

مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلايفوسیت با تأکید بر روش های مولکولی

صدیقه نصررمزی^{۱*}، محمد مهدی سوهانی^۲، رضا شیرزادیان خرم آباد^۳

۱- دکتری بیوتکنولوژی گیاهی دانشگاه گیلان، ایران

۲- دانشیار بیولوژی سلولی دانشگاه گیلان، ایران

۳- استادیار ژنتیک مولکولی دانشگاه گیلان، ایران

kiana.ramsey@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۶/۲۷، تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۳/۲۵

صفحه ۴۰-۲۱

چکیده

گیاهان مقاوم به علف کش یکی از رایج ترین گیاهان تراریخته هستند که بیشتر جمعیت کل گیاهان تراریخته را شامل می شوند. گلايفوسیت علف کشی است که طیف وسیعی از گونه های گیاهی را کنترل می کند. موضع اثر این علف کش آنزیم ۵-انول پیرویل شیکیمات-۳-فسفات سیتاز (EPSPS) است که فقط در گیاهان و بعضی باکتری ها وجود دارد. به همین جهت به عنوان یک علف کش مناسب و بی خطر برای محیط زیست شناخته شده است. با این حال، توانایی آسیب رسانی به گیاهان زراعی را نیز دارد، بنابراین در سیستم های کشاورزی به صورت پیش از کشت استفاده می شود. امروزه با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک، ژن مقاوم به این علف کش ساخته و با انتقال آن به گیاهان زراعی مختلف منجر به تولید گیاهان مقاوم به گلايفوسیت می شود، به طوری که سطح زیر کشت گیاهان زراعی مقاوم به این علف کش در حال افزایش است. در پژوهش حاصل مروری بر روش های تولید این گونه گیاهان انجام شده است.

واژه های کلیدی: ایمنی زیستی، گلايفوسیت، جهش زایی، علف هرز، گیاهان تراریخته.

مقدمه

گلایفوسیت اولین بار در سال ۱۹۷۰ یعنی ۲۶ سال پیش از تولید محصولات تراریخته، سنتز و اثر آن به عنوان علفکش بررسی شد. از آنجاکه، علفکشی غیر انتخابی است و طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی را کنترل می‌کند، در بسیاری از کشورها به شکل غیرانتخابی، فقط به صورت پیش از کشت مصرف می‌شود (۱). گلایفوسیت ممانعت‌کننده مسیر بیوسنتز اسیدهای آمینه آروماتیک است که توسط مسیر ششیکیمات در میکروارگانسیم‌ها، گیاهان و همچنین بعضی از قارچ‌ها ساخته می‌شود (۲). آنزیم ۵-انول پیرویل شیکیمات-۳-فسفات (EPSP) سینتاز ششمین آنزیم این مسیر است. آنزیم EPSPS که یک انول پیروویل ترانسفراز است انتقال بخش انول پیروویل به شیکیمات ۳ - فسفات (S3P) را کاتالیز کرده و EPSP و فسفات غیر آلی تولید می‌کند. از آنجائیکه گلایفوسیت با وزن مولکولی ۱۶۹/۱ آنالوگ PEP با وزن مولکولی ۱۶۷ است به جایگاه اتصال PEP روی آنزیم وصل شده و به صورت یک

مهارکننده رقابتی علیه PEP و یک مهارکننده نارقابتی علیه S3P عمل کرده و مانع فعالیت آنزیم می‌شود (۳). اتصال علفکش به آنزیم منجر به غیرفعال شدن آن و در نتیجه افزایش غلظت شیکیمات و عدم ساخت کوریسمات می‌شود. به این ترتیب مسیر ساخت اسیدآمینه‌های حلقوی متوقف شده و سلول در اثر فقدان این اسیدهای آمینه از بین می‌رود (۴).

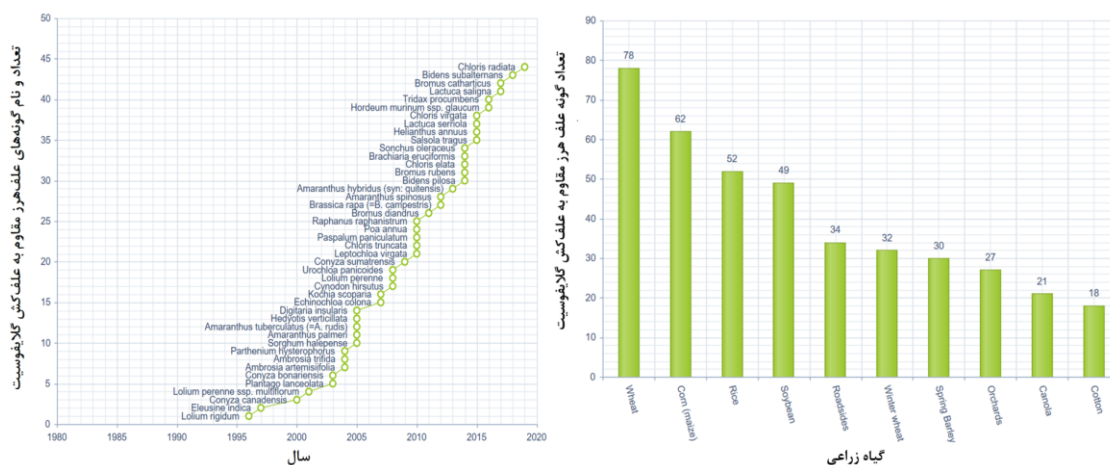
علف‌های هرز مقاوم به گلایفوسیت

بیست سال بعد از معرفی گلایفوسیت و پیش از تولید هرگونه محصول تراریخته‌ای دانشمندان اظهار داشتند که جمعیت علف‌های هرز مقاوم به آن رو به افزایش است (۵). ظهور جمعیت علف‌هرز مقاوم منجر به ظهور تفکر ایجاد گیاهان زراعی تراریخته مقاوم شد. مقاومت علف‌های هرز اولین بار (۱۹۹۶، استرالیا) در علف‌هرز چچم *Lolium rigidum* گزارش شد. این مقاومت در حال حاضر در بیش از ۵۳ گونه گیاهی مختلف گزارش شده است. تغییرات تدریجی مانند توقف انتقال علفکش در بافت‌های گیاه،

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلایفوسیت ..."

در ایران گزارش نشده است (۷). با تولید گیاهان تراریخته مقاوم به این علف کش که یکی از روش های مدیریتی مهم در کنترل علف های هرز است، می توان از جمعیت چنین گیاهان مقاومی به علف کش کاست (۸).

جابه جایی محدود و سوخت و ساز آهسته آن در جمعیت علف های هرز مشاهده می شود (۶). شکل ۱ تعداد و نام گونه های علف های هرز مقاوم به علف کش را تا ۱۲ سپتامبر ۲۰۱۹ گزارش می کند. تاکنون مقاومتی از علف های هرز به این علف کش



شکل ۱: تعداد و نام گونه های علف هرز مقاوم به علف کش گلایفوسیت تا سال ۲۰۱۹ (۷)

۱- کشت سلول و انتخاب گیاهان مقاوم یکی از مزایای این روش القاء تغییرات وراثت پذیر در ژنوم (تنوع سوماکلونال) است. از این تنوع جهت شناسایی صفات مطلوب استفاده می شود (۹). با این روش گیاهان نیشکر، اطلسی و توتون مقاوم ایجاد شده است (۱۰). رده های سلولی نیشکر در محیط داری ۰/۸ میلی مولار

مقاوم سازی نسبت به علف کش گلایفوسیت

روش های سنتی به نژادی و به زراعی در تولید گیاهان زراعی مقاوم چندان موفق نبوده و راه کارهای دیگری بر اساس انواع روش های ایجاد مقاومت مدنظر قرار گرفته اند که روش های اصلی آن در ادامه ذکر می شود.

گلایفوسیت شناسایی شدند. گیاهان باززایی شده توانایی تحمل ۵ برابر غلظت کشنده را داشتند (۱۱).

در پژوهشی مشابه سلول‌های مقاوم کاسنی انتخاب و گیاهان مقاوم به علف‌کش ایجاد شدند (۱۲). کشت سلول تحت غلظت‌های کشنده علف‌کش منجر به تکثیر ژن EPSPS در سلول‌های زنده‌مانده شد که موجب مقاومت بر اساس افزایش محصول آنزیم هدف می‌شود. یک سلول از گیاه اطلسی مقاوم با روش کشت بافت انتخاب و گیاهان باززایی شده از آن تحت سطوح کشنده گلایفوسیت زنده ماندند (۱۳).

کشت بافت *Corydalis sempervirens* در حضور ۵ میلی‌مولار گلایفوسیت منجر به تولید مقادیر زیادی از آنزیم هدف و ایجاد مقاومت چندین برابری سلول‌ها شد. فعالیت ترجمه‌ای mRNA برای EPSPS در محیط کشت حاوی گلایفوسیت ۱۰ برابر بیشتر از محیط کشت بدون آن بود (۱۴).

با اینحال محدودیت اصلی این روش، مشکل باززایی گیاهان تحت آزمون و نیز

نشان ندادن مقاومت در شرایط مزرعه‌ای بود.

۲- **جهش‌زایی:** جهش‌زایی فیزیکی یا شیمیایی بذر، میکروسپور یا دانه گرده توسط انتخاب تحت فشار نیز منجر به مقاومت شده است. ماده جهش‌زای عمومی اتیل متان سولفونات (EMS) نام دارد (۱۵).

بذور یا دانه گرده با EMS تیمار شده و در دو شرایط *in vitro* و *in vivo* و در حضور علف‌کش رشد می‌کنند. گیاهان زنده‌مانده انتخاب و پس از طی مراحل رشدی و تولید بذر برای بررسی‌های بیشتر مورد ارزیابی قرار گیرند. با استفاده از این روش ۲۱ رقم برنج برزیلی مقاوم به گلایفوسیت تولید شد (۱۶). این روش به دلیل ملاحظات مربوط به ماده جهش‌زا و عدم مقاومت در سطوح زیاد دارای محدودیت بود.

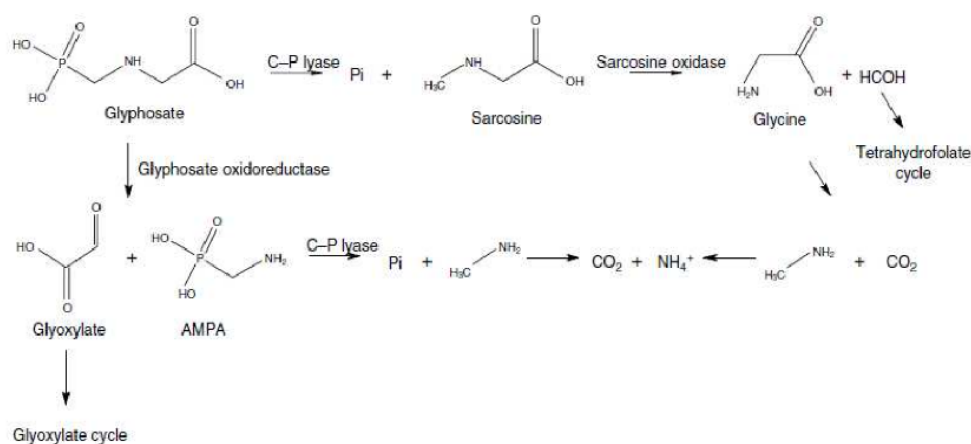
۳- **مهندسی ژنتیک:** شامل شناسایی ژن‌های مقاوم از گیاهان و یا میکروارگانسیم‌ها، جداسازی و دستکاری آن‌ها برای بیان کافی و کارا در گیاهان و

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلايفوسیت ..."

گلايفوسیت را شکسته و موجب تولید آمینو متیل فسفونیک اسید (AMPA) و گلی اکسالات می شود. گیاهان گندم و ذرت این گونه مقاوم شده اند (۱۹) (شکل ۲). آنزیم کربن فسفروز لیاز که پیوند C-P را در این علف کش شکسته و موجب ایجاد سارکوزین و تبدیل آن به ترکیبات غیرسمی می شود نیز در این تجزیه نقش دارد (۲۰).

انتقال، درج و بیان آن در سلول های گیاهی است (۹، ۱۷). این مقاومت را می توان از یک و یا ترکیبی از روش های زیر بدست آورد.

تجزیه و غیرسمی کردن علف کش
مقاومت با استفاده از کاهش تجمع علف کش در بافت های حساس (قسمت های تولید مثل و مریستمی) ایجاد می شود (۱۸). آنزیم گلايفوسیت اکسیدوردوکتاز (gox) که پیوند N-C در



شکل ۲: مسیر بیوشیمیایی تجزیه گلايفوسیت (۱۹).

ایجاد گیاه یونجه مقاوم شد (۲۴). اخیراً هان و همکاران (۲۰۱۵) به کمک فرابیان ژن *DAAO* از باکتری *Bradyrhizobium japonicum* موجب ایجاد مقاومت در گیاه آراییدوپسیس شده اند (۲۵).

انتقال ژن رمزکننده آنزیم GAT به ذرت (۲۱)، سویا (۲۲) و توتون (۲۳) موجب استیله و تجزیه شدن علف کش شده است. ژن تولیدکننده آنزیم گلايفوسیت اکسیداز از باکتری *Bacillus subtilis* منجر به

تولید بیش از حد آنزیم

در این روش ژن مورد نظر از منابع گیاهی یا پروکاریوتی جدا و تحت کنترل یک پیشبر قوی وارد گیاه مورد نظر می شود. هنگام برخورد گیاه زراعی با غلظت مشخصی از علف کش، بخشی از آنزیم غیرفعال و مقادیر باقی مانده برای عملکرد کافی خواهد بود. در این حالت متابولیت گیاه از نظر این آنزیم و مسیر مربوطه عادی است (۲۶). استفاده از پیشبر CaMV35S در گیاهان تراریخته نیشکر منجر به ایجاد مقاومت شده است (۲۷). فرابیان آنزیم EPSPS منجر به افزایش مقاومت در گیاهان رشد یافته تحت شرایط کشت بافت شد که این امر با افزودن غلظت گلایفوسیت در مراحل کشت بافت سلول های گیاه توتون بدست آمده است (۲۸). با این حال در گیاه *Corydalis sempervirens* این افزایش منجر به تغییرات رونویسی و ترجمه ای مرتبط با توالی EPSPS شده است (۲۹). همچنین مقاومت در گیاه اطلسی تراریخته حامل ژن EPSPS تحت کنترل پیشبر قوی CaMV35s بدست آمد (۳۰).

اما فرابیان این آنزیم در مریستم ها که محل تجمع گلایفوسیت است در سطوح کافی، انجام نشد و به طور کلی انتقال ژن موجب کاهش رشد گیاه شد (۳۱).

وارد کردن ژن تغییر یافته آنزیم با میل ترکیبی کمتر

با استفاده از روش های زیست مولکولی در نقاط حفاظت شده آنزیم که محل میانکنش با علف کش است تغییر کدونی ایجاد کرده و عملاً با حفظ عملکرد آنزیم مانع از اتصال علف کش به آن می شوند (۳۲). به منظور ایجاد تغییرات کدونی در آنزیم از روش جهش زایی مکانی هدایت شده یا به اختصار SDM استفاده می شود (۳۳). استفاده از PCR در روش SDM مناسب ترین راه برای ایجاد جهش نقطه ای است. آمینواسیدهای موجود در مناطق حفاظت شده آنزیم هدف این مطالعه هستند. با بررسی توالی EPSPS در چندین باکتری و گیاه این آمینواسیدها مشخص شده اند. استفاده از PCR برای جهش زایی به صورت SOEing و به دو روش انجام می گیرد (۳۴).

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلایفوسیت ..."

روش SOEing دو طرفه

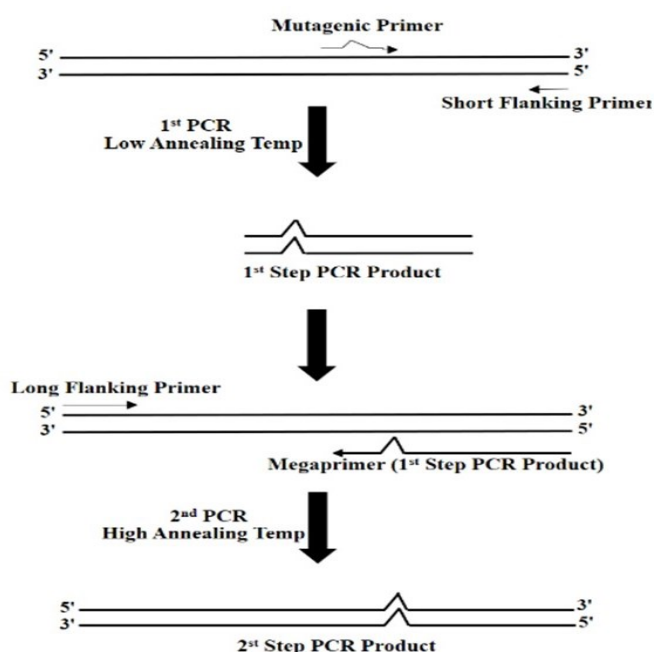
این روش که بسط همپوشان نیز نام دارد توسط Ho و همکاران (۱۹۸۹) ارائه شد. در این روش دو قطعه از دی.ان.ا که در یکی از این قطعات جهش در بالادست و در دیگری در پایین دست محل موردنظر قرار دارد با استفاده از آغازگرهایی که جهش موردنظر در آنها وارد شده است، به صورت همپوشان تکثیر می شوند. به منظور خارج کردن دی.ان.ای الگوی اولیه در مرحله بعد این محصولات خالص سازی می شوند. در PCR دوم به دلیل وجود بخش همپوشان در حدود ۲۰ نوکلئوتید، یکی از محصولات می تواند تکثیر شود قطعه کامل ژن با جهش موردنظر است (۳۴).

روش SOEing یک طرفه (مگاپرایمر)

در این روش از PCR اول برای تکثیر قطعه هایی از دی.ان.ا استفاده می شود که دارای جهش مورد نظر در یکی از انتهای خود باشند. این محصول PCR خالص شده و در چرخه دوم به عنوان مگاپرایمر همراه با آغازگر اختصاصی دوم جهت ایجاد طول کامل ژن جهش یافته

مورد استفاده قرار می گیرد. برای جلوگیری از تکثیر ژن تیپ وحشی با خالص سازی محصول PCR اولیگونوکلئوتیدهای اولیه حذف می شوند. به دلیل هزینه بر و وقت گیر بودن، روش تغییرشکل یافته ای ارائه شد که بر استفاده از غلظت های محدود آغازگر جهش زا و نیز طولانی بودن مدت زمان بسط نهایی در واکنش PCR اول برای تکثیر مگاپرایمر است. در چرخه دوم تنها کاری که انجام می شود اضافه کردن غلظت نرمال آغازگر اختصاصی دوم است (۳۳). در واقع از دیدگاه مولکولی، در روش SDM از آغازگرهای جهش دار استفاده شده و محصول واسط هر PCR که قطعات همپوشان هستند به عنوان رشته های الگوی واکنش های PCR بعدی با دو آغازگر طرفین ژن، به کار رفته و در نهایت طی یک واکنش PCR نهایی به منظور امتزاج دو محصول PCR دارای نقاط همپوشان، دو رشته ای طویل حامل جهش موردنظر، حاصل می شود (۳۵، ۳۶). انتقال ژن تغییر یافته به گیاهان یکی از مؤثرترین روش ها برای تولید گیاهان مقاوم به گلایفوسیت است (۳۲). این روش برای بررسی

ساختار و عمل آنزیم‌ها و نیز بررسی نقش
آمینواسیدهای موجود در مکان فعال آنزیم
بسیار قدرتمند است (۳۳). همچنین این
روش دانسته‌های ارزشمندی در خصوص
جهش‌های ایجاد شده ارائه می‌دهد (۱۷).



شکل ۳: روش SOEing یک طرفه (مگاپرایمر) (۳۳).

تاریخچه جهش‌زایی در آنزیم EPSPS

روش‌های دی.ان.ای نو ترکیب برای
ایجاد مقاومت به گلایفوسیت در تعدادی
از گونه‌های گیاهان زراعی مورد استفاده
قرار گرفته است. مشخص شده که
گلایفوسیت مستقیماً EPSPS را مورد
هدف قرار داده و بدین ترتیب، مهم‌ترین
آنزیم در ساخت اسیدهای آمینه حلقوی،
غیرفعال می‌شود (۳۷، ۳۸). در سال ۱۹۸۰

نخستین آنزیم EPSPS غیرحساس که
جهش Gly96Ala بر روی آن اعمال شده
بود تولید شد. طی این تحقیقات نشان داده
شد که آنزیم‌های نو ترکیب ضمن حفظ
فعالیت‌های کاتالیتیکی خود، تمایل کمتری
به گلایفوسیت نشان می‌دهند. مکان‌های
انتخابی در جهش‌های فوق در دو ناحیه
حفاظت شده، بیشتر در ناحیه اول (بین
موقعیت اسید آمینه ۸۰ الی ۱۲۰) جایگزینی

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلايفوسیت ..."

گلايسين با آلانين و در ناحیه دوم (بين موقعیت ۱۷۰ تا ۲۱۰) جایگزینی آلانين با ترئونين در نظر گرفته شده است (۳۹). دو ناحیه گلايسين ۹۶ و پرولين ۱۰۱ بیشترین اهمیت را در این خصوص دارا هستند (۳۷). در سال ۱۹۸۵ گزارش مقاومت به گلايفوسیت توسط کومای و همکاران ارائه شد، بدین ترتیب که ژن جهش یافته رمزکننده EPSPS با نام *aroA* از باکتری *Salmonella typhimurium* را به درون سلول های توتون وارد و ایجاد مقاومت کردند. نتایج مشابهی از کاربرد این ژن در گیاه سیب زمینی نیز گزارش شده است (۴۰). در سال ۱۹۸۸ کیشوری و شاه با ایجاد جهش نقطه ای خاص در ژن EPSPS، آنزیم های جهش یافته ای را تولید کردند. برخی از این ژن ها مقاومت چهار برابری نسبت به گلايفوسیت را در توتون نشان دادند. در سال ۱۹۹۰ سوست و آمرهين Gly96 از ژن *aroA* باکتری *Klebsiella pneumonia* را به Ala تغییر و تأثیر فزاینده ای را در کاهش تمایل اتصال به آنزیم مشاهده کردند (۳۸). تغییر گلايسين ۹۶ به آلانين در ژن EPSPS از باکتری *E. coli* به روش جهش زایی تک نوکلئوتیدی موجب ایجاد مقاومت در گیاه اطلسی شد (۴۱). Schonbrunn و همکاران (۲۰۰۲) جهش Gly96Ala روی ژن رمزکننده EPSPS باکتریایی و به منظور بررسی های کینتیکی و مطالعه ساختار آنزیم ایجاد شد (Schonbrunn et al, 2002). Majumder و همکاران (۱۹۹۵) در هند به وسیله روش SDM در *B. subtilis* جهش های His385Lys و Pro105Ser و Arg24Asp را به منظور مطالعه آنزیم آلوستریک EPSPS ایجاد کردند (Majumder et al, 1995). در همین سال گروه دیگری در کشور هند جهش Arg104Lys را در ناحیه حفاظت شده آنزیم EPSPS ایجاد کردند. در مطالعه ای که بر روی EPSPS نوع دوم باکتری احیاکننده نیتروژن *Pseudomonas stutzeri* سویه A1501 انجام شد در اثر جهش سرین به آسپارژین ۱۳۰، مقاومت ایجاد شد (۴۲). با ایجاد جهش ترئونین ۲۴ به اسید گلوتامیک در EPSPS باکتری *E. coli* مشخص شد که جهش در ناحیه ای به غیر از جایگاه فعال و دور از آن نیز

می‌تواند در خصوصیات کاتالیتیکی آن تأثیر گذاشته و موجب ایجاد مقاومت شود (۳۵). تغییر اسیدآمین پرولین ۱۰۶ به سرین در گیاه *goosegrass* مقاومت پنج برابری را در مقایسه با گیاهان حساس ایجاد کرد (۴۳). کمپانی مونسانتو آنزیم EPSPS با منشاء *اگروباکتریوم CP4* را به گونه‌ای دست‌ورزی کرد که تحمل بالاتری را نسبت به EPSPS گیاهی نشان دهد. آنزیم نو ترکیب Km کمتری را برای فسفوانول پیرووات نسبت به دیگر واریته‌های آنزیم EPSPS نشان داد. جایگاه اتصال سوبسترا و گلایفوسیت در EPSPS CP4 و EPSPS حساس به گلایفوسیت در بیشتر گونه‌های گیاهی یکسان است (۴۴). جهش‌زایی نقطه‌ای اسیدآمین ترئونین ۴۲ به گلوتامات در باکتری *E.coli* موجب کاهش ۲۵-۹ برابری Km آنزیم به فسفوانول پیرووات و افزایش ۲۶-۲۱ برابری نسبت به گلایفوسیت در مقایسه با آنزیم طبیعی شد (۳۵). طی پژوهشی P153A، P25A، P242A، P322A و P434A از *Agrobacterium sp.* سویه CP4 تغییر

یافت و مقاومت در دو جهش یافته P242A و P434A بدست آمد (۴۵). با تغییر پرولین ۱۰۶ به لوسین در EPSPS گیاه برنج و انتقال آن به توتون گیاه مقاوم بدست آمد (۴۶). موتاسیون جفتی T102I/P106S به‌صورت توأم در گیاه برنج موجب ایجاد مقاومت شده است (۴۷). ارقام برنج G2-6 و G2-7 حامل ژن *Pseudomonas* G2-EPSPS از باکتری *fluorescens* با مقاومت چند برابری به گلایفوسیت ایجاد شده‌اند (۴۸). ژن G6 از باکتری *Pseudomonas putida* رمزکننده آنزیم ۵--3-enolpyruvylshikimate phosphate synthase، توسط *اگروباکتریوم* به گیاه برنج انتقال یافت و مقاومت در غلظت ۸ گرم بر لیتر ایجاد شد (۴۹). دو جهش با استفاده از روش DNA shuffling در آمینواسیدهای T101A و A187T ژن *MdEPSPS* از درخت سیب (*Malus domestica*) موجب ایجاد مقاومت شد (۵۰). ژن *OsEPSPS* از گیاه برنج جدا و برای فرابیان به همان گیاه منتقل شد. در این پژوهش غربال اولیه گیاهان به واسطه بررسی مقاومت به

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلایفوسیت ..."

انجام و بر اساس مناطق همپوشان اتصال انجام شد. گیاهان تراریخته حاصل به غلظت ۵ میلی مولار علف کش مقاوم بودند (۵۴). هامل و همکاران به کمک روش Crispr-Cas9 آلل های ژن EPSPS را در گیاه کاساوا تغییر دادند. در واقع از آنزیم Crispr-Cas9 اندونوکلاز برای هدف قرار دادن پیشبر ژن EPSPS در این گیاه و ترمیم آن استفاده کردند. گیاهان تغییر یافته دارای فنوتیپ نرمال همراه با مقاومت به مقدار ۵۰ میلی گرم بودند (۵۵). موسوی و همکاران همزمان دو ژن *epsps* (حاوی دو جهش G96A و A183T) و ژن *gox* جهت تجزیه گلایفوسیت را به گیاه کلزا انتقال داده و مقاومت گیاه را در غلظت های مختلف بررسی کردند. در نهایت مقاومت این گیاهان را به ۰/۴mM علف کش گزارش کردند (۵۶). مقاومت به گلایفوسیت با ایجاد جهش G96A به روش SDM در مقایسه با انتقال ژن وحشی EPSPS از *E.coli* بررسی شد (۵۷). بر اساس نتایج پژوهشگران، انتقال ژن های فوق به روش *in planta* و به واسطه *Agrobacterium*

آنتی بیوتیک هایگرومایسین انجام شد. در نهایت این انتقال موجب ایجاد گیاهان برنج مقاوم به غلظت ۴ میلی مولار شد (۵۱). ژن *CP4-EPSPS* به صورت فرایبان وارد گیاه برنج شد و مقاومت ۱٪ ایجاد کرد (۵۲). انتقال همزمان ژن *igrA* از باکتری *Pseudomonas* برای غیرفعال کردن گلایفوسیت و ژن *epsps* جهش دار به صورت P173S از گیاه برنج تحت کنترل پیشبر قوی CaMV35s منجر به ایجاد مقاومت (۲mL/L) شد (۵۳). جهش های Ala183Thr و Gly96Ala در آنزیم EPSPS باکتری *E.coli* انجام و ژن نو ترکیب وارد کلزا شد. چند نسل از کلزای تراریخته از نظر بیان این آنزیم مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده بیان ژن انتقال یافته در گیاه و همچنین مقاوم شدن آن بود. همچنین جهش در سویه K12 باکتری *E.coli* به صورت گلایسین ۹۶ به آلانین و آلانین ۱۸۳ به ترئونین ایجاد شد. سپس این ژن با کمک PCR به زیر واحد روبیسکو متصل شد. بدین منظور دو PCR جداگانه از ژن جهش دار و زیر واحد روبیسکو

tumefaciens به جنین بالغ برنج رقم هاشمی (۵۸، ۵۹) انجام شد. بررسی نتایج مقاومت و تجزیه و تحلیل‌های بیوشیمیایی در چندین نسل مورد تأیید بود. پژوهشگران کارآمد بودن مسیر شیکیمات و متابولیت‌های ثانویه مرتبط با این مسیر از جمله آلکالوئیدها، شیکیمات، پرولین، فلاونوئیدها و ... را در بررسی‌های آنزیمی و مولکولی تأیید کردند (۶۰، ۵۷).

گیاهان تجاری مقاوم به گلایفوسیت:

تلاش‌های فراوانی در تولید گیاهان مقاوم به گلایفوسیت انجام گرفته است. در حال حاضر بیش از نیمی از گیاهان زراعی تراریخته نسبت به گلایفوسیت مقاوم هستند (۶۱). تولید گیاهان مقاوم به عنوان یکی از سریع‌ترین فناوری‌ها در علم کشاورزی تبدیل شده است (۶۲). اما محصولات زراعی مقاوم اولیه به طور کامل بی‌نقص نبودند. در این خصوص باید زمان، سرعت و تعداد دفعات استفاده از علف‌کش محدود شود تا بتوان از مقاومت محصولات تولیدی اطمینان یافت. همچنین گاهی کاهش عملکرد نیز گزارش

شده است. در حال حاضر نسل جدیدی از محصولات زراعی مقاوم در حال توسعه است به طوری که همراه با بهبود تکنولوژی، انقلابی را در مدیریت علف‌های هرز در زمین زراعی ایجاد کرده است (۶۳). راه‌اندازی مسیر تجاری سویای مقاوم در سال ۱۹۹۶ یک عصر جدید در مدیریت علف‌های هرز را نوید داد (۴۴). از آن زمان بسیاری از محصولات مهم زراعی، تراریخته شدند که کاربرد گروه وسیعی از علف‌کش‌های شیمیایی را برای آنها میسر ساخت. در این مورد می‌توان به رقم مقاوم GTS-40-3-2 سویا اشاره کرد که EPSPS-CP4 با روش بمباران ذره‌ای (بیولستیک) به همراه پپتید نشانه کلروپلاستی *Petunia hybrid* به درون کلروپلاست منتقل و پایداری صفت تا شش نسل بررسی شده است. پژوهش‌ها حاکی از آن بود که این گیاه از نظر مورفولوژیکی و خصوصیات زراعی مهم مانند زمان گلدهی و تولید دانه تفاوت چندانی نداشت (۶۴). همچنین رقم MON89788 سویا حامل ژن *cp4 epsps* در سال ۲۰۰۹ به صورت وسیع مورد کشت

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلایفوسیت ..."

قرار گرفت (۶۳). در سال ۲۰۰۸ بیش از ۸۰ درصد کشت سویا در آمریکا مقاوم به گلایفوسیت بوده است (۶۲). سطح زیر کشت سویای مقاوم همچنان در آمریکا رو به افزایش است به طوری که طی شش سال مقدار کشت آن نسبت به سایر گیاهان زراعی به ۵۰٪ رسید (۶۵). از جمله گیاهان مقاوم به گلایفوسیت که به صورت تجاری مورد کشت قرار گرفته اند، می توان به کلزا و ذرت اشاره کرد. گیاه GT73 اولین کلزای مقاوم به گلایفوسیت تجاری شده در سال ۱۹۹۶ در کانادا است که انتقال ژن *EPSPS* از اگروباکتریوم CP4 و ژن *GOX* تغییر یافته، کلزای مقاوم تری را بوجود آورده است. این گیاهان تجاری شده در سال ۲۰۰۰ در کانادا و آمریکا در سطحی برابر با ۲/۲ میلیون هکتار کشت شدند و گزارش های مناسبی در مورد کنترل علف های هرز کلزا وجود دارد (۶۴). رقم تجاری ذرت GA21 که در سال ۱۹۹۸ معرفی شد، با دو جهش در آنزیم EPSPS آن شامل جانشینی ترئونین ۱۰۲ با ایزولوسین و پرولین ۱۰۶ با سرین مقاوم شده است (۶۶). همچنین برای

تولید ذرت NK603 دو نسخه از ژن رمز کننده آنزیم CP4 EPSPS را که یک نسخه آن تحت کنترل پیشبر اکتین برنج و نسخه دیگر تحت کنترل پیشبر CaMV35s بود، به این گیاه انتقال دادند (۱۹). گیاه GT200 کلزا مقاوم توسط شرکت مونسانتو تجاری شده است. این گیاه حامل دو ژن *EPSPS* مهندسی شده از اگروباکتریوم CP4 به منظور تمایل کمتر به گلایفوسیت و *GOX* از *Bacillus anthracis* سویه LBAA به همراه ترادف نشانه کلروپلاستی است (۶۷). ارقام مختلف گیاه کتان شامل MON1445 حامل ژن *cp4 epsps* در سال ۱۹۹۶، MON88913 حامل ژن *two cp4 epsps* در سال ۲۰۰۶ و GHB614 حامل ژن *zm-2mepsps* در سال ۲۰۰۹ به صورت وسیع کشت شد (۶۳). همچنین گیاه یونجه مقاوم با نام تجاری J101 و J163 توسط شرکت مونسانتو در سال ۲۰۰۵ تولید شد. این گیاهان حامل *cp4 epsps* و پیشبر CaMV35s بودند (۶۴). گیاهان زراعی مقاوم به علف کش گلایفوسیت که

اتحادیه اروپا به صورت وسیع کشت شد. گیاه پنبه رقم BCS-GH811-4 حامل ژن‌های مقاومت به علف‌کش‌های گلایفوسیت (حاوی دو ژن جهش‌یافته از گیاه ذرت) و Isoxaflutole (ژن تغییریافته *hppdPF* W336 از باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain A32) نیز تولید شده است. این گیاه در سال ۲۰۱۸ در استرالیا، ژاپن، زلاندنو و آمریکا کشت شد (۶۹).

نتیجه‌گیری

در مجموع، از سال ۱۹۹۶ گیاهان زراعی مقاوم به علف‌کش گلایفوسیت تولید و تجاری شده‌اند. از جمله این گیاهان سویا، ذرت، پنبه، یونجه، گندم و کلزا را می‌توان نام برد. تولید و سطح زیر کشت گیاهان زراعی مقاوم به این علف‌کش در حال افزایش است. مزیت‌های تجاری این سیستم کنترل‌کننده علف‌های هرز افزایش پیدا خواهد کرد تا مقاومت به گلایفوسیت به صورت کنترل‌شده یکی از پایه‌های اساسی و اصلی مدیریت علف‌های هرز در بیشتر گیاهان به‌ویژه گیاهان زراعی شود.

به صورت تجاری به‌ویژه در آمریکای شمالی عرضه شده‌اند شامل سویا (*Glycine max*) در سال ۱۹۹۶، شلغم روغنی (*Brassica rapa* L.)، کلزا (*Brassica napus* L.) در سال ۱۹۹۶، چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) در سال ۲۰۰۵، گندم (*Triticum aestivum* L.)، یونجه (*Medicago sativa* L.) در سال ۲۰۰۵، پنبه (*Gossypium hirsutum* L.)، ذرت (*Zea mays* L.) در سال ۱۹۹۸ و نیشکر است (۶۲، ۶۸).

امروزه گیاهان تراریخته حامل ژن‌های مقاومت به صورت ترکیبی ایجاد شده‌اند. به‌طور مثال گیاه ذرت رقم MON87427 x MON89034 x NK603 که علاوه بر داشتن ژن‌های مقاومت به گلایفوسیت (*cp4 epsps* (aroA:CP4)) حاوی ژن اختصاصی مقاومت در برابر حمله حشرات راسته بالپولکداران (*cry1A.105* و *cry2Ab2*) نیز است توسط کمپانی مونسانتو تولید شده است. این گیاه در سال ۲۰۱۳ در کشورهای مکزیک و ژاپن، در ۲۰۱۴ در تایوان و کره جنوبی و در سال ۲۰۱۸ در کشورهای

"نصررمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلايفوسیت ..."

که تولید این گیاهان دلیلی بر مصرف
غیرکنترل شده علف کش نیست. در نهایت
همانند تمام پدیده های علمی قبل از
مصرف چنین گیاهانی باید به تجزیه و
تحلیل دقیق آزمایشگاهی و مزرعه ای در
سطح وسیع پرداخته شود. علف کش
گلايفوسیت کم زیان ترین علف کش
معرفی شده تا امروز است.

References

فهرست منابع

1. Duke S.O. and Powles S.B. (2008). Mini-review Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. Pest Management Science. 64: 319-325.
2. Bentley R. (1990). The shikimate pathway-a metabolic tree with many branches. Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 25: 307-383.
3. Kang K. and 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. Agriculture and Chemistry and Biotechnology. 49 (2): 65-68.
4. Hermann K.M. (1995). The shikimate pathway: early steps in the biosynthesis of aromatic compound. Plant Cell 7: 907-919.
5. Bradshaw L.B., Padgett S.R., Kimbell S.L. and Wells B.H. (1997). Perspective on glyphosate resistance. Weed Technology. 11:189-198.
6. Johnson W.G., Davis V.M., Kruger G.R. and Weller S.C. (2009). Influence of glyphosate-resistant cropping systems on weed species shifts and glyphosate-resistant weed populations. European Journal of Agronomy. 31(3):162-72.
7. Weed Science. (2019). <http://www.weedscience.org/>. The Global Herbicide Resistance Action Committee and Crop Life International.
8. Heap I. (2016). The International Survey of Herbicide Resistant Plants. Accessed October 4th. <http://www.weedscience.org/>.
9. Mulwa R.M.S. and Mwanza L.M. (2006). Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/ selectivity in crops. African Journal of Biotechnology. 5 (5): 396-404.
10. Perez-Jones A., Park K.W., Polge N., Colquhoun J. and Mallory-Smith. C.A. (2007). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*. Planta Journal. 226:395-404.
11. Zambrano A.Y., Demey J.R. and Gonzalez V. (2003). In vitro selection of a glyphosate tolerant sugarcane cellular line. Plant Molecular Biology Reporter. 21: 365-373.
12. Sellin C., Forlani G., Dubois J., Nielsen E. and Vasseur J. (1992). Glyphosate tolerance in *Chicorium intybus* L. var. Magdebourg. Plant Science. 85: 223-231.

13. Steinrucken H.C., Schulz A., Amerhein N., Porter C.A. and Fraley R. (1986). Overproduction of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in a glyphosate-tolerant *Petunia* hybrid cell line. *Archeology and Biochemistry and Biophysics*. 244: 169-178.
14. Hollander-Czytko H. and Amrhein N. (1987). 5-Enolpyruvylshikimate 3-Phosphate Synthase, the Target Enzyme of the Herbicide Glyphosate, Is Synthesized as a Precursor in a Higher Plant. *Plant Physiology*. 83: 229-231.
15. McCabe P.F., Cselo A., Timmons A.M. and Dix P.J. (1990). Selection of chloroplast mutants. In: Pollard JW and Walker JM (eds). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 6. Plant cell and tissue culture. The Humana Press, Totowa NJ., pp 467-675.
16. Sandhu S.S., Bastos C.R., Azini L.E., Neto A.T. and Colombo C. (2002). RAPD analysis of herbicide-resistant Brazilian rice lines produced via Mutagenesis. *Genetics and Molecular Research*. 1: 359-370.
17. Tian Y.S., Jing X., Xiong A., Zhao W., Xiao-Yan F., Peng R.H. and Yao Q.H. (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.
18. De-Carvalho L.B., Alves P.L.C.A. and Duke S.O. (2013). Hormesis with glyphosate depends on coffee growth stage. *Annual Brazilian Academic Science*. 85: 813-821.
19. Borggaard O.K. and Gimsing A.L. (2008). Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. *Pest Management Science*. 64: 441-456.
20. Pline-Srnic, W. (2006). Physiological mechanisms of glyphosate resistance. *Weed Technology*. 20:290-300.
21. Castle L., Siehl L., Gorton R., Patten P.H., Chen Y., Bertain S., Cho H., Duck N., Wong J., Liu D. and Lassner M. (2004). Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene. *Science*. 304: 1151-1154.
22. Delaney B., Zhang J., Carlson G., Schmidt J., Stagg B. and Comstock B. (2008). A gene-shuffled glyphosate acetyltransferase protein from *Bacillus licheniformis* (GAT4601) shows no evidence of allergenicity or toxicity. *Toxicology Science*. 102: 425-432.
23. Liu Y., Cao G., Chen R., Wang J. and Wang G. (2015). Transgenic tobacco simultaneously overexpressing glyphosate N-acetyltransferase and 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase are more resistant to glyphosate than those containing one gene, *Transgenic Research*. 24: 753-763.
24. Nicolio A., Ferradini N., Molla G., Biagetti E., Pollegioni L. and Veronesi F. (2014). Expression of an evolved engineered variant of a bacterial glycine oxidase leads to glyphosate resistance in alfalfa. *Journal of Biotechnology*. 184: 201-208.
25. Han H., Zhu B., Fu X., You S. and Wang B. (2015). Overexpression of D -amino acid oxidase from *Bradyrhizobium japonicum*, enhances resistance to glyphosate in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Report*. 34, 2043-2051.
26. Gaines T.A., Zhang W., Wang D., Bukun B., Chisholm S.T., Shaner D.L., Nissen S.J., Patzoldt W.L., Tranel P.J., Culpepper A.S., Grey T.L., Webster T.M., Vencill W.K., Sammons R.D., Jiang J., Preston C., Leach J.E. and Westra P. (2010). Gene amplification confers

"نصرمزی و همکاران، مروری بر پیشینه تولید گیاهان مقاوم به علف کش گلیفوسیت ..."

glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of American. 107:1029–1034.

27. Nasir I.A., Tabassum B., Qamar Z., Javed M.A., Tariq M., Farooq A.M., Butt S.J., Qayyum A. and Husnain T. (2014). Herbicide tolerant Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) Plants: An Unconventional Method of Weed Removal, Turkish Journal of Biology. 38: 439-449.

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

29. Hollander-Czytko H., Johanning D., Meyer H. and Amrhein N. (1988). Molecular basis for the overproduction of 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in a glyphosate tolerant cell suspension culture of *Corydalis sempervirens*. Plant Molecular Biology. 11: 215–220.

30. Shah D.M., Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winton J.A., Turner N.E., Hironaka C.M., Sanders P.R., Gasser C.S., Aykent S.A., Siegel N.R., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1986). Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. Science. 233: 474-481.

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

32. Wang H.Y., Li Y.F., Xie L.X. and Xu P. (2003). Expression of bacterial *aroA* mutant, *aroAM1*, encoding 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase for the production of glyphosate resistant tobacco plants. Journal of Plant Research. 116: 455-460.

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

34. Mc Pherson M.G. and Moller S.G. (2003). PCR. Bios Scientific Published, Enfield, NH, USA.

35. He M., Yan-Fang N.I.E. and Pielin X.U. (2003). T42M mutation in a bacterial 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase generates enzyme with increased resistance to Glyphosate. Biochemistry. 67(6):17405-1409.

36. Novoradosky A., Zhang V., Ghosh M., Hogrefe M., Sorge J.A. and Gaasterland T. (2005). Computational principle of primer design for site directed mutagenesis, Nano Science and Technology Institute. 1: 532-535.

37. Dev A., Tapas S., Pratap S. and Kumar P. (2012). Structure and function of enzymes of shikimate pathway. Bioinformatic. Vol 7.

38. Sost D. and Amrhein N. (1990). Substitution of Gly-96 to Ala in the 5-Enolpyruvylshikimate 3- Phosphate Synthase of *Klebsiella pneumoniae* results in a greatly reduced affinity for the herbicide glyphosate. Archeology and Biochemistry and Biophysics. 282:433-436.

39. Barry G.L., Francis G., Kishore K. and Murthy G. (1998). Glyphosate tolerant plants. Patent Search. 5: 776- 760.

40. Fillatti J.J., Kiser R. and Comai L. (1987). Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene in to tomato using a binary Agrobacterium tumefaciens vector. Biotechnology. 5: 726-730.

41. Padgett S.R., Kolacz K.H., Delannay X., Re D.B., La Vallee B.J., Peschke V.M., Nida D.L., Taylor N.B. and Kishore G.M. (1995). Development, identification and characterization of a glyphosate tolerant soybean line. *Crop Science*. 35: 1451-1461.
42. Liang A., Shah J., Lu W., Chen M., Li L., Jin Dan, Yongliang Y., Jin W., Ping S., Zhang W., Wang Y. and Lin M. (2008). A single residue mutation of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Pseudomonas stutzeri* enhances resistance to the herbicide glyphosate. *Biotechnology Letter*. 30:1397-1401.
43. Baerson S.R., Rodriguez D.J., Tran M., Feng Y., Biest N.A. and 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.
44. Dill G. (2005). Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*. 61:219-224.
45. Kang K., Jin Y., Jeon H., Park S., Song D., Lee J., Pan C. and Kim M. (2010). The three proline residues (P25, P242, and P434) of *Agrobacterium* CP4 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase are crucial for the enzyme activity. *Plant Biotechnology Report*. 4: 329-334.
46. Kahrizi D., Salmanian A.H. Afshari A. and 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.
47. Li J., Meng X., Zong Y., Chen K., Zhang H., Liu J. and Li J. (2016). Gene replacements and insertions in rice by intron targeting using CRISPR-Cas9. *National Plants*. 2, 16139.
48. Dong Y., Jin X., Tang Q., Zhang X., Yang J., Liu X., Cai J., Zhang X., Wang X. and 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.
49. Zhao T., Lin C. and 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.
50. Tian Y.S., Xu J., Peng R.H., Xiong A.S., Xu H. and Zhao W. (2013). Mutation by DNA shuffling of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from *Malus domestica* for improved glyphosate resistance. *Journal of Plant Biotechnology*. 11: 829-838.
51. Chandrasekhar K., Reddy G.M., Singh J., Vani K., Vijayalakshmi M. and 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.
52. Chhakekar S., Raghavendrarao S., Pavan G., Ramakrishna C., Singh V.K. and Phanindra M.L.V. (2015). Transgenic rice expressing a codon-modified synthetic CP4-EPSPS confers tolerance to broad-spectrum herbicide. glyphosate. *Plant Cell Report*. 34: 721-731.
53. Fartyal D., Agarwal A., James D., Borphukan B., Ram B., Sheri V., Yadav R., Manna M., Varakumar P., Achary M.M. and Reddy M.K. (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.

54. Salmanian A.H. and Hemmesi K. (2010). Site-directed mutagenesis, expression and biological activity of *E. coli* 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase gene. Iranian journal of Biotechnology. 4: 224-229.
55. Hummel A.W., Chauhan R.D., Cermak T., Mutka A.M., Vijayaraghavan A., Boyher A., Starker C.G., Bart R., Voytas D.F. and Taylor N.J. (2018). Allele exchange at the EPSPS locus confers glyphosate tolerance in cassava. Plant Biotechnology Journal. 16, pp. 1275–1282 doi: 10.1111/pbi.12868.
56. Mousavi A., Salmanian A.H., Eftekharian Ghamsari M.R. and Parvanian S. (2018). Simultaneous expression of 5-enol pyruvyl shikimate 3-phosphate synthase (*epsps*) and glyphosate oxidoreductase (*gox*) in transgenic canola plants towards enhancing resistance to glyphosate herbicide. Iranian Journal of Plant Biology. Vol. 10, No. 1, 57-66. (In Farsi with English abstract).
57. Nasr Ramzi S., Sohani M.M., Shirzadian K.R., Amini nasab M. and Asghari J. (2018). The reaction of transgenic rice plants containing EPSPS gene to glyphosate. Genetic Engineering and Biosafety Journal. Volume 7, Number 1. 65-78. (In Farsi with English abstract).
58. Nasr Ramzi S., Sohani M.M., Hasani H. and Asghari J. (2012). A stable and simple transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mature embryo using in planta method. Crop Biotechnology Journal. Volume 2, Number 2. 49-62. (In Farsi with English abstract).
59. Nasr Ramzi S., Sohani M.M. and Imanzadeh M. (2014). Optimization of Agrobacterium-mediated transformation efficiency in wheat and rice using a non-tissue culture approach. Genetic Engineering and Biosafety Journal. Volume 2, Number 1. 71-80. (In Farsi with English abstract).
60. Nasr Ramzi S., Sohani M.M., Shirzadian K.R., Amini nasab M. and Asghari J. 2020. Enhancement of glyphosate tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) through mutation induction in EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase). Plant Gene Journal. 22. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2020.100225>.
61. Green J.M. (2018). The rise and future of glyphosate and glyphosate-resistant crops. Pest Management Science. 74: 1035-1039.
62. Dill G., Cajacob C. and Padgett S. (2008). Glyphosate-resistant crop: adoption, use and future considerations. Pest Management Science. 64:326 -331.
63. . Green J.M. and Owen M.D.K. (2011). Herbicide-Resistant Crops: Utilities and Limitations for Herbicide-Resistant Weed Management. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 59(11): 5819–5829.
64. Green J.M. (2009). Evolution of glyphosate-resistant crop technology. Weed Science. 57: 108 -117.
65. Kniss A.R. (2018). Genetically Engineered Herbicide-Resistant Crops and Herbicide-Resistant Weed Evolution in the United States, Author(s): <http://orcid.org/0000-0003-2551>. Weed Science. 66(2): 260-273.
66. Spencer M., Mumm R. and Gwyn J. (2000). Glyphosate tolerant maize line. USA Patent and Trademark Office. 6040497.
67. AgBios. (2009). GM crop database. <http://www.agbios.com>.

68. Leger A. (2005). Risks and consequences of gene flow from herbicide-resistant crops: canola (*Brassica napus* L) as a case study. *Pest Management Science*. 61: 292-300.
69. ISAAA (International Service for the Acquisition of Agribiotech Applications). (2007). ISAAA Briefs 37-2007: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: Available at <http://www.isaaa.org/>.

A Review on Production of Glyphosate-Resistant Plants with Emphasis on Molecular Methods

Sedigheh Nasr Ramzi ^{1*}, Mohammad Mahdi Sohani ², Reza Shirzadian Khorramabad ³

1- Ph.D. Plant Biotechnology. The Guilan University, Iran.

2- Associate Professor. Molecular Biology. The Guilan University, Iran.

3- Assistant Professor. Molecular Genetic. The Guilan University, Iran.

kiana.ramsey@gmail.com

Abstract

Herbicide-resistant plants are one of the most common plants that comprise the majority of the total population of transgenic plants. Glyphosate is an herbicide that controls a wide range of plant species. Position of these herbicides reaction is 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) that only exists in plants and some bacteria. This herbicide was known to be suitable and safe for the environment. However, it can also damage crops in farming systems, therefore, it is used before planting. Today, using genetic engineering techniques, the herbicide-resistant gene was isolated and transferred to different crops. The cultivation of herbicide-resistant crops to is increasing. This study, is a review on studies about herbicide-resistant crops.

Keywords: Biosafety, Glyphosate, Mutagenesis, Weeds, Transgenic Plants.