

## تراریختی چغندر قند با ژن *cryIAb* به کمک آگروباکتریوم و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)

### Transformation of *cryIAb* gene to sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* and development of resistant plants against *Spodoptera littoralis*

مراد جعفری<sup>۱\*</sup>، پیمان نوروزی<sup>۲</sup>، محمدعلی ملبویی<sup>۳</sup>، بهزاد قره‌بازی<sup>۴</sup>، مصطفی ولیزاده<sup>۵</sup> و سیدابولقاسم محمدی<sup>۶</sup>  
تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۷

م. جعفری، پ. نوروزی، م. ع. ملبویی، م. ولیزاده و س. ا. محمدی. ۱۳۸۷. تراریختی چغندر قند با ژن *cryIAb* به کمک آگروباکتریوم و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*). مجله چغندر قند ۲۴(۲): ۵۵-۳۷.

#### چکیده

آفات پروانه‌ای چغندر قند باعث خسارت شدید این محصول در اکثر نواحی زیر کشت دنیا به خصوص در ایران می‌شوند. به دلیل محدود بودن منابع ژنتیکی مقاومت به حشرات زیان‌آور و سیستم چند ژنی مقاومت به این صفت، تهیه ارقام مقاوم به آفات آن از طریق اصلاح کلاسیک مشکل است. بهبود بیوتکنولوژیکی از طریق انتقال ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های *Bt* می‌تواند یک استراتژی مکمل و جایگزین برای مبارزه با آفات چغندر قند به حساب آید. دو رقم دیپلوئید ۷۲۳۳ و HM1990 جهت تراریختی به کمک *Agrobacterium tumefaciens* سویه GV3101 حاوی پلاسمید pBI35Scry حامل ژن *cryIAb* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S و ژن گزینشگر *nptII* استفاده شد و برگ حاوی پایه جوانه به عنوان ریزنمونه در تراریختی بکار رفت. جوانه‌های تراریخت احتمالی در محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف کانامایسین غربال شدند. آنالیز PCR، حضور ژن *cryIAb* را در بیش از ۵۰ درصد گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین نشان داد. آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای (dot blotting) در حداقل یک نسخه از تراژن در ژنوم گیاهان تراریخته را تایید کرد. آنالیز وسترن با استفاده پادتن پلی‌کلونال اختصاصی CryIAb، حضور پروتئین هدف با اندازه مورد انتظار ۶۷ kDa را در لاین‌های تراریخته T<sub>0</sub> مورد بررسی نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش زیست‌سنجی با استفاده از لارو کرم برگ‌خوار پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)، گیاهان تراریخته مقاومت بهبود یافته‌ای بر علیه آفت، با مرگ و میر ۷۰-۳۷ درصد در طول یک هفته، نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: آفات پروانه‌ای، تراریختی، چغندر قند، *Agrobacterium tumefaciens*، ژن *cryIAb*، *Spodoptera littoralis*

۱- دانش آموخته دکترای دانشگاه تبریز \* نویسنده مسئول [m.jafari@urmia.ac.ir](mailto:m.jafari@urmia.ac.ir)  
۲- استادیار مؤسسه تحقیقات چغندر قند- کرج  
۳- دانشیار مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی  
۴- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی  
۵- استاد دانشگاه تبریز  
۶- دانشیار دانشگاه تبریز

## مقدمه

چغندر قند از مهم‌ترین گیاهان صنعتی در دنیا و ایران بوده و در حدود یک چهارم شکر جهان در مناطق معتدل، جایی که نیشکر کشت نمی‌شود، از آن تولید می‌گردد (Draycott 2006). در ایران نیز چغندر قند با دارا بودن ۵۳/۳۲ درصد از تولید گیاهان صنعتی، در جایگاه نخست قرار دارد (بی نام ۱۳۸۶). به دلیل قابلیت عملکرد بالای آن (بیش از ۲۴ میلیون تن تولید جهانی شکر) نه تنها به عنوان منبع شکر بلکه به عنوان یک بیوراکتور سبز برای ذخیره متابولیت‌های جدید در ریشه به‌طور قابل ملاحظه‌ای مورد توجه می‌باشد (Ivic-Haymes and Smigocki 2005a). تنش‌های زیستی و غیرزیستی از عوامل مهم در کاهش عملکرد و تولید محصولات زراعی می‌باشند به طوری که حشرات مضر حدود ۱۴ درصد کل محصولات کشاورزی در جهان را از بین می‌برند (1999 Hilder and Boulter). آفات پروانه‌ای (Lepidoptera) از جمله آفات مهم چغندر قند می‌باشند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کرم برگ‌خوار چغندر قند (کارادرنیا)، شب‌پره زمستانی (آگروتیس) و بید چغندر قند (لیتا) اشاره کرد که در سراسر کشور به خصوص در مناطق چغندرکاری مشاهده می‌شود (میردربکوند و همکاران ۱۳۷۸) و سهم خسارت ناشی از این آفات در مزارع چغندر قند ایران بین ۲۰ تا ۲۵ درصد برآورد شده است (بی‌نام ۱۳۸۵). بهبود بسیاری از صفات زراعی به دلیل وضعیت بیولوژیکی خاص چغندر قند (دوساله بودن،

آلوگامی و خود ناسازگاری) و همچنین بهبود مقاومت به حشرات مضر به دلیل محدود بودن منابع ژنتیکی مقاومت به آفات، عدم تنوع ژنتیکی کافی در ژرم‌پلاسما و سیستم چندژنی مقاومت، از طریق به‌نژادی کلاسیک موفقیت‌آمیز نیست و یا بسیار مشکل است (Sharma et al. 2000; Ivic-Haymes and Smigocki 2005b). استفاده از روش‌های نوین مهندسی ژنتیک و انتقال ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به حشرات زیان‌آور در چغندر قند می‌تواند به عنوان راهکاری برای حل این مشکل مورد بررسی قرار گیرد. ژن‌های مختلفی برای ایجاد گیاهان مقاوم چغندر قند به آفات و بیماری‌ها شامل ژن ALS برای مقاومت به علف‌کش کلروسولفورون (D'Halluin et al. 1992)، ژن *bar* برای مقاومت به علف‌کش گلوپوسینات آمونیوم (D'Halluin et al. 1992; Kishchenko et al. 2005) و ژن‌های CP4 EPSPS و GOX جهت مقاومت به علف‌کش گلی‌فوسیت (Mannerlof et al. 1997)، ژن‌های رمزکننده اسموتین، پلی‌پپتید سکروپین تغییر یافته MB39 و پلی‌پپتید آلفاتیونین برگ جو (Snyder et al. 1999)، ژن *ipt* رمزکننده سیتوکینین باکتریایی که باعث مرگ و یا اختلال در رشد و تولید مثل مگس ریشه چغندر قند (root maggot) می‌گردد (Ivic et al. 2001)، بازدارنده‌های پروتئینازی (Proteinase inhibitors) دارای اثر مهارکنندگی بر روی پروتئازهای مگس ریشه چغندر (Wilhite et al. 2000)، ژن پروتئین پوششی (Coat protein) ویروس

و مقاومت گیاهان تراریخته حاصل در برابر یکی از آفات مهم چغندرقد بررسی گردید.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی

در این تحقیق از دو رقم مولتی ژرم دیپلوئید چغندرقد شامل HM1990 و ۷۲۳۳ جهت تراریختی استفاده گردید. برای تولید گیاهچه‌های استریل و کلون‌های کشت بافت، طبق روش نوروزی و همکاران (Norouzi et al. 2005) با تغییراتی به شرح زیر عمل شد:

برای جوانه‌زنی سریع، بذر چغندرقد با اسیدسولفوریک غلیظ به مدت ۳۰ دقیقه تیمار گردید و سپس در آب شستشو شد. سپس با الکل ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و با محلول وایتکس رقیق شده با ۲/۵ درصد کلر فعال به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی شد و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل و هر بار به مدت ۵ دقیقه، بذر بین کاغذ صافی استریل درون ظروف پتری در تاریکی قرار داده شد. پس از دو روز بذور ریشه‌دار به محیط آب آگار برای تولید گیاهچه‌های هفت روزه منتقل شدند. سپس قسمت کوتیلدون و ریشه حذف شده و جوانه‌های انتهایی جهت تولید گیاهچه و برگ جوانه کشت بافت به محیط کشت مصنوعی شامل محیط پایه MS با ترکیبات هورمونی  $BA (1 \text{ mg l}^{-1})$ ،  $NAA (0.5 \text{ mg l}^{-1})$  و  $TIBA (0.5 \text{ mg l}^{-1})$  منتقل شدند. جوانه‌های ۱۴-۱۰

ریزومانیا (Mannerlof et al. 1996) و ژن dsRNA ویروسی (Lennfors et al. 2006) برای ایجاد مقاومت به بیماری ریزومانیا به چغندرقد منتقل شده است. گزارش‌های نادری مبنی بر استفاده از بعضی ژن‌های ایجادکننده مقاومت به حشرات آفت به خصوص ژن‌های Bt (*Bacillus thuringiensis*) در چغندرقد ارائه گردید. فقط یک گزارش در مورد تولید چغندرقد Bt با استفاده از ژن‌های *cryIAb* و *cryIC* آن هم برای مقاومت به کرم کلم (*Mamestra brassicae*) (Kimoto and Shimamoto 2002) نشر شد و با بررسی‌های انجام شده از منابع علمی موجود در دسترس، هنوز در دنیا چغندرقد Bt تجاری وجود ندارد.

بهبود ژنتیکی چغندرقد از طریق بیوتکنولوژی به دلیل عدم پاسخ مناسب به بازایی در محیط کشت مصنوعی و همچنین دستکاری ژنتیکی با مشکل روبرو است و شدیداً به ژنوتیپ وابسته می‌باشد (Ivic et al. 2001). در چغندرقد تاکنون تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها با موفقیت تراریخت شده‌اند و اکثر ژنوتیپ‌ها نسبت به تراریختی عکس‌العمل مناسبی نداشتند. خوشبختانه تحقیقات بعدی تا حدودی سیستم انتقال ژن در چغندرقد را بهینه کرده‌اند (Yang et al. 2005).

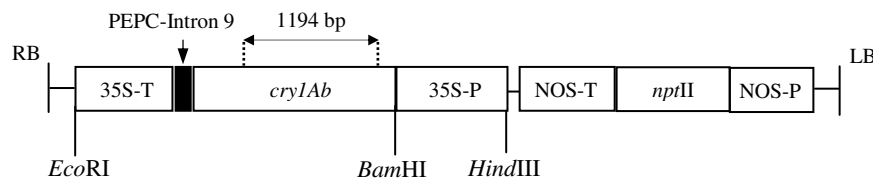
در این تحقیق سعی شده است با استفاده از یک روش بهینه شده و کارا با در نظر گرفتن دخالت دادن عوامل مؤثر در انتقال پایدار T-DNA، ژن سنتتیک *cryIAb* به کمک آگروباکتريوم به چغندرقد منتقل شود

قطعه‌ای به طول ۲۱۶۲ bp (شامل ژن *cryIAb*، قطعه مربوط به Intron 9 ژن PEPC ذرت و توالی پایان دهنده 35S) به دست آید. قطعه مزبور در پلاسمید pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) جایگاه *EcoRI/BamHI* (با حذف ژن GUS) متصل شد و بدین ترتیب سازه جدید pBI35Scry حاوی ژن *cryIAb* تحت پیشبر 35S CaMW، توالی پایان دهنده 35S و ژن گزینش گر *nptII* ساخته شد (شکل ۱) و پس از تایید مولکولی، به آگروباکتریوم *tomoplasma* سویه GV3101 (Koncz and Schell 1986) به روش‌های مرسوم مولکولی منتقل گردید (Sambrook and Russell 2001).

روزه به محیط کشت پایه MS با ترکیبات هورمونی BA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ )، NAA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) و IBA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) منتقل شدند و جهت القاء جوانه در برگ، برگ‌های جوان تولید شده در محیط کشت MS پایه با ترکیب هورمونی BA ( $0.25 \text{ mg l}^{-1}$ ) و BA ( $0.1 \text{ mg l}^{-1}$ ) قرار گرفتند و جوانه‌های حاصل بر روی برگ از پایه قطع شده و برگ حاوی پایه جوانه به عنوان ریزنمونه در فرآیند تاریختی استفاده گردید.

### تهیه سازه

به منظور ساخت سازه حاوی ژن *cryIAb* ابتدا پلاسمید pCIB4421 (Ciba-Geigy Ltd. Co, Basel, Sz) توسط آنزیم‌های *EcoRI/BamHI* برش داده شد تا



شکل ۱ نقشه فیزیکی بخش T-DNA پلاسمید pBI35Scry. RB: left border, LB: right border, nptII gene, nos terminator: Nos-T, neomycin phosphotransferase promoter: 35S-T, promoter: 35S-T, 35S terminator: 35S-P, 35S promoter: 35S-P, NOS-T, NOS-P, NOS terminator: NOS-T, NOS promoter: NOS-P. فلش دوطرفه ناحیه تکثیر DNA بوسیله PCR را نشان می‌دهد که به عنوان کاوش گر در لکه‌گذاری نقطه‌ای استفاده شد

آگروباکتریوم سویه GV3101 حامل پلاسمید pBI35Scry در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای ۷۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در

تلقیح ریزنمونه با آگروباکتریوم، گزینش و باززایی گیاهچه‌ها

۷۰ درصد تحت تناوب نوری ۱۲ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

### آنالیز مولکولی

#### آزمون PCR

DNA ژنومی از برگ گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta et al. 1983) استخراج شد و به منظور تایید حضور تراژن (Transgene) در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *cryIAb* انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۱۱۹۴ bp از ناحیه رمزکننده ژن *cryIAb* به شرح زیر بودند: آغازگر مستقیم: 5'-TCGGCGGACGTTGTTGTTTC-3' طبق برنامه یک سیکل ۵ دقیقه  $94^{\circ}\text{C}$  و ۳۵ سیکل (۱ دقیقه  $94^{\circ}\text{C}$ ، ۱ دقیقه  $58^{\circ}\text{C}$ ،  $1/20$  دقیقه  $72^{\circ}\text{C}$ ) و ۱۰ دقیقه  $72^{\circ}\text{C}$  در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل ALS 1296 انجام گرفت. محصول PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه Gel-Doc عکسبرداری شد.

#### آنالیز لکه گذاری نقطه‌ای (Dot blotting)

در حدود ۱۲ میکروگرم DNA ژنومی برگ گیاهان PCR مثبت به وسیله قرار دادن در آب جوش و سرد کردن فوری بر روی یخ واشرست شد و سپس بر روی غشاء نایلونی لکه گذاری گردید. غشاء حاوی نمونه‌های DNA با کاوشگر اختصاصی ژن *cryIAb* به

لیتر کانامایسین کشت شد و در انکوباتور با دمای  $28^{\circ}\text{C}$  با تکان ۲۰۰ دور در دقیقه به طور شبانه نگهداری گردید تا زمانی که  $OD_{600} = 0.5 - 1$  به دست آمد. سپس سلول‌های باکتری در  $3500$  دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در ۵۰ میلی لیتر محیط القاء (شامل محیط پایه MS با نصف غلظت نمک‌ها حاوی ۵۰ میکرومولار استوسرینگان) تعلیق گردید و پس از ۳-۵ ساعت ادامه کشت در انکوباتور (با همان شرایط فوق الذکر)، از سوسپانسیون باکتری حاصل برای تلقیح بافت‌های گیاهی مختلف استفاده گردید. ریز نمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری حاصل با غلظت  $0.4 - 0.3$   $OD_{600}$  به مدت ۵ دقیقه تلقیح شده غوطه‌ور شدند و سپس بر روی کاغذ صافی استریل جهت حذف باکتری‌های اضافی قرار گرفتند. ریز نمونه‌های تلقیح شده به محیط کشت توام (شامل MS پایه با نصف غلظت نمک‌ها حاوی ۵۰ میکرومولار استوسرینگان منتقل شدند. پس از کشت توام، ریز نمونه‌ها در محیط شستشوی (شامل محیط پایه MS حاوی ۵۰۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم) شستشو شده و به محیط گزینش (شامل محیط پایه MS با ترکیبات هورمونی  $BA$   $1^{-1} mg$ ،  $IBA$   $1^{-1} mg$ ) و  $100 - 50$  میلی گرم در لیتر کانامایسین کشت شدند. پس از یک دوره گزینش ۶۰ روزه، گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به محیط ریشه‌زایی (شامل محیط پایه MS با ترکیب هورمونی  $NAA$   $1^{-1} mg$  و  $IBA$   $1^{-1} mg$ ) و نهایتاً گیاهچه‌های ریشه‌دار شده جهت سازگاری به محیط طبیعی به گلدان انتقال یافتند. تمام نمونه‌های کشت بافتی در اتاقک رشد با دمای  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و رطوبت

(1997) هدف طبق روش فام (Pham 2003) انجام گرفت.

### زیست‌سنجی گیاهان تراریخته نسل اول (T<sub>0</sub>)

زیست‌سنجی گیاهان تراریخته با لارو سن اول (Neonate) کرم برگ‌خوار پرودینا (*Spodoptera littoralis*) انجام گرفت. بر روی هر برگ جوان از ۶ لاین تراریخته مستقل (Independent event) به همراه دو گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد تعداد ۷ لارو در سه تکرار در داخل پتری‌دیش قرار گرفت و نمونه‌ها به اتافک رشد با شرایط دمایی  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ، رطوبت ۷۰ درصد و تناوب نوری ۱۲ ساعت نور و ۸ ساعت منتقل شدند. آزمایش زیست‌سنجی ۴ بار تکرار گردید و میزان مرگ و میر و متوسط وزن لاروها پس از ۳ و ۷ روز آلودگی یادداشت‌برداری شد. داده‌های حاصل از زیست‌سنجی در نرم‌افزار SAS تجزیه شد. پس از آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها، برای صفات با توزیع غیرنرمال از تبدیل‌های جذری (برای داده‌های حاصل از تعداد) و زاویه‌ای (برای داده‌های درصدی) استفاده شد و مقایسه میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

### نتایج و بحث

باززایی و گزینش گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین

محیط کشت القا جوانه با ترکیب هورمونی BA ( $0.25 \text{ mg l}^{-1}$ )، IBA ( $1 \text{ mg l}^{-1}$ ) به مدت تقریباً سه هفته، شرایط مساعد را برای ایجاد جوانه‌های زیادی در

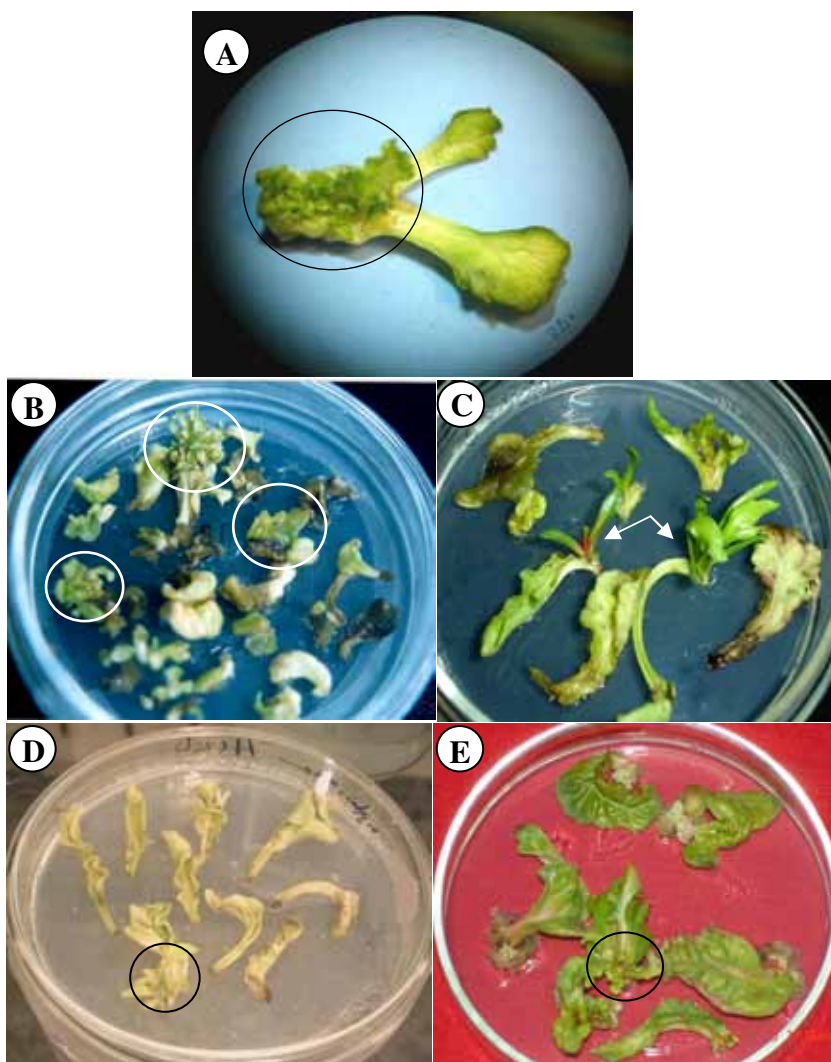
طول ۱۱۹۴ bp (محصول PCR با آغازگرهای فوق‌الذکر) نشاندار شده با دیگ‌اکسی‌جینین (Digoxigenin) طبق دستورالعمل DIG DNA Labeling and Detection Kit (شرکت Roche، آلمان) دورگ‌سازی شد. دورگ‌سازی، مراحل شستشو و تشخیص سیگنال‌ها طبق دستورالعمل کیت DIG DNA labeling and detection kit (شرکت Roche، آلمان) انجام شد. این آنالیز در سه تکرار برای لاین‌های PCR<sup>+</sup> انجام گرفت.

### آنالیز لکه‌گذاری وسترن

پروتئین‌های کل برگ گیاهان تراریخته ۲-۳ ماهه، گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی و گیاه برنج تراریخته Bt به عنوان شاهد مثبت به روش قره‌یاضی و همکاران (Ghareyazie et al. 1997) استخراج شد و غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش برادفورد (Bradford 1976) تعیین گردید. در حدود ۵۰ میکروگرم پروتئین از گیاهان تراریخته و شاهد در ژل SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) ۵/۱۰ درصد بارگذاری شد و الکتروفورز با دستگاه Protean II (Bio-Rad) با ولتاژ ۶۰ انجام شد. هم‌چنین از پروتوکسین CryIAb (۱۳۲ kDa) با غلظت ۵۰ ng به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. پس از الکتروفورز، پروتئین‌ها به وسیله دستگاه wet blot (Bio-Rad) با ولتاژ ۳۵ در دمای  $4^\circ\text{C}$  به طور شبانه (۱۲ ساعت) از ژل بر روی غشای نیتروسولوزی (Bio-Rad) منتقل شدند و تشخیص ایمونولوژیکی پروتئین هدف با استفاده از پادتن اختصاصی Rabbit polyclonal anti-CryIAb (Ghareyazie et al. )

خود را حفظ نموده‌اند و جوانه‌ای سبز نیز رشد نموده است و این نشان‌دهنده تأثیر و کارایی کانامایسین به‌عنوان عامل انتخابی در فرآیند گزینش می‌باشد. پس از سه روز کشت توأم، گزینش جوانه‌های تراریخته در محیط گزینش دارای عامل انتخابی کانامایسین انجام گرفت. در مراحل اولیه گزینش، از غلظت ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و سپس از غلظت ثابت ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر تا انتهای فاز گزینش استفاده شد و هر دو هفته یکبار زیرکشت جوانه‌های احتمالا تراریخته انجام گرفت. غلظت بالای کانامایسین مانع از سنتز کلروفیل حتی در جوانه‌های تراریخته می‌شود (Norouzi et al. 2005) و در غلظت‌های بالا، قدرت رشد و باززایی جوانه‌های تراریخته نیز کاهش می‌یابد (Ivic-Haymes and Smigocki 2005a). براساس این رهیافت گزینشی، جوانه‌های سبز مقاوم به کانامایسین غربال شدند و کانامایسین به خوبی توانست از رشد جوانه‌های غیرتراریخته ممانعت نماید (شکل ۳، A و B). براساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۱)، ۳۵/۸ و ۳۳/۹ درصد جوانه‌های باززا شده به ترتیب در ژنوتیپ‌های ۷۲۳۳ و HM1990، مقاوم به کانامایسین هستند. اکثر گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین در محیط ریشه‌زایی (محیط پایه MS حاوی ترکیبات هورمونی NAA به میزان  $1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$  و IBA به میزان  $1/5 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ) به خوبی ریشه‌دار شدند (شکل ۳، C) و عدم ریشه‌زایی که یکی از مشکلات مرسوم در گیاهچه‌های تراریخته می‌باشد، خیلی به‌ندرت مشاهده گردید. سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار به شرایط محیطی غیراستریل با موفقیت انجام گرفت (شکل ۳، D).

روی پهنک برگ به خصوص در اطراف رگبرگ اصلی فراهم نمود و نکته جالب توجه این‌که، در طول کشت‌های مختلف مشخص شد که برگ‌هایی با قابلیت جوانه‌زایی بالا، از لحاظ مورفولوژیکی دارای شکل خاص و متفاوت از سایر برگ‌ها داشته و دو شاخه مانند هستند (شکل ۱، A). چون این فیتوهورمون‌ها برای ریخت‌زایی از جداکشت برگ چغندرقد مناسب تشخیص داده شده‌اند (Hisano et al. 2004). تعداد جوانه‌های القاء شده بر روی برگ در بین و حتی در داخل ژنوتیپ‌ها متفاوت بوده و اکثرا برگ‌ها ۳-۱ جوانه‌ای بودند. ژنوتیپ ۷۲۳۳ بیشترین قابلیت القاء جوانه بر روی برگ را نشان داد و قدرت باززایی بیشتری به نسبت به رقم HM1990 نشان داد، با این حال هر دو ژنوتیپ بسیار پاسخ‌پذیر نسبت به محیط کشت‌های مختلف در طول باززایی بودند و به ازای هر جداکشت ۱/۲۵ و ۱/۱۵ جوانه به ترتیب برای ژنوتیپ ۷۲۳۳ و HM1990 برای باززایی القاء شده بود (جدول ۱). لذا هر دو ژنوتیپ برای تراریختی و باززایی بسیار مناسب تشخیص داده شدند. در طی دوره‌های اولیه تلقیح مشاهده گردید که استفاده از ترکیب هورمونی BA ( $1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ) و NAA ( $1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ) در محیط گزینش باعث شیشه‌ای شدن بیشتر جوانه‌ها می‌شود ولی در حضور ترکیب هورمونی BA ( $0/25 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ) و IBA ( $0/1 \text{ mg } \Gamma^{-1}$ ) به‌خصوص در مرحله گزینش، باززایی جوانه‌ها به بهترین نحو صورت گرفت (شکل ۲، B و C). برگ‌های تلقیح نشده در محیط حاوی کانامایسین (نمونه شاهد ۱) در اثر عامل انتخابی زرد شده‌اند (شکل ۲، D) در حالی‌که در نمونه شاهد ۲ (شکل ۲، E) برگ‌های تلقیح نشده در محیط بدون کانامایسین، شادابی و سبزی

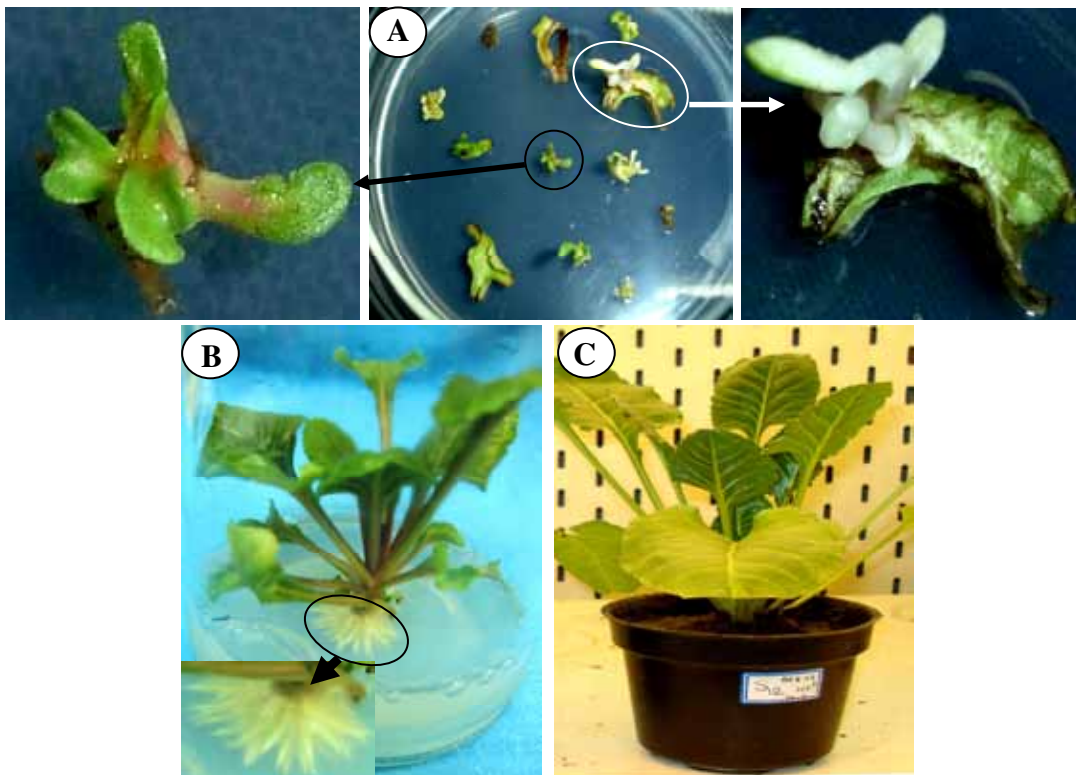


شکل ۲ A: برگ دو شاخه مانند حاوی جوانه‌های القاء شده (داخل کادر سیاه)، B: شیشه‌ای شدن جوانه‌های تولید شده (داخل کادر سفید) در محیط گزینش حاوی ترکیبات هورمونی  $BA (1 \text{ mg l}^{-1})$  و  $NAA (1 \text{ mg l}^{-1})$ ، C: ظهور جوانه‌های سبز طبیعی در محیط گزینش حاوی ترکیبات هورمونی  $BA (0.25 \text{ mg l}^{-1})$ ،  $IBA (0.1 \text{ mg l}^{-1})$ ، D: نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط کشت حاوی کانامایسین و زرد شدن برگ‌ها و جوان (داخل کادر سیاه) در اثر کانامایسین، E: نمونه شاهد تلقیح نشده در محیط بدون کانامایسین، جوانه سبز شده بر روی برگ (داخل کادر سیاه)



جدول ۱ کارایی تراریختی جداگشت برگ چغندرقد حاوی پایه جوانه به روش آگروباکتریوم

ژنوتیپ	تعداد جداگشت	تعداد جوانه باززایی شده	تعداد گیاهچه <sup>†</sup> Kan <sup>R</sup> (%)	تعداد گیاهچه <sup>†</sup> PCR <sup>+</sup> (%)	تعداد گیاه (%) Dot <sup>+</sup> /PCR <sup>+</sup>	فراوانی تراریختی <sup>†</sup>	
						Dot <sup>+</sup>	PCR
۷۲۳۳	۱۲۰	۱۵۱	۵۴ (۳۵/۸)	۳۴ (۶۳)	۲۴/۳۲ (۷۵)	۲۸/۳	۲۰
HM1990	۵۴	۶۲	۲۱ (۳۳/۹)	۸ (۳۸)	۳/۵ (۶۰)	۱۴/۸	۵/۶



شکل ۳ A: تصویر سمت چپ جوانه سبز گزینش شده مقاوم به کانامایسین و احتمالاً تراریخته و تصویر سمت راست جوانه غیرتراریخته که در حضور کانامایسین رنگ دانه کلروفیلی خود را از دست داده است (Chlorosis); B: گیاهچه<sup>†</sup> اتمالا تراریخته ریشه دار شده در محیط رشیه زایی، C: گیاه تراریخته سازگار شده به شرایط محیطی غیراستریل

طاقة فرسا است و معمولاً فراوانی باززایی کم و با توجه به زیرکشت‌های مختلف تحت ترکیبات محیط کشت مختلف در طول باززایی، باعث ایجاد گیاهان غیرطبیعی از نظر صفات مورفولوژیکی و ژنتیکی می‌شود (Norouzi et al. 2005; Ivic-Haymes and Smigocki

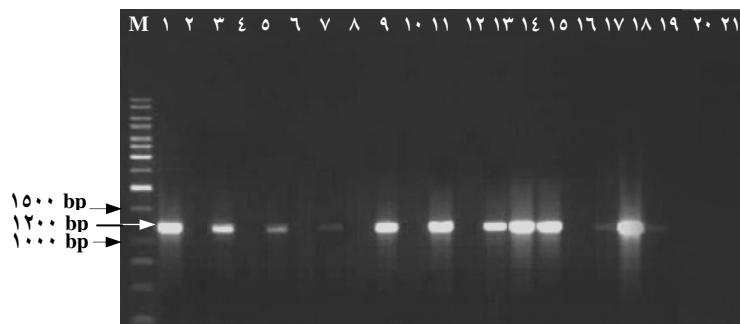
جداگشت مختلفی از جمله کوتیلدون، هیپوکوتیل، دمبرگ، کالوس جنین‌زا، برگ، پایه جوانه و پروتوپلاست در تراریختی چغندرقد استفاده شده است و اکثراً باززایی گیاه از این جداگشت‌ها به‌طور غیرمستقیم و شامل فاز کالوس بوده است. باززایی غیرمستقیم زمان‌بر و

شده با پلاسمید pBI35Scry حاوی ژن *cryIAb* به عنوان شاهد مثبت نشان دادند، در حالی که گیاه غیرتراریخته هیچ باندی نشان نداد که دلیل بر نداشتن ژن *cryIAb* در ژنوم آن است (شکل ۴). بیش از ۵۰٪ گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین PCR<sup>+</sup> شده‌اند و میزان گیاهچه‌های PCR<sup>+</sup> در ۷۲۳۳ و ژنوتیپ HM199 به ترتیب ۶۳ و ۳۸ درصد بود. لیندسی و گالوئیس (Lindsey and Gallois 1990) با تراریختی پایه جوانه چغندرقد و تحت عامل گزینشی کانامایسین، در درصد پایینی از جوانه‌های مقاوم به کانامایسین (۳۰ درصد) حضور ژن انتقالی را تایید کردند. یانگ و همکاران (Yang et al. 2005) با تراریختی جداگشت غنچه گل حاوی جوانه القاء شده چغندرقد و تحت عامل گزینشی هیگرومایسین، میزان گیاهچه‌های PCR<sup>+</sup> برای ژن انتقالی را بین ۱۵/۲-۳۸/۷ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقد گزارش کردند که نشان دهنده کارایی بالای استراتژی گزینشی مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد.

(2005a). نتایج حاصل در این تحقیق نشان داد که جداگشت برگ جوانه القاء شده جداگشت مناسبی برای تراریختی چغندرقد بوده و دارای مزیت‌هایی چون سادگی تهیه جداگشت، منبع قابل دسترس و دائمی با قابلیت باززایی بالا برای تهیه جداگشت هدف، کاهش زمان لازم برای باززایی جوانه‌های تراریخته به دلیل باززایی مستقیم و به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به دلیل نداشتن فاز کالوس است. به طور کلی نتایج حاصل از سیستم تراریختی مورد استفاده در این تحقیق، نتایج هیسانو و همکاران (Hisano et al. 2004) و نوروزی و همکاران (Norouzi et al. 2005) را مبنی بر تکرارپذیری و کارایی بالای این روش برای تولید گیاهان تراریخته چغندرقد در مقیاس وسیع تایید کرد.

#### آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته T<sub>0</sub>

آزمون PCR حضور ژن *cryIAb* را در گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین تایید کرد. گیاهچه‌های تراریخته باندی به اندازه ۱۱۹۴ bp هم اندازه باند تکثیر

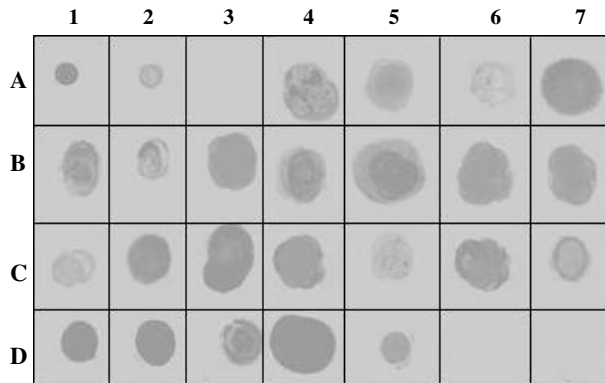


**شکل ۴** آنالیز PCR گیاهچه‌های تراریخته احتمالی با ژن *cryIAb* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S : نشان گر 1 kb DNA ladder (شرکت Fermentas)، چاهک ۱: سازه نوترکیب pBI35Scry به عنوان شاهد مثبت، چاهک‌های ۱۴-۲: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از ژنوتیپ ۷۲۳۳، چاهک‌های ۱۵-۱۹: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از ژنوتیپ HM1990، چاهک ۲۰ و ۲۱ به ترتیب گیاه غیرتراریخته از ژنوتیپ‌های ۷۲۳۳ و HM1990 به عنوان شاهد منفی اول، چاهک ۲۲: واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان شاهد منفی دوم

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان PCR<sup>+</sup>

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای به عنوان روش سریع و تقریباً آسان برای غربال گیاهان تراریخته استفاده شد. مقدار کمی DNA با کیفیت خوب (در حدود ۱۰ میکروگرم) از گیاهان PCR<sup>+</sup> (T<sub>0</sub>) برای انجام این آنالیز استفاده گردید. براساس نتایج حاصل از این آنالیز (شکل ۵)، نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم (D<sub>7</sub>) هیچ علامتی (signal) نشان نداده است و لذا سیسم هیبریداسیون هیچ گونه آلودگی نداشته و آزمون لکه‌گذاری به درستی انجام گرفته است. نمونه‌های DNA مربوطه به گیاه غیرتراریخته (D<sub>6</sub>) نیز علامتی نداده است که دلیلی بر نداشتن توالی هومولوگ با کاوش‌گر اختصاصی ژن *cryIAb* در ژنوم و غیر تراریخته بودن آن می‌باشد. نمونه‌های DNA گیاهان PCR<sup>+</sup> (A<sub>4</sub>-D<sub>5</sub>)

همانند پلاسمیدهای pBI35S*cry* (A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>) سیگنال نشان داده‌اند. به عبارتی لکه‌های سیاه نشان دهنده هیبرید شدن کاوش‌گر اختصاصی ژن *cryIAb* با قطعه هومولوگ خود در ژنوم این گیاهان بوده و تایید دیگری بر تراریخته بودن این نمونه‌ها است و می‌توان گفت که این گیاهان حداقل دارای یک نسخه از ژن انتقالی می‌باشند. با توجه به نتایج حاصله (جدول ۱) بیش از ۶۰ درصد گیاهان مورد بررسی dot<sup>+</sup> شدند و ژنوتیپ ۷۲۳۳ با ۷۵ درصد گیاه dot<sup>+</sup> نسبت به ژنوتیپ HM1990 (۶۰٪) از کارایی تراریختی بالایی برخوردار است. به‌طور کلی کارایی تراریختی در ژنوتیپ ۷۲۳۳، ۲۰ درصد و در ژنوتیپ HM1990، ۵ درصد برآورد شد که بیان‌گر کارایی بالای تراریختی در روش مورد استفاده و وابسته بودن آن به ژنوتیپ است.



شکل ۵ آنالیز لکه‌گذاری گیاهان PCR<sup>+</sup> با کاوش‌گر اختصاصی ژن *cryIAb* نشاندار شده با DIG. A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>: پلاسمید pBI35S*cry* به عنوان شاهد مثبت A<sub>4</sub>-A<sub>7</sub>، B<sub>1</sub>-B<sub>7</sub>، C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>، D<sub>1</sub>-D<sub>2</sub>: گیاهان Dot<sup>+</sup> از ژنوتیپ ۷۲۳۳، D<sub>3</sub>-D<sub>5</sub>: گیاهان Dot<sup>+</sup> از ژنوتیپ HM1990، D<sub>6</sub>: گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی اول، D<sub>7</sub>: نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم. لکه‌های سیاه نشان‌دهنده هیبرید شدن کاوش‌گر اختصاصی ژن *cryIAb* با قطعه هومولوگ خودش در ژنوم گیاهان PCR<sup>+</sup> است.

ژنوم چغندر قند و تظاهر آن در این گیاهان است ولی در گیاه چغندر قند والدی غیر تراریخته مطابق با انتظار نواری مشاهده نشد که دلیلی بر غیر تراریخته بودن آن می باشد. با مقایسه شدت نوار مربوط به پروتئین استاندارد (۵۰ ng) با گیاهان تراریخته می توان گفت که میزان پروتئین بیان شده حداقل ۱ نانوگرم در هر میکرورگرم (۰/۱٪) پروتئین های کل محلول برگ می باشد.

بر اساس نتایج حاصل از آنالیز وسترن، حضور پروتئین CryIAb با اندازه مورد انتظار (۶۷ kDa)، تلفیق کامل کاست ژنی (شامل راه انداز، ناحیه رمز کننده ژن و توالی پایان دهنده) را بار دیگر در لاین های تراریخته تأیید شد. اگر چه قطعات پروتئینی کوچکتر از ۶۷ kDa حتی در شاهد مثبت (برنج Bt) نیز تشخیص داده شد (شکل ۶). وجود چنین قطعاتی می تواند در اثر برش توسط پروتئازهای داخلی برگ (ANZFA 2001) یا ناشی از تخریب پروتئین CryIAb در طول تهیه نمونه پروتئینی (Ghareyazie et al. 1997; Breitler et al. 2004) باشد، زیرا پروتئین های Bt از جمله CryIAb در برابر عواملی مانند دمای بالا تخریب پذیر هستند (Betz et al. 2000). سطح بیان پروتئین CryIAb تحت کنترل یک راه انداز دائمی (Constitutive promoter) از ۰/۰۰۲٪ (Tu et al. 2000) تا ۰/۵-۰/۴ درصد کل پروتئین محلول برگ (Koziel et al. 1993; Breitler et al. 2004) گزارش شده است و حتی در کمترین سطح بیان یعنی ۰/۰۰۲٪ فعالیت زیستی نشان داده است (Breitler et al. 2004).

نوروزی و همکاران (Norouzi et al. 2005) کارایی تراریختی جداگشت برگ به روش آگروباکتري را ۶/۲٪ گزارش نموده اند، در حالی که هال و همکاران (Hall et al. 1996) کارایی تراریختی سلول های محافظ روزنه ای چغندر قند به روش الکتروپوریشن را ۳ درصد، اسنایدر و همکاران (Snyder et al. 1999) کارایی تراریختی جداگشت کالوس جنین زای حاصل از برگ و کوتیلدون به روش تفنگ ژنی را ۷/۷ درصد و آیویک-هیمز و اسمیکوکی (Ivic-Haymes and Smigocki 2005a) کارایی تراریختی جداگشت دیسک برگ کالوس زا به روش تفنگ ژنی بر اساس فعالیت ژن GUS را ۳/۷-۰/۹٪ گزارش کردند. می توان نتیجه گرفت که اولاً نوع جداگشت و نحوه باززایی (باززایی مستقیم بدون داشتن فاز کالوس) در کارایی تراریختی بسیار مؤثر بوده است. ثانیاً کارایی بالای تراریختی به دست آمده در این تحقیق همانند تحقیقات قبلی در نتیجه استفاده از سیستم تراریختی آگروباکتري می باشد.

### آنالیز بیان ژن *cryIAb*

شکل ۶ آنالیز لکه گذاری وسترن برای گیاهان چغندر قند T<sub>0</sub> مورد بررسی نشان می دهد. با توجه به شکل، گیاهان تراریخته همانند گیاه برنج Bt که با همان ژن *cryIAb* مورد استفاده در این تحقیق تراریخته شده است، نوار مورد انتظار ۶۷ kDa را نشان داده اند که همان پروتئین CryIAb می باشد که بیانگر تلفیق ژن هدف در



شکل ۶ آنالیز لکه گذاری وسترن برای گیاهان چغندرقد  $T_0$  تراریخته با ژن *cryIAb*: 1: پروتوکسین Cry1Ab (۱۳۲ kDa) با غلظت ۵۰ ng به عنوان پروتئین استاندارد، 2: نشان گر پروتئینی (Bio-Rad) Plus protein kaleidoscope prestained standards، 3: برنج Bt تراریخته با ژن *cryIAb* به عنوان شاهد مثبت، 4: گیاه چغندرقد والدینی غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، 5-10: لاین های چغندرقد تراریخته به ترتیب ۳۵-۷۲۳۳، ۱۷-۷۲۳۳، ۱۵-۷۲۳۳، 2-HM1990 و 3-HM1990. نوار ۶۷ kDa پروتئین Cry1Ab بیان شده را نشان می دهد.

#### آنالیز عملکردی تراژن در گیاهان تراریخته $T_0$

تعدادی از گیاهان تراریخته  $T_0$  حاوی ژن *cryIAb* به همراه دو گیاه غیرتراریخته برای بررسی اثر توکسین Cry1Ab و مقاومت بر علیه آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)، یکی از آفت پروانه ای مهم مزارع چغندرقد ایران، کشورهای آفریقایی و حاشیه دریای مدیترانه، انتخاب شدند. نتایج حاصل از زیست سنجی در جدول ۲ آمده است. درصد مرگ و میر لاروها در هفتمین روز آلودگی بر روی گیاهان تراریخته بین ۷۰-۳۷ درصد متغیر است و ولی در گیاهان غیرتراریخته تقریباً ۲/۵ درصد می باشد که بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته از لحاظ آماری تفاوت بسیار معنی دار وجود دارد. لاین های ۱۸-۷۲۳۳ و ۳۵-۷۲۳۳ با

۳۷ درصد و لاین ۱۵-۷۲۳۳ با ۷۰ درصد مرگ و میر لاروها دارای پایین ترین و بالاترین میزان مقاومت بر علیه آفت مورد بررسی هستند. متوسط وزن لاروهای زنده برداشته شده از روی برگ گیاهان تراریخته در سومین روز آلودگی ۲/۳۰-۱/۹۰ میلی گرم متغیر است و در هفتمین روز آلودگی این میزان به ۴/۴۲-۲/۳۲ میلی گرم رسیده است در حالی که وزن لاروهای زنده روی برگ گیاهان شاهد پس از هفت روز آلودگی ۱۲/۱۱ میلی گرم است که تفاوت بسیار معنی دار با وزن لاروهای مربوط به گیاهان تراریخته دارد و این نشان می دهد که لاروهای روی گیاهان تراریخته در اثر توکسین Bt و نامناسب بودن غذا و بالاخره عدم ترجیح تغذیه آن نتوانسته اند رشد و توسعه سنی پیدا کنند و یا مرده اند (شکل ۷، ۱-C) و یا

شاخص در گیاهان تراریخته روند کند داشته است (شکل ۷، A) به طوری که میزان خسارت ۱۲ تا ۲۷ درصد و حداکثر ۵۰ درصد که به ترتیب پس از ۳ و ۷ روز آلودگی برآورد شده است که از لحاظ آماری با گیاهان غیرتراریخته تفاوت کاملاً معنی دار دارد که باز بیانگر عدم توانایی رشد، توسعه آفت بر روی برگ گیاهان تراریخته است.

رشد متوقف شده و کم داشته اند (شکل ۷، ۲-C) ولی لاروهای تغذیه کننده از گیاه غیرتراریخته با توجه به مناسب بودن غذای مورد استفاده در حد عالی رشد و توسعه یافته اند (شکل ۷، ۳-C). میزان خسارت برگ گیاهان شاهد ناشی از تغذیه آفت که به صورت لکه های قهوه ای فاسد شده و توری مانند نمایان است (شکل ۷، B)، ۳۶ تا ۵۵ درصد پس از سه روز تغذیه آفت می باشد که در هفتمین روز به ۱۰۰٪ رسید است در حالی که این



**شکل ۷** زیست سنجی گیاهان تراریخته  $T_0$  حاوی ژن *cryIAb* بر علیه آفت پرو دنیا (*Spodoptera littoralis*). A: برگ گیاه تراریخته B: برگ گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد، C: مقایسه لاروهای زنده با رشد متوقف شده (۱) و مرده (۳) برداشته شده از روی برگ گیاه تراریخته با لاروهای زنده و توسعه یافته به سنین رشدی بالاتر (۲) برداشته شده از روی برگ گیاه غیرتراریخته.

جدول ۲ آنالیز زیست‌سنجی گیاهان تراریخته T<sub>0</sub> با آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)

مرگ و میر (%) γ DAI	خسارت برگ (%)		وزن لاروهای زنده (mg)		تعداد لارو مرده		لاین
	γ DAI	۳ DAI	γ DAI	۳ DAI	γ DAI	۳ DAI†	
۲/۳۱±۰/۰۱ <sup>e</sup>	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۵۵/۰۰±۲/۵۲ <sup>d</sup>	۱۰/۲۴±۱/۲۳ <sup>a</sup>	۷/۷۱±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۰/۱۲±۰/۰۱ <sup>d</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>e</sup>	*۷۲۳۳
۲/۵۲±۰/۰۴ <sup>e</sup>	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>a</sup>	۳۶/۴۵±۲/۱۱ <sup>b</sup>	۱۲/۱۱±۰/۳۱ <sup>a</sup>	۱/۹۲±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۰/۲۵±۰/۰۸ <sup>d</sup>	۰/۰۰±۰/۰۰ <sup>e</sup>	*HM1990
۷۰/۰۰±۱/۲ <sup>e</sup>	۳۱/۳۴±۰/۷۰ <sup>e</sup>	۱۲/۵۴±۰/۱۳ <sup>d</sup>	۲/۵±۰/۱۵ <sup>c</sup>	۱/۹۰±۰/۲۵ <sup>bc</sup>	۴/۹۲±۰/۱۰ <sup>a</sup>	۱/۹±۰/۱۱ <sup>ab</sup>	۷۲۳۳-۱۵
۵۵/۱۳±۲/۳۳ <sup>abc</sup>	۲۷/۵۴±۱/۴۰ <sup>e</sup>	۲۷/۲۵±۱/۴۵ <sup>b</sup>	۲/۶۰±۰/۲۳ <sup>bc</sup>	۲/۳۰±۰/۳۲ <sup>b</sup>	۳/۹۱±۰/۲۳ <sup>ab</sup>	۲/۳۱±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۷۲۳۳-۱۷
۳۷/۳۰±۲/۶۰ <sup>d</sup>	۵۱/۳۴±۱/۳۱ <sup>b</sup>	۲۰/۱۲±۰/۸۰ <sup>c</sup>	۳/۳۳±۰/۱۰ <sup>bc</sup>	۱/۹۲±۰/۴۰ <sup>bc</sup>	۲/۶۱±۰/۳۰ <sup>c</sup>	۱/۱۰±۰/۱۳ <sup>cd</sup>	۷۲۳۳-۱۸
۳۷/۰۳±۲/۶۱ <sup>d</sup>	۴۰/۰۲±۱/۰۰ <sup>d</sup>	۱۸/۸۴±۰/۷۱ <sup>c</sup>	۳/۸۰±۰/۱۱ <sup>bc</sup>	۲/۳۳±۰/۱۰ <sup>b</sup>	۲/۶۳±۰/۳۰ <sup>c</sup>	۱/۲۰±۰/۱۳ <sup>bcd</sup>	۷۲۳۳-۳۵
۴۰/۰۳±۱/۳۳ <sup>cd</sup>	۵۳/۴۸±۳/۸۴ <sup>b</sup>	۲۰/۱۰±۱/۲۴ <sup>c</sup>	۴/۴۲±۰/۴۳ <sup>b</sup>	۲/۲۴±۰/۴۰ <sup>b</sup>	۲/۸۴±۰/۲۰ <sup>bc</sup>	۱/۴۱±۰/۲۱ <sup>bcd</sup>	HM1990-2
۶۱/۵۳±۲/۳۴ <sup>ab</sup>	۴۸/۸۳±۲/۴۰ <sup>c</sup>	۲۰/۰۰±۰/۲۱ <sup>c</sup>	۲/۳۲±۰/۱۳ <sup>c</sup>	۱/۸۳±۰/۱۰ <sup>bc</sup>	۴/۳۱±۰/۲۰ <sup>a</sup>	۱/۸۳±۰/۲۰ <sup>ab</sup>	HM1990-3

\* گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد، † روزهای پس از آلودگی با آفت (Days after infestation). در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک، اختلاف معنی‌دار در سطح اعتماد یک درصد به روش دانکن با همدیگر ندارند.

چغندرقد Bt استراتژی مناسبی برای کنترل آفات آن و بهبود مدیریت تلفیقی آفات باشد. این تحقیق موفق به تولید گیاهان چغندرقد تراریخته حاوی ژن *cryIAb* از هر دو نوع ژنوتیپ ۷۲۳۳ و HM1990 شد. نتایج زیست‌سنجی با یکی از آفات پروانه‌ای مهم مزارع چغندرقد (پرودنیا) مقاومت خوب در تعدادی از گیاهان تراریخته حاصل برعلیه این آفت را تأیید نمود. برای بررسی وراثت ژن انتقالی و ارزیابی مقاومت به آفت در نسل‌های بعدی، در حال حاضر گیاهان تراریخته T<sub>0</sub> علاوه بر خودگشنی با گیاهان کلونی خود، با یک لاین نرعیم ژنتیکی تلاقی داده شدند.

به نظر می‌رسد با توجه به تحقیقات محدود انجام یافته در مورد مقاومت به حشرات آفت در چغندرقد، لازم است تحقیقات بیشتری در مورد ایجاد و توسعه چغندرقد مقاوم به آفات با استفاده از ژن‌های مختلف Bt و یا در ترکیب با دیگر ژن‌های رمزکننده مقاومت انجام گیرد.

به طور کلی لاین‌های تراریخته حاصل در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر آفت پرودنیا مقاومت مناسبی نشان دادند، اگر چه مقاومت ۱۰۰ درصد در این گیاهان مشاهده نگردید که ممکن است به دلیل سطح ناکافی پروتئین CryIAb تولید شده و یا به دلیل طبیعت سرسخت آفت مذکور نسبت به این توکسین باشد. همچنین بین لاین‌های تراریخته تنوع در میزان مرگ و میر و خسارت برگ (جدول‌های ۲) مشاهده گردید که می‌تواند ناشی از تفاوت در سطح بیان توکسین Bt در نتیجه اثرات اپی‌ژنتیک (مانند تعداد نسخه، اثرات موضعی در محل درج و یا متیله شدن تراژن)، شرایط آزمایشات زیست‌سنجی و تا حدودی به دلیل تفاوت فیزیولوژیکی بین لاروها (Fujimoto et al. 1993) باشد.

با توجه به اهمیت این گیاه استراتژیک، خسارت قابل توجه آفات پروانه‌ای به خصوص در کشور و کافی نبودن منابع مقاومت در ژرم پلاسما، به نظر می‌رسد تولید

گیاهپزشکی کشور) به خاطر راهنمایی های ارزنده در انجام زیست‌سنجی و خانم مهندس مژگان موسوی از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به خاطر فراهم کردن لارو آفت پرودنیا و همکاری در زیست‌سنجی سپاسگزاری می‌شود.

### تشکر و قدردانی

از مدیران پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به خاطر پشتیبانی مالی و در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی کمال تشکر و قدردانی میشود. همچنین از آقای مهندس ولی‌اله قدیری (محقق مؤسسه تحقیقات

### References:

### منابع مورد استفاده:

میردریکوند، م. قره یاضی، ب و ضرغام، ن. ۱۳۷۸. بررسی پتانسیل اقتصادی بیوتکنولوژی کشاورزی در ایران. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی.

بی نام. ۱۳۸۵. وزارت جهاد کشاورزی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات.

بی نام. ۱۳۸۶. بررسی آماری محصولات کشاورزی (چغندر قند و نیشکر) در سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۶۷. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت امور برنامه ریزی و اقتصادی، دفتر آمار و فناوری اطلاعات، ۹۳ صفحه.

ANZFA (2001) Food produced from insect protected Bt-176 corn. A safety assessment , technical report series No. 9. Australia New Zealand Food Authority (AFNZA). Canberra, Australian

Betz FS, Hammond BG, Fuchs RL (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis* protected plants to control insect pests. Regul. Toxicol. Pharm., 32:156-173

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254

Breitler JC, Vassal JM, Catala MD, Meynard D, Marfa V, Mele E, Royer M, Murillo I, San Segundo B, Guiderdoni E, Messeguer J (2004) Bt rice harbouring *cry* genes controlled by a constitutive or wound-inducible promoter: protection and transgene expression under Mediterranean field conditions. Plant Biotechnol. J., 2: 417-430



- D'Halluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J (1992) Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Bio/Technol.*, 10: 309–315
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983) A plant DNA mini-preparation Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1:19-21
- Draycott AP (2006) Sugar beet. Blackwell Publishing Co Ltd, UK
- Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, Kyozuka J, Shimamoto K (1993) Insect resistant rice generated by introduction of a  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotechnol.*, 11:1151–1155
- Hall RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens GJ, Rosquin IJ, Denys PN, Evans IJ, Lathouwers JE, Lefebvre MP, Dunwell JM, van Tunen A, Krens FA (1996) A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nat. Biotechnol.*, 14:1133–1138
- Hilder VA, Boulter D (1999) Genetic engineering of crop plants for insect resistance. *Crop Prot.*, 18: 177-191
- Hisano H, Kimoto Y, Hayakawa H, Takeichi J, Domae T, Hashimoto R, Abe J, Asano S, Kanazawa A, 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
- Ivic SD, Sicher RC, Smigocki AC (2001) Growth habit and sugar accumulation in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) transformation with a cytokinin biosynthesis gene. *Plant Cell Rep.*, 20: 770-773
- Ivic-Haymes SD, Smigocki AC (2005a) Biolistic transformation of highly regenerative sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves. *Plant Cell Rep.*, 23: 699-704

- Ivic-Haymes SD, Smigocki AC (2005b) Identification of highly regenerative plants within sugar beet (*Beta vulgaris* L.) breeding lines for molecular breeding. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.*, 41: 483-488
- Kimoto Y, Shimamoto Y (2002) Difference in toxicity to larvae of cabbage armyworm between transgenic sugar beet lines with Cry1Ab and Cry1C. *J. P. Soc. Sugar Beet Technol.*, 43: 20-23
- Kishchenko EM, Komarnitskii IK, Kuchuk NV (2005) Production of transgenic sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants resistant to phosphinothricin. *Cell Biol. Int.*, 29: 15-19
- Koncz C, Schell, J (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.*, 204: 393–396.
- Koziel MG, Beland GL, Bowman C, Carozzi N, Crensham 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 GW, Wright M, Evola S (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Nat. Biotechnol.*, 11:194-200
- Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremmerth-Weich E, Roggen P, Tuveesson S, Valkonen JPT, Gielen J (2006) dsRNA-mediated resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Mol. Breeding*, 18:313–325
- Lindsey K, Gallois P (1990) Transformation of sugar beet by *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Exp. Bot.*, 41: 529-536
- Mannerllof M, Tuveesson S, Steen P, Tenning P (1997) Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica*, 94: 83-91

- Norouzi P, Zamani K, Malboobi MA, Yazdi-Samadi B (2005) Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 41: 11-16
- Pham V (2003) SDS-PAGE and Western blotting protocols. <http://micro.mic.ucdavis.edu/edu/singer/protocols/SDS-PAGEandWesternBlotting.pdf>
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA
- Sharma HC, Sharma KK, Seetharama N, Ortiz R (2000) Prospects for using transgenic resistance to insect in crop improvement. *Electron. J. Biotechnol.*, 3 (2): 76- 95
- Snyder GW, Ingersoll JC, Smigocki AC (1999) Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Rep.*, 18: 829-834
- Tu J, Zhang G, Datta K, Xu C, He Y, Zhang Q, Khush GS, Datta SK (2000) Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin. *Nature Biotechnol.*, 18: 1101-1104
- Wilhite, SE, Elden TC, Puizdar V, Armstrong S, Smigocki AC (2000) Inhibition of aspartyl and serine proteinases in midgut of sugarbeet root maggot with proteinase inhibitors. *Entomol. Exp. Appl.*, 97:229-233
- Yang AF, Duan XG, Gu XF, Gao F, Zhang JR (2005) Efficient transformation of beet (*Beta vulgaris* L.) and production of plants with improved salt-tolerance. *Plant Cell Tiss. Org.*, 83: 259-270