

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 Hatf 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

بیان هم‌زمان ژن‌های ۵-انول پیروویل شیکیمیت-۳-فسفات سنتاز (*epsps*) و گلایفوسیت اکسیدوردوکتاز (*gox*) با هدف ارتقای مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در گیاهچه‌های تراریخته کلزا

امیر موسوی^{*}، علی هاتف سلمانیان، محمدرضا افتخاریان قمصری، سپیده پروانیا
گروه زیست‌فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشکده زیست‌فناوری کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

چکیده

باتوجه به اهمیت غذایی کلزا (*Brassica napus* L.)، یکی از مهم‌ترین گیاهان تولیدکننده 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 گسترده 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 توسعه گیاهان مقاوم به علف‌کش یادشده و به‌منظور توسعه گیاهان جدید دارای مقاومت بیشتر، ناقل بیانی pBI121 حامل کاست‌های ژنی گلایفوسیت اکسیدوردوکتاز (*gox*) و *epsps* جهش‌یافته تحت کنترل پروموتور CaMV 35S به گیاهچه‌های کلزا منتقل شد. پس از غربال‌گری گیاهچه‌های حاصل، گیاهان منتخب به‌منظور تأیید الحاق و رونویسی ژن هدف تجزیه و تحلیل مولکولی شدند و از نظر مقایسه سطح تحمل به علف‌کش ارزیابی زیستی شدند. نتایج بررسی لاین‌های تراریخت حاصل از راه *gPCR* و *RT-PCR* نشان‌دهنده انتقال و بیان موفق تراژن‌های یادشده بودند. آزمون زیستی نیز بروز مقاومت نسبی در لاین‌های بیان‌کننده هم‌زمان دو سازه ژنی در مقایسه با نمونه‌های غیرتراریخت و لاین‌های تراریخت تک‌ژنی را نشان داد. مطالعه 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

* نگارنده مسئول: نشانی پست الکترونیک: am-amir@nigeb.ac.ir، شماره تماس: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۴۷

مقدمه

دو رقم کلزای مقاوم به گلوکوسینیت-آمونیم و گلایفوسیت و همچنین محصولات هیبرید مقاوم به این دو علف کش تولید شده‌اند (Oliver *et al.*, 2016). علف کش با طیف گسترده گلایفوسیت آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمیت-۳-فسفات سنتاز (EPSPS) در مسیر شیکیمات را مهار می‌کند. این آنزیم واکنش تبدیل شیکیمیت-۳-فسفات (S3P) و فسفوانول پیرووات (PEP) به ۵-انول پیروویل شیکیمیت-۳-فسفات را کاتالیز می‌کند که مرحله مهمی در بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک در گیاهان است. ابتدا گلایفوسیت علف کشی غیرانتخابی و در نهایت علف کشی انتخابی با سازگاری محیطی زیاد برای محصولات تراریخت مقاوم به گلایفوسیت و پرمصرف‌ترین علف کش استفاده شده در جهان مطرح شد. محل هدف مشخص، توانایی رفتن به بافت‌های گیاه، خطر سمیت کم برای انسان و سایر جانوران از دیگر ویژگی‌های این علف کش 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). به کارگیری آنزیم هدف EPSPS سمیت‌زدایی مولکول گلایفوسیت دو راهبرد اساسی برای توسعه موفقیت آمیز محصولات مقاوم به گلایفوسیت هستند. راهبرد اول در بیشتر محصولات تجاری مقاوم به گلایفوسیت با به کارگیری دو شکل جهش یافته و مقاوم ذاتی آنزیم EPSPS استفاده شده است. این روش از نظر تئوری معایبی مانند باقی ماندن گلایفوسیت و تجمع آن در مناطق مرستمی گیاه دارد که ممکن است به بروز برخی

گیاه دانه روغنی کلزا (*Brassica napus* L.) از گیاهان مهم زراعی متعلق به تیره کلمیان (Brassicaceae) است (Elahi *et al.*, 2016)؛ علاوه بر مصرف گسترده کلزا برای تهیه روغن‌های خوراکی، این گیاه منبع مهمی برای تغذیه حیوانات است و روغن آن در صنعت و سوخت‌های زیستی استفاده می‌شود. گسترش سطح زیر کشت و تولید کلزا به علت وجود تنش‌های زیستی و غیرزیستی در ایران محدود شده است. مصرف جهانی کلزای چهاردهم 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 علف کش در سال ۱۹۹۶ تولید شدند و پس از آن، محصولات زیادی از جمله 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 علف کش توسعه و محصولات تراریخت مقاوم به علف کش به سرعت در سراسر جهان گسترش یافته‌اند و فواید کشت آنها مدنظر قرار گرفته‌اند؛ به طوری که طی ۲۱ سالی که از کشت انبوه و تجاری محصولات تراریخت می‌گذرد، صفت مقاومت به علف کش با عنوان صفت غالب بیشترین درصد سطح کشت این محصولات را به خود اختصاص داده است (Duke, 2015; Shaner, 2014).

دانه‌روغنی منتج شوند؛ این مهم با در نظر گرفتن واردات بیش از ۹۰ درصدی روغن‌های خوراکی کشور و ضرورت توسعه سطح زیرکشت این محصولات از راه مدیریت بهینه علف‌های هرز بیش‌ازپیش اهمیت می‌یابد.

مواد و روش‌ها

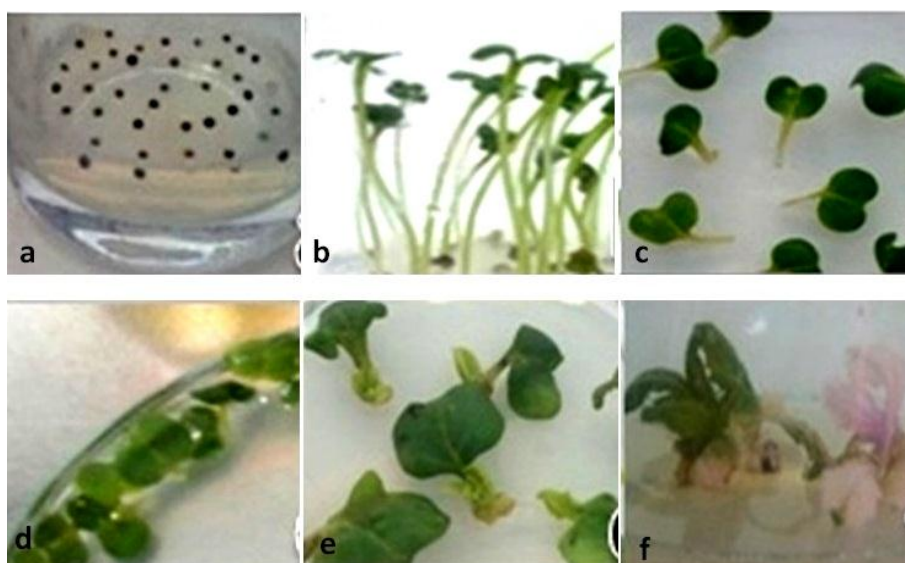
ساخت سازه‌های ژنی: ساخت سازه حاوی دو کاست ژنی با استفاده از سازه‌های تک‌ژنی حاوی ژن‌های *epsps* و *gox* انجام شد که در گذشته به‌تنهایی برای تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری استفاده شده بودند (Kahrizi *et al.*, 2007; Hadi *et al.*, 2012). یکی از ژن‌های استفاده‌شده 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*، پروموتور CaMV 35S و پایان‌دهنده Nos از روی ناقل pBI121 طراحی و جایگاه آنزیم

ویژگی‌های نامطلوب مانند جلوگیری از توسعه اندام‌های تولیدمثلی و در نتیجه بازده 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 آمینومتیل فسفونیک‌اسید (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 کنترل‌کننده بیان در این رخدادهای تجاری به علت وجود حقوق مالکیت فکری شرکت‌های تولیدکننده آنها ممکن نیست. در مطالعه 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 کنترل‌کننده بیان آنها به‌طور هم‌زمان ارزیابی نشده است. تجزیه و تحلیل 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 می‌تواند به استفاده از ایده‌های برتر برای توسعه محصولات تراریخت نسل جدید به‌ویژه در گیاهان

شوک گرمایی به آگروباکتری سویه 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).

برشی *EcoRI* در دو سر آن تعیین شد. از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تکثیر قطعه مد نظر از روی ناقل pBI121 حاوی ژن مصنوعی استفاده شد. محصول در جایگاه *EcoRI* در پایین دست کاست ژنی CaMV 35S-epsps-Nos روی ناقل pBI121 قرار داده شد. سازه بیانی نو ترکیب حاصل با روش



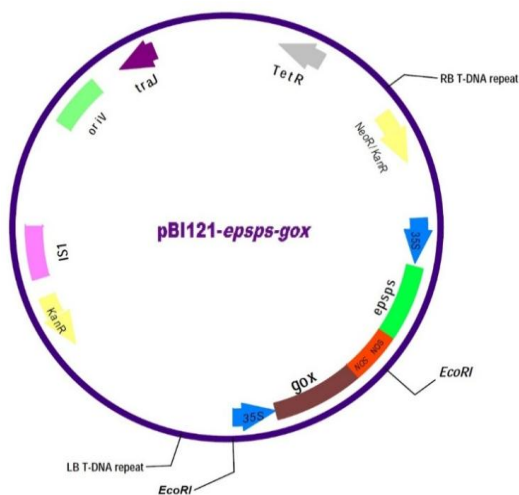
شکل ۱- مراحل انتقال سازه ژن هدف به گیاه کلزا و غربال گیاهان تراریخت از غیر تراریخت. a. کشت بذر گیاه کلزا در محیط جوانه‌زنی، b. دانه‌های رشد یافته در وضعیت چهارروزه، c. کشت دمبرگ‌های لپه‌ای جدا شده از گیاه در محیط پیش کشت، d. آلوده‌سازی ریزنمونه‌ها با سوسپانسیون آگروباکتری ($OD=0.5-1$)، e. جوانه‌زنی دمبرگ‌های لپه‌ای در محیط انتخابی حاوی کانامایسین، f. باززایی نوساقه‌های سبز تراریخت احتمالی در محیط طویل‌سازی نوساقه

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.

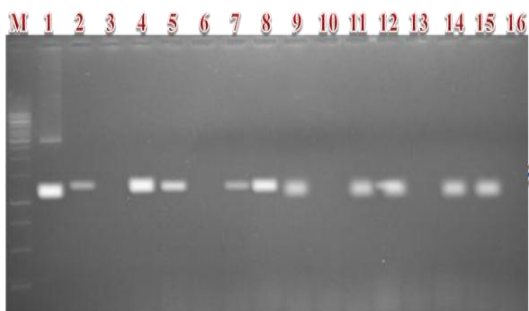
ارزیابی مولکولی گیاهان تراریخت: DNA
ژنومی با بافر CTAB از برگ‌های جوان گیاهچه‌های باززایی شده استخراج و گیاهچه‌های تراریخت احتمالی با PCR و آغازگرهای اختصاصی تراژن‌ها (جدول ۱) غربال‌گری شدند (Murray and Thompson, 1980). به‌منظور تأیید بیان تراژن‌ها در سطح رونویسی در گیاهان تراریخت، بافت تازه برگ‌ی برداشت و RNA تام با بافر RNX-Plus (SinaClon) استخراج شد. پس از تأیید کیفیت RNA با الکتروفورز و

جدول ۱- ویژگی‌های آغازگرهای به‌کاررفته در مطالعه حاضر

نام آغازگر	توالی (5'→3')	دمای ذوب	اندازه قطعه تکثیر شده (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	



شکل ۲- نقشه شماتیک کاست‌های ژنی ناقل ترکیب دو کاسته و نمایش جهت‌گیری دو کاست ژنی *epsps* و *gox*. Kan R. ژن نوامایسین فسفو ترانسفراز (نشانگر انتخابی)، NOS. ژن پایان‌دهنده نوپالین سنتاز، 35S. آغازگر



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

(Fermentas)

آستانه مقاومت لاین‌های تراریخت در محیط

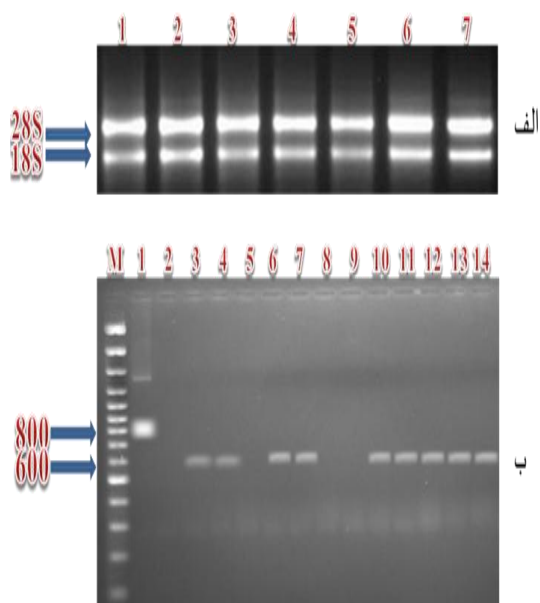
حاوی علف‌کش: بذرهاى حاصل از گیاهان T₀ در شیب غلظت صفر تا ۱ میلی‌مولار علف‌کش گلایفوسیت (اضافه‌شده به محیط کشت MS استریل پیش از اتوکلاو) در شرایط درون‌شیشه (*in vitro*) کشت داده شدند. برای هر بذر ۵ تکرار در نظر گرفته شد. حد مقاومت گیاهچه‌های دوژنی ریشه‌دار شده با گیاهچه‌های تک‌ژنی و گیاهچه‌های شاهد غیر تراریخته 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 تکثیر شده از روی ناقل pBI121 حاوی ژن *gox* و ناقل pBI121 حاوی ژن *epsps* به‌طور هم‌زمان با آنزیم *EcoRI* هضم و ناقل جدید حاوی ژن‌های *epsps* و *gox* طی واکنش اتصال ساخته شد (شکل ۲). با توجه به الگوی الکتروفورزی محصولات نتیجه گرفته می‌شود دو سازه 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 میزان آگروباکتری انتقال یافتند. حضور سازه‌ها در میزان جدید با غربال‌گری PCR ارزیابی شد (شکل ۳).

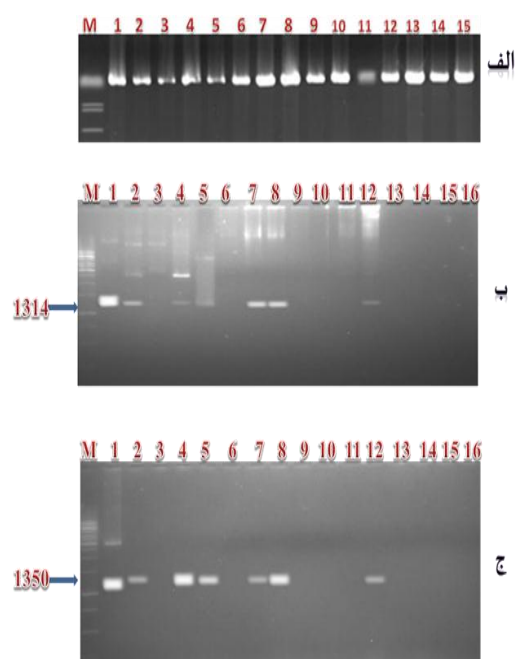
به منظور بررسی رونویسی ژن مدنظر در گیاهان تراریخت، RNA تام از بافت برگ‌های تازه استخراج شد. برای اطمینان از RNA استخراجی، مقداری از آن روی ژل آگارز ۰/۸ درصد الکتروفورز شد (شکل ۵).



شکل ۵- الف. الگوی الکتروفورزی RNA کل در گیاهان بررسی شده روی ژل آگارز ۰/۸ درصد، ب. چاهک ۱: محصول PCR از DNA ژنومی گیاه غیرتراریخت، چاهک شماره ۲: کنترل منفی بدون الگوی DNA، چاهک‌های ۳ تا ۱۶: الکتروفورز محصول RT-PCR گیاهان تراریخت شده 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 ریوزومی 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 تراریخت شده مشاهده می‌شود.

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



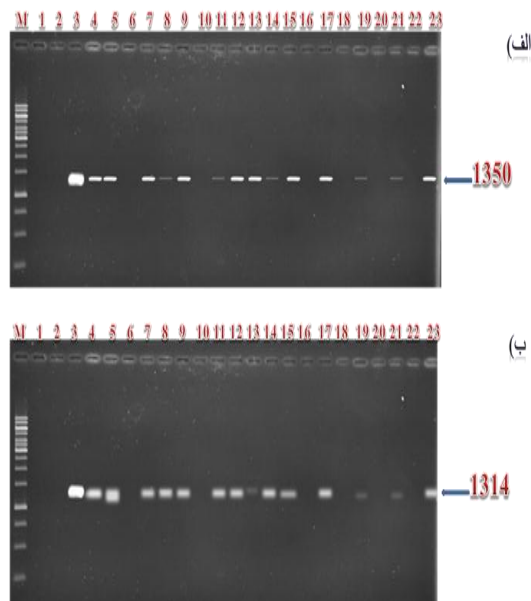
شکل ۴- الف. الکتروفورز نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان کلزا روی ژل آگارز ۱ درصد. چاهک شماره ۱. گیاه غیرتراریخت، چاهک‌های ۲ تا ۱۵. نمونه‌های حاصل از گیاهان تراریخت، ب. الکتروفورز محصولات PCR مربوط به DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت کلزا با آغازگرهای اختصاصی ژن *gox*، ج. گیاهان تراریخت کلزا با آغازگرهای اختصاصی ژن *epsps*، چاهک شماره 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

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

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 از جمله سالم‌ترین روغن‌ها به شمار می‌رود (Elahi *et al.*, 2016). کشف علف‌کش‌های سنتتیک در سال ۱۹۴۵ بزرگ‌ترین دستاورد فناورانه بود که مدیریت علف‌ها را به سرعت 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 به تنهایی تمام علف‌های هرز را کنترل می‌کرد. محصولات تراریخت با ویژگی مقاومت به علف‌کش مدیریت علف‌های هرز را آسان، مؤثر و کارآمد کردند. صرفه اقتصادی، افزایش محصول، کاهش آثار زیست‌محیطی از دیگر عوامل همه‌گیر شدن این فناوری هستند (Green, 2014; Brookes, 2014). نخستین بار در سال ۱۹۹۹، کلزای مقاوم به گلایفوسیت و یا گلو فوسینیت کشت شد. این گیاه



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

در نهایت، 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، آستانه 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 سبزیگی 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 علف کش داشتند؛ احتمالاً علت این مشاهده اینست که EPSPS نوع جهش‌یافته باعث کاهش میل ترکیبی علف کش 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 ناخواسته علف کش تجمع‌یافته روی ویژگی‌های فیزیولوژیک (به‌ویژه روی اندام‌های زایشی) ممانعت می‌کند. گفتنی است برای افزایش مقاومت گیاهان به مقادیر زیاد علف کش (بیشتر از ۰/۵ میلی‌مولار)، استفاده از ژن‌های *epsps* با مقاومت ذاتی (کلاس II) و نیز پتیدهای نشانه‌ی کلروپلاستی با کارایی مناسب در گیاه کلزا (هدفمندسازی خوب و شکسته‌شدن به موقع توالی) و نیز بهره‌گیری از توالی‌های تشدیدکننده در بالادست ژن ضروری هستند. ترکیب راهبردهای مختلف در توسعه محصولات مقاوم به گلایفوسیت مهم است. دو آنزیم گلیفوسیت‌اکسیدوردوکتاز و گلیفوسیت‌استیل ترانسفراز توانایی سمیت‌زدایی گلایفوسیت را دارند. تاکنون محصولات بسیاری شامل ذرت، سیب زمینی، سویا، چغندر قند و گوجه با دو ژن *gox* و *cp4* تراریخت شده‌اند (Dun et al., 2014). پیش‌ازین، 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 علف کش در جهان ۴۸۱ میلیون دلار در سال ۲۰۱۲ بوده است (Brookes and Barfoot, 2012)؛ کانادا با تولید سالانه ۶ میلیون هکتار بزرگ‌ترین تولیدکننده 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 از جمله کلزای GT200 به‌طور هم‌زمان از دو ژن *cp4 epsps* (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 به ترتیب از پروموتور Figwort Mosaic Virus (FMV) و پتید نشانه‌ی کلروپلاستی با منشأ گیاه آرابیدوپسیس بهره‌گیری شده است. در مطالعه حاضر، با توجه به ممکن نبودن استفاده از ژن‌های دارای حقوق مالکیت فکری ثبت‌شده و پیشینه پژوهش‌های قبلی تیم کاری ما، از *epsps* با منشأ *E. coli* (k12) دارای جهش‌های نقطه‌ای (شامل گلايسين ۹۶ به آلانين و آلانين ۱۸۳ به ترئونين) و توالی *gox* سنتز شده با کدون‌های بهینه‌شده برای گیاه کلزا و ساختار ثانویه اصلاح‌یافته mRNA، هر دو تحت کنترل پروموتور 35S ویروس موزایک گل کلم (CaMV 35S) استفاده شد. مطالعه حاضر برای نخستین بار ترکیب و کارایی این دو ژن ویژه را به‌طور هم‌زمان در گیاه کلزا ارزیابی می‌کند تا برای هدف نهایی تجاری‌سازی گیاه مقاوم بهره‌برداری

- 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.
- انجام شده است (Zhao *et al.*, 2015). مقایسه قدرت جوانه‌زنی بذرها و میزان مقاومت نسل‌های بعدی گیاهان تراریخت دو کاسته با گیاهان تک کاسته و بذرها غیر تراریخت (Wt) در غلظت‌های مختلف گلایفوسیت در پژوهش‌های بعدی پیشنهاد می‌شود.
- ### سپاسگزاری
- نویسندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای تأمین اعتبار مالی پروژه حاضر (طرح مأموریت محور ۴۰۷-م) سپاسگزاری می‌کنند.
- ### 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 and 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 and 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.

- 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.