مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
علمی-پژوهشی و ISC

تراریختی گیاه کلزا با ساختار ترکیبی حاوی ژن جهش یافته *epsps* و ترادف نشانه کلروپلاستی به منظورافزایش تحمل به علف کش گلیفوسیت

مه لقا قوامی[۱]، امیرموسوی[۲*]، علی هاتف سلمانیان[۳]، فرانک هادی [٤]

[۱]کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان.
[۲]دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
[۳]استاد گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری.
[٤]استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۰۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۳/۲۰

چکیده

گیاهان زراعی متحمل نسبت به علف کش گلیفوسیت یکی از کاراترین روش های موجود در کنترل علف های هرز مزارع محسوب می شود. گلیفوسیت با مهار آنزیمEPSPS (۵-انول پیرویل شیکیمات-۳-فسفات سنتاز) در مسیر شیکیمات مانع سنتز اسید های آمینه حلقوی و در نتیجه مرگ گیاه می شود. یکی از موثرترین راه های ایجاد گیاهان مقاوم به علف کش گلیفوسیت، دست ورزی ژن کد کننده آنزیم EPSPS به منظور کاهش تمایل گلیفوسیت به این آنزیم می باشد. در مطالعات گذشته از روش جهش زایی هدایت یافته برای ایجاد دو جهش نقطه ای در ژن *epsps اشرشیا کولی* جهت تبدیل اسید آمینه گلیسین ۹۶ به آلانین و آلانین ۱۸۳ به ترئونین استفاده شد. در این تحقیق، ژن *epsps* باکتری *اشرشیاکولی* (*Ec-epsps*) با دو جهش مذکور، به پپتید نشانه کلروپلاستی ژن *epsps* مربوط به گیاه کلزا متصل شد. سپس، سازه ژنی حاصله در ناقل بیانی گیاهی pBI121 همسانه سازی و با روش مبتنی بر *Agrobacterium* به گیاه کلزا رقم PF-704591منتقل شد. حضور و بیان ژن مورد نظر با آنالیز های مولکولی بررسی و نتایج حاصل از آزمون زیستی نشان داد که گیاهان تراریخت، علف کش گلیفوسیت را تا سطح ۲ میلی مولار تحمل می نمایند. در حالی که گیاهان شاهد در غلظت ۰/۵ میلی مولار از علف کش از بین رفتند.

واژه های کلیدی: ***کلزا (Brassica napus L.)، مقاومت به علف کش، گلیفوسیت، epsps دستورزی شده، پپتید نشانه کلروپلاستی.***

*نویسنده مسئول: امیر موسوی تلفن: ۰۲۱٤٤۷۸۷۳۳٦ Email: m-amir@nigeb.ac.ir

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) با تامین ۱۲٪ از کل روغن خوراکی جهان بعد از سویا و نخل روغنی مهم ترین گیاه روغنی به شمار می رود (Canola Council of Canada, 2008). ارزش غذایی روغن آن به دلیل وجود اسید های چرب بی نظیری است که آن را مطلوب تر از سایر روغن های گیاهی نموده است (Barzan et al. 2015; Kakaei et al. 2009) همچنین کنجاله کلزا بعد از روغن کشی به عنوان غذای دام مورد استفاده قرار می گیرد (Stringam *et al.* 2003). یکی از مهم ترین عوامل تهدید کننده کشت و گسترش کلزا، علاوه بر آفات و بیماری ها، وجود علف های هرز در مزارع می باشد (Bhalla *et al.*, 2008). علف های هرز، کیفیت و کمیت روغن کلزا را کاهش می دهند (Kishore *et al.*, 1988). علف کش با دامنه عملکرد وسیع و غیر انتخابی گلیفوسیت برای کنترل علف های هرز بسیار استفاده می شود. فعالیت اصلی گلیفوسیت در گیاهان، مهار رقابتی آنزیم EPSPS می باشد که ششمین و تخصصی ترین مرحله ساخت اسید های آمینه حلقوی در چرخه شیکیمات که در گیاهان در کلروپلاست قرار دارد، مهار می کند (Amrhein *et al.*, 1983). این چرخه مسئول ساخت اسید های آمینه حلقوی در گیاهان، باکتری ها و برخی از قارچ ها می باشد. دو نوع آنزیم EPSPS تاکنون شناسایی شده است، نوع اول، به طور ذاتی به گلیفوسیت حساس است، درحالی که نوع دوم آن به گلیفوسیت مقاوم می باشد (Funke *et al.*,2006). پس از اینکه آنزیم EPSPS، هدف اولیه گلیفوسیت در دهه ۱۹۸۰ شناخته شد، این آنزیم اولین انتخاب برای تولید محصولات متحمل به گلیفوسیت قرار گرفت. مطالعات بسیاری در راستای ایجاد آنزیم EPSPS مقاوم به گلیفوسیت تاکنون انجام شده است. یکی از مهم ترین راه کارهای مقاوم سازی گیاهان زراعی به علف کش گلیفوسیت، تولید آنزیم EPSPS مقاوم به علف کش از طریق ایجاد جهش های نقطه ای می باشد (Devine *et al.*, 2000). مطالعات ساختاری بر روی اسید های آمینه حفظ شده در این آنزیم، دو اسید آمینه را شناسایی کرد که در جایگاه فعال این آنزیم قرار ندارند ولی بر روی تمایل گلیفوسیت به EPSPS بسیار موثرند. گلیسین در موقعیت ۹٦ با گلیفوسیت پیوند هیدروژنی برقرار می کند و آلانین در جایگاه۱۸۳، اسید آمینه مهمی برای میان کنش گلیفوسیت با آنزیم EPSPS می باشد (Schonbrunn *et al.*, 2011). تغییر هر کدام از این اسید آمینه ها به تنهایی تمایل آنزیم به اتصال با گلیفوسیت را به مقدار قابل توجهی کاهش می دهد (Eichholtz *et al.*, 2001). این تغییرات اگرچه تمایل آنزیم به گلیفوسیت را کاهش می دهد ولی تغییری در فعالیت آنزیم ایجاد نمی کند. در تحقیقات گذشته، در ژن *epsps* مربوط به باکتری *اشرشیا کولی* K12 (*Ec-epsps*) دو جهش جانشینی شامل گلیسین ۹٦ به آلانین و آلانین

۱۸۳به ترئونین به منظور کاهش تمایل گلیفوسیت به آنزیم EPSPS انجام شد (Kahrizi *et al.*, 2007). در تحقیق حاضر، به منظور انتقال موثر آنزیم EPSPS به کلروپلاست، توالی پپتید نشانه کلروپلاستی (Chloroplast signal peptide) مربوط به ژن *epsps* گیاه کلزا به ابتدای ژن *Ec-epsps* اضافه شد و سپس با انتقال این سازه ژنی (*sp-epsps*) به کلروپلاست گیاه کلزا، میزان مقاومت گیاه کلزا به علف کش گلیفوسیت مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده

تنظیم کننده های رشد گیاه و آنتی بیوتیک ها از شرکت Merk آلمان با بالاترین درجه خلوص خریداری شد. کیت های آزمایشگاهی جهت تخلیص محصول PCR و استخراج ناقل، آنزیم های محدودگر و دیگر آنزیم های موردنیاز برای ساخت سازه ژنی از شرکت های Roche و Fermentas تهیه شدند.

سویه های باکتری، ناقل ها و مواد گیاهی

باکتری *E. coli* سویه DH5α از شرکت Invitrogene خریداری گردید و باکتری آگروباکتری سویه LBA4404، برای تراریختی گیاه استفاده شد. از ناقل همسانه سازی pUC19 و ناقل بیانی گیاهی pBI121 به منظور همسانه سازی و تهیه ساختار های انتقال به گیاه، استفاده شد. بذور کلزا رقم PF-7045-91 از موسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید و تا زمان استفاده در ٤- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. کلیه روش‌های ساخت محیط های کشت و آنتی‌بیوتیک‌ها، اندازه‌گیری غلظت DNA، تخلیص و هضم آنزیمی پلاسمید، تخلیص محصول هضم آنزیمی، الحاق قطعه هدف در ناقل، تهیه سلول‌های مستعد و غربالگری کلونی‌ها براساس کتب مرجع در روش‌های آزمایشگاهی مولکولی انجام شد (Sambrook *et al*., 2001).

تهیه سازه ژنی *sp-epsps*

به منظور اتصال ژن *Ec-epsps* دارای دو جهش مضاعف به پپتید نشانه کلروپلاستی گیاه کلزا، ابتدا ژن *Ec-epsps* ۱۳۰۰ نوکلئوتیدی توسط آغازگرهای اختصاصی (*eps* F و *eps* R) و سپس توالی پپتید نشانه کلروپلاستی ژن *epsps* گیاه کلزا با آغازگرهای *beps* F و *beps* R (۲۰۰ نوکلئوتید) به طور جداگانه تکثیر شدند، برای ایجاد قطعات همپوشان، یک جفت آغازگر تحت عنوان *epsbn* F و *epsbn* R با کمک نرم افزار primer 3 online (*biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi*) طراحی شد. بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمراز Soeing،دو PCR جداگانه با آنزیم پلیمراز *pfu* انجام شد. واکنش I PCR و II به ترتیب با کمک ۱ پیکومول از آغازگرهای *epsbn* F, *eps* R، دمای اتصال ۵۷ درجه سانتی گراد و *epsbn* R ,*beps* F، دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی گراد انجام گردید و پس از الکتروفورز بر روی

ژل آگارز ۱٪، قطعات توسط کیت از روی ژل استخراج گردید. بدین ترتیب در انتهای ´۳ ترادف نشانه و ´۵ ژن جهش *epsps* نقاط مشترک به وجود آمد. سپس این دو قطعه با اندازه های ۱۳۰۰ و ۲۰۰ نوکلئوتیدی با کمک روش Soeing به نسبت ۱ به ۳ طی دو مرحله به هم متصل شدند. مرحله اول برای اتصال دو قطعه با چرخه های کم (حدود ٦ تا ۱۰) در حضور دو محصول I PCR و II به نسبت ۱ به ۳ انجام شد و سپس در مرحله دوم با استفاده از آنزیم Expand high fidelity و با آغازگرهای F *beps* و R *eps* قطعه ژنی ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی حاصل گردید. سازه ژنی حاصله *sp-epsps* نامیده شد (جدول ۱).

جدول۱ - مشخصات آغازگرهای به کار رفته در این تحقیق.

Table 1- Characteristics of the primers used in this study.

	نام توالی Primer name	توالی ('3→'5) Sequence	اندازه محصول تکثیر یافته Product length
Overlapping extension (SOEING) PCR	*Ec-epsps* : signal peptide	***epsbn F***: 5'- ACAGCTTCTGTTTCTATGGAATCCCTGACCT-3‘ ***eps* R:** 5' –CGGGATCCTCAGGCTGCCTGGCTAATC -3' ***beps*** F: 5'- AAATTTCTAGAATGGCGCAATCTAGCAGA-3' ***epsbn* R:** 5'- ACGTCAGGAATTCCATGGAAACAGAAGCTGT-3'	1300 bp 200 bp
	sp-epsps	***beps*** F: 5'- AAATTTCTAGAATGGCGCAATCTAGCAGA-3' ***eps* R:** 5' –CGGGATCCTCAGGCTGCCTGGCTAATC -3'	1500 bp

ساخت ناقل بیانی pBI –*sp-epsps*

سازه ژنی *sp-epsps* پس از تکثیر، در ناقل pUC۱۹ توسط آنزیم لیگاز T4 همسانه سازی شد. سپس صحت ناقل pUC- *sp-epsps* بوسیله آنزیم های برشی، واکنش PCR و توالی یابی با استفاده از آغازگر های استاندارد M۱۳ مورد تائید قرار گرفت. سازه ژنی *sp-epsps* با آنزیم های برشی *Xba*I/*Sac*I از ناقل pUC۱۹ برید شده و در ناقل بیانی pBI121 به جای ژن بتاگلوکورونیداز (*gus*) قرارگرفت. پس از انتقال ناقل pBI–*sp-epsps* به *E. coli*، صحت آن توسط برش با آنزیم های *Xba*I/*Sac*I و PCR با آغازگر های اختصاصی ژن مربوطه اثبات گردید. ناقل pBI– *sp-epsps* به روش استاندارد انجماد و ذوب با استفاده از CaCl2 ۲۰ میلی مولار و ازت مایع به باکتری آگروباکتری سویه ی LBA4404 منتقل شد و کلونی های رشد یافته بر روی محیط انتخابی کانامایسین/ریفامپیسین توسط واکنش کلونی PCR با آغازگر های اختصاصی مورد تایید قرار گرفتند (Sambrook *et al.*, 2001).

انتقال ژن به گیاه و باززایی آن

به منظور انتقال سازه ژنی مورد نظر به گیاه کلزا، بذور این گیاه پس از ضد عفونی شدن

سطحی، در محیط MS کشت داده شدند. سپس با قطع کردن دمبرگ های لپه ای، ریزنمونه ها تهیه گردیدند. ریزنمونه ها بر روی محیط پیش کشت حاوی ۳/۵ mg/l هورمون BAP کشت داده شدند. پس از مجاورت با آگروباکتری، ریزنمونه ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در محیط کشت هم کشتی با اگروباکتری قرار گرفتند. پس از باززایی بیشتر ریزنمونه ها و به منظور حذف نمونه های غیر تراریخت، این شاخه ها به محیط انتخابی با ۱۵ mg/l کانامایسین منتقل شدند. گیاهچه های بدست آمده که از نظر اندازه و ریشه دهی آمادگی لازم را دارا بودند، به خاک انتقال داده شدند.

تایید تراریختی گیاهان کلزا از طریق واکنش PCR

جهت بررسی گیاهان تراریخت و اثبات حضور ساختارهای مورد نظر در ژنوم گیاه، روش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *sp-epsps* برای ژنوم گیاه کلزا با دمای اتصال ۵۸ درجه سانتی گراد انجام شد.

تأیید بیان ژن در سطح رونویسی در گیاه تراریخت

به منظور تأئید بیان تراژن در گیاهان تراریخت شده از روش RT-PCR استفاده شد. بدین منظور، RNA از گیاه تراریخت با استفاده از کیت(PLUS) RNX استخراج شد و پس از ساخت cDNA تک رشته‌ای و تعیین رقت مناسب، از آن به عنوان الگو برای ساخت cDNA دو رشته‌ای و تکثیر آنها توسط PCR و دمای اتصال ۵۸ جهت تایید بیان ژن مصنوعی در گیاه تراریخت استفاده شد.

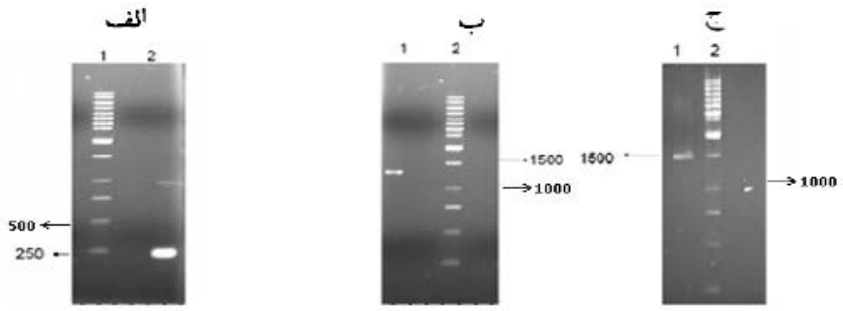
آزمون زیستی گیاهان تراریخت نسل T0

جهت ارزیابی مقاومت به گلیفوسیت، گیاهان تراریخته با سازه ژنی و گیاهان شاهد (غیر تراریخته) با غلظت های مختلف گلیفوسیت (۰/۵، ۱، ۱/۲، ۱/۵ و ۲ میلی مولار) محلول پاشی شدند. یک هفته پس از اولین تیمار، دوباره این محلول پاشی تکرار شد. پس از گذشت ۲ هفته وضعیت گیاهان و میزان سبز بودن برگ های آن ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

آنزیم EPSPS توسط ژنوم هسته ای کد شده و پس ازساخته شدن بر روی ریبوزوم های سیتوپلاسمی به درون کلروپلاست هدایت می شود (Read and Cobb, 2002). اطلاعات لازم برای هدفمند شدن پروتئین به سمت اندامک مورد نظر توسط بخشی از توالی پپتیدی که معمولاً در انتهای آمینی پروتئین قرار گرفته و پپتید نشانه نام دارد، مهیا می‌گردد. امروزه، استفاده از این توالی ها در تحقیقات زیست فناوری به منظور هدایت پروتئین نوترکیب به اندامک های خاص رو به افزایش است. این ترادف ها به گونه ای عمل می‌کنند که کارآیی انتقال یک پروتئین ساخته شده در سیتوپلاسم به داخل اندامک را چندین بار افزایش می‌دهد. با توجه به جایگاه مسیر شیکیمات در کلروپلاست گیاهان، باید ژن

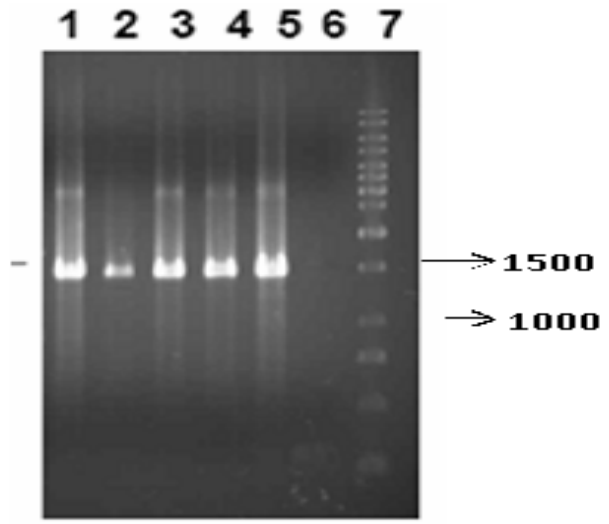
*epsps*دارای دوجهش مضاعف را به روشی کارا به درون کلروپلاست گیاه کلزا هدایت کرد. به این منظور در این پروژه ژن *epsps* باکتری *اشرشیا کولی* و پپتید نشانه کلروپلاستی گیاه کلزا، از طریق واکنش PCR به طور مجزا با کمک آغازگرهای هم پوشان توسط آنزیم *pfu* تکثیر و دو قطعه ی ۱۳۰۰ و ۲۰۰ نوکلئوتیدی حاصل شد (شکل۱ الف و ب). سپس این ۲ قطعه تکثیر شده، با استفاده از آغازگر *beps* F و *eps* R وآنزیم Expand high fidelity به یکدیگر متصل شده و سازه ی ژنی *sp-epsps* با اندازه ۱۵۰۰ جفت بازی حاصل گردید (شکل ۱ ج).



شکل ۱- الگوی الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر قطعات هم پوشان در توالی های *Ec-epsps* و پپتید نشانه و اتصال آنها توسط روش توسعه نقاط هم پوشان الف) چاهک ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb (Fermentas) چاهک۲: تکثیر قطعه حد واسط پپتید نشانه کلروپلاستی (۲۰۰bp) با آغازگر *epsbn* R و *beps* F. ب) چاهک ۱: تکثیر قطعه حد واسط *epsps* (۱۳۰۰bp) با آغازگر *eps* R و *epsbn* F چاهک ۲: نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb (Fermentas). ج) اتصال ژن *Ec-epsps* به پپتید نشانه کلروپلاستی با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی(*beps* F و *eps* R) چاهک ۱: سازه ژنی *sp-epsps* (۱۵۰۰ bp) چاهک ۲: نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb(Fermentas).

Figure 1- Electrophoretic pattern of PCR products for amplification of overlapping fragments in *Ec-epsps* and signal peptide sequences and fusion of them by overlapping extension technique. A: Lane 1, 1 Kb ladder; Lane2, amplification of signal peptide intermediate fragment (200 bp) using *beps* F and *epsbn* R primers; B: Lane 1, amplification of *epsps* intermediate fragment (1300 bp) using *eps* R and *epsbn* F primers, Lane 2, 1 Kb ladder (Fermentas); C: Fusion of *Ec-epsps* to chloroplast signal peptide using specific primers (*beps* F و and *eps* R); Lane 1, *sp-epsps* (1500 bp), Lane 2, 1 Kb ladder (Fermentas).

قطعه نهایی در ناقل pUC۱۹ همسانه سازی شد و در مرحله بعد پس از برش ناقل pUC۱۹ با استفاده از آنزیم های *Xba*I و *Sac*I، سازه ژنی *sp-epsps*در ناقل pBI121 توسط یک واکنش اتصال قرار می گیرد و سپس ناقل *sp-epsps*– pBI برروی محیط جامد حاوی آنتی بیوتیک کاناماپسین غربالگری شد. پس از تایید همسانه سازی سازه ژنی در ناقل pBI121 با کمک هضم آنزیمی و PCR با آغازگرهای اختصاصی، جهت انتقال ژن به گیاه، این ناقل به اگروباکتری منتقل شد (به روش انجماد و ذوب) (شکل ۲).



شکل ۲- تایید سازه ژنی *sp-epsps*–pBI از طریق واکنش زنجیره ای پلی مراز، چاهک های ۱-۵: تایید حضور ناقل حاوی قطعه *sp-epsps* در باکتری های نوترکیب از طریق PCR با آغازگر های اختصاصی چاهک٦: ناقل pBI121 بدون سازه ژنی به عنوان کنترل منفی، چاهک ۷: نشانگر وزن مولکولی ۱ Kb (Fermentas).

Figure 2- Confirmation of pBI-*epsps* gene construct by polymerase chain reaction, Lanes 1-5, confirmation the presence of vector contains *sp*-epsps fragment in recombinant bacteria by PCR with specific primers; Lane 6, pBI121 without gene construct as a negative control; Lane 7, 1Kb ladder (Fermentas).

کشت بافت و تراریختی گیاه

برای انتقال ژن به گیاه کلزا از باکتری اگروباکتری سویه LBA4404 استفاده شد و با توجه به وجود ژن مقاومت به کانامایسین در قطعه ی انتقال یافته، تولید نوساقه در بعضی از برگ های لپه ای بر روی محیط کشت گیاهی حاوی کانامایسین مشاهده شد(شکل ۳). شاخه های سبز باززایی شده به محیط طویل شدن نوساقه و القای ریشه زایی انتقال داده شدند.

آزمون PCR به منظور اثبات حضور سازه ژنی در گیاهان تراریخت

به منظور بررسی مولکولی گیاهان تراریخت، DNA ژنومی با استفاده از کیت تخلیص DNA ،از برگ های جوان و سبز گیاه کلزای تراریخت و شاهد غیر تراریخت استخـراج گـــردید. نتیجه PCR با استفاده ازآغازگرهای اختصاصی ابتدای ترادف نشانه و انتهای ژن جهش یافته *epsps* در شکل ٤ آمده است.

شکل ۳- گیاهچه های سبز تراریخت در محیط طویل شدن نوساقه حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین پس از ۱ ماه.

Figure 3- Green transformed plant in shoot elangation medium containing 15 mg/l kanamycin after one month.

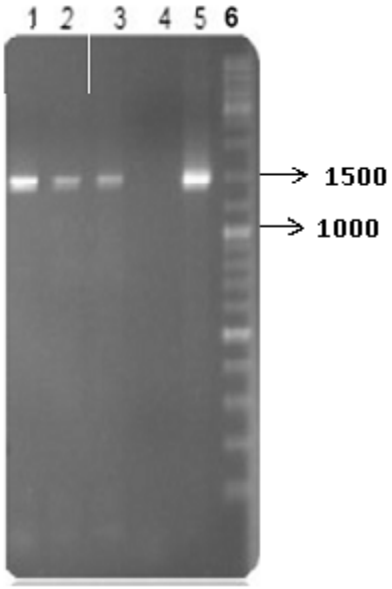
U] Comment [۱]: شکل ها باید عنوان انگلیسی هم داشته باشند؟؟؟
لطفا برای همه شکل ها نوشته شود

آزمون RT-PCR به منظور اثبات حضور رونوشت در گیاهان تراریخت

پس از تائید حضور ژن *sp-epsps* در گیاهان تراریخت با استفاده از PCR، اقدام به بررسی نسخه‌برداری و بیان این ژن ها با کمک روش RT-PCR شد. پس از استخراج RNA کل و ساخت cDNA، با به کارگیری آغازگر های اختصاصی سازه ژنی، واکنش PCR انجام شد. همان طور که انتظار می رفت، در محصول RT-PCR گیاه تراریخت باند حدود ۱۵۰۰ bp مشاهده گردید(شکل ۵).

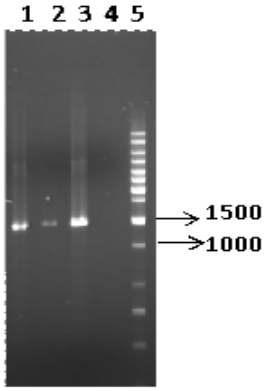
ارزیابی مقاومت به گلیفوسیت در گیاهان تراریخته

جهت ارزیابی مقاومت به گلیفوسیت، گیاهان تراریخته و گیاهان شاهد (غیر تراریخت) در غلظت های مختلف گلیفوسیت محلول پاشی شدند. گیاهان شاهد در غلظت ۰/۵ میلی مولار گلیفوسیت در مرحله اول از بین رفتند اما گیاهان تراریخت تا غلظت ۲ میلی مولار، پس از ۲ مرحله محلول پاشی با فاصله یک هفته، تحمل نشان دادند که نشان دهنده تحمل نسبی گیاهان تراریخت به علف کش گلیفوسیت می باشد (شکل ٦).



شکل ٤- الگوی الکتروفورز محصول آزمون PCR برای اثبات حضور سازه ژنی *sp-epsps* (۱۵۰۰ bp) در گیاه کلزا با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی *eps* R و *beps* F. چاهک های ۱ تا ۳: محصول PCR گیاه تراریخت حاوی سازه ژنی *sp-epsps* (۱۵۰۰bp)، چاهک٤: گیاه کلزای غیر تراریخت (کنترل منفی)، چاهک ٥: ناقل نوترکیب pBI121 (کنترل مثبت)، چاهک ٦: نشانگر وزن ملکولی Mix (Fermentas).

Figure 4- Electrophoretic pattern of PCR assay products to confirm the presence of *sp-epsps* construct (1500 bp) in canola plant using specific primers *beps* F and *eps* R. Lanes 1-3, PCR products of transformed plant containing *sp-epsps* (1500 bp); Lane 4, untransformed canola plant (negative control); Lane 5, recombinant pBI121 vector (positive control); Lane 6, Mix ladder (Fermentas).



شکل ٥- الگوی الکتروفورز محصول RT-PCR گیاهان کلزای تراریخت حاوی سازه ژنی *sp-epsps* (۱۵۰۰ bp) با بکارگیری آغازگرهای اختصاصی *eps* R و *beps* F. چاهک ۱-۲: محصول RT-PCR گیاه تراریخت حاوی سازه *sp-epsps* (۱۵۰۰bp)، چاهک ۳: ناقل نوترکیب pBI121 (کنترل مثبت)، چاهک ٤: گیاه کلزای غیر تراریخت (کنترل منفی)، چاهک ٥: نشانگر وزن ملکولی ۱Kb (Fermentas).

Figure 5- Electrophoretic pattern of RT-PCR products in transformed canola plants containing *sp-epsps* construct (1500 bp) using specific primers *beps F* and *eps R*. Lanes 1-2, RT-PCR products of transformed plants containing *sp-epsps* construct(1500 bp); Lane 3, recombinant pBI121 vector (positive control); Lane 4, untransformed canola (negative control); Lane 5, 1 Kb ladder (Fermentas).

ب (B) الف (A)

شکل ٦- مقایسه گیاهچه های تراریخت (الف) و غیر تراریخت (ب) پس از محلول پاشی با ۲ میلی مولار گلیفوسیت بعد از گذشت سه هفته.

Figure 6- Comparison of the transformed plant (A) and an untransformed plant (B) after spraying with 2 mM glyphosate after three weeks.

گیاهان تراریخت در غلظت ۰/۵ میلی مولار از گلیفوسیت که برای گیاهان غیر تراریخت کشنده است قادر به تحمل علف کش هستند، هر چند که با افزایش میزان دز علف کش تحمل گیاهان کاهش می یابد ولی در بالاترین غلظت اعمال شده، غلظت ۲ میلی مولار، گیاهان تراریخت همچنان عملکرد بهتری نسبت به گیاه غیر تراریخت در غلظت کشنده دارند.

مطالعات متعدد نشان داده است که برخی اسید های آمینه حفظ شده در آنزیم EPSPS نقش اساسی در اتصال گلیفوسیت به این آنزیم دارند و بنابراین ایجاد تغییرات در این اسیدهای آمینه از اصلی ترین روش ها برای جلوگیری از بازدارندگی و عدم اتصال گلیفوسیت به آنزیم EPSPS شده است. برای اولین بار padgette و همکارانش آنزیم EPSPS با تحمل بالا به گلیفوسیت را گزارش کردند که دارای جهش جانشینی Gly96 Ala بود (Padgette *et al.*, 1991). در این پروژه از ژن *epsps* -*Ec* باکتریایی که توسط روش جهش زایی نقطه ای، جهش یافته (Ala183Thr و Gly96Ala) و متحمل به گلیفوسیت شده بود استفاده گردید (Kahrizi *et al.*, 2007). اسیدهای آمینه Gly96 و Ala183 دو جایگاه اساسی برای میان کنش علف کش گلیفوسیت با آنزیم می باشند و تغییر هر کدام به تنهایی تمایل آنزیم به اتصال با گلیفوسیت را به مقدار قابل توجهی کاهش می دهد(Eichholtz et al., 2001). این تغییرات اگرچه تمایل آنزیم به گلیفوسیت را کاهش می دهد ولی تغییری در فعالیت آنزیم ایجاد نمی کند. مطالعات همچنین نشان داده است که می توان تمایل آنزیم به گلیفوسیت را توسط ایجاد تغییرات در آمینواسیدهای دیگر ی نیز کاهش داد (Baerson *et al.*, 2002).

مقایسه نتایج حاصل از تراریختی گیاه کلزا توسط آنزیم *epsps* بدون پپتید نشانه حاکی از آن است که میزان مقاومت ایجاده شده در گیاه کلزا نسبت به علف کش گلیفوسیت، یک مقاوت نسبی بوده است(Kahrizi *et al.*, 2008). تصادفی بودن سیستم انتقال ژن از طریق اگروباکتری در درون ژنوم میزبان و تعداد نسخه های وارد شده تراژن و پدیده خاموشی ژن می تواند دلیل مقاومت نسبی به علف کش گلیفوسیت باشد (Bhalla and Smith, 1998). با توجه به این که جایگاه آنزیم EPSPS در کلروپلاست گیاه قرار دارد(Della-Cioppa *et al.*, 2006) برای هدایت آن به سمت کلروپلاست یک پپتید نشانه کلروپلاستی با منشا گیاه کلزا ابتدای این آنزیم اضافه شد. نتایج حاصل از تراریختی گیاه کلزا با آنزیم EPSPS همراه با ترادف نشانه کلروپلاستی نشان داد که میزان مقاومت حاصله در مقایسه با مطالعات پیشین که بدون توالی نشانه انجام شده بودند، افزایش چشمگیری نداشت. به نظر می رسد بررسی ساختار فعال و عملکردی آنزیم EPSPS پس از افزایش پپتید نشانه کلروپلاستی و مقایسه آن با آنزیم EPSPS بدون پپتید نشانه

کلروپلاستی ضروری می باشد. لذا تراریختی ژنوم کلروپلاست با ژن *epsps* در ژنوم کلروپلاست می تواند یکی دیگر از راه کارهای مناسب برای ایجاد کلزای مقاوم به علف کش باشد (Ye *et al.*, 2001).

تشکر وقدردانی

نگارندگان از همکاری پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری در تامین اعتبار پروژه (طرح ٤٠٧-م)و امکانات لازم، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

منابع

Baerson SR, Rodriguez DJ, Tran M, Feng Y, Biest NA, Dill M (2002). Glyphosate- resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiology 129: 1265-1275.

Barzan Z, Dehdari M, Amiri Fallahi R. (2015). Study of genetic diversity in rapeseed (*Brassica napus* L.) genotypes using microsatellite markers. Journal of Agricultural Biotechnology 7(1): 29-42.

Bhalla PL, Smith N (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis.* Molecular Breeding 4:531–541

Bhalla L prem, Singh M (2008). *Agrobacterium-mediated* transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea.* Nature protocol 3:181-9

Canola Council of Canada., (2008). Available from: http://www.canola-council.org/canola_resources/product45.aspx

Della-Cioppa G, Bauer SC, Taylor ML, Rochester DE, Klein BK (1987). Targeting a herbicide resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. Nature Biotechnology 5: 579.584

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

Eichholtz DA, Alan D, Gasser CS, Scott C, Kishore GM, Murthy G (2001). U.S. Patent 225: 114.

Eschenburg S, Healy M, Priestman M, Lushington,G, Scho¨ nbrunn E (2002). How the mutation glycine96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5- enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli.* Planta 216: 129–135

Funke T, Han Huijong, Healy-Fried Martha L, Fischer Markus, Scho¨nbrunn Ernst (2006). Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops. Proceedings of the National Academy of Sciences 103: 13010–13015

Healy-Fried M, Funke T, Priestman M, Han H, Schonbrunn E (2007). Structural basis of glyphosate tolerance resulting from mutations of pro101 in *Escherichia coli* 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. The journal of biological chemistry 282:32949–32955

Kahrizi D, Salmanian A.H, Afshari A, Mousavi A, Moeini A, (2008). Substitution of Amino Acid Ala-183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate 3-phoshpate Synthase of *E. coli* (k12) and the Effect of This Altered Gene in Glyphosate Tolerance in Rapeseed Plant (*Brassica napus* L.). *Pajoohesh va Sazandeghi* 79: 151-159

Kahrizi D, Salmanian A, Afshari A, Moeinie M, 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: 95-104

Kahrizi D, Salmanian A.H, Afshari A, Mousavi A, Moeini A, Karimzadeh GH (2004). Isolation, Molecular Characterization and Site Directed Mutagenesis in Bacterial EPSPS gene in order to confer tolerance to glyphosate herbicide in canola plant. Pajoohesh va Sazandeghi 64: 94-103

Kakaei M., Zabarjadi A.R., Mostafaie A. (2009). Comparison of genetic and morpho-physiological distance via SDS-PAGE marker in some rapeseed genotypes. Journal of Agricultural Biotechnology, 1(2): 79-93.

Kishore G M, Shah D (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. Annual Reviews of Biochemistry 57: 627-663

Padgette S, Biest D, Gasser C S, Eichholtz D, Frazier R, Hironaka C,Levine E, Shah D, Fraley R, Kishore G (1991). Site-directed mutagenesis of conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphatse synthase active site. The journal of biological. Chemistry 266: 22361-22369.

Reade JPH, Cobb AH (2002). Herbicides: modes of action and metabolism. Management handbook. Blackwell Science Oxford pp 134–170.

Sambrook J, Russell D W (2001). Molecular Cloning. A Laboratory manual. Cold Spring Harhor Press. New York

Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JN, Kabsch W (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98: 1376-1380.

Stringam G R, Ripley V L, Love H K, Mitchell A (2003). Transgenic Herbicide Tolerant Canola. The Canadian Experience Crop Science 43:1590 1593.

Ye GN, Hajdukiewicz PT, Broyles D, Rodriguez D, Xu CW (2001). Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco. The Plant Journal 25: 261.270

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹٤)

Transformation of rapeseed by mutated *epsps* gene fused to chloroplast signal peptide towards enhancing tolerance to glyphosate

Ghavami M. [1], Mousavi1 A.[*2], Salmanian A.H.[3], Hadi F.[4]

[1]M.Sc student, Department of Bbiology, Faculty of Science, Tarbiat Moallem University of Azarbaijan.
[2]Associate Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
[3]Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.
[4]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Lorestan University, Khoramabad, Iran.

Abstract

One of the most effective approaches for weed control is production of glyphosate herbicide tolerant crops. Glyphosate blocks plant growth by inhibiting EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) enzyme which in shikimate pathway for the biosynthesis of aromatic amino acids in plants and cause plant death. Manipulation of *epsps* gene in order to reduce its affinity for glyphosate is one of the best methods for production of glyphosate-tolerant plants. In the previous studies, site-directed mutagenesis was used to confer two point mutations in *E. coli epsps* gene in order to convert Glycine96 to Alanine (Gly96Ala) and Alanine 183 to Threonine, (Ala183Thr). In this study, mutated *epsps* gene was fused to the chloroplast signal peptide from *B. napus* L. *epsps* gene. Then, the manipulated *Ec-epsps* gene was cloned in pBI121 as a plant expression vector; *Agrobacterium*–mediated transformation was used to deliver the recombinant pBI121 in rapeseed cultivar PF-704591. Molecular analyses were used to confirm the presence and expression of the transgene. Bioassay analysis showed that the amount of glyphosate tolerance in transgenic plants was 2 mM, whereas the non-transformed ones were unable to survive in 0.5 mM glyphosate.

Key words: *Rapeseed, tolerance to herbicide, Manipulated epsps, Glyphosate, Chloroplast Signal Peptide.*

[*] Corresponding Author: Mousavi A. Tel: 02144787336 Email: m-amir@nigeb.ac.ir