Development and Molecular Characterization of Lentil Plants (*Lens culinaris* Medik) Tolerant to Chlorsulfuron Herbicide

By:

Nisreen Adnan Al-Quraan.

Supervisor:

Dr. Hanan I. Malkawi

Department of Biological Sciences

Yarmouk University

May. 2001

ABSTRACT

Lentil (*Lens culinaris* Medik) cultivars (Jordan1 & Jordan 2) were sensitized to chlorsulfuron herbicide. Both cultivars have been subjected to three doses of gamma-irradiation (90, 100, and 110 Gray) to develop plants tolerant/resistant to such herbicide. The herbicide tolerant plants as well as the sensitized plants were subjected to Acetolactate synthese (ALS) enzyme assay and polymerase chain reaction (PCR) (Using three primer pairs specific to ALS genes sequences) to reveal the biochemical and the molecular basis of plants tolerancy, resulted from radiation dose increased. The germination time, plant height, seed yield, and the tolerancy to the herbicide have been decreased in both lentil cultivars. Jordan1 cultivars was less sensitive to chlorsulfuron herbicide at all treatments schemes than Jordan 2. ALS enzyme activity in the two lentil cultivars were inhibited by chlorsulfuron. The radiated plants (90 Gy) in both (M1) and (M2) showed a lower level of inhibition to high concentration (250 µg/L) of chlorsulfuron herbicide. These results suggesting an alteration of the expression system of ALS enzyme gene(s) leading to

over production of altered ALS enzyme at the herbicide binding site of enzyme. Amplification of the ALS gene(s) via PCR, suggested a homology between the lentil ALS gene(s) sequences with both the conserved sequences of ALS genes among bacteria, yeast, and plants (when using the first primer pair) and also the ALS genes sequences of *Brassica napus* (when using the second primer pair), but low homology with the *Nicotiana tabacum* SurA and SurB genes sequences (when using the third primer pair). The PCR amplification products with *B. napus* primer pair revealed an alteration at the ALS gene(s) of lentil which conferred tolerancy to the herbicide. All the PCR profiles analysis strongly suggesting that , ALS enzyme expression system in lentil is controlled by at least two gene loci .

استخدام طرق البيولوجيا الجزيئية لتطوير وتشخيص نبات عدس مقاوم للمبيد العشبي كلوروسالفيرون

مقدمة من:

نسرين عدنان طايل القرعان

بكالوريوس علوم حياتية – جامعة اليرموك ١٩٩٨

باشراف الدكتورة:

حنان عيسى ملكاوي

قسم العلوم الحياتية | جامعة اليرموك

أيار (٢٠٠١م)

الخلاصة

يعتبر نبات العدس (*Lens culinaris* Medik) من أهم المحاصيل النباتية في الأردن، حيث أنه نبات غني جداً بالعناصر الغذائية وخاصة البروتين. تقدر مساحة المنطقة المزروعة بالعدس بحوالي (٤١٥٠٠) دونم. لزيادة إنتاج هذا المحصول النباتي وخاصة تحمله ومقاومته للمبيدات العشبية مثل الكلوروسالفيرون (Chlorsulfuron)، تم في هذه الدراسة تطوير نوعين من هذا النبات (أردن ١ و أردن ٢) لزيادة درجة التحمل والمقاومة للمبيد العشبي الكلوروسالفيرون (Chlorsulfuron) من خلال تعريض حبوب العدس من كلا النوعين إلى ثلاث جرعات مختلفة من الإشعاع الجامي (gamma-irradiation) (90, 100, and 110 Gy).

تم دراسة نبات العدس المقاوم للمبيد العشبي والنبات الأصلي الحساس للمبيد عن طريق تطبيق طريقتي، التحليل البيوكيميائي للأنزيم (ALS) وهو الإنزيم المسؤول عن الخطوة الأولى في إنتاج الأحماض الأمينية المتشعبة (الفالين، الليوسين، والأيسوليوسين) والدراسة البيولوجية الجزيئية وخاصة طريقة البولميريز التسلسلي (Polymerase Chain Reaction (PCR)) باستخدام ثلاثة أزواج من البوادئ (Primers) (مطابقة للسلسة النيوكلوتيدية لجين (جينات) أنزيم (ALS) بهدف إثبات الأساس البيوكيميائي والجزيئي لنباتات العدس المقاومة والحساسة للمبيد العشبي من كلا النوعين. وقد وجد أن نسبة الانبات، طول النبات، ناتج الحبوب ودرجة المقاومة للمبيد العشبي تقل بإزدياد الجرعة الاشعاعية لنبات العدس من كلا النوعين إلا أن النوع الأول (أردن ١) قد أظهر حساسية أقل ومقاومة أعلى للمبيد العشبي مقارنة مع النوع الثاني (أردن ٢). أظهرت الدراسة البيوكيميائية للأنزيم (ALS-assay) التأثير التثبيطي الواضح

للمبيد العشبي (Chlorsulfuron) على الأنزيم (ALS) في كلا النوعيـــن (أردن ١ وأردن ٢)، غير أن النباتات المعرضة للجرعة الإشعاعية (90 Gy) في كل مـــن الجيل الأول (M1) والجيل الثاني (M2) أظهرت مقاومة ممـيزة للمبيـد العشـبي (Chlorsulfuron) حتى بوجود تراكيز عالية من المبيد. وهذا يؤدي إلى اسـتنتاج واضح أنه قد حدث تغير (أو طفرة) على المستوى الجيني من خلال الإشـعاع أدى إلى إنتاج عالي من أنزيــم (ALS) المحـورّ (Altered ALS enzyme). أظـهر الانخفاض الواضح في شدة التثبيط للمبيد على فعالية الإنزيم (ALS).

عند دراسة نبات العدس المقاوم للمبيد العشبي ومقارنته مع النبات الحسـلس من خلال تطبيق التفاعل التسلسلي (PCR) لجين الإنزيم (ALS) كان هناك تشـابه في حجم القطع المبلمرة (المضخمة) مما يدل على تشابه في التسلسل القـاعدي أو النيوكلوتيدي بين جين (ALS) في العدس مع كـل مـن السلاسـل النيوكلوتيديـة المحفوظة في نفس الجين (ALS gene(s)) في البكتيريا، الخميرة، والنباتات (من خلال استخدام زوج البوادئ الأول). وكذلك كانت هناك دلائل قويـة تشـير إلـى التشابه في التسلسل النيوكلوتيدي للجين نفسه بين نبات (*Brassica nàpus*) ونبـات العدس (باستخدام زوج البوادئ الثاني)، إلا أن درجة التشابه (بين نبات العـدس ونبات التبغ) كانت منخفضة في التسلسل النيوكلوتيدي لجين (Sur A) و (Sur B) المسؤولة عن صناعة الإنزيم (ALS) في نبات التبـغ (*Nicotiana tabacum* L.) (باستخدام زوج البوادئ الثالث). وقد دلّت نتائج الـ (PCR) عند اسـتخدام زوج البوادئ الثاني (*B. napus* Primer Pair) على حصول تحويـر علـى المسـتوى الجيني للإنزيم (ALS gene(s)) أدى إلى عكس المقاومة المشاهدة للمبيد العشـبي (Chlorsulfuron) وكذلك أشارت نتائج الـ (PCR) من خلال نتائج أزواج البوادئ الثلاثة على أن الجين المسؤول عن صناعة الإنزيم (ALS) فـي نبـات العـدس (*Lens culinaris* Medik) يتحكم به على الأقل موقعين من الجينات.