مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ۵۲-۴۱

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

پاسخ کلزای تراریخته با ژن *aroA* نسبت به تیمار گلایفوسیت

The response of transgenic *Brassica napus* with *aroA* gene to glyphosate treatment

مرضیه سعادتی جبلی، دانیال کهریزی* و ایرج نصرتی
Marzieh Saadati Jebeli, Danial Kahrizi* and Iraj Nosratti

گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: dkahrizi@yhaoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/۲/۳۱ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۲)

چکیده

کلزا (*Brassica napus*) یکی از با اهمیت‌ترین دانه‌های روغنی جهان به شمار می‌رود. علف‌های هرز یکی از مهمترین عوامل تهدید کننده کشت کلزا است. گلایفوسیت علف‌کشی عمومی، آنزیم 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate (EPSPS) را مهار می‌کند. یکی از موثرترین راه‌های ایجاد گیاهان مقاوم به گلایفوسیت، انتقال نسخه مقاوم به گلایفوسیت ژن کد کننده آنزیم EPSPS است. در پژوهش حاضر، یک جهش سه نقطه‌ای در ژن *aroA* باکتری *E.coli* ایجاد شده و سپس در سازه تهیه شده ژن مورد نظر را به همراه یک نسخه ژن معمولی در کنار هم و به صورت هیبریدی در پلاسمیدهای pUC18 و pBI121 کلون شد و توسط سویه LBA4404 باکتری *Agrobacterium tumefaciense*، به سلول‌های گیاه کلزا رقم بهاره RGS003 انتقال داده شد. ژن مورد نظر تحت کنترل پروموتور CaMV35S و ترمیناتور NOS بود. کلون سازی ژن در ناقل‌های کلونی و بیانی، بررسی تراریختی از طریق PCR و سایر آزمایش‌های مولکولی جهت تائید انجام گرفت. در این تحقیق در نسل T1 از ۱۴۲ لاین مستقل تراریخته برای تیمار گلایفوست استفاده گردید که از این تعداد ۱۰ لاین برای آزمونهای بعدی در نسل T_2 انتخاب شد. بذور گیاهان تراریخته نسل T_2 در دو شرایط *in vivo* و *in vitro* به صورت آزمایش فاکتوریل در غلظت‌های مختلف علفکش گلایفوسیت مورد بررسی قرار گرفتند. سپس درصد سوختگی و برخی صفات مرفولوژیک مانند ارتفاع بوته، تعداد شاخه‌ی فرعی و تعداد غلاف در بوته اندازگیری شد. نتایج نشان داد که گیاهان تراریخته می‌توانند تا غلظت ۷۶/۸ میلی مولار از علفکش گلایفوسیت را تحمل کنند؛ در حالی که گیاه شاهد در غلظت‌های صفر، ۱/۲، ۲/۴ میلی مولار قدرت زنده‌مانی دارند.

واژه‌های کلیدی

کلزا،
گلایفوسیت،
EPSPS،
مقاومت به علفکش،
صفات مرفولوژیک

مقدمه

کلزا (*Brassica napus* L.) با تأمین ۱۲ درصد از کل روغن خوراکی جهان بعد از سویا و نخل روغنی مهم‌ترین گیاه روغنی به شمار می‌رود (Thiyam-Hollander *et al*. 2012). میزان زیاد روغن در دانه‌ی کلزا و ترکیبات مناسب اسیدهای چرب آن سبب توجه بیشتر کشورهای جهان به این دانه‌ی روغنی شده است (Barzan *et al*.2015). در کشت این گیاه با ارزش محدودیت‌هایی وجود دارد، از جمله این که علف‌های هرز موجب کاهش کمی و کیفی عملکرد آن می‌شوند. به همین دلیل کنترل علف‌های هرز مزارع کلزا، از مهمترین عملیات زراعی این گیاه به شمار می‌رود. استفاده از علفکش‌های شیمیایی، اصلی‌ترین روش کنترل علف‌های هرز است (Know *et al*, 2001). طیف وسیعی از علف‌های هرز، مزارع این گیاه را تهدید می‌کنند، بنابراین به کارگیری علفکش وسیع الطیف الزامی است (Gomes *et al*. 2016). اما چنین علفکش‌هایی علاوه بر علف هرز، به گیاه زراعی نیز آسیب می‌رسانند. به همین جهت تولید گیاه کلزای متحمل به این نوع علفکش‌ها از اهمیت فوق العاده‌ای برخوردار است (Know *et al*, 2001). علفکش گلایفوسیت با دامنه عملکرد وسیع و غیرانتخابی برای کنترل علف‌های هرز، به طور رایج استفاده می‌شود، این علفکش، آنزیم ۵- انول پیرویل شیکیمات۳- فسفات سنتتاز (EPSPS) که ششمین آنزیم در مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه‌ی حلقوی است را مهار می‌کند (Amrhein *et al*. 1983). چنانچه این آنزیم تولید نشود گیاه دچار مرگ می‌شود (Kahriz *et al*. 2014). از مهم‌ترین راهکارهای مقاوم سازی گیاهان زراعی به علفکش گلایفوسیت تولید آنزیم EPSPS مقاوم به علفکش از طریق ایجاد جهش نقطه‌ای در آن است (Devine *et al*. 2000; Kahrizi *et al*. 2007). تا میل ترکیبی گلایفوسیت با آنزیم کاهش پیدا کند. البته نوع موتانت هم باید طوری باشد که علاوه بر کاهش میل ترکیبی علفکش، تأثیری بر عملکرد آنزیم نداشته باشد. یک راهکار دیگر بیان بیشتر آنزیم EPSPS است تا درصدی آنزیم برای کاتالیز اسیدهای آمینه آروماتیک وجود داشته باشد. یک روش دیگر استفاده تلفیقی از دو راهکار بالا می‌باشد (سازه مورد نظر در این تحقیق) که به صورت ترکیبی یا هیبریدی استفاده شد.

(Devine *et al*. 2000; Kahrizi *et al*. 2007; Kahrizi and Salmanian, 2008). برای ایجاد مقاومت به علفکش گلایفوسیت در کلزا، از موتاسیون یگانه (Kahrizi et al., 2005; Kahrizi and Salmanian, 2008) و دوگانه (Kahrizi et al. 2007) در ژن *aro*A کد کننده آنزیم EPSPS استفاده شده است. در این پژوهش از راهکار ترکیبی یا هیبریدی یعنی به صورت توام از دو روش وارد نمودن ژن جهش یافته *aro*A دارای سه موتاسیون نقطه‌ای و تولید بیشتر آنزیم EPSPS توسط گیاه، به منظور افزایش میزان مقاومت گیاه کلزا به علفکش گلایفوسیت استفاده شد.

مواد و روش‌ها

سویه‌های باکتری، ناقل‌ها و مواد گیاهی

از باکتری *E. coli* سویه DH5α به منظور تهیه سلول‌های مستعد و نگهداری پلاسمیدهای اصلی و نوترکیب، از باکتری *E. coli* سویه استاندارد K12، برای جداسازی DNA ژنومی و از باکتری خاکزی*Agrobacterium tumefaciense*، سویه LBA4404، جهت انتقال ژن به سلول‌های کلزا استفاده شد. از ناقل کلونی pUC18 در کلون کردن و ناقل بیانی pBI121 به منظور بیان ژن مورد استفاده شد. مواد گیاهی این پژوهش شامل بذور کلزا رقم بهاره RGS003 بود. این رقم از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات تهیه و اصلاح نهال و بذر کرج تهیه گردید.

کلیه مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت Merck و Roche با بالاترین درجه خلوص تهیه شد. آنزیم‌های برشی اصلی، کیت پلیمرازی Expand و سایر آنزیم‌های مورد نیاز نظیر RNAase و آلکالین فسفاتاز از شرکت Roche و Fermentas تهیه شد.

تهیه DNA ژنومی از باکتری *E. coli* (K12)

از کشت شبانه باکتری *E. coli* (K12) بر روی محیط جامد، یک کلنی انتخاب و در شرایط استریل به درون محیط LB مایع (۵ ml) تلقیح شد. رشد باکتری به مدت یک شب (O/N)، با دور ۱۵۰ rpm و دمای ۳۷°C انجام گرفت. جهت خالص سازی DNA ژنومیک از روش استاندارد استخراج کروموزوم باکتریایی با وزن مولکولی زیاد استفاده شد.

تهیه ژن جهش یافته و سازه اصلی

ژن جهش یافته *aro*A در سه نقطه (E145G، N267S و M377V) از طریق شرکت سیناژن تهیه شد. سپس با استفاده از آنزیم‌های برشی و لیگاز، سازه اصلی تهیه گردید (شکل ۱). از واکنش زنجیره-ای پلیمراز (PCR) برای تکثیر توالی‌های ویژه DNA استفاده شد در این پژوهش PCRهای متفاوتی برای تکثیر یا تأیید طرح‌ریزی و اجرا شد.

کلون کردن قطعات در پلاسمید pUC1 و انتقال آن به سلول مستعد

جهت هضم قطعات و پلاسمید، از آنزیم برشی *Bam*HI استفاده شد. سپس برای وارد نمودن DNA خارجی به سلول میزبان، DNA خارجی در پلاسمید pUC1 کلون گردید. از روش کلرید کلسیم برای مستعد کردن سویه DH5α باکتری *E. coli* استفاده شد. سپس باکتری‌های حاوی پلاسمید بر روی محیط مک کانکی (MacConkey, 1908) حاوی آنتی بیوتیک آمپی‌سیلین، گزینش شدند. از کلونی‌های سفید به دست آمده، کشت شبانه در محیط LB مایع تهیه شد و در نهایت از روش PCR برای تأیید نهایی حضور قطعه در پلاسمید استفاده شد.

همسانه سازی در ناقل بیانی گیاهی

به منظور انتقال ژن به گیاه از طریق باکتری *A. tumefaciense*، ژن-های جهش یافته که به صورت مستقیم در پلاسمید pUC18 کلون شده بودند، با هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های *Xba*I و *Sac*I خارج شده و در پلاسمید pBI121 که با همین آنزیم‌ها هضم شده بودند، کلون شدند. ضمناً هضم پلاسمید با این دو آنزیم باعث حذف ژن gus در پلاسمید می‌شود (شکل ۱). به منظور تراریختی باکتری، از روش استاندارد انجماد و ذوب با استفاده از $CaCl_2$ و ازت مایع (Höfgen and Willmitzer, 1988) به کار گرفته شد.

در شکل ۱، سازه مورد استفاده در پلاسمید بیانی pBI121 نشان داده شده است. همانطور که ملاحظه می گردد در این سازه از دو ژن *aro*A استفاده گردیده است؛ به طوری که یک ژن دارای سه ژن نقطه‌ای (M- aroA) و ژن دیگر به فرم وحشی یا نرمال (W- aroA) می‌باشد. این دو ژن تحت کنترل پروموتر CaMV35S و ترمیناتور NOS می‌باشد.

تهیه مواد گیاهی و انتقال ژن به گیاه

بر اساس بررسی‌های به عمل آمده و توصیه‌های بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، در این تحقیق از رقم بهاره RGS003 به عنوان گیاه گیرنده ژن استفاده شد چرا که این رقم از جمله ارقامی است که سطح زیر کشت آن نسبتا بالا و جزو ارقام نسبتاً متحمل به بیماری اسکلروتینایی ساقه می‌باشد.

بذور کلزای رقم بهاره RGS003 استریل و در شرایط درون شیشه‌ای کشت داده شد. سپس کوتیلدون‌های گیاهچه‌های پنج روزه پس از حذف مریستم انتهایی در محیط MS حاوی ٤/٥ mg/l IBA، ۳۰ g/l ساکارز و ۸ g/l آگار، کشت شدند. این کوتیلدون‌ها پس از دو روز نگهداری در اتاق رشد، برای همکشتی با آگروباکتریوم و سپس انتقال ژن استفاده شدند. پس از کشت این کوتیلدون در محیط القای نوساقه و سپس شست و شو در محلول حاوی ۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم، به آنها اجازه رشد داده شد و سپس کوتیلدون‌های سبز گزینش شدند. نوساقه‌های سبز حاکی از پذیرش ژن بوده و جهت طویل شدن به محیط کشت حاوی یک گرم درلیتر IBA انتقال داده شدند و پس از رشد کافی و سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی به گلخانه کنترل شده با شرایط نوری ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ºC در روز و ۱۵ºC در شب منتقل شدند و تا زمان بذرگیری در همان شرایط باقی ماندند (Kahrizi et al., 2007).

ارزیابی مقاومت به علفکش گلایفوسیت در گیاهان تراریخته

ارزیابی مقاومت به علفکش گلایفوسیت بر روی گیاهچه‌های حاصل از کشت بذور نسل T_2 در دو شرایط *in vivo* و *in vitro* انجام پذیرفت.

در ارزیابی در شرایط *in vitro* به منظور ارزیابی و مقایسه میزان مقاومت به علفکش گلایفوسیت ابتدا محیط کشت MS همراه با علفکش گلایفوسیت در پنج غلظت ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰ میلی مولار تهیه شد. سپس از ۹ لاین تراریخته و یک لاین شاهد ده عدد در هر یک از محیط‌های کشت قرار داده شد و بذور جوانه زده شمارش و نسبت به شاهد و یکدیگر مورد مقایسه قرار گرفت.

جهت ارزیابی در شرایط *in vivo*، بر اساس اطلاعات پیشین حاصل

از تیمار لاین‌های نسل‌های T0 و T1 با علفکش گلایفوسیت و مقایسه آنها با گیاه غیرتراریخت یا شاهد منفی، تراریخته بودن گیاهان تایید گردید. این آزمایش به منظور بررسی میزان مقاومت به علفکش گلایفوسیت در ۹ لاین مستقل کلزای تراریخته در گلخانه‌ی دانشکده پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی با شرایط محیطی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی، دمای ۲۵°C و رطوبت ۹۸-۹۵ انجام شد. به منظور انجام این آزمایش ۲۷۰ گلدان پلاستیکی (برای ۹ لاین، ۱۰ غلظت علفکش در ۳ تکرار)، با مخلوطی از خاک مزرعه، ماسه و کوکوپیت به نسبت مساوی پر شد. سپس بذور کلزای نسل T_2 با سه تکرار در داخل گلدان کشت شدند. در مرحله چهار برگی گیاهان با غلظت‌های ۰، ۱/۲، ۲/٤، ٤/۸، ۹/٦، ۱۹/۲، ۳۸/٤، ۷٦/۸، ۱۵۳/٦ میلی مولار علفکش گلایفوسیت سمپاشی شدند. با توجه به اینکه غلظت ۹/٦ میلی مولار علفکش گلایفوسیت برای کنترل علف‌های هرز توصیه می‌شود، در این آزمایش چندین دوز بالاتر و پایین‌تر از غلظت توصیه شده با ضریب یکسان در نظر گرفته شد. سپس صفات درصد سوختگی، ارتفاع بوته، تعداد شاخه-ی فرعی، تعداد غلاف در شاخه اصلی، تعداد غلاف در شاخه فرعی و تعداد غلاف در بوته در این گیاهان تیمار شده با علفکش گلایفوسیت مقایسه شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق عملیات مولکولی شامل استخراج DNA ژنومی (شکل ۱، الف)، استخراج پلاسمید، کلون سازی ژن در ناقل‌های کلونی و بیانی (شکل۱ ب و ج) و بررسی تراریختی از طریق PCR (شکل۱ د) انجام گرفته شد که برخی از آنها در شکل ۱ آورده شده است. ژل آگارز مربوط به الکتروفورز DNA ژنومی (شکل ۱، الف) نشان داد که DNA استخراج شده از کمیت و کیفیت قابل قبولی برخوردار بوده است.

در این تحقیق جهت سبک‌تر کردن پلاسمید، ژن gus به روش آنزیمی حذف گردید (شکل ۱، ب). همانطور که در شکل مشاهده می‌گردد، قطعه سبکتر (حدود bp ۱۹۰۰) مربوط به ژن gus و قطعه سنگین‌تر مربوط به باقی‌مانده پلاسمید pBI121 می‌باشد. پس از حذف این قطعه غیرضروی، توالی‌های مربوط به دو ژن *aroA* در جای آن قرار گرفت. برای تایید کلونینگ از آزمون PCR و مشاهده قطعه‌ای به طول تقریبی bp ۱۳۰۰ (شکل ۱، ج) استفاده گردید. از همان پرایمرهای استفاده شده برای تایید کلونینگ در پلاسمید برای تایید تراریختی در گیاه کلزا و مشاهده باندی با همان اندازه استفاده گردید (شکل ۱، د). در این رابطه برای کنترل مثبت از pBI121 نوترکیب و از گیاه کلزای غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

بررسی مقاومت به علفکش در نسل T_1 کلزای تراریخته و شاهد

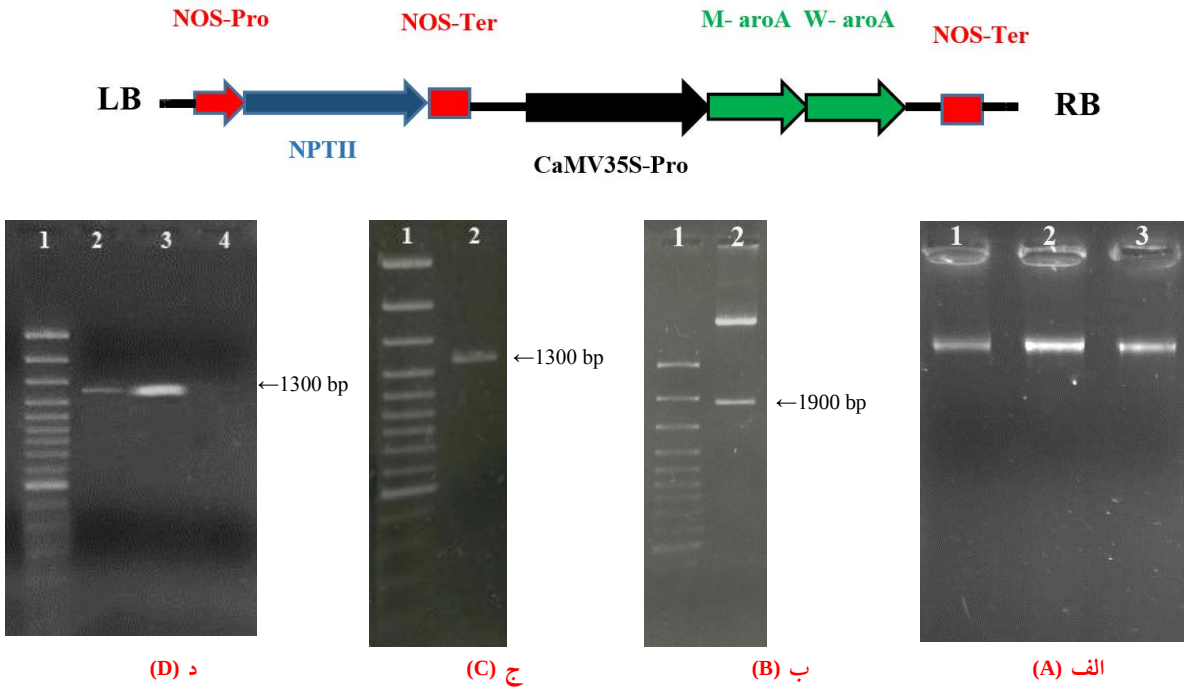
پس از دو هفته لاین‌های تیمار شده با دوز توصیه شده‌ی علفکش گلایفوسیت (۱۰ mM)، ارزیابی شدند. پس از این مدت گیاهان شاهد به طور کامل از بین رفتند. گیاهان تراریخته احتمالی سه نوع علائم نشان دادند گروه اول از بین رفتند. گروه دوم سالم ولی دارای برگ‌هایی تا حدودی آسیب دیده بودند وگروه سوم به طور کامل سالم بودند نتایج این آزمایش به طور خلاصه به شرح زیر است:

۱-تعداد گیاهچه‌های مورد تیمار علفکش ۱٤۲ مورد بود.

۲-تعداد گیاهچه‌های به طور کامل سالم ۳٤ مورد مشاهده شد (مقاوم)

۳-تعداد گیاهچه های از بین رفته و آسیب دیده ۱۰۸ مورد بودند یعنی تلفیقی از گروه‌های اول و دوم که در بالا شرح داده شد (گیاهچه‌های حساس)

صفت مورد نظر در این آزمایش میزان تحمل گیاه نسبت به علفکش بود. با استفاده از آزمون کای اسکور ($\chi 2$) نسبت مندلی (۳:۱) برای نسبت‌های فوق بررسی شد. میزان کای اسکور محاسبه شده برابر ۰/۰۸۵ و بزرگتر از $\chi 2$ جدول (٦/٦۳) بود بنابراین بین نسبت مشاهده شده در آزمایش و نسبت‌های مندلی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و مقاومت به علفکش گلایفوسیت از قانون اول پیروی کرده و یعنی توارث تک ژنی دارد. مقاومت در این آزمایش به معنی تحمل تیمار علفکش اعمال شده (نسبت به شاهد) و تولید بذر و محصول می‌باشد. همچنین توارث تک ژنی به این معناست که گیاهان تراریخته یک نسخه از ژن مقاومت را دریافت نموده‌اند. در صورتی که گیاهان تراریخته بیش از دو نسخه دریافت می‌کردند، مسلماً نسبت مندلی فوق به دست نمی‌آمد. البته برای تایید بیشتر لازم است که آزمون سادرن بلات هم انجام شود.



شکل ۱- سازه طراحی شده برای انتقال ژن که در آن LB (مرز چپ)، NOS-Pro (پروموتر NOS)، NPTII (ژن نئومایسین فسفو ترانسفراز که مقاومت به کانامایسین را القاء می کند)، NOS-Ter (ترمیناتور NOS)، CaMV35S-Pro (پروموتر CaMV35S)، M-aro (ژن *aro*A موتانت دارای سه موتاسیون نقطه‌ای)، W-aroA (ژن aroA فرم وحشی یا طبیعی) و RB (مرز راست). عملیات و تائیدیه‌های مولکولی انجام شده در این تحقیق. الف: DNA ژنومی (هر سه چاهک)، ب: حذف ژن gus به روش حذف آنزیمی (چاهک ۱: مارکر و چاهک ۲: ژن gus.حذف شده و باقی‌مانده پلاسمید) ج: تأئید کلونیگ با استفاده از PCR (چاهک ۱: مارکر و چاهک ۲: محصول PCR). د: تائید تراریختی گیاه با استفاده از PCR (چاهک ۱: مارکر، ۲: محصول PCR گیاه تراریخته، ۳: کنترل مثبت و ٤: کنترل منفی). مارکر تعیین کننده اندازه قطعات DNA در تمامی موارد مارکر bp ۱۰۰ می‌باشد که کوچکترین و بزرگترین قطعات آن به ترتیب ۱۰۰.و bp ۳۰۰۰ می‌باشد.

Figure 1. Designed structure for gene transfer. Where LB (Left border), NOS-Pro (NOS promoter), NPTII (neomycin phospho-transferase gene inducing resistance to kanamycin), NOS-Ter (NOS terminator), CaMV35S-Pro (CaMV35S promoter), M-aroA (mutant aroA gene with three point mutations), W-aroA (wild type or natural form of aroA gene) and RB (right border).
Operations and molecular confirmations performed in this research. A: Genomic DNA (3 wells), B: Deletion of gus gene by enzymatic removal method (1: size marker and 2: deleted gus and remaining plasmid), C: Cloning confirmation using PCR (1: size marker and 2: PCR product), D: Plant transgenic confirmation using PCR (1: size marker and 2: PCR product from transgenic plant, 3: positive control, 4: negative control or non-transformant plants). The used DNA size marker in all cases is 100 bp marker that the smallest and largest fragments are 100 and 3000 bp respectively.

بررسی اثر لاین بر میزان مقاومت به کانامایسین

نتایج تجزیه واریانس نشان داد بین لاین‌های مورد بررسی برای میزان مقاومت به کانامایسین تفاوت‌های معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان مقاومت به کانامایسین مربوط به لاین ۳ (۰/۷۸) بود؛ البته این لاین با لاین‌های ۲، ٤ و ۸ اختلاف معنی‌داری ندارد. کمترین مقاومت به کانامایسین به لاین شاهد (۰/۳۷) مربوط بود که با تمامی لاین‌های تراریخته اختلاف معنی‌داری نشان داد (شکل ۲). همانطور که در این مقایسه میانگین نشان داده شده است، لاین غیرتراریخته یا شاهد حداقل مقاومت را نشان داده و مختصر مقاومت هم به علت تحملی می‌باشد که هر گیاهی تا حدودی می‌تواند این تحمل را در مقابل کانامایسین داشته باشد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر لاین بر میزان میزان مقاومت کانامایسین در کلزای تراریخته

Table 1. Analysis of variance of Line effect on kanamycin resistance in transgenic rapeseed

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
لاین	۹	۰/۱۵۲*
خطای آزمایشی	۲۰	۰/۰۶۷
CV (%)	۱۴/۳	

* معنی‌دار در سطح ۵ درصد

جدول۲ -تجزیه واریانس لاین، غلظت علفکش گلایفوسیت و اثر متقابل آن‌ها بر درصد سوختگی گیاهان در گلخانه.

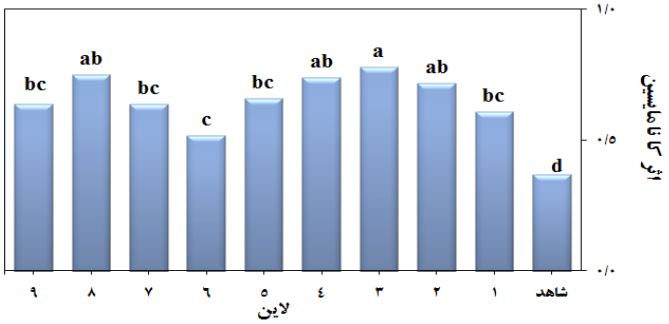
Table 2. Analysis of variance of line, glyphosate herbicide concentration and their interaction effects on burn percentage in greenhouse conditions

منبع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
لاین	۹	۵۵۸۹/۲**
غلظت علفکش	۸	۲۴۱۹۳/۰**
لاین × غلظت علفکش	۷۲	۴۹۶/۳ ns
خطای آزمایشی	۱۸۰	۶۸۳/۲
CV (%)	۱/۰۰	

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ns غیر معنی‌داری

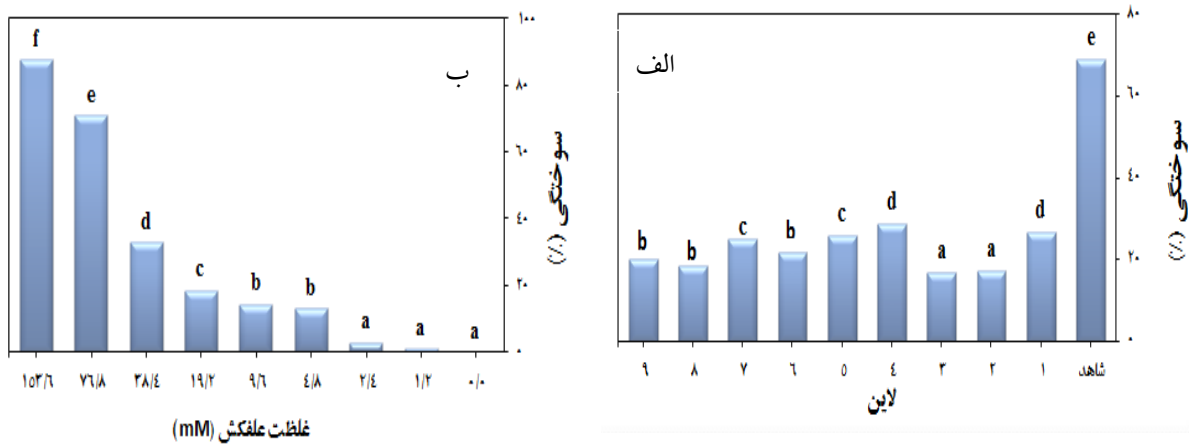
بررسی درصد سوختگی ناشی از تیمار گلایفوسیت گیاهان در شرایط گلخانه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که لاین و غلظت علفکش بر درصد سوختگی ناشی از تیمار گلایفوسیت در شرایط گلخانه، اثر بسیار معنی‌داری داشت (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر لاین بر درصد سوختگی نشان داد که بیشترین درصد سوختگی مربوط به لاین شاهد به میزان (۶۸٪/۹) و کمترین درصد سوختگی مربوط به لاین ۳ به میزان (۱۶٪/۸) بود ولی با لاین ۲ تفاوت معنی‌داری نداشت. تفاوت معنی‌دار بین لاین‌های تراریخته و لاین شاهد می‌تواند دلیلی بر پذیرش ژن مقاومت توسط گیاه باشد (شکل ۳ الف). مقایسه میانگین اثر غلظت علفکش بر درصد سوختگی نشان داد که بیشترین درصد سوختگی مربوط به غلظت ۱۵۳/۶ میلی مولار علفکش (۸۷/۷ ٪) و کمترین آن شاهد یا عدم تیمار علفکش است که هیچ گونه سوختگی نشان نداد (شکل ۳ ب). با بررسی رگرسیونی مشخص شد که ضریب رگرسیون اثر غلظت علفکش بر صفت درصد سوختگی به صورت مثبت و معنی‌دار (۰/۶) بود.



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر لاین بر میزان مقاومت به کانامایسین در لاین‌های تراریخته کلزا. حروف مشترک نشانه عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین لاین‌های مورد بررسی در سطح احتمال ۵ درصد است.

Figure 2. Mean comparison of line effect on kanamycin resistance in transgenic rapeseed. Similar letters indicate the non-significant differences between investigated lines ($p \leq 0.05$)



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر لاین (الف) و غلظت علف کش (ب) بر درصد سوختگی.

Figure 3. Mean comparison line effect (A) and herbicide concentration (B) on burn percentage

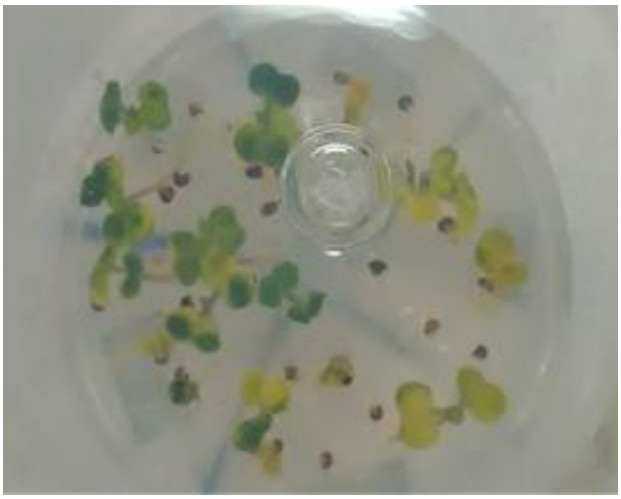
طبق مشاهدات حاصل از این آزمایش، گیاهان تراریخته تا غلظت ۷٦/۸ میلی مولار از علفکش گلایفوسیت را تحمل کردند؛ در حالی که گیاه شاهد، فقط در غلظت‌های ۰، ۱/۲، ۲/٤ میلی مولار قدرت زنده‌مانی داشت.

با توجه به اینکه لاین‌های تراریخته نسبت به لاین شاهد به طور معنی‌داری درصد سوختگی کمتری نشان دادند، می‌توان استنباط کرد که ژن مقاومت به علفکش توسط گیاه پذیرش و بیان شده است.

از نظر ایمنی زیستی، گیاهان تراریخته‌ای مناسب می‌باشند که ژن نشانگر گزینشگر را در نسل‌های در حال تفرق از دست داده باشند (Gupta *et al.* 2017). با مقایسه دو شکل ۲ و ۳ مشاهده می‌شود که گیاهان شاهد دارای کمترین میزان مقاومت به کانامایسین یا حداقل زنده‌مانی (حدود ۳۷٪) (شکل ۲) و بیشترین درصد سوختگی (حدود ۷۰٪) نسبت به علفکش گلایفوسیت (شکل۳) می‌باشند. با بررسی مقاومت به کانامایسین و گلایفوسیت مشخص گردید که تمامی لاین‌های تراریخته مورد از این نظر نسبت به شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. این نشان دهنده این است که هیچ کراسینگ آوری بین این دو ژن در این لاین‌ها تاکنون (از زمان تولید تراریخته تا این نسل) اتفاق نیفتاده است. در بین لاین‌های تراریخته، لاینی که مقاومت به کانامایسین و حساسیت به گلایفوسیت داشته باشد، مشاهده نشد. لازم است در طی نسل‌های بعدی این موضوع مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان به لاینی دسترسی پیدا کرد که مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین را از دست داده باشد ولی مقاوم به علفکش گلایفوسیت باشد. در صورت دسترسی به چنین لاینی، از ارزش فوق‌العاده‌ای برخوردار خواهد بود؛ چرا که یکی از نگرانی‌ها در را رابطه با گیاهان تراریخته، همراه بودن و بیان ژنهای مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد.

بررسی درصد سوختگی گیاهان در شرایط آزمایشگاه

رنگ گیاهچه‌های مورد بررسی در محیط کشت ناشی از دو عامل اثر لاین و اثر غلظت علفکش گلایفوست بود که این صفت به صورت کیفی مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه اثر غلظت علفکش بر رنگ گیاهچه در محیط کشت نشان داد که غلظت ۲ میلی مولار علفکش دارای کمترین میزان زردی گیاهچه (٪۲۵) و غلظت ۱۰ میلی مولار علفکش دارای بیشترین میزان زردی گیاهچه (٪۹۰) است. مقایسه اثر لاین بر رنگ گیاهچه در محیط کشت نشان داد که لاین ۱۰ دارای بیشترین میزان سبزی گیاهچه (٪۷۵) و لاین ۸ دارای بیشترین میزان زردی گیاهچه‌ی (٪۹۰) است (شکل ٤).



شکل ٤- رنگ‌های مختلف گیاهچه‌های کلزای تراریخته در محیط کشت حاوی علفکش گلایفوسیت به غلظت ۱۰ میلی مولار. در هر بخش پتری دیش لاین‌های مستقل کشت شده است و تفاوت لاین‌ها از نظر رنگ مشخص می‌باشد.

Figure 4. Different colors of transgenic rapeseed seedlings on medium containing 10 mM glyphosate herbicide. In each section of Petri dishes are cultivated independent lines and the differences in the lines are color-specific.

صفات مورفولوژیک

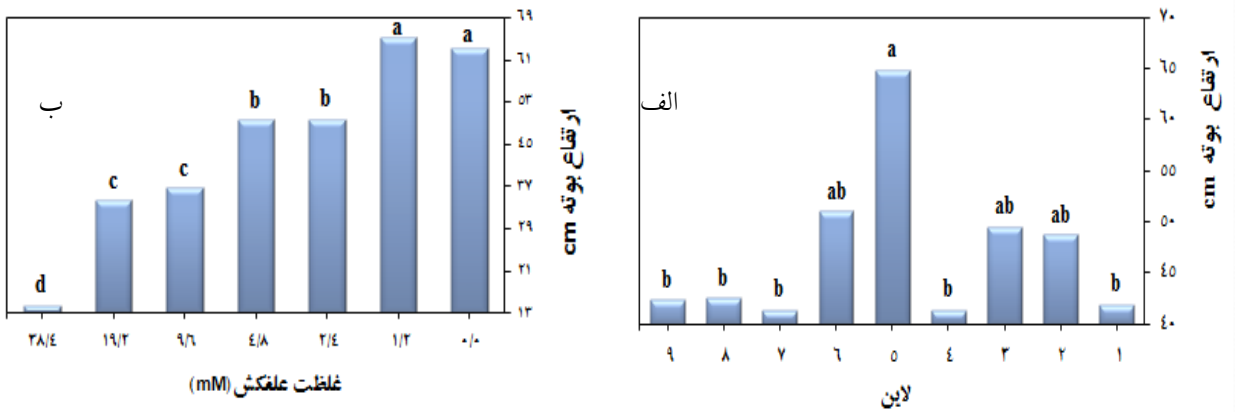
طبق نتایج حاصل از این آزمایش، اثر لاین و غلظت علفکش بر ارتفاع بوته در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر لاین بر ارتفاع بوته نشان داد که بیشترین مقدار این صفت مربوط به لاین ۵ (٦٤/٨٣ سانتی‌متر) و کمترین مقدار آن مربوط به لاین ۷ (٤١/٣٨ سانتی‌متر) بود (شکل ۵ الف). مقایسه میانگین اثر غلظت علفکش بر ارتفاع بوته نشان داد که بیشترین مقدار این صفت مربوط به غلظت ۱/۲ میلی مولار (٦٥/١ سانتی‌متر) و کمترین مقدار آن مربوط به غلظت ٣٨/٤ میلی‌مولار (١٤/٥ سانتی‌متر) است (شکل ۵ ب). با توجه به اینکه از اهداف این آزمایش بررسی تأثیر غلظت علفکش و اثر متقابل لاین در علف‌کش روی صفات مرفولوژیک در لاین‌های تراریخته بود، از دامنه‌ای از غلظت‌های مختلف علف‌کش در آزمایش استفاده گردید. در بررسی رگرسیونی مشخص شد که ضریب رگرسیون اثر غلظت‌های علفکش بر صفت مورد نظر به صورت منفی و معنی‌دار (٨/١-) و است. یعنی با افزایش غلظت علفکش ارتفاع بوته کاهش یافت.

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر لاین، غلظت علفکش گلایفوسیت و اثر متقابل آن‌ها بر صفات مورفولوژیک.

Table 3. Analysis of variance of line, glyphosate herbicide concentration and their interaction effects on morphologic traits

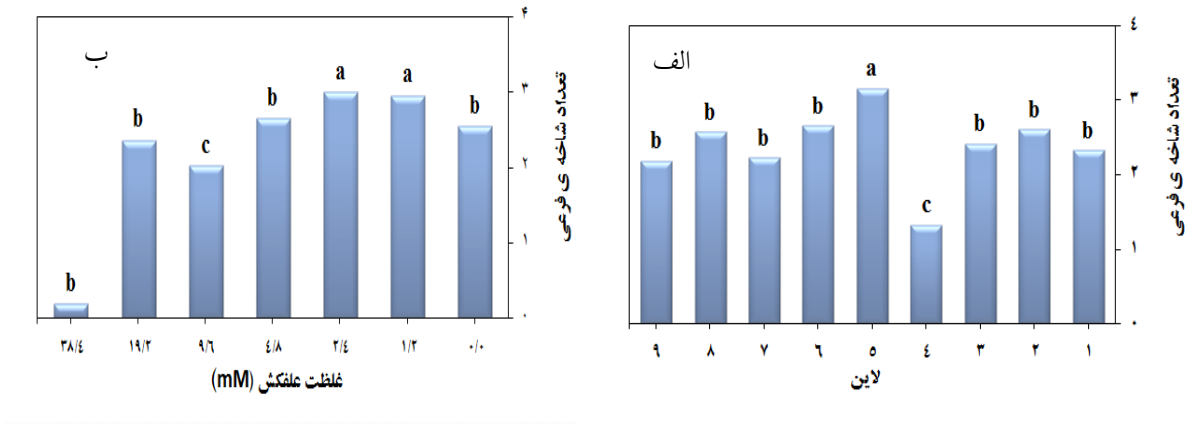
منابع تغییرات	درجه آزادی	ارتفاع گیاه	تعداد شاخه فرعی	تعداد غلاف شاخه فرعی	تعداد غلاف شاخه اصلی	تعداد غلاف در بوته
لاین	۸	١٠٩٤/٥**	٤٨٠/٥*	١٢٥/٧*	٢١٣١/٨**	٦٧٢/٣*
غلظت علفکش	٦	٥٢٥٢/٥**	٦٦٠/٩**	٣٧١/٣**	٦٥٢٠/٤**	٢٦٠٣/٧**
لاین× غلظت	٤٨	٢٨٧/٩ ^{ns}	١٢٤/ ٣^{ns}	٨٧/١*	١٠٩٥/١^{ns}	١٧١/١^{ns}
خطای آزمایشی	١١٠	٣٦٨/١	٢٨٠/٦	٥٨/٢	١١٨٥/٨	٢٠٨/٢
CV		٢٤/٣٥	٤/٤٢	١٤/٩٦	١٠/٣٩	١٠/٧٦

* معنی‌دار در سطح ۵ درصد، ** معنی‌دار در سطح ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌داری



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر لاین (الف) و غلظت علف کش گلایفوسیت (ب) بر ارتفاع بوته کلزای تراریخته.

Figure 5. Mean comparison of effect of line (A) and herbicide concentration (B) on the height of transgenic rape plant



شکل ٦- مقایسه میانگین اثر لاین (الف) و غلظت علف‌کش گلایفوسیت (ب) بر تعداد شاخه فرعی در گیاه کلزا تراریخته

Figure 6. Mean comparison of effect of line (A) and herbicide concentration (B) on the number of branches in Transgenic rapeseed

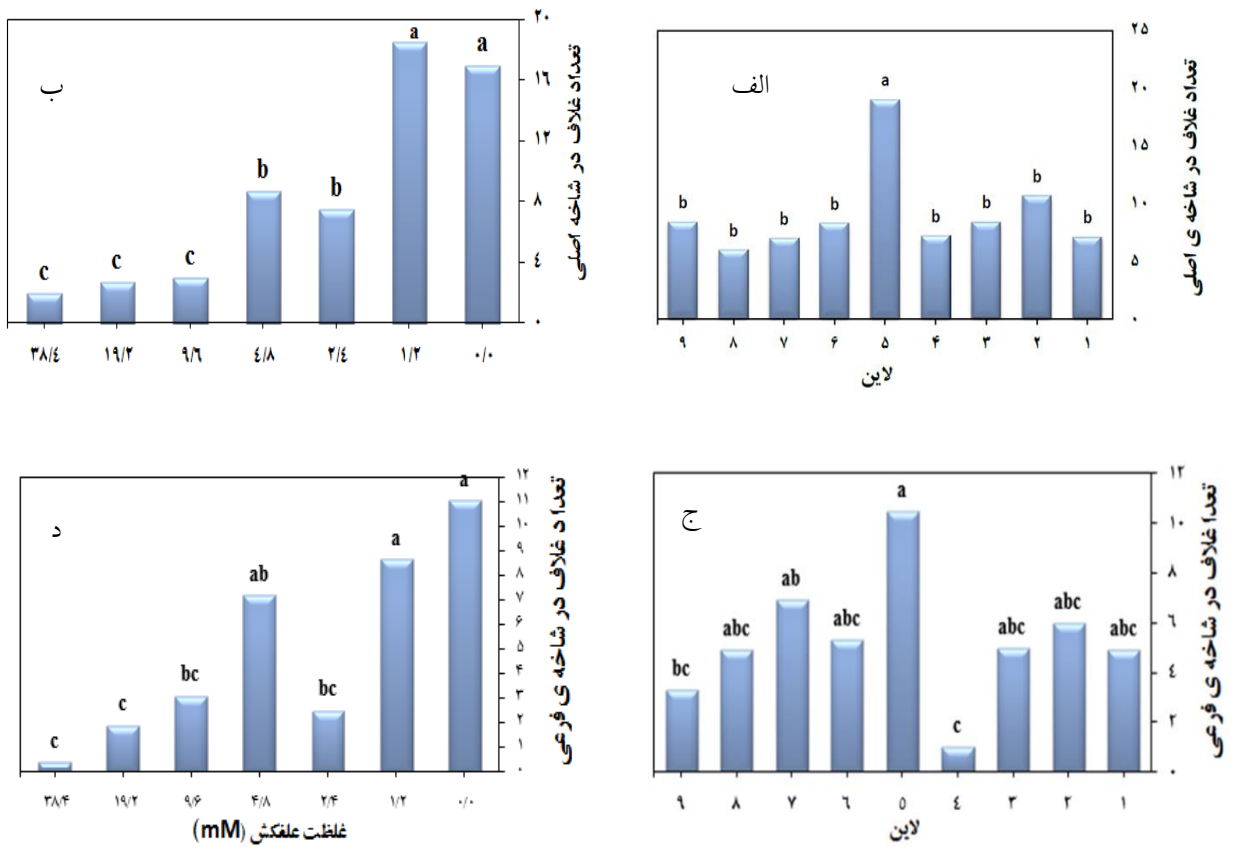
نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر لاین بر تعداد شاخه‌های فرعی در سطح احتمال ۵ درصد و اثر غلظت علفکش بر صفت مورد نظر در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر لاین بر تعداد شاخه‌های فرعی نشان داد که بیشترین مقدار این صفت مربوط به لاین ۵ (۱٦۷/۳ شاخه) و کمترین مقدارآن مربوط به لاین ٤ (۱/۱۳۳ شاخه) است (شکل ٦ الف). مقایسه میانگین اثر غلظت علفکش بر تعداد شاخه‌های فرعی نشان می‌دهد که بیشترین تعداد شاخه‌های فرعی مربوط به غلظت ۲/٤ میلی مولار (۳ شاخه) کمترین مقدارآن مربوط به غلظت ۳۸/٤ میلی مولار (۰/۲۰۰ شاخه) است (شکل ٦ ب). در بررسی رگرسیونی مشخص شد که ضریب رگرسیون اثر غلظت‌های علفکش بر صفت مورد نظر به صورت منفی و معنی‌دار (۰/۲-) است و با افزایش غلظت علفکش تعداد شاخه-های فرعی کاهش می‌یابد.

طبق نتایج حاصل از این آزمایش اثر لاین و غلظت علفکش بر تعداد غلاف در شاخه اصلی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۳). میانگین اثر لاین بر صفت مورد نظر نشان داد که بیشترین مقدار این صفت مربوط به لاین ۵ (۱۹ غلاف) و کمترین مقدار آن مربوط به لاین ۸ (٦ غلاف) بود (شکل ۷ الف). مقایسه میانگین اثرغلظت علفکش بر تعداد غلاف در شاخه اصلی نشان داد که بیشترین تعداد غلاف در شاخه اصلی مربوط به غلظت ۱/۲ میلی مولار (۱۸/۵ غلاف) و کمترین مقدار این صفت مربوط به غلظت ۳۸/٤ میلی مولار (۲ غلاف) است (شکل ۷ ب). در بررسی رگرسیونی مشخص شد که ضریب رگرسیون اثر

غلظت‌های علفکش بر صفت مورد نظر به صورت منفی و معنی‌دار (۳/۱ –) است، به گونه‌ای که با افزایش غلظت علفکش تعداد غلاف در شاخه اصلی کاهش می‌یابد.

طبق نتایج حاصل از این آزمایش اثر لاین و اثر متقابل لاین و غلظت علفکش بر تعداد غلاف در شاخه‌های فرعی در سطح احتمال پنج درصد و اثر غلظت علفکش برصفت مورد نظر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر لاین بر تعداد غلاف در شاخه‌های فرعی نشان داد که این صفت در لاین‌های مختلف کلزا با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد و بیشترین مقدار آن مربوط به لاین ۵ با (۱۰/۵ غلاف) و کمترین مقدارآن مربوط به لاین٤ با (۱ غلاف) است (شکل ۷ ج). مقایسه میانگین اثر غلظت علفکش بر صفت تعداد غلاف در شاخه‌ی فرعی نشان داد که این صفت در غلظت‌های مختلف علفکش با یکدیگر اختلاف معنی‌داری دارد و بیشترین مقدار آن مربوط به غلظت صفر میلی مولار با (۱/ غلاف) و کمترین مقدارآن مربوط به غلظت ۳۸/٤ میلی مولار با (۰/٤ غلاف) بود (شکل ۷ د). همانطور مشخص است با افزایش غلظت علفکش تعداد غلاف در شاخه فرعی کاهش پیدا می‌کند، ضریب رگرسیون بین غلظت علفکش و این صفت به صورت منفی و معنی‌دار (۰/۷٤–) برآورد شد.

طبق نتایج حاصل از این آزمایش بیشترین تعداد غلاف در شاخه فرعی مربوط به لاین ۵ در غلظت شاهد برابر با ۲۷ علاف است و کمترین مقدار این صفت در لاین‌ها و غلظت‌های مختلف برابر با صفر عدد یا بدون غلاف است (جدول ٤).



شکل ۷ – مقایسه میانگین اثر لاین (الف) و غلظت علف‌کش گلایفوسیت (ب) بر تعداد غلاف در شاخه اصلی و اثر لاین (ج) و غلظت علف‌کش گلایفوسیت (د) بر تعداد غلاف در شاخه فرعی در کلزا تراریخته

Figure 7. Mean comparison of effect of line (A and C) and herbicide concentration (B and D) on the number of pods per the sub-branch and main branch (respectively) in transgenic rapeseed

جدول ٤- میانگین اثر متقابل لاین و غلظت علفکش برای صفت تعداد غلاف در شاخه فرعی در کلزای تراریخته (SE = ۰/۹۲)

Table 4. The means of interaction effects of line and herbicide concentration on number of pods per the sub-branch in transgenic rapeseed

		لاین								
		۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹
غلظت	۰/۰۰	۱۱/۳	۱۲/۳	۸/٦	۲/٦	۲۷/۰	۸/۰	۲٤/٦	۰/٦	٥/۳
	۱/۲	۱۱/٦	٥/۳	۱٦/٦	۰/۰	۷/٦	۳/۰	۱۷/۰	۱۲/٦	٤/۳
	۲/٤	۰/۰	۱/۰	٥/۰	۲/۳	٤/٦	۰/۰	۰/۰	۰/۰	۱۰/۳
	٤/۸	٦/٦	۱۲/۰	۰/۰	۰/۰	۹/۰	۲۱/۰	۲/۰	۱۳/۳	۱/۳
	٦/۹	۰/۰	۲/٦	٤/٦	۰/۳	٦/۰	٥/۳	٥/۰	۲/۰	۲/۳
	۱۹/۲	۰/۰	۲/٦	۰/۰	–	۹/۰	۰/۳	۰/۰	۳/٦	۰/۰
	۳۸/٤	–	–	۰/۰	–	–	۰/۰	۰/۰	۲/۰	۰/۰

طبق نتایج حاصل از این آزمایش اثر لاین بر صفت تعداد غلاف در بوته در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار است و اثر غلظت علفکش بر صفت مورد نظر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است و اثر متقابل لاین و غلظت علفکش بر صفت مورد نظر غیر معنی‌دار است (جدول ۳). مقایسه میانگین اثر لاین بر صفت تعداد غلاف در بوته نشان داد که بیشترین تعداد غلاف در بوته مربوط به لاین ٥ (۲۹/٦ غلاف) و کمترین مقدار این صفت مربوط به لاین ٤ (۸/۲ غلاف) است. مقایسه میانگین اثرغلظت علفکش بر صفت تعداد غلاف در بوته نشان می‌دهد که بیشترین تعداد غلاف در بوته مربوط به غلظت صفر میلی مولار با (۲۸/۲ غلاف) کمترین مقدار این صفت مربوط به غلظت ۳۸/٤ میلی مولار با (۲/۳ غلاف) است (داده‌ها نشان داده نشده است). در بررسی رگرسیونی مشخص شد که ضریب رگرسیون اثر غلظت‌های علفکش بر صفت مورد نظر به صورت منفی و معنی‌دار (٤/۸ –) است.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی، نتایج این تحقیق نشان داد که لاین‌های تراریخته نسل اول برای مقاومت به علفکش گلایفوسیت دارای توارث مندلی تک ژنی هستند. همچنین مشخص شد که از نظر صفات مرفولوژی، فیزیولوژی و فنولوژی لاین‌های تراریخته نسل دوم دارای تنوع می‌باشند. حداکثر مقاومت به علفکش گلایفوسیت در لاین شماره ۳ مشاهده شد. در لاین شماره ۱ مقاومت به گلایفوسیت و حساسیت به کانامایسین دیده شد که این نتیجه به نوبه خود ارزشمند است؛ چرا که گیاهان تراریخته‌ای که حاوی ژن مورد نظر و بدون ژن گزینشگر باشند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه رازی کرمانشاه انجام شد.

منابع

Amrhein N, Johanning D, Schab J, Schulz A. 1983. Biochemical basis for glyphosate-tolerance in a bacterium a plant tissue culture. FEBS Letters 157:191-196.

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): 29-41. (Farsi with English abstract).

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

Gomes M, Le Manach S, Moingt M, Smedbol E, Paquet, S. and Labrecque, M. 2016. Impact of phosphate on glyphosate uptake and toxicity in willow. Journal of Hazardous Materials 304: 269–279.

Gupta V, Sengupta, M, Prakash J, Tripathy B. 2017. Transgenic Animals and Plants. In Basic and Applied

Aspects of Biotechnology. Springer Singapore. 103-123.

Höfgen R., Willmitzer L. 1988. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. Nucleic Acids Research. 16:9877.

Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari. 2005. Isolation,molecular analysis and site directed mutagenesis in *E. coli* EPSPS gene in order to make glyphosate tolerant rapeseed (*Brassica napus* L.). Pajouhesh & Sazandegi. 64: 94-103.

Kahrizi D. 2014. Reduction of EPSP synthase in transgenic wild turnip (*Brassica rapa*) weed via suppression of *aro*A. Molecular Biology Reports 41: 8177-8184.

Kahrizi D, Salmanian AH, Afshari A, Mousavi A, Moieni 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 AH. 2008. Substitution of Ala183Thr in aroA Product of *E. coli* (k12) and Transformation of Rapeseed (*Brassica napus*) with Altered Gene to Tolerance of Plant to Roundup. Transgenic Plant Journal 2(2): 170-175.

Know YW, Kim DS, Yim KO. 2001. Herbicide resistant genetically-modified crop assessment and management of gene flow. Weed Biology and Management. 1(2):96-107.

MacConkey AT. 1908. Bile Salt Media and their advantages in some Bacteriological Examinations. Journal of Hygiene. 8(3): 322–34.

Thiyam-Hollander U, Eskin NA, Matthaus B. 2012. Canola and Rapeseed: Production, Processing, Food Quality, and Nutrition. CRC Press. 374 P.

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

The response of transgenic *Brassica napus* with *aroA* gene to glyphosate treatment

Marzieh Saadati Jebeli[1], Danial Kahrizi[1*] and Iraj Nosratti[1]

1-Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran
* Email corresponding author: dkahrizi@yhaoo.com

Abstract

Rapeseed (*Brassica napus*) is one of the most important oil seed crops in the world. The weeds are the most important threats to cultivating this plant. Glyphosate is a general herbicide that inhibit the EPSPS enzyme. One of the most effective methods to make glyphosate herbicide resistance is the transformation of the EPSPS enzyme-encoding gene. In the present study, a 3-point mutation in the *E. coli aro*A gene was created and then this gene with a wild-type gene was cloned in the pUC18 and pBI121 plasmids and transformed to the RGS003 spring straw cultivar of rapeseed by the *Agrobacterium tumefaciense* strain LBA4404 strain. The gene was expressed with the CaMV35S promoter and NOS terminator. Gene cloning in cloning and expression vectors, plant transformation confirmation through PCR and other molecular tests were carried out. In this research, 142 independent T1 transgenic lines were screened for glyphosate treatment and then 10 lines were selected for later tests in the T2 generation. Seeds of transgenic T2 generation under *in vivo* and *in vitro* conditions were studied in a factorial experiment in different concentrations of glyphosate herbicide. The percentage of burn and some morphological traits such as plant height, number of branches, number of pods per sub-branch, number of pods per main branch and number of pods per plant were measured. The results showed that transgenic plants can tolerate glyphosate herbicide up to 76.8 mM, while the control plant has a lifetime of 0, 1.2, 2.4 mM.

Keywords: Rapeseed, Glyphosate, EPSPS, Herbicide resistance, Morphologic traits