**Crop Biotech.**
Autumn (2019) 9(1): 69-77. DOI: 10.30473/cb.2019.46927.1776

**مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی**
سال نهم، شماره یکم، پیاپی بیست و هفتم، پاییز 1398 (77-69)

# طراحی و ساخت سازه دو ژنی حاوی ژن *EPSPS* و *11 kDa delta zein* به‌منظور تراریختی سویا با هدف بهبود محتوی متیونین و تحمل به علف‌کش گلایفوسیت

**الهام صبوری‌رباط[1]، محمود سلوکی[1*]، علی‌اکبر حبشی[2]، مطهره محسن‌پور[2]، عباسعلی امام‌جمعه[1]**
1. گروه اصلاح و بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران
2. پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: 1398/3/27 - تاریخ پذیرش: 1398/9/24)

# Design and construction of two-genes construct consists of *11 kDa delta zein* and *EPSPS* genes in order to transform soybean to improve the methionine content and induce resistance to glyphosate herbicide

**Elham Saboori-Robat[1], Mahmood Solouki[1]*, Ali Akbar Habashi[2], Motahhareh Moshenpour[2], Abbasali Emamjomeh[1]**
1. Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, Iran.
2. Department of Gene Transformation, Agriculture Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Karaj, Iran.
(Received: Jun. 18, 2019 - Accepted: Dec. 15, 2019)

**چکیده**

سویا یک منبع ممتاز پروتئین در تغذیه انسان و سایر حیوانات به شمار می رود و به منظور تولید و بهره برداری اقتصادی از روغن و پروتئین آن کشت می‌شود. این گیاه همانند سایر اعضای خانواده لگومینه، حاوی مقادیر کم اسیدهای آمینه گوگرددار (متیونین و سیستئین) است. استفاده از یک نشانگر انتخابی مناسب، در باززایی گیاهان حاصل از انتقال ژن و همچنین افزایش نرخ انتقال ژن مؤثر خواهد بود. گلایفوسیت به‌عنوان یک علف‌کش غیرانتخابی برای کنترل دامنه وسیعی از علف‌های هرز در دنیا استفاده می‌شود. این پژوهش با هدف ساخت سازه دوژنی به منظور انتقال همزمان ژن‌های *EPSPS* و *11 kDa delta zein* به سویا با استفاده از روش اگروباکتریوم به منظور تحمل به علف‌کش گلایفوسیت و بهبود محتوای اسیدآمینه متیونین انجام شده است. پس از انجام مراحل کشت بافت، انتقال ژن و باززایی، گیاهان حاصل از انتقال ژن در نسل اول غلظت 3/5 میلی مولار علف‌کش گلایفوسیت را تحمل کردند. علاوه بر آن سنجش میزان شیکمیک اسید و کلروفیل در گیاهان حاصل نشان داد که این دو شاخص بعد از تیمار گلایفوسیت به‌طور معنی‌داری در لاین‌های حاصل از انتقال ژن در مقایسه با شاهد تغییر می‌کند. آنالیزهای تکمیلی در حال انجام است.

**واژه‌های کلیدی:** شیکمیک اسید، گلایفوسیت، متیونین، *EPSPS*، *11 kDa delta zein*.

**Abstract**

Soybean is considered as one of the best source of protein for the nutrition of humans and mammals, and also is cultivated as an economic source of both vegetable oil and protein. Soybean like other *Leguminosae*, contains low levels of S-amino acids (methionine and cysteine). Using an appropriate selectable marker can be effective in the regeneration of transgenic plants and increasing gene transfer rate. Glyphosate is a widely used non-selective herbicide with broad spectrum of weed control around the world. The aim of this study is constructing of two-genes construct consists of *11 kDa delta zein* and *EPSPS* genes to improve the methionine content and induce resistance to glyphosate herbicide using *Agrobacterium*-mediated method in soybean. After experimental processes tissue culture, gene transformation and regeneration, plants produced by gene transformation showed glyphosate resistance at 3.5 mM concentration of glyphosate herbicide. Chlorophyll and shikimic acid content analysis also revealed that these two indexes in lines produce by gene transformation compared to wild type were significantly altered after glyphosate application. Complementary analyses are under progress.

**Keywords:** *11 kDa delta zein*, *EPSPS*, Glyphosate, methionine, shikimic acid.

* نویسنده مسئول: محمود سلوکی
E-mail: Mahmood.solouki@gmail.com

## مقدمه

سویا (*Glycine max*) یک لگوم اقتصادی مهم از لحاظ روغن و پروتئین برای تغذیه انسان و حیوانات محسوب می‌شود که محتوای دانه آن شامل 31 درصد روغن و 67 درصد پروتئین است (www.unitedsoybean.org). این گیاه همانند سایر گیاهان خانواده لگوم حاوی مقادیر کم اسیدهای‌آمینه گوگرددار (متیونین و سیستئین) است (Millward *et al.*, 2008; Schaafsma, 2005). پستانداران بر خلاف گیاهان قادر به ساخت متیونین نیستند بنابراین آن‌را از طریق رژیم غذایی به‌دست می‌آورند. این دو اسیدآمینه منبع ممتاز پروتئین برای انسان و برخی حیوانات به شمار رفته و ارزش غذایی سویا با افزایش این دو اسیدآمینه بالا میرود. غلظت متیونین در سویا 1/3 گرم در هر 100 گرم پروتئین است در صورتی‌که مقدار این اسیدآمینه 3/5 گرم در هر 100 گرم پروتئین لازم می‌باشد (Consultation, 2011). برای رسیدن به رشد و تغذیه مطلوب انسان و حیوان نیاز به مکمل‌های غذایی با اسیدهای آمینه سنتتیک مانند متیونین می‌باشد. بنابراین افزایش سطح متیونین در غذاهایی مانند سویا که کمبود این اسیدآمینه را دارند راهی برای جبران هزینه های سنگین حاصل از اسیدهای‌آمینه سنتتیک می‌باشد.

با توجه به اهمیت اسیدهای‌آمینه گوگرددار تلاش‌های قابل‌توجهی به‌منظور افزایش سطح آنها در سویا صورت گرفته است که از آن جمله می‌توان از جمله معرفی ژن‌های حاوی اسیدهای آمینه سولوفور دار و افزایش بیان آنها در بذر و همچنین تنظیم بیان ژن‌های مسیر متیونین به منظور افزایش فرم محلول آن اشاره نمود. مطالعات تا کنون نشان داده است که معرفی و بیان ژن‌های *2S albumin* از آجیل برزیلی (Brazil nut)، *11 kDa zein (δ-zein)* و *15 kDa zein (β-zein)* همرا با پیش‌برهای مختص بذر به سویا در افزایش محتوای متیونین دانه موفق بوده‌اند (Kirihara *et al.*, 1988a; Kirihara *et al.*, 1988b; Kortt *et al.*, 1991; Bagga *et al.*,1997; Kim and Krishnan, 2019).

علف‌های هرز در بسیاری از موارد به‌طور عمده باعث کاهش تولید محصول ناشی از رقابت برای نور، آب، مواد مغذی خاک و فضا می‌شوند. به‌طورکلی، علف‌های هرز باعث کاهش حدود 15 درصد عملکرد دانه سویا می‌شوند (Gunsolus, 1990). بنابراین کنترل علف‌های هرز برای اطمینان از عملکرد بالای محصول با روش‌های مختلف از جمله مکانیکی، زیستی و شیمیایی رایج است. روش‌های شیمیایی از لحاظ اقتصادی، کارآمدبودن و سهولت کار به‌عنوان یک راهکار مهم در مدیریت علف‌های هرز در مزرعه به شمار می‌رود (Zhi-fang, 2011). با توجه به هزینه‌های مربوط به علف‌های هرز، حدود 30 و 13 درصد از فروش جهانی مواد شیمیایی زراعی به‌ترتیب مربوط به علف‌کش‌های انتخابی و غیر انتخابی می‌باشد (Edwards and Hannah, 2014). قابلیت استفاده از گلایفوسیت در محصولات مقاوم به این علف‌کش باعث کنترل آسان علف‌های هرز، کارآیی و مقرون به صرفه بودن می‌شود.

استفاده از یک نشانگر انتخابی مناسب در باززایی گیاهان حاصل از انتقال ژن و همچنین افزایش نرخ انتقال ژن مؤثر خواهد بود. گلایفوسیت به‌عنوان یک علف‌کش غیرانتخابی برای کنترل دامنه وسیعی از علف‌های هرز در دنیا استفاده می‌شود. مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت، به‌وسیله ژن باکتریایی *EPSPS* (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase) ایجاد می‌شود. ژن CP4 *EPSPS* از Agrobacterium SP. Strain CP4 جدا شده است (Alibhai and Stallings, 2001; Garcia-Alonso *et al.*, 2014). آنزیم CP4 *EPSPS* در حضور علف‌کش گلایفوسیت تولید اسیدهای‌آمینه ضروری و دیگر متابولیت‌هایی را که برای رشدونمو گیاه ضروری هستند ادامه می‌دهد (Comai *et al.*,

1983).

در این مطالعه ژن *11 kDa delta zein* تحت کنترل پیش‌بر مختص بذر β-conglycinin به منظور افزایش متیونین در دانه سویا به همراه ژن *EPSPS* CP4 به منظور تحمل به علف‌کش گلایفوسیت به سویا منتقل شد.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و باکتری مورد استفاده

در این تحقیق از سویای زراعی، رقم "ساری" دریافت شده از مؤسسه دانه‌های روغنی در مراحل کشت بافت و انتقال ژن استفاده شد. باکتری مورد استفاده برای انتقال ژن *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 بود.

### ساخت سازه بیانی دوگانه اگروباکتریومی

به‌منظور ساخت سازه بیانی دوژنی حامل ژن‌های *11 kDa delta zein* و *EPSPS*، از پلاسمید pBI121-CZ حاوی ژن *11 kDa delta zein* به‌همراه پیش‌بر مختص بذر β-کانگلایسینین استفاده شد (Saboori Robat *et al*., 2016). برای ساخت سازه دوژنی *EPSPS* و *11 kDa delta zein* کاست ژنی CZ (حاوی ژن *11 kDa delta zein* که از گیاه ذرت رقم KE72012 جداسازی‌شده به‌همراه پیش‌بر مختص بذر β- کانگلایسینین) به‌همراه پایانبر نوپالین سینتاز (NOS) از سازه بیانی pBI121 با آنزیم‌های برشی *Hind*III و *Eco*RI جداسازی و به سازه بیانی pUEs (Chamani *et al*., 2017) منتقل شد که دارای ژن مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت (*EPSPS*) است. ژن *EPSPS* در این پلاسمید دارای پیش‌بر *tsf1* منشا شده از آرابیدوپسیس تالیانا و پایان‌بر E9 است، همچنین ژن *EPSPS* موجود در این سازه به پپتید نشانه کلروپلاستی از منشأ آرابیدوپسیس تالیانا (CTP2) متصل شده است (شکل 1). پلاسمید نوترکیب حاصل موسوم به (pUEs-CZ) به اگروباکتریوم سویه GV3101 منتقل شد. کلیه مراحل بر اساس دستورالعمل‌های (Sambrook *et al*., 1989) انجام شد.

### کشت بافت و انتقال ژن به گیاه

بذرهای/ دانه‌های سویای زراعی رقم ساری با الکل 70 درصد به‌مدت 30 ثانیه شست‌وشو داده شد. سپس با محلول هیپوکلریت سدیم 50 درصد به‌مدت 30 دقیقه ضد عفونی و بعد از سه بار شست‌وشو با آب استریل برای جوانه زدن به محیط جوانه زنی B5 به همراه ساکارز 3 درصد و آگار 7 درصد با pH، 5/8 منتقل شد. بذرهای کشت شده در شرایط تاریکی به اتاقک کشت در دمای (2±24 درجه سانتی‌گراد) منتقل شد. بعد از هفت روز، جداسازی ریز نمونه گره لپه به روش بذر نیمه انجام شد (Jia *et al*., 2015). به منظور تلقیح ریزنمونه‌ها ابتدا یک کلونی از باکتری تازه کشت‌شده آگروباکتریوم به 20 میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین 50 میلی‌گرم در لیترو ریفامپی‌سین 75 میلی‌گرم در لیتر در ارلن 100 میلی‌لیتر منتقل شد. کشت در شیکر انکوباتور با دور 185 rpm در دمای 28 درجه سانتی‌گراد به‌مدت 16 ساعت قرار داده شد و بعد از رسیدن OD باکتری به حدود 0/8، سوسپانسیون با دور 3500 rpm به‌مدت 5 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس محلول رویی در 20 میلی‌لیتر محیط القای ژن‌های بیماری‌زای اگروباکتریوم رقیق شد و به‌مدت 5 ساعت در شیکر انکوباتور با سرعت 185 rpm و دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بعد از رسیدن OD باکتری به حدود 0/8 تمامی ریزنمونه‌های گره‌لپه‌ای در محیط تلقیح به‌مدت 30 دقیقه غوطه‌ور شد. ریزنمونه‌های تلقیح‌شده بعد از خشک‌شدن

به‌وسیله کاغذ صافی استریل، به‌مدت 3 روز در محیط هم‌کشتی در تاریکی قرار داده شدند. بعد از هم‌کشتی با باکتری، ریزنمونه‌ها به محیط شاخه‌زایی (جدول 1) دارای 200 میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم جهت ازبین‌بردن باکتری در شرایط 16 ساعت روشنایی و 8 ساعت تاریکی و دمای 2±25 درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از یک هفته محیط باززایی، استفاده از گلایفوسیت با مقدار 2/5 میلی‌مولار بر لیتر در محیط کشت انتخابی شروع شد. ریزنمونه ها هر دو هفته یکبار در محیط باززایی واکشت شدند. بعد از 25 روز نمونه‌ها در محیط طویل‌شدن شاخساره (جدول 1) به‌مدت 20 روز قرارگرفت. واکشت هر دو هفته یکبار صورت گرفت. بعد از این‌که نمونه‌ها به طول 3 تا 4 سانتی‌متر رسیدند گیاهچه‌های حاصل برای ریشه‌زایی به محیط ریشه‌زایی (جدول 1) به‌مدت 2 هفته منتقل شدند.

**زیست‌سنجی مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت**

گیاهان حاصل از انتقال ژن به گلخانه منتقل شده و تعداد قابل‌توجهی بذر تولید کردند. بذرهای این گیاهان پس از چند روز قرار دادن در یخچال جهت شکستن خواب احتمالی، ضدعفونی شده و ابتدا در محیط این‌ویترو جوانه زدند و پس از رشد اولیه به گلدان‌های کوچک در شرایط فیتوترون و سپس به گلدان‌های بزرگ در شرایط گلخانه منتقل شدند. در ابتدا آزمایشی به‌منظور تعیین آستانه مقاومت به علف‌کش بر روی گیاهان شاهد در گلخانه انجام شد. گیاه شاهد پس از رشد کافی به‌مدت 3 هفته با غلظت‌های مختلف 1/5، 2/5، 3/5، 5/5 و 7/5 میلی‌مولار از علف‌کش گلایفوسیت با ماده مؤثره 410 گرم در کیلوگرم ساخت شرکت زرین سم اسپری شدند. پس از تعیین آستانه مقاومت، گیاهان حاصل از انتقال ژن نسل اول شرایط یکسان در گلخانه با علف‌کش گلایفوسیت با غلظت 3/5 میلی‌مولار اسپری شدند.

**اندازه گیری محتوای کلروفیل**

اندازه‌گیری کلروفیل گیاهان حاصل از انتقال ژن بعد از اسپری علف‌کش گلایفوسیت با استفاده از روشArnon (1949) انجام شد. گیاهان ترایخت لاین 1، 2 و گیاه شاهد با علف‌کش گلایفوسیت با غلظت 3/5 میلی‌مولار اسپری شدند. محتوای کلروفیل با استفاده از دستگاه Cary 300 Scan Uvi Vis در زمان‌های 0، 6، 12، 24، 48، 72 و 120 ساعت بعد از تیمار با علف‌کش اندازه‌گیری شد.

جدول 1. محیط کشت‌های استفاده شده برای باززایی و انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم به سویا

Table 1. Mediums used for *Aablegrobacterium*-mediated transformation and regeneration of soybean

| نوع محیط کشت | توضیحات |
|---|---|
| محیط تلقیح | محیط B5 (1/2)، ساکارز 3٪، 3/9 گرم در لیتر MES، 400 میلی‌گرم در لیتر سیستئین، 40 میلی‌گرم در لیتر استوسرینگون، pH= 5/4 |
| محیط هم‌کشتی | محیط B5 به‌همراه ویتامین، ساکارز 3٪، 3/9 گرم در لیتر MES، 0/25 میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک (GA3)، 1/67 میلی‌گرم در لیتر BAP، 400 میلی‌گرم در لیتر سیستئین، 40 میلی‌گرم در لیتر استوسرینگون، 7 گرم در لیتر آگار، pH= 5/4 |
| محیط القای شاخه‌زایی | محیط B5 به‌همراه ویتامین، ساکارز 3٪، 0/25 میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک، 1 میلی‌گرم در لیتر BAP، 250 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، 2/5 میلی‌مولار گلایفوسیت 2/5 میلی‌مولار بر لیتر، 7 گرم در لیتر آگار، pH= 5/8 |
| محیط طویل‌شدن شاخساره | محیط B5 به‌همرا ویتامین، ساکارز 3٪، 0/7 میلی‌گرم در لیتر اسیدجیبرلیک، 1 میلی‌گرم در لیتر زآتین ریبوزاید، 100 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، 2/5 میلی‌مولار گلایفوسیت، 7 گرم در لیتر آگار، pH= 5/8 |
| محیط ریشه‌زایی | محیط MS (1/2)، ساکارز 3٪، 1 میلی‌گرم در لیتر IBA، 100 میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم، 7 گرم در لیتر آگار، pH= 5/8 |

**استخراج و سنجش محتوای شیکمیک اسید**

برای استخراج شیکیمیک اسید از روش Zelaya *et al.* (2011) استفاده شد. محتوای شیکمیک اسید گیاهان تراریخته احتمالی لاین 1، 2 و گیاه شاهد در زمان‌های 0، 6، 12، 48 و 72 ساعت بعد از تیمار با اسپری علف‌کش اندازه‌گیری شد. 200 میلی‌گرم برگ گیاه سویا در هاون چینی با نیتروژن مایع پودر و سپس 2 میلی‌لیتر از HCL (0/25 نرمال) به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت 30 دقیقه در دمای اتاق سونیکیت شدند و بعد از آن نمونه‌ها با دور 15000 به‌مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند. فاز رویی جمع‌آوری و در دمای 20- تا زمان سنجش شیکمیک اسید نگهداری شد. برای سنجش محتوای شیکمیک اسید از HPLC مدل Agilent, 1260 infinity II با ستون C18 250 میلی‌متری و فازهای متحرک (حلال‌های آبی) با شدت جریان 1 میلی‌متر بر دقیقه استفاده شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SAS انجام شد و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون LSD[1] و معنی‌داری در سطح یک درصد انجام شد.

## نتایج و بحث

**ساخت سازه و انتقال ژن**

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و هضم آنزیمی حضور دو کاست ژنی *EPSPS* و *11 kDa delta zein* را تأیید کرد. سازه حاصل موسوم به pUEs-CZ (شکل 1) برای انتقال ژن به گیاه سویا استفاده شد (شکل 2). گیاه شاهد پس از رشد کافی به‌مدت 3 هفته با غلظت‌های 1/5، 2/5، 3/5، 5/5 و 7/5 میلی-مولار از علف‌کش گلایفوسیت اسپری شد که گیاهان تیمار شده در غلظت 3/5 میلی‌مولار و بالاتر از آن علائم سوختگی و زردشدگی برگ را نشان دادند. از این‌رو گیاهان حاصل از انتقال ژن که پس از ریشه‌دار شدن به گلدان منتقل شده بودند تأیید اولیه آنها با تیمار 3/5 میلی‌مولار از علف‌کش گلایفوسیت بر روی برگ‌های جوان انجام شد.

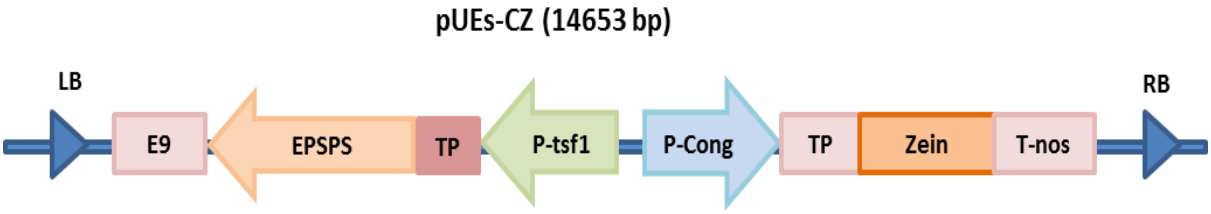
سازه نوترکیب دو ژنی گیاهی ساخته شده در این تحقیق که به سویا منتقل شد دارای مزایای متعددی می‌باشد که از آن‌جمله می‌توان به فقدان ژن نشانگر مقاومت به آنتی‌بیوتیک و استفاده از علف‌کش گلایفوسیت برای انتخاب گیاهان حاصل از انتقال ژن و نیز ژن *delta zein* تحت پیش‌بر مختص بذر اشاره نمود. با توجه به این‌که استفاده از پیش‌برهای دائمی ممکن است هزینه‌های متابولیکی بالا و اثرات نامطلوب پلیوتروپی را برای گیاه به دنبال داشته باشد استفاده از پیش‌بر مختص بذر β- کانگلایسینین در جهت تولید لگوم‌های تراریخته می‌تواند مفید واقع شود. سویا از لحاظ اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین و سیستئین فقیر است و هر ساله هزینه زیادی صرف اسیدهای‌آمینه سنتتیک برای مصرف کنجاله سویا در خوراک دام و طیور می‌شود. ژن *11 kDa delta zein* استفاده شده در این ناقل می‌تواند در جهت افزایش بیان اسیدآمینه متیونین در بذر مفید باشد. ژن CP4 *EPSPS* به‌عنوان نشانگر انتخابی در محیط کشت برای نمونه‌های حاصل از انتقال ژن از شاهد استفاده شد و باعث شد گیاهانی باززا شوند که که به‌طور اولیه نسبت به علف‌کش تحمل نشان داده باشند.

**ارزیابی تحمل به علف کش گلایفوسیت در گیاهان حاصل از انتقال ژن**

به‌منظور بررسی تحمل به علف‌کش گلایفوسیت، از هر حاصل از انتقال ژن تعدای بذر در گلخانه رشد یافت. گیاهان جوان برای ارزیابی مقاومت به علف کش گلایفوسیت انتخاب شدند. از نتایج آزمایشات

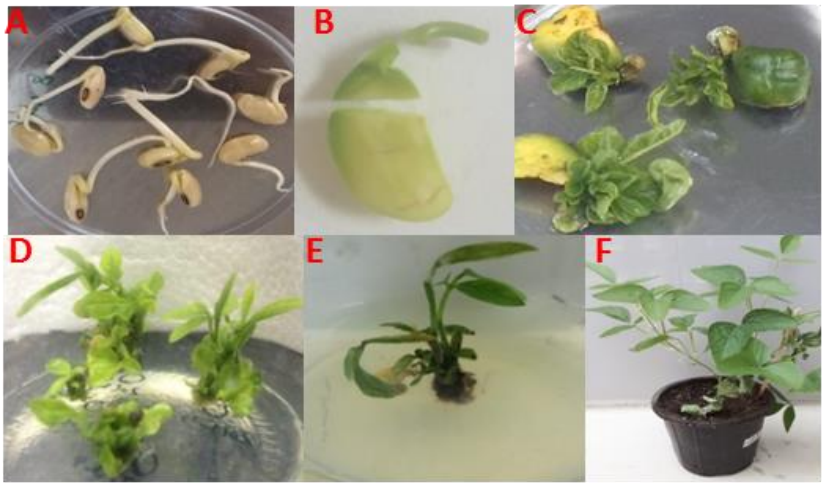
1. Least significant difference (LSD)

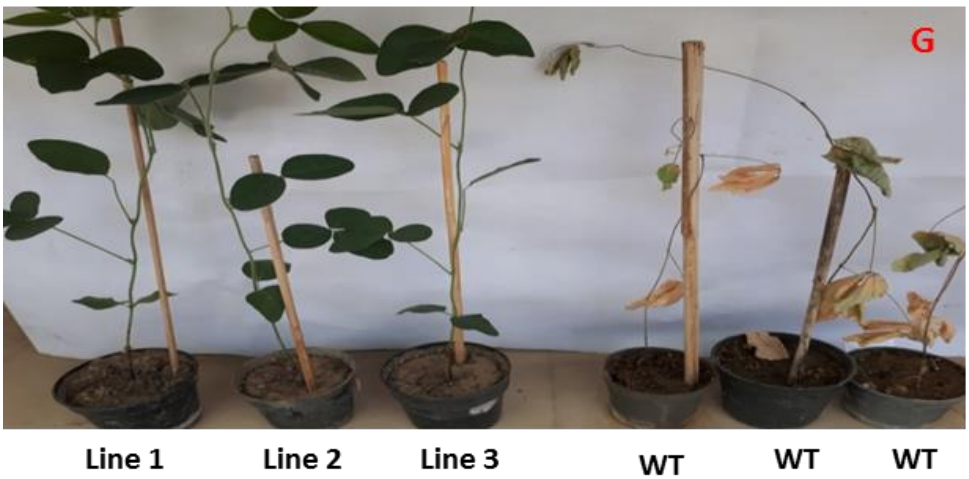
قبلی، غلظت 3/5 میلی‌مولار به‌عنوان غلظت تحمل به علف‌کش انتخاب شد. یک هفته بعد از اسپری علف‌کش گیاهان شاهد در مقایسه با گیاهان حاصل از انتقال ژن زرد شدند و بعد از دو هفته به‌طور کامل از بین رفتند (شکل 2-G). بذرهای حاصل از یک یکی از لاین‌ها نیز نسبت به یکدیگر تحمل متفاوتی نشان دادند. این تفاوت در نسل اول می‌تواند به این دلیل باشد که گیاهان این نسل در حال تفرق هستند.




شکل 1. نمایی شماتیک از سازه ژنی pUEs-CZ.

Figure 1. Schematic representation of pUEs-CZ construct.



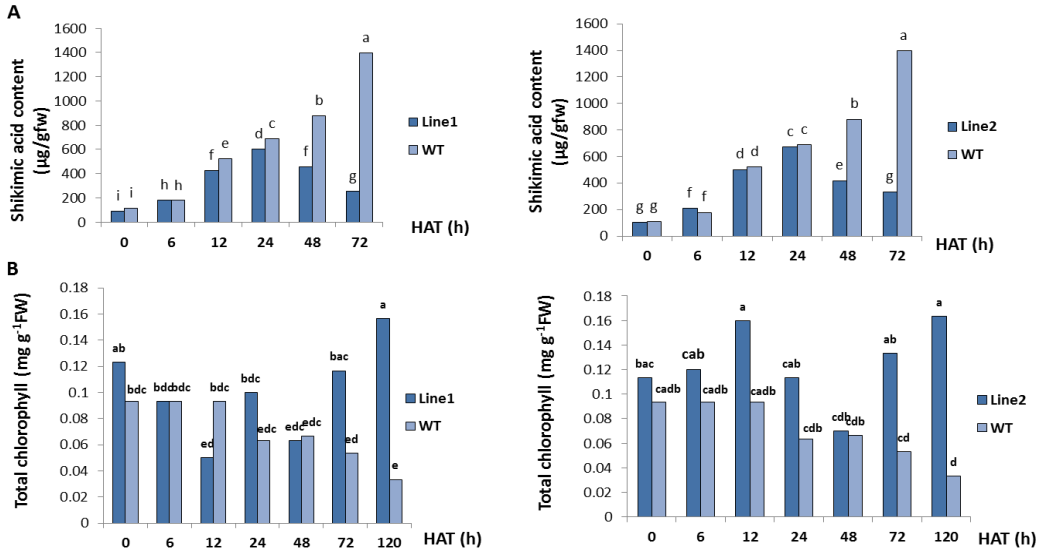

شکل 2. مراحل انتقال ژن به واسطه اگروباکتریوم و باززایی در گیاهان سویا. A: جوانه‌زنی، B: آماده‌سازی ریزنمونه، C: شاخه‌زایی، D: طویل‌شدن شاخه‌ها، E: ریشه‌دهی،F: سازگاری، G: فنوتیپ گیاهان حاصل از انتقال ژن و شاهد دو هفته بعد از اسپری علف‌کش گلایفوسیت.

Figure 2. Stages of *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration in soybean plants. (A) Seed germination. (B) Preparation of explant. (C) Shoot initiation. (D) Shoot elongation. (E) Rooted seedlings. (F) Hardening. (G) Phenotype of plants produced by gene transformation and wild type after two weeks' treatment with glyphosate.

**سنجش محتوای شیکمیک اسید و کلروفیل در گیاهان حاصل از انتقال ژن**

در گیاهانی که مقاوم به گلایفوسیت نیستند، گلایفوسیت به آنزیم *EPSPS* متصل شده و بیوسنتز 5- انول پیرول- شیکیمات-3- فسفات را بلوکه می‌کند و در نتیجه منجر به تجمع شیکمیک اسید در گیاه می‌شود، درحالی‌که در گیاهان مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت آنزیم *EPSPS* در حضور علف‌کش گلایفوسیت به فرآیند کاتالیز ادامه می‌دهد و سطح شیکمیک اسید را در گیاه کاهش می‌دهد. از اینرو در این مطالعه به منظور مقایسه محتوای شیکمیک اسید در گیاهان حاصل از انتقال ژن و غشاهد، محتوای شیکیمیک اسید بعد از تیمار با علف‌کش گلایفوسیت اندازه‌گیری شد. محتوای شیکمیک اسید به‌طور معنی‌داری در گیاهان شاهد بعد از اسپری علف‌کش گلایفوسیت افزایش یافت (شکل 3-A). تجمع شیکیمیک اسید در لاین‌های حاصل از انتقال ژن نسبت به شاهد کاهش نشان داد، در حالیکه در ابتدا افزایش شیکیمیک اسید را نشان دادند و سپس شروع به کاهش کردند. که این افزایش ابتدایی شیکیمیک اسید می‌تواند به‌علت پدیده زردشدگی موقت برگ‌های سویا بعد از کاربرد علف‌کش گلایفوسیت باشد.

از عوارض بارز کاربرد گلایفوسیت در گیاهان تغییرات محتوای کلروفیل برگ‌ها می‌باشد. محتوای کلروفیل در گیاه شاهد پس از تیمار علف‌کش به میزان 3/5 میلی‌مولار به‌طور معنی‌داری نسبت به گیاهان حاصل از انتقال ژن کاهش یافت (شکل 3-B) در گیاهان حاصل از انتقال ژن محتوای کلروفیل بعد از اسپری علف‌کش گلایفوسیت در ابتدا کاهش یافته ولی سپس شروع به افزایش نمود. این تغییرات با نتایج تغییرات محتوای شیکمیک اسید پیوسته بود. علاوه بر آن، گیاهان حاصل از انتقال ژن نسبت به گیاهان شاهد بعد از اسپری علف‌کش گلایفوسیت پدیده زرد شدگی را در برخی از برگ‌های جوان نشان دادند که بعد از مدتی گیاه بازیابی شد.




شکل 3. سنجش محتوای شیکمیک اسید و کلروفیل. A: سنجش محتوای شیکمیک اسید در 2 گیاه حاصل از انتقال ژن Line 1، Line 2 و گیاه شاهد بعد از تیمار با علف کش گلایفوسیت. B: سنجش محتوای کلروفیل در 2 گیاه حاصل از انتقال ژن Line 1، Line 2 و گیاه شاهد. حروف متفاوت اختلاف معنی داری را در سطح کمتر از یک درصد نشان می‌دهند. Hours after treatment (HAT).

Figure 3. Analysis of shikimic acid and Chlorophyll contents (A) Contents of the shikimic acid in plants produced by gene transformation line1, Line2 and wild type (WT) after treatment with glyphosate (B) Chlorophyll contents analysis in plants produced by gene transformation Line 1, Line 2 and wild type (WT). Different letters indicate significant differences at t-test $p$ value $\leq 0.01$. HAT, Hours after treatment.

در حال حاضر اکثر سویاهای تجاری مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت برگرفته از دو ژن CP4 *EPSPS* یا ژن glyphosate acetyltransferase (*GAT*) می‌باشند (http://www.isaaa.org). جداسازی ژن *EPSPS* از *R. aqualilis* و بیان آن در تنباکو به‌طور قابل‌توجهی مقاومت به علف‌کش گلایفوسیت را نشان داده است (Peng *et al.*, 2012). علاوه بر آن Cao *et al.* (2013) نقش 5 ژن باکتریایی کدکننده EPSPS را در *E.coli* و توتون تراریخته مقاوم به گلایفوسیت را تأیید کردند (Guo *et al.*, 2015). بیان CP4-*EPSPS* بهینه‌سازی‌شده در گیاه برنج مقاومت به 1 درصد از علف‌کش تجاری گلایفوسیت را نشان داد (Chhapekar *et al.*, 2015). در حال حاضر استراتژی‌های جدیدی برای مقاومت در سطح بالا به علف‌کش گلایفوسیت در گیاهان تراریخته رو به پیشرفت است. Guo *et al.* (2013) با هم بیانی دو ژن *G2-EPSPS* و *GAT* مقاومت بالایی از علف‌کش گلایفوسیت با مقدار $3600ga.e.ha^{-1}$ در سویاهای تراریخته رسیدند، درحالی‌که در این مطالعه گیاهان سویای حاصل از انتقال ژن تحمل به علف‌کش گلایفوسیت را تا 3/5 میلی مولار نشان دادند مطالعات بیشتر در زمینه این پژوهش می‌تواند بر روی بیان ژن *11 kDa delta zein* و سنجش محتوای اسیدآمینه متیونین بذر انجام شود.

## سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به جهت در اختیار نهادن امکانات و بودجه این تحقیق و همچنین از جناب آقای دکتر حسین هداوند میرزایی هیئت علمی بخش فیزیولوژی پژوهشگاه بیوتکنوژی کشاورزی کرج، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## REFERENCES

Alibhai MF, Stallings WC (2001) Closing down on glyphosate inhibition-with a new structure for drug discovery. PNAS. 98: 2944-2946.

Arnon DI (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol. 24 (1): 1.

Bagga S, Adams HP, Rodriguez FD, Kemp JD, Sengupta-Gopalan C (1997) Coexpression of the maize delta-zein and beta-zein genes results in stable accumulation of delta-zein in endoplasmic reticulum-derived protein bodies formed by beta-zein. Plant Cell. 9: 1683-1696.

Chhapekar S, Raghavendrarao S, Pavan G, Ramakrishna C, Singh VK, Phanindra MLV, Comai L, Sen LC, Stalker DM (1983) An altered aroA gene product confers resistance to the herbicide glyphosate. Science. 221: 370-371.

Chamani Mohasses F, Soluki M, Ghareyazie B, Farshad F, Fahmideh L, Ghafari A (2017) Isolation and functional analysis of PSTOL1 from wild species of rice. Genetic Engineering and Biosafety Journal; 6(1): 1-10.

Consultation FE (2011) Dietary protein quality evaluation in human nutrition. FAO Food Nutr. Pap. 92: 1-66.

Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem Bull. 19: 11-15.

Edwards R, and Hannah M (2014) Focus on weed control (Am. Soc. Plant Biol.).

Garcia-Alonso M, Hendley P, Bigler F, Mayeregger E, Parker R, Rubinstein C, Satorre E, Solari F, and McLean MA (2014) Transportability of confined field trial data for environmental risk assessment of genetically engineered plants: a conceptual framework. Transgenic Res. 23: 1025-1041.

Gunsolus JL (1990) Mechanical and cultural weed control in corn and

soybeans. Am. J. Altern. Agric. 5: 114-119.

Guo B, Guo Y, Hong H, Jin L, Zhang L, Chang RZ, Lu W, Lin M, Qiu LJ (2015) Co-expression of G2-EPSPS and glyphosate acetyltransferase GAT genes conferring high tolerance to glyphosate in soybean. Front. Plant Sci. 6: 847.

Jia Y, Yao X, Zhao M, Zhao Q, Du Y, Yu C, Xie F (2015) Comparison of soybean transformation efficiency and plant factors affecting transformation during the *Agrobacterium* infection process. Int. J. Mol. Sci. 16: 18522-18543.

Kim WS, Krishnan HB (2019) Impact of co-expression of maize 11 and 18 kDa δ-zeins and 27 kDa γ-zein in transgenic soybeans on protein body structure and sulfur amino acid content. Plant Sci. 280: 340-347.

Kirihara JA, Hunsperger JP, Mahoney WC, Messing JW (1988a) Differential expression of a gene for a methionine-rich storage protein in maize. Mol. Gen. Genet. 211: 477-484.

Kirihara JA, Petri JB, Messing J (1988b) Isolation and sequence of a gene encoding a methionine-rich 10-kDa zein protein from maize. Gene, 71: 359-370.

Kortt AA, Caldwell JB., Lilley GG, HIGGINS TJ (1991) Amino acid and cDNA sequences of a methionine-rich 2S protein from sunflower seed (*Helianthus annuus* L.). Eur. J. Biochem. 195: 329-334.

Millward DJ, Layman DK, Tomé D, Schaafsma G (2008) Protein quality assessment: impact of expanding understanding of protein and amino acid needs for optimal health. Am. J. Clin. Nutr. 87: 1576S-1581S.

Peng RH, Tian YS, Xiong AS, Zhao W, Fu XY, Han HJ, Chen C, Jin XF, Yao QH (2012). A novel 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from Rahnella aquatilis with significantly reduced glyphosate sensitivity. PloS one. 7P: e39579.

Saboori Robat E, Habashi AA, Solouki M, Moshenpour M, Emamjomeh A (2017) Identification, isolation and sequence analysis of β-Conglycinin seed specific promoter. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 5(2): 187-196. (in Farsi with English abstract).

Sambrook J, ritsch EFF, Maniatis T (1989) Molecular cloning, Cold spring harbor laboratory press New York. Molecular cloning. 2, 14-9.

Schaafsma G (2005) The protein digestibility-corrected amino acid score (PDCAAS)-a concept for describing protein quality in foods and food ingredients: a critical review. J. AOAC Int. 88: 988-994.

Zelaya IA, Anderson JA, Owen MD, Landes RD (2011) Evaluation of spectrophotometric and HPLC methods for shikimic acid determination in plants: models in glyphosate-resistant and-susceptible crops. Journal of agricultural and food chemistry. 59: 2202-2212.

Zhi-fang Z (2011) The application of chemical herbicides in forestry projects. Sci-Tech Information Development & Economy. 35: 94.