریشه‌دارشده با گیاهچه‌های تک‌ژنی و گیاهچه‌های شاهد غیرتراریخته در سن‌های ۱۴ و ۲۱ روزه مقایسه شد (Dun *et al*., 2014)؛ معیار حد مقاومت، حفظ شادابی و طراوت ساقه‌ها و سبزینگی برگ‌ها در نظر گرفته شد.

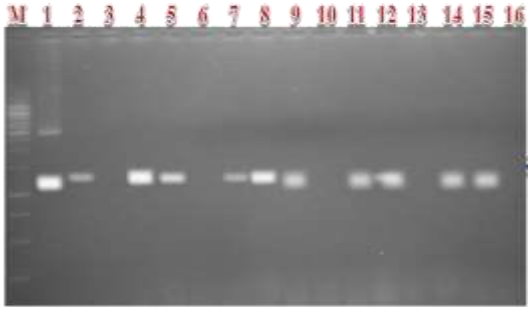
نتایج

محصول ۲۷۰۰ جفت‌بازی تکثیرشده از روی ناقل pBI121 حاوی ژن *gox* و ناقل pBI121 حاوی ژن *epsps* به‌طور هم‌زمان با آنزیم *Eco*RI هضم و ناقل جدید حاوی ژن‌های *epeps* و *gox* طی واکنش اتصال ساخته شد (شکل ۲). باتوجه‌به الگوی الکتروفورزی محصولات نتیجه گرفته می‌شود دو سازهٔ ژنی در جهت مخالف یکدیگر و مطابق شکل ۲ قرار گرفته‌اند.

تأیید همسانه‌سازی دو ژن *gox* و *epsps* در ناقل بیانی pBI121 با PCR و هضم آنزیمی انجام شد. سازه‌های ژنی به میزبان آگروباکتری انتقال یافتند. حضور سازه‌ها در میزبان جدید با غربال‌گری PCR ارزیابی شد (شکل ۳).

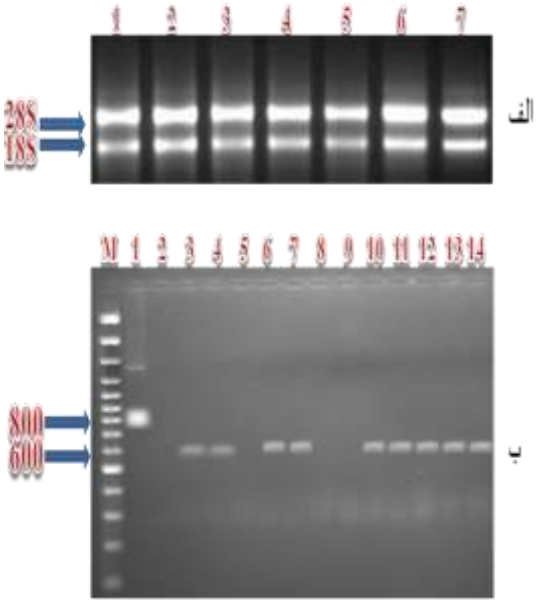


شکل ۲- نقشهٔ شماتیک کاست‌های ژنی ناقل نوترکیب دوکاسته و نمایش جهت‌گیری دو کاست ژنی *epsps* و *gox*. Kan R. ژن نئومایسین‌فسفوترانسفراز (نشانگر انتخابی)، NOS. ژن پایان‌دهندهٔ نوپالین‌سنتاز، 35S. آغازگر



شکل ۳- الگوی الکتروفورز غربال‌گری PCR انتقال سازه در آگروباکتری روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک‌ها به‌ترتیب شماره ۲ تا ۸. محصول PCR تکثیر ژن *epsps* (قطعهٔ ۱۳۵۰ جفت‌بازی)، ۹ تا ۱۵. محصول PCR ژن *gox* (قطعهٔ ۱۳۱۴ جفت‌بازی) با آغازگرهای synth-gox F و synth-gox R، چاهک شمارهٔ ۱. pUC-gox (شاهد مثبت)، چاهک شمارهٔ ۱۶. شاهد منفی بدون الگو، M. نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas)

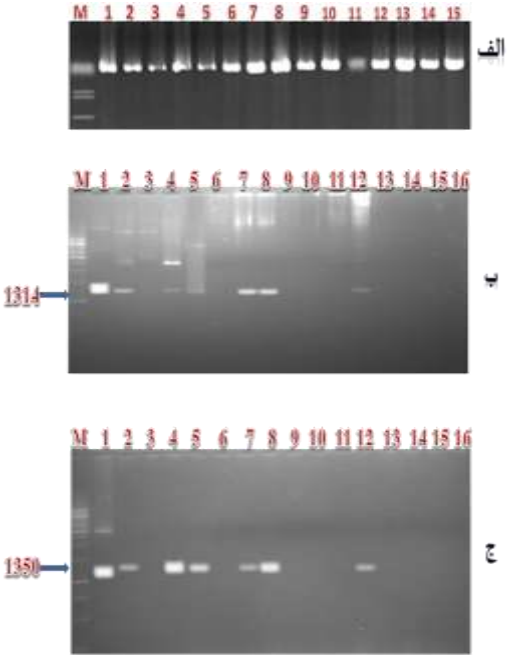
به‌منظور بررسی رونویسی ژن مدنظر در گیاهان تراریخت، RNA تام از بافت برگ‌های تازه استخراج شد. برای اطمینان از RNA استخراجی، مقداری از آن روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد (شکل ۵).



شکل ۵- الف. الگوی الکتروفورزی RNA کل در گیاهان بررسی‌شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، ب. چاهک ۱: محصول PCR از DNA ژنومی گیاه غیرتراریخت، چاهک شمارهٔ ۲: کنترل منفی بدون الگوی DNA، چاهک‌های ۳ تا ۱۶: الکتروفورز محصول RT-PCR گیاهان تراریخت‌شده با آغازگرهای ژن درون‌زاد TUB F/TUB R روی ژل آگارز ۱ درصد، M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی (Fermentas)

قطعه‌های واضح‌تر به RNA زیرواحدهای ریبوزومی مربوط هستند. پس از ساخت cDNA، PCR برای ساختار مدنظر انجام و از ژن خانه‌دار *توبولین* (شاهد داخلی) استفاده شد. در شکل ۶، الکتروفورز محصول RT-PCR حاصل از گیاهان تراریخت‌شده مشاهده می‌شود.

به‌منظور غربال‌گری گیاهچه‌های تراریخت‌شده، پس از استخراج DNA ژنومی، PCR با آغازگرهای اختصاصی تراژن‌های *gox* و *epsps* انجام شد و محصولات آن روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند. مشاهدهٔ محصولات PCR با اندازه‌های ۱۳۱۴ جفت‌باز و ۱۳۵۰ جفت‌باز تلفیق موفق تراژن در ژنوم لاین‌های بررسی‌شده را تأیید می‌کند (شکل ۴).



شکل ۴- الف. الکتروفورز نمونه‌های DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان کلزا روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک شمارهٔ ۱. گیاه غیرتراریخت، چاهک‌های ۲ تا ۱۵. نمونه‌های حاصل از گیاهان تراریخت، ب. الکتروفورز محصولات PCR مربوط به DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان تراریخت کلزا با آغازگرهای اختصاصی ژن *gox*، ج. الکتروفورز محصولات PCR مربوط به DNA ژنومی استخراج‌شده از گیاهان تراریخت کلزا با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps*، چاهک شمارهٔ ۱. ناقل پلاسمیدی pBI121-*gox-epsps* (شاهد مثبت)، چاهک ۱۶. محصول PCR گیاه غیرتراریخت (شاهد منفی)، چاهک M. نشانگر وزن مولکولی 1 kb (Fermentas)

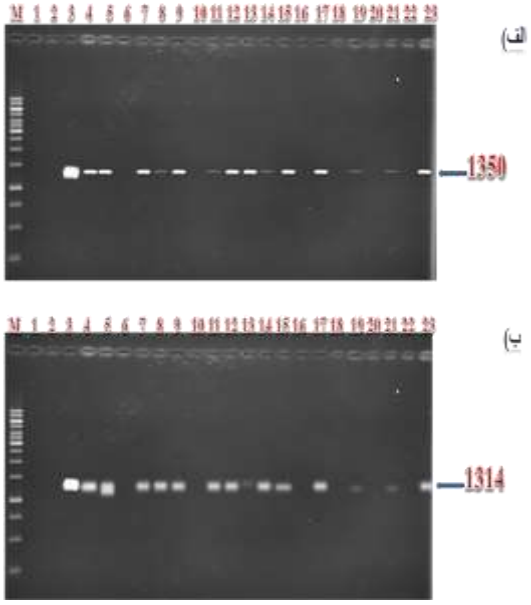
جدول ۲- نتایج میزان مقاومت جوانه‌های تراریخت حاوی سازه‌های ژنی مختلف به گلایفوسیت

سازه ژنی انتقال‌یافته	میزان مقاومت (میلی‌مولار)
pBI121-*epsps-gox*	۰/۴
pBI121-*epsps*	۰/۲۵
pBI121-*gox*	۰/۱
Wild type	۰/۰۵

بحث

دانه‌های روغنی کلزا بخش زیادی از روغن خوراکی جهان (۱۳ تا ۱۶ درصد بین سال‌های ۱۹۹۹ تا ۲۰۰۹) را تولید می‌کنند (Hannoufa *et al.*, 2014). روغن کلزا به علت مقدار کم اسیدهای چرب ازجمله سالم‌ترین روغن‌ها به شمار می‌رود (Elahi *et al.*, 2016). کشف علف‌کش‌های سنتتیک در سال ۱۹۴۵ بزرگ‌ترین دستاورد فناورانه بود که مدیریت علف‌ها را به‌سرعت تغییر داد. کشاورزان به مدت ۶۰ سال و تا پیش از معرفی محصولات مقاوم به علف‌کش، از علف‌کش‌های انتخابی استفاده می‌کردند (Green, 2014) و تشخیص علف‌ها و طراحی راهبردهای مبارزه با آنها، فرایند وقت‌گیری برای کشاورزان بود. پس از معرفی محصولات مقاوم به علف‌کش، در بیشتر مواقع کاربرد گلایفوسیت به‌تنهایی تمام علف‌های هرز را کنترل می‌کرد. محصولات تراریخت با ویژگی مقاومت به علف‌کش مدیریت علف‌های هرز را آسان، مؤثر و کارآمد کردند. صرفهٔ اقتصادی، افزایش محصول، کاهش آثار زیست‌محیطی از دیگر عوامل همه‌گیرشدن این فناوری هستند (Green, 2014; Brookes, 2014).

نخستین‌بار در سال ۱۹۹۹، کلزای مقاوم به گلایفوسیت و یا گلوفوسینیت کشت شد. این گیاه



شکل ۶- بررسی رونویسی از ژن‌های *gox* و *epsps* در گیاهان تراریخت‌شده روی ژل آگارز ۱درصد. الف. الکتروفورز محصول RT-PCR گیاهان تراریخت با آغازگرهای اختصاصی *gox*، ب. الکتروفورز محصول RT-PCR از cDNA تهیه‌شده از گیاهان تراریخت با آغازگرهای اختصاصی *epsps*. چاهک ۱: محصول PCR از DNA ژنومی گیاه غیرتراریخت، چاهک ۲: محصول PCR از cDNA تهیه‌شده از گیاهان تراریخت بدون آنزیم Reverse Transcriptase (شاهد– RT)، چاهک‌های ۴ تا ۲۳: محصول PCR از cDNA تهیه‌شده از گیاهان تراریخت احتمالی، M: نشانگر وزن مولکولی 100bp (Fermentas)

درنهایت، میزان مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در جوانه‌های تراریخت دارای دو کاست ژنی با گیاهان تراریخت تک‌ژنی و گیاهچه‌های شاهد غیرتراریخت در شرایط کشت *درون‌شیشه* (*in vitro*) بررسی و مقایسه شد. طی این بررسی، آستانهٔ مقاومت گیاهچه‌ها در غلظت‌های مختلف صفر، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۴ و ۱ میلی‌مولار گلایفوسیت بررسی و قابلیت حفظ رشد، طراوت و سبزینگی طبیعی آنها مدنظر قرار گرفت. نتایج در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

شود. در پژوهش حاضر، گیاهان تراریخت دارای دو کاست ژنی *epsps* و *gox* در مقایسه با گیاهان تراریخت دارای یکی از ژن‌های *gox* و *epsps* قدرت تحمل بیشتری در محیط کشت حاوی علف‌کش داشتند؛ احتمالاً علت این مشاهده اینست که EPSPS نوع جهش‌یافته باعث کاهش میل ترکیبی علف‌کش گلایفوسیت به آنزیم می‌شود و به این ترتیب، تحمل گیاه را افزایش می‌دهد؛ این در حالیست که GOX هم‌زمان گلایفوسیت تجمع‌یافته را به مواد غیرسمی تجزیه می‌کند و علاوه بر اثر افزایشی آن در ارتقای سطح تحمل گیاه، از آثار ناخواستهٔ علف‌کش تجمع‌یافته روی ویژگی‌های فیزیولوژیک (به‌ویژه روی اندام‌های زایشی) ممانعت می‌کند. گفتنی است برای افزایش مقاومت گیاهان به مقادیر زیاد علف‌کش (بیشتر از ۰/۵ میلی‌مولار)، استفاده از ژن‌های *epsps* با مقاومت ذاتی (کلاس II) و نیز پپتیدهای نشانهٔ کلروپلاستی با کارایی مناسب در گیاه کلزا (هدفمندسازی خوب و شکسته‌شدن به‌موقع توالی) و نیز بهره‌گیری از توالی‌های تشدیدکننده در بالادست ژن ضروری هستند. ترکیب راهبردهای مختلف در توسعهٔ محصولات مقاوم به گلایفوسیت مهم است. دو آنزیم گلیفوسیت‌اکسیدوردوکتاز و گلیفوسیت‌استیل‌ترانسفراز توانایی سمیت‌زدایی گلایفوسیت را دارند. تاکنون محصولات بسیاری شامل ذرت، سیب زمینی، سویا، چغندرقند و گوجه با دو ژن *cp4* و *gox* تراریخت شده‌اند (Dun *et al.*, 2014). پیش‌ازاین، انتقال توأم ژن مقاومت به آفت (Bt) و ژن مقاومت به گلایفوسیت در یک ناقل T-DNA برای انتقال به برنج با استفاده از آگروباکتری در کانادا، امریکا و به‌تازگی در استرالیا کشت شده است. دستاورد مالی محصولات مقاوم به علف‌کش در جهان ۴۸۱ میلیون دلار در سال ۲۰۱۲ بوده است (Brookes and Barfoot, 2012)؛ کانادا با تولید سالانه ۶ میلیون هکتار بزرگ‌ترین تولیدکنندهٔ کلزای تراریخت در جهان است (Beckie and Hall, 2014). در تولید اکثر گیاهان تراریخت مقاوم به گلایفوسیت، غالباً از یک ژن (*epsps* نوع مقاوم) استفاده شده است؛ درحالی‌که در برخی رخدادهای دیگر ازجمله کلزای GT200 به‌طور هم‌زمان از دو ژن *epsps* cp4 (با منشأ *Agrobacterium tumefaciens* cp4) و ژن *gox247* (با منشأ *Ochrobactrum anthropic* strain LBAA) استفاده شده است. برای کنترل بیان و هدفمندسازی کلروپلاستی محصول این دو ژن به‌ترتیب از پروموتر Figwort Mosaic Virus (FMV) و پپتید نشانهٔ کلروپلاستی با منشأ گیاه آرابیدوپسیس بهره‌گیری شده است. در مطالعهٔ حاضر، باتوجه‌به ممکن‌نبودن استفاده از ژن‌های دارای حقوق مالکیت فکری ثبت‌شده و پیشینهٔ پژوهش‌های قبلی تیم کاری ما، از *epsps* با منشأ *E. coli* (k12) دارای جهش‌های نقطه‌ای (شامل گلایسین ۹۶ به آلانین و آلانین ۱۸۳ به ترئونین) و توالی *gox* سنتزشده با کدون‌های بهینه‌شده برای گیاه کلزا و ساختار ثانویهٔ اصلاح‌یافتهٔ mRNA، هردو تحت کنترل پروموتر 35S ویروس موزاییک گل کلم (CaMV 35S) استفاده شد. مطالعهٔ حاضر برای نخستین‌بار ترکیب و کارایی این دو ژن ویژه را به‌طور هم‌زمان در گیاه کلزا ارزیابی می‌کند تا برای هدف نهایی تجاری‌سازی گیاه مقاوم بهره‌برداری

انجام شده است (Zhao *et al*., 2015). مقایسهٔ قدرت جوانه‌زنی بذرها و میزان مقاوت نسل‌های بعدی گیاهان تراریخت دوکاسته با گیاهان تک‌کاسته و بذرهای غیرتراریخت (Wt) در غلظت‌های مختلف گلایفوسیت در پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌شود.

قدردانی

نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بابت تامین اعتبار مالی این پروژه (طرح ماموریت محور ۴۰۷-م) کمال تشکر و سپاسگزاری را دارا می باشند.

References

Beckie ,H. J. and Hall, L. M. (2014) Genetically-modified herbicide-resistant (GMHR) crops a two-edged sword? An Americas perspective on development and effect on weed management. Crop Protection 66: 40-45.

Brookes, G. (2014) Weed control changes and genetically modified herbicide tolerant crops in the USA 1996-2012. GM Crops & Food 5(4): 321-332.

Brookes, G. and Barfoot, P. (2014) Economic impact of GM crops: the global income and production effects 1996-2012. GM Crops & Food 5(1): 65-75.

Chhapekar, S., Raghavendrarao, S., Pavan, G., Ramakrishna, C., Singh, V. K., Phanindra, M. L., Dhandapani, G., Sreevathsa, R. and Ananda Kumar, P. (2015) Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-PSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. Plant Cell Reports 34(5): 721-731.

Dill, G. M. (2005) Glyphosate-resistant crops: history, status and future. Pest Management Science 61(3): 219-224.

Duke, S. O. (2015) Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. Pest Management Science 7(5): 652-657.

Dun, B., Xujing, W., WeiLu, M., Chenb, W. and Zhangb, S. H. (2014) Development of highly glyphosate-tolerant tobacco by coexpression of glyphosate acetyltransferase gat and EPSPS G2-aroA genes. The Crop Journal 2(2): 164-169.

Elahi, N., Duncan, R. W. and Stasolla, C. (2016) Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON. Plant Physiology and Biochemistry 100: 52-63.

Green, J. M. (2014) Current state of herbicides in herbicide-resistant crops. Pest Management Science 70(9): 1351-1357

Hadi, F., Mousavi, A., Salmanian, A. H., Akbari, N. and Khajeh, K. H. (2012) Glyphosate tolerance in transgenic canola by a modified glyphosate oxidoreductase (gox) gene. Progress in Biological Sciences 2(1): 50-58.

Han, H., Yu, Q., Widderick, M. J. and Powles, S. B. (2016) Target-site EPSPS Pro-106 mutations: sufficient to endow glyphosate resistance in polyploid Echinochloa colona? Pest Management Science 72(2): 264-271.

Hannoufa, A., Pillai, B. V. and Chellamma, S. (2014) Genetic enhancement of *Brassica napus* seed quality. Transgenic Research 23(1): 39-52.

Kahrizi, D., Salmanian, A. H., Afshari, A., Moieni, A. and 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 Reports 26(1): 95-104.

Moloney, M. M., Walker J. M. and Sharma, K. K. (1989) High efficiency transformation of *Brassica napus* using Agrobacterium vectors. Plant Cell Reports 8(4): 238-242.

Murray, M. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19): 4321-4326

Oliver, D. P., Kookana, R. S., Miller, R. B. and Correll, R. L. (2016) Comparative environmental impact assessment of herbicides used on genetically modified and non-genetically modified herbicide-tolerant canola crops using two risk indicators. Science of the Total Environment 557: 754-763.

Sammons, R. D. and Gaines, T. A. (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Management Science 70(9): 1367-1377.

Shaner, D. L. (2014) Lessons learned from the history of herbicide resistance. Weed Science 62(2): 427-431.

Zhang, C., Wohlhueter, R. and Zhang, H. (2016) Genetically modified foods: A critical review of their promise and problems. Food Science and Human Wellnes 5: 116-123.

Zhao, Q., Liu, M. H., Zhang, X. W., Lin, C. Y., Zhang, Q. and Shen, Z. C. (2015) Generation of insect-resistant and glyphosate-tolerant rice by introduction of a T-DNA containing two Bt insecticidal genes and an EPSPS gene. Journal of Zhejiang University Science 16(10): 824-831.

Ziaei, M., Motallebi, M., Zamani, M. R. and Panjeh, N. (2016) Co-expression of chimeric chitinase and a polygalacturonase-inhibiting protein in transgenic canola *(Brassica napus)* confers enhanced resistance to Sclerotinia sclerotiorum. Biotechnology Letters 38(6): 1021-1032.