مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۷، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۷
صفحه ۷۸-۶۵

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

واکنش گیاهان تراریخت برنج حاوی ژن EPSPS به علف‌کش گلایفوسیت

The reaction of transgenic rice plants containing EPSPS gene to glyphosate

صدیقه نصررمزی[۱]، محمد مهدی سوهانی[۲*]، رضا شیرزادیان خرم آباد[۳]، مهریار امینی نسب[٤]، جعفر اصغری[٥]

Sedigheh Nasr Ramzi [1], Mohammad Mahdi Sohani[* 2], Reza Shirzadian Khorramabad [3], Mehryar Amininasab [4], Jafar Asghari [5]

۱- دانشجوی دکتری بیوتکنولوژی، ۲- دانشیار بیولوژی سلولی، ۳- استادیار ژنتیک مولکولی، ۵- استاد علف‌های هرز، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران
٤- استادیار بیوفیزیک دانشگاه تهران، تهران، ایران

1- Ph.D. student in plant biotechnology, 2-Associate Professor of Molecular Biology, 3- Associate Professor of Molecular Genetic, 5- Professor of Weed Physiology, Plant Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Assistant Professor of Biophysics in the Tehran University

* نویسنده مسئول، پست الکترونیکی: mhdsohani@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۷/٤/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۱۵)

چکیده

یکی از مؤثرترین راه‌های ایجاد گیاهان مقاوم به علفکش گلایفوسیت، دستورزی ژن کد کننده آنزیم EPSPS به منظور کاهش میل ترکیبی گلایفوسیت به این آنزیم است. EPSPS از آنزیم‌های مسیر شیکیمات بوده که مسئول ساخت اسیدهای آمینه حلقوی و نیز انواع متابولیت‌های ثانویه در گیاهان و باکتری‌ها است. بدون حضور آنزیم فوق، موجود قادر به ادامه حیات نخواهد بود. در تحقیق حاضر یکی ازدومین‌های مهم جهت اتصال آنزیم EPSPS که اسیدآمینه گلایسین ۹٦ است، به روش جهش‌زایی نقطه‌ای به‌واسطه مگاپرایمر در تک تیوپ از واکنش PCR به اسیدآمینه آلانین تغییر داده شد. ژن تغییر یافته (*EPSPS*)، به همراه ژن تیپ وحشی (*35S:EPSPS*) جداگانه در وکتور بیانی pPZPY122 کلون و به واسطه سویه سوپربیماریزای EHA105 از *Agrobacterium tumefaciens* به جنین بالغ گیاه برنج (*Oryza sativa* L.) در رقم هاشمی به روش *in planta* انتقال یافتند. تأیید مولکولی تراریزش در دو نسل از گیاهان برنج به روش PCR انجام شد. همچنین تأیید فنوتیپی بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و نیز مقاومت به علفکش گلایفوسیت در غلظت‌های مختلف انجام شد. در نهایت بررسی مقدار بیان ژن‌های انتقال یافته در نسل دوم به واسطه Quantitative PCR انجام شد. نتایج نشان دهنده بیان هر دو ژن در گیاهان مورد آزمایش بود. در این مطالعه مشخص شد که فرابیان ژن موتانت سبب تولید گیاهان با مقاومت بالاتر به علفکش در مقایسه با گیاهان شاهد غیرموتانت و همچنین گیاهان با فرابیان ژن وحشی شده است.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
برنج،
گلایفوسیت،
تراریزش،
in planta.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

مقدمه

یکی از عملیات مهم زراعی کنترل علف‌های هرز است زیرا عامل عمده کاهش محصولات زراعی است. بر این اساس کنترل علف‌های هرز امری ضروری است. در سال‌های گذشته، به ویژه در زمین‌هایی که کشت گیاهان به صورت مکانیزه انجام می‌شود، مواد شیمیایی علفکش به مقدار زیادی جایگزین روش‌های مکانیکی مبارزه با علف‌های هرز شده‌اند (Chauhan, 2013). استفاده از علفکش‌ها در مقایسه با دیگر روش‌ها از قبیل شخم، وجین و کولتیواتور زنی، راهبرد مؤثرتری می‌باشد. امروزه تولید مکانیزه محصولات بدون مصرف علفکش‌ها غیر ممکن است، با این حال سعی بر آن است، از علفکشی استفاده شود که بجز گیاه زراعی مورد نظر، تمام گیاهان مضر و ناخواسته را از بین ببرد و برای سلامتی انسان، دام و محیط زیست مشکلی ایجاد نکند (Kuiper *et al*.2000). گلایفوسیت با نام تجاری راندآپ تقریباً تمامی ویژگی‌های فوق را داشته و علاوه بر آن موجب کنترل مناسب‌تر علف‌های هرز شده و تسهیل شخم را نیز به دنبال دارد. با این وجود این علفکش دارای اثر سوء بر گیاهان زراعی بوده و موجب از بین رفتن آنها می‌شود (Duke, 2011; De-Carvalho *et al*. 2013). بر این اساس ایجاد ارقام زراعی که از نظر ژنتیکی متحمل به گلایفوسیت باشند، بسیار با ارزش بوده و توسعه این ارقام راهکار مؤثرتری برای کاهش معضلات کنترل علف‌های هرز است (Stam *et al*. 2003).

علف‌کش گلایفوسیت دارای تأثیر بازدارندگی بر تولید اسیدهای‌آمینه آروماتیک در گیاهان است. این کار را به واسطه تأثیر بر آنزیم ۵- انول پیرویل شیکیمیک- ۳- فسفات سینتاز (EPSPS) انجام می‌دهد. گلایفوسیت تنها علفکشی است که مهار کنندهٔ خاص و قوی این آنزیم است (Duke *et al*. 2011). این آنزیم یک آنزیم ضروری در مسیر تولید کوریسمات است، که مولکول‌های حد واسط مورد نیاز برای تولید اسیدآمینه‌های آروماتیک مانند فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان و نیز انواع متابولیت‌های ثانویه را فراهم می‌آورد. از آنجا که مسیر شیکیمات در پستانداران وجود ندارد، آنزیم EPSPS یک هدف اصلی برای توسعه عوامل ضدمیکروبی جدید و مؤثر علیه باکتری‌های بیماریزا است (Maeda and Dudareva, 2012).

گلایفوسیت باعث مهار تبدیل شیکیمات به کوریسمات می‌شود. مهار EPSPS را گلایفوسیت با تشکیل کمپلکس گلایفوسیت- شیکیمات- ۳- فسفات (S3P)- EPSPS و اشغال جایگاه اتصال سوبسترای دوم یعنی فسفوانول پیروات (PEP) انجام می‌دهد. گلایفوسیت یک مهارکنندهٔ رقابتی علیه PEP و یک مهار کنندهٔ غیررقابتی علیه شیکیمات-۳ فسفات است. اتصال گلایفوسیت به جایگاه احتمالی آلوستریک موجب تغییرات ساختاری در جایگاه فعال آنزیم و در نتیجه مانع اتصال PEP می‌شود (Tan *et al*. 2006; Tian *et al*. 2011). جایگاه اتصال گلایفوسیت در آنزیم، در حقیقت همان جایگاه اتصال PEP به آنزیم است. با این اتصال مراکز آنیونی گلایفوسیت به وسیله زنجیره‌های جانبی ۵ اسیدآمینه باردار، در حالت موزون و مناسب قرار می‌گیرند. این اسیدآمینه‌ها که شامل Arg386، Arg344، Glu341، Arg124 و Lys22 می‌باشند، نسبت به سایر ترادف‌های شناخته شده از آنزیم EPSPS، به میزان بالایی محافظت شده‌اند و پیش از اتصال گلایفوسیت، در اتصال PEP نقش دارند (Tian *et al*. 2011; Corea *et al*. 2012). بنابراین علت جذب مولکول‌های با بار منفی نظیر گلایفوسیت به جایگاه فعال آنزیم به این صورت توجیه می‌شود که تجمع بارهای مثبت در جایگاه فعال باعث جذب این مولکول‌های باردار منفی می‌شود (Schonbrunn *et al*. 2001). اتصال علفکش به آنزیم منجر به غیرفعال شدن آن شده و در نتیجه غلظت شیکیمات افزایش یافته و با عدم ساخت کوریسمات، مسیر ساخت آمینواسیدهای حلقوی متوقف و سلول در اثر فقر این اسیدهای آمینه دچار مرگ می‌شود (Maeda and Dudareva, 2012).

توانایی دستکاری مستقیم ژنوم گیاهان بر اساس روش‌های جدید، به دانشمندان امکان تولید گیاهان زراعی مقاوم به گلایفوسیت و سایر علف‌کش‌ها را داده است (Green, 2009). امروزه پژوهش‌های بسیاری در مورد ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت انجام شده است (Duke, 2011). در تحقیق حاضر

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

یکی از اسیدهای آمینه کد کننده آنزیم EPSPS به روش Site-directed mutagenesis در تک تیوب در واکنش PCR به شکل موفقیت‌آمیز جهش و سپس کلون شد. همچنین ژن غیرجهش‌دار *EPSPS* نیز در وکتور بیانی گیاهی کلون و هر دو ژن به صورت مجزا به گیاه برنج رقم هاشمی به روش *in planta* با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه سوپر بیماریزای EHA105 انتقال داده شدند. بررسی‌های مولکولی و فنوتیپی نشان از تأیید موفقیت‌آمیز ژن انتقال یافته در دو نسل از گیاهان برنج داشت. همچنین مقاومت گیاهان موتانت و شاهد به غلظت‌های مختلف علفکش مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، مواد شیمیایی و آنزیم‌ها

بذور برنج رقم هاشمی از موسسه تحقیقاتی برنج کشور (رشت)، آنزیم‌ها، کیت‌های استخراج پلاسمید، وکتور کلونینگ pJET1.2، کیت سنتز cDNA و نیز نشانگر مورد استفاده به صورت plus۱۰۰bp از Thermo Fisher Scientific (آمریکا)، پلاسمید pPZPY122 از موسسه ABRC (Arabidopsis Biological Research Center)، کیت استخراج RNA از Cinnagen (ایران)، آنتی‌بیوتیک Cefotaxime از داروپخش، علفکش گلایفوسیت از کاوش کیمیای کرمان، استوسیرینگون (4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxyacetophenone) از Sigma (آمریکا) و کلیه مواد شیمیایی از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند.

کلون‌سازی ژن کد کننده آنزیم EPSPS

در این تحقیق از باکتری *E.coli* سویه DH5α برای جداسازی DNA ژنومی استفاده شد (Sambrook and Russell, 2001). آغازگرهای مربوط به تکثیر ژن *EPSPS* با استفاده از نرم افزار primer3 (http://primer3.ut.ee/) به صورت توالی رفت 5′-CG TCTAGAATGGAATCCCTGACGTTACAA-3′ و برگشت 5′-GCGGGCCCTCAGGCTGCCTGGCTAATCCG-3' طراحی شدند. برنامه PCR بر اساس استفاده از آنزیم *Pfu* پلیمراز، به صورت یک سیکل (°C ۹۵، ۵min)، ۳۵ سیکل به صورت ۹۵°C به مدت ۱ min، ۶۳ °C به مدت ۱ min و ۷۲ °C به مدت ۱ min و نیز تکثیر نهایی در ۷۲ °C انجام شد. باند مربوط به ژن هدف به کمک کیت از ژل جداسازی شد. غلظت ژن استخراج شده با روش نانودراپ بررسی شد. جهت کلون‌سازی اولیه، از پلاسمید کلونینگ pJET1.2 بر اساس دستورالعمل کیت استفاده شد. اتصال قطعه مورد نظر و پلاسمید به صورت قطعه اینزرت ۵۰–۱۰۰ng، ۲µl 10X buffer، پلاسمید ۱µl، T4 DNA ligase ۱µl در حجم کلی ۲۰µl در دمای ۲۲°C انجام شد. سلول‌های مستعد جهت الکتروپوریشن به روش Sambrook and Russell (۲۰۰۱) آماده و ترانسفورماسیون سلول‌های *E. coli* با روش الکتروپوریشن در دستگاه Bio-Rad (ولتاژ ۱۸۰۰ در بازه زمانی ۹/۶–۳/۵ ثانیه) جهت انتقال پلاسمید به داخل سلول‌های مستعد انجام شد. جهت تأیید نهایی تراریزش از کلونی‌های رشد یافته کشت شبانه در محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین انجام و بعد از رشد، استخراج پلاسمید انجام شد. واکنش هضم آنزیمی انجام شد. در نهایت جهت تأیید کلونینگ و تکثیر صحیح ژن هدف پلاسمید برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

واکنش PCR به منظور جهش‌زایی در ژن *EPSPS*

براساس مطالعات انجام شده، اسیدآمینه گلایسین ۹۶ به عنوان جایگاه حفاظت شده مهم در آنزیم EPSPS انتخاب شد. هدف تغییر کدون اسیدآمینه گلایسین (GGA) به آلانین (GCC) است. برای ایجاد جهش در ناحیه فوق از روش جهش‌زایی جهت‌دار در تک تیوپ به واسطه مگاپرایمر استفاده شد (Tyagi *et al*. 2004). طراحی آغازگر جهش‌دار برای تبدیل اسیدآمینه گلایسین ۹۶ به آلانین به کمک نرم‌افزار PrimerX (www.bioinformatics.org/primerX) به صورت آغازگر رفت جهش‌دار 5'-AGT TGT TCC TCG GTA ACG CCG CCA CG-3' انجام شد. جهت ایجاد جهش واکنش PCR به صورت یک واکنش دو مرحله‌ای انجام شد، که در آن از DNA الگو یعنی همان پلاسمید pJET1.2 بعد از کلونینگ به مقدار ۱µl، آغازگر رفت جهش‌دار در چهار غلظت ۰/۰۵ µl، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ و در چهار واکنش مختلف، آغازگر برگشت ۱µl، dNTPs ۱µl، 10x

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

۵µl buffer with $MgSO_4$، آنزیم *Pfu* DNA Polymerse ۰/۵µl در حجم کلی ۵۰µl به صورت یک سیکل (۹۵ °C، ۱min)، ۵ سیکل: ۹۵ °C به مدت ۱min، ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۲min و نیز تکثیر نهایی در ۷۲ °C به مدت ۳۵min استفاده شد. بعد از اتمام PCR، آغازگر روبه جلو اصلی مربوط به ژن هدف به مقدار ۱µl به هر یک از تیوپ‌ها اضافه و تیوپ‌ها وارد دستگاه PCR با برنامه یک سیکل (۹۶ °C به مدت ۵min)، ۲۵ سیکل: ۹۶ °C به مدت ۱min، ۶۳ °C به مدت ۱/۵min و ۷۲ °C به مدت ۲min و نیز تکثیر نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰min انجام و نتیجه بر روی ژل آگارز بررسی شد. در نهایت نمونه برای توالی‌یابی ارسال شد.

کلونینگ در پلاسمید گیاهی pPZPY122

ژن‌های *EPSPS* جهش‌دار و فاقد جهش، جداگانه به پلاسمید بیانی گیاهی pPZPY122 انتقال یافتند. واکنش هضم آنزیمی با *Sma*I و *Xba*I انجام شد: ۱µg/µl پلاسمید، آنزیم‌های برشی هر یک ۰/۵µl، بافر 10X Tango ۲µl در حجم نهایی ۲۰µl. پس از هضم آنزیمی پلاسمید و محصول PCR، کل محصول روی ژل آگارز بررسی و قطعه ژن هدف با طول ۱۲۸۴bp و نیز پلاسمید هضم شده از ژل برش داده و با استفاده از کیت Thermo Fisher Scientific (آمریکا) خالص‌سازی شد. واکنش اتصال قطعه به پلاسمید pPZPY122 به نسبت ۱:۳ به کمک آنزیم T4 DNA Ligase به مقدار ۱µl و بافر 10X در دمای ۲۲°C انجام شد. محصول واکنش اتصال، به روش شیمیایی به باکتری *E. coli* انتقال داده شد. به منظور تأیید ترانسفورماسیون از کلون‌های رشد یافته در محیط کشت انتخابی LB حاوی کلرامفنیکل و استخراج پلاسمید انجام و واکنش هضم آنزیمی برای ژن هدف توسط آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Eco*RI انجام شد. ناحیه فوق مربوط به T-DNA بوده که در پلاسمید pPZPY122 معادل ۱۱۰۰bp است که در صورت حضور ژن هدف با طول ۱۲۸۴bp جمعاً معادل ۲۳۸۴bp طول خواهد داشت که نتیجه آن روی ژل آگارز بررسی شد. تولید سلول‌های پذیرنده *Agrobacterium tumefaciens* سویه EHA105 (Hood *et al*. 1993) برای استفاده در روش الکتروپوریشن تهیه شد (Sambrook & Russell, 2001). تراریزش باکتری‌ها با ۱۵۰ng/µl از پلاسمیدهای حامل ژن جهش یافته و نیز غیرجهش‌دار به روش الکتروپوریشن به مدت ۵ms و ولتاژ ۲۵۰۰v انجام شد. بعد از گذشت ۴۸ ساعت در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپیسین ۲۵mg/ml و کلرامفنیکل ۳۴mg/ml در دمای ۲۸°C کلونی‌ها ظهور کردند. جهت تأیید ترانسفورماسیون، کلونی PCR به روش جوشانیدن انجام شد. ابتدا چند کلونی انتخاب و به نسبت ۱:۱۰ در آب مقطر استریل رقیق و سپس در دمای ۱۰۰ °C جوشانده و با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شدند که از فاز رویی جهت انجام واکنش PCR استفاده شد.

تراریزش گیاه برنج به روش *in planta*

به منظور انجام تراریزش، ابتدا بذور برنج با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۱/۵٪ ضدعفونی شدند و به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۰ °C با رطوبت کافی جهت جوانه زنی قرار گرفتند تا سفیدی نوک ریشه‌چه ظاهر شود. سویه سوپربیماریزای EHA105 از *Agrobacterium tumefaciens* بر اساس روش گلوین در سه محیط LB، AB و القاءکننده کشت داده شد (Gelvin, 2006). جهت تلقیح بذور هاشمی ناحیه جنینی بذر جوانه زده با سوزن به قطر ۰/۵mm آغشته به *Agrobacterium tumefaciens* تا عمق حدود ۱mm سوراخ شد. سپس بذور تلقیح شده تحت شرایط خلأ، با استفاده از دستگاه خلاء (Eppendorf, Concentrator plus) در دمای محیط و تا زمان جوش آمدن محلول درون محیط کشت القایی قرار گرفتند. بذور تلقیح شده در اتاقک رشد با دمای ۲۳ °C، به مدت ۹ روز نگهداری و بعد از این مدت جهت حذف باکتری با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۱۰۰۰mg/L) تیمار شدند (Bechtold *et al*. 1993). گیاهچه‌های حاصل در شرایط آبکشت در محیط تغذیه‌ای یوشیدا (Yoshida *et al*. 1971) کشت شدند. پس از تقویت سیستم ریشه، گیاهچه‌ها وارد گلدان و در نهایت به گلخانه انتقال یافتند. استخراج DNA از جوانترین برگ گیاهچه‌ها با روش CTAB تغییر یافته انجام شد (Clarke, 2009). سپس جهت بررسی اولیه از واکنش PCR با شرایط اولیه تکثیر استفاده شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

تجزیه و تحلیل فنوتیپی و مولکولی گیاهان

بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین

غربال اولیه گیاهان احتمالاً تراریخته در محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین انجام شد. ابتدا به منظور تعیین غلظت کشندگی آنتی‌بیوتیک، بذور در محیط $\frac{1}{2}$ MS جامد (Duchefa هلند، حاوی ویتامین ٤٤٠٥/٠١٩ mg/l) حاوی پنج غلظت mg/l ۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ جنتامایسین کشت و بعد از گذشت ۲۰ روز کمترین غلظتی که در آن تمام گیاهان زرد شده بودند، به عنوان غلظت کشندگی یعنی ۱۰۰mg/l در نظر گرفته شد. بذور برنج گیاهان مورد آزمون در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین (۱۰۰mg/l) کشت شدند. پوسته بذر بدون آسیب به جنین جوان، جدا و بعد از استریل‌سازی به ظروف محیط کشت انتقال یافتند. محیط‌های کشت به اتاقک کشت، در شرایط تاریکی و دمای ۲۳°C به مدت هفت روز قرار گرفته و سپس تیمار تاریکی قطع و تیمار ١٦ ساعت روشنایی و دمای ۲۳°C به مدت ۲۰ روز اعمال شد. بعد از گذشت این زمان، گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. گیاهان تراریخته در حین رشد همچنان رنگ سبز خود را حفظ کرده اما گیاهان غیرتراریخته زرد شدند. درصد گیاهان تراریخت احتمالی با شمارش گیاهان سبز و زرد در محیط کشت $\frac{1}{2}$ MS محاسبه و نتایج به صورت نمودار ارائه شد. گیاهان سبز جهت ادامه فرایند رشد و نمو به خاک و اتاق کشت با دمای ۲۵°C و ١٦ ساعت روشنایی انتقال داده شدند. جهت مطالعه بیشتر از گیاهان فوق استخراج DNA و واکنش PCR انجام و نتیجه در ژل آگارز بررسی شد.

بررسی مقاومت به علفکش گلایفوسیت

جهت تعیین غلظت کشندگی به علفکش گلایفوسیت در برگ گیاه برنج، نمونه برگی از گیاهان شاهد تهیه و در غلظت‌های مختلف از علفکش به صورت mM ۰، ۱، ۳/۵، ٤، ٦، ۷ و ۸ در محیط $\frac{1}{2}$ MS مایع قرار گرفت. نمونه‌ها به اتاقک کشت در دمای ۲۵°C با طول روز ١٦ ساعت روی شیکر با دور rpm ۵۰ قرار گرفتند. غلظتی که در آن تمام نمونه‌ها به طور کامل زرد و نکروز شده بودند، به عنوان غلظت کشندگی علفکش در برگ گیاه برنج تعیین (۸mM) و کلیه آزمایشات بعدی مربوط به علفکش، در این غلظت و شرایط انجام شد. از گیاهان برنج چهار ماهه شاهد، تراریخته با ژن فرابیان یافته (*35S:EPSPS*) و تراریخته با ژن موتانت *epsps*، برگ سبز تهیه و به درون محیط گزینشی $\frac{1}{2}$ MS مایع حاوی ۸mM از گلایفوسیت انتقال داده و نمونه‌ها در شرایط ذکر شده در اتاقک کشت نگهداری شدند. دو روز بعد از شروع آزمایش بررسی‌ها انجام و تا چهار روز ادامه داشت. رنگ نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت و تعداد آنها ثبت شد. از گیاهان مثبت در سه تست PCR، مقاومت به آنتی‌بیوتیک جنتامایسین و مقاومت به علفکش گلایفوسیت مربوط به این نسل در گلخانه نگهداری شد، تا به بذر بروند. بذور نسل دوم همانند نسل قبل مورد بررسی قرار گرفتند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

از گیاهان تراریخته احتمالی توسط کیت RNX-Plus بر اساس دستور سازنده RNA استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراجی با کمک دستگاه نانودراپ بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت مربوطه و ٤٠٠ ng از RNA و آغازگر Oligo dt بر اساس دستور شرکت سازنده انجام شد. به منظور بررسی بیان ژن از آغازگرهای اختصاصی ژن هدف استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن یوبیکوئیتین به صورت یک سیکل (۹۵ °C، ۳min)، ۳۵ سیکل: ۹۵ °C به مدت ۲۵ s، ۵۸/۷°C به مدت ۲۵s و ۷۲°C به مدت ۲۵s و نیز تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵min با آغازگرهای روبه‌جلو 5′-ACCACTTCGACCGCCACTACT-3′ و نیز روبه‌عقب 5′-ACGCCTAAGCCTGCTGGTT-3′ انجام شد. همچنین این واکنش برای ژن *EPSPS* به صورت یک سیکل (۹۵°C، ۳min)، ۳۵ سیکل: ۹۵°C به مدت ۲۵ s، ٥٤/٢°C به مدت ۲۵s و ۷۲°C به مدت ۲۵ s و نیز تکثیر نهایی ۷۲°C به مدت ۵min با آغازگرهای روبه جلو 5′-AGCAGCAGCAATCAAAGG-3′ و رو به عقب 5′-ATCGCCGCATCAGGAATA-3′ انجام شد. جهت بررسی میزان بیان ژن از نمونه‌های cDNA مثبت سنتز شده، در واکنش Real Time Quantitative PCR از دستگاه Biorad استفاده شد. این واکنش هم برای ژن رفرنس و هم برای ژن هدف انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

در نهایت برای محاسبه میزان نسبی بیان ژن از روش ΔCt و فرمول لیواک استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001) و نتایج به صورت نمودار ارائه شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام داده‌های بدست آمده از این تحقیق به کمک نرم افزار SAS نسخه ۹ تجزیه و تحلیل و کلیه نمودارها با برنامه اکسل ۲۰۱۰ رسم شدند. طرح آماری مورد استفاده به صورت کاملاً تصادفی در سه تکرار و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون LSD در سطح احتمال ۱ درصد بررسی شد.

نتایج و بحث

کلون‌سازی و جهش‌زایی در ژن *EPSPS*

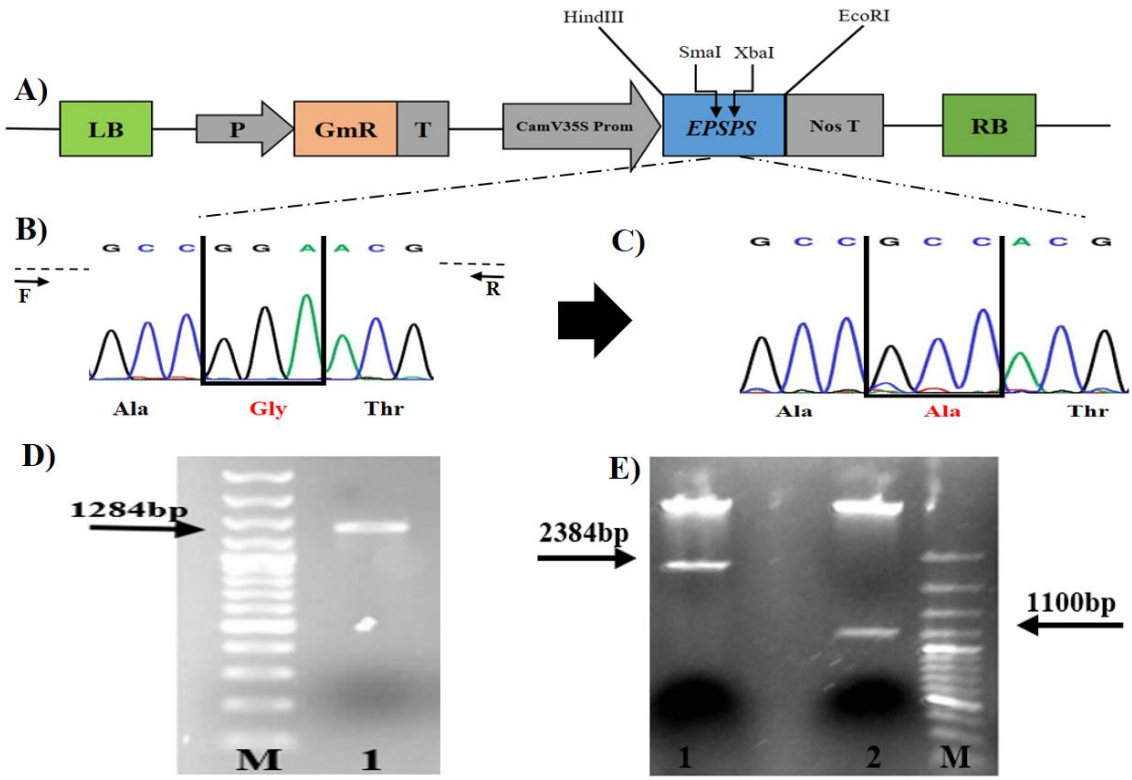
تکثیر اولیه در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن با کمک آنزیم *Pfu* پلیمراز انجام و نتیجه یک باند به طول ۱۲۸٤bp بود (نتیجه آن نشان داده نشده است). حضور ژن هدف در پلاسمید pJET1.2 توسط واکنش هضم آنزیمی تأیید شد. جهت بررسی و تأیید صحت توالی کلون شده توالی‌یابی انجام شد. به منظور ایجاد جهش نقطه‌ای از روش جهش‌زایی تک تیوب با استفاده از مگاپرایمر طی دو واکنش متوالی PCR استفاده و نتیجه آن بر روی ژل آگارز ۱ درصد بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده باند مورد نظر در غلظت ۲۰۰ng/ul جداسازی و برای توالی‌یابی بعد از ایجاد جهش به شرکت bioneer ارسال شد (شکل ۱-d). نتیجه نشان داد که کد گلایسین در جایگاه ۹٦ از GGA به آلانین با کد GCC تغییر کرده است. مقایسه دو توالی قبل و بعد از جهش با نرم افزار Muscle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle) تأیید کننده ایجاد جهش در ناحیه ۹٦ بود (شکل ۱-a، b و c). به منظور انتقال ژن *EPSPS* فرابیان یافته (*35S:EPSPS*) و موتانت (35S:*epsps*) به گیاه برنج، از پلاسمید بیانی گیاهی pPZPY122 استفاده شد که در همین خصوص واکنش هضم آنزیمی و اتصال انجام و نتیجه آن در ژل آگارز بررسی شد (شکل ۱-e). جهت تأیید تراریزش از پلاسمیدهای استخراجی، هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Hind*III و *Eco*RI انجام شد. همچنین تراریزش آگروباکتریوم با روش PCR و آغازگرهای اختصاصی تأیید شد.

غربالگری گیاهان تراریخته نسل اول در محیط کشت انتخابی

این یک تست غربال‌گری اولیه نسبتاً آسان و سریع برای تشخیص گیاهان تراریخته در یک جمعیت بزرگ است. گیاهان تراریخته برنج در محیط انتخابی مقاومت داشته و پس از گذشت ۲۰ روز همچنان توانایی حفظ رنگ سبز خود را داشتند به اصطلاح سبزمان بودند. در حالی که پس از گذشت این مدت کلیه گیاهان شاهد زرد شده و از بین رفتند (شکل ۲- A، B و C). بنابراین می‌توان اطمینان داشت که جنتامیسین یک آنتی‌بیوتیک مناسب برای غربالگری گیاه برنج است. مقدار سبزمانی در گیاهان *35S:EPSPS* و گیاهان *epsps* از یکدیگر متفاوت بود (شکل ۲- D). بر اساس نتایج حاصله واکنش گیاهان تراریخته ۲۰ روزه پس از رشد در محیط کشت انتخابی، از گیاهان شاهد که به صورت تماماً زرد شده بودند (۱۰۰ درصد)، بیشتر بود و گیاهان تراریخته تا پایان مدت مذکور سبز بودند. همچنین گیاهان تراریخته حاوی ژن *EPSPS* تعداد گیاه سبز بیشتری (۸۲ درصد) در مقایسه با گیاهان تراریخته *35S:EPSPS* (۷٦ درصد) داشتند.

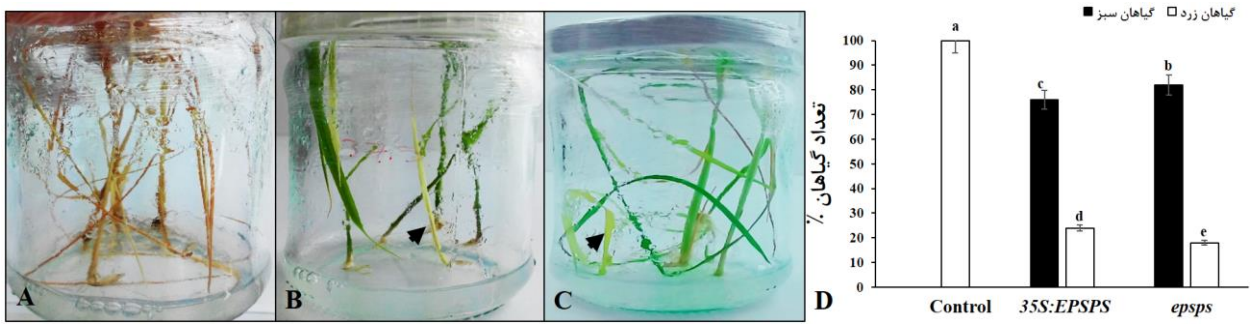
جهت انجام تست علفکش از گیاهان تراریخته احتمالی حاوی ژن *EPSPS*، *35S:EPSPS* و شاهد نمونه برگی تهیه شد. نمونه‌ها بعد از استریل‌سازی، داخل محیط کشت MS $\frac{1}{2}$ مایع حاوی غلظت ۸mM از علفکش گلایفوسیت قرار داده شدند (شکل ۳- A، B و C). در روز اول هیچ تغییر فاحشی در نمونه‌ها مشاهده نشد و همگی سبز بودند. روز دوم بعد از شروع آزمایش برگ‌های گیاهان شاهد ۱۰۰ درصد سفید یا زرد شدند. اما، گیاهان حامل ژن *EPSPS* و گیاهان حامل ژن *35S:EPSPS* کمی رنگ پریدگی داشتند. با این حال، قدرت سبزمانی در گیاهان حامل ژن *EPSPS* بیشتر بود. در روز سوم دوباره نمونه‌ها بررسی شدند. بر این اساس، گیاهان تراریخته رنگ سبز خود را حفظ کردند که بر اساس نتایج حاصله، مشخص شد که این مقاومت در گیاهان حامل ژن *EPSPS* (۹۱ درصد) بیشتر از گیاهان حامل ژن *35S:EPSPS* (۸۲ درصد) بود (شکل ۳- D).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]



شکل ۱– a) ناحیه T-DNA مربوط به پلاسمید pPZPY122، LB مرز چپ، P پیشبر، GmR ژن مقاومت به جنتامایسین، T ترمیناتور، CamV35S پیشبر، *EPSPS* ژن هدف، Nos T ترمیناتور، RB مرز راست. b) بخشی از نتیجه توالی‌یابی از ژن *EPSPS* طبیعی با تعیین گلایسین ۹۶ (قرمز). c) بخشی از نتیجه توالی‌یابی بعد از انجام جهش با تعیین آلانین ۹۶ (قرمز). d) جهش‌زایی نقطه‌ای در ژن *EPSPS* با روش تک تیوب. M) نشانگر plus۱۰۰bp، ۱) تکثیر ژن هدف. e) تأیید تراریزش به کمک هضم آنزیمی. M) نشانگر plus۱۰۰bp و ۱) پلاسمید حاوی ژن هدف، که باند ۲۳۸٤bp مربوط به ژن هدف و قطعه T-DNA است، ۲) پلاسمید خالی که در آن T-DNA به طول ۱۱۰۰bp پس از هضم آنزیمی جدا شده است.

Figure 1- a) T- DNA casset of pPZPY122 plasmid, LB; Left border, P; promoter, GmR; gentamicin resistance gene, T; Terminator, CamV35S promoter, *EPSPS* gene, Nos T; nos terminator, RB; right border. b) Part of native *EPSPS* sequence performed by specifying glycine 96 (red). c) Part of mutant sequence by identifying the alanine 96 (red). d) A single-tube method used for mutagenesis. M) Ladder, 1) Target gene. e) Double digest reaction. M) Ladder; (1) Plasmid containing target gene, which is 2384 bp for target gene plus T-DNA fragment, 2) An empty plasmid which 1100 bp in T-DNA fragment.



شکل ۲– بررسی گیاهان تراریخته احتمالی در محیط کشت انتخابی حاوی ۱۰۰mg/l جنتامایسین. A) گیاهان شاهد تماماً زرد شدند، B) گیاه حاوی ژن *35S:EPSPS* و C) گیاه حاوی ژن *EPSPS*. جمعیت گیاهان تراریخته احتمالی تفرق صفت یافته برخی زرد شده و از بین رفتند که در شکل با فلش مشخص شده است. D) واکنش گیاهان تراریخته ۲۰ روز پس از رشد در همان محیط. گیاهان شاهد تماماً زرد شده اما گیاهان تراریخته قدرت سبزمانی از خود نشان دادند. گیاهان تراریخته *epsps* تعداد گیاه سبزمان بیشتری در مقایسه با گیاهان تراریخته حامل ژن *35S:EPSPS* داشتند

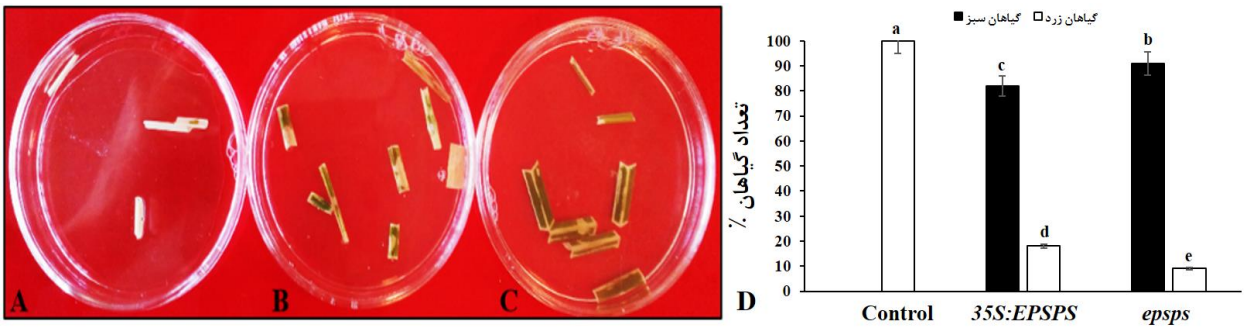
Figure 2- Selective medium containing 100 mg/l gentamicin. A) Control plants were completely yellow, B) Plants containing *35S:EPSPS* gene; and C) Plants containing *epsps* gene. The population of none transgenic ones indicated by arrow. D) 100% of control plants turn yellow, wherese others were green. Mutant plants had more green color than overexpressed ones.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

قابل ذکر است رنگ برگ کلیه نمونه‌ها بعد از روز سوم زرد شده و نمونه‌ها از بین رفتند. بنابراین بهترین زمان برای بررسی رنگ برگ‌ها قبل از روز سوم است تا تغییرات را در دو نوع گیاه تراریخته بتوان به خوبی مشاهده کرد و تفاوت‌ها را تشخیص داد.

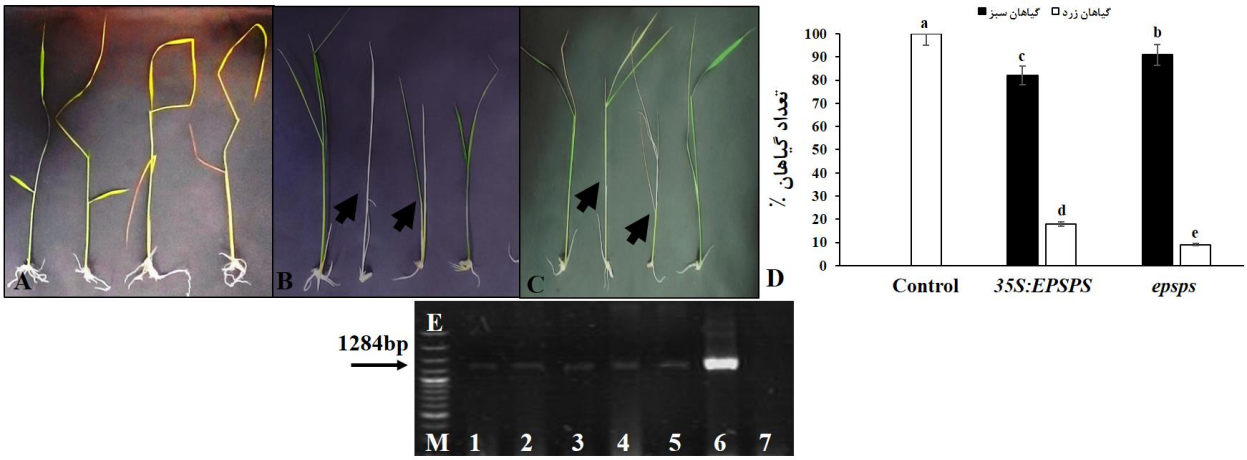
غربال‌گری گیاهان تراریخته نسل دوم

گیاهان تراریخته نسل دوم همانند نسل قبل در محیط کشت انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک جنتامایسین غربال‌گری شدند. تعداد گیاهان در هر شیشه کشت شمارش و بررسی شد (شکل ٤- A، B و C) که بر این اساس، ۱۰۰ درصد گیاهان شاهد زرد شده و از بین رفتند اما مقدار سبزمانی در دو نوع گیاه تراریخته دیگر حامل ژن *35S:EPSPS* (۸۰ درصد) و حامل ژن *EPSPS* (۹۰ درصد) متفاوت بود (شکل ٤- D). از گیاهان مثبت در تست مقاومت به علفکش گلایفوسیت، DNA ژنومی استخراج و متعاقباً واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *EPSPS* انجام شد. بر این اساس، کلیه گیاهان PCR مثبت بودند (شکل ٤- E).



شکل ۳- بررسی نمونه‌های برگی گیاهان برنج چهار ماهه در محیط کشت انتخابی مایع حاوی علفکش گلایفوسیت. بعد از گذشت سه روز از تیمار با علفکش. A) گیاه شاهد، B) گیاه تراریخته حامل ژن *35S:EPSPS* و C) گیاه تراریخته حامل ژن *EPSPS*. ب) واکنش همان گیاهان در محیط کشت انتخابی گلایفوسیت. D) گیاهان *epsps* قابلیت نگه‌داری رنگ سبز بیشتری در مقایسه با گیاهان تراریخته حامل ژن *35S:EPSPS* داشتند. گیاهان شاهد تماماً زرد شدند و از بین رفتند.

Figure 3 - Examination of four-month plants in a selective liquid medium containing glyphosate. Three days after treatment with herbicide. A) Control; B) overexpressed plants; and c) Mutant plants. D) Same plants in a selective medium containing glyphosate. The *epsps* plants had a higher green compared to the *35S:EPSPS* plants. The control plants get completely yellow.

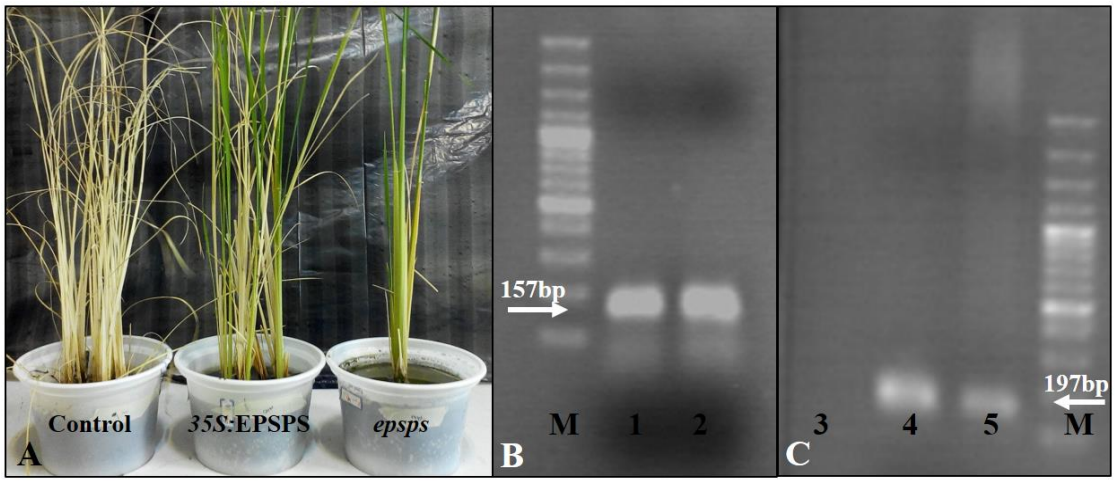


شکل ٤- بررسی گیاهان برنج تراریخته نسل دوم در محیط کشت انتخابی جامد حاوی جنتامایسین. A) گیاهان شاهد، B) گیاهان حاوی ژن *35S:EPSPS* و C) گیاهان حاوی ژن *EPSPS*. D) درصد زنده‌مانی همان گیاهان در محیط کشت انتخابی حاوی جنتامایسین. گیاهان *epsps* تعداد گیاه سبزمان بیشتری در مقایسه با گیاهان *35S:EPSPS* داشتند. E) بررسی تعدادی از گیاهان تراریخته نسل دوم در واکنش PCR. M) نشانگر، ۱ و ۲) گیاهان موتانت *epsps*، ۳، ٤ و ٥) گیاه حامل ژن *35S:EPSPS*، ٦)کنترل مثبت و ۷) کنترل منفی.

Figure 4- Evaluation of T_2 plants in a solid selective medium containing gentamicin. A) Control plants; B) Plants containing *35S:EPSPS*; and C) Plants containing *EPSPS*. D) Evaluation of T_2 plants in a solid selective medium containing gentamicin. The *epsps* plants had more green than others. E) Examination of T_2 plants by PCR reaction. M) Ladder, 1 and 2) *epsps* plant, 3 to 5) *35S:EPSPS* plants, 6) positive and 7) negative control.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

بررسی مقاومت به علفکش بر روی گیاهان تراریخته احتمالی بدست آمده از دو تست قبل انجام شد. با این تفاوت که به جای نمونه برگی، گیاه کامل نسل دوم تحت تیمار با علفکش قرار گرفت (شکل ۵). بر این مبنا، از هر یک از گیاهان تراریخته یک گیاه در پاسخ به علفکش با غلظت ۸mM بررسی شد که توانایی زنده‌مانی بعد از گذشت دو هفته از آزمایش را داشت. قابل ذکر است اسپری برگ و ساقه گیاهان مذکور در سه نوبت و بعد از آبیاری انجام شد. گیاه شاهد به طور کامل بعد از سه روز از اعمال علفکش زرد شد و از بین رفت، اما دو گیاه دیگر یعنی گیاه *epsps* و *35S:EPSPS* توانایی نگه داری رنگ سبز خود را داشتند و این ویژگی در گیاهان موتانت بیشتر بود. البته این گیاهان حاوی لکه‌های زرد شده بودند که طبیعی است و بعد از گذشت ده روز تقریباً این گیاهان توانستند خود را بازیابی کرده، مریستم فعال تولید و برگ جدید ایجاد کنند. گیاهان فوق در شرایط گلخانه نگهداری شدند تا به بذر رفته و نسل بعد را ایجاد کنند. از این گیاهان RNA استخراج و cDNA سنتز شد. بررسی صحت سنتز cDNA با ژن رفرنس یوبیکوئیتین برنج و میزان بیان ژن هدف با RT-PCR سنجیده شد (شکل ۵). جهت بررسی میزان بیان هر یک از ژن‌های فوق، از روش Real Time Quantitative PCR استفاده و تجزیه و تحلیل مربوطه به روش ΔCt انجام شد. بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد که هر دو نوع ژن کلون شده در گیاهان بیان و موجب مقاومت به علفکش گلایفوسیت شده‌اند. همچنین این مقاومت در هر دو نسل از گیاهان برنج رقم هاشمی مورد تأیید و مشابه بود.



شکل ۵- a) بررسی فنوتیپی مقاومت به گلایفوسیت. b) بررسی بیان ژن هدف در هر یک از گیاهان تراریخته. M) نشانگر، ۱) RT-PCR با ژن رفرنس یوبیکوئیتین برنج از گیاه *35S:EPSPS*، ۲) RT-PCR با همان ژن از گیاه *epsps*، ۳) کنترل منفی، ٤) RT-PCR از گیاه *epsps*، ۵) RT- PCR از گیاه *35S:EPSPS*.

Figure 5- a) phenotypic evaluation of resistance to glyphosate. b) Molecular analysis of gene expression in transgenic plants. M) Ladder; 1) RT-PCR with reference gene in *35S:EPSPS*, 2) *epsps* plant; 3) negative control; 4) RT-PCR of *epsps* plant and 5) *35S*: *EPSPS* Plant.

گلایفوسیت با توجه به ویژگی‌های ممتازی که در کنترل علف‌های هرز دارد توجه محققان بسیاری را به خود جلب نموده است. در این خصوص تولید گیاهان مقاوم به گلایفوسیت به عنوان یکی از سریع‌ترین فناوری‌ها در علم کشاورزی تبدیل شده است (Green, 2018). در حال حاضر نسل جدیدی از محصولات زراعی مقاوم به علف‌کش در حال توسعه هستند به طوری که همراه با بهبود تکنولوژی، انقلابی در مدیریت علف‌های هرز در زمین زراعی باشند (Green and Owen, 2011). در تحقیق حاضر یکی از ژن‌های انتقال یافته به برنج، *EPSPS* وحشی تحت کنترل پیشبر قوی CaMV35S است که بیان موفقیت‌آمیز آن در دو نسل تأیید شد. بر اساس نتایج بدست آمده تراریزش گیاه برنج با این ژن موجب ایجاد مقاومت به علفکش شد، البته این مقدار نسبت به گیاهان تراریزش یافته با ژن موتانت کمتر بود. این نتایج مشابه با نتایج سایر پژوهشگران در گیاه اطلسی بود (Shah *et al*. 1986; Gaines *et al*. 2010; Tian *et al*. 2011; Sammons and Gaines, 2014). به طوری که ژن مورد نظر از منابع گیاهی یا پروکاریوتی جدا و تحت کنترل یک پیشبر قوی وارد گیاه هدف می‌شود و هنگام برخورد گیاه زراعی با غلظت مشخص از علف‌کش، بخشی از آنزیم غیرفعال شده و مقادیر باقی مانده برای عملکرد کافی خواهد بود البته متابولیت حاصل از فعالیت این انزیم در گیاه

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

حالت عادی را خواهد داشت (Gaines *et al.* 2010). فرابیان آنزیم EPSPS منجر به افزایش مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان رشد یافته تحت شرایط کشت بافت شده است که این امر با افزودن غلظت گلایفوسیت در مراحل کشت بافت سلول‌های گیاه توتون بدست آمد (Goldsbrough *et al.* 1990; Eschenburg *et al.* 2002; Tian *et al.* 2011). فرابیان ژن *EPSPS* موجب ایجاد مقاومت به گلایفوسیت در *Eleusine indica* شده است (Chen *et al.* 2015). چند برابرسازی بیان ژن هدف در گیاهانی مانند *Amaranthus palmeri* و *Lolium perenne* ssp. نیز موجب ایجاد مقاومت شده است (Gaines *et al.* 2010; Salas *et al.* 2012) امروزه این روش یک مکانیسم متداول جهت ایجاد مقاومت به گلایفوسیت می‌باشد (Sammons and Gaines, 2014).

تلاش‌ها برای تغییر ساختار آنزیم EPSPS به گونه‌ای که همچنان دارای عملکرد بوده و نیز منجر به ایجاد مقاومت در گیاه شود، جزو تحقیقات رایج در دو دهه گذشته بوده است. بدین منظور با استفاده از روش‌های زیست مولکولی در نقاط حفاظت شده آنزیم که محل میانکنش علفکش است، تغییر کدونی ایجاد و عملاً با حفظ عملکرد آنزیم مانع اتصال علفکش به آن می‌شود. در این حالت ورود این آنزیم جدید به داخل گیاه آن را در برابر علفکش مقاوم می‌سازد (Baerson *et al.* 2002; Wang *et al.* 2003; Tian *et al.* 2011). در تحقیق حاضر به‌منظور ایجاد تغییرات کدونی در آنزیم مورد نظر از روش جهش‌زایی مکانی هدایت شده (SDM) استفاده شد. هدف این کار، بررسی جایگاه فعال آنزیم، شناسایی و تعیین میزان اهمیت هر یک از اسیدهای آمینه در اتصال به لیگاند و تأثیر آن بر واکنش کاتالیزوری آنزیم است. روش SDM به واسطه PCR مناسب‌ترین راه برای ایجاد جهش نقطه‌ای است (Tyagi *et al.* 2004). آمینواسیدهای موجود در مناطق حفاظت شده آنزیمی، هدف این مطالعه هستند. با بررسی توالی EPSPS در چندین باکتری و گیاه این آمینواسیدها مشخص شدند (Kishore and Shah, 1988). مکان هدف مقاومت به گلایفوسیت می‌تواند با ایجاد جهش نقطه‌ای در EPSPS و در اسیدآمینه‌هایی چون Gly96Ala بدست آید (Eschenburg *et al.* 2002; Priestman, 2005; Corea *et al.* 2012; Maeda and Dudareva, 2012; Yaqoob *et al.* 2016). در سال ۱۹۸۰ Amerhein و همکاران نخستین آنزیم EPSPS غیر حساس به گلایفوسیت حامل جهش Gly96Ala را تولید کردند. طی این تحقیقات نشان داده شد که این آنزیم‌های نوترکیب ضمن حفظ فعالیت‌های کاتالیتیکی خود، تمایل کمتری به گلایفوسیت نشان می‌دهند (Priestman, 2005; Corea *et al.* 2012; Maeda and Dudareva, 2012). یک نوع ژن AroA مقاوم در باکتری *E. coli* گزارش شده است که مقاومت را با جهش نقطه‌ای Gly96Ala ایجاد کرده است (Padgette *et al.*, 1991). Comai و همکاران (۱۹۸۵) با این جهش گیاه توتون مقاوم به گلایفوسیت ایجاد کردند. نتایج مشابهی از کاربرد این ژن در گیاه سیب‌زمینی نیز گزارش شده است (Fillatti *et al.* 1987). همچنین در سال ۱۹۹۰ Sost و Amerhein Gly96Ala را در *Klebsiella pneumonia* ایجاد و تأثیر فزاینده‌ای در کاهش تمایل علف‌کش برای اتصال به آنزیم مشاهده کردند که به دلیل افزایش Ki به مقدار ۵۰۰۰ برابر و km برای PEP به مقدار ٤٠ برابر است. تغییر اسید آمینه گلایسین ۹٦ به آلانین در ساختار آنزیم مانع از اتصال گلایفوسیت به جایگاه فعال می‌شود و آنزیم به صورت طبیعی فعال خواهد بود. در واقع اعمال این جهش، تمایل آنزیم به اتصال با گلایفوسیت را به مقدار قابل توجهی کاهش می‌دهد (Schonbrunn *et al.* 2001). این تغییر موجب ایجاد یک گروه متیل اضافه در ساختار آنزیم شده که در برهم کنش آنزیم و علفکش مؤثر است و در واقع یک نوع ممانعت استری را به وجود می‌آورد. این گروه متیل اضافه به طور خاص با عدم تغییر در جایگاه اسیدهای آمینه واقع در مکان فعال آنزیم، از فضای کافی برای اتصال گلایفوسیت جلوگیری می‌کند. از طرف دیگر در صورت ایجاد این جهش مولکول گلایفوسیت به درستی نمی‌تواند در جایگاه اتصال مربوط به آنزیم قرار گرفته و یا به عبارتی نمی‌تواند به درستی جفت و جور شود (Eschenburg *et al.* 2002; Priestman, 2005; Kang and Kim, 2006; Corea *et al.* 2012; Maeda and Dudareva, 2012). مطالعات بیشتر نشان داد که دو اسیدآمینه گلایسین ۹٦ و آلانین ۱۸۳ در *E. coli* در منطقه بسیار حفاظت شده آنزیمی قرار دارند به طوری که گلایسین در این منطقه پیوند هیدروژنی بسیار محکمی با نیتروژن و اکسیژن موجود در گروه فسفات در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

گلایفوسیت ایجاد می‌کند (Priestman, 2005; Corea *et al.* 2012; Maeda and Dudareva, 2012) و نیز آلانین ۱۸۳ یک آمینواسید بسیار مهم برای تعاملات بین EPSPS و گلایفوسیت است (Schonbrunn, 2001). اما این دو آمینواسید در مکان فعال EPSPS قرار ندارند، بنابراین تغییر آنها می‌تواند منجر به تغییر مقاومت گلایفوسیت به آنزیم شود. در سال ۲۰۰۶ Zhou و همکاران جهش پرولین ۱۰۶ به لوسین را در EPSPS گیاه برنج انجام و موفق به تراریختی توتون مقاوم به گلایفوسیت شدند. (Kahrizi *et al*. 2007; Tian *et al.* 2011). در مورد گیاه برنج نیز مطالعات زیادی انجام شده اما نکته مهم در این خصوص پایایی و فعال بودن تراژن در گیاهان تراریزش یافته است (Mehrotra and Goyal, 2013; Yaqoob *et al*. 2016). ارقام برنج G2-6 و G2-7 حامل ژن *G2-EPSPS* از باکتری *Pseudomonas fluorescens* با مقاومت چند برابری ایجاد شده‌اند (Dong *et al*. 2017). ژن *G6* از باکتری *Pseudomonas putida* به گیاه برنج انتقال یافته و موجب مقاومت در غلظت ۸ گرم بر لیتر شد (Zhao *et al*. 2011). ژن *MdEPSPS* از درخت سیب و دو جهش در آمینواسیدهای T101و A187T موجب ایجاد مقاومت شد (Tian *et al*. 2013). ژن *OsEPSPS* به صورت فرابیان یافته از برنج جدا و به همان گیاه منتقل شد. غربال اولیه گیاهان به واسطه بررسی مقاومت به آنتی‌بیوتیک هایگرومایسین انجام و موجب ایجاد گیاهان مقاوم در غلظت ٤mM شد (Chandrasekhar *et al*. 2014). ژن *CP4-EPSPS* به صورت فرابیان یافته وارد گیاه برنج و ۱٪ مقاومت به علفکش ایجاد شد (Chhapekar *et al*. 2015). انتقال همزمان ژن igrA جهت غیرفعال کردن گلایفوسیت از باکتری *Pseudomonas* و ژن *EPSPS* P173S از گیاه برنج تحت کنترل پرومتور قوی CaMV35S منجر به ایجاد مقاومت به گلایفوسیت (۲mL/L) در برنج شد (Fartyal *et al.* 2018). در تحقیق حاضر نیز جهش Gly96Ala به روش SDM به واسطه مگاپرایمر انجام شد و سپس به جنین بالغ گیاه برنج رقم هاشمی به واسطه *Agrobacterium tumefaciens* سویه سوپر بیماریزای EHA105 به روش *in planta* انتقال یافت. همچنین جهت مقایسه این انتقال و بیان ژن مذکور، به طور همزمان ژن فرابیان یافته نیز به گیاه برنج با همان روش انتقال یافت. نتایج نشان از مقاومت بیشتر گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان فرابیان یافته در غلظت ۸mM داشته است. جهت رسیدن به سطوح تجاری نیاز به بررسی‌های بیشتر، خصوصاً انتقال ژن به نسل‌های آینده است. بدین جهت در تحقیق حاضر به بررسی بیان ژن‌های انتقالی در نسل‌های اول و دوم پرداخته شد، که در مقایسه با نسل اول نتایج مشابهی بدست آمد. در نهایت می‌توان گفت مزایای تجاری سیستم کنترل کننده علف-های هرز، افزایش پیدا خواهد کرد تا مقاومت به گلایفوسیت یکی از پایه‌های اساسی و اصلی مدیریت علف‌های هرز در بیشتر گیاهان زراعی خصوصاً گیاه زراعی برنج شود.

سپاسگزاری: از ستاد توسعه زیست فناوری که بخشی از هزینه این پژوهش را (شماره ۹۵۰٤۱۲) تأمین نموده است، تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

Amerhein N, Deus B, Gehrke P, Steinrucken HC. 1980. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. Journal of Plant Physiology. 66: 830-834.

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-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase. Plant Physiology. 129: 1265-1275.

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G. 1993. *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. Comptes Rendus Academie de Paris Life Science. 316: 1194-1199.

Chandrasekhar K, Reddy GM, Singh J, Vani K, Vijayalakshmi M, Kaul T. 2014. Development of transgenic rice harbouring mutated rice 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate synthase (Os-mEPSPS) and Allium sativum leaf agglutinin (ASAL) genes conferring tolerance to herbicides and sap-sucking insects. Plant Molecular and Biological Report. 32: 1146–1157.

Chauhan BS. 2013. Effect of tillage systems, seeding rates, and herbicides on weed growth and grain yield in dry-seeded rice systems in the Philippines. Crop Protect. 54: 244–250.

Chen J, Huang H, Zhang C. 2015. Mutations and amplification of *EPSPS* gene confer resistance to

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*). Planta. 242: 859–868. doi: 10.1007/s00425-015-2324-2.

Chhapekar S, Raghavendrarao S, Pavan G, Ramakrishna C, Singh VK, Phanindra MLV. 2015. Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide, glyphosate. Plant Cell Report. 34: 721–731.

Clarke JD. 2009. Cetyle tri methyl ammonium bromide (CTAB) DNA mini prep for plant DNA isolation. Cold Spring Harbor Protocols. 10: 1101-5177.

Corea OR. Ki A, Cardenas C, Kim CL, Brewer SJ, Patten, AM. 2012. Arogenate dehydratase isoenzymes profoundly and differentially modulate carbon flux into lignins. Journal of biology and chemistery. 287: 11446–11459.

De-Carvalho LB, Alves PLCA, Duke SO. 2013. Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. Annual Brazilian Academic Science. 85: 813–821.

Dong Y, Jin X, Tang Q, Zhang X, Yang J, Liu X, Cai J, Zhang X, Wang X, Wang Z. 2017. Development and event-specific detection of transgenic glyphosate-resistant rice expressing the *G2-EPSPS* gene. Frontiers in Plant Science Journal. 8: 885.

Duke SO. 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and -susceptible crops and weeds. Journal of Agriculture and Food Chemistary. 59(11): 5835-5841.

Eschenburg S, healy ML, Priestman MA, Lushington GH, Schonbrunn E. 2002. How the mutation glycine 96 to alanine confers glyphosate insensitivity to 5-enolpyruvyl shikimate-3-phosphate synthase from *Escherichia coli*. Planta. 216: 129-135.

Fartyal D, Agarwal A, James D, Borphukan B, Ram B, Sheri V, Yadav R, Manna M, Varakumar P, Achary MM, Reddy MK. 2018. Co-expression of P173S mutant rice EPSPS and igrA genes results in higher glyphosate tolerance in transgenic rice. Frontiers in Plant Science Journal. 9: 144.

Fillatti JJ, Kiser R, Comai L. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene in to tomato using a binary *Agrobacterium tumeifaciens* vector. Biotechnology. 5: 726-730.

Gaines TA, Zhang W, Wang D, Bukun B, Chisholm ST, Shaner DL, Nissen SJ, Patzoldt WL, Tranel PJ,Culpepper AS, Grey TL, Webster TM, Vencill WK, Sammons RD, Jiang J, Preston C, Leach JE , Westra P. 2010. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American. 107:1029–1034.

Gelvin SB. 2006. *Agrobacterium* virulence gene induction. Molecular Biology. 343: 77-84.

Goldsbrough P, Hatch E, Huang B, Kosinski W, Dyer W, Herrmann K, Weller S. 1990. Gene amplification in glyphosate tolerant tobacco cells. Plant Science. 72: 53–62.

Green JM. 2009. Evolution of glyphosate-resistant crop technology. Weed Science. 57: 108 -117.

Green JM. 2018. The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. Pest Management Science. 74: 1035-1039.

Green JM, Owen MDK. 2011. Herbicide-Resistant Crops: Utilities and Limitations for Herbicide-Resistant Weed Management. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(11): 5819–5829.

Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS, Hoekema A. 1993. New *Agrobaterium* helper plasmids for plasmids for gene transfer to plants. Transgenic Research. 2: 208-218.

Kahrizi D, Salmanian AH Afshari A, Mousavi A. 2007. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase of *E.coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Report. 26(1): 94-105.

Kang K, Kim M. 2006. Single amino acid changes in the 5-enolpyruvylshikimate-3 phosphate synthase from Agrobacterium sp. strain CP4 and Synechocystis sp. PCC6803 alter enzyme activity and glyphosate sensitivity. Agricultural chemistry and biotechnology. 49 (2): 65-68.

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

Kuiper HA, Kleter GA, Noordam MY. 2000. Risks of the release of transgenic herbicide-resistant plants with respect to humans, animals and the environment. Crop Protection. 19: 773-778.

Lin J, Zhou B, Yang Y, Mei J, Zhao X, Guo X, Huang X, Tang D, Liu X. 2009. Piercing and vacuum in filtration of mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. Plant Cell Report. 28: 1065-1074.

Maeda H, Dudareva N. 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. Annual Reviwe in Plant Biology. 63: 73–105.

Mehrotra S, Goyal V. 2013. Evaluation of designer crops for biosafety a scientist's perspective. Genetic. 515: 241–248.

Padgette SR, Re DB, Grasser CS, Eichholtz DA, Frazier RB, Hironaka CM, Levine EB, Shah DM, Fraley RT, Kishore GM. 1991. Site-directed mutagenesis of a conserved region of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase active

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

site. Journal of Biology and Chemistry. 266: 22364-22369.

Priestman MA. 2005. Interaction of phosphonate analogues of the tetrahedral reaction intermediate with 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in atomic detail. Biochemistry. 44: 3241–3248.

Salas RA, Dayan F, Pan E, Watson Z, Dickson SB, Scott JW. 2012. EPSPS gene amplification in glyphosate-resistant Italian ryegrass (Lolium perenne ssp. multiflorum) from Arkansas. Pest Management Science. 68:1223–1230. doi: 10.1002/ps.3342.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

Sammons RD, Gaines TA. 2014. Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Management Science. 70: 1367-1377.

Schonbrunn E, Eschenburg S, Shuttleworth WA, Schloss JV, Amrhein N, Evans JNS, Kabsch W. 2001. Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvyl shikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98 (4): 1376-1380.

Shah DM, Horsch RB, Klee HJ, Kishore GM, Winten JA, Turner NE, Hironaka CM, Sanders PR, Gasser CS, Aykent SA, Siegel NR, Rogers SG, Fraley RT. 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science. 233: 474-481.

Stam M, Mol JN, Kooper JM. 2003. The silence of genes in transgenic plants. Annual Botany. 81:2-14.

Tan S, Evans R, Singh B. 2006. Herbicidal inhibitors of amino acid biosynthesis and herbicide-tolerant crops. Amino Acids. 30: 195 204.

Tian YS, Jing X, Xiong A, Zhao W, Xiao-Yan F, Peng RH, Yao QH. 2011. Improvement of glyphosate resistance through concurrent mutations in three amino acids of the *Ochrobactrum* 5-enopyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Apply Environment and Microbiology. 77: 8409–8414.

Tian YS, Xu J, Peng RH, Xiong AS, Xu H, Zhao W. 2013. Mutation by DNA shuffling of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Malus domestica* for improved glyphosate resistance. Journal of Plant Biotechnol. 11: 829–838.

Tyagi, R., Lai R, duggleby RG. 2004. A new approach to megaprimer polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. Biotechnology. 4: 1-6.

Wang HY, Li YF, Xie LX, Xu P. 2003. Expression of bactrial aroA mutant, aroAM1, encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phospate synthase for the production of glyphosate resistant tobacco plants. Journal of Plant Research. 116: 455-460.

Yaqoob U, Kaul T, Pandey S and Nawchoo I. 2016. *In-silico* Characterization, Structural Modelling, Docking Studies and Phylogenetic Analysis of 5-Enolpyruvyl shikimate-3-Phosphate Synthase Gene of *Oryza sativa*. Medicinal and Aromatic Plants. 5: 274. Doi: 10.4172/2167-0412.1000274.

Yoshida S, Forno DA, Cock JH, Gomez KA. 1971. Laboratory manual for physiological studies of rice. The International Rice Research Institute, Los Babos, Philippines. 83pp.

Zhao T, Lin C, Shen Z. 2011. Development of transgenic glyphosate-resistant rice with G6 gene encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Journal of integrative agriculture. 10: 1307–1312.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 7, Number 1

The reaction of transgenic rice plants containing *EPSPS* gene to glyphosate

Sedigheh Nasr Ramzi [1], Mohammad Mahdi Sohani[* 2], Reza Shirzadian Khorramabad [3], Mehryar Amininasab [4], Jafar Asghari [5]

1- Ph.D. student in plant biotechnology, 2-Associate Professor of Molecular Biology, 3- Associate Professor of Molecular Genetic, 5- Professor of Weed Physiology, Plant Biotechnology Department, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
4. Assistant Professor of Biophysics in the Tehran University
*Corresponding Author: mhdsohani@gmail.com

Abstract

The most effective way to produce a plant resistant to glyphosate is manipulation of EPSPS enzyme in order to reduce its affinity to this herbicide. It is one of the vital enzymes in the shikimate pathway, which is responsible for producing aromatic amino acids and various secondary metabolites in plants and bacteria. Without an active enzyme, the organism will not be able to survive. In the present study, one of the important domains in the EPSPS enzyme was modified by site-directed mutagenesis using mega-primer method and one tube approach. Glycine in position 96 was modified to Alanine which was sub-cloned along with the wild-type gene into pPZPY122 plant binary vector. Hashemi cultivar of rice (*Oryza sativa*) was used for transformation using EHA105 strain of *Agrobacterium tumefaciens* by *in planta* method. T_2 transgenic plants separately were evaluated to resistance to the gentamicin and glyphosate. Also, positive gene expression was confirmed by Quantitative PCR. Therefore, based on the results, these plants showed significantly a high degree of resistance to the herbicide.

Keywords: Gene expression, rice, Glyphosate, *In planta*, Transformation

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-29]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1397.7.1.8.7]