

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دو فصل نامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱

صاحب امتیاز: انجمن ایمنی زیستی ایران

مدیر مسئول: دکتر بهزاد قره‌یاضی

سردبیر: دکتر منصور امیدی

دبیر هیات تحریریه و اجرایی: مهندس سمیرا کهک

هیات تحریریه

دکتر فضل الله افراز (استادیار، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور)

دکتر منصور امیدی (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)

دکتر علی‌اکبر شاه نجات بوشهری (استاد، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج)

دکتر مسعود توحیدفر (استادیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران)

دکتر بهزاد قره‌یاضی (دانشیار، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی)

دکتر محمد علی ملبوی (دانشیار، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری)

دکتر سید ضیاء الدین میرحسینی (دانشیار، دانشگاه گیلان)

صفحه آرایی: مهندس سمیرا کهک

درجه علمی-پژوهشی مجله مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی طی نامه شماره ۸۹/۱۱/۱۸ مورخه ۸۹/۳/۱۱/۸۹۳۶۴ کمیسیون بررسی

نشریات علمی کشور تایید شده است.

مسئولیت محتوای علمی، اطلاعاتی، اسمای نویسنده(گان) و ترتیب آن‌ها به عهده مکاتبه کننده مقاله است.

دو فصل نامه در ویرایش و تخلیص مطالب آزاد است. درج مطالب به منزله تایید کامل محتوای آن‌ها نیست.

مقالات واردہ مسترد نمی‌شود. نقل مطالب با ذکر مأخذ مجاز است.

نشانی: تهران، انتهای اتوبان همت به سمت غرب، بلوار پژوهش، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری

صندوق پستی ۱۴۹۶۵/۱۶۱

پست الکترونیک: gebs.j.bs@gmail.com .تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۷۵

امور چاپ: مرکز نشر دانشگاهی

تیراز: ۱۰۰۰

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ

مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی

دوفصلنامه علمی-پژوهشی مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، دوره اول، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۱

فهرست مطالعه ها

| | |
|---|---|
| ب | اسامي داوران همکار در اين شماره |
| ج-د | راهنماي نگارش مقاله |
| مقالات | |
| محمدامين الماسي، على حقنظري، ابوبكر مرادي، اسماعيل صابرفر ۱-۸ | به کارگيري روش‌های مختلف تأیید انجام واکنش RT- LAMP جهت تشخیص وبروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV) |
| سعید نوابپور و حسین صبور ۹-۱۴ | غربالگری موتاسیونی آرابیدوپسیس تراریخته در مسیر ژنتیک فعالیت نواحی کنترلی ژن متالوتایونین جو |
| نغمه عبیری، سعید امینزاده، محمدرضا بی‌همتا ۱۵-۲۲ | بهینه‌سازی محیط کشت تولید باکتری بومی گرمادوست <i>Cohnella sp. A01</i> خالص‌سازی آنزیم کیتیناز و بررسی فعالیت قارچ‌کشی آن |
| سیده مائده فیض بخش، مسعود توحیدفر، سید حسن مرعشی، نسرین مشتاقی، مطهره محسن پور، محسن مردی ۲۳-۳۶ | بهینه‌سازی بازیابی و انتقال ژن به لیموترش (<i>Citrusaurantifolia</i>) به کمک اگروباکتریوم و ژن گزارشگر <i>gus</i> |
| سعیده کی ارسلان، سیدالیاس مرتضوی، بهزاد قره‌باضی، سکینه مهرانی ۳۷-۴۲ | استفاده از روش تراریزش تؤام برای انتقال ژن کولین/کسیداز به برنج |
| بنت الهدى مدیرروستا، مسعود توحیدفر، جلال صبا، حسین هداوند ۴۳-۴۸ | ارزیابی تغییرات آنیون‌ها و کاتیون‌های پنبه تراریخته حاوی ژن‌های کیتیناز و <i>cryIAb</i> |
| پیمان نوروزی، مراد جعفری، بهزاد قره‌باضی، محمدعلی ملبوی، محمدرضا رضاپناه ۴۹-۶۲ | بررسی آخرین وضعیت تولید چغندرقند تراریخته مقاوم به آفات در ایران و جهان |

با سپاس از داورانی که در این شماره ما را یاری کردند.

- ۱- دکتر کسری اصفهانی
- ۲- دکتر مسعود توحیدفر
- ۳- دکتر نیراعظم خوش خلق سیما
- ۴- دکتر فاطمه ذاکر تولایی
- ۵- دکتر حسن رهنما
- ۶- دکتر فهیمه شاهین نیا
- ۷- دکتر عباس عالمزاده
- ۸- دکتر بهزاد قره یاضی
- ۹- دکتر محمدعلی ملبوسی
- ۱۰- دکتر پیمان نوروزی

راهنمای نگارش مقاله در مجله مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی

استفاده شود. در موارد خاص (مانند اسامی علمی گونه‌ها) از قلم کج (Italic) استفاده شود.

۱-۳- عنوان: عنوان مقاله باید حداقل ۱۵ کلمه و منعکس کننده محتوای کامل مقاله باشد. قلم نگارش عنوان، B-تیتر با اندازه ۱۴ است.

۲-۳- چکیده فارسی: در این بخش چکیده مقاله باید بیانگر مساله، هدف، روش، نتایج به دست آمده و نتیجه‌گیری کلی از پژوهش باشد و تا حد ممکن نباید از ۳۰۰ کلمه تجاوز کند. لازم است واژه‌های کلیدی (حداکثر ۵ واژه بر اساس حروف الفباء) مرتبط با موضوع پژوهش در پایان چکیده مقاله درج شود.

۳-۳- مقدمه: در این قسمت لازم است پس از معرفی موضوع پژوهش (تعریف مساله) به منابع و پژوهش‌های انجام شده قبلی (داخلی یا خارجی) اشاره شود و همچنین هدف از اجرای پژوهش در پایان مقدمه ذکر شود.

۴-۳- مواد و روش‌ها: در این بخش از مقاله مواد و وسایل به کار رفته، شیوه اجرای پژوهش، طرح آماری و روش‌های شناسایی و ارزیابی به طور کامل با ذکر منبع توضیح داده می‌شوند.

۵-۳- نتایج: نتایج حاصل از پژوهش به صورت متن، جدول و شکل قابل ارائه است. لازم است از تکرار و ارائه ارقام به شکل‌های چندگانه (جدول، نمودار و غیره) اجتناب شود. شکل‌ها در متن مقاله باید به صورت سیاه و سفید ارائه شوند. لازم به ذکر است که شکل‌ها به صورت جداگانه، با فرمت JPG و 300DPI در انتهای مقاله هر کدام در صفحه مجزا آورده شوند. ضمناً در تدوین جدول‌ها باید از رسم خطوط عمودی در داخل جدول پرهیز شود.

هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوطه باشد. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول با استفاده از نماد ستاره (*) در بالا و سمت چپ جمله یا عدد مورد نظر و توضیح در پانوشت جدول در سمت راست با اندازه قلم ۱۰ مشخص می‌شود. عنوان و محتوای جدول‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی تهیه شود و اعداد داخل جدول نیز انگلیسی باشد. عنوان جدول با واژه "جدول"، شماره آن و خط تیره (به صورت ساده نه پرنگ) شروع می‌شود. شکل‌ها باید دارای وضوح و تمایز مطلوب باشند.

عرض شکل‌ها نباید از ۷/۵ سانتی‌متر تجاوز کند. عناوین شکل‌ها به دو زبان فارسی و انگلیسی باید در پایین آن قرار گیرد و با کلمه "شکل"، شماره آن و خط تیره شروع می‌شود. روابط و معادلات در متن مقاله باید شماره‌گذاری شوند و ارجاع به جدول‌ها، شکل‌ها و روابط در متن با شماره مورد یاد شده داخل پرانتز صورت می‌گیرد.

مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی: نشریه‌ای علمی پژوهشی است که توسط انجمن اینمی زیستی ایران منتشر می‌شود. هدف اصلی این مجله اطلاع‌رسانی و نشر دانش روز مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی و چاپ مقاله‌های پژوهشی (Research Paper)، تحلیلی (Short Communication) و کوتاه (Review Paper) (نهیه شده در زمینه‌های مختلف مهندسی ژنتیک و اینمی زیستی). را که قبلاً چاپ نشده یا همزمان به مجلات دیگر فرستاده نشده باشند است. اینمی زیستی به مجموعه‌ای از تدابیر، سیاست‌ها، مقررات و روش‌هایی اطلاق می‌شود که برای تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و پیشگیری از آثار سوء احتمالی کاربرد این فناوری بر تنوع زیستی، سلامت دام، گیاه و محیط زیست بکار گرفته می‌شود. همچنین نتایج پژوهش‌هایی که خلاصه آنها در سمینارها و کنفرانس‌های علمی ارائه شده باشند را با داوری علمی پذیرفته، چاپ و منتشر می‌کند. مسؤولیت صحت و سقم محتوای علمی مقاله و ترتیب نام نویسنده (نویسنده‌گان) بر عهده شخصی است که مقاله را به مجله ارسال می‌کند و کلیه مکاتبات با وی انجام می‌شود. دانشجویان کارشناسی ارشد و دکترا نیز برای ارسال مقاله باید موافقت کتبی استاد (استادان) راهنمای خود را کسب کرده باشند. رعایت موارد زیر در تهیه مقاله ضروری است.

الف- راهنمای تهیه مقاله تحقیقی

روش نگارش: مقالات باید روی کاغذ سفید و بدون آرم و در ابعاد ۲۱×۲۹ سانتی‌متر (A4)، با حفظ ۲/۵ سانتی‌متر حاشیه از هر طرف و ۱/۵ سانتی‌متر فاصله بین سطرها، به صورت تایپ رایانه‌ای و به زبان فارسی تهیه و ارسال شود. محتوای مقاله باید از ۱۵ صفحه تجاوز کند. لازم است مقاله‌ها با نرم‌افزار Word 2003، در محیط ویندوز XP و با قلم B-لوتوس با اندازه ۱۲ برای متن فارسی، با قلم Times New Roman با اندازه ۱۰ برای متن انگلیسی، به صورت معمولی تایپ شده و از طریق پست الکترونیک geneticengineeringandbiosafety@gmail.com به دفتر مجله ارسال شود.

برگه مشخصات مقاله: این قسمت در دو صفحه مجزا (فارسی و انگلیسی) شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی و آدرس پستی و الکترونیکی نویسنده (نویسنده‌گان) خواهد بود.

اجزاء مقاله: قسمت‌های اصلی مقاله به ترتیب عبارتند از: عنوان، چکیده، واژه‌های کلیدی، مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث، سپاسگزاری (اختیاری)، منابع و چکیده به زبان انگلیسی نتایج و بحث ممکن است به صورت توازن یا جداگانه ارائه شود. برای قالب‌بندی تیترها از تیتریندی (Heading) استاندارد MS Word (Heading) استاندارد (Heading)

(In Farsi).

Brown B, Aaron M. 2001. The politics of nature. In: Smith J (Ed.) The rise of modern genomics, 3rd edn. Wiley, New York, 230-257.

کنفرانس

Vojdany P 1996. Importance of in-situ conservation of genetic resources. In: Proceedings of 4th Agronomy and plant breeding congress. Iran, Esfahan Industrial University, 554-573. (In Farsi).

گزارش نهایی طرح پژوهشی

Pasban Eslam B 2004b. Evaluation of physiologic and agronomic characters of oilseed rape cultivars for late season drought resistance. Research final Report. Research, Education and Extension organization. Iran. 83.289.25-27. (In Farsi).

منابع برخط (On-line)

FAO. 2009. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. FAO, Rome, Italy.

۱۰-۳- چکیده انگلیسی(Abstract): چکیده فارسی مقاله باید بهطور کامل به انگلیسی ترجمه و با قلم Times New Roman در انتهای چکیده انگلیسی اندازه ۱۲ و در پایان مقاله درج شود. در انتهای چکیده انگلیسی ترجمه واژه‌های کلیدی فارسی بر اساس حروف الفباء آورده شود. ضمناً نام نویسنده (نویسندهان) نوشته و آدرس آنان آورده شود. عنوان انگلیسی، با قلم Times New Roman بهصورت Bold است.

ب- راهنمای تهیه مقاله مروری

فرستنده مقاله مروری باید نویسنده اول مقاله بوده و در زمینه موضوع مقاله در سطح کشور صاحب نظر باشد. نویسنده اول مقاله لازم است حداقل دو مورد از تحقیقات خود که به موضوع مقاله مربوط بوده، در مجله‌های معتبر علمی-پژوهشی چاپ شده و بیانگر پژوهش‌های نامبرده در پنج سال گذشته باشد، در منابع استفاده کرده باشد.

در مقاله مروری تمامی موارد ذکر شده برای مقاله پژوهشی به استثناء مواد و روش‌ها، نتایج و بحث باید رعایت شود.

ج- راهنمای تهیه مقاله کوتاه

مقاله کوتاه از نظر ارزش علمی و محتوی هم تراز مقاله کامل است و تنها از نظر مطالب ارائه شده، کوتاهتر است و بایستی حداقل در ۴ صفحه و با رعایت تمامی موارد ذکر شده در مقاله پژوهشی و با حذف عنوان‌بندی داخل مقاله (حذف عنوان‌های مقدمه، مواد و روش‌ها، نتایج و بحث) تهیه شود.

۶-۳- بحث: در این قسمت نتایج حاصل از پژوهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و با توجه به هدف پژوهش بحث و نتیجه‌گیری به عمل می‌آید. مقایسه نتایج حاصل از آن با نتایج پژوهش‌های مشابه در منابع داخلی و خارجی در این بخش از مقاله ضروری است. در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را توأمًا تحت عنوان نتایج و بحث ارائه کرد.

۷-۳- پانوشت‌ها با قلم Times New Roman و اندازه ۱۰ تهیه شده و در هر صفحه به صورت مجزا از شماره یک شروع می‌شوند.

۸-۳- سپاسگزاری (اختیاری): در پایان بحث حداقل در چهار سطر می‌توان از افراد و مراکزی که در راهنمایی و یا انجام پژوهش مساعدت کرده و یا در تامین بودجه، امکانات و لوازم پژوهش نقش موثری داشته‌اند تقدیر و سپاسگزاری کرد.

۹-۳- منابع: کلیه منابع مورد استفاده اعم از فارسی و انگلیسی در انتهای مقاله به زبان انگلیسی و به ترتیب حروف الفباء نام خانوادگی نویسنده اول بدون ذکر شماره آورده شود. در انتهای منابع فارسی عبارت (In Farsi with English abstract) قید شود. در متن ارجاع به منابع باید تا حد ممکن از ذکر نام نویسنده (نویسندهان) در شروع جمله خودداری و منابع در انتهای جمله و در پرانتز ارائه شوند و برای جداسازی چند منبع از یکدیگر از نقطه ویرگول (, " استفاده شود. مانند

(Thion et al. 1996; Dodd et al. 2006)

منابع مورد اشاره باید چاپ شده یا با اجازه چاپ (پذیرش شده) باشند و پژوهش‌های چاپ نشده قابل ذکر در لیست منابع نخواهد بود. برای مثال به موارد ذیل اشاره می‌شود.

مقاله علمی پژوهشی

Apel K, Hirt H. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55:373–399.

Beck EH, Heim R, Hansen J. 2004. Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. Journal of Biosciences 29:449–459.

Nazari MR, Maali Amiri R, Ramezanpour SS. 2011. Quantitative assessment of gene expression pattern of sucrose synthase under cold stress condition in chickpea. Modern Genetics Journal 2, 59-69. (In Farsi).

کتاب

Ducke JA. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. Plenum Press, New York, USA, 199-265.

Farshadfar E (1998) Application of quantitative genetics in plant breeding. Razi University Press, Kermanshah, Iran.

به کارگیری روش‌های مختلف تأیید انجام واکنش RT-LAMP جهت

تشخیص ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV)

محمد امین الماسی^{*}، علی حق نظری^۲، ابوبکر مرادی^۳، اسماعیل صابرفر^۴

۱ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۲- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۴- استادیار دانشگاه دانشکده پزشکی بقیه الله

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminalmasi66@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱۹ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

رنگ‌های فلورسنت

کدورت

RT-LAMP

واکنش RT-PCR

ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی (PLRV)

بیماری پیچیدگی برگ سیب زمینی، از بیماری‌های مهم در هزارع سیب زمینی است که باعث کاهش عملکرد و کیفیت غده‌های سیب زمینی می‌شود. این بیماری توسط ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی ایجاد می‌شود. یکی از روش‌های اولیه مدیریت آلودگی در محصولات سیب زمینی، استفاده از غده‌های عاری از ویروس به عنوان غده بدزدی برای کاشت است. روش‌های متعددی جهت تشخیص این ویروس وجود دارند که می‌توان به آزمون‌های سرولوژیک و روش‌های مولکولی اشاره کرد. روش جدیدی جهت تشخیص پاتوژن‌ها است که در این پژوهش جهت تشخیص ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی به کار گرفته شد. به منظور انجام آزمون سرولوژیک، نمونه‌های برگی با عالیم مشابه به ویروس پیچیدگی برگ سیب زمینی از سطح استان زنجان جمع‌آوری شدند. جهت انجام آزمون‌های مولکولی، آر.إن.إ. کل استخراج و واکنش RT-LAMP صورت گرفت. پس روش‌های مختلفی جهت تأیید انجام این واکنش استفاده شدند و واکنش مثبت با دیدن کدورت حاصله، بارگذاری محصول بر روی ژل آگارز و استفاده از رنگ‌های فلورسنت سایبرگرین و اتیدیوم بروماید تأیید شد. از مزایای این روش جدید در مقایسه با سایر روش‌های پیشین می‌توان به سرعت (۷۵ دقیقه)، سهولت و اینمنی آن اشاره کرد.

مقدمه

تأمین کیفیت بالای آنتی سرم جهت اطمینان از آزمایش‌های مهم است اما باید توجه داشت که خالص‌سازی مواد کافی برای تولید آنتی سرم، زمان‌بر و پرهازینه است. اولین موفقیت در تهیه آنتی سرم برای PLRV توسط کوچیما و موری یاما گزارش شد که توانستند آنتی سرم نسبتاً خالصی را بدست آورند (Al-mrabe et al.2009; Alvarez et al.2005). بعد از آن آزمون‌های مختلفی با این روش توسط پژوهشگران صورت پذیرفت. روحانی و استاک-اسمیت (Rowhani & Stace-Smith) (Rowhani et al.1979)، با این روش توانستند خصوصیات این ویروس را مشخص کنند (Rowhani et al.1979). المرابه (Al-Mrabe) و همکارانش، روش الایزای نوترکیب را با استفاده از آنتی بادی نوترکیب V3HCL که با بیوتین نشاندار شده بود، جهت تشخیص PLRV به کار گرفتند و نشان دادند که نتایج حاصل از این روش نسبت به الایزای معمولی دقیق‌تر است (Al-mrabe et al.2009). در سال‌های اخیر استفاده از تکنیک‌های مولکولی برای تشخیص ویروس‌ها، به ویژه برای گواهی غده‌های بذری توسعه یافته است. (Klerks et al.2001).

گیلدو (Gildow) و همکارانش، روش Northern blotting را برای تشخیص این ویروس به کار گرفتند و با استفاده از انتقال آر.ان.‌ر استخراج شده از شته‌های ناقل و گیاهان آلوده به غشای نایلونی و نشاندار کردن با نشانگر توانستند بعد از عکس‌برداری، ویروس را تشخیص دهند (Gildow et al.2000). بیشتر ویروس‌های مهم سیب‌زمینی دارای ژنوم از نوع RNA هستند. بنابراین ساخت رشته مکمل دی‌ان.‌ر (cDNA) توسط آنزیم نسخه‌برداری معکوس، در گذشته برای تشخیص این نوع از ویروس‌ها با استفاده از RT-PCR به کار رفته است (Nie 2006).

سینگ (Singh) این روش را برای تشخیص PLRV به کار گرفت (Singh et al.1995). با این وجود روش RT-PCR چندین عیب مشخص مانند نیاز به ترموسایکلر و مواد خطرناک آشکارساز دارد (Fukuta et al.2003). روش Real-time RT-PCR برای تشخیص عوامل بیماری‌زا است، اما نیاز به تجهیزات و مواد شیمیایی گران قیمت دارد (Caipang et al.2009). مورتیمر-جونز (Mortimer-Jones) و همکارانش این روش را برای تشخیص PLRV به کار گرفتند و دریافتند که با این روش می‌توان پی به کمیت دی‌ان.‌ر برد (Mortimer-Jones et al.2009).

سیب‌زمینی چهارمین محصول مهم دنیا بعد از برنج، گندم و ذرت است که همواره با چندین ویروس در خلال فصل رشد آلوده می‌شود. این ویروس‌ها می‌توانند به صورت مخلوط یا مجزا در مزرعه نمایان شوند (Agindotan et al.2007). ویروس پیچیدگی برگ سیب‌زمینی یا Potato leafroll virus (PLRV) که با نام‌های ویروس لوله‌ای شدن برگ، نکروز بافت آبکشی و نکروز شبکه‌ای سیب‌زمینی نیز شناخته شده است، ویروسی از خانواده Luteoviridae (Gildow et al.2000) و جنس Polerovirus است (Johannes et al.1994). اعضای خانواده Luteoviridae طیف وسیعی از گیاهان دو لپه‌ای و تک لپه‌ای را آلوده می‌کنند و اغلب در بافت آبکشی تکثیر می‌یابند. Physalis oridana از جنس سولانا سیب‌زمینی (Solanum Lycopersicum esculentum Datura stramonium tuberosum) (Guyader et al.2002) محدود می‌شود (Guyader et al.2002). ویروس PLRV سبب پیچیدگی برگ، کلروز و کوتاه‌قادی در گیاهان می‌شود. همچنین در بعضی واریته‌ها سبب علامت تیپیکی به نام نکروز شبکه‌ای می‌شود که سبب مرگ انتخابی و آسیب سلول‌ها در بافت آبکشی غده‌ها می‌شود (Alvarez et al.2005). این ویروس از طریق پیوند، کاشت غده آلوده و شته‌ها منتقل می‌شود اما با عصاره گیاهی نمی‌تواند انتقال یابد. انتقال توسط شته به طریق پایا و چرخه‌ای به وسیله تغذیه از آوند آبکشی صورت می‌گیرد (Guyader et al.2002). شته‌هایی مانند شته سبز هللو Macrosiphum persicae (Myzus persicae) (Acyrthosiphon solani) (euphorbiae) و شته پنجه روباهی (Singh et al.1995) این ویروس به شمار می‌روند. مهرین ناقلين این ویروس به شمار می‌رسانند (Zhang et al.2011).

جهت کنترل این بیماری، اولین قدم تشخیص ویروس است و از آنجایی که علاوه بر بیماری‌های ویروسی به هم شباخت زیادی دارند، تشخیص دقیق و درست ویروس مورد نظر در امر کنترل مهم است. روش‌های بر پایه آنتی بادی به ویژه الایز، آنتی بادی‌های مونوکلونال یا پلی‌کلونال یا ترکیبی از هر دو به کار می‌گیرند.

محل نمونه برداری در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

۲- آزمون سرولوژیک

به منظور شناسایی ویروس PLRV، آزمون سرولوژیک بر روی نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از آنتی‌سرم چند همسانه‌ای PLRV (تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) به روش الیزای ساندویچی (DAS-ELISA) و بر اساس روش کلارک و آدامس ۰/۱ (Clark *et al.* 1977) (Clark & Adams) انجام شد (Clark & Adams) گرم بافت برگی در هاون چینی با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری، عصاره‌گیری شد. عصاره حاصل تا زمان ریختن در چاهک‌های پلیت در یخچال نگهداری شد. ابتدا (IgG) مورد نظر به نسبت توصیه شده توسط کمپانی سازنده (۱/۱۰۰۰) در بافر پوششی رقیق و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آن در چاهک‌های پلیت ریخته شد. پلیت به مدت دو الی چهار ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شد. پس از گذشت زمان لازم پلیت تخلیه و سه بار (هر بار به مدت سه دقیقه) با بافر شستشو شسته شد. سپس پلیت به طور کامل خشک شد و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های گیاهی از قبل آماده شده شامل نمونه‌های شاهد مثبت (ایزوله PLRV-C تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس)، شاهد منفی (نمونه فاقد ویروس تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) و بافر عصاره‌گیری در چاهک‌ها ریخته شد. پلیت موردنظر به مدت یک شب در چهار درجه سانتی گراد قرار گرفت. روز بعد پلیت به روش ذکر شده در قبل شسته و این بار پس از خشک کردن کامل پلیت، ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای متصل شده به آنزیم آلkalین فسفاتاز رقیق شده در بافر Conjugate به چاهک‌ها اضافه و پس از آن پلیت به مدت چهار ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور قرار داده شد. پس از شستشو و خشک کردن پلیت همانند قبل مقدار ۶/۵ میلی‌گرم پارانیتروفنیل فسفات را که سوبسترات آنزیم آلkalین فسفاتاز است در ۶/۵ میلی‌لیتر بافر سوبسترا حل کرده و به اندازه ۱۰۰ میکرولیتر از آن به هر چاهک اضافه شد. برای مشاهده تغییر رنگ پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از گذشت ۳۰ الی ۴۵ دقیقه تغییر رنگ چاهک‌ها با چشم غیرمسلح بررسی و مشاهده شد.

AmpliDet RNA multiplex Klerks (Klerks) و همکارانش جهت تشخیص PLRV در سیب‌زمینی‌های بذری به کار گرفته شد. در این روش خطر آسودگی در خلال تشخیص به دلیل انجام واکنش در تیوب درسته حذف می‌شود و وجود ویروس در نمونه‌ها با استفاده از نشانگرهای رنگی انتخاب شده برای یک توالی خاص صورت می‌گیرد (Klerks *et al.* 2001). اخیراً توانایی سیستم تکثیر بر پایه توالی اسیدنوکلئیک (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification) برای تشخیص مستقیم PLRV در غده‌های سیب‌زمینی نیز ثابت شده است که قادر به تشخیص حساس‌تر و سریع‌تر در مقایسه با تکنیک‌های استفاده شده قبلی است (Leone *et al.* 1997). روش LAMP توسط نوتومی (Notomi) و همکارانش معرفی شده، قادر است اسیدنوکلئیک را با کارایی بسیار زیاد در یک دما (۶۰-۶۵) با اختصاصیت بالا تکثیر کند. در این روش از ۴ آغازگر اختصاصی که ۶ ناحیه مشخص از توالی ژن هدف را شناسایی می‌کنند، استفاده می‌شود. آنزیم مورد استفاده در این روش، Bst DNA پلیمراز است که دارای خاصیت جایگزینی رشته و مقاوم به حرارت است (Nagamine *et al.* 2002; Notomi *et al.* 2000).

در این پژوهش روش RT-LAMP برای تشخیص این ویروس برای اولین بار انجام شد. تأیید انجام واکنش علاوه بر کدورت حاصل از تشکیل رسوب پیروفسفات منیزیم، توسط بردن محصول بر روی ژل آگارز و استفاده از رنگ‌های فلورسنت SYBR® Premix Ex Taq™ و اتیدیوم بروماید نیز صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌برداری و نحوه انتخاب نمونه‌ها
 طی سال زراعی ۱۳۸۹-۹۰ از مناطق عملده سیب‌زمینی کاری استان زنجان، نمونه‌برداری به عمل آمد و برگ بوته‌های با علایمی مانند زردی برگ، لوله‌ای شدن برگ، کاغذی شدن برگ و کوتولگی بوته، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. به علت حضور ویروس در آوند آبکش، در مورد هر بوته مشکوک به بیماری، ساقه‌های متنه‌ی به برگ و برگ‌ها جمع‌آوری شدند. تعداد ۱۴۵ نمونه برگی در کیسه‌های پلاستیکی به طور جداگانه و با ذکر

مؤسسه Bioreba سویس) و شاهد منفی (RNA کل بافت برگی Bioreba گیاه سیب زمینی عاری از ویروس تهیه شده از مؤسسه Bioreba سویس) بودند. لازم به توضیح است که ایزوله ویروس موردنظر ایزوله کانادایی (PLRV-C) بود و از آنجا که تشخیص بر اساس ژن بسیار حفاظت شده پوشش پروتئینی صورت می‌گرفت که در کل ایزوله‌ها وجود داشت، نوع ایزوله دارای اهمیت چندانی نبود. جهت انجام واکنش در ابتدا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۰/۰۲ میلی‌مولار RNA کل، ۰/۰۴ میلی‌مولار dNTP، ۰/۰۶ میلی‌مولار DDT، ۰/۰۲ میلی‌مولار RNasin، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر FIP، ۰/۰۶ میلی‌مولار آغازگر BIP، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر، ۰/۰۴ میلی‌مولار آغازگر LB، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر F3، ۰/۰۲ میلی‌مولار آغازگر B3، ۰/۰۸ میلی‌مولار بتایین، ۰/۰۴ میلی‌مولار MgSO₄، ۰/۱ میلی‌مولار بافر (Bst(10X) و ۰/۱ میلی‌مولار آب استریل) در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه قرار گرفت و بعد از این مدت ۰/۲ میلی‌مولار آنزیم

۳- استخراج آر. ان. ا. کل از برگ‌های سیب زمینی آلوه

استخراج آر. ان. ا. کل به روش روحانی (Rowhani) و همکارانش انجام شد (Rowhani *et al.* 1979). در پایان مرحله استخراج، رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (شرکت سیناژن، ایران) حل شد و در دمای ۷۰-درجه سانتی‌گراد تا قبل از استفاده قرار گرفت.

۴- آزمون RT-LAMP

طراحی آغازگرها جهت انجام تست RT-LAMP بر اساس ژن پوشش پروتئینی (CP) ویروس موردنظر با شماره شناسایی PrimerExplorer Genbank: U73777.1 V3 (نرم‌افزار online ویژه جهت طراحی آغازگرهای LAMP) صورت گرفت (جدول ۱). واکنش RT-LAMP به طور همزمان و یک مرحله‌ای با استفاده از آر. ان. ا. به عنوان الگو در یک تیوب انجام شد. شاهد مثبت (آر. ان. ا. ایزوله PLRV-C تهیه شده از

جدول ۱- آغازگرهای الیگونوکلوتیدی برای ژن پوشش پروتئین ویروس PLRV برای انجام واکنش RT-LAMP

Table 1- Oligonucleotide primers used for RT-LAMP of coat protein gene of PLRV

| Primer آغازگر | Type نوع | Position موقعیت | Length طول | Sequence توالی |
|------------------|--|------------------------|---------------|---|
| F3 | Forward outer پیشرو خارجی | 61-78 | 18 nt | AGAAGGCAATCCCTTCGC |
| B3 | Backward outer پیشرو خارجی | 245-264 | 20 nt | GGTGAAACTCCTTGGGTGT |
| FIP | Forward inner پیشرو داخلی | 139-159 and 79-96 | 43 nt | GCCTCCTCTGCGTCTTCG TTTAGGCGCGCTAACAGAGT T |
| BIP | Backward inner پیشرو داخلی | 161-182 and 223-241 | 45 nt | ATGCCGCTCAAGAAGAACT GGTTTCCACGAGGTTGTCCT TTGT |
| LF | Loop forward outer پیشرو حلقه‌ای خارجی | 97-118 | 22 nt | CCGTGACCATAACCACTGGCT G |
| LB | Loop backward outer پیشرو حلقه‌ای خارجی | 191-210 | 20 nt | GAGGACGAGGCTAAGCGAG |

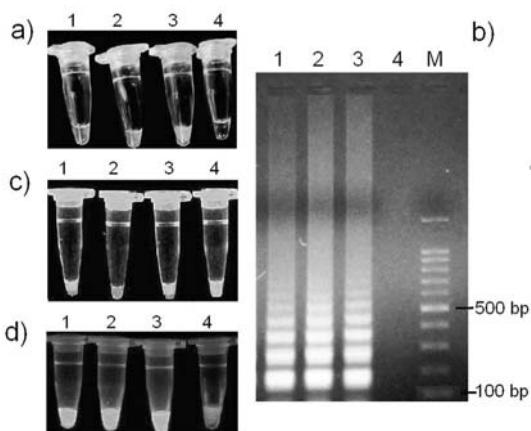
به گونه‌ای که هر اشتباه کوچکی به هنگام انجام آن موجب اخلال در کار می‌شود. زمان بر بودن یکی دیگر از معایب این روش است به طوری که نیاز به ۲ روز کار مداوم و پشت سر هم دارد. شاید بتوان گفت یکی از برتری‌های این روش عدم نیاز به استخراج آر.ان.ا است. واکنش RT-LAMP یک مرحله‌ای نیز با استفاده از آر.ان.ا به عنوان الگو انجام شد. واکنش مثبت با خارج کردن تیوب‌ها و دیدن کدورت حاصل شده تأیید شد (شکل ۲a). طبق بررسی انجام شده توسط نوتومی (Notomi) و همکارانش، در ۲۵ واکنش LAMP مقدار ۱۰ میکروگرم یا بیشتر، دی.ان.ا در میکرولیتر از مخلوط واکنش تولید می‌شود، بنابراین یون پیروفسفات تولید شده با منیزیم واکنش داده و رسوب ایجاد می‌کند که به دنبال آن کدورت مشاهده می‌شود. در حالی که عملکرد واکنش زنجیرهای پلیمراز در تولید دی.ان.ا ۰/۲ میکروگرم در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش است و در نتیجه میزان یون پیروفسفات به حدود ۰/۰۲ میلی مولار می‌رسد که در نتیجه قادر به تولید رسوب پیروفسفات منیزیم نیست و بنابراین در تکثیر دی.ان.ا بوسیله پی.سی.آر هیچ رسوبی مشاهده نمی‌شود. به علاوه پیروفسفات در دمای بالا هیدرولیز می‌شود، به همین دلیل در واکنش زنجیرهای پلیمراز به علت استفاده از دمای بالا جهت و اسرشت سازی پیروفسفات هیدرولیز می‌شود. برخلاف واکنش LAMP که در یک دمای پیوسته (۶۰ درجه سانتی گراد) انجام می‌گیرد، در واکنش زنجیرهای پلیمراز چرخه‌های دمایی را داریم که خود مانع جهت انجام واکنش پیروفسفات با منیزیم هستند. همبستگی مثبتی بین سنتز دی.ان.ا و کدورت وجود دارد. با افزایش سنتز دی.ان.ا در واکنش LAMP، کدورت نیز به صورت خطی افزایش می‌پابد. نتایج پژوهش حاضر با نتایج سایر پژوهشگران نشان داد که کدورت سنجه، نیاز به استفاده از روش‌های تشخیصی را حذف می‌کند که خود این مسئله سبب صرفه‌جویی در هزینه و زمان می‌شود (Nagamine et al. 2002; Leone et al. 2000). همچنین با بردن محصول واکنش بر روی ژل آگارز ۱ درصد و الکتروفورز آن، الگوی نرdbانی شکل دیده شد که ناشی از تولید قطعات با اندازه‌های مختلف است (شکل ۲b). کدورت و الکتروفورز، روش‌های تأیید مولکولی برای LAMP هستند زیرا در آغاز واکنش LAMP ایجاد ساختاری با دو

M-Mulv RT ۰/۰۴ میلی مولار آنزیم *Bst* DNA پلیمراز اضافه شد و واکنش در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ دقیقه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه ادامه یافت (تمام دماها یک سیکلی بودند). به محض اتمام واکنش تیوب‌ها خارج گشت و کدورت حاصل از واکنش مثبت مشاهده شد. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول به همراه یک مارکر نرdbانی (Gene Ruler, TM 100bp DNA Ladder) در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی (Avidiyom) بر ماید با دستگاه ژل داک عکس برداری شد. علاوه بر این جهت تأیید انجام واکنش RT-LAMP از رنگ فلورسنت SYBR® Premix Ex Taq™ I (ساخت شرکت تاکارا، ژاپن) نیز استفاده شد. از این رنگ مقدار ۱۱۵ μl به ۱۰ μl از محصول واکنش RT-LAMP اضافه شد و بعد از یک ورتكس کوتاه، تیوب‌ها زیر نور UV قرار داده شدند. واکنش مثبت با تغییر رنگ از قرمز به سبز مشاهده شد. واکنش مثبت با بکارگیری رنگ Avidiyom بر ماید بهینه شده به ۱۱۵ μl از محصول اضافه شد و تیوب‌ها زیر نور UV قرار داده شدند.

نتایج و بحث

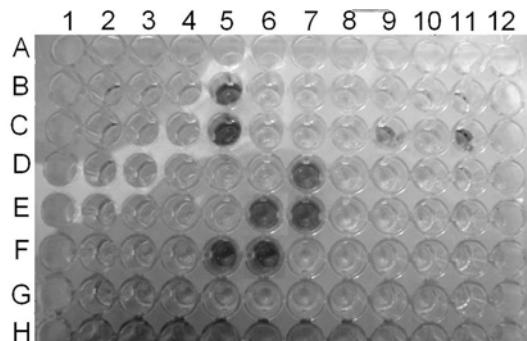
بعد از جمع آوری نمونه‌ها، در اولین قدم جهت تشخیص نمونه‌های آلوده به ویروس و اطمینان از حضور ویروس در آنها، آزمون الایزا انجام شد و از بین نمونه‌های آزمایش شده، دو نمونه مثبت مشخص شد که بر اساس شماره‌ای که از قبل داده بودیم، مثبت مشخص شد که بر اساس شماره‌ای که از قبل داده بودیم، PLRV10 و PLRV16 بودند (شکل ۱). مشاهدات چشمی با توجه به رنگ نمونه‌ها نشان دهنده غلطت بالای ویروس در نمونه‌ها بود و به علت وضوح بالای تغییر رنگ در نمونه‌ها، عملاً نیازی به استفاده از دستگاه ELISA Reader نبود. این نتایج مشابه با نتایج بدست آمده توسط دیگر پژوهشگران بود (Al- (mrabeh et al. 2009; Leone et al. 1997; Rowhani et al. 1979) روش الایزا یک آزمون سرولوژیک بر پایه اتصال آنتی‌بادی و آنتی‌ژن است که هزینه بالای تهیه آنتی‌سرم یکی از مشکلات این روش است. علاوه بر این، روش حاضر نیاز به دقیق بالای دارد

غیراختصاصی در این واکنش، استفاده از این رنگ‌ها مدنظر دانشمندان نیست زیرا به باندهای غیراختصاصی نیز متصل می‌شوند. در حالی که در واکنش LAMP به دلیل اطمینان از اختصاصی بودن واکنش و عدم وجود باندهای غیراختصاصی، استفاده از مواد فلورسانس در این واکنش در حال افزایش است. مزیت استفاده از رنگ‌های فلورسن特، عدم نیاز به الکتروفورز بر روی ژل و کاهش زمان تشخیص است. مشاهده کدورت ناشی از رسوب پیروفسفات منیزیم یک روش تشخیص سریع است که سبب بالارفتن سرعت تشخیص (75 دقیقه)، اینمی‌بala، سهولت کار و کاهش هزینه‌ها (عدم نیاز به ترموسایکلر و الکتروفورز) می‌شود. همچنین حساسیت و اختصاصیت این روش نسبت به



شکل ۲- تأیید انجام واکنش (a) RT-LAMP کدورت حاصل از تشكیل رسوب پیروفسفات منیزیم (b) نتایج حاصل از الکتروفورز SYBR[®] بر روی ژل آگارز (c) استفاده از رنگ فلورسانس (d) استفاده از رنگ فلورسانس اتیدیوم TaqTM I Premix Ex. بروماید. خطوط و تیوب ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب نمونه C، PLRV-C، PLRV10 و نمونه عاری از ویروس و M مارکر ۱۰۰ bp استند.

Figure 2- Confirm of RT-LAMP reaction. (a) Electrophoresis of the RT-LAMP product on agarose gel (b) Turbidity due to the formation of precipitate of magnesium pyrophosphate. (c) Using Ethidium Bromide fluorescence dye. (d) Using SYBR[®] Premix Ex TaqTM I fluorescence dye. Lines and tubes 1, 2, 3 and 4 are respectively: PLRV-C, PLRV10, PLRV16 and free virus sample; M: 100 bp marker.



شکل ۱- نتایج آزمون الایزا. به ترتیب چاهک های 5B, 7D, 6F نمونه های شاهد مثبت (PLRV-C)، چاهک های 6D, 9F, 8E نمونه های شاهد منفی، چاهک های 5C, 5F, 7E نمونه های PLRV10 و چاهک های 6E, 9C, 11C نمونه های PLRV16 هستند.

Figure 1- The results of ELISA assay. The slots are respectively: 6F, 7D and 5B positive control (PLRV-C); 8E, 9F, and 6D negative control; 7E, 5F and 5C PLRV10; 11C, 9C and 6E PLRV16.

حلقه در انتهای قطعه تولید شده بوسیله آغازگرهای BIP و FIP برای ادامه واکنش لازم است و در صورت عدم اتصال حتی یکی از آغازگرهای ساختار حلقه ای ایجاد نشده و به دنبال آن واکنش LAMP نیز انجام نمی‌گیرد و در نهایت هیچگونه کدورت و الگوی نرdbانی شکل نیز مشاهده نمی‌شود. همچنین از آنجایی که آغازگرهای خیلی اختصاصی هستند و با همدیگر در تولید محصول عمل می‌کنند، امکان تولید قطعات غیراختصاصی در این واکنش صفر است و بنابراین کدورت و الگوی نرdbانی تأییدی مطمئن در واکنش LAMP هستند (Nie 2006). مشاهده واکنش مثبت با استفاده از رنگ فلورسن特 SYBR[®] Premix Ex TaqTM I در زیر نور UV، نشان داد که تیوبی که تکثیر در آن صورت گرفته بود، به رنگ سبز و تیوبی که تکثیری در آن رخ نداده بود قرمز رنگ است (شکل ۲c). این نتایج مشابه با نتایج به دست آمده از زهانگ (Zhang) و همکارانش بود (Zhang et al. 2011). واکنش مثبت با اضافه کردن مستقیم اتیدیوم بروماید بهینه شده در زیر نور UV نیز دیده شد که با نتایج تسایی (Tsai) و همکارانش مطابقت داشت (Tsai et al. 2009) (شکل ۲d). لازم به توضیح است که رنگ‌های فلورسانس فوق، در واکنش زنجیرهای پلیمراز نیز می‌توانند استفاده شوند اما گاهی به دلیل وجود باندهای

سادگی، سرعت، ایمنی، اختصاصیت بالا، حساسیت بالا و هزینه پایین تاکنون توانسته از جایگاه برتری در مقایسه با دیگر روش‌های تشخیصی برخوردار شود (Nagamine *et al.* 2002; Notomi *et al.* 2000).

روش‌های تشخیصی قبلی بیشتر است که آن هم به آغازگرهای بسیار اختصاصی طراحی شده آن مربوط می‌شود. در کل می‌توان گفت که روش LAMP از زمان پیدایش خود از سال ۲۰۰۰ توسط نوتومی (Notomi) به دلیل ویژگی‌های ممتاز خود از جمله

منابع

- Agindotan BO, Shiel PJ, Berger PH. 2007. Simultaneous detection of potato viruses, PLRV, PVA, PVX and PVY from dormant potato tubers by taqman® Real-time RT-PCR. Journal of Virological Methods 142:1–9.
- Al-mrabeh A, Ziegler A, Cowan G, Torrance L. 2009. A fully recombinant ELISA using in vivo biotinylated antibody fragments for the detection of potato leafroll virus. Journal of Virological Methods 159:200–205.
- Alvarez JM, Srinivasan R. 2005. Evaluation of hairy nightshade as an inoculum source for aphid-mediated transmission of potato leafroll virus. Journal of Economic Entomology 98:1101–1108.
- Caipang CMA, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. 2009. Detection of *francisella piscicida* in atlantic cod (*gadus morhua l*) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. The Veterinary Journal 184:357–361.
- Clark MF, Adams AN. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses The Journal of General Virology 34:475–483.
- Fukuta S, Iida T, Mizukami Y, Ishida A, Ueda J, Kanbe M, Ishimoto Y. 2003. Detection of japanese yam mosaic virus by RT-LAMP. Archives of Virology 148:1713–1720.
- Gildow FE, Reavy B, Mayo MA, Duncan GH, Woodford JA, Lamb IW, Hay RT. 2000. Aphid acquisition and cellular transport of potato leafroll virus like particles lacking p5 readthrough protein. Phytopathology 90:1153–1161.
- Guyader S, Ducray DG. 2002. Sequence analysis of potato leafroll virus isolates reveals genetic stability, major evolutionary events and differential selection pressure between overlapping reading frame products. The Journal of General Virology 83:1799–1807.
- Johannes FJM, Heuvel VD, Verbeek M, Van Der Wilk F. 1994. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *myzus persicae* The Journal of General Virology 75:2559–2565.
- Klerks MM, Leone GOM, Verbeek M, Heuvel JFJM, Schoen CD. 2001). Development of a multiplex amplidet rna for the simultaneous detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tubers. Journal of Virological Methods 93:115–125.
- Leone G, Schijndel HB, Gemen B, Schoen CD. 1997. Direct detection of potato leafroll virus in potato tubers by immunocapture and the isothermal nucleic acid amplification method NASBA. Journal of Virological Methods 66:19–27.
- Mortimer-Jones SM, Jones MG, Jones RA, Thomson G, Dwyer GI. 2009. A single tube, quantitative Real-time RT-PCR assay that detects four potato viruses simultaneously. Journal of Virological Methods 161:289–296.
- Nagamine K, Hase T, Notomi T. 2002. Accelerated reaction by loop mediated isothermal amplification using loop primers. Molecular and Cellular Probes 16:223–229.
- Nie X. 2006. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification of DNA for detection of potato virus Y. Plant Disease 89:605–610.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Research 28:e63.
- Rowhani A, Stace-Smith R. 1979. Purification and characterization of potato leafroll virus. Virology 98:45–54.
- Singh RP. 1999. A solvent-free, rapid and simple virus RNA-release method for potato leafroll virus detection in aphids and plants by reverse transcription polymerase chain reaction. Journal of Virological Methods 83:27–33.
- Singh RP, Kurz J, Boiteau G, Bernard G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. Journal of Virological Methods 55:133–143.
- Tsai SM, Chan KW, Hsu WL, Chang TJ, Wong ML, Wang CY. 2009. Development of a loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of ORF virus. Journal of Virological Methods 157:200–204.
- Van der wilk F, Huisman MJ, Cornelissen BGC, Huttinga H, Goldbach R. 1989. Nucleotide sequence and organization of potato leafroll virus genomic RNA. FEBS Letters 245:51–56.
- Zhang J, Zhang GH, Yang L, Huang R, Zhang Y, Jia K, Yuan W, Li SJ. 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. The Veterinary Journal 187:393–396.

غربالگری موتاسیونی آراییدوپسیس ترا ریخته در مسیر ژئوتک فعالیت

نواحی کنترلی ژن متالوتایونین جو

سعید نواب پور^{*}^۱ و حسین صبوری^۲

۱- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گندم

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: s.navabpour@gau.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۶/۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

جو زراعی
نوترون پرسرت
موتاپیون
پیشبر متابولوتایینین
ژن گاس

به منظور بررسی تغییرات عوامل انتقال پیام در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین جو از روش غربالگری موتاسیونی استفاده شد. با شناسایی ناحیه پیشبر ژن مزبور در گیاه جو و ترکیب آن با ژن گزارشگر گاس، انتقال ترکیب حاصل به گیاه مدل آراییدوپسیس صورت گرفت. بدور M_0 ترا ریخته حاصله توسط ۴ دوز (۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ واحد) نوترون پرسرت بمباران شدند. بر اساس نتایج آماری در یک طرح کاملاً تصادفی ترکیب شیمیایی تری آمینوترازیول (3-AT) در غلظت (3-AT) در غلظت ۲۰ میلی مولار به عنوان بهترین محرك فعالیت ژن گاس (پیشبر متالوتایونین) شناسایی شد. گیاهچه های نسل M_2 ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی با 3-AT ۲۰ میلی مولار برای تفرق نسبت ۳ به ۱ بیان ژن گاس با کمک روش سنجش بیوشیمیایی پروتئین گاس ارزیابی شدند. از مدل ممانعت که نسبت ۷۵ درصد بیان گاس و ۲۵ درصد عدم بیان را شامل می شد، جهت شناسایی عوامل کنترلی استفاده شد. طی چندین نوبت ارزیابی تعداد ۳۰ گیاهچه ۱۵۰۰ لاین جهیده M_2 بررسی شد. در نهایت ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسب برای جهیده مورد نظر در مسیر فعالیت پیشبر مزبور معرفی شد. ترکیب لاین های کاندید شامل ۳، ۹، ۵ و ۳ بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ واحد نوترون پرسرت بودند. لاین های مزبور جهت بررسی دقیق تر با استفاده از روش طیف سنجی فعالیت پروتئین گاس مورد ارزیابی قرار گرفته و به عنوان جهیده های احتمالی در مسیر فعالیت پیشبر ژن متالوتایینین جهت انجام پژوهش های بعدی معرفی شدند.

مقدمه

ژنهای گزارشگر^۶ بسیار مفید و مؤثر است (Fukuzawa *et al.* 2004).

معرفی جهیده‌های *cpr1* و *npr1* آراییدوپسیس که با استفاده از پیشبر ژن *PRla* که با ژن گزارشگر *gus* ترکیب شده بودند، از Cao *et al.* 1994; Glazebrook 1997 مانع بیان ژن مقاومت PR به عامل بیماری زا شده و افزایش حساسیت به بیماری را موجب می‌شود. در مقابل جهیده *cpr1* با تداوم بیان پروتئین PR مقاومت پایداری را ایجاد می‌کند. استفاده از جهیده‌های مزبور منجر به معرفی مسیرهای کترول ژنتیک توسط اسید سالیسیک به عنوان یک عامل انتقال پیام شد (OLD and Primrose 1994; Pieterse and Van Loon 1999). در این پژوهش پیشبر ژن متالوتاییونین در گیاه جو شناسایی و پس از همسانه سازی ضمن ترکیب با ژن گزارشگر *gus*، به گیاه مدل آراییدوپسیس منتقل شد. بذور جهیده M2 به منظور یافتن نسبت جهشی^۷ ۳ به ۱ (برای بیان و عدم بیان *gus*) در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر مزبور ارزیابی شدند.

مواد و روش‌ها

بذور M₀ گیاهان تواریخته آراییدوپسیس (رقم کلمبیا) واجد پیشبر متالوتاییونین ترکیب شده با ژن گزارشگر گاس توسط چهار دوز نوترон پرسرعت (d)، پرتوتابی شدند. دوزهای اعمال شده شامل ۲۰، ۳۰ و ۴۰ گری^۸ بود. با کشت بذور M₀ در شرایط اتاق رشد کترول شده، بذور M₁ برداشت و پس از آن بذور M₁ جداگانه کشت و بذور M₂ به طور جداگانه برداشت شدند. با ارزیابی تصادفی گیاهان M₂ از تأثیر پرتوتابی در بروز جهش اطمینان حاصل شد. بازهای از عوامل شیمیایی احتمالی فعال کننده پیشبر متالوتاییونین (بیان ژن گاس) مورد ارزیابی قرار گرفت و در نهایت ترکیب تری آمینوتراپیزول (3-AT) به عنوان بهترین محرك شناسایی شد. غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی مولار مورد استفاده قرار گفت. با انجام یک سری آزمایش‌های تکرار دار و تجزیه و تحلیل آماری مشخص شد نتایج حاصل از اثر (3-AT) بر بیان

گروه ژنهای متالوتاییونین (MTs) رمز کننده پروتئین‌های با خصوصیاتی چون وزن مولکولی پائین، غنی از اسید آمینه سیستئین، وفور در محیط سلولی و اغلب اندامکها و وجود یک Colye یا چند ناحیه حساس در واکنش به یون‌های فلزی هستند (Cobbett Goldsbrough. 2002; Zhou *et al.* 2005). از حدود ۵۰ سال گذشته که متالوتاییونین از کلیه موجودات مختلف پست و عالی شناسایی شده‌اند (Chatthai *et al.* 2004; Liu *et al.* 2000). تقسیم‌بندی‌های متفاوتی بر اساس ساختمان و نوع فعالیت این چهار پروتئین صورت گرفته است (Akashi *et al.* 2004; Wong *et al.* 2004) در عین حال شواهد انکار ناپذیری دال بر نقش این ژن در کمک به بقای سلول در مرحله پیری به منظور امکان انتقال مواد و ماکرومولکول‌ها به اندام‌های ذخیره‌ای بهویژه دانه گزارش شده است (Navabpour *et al.* 2003). بررسی نواحی ژن متالوتاییونین در برخی موجودات از جمله انسان، موش، مخمر و آراییدوپسیس با ژن گزارشگر گاس *et al.* 2003; Navabpour *et al.* 2003; Wong *et al.* 2004). (Haq *et al.* 2004).

استفاده از غربالگری جهشی یک روش قوی جهت شناسایی و در پی آن همسانه کردن ژن یا گروهی از ژنهای از در سطح پیش رونویسی^۹ فعالیت می‌کند، است. در اساس در بیشتر موارد امکان شناسایی ژنهایی که به عنوان عوامل انتقال پیام^{۱۰} یا عوامل رونویسی^{۱۱} عمل می‌کنند، با استفاده از روش‌های مرسوم مولکولی مثل روش شناسایی تفرقی^{۱۲} یا دورگسازی کاهشی^{۱۳} وجود ندارد (Hsing *et al.* 2007; Lee *et al.* 2005). در عین حال روش غربالگری موتاسیونی معمولاً روشی طولانی و وقت‌گیر است، به منظور افزایش کارآیی و سرعت عمل در این روش استفاده از

1 -Pre-transcription

2 -Signaling factors

3 -Transcription factors

4 -Differential screen

5 -Subtractive hybridization

6 -Reporter gene markers

7 -Pathogen resistance

8 -Grays

سانتریفیوژ شد. ۱۰ میکرولیتر از محلول فوکانی برداشت و با ۴۴ میکرولیتر بافر سنجش گاس به خوبی مخلوط شد. واکنش با افزودن مقدار ۵۰ میکرولیتر متیل آمیلی فریل گلوکورناید (MUG) (MUG) ۱۰ mM آغاز شد. توضیح اینکه ترکیب MUG بوسیله فعالیت آنزیم ژن گاس به MU و X-Gluc تجزیه می‌شود. ترکیب MU یک ماده فلورسنت بوده و توسط فلورسنت اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. بالا بودن میزان MU نشان دهنده فعالیت بالاتر گاس بوده که به نوبه خود نشانه فعالیت پیشبر متالوتایونین است. میزان جذب براساس طول موج برانگیختگی ۳۶۵ نانومتر توسط Prink Elmer 3000 Fluorescence (Spectrometer) اندازه گیری شد. نتایج بر حسب منحنی استاندارد بر حسب واحد (nmoles MU/min/mg protein) تنظیم شد.

نتایج و بحث

تعداد ۳۰ گیاهچه از حدود ۱۵۰۰ لاین M_2 با استفاده از روش سنجش بیوشیمیابی گاس برای نسبت ۳ به ۱ (فعالیت و عدم بیان ژن گاس) ارزیابی شد. از مدل ممانعت (Inhibition Model) در جهت شناسایی جهیده‌های مورد نظر استفاده شد (شکل ۱). نتایج بررسی آماری در قالب طرح کاملاً تصادفی به منظور تعیین بهترین سطح غلظت (3-Amino-1,2,4-Triazole) ۳-AT در دو شرایط اتفاق رشد (A: 22 ± 2 درجه سلسیوس و B: 22 ± 2 درجه سلسیوس) نشان داد که غلظت ۲۰ میلی مولار در شرایط A بهترین و یکنواخت‌ترین نتایج را برای القاء فعالیت پیشبر متالوتایونین فراهم می‌آورد. ترکیب ۳-AT به عنوان یک محدود کننده فعالیت آنزیم کاتالاز معرفی شده است (Sanchez-Casas and Klessig 1994). آنزیم کاتالاز در فرآیند احیا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) به آب و اکسیژن نقش مهمی دارد (Kindle 1982). بر این اساس به نظر می‌رسد کنترل سطح H_2O_2 در روند تحریک فعالیت گاس و به بیان دقیق‌تر القای فعالیت پیشبر متالوتایونین، نقشی کلیدی دارد. در روند انجام غربالگری به منظور افزایش دقت، لاین‌های جهیده‌ای که شانس احتمالی داشتند طی ۴ مرحله ارزیابی شدند و در نهایت تعداد ۲۰ لاین به عنوان کاندید مناسبی برای داشتن جهیده دلخواه در مسیر فعالیت پیشبر متالوتایونین شناسایی شد. ترکیب تعداد لاین‌های کاندید شامل ۳، ۴، ۵ و ۳ بود که به ترتیب

گاس در گیاه کامل شباهت قابل توجهی به روند بیان آن در گیاهچه‌های مربوطه دارد، بر این اساس به منظور سرعت عمل بیشتر از گیاهچه‌های نسل M_2 استفاده شد. تعداد ۳۰ گیاهچه ۲۰ روز پس از کشت، توسط محلول پاشی AT-3 با غلظت ۲۰ میلی مولار تیمار شد. میزان فعالیت ژن گاس ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی توسط روش بیوشیمیابی برای نسبت ۳ به ۱ (بیان و عدم بیان گاس) ارزیابی شد.

سنجدش بیوشیمیابی فعالیت گاس^۹

نمونه‌های برگ به طور جداگانه در محلول بافر X-Gluc (باfer Fسفات سدیم ۵۰ mM، ۱mM X-Gluc، ۱۰۰X-تیریتون، فریسیاناید پتاسیم ۴ mM و کلروم فنیک ۱۰۰ g/mL) قرار گرفت. در همین وضعیت به مدت ۴ دقیقه اینفیلتر^{۱۰} شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس بافر حذف شد و اتانول مطلق به منظور از بین بردن رنگ سبز برگ‌ها جایگزین شد. پس از ۲۴ ساعت اتانول حذف و گلیسرول ۵۰٪ جایگزین شد و در نهایت میزان فعالیت گاس (میزان رنگ آبی ظاهر شده) با لنز بزرگ‌نما بررسی شد. هم‌چنین در صد سلول‌های مرده نیز به وسیله میکروسکوپ فلئورسنت ارزیابی شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت مارکر گاس ژن^{۱۱}

سنجدش میزان فعالیت آزیمی ژن گاس که نشان دهنده میزان فعالیت پیشبر متالوتایونین است، توسط روش جفرسون و همکاران (Jefferson et al. 1987) با تغییراتی به شرح زیر انجام شد.

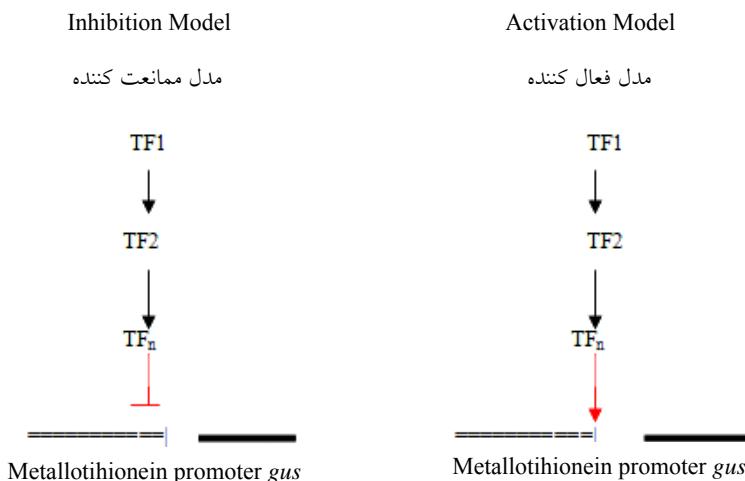
نمونه کوچک بافت برگ گیاه کامل جهیده‌های (M_2) کاندید (انتخابی با استفاده از سنجش بیوشیمیابی) برداشت و میزان ۵۰۰ mM میکرولیتر بافر سنجش گاس (باfer سدیم ۵۰ mM (pH=۷/۲)، ۱۰ EDTA، ۱۰ سارکوزیل^{۱۲} درصد، تیریتون ۱۰۰ بار ۱/۰ درصد، ۱۰ mM اضافه و به طور یکنواخت مخلوط شد. مخلوط هموژنیزه با دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه

9 - Histochemical analysis

10 - In filter

11 - Fluorometric analysis of β-glucuronidase activity

12 - Sarcosyl



شکل ۱- مدل‌های فرضی روش ارزیابی فعالیت پیشبر ژن متالوتایینین. در مدل ممانعت (Inhibition Model) در آخرین مرحله با جلوگیری از ساخت عامل رونویسی بیان ژن رخ می‌دهد و در مدل فعال کننده (Activation Model) در مرحله آخر با ساخت عامل رونویسی فعالیت پیشبر محقق می‌شود.

Figure 1. Putative models for expression of metallothionein promoter. In the inhibition model transcription changes result in lifting the repression and in activation model transcription changes that result in the activation.

کاندیدهای خوبی برای انجام بررسی‌های بیشتر d₃₀ و (5) d₂₀(10) مولکولی و پژوهش‌های بیوانفورماتیک هستند. نتایج پژوهش‌های برخی پژوهشگران نشان داده است که تجزیه و تحلیل پیشبر ژن متالوتایونین ترکیب شده با ژن نشانگر گاس پیچیده بوده و توسط عوامل مختلف درون سلولی و محرک‌های خارجی تحریک می‌شود (Lü et al.2007; Obertello et al.2007). براساس نتایج پژوهش‌های رن و ژو (۲۰۰۹) این مسئله به دلیل وجود عناصر همسوساز ^{۱۳} در نواحی کنترلی ژن متالوتایونین است (Ren 2009 and Zhao).

مریبوط به اعمال تیمارهای با غلظت ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ واحد نوترون پرسعت (d) بودند.

لاین‌های مزبور برای انجام بررسی دقیق‌تر تا مرحله گیاه کامل با مراقبت ویژه نگهداری شدند. در مرحله حداکثر رشد رویشی (آغاز گلدهی) با نمونه‌برداری از ۳۰ گیاه کامل هر لاین، طیف سنجی میزان MU صورت گرفت. نتایج مربوط در جدول ۱ برای هر یک از ۲۰ لاین کاندید انتخابی ارائه شده است. چنانچه اشاره شد محدوده نسبت ۳ به ۱ برای بیان GUS (مقدار نسبتاً بالای MU) به عدم بیان (مقدار نسبتاً پایین MU) می‌تواند دلیل موجه‌ی بروقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک بیان ژن متالوتایونین تلقی شود.

تعداد ۵ جهیده که با علامت ستاره در جدول ۱ مشخص شده است با اطمینان آماری معنی داری ($\alpha=1\%$) نسبت ۳ به ۱ را برای میزان MU (فعالیت گاس) و عدم بیان گاس نشان می دهد. این مسئله نشانگر شناس بیشتر این جهیده ها برای وقوع جهش مغلوب در مسیر ژنتیک فعالیت پیشبر ژن متالوتایونین است. بر این اساس جهیده های مزبور به نسل بعد برده شده و ارزیابی های انجام شده و یکنواختی نتایج به دست آمده نشان داد دو جهیده

غروبالگری موتاسیونی آراییدوپسیس ترا را بخته در مسیر ژنتیک...

جدول ۱- میزان بیان ژن گاس (nmoles MU/min/mg protein) در جهیده های تراویخته نسل M₂ گیاه آراییدوپسیس ۴۸ ساعت پس از محلول پاشی با ۳-AT (۲۰ میلی مولار)

Table 1- Levels of GUS expression (nmoles MU/min/mg protein) in *Arabidopsis* M₂ Leaves 48 hour after sprayed by 3-AT (20 mM)

| شماره مورثات | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Mut. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | AT | T | | | | |
| 30 | 29 | 28 | 27 | 26 | 25 | 24 | 23 | 22 | 21 | 20 | 19 | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | AT | T | | |
| 73 | 37 | 71 | 68 | 25 | 60 | 27 | 57 | 59 | 78 | 71 | 69 | 76 | 25 | 79 | 70 | 59 | 61 | 80 | 28 | 71 | 63 | 71 | 59 | 30 | 78 | 70 | 69 | 61 | 53 | 59 | 7 | d ₁₀ (1) | |
| 63 | 59 | 60 | 40 | 63 | 68 | 59 | 62 | 60 | 61 | 60 | 31 | 65 | 70 | 59 | 32 | 61 | 62 | 69 | 59 | 64 | 56 | 65 | 30 | 65 | 70 | 59 | 41 | 66 | 67 | 57 | 9 | d ₁₀ (2) | |
| 62 | 70 | 59 | 25 | 67 | 66 | 26 | 59 | 63 | 60 | 62 | 64 | 63 | 61 | 60 | 70 | 61 | 63 | 66 | 70 | 59 | 63 | 29 | 62 | 68 | 25 | 60 | 65 | 61 | 59 | 63 | 11 | d ₁₀ (3) | |
| 65 | 60 | 62 | 63 | 62 | 61 | 60 | 63 | 39 | 62 | 61 | 59 | 70 | 59 | 65 | 37 | 59 | 67 | 61 | 62 | 60 | 33 | 59 | 60 | 40 | 63 | 59 | 66 | 63 | 62 | 59 | 8 | d ₂₀ (1) | |
| 60 | 69 | 59 | 61 | 65 | 27 | 61 | 60 | 62 | 65 | 63 | 42 | 60 | 64 | 61 | 62 | 31 | 60 | 59 | 70 | 62 | 60 | 47 | 63 | 59 | 60 | 60 | 29 | 65 | 67 | 58 | 7 | d ₂₀ (2) | |
| 61 | 67 | 65 | 70 | 64 | 63 | 59 | 61 | 59 | 59 | 64 | 60 | 40 | 60 | 63 | 61 | 62 | 63 | 60 | 41 | 65 | 62 | 60 | 59 | 33 | 59 | 31 | 60 | 59 | 61 | 67 | 9 | d ₂₀ (3) | |
| 59 | 62 | 59 | 27 | 61 | 60 | 30 | 68 | 62 | 60 | 31 | 62 | 59 | 63 | 60 | 39 | 62 | 59 | 40 | 59 | 61 | 31 | 62 | 63 | 29 | 68 | 64 | 62 | 59 | 56 | 9 | d ₂₀ (4)* | | |
| 63 | 69 | 60 | 60 | 44 | 68 | 59 | 62 | 60 | 61 | 60 | 66 | 65 | 70 | 59 | 64 | 68 | 60 | 69 | 29 | 64 | 59 | 65 | 25 | 65 | 70 | 59 | 30 | 66 | 67 | 67 | 11 | d ₂₀ (5) | |
| 65 | 63 | 68 | 63 | 60 | 64 | 64 | 59 | 61 | 59 | 40 | 68 | 60 | 67 | 68 | 63 | 36 | 64 | 63 | 60 | 62 | 33 | 63 | 65 | 62 | 29 | 65 | 63 | 65 | 60 | 67 | 10 | d ₂₀ (6) | |
| 70 | 60 | 65 | 61 | 69 | 61 | 65 | 63 | 64 | 63 | 61 | 63 | 71 | 62 | 63 | 59 | 67 | 41 | 66 | 63 | 68 | 60 | 61 | 68 | 31 | 59 | 62 | 29 | 59 | 62 | 62 | 11 | d ₂₀ (7) | |
| 73 | 68 | 71 | 68 | 63 | 60 | 27 | 67 | 59 | 71 | 71 | 69 | 62 | 60 | 25 | 70 | 59 | 61 | 72 | 67 | 71 | 63 | 71 | 59 | 61 | 29 | 70 | 69 | 61 | 30 | 60 | 8 | d ₂₀ (8) | |
| 63 | 59 | 60 | 60 | 63 | 68 | 40 | 62 | 60 | 61 | 60 | 61 | 65 | 70 | 59 | 64 | 29 | 62 | 69 | 59 | 64 | 33 | 65 | 31 | 65 | 70 | 59 | 61 | 66 | 67 | 58 | 9 | d ₂₀ (9) | |
| 62 | 70 | 31 | 61 | 67 | 66 | 30 | 59 | 63 | 60 | 27 | 64 | 63 | 65 | 30 | 70 | 61 | 63 | 66 | 21 | 59 | 63 | 64 | 62 | 25 | 59 | 60 | 65 | 26 | 59 | 61 | 11 | d ₂₀ (10)* | |
| 65 | 60 | 62 | 63 | 62 | 22 | 60 | 63 | 59 | 62 | 61 | 30 | 70 | 59 | 65 | 31 | 59 | 67 | 61 | 29 | 28 | 62 | 59 | 27 | 61 | 63 | 25 | 66 | 63 | 62 | 63 | 12 | d ₃₀ (1)* | |
| 60 | 69 | 59 | 61 | 65 | 64 | 61 | 60 | 62 | 65 | 63 | 66 | 60 | 29 | 61 | 62 | 68 | 60 | 59 | 70 | 62 | 60 | 61 | 63 | 59 | 60 | 60 | 30 | 65 | 67 | 66 | 11 | d ₃₀ (2) | |
| 68 | 67 | 65 | 70 | 64 | 63 | 70 | 61 | 41 | 71 | 64 | 60 | 68 | 60 | 63 | 61 | 62 | 63 | 67 | 64 | 65 | 33 | 64 | 69 | 60 | 31 | 65 | 60 | 71 | 61 | 68 | 11 | d ₃₀ (3) | |
| 73 | 62 | 65 | 73 | 61 | 67 | 63 | 68 | 62 | 64 | 68 | 62 | 66 | 27 | 65 | 70 | 68 | 72 | 62 | 68 | 70 | 61 | 72 | 62 | 63 | 65 | 68 | 31 | 62 | 69 | 65 | 10 | d ₃₀ (4) | |
| 63 | 69 | 66 | 64 | 40 | 68 | 70 | 62 | 70 | 36 | 63 | 66 | 65 | 32 | 31 | 64 | 69 | 65 | 69 | 70 | 64 | 30 | 65 | 63 | 65 | 28 | 67 | 65 | 66 | 27 | 61 | 12 | d ₃₀ (5)* | |
| 69 | 61 | 63 | 70 | 68 | 66 | 72 | 63 | 67 | 61 | 64 | 69 | 66 | 70 | 61 | 66 | 30 | 73 | 68 | 63 | 65 | 72 | 66 | 63 | 68 | 65 | 70 | 67 | 25 | 68 | 69 | 11 | d ₄₀ (1) | |
| 72 | 70 | 68 | 63 | 71 | 62 | 35 | 66 | 36 | 68 | 65 | 71 | 63 | 69 | 63 | 67 | 65 | 31 | 70 | 62 | 72 | 30 | 63 | 63 | 67 | 67 | 70 | 26 | 64 | 68 | 60 | 73 | 9 | d ₄₀ (2)* |
| 73 | 69 | 64 | 65 | 69 | 65 | 63 | 67 | 63 | 64 | 29 | 62 | 65 | 65 | 68 | 66 | 63 | 66 | 64 | 28 | 64 | 70 | 64 | 68 | 64 | 66 | 68 | 63 | 65 | 27 | 78 | 12 | d ₄₀ (3) | |

داده های پیرینگ شنآن دهنده کامپیوچنی دار بیان گاس (MU) است. d_{10} , d_{20} , d_{30} و d_{40} به ترتیب شنآن دهنده دوز پرینتینگ یوتیرون بر سرعت شامل ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۴۰ واحد است.

علاقه مسنا بر روی جوییده های انتخابی که شناسن پیشتری برای احراز نسبت ۱:۳ دارند درج شده است. مقادیر MU در دو شاهد منفی (آب) و مثبت (AT-3) بر روی گیاه ترا ریخته شاده اند.

Bold digits show a significant decline in GUS expression (MU) d_{10} , d_{20} , d_{30} and d_{40} are dosage of fast neutron radiation correspondingly to 10, 20, 30 and 40 grays.

The star sign (*) show M₂ mutants that have more chance for 3:1 ratio. The amount of MU presented in negative control (water) and in positive control (3-AT) on non-disposal transgenic *Arabidopsis* plant in 2_{nd} and 3_{rd} column respectively.

منابع

1. Akashi K. Nishimura N. Ishida Y. Yokota A (2004) Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. Biochemical and Biophysical Research Communications 323: 72–78.
 2. Cao H. Bowling S.A. Gordon A.S. and Dong X.N (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired-resistance. Plant Cell 6: 1583–1592.
 3. Chatthai M. Osusky M. Osuska L. Yevtushenko D. Misra S (2004) Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco. Planta 220:118–128.
 4. Cobbett C. Goldsbrough P (2002) Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. Annual Review of Plant Biology 53: 159–182.
 5. Coyle P. Philcox J.C. Carey L.C. Rofe A.M (2002) Metallothionein: the multipurpose Protein.

- Cellular and Molecular Life Sciences 59: 627–647.

 6. Fukuzawa H. Yu L.H. Umeda-Hara C. Tagawa M. Uchimiya H (2004) The rice metallothionein gene promoter does not direct foreign gene expression in seed endosperm. *Plant Cell Report* 23: 231–235
 7. Glazebrook J (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280–286.
 8. Haq F. Mahoney M. Koropatnick J (2003) Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research* 533: 211–226.
 9. Hsing Y.I. Chern C.G. Fan M.J. Lu P.C. Chen K.T. Lo S.F. Sun P.K. Ho S.L. Lee K.W. Wang Y.C. Huang W.L. Ko S.S. Chen S. Chen J.L. Chung C.I. Lin Y.C. Hour A.L. Wang Y.W. Chang Y.C. Tsai M.W. Lin Y.S. Chen Y.C. Yen H.M. Li C.P. Wey C.K. Tseng C.S. Lai M.H. Huang S.C. Chen L.J. Yu S.M (2007) A rice gene activation/knockout mutant resource for high throughput functional genomics. *Plant Molecular Biology Reporter* 63: 351–364.

10. Jefferson R.A. Kavanagh T.A. Bevan M.W (1987) GUS fusions:bglucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
11. Kindle H. Lazarow (eds) P.B (1982) Peroxisomes and glyoxisomes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 385: 1-550.
12. Lee J.Y. Levesque M. Benfey P.N (2005) High-throughput RNA isolation technologies. New tools for high-resolution gene expression profiling in plant systems. *Plant Physiology* 138: 585–590.
13. Liu J.Y. Lu T. Zhao N.M (2000) Classification and nomenclature of plant metallothionein-like proteins based on their cysteine arrangement patterns. *Acta Botanica Sinica* 42:649–652.
14. Lü S. Gu H. Yuan X. Wang X. Wu A.M. Qu L. Liu J.Y (2007) The GUS reporter-aided analysis of the promoter activities of a rice metallothionein gene reveals different regulatory regions responsible for tissuespecific and inducible expression in transgenic Arabidopsis. *Transgenic Research* 16: 177–191.
15. Navabpour S. Morris K. Allen R. Harrison E. Mackerness S. and Buchanan-Wollaston V (2003) Expression of senescence –enhanced genes in response to oxidative stress. *Experimental Botany* 54(391) :2285 -2292.
16. Obertello M. Wall L. Laplaze L. Nicole M. Auguy F. Gherbi H. Bogusz D. and Franche C (2007) Functional analysis of the metallothionein gene cgMT1 isolated from the actinorhizal tree Casuarina glauca. *Mol. Plant Microbe Interact* 20: 1231-1240.
17. OLD R.W. and Primrose S.B (1994) Principles of gene manipulation and introduction to genetic engineering P 474.
18. Pieterse C.M.J. and Van Loon L.C (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Sciences* 4: 52-58.
19. Ren Y. and Zhao J (2009) Functional analysis if the rice metallothionein gene OsMT2b promoter in transgenic *Arabidopsis* plants and rice germinated embryos. *Plant Sciences* 176: 528-538.
20. Sanchez-Casas P. and Klessig D.F (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiology* 106: 1675-1679.
21. Vasak M. Hasler D (2000) Metallothioneins: new functional and structural insight. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 177–183.
22. Wong H.L. Sakamoto T. Kawasaki T. Umemura K. Shimamoto K (2004) Down-regulation of Metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. *Plant Physiology* 135: 1447–1456.
23. Zhou G.K. Xu Y.F. Liu J.Y (2005) Characterization of a rice class II metallothionein gene: tissue expression patterns and induction in response to abiotic factors. *J. Plant Physiology* 162: 686–696.

بهینه‌سازی محیط کشت تولید باکتری بومی گرمادوست

حالص‌سازی آنژیم کیتیناز و بررسی فعالیت *Cohnella sp. A01*

قارچ‌کشی آن

نغمه عبیری^۱، سعید امین‌زاده^{۲*}، محمدرضا بی‌همتا^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست‌فناوری

۲- استادیار پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست‌فناوری

۳- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminzade@nigeb.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

اثر ضدقارچی
حالص‌سازی آنژیم
فعالیت آنژیمی
کیتیناز

کیتین جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت پوستان بوده دیواره سلولی بیشتر قارچ‌ها، بعضی از جلبک‌ها و نماتدها را تشکیل می‌دهد. کیتینازها از آنژیم‌هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. باکتری‌ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند، اصولاً آنها از کیتین به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. در این پژوهش جهت بررسی حداقل تولید آنژیم کیتیناز پنج نوع محیط کشت مختلف مورد بررسی قرار گرفت. آنژیم کیتیناز از این سوبهی بومی ایران (*Cohnella sp. A01*) که توانایی تولید کیتیناز را دارد، حالص‌سازی شد. باکتری بعد از کشت اولیه به محیط پیش‌کشت منتقل شد. بعد از ۲۴ گذشت ۲۴ ساعت باکتری به پنج محیط کشت مختلف که همگی حاوی کیتین کلوئیدی به عنوان جزء اصلی بودند، جهت تولید کیتیناز منتقل شد. بیشترین تولید آنژیم مربوط به تیماری بود که شامل $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ۰.۰۵٪ و ۰.۱٪ Agar بود. سنجش فعالیت آنژیم کیتیناز به کمک معرف رنگی ۳ و ۵ دی‌نیترو سالیسیلیک اسید و رسوب‌دهی پروتئین‌ها توسط آمونیوم سولفات انجام شد. بعد از رسوب‌دهی پروتئین‌ها با آمونیوم سولفات میزان فعالیت آنژیمی افزایش یافت. حداقل عملکرد این باکتری برای تولید آنژیم کیتیناز در این پنج نوع محیط کشت تولید با کمک نرم‌افزار SAS در طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. اثر مهارکنندگی آنژیم نسبتاً خالص‌سازی شده کیتیناز بر روی تعدادی از قارچ‌هایی که عوامل بیماری‌زای گیاهی محسوب می‌شوند نیز مورد بررسی قرار گرفت و اثر مهارکنندگی (ضد قارچی) آنژیم کیتیناز بر روی چهار قارچ بیماری‌زای گیاهی ثابت شد.

مواد و روش‌ها

مقدمه

کیتین، (GlcNAc) poly- β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine دومین بیopolymer فراوان در طبیعت بعد از سلولر و جزء اصلی کوتیکول حشرات و پوسته سخت‌پوستان است. کیتین، دیواره سلولی بیشتر قارچ‌ها و بعضی از جلبک‌ها و نماتدها را تشکیل می‌دهد (Flach *et al.*, 1992; Gooday, 1996). تولید کیتین و N-acetylglucosamine مواد تجزیه شده از آن مانند chitooligosaccharides هزینه بالا، فرآیند محلود و پیچیده‌ای است (Simpson *et al.*, 1994; Martinou *et al.*, 1995; Aloie *et al.*, 1996; Keyhani *et al.*, 1999; Khor, 2002; Tharanathan *et al.*, 2003). کیتینازها یکی از آنزیم‌هایی هستند که نقش تجزیه کیتین نامحلول را بر عهده دارند. باکتری‌ها کیتیناز را برای هضم کیتین تولید می‌کنند، اصولاً آنها از کیتین به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند (Wiwat, 1999). کیتیناز از خانواده آنزیمی E.C 3.2.1.14 (Hidroliz پوندهای β -1,4- β -D-glucosamine در کیتین و کیتین دکسترن انجام می‌دهد. از کیتیناز می‌توان در کترل بیماری‌های قارچی در گیاهان و حشرات استفاده کرد (Patil *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). در بخش کشاورزی، اثرهای بیولوژیک ضد قارچی در کیتینازهای مختلف که توسط میکروارگانیسم‌ها تولید شده‌اند، بسیار حائز اهمیت هستند (Tang *et al.*, 2001). این اثرها به هیدرولیز کیتین در دیواره سلولی قارچ مربوط می‌شود (Sietsma *et al.*, 1979; Fleuri *et al.*, 2005).

در این پژوهش آنزیم کیتیناز از باکتری بومی Cohnella SP. A01 تولید و خالص‌سازی شد. این باکتری که از خانواده Bacillus و نژاد Paenibacillaceae است یک باکتری مقاوم به گرمای است. نشان داده شده است که این باکتری بعد از قرار گرفتن در Nutrient agars در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در TS در دمای ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس به خوبی رشد می‌کند. این رشد خوب در دمای ۵۵ درجه سلسیوس نیز صورت می‌گیرد (Ash *et al.*, 1994). در ادامه اثر مهارکنندگی این آنزیم بر روی سه قارچ آفت گیاهی بررسی شده است.

تولید کیتیناز
کشت اولیه در محیط کشت زیر انجام شد. Trace element 0.1%, Yeast extract 0.5%, Tryptone 1%, Pepton 0.03%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.07%, KH₂PO₄ 0.03%, CaCl₂.7H₂O 0.013%, MgSO₄.7H₂O 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, Agar 2%, Glucose 0.2%, Colloid Chitin 0.5% (Zarei *et al.*, 2011).

برای تهیه Trace element از ترکیبات زیر استفاده شد. ZnSO₄.7H₂O 0.014%, MnSO₄.2H₂O 0.016%, FeSO₄.7H₂O 0.05%, CoCl₂ 0.02%

بعد از کشت اولیه باکتری به محیط پیش‌کشت متصل شد. برای محیط پیش‌کشت از ترکیبات زیر استفاده شد. Trace element 0.1%, Yeast extract 0.5%, Tryptone 1%, Pepton 0.03%, NaCl 0.5%, K₂HPO₄ 0.07%, KH₂PO₄ 0.03%, CaCl₂.7H₂O 0.013%, MgSO₄.7H₂O 0.05%, (NH₄)₂SO₄ 0.1%, Agar 0.2%, Glucose 0.2%, Colloid Chitin 0.5% (Zarei *et al.*, 2011).

بهینه‌سازی محیط کشت تولید باکتری Cohnella sp. A01 جهت تولید حداکثر آنزیم کیتیناز

جهت بررسی حداکثر تولید کیتیناز توسط باکتری Cohnella sp. A01 در محیط کشت تولید، پنج نوع محیط کشت تولید با اجزای مختلف مورد بررسی قرار گرفت. تمامی محیط کشت‌ها شامل موارد زیر بودند.

Colloid Chitin 0.25%, K₂HPO₄ 0.035%, Trace element 0.05%, Yeast extract 0.015%, Pepton 0.015%, NaCl 0.05%, MgSO₄.7H₂O 0.025%, KH₂PO₄ 0.015% (Zarei *et al.*, 2011).

pH ۷/۸ تمامی محیط کشت‌های تهیه شده به ۷/۵ رسانده شد. بعد از تهیه محیط‌های تولید، ۴ml از محیط پیش‌کشت حاوی باکتری Cohnella sp.A01 که ۲۴ ساعت در محیط پیش‌کشت رشد کرده بود به این پنج محیط تولید متفاوت اضافه شد و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز بر روی یک

جدول ۱- تیمارهای متفاوت استفاده شده در پنج نوع محیط کشت تولید برای بررسی حداقل تولید آنزیم کیتیناز

Table 1- Different treatments used in five media with the objective of achieving the maximum production of Chitinase

| نام Culture | محیط کشت تولید | تیمارهای متفاوت محیط کشت | منبع Source |
|----------------|--|---|---|
| 1 | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05% | نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیمها) | Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme) |
| 2 | (NH ₄)NO ₃ 0.1%. | نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) | Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) |
| 3 | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05%, Agar 0.1% | نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیمها) | Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme) |
| 4 | Agar 0.1%, CaCl ₂ .7H ₂ O 0.0065%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05% | نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیمها) و کلسیم (کوفاکتور برخی آنزیمها) | Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme) and calcium (cofactor of some enzymes) |
| 5 | (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05%, NaCl 0.25% (افزایش) | نیتروژن (شامل آمینواسیدها و نوکلئیک اسیدها) و سولفور (شامل انواع کوآنزیمها) | Nitrogen (including amino acids and nucleic acids) and sulfur (including coenzyme) |

واحد فعالیت آنزیمی به صورت تشکیل یک میکرو مول N-acetylglucosamine در شرایط سنجهش در نظر گرفته شد.

شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

سنجهش فعالیت آنزیم کیتیناز

حالص سازی نسبی توسط آمونیوم سولفات در دمای ۴ درجه سلسیوس، آمونیوم سولفات به محلولی که از ساتریفیوژ محیط کشت (روشنوار) بدست آمد، اضافه شد و به

سنجهش فعالیت آنزیمی به کمک معرف رنگی ۳ و ۵ دی نیترو سالیسیلیک اسید یا DNS (1gr DNS, 30gr Potassium sodium tartrate, 1.6 gr NaOH Miller) به روش (1959) انجام شد. یک

جدول ۲- پنج قارچ مورد بررسی در این پژوهش

Table 2- plant pathogenic fungus

| | |
|-------------------------|--|
| Rhizoctonia solani | قارچ عامل بیماری شیت بلایت برنج و مرگ گیاهچه لوپیا The fungi responsible for Sheath blight of Rice and seedling death of Bean |
| Bipolaris sp. | عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج |
| Botrytis cinerea | عامل بیماری کپک خاکستری |
| Macrophomina phaseolina | عامل بیماری پوسیدگی زغال چوب |
| Alternaria brassicocola | عامل بیماری سوختگی کلزا Responsible for burn Rapeseed disease |

و محیط کشت تولید به ترتیب به دیسک‌های یک تا چهار در شرایط استریل اضافه شد. در مرحله بعد پتری‌ها در دمای اتاق و دور از نور، انکوبه شده تا زمانی که رشد کلنی، دیسک‌های کترل را پوشانده و در عین حال یک هلال در اطراف دیسک حاوی آنزیم با خاصیت ضد قارچی پیدید آورد (Lam *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000; et al., 2000).

تجزیه آماری

داده‌های بدست آمده در این پژوهش در یک طرح کاملاً تصادفی SAS Institute, (SAS) (CRD) با سه تکرار با استفاده از نرم‌افزار (SAS Institute, 1994) تجزیه آماری شدند. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از پنج تیمار محیط کشت تولید در سه تکرار محاسبه شد. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تولید آنزیم کیتیناز توسط باکتری *Cohnella SP. A01* در پنج نوع محیط کشت تولید

پس از سه روز رشد باکتری *Cohnella SP. A01* در پنج نوع محیط کشت تولید با اجزای متفاوت، سنجش آنزیمی نمونه‌ها در سه تکرار انجام شد و میزان جذب در ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد.

مدت یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده و سپس در ۱۷۰۰۰g به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب بدست آمده در حداقل ممکن بافر (باfr- base ۲۰ میلی مولار با pH = ۸/۵) حل شد. سپس محلول حاصل در کیسه دیالیز (با اندازه ۱۰ kDa) ریخته و دیالیز شد. کیسه دیالیز حاوی محلول ۲۰ Tris- base به درون ارلن بزرگی که حاوی دو لیتر بافر (باfr- base ۲۰ میلی مولار با pH = ۸/۵) بود؛ انتقال داده شد. بافر هر ۱۲ ساعت تعویض شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت و از بین رفتان نمک محلول داخل کیسه دیالیز، محلول از کیسه خارج شده و سنجش آنزیمی بر روی محلول برای اثبات وجود آنزیم انجام شد (Harrison *et al.*, 1993).

بررسی اثرهای ضد قارچی آنزیم خالص‌سازی شده برای این منظور از پنج قارچ آفت گیاهی استفاده شد. انتخاب این قارچ‌ها به دلیل خسارت بالا و اهمیت آنها است.

ایزوله‌های قارچ در مرکز پتری دیش در محیط PDA، کشت داده شدند و برای رشد به مدت ۲۴ ساعت به انکوباتور ۳۰ °C متقل شدند. زمانی که قطر کلنی قارچ‌ها تقریباً به ۲cm رسید، چهار دیسک کاغذی استریل در فاصله ۲۵ میلیمتری از مرکز پتری دیش و در حوالی میسیلیوم‌های قارچ‌ها قرار داده شد و مقادیر مساوی (۵۰ µl) از آنزیم نسبتاً خالص شده (بعد از رسوب‌دهی با استن)، آنزیم جوشانده شده به مدت ۱۵ دقیقه، باfr- base ۲۰ mM Tris-

جدول ۳- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار و سه تکرار که توسط نرم افزار SAS بدست آمد.

Table 3- variance analysis in CRD with five treatments and three replications with SAS software

| منبع تغییرات Source of Variation | درجه آزادی Degrees of Freedom | مجموع مربعات Sum of Squares | میانگین مربعات Mean Square | ارزش F F value |
|-------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| Treatment تیمار | 4 | 1.00185 | 0.25046 | 70.46** |
| Error خطای | 10 | 0.03554 | 0.00355 | |
| Total کل | 14 | 1.03739 | | C.V-11.33% |

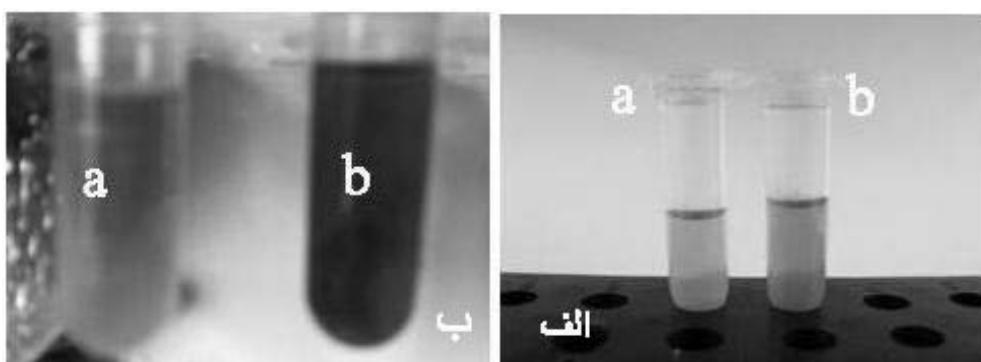
سه و یک فقط در ۰.۱% Agar است و نتایج نشان دادند که تفاوت معنی داری بین تیمار سه و یک وجود دارد، بنابراین می توان نتیجه گیری کرد که حضور مقدار کمی از آگار در محیط کشت تولید باعث افزایش تولید آنزیم کیتیناز می شود و آگار به عنوان یک محرک در محیط کشت عمل کرده است. با بررسی های انجام شده از آنجاییکه شباهت زیادی بین ساختار شیمیابی آگار و کیتین مشاهده شد می توان نتیجه گیری کرد که مقدار کم آگار در محیط کشت همانند کیتین خاصیت القا کنندگی برای تولید آنزیم کیتیناز را ایفا می کند.

جدول تجزیه واریانس

همانطور که در جدول (۳) مشاهده می شود F در سطح احتمال ۰/۰۱ معنی دار است یعنی بین تیمارها تفاوت معنی داری وجود دارد. همچنین مقدار ضریب تغییرات (C.V) که نشان دهنده دقت آزمایش است در حد پایینی است یعنی خطای آزمایشی کم است.

مقایسه میانگین تیمارها

بیشترین تولید آنزیم در تیمار سه که شامل ۰.۰۵% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ و Agar ۰.۱% بود، بدست آمده است. با توجه به اینکه تفاوت تیمار



شکل ۱- سنجش فعالیت آنزیم الف) قبل از رسوب دهی (ب) بعد از رسوب دهی با آمونیوم سولفات

(a) شاهد حاوی سوبسترای کیتینی و بافر

(b) نمونه سنجش فعالیت آنزیم حاوی سوبسترای کیتینی و آنزیم

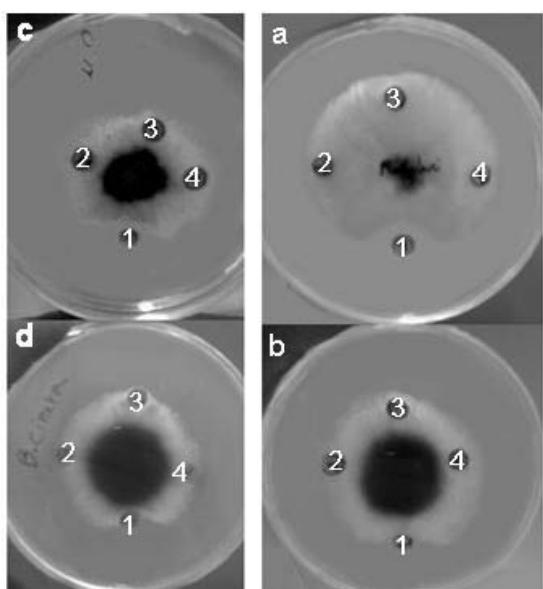
Figure 1- Enzyme Assay A) before precipitation B) After precipitation with Ammonium sulfate

a) substrate (colloidal chitin) and buffer as Control

b) substrate (colloidal chitin) and Enzyme as sample for enzyme assay

جدول ۴- مراحل خالص‌سازی نسبی کیتیناز از *Cohnella sp. A01***Table 4- Steps of Chitinase partially purification from *Cohnella sp. A01***

| مراحل خالص‌سازی Purification step | فعالیت Activity (Unit) | فعالیت ویژه Special activity (U/mg) | غلظت پروتئین Protein (mg/ml) | Recovery (%) | خلوص (Fold) |
|---|------------------------------|--|------------------------------------|-----------------|----------------|
| محلول ناخالص Unpurified Supernatant | 0.9 | 2.66 | 0.34 | 100 | 1 |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 0.7 | 3.95 | 0.18 | 77 | 0.9 |



شکل ۲- اثر مهارکنندگی آنزیم کیتیناز خالص‌سازی شده بر روی قارچ‌های مورد بررسی در این پژوهش.

Figure 2- Antifungal effect of purified chitinase on plant pathogenic fungus.

۱. دیسک ۱ آغشته به آنزیم است (بعد از رسوب با آمونیوم سولفات)

۱. Disc 1 enzyme (After precipitation with Ammonium sulfate)

۲. دیسک شماره ۲ آغشته به محیط کشت باکتری

2. Disc 2 bacteria culture

۳. دیسک شماره ۳ آغشته به بافر Tris- Base

3. Disc 3 Tris- Base Buffer

۴. دیسک شماره ۴ آغشته به آنزیم جوشانده شده (۱۵ دقیقه)

4. Disc 4 Inactivated enzyme (boiled 15 min)

5. a) *Rhizoctonia solani* b) *Bipolaris sp.* c)

Macrohomina phaseolina d) *Botrytis cinerea*

تولید کیتیناز

سنجهش فعالیت آنزیم قبل و بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات نشان داد که رسوب‌دهی موجب تخلیص بیشتر می‌شود. این نتایج در شکل (۱) مشهود است.

مراحل خالص‌سازی آنزیم کیتیناز مقاوم به گرما از باکتری *Cohnella sp. A01*

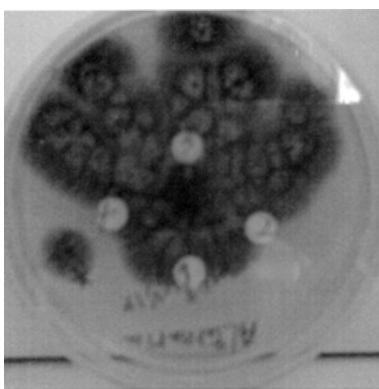
بعد از خالص‌سازی نسبی پروتئین برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین از روش برادفورد (Bradford, 1976) استفاده شد. در هر مرحله فعالیت ویژه آنزیم (unit per mg) بررسی شد. نتایج به صورت جدول ۴ است.

فعالیت ویژه معیاری برای خلوص پروتئین است. همانطور که در جدول ۴ مشخص شده است علیرغم اینکه فعالیت آنزیم کاهش پیدا کرده است فعالیت ویژه آنزیم بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات افزایش یافته است یعنی خلوص آنزیم بیشتر شده است

اثرهای کیتیناز خالص شده (بعد از رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات) بر روی قارچ‌ها

از میان قارچ‌هایی که در این پژوهش استفاده شد آنزیم کیتیناز توانست رشد چهار قارچ را مهار کند. همانطور که در شکل‌ها مشاهده می‌شود در بخش دیسک یک که آغشته به آنزیم بود قارچی رشد نکرده است. بدین ترتیب خاصیت ضدقارچی آنزیم کیتیناز بر روی چهار قارچ *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sp.*, *Botrytis cinerea* مشخص شد. *Macrohomina phaseolina*, *Botrytis cinerea*

Bipolaris solani sp. بیماری لکه قهوه‌ای که توسط دو گونه قارچ ایجاد می‌شود، تا اندازه‌ای مقاوم کرد. همچنین استفاده از کیتیناز به تنهایی (به صورت پاشیدن بر روی گیاه) و هم به صورت ترکیبی با قارچ‌کش‌ها در آینده بسیار مؤثر بوده و از نظر اکولوژیک نیز برای کنترل بیولوژیک بیماری‌های قارچی ایمن خواهد بود (Singh et al., 2007).



شکل ۳- قارچ *Alternaria brassicocola* توسط آنزیم خالص شده کیتیناز مهار نشده است. دیسک ۱ آغشته به آنزیم است (بعد از رسوب با آمونیوم سولفات)، دیسک شماره ۲ آغشته به محیط کشت باکتری، دیسک شماره ۳ آغشته به بافر Tris-Base، دیسک شماره ۴ آغشته به آنزیم جوشانده شده (۱۵ دقیقه)

Figure 3- The growth of the *Alternaria brassicocola* is not inhibited by purified chitinase. Disc 1 enzyme (After precipitation with Ammonium sulfate), Disc 2 bacteria culture, Disc 3 Tries- Base Buffer, Disc 4 Inactivated enzyme (boiled 15 min).

اثر مهاری کیتیناز حاصل از باکتری بومی جدا شده روی رشد برخی از گونه‌های قارچی و عدم مهار آن را شاید بتوان به نوع سوبسترای کیتینی آن یعنی درصد استیلاسیون کیتین و محل قرارگیری گروههای استیل مربوط دانست؛ بدین صورت که دیواره گونه‌های قارچی با زیرنوع‌های (subtypes) کیتینی مختلف بوده به نحوی که کیتیناز حاصل تنها روی برخی از آنها عمل می‌کند (Sasaki et al., 2002).

در پژوهشی که توسط Dahiya و همکاران انجام شد فعالیت ضد قارچی کیتیناز استخراج شده از *Enterobacter* sp. NRG در برابر قارچ پاتوژن گیاهی *R. solani* اثبات شده است (Dahiya et al., 2005). همچنین کیتینازهایی با فعالیت ضد قارچی از *Bacillus cereus* J1-1 (Yang et al., 2009) *subtilis* CH426 Lee et al., (Bacillus sp. DAU101 (Wang et al., 2001) Fleuri et al., (Cellulosimicrobium cellulans 191 (2007) 2009) استخراج شده است.

بررسی بر روی انتقال و بیان ژن کیتیناز گرمادوست از این باکتری بومی در حال انجام است و امید است در آینده‌ای نزدیک بتوان این ژن را به گیاه هدف انتقال داد. با استفاده از پژوهش‌های صورت گرفته کاندیدای اول برای انتقال این ژن گیاه برنج در نظر گرفته شده است. با انتقال این ژن به گیاه برنج و بیان آنزیم کیتیناز باکتریایی در گیاه برنج می‌توان گیاه برنج را در برابر دو بیماری *Rhizoctonia*، بیماری شیت بلاست که توسط قارچ

منابع

1. Aloise PA, Lumme M, Haynes CA (1996) N-acetyl D-glucosamine production from chitin waste using chitinase from *Serratia marcescens*. In: Muzzarelli RAA (ed) Chitin enzymology, vol 2. Eur Chitin Soc, Grottammare, pp 581–594.
2. Ash, C., Priest, F. G. & Collins, M. D. (1994). Paenibacillus gen. nov. In Validation of the Publication of New Names and New Combinations Previously Effectively Published Outside the IJSB, List no. 51. Int J Syst Bacteriol 44, 852.
3. Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
4. Clewer, A.G., and D.H. Scarisbrick. (2001). Practical Statistics and Experimental Design for Plant Crop Science. John Wiley and Sons, Ltd. England.
5. Dahiya, N.; Tewari, R.; Tiwari, R.P.; Hoondal, G.S. (2005) Chitinase from *Enterobacter* sp. NRG4: its purification, characterization and reaction pattern. *Electronic Journal of Biotechnology* 8:134-145.
6. Flach, J., Pilet P. E., and Jollès P. (1992). Chitin and chitinases research. *Experientia* 48, pp-701-716.
7. Fleuri, L.F.; Sato, H.H. (2005). Produce, Purification, and application the enzyme. *Quim. Nova*. 28, 871-879.
8. Fleuri, L.F.; Kawaguti, H.Y.; Sato, H.H. (2009) Production, purification and application of extracellular

- chitinase from *Cellulosimicrobium cellulans* 191. *Braz. J. Microbiol.* 40: 623-630.
9. Gooday G. W. (1996). Aggresive and Defensive Roles for Chitinases. In: Chitin Enzymology, R.A.A. Muzzarelli (ed). Atec Edizioni, Italia. 2:125- 133.
 10. Harrison, Roger G., *Protein Purification Process Engineering*, New York: Marcel Dekker, 1993. 115-208.
 11. Keyhani, N. O. and S. Roseman (1999) Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1473: 108-122.
 12. Khor E. (2002). Chitin: a biomaterial in waiting. *Curr Opin Solid State Mater Sci*; 6:313-7.
 13. Lam, Y.W., Wang, H.X., Ng, T.B., (2000). A robust cysteine-deficient chitinase-like antifungal protein from inner shoots of the edible chive *Allium tuberosum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 279(1):74-80. [doi:10.1006/bbrc.2000.3821].
 14. Lee, Y.S.; Park, I.H.; Yoo, J.S.; Chung, S.Y.; Lee, Y.C.; Cho, Y.S.; Ahn, S.C.; Kim, C.M. Choi, Y.L. (2007) Cloning, purification, and characterization of chitinase from *Bacillus sp.* DAU101. *Bioresour. Technol* 98:2734-2741.
 15. Martinou, A., D. Kafetzopoulos, and V. Bouriotis (1995) Chitin deacetylation by enzymatic means: monitoring of deacetylation processes. *Carbohydr. Res.* 273: 235-242.
 16. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducingSugar, *Anal. Chem.* 31 426-428.
 17. Patil, R.S.; Ghormade, V.; Desphande, M.V. (2000). Review: Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme Microbial Technol.* 26, 473-483.
 18. Peighambari, S.A. (2009). Experimental designs in agricultural sciences, University of Tehran press, 3: 35-69. (In Farsi).
 19. Sasaki, C.; Yokoyama, A.; Itoh, Y.; Hashimoto, M.; Watanabe, T.; Fukamizo, T. (2002) Comparative Study of the Reaction Mechanism of Eamily 18 Chitinases from Plants and Microbes. *J Biochem* 131:557-564.
 20. SAS Institute. (1994) The SAS System for Windows. Release 6.10. SAS Inst., Cary, NC. USA.
 21. Sietsma, J.H. and J.G.H. Wessels, (1979).

- Evidence for covalent linkages between chitin and β -glucan in fangul wall. *J.Gen. Microbiol.*, 114: 99-108.
22. Singh, P. P., Y. C. Shin, C. S. Park, and Y. R. Chung. (2007). Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92-99.
 23. Simpson, B.K.; Gagne, N. and Simpson, M.V. (1994). Bioprocessing of chitin and chitosan. In: *Fisheries Processing: Biotechnological applications*. A.M. Martin
 24. (Ed.). Chapman and Hall. London. 155-173.
 25. Tang, Y., Zhao, J., Ding, S., Liu, S. and Yang, Z. (2001). Purification and properties of chitinase from *Enterobacter aerogenes*. *Wei Sheng Wu Xue Bao (Acta Microbiologica Sinica)*, vol. 41, no. 1, p. 82-86.
 26. Tharanathan RN, Kittur FS. (2003) Chitin: the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr*; 43:61-87.
 27. Wiwat, C., P. Siwayaprahm. (1999). Purification and characterization of chitinase from *Bacillus circulans* No. 4.1. *Cur. Microbiol.* 39: 134-140.
 28. Wang X, Bunkers GJ, Walters MR, Thoma RS. (2001). Purification and characterization of three antifungal proteins from cheeseweed (*Malava parviflora*). *Biochem Biophys Res Commun* 282: 1224-1228.
 29. Wang, S.L.; Hwang, J.R. (2001) Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. *Enzyme Microb. Technol.* 28:376-382.
 30. Yang, C.Y.; Ho, Y.C.; Pang, J.C.; Huang, S.S.; Tschen, J.S.M. (2009) Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of novel *Bacillus subtilis* isolated from Taiwan patato field *Bioresour. Technol* 100:1454-1458.
 31. Ye, X.Y., Ng, T.B., (2000). Sativin: a novel antifungal miraculin-like protein isolated from legumes of the sugar snap *Pisum sativum* var. macrocarpon. *Life Sciences* 67, 775-781.
 32. Zarei M, Aminzadeh S, Zolgharnein H, Safahieh A, Daliri M, Akbari Noghabi K, Ghoroghi A, Motallebi A (2011), Characterization of a Chitinase with Antifungal Activity from a Native *Serratia Marcescens* B4A, *Brazilian Journal of Microbiology* 42: 1017-1029.

بهینه‌سازی باززایی و انتقال ژن به لیموترش (*Citrusaurantifolia*) به

کمک اگروباکتریوم و ژن گزارشگر *gus*

سیده مائده فیض بخش^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، سید حسن مرعشی^۳، نسرین مشتاقی^۴،
مطهره محسن پور^۵، محسن مردی^۶

۱، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار دانشکده کشاورزی
دانشگاه فردوسی مشهد

۲ و ۶- استادیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج
۵- دانشجوی دکترا اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آگروباکتریوم
انتقال ژن
gus
لیموترش
مهندسی ژنتیک

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باغی در جنوب ایران است و نسبت به بیماری‌هایی از جمله ویروس تریستیزای مرکبات (CTV) و جاروی جادوگر (WBDL) حساس است. بنابراین بهینه‌سازی یک سیستم باززایی و تراریزش کارآمد در این گیاه جهت بهبود و اصلاح آن از طریق مهندسی ژنتیک ضروری است. به همین منظور بهینه‌سازی باززایی و تراریزش لیموترش با استفاده از قطعات میانگره و قطعات اپی کوتیل سفید در دو محیط کشت باززایی با غلظت‌های متفاوت BAP و NAA و دو سویه مختلف اگروباکتریوم شامل LBA4404 و EHA105 و پلاسمید pBI حاوی کاست ژن *gus* به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام شد. از بین دو ریزنمونه بکار رفته، ریزنمونه اپی کوتیل سفید نسبت به میانگره کالوس‌زایی و باززایی بالاتری داشت. اما بین دو محیط کشت باززایی مورد استفاده، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. همچنین از بین دو سویه اگروباکتریوم بکار رفته در این پژوهش، سویه EHA105 به عنوان بهترین سویه اگروباکتریوم جهت تراریزش و باززایی لیموترش شناخته شدند. با استفاده ازواکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* بر روی دی.ان.ای استخراجی از تمامی گیاهان باززا شده ۲۱ شاخصاره دارای این ژن بدست آمد. اما تنها ۸ شاخصاره بیان این ژن را نشان دادند. همچنین عدم آلوودگی ناشی از اگروباکتریوم در شاخصاره‌های تراریخته به کمک PCR ژن‌های اختصاصی *virG* تایید شد.

مقدمه

بیشترین کاربرد را در آزمایش‌های تراریزش مرکبات داشته است (Moore et al. 1992). همچنین استفاده از گیاهچه‌های آلبنوی رشد کرده در تاریکی، موجب افزایش راندمان بازیابی گیاهان تراریخته شده است (Bond and Roose 1998). پنا و همکاران برای تهیه گیاهان تراریخته در لیموترش از آلودگی ریزنمونه میانگرها با آگروباکتریوم استفاده کردند (Pena et al. 1995, 1997) که درصد بازیابی ۶/۲ و فراوانی تراریزش، ۴/۳ درصد بوده است (Pena et al. 1997). در سال ۱۹۹۸ پژوهشگران از ریزنمونه میانگرها گیاهچه‌های ۶ ماهه لیموترش برای القای کالوس و سپس بازیابی در محیط کشت MS حاوی ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۳ درصد ساکارز و یک درصد آگار(pH5/7) استفاده کردند و نتیجه بازیابی را ۱-۲ درصد گزارش کردند (Cervera et al. 1998a).

پژوهشگران با استفاده از آگروباکتریوم و ریزنمونه‌های اپیکوتیل و هیپوکوتیل، گیاهان تراریخته لیموترش تولید کردند که میزان تراریزش حدود ۲/۹ درصد گزارش شد (Koltunow et al. 2000). در سال ۲۰۰۰ پژوهشگران توانستند از ۱۲۰۰ ریزنمونه میانگرها، ۴۲ گیاه تراریخته لیموترش که حداقل یک نسخه از ژن پروتئین پوششی ویروس CTV را دارا بودند، تولید کنند (Dom'inguez 2000).

با توجه به بررسی‌های انجام شده، در این پژوهش از ریزنمونه‌ها و محیط کشت‌های مختلف جهت بازیابی، سویه‌های متفاوت اگروباکتریوم برای تراریزش لیموترش استفاده شده است تا ضمن شناسایی فاکتورها و عوامل موثر در تراریزش لیموترش بتوان به دستور عملی کارآمد برای تراریزش این گیاه اقتصادی دست یافته و زمینه‌ای مناسب برای انتقال ژن‌های مفید به این گیاه با اهداف اصلاحی فراهم آورد.

مواد و روش‌ها

میوه‌های حاوی بذر رقم Mexican lime از مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی بندرعباس تهیه شد. پس از شستشو و ضد عفنونی، تعداد ۵ عدد بذر داخل شیشه‌های مربایی حاوی محیط کشت جوانه‌زنی MS (Murashige and skoog 1962) قرار داده شد تا آماده‌ی جوانه‌زنی شوند. تعدادی از شیشه‌ها مورد تیمار دوره‌ی نوری ۱۶ ساعت با شدت نوری ۲۰۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی قرار

لیموترش یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات باگی در جنوب ایران است که سطحی معادل ۴۱۸۰ هکتار و تولیدی بیش از ۵۰۰۰۰۰ تن را به خود اختصاص داده است. اما حساسیت زیادی به بیماری جاروی جادوگر دارد که از مهم‌ترین محدود کننده‌های کشت لیموترش در دنیا است (Garnier et al. 1991). گسترش روز افزون این بیماری در نواحی مرکبات خیز جنوب کشور تهدیدی جدی برای اقتصاد کشاورزی و درآمد کشاورزان این نواحی محسوب می‌شود. با توجه به هزینه‌ها و خسارات واردۀ از سال ۱۳۷۷ تا ۱۳۸۵ و پیش‌بینی رو به گسترش بیماری در صورتی که با این موضوع به صورت جدی و مستمر برخورد نشود حداًکثر تا یک دهه آینده میزان تولید لیموترش در استان هرمزگان به صفر نزدیک خواهد شد و این بدان معناست که عملاً اقتصاد روستایی در بسیاری از نقاط استان هرمزگان و پیروی آن اشتغال‌زایی روستائیان این منطقه با خطر جدی مواجه است (IWBDLN 2009). مبارزه با این بیماری تاکنون کارایی لازم را نداشته و استفاده از روش‌های اصلاح ستی مشکل و وقت‌گیر است (Pena et al. 2007). بعلاوه منبع مقاومتی برای این بیماری در ژرم پلاسمهای گیاهی وجود ندارد (IWBDLN 2009)، بنابراین به نظر می‌رسد که مهندسی ژنتیک راه حل مناسبی برای ایجاد مقاومت نسبت به این بیماری است.

از آنجا که وجود یک پروتکل کارا برای بازیابی گیاه، پیش‌نیاز استفاده از تکنیک انتقال ژن است در این پژوهش سعی شده است با انتخاب ریزنمونه مناسب و اعمال تیمارهای مناسب، درصد بازیابی غیر مستقیم برای ژنوتیپ‌های ایرانی لیموترش افزایش یابد و با استفاده از سیستم آگروباکتریوم و ژن گزارشگر gus، فرآیند انتقال ژن به لیموترش جهت فراهم آوردن زمینه‌های بعدی برای انتقال ژن به این گیاه بهینه شود.

در مرکبات از ریزنمونه‌های مختلفی از جمله سلول‌های جنین زا Ghorbel et al. 2000; (Yao et al. 1996)، اپیکوتیل (Moore et al. 1994)، قطعات گره و میانگرها ساقه (Kaneyoshi et al. 1994)، کالوس (Hidaka et al. 1990) و پروتوبلاست (al. 1992) استفاده شده است. از آنجا که ریزنمونه اپیکوتیل دارای بیشترین پاسخ به اندام‌زایی است، همواره

گیاهچه‌های ۳-۴ ماهه و قطعات یک سانتی‌متری اپی‌کوتیل سفید گیاهچه‌های ۳-۵ هفت‌های و دو محیط کشت باززایی شامل نمک و ویتامین‌های MS، ۸ گرم در لیتر آگار، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۰/۵ گرم در لیتر MES با ترکیبات هورمونی متفاوت (جدول ۱) و pH بهینه ۵/۸ به صورت آزمایش‌های فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار انجام گرفت.

پس از طی سه روز کشت مشترک در محیط حاوی نمک و ویتامین‌های MS، ۳ میلی‌گرم در لیتر BAP، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر D-2,4-چلوروبیوتون در لیتر ساکارز، ۸ گرم در لیتر آگار، ۰/۵ گرم در لیتر MES، ۱۰۰ میکرومولار استوسرین‌گون^۱ و pH بهینه ۵/۸ ریزنمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت‌های باززایی انتخابی حاوی ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کاناامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم جهت کنترل رشد باکتری و همچنین تحیریک شاخه‌زایی منتقل شدن پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت باززایی به مدت دو هفته در فیتوترون در تاریکی با شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت ۳۶۰۰ لوکس و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت. واکنش ریزنمونه‌ها هر ۳ هفته یک بار در محیط کشت‌های فوق صورت گرفت و بعد از ۴۵ روز شاخص‌های باززا شده ظاهر شدند. در طی این مدت، فاکتورهایی نظیر تاریخ کالوس‌زایی، درصد کالوس‌دهی، تاریخ شاخه‌زایی و درصد شاخه‌زایی بررسی شدند.

پیوند نوک شاخص‌سازه

شاخص‌های باززا شده با طول ۰/۵-۱ سانتی‌متر و قطر ساقه حدود ۰/۲ میلی‌متر از محیط کشت خارج شد، انتهای ساقه آنها با آب استریل شستشو داده شد و بر روی گیاهچه‌های دو برگی نارنج در محیط گلخانه پیوند زده شد. محل پیوند با پارافیلم بسته شد و بر روی آن یک عدد لیوان پلاستیکی شفاف قرار گرفت. گلدان‌ها به مدت یک ماه در گلخانه در سایه قرار گرفتند. پس از طی این مدت لیوان‌های پلاستیکی برداشته شدند و گلدان‌ها به مکان دیگری در گلخانه که در معرض مستقیم آفتاب است منتقل شدند.

2-Acetosyringone

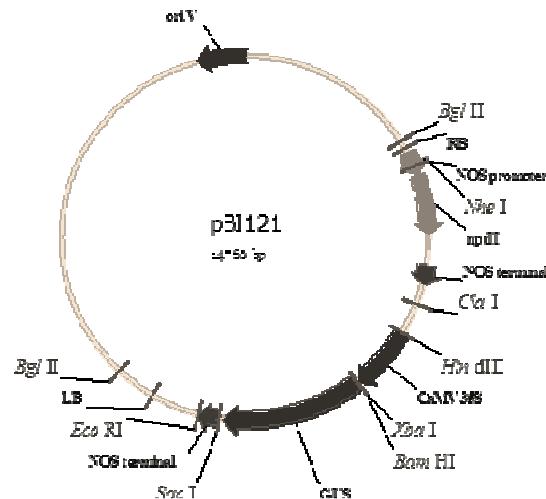
گرفتند و باقی‌مانده در سه هفته اول در تاریکی قرار گرفته و سپس به روشنایی منتقل شدند.

به منظور تعیین غلطت مناسب کاناامایسین در انتخاب کالوس‌های ترازیخته در محیط کشت باززایی از چهار غلطت کاناامایسین شامل ۰، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر با سه تکرار و ریزنمونه اپی‌کوتیل در هر تکرار استفاده شد.

در این پژوهش، پلاسمید دوگانه pBI تحت پیشبر CaMV35S و پایانبر NOS به عنوان حامل پلاسمیدی مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱).

استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی در حجم کم (مینی پرب^۲)، طبق روش سمبروک و راسل (۲۰۰۱)، انجام شد.

همچنین از روش ذوب-انجماد یا شوک حرارتی (Sambrook and Russel 2001)، جهت ترازیش اگروباکتریوم استفاده شد و تأیید صحت ترازیش اگروباکتریوم از طریق آزمون هیستوشیمیایی GUS (Jefferson et al. 1987) و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام گرفت.



شکل ۱- نقشه فیزیکی وکتور دوگانه pBI استفاده شده در این

Figure 1- Binary vector pBI121

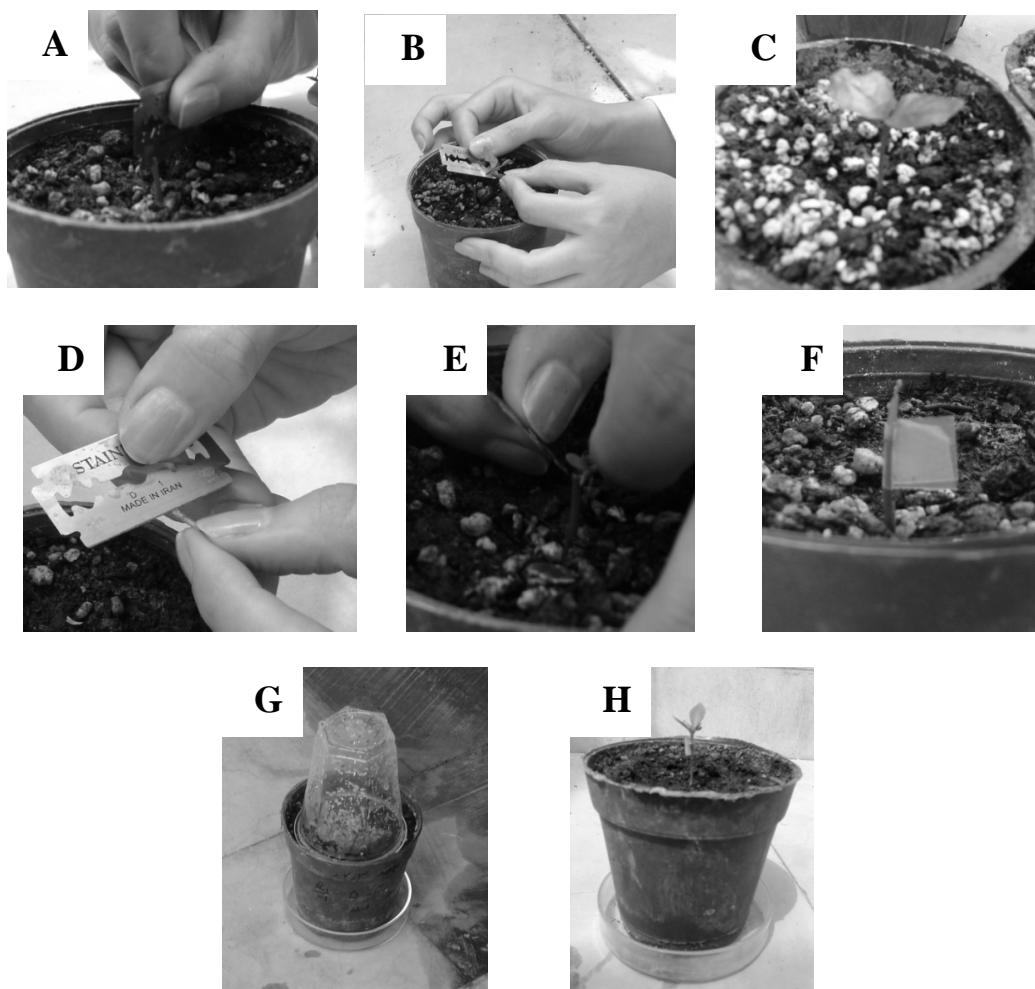
ترازیش گیاه لیموترش با استفاده از دو سویه ترازیخته اگروباکتریوم LBA4404، EHA105 حاوی پلاسمید pBI با دو ریزنمونه متفاوت شامل: قطعات یک سانتی‌متری میانگره

1-Mini preb

جدول ۱- ترکیبات هورمونی دو محیط کشت باززایی

Table 1- hormones which were used in 2 different regeneration media

| محیط باززایی ۲ Regeneration medium 2 | محیط باززایی ۱ Regeneration medium 1 | هورمون Hormone |
|---|---|-------------------|
| 1mg/L | 3 mg/L | BAP |
| 0/1 mg/L | 0/4 mg/L | NAA |



شکل ۲- مراحل پیوند گیاهچه‌های تراریخته روی گیاهچه‌های دو برگی نارنج، A. گیاهچه دو برگی نارنج، B. برش افقی پایه، C. برش عمودی پایه، D. برش انتهای پیوندک، E. قرارگیری پیوندک در برش عمودی پایه، F. بستن محل پیوند به وسیله پارافیلم، G. قرار دادن لیوان پلاستیکی و نگهداری در سایه، H. گیاهچه رشد یافته پس از قرارگیری در معرض نور آفتاب.

Figure 2- Shoot tip grafting. A. seedling of *Citrus aurantium*. B. Horizontal cut of rootstock (remove the 2 new leaves), C. vertical incision of rootstock, D. Preparation of Scion, E. The shoot-tip is placed inside the incision of the rootstock, F. Protection the incision area with parafilm, G. Grafted plants are kept in a shadow area and are covered with a closed plastic bag for about 1 month, H. The shoot starts to actively grow, plant is transferred to a greenhouse area with normal illumination.

دقیقه در ۵۷ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه، ۷ دقیقه) انجام شد.

گیاهان تراریخته‌ای که در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus*، قطعه مورد انتظار را تکثیر کردند، جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم، با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم (*virG*) (جدول ۲)، با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه، ۱ دقیقه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و تکمیل بسط در ۷۲ درجه، ۵ دقیقه) انجام شد.

.(Pena et al. 1997)، (شکارچیان)

تجزیه گیاهان تاریخته احتمالی

در این پژوهش، استخراج دی.ان.ا از برگ‌های شاخصاره‌های تاریخته احتمالی به سبب کوچک بودن و کم بودن میزان برگ به روش احمد و همکاران انجام گرفت (Ahmed et al. 2009) و اثبات تاریزش شاخصاره‌ها با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (جدول ۲) بررسی شد. واکنش فوق در ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵ دققه و ۳۵ چرخه (هر چرخه شاملاً یک دققه در ۹۴ درجه، ۱

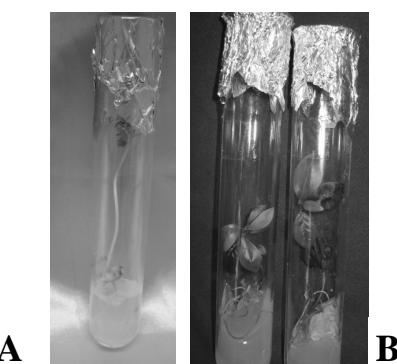
جدول ۲-۲ توالی آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمران، قطعه تکثیری و دمای بهینه اتصال جهت تایید تراریزیش گیاهان تراویرخته احتمالی

Table 2- Primers, Amplified fragment and annealing temperature that used in PCR reaction.

| آغازگرها | توالی | طول قطعه تکثیری (bp) | دماهی بهینه اتصال (°C) | |
|----------|--|------------------------------------|------------------------|-------------|
| Primers | sequence | Leangth of amplified fragment (bp) | Annealing | |
| | Forward:CCCGCTTCGAAACCAATGCC 5' Reverse:ACGTCTGAAGAAACCCCAA5' | 1097 | 57 | <i>gus</i> |
| | Forward: 5'ATGATTGTACATCCTTCACG Reverse:TGCTGTTTTATGAGTTGAG5' | 850 | 58 | <i>virG</i> |

نتایج و بحث

کشت بذور و ریزاسیدیادی گیاهچه‌های لیموترش
بذور کشت شده در محیط کشت MS پس از یک هفته جوانه زده
و شروع به رشد کردند. بذور کشت شده در تاریکی تولید
گیاهچه‌های سفید کردند که پس از سه هفته به روشنایی منتقل
شدند (شکا ۳).



شکل ۳- گیاهچه های لیموترش رشد کرده از بذور کاشته شده در محیط کشت A. گیاهچه سفید شده درنتیجه رشد در تاریکی، B. گیاهچه های رشد کرده در روشنایی،

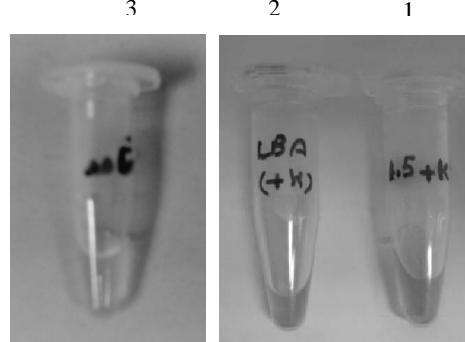
Figure 3- In vitro Mexican lime seedling. A. Etiolated seedling that grown in the dark, B. Seedling that grown in normal condition.

تائید صحت تراریزش اگروباکتریوم

نتیجه آزمون هیستوشیمیایی GUS در هر دو سویه اگروباکتریوم با استفاده از محلول رنگ آمیزی GUS مثبت بود. تشکیل رسوب نیلی رنگ داخل تیوپ، و عدم تشکیل آن در نمونه شاهد، دلیلی بر بیان زن *gus* در باکتری های تاریخته است (شکل ۴) همچنین آزمون زنجیره ای پلیمراز برای کلندی های تاریخته LBA4404

اپی‌کوتیل نسبت به میانگرۀ سویه اگروباکتریوم EHA105 نسبت به سویه LBA4404 درصد کالوس‌زایی بیشتری حاصل شد (شکل ۷).

بررسی اثرهای متقابل ریزنمونه با سویه اگروباکتریوم نشان داد که سویه EHA105 و ریزنمونه اپی‌کوتیل بیشترین درصد کالوس‌زایی را به همراه داشتند (شکل ۸).



شکل ۴- آزمون هیستوشیمیایی باکتری‌ها. ۱-سویه EHA105 حاوی پلاسمید pBI، ۲- سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI، ۳- سویه اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب

Figure 4- Histochemical Gus expression in *Agrobacterium*. 1. Strain EHA105 carrying binary plasmid pBI121, 2. Strain LBA4404 carrying binary plasmid pBI121, 3. *Agrobacterium* without pBI121.

بررسی صفت شاخه‌زایی
نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت شاخه‌زایی نشان داد که بیشترین درصد شاخه‌زایی به ریزنمونه اپی‌کوتیل، سویه EHA105 تعلق دارد (شکل ۹).

نتایج بدست آمده بیانگر این مطلب است که سویه اگروباکتریوم مورد استفاده اثر قابل توجهی در میزان کالوس‌زایی و شاخه‌زایی ریزنمونه‌های اپی‌کوتیل و میانگرۀ لیموترش در دو محیط کشت بازیابی فوق دارند و همچنین ریزنمونه اپی‌کوتیل سفید نسبت به میانگرۀ دارای قابلیت بیشتری برای کالوس‌دهی و شاخه‌زایی است (شکل ۷ و شکل ۹). هنگامی که از سویه اگروباکتریوم EHA105 استفاده شد درصد کالوس‌زایی و به دنبال آن شاخه‌زایی افزایش یافت، این امر حاکی از آن است که این سویه نسبت به سویه LBA4404 جهت تراریزش ریزنمونه‌های لیموترش کارآمدتر بوده، در نتیجه تولید کالوس‌های تراریخته و به دنبال آن شاخه‌زایی در محیط کشت انتخابی افزایش می‌یابد. ریزنمونه‌های تراریخته در محیط کشت بازیابی انتخابی تولید کالوس نموده و بازرا شدند (شکل ۱۰) و ریزنمونه‌های غیرتراریخته و نمونه شاهد به تدریج پس از چند روز نکروزه شدند (شکل ۱۰). در این آزمایش برش ریزنمونه‌ها به صورت اریب صورت گرفت که موجب می‌شود سطح ناحیه برش افزایش یافته و در نتیجه فعالیت اگروباکتریوم افزایش یابد (شکل ۱۰. B و A).

تجزیه گیاهان تراریخته احتمالی اثبات بیان ژن gus در گیاهان تراریخته احتمالی با استفاده از آزمون هیستوشیمیایی GUS

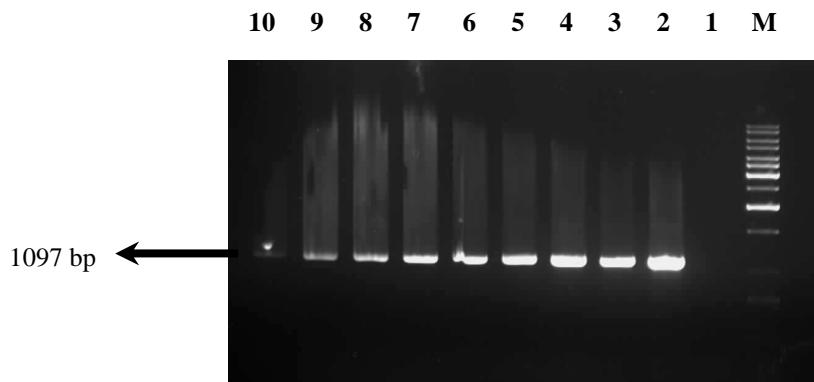
پس از رشد شاخصاره‌ها در محیط رشد طولی، شاخصاره‌ها مورد سنجش آزمون هیستوشیمیایی GUS قرار گرفتند. وجود نواحی

تعیین غلظت آستانه آنتی بیوتیک کاناامایسین

بررسی نتایج پس از ۴ هفته نشان داد که اختلاف معنی‌داری در میزان رشد و نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت‌های مختلف کاناامایسین وجود دارد به طوری که کالوس‌ها در غلظت‌های ۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کاناامایسین رشد کرده و میزان رشد به ترتیب ۱۰۰ درصد و ۵۰ درصد بود (شکل ۶-C، D) در حالی که ریزنمونه‌ها در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاملا نکروزه شدند (شکل ۶-A، B). از این رو غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر به عنوان غلظت آستانه آنتی بیوتیک کاناامایسین در نظر گرفته شد.

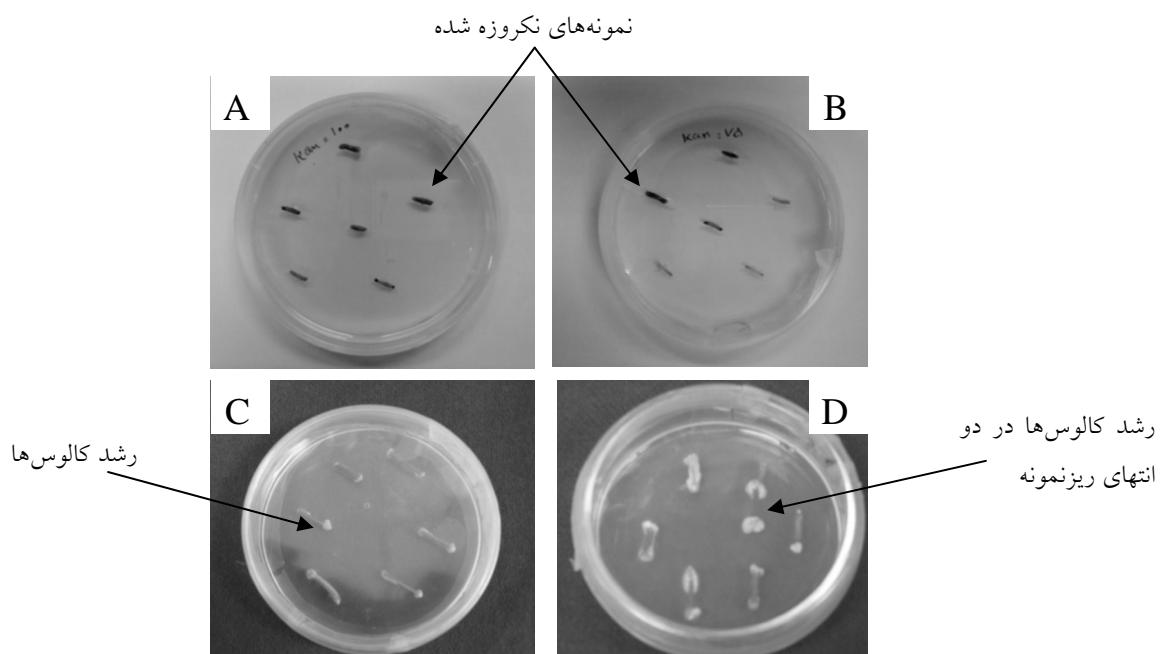
بررسی صفت کالوس‌زایی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس صفت کالوس‌زایی نشان داد که بین سطوح مختلف فاکتور ریزنمونه، سویه باکتری و اثرهای متقابل ریزنمونه با سویه باکتری اختلاف معنی‌داری وجود دارد ولی بین دو سطح مختلف محیط کشت بازیابی اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. مقایسه میانگین درصد کالوس‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم نشان داد که با استفاده از ریزنمونه



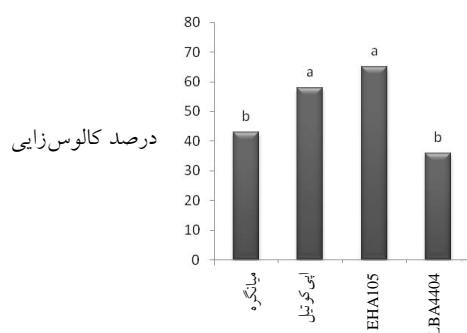
شکل، ۵_ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* به منظور تایید صحت تراریزش اگروباکتریوم سویه‌های M. نشانگر وزن مولکولی DNA (1Kb)، چاهک ۱. نمونه آب (کترل منفی)، چاهک ۲. نمونه پلاسمید (کترول مثبت)، چاهک ۳، ۵، ۷، ۹ سویه‌های اگروباکتریوم با غلظت ۲ میکرولیتر، چاهک ۴، ۶، ۸، ۱۰ سویه‌های اگروباکتریوم با غلظت ۱ میکرولیتر، وجود باند ۱۰۹۷bp نشان دهنده وجود ژن *gus* و تراریزش سویه‌های اگروباکتریوم است.

Figure, 5_ PCR analysis of genomic DNA of transformed *Agrobacterium* with *gus* specific primers which successfully amplified expected 1097 bp gene fragment. M: DNA marker. 1: Negative PCR control with no DNA (H_2O). 2: Positive PCR control with GUS plasmid DNA. 3_10 :Transformed *Agrobacterium* strain EHA105 and LBA4404.



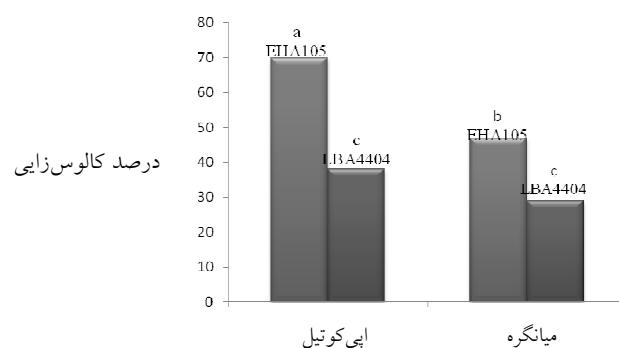
شکل ۶- تعیین غلظت آستانه آنتی‌بیوتیک کانامایسین. A. نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، B.. نکروزه شدن ریزنمونه‌ها در غلظت ۷۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، C. رشد کالوس‌ها در غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، D.. رشد صد در صد کالوس‌ها در غلظت ۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین.

Figure 6- Evaluating appropriate dose of the selection agent on shoot regeneration. A. Concentration of 100 mg/l kanamycin killed Mexican lime explants, B. Concentration of 75mg/l kanamycin killed Mexican lime explants, C. Shoot development and callus formation with 50 mg/l kanamycin, D. No kanamycin



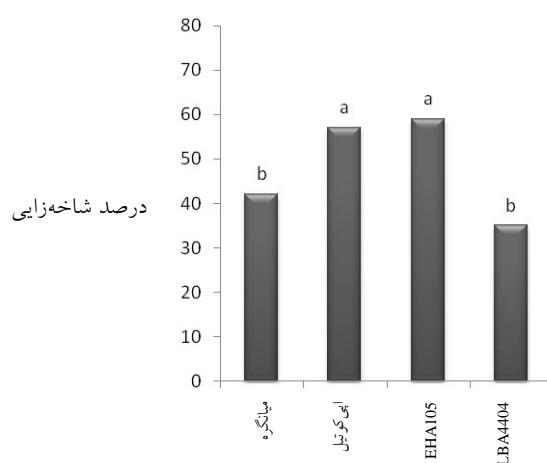
شکل ۷- نمودار مقایسه میانگین درصد کالوس زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم.

Figure 7-The effect of explants and *Agrobacterium* strains on percentage of callus induction



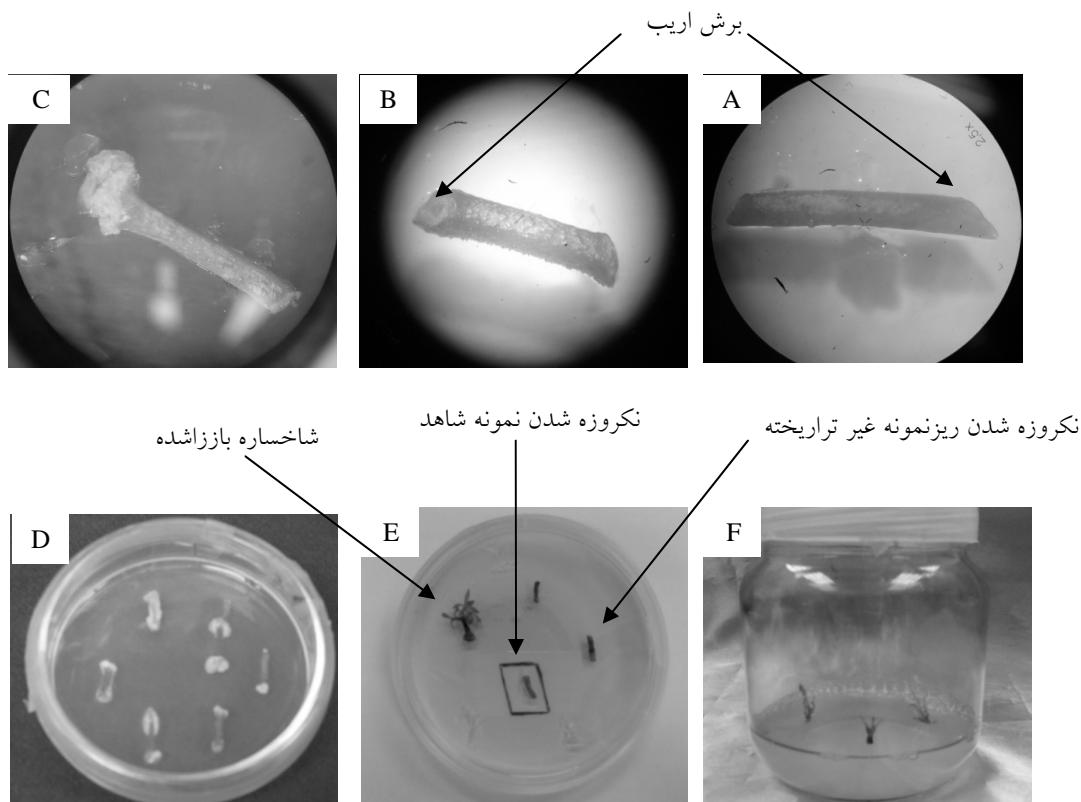
شکل ۸- نمودار اثر متقابل ریزنمونه و سویه در درصد کالوس‌زایی.

Figure 8- The interaction of explants and *Agrobacterium* strain effecs on callus induction percentage.



شکل ۹- نمودار مقایسه میانگین درصد شاخه‌زایی برای فاکتورهای ریزنمونه و سویه اگروباکتریوم.

Figure 9-The effect of explants and *Agrobacterium* strains on shoot induction percentage



شکل ۱۰- تراریختن ریزنمونه‌های لیموترش با استفاده از سوبیه‌های اگروباکتریوم LBA4404 و EHA105. A. برش اریب انتهای ریزنمونه‌ای کوتیل سفید، B. برش اریب انتهای ریزنمونه میانگر، C. تشکیل کالوس در انتهای بریده شده ریزنمونه، D. تولید کالوس در محیط کشت باززایی، E. شاخساره تراریخته احتمالی در حال رشد در محیط باززایی و نکروزه شدن کالوس‌های غیرتراریخته و نمونه شاهد، F. شاخساره باززا شده در محیط رشد طولی.

Figure 10- Transformation of explants. A. Obliquely cut of epicotyl, B. Obliquely cut of internode, C. Callus formation at the end of explants segments, D. callus formation in regeneration medium, E. Transgenic shoot regeneration , F. Transgenic shoots in shoot growth medium.



شکل ۱۱- آزمون هیستوشیمیایی GUS در برگ گیاهان تراریخته در محلول رنگ آمیزی GUS. نواحی آبی رنگ در مناطق برش یافته نشان دهنده بیان ژن *gus* هستند.

Figure 11- Histochemical GUS expression in transgenic citrus plants leaf.

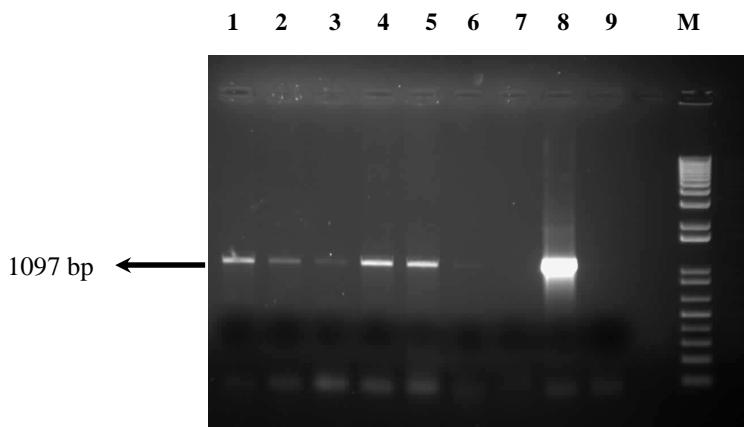
جدول ۳- خلاصه‌ای از آزمایشات انجام شده و نتایج بدست آمده

Table 3- Summary of transformation experiments

| درصد شاخساره‌ها | درصد شاخساره‌های رنگ‌آمیزی | محیط باززایی | سویه | ریزنمونه | شماره آزمایش |
|--------------------------------|-------------------------------|------------------------|---------|-----------|--------------|
| PCR مثبت برای ژن <i>gus</i> | Gus ⁺ shoots | Regeneration medium | Strain | Explant | number |
| PCR ⁺ shoots | | | | | |
| . | . | 1 | EHA105 | Internode | 1 |
| 10% | 10% | 2 | EHA105 | Internode | 2 |
| . | . | 1 | EHA105 | Internode | 3 |
| . | . | 2 | EHA105 | Internode | 4 |
| 30% | 10% | 1 | EHA105 | Epicoty | 5 |
| 20% | . | 2 | EHA105 | Epicoty | 6 |
| 15% | 15% | 1 | EHA105 | Epicoty | 7 |
| . | . | 2 | EHA105 | Epicoty | 8 |
| 5% | 5% | 1 | LBA4404 | Internode | 9 |
| . | . | 2 | LBA4404 | Internode | 10 |
| . | . | 1 | LBA4404 | Epicoty | 11 |
| . | . | 2 | LBA4404 | Epicoty | 12 |
| 10% | . | 1 | LBA4404 | Epicoty | 13 |
| 15% | . | 2 | LBA4404 | Epicoty | 14 |
| . | . | 1 | LBA4404 | Internode | 15 |
| . | . | 2 | LBA4404 | Internode | 16 |

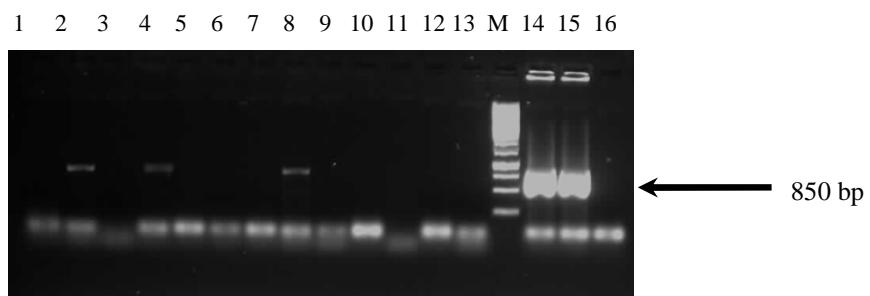
شد. ظهور باند ۱۰۹۷ جفت بازی وجود این ژن را در ۸ گیاه تراریخته‌ای که به آزمون هیستوشیمیایی GUS پاسخ مثبت داده بودند و همچنین ۱۳ عدد از گیاهانی که ژن *gus* در آن‌ها بیان نشده بود، اثبات کرد که این امر ممکن است ناشی از خاموشی و

آبی رنگ در مناطق برش یافته برگ، نشان دهنده بیان این ژن در ۳۸ درصد از شاخساره‌های باززا شده بود (شکل ۱۱) (جدول ۳). به منظور اثبات حضور ژن *gus*، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس این ژن انجام



شکل ۱۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *gus* برای اثبات تراریخته احتمالی، چاهک ۱-۵ ۵ گیاه باززاشده (GUS+), چاهک ۶. گیاه شاهد، چاهک ۷. گیاه باززاشده (GUS-), چاهک ۸. پلاسمید (کنترل مثبت)، چاهک ۹. نمونه آب (کنترل منفی)، M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.إ (1 Kb plus)

Figure 12- PCR analysis of genomic DNA of transgenic citrus plants with *gus* specific primers which successfully amplified expected 1097 bp gene fragment. 1-5: 5 individual transgenic shoots which expressed *gus* gene. 6: One regenerated shoot which don't express *gus* gene. 7: DNA from untransformed shoot. 8: Positive PCR control with GUS plasmid DNA. 9: Negative PCR control with no DNA (H_2O). M: DNA marker.



شکل ۱۳- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی اگروباکتریوم (*virG*). چاهک ۱-۱۲ ۱۲ گیاه تراریخته احتمالی، چاهک ۱۳ گیاه شاهد، M: نشانگر وزن ملکولی دی.ان.إ (1 Kb) ۱، چاهک ۱۴. اگروباکتریوم فاقد پلاسمید نوترکیب (کنترل مثبت)، چاهک ۱۵. اگروباکتریوم دارای پلاسمید نوترکیب، چاهک ۱۶. نمونه آب (کنترل منفی).

Figure 13- PCR analysis of genomic DNA of transgenic citrus plants with *virG* specific primers. 1-12 : DNA samples from transgenic shoots. 13: DNA from untransformed shoot. M: DNA marker. 14: *Agrobacterium* without pBI121. 15: *Agrobacterium* carring pBI121. 16: Negative PCR control with no DNA (H_2O).

احتمالی که بیان ژن *gus* را نشان ندادند اما واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *gus* در آنها مثبت شده بود، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی مستقیم و معکوس ژن *virG* انجام شد. باند ۸۵۰ جفت بازی در نمونه اگروباکتریوم و سه نمونه از این گیاهان مشاهده شد. این امر نشان دهنده حضور و پایداری اگروباکتریوم به همراه شاخصاره‌های باززا شده و ماهیت غیرتراریخته این سه گیاه است. عدم ظهور این باند در ۱۰ گیاه

یا بیان اندک این ژن در ۱۳ گیاه مذکور باشد (Dom'inguez et al. 2004) (شکل ۱۲). مطابق جدول ۳ بیشترین تعداد گیاهان تراریخته زمانی به دست آمد که از ریزنمونه اپیکوتیل، سویه اگروباکتریوم EHA105 استفاده شد.

اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در گیاهان تراریخته احتمالی جهت اثبات عدم حضور اگروباکتریوم در ۱۳ گیاه تراریخته

تاریخش مركبات تنها بر مبنای بیان ژن گزارشگر تخمین زده شود، کمتر از مقدار واقعی محاسبه خواهد شد (Domínguez et al. 2004).

گیاهان حاصل جهت ارزیابی حضور اگروبکتریوم توسط آغازگرهای اختصاصی ژن *virG* نیز مورد سنجش قرار گرفتند و آلدگی ناشی از اگروبکتریوم در سه نمونه دی.ان.ای استخراجی مشاهده شد. این امر بیانگر آن است که با وجود آنکه ریزنمونه‌ها بعد از هم کشتی به محیط کشت باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم، جهت جلوگیری از رشد بیش از اندازه باکتری، متقل شدند، اگروبکتریوم به طور کامل حذف نشد زیرا آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم بیشتر از رشد باکتری جلوگیری می‌کند تا اینکه باکتری را از بین ببرد (Pena et al. 2010).

Mexican lime از گونه‌های سرخخت مركبات جهت تاریخش به وسیله اگروبکتریوم محسوب می‌شود. در سال ۱۹۹۷، ۱۴ گیاه لیموترش تاریخته از ۳۲۴ ریزنمونه (درصد تاریخش ۴۳ درصد) بدست آمد (Pena et al. 1997). پژوهشگران در سال ۲۰۰۰، ۴۲ گیاه تاریخته لیموترش از ۱۲۰۰ ریزنمونه بدست آوردنده درصد تاریخش را ۳/۵ درصد اعلام کردند (Dominguez et al. 2000). در پژوهش دیگری که در همین سال انجام گرفت، پژوهشگران میزان تاریخش لیموترش را ۲/۹ درصد گزارش کردند (Koltunow et al. 2000). کارایی تاریخش در لیموترش در بیشترین حالت ۸ درصد گزارش شده است (Dutt and Grosser 2009). در این پژوهش بیشترین درصد تاریخش (۵/۶ %) مربوط به ریزنمونه اپی کوتیل و سویه اگروبکتریوم EHA105 بود.

منابع

1. IWBDLN. 2009. Witches' Broom Disease of Lime Network. Available at www.iwbdln.ir. (in farsi)
2. Ahmed I, Islam M, Arshad W, Mannan A, Ahmed W, and Mirza B. 2009. High quality plant DNA extraction for PCR: an easy approach. J Appl Genet 50: 105-107.
3. Bond JE, and Roose ML. 1998. *Agrobacterium*-mediated transformation of the commercially important citrus cultivar Washington navel orange. Plant Cell Rep 18:229–234.
4. Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, Duran-

تاریخته دیگر، نشان‌دهنده عدم وجود آگروبکتریوم در این گیاهان و اثبات صحت تاریخش آنها است (شکل ۱۳).

بحث

پروتکل تکرار پذیر باززایی گیاه لیموترش ایرانی و انتقال ژن به این گیاه ارائه شد. در این پژوهش از ۳۲۰ ریزنمونه تلقیح یافته، ۷۲ شاخساره بدست آمد. مطابق جدول ۳، هشت شاخساره در آزمون هیستوشیمیایی *gus* بیان این ژن را نشان دادند که تنها یکی از آنها در نتیجه تلقیح با سویه اگروبکتریوم LBA4404 حاصل شده بود (جدول ۳). بنابراین سویه اگروبکتریوم EHA105 به عنوان بهترین سویه جهت تاریخش و باززایی ژنتیک‌های ایرانی لیموترش معرفی شد. EHA105 یک سویه غیرتومورزا است که از سویه A281 اشتقاق یافته است که به عنوان ناقل مناسب جهت تاریخش مركبات معرفی شده است (Cervera et al. 1998b) و راندمان بالای تاریخش آن به ناحیه ژن‌های *vir* پلاسمید Ghorbel et al. (2004) در آن مربوط می‌شود (pTiBo542)Ti (2001; li et al

در این پژوهش استخراج دی.ان.ای از برگ تمام گیاهان بازرا شده‌ای که آزمون هیستوشیمیایی *gus* در آنها منفی بود نیز انجام گرفت و از بین آنها ۱۳ گیاه در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* مثبت شدند. این امر می‌تواند ناشی از خاموشی یا بیان بسیار اندک ژن گزارشگر *gus* در این گیاهان باشد. تعداد نسخه، اثرهای مکانی و سازماندهی ژن‌های مورد نظر می‌تواند مسئول سطوح بسیار متغیر بیان تراژن در گیاهان تاریخته باشد. این بدان معنی است که اگر فراوانی

- Vila N, Navarro L, and Pena L. 1998a. Genetic transformation and regeneration of mature tissues of woody fruit plants bypassing the juvenile stage. Transgenic Res 7: 51–59.
6. Cervera M, L'opez MM, Navarro L, and Pe na L. 1998b. Virulence and supervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* in woody fruit plants. Physiological and Molecular Plant Pathology 52: 67–78.
7. Dominguez A, Guerri J, Cambra M, Navarro L, Moreno P, and Pena L. 2000. Efficient production of transgenic citrus plants expressing the coat protein

- gene of citrus tristeza virus. *Plant Cell Rep* 19: 427–433.
8. Domínguez A, Cervera M, Pérez R, Romero J, Fagoaga C, Cubero J, López MM, Juárez J, Navarro L, and Peña L. 2004. Characterisation of regenerants obtained under selective conditions after *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus explants reveals production of silenced and chimeric plants at unexpected high frequencies. *Molecular Breeding* 14: 171–183.
 9. Dutt M, and Grosser EJW. 2009. Transgenic Evaluation of parameters affecting *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 98: 331–340.
 10. Fleming GH, Olivares-Fuster O, Fatta Del-Bosco S, and Grosser JW. 2000. An alternative method for the genetic transformation of sweet orange. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 36: 450–455.
 11. Garnier M, Zreik L, and Bove J M. 1991. Witches' broom, a lethal mycoplasmal disease of lime in Sultanate of Oman and the United Arab Emirates. *Plant Dis* 75: 546–551.
 12. Ghorbel R, Dominguez A, Navarro, L, and Peña L. 2000. High efficiency genetic transformation of sour orange (*Citrus aurantium*) and production of transgenic trees containing the coat protein gene of citrus tristeza virus. *Tree Physiol* 20: 1183–1189.
 13. Ghorbel R, López C, Fagoaga C, Moreno P, Navarro L, Flores R, and Peña L. 2001. Transgenic citrus plants expressing the citrus tristeza virus p23 protein exhibit virallike symptoms. *Molecular Plant Pathology* 2: 27–36.
 14. Haldrup A, Petersen SG, and Okkels FT. 1998. Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in the food industry. *Plant Cell Reports* 18: 76–81.
 15. Hidaka T, Omura M, Ugaki M, Tomiyama M, Kato A, Ohshima M, and Motoyoshi, F. 1990. *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of Citrus spp. from suspension cells. *Jpn J Breed* 40: 199–207.
 16. Jefferson RA, Kavanagh T. A, and Bevan M W. 1987. Gus fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
 17. Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, Shigemoto N, and Doi Y. 1994. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange. *Plant Cell Rep* 13: 541–545.
 18. Koltunow AM, Brennan P, Protopsaltis S, and Nito N. 2000. Regeneration of West Indian limes (*Citrus aurantifolia*) containing genes for decreased seed set. *Acta Hort* 535: 81–91.
 19. Li Z, Jayasankar S, and Gray D J. 2004. Bi-directional duplex promoters with duplicated enhancers significantly increase transgene expression in grape and tobacco. *Trans Res* 13: 143–154.
 20. Moore GA, Jacono CC, Neidigh JL, Lawrence SD, and Cline K. 1992. *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 11: 238–242.
 21. Murashige T, and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15: 473–497.
 22. Pena L, Cervera M, Juarez J, Ortega C, Pina JA, Duran-Vila N, and Navarro L. 1995. High efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of citrus. *Plant Sci* 104: 183–191.
 23. Pena L, Cervera M, Juarez J, Navarro A, Pina JA, and Navarro L. 1997. Genetic transformation of lime (*Citrus aurantifolia* Swing.): factors affecting transformation and regeneration. *Plant Cell Rep* 16: 731–737.
 24. Pena L, Cervera M, Fagoaga C, Romero J, Juárez J, Pina JA, and Navarro L. 2007. Biotechnology in Agriculture and Forestry Vol. 60.
 25. Pena L, Cervera M, Fagoaga C, Romero J, Ballester A, Soler N, Pons E, Rodríguez A, Peris J, Juárez J, and Navarro L. 2010. Compendium of Transgenic Crop Plants, Volume 5: Transgenic Tropical and Subtropical Fruits and Nuts: Citrus fruit.
 26. Sambrook J, and Russel D. 2001. Molecular Cloning, A Laboratory Manual. 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.
 27. Yao JL, Wu JH, Gleave AP, and Morris BAM. 1996. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos. *Plant Sci* 113: 175–183.

استفاده از روش تراریزش توأم برای انتقال ژن کولین اکسیداز به بروج

سعیده کی ارسلان^{*}، سیدالیاس مرتضوی^۲، بهزاد قره یاضی^۳، سکینه مهرانی^۴

۱ و ۴- به ترتیب کارشناس ارشد بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات

۲ و ۳- به ترتیب استاد دیار و دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: saeideh.keyarsalan@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

برنج رقم‌هاشمی
تراریزش توأم
ریزپرتابه
ژن *hph*
کولین اکسیداز
گلابیسین
بنتائین

در این پژوهش به منظور تولید گیاه بrong تراریخته با ژن کولین اکسیداز با قابلیت حذف ژن شانگر انتخابی، دو پلاسمید بیانی موسوم به pABRII-Chl و (ژن کولین اکسیداز حاوی پیتید راهنمای برای ظاهر ژن در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پیتید راهنمای برای ظاهر در سیتوپلاست) ساخته شد و سپس با استفاده از روش تراریزش توأم^۱، به همراه پلاسمید pTRA132 (حاصل ژن مقاومت به هیگرومایسین (hph)، به کالوس‌های جنین‌زایی که از ناحیه اسکوتوم بدوز رسیده رقم هاشمی منشا گرفته بودند، به روش ریزپرتابی منتقل شدند. سلول‌های تراریخته احتمالی از بافت‌های بمباران شده پس از ۳ دوره گزینش در محیط کالوس‌زای N6 حاوی هیگرومایسین ب گرینش شدند. به صورتی که غلظت آنتی بیوتیک از ۶۰ میلی‌گرم در لیتر به ۸۰ میلی‌گرم در لیتر افزایش یافت. در نهایت کالوس‌های مقاوم به هیگرومایسین، در محیط باززایی MS حاوی هیگرومایسین باززا شدند. صورتی که غلظت آنتی بیوتیک از ۸۰ میلی‌گرم در لیتر به ۶۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. گیاهان بrong تراریخته احتمالی به روش آنالیز زنجیره‌ای PCR، آنالیز سادرن و RT-PCR مورد بررسی قرار گرفتند و حضور ژن و بروز آن مورد تأیید پلیمراز، آنالیز سادرن و قرار گرفت. فراوانی قابل قبول گیاهان تراریخته حاصل از روش تراریزش همزمان در این پژوهش نشان داد که روش مورد استفاده یک روش تکرار پذیر و نسبتاً کارا برای انتقال پایدار ژن‌های مفید و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر در مقیاس وسیع است. انتقال ژن مقاومت به آنتی بیوتیک در ساختار جداگانه امکان جداسازی این ژن از محصول نهایی را در نتیجه تفرق فراهم می‌آورد که از جنبه‌ایمنی زیستی حائز اهمیت است.

مواد و روش ها

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن کولین اکسیداز به منظور تهیه ژن کولین اکسیداز (*cod A*), دو پلاسمید pChl و pCyt pCyt جداگانه با سه آنزیم *BamHI*, *HinDIII* و *EcoRI*, و ناقل pTRA132 نیز با دو آنزیم *EcoRI* و *HinDIII* هضم شد و سپس قطعات تشکیل دهنده ژن *Cod A* (kb ۱.۹ + kb ۲.۹ + kb ۰.۷۵ kb) و یک قطعه از ناقل بیانی (kb ۲/۷ kb), از روی ژل آگارز جداسازی شده و با استفاده از کیت خالص سازی شرکت Roche, خالص سازی شدند. پس از انجام دو واکنش اتصال به صورت جداگانه (با استفاده از کیت الحاق سریع, شرکت Roche) مخلوط اتصال به درون باکتری های مستعد (DH5 α) با استفاده از روش شوک حرارتی انتقال داده شد. در پلاسمیدهای نوترکیب حاصل موسوم به pABRII-Chl (دارای پیتید راهنمای ژن *Cod A*, برای تجمع گلایسین بتائین در کلروپلاست) و pABRII-Cyt (بدون پیتید راهنمای گلایسین بتائین در سیتوزول), ژن *Cod A* توسط پیشبر دائمی ۳۵S ویروس موژاییک کلم موجود در پلاسمید pTRA132 هدایت می شود. صحت ساخت این حامل های پلاسمیدی نوترکیب با استفاده از آنالیز هضم ساده و *XbaI* دو گانه دی. آن را آنژیم های *BamHI* و *HinDIII* و *EcoRI* و *XbaI* و *SacI* و *HinDIII*-*EcoRI* و آزمون پی.سی. آر (با آغازگرهای اختصاصی ژن *Cod A* مورد تأیید قرار گرفت. سپس وکتورهای مذکور تعیین توالی شدند.

مواد گیاهی، الفا کاللوس و گزینش کاللوس جنین زا برای بمباران در این بررسی از بذور رسیده رقم هاشمی برنج به عنوان ریزنمونه در محیط کشت این- ویترو استفاده شد. برای کاللوس زایی نیز محیط کاللوس زای N6 (چو و همکاران، ۱۹۷۶) به همراه ۲ میلی گرم در لیتر تو، فور- دی به عنوان تنظیم کننده رشد بکار گرفته شد. بذور بعد از پوست گیری و ضد عفونی در ظروف پتری حاوی محیط کشت کاللوس زای N6 کشت شدند و در اتاق رشد تاریک در دمای ۲۵ درجه به مدت ۶-۵ هفته یا تا زمانی که کاللوس های جنین زای فراوان در آن ها تولید شود، قرار داده شدند (Mortazavi, et al., 2006). به منظور آماده سازی بافت هدف برای بمباران،

مقدمه

برنج غذای اصلی بیش از نیمی از مردم جهان را تشکیل می دهد. یکی از راه های افزایش تولید برنج، کاهش خسارت ناشی از تنش های محیطی ژنده و غیر ژنده است. در این میان، خسارت ناشی تنش های غیر ژنده ای مانند شوری، خشکی، سرما و گرما در گیاه برنج بسیار بیشتر از اثر تنش های ژنده است (Roozitalab, M. H. 1987). تخمین زده می شود که بین ۱۶ تا ۲۳ میلیون هکتار از کل زمین های کشور با مشکل شوری مواجه باشد. علاوه بر این بسیاری از شالیزارها در مناطق جنوبی با مشکل شوری آب ناشی از آبیاری یا زمین رو برو هستند و حتی در مناطق شمالی کشور، سطح وسیعی از شالیزارها بر اثر پیشروی آب دریا در معرض شورش دگری هستند (Kovad, V. 1970). بنابراین تولید ارقام مقاوم به شوری برای همه محصولات کشاورزی و از جمله برنج بسیار مهم و ضروری به نظر می رسد.

یکی از راه های احتمالی افزایش تحمل شوری در گیاهان تجمع مواد اسمولیت سازگار نظری گلایسین بتائین است. شواهد تجربی نشان می دهد که گلایسین بتائین می تواند قابلیت تحمل چند تنش غیر ژنده مثل شوری، خشکی، سرما و گرما را بهبود بخشد. گلایسین بتائین یک ترکیب آمونیومی قطبی چهار واحدی است که در pH فیزیولوژیک خنثی بوده و می تواند از طریق پایدار سازی ساختمان چهارم پروتئین ها و ساختمان منظم غشاء در برابر آثار مضر شوری زیاد و دماهای بسیار زیاد و بسیار کم به عنوان حفاظت کننده عمل کند. سنتز گلایسین بتائین در گیاهان توسط اکسیداسیون دو مرحله ای "کولین" از طریق یک ماده حد وسط سمی به نام "بتائین آلدھید" صورت می گیرد (Ikuta, et al. 1977). اما یک روش ساده تر برای سنتز این ماده در گیاه، استفاده از یک تکڑن باکتریایی موسوم به "کولین اکسیداز" می باشد. انتقال ژن "کولین اکسیداز" (*cod A*) به گیاه، منجر به تولید "گلایسین بتائین" بدون نیاز به کاربرد بیرونی "کولین" یا ماده حد وسط "گلایسین بتائین آلدھید" می شود. هدف این پژوهش، انتقال ژن کولین اکسیداز به یک رقم بومی برنج، به منظور بررسی اثر آن بر روی توان تحمل تنش اسمزی بود.

درجه سانتی گراد منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت، کالوس‌های بمباران شده به محیط کشت انتخابی N6 حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین، منتقل شدند. کالوس‌های موجود در این پتری‌ها در فواصل ۲ تا ۳ هفته‌ای و جمعاً سه بار در محیط کشت انتخابی واکشت شدند. در انتهای دوره گرینش، کالوس‌هایی که قهوه‌ای و سیاه شده و یا آبکی و لزج بودند حذف شده و تنها کالوس‌های جنین‌زای کاملاً سفید، ترد و تازه به محیط کشت باززایی منتقل شدند.

باززایی گیاهچه‌های تراریخته احتمالی و انتقال آن‌ها به محیط کشت آبی یوشیدا

محیط باززایی مورد استفاده، محیط کشت انتخابی MS تغییریافته (وانگ و همکاران، ۱۹۸۷) حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر هیگرومایسین به همراه ۲ میلی‌گرم در لیتر کایتین و ۳ میلی‌گرم در لیتر نفتالین استیک اسید (NAA)، ۲۰ گرم در لیتر مالتوز و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر میو-اینوزیتول بود. کالوس‌های تراریخته احتمالی هر ۳۰ روز یکبار در محیط کشت انتخابی واکشت می‌شدند. پس از آنکه طول گیاهچه‌های تراریخته احتمالی در محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک به حدود ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر رسید، گیاهچه‌ها به لوله‌های آزمایش حاوی محیط آبی یوشیدا (یوشیدا و همکاران، ۱۹۷۶) منتقل شدند.

کالوس‌های جنین‌زا در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت N6 به قطر تقریبی ۱/۵ سانتی‌متر به صورت کاملاً متراکم جمع‌آوری شدند.

تراریزش با تفنگ ژنی

پلاسمیدهای نوترکیب pABRII-Chl و pABRII-Cyt هرکدام به طور جداگانه به همراه پلاسمید pTRA132 (حامل ژن hph) عامل مقاومت به هیگرومایسین فسفوترانس‌فراز (hph) (عامل مقاومت به هیگرومایسین ب) به نسبت ۱:۱ در روش تراریزش توام کالوس‌جنین‌زای برنج با استفاده از تفنگ ژنی مورد استفاده قرار گرفت.

در هر بمباران جهت تراریزش همزمان و امکان حذف ژن نشانگر انتخابی پس از یک نسل تفرق صفات و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر، ۱۰ میکروگرم از پلاسمید حاوی ژن کولین اکسیداز (pABRII-Cyt) و یا pABRII-Chl به همراه ۱۰ میکروگرم از پلاسمید حاوی ژن مقاومت به هیگرومایسین (pTRA132) بر روی ذرات طلا رسوب داده شد و با استفاده از تفنگ ژنی بایوراد مدل PDS-1000/He ۲۰ بار با خلا معادل ۲۰ بار و با فشار ۱۱۰۰ psi و در فواصل ۶ و ۹ سانتی‌متری، به سمت بافت هدف پرتاب شدند. بلافاصله پس از بمباران، پتری‌ها برای طی کرده دوره استراحت، به محیط کاملاً تاریک و دمای 25 ± 1 درجه دوره استراحت، به محیط کاملاً تاریک و دمای

جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده در آزمون پی.سی.آر گیاهان تراریخته احتمالی

Table 1- Primers used for PCR analysis of possible transgenic plants

| | | | |
|---|---------|-------|-----------------|
| 5'- AGA ATC TCG TGC TTT CAG CTT CGA -3' | Forward | توالی | آغازگرهای hyg. |
| 5'- TCA AGA CCA ATG CGG AGC ATA TAC -3' | Reverse | توالی | |
| 5'- GCC ACA ACT CCT GCA TCG CCT TCT -3' | Forward | توالی | آغازگرهای codA5 |
| 5'- CGG TTA GCA GGG TGA AGT TCT CCT -3' | Reverse | توالی | |
| 5'- GAT ACG CCG AAG CTG TTG ATG C -3' | Forward | توالی | آغازگرهای codA4 |
| 5'- TGC GTC TTG CGG ATG TAG TCC T -3' | Reverse | توالی | |
| 5'- GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT -3' | Forward | توالی | آغازگرهای 18s |
| 5'- CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG -3' | Reverse | توالی | |

به جز دی.ان.ای الگو) بر روی ژل آکارز بارگذاری شده‌اند. آغازگر hgy قطعه‌ای به طول حدود ۶۵۰ باز، آغازگر codA5 قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز و آغازگر ۱۸S قطعه‌ای به طول ۵۶۰ باز، آغازگر A4 قطعه‌ای به طول ۱۰۰ باز، را تکثیر کردند. آغازگر ۱۸S نشانگری است که به طور اختصاصی قطعه‌ای از ژنوم برنج را تکثیر می‌کند. این آغازگر در پلاسمید فاقد ناحیه مکمل است و بنابراین باندی تولید نمی‌کند (شکل ۱) ولی در تاریخته مصنوعی (اختلالات پلاسمید و دی.ان.ای گیاه غیرتاریخته) به دلیل وجود ژنوم برنج در آن دارای ناحیه مکمل بوده و همان باند را تولید می‌کند.

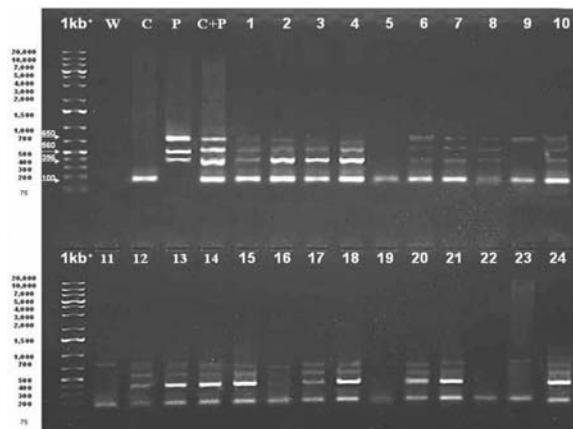
آغازگر hgy در گیاهان تاریخته احتمالی، تاریخته مصنوعی (C+P) و نیز در پلاسمید (P) ایجاد باند کرد که این نتیجه نیز مورد انتظار است زیرا در تمامی این نمونه‌ها ژن مقاومت به هیگرومایسین وجود دارد. آغازگرهای CodA4 و CodA5 نیز در همین نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید کرده‌اند که به دلیل وجود ژن کولین اکسیداز در تمامی نمونه‌های یادشده کاملاً قابل انتظار بوده است. همانگونه که انتظار می‌رفت، نمونه کنترل منفی (W) باند تولید نکرده است و این مؤید آن است که واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بدون آلدگی بوده و به درستی انجام شده است.

استخراج دی.ان.ای بافت گیاهی و آنالیز گیاهان تاریخته احتمالی

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، دی.ان.ای ژنومی گیاهان تاریخته احتمالی به روش دلپورتا و همکاران (۱۹۸۳) استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای CodA4، CodA5 و ۱۸S hgy (جدول ۱) و در سه دمای اتصال متفاوت انجام شد. جهت اثبات این که ژن‌ها به طور کامل در دی.ان.ای گیاه ادغام شده‌اند، روش استاندارد لکه‌گذاری سادرن مورد استفاده قرار گرفت (سمبروک و راسل، ۲۰۰۱). برای اثبات بیان ژن در گیاهان تاریخته، آر.ان.ای گیاهی از گیاهان تاریخته استخراج شد و مورد آنالیز RT-PCR دو مرحله‌ای قرار گرفت.

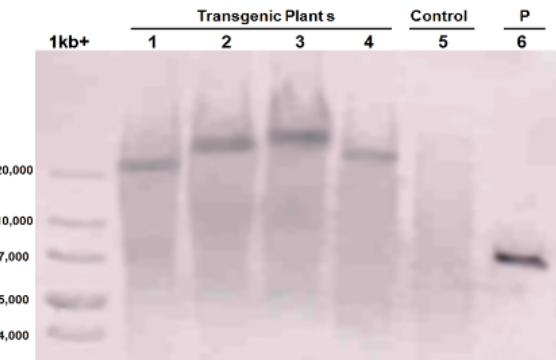
نتایج و بحث

شکل ۱ نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از چهار جفت آغازگر را نشان می‌دهد. در این شکل محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای ۲۴ گیاه تاریخته احتمالی که برای وجود یا عدم وجود ژن انتقالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته بودند به همراه گیاه غیرتاریخته، تاریخته مصنوعی، پلاسمید اولیه pChl و نیز کنترل منفی (دارای کلیه مواد نیاز



شکل ۱- فرآورده‌های واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از آغازگرهای اختصاصی ژن hph (codA5 و codA4)، ۱۸s و W (بدون دی.ان.ای الگو؛ C- گیاه غیرتاریخته؛ P- پلاسمید؛ C+P: ایجاد غیرتاریخته، تاریخته احتمالی).

Figure 1- Polymerase chain reaction products derived from codA, hph and 18s gene-specific primers: W: Master Mix without DNA template, C: Control plant (non-transgenic), P: Plasmid, C+P: Artificial transgenic, 1-24: Eventual transgenic plants.



شکل ۲- آنالیز دورگسازی سادرن برای ۴ لاین برنج تراریخته مستقل از هم: ۱-۴: دی.ان.ای ژنومی گیاهان تراریخته، هضم شده با آنزیم *Hin*DIII؛ ۵: دی.ان.ای ژنومی گیاه شاهد غیرتراریخته هضم شده با آنزیم *Hin*DIII؛ ۶: پلاسمید نوترکیب *pABRII-Chl* با آنزیم *Hin*DIII

Figure 2- Southern analysis for 4 independent transgenic rice lines: 1-4: Genome DNA of transgenic plants, digested with *Hind*III enzyme, 5: Genome DNA of non-transgenic plant, digested with *Hind*III enzyme, 6: *pABRII-Chl* digested with *Hind*III enzyme.

کرده است که این امر، نشان دهنده وجود ام.آر.ان.ای ژن کولین اکسیداز در نمونه اولیه و در واقع مؤید انجام رونویسی از این ژن در این گیاهان است. همانگونه که انتظار می‌رفت، نمونه‌های کنترل منفی (W1 و W2) باندی تولید نکردند و این مؤید آن است که هر دو مرحله واکنش آزمون RT-PCR بدون آلدگی بوده و به درستی انجام شده است.

فرآوانی قابل قبول گیاهان تراریخته حاوی هر دو ژن انتقال داده شده به روش تراریختش همزمان در این پژوهش نشان داد که روش مورد استفاده یک روش تکرار پذیر و نسبتاً کارا برای انتقال پایدار ژن‌های مفید و تولید گیاهان تراریخته عاری از ژن انتخابگر در مقیاس وسیع است. اندازه سازه‌های بکار رفته، پیشتر مناسب، نوع ترکیبات هورمونی و غلظت آنها در محیط‌های کشت کالوس زایی و باززایی، طول زمان واکشت جهت گرفتن کالوس جنین زا، و راهبرد گزینشی مناسب از نکات قابل توجه و مؤثر در موفقیت این روش بود. تراریختش همزمان با استفاده از روش غیر مستقیم تفنگ ژنی، همچنان نیازمند پژوهش و بررسی است و برای تولید نسل‌های تراریخته عاری از توالی‌های زائد بسیار مستعد است.

آنالیزهای ملکولی مختلف تلفیق تراژن در ژنوم برنج و عملکرد درست آن را تایید کردند. به طور کلی گیاهان تراریخته بدست آمده، هیچ مشخصه غیر عادی مورفو‌لوزیک نشان ندادند و روند رشدی کاملاً مشابهی با گیاهان شاهد داشتند. اگرچه خصوصیات زراعی و مشابهت عمده‌^۱ آن‌ها با گیاه والد غیرتراریخته باید مورد

شکل ۲ نتایج آنالیز سادرن برای چهار لاین تراریخته به همراه گیاه غیرتراریخته (کنترل منفی) و سازه نوترکیب (کنترل مثبت) را نشان می‌دهد. مطابق انتظار، کاوشگر اختصاصی ژن *codA* با دی.ان.ای گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، دورگ نشده و باندی ایجاد نکرد و این به دلیل عدم حضور قطعه مکمل کاوشگر در ژنوم گیاه غیرتراریخته است.

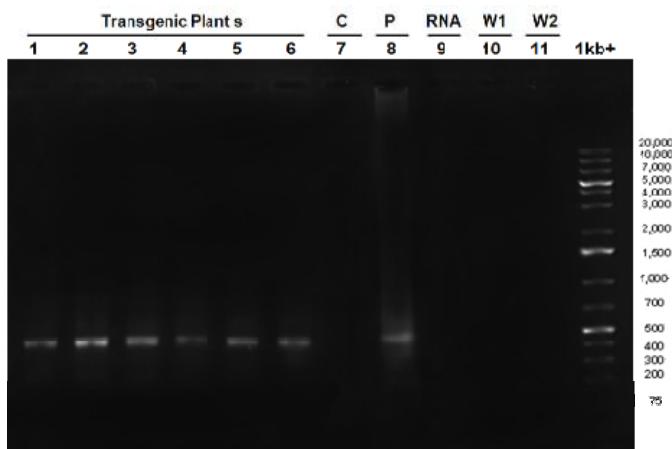
استفاده از روش دورگ‌گیری سادرن و کاوشگر اختصاصی و هضم دی.ان.ای استخراج شده از لاین‌های تراریخته با آنزیم *Hin*DIII در هر چهار گیاه تراریخته، یک باند ایجاد کرد. تفاوت در الگوی دورگسازی در همه لاین‌ها نشان می‌دهد که ژن *codA* در مکان‌های مختلفی از ژنوم این گیاهان الحاق شده است. در نتیجه، این لاین‌ها به عنوان لاین‌های مستقل از هم در نظر گرفته می‌شوند. تعداد نوارها در هر کدام از لاین‌ها، نشان دهنده تعداد نسخه‌الحاق شده از ژن انتقالی در ژنوم آن‌ها است.

شکل ۳ نتیجه آزمون RT-PCR دوم مرحله‌ای برای شش گیاه تراریخته به همراه گیاه غیرتراریخته، پلاسمید اولیه *pChl* و نیز دو نوع کنترل مخلوط اولیه (دارای کلیه مواد مورد نیاز به جز دی.ان.ای الگو) برای مرحله اول و دوم پی.سی.آر روی ژل آگاراز رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید را نشان می‌دهد.

در مرحله دوم آنالیز که نتایج آن در شکل آمده است، آغازگر *codA4* که قطعه‌ای به طول ۳۹۳ باز تکثیر می‌کند، برای تشخیص وجود ژن، نسخه سی. دی.ان.ای ژن کولین اکسیداز به کار برده شد. این آغازگر در تمام نمونه‌ها باند مخصوص به خود را تولید

۱-Substantial Equivalence

بررسی‌های بیشتر قرار گیرد.



شکل ۳- فرآورده‌های واکنش RT-PCR دو مرحله‌ای شش گیاه تواریخته با ژن کولین اکسیلاز: ۱- ۶: گیاهان تواریخته؛ C: گیاه شاهد (غیرتواریخته)؛ P: پلاسمید؛ W1: کنترل منفی مرحله اول (بدون آر.ان.ای الگو)؛ W2: کنترل منفی مرحله دوم (بدون سی.دی.ان.ای الگو).

Figure 3- Two-phase RT-PCR products for six transgenic plants contains *choline oxidase*: 1-6: Transgenic plants, C: Control plant (non-transgenic), P: Plasmid, W1: Phase one negative control (without RNA template), W2: Phase two negative control (without cDNA template).

منابع

1. Ikuta, S., K. Matuura, S. Imamura, H. Misaki, and Y. Horiuti. 1977. Oxydative pathway of choline to betaine in the soluble fraction prepared from *Arthrobacter globiformis*. J Biochem. 82: 157-165
2. Kovad, V. 1970. Prevention or salinity and reclamination of saline soil of Iran. Soil Institutur of Iran. Puplicatin No.227.
3. Roozitalab, M. H. 1987. National soil policy and its technical and administrative organization in Iran, Soil and Water Research Ins. Publ. No. 725.
4. Mortazavi, S.-E., A. Mirlohi, B. Ghareyazie, A. Arzani, N. Khoshkholgh-Sima, 2006, Physiological

Aspects of Rice Callus Growth and Regeneration in a Modified MS Medium Supplemented with NaCl, IAR, Vol. 23, 51-70.

5. Wang, M. S., F. J. Zapata and D. C. deCastro. 1987. Plant regeneration through somatic embryogenesis from mature seed and Young inflorescence of wild rice (*Oryza perennis* Moench.). Plant Cell Rep., 6: 294-296.
6. Yoshida,S., D.A.Forno, J.H.Cock, and K.A.Gomez, 1976.Laboratori manual for physiological studies of rice, International Rice Research Institute, Manilla

ارزیابی تغییرات آنیون‌های پنبه ترازیخته حاوی ژن‌های

کیتیناز و *cry1Ab*

بنت الهدی مدیرروستا^۱، مسعود توحیدفر^{*}^۲، جلال صبا^۳، حسین هداوند^۴

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زنجان

۲ و ۴- استادیار و کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۰۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

آنیون‌ها

کاتیون‌ها

ارزیابی اینمی

پنبه ترازیخته

یکی از جنبه‌های بیوتکنولوژی، تولید گیاهان ترازیخته به منظور افزایش عملکرد، بهبود امنیت و کیفیت غذایی است. گیاهان ترازیخته ضمن به همراه داشتن سودآوری، ملاحظاتی را نیز برای مصرف کنندگان به دنبال داشته‌اند. اگرچه بسیاری از این ملاحظات اساس علمی ندارد، اما ارزیابی اینمی گیاهان ترازیخته می‌تواند باعث اطمینان از بی‌خطر بودن این محصولات شود. یکی از جنبه‌های ارزیابی اینمی زیستی، بررسی متabolیک گیاهان ترازیخته از جنبه آنیون‌ها و کاتیون‌ها (سدیم، پتاسیم، منیزیم، استات، کلراید، نیترات، فسفات، سولفات، سوکسینات و اگزالات) است که با کروماتوگرافی یونی قابل شناسایی و اندازه‌گیری هستند. بدین منظور دو لاین پنبه ترازیخته حاوی ژن *cry1Ab* و ژن کیتیناز به همراه گیاهان شاهد در شرایط کاملاً یکسان در گلخانه کاشته شدند، پس از نمونه برداشی و عصاره‌گیری، آنیون‌ها و کاتیون‌های آنها با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی یونی اندازه‌گیری شد و نتایج نشان داد که پنبه‌های *Bt* از نظر آنیون‌ها و کاتیون‌های اندازه‌گیری شده غیر از اگزالات، سدیم و آمونیوم اختلاف معنی داری با لاین شاهد ندارند؛ لاین‌های حاوی ژن کیتیناز نیز فقط در مقادیر اگزالات و سدیم با شاهد اختلاف نشان دادند و سایر آنیون‌ها و کاتیون‌های اندازه‌گیری شده اختلافی با شاهد نشان نداد.

مقدمه

روی، آهن، کادمیم و سرب را اندازه‌گیری کردند که در مقایسه با گیاه غیرترازیخته اختلاف معنی‌داری مشاهده نکردند (Mohanta et al. 2011).

لی و همکاران (۲۰۰۸) نیز در مقایسه برنج ترازیخته حاوی ژن bar با همتای غیرترازیخته آن گزارش کردند که عناصر معدنی در هر دو نوع یکسان بوده و در محدوده لاین‌های تجاری است. در این ارزیابی سطوح فسفر، کلسیم، روی، پتاسیم، سدیم، منگنز، آهن، مس و منیزیم اندازه‌گیری شد. در میان عناصر اندازه‌گیری شده، فقط آهن دارای اختلاف معنی‌دار بین گیاه ترازیخته با همتای غیرترازیخته بود (Li et al. 2008).

یوکوبی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی عناصر پنبه‌های ترازیخته مشاهده کردند که ۱۲ عنصر در گیاهان ترازیخته و شاهد متفاوت هستند. پتاسیم، فسفر و مس در برگ‌های پنبه ترازیخته نسبت به شاهد کمتر بودند. منیزیم، بور و مولیبدن در برگ‌ها و ریشه‌های پنبه ترازیخته در مقایسه با شاهد بیشتر اما در ساقه کمتر بودند. روبيدیم، آهن، منگنز، سیلیسیم و روی در برگ‌ها و ساقه‌های پنبه ترازیخته در مقایسه با شاهد کمتر اما در ریشه گیاهان ترازیخته بیشتر بودند. کلسیم در ریشه، ساقه و برگ بیشتر از شاهد بود (Yukui et al. 2009).

نتایج پژوهش روئی و همکاران (۲۰۰۸) بر روی میزان عناصر در پنبه دانه‌های ترازیخته نشان داد که اغلب عناصر کم مصرف شناسایی شده شامل سدیم، سلنیم، روی، نیکل، کوبالت، منگنز، کلسیم، پتاسیم، فسفر، سیلیسیم، بور و مولیبدن نسبت به پنبه دانه‌های شاهد کمتر بودند در حالیکه آهن، منیزیم و مس اختلافی نشان ندادند. محتوا اغلب عناصر سنگین شناسایی شده شامل بیسموت، آلومینیوم، آرسینیک، سرب، کادمیوم و تیتانیوم نسبت به پنبه دانه‌های شاهد بیشتر بود اما کروم و جیوه تفاوتی نداشتند. در این آزمایش تمام داده‌ها حاکی از این بود که تجمع عناصر سنگین و عناصر کم مصرف در پنبه دانه‌های ترازیخته زیان‌آور است (Rui et al. 2008).

هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر حضور ژن‌های کیتیناز و cry1Ab در ژنوم پنبه ترازیخته بر روی ترکیب عناصر معدنی برگ در گیاه پنبه است.

گیاهان ترازیخته حاوی صفات جدیدی هستند که به آن‌ها ویژگی‌های سودمندی همچون مقاومت در برابر حشرات، پاتوژن‌های باکتریایی، قارچی و علف‌کش‌ها را می‌دهد. در سال ۱۹۹۶ اولین گیاه ترازیخته در ایالات متحده وارد بازار شد. با وجود گسترش کشت گیاهان موضوع جنجال برانگیزی است. کشورها آزادسازی این گیاهان موضوع جنجال برانگیزی است. استاندارد "این همانی"^۱ تعیین می‌کند که آیا گیاه ترازیخته، از نظر ترکیبات کلیدی همچون پروتئین، کربوهیدرات، عناصر، چربی و محتویات تغذیه‌ای شبیه به همتای سنتی خود است یا خیر (Royal Society. 2002). در خصوص پژوهش در مورد اینمی غذاهای ترازیخته، به طور اساسی نیاز به تعیین این مسئله است که آیا تغییراتی علاوه بر ویژگی جدید مورد نظر در محصولات ترازیخته رخ داده یا خیر (International Life Science Institute. 2004) که با مقایسه الگوی متابولیک می‌توان به این تغییرات پی برد. در این ارزیابی‌ها پارامترهایی انتخاب می‌شوند که نماینده‌ای برای محصول مورد ارزیابی و نماینده مسیرهای اصلی متابولیک باشند. انتظار بر این است که تغییرات معنی‌دار در این پارامترها، نشان‌دهنده تغییرات اساسی باشد (Konig et al. 2004). کمیسیون کدکس غذایی آنالیزهای مقایسه‌ای ترکیبات کلیدی همچون عناصر معدنی را برای گیاهان نوترکیب ضروری می‌داند و عنوان کرده که گیاهان باید تحت شرایط یکسان رشد کرده و مقایسه شوند (Codex Guideline).

از آنجا که مولکول‌های کوچک می‌توانند اثرهای بزرگی داشته باشند، آنالیز متابولیت‌ها، بخشی از ارزیابی تغذیه‌ای محصولات ترازیخته است. آنیون‌ها و کاتیون‌ها جزوی از متابولیت‌های اولیه محسوب می‌شوند. استفاده از تکنیک کروماتوگرافی یونی، بررسی یون‌ها و نقش آن‌ها در تغذیه گیاه، فعالیت‌های فیزیولوژیک و بررسی مسیرهای بیوشیمیایی را تسهیل می‌کند. دستگاه کروماتوگرافی یونی روشی سودمند برای اندازه‌گیری یون‌های موجود در نمونه است (Metrohm).

موهانتا و همکاران (۲۰۱۱) در ارزیابی اینمی پنبه‌های ترازیخته حاوی ژن cryIC میزان عناصر شامل کلسیم، فسفر، مس، منگنز،

1-Substantial equivalence

مواد و روش‌ها

اضافه نموده و در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. نمونه‌ها با کاغذ صافی فیلتر شده و آنیون‌ها با استفاده از ستون Metrosep Asupp7 دستگاه کروماتوگرافی یونی اندازه‌گیری شدند. نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه قرار گرفته (Metrohm).

نتایج و بحث

مقایسه میانگین‌های آنیون‌ها با استفاده از آزمون دانکن (جدول ۱)، نشان داد که در سطح احتمال ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری از نظر میزان فلوراید، استات، کلراید، نیترات، فسفات، سولفات و سوکسینات بین گیاهان شاهد و تاریخته وجود ندارد و هر دو لاین تاریخته با شاهد در یک سطح هستند. البته این آزمون نشان داد که لاین‌های حاوی ژن کیتیناز و همچنین لاین‌های حاوی ژن cryIAb مقدار اگزالات کمتری در مقایسه با شاهد دارند. تجمع اگزالات در گیاهان بر کیفیت تغذیه‌ای آنها اثر منفی دارد. تغذیه از گیاهانی که حاوی میزان اگزالات زیادی هستند ممکن است منجر به مسموم شدن و مرگ دام شود (Libert *et al.* 1987). بنابراین کاهش مقدار اگزالات در پنبه‌های تاریخته مورد بررسی، نگران کننده نخواهد بود. سوکسینات علاوه بر نقشی که در تنفس گیاه دارد، باعث افزایش تحمل گیاه به سطوح بالای برخی عناصر سنگین مانند روی می‌شود (Stoyanova *et al.* 2002).

مقایسه میانگین‌های کاتیون‌ها با استفاده از آزمون دانکن (جدول ۲) اختلاف معنی‌داری در غلظت پتاسیم و منیزیم بین گیاهان شاهد و تاریخته نشان نداد. این آزمون در لاین حاوی ژن کیتیناز کاهش معنی‌دار در میزان یون سدیم و در پنبه‌های *Bt* کاهش در میزان سدیم و آمونیوم را تائید کرد.

در رابطه با شکل ازت در گیاهان، تحقیقات نشان داده‌اند که گیاهان زراعی می‌توانند یون‌های نیترات و آمونیوم را جذب کرده و مورد استفاده قرار دهند. افزایش مقدار نیترات باعث افزایش تجمع ماده خشک می‌شود؛ که این امر اختلافات ژنتیکی در اولویت یونی را نشان می‌دهد. مقادیر زیاد آمونیوم در بافت می‌تواند رشد را به تاخیر بیندازد ولی مقادیر زیاد نیترات زیان‌آور نیست (Koocheki *et al.* 1999). بنابراین کاهش آمونیوم در لاین *Bt* نسبت به شاهد نگران‌کننده نیست. اختلاف در میزان آمونیوم

این پژوهش در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج انجام گرفت. بذور نسل سوم پنبه‌های تاریخته حاوی ژن کیتیناز جهت مقاومت به پاتوژن قارچی *Verticillium dahliae* و نیز نسل سوم پنبه‌های تاریخته حاوی ژن *cryIAb* موسوم به پنبه *Bt* جهت مقاومت به کرم غوزه پنبه که توسط توحدیفر و همکاران (Tohidfar *et al.* 2005; Tohidfar *et al.* 2008) تاریخته شده بودند و نیز لاین غیرتاریخته (شاهد) به عنوان مواد گیاهی مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از آب ژاول، بذور استریل و درون پتري جوانه‌دار و سپس به گلدان منتقل شدند، هر گلدان حاوی یک گیاه بوده و شرایط نگهداری و میزان و زمان آبیاری برای تمام گیاهان در گلخانه یکسان اعمال شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل با ۳ تیمار انجام گرفت و تعداد تکرار برای تیمار اول (لاین حاوی ژن کیتیناز) ۱۵ گیاه، تیمار دوم (لاین حاوی ژن *cryIAb*) ۲۰ گیاه و برای تیمار سوم (شاهد) ۳ گیاه بود.

استخراج و اندازه‌گیری کاتیون‌ها و آنیون‌ها

نمونه برداری از برگ‌های حقیقی شاخه رویشی گیاهان، هفت هفته بعد از کشت صورت گرفته و سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری و خشک شدند. نمونه‌ها بعد از خشک شدن پودر شده و جهت استخراج کاتیون‌ها و آنیون‌ها استفاده شدند.

برای استخراج کاتیون‌ها ۰/۲ گرم از هر نمونه خشک شده در فالکون‌های ۵۰ میلی لیتری قرار داده و به هر نمونه ۲۵ میلی لیتر محلول ۱۰٪ استیک اسید و ۱٪ نرمال نیتریک اسید اضافه شد. فالکون‌ها ۴ ساعت در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری و بعد از هم دما شدن با محیط، با کاغذ صافی فیلتر شدند. از این عصاره جهت اندازه‌گیری کاتیون‌ها با استفاده از ستون 250 C2 Metrosep دستگاه Ion chromatography ساخت شرکت Metrohm استفاده شد (Metrohm).

جهت استخراج آنیون‌ها از هر گیاه ۰/۲ گرم پودر برگ خشک شده در فالکون ۵۰ میلی لیتری ریخته و ۲۰ میلی لیتر آب قطر

جدول ۱- مقایسه میانگین آنیون‌ها (میلی‌مولار در گرم وزن خشک) با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵

Table 1- Concentration (mMol/g) of anions in cotton leaves from *Chitinase* lines (C) and *Bt* lines (*Bt*) and nontransgenic (N) plants.

| <i>Bt</i> | کیتیناز C | شاهد N | | |
|---------------------|--------------------|---------------------|-----------|---------|
| | | | فلوراید | Floride |
| 54.8 ^a | 35.3 ^a | 59.6 ^a | | استات |
| 378.5 ^a | 281.7 ^a | 391.6 ^a | | Acetate |
| 974.5 ^a | 973.3 ^a | 1273.6 ^a | کلراید | |
| | | | Chloride | |
| 18.7 ^a | 24.8 ^a | 22 ^a | نیترات | |
| | | | Nitrate | |
| 125.6 ^a | 115.9 ^a | 161 ^a | فسفات | |
| | | | Phosphate | |
| 1865.8 ^a | 822 ^a | 806.3 ^a | سولفات | |
| | | | Sulphate | |
| 168.1 ^a | 103.8 ^b | 131.6 ^{ab} | سوکسینات | |
| | | | Succinate | |
| 22.5 ^b | 23.9 ^b | 29.3 ^a | اکرالات | |
| | | | Oxalate | |

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است.

Values followed by the superscript different letters within the same column are significantly different at 0.05 probability level.

ندارد و برای دست یابی به محصول زیاد در گیاهان ضروری نیست (Amin Panah *et al.* 2005).

بر اساس نتایج این پژوهش، اگر چه پنبه‌های ترازیخته در برخی عناصر کم مصرف با گیاه شاهد اختلاف نشان دادند ولی در اکثر موارد با شاهد اختلافی نداشتند، ضمن اینکه این مقادیر در دامنه قابل قبول قرار داشتند. از طرفی این اختلافات می‌توانند ناشی از اثرات محیطی و یا خطا در زمان نمونه برداری باشد که می‌توان آنرا طبیعی قلمداد کرد. در حال حاضر اکثر پنبه‌های ترازیخته تجاری شده در دنیا، علاوه بر اختلاف در عناصر کم مصرف حتی در میزان الیاف، خاکستر، چربی و کربوهیدرات با شاهد اختلاف

ممکن است مربوط به ترکیبات خاک و یا سرعت جذب عناصر توسط گیاهان باشد (Hawkins *et al.* 1993).

میزان سدیم در لاین‌های ترازیخته به طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود. تجمع سدیم در گیاه منجر به کاهش جذب کلسیم و پتاسیم می‌شود. سدیم نمی‌تواند در فعالیت‌های ویژه مانند فعال سازی آنزیم‌ها و سنتز پروتئین برای ایجاد رشد کافی، جایگزین یون پتاسیم شود. علاوه بر این جایگزینی سدیم به جای کلسیم در غشای سلول سبب کاهش خاصیت نیمه تراوایی غشا و در نتیجه خروج پتاسیم و نیترات درون سلولی می‌شود؛ لذا افزایش تجمع سدیم برای گیاه مضر است اما کاهش سدیم خطری برای گیاه

بررسی را بر میزان آنیون‌ها و کاتیون‌ها ناچیز قلمداد کرد (Tang et al. 2006).

دارند، با این وجود مجوز لازم برای تجاری سازی را دریافت کردند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می‌توان تاثیر حضور ژن‌های کیتیناز و *cryIAb* در ژنوم پنبه‌های ترازیخته مورد

جدول ۲- مقایسه میانگین کاتیون‌ها (میلی مولار در گرم وزن خشک) با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵

Table 2- Concentration (mMol/g) of cations in cotton leaves from *Chitinase* lines (C) and *Bt* lines (*Bt*) and nontransgenic (N) plants

| <i>Bt</i> | کیتیناز | | شاهد سدیم |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | C | N | |
| 26.8 ^b | 28.5 ^b | 44.6 ^a | |
| 1250.8 ^a | 1199.4 ^a | 1303.6 ^a | Sodium پتاسیم |
| | | | Potassium |
| 400.1 ^a | 430.1 ^a | 410.6 ^a | Magnesium منیزیم |
| 24.7 ^b | 27.2 ^{ab} | 32.6 ^a | آمونیوم Ammonium |

حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵ است

Values followed by the superscript different letters within the same column are significantly different at 0.05 probability level

منابع

1. Amin Panah H, Soroushzadeh A.(2005). The effect of calcium nitrate on sodium and potassium distribution in seedling of rice under saline conditions.Journal of Biology of Iran. 18(2):92-100. (In Farsi).
2. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods derived from recombinant DNA plants. Available at: http://www.codexalimentarius.net/download/standards/10025/CXG_046e.pdf
3. Hawkins, H.J. and O.A.M. Lewis. 1993. Effect of NaCl Salinity, nitrogen form, calcium and potassium concentration on nitrogen uptake and kinetics in *Triticum aestivum*. L. CV. Gamtoos. New Phytol. 124:171-177.
4. International Life Science Institute(ILSI) Task Force.(2004). Nutritional and safety assessments of foods and feeds nutritionally improved through biotechnology. Task force of the International Life Science Institute (ILSI) International Food Biotechnology Committee. Comprehensive Rev Food Sci Food Saf 3(2):35–104.
5. Konig A., Cockburn A., Crevel R.W.R., Debruyne E., Grafstroem R., Hammerling U., Kimber I., Knudsen I., Kuiper H.A., Peijnenburg A.C.M., Penninks A.H., Poulsen M., Schauzu M., Wal J.M.(2004). Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. Food Chem Toxicol 42:1047–1088.
6. Koocheki A., Sarmadnia G.(1999). Physiology of crop plants. Jahad daneshgahi press. Mashhad. Iran.(In Farsi).
7. Li Xina, He Xiaoyuna, Luo Yunboa, b, Xiao Guoyingc, Jiang Xianbinc, and Huang Kunlun.(2008). Comparative analysis of nutritional composition between herbicide-tolerant rice with bar gene and its non-transgenic counterpart. Journal of Food Composition and Analysis. 21(7): 535- 539.
8. Libert B. and Franceschi V.R. Oxalate in crop plants.(1987). Journal of Agric. Food chem. 35: 926-938.

9. Methods available from Metrohm for the food industry
<http://food.metrohm.com/overview/index.html>.
10. Mohanta R .K. Singhal K. K, Ebrahimi S.H., Rajput Y.S. and Mohini M.(2011). Comparative nutritional evaluation of transgenic cottonseeds containing Cry1C protein for ruminant feeding. *Livestock Research for Rural Development*.
<http://www.lrrd.org/lrrd23/1/moha23014.htm>
11. Royal Society.(2002). Genetically modified plants for food use and human health – an update. The Royal Society, London, UK. Available at <http://www.royalsoc.ac.uk/displaypagedoc.asp?id=11319>.
12. Rui Y.K., Zhang F.S., Wang Z.R. (2008).Application of ICP-MS to detection of mineral elements and heavy metals in transgenic cotton seeds. 28(1): 188-90.
13. Stoyanova Z. and Doncheva S.(2002). The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14(2).
14. Tang M., Huang K., Li X., Zhou K., He X. and Luo Y. (2006). Absence of effect after introducing *Bacillus thuringiensis* gene on nutritional composition in cottonseed. *J Food Sci*. 71(1): S38-S41.
15. Tohidfar M., Mohammadi M., Ghareyazie B. (2005). Agrobacterium- mediated transformation of cotton(*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant Cell Tiss Org*.83: 83-96.
16. Tohidfar M., Ghareyazie B., Mosavi M., Yazdani S., Golabchian R. (2008). Agrobacterium-mediated transformation of cotton(*Gossypium hirsutum*) using a synthetic cry1Ab gene for enhanced resistance against *Heiothis armigera*. *Iranian Journal of Biotechnology*. 6(3):164-173.
17. Yukui R. , Wenya W. , Pinghui L. & Fusuo Z. (2009). Mineral element distribution in organs of dual-toxin transgenic (Bt+CpTI) cotton seedling. *Plant Biosystems*. 143(1): 137-139.

بررسی آخرین وضعیت تولید چندرقند ترازیخته مقاوم به آفات در

ایران و جهان

پیمان نوروزی^{۱*}، مراد جعفری^۲، بهزاد قره‌باضی^۳، محمدعلی ملبوی^۴، محمدرضا رضاپناه^۵

- ۱- موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چندرقند
- ۲- دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه
- ۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
- ۴- پژوهشگاه ملی مهندسی ژئوتک و زیست فناوری
- ۵- موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: norouzi@sbsi.ir

(تاریخ دریافت: ۹۰/۳/۳ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۲/۱۰)

چکیده

واژه‌های کلیدی

چندرقند
cry1Ab
ژن
پرودنیا
کارادرینا
اگروتیس

در این مقاله ابتدا معرفی بر تحقیقات انجام شده در زمینه تولید چندرقند ترازیخته مقاوم به آفات (در مفهوم عام شامل حشرات آفت، بیماری‌ها و علف‌های هرز) در جهان و نیز اشاره ای به ملاحظات اینمنی زیستی چندرقند ترازیخته خواهد شد و سپس به نتایج پژوهش‌های انجام شده در ایران در زمینه تولید گیاهان چندرقند ترازیخته حامل ژن *Bt* و زیست سنجی و ارزیابی خسارت آفات مذکور بر روی چند لاین ترازیخته چندرقند حامل ژن *Bt* نسل *T₀* و *F₁* و *T₁* نسل *cry1Ab* خواهیم پرداخت. در آزمایش‌های زیست سنجی با لارو سه نوع آفت پرودنیا، کاردرینا و آگروتیس، لاین‌های ترازیخته از نظر صفات میزان مرگ و میر لارو، کاهش وزن لاروی و کاهش خسارت ایجاد شده روی برگ میزان مورد مقایسه آماری قرار گرفتند. نتایج آزمایش زیست سنجی لاین‌های ترازیخته نسل *T₀* و *F₁* بیان ژن و مقاومت گیاهان ترازیخته را بر علیه کرم برگخوار پرودنیا نسبت به شاهد نشان داد. همچنین بر اساس نتایج زیست سنجی لاین‌های ترازیخته نسل *T₁*، مشخص شد که لاین S37-3 با ۳۸ درصد مرگ و میر لاروی، ۱۲/۵ میلی گرم کاهش وزن لاروی و ۶۳ درصد کاهش خسارت برگ (در مورد آفت پرودنیا)، لاین H2-3 با ۴۳ درصد مرگ و میر لاروی، ۱۱/۵ میلی گرم کاهش وزن لاروی و ۶۳ درصد کاهش خسارت برگ (در مورد آفت کاردرینا) و لاین S36-13 با ۲۰ درصد مرگ و میر لاروی، ۱۰/۸ میلی گرم کاهش وزن لاروی و ۵۴ درصد کاهش خسارت برگ (در مورد آفت اگروتیس) به عنوان برترین لاین‌های نسل *T₁* از گیاهان ترازیخته چندرقند هستند.

مقدمه

هر یک درجای خود می‌تواند مورد بحث علمی قرار گرفته و پاسخ داده شود. در این قسمت اشاره‌ای به ملاحظات ایمنی زیستی مرتبط با چغندر تاریخته مقاوم به علف کش می‌شود.

مهاجرت و انتشار ژن

جهت بررسی شار ژنی از چغندر تاریخته مقاوم به علف کش به چغندر علفی و انواع وحشی آن یک سری آزمایش در شش سال Darmency *et al.*, 2007 در مکان در سطح مزارع صورت گرفته است (Darmency *et al.*, 2007). در این آزمایش‌ها از دو لاین چغندرقند تاریخته یکی مقاوم به علف کش گلیفوسینات و دیگری مقاوم به علف کش رانداب استفاده شد. انتقال مستقیم دانه گرده از چغندر تاریخته به ساقه رفته در سال اول به چغندر علفی^۱ که در مزارع مورد آزمایش و یا در مزارع آیش مجاور رشد می‌کردند فقط منجر به تولید ۰/۴ درصد بذر مقاوم برداشت شده از روی چغندرهای علفی در طی شش سال آزمایش در دو مکان شد. ضمناً بذور مقاوم به علف کش از نتاج چغندر علفی زمانی ایجاد می‌شدند که فاصله بوته‌های والدی آنها از چغندر تاریخته حداقل ۱۱۲ متر بوده است (Darmency *et al.*, 2007). در آزمایش دیگر برای تعیین میزان شار ژنی دانه گرده چغندر تاریخته از گیاهان نر عقیم تله (این گیاهان به علت نداشتن دانه گرده به عنوان گیرنده دانه گرده از سایر گیاهان عمل می‌کنند و در نتیجه بذر تشکیل شده بر روی آنها صد درصد هیبرید است) که درون و بیرون از مزارع چغندر تاریخته محصور شده با نواری از شاهدانه کشت شده بودند استفاده و مشخص شد که شار ژنی در فاصله ۳۰۰ متری بسیار محدود می‌شود (Saegritz *et al.*, 2000). بنابراین این آزمایش‌ها نشان دادند که با وجود آنکه احتمال فرار ژن از چغندر زراعی به انواع وحشی آن وجود دارد می‌توان با کشت چغندرهای تاریخته مقاوم به ساقه روی و حذف ساقه رفته‌های سال اول (با توجه به آنکه چغندرقند یک گیاه دو ساله است که در سال اول تولید ریشه و در سال دوم تولید بذر می‌کند) و نیز استفاده از بذور گواهی شده با کیفیت بالا که قادر بذر هیبرید چغندر تاریخته و چغندرهای یک ساله باشند، شار ژنی را در زراعت چغندرقند به تاخیر انداخت (Darmency *et al.*, 2007). همچنین

چغندرقند از مهم‌ترین گیاهان صنعتی در دنیا و ایران بوده و در حدود یک چهارم شکر جهان در مناطق معتدل، جایی که نیشکر کشت نمی‌شود، بوسیله آن تولید می‌شود (Datta *et al.*, 1998). چغندرقند به دلیل قابلیت عملکرد بالای آن (بیش از ۲۴ میلیون تن تولید جهانی) نه تنها به عنوان منبع شکر بلکه به عنوان یک بیوراکتور سبز برای ذخیره متabolیت‌های جدید در ریشه بطور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه است (Ivic-Haymes and Smigoki, 2005). تنش‌های زیستی و غیرزیستی از عوامل مهم در کاهش عملکرد و تولید محصولات کشاورزی هستند به طوری که حشرات آفت حدود ۱۴ درصد کل محصولات کشاورزی در جهان را از بین می‌برند (Hilder and Boulter, 1999).

چغندرقند متحمل به علف کش

ژن‌های مختلفی برای ایجاد گیاهان چغندرقند مقاوم به آفات، امراض و علف‌های هرز با استفاده از فنون مهندسی ژنتیک در منابع خارجی به کار رفته است. ژن ALS برای مقاومت به علف کش کلروسولفورون (Halluin *et al.*, 1992)، ژن bar برای Kishchenko *et al.*, 2005; Halluin *et al.*, 1992 مقاومت به علف کش گلوفوسینات آمونیوم (GOX و CP4 EPSPS) (Mannerllof *et al.*, 1997) جهت مقاومت به علف کش گلیفوسیت (Mannerllof *et al.*, 1997) به چغندرقند منتقل شده‌اند. از بین گیاهان چغندرقند تاریخته ایجاد شده در جهان، این محصول از سال ۲۰۰۹ میلادی تنها در آمریکا به صورت تجاری در سطح وسیع کشت می‌شود. طبق این گزارش تقریباً کل سطح کشت چغندرقند در آمریکا معادل ۴۷۵ هزار هکتار در سال ۲۰۰۹ از نوع تاریخته بوده است. چغندرقند تاریخته مقاوم به علف کش موسوم به RoundupReady توسط شرکت مونسانتوی آمریکا و با همکاری شرکت KWS آلمان ایجاد شده است که به ماده موثره علف کش رانداب (گلیفوسیت) مقاومت نشان می‌دهد و در نتیجه باعث کترول و مدیریت موثر کلیه علف‌های هرز مزارع چغندرقند می‌شود (Ananymus, 2010).

به موازات پیشرفت در زمینه مهندسی ژنتیک چغندرقند، سوالاتی نیز در مورد اثرهای احتمالی ارقام تاریخته مطرح شده است که

زراعی و گونه وحشی آن (*Beta maritima*) انتقال دادند، ولی آنها هیچگونه آنالیز مولکولی برای ژن‌های *cry* و آزمایش زیست‌سنگی به منظور بررسی مقاومت به آفت را گزارش نکردند (Hisano *et al.*, 2004). با بررسی‌های انجام شده از منابع علمی موجود در دسترس، هنوز در دنیا چغندرقند مقاوم به آفات حشره‌ای *Bt* تجاری وجود ندارد.

وضعیت تولید چغندرقند تاریخته در ایران

در سال‌های اخیر در داخل کشور نیز پژوهش‌های زیادی در زمینه انتقال ژن‌های مهندسی شده به چغندرقند به منظور ایجاد مقاومت در برابر آفات پروانه‌ای در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی و موسسه تحقیقات چغندرقند (نوروزی، قره یاضی و ملبوی، نتایج منتشر نشده)، در برابر آفات سخت بالپوش چغندرقند در دانشگاه ارومیه (جعفری، نتایج منتشر نشده)، بیماری‌های ویروسی عمدتاً ریزومانیا (ملبوی، نتایج منتشر نشده)، مقاومت در برابر بیماری‌های قارچی چغندرقند (زمانی و مطلبی، نتایج منتشر نشده) و مقاومت در برابر علفکش گلیفوسیت (سلمانیان، نتایج منتشر نشده) در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شده است. برخی از مقالات حاصل از پژوهش‌های مذکور شامل Aghel (انتقال ژن پروتئین پوششی ریزومانیا به چغندرقند (Pasand, 2010)، ژن پلاتنتی بادی ویروس ریزومانیا به چغندرقند (Mardani, 2010)، ژن‌های *PGIP1&2* برای ایجاد مقاومت Mohammadzadeh, 2010) برعلیه بیماری‌های قارچی چغندرقند (2010) پیش از این منتشر شده است.

آفات پروانه‌ای (Lepidoptera) از جمله آفات مهمی هستند که در اغلب مزارع چغندر وجود دارند. سه آفت مهم این گروه شامل کرم برگ‌خوار مصری یا پرودنیا (*Spodoptera littoralis*), کرم برگ‌خوار چغندرقند یا کارادرینا (*Spodoptera exigua*) و کرم طوقه‌بر یا آگروتیس (*Agrotis segetum*) هستند که هر ساله خسارت قابل توجهی به مزارع چغندرقند وارد می‌کنند (Asadi, 1994; Behdad, 1997; Kheiri, 1990; Ghadiri, 2004; Mirderikvand, 1999; Rivany, 1962). در واقع گیاهان تاریخته به نوعی با دارا بودن ترکیباتی از باکتری باسیلوس تورینجینسیس موجب از بین رفتن آفت و یا کاهش میزان رشد آن

در مزارع تولید بذر چغندر تاریخته نیز می‌توان با حصر فیزیکی چغندر تاریخته در بین نوارهای کشت گیاه شاهدانه (این گیاه با داشتن ارتفاع زیاد و برگ‌های چسبنده تا حد زیادی از جریان دانه‌های گرده جلوگیری می‌کند) و نیز فاصله استاندارد بین مزارع تولید بذر از ورود و خروج گرده‌های ناخواسته جلوگیری کرد (Saegritz *et al.*, 2000).

چغندر مقاوم به ریزومانیا و آفات حشره‌ای

برای ایجاد مقاومت به بیماری ریزومانیا به چغندرقند عمدتاً از ژن پروتئین پوششی (Coat protein) ویروس ریزومانیا (Mannerlof Lennefors *et al.*, 1996) و ژن dsRNA ویروس ریزومانیا (al., 2006) استفاده شده است. گزارش‌های محدودی در استفاده از بعضی ژن‌های مقاومت به حشرات آفت به خصوص ژن‌های *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) در چغندرقند وجود دارد. ژن‌های رمزکننده بازدارنده‌های پروتئازی (PI) به چغندرقند انتقال داده شده است مگس ریشه (Root maggot) (Wilhite *et al.*, 2000; Smigocki *et al.*, 2003; Smigocki, 2001). استریزوف و همکاران (2000) گزارش کردند که ژن *cryIC* یافته در گیاهان تاریخته یونجه و سیب زمینی قادر به کنترل حشراتی همچون کارادرینای چغندرقند است (Strizhov et al., 2000). کیموتو و شیماموتو (2002)، به منظور ایجاد مقاومت به کرم کلم (*Mamestra brassicae*), ژن‌های *cry1Ab* و *cry1Ac* توسط آگروباکتریوم *CaMV35S* را تحت کنترل پیشبر *cry1Ac* تومه‌فاسینس به چغندرقند انتقال دادند. نتایج زیستی‌سنگی نشان داد که هر دو ژن برای لارو سن دوم کرم کلم مقاومت ایجاد می‌کنند و باعث توقف رشد و یا کند شدن رشد لاروها می‌شوند ولی گیاهان تاریخته حاوی *cry1c* نسبت به آفت مذکور سمیت بیشتری نشان می‌دهند (Kishchenko *et al.*, 2005). اسمیکوگی و همکاران (2003)، ژن سازنده سیتوکینین باکتریایی موسوم به *ipt* که باعث مرگ و یا اختلال در رشد و تولید مثل مگس ریشه چغندرقند می‌شود را به چغندرقند وارد کردند (Smigocki *et al.*, 2003). هیسانو و همکاران (2004)، با معرفی یک روش جدید به منظور تولید گیاهان تاریخته با فراوانی بالا، ژن‌های *cry1Ab* و *cry1Ac* را تحت کنترل پیشبر *CaMV35S* به چغندرقند *cry1C* و *chi* را تحت کنترل پیشبر

گرفتند. تعداد هفت لارو سن اول (۰-۲۴ ساعته) در یک مرحله بر روی برگ گیاهان ترا ریخته چغندرقند حاوی ژن *cryIAb* و گیاه غیر ترا ریخته به عنوان شاهد در پتری دیش حاوی کاغذ صافی استریل مطروب گذاشته و بوسیله پارافیلم بسته شد. برای هر لارو ترا ریخته سه تکرار در نظر گرفته شد. نمونهها به اتفاق رشد با شرایط دمایی $20 \pm 2^\circ\text{C}$, رطوبت ۷۰٪ و تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند و آزمایش زیست سنجی ۴ بار به فواصل چند هفته‌ای تکرار شد. تعداد لارو مرده، وزن لاروهای زنده و درصد خسارت به طور چشمی پس از سومین و هفتمین روز آلوودگی بر طبق روش مرسوم در موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور یادداشت برداری شد.

زیست سنجی گیاهان نسل T_1 : برای هر یک از سه آفت پرودنیا، کارادرینا و آگروتیس به طور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۴ تکرار و در هر تکرار روی ۱۰ عدد لارو نئونات در داخل ظروف پتروی شیشه‌ای با قطر ۱۰ سانتی‌متر در فواصل زمانی ۳ و ۶ روز پس از آغاز تغذیه روی چغندرهای ترا ریخته نسل T_1 بررسی شد. صفات اندازه گیری شده شامل تعداد لاروهای مرده، وزن لاروهای زنده مانده و میزان خسارت (کاهش وزن) برگ بود. همچنین صفات محاسبه شده شامل درصد لاروهای مرده، کاهش وزن لاروی و کاهش خسارت برگ در مقایسه با گیاهان شاهد غیر ترا ریخته بود. این آزمایش‌ها در سه مرحله و در شرایط محیطی دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی $65 \pm 10\%$ درصد انجام شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: داده‌های حاصل از زیست سنجی گیاهان ترا ریخته نسل T_0 و F_1 بوسیله نرم افزار SAS و گیاهان ترا ریخته نسل T_1 با استفاده از نرم افزار SPSS ver.13.0 در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. بر روی داده‌های حاصل از تعداد و داده‌های حاصل از درصد به ترتیب تبدیل جذری و تبدیل زاویه‌ای انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن انجام گرفت.

نتایج و بحث

فرآیند ترا ریخته چغندرقند به کمک آگروباکتری و بازیابی گیاهان

می‌شوند. اثر آنتی‌بیوتیکی در این نوع گیاهان بر روی حشره می‌تواند از ملایم تا کشنده باشد (Hatammi, 1991). در این مقاله به نتایج پژوهش‌های انجام شده در ایران در زمینه تولید گیاهان چغندرقند ترا ریخته Bt و زیست سنجی و ارزیابی خسارت آفات پرودنیا، کارادرینا و آگروتیس بر روی چند لارو ترا ریخته چغندرقند حامل ژن *cryIAb* نسل T_0 , F_1 و T_1 اشاره می‌شود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: این تحقیق در قالب طرح مشترک مصوب بین موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند (SBSI) و پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج (ABRII) انجام گرفته است. در این پژوهش بنا به پیشنهاد موسسه اصلاح و تهیه بذر چغندرقند از دو رقم مولتی ژرم دیپلولئید 7233 و HM1990 برای ترا ریخته گیاه استفاده شد.

تهیه سازه‌های ژنی: سازه‌های ژنی حاوی ژن *cryIAb* تحت کترول پیشبر CaMV 35S و یا PEPC به روش سمبروک و راسل Sambrook and (2001) از پلاسمید‌های اولیه انجام گرفت (pBI35Scry, Russell, 2001) و pBIPEPcry نامگذاری شدند.

ترا ریخته چغندرقند: مراحل کشت آگروباکتری، تلقیح بافت گیاهی، انتقال به محیط کشت توام و گزینش جوانه‌های ترا ریخته احتمالی در محیط حاوی آنتی‌بیوتیک طبق روش تلفیقی هیسانو و همکاران (2004) و نوروزی و همکاران (2005) با تغییرات جزئی انجام گرفت (Hisano, 2004; Norouzi et al., 2005).

تهیه نسل‌های T_1 و F_1 : گیاهان ترا ریخته نسل T_0 به صورت رویشی (کلون) تکثیر شدند. برای بدست آوردن بذر T_1 کلون‌های مختلف یک رخداد ترا ریخته با یکدیگر تلاقی داده شدند (خودگشتنی). برای تهیه نسل F_1 , گیاه ترا ریخته T_0 با لارو CMS#231 نر عقیم سیتوپلاسمی (CMS#231) تلاقی داده شد و بذرها جمع آوری شدند.

زیست سنجی گیاهان ترا ریخته نسل T_0 و F_1 : با همکاری موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی، دسته‌های تخم حشره پرودنیا، یکی از آفات پروانه‌ای مهم مزارع چغندرقند ایران، از مزارع گرگان و دزفول جمع آوری شدند و در ظروف حاوی مواد غذایی لازم قرار

تحت کنترل پیشبر PEPC *cryIAb* همراه گیاهان غیرتاریخته به عنوان کنترل با زیست سنجی بر علیه آفت پرودنیا مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج زیست سنجی در جدول ۲ آمده است. تفاوت بسیار معنی دار بین گیاهان ترا ریخته و غیرتاریخته از نظر هر سه صفت اندازه گیری شده وجود دارد.

زیست سنجی گیاهان ترا ریخته F_1 : گیاهان ترا ریخته F_1 حاوی ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر CaMV35S همانند گیاهان T_0 در تحت آنالیز زیست سنجی با آفت پرودنیا قرار گرفتند. نتایج حاصل از زیست سنجی در جدول ۳ خلاصه شده است. به طور کلی هر سه شاخص در گیاهان ترا ریخته و غیرتاریخته از لحاظ آماری تفاوت بسیار معنی دار داشتند. گیاهان ترا ریخته F_1 مورد بررسی، مقاومت بهبود یافته ای در برابر آفت مورد بررسی نشان

ترا ریخته نشان داد که برگ حاوی جوانه القا شده به عنوان یک جدایشت مناسب و با قابلیت جوانه زایی بالا برای ترا ریزش چغندرقند است.

زیست سنجی گیاهان T_0 ترا ریخته حاوی ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر CaMV 35S: تعدادی گیاه ترا ریخته T_0 حاوی ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر CaMV 35S به همراه دو گیاه غیرتاریخته برای بررسی اثر توکسین Cry1Ab و مقاومت بر علیه پرودنیا انتخاب شدند. بر اساس نتایج حاصل از زیست سنجی (جدول ۱) تفاوت بسیار معنی دار بین گیاهان ترا ریخته و غیرتاریخته از نظر هر سه صفت اندازه گیری شده وجود دارد.

زیست سنجی گیاهان ترا ریخته T_0 حاوی ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر PEPC: مقاومت گیاهان ترا ریخته T_0 حاوی ژن

جدول ۱- زیست سنجی پرودنیا و ارزیابی مقاومت گیاهان ترا ریخته T_0 حامل ژن *cryIAb* تحت کنترل پیشبر CaMV 35S

Table 1- Bioassay of resistance of T_0 sugar beet plants carrying a *cryIAb* gene under the control of CaMV 35S promoter against Prodenia.

| مرگ و میر (%) | خسارت برگ (%) | وزن لاروهای زنده (mg) | | تعداد لارو مرده | | لاین |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| %Mortality | %Leaf damage | Weight of live larvae | | No. of dead larvae | | Line |
| 7DAI | 7DAI | 7DAI | 3DAI | 7DAI | 3DAI† | |
| 2.31±0.01 ^e | 100±0.00 ^a | 55.00±3.52 ^a | 10.24±1.22 ^a | 7.71±0.00 ^a | 0.12±0.10 ^d | 7233* |
| 2.52±0.44 ^e | 100±0.00 ^a | 36.45±2.11 ^b | 12.11±0.31 ^a | 1.92±0.20 ^b | 0.25±0.08 ^d | HM1990* |
| 70.00±1.2 ^a | 31.34±0.70 ^e | 12.54±0.13 ^d | 2.55±0.15 ^c | 1.90±0.25 ^{bc} | 4.92±0.10 ^a | 1.9±0.11 ^{ab} |
| 48.88±2.53 ^{bcd} | 47.50±1.42 ^{bc} | 22.52±0.10 ^b | 2.62±0.20 ^{bc} | 1.00±0.10 ^d | 3.41±0.31 ^{abc} | 1.41±0.23 ^{bcd} |
| 55.73±2.33 ^{abc} | 27.54±1.40 ^e | 27.251±1.45 ^b | 2.60±0.22 ^{bc} | 2.30±0.22 ^b | 3.91±0.22 ^{ab} | 2.31±0.11 ^a |
| 37.30±2.60 ^d | 51.34±1.31 ^b | 20.12±0.80 ^c | 3.33±0.10 ^{bc} | 1.92±0.40 ^{bc} | 2.61±0.30 ^c | 1.10±0.12 ^{cd} |
| 38.34±2.40 ^d | 50.00±3.11 ^{bc} | 21.00±0.65 ^{bc} | 3.82±0.24 ^{bc} | 1.52±0.11 ^{cd} | 2.72±0.30 ^c | 0.94±0.31 ^d |
| 37.03±2.61 ^d | 40.02±1.00 ^d | 18.84±0.71 ^c | 3.80±0.11 ^{bc} | 2.33±0.10 ^b | 2.63±0.30 ^c | 1.20±0.12 ^{bcd} |
| 38.32±0.33 ^d | 43.81±1.73 ^{cd} | 16.32±0.70 ^{cd} | 3.30±0.10 ^{bc} | 1.14±0.10 ^d | 2.72±0.30 ^c | 1.52±0.10 ^{abcd} |
| 40.030±1.32 ^{cd} | 53.382±3.84 ^b | 20.10±1.24 ^c | 4.42±0.43 ^b | 2.24±0.40 ^b | 2.84±0.20 ^{bc} | 1.41±0.21 ^{bcd} |
| 61.53±2.34 ^{ab} | 48.83±2.40 ^c | 20.00±0.21 ^c | 2.32±0.13 ^c | 1.83±0.10 ^{bc} | 4.31±0.20 ^a | HM1990-3 |

گیاهان غیرتاریخته به عنوان شاهد، [†] روزهای پس از آلودگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین هایی که حروف غیر مشترک دارند، دارای اختلاف معنی دار به روشن دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Non-transgenic parental genotype were used as control.

جدول ۲- زیست سنجی پرودنیا و ارزیابی مقاومت گیاهان ترازیخته T_0 حامل ژن *cry1Ab* تحت کنترل پیشبر PEPC**Table 2-** Bioassay of resistance of sugar beet to plantal containing a *cry1Ab* under the control of PEPC promoter against Prodenia.

| مرگ و میر (%) % Mortality | خسارت برگ (%) % Leaf damage | وزن لاروهای زنده (mg) Weight of live larvae | | تعداد لارو مرده No. of dead larvae | | لاین Line |
|--|--------------------------------|--|--------------------------|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|
| 7DAI | 7DAI | 3DAI | 7DAI | 3DAI | 7DAI | 3DAI† |
| 4.16±1.50 ^c | 97.43±5.32 ^a | 28.66±1.51 ^b | 11.12±0.38 ^a | 3.07±0.20 ^b | 0.16±0.06 ^d | 0±0.00 ^c |
| 8.39±1.30 ^c | 100±0.00 ^a | 47.49±0.83 ^a | 13.05±0.86 ^a | 3.9±0.54 ^a | 0.16±0.10 ^d | 0±0.00 ^c |
| 67.64±2.13 ^a | 14.95±0.82 ^f | 5.58±0.74 ^d | 3.27±0.28 ^d | 0.26±0.07 ^d | 4.39±0.04 ^a | 1.65±0.05 ^a |
| 40.53±2.38 ^{bc} | 47.57±0.83 | 11.21±0.65 ^c | 3.62±0.37 ^{dc} | 0.75±0.06 ^{dc} | 2.83±0.02 ^b | 1.31±0.05 ^a |
| 57.14±2.00 ^{bc} | 46.87±1.07 ^e | 9.92±0.98 ^c | 4.12±0.43 ^{dc} | 0.79±0.06 ^{dc} | 4.10±0.04 ^a | 1.28±0.05 ^a |
| 40.61±2.40 ^{bc} | 62.51±0.61 ^d | 11.21±0.65 ^c | 6.50±0.29 ^b | 1.42±0.05 ^c | 2.20±0.03 ^b | 0.98±0.05 ^{ab} |
| 22.61±2.34 ^d | 80.11±1.47 ^c | 6.19±0.86 ^d | 5.55±0.31 ^{bc} | 0.55±0.06 ^d | 1.57±0.05 ^c | 1.01±0.02 ^{ab} |
| 31.12±0.84 ^{dc} | 77.54±1.00 ^c | 12.44±0.89 ^c | 5.17±0.28 ^{bcd} | 0.78±0.08 ^{dc} | 1.82±0.02 ^c | 0.76±0.04 ^{ab} |
| 53.20±2.00 ^b | 42.49±0.84 ^e | 11.80±1.04 ^c | 3.12±0.43 ^d | 0.81±0.05 ^{dc} | 2.86±0.03 ^b | 0.46±0.16 ^{bc} |
| گیاهان غیرترازیخته به عنوان شاهد، † روزهای پس از آلوگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند. | | | | | | |

جدول ۳- زیست سنجی پرودنیا و ارزیابی مقاومت گیاهان ترازیخته نسل F₁**Table 3-** Insect bioassay of F₁ transgenic sugar beet plants against Prodenia.

| مرگ و میر (%) % Mortality | خسارت برگ (%) % Leaf damage | وزن لاروهای زنده (mg) Weight of live larvae | | تعداد لارو مرده No. of dead larvae | | لاین Line |
|--|--------------------------------|--|-------------------------|---------------------------------------|------------------------|------------------------|
| 7DAI | 7DAI | 3DAI | 7DAI | 3DAI | 7DAI | 3DAI† |
| 4.16±1.50 ^c | 97.43±5.32 ^a | 28.66±1.51 ^b | 11.12±0.38 ^a | 3.07±0.20 ^a | 0.16±0.06 ^c | 0±0.00 ^d |
| 8.39±1.30 ^c | 100±0 ^a | 47.49±0.83 ^a | 13.05±0.86 ^a | 3.9±0.54 ^a | 0.16±0.10 ^c | 0±0.00 ^d |
| 43.89±1.6 ^a | 23.71±0.86 ^e | 3.23±0.39 ^d | 3.5±0.20 ^b | 0.38±0.04 ^b | 2.80±0.03 ^a | 1.41±0.01 ^a |
| 39.47±1.74 ^a | 32.49±0.62 ^{de} | 11.20±0.45 ^c | 3.15±0.43 ^b | 0.60±0.14 ^b | 2.61±0.02 ^a | 1.11±0.04 ^b |
| 30.31±1.17 ^b | 50±0.58 ^c | 9.33±0.63 ^c | 4.37±0.24 ^b | 0.45±0.09 ^b | 1.81±0.03 ^b | 0.9±0.03 ^{bc} |
| 45.95±0.67 ^a | 42.44±0.85 ^{dc} | 5.57±0.74 ^d | 3.75±0.48 ^b | 0.92±0.09 ^b | 0.74±0.02 ^a | 0.7±0.02 ^c |
| گیاهان غیرترازیخته به عنوان شاهد، † روزهای پس از آلوگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند. | | | | | | |

گیاهان غیرترازیخته به عنوان شاهد، † روزهای پس از آلوگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Non-transgenic parental genotype were used as control.

جدول ۴- زیست سنجی پرودنیا و ارزیابی مقاومت گیاهان چغندرقند تراریخته Bt نسل T₁**Table 4-** Insect bioassay of T₁ transgenic sugar beet plants against Prodenia.

| کاهش خسارت برگ (%) | | کاهش وزن لاروی (mg) | | مرگ و میر لاروی (%) | | لاین |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|--------|
| %Decrease in Leaf Damage | | Decrease in larvae Weight | | Larvae Death | | Line |
| 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI† | |
| 48.37± 1.85 ^{ghi} | 31.15±1.42 ^{ef} | 10.96±0.05 ⁱ | 0.09±0.02 ⁱ | 35.00±4.78 ^{abc} | 5.00±2.88 ^c | S18-1 |
| 49.99±0.94 ^{fghi} | 36.90±1.07 ^{cd} | 11.67±0.06 ^{ef} | 0.68±0.03 ^{gh} | 45.00±4.78 ^a | 22.50±2.50 ^a | S18-12 |
| 41.91±1.19 ^j | 33.83±1.17 ^{de} | 11.73±0.08 ^{de} | 0.82±0.06 ^{e fg} | 30.00±2.50 ^{ab} | 17.50±2.50 ^{ab} | S18-15 |
| 47.89±1.12 ^{hi} | 38.70±0.70 ^{bc} | 11.28±0.09 ^{gh} | 0.98±0.06 ^{def} | 35.00±6.29 ^{ab} | 7.50±4.78 ^{bc} | S32-2 |
| 58.64±1. 26 ^{bcd} | 40.92±0.48 ^b | 12.17±0.06 ^b | 1.42±0.23 ^{ab} | 35.00±2.50 ^{abc} | 17.50±4.78 ^{ab} | S35-3 |
| 48.45±1.38 ^{ghi} | 30.30±0.90 ^{ef} | 11.39±0.10 ^g | 0.96±0.06 ^{def} | 37.50±4.08 ^{abc} | 12.50±2.50 ^{abc} | S36-13 |
| 63.05±2.50 ^{abc} | 45.50±0.09 ^a | 12.52±0.03 ^a | 1.44±0.07 ^a | 37.50±7.07 ^{abc} | 15.00±2.88 ^{abc} | S37-3 |
| 58.26±1.50 ^{cd} | 41.09±0.81 ^b | 11.76±0.04 ^{de} | 0.93±0.04 ^{ef} | 40.00±2.50 ^{ab} | 15.00±2.88 ^{abc} | S37-4 |
| 51.69±1.15 ^{e fgh} | 36.68±1.06 ^{cd} | 11.70±0.10 ^e | 0.58±0.09 ^h | 25.00±4.78 ^{bcd} | 15.00±2.88 ^{abc} | S37-5 |
| 51.40±2.30 ^{e fgh} | 28.15±1.29 ^{fg} | 11.16±0.03 ^h | 0.77±0.02 ^{fgh} | 32.50±2.88 ^{abc} | 15.00±2.88 ^{abc} | S38-3 |
| 45.00±1.54 ^{ij} | 27.50±1.34 ^{fg} | 11.28±0.05 ^{gh} | 1.02±0.03 ^{de} | 30.00±4.78 ^{abcd} | 10.00±0.00 ^{bc} | S38-4 |
| 55.24±1.42 ^{def} | 19.80±0.69 ^{ij} | 11.87±0.08 ^{de} | 1.18±0.09 ^{bcd} | 25.00±4.08 ^{bcd} | 10.00±2.50 ^{bc} | H2-3 |
| 53.88±1.74 ^{defg} | 19.22±1.68 ^j | 11.53±0.16 ^{ef} | 0.91±0.04 ^{ef} | 22.50±4.78 ^{cd} | 15.00±4.78 ^{abc} | H2-13 |
| 56.73±1.15 ^{de} | 25.76±1.17 ^{gh} | 11.94±0.04 ^{cd} | 1.38±0.05 ^{ab} | 27.50±4.78 ^{bcd} | 10.00±2.50 ^{bc} | H2-28 |
| 65.73±1.17 ^{de} | 24.61±1.06 ^{gh} | 11.76±0.06 ^{de} | 1.33±0.08 ^{ab} | 35.00±4.08 ^{abc} | 22.50±2.88 ^a | H2-33 |
| 65.16±1.43 ^a | 39.88±1.01 ^{bc} | 12.11±0.04 ^{bc} | 1.45±0.04 ^a | 37.50±4.78 ^{abc} | 17.50±4.08 ^{ab} | H2-39 |
| 54.27±1.25 ^{def} | 23.13±1.62 ^{hi} | 11.78±0.04 ^{de} | 0.96±0.03 ^{def} | 37.50±2.50 ^{abc} | 10.00±2.50 ^{bc} | H2-40 |
| 47.19±2.52 ^{hi} | 14.65±1.04 ^k | 11.85±0.04 ^{de} | 1.04±0.01 ^{cde} | 17.50±2.50 ^d | 10.00±2.50 ^{bc} | H3-2 |
| 62.36±2.33 ^{abc} | 41.99±1.69 ^b | 12.09±0.03 ^{bc} | 1.36±0.02 ^{ab} | 40.00±6.45 ^{ab} | 15.00±4.78 ^{abc} | H6-3 |
| 63.86±2.34 ^{ab} | 19.69±1.86 ^{ij} | 11.84±0.05 ^{de} | 1.26±0.03 ^{abc} | 30.00±2.88 ^{abcd} | 10.00±2.50 ^{bc} | H6-4 |
| 50.338±2.23 ^{fghi} | 18.50±1.38 ⁱ | 11.48±0.04 ^{fg} | 0.96±0.02 ^{def} | 32.50±4.78 ^{abc} | 05.62±1.87 ^c | H6-8 |

گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد، \ddagger روزهای پس از آبودگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌های که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روشن دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Non-transgenic parental genotype were used as control.

در ایجاد مرگ و میر روی لاروهای پرودنیا، کاهش وزن لاروی و دادند. نتایج زیست سنجی آفت پرودنیا در گیاهان چغندرقند تراریخته نسل T₁: نتایج حاصل از بررسی‌ها (جدول ۴) روی میزان مرگ و میر لاروها نشان داد که لاین‌های تراریخته برتر در کنار ایجاد مرگ و میر در جمعیت آفت، بر روی افراد باقیمانده

نتایج زیست سنجی آفت پرودنیا در گیاهان چغندرقند تراریخته بین کارایی ۲۱ لاین چغندرقند تراریخته

جدول ۵- زیست سنجی کارادرینا و ارزیابی مقاومت گیاهان چغندرقند ترازیخته Bt نسل T₁Table 5- Insect bioassay of T₁ transgenic sugar beet plants against Caradrina.

| کاهش خسارت برگ (%) | | کاهش وزن لاروی (mg) | | مرگ و میر لاروی (%) | | لاین |
|---------------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------|
| % Decrease in Leaf Damage | | Decrease in larvae Weight | | Larvae Death | | Line |
| 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI† | |
| 63.06±1.17 ^a | 34.65±1.29 ^b | 11.46±0.02 ^a | 1.54±0.02 ^{ab} | 42.50±2.50 ^a | 20.00±2.50 ^{ab} | H2-3 |
| 53.03±1.16 ^g | 25.51±1.13 ^g | 11.16±0.03 ^{de} | 1.33±0.04 ^{de} | 22.50±4.78 ^{cd} | 12.50±2.50 ^{bcd} | H2-8 |
| 62.96±1.11 ^a | 36.58±1.15 ^a | 11.39±0.02 ^{ab} | 1.61±0.05 ^a | 40.00±2.50 ^a | 25.00±2.50 ^a | H2-13 |
| 57.13±1.10 ^d | 29.58±1.09 ^d | 11.31±0.03 ^{bc} | 1.47±0.04 ^{bc} | 30.00±2.50 ^{abc} | 10.00±0.00 ^e | H2-27 |
| 61.26±1.21 ^b | 24.67±1.30 ^h | 11.04±0.03 ^{ef} | 1.20±0.03 ^{fg} | 20.00±2.88 ^d | 5.00±2.88 ^{de} | H6-5 |
| 55.87±1.15 ^f | 27.42±1.04 ^f | 11.05±0.05 ^{ef} | 1.12±0.02 ^g | 25.00±2.50 ^{bcd} | 7.50±2.50 ^{cde} | H6-7 |
| 60.07±1.30 ^c | 33.36±1.07 ^c | 11.20±0.03 ^{cd} | 1.42±0.06 ^{bcd} | 35.00±2.50 ^{ab} | 12.50±2.88 ^{bcd} | H6-8 |
| 56.12±1.05 ^e | 27.61±1.17 ^f | 10.99±0.03 ^f | 1.29±0.01 ^{ef} | 27.50±2.88 ^{bcd} | 10.00±2.50 ^{cd} | H6-9 |
| 50.91±1.14 ^h | 23.98±1.15 ⁱ | 11.11±0.05 ^{def} | 1.35±0.02 ^{cde} | 30.00±2.50 ^{abc} | 15.00±4.78 ^{bc} | H6-12 |

گیاهان غیرترازیخته به عنوان شاهد، [†] روزهای پس از آلدگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی دار به روشن دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Non-transgenic parental genotype were used as control.

در لاین‌های S18-13، S36-15 دیده شد. به عبارت بهتر در روی این لاین‌ها میزان تغذیه لاروها کمتر از سایر لاین‌ها بود. در واقع نتایج حاصل از ارزیابی‌ها در مورد هر سه آفت مورد بررسی (کرم برگخوار مصری، شب پره زمستانی و برگخوار کارادرینا) نشان داد که بین لاین‌های ترازیخته و غیر ترازیخته (شاهد) در مورد فاکتورهای مورد ارزیابی از نقطه نظر آماری تفاوت معنی دار وجود دارد.

بحث

نتایج حاصل از ترازیش نشان داد که برگ جوانه کشت بافت مناسب‌ترین جداکشت برای ترازیش چغندرقند بوده و دارای مزیت‌هایی چون سادگی تهیه جداکشت، یک منبع قابل دسترس و دائمی با قابلیت باززایی بالا برای تهیه جداکشت هدف، کاهش زمان لازم برای باززایی جوانه‌های ترازیخته به دلیل باززایی مستقیم و به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به دلیل نداشتن فاز کالوس است. به طور کلی سیستم ترازیش مورد استفاده در این

نیز اثرهای آنتی‌بیوزی داشته و منجر به کاهش معنی دار وزن لاروها و اختلالات زیستی در آنها می‌شود.

نتایج زیست سنجی آفت کارادرینا در گیاهان چغندرقند ترازیخته نسل T₁: نتایج حاصل از زیست سنجی (جدول ۵) نشان داد که بر اساس نتایج سه آزمون، لاین‌های H2-3، H2-13، H6-5، H6-7، H6-8، H6-9 و H6-12 در مورد ۲۰-۴۳ درصد، کاهش وزن لاروی با توجه به مرگ و میر لاروی ۱۰/۹-۱۱/۵ میلی‌گرم و کاهش خسارت برگ ۵۱-۶۳ درصد در روز ششم، به عنوان مؤثرترین لاین‌های ترازیخته در کنترل آفت برگخوار کارادرینا هستند.

نتایج زیست سنجی آفت آگروتیس در گیاهان چغندرقند ترازیخته نسل T₁: نتایج حاصل از بررسی‌ها (جدول ۶) در آزمایش اول روی میزان مرگ و میر لاروها، در آزمایش دوم روی میزان کاهش وزن لاروها و در آزمایش سوم روی کاهش میزان خسارت ناشی از تغذیه لاروها نشان داد که بین ۱۶ لاین چغندرقند ترازیخته از نظر این صفات اختلاف معنی دار مشاهده شد. کمترین میزان خسارت در برگ‌های مورد بررسی به ترتیب

جدول ۶- زیست سنجی آگروتیس و ارزیابی مقاومت گیاهان چغندرقند تراریخته Bt نسل T₁Table 6- Insect bioassay of T₁ transgenic sugar beet plants against Agrotis.

| خسارت برگ (%) | | وزن لاروهای زنده (mg) | | مرگ و میر لاروی (%) | | لاین |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--------|
| % Leaf damage | | Weight of live larvae | | No. of dead larvae | | Line |
| 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI | 6DAI | 3DAI† | |
| 47.56±1.40 ^f | 31.79±1.96 ⁱ | 10.01±0.03 ^f | 0.21±0.06 ^g | 12.50±2.50 ^{abc} | 2.50±2.50 ^{ns} | S18-1 |
| 51.51±1.55 ^c | 33.53±1.42 ^g | 10.10±0.08 ^{ef} | 0.88±0.08 ^f | 5.00±2.88 ^{bc} | 2.50±2.50 ^{ns} | S18-8 |
| 53.65±1.38 ^a | 38.95±1.13 ^a | 10.78±0.05 ^a | 1.41±0.06 ^{abc} | 10.00±0.00 ^{abc} | 2.50±2.50 ^{ns} | S18-15 |
| 51.92±2.25 ^{bc} | 37.00±1.57 ^{bc} | 10.48±0.04 ^{bc} | 1.20±0.03 ^{de} | 7.50±2.50 ^{bc} | 5.00±2.88 ^{ns} | S32-2 |
| 52.78±1.18 ^{ab} | 37.29±1.45 ^b | 10.60±0.07 ^{ab} | 1.50±0.07 ^{ab} | 12.50±4.78 ^{abc} | 2.50±2.50 ^{ns} | S35-3 |
| 53.64±2.10 ^a | 39.30±2.18 ^a | 10.76±0.03 ^a | 1.57±0.08 ^a | 20.00±4.08 ^a | 7.50±2.50 ^{ns} | S36-13 |
| 51.06±1.57 ^{cd} | 34.42±1.56 ^f | 10.36±0.05 ^{cd} | 1.24±0.02 ^{cde} | 10.00±4.08 ^{abc} | 5.00±2.88 ^{ns} | S37-2 |
| 45.75±1.47 ^g | 33.29±1.53 ^{gh} | 9.96±0.05 ^f | 1.34±0.01 ^{bcd} | 2.50±2.50 ^c | 2.50±2.50 ^{ns} | H2-2 |
| 51.98±2.10 ^{bc} | 37.11±1.64 ^{bc} | 10.67±0.03 ^{ab} | 1.45±0.06 ^{abc} | 15.00±2.88 ^{ab} | 2.50±2.50 ^{ns} | H2-5 |
| 46.45±1.38 ^{fg} | 36.20±1.21 ^d | 9.99±0.07 ^f | 1.28±0.07 ^{cde} | 10.00±4.08 ^{abc} | 7.50±2.50 ^{ns} | H2-6 |
| 49.76±1.16 ^e | 32.83±2.31 ^h | 10.14±0.06 ^{ef} | 1.15±0.02 ^e | 5.00±2.88 ^{bc} | 2.50±2.50 ^{ns} | H2-7 |
| 45.29±2.21 ^g | 31.60±1.83 ⁱ | 10.11±0.04 ^{ef} | 1.44±0.06 ^{abc} | 7.50±2.50 ^{bc} | 2.50±2.50 ^{ns} | H3-2 |
| 50.17±2.32 ^{de} | 35.27±1.42 ^e | 10.01±0.09 ^f | 1.38±0.03 ^{abcd} | 10.00±4.08 ^{abc} | 2.50±2.50 ^{ns} | H3-4 |
| 51.29±1.72 ^{cd} | 36.25±1.40 ^d | 10.25±0.05 ^{de} | 1.15±0.03 ^e | 7.50±2.50 ^{bc} | 2.50±2.50 ^{ns} | H6-3 |
| 46.29±1.64 ^g | 31.76±1.51 ⁱ | 10.21±0.05 ^{de} | 0.93±0.03 ^f | 7.50±2.50 ^{bc} | 5.00±2.88 ^{ns} | H6-4 |
| 49.27±1.20 ^e | 36.64±1.87 ^{cd} | 10.13±0.05 ^{ef} | 1.44±0.03 ^{abc} | 10.00±4.08 ^{abc} | 2.50±2.50 ^{ns} | H6-10 |

گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد، † روزهای پس از آلودگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌هایی که حروف غیرمشترک دارند، دارای اختلاف معنی‌دار به روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Non-transgenic parental genotype were used as control.

این تحقیق موفق به تولید گیاهان چغندرقند تراریخته حاوی ژن cry1Ab تحت کنترل دو پیشبر مختلف 35S و CaMV و PEPC از هر دو نوع ژنوتیپ 7233 و HM1990 چغندرقند شد. به طور کلی لاین‌های تراریخته حاصل در مقایسه با گیاهان کنترل در برابر آفت پرودنیا مقاومت مناسبی نشان دادند، اگر چه مقاومت ۱۰۰٪ در این گیاهان مشاهده نشد که ممکن است به دلیل سطح ناکافی پروتئین Cry1Ab تولید شده و همچنین حساسیت پایین آفت مذکور نسبت به این توکسین باشد. همچنین بین لاین‌های تراریخته تحت کنترل هر دو پیشبر تنوع و تفاوت در درصد مرگ

پژوهش که برگرفته از دو روش ترازیزش هیسانو و همکاران Hisano *et al.*, (۲۰۰۴) و نوروزی و همکاران (۲۰۰۵) بود ()، یک روش تکرارپذیر و با کارایی بالا برای تولید گیاهان چغندرقند تراریخته در مقیاس وسیع است. بر اساس منابع علمی قابل دسترس پژوهش‌های بسیار محدودی مبنی بر ایجاد چغندرقند مقاوم به حشرات آفت به خصوص با استفاده از ژن‌های Bt وجود دارد و فقط یک گزارش توسط Kimoto and Shimamoto (۲۰۰۲)، ارائه شده است (، کیمoto و شیماموتو (۲۰۰۲)، ارائه شده است (، کیمoto و شیماموتو (۲۰۰۲)، ارائه شده است (، کیمoto and Shimamoto, 2002) و چغندرقند Bt تجاری در دنیا وجود ندارد.

آنرا از یک سوبه علت تفاوت حساسیت گونه‌ها در مقابل توکسین ایجاد شده توسط باکتری و از سوی دیگر به دلیل تفاوت در جثه لاروها در گونه‌های مختلف و نیاز به مقدار توکسین بیشتر برای تاثیر همسان روی لاروهای با جثه درشت‌تر دانست. شاید به همین دلیل در گونه آگروتیس که نسبت به دو گونه دیگر لاروهای درشت درشت‌تردارد تاثیر کمتری دیده شد. خاصیت ضد تغذیه‌ای یکی از اثرهای مشتباکتری Bt است که به عنوان یکی از جنبه‌های مفید در مبارزه بیولوژیک نیز بررسی می‌شود. این عکس العمل در بین لاروهای تغذیه شده از برگ تاریخته (به ویژه در آگروتیس) نیز مشهود بود. در واقع می‌توان این موضوع را یک نوع مقاومت آنتی بیوزی به شمار آورد که با ایجاد اختلال در فیزیولوژی آفت موجب می‌شود. این موضوع از نظر علم مدیریت آفات حائز اهمیت است. زیرا نه تنها تغذیه شدیدی انجام نمی‌شد بلکه در چنین شرایطی، لاروهای آفت به دلیل افزایش طول دوره زیستی، مدت زمان بیشتری در معرض پردازورها و پارازیتوبیئیدها قرار می‌گیرند. لاروهایی که در اثر تغذیه از گیاه تاریخته در آزمایش‌های انجام شده زنده ماندند، طول دوره لاروی در آنها افزایش یافته و وزن لاروهای باقیمانده نسبت به شاهد به شدت کاهش نشان داد. این موضوع توسط Bt باجوا و همکاران (۲۰۰۱)، در قالب اثرهای ذرهای زیرکشته شامل کاهش تغذیه، کاهش طول عمر لاروی و بالغین، کاهش باروری و کاهش وزن لارو و حشرات بالغ ذکر شده است (Bajuwa and Kogan, 2001).

آزمایش در مرحله انتقال لارو به شفیره، توانایی رفتن به این مرحله را نداشته و در حالی که لارو طول بدن خود را کم و پاهای خود را جمع کرده و آماده رفتن به مرحله شفیرگی بود ولی نمی‌توانست این مرحله را پشت سر بگذارد، براین اساس در همین وضعیت می‌مرد. لاروهایی که در طول زمان‌های متفاوت از گیاه تاریخته تغذیه کرده ولی در پایان آزمون زنده بودند با گذشت زمان نسبت به لاروهای شاهد از نظر رشد دچار عقب افتادگی شده بودند به طوری که وقتی لاروهای شاهد به سن سوم رسیدند لاروهای تیمار در سن دوم توقف کرده بودند. نتایج پژوهش حاضر که در قالب بررسی کاهش وزن لاروهای تغذیه کننده از لاین‌های تاریخته، کاهش تغذیه و در نتیجه کاهش

و میر آفت و خسارت برگ مشاهده شد که می‌تواند ناشی از تفاوت در سطح بیان توکسین Bt در نتیجه اثرهای اپی‌ژنتیک مانند تعداد نسخه، اثرهای موضعی در محل تالفیق و یا متیله شدن تراژن، شرایط آزمایش‌های زیست‌سنجدی و تا حدودی به دلیل تفاوت فیزیولوژیک بین لاروها (Fujimoto et al. 1998) باشد. رجوو و همکاران (۱۹۹۶)، گزارش کردند که پروتئین Cry1C قادر به کنترل آفت جنس پرودنیا است (Regev et al. 1996) در حالی که داتون و همکاران (۲۰۰۲ و ۲۰۰۵)، گزارش کردند که پروتئین Cry1Ab آفت پرودنیا را کنترل کرده و اثرهای نامطلوبی Dutton et al. 2002; Dutton et al. (2005)، همانطور که در این تحقیق نیز گزارش شد. کوزیل و همکاران (۱۹۹۳)، کنترل کامل آفت کرم ساقه‌خوار ذرت توسط تعدادی از گیاهان تاریخته حاوی ژن cry1Ab تحت کنترل پیشبر PEPC در ترکیب با پیشبر اختصاصی دانه گرده گزارش کردند (۲۸). قره‌یاضی و همکاران (۱۹۹۷) و داتا و همکاران (۱۹۹۸)، مقاومت ۱۰۰٪ در برابر کرم ساقه‌خوار زرد و حسینی و همکاران (۲۰۰۲)، مقاومت ۱۷٪ نسبت به کرم ساقه‌خوار زرد و مقاومت ۰.۵٪ نسبت به کرم برگ خوار برنج در گیاهان برنج تاریخته حاوی ژن cry1Ab تحت کنترل پیشبر PEPC را گزارش کردند Husnain et al. 2002; Dutton et al. 1998; Ghareyazie et al. (1997). علی‌نیا و همکاران (۲۰۰۱)، تاثیر کشنده برنج تاریخته طارم مولایی در بردارنده ژن cry1Ab تحت کنترل پیشبر PEPC را بر روی چهار نوع آفت پروانه‌ای برنج نشان دادند (Alinia et al. 2001). براقا و همکاران (۲۰۰۳)، نیز نتیجه گرفتند که گیاهان نیشکر تاریخته حاوی ژن cry1Ab تحت کنترل پیشبر PEPC مقاومت بهتری در مقایسه با پیشبر pith در برابر آفت ساقه‌خوار نیشکر دارند (Braga et al. 2003). با توجه به نتایج حاصل از زیست‌سنجدی در این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که اگر چه دامنه مقاومت در گیاهان تاریخته تحت کنترل پیشبر PEPC متنوع است ولی این گیاهان تقریباً سطح مقاومت مشابهی با گیاهان تاریخته تحت کنترل پیشبر CaMV35S نشان دادند. در زیست‌سنجدی گیاهان نسل T₁ میزان مرگ و میر حادث شده در لاروهای آفات پرودنیا و کارادرینا تا حدودی رضایت بخش بود اما در آگروتیس مرگ و میر کمتری اتفاق افتاد که می‌توان دلیل

مورد ارزیابی از نقطه نظر آماری تفاوت معنی دار وجود دارد. با توجه به پژوهش های محدود انجام یافته در مورد مقاومت به حشرات آفت در چغندرقند، لازم است پژوهش های بیشتری در مورد ایجاد چغندرقند مقاوم به آفات با استفاده از ژن های مختلف *Bt* و یا در ترکیب با دیگر ژن های رمز کننده مقاومت انجام گیرد. توصیه می شود آزمایش های ارزیابی کارآیی لاین های ترا ریخته چغندرقند روی سایر آفات پروانه ای چغندرقند (در مراحل مختلف و نسل های بعد) و در صورت امکان تحت شرایط گلخانه ای و مزرعه ای نیز انجام گیرد. بر اساس یافته های این پژوهش احتمالاً بتوان لاین های ترا ریخته مورد بررسی را به عنوان یکی از ابزارهای قابل استفاده در برنامه مدیریت تلفیقی آفات (IPM) چغندر قند معرفی کرد که در کنار سایر روش های غیر شیمیایی در تولید محصولات عاری از سموم شیمیایی مؤثر باشد.

تشکر

نویسندها لازم می دانند از همکاری و مساعدت مسئولین محترم موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی و موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور جهت تأمین امکانات لازم در مراحل مختلف اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی کنند.

منابع

1. Aghel Pasand H. 2010. Assessment of tolerance of transgenic T₁ lines of sugar beet against Rhizomonia. 19th Iranian Plant Production Congress. Plant Production Research Institute. July 30 – Aug. 2 2010.Tehran, Iran (in Farsi).
2. Alinia, F., Ghareyazie, B., Rubia, L., Bennett, J., and Cohen, M.B. (2001). Expression of effect of plant age, larval age, and fertilizer treatment on resistant of a *cryIAb*-transformed aromatic rice to lepidopterans stem borers and foliage feeders. *J. Econ. Entomol.* 93:484–493.
3. Asadi G. 1994. Biological studies on *Agrotis segetum* Schitt (Lep. Noctuidae) and strategies for its control in sugar beet fields of Shirvan MSc thesis, Tarbiat Modarres University (in Farsi).
4. Anonymus. (2010). Debate over GM sugar beets:

خسارت ایجاد شده در گیاهان ترا ریخته بود طبق یافته های با جوا Bajuwa and Kogan, (2001)، قابل توجیه است (2001). به طور کلی لاین های ترا ریخته حاصل در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر آفت مذکور با ایجاد اثرهای نامطلوب در روند رشد و نمو و بازدارندگی از تغذیه آفت، مقاومت نسبتاً خوبی نشان دادند.

اگرچه چغندرقند یک گیاه صنعتی بوده و بیشتر ریشه آن مورد استفاده قرار می گیرد و استفاده مستقیم خیلی کمی دارد با این حال برای کاهش نگرانی های عمومی مبنی بر استفاده از چغندرقند ترا ریخته و همچنین به عنوان یک استراتژی مدیریت مقاومت به آفت در این پژوهش از پیشبر PEPC (اختصاصی بافت سیز) برای محدود کردن بیان ژن انتقالی به برگ استفاده شد. این اولین گزارش در مورد استفاده از پیشبر درگیر در مسیر فتوستزی C4 در چغندرقند است. به طور کلی گیاهان ترا ریخته حاصل هیچ مشخصه غیرعادی مورفولوژیک نشان ندادند و روند رشدی کاملاً مشابهی با گیاهان غیرترا ریخته مربوط به خود داشتند با این حال، خصوصیات زراعی و این همانی آنها با گیاهان غیرترا ریخته باید مورد بررسی های بعدی قرار گیرد. نتایج زیست سنجی گیاهان T₁ با سه آفت پروانه ای مهم مزارع چغندرقند مقاومت نسبتاً خوبی را در تعدادی از گیاهان ترا ریخته حاصل تایید کرد. نتایج حاصل از ارزیابی ها در مورد هر سه آفت مورد بررسی نشان داد که بین لاین های ترا ریخته و غیر ترا ریخته (شاهد) در مورد فاکتورهای

US court allows planting and harvest. www.gmo.compass.org/eng/news.

5. Bajwa, W.I. and M.Kogan. (2001). Integrated plant protection center (IPPC) Oregon State University, Corvallis.

6. Behdad A. 1997. Insect Pests of Crop Plants. Neshat Publisher, Isfahan, Iran (in Farsi).

7. Braga, D.P.V., Arrigoni, E.D.B., Silva-Filho, M.C., and Ulian, E.C. (2003). Expression of the Cry1Ab protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. of New Seeds.* 5(2/3): 209-221.

8. Darmency, H., Vigouroux, Y., Garambe, T.G., Richard-Molard, M. and Muchembled, C. (2007). Transgene escape in sugar beet production fields: data from six years farm scale monitoring. *Environ.*

- Biosafety Res. 6: 197-206.
9. Datta, K., Vasquez, A., Tu, J., Torrizo, L., Alam, M.F., Oliva, N., Abrigo, E., Khush, G.S. and Datta, S.K. (1998). Constitutive and tissue specific differential expression of the *cry1Ab* gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor. Appl. Genet.* 97: 20–30.
 10. Draycott, A.P. (2006). Sugar Beet. Wiley-Blackwell, London. 496pp.
 11. Dutton, A., Klein, H., Romeis J., and Bigler, F. (2002). Uptake of Bt-toxin by herbivores feeding on transgenic maize and consequences for the predator *Chrysoperla carnea*. *Ecol. Entomol.* 27: 441-447.
 12. Dutton, A., Romeis, J., and Bigler, F. (2005). Effects of Bt-maize expressing Cry1Ab and Bt-spray on *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Exp. Appl.* 114: 161-170.
 13. Fujimoto, H., Itoh, K., Yamamoto M., Kyozuka, J., and Shimamoto, K. (1993). Insect resistant rice generated by introduction of a modified endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology*. 11: 1151-1155.
 14. Ghadiri V., Arjmand M.N. and Shimi P. 2004. Pests, diseases and weed of sugar beet and integrated pest management. Nashr Amoozesh Keshavarzi publisher, Tehran, Iran (in Farsi).
 15. Ghareyazie, B., Alinia, F., Menguito, C.A., Rubia, L.G., Palma, J.M., Liwanag, E.L., Cohen, M.B., Khush, G.S., and Bennett, J. (1997). Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic *cry1Ab* gene. *Mol. Breeding*. 3:401-414.
 16. Halluin, K.D., Bossut, M., Bonne, E., Mazur, B., Leemans, J., and Boterman, J. (1992). Transformation of sugar beet and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Technol.* 10: 309-315.
 17. Hatami B. 1991. Field trial guidelines in plant pathology. Arkan Publisher. Isfahan, Iran (in Farsi).
 18. Hilder, V.A. and Boulter, D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Crop production*. 18: 177-191.
 19. Hisano, H., Kimoto, Y., Hayakawa, H., Takeichi, J., Domae, T., Hashimoto, R., Abe, J., Asano, S., Kananzawa, A. and Shimamoto, Y. (2004). High frequency Agrobacterium-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell Rep.* 22: 910-918.
 20. Husnain, T., Asad, J., Maqbool, S.B., Datta, S.K. and Riazuddin, S. (2002). Variability in expression of insecticidal *cry1Ab* gene in Indica Basmati rice. *Euphytica*. 128: 121–128.
 21. Ivic-Haymes, S.D. and Smigocki, A.C. (2005). Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding. *In Vitro Cell Dev. Plant.* 41:483-488.
 22. Kheiri M. 1990. Most Important pests of sugar beet and their control. Agricultural Research, Education and Extension organization (in Farsi).
 23. Kimoto, Y. and Shimamoto, Y. (2002). Difference in toxicity to larvae of cabbage armyworm between transgenic sugar beet lines with Cry1Ab and Cry1C. *Journal of Proceedings of the Japanese Society of Sugar Beet Technologists*. 43: 20-23.
 24. Kishchenko, E.M., Komarnitskii, I.K., and Kuchuk, N.V. (2005). Production of transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin. *Cell Biol. Int.* 29: 15-19.
 25. Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M., and Evola, S. (1993). Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotechnol.* 11:194-200.
 26. Lennefors, B.L., Savenkov, E.I., Bensefelt, J., Wremerth-Weich, E., Roggen, P., Tuvesson, S., Valkonen, J.P.T., Gielen, J. (2006). dsRNA-mediated resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Breeding*. 18:313–325.
 27. Mannerlof, M., Lennerfors, B.L., and Tenning, P. (1996). Reduced titer of BNYVV in transgenic sugar beets expressing the BNYVV coat protein. *Euphytica*. 90: 293-299.
 28. Mannerlof, M., Tuvesson, S., Steen, P., and Tenning, P. (1997). Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica*. 94: 83-91.
 29. Mardani H. 2010. Stability of Inheritance of Plantibody Conferring Rhizomoniasis resistance in transgenic sugar beet. 11th Iranian Genetic Congress May 21-23, 2010. Tehran, Iran (in Farsi).
 30. Mirderikvand M, Ghareyazie B. and Zargham N. 1999. Assessment of economic potentials for Agricultural Biotechnology in Iran. Agricultural Research and Extension Organization (in Farsi).
 31. Mohammadzadeh R. 2010. Transformation of sugar beet using a polygalacturonidase inhibitor proteins for enhanced fungal disease tolerance. 19th Iranian Plant Production Congress, Plant Production Research Institute, July 30 – Aug 2, 2010. Tehran, Iran (in Farsi).
 32. Norouzi, P., K. Zamani, Malboobi, M.A., and Yazdi-Samadi, B. (2005). Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Bata vulgaris* L.). *In Vitro Cell Dev. Plant.* 41: 11-16.
 33. Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., Ginzberg, I., Koncz-Kalman, Z., Koncz, C., Schell, J., Zilberman, A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microb.*

- 62: 3581–3586.
34. Rivany, E. (1962). Field crop pests in the near east. Uitgeverij Dr.W.Junk-Den. Haag. 450 pp.
35. Saegglitz, C., Pohl, M. and Bartsch, D. (2000). Monitoring gene flow from transgenic sugar beet using cytoplasmic male-sterile bait plants. *Molecular Ecology*. 9: 2035-2040.
36. Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA.
37. Smigocki, A.C. (2001). Engineering sugarbeets with multiple proteinase inhibitor genes for enhanced tolerance to sugarbeet root maggot. Sugarbeet Development Foundation Research Report. United States Department of Agriculture (USDA), NY, USA.
- P. 17-24.
38. Smigocki, A.C., Ivic, S.D., Wilson, D., Wozniak, C.A., Campbell, L., Dregseth, R., and Boetel, M. (2003). Molcular approaches for control of the sugar beet root maggot. 1st joint IIRB-ASSBT Congress, 26th Feb-1st March, San Antonio, USA. P. 419–428.
39. Strizhov, N., Schell, J., Zilberstein, A., Keller, M., Sneh, B., and Koncz, C. (2000). Synthetic *Bacillus thuringiensis* cry1C gene encoding insect toxin. United States Patent: 6043415.
40. Wilhite, S.E., Elden, T.C., Puizdar, V., Armstrong, S., and Smigocki, A.C. (2000). Inhibition of aspartyl and serine proteinases in midgut of sugar beet root maggot with proteinase inhibitors. *Entomol. Exp. Appl.* 97:229-233.

Different methods of RT-LAMP for detection of potato leaf roll virus (PLRV)

Mohammad Amin Almasi^{1*}, Ali Haghnazari², Aboubakr Moradi³, Esmail Saberfar⁴

1, 3- MS.c, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Zanjan

2- Ph.D, Department of Plant Breeding, College of Agriculture, University of Zanjan

4- Ph.D, Department of Microbiology, College of Medicine, University of Baghiatolla

* Corresponding Author, Email: aminalmasi66@gmail.com

ABSTRACT

Potato leaf roll virus is an important virus that causes economic loss in the yield and quality of potato tubers. One of the primary methods of managing infection in potato crops is using certified virus-free tuber as ‘seed’ for planting. Early and efficient detection of virus is essential for production of PLRV-infection free tubers. There are several techniques to detect the virus including serological test and molecular methods. LAMP is a new method to identify pathogens that is used in this study for detection of potato leaf roll virus. Potato plants with symptoms similar to PLRV were collected from Zanjan province and were subjected to a serological test. Total RNA was extracted and RT-LAMP reactions were carried out. Different methods were used to confirm performance of this reaction. Positive reaction was confirmed based on the resulting turbidity and loading product on agarose gel and using SYBR and ethidium bromide fluorescence dyes. The advantages of this new method include the speed (75 min), ease and safety of the method compared to other methods.

Key Words

Florescence dyes, Potato Leaf Roll Virus (PLRV), RT-LAMP Reaction, RT-PCR, Turbidity

Mutant screening of transgenic *Arabidopsis* in genetic pathway of barley metallothionein promoter

Saeid Navabpour^{1*}, Hossein Saburi²

1-Assistant Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Gonbad University

* Corresponding Author, Email: s.navabpour@gau.ac.ir

ABSTRACT

In order to search for signaling factors altering the expression of barley metallothionein promoter, the mutant screening technique was used. The promoter region of metallothionein in barley (cv. *Hordeum*) was used to drive the *gus* gene and it was transferred to *Arabidopsis thaliana*. The M₀ seeds were mutagenized using four doses (10, 20, 30, 40 Grays) of fast Neutron radiation. The chemical compound of 3-Amino-1,2,4-Triazole (3-AT) at 20 mM was chosen as the best activator using CRD statistical design. Inheritance of GUS activity was evaluated using histochemical GUS assay. 48 hours after spraying by 20 mM 3-AT the inhibition model of 3:1 GUS expression: non expression was tested. 20 potential mutant lines were selected by carrying out several screening steps. In each stage 30 seedlings of 1500 M₂ lines were checked by GUS staining. The arrangement of promising lines included 3, 5, 9 and 3 which were referred to 10, 20, 30 and 40 Gray of fast Neutron treatments respectively. These lines were analyzed using fluorometric β-glucuronidase technique and were selected as potential mutants in genetic pathways of metallothionein promoter activity for further studies.

Key Words

Barley, Fast Neutron, Mutation, Metallothionein Promoter, *gus* Gene.

Partial purification and assessment of antifungal activity of an extracellular chitinase from an Iranian thermophile strain of *Cohnella* sp. A01

Abiri Naghmeh^{1,2}, Aminzadeh Saeed^{*,2} Bihamta Mohammad Reza^{1,3}

1- Faculty of Agriculture, Azad University of Karaj, Karaj, Iran.

2- Department of Animal Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran.

3- University of Tehran, Pardis, Karaj, Iran.

* Corresponding Author, Email: aminzade@nigeb.ac.ir

ABSTRACT

Chitin, poly- β -1,4-N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc), is the second most abundant organic polymer in nature after cellulose and it is the main part of insects cuticle and crustaceans that includes in cell walls of most fungi and some algae and nematodes. One of the enzymes that are responsible for disintegration of chitin is Chitinase. Bacteria produce Chitinase for digesting chitin, principally as a source of carbon and energy. With the objective of achieving the maximum production of Chitinase in an Iranian thermophile strain of *Cohnella* sp. A01, five different media were examined. We partially purified this enzyme from a native strain. Bacteria were transferred to a pre-culture media after an initial culture. After 24 hours, the bacteria were transferred to five different media containing colloidal chitin as the main component. Maximum enzyme production reached in a treatment that contained $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.05% and Agar 0.1%. We performed Chitinase assay using the DNS (dinitrosalicylic acid) and precipitated proteins by Ammonium sulfate. After precipitation of proteins with Ammonium sulfate, enzyme activity was increased. Completely Randomized Design was used and statistical analysis was performed using SAS software. Anti-fungal effect of Chitinase partially purified in this study was tested on five plant fungal pathogens and was confirmed in four cases.

Key Words

Chitinase, Enzyme Activity, Purification of Enzyme, Anti-Fungal Effect.

Optimization of regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of citrus (*Citrus aurantifolia*)

Seyedeh Maedeh Feizbakhsh^{1,2}, Masoud Tohidfar², Seyed Hasan Marashi¹, Nasrin Moshtaghi¹, Motahare Mohsenpoor², Mohsen Mardi²

1- University of Ferdowsi, Mashhad

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

* Corresponding Author, Email: gtohifar@abrii.ac.ir

A B S T R A C T

Mexican lime is one of the most important and economic fruit crops in the southern regions of Iran. This crop is susceptible to Citrus Tristeza Virus (CTV) and Witches Broom Disease of Lime (WBDL). Therefore, optimization of regeneration and transformation system for this plant is necessary for its improvement. In this project, the effect of different factors such as internode and epicotyl explants; two different regeneration media containing different concentrations of BAP and NAA, different *Agrobacterium* strains: "LBA4404" and "EHA105", each harboring a binary vector pBI were studied in a factorial experiment. The results showed that the etiolated epicotyl was the best explants for regeneration and callus production. There was no significant difference between two regeneration media. Furthermore, EHA105 was the best *Agrobacterium* strain for this purpose. Polymerase Chain Reaction (PCR) using *gus*-specific primers has been carried out on DNA extracted from all regenerated plants. Twenty-one shoots were carrying this gene but only 8 shoots out of these 21 showed the expression of this gene. Furthermore, the lack of *Agrobacterium*-related infections has been confirmed using *virG*-specific markers.

Key Words

Agrobacterium, Transformation, Mexican Lime, *gus* Gene, Genetic Engineering.

Application of co-transformation for *Choline oxidase* gene transfer into rice genome

Saeideh Keyarsalan^{1*}, Seyed Elyas Mortazavi², Behzad Ghareyazie², Sakineh Mehranie³

1- M.Sc., Agricultural Biotechnology

2- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII)

3- M.Sc., Department of Plant Breeding

* Corresponding Author, Email: saeideh.keyarsalan@gmail.com

ABSTRACT

In order to produce a marker-free transgenic rice with improved tolerance to salinity and drought stresses, expression vectors pABRII-Chl and pABRII-Cyt containing "*choline oxidase*" gene (with or without leader sequence respectively) were constructed from pChl and pCyt and pTRA132 for co-transformation. The pChl and pCyt vectors were digested with *HindIII-BamH* and *BamHI-EcoRI* enzymes. Then the resulting sequences were ligated and inserted into expression vector pTRA132, in which the *HindIII-EcoRI* fragment (*hph* gene) had been deleted. The constructs pABRII-Chl or pABRII-Cyt and pTRA132 (containing *hph* gene) were introduced into embryogenic calli derived from the mature seeds of a rice cv. Hashemi by biolistic transformation method. Then putative transformants were screened after 3 rounds of selection on N6 medium containing increasing concentrations of Hygromycin B from 60 to 80 mg/L. Finally, Hygromycin resistant calli were regenerated on MS medium supplemented with 50 mg/L Hygromycin B. Putative transgenic rice plants were analyzed by polymerase chain reaction PCR. Then, four of the transgenic plants were analyzed using Southern blotting. Each transgenic plant received one copy number of both *choline oxidase* and *hph* genes. Expression of the transgene was confirmed by reverse transcription PCR. The high frequency of transformation rate in this study showed that co-transformation method is a reliable method for stable transformation with the goal to make marker-free transgenic plants in subsequent steps.

Key Words

Choline oxidase, Glycine Betaine, Co-transformation, Rice, *hph* Gene, Biolistic.

Evaluation of anion and cation contents of a genetically modified cotton expressing *chitinase* and *Bt* genes

Bentol Hoda Modirroosta¹, Masoud Tohidfar^{2*}, Jalal Saba³, Hossein Hadavand⁴

1, 3- Zanjan University

2, 4- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

* Corresponding Author, Email: gtohidfar@abrii.ac.ir

ABSTRACT

One of the main goals of modern biotechnology is the production of higher yielding quality varieties to help attaining food security. In spite of numerous benefits, genetically modified crop plants have raised concerns for some of the consumers. Although some of these concerns have no scientific basis, safety evaluations of transgenic plants could reduce them. One of the studies to this end is the metabolic analysis of transgenic plants. Anions and cations (Na, K, Mg, acetate, chloride, nitrate, phosphate, sulfate, succinate and oxalate) of transgenic plants and their non transgenic counterparts were measured using Ion chromatography. After planting, sampling and extraction, Anions and cations of transgenic cotton (*chitinase* and *Bt* cotton) were measured. Significant differences in the amount of oxalate, sodium and ammonium in *cryIAb* expressing cotton lines and oxalate and sodium in *chitinase* over expressing lines were observed.

Key Words

Anions, Cations, Safety assessment, Transgenic Cotton

Global status of transgenic sugar beet and its advancement in Iran

Peyman Norouzi^{1*}, Morad Jaffari², Behzad Ghareyazie³, Mohammad Ali Malboobi⁴, Mohammad Reza Rezapanaah⁵

1- Sugar Beet Research Institute of Iran,

2- Uromiyeh University

3- Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

4- Institute for Genetic Engineering and Biotechnology

5- Plant Protection Research Institute

* Corresponding Author, Email: norouzi@sbsi.ir

ABSTRACT

Global status of sugar beet transformation for enhanced biotic stress tolerance is reviewed. Biosafety concerns related to deliberate environmental release and commercialization of genetically modified (GM) sugar beet are discussed. Status of production of GM sugar beet in Iran is also reviewed. A case study of enhanced insect tolerance in sugar beet is presented. A *cry1Ab* gene under the control of two different PEPC and CaMV35 promoters was transferred to sugar beet using biolistic transformation method. Insect bioassays for T₀, T₁ and F₁ generations against 3 different insect pests (*Prodenia*, *Caradrina* and *Agrotis*) were conducted. Results show significant enhanced tolerance among T₀, T₁ and F₁ progenies against the tested insect pests in comparison to their non-transgenic counterpart.

Key Words

Sugar Beet, *cry1Ab*, *Prodenia*, *Caradrina*, *Agrotis*, Genetic Engineering.

Genetic Engineering and Biosafety Journal

Vol.1, No.1, Issue 1, Spring and Summer 2012

Copyright and publisher

BIOSAFETY SOCIETY OF IRAN

Managing Director: B. Ghareyazie

ghareyazie@yahoo.com

Editor-In-Chief: M. Omidi

momidi@ut.ac.ir

Secretary of the Editorial Board: S. Kahak

gebs.j.bs@gmail.com

Address: Pajouhesh Blvd., 17 Km of Tehran-Karaj Highway, Tehran, Iran

P.O.Box.14155-6343

Tel:(+98)2144580375