ژنتیک نوین
دوره شانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۴۰۰
صفحه ۲۳ - ۱۷

مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته توتون با بیان ژن اصلاح شده *EPSPS* از گیاه نخود

Glyphosate resistance in transgenic Tobacco plants by expression of a modified *EPSPS* gene from chickpea

نیلوفر پیکاری[۱،۲]، علا الدین کردنائیج[۲]، کتایون زمانی*[۱]

۱- استادیار، گروه پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- استادیار، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

Peykari N[1,2], Kordnaeij A[2], Zamani K[*1]

1- Assistant Professor, Department of Genetic Engineering and Biosafety, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Karaj, Iran
2- Assistant Professor, MSc Student, Department of Agricultural Biotechnology, Shahed University, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: katayounzamani@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۶/۰۲)

چکیده

علف‌های هرز از مهم‌ترین محدودیت‌های زیستی در کشاورزی هستند که با رقابت با گیاهان زراعی بر سر نور، مواد غذایی، آب و فضا آثار متعدد زیان‌باری را بر روی رشد و نمو و کیفیت و کمیت عملکرد این گیاهان دارند. گلایفوسیت یکی از مهم‌ترین علف‌کش‌هایی است که به‌طور گسترده در جهان استفاده می‌شود و اثر بازدارنده بر آنزیم EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) دارد که آنزیمی کلیدی در مسیر ساخت اسید آمینه‌های آروماتیک است. هدف اصلی این پژوهش استفاده از یک ژن با منشاء گیاهی برای ایجاد مقاومت به علف‌کش در همان گیاه بود. بنابراین ژن *EPSPS* از گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) همسانه‌سازی و دو اسیدآمینه آن (Pro187Ala و Thr183Ile) که ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت می‌نمایند اصلاح شد. عملکرد ژن مذکور در گیاه مدل توتون (*Nicotiana tabacum* L.) بررسی شد. قابلیت باززایی برگ‌های گیاهان توتون تراریخته که ژن *EPSPS* اصلاح شده از گیاه نخود را بیان می‌کنند در غلظت‌های مختلف علف‌کش گلایفوسیت (از صفر تا یک میلی‌مولار) مورد بررسی قرار گرفت و برگ‌ها در همه غلظت‌ها حتی در غلظت یک میلی‌مولار باززایی شدند. این گیاهان همچنین در گلخانه با غلظت یک درصد گلایفوسیت اسپری شدند و زنده ماندند. در آخر ژن *EPSPS* اصلاح شده نخود انتخاب مناسبی برای ایجاد گیاهان زراعی تراریخته مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت در آینده خواهد بود.

واژه‌های کلیدی

گلایفوسیت
علف‌کش
EPSPS
TIPA
TIPS

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

مقدمه

علف‌کش‌ها با حذف ساده علف‌های هرز به یکی از ملزومات کشاورزی مدرن و تولید غذا در جهان تبدیل شده‌اند. بیش از ۸۰ درصد زمین‌های زراعی زیرکشت گیاهان تراریخت در جهان را گیاهان مقاوم به علف‌کش تشکیل می‌دهد که تقریبا همه آن‌ها مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت هستند (Duke 2017).

گلایفوسیت یکی از مهم‌ترین علف‌کش‌هایی است که به‌طور گسترده در جهان استفاده می‌شود و اثر بازدارنده بر آنزیم EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) دارد. EPSPS آنزیمی کلیدی در مسیر شیکیمیک اسید است که این مسیر در نهایت به تولید اسیدآمینه‌های آروماتیک، لیگنین و ترکیباتی می‌رسد که نقش دفاعی دارند (Yang et al. 2017). نکته قابل توجه آن است که مسیر شیکیمیک اسید در پستانداران وجود ندارد و همین امر EPSPS را هدفی جذاب برای توسعه علف‌کش‌ها کرده است. تحقیقات نشان داد که برخی از میکروارگانیسم‌ها همانند نژاد CP4 اگروباکتریوم دارای شکل مقاومی از آنزیم EPSPS هستند که بعدا در ایجاد سویای تراریخته مقاوم به گلایفوسیت مورد استفاده قرار گرفت (Han and Kim 2019).

ویژگی حرکت در فلوئم و عملکرد آهسته گلایفوسیت در کشتن علف‌ها و حرکت علف‌کش در سراسر گیاه، سبب از بین رفتن همه مریستم‌های گیاه می‌شود که این ویژگی کارایی خوبی برای کنترل علف‌های هرز چند ساله دارد (Duke 2017).

با پژوهش‌های متعدد در مورد مکانیسم‌های مقاومت به گلایفوسیت اطلاعات در مورد راه‌های مختلف ایجاد مقاومت به این علف‌کش افزایش یافته است. مکانیسم‌های مقاومت به پنج گروه تقسیم می‌شود: ۱- مقاومت ناشی از جهش نقطه‌ای که حاصل آن تغییر یک اسیدآمینه است که بر روی برهمکنش علف‌کش با جایگاه فعال آنزیم اثر می‌گذارد. ۲- مقاومت ناشی از تغییرات متابولیسمی که با اصلاح شیمیایی ساختار علف‌کش یا تخریب آن همراه است. ۳- ممانعت از حضور علف‌کش در محل هدف، به‌صورت فیزیکی با افزایش موانع کوتیکولی، ساختاری و یا فیزیولوژیکی با ناقلین فعال. ٤- اجتناب، که به توانایی بیوشیمیایی تغییر ماده سمی مربوط می‌شود (Sammons and Gaines 2014) و پنجمین مورد افزایش تعداد نسخه‌های ژن در گیاه است که در مواردی تا ۱۰۰ نسخه هم مشاهده شده است (Ngo et al. 2017).

جهشی که در گیاهان مختلف سبب مقاومت می‌شود معمولاً در اسیدآمینه پرولین شماره ۱۰٦ اتفاق می‌افتد که یک ناحیه کاملاً حفظ شده است. شماره‌گذاری اسیدآمینه‌ها بر اساس پروتئین بالغ بدون توالی راهنما صورت می‌گیرد. این جایگزینی، مقاومت متوسطی را ایجاد می‌نماید. پژوهشگران با ایجاد جهش‌های دیگری در مجاورت پرولین ۱۰٦ و با تبدیل اسیدآمینه تیروزین شماره ۱۰۲ به ایزولوسین توانستند به مقاومت بالاتری دست یابند (Powles et al. 2010). این جهش بعدا در طبیعت در گیاه *Eleusine indica* شناسایی شد و به جهش TIPS مشهور شد (Yu et al. 2015). ژن اصلاح شده *EPSPS* گیاه ذرت با جهش TIPS، به‌طور گسترده در گیاهان تراریخته تجاری شده همچون ذرت (رخداد G21)، پنبه و سویا برای ایجاد مقاومت مورد استفاده قرار گرفته است (Matthews et al. 2017).

هدف اصلی این پژوهش استفاده از ژن درونی یک گیاه برای ایجاد مقاومت به علف‌کش در همان گیاه بود. از آنجا که علف‌های هرز از مشکلات اصلی زراعت گیاه نخود به شمار می‌روند، بنابراین ژن *EPSPS* از گیاه نخود با هدف ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت در این گیاه همسانه‌سازی شد و بر اساس منابع دو اسیدآمینه آن (Pro187Ala و Thr183Ile) به منظور ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت، اصلاح شد. با توجه به سرعت و سهولت تراریختی گیاه توتون نسبت به نخود، عملکرد ژن مذکور در گیاه مدل توتون بررسی شد. قابلیت باززایی برگ‌های گیاهان توتون تراریخته که ژن *EPSPS* اصلاح شده از گیاه نخود را بیان می‌کنند در غلظت‌های مختلف علف‌کش گلایفوسیت مورد بررسی قرار گرفت و از دو رخداد تراریخته منتخب، یک رخداد در غلظت یک میلی‌مولار و دیگری تا غلظت ۰/۵ میلی‌مولار از گلایفوسیت هم باززایی شدند. این گیاهان همچنین در آزمون‌های گلخانه‌ای مقاومت بالایی به این علف‌کش از خود نشان دادند.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

مواد و روش‌ها

بافت برگی گیاهان نخود رقم هاشم برای استخراج RNA کل با استفاده از ترایزول به‌کار رفت. ساخت cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت Thermo Fisher Scientific انجام شد.

به‌منظور تکثیر و جداسازی طول کامل ناحیه رمزکننده ژن *EPSPS* و ایجاد تغییر در آن، دو جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد (جدول ۱). تغییرات مورد نظر در جفت آغازگرهای میانی (EPSF3, EPSR3) در نظرگرفته شد. در توالی جفت آغازگرهای بیرونی (EPNF2, EPNR2) جایگاه مناسب آنزیمی برای همسانه‌سازی نهایی در ناقل بیانی گیاهی pBI121 در نظر گرفته شد. آغازگرها بر اساس توالی ژنومیک DNA حاصل از کلون‌های shotgun (GenBank Acc # NC_021165) طراحی شدند. این توالی توسط نرم‌افزار Seqbuilder از مجموعه DNASTAR Lasergene برای وجود جایگاه برش آنزیم‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. ناحیه رمزکننده به‌صورت دو قطعه مجزا و با استفاده از آنزیم Fusion شرکت Thermo Fisher Scientific تکثیر شد. قطعات مورد نظر توسط کیت High pure PCR product purification شرکت Roche تخلیص و با غلظت یکسان به عنوان الگو در واکنش تکثیر به‌کار رفتند. دو قطعه بزرگ و کوچک ژن با استفاده از آنزیم Expand High Fidelity شرکت Thermo Fisher Scientific و با تکنیک sewing PCR به‌هم متصل شدند. قطعه نهایی در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی و صحت آن با هضم آنزیمی و توالی‌یابی تایید شد. ژن اصلاح شده در پایین دست پروموتر CAMV35S در ناقل بیان گیاهی pBI121 قرار گرفت و با استفاده از روش ذوب و انجماد به *Agrobacterium tumefaciens* سویه AGL1 منتقل شد (Holsters et al. 1978).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر و اصلاح ژن *EPSPS* نخود و ردیابی آن در گیاهان تراریخته

نام آغازگر	توالی آغازگر
EPNF2	5-TCTAGAGAGAGAACAAAGAAACCGAAC-3
EPNR2	5-CGAGCTCTCTCCTACTTAATATACAACAA-3
EPSF3	5-GTATTGCAATGCGTGCTTTGACGGCAG-3
EPSR3	5-AAAGCACGCATTGCAATACCGGCATTTC-3

تراریختی صفحات برگی توتون (رقم *Xanthi*) با *Agrobacterium tumefaciens* و بر اساس روش Hirschi (۱۹۹۹) انجام شد. جوانه‌های تراریخته پس از انتخاب بر روی محیط دارای ۱۰۰mg/l کانامایسین هر دو هفته یکبار در محیط جدید واکشت شدند. گیاهان تراریخته حاصل با روش PCR و با آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن *EPSPS* تایید (جدول ۱) و پس از ریشه‌زایی به خاک منتقل شدند.

به‌منظور بررسی مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته توتون از دو روش استفاده شد. در روش اول غلظت یک درصد از علف‌کش رانداپ ۴۱ درصد تهیه شد و گیاهان گلدانی در مرحله ۲ تا ٤ برگی در دو آزمایش از فاصله ۳۰ تا ٤۰ سانتی‌متری یکبار با مقدار ۲۰ میلی‌لیتر به ازای یک مترمربع و بار دوم با ۲۰۰ میلی‌لیتر در متر مربع با علف‌کش اسپری شدند. از همین گیاهان صفحات برگی بر روی محیط کشت باززایی با غلظت‌های مختلف گلایفوسیت صفر، ۰/۰۱، ۰/۰۲۵، ۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ میلی‌مولار قرار داده شد و باززایی گیاهان پس از ۲۵ روز بررسی شد.

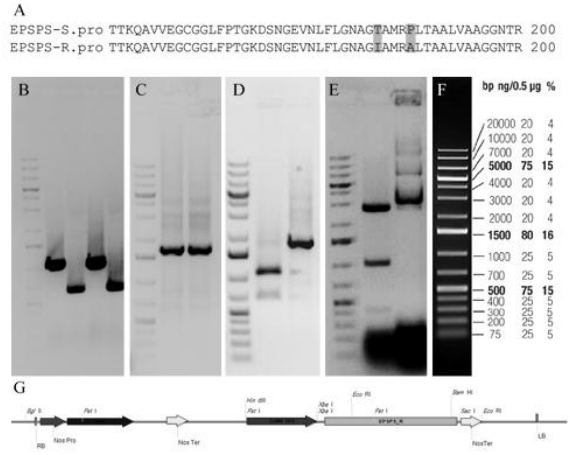
نتایج و بحث

جداسازی ژن *EPSPS* از گیاه نخود و اصلاح آن

جایگزینی اسیدآمینه‌های تیروزین ۱۰۲ با ایزولوسین و پرولین ۱۰٦ با سرین، در ژن *EPSPS* درونی گیاه می‌تواند نسبت به علف‌کش گلایفوسیت مقاومت ایجاد نماید که به جهش TIPS مشهور است (Yu et al. 2015; Sammons and Gaines 2014). پروتئین EPSPS در گیاهان دارای یک توالی راهنما است که آن را به کلروپلاست هدایت می‌کند. طول پپتید راهنما در گونه‌های مختلف گیاهی متغیر بوده و پس از رسیدن به کلروپلاست از پروتئین جدا شده و پروتئین EPSPS نهایی حاصل می‌شود. به‌منظور سادگی مقایسه، در اغلب مقالات موقعیت این دو اسیدآمینه در پروتئین نهایی و بدون توالی راهنمای کلروپلاستی ارائه شده است (Powles et al. 2010). در نخود این دو اسیدآمینه در موقعیت ۱۸۳ و ۱۸۷ قرار دارند (شکل 1A). موقعیت اسیدآمینه‌های ذکر شده در پروتئین EPSPS کاملا حفظ شده است. بنابراین آغازگرهای میانی به

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

گونه‌ای طراحی شدند که ژن مذکور به‌صورت دو قطعه با جهش‌های مورد نظر را ایجاد کنند (شکل 1B). این دو قطعه با استفاده از تکنیک sewing PCR بهم متصل و ژن نهایی حاصل شد (شکل 1C). به‌منظور حصول اطمینان از صحت قطعه تکثیر شده، محصول PCR با توجه به نقشه آنزیمی ژن *EPSPS* با آنزیم *Pst*I هضم و دو باند ۶۷۲ و ۱۰۲۱ جفت‌بازی مشاهده و صحت قطعه تکثیر شده تایید شد (شکل 1D, G). ژن حاصل در ناقل pTZ57R/T همسانه‌سازی شد. کلونی‌های حاصل با روش کلونی–PCR و سپس هضم آنزیمی با آنزیم‌های *Eco*RI و *Pst*I (*Pst*I درون ژن دارای جایگاه برش است) و مشاهده قطعه‌ای با اندازه ۱۵۲۰ جفت‌باز و توالی‌یابی تایید شدند (شکل 1E). ژن تایید شده در ناقل pBI121 با استفاده از آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I جایگزین ژن *GUS* شد (شکل 1G).



شکل ۱- همسانه‌سازی و ایجاد جهش در ژن درونی *EPSPS* گیاه نخود A: بخشی از توالی آمینواسیدی پروتئین EPSPS حساس S و مقاوم R به گلایفوسیت در گیاه نخود، B: تکثیر قطعات کوچک و بزرگ ژن C: *CaEPSPS*. اتصال دو قطعه با روش Sewing PCR و ایجاد ژن کامل، D: هضم آنزیمی محصول PCR با آنزیم *Pst*I به‌منظور تایید صحت قطعه تکثیر شده، E: تایید حضور قطعه در ناقل T/A با آنزیم‌های *Eco*RI و F.*Pst*I: مارکر وزنی مورد استفاده در ژل‌های B تا E. G: نقشه منطقه T-DNA در سازه pBI121/EPSPS

پژوهش‌ها نشان داده است، جهش‌هایی که در ژن EPSPS در باکتری Escherichia coli نسبت به علف‌کش گلایفوسیت ایجاد مقاومت می‌نمایند در ناحیه حفظ شده (95LFLGNAGTAMRPL107) اتفاق می‌افتند که این ناحیه به‌طور مستقیم با گلایفوسیت برهمکنش نشان می‌دهد. جایگزینی اسیدآمینه پرولین شماره ۱۰۶ با سرین، آلانین ترئونین و یا لوسین مقاومت به گلایفوسیت را به میزان ۲ تا ۳ برابر افزایش می‌دهد که درعلف‌های تک لپه‌ای و دولپه‌ای هم مشاهده شده است (García et al. 2019).

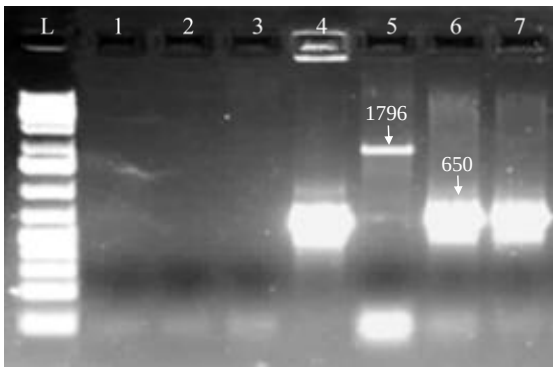
جهش‌های دوگانه دیگری همانند TIPA، TIPT، TLPA نیز کینتیک مناسبی را در مقایسه با TIPS و حتی بهتر از آن نشان داده‌اند (Yu et al. 2015). تحقیقات نشان داد که تغییر پرولین به سرین با کاهش رشد گیاه در غیاب علف‌کش در گیاهان هموزیگوت برنج وحشی همراه بوده است (Yu et al. 2015) ولیکن با جایگزینی پرولین با آلانین در گیاهان کاساوا و کتان چنین موردی مشاهده نشد و گیاهان سازگاری و عملکرد بهتری را در مقایسه با جهش TIPS نشان دادند (Hummel et al. 2018; Sauer et al. 2016)، بنابراین آغازگرها به گونه‌ای طراحی شدند که پرولین به آلانین تبدیل شود (شکل 1A). پرولین ۱۰۶ در برهمکنش‌های مولکولی با گلایفوسیت یا PEP دخالت مستقیم ندارد، اما تغییر پرولین ۱۰۶ به اسیدآمینه‌های دیگر موجب تغییر ساختار جایگاه فعال آنزیم و میل ترکیبی آن نسبت به مهارکننده می‌شود. از سوی دیگر جهش Thr102Ile می‌تواند جهش Pro106Ser را بهبود بخشد و در نهایت باعث ایجاد مقاومت چند برابری نسبت به گلایفوسیت شود (Sammons and Gaines 2014). جایگزینی پرولین ۱۰۶ با ترئونین (Takano et al. 2020) و ترئونین ۱۰۲ با سرین نیز در طبیعت مشاهده شده است (Li et al. 2018). مقایسه ساختار ژن وحشی با ژن جهش‌یافته (Thr102Ser) در ترکیب با گلایفوسیت و فسفوانول پیروات نشان داده است که جایگزینی Thr102Ser میل ترکیبی EPSPS به گلایفوسیت را کاهش داده ولی میل ترکیبی آن به سوبسترای طبیعی EPSPS یعنی فسفو انول پیروات (PEP) را به میزان زیادی افزایش می‌دهد. اخیراً جهش‌های سه‌گانه (Thr102Ile, Ala103Val, Pro106Ser) نیز در طبیعت مشاهده شده است که علاوه بر دو اسیدآمینه ۱۰۲ و ۱۰۶ که ذکر شد، اسیدآمینه آلانین شماره ۱۰۳ به والین تغییر یافته است (García et al. 2019; Li et al. 2018).

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

بررسی عملکرد ژن *EPSPS* اصلاح شده نخود در ایجاد مقاومت به گلایفوسیت در گیاهان تراریخته توتون

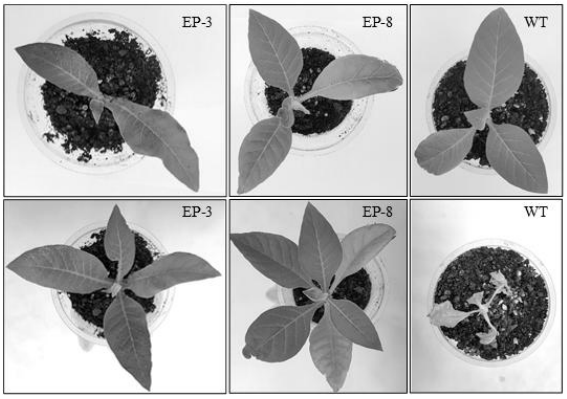
به‌منظور بررسی قابلیت ژن *EPSPS* اصلاح شده نخود در ایجاد مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت، گیاهان توتون تراریخته بیان کننده این ژن ایجاد شدند. گیاهان مقاوم به کانامایسین پس از گذشت حدود ٤ ماه از تراریختی و ریشه‌دار شدن به خاک منتقل و سپس با آزمون PCR و آغازگرهای اختصاصی *EPSPS* تایید شدند (شکل ۲).



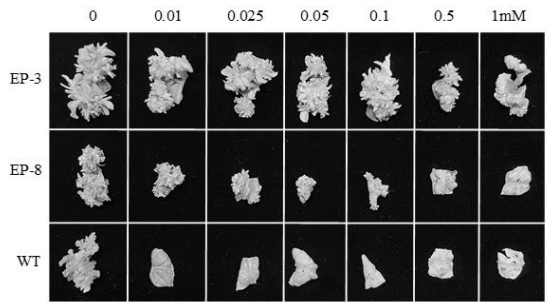
شکل ۲- تایید حضور ژن *EPSPS* در گیاهان تراریخته توتون با آزمون PCR، L: مارکر وزنی 1kb Plus DNA Ladder، ۳-۱: نمونه‌های شاهد منفی آب، بافر و آب، ٤: نمونه شاهد مثبت پلاسمید pBI121/*EPSPS*، ٥: نمونه شاهد مثبت DNA ژنومی نخود (دارای اینترون)، ٦: گیاه تراریخته توتون EP-3، ۷: گیاه تراریخته توتون EP-8.

این گیاهان پس از رسیدن به مرحله ۳ برگی در گلدان با علف‌کش گلایفوسیت با غلظت یک درصد شسته شدند (Imran et al. 2017). در مقالات میزان گلایفوسیت مصرفی در مزرعه یا گلخانه ٦-۲ لیتر در هکتار است که معادل آن یعنی ٦۰۰-۲۰۰ میکرولیتر در یک مترمربع استفاده شده است (Zhou et al. 2006; Cao et al. 2012). گیاهان پس از ۷ روز از قسمت مریستم و رگبرگ‌ها شروع به زرد شدن کردند. رخدادهای مختلف درجات متفاوتی از تحمل به گلایفوسیت، از حساس تا بسیار متحمل را نشان دادند. پس از گذشت یک ماه فقط نمونه‌های متحمل باقی ماندند، گیاهان شاهد به طور کامل از بین رفتند (شکل۳). نمونه‌های متحمل که در مرحله اول سبز باقی ماندند با حجم ده برابر بیشتر از آزمایش اول یعنی ۲۰۰ میلی‌لیتر گلایفوسیت دوباره اسپری شدند و این بار آثار زردی در آن‌ها مشاهده شد لیکن پس از ١٤ روز دوباره شروع به سبز شدن و ترمیم خود کردند (داده‌ها نشان داده نشده است).

از بین گیاهان اسپری شده با علف‌کش، دو رخداد یکی با تحمل بالا و دیگری با تحمل متوسط برای آزمایش بعدی انتخاب شدند. در این آزمایش صفحات برگی از این گیاهان تهیه شد و میزان باززایی آن‌ها در غلظت‌های مختلف گلایفوسیت پس از گذشت ۲۵ روز بررسی شد. رخدادی که تحمل بالایی داشت در غلظت یک میلی‌مولار از گلایفوسیت نیز باززایی داشت. رخداد با تحمل کمتر تا غلظت ۰/۵ میلی‌مولار را هم تحمل کرد و آثار تورم بافت و ایجاد جوانه در آن قابل مشاهده بود ولیکن نمونه‌های شاهد در غلظت ۰/۰۱ میلی‌مولار از گلایفوسیت هم باززایی نداشتند (شکل ٤). این نتایج قابلیت ژن اصلاح شده نخود را برای ایجاد تحمل مناسب به علف‌کش گلایفوسیت به خوبی نشان می‌دهد.



شکل ۳- بررسی تحمل رخدادهای تراریخته به علف‌کش گلایفوسیت، ردیف بالا: گیاهان قبل از اسپری شدن با علف‌کش، ردیف پایین: گیاهان یک ماه بعد از اسپری شدن با علف‌کش.



شکل ٤- بررسی میزان تحمل به گلایفوسیت در گیاهان توتون تراریخته بیان کننده ژن اصلاح شده *EPSPS* از گیاه نخود. EP-3 و EP-8 برگ‌های دو رخداد مختلف هستند که *EPSPS* دارای جهش TIPA را بیان می‌کنند و ردیف آخر برگ‌های گیاه شاهد است.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

در ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به علف‌کش با استفاده از ژن‌های با منشاء گیاهی علاوه بر نوع اسیدآمینه‌های اصلاح شده در ژن، میزان بیان ژن درگیاه برای ایجاد مقاومت مناسب به علف‌کش در شرایط مزرعه بسیار ضروری است. در رخداد تجاری شده ذرت G21، ژن *EPSPS* با اصلاح TIPS تحت کنترل یک پروموتر دائمی قوی به‌همراه اینترون آن مربوط به ژن اکتین از برنج بیان می‌شود. این رخداد که دارای سه تا پنج نسخه فعال از ژن است، بیان بالایی را سبب شده‌اند که لازمه ایجاد مقاومت و تحمل مناسب نسبت به علف‌کش در سطح مزرعه است (Hummel et al. 2018). تلاش‌های متعددی برای اصلاح ژن درونی *EPSPS* و ایجاد جهش‌های TIPS و TIPA در گیاهان زراعی مانند برنج، کتان و کاساوا و تولید گیاهان مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 انجام شده است (Li et al. 2016; Sauer et al. 2016; Hummel et al. 2018). این گیاهان هنوز در مراحل آزمایشی هستند. در پژوهشی دیگر ژن *EPSPS* گیاه فلفل همسانه‌سازی و جهش TIPS در آن ایجاد و تحت کنترل پروموتر CAMV35S به گیاه توتون منتقل شده است. این گیاهان مقاومت خوبی به علف‌کش گلایفوسیت نشان داده‌اند (Ortega et al. 2018). با توجه به اهمیت میزان بیان ژن در سازگاری و مقاومت گیاه در مزرعه به‌نظر می‌رسد که اصلاح ژن به تنهایی کافی نبوده و استفاده از یک پروموتر درونی، دائمی و قوی برای تولید گیاهان با مقاومت کافی برای کشت در مزرعه ضروری است.

سپاسگزاری

نویسندگان در اجرای این پژوهش از حمایت‌های پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

Cao G, Liu Y, Zhang S, Yang X, Chen R, Zhang Y, Lu W, Liu Y, Wang J, Lin M, Wang G (2012) A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase shows high glyphosate tolerance in *Escherichia coli* and tobacco plants. PLoS One. 7: e38718.

Duke SO (2017) The history and current status of glyphosate. Pest Management Science.

García MJ, Palma-Bautista C, Rojano-Delgado AM, Bracamonte E, Portugal J, Alcántara-de la Cruz R, De Prado R (2019) The triple amino acid substitution TAP-IVS in the EPSPS gene confers high glyphosate resistance to the superweed *Amaranthus hybridus*. International Journal of Molecular Sciences. 10: 2396.

Han H, Vila-Aiub MM, Jalaludin A, Yu Q, Powles SB (2017) A double EPSPS gene mutation endowing glyphosate resistance shows a remarkably high resistance cost. Plant, Cell and Environment. 40: 3031-42.

Han YJ, Kim JI (2019) Application of CRISPR/Cas9-mediated gene editing for the development of herbicide-resistant plants. Plant Biotechnology Reports. 1: 1-1.

Herouet-Guicheney C, Rouquié D, Freyssinet M, Currier T, Martone A, Zhou J, Bates EE, Ferullo JM, Hendrickx K, Rouan D (2009) Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 54: 143-53.

Hirschi KD (1999) Expression of Arabidopsis CAX1 in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. Plant Cell. 11: 2113-22.

Holsters M, De Waele D, Depicker A, Messens E, Van Montagu M, Schell J (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. Molecular and General Genetics MGG. 163: 181-7.

Hummel AW, Chauhan RD, Cermak T, Mutka AM, Vijayaraghavan A, Boyher A, Starker CG, Bart R, Voytas DF, Taylor NJ (2018) Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. Plant Biotechnology Journal. 16: 1275-82.

Imran M, Asad S, Barboza, AL, Galeano E, Carrer H, Mukhtar Z (2017) Genetically transformed tobacco plants expressing synthetic EPSPS gene confer tolerance against glyphosate herbicide. Physiology and Molecular Biology of Plants. 23: 453-460.

Li J, Meng X, Zong Y, Chen K, Zhang H, Liu J, Li J, Gao C (2016) Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. Nature Plants. 2: 1-6.

Li J, Peng Q, Han H, Nyporko A, Kulynych T, Yu Q, Powles S (2018) Glyphosate resistance in *Tridax procumbens* via a novel EPSPS Thr-102-Ser substitution. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66: 7880-8.

Matthews BA, Launis KL, Bauman PA, Juba NC (2017) Double-mutated 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase protein expressed in MZHG0JG Corn (*Zea mays* L.) has no impact on toxicological safety and nutritional

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]

composition. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65: 8459-65.
Ngo TD, Malone JM, Boutsalis P, Gill G, Preston C (2017) EPSPS gene amplification conferring resistance to glyphosate in windmill grass (*Chloris truncata*) in Australia. Pest Management Science.
Ortega JL, Rajapakse W, Bagga S, Apodaca K, Lucero Y, Sengupta-Gopalan C (2018) An intragenic approach to confer glyphosate resistance in chile (*Capsicum annuum*) by introducing an in vitro mutagenized chile EPSPS gene encoding for a glyphosate resistant EPSPS protein. PLoS ONE. 13.
Pallett K (2018) Engineered crop tolerance to glyphosate and its impact on the use of the herbicide. Outlooks on Pest Management. 29: 277-81.
Powles SB, Yu Q (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. Annual Review of Plant Biology. 61: 317-47.
Sammons RD, Gaines TA (2014) Glyphosate resistance: state of knowledge. Pest Management Science. 70: 1367-1377
Sauer NJ, Narváez-Vásquez J, Mozoruk J, Miller RB, Warburg ZJ, Woodward MJ, Mihiret YA, Lincoln TA, Segami RE, Sanders SL, Walker KA (2016) Oligonucleotide-mediated genome editing provides precision and function to engineered nucleases and antibiotics in plants. Plant Physiology. 170: 1917-28.
Takano HK, Fernandes VN, Adegas FS, Oliveira Jr RS, Westra P, Gaines TA, Dayan FE (2020) A novel TIPT double mutation in EPSPS conferring glyphosate resistance in tetraploid *Bidens subalternans*. Pest Management Science 76: 95-102.
Yang X, Beres ZT, Jin L, Parrish JT, Zhao W, Mackey D, Snow AA (2017) Effects of over-expressing a native 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) on glyphosate resistance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE 12: e0175820.
Yu Q, Jalaludin A, Han H, Chen M, Sammons RD, Powles SB (2015) Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in Eleusine indica conferring high-level glyphosate resistance. Plant Physioloy. 167: 1440-7.
Zhou M, Xu H, Wei X, Ye Z, Wei L, Gong W, Wang Y, Zhu Z (2006) Identification of a glyphosate-resistant mutant of rice 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase using a directed evolution strategy. Plant Physiology 140: 184-195.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1400.16.1.1.9]