جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

انتقال ژن بتا ۱و۳ گلوکاناز (*bgn*I) از *Trichoderma virens* به گیاه کلزا جهت ایجاد مقاومت علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*

لیلا روحی[۱،۲]، محمدرضا زمانی*[۱] و مصطفی مطلبی[۱]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۲] تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۲۱

چکیده

کلزا به عنوان یکی از محصولات مهم زراعی نسبت به بسیاری از قارچهای بیماری زا حساس می باشد. یکی از روشهای ممانعت از نفوذ قارچهای بیماری زا به درون گیاهان، استفاده از آنزیمهای هیدرولازی نظیر گلوکانازها می باشد که باعث تجزیه دیواره این قارچها شده و قادرند از کلونیزه شدن آنها در گیاه جلوگیری نمایند. در این تحقیق جهت ایجاد مقاومت به قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در گیاه کلزا، ژن *bgn*I (کد کننده آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز) به این گیاه منتقل گردیده و میزان مقاومت آن مورد بررسی قرار گرفته است. بدین منظور ابتدا ژن *bgn*I با منشاء قارچ *Trichoderma* virens در وکتور بیانی pBI121^{GUS-} تحت پروموتر CaMV 35S کلون و با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد تأیید قرار گرفت. جهت انتقال ژن کلون شده از *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده گردید. جهت تشخیص گیاهان تراریخت به دست آمده از الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ، و نیز Souther dot blot استفاده گردید. ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخت در برابر قارچ *S. sclerotiorum* به روش radial diffusion assay انجام گرفت. آنالیز نتایج به دست آمده نشان داد که گیاهان تراریخت، نسبت به گیاه شاهد (کلزای غیر تراریخت) در برابر قارچ *S. sclerotiorum* از مقاومت بیشتری برخوردار می باشند.

واژه های کلیدی: کلزا، ژن *bgn*I ، انتقال ژن، باززایی، *Sclerotinia sclerotiorum*

* نویسنده مسئول، تلفن : ٤٤٥٨٠٣٦٣ پست الکترونیکی: zamani@nigeb.ac.ir

مقدمه

کلزا گیاهی مهم از نظر تأمین مواد غذایی مورد نیاز بشر می باشد. با توجه به مصرف بالای روغن در کشور که حدود ۱/۵ میلیون تن است و ۸۰ درصد آن از واردات تأمین می شود، به نظر می رسد استفاده از این گیاه برای کاهش واردات روغن و افزایش خودکفایی کشور در تولید مواد غذایی مورد نیاز مناسب باشد. از طرفی این گیاه نیز مانند سایر گیاهان همواره در معرض هجوم آفات و بیماریهای مختلفی بوده که باعث کاهش محصول، افزایش هزینه تولید و در نهایت عدم استقبال کشاورزان از کشت آن می گردد. هر ساله به علت بیماریهای گوناگونی که انواع قارچها و باکتریهای بیماری زا در گیاهان مختلف ایجاد می نمایند، خسارت فراوانی به محصولات کشاورزی وارد می شود. همزمان با شروع برنامه توسعه کشت کلزا (سال ۱۳۷۸) بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum* نیز در استانهای شمالی کشور گسترش یافته است (بیش از ۵۰ درصد کشت کلزا در دو استان مازندران و گلستان صورت می گیرد) و اکنون علاوه

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

بر این مناطق در استانهای فارس و کردستان نیز به صورت محدود مشاهده می گردد (۱ و ۲).

متداول ترین روش برای مبارزه با بسیاری از این بیماریها استفاده از انواع قارچ کشهای شیمیایی است. اما این گونه مواد نه تنها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی باشند، بلکه باعث آلوده شدن محیط زیست و نیز ایجاد گونه های بیماری زای مقاوم به قارچ کش می شوند. تلاش جهت یافتن جایگزینی مناسب برای این ترکیبات شیمیایی، منجر به استفاده از روشهای مختلف کنترل بیولوژیک این گونه بیماریها شده است (۹ و ۱۸). کاربرد روشهای مولکولی به منظور انتقال ژنهای مقاومت علیه بیماریهای گیاهی، به گیاهان زراعی می تواند به عنوان یک روش تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد.

مطالعه ساختمان دیواره سلولی در قارچها نشان می دهد که تقریباً، الگوی کلی ساختمان دیواره سلولی (شامل مولکولهای بتا گلوکان، شبکه ای از گلیکوپروتئینها و میکروفیبریلهای کیتین)، در اکثر رده های مختلف قارچها مشابه بوده و تنها نسبت ترکیبات تغییر می کند (٦). بتاگلوکان هموپلیمری از منومر دی گلوکز است که با فرم بتا به هم متصل شده و از فراوان ترین رده پلی ساکاریدهای موجود در طبیعت می باشند (۷ و ۱۵).

یکی از مهمترین عوامل مؤثر در بیوکنترل استفاده از انواع آنزیمهای هیدرولازی است که با فرو پاشیدن ساختار سلولی قارچهای بیماری زای گیاهی باعث نابودی آن می گردند (١٤ و ۲۰). از میان آنزیمهای گلوکاناز موجود در جنس تریکودرما، دو آنزیم β-1,3 و β-1,6 گلوکاناز، در تجزیه ترکیبات گلوکانی دیواره قارچهای بیماری زا نقش دارند. با تشدید فعالیت آنزیمهای گلوکاناز، به ویژه 1,3-β-گلوکاناز، بخشی از دیواره که عمدتاً از ترکیبات گلوکانی ساخته شده است به طور کلی از بین می رود. از سوی دیگر، از آنجا که کیتین دیواره قارچهای بیماری زا در ماتریکسی از رشته های گلوکان محصور شده است، غالباً فعالیت گلوکانازی پیش از فعالیت کیتینازی مشاهده می شود (۷ و ١٤).

از ژنهای تجزیه کننده دیواره قارچها مانند کیتینازها و گلوکانازها برای انتقال به گیاهان جهت ایجاد مقاومت علیه طیف وسیعی از بیماریهای قارچی استفاده شده است (۳، ٤ و ۱۰). بنابراین با توجه به نقش ژنهای تجزیه کننده دیواره قارچهای بیماری زا از جمله ژنهای گلوکانازی در ایجاد مقاومت در گیاهان مختلف، هدف از این تحقیق، انتقال ژن β-1,3 گلوکاناز (*bgn*I) به گیاه کلزا با استفاده از آگروباکتریوم و بررسی میزان مقاومت گیاهان تراریخت به دست آمده به قارچ *Sclerotinia sclerotorum* می باشد.

مواد و روشها

مواد گیاهی و سویه های باکتری: بذرهای کلزا رقم R line Hyola 308 از شرکت دانه های روغنی تهیه گردیده و تا زمان استفاده در درجه حرارت ٤ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. باکتری *Escherichia coli* (سویه DH5α) و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه گردید.

پلاسمیدها و مواد مورد استفاده: پلاسمید مورد استفاده در این تحقیق pBI121^{GUS-} برای تهیه سازه های ژنی جهت انتقال به گیاه استفاده شد. برای انجام واکنش PCR از آنزیم *Taq*-polymerase (از شرکت Fermentas) استفاده گردید. آنزیمهای مورد استفاده برای هضم آنزیمی DNA و آنزیم لیگاز از شرکت Fermentas تهیه گردید. مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص بیولوژی مولکولی و نیز کیت خالص سازی DNA از شرکت Roche تهیه شد. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت گیاهی و باکتریایی و نیز تنظیم کننده رشد گیاهی (BAP) از شرکت Sigma تهیه گردید.

آغازگرهای مورد استفاده: مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۱ ارائه شده است.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

شماره	نام آغازگر	توالی آغازگر
۱	FbgnI	5'-GCTCTAGAATGTTGAAGTCACTGGCCTTTG-3'
۲	RbgnI-I	5'-GCTCTAGACTAGGTTGTGTAGCGGCCAACCTC-3'
۳	R2bgnI	5'-AGGTAACGCCCGAGTTGATCGACTTGG-3'
٤	35S	5'-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3'
٥	NosR	5'-CGCGATAATTTATCCTAGTTTGC-3'
٦	M13f	5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGC-3'
۷	M13r	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
۸	ACCf	5'-CATATGCTGGGGTCAATGACAAC-3'
۹	ACCr	5'-GTCGACAGAAGAATGATCGCGAA-3'

کلون کردن ژن *bgn*I در ناقل بیانی گیاهی: ناقل pUCLR1 حاوی ژن *bgn*I به روش لیز قلیایی (۱۷) از باکتری *E. coli* DH5α استخراج شده و جهت تأیید حضور ژن از هضم آنزیمی مناسب و الگوی PCR استفاده گردید. ناقل pUCLR1 تأیید شده و نیز ناقل بیانی pBI121^{GUS-} با آنزیم *Xba*I برش داده شده و مراحل کلون کردن و انتقال به باکتری *E. coli* DH5α طبق روش استاندارد انجام گرفت. جهت انتخاب پلاسمیدهای نوترکیب از آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ μg/ml) در محیط کشت استفاده گردید. پلاسمید pBI121 حاوی ژن *bgn*I به روش انجماد و ذوب با استفاده از کلرید کلسیم (۲۰ میلی مولار) و ازت مایع به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل گردید (۱۷).

آماده سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه: بذور کلزا به روش ارائه شده توسط Moloney و همکاران (۱۲) ضد عفونی شده و برای جوانه زدن روی محیط کشت جوانه زنی (1X MS, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت داده شدند. بذور کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برگهای لپه ای گیاهان ۵ روزه که طول دم برگ آنها حدود ۲ میلی متر بود، جدا شدند و پس از حذف جوانه انتهایی دمبرگها به مدت ٤۸ ساعت روی محیط پیش کشت (1X MS, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت شدند. ریزنمونه ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم می باشند.

از کشت شبانه آگروباکتریوم ترانسفورم شده (OD_{650}=1) رسوب تهیه شد (با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) سپس باکتریهای رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. ریز نمونه های مورد استفاده شامل برگهای لپه ای بودند که ۲٤ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (پیش کشت) قرار گرفته بودند. دمبرگهای برگهای لپه ای به مدت ۹۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار داده شدند. این برگهای لپه ای بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا نسبتاً خشک گردند. سپس در محیط هم کشتی (1X MS, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت داده شدند و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ٤۸ ساعت ریز نمونه ها به محیط انتخابی القاء نوساقه (1X MS, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) ، که حاوی 15 mg/l کانامایسین و 200 mg/l سفوتاکسیم است، منتقل شدند. ریز نمونه ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. در هفته سوم نوساقه های متعددی در سطح فوقانی بعضی از ریز نمونه ها به وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه های تولید شده بر روی محیط انتخابی فوق، سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت

به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند. به نظر می رسد نوساقه های زنده مانده، پلاسمید pBI121 (حامل سازه ژنی مورد نظر) را دریافت نموده و تراریخت شده اند.

نوساقه های سبز باززایی شده در محیط گزینشگر، جدا شده و به محیط طویل شدن نوساقه (1X MS, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) حاوی 25 mg/l کانامایسین و 200 mg/l سفوتاکسیم است منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مریستم فعال، نمونه ها به محیط ریشه‌زایی (1X MS, sucrose 30 g/l, IBA 2 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) به علاوه آنتی بیوتیکهای کانامایسین (25 mg/l) و سفوتاکسیم(200 mg/l) انتقال داده شدند. لازم به ذکر است بعضی از نمونه‌ها در همان محیط طویل شدن نوساقه ریشه دار می‌شدند و احتیاجی به انتقال به محیط ریشه‌زایی نداشتند.

گیاهان پس از حدود ٤ هفته و پس از مشاهده ریشه های کافی به گلدان منتقل شدند و بر روی آنها نایلون کشیده شد سپس با ایجاد منفذهای تدریجی کم کم به محیط سازگار شدند. خاک استفاده شده برای گلدانها استریل شده بود و تا اتمام بذر گیری به طور مرتب آبیاری شدند.

استخراج DNA ژنومی گیاه و PCR: DNA ژنومی از برگ گیاه کلزا به روش زیر استخراج گردید: پانصد میلی گرم از برگ گیاهان مقاوم به کانامایسین و شاهد پس از انجماد با ازت مایع با استفاده از پودر شیشه در تیوپهای ۱/۵ میلی لیتری ساییده گردید. سپس یک میلی لیتر بافر استخراج TNE (Tris-HCl ۵۰ میلی مولار، EDTA ۱۰۰ میلی مولار، NaCl ۱۵۰ میلی مولار با pH برابر ۸) به پودر اضافه شد و به شدت تکان داده شد. به هموژن حاصل ٦۰ میکرولیتر SDS 20% اضافه گردید و به مدت نیم ساعت به طور ملایم مخلوط گردید. سپس۱۵۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و۱۳۰ میکرولیتر CTAB ۱۰ درصد اضافه شد. هموژن حاصله به آرامی مخلوط شد و ۲۰ دقیقه در ٦۵ درجه سانتی گراد (با هم زدن ملایم در هر ۵ دقیقه) نگهداری گردید. مخلوط حاصل بین دو لوله اپندورف ۱/۵ میلی لیتری استریل تقسیم گردید و به هر لوله مقدار ۳۷۵ میکرولیتر مخلوط کلروفرم/ ایزوآمیل الکل (۱:۲٤) اضافه شده و به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. بعد از سانتریفیوژ۱۵ دقیقه‌ای در g ۱۳۰۰۰، فاز رویی که حاوی DNA ژنومی بود به لوله تمیز منتقل گردید. DNA ژنومی با افزودن ۱/۲ حجم ایزوپروپانل ۱۵دقیقه سانتریفیوژ (۱۳۰۰۰g) رسوب دهی شد. رسوب حاصله با اتانل ۷۰ درصد شستشو داده شد و بعد از خشک شدن در دمای اطاق، در ۷۵–۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر سترون شده حل گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جهت تکثیر ژن *bgn*I از آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I استفاده گردید (جدول ۱). PCR اختصاصی پس از بهینه سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲ میلی مولار MgSO4، ۳۰ نانوگرمDNA، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی مولار dNTP، و ۲/۵ واحد آنزیم *Pfu*-DNA polymerase و ۵ میکرولیتر بافر (10X) (۲۰۰ میلی مولار Tris-HCl، pH برابر ۸/۸، ۱۰۰ میلی مولار KCl ، ۱۰۰ میلی مولار $(NH4)_2SO_4$ ، ۱ درصد تریتون X۱۰۰ و یک میلی گرم در میلی لیتر از BSA) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰۰ ثانیه، دمای ٦۰ درجه سانتی گراد به مدت ٦۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲۰ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

لکه گذاری DNA : مقدار ۱۵ میکروگرم از DNA استخراج شده از برگ تازه گیاهان تراریخت و غیرتراریخت تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده و سپس با قرار دادن روی یخ سرد گردید. DNA

های واسرشته شده بر روی غشاء نایلونی (Hybond N^+, Amersham) لکه گذاری گردید و سپس با پروب نشان دار آغشته گردید. جهت تهیه پروب نشان دار از کیت غیررادیواکتیو (Dig-labeled dNTP) و تکثیر به روش PCR توسط آغازگرهای FbgnI/R2bgnI که قطعه ای از ژن *bgn*I به طول ۹۰۰ جفت باز را تکثیر می کند، استفاده گردید.

ارزیابی مقاومت لاینهای تراریخت در شرایط آزمایشگاهی: به منظور مقایسه مقاومت گیاهان کلزای تراریخت با گیاهان شاهد از روش زیست سنجی radial diffusion assay استفاده گردید. در این روش از تأثیر میزان بازدارندگی پروتئینهای استخراج شده از برگ گیاهان تراریخت بر رشد میسلیومهای قارچ *S. sclerotiorum* استفاده شد.

جهت مطالعه تأثیر بازدارندگی پروتئینهای استخراج شده از گیاهان تراریخت بر رشد میسلیومهای قارچ اسکلروتینیا، یک تکه کوچک محیط کشت به ابعاد حدود (۲×۲ mm) حاوی میسلیومهای تازه رشد یافته قارچ اسکلروتینیا در مرکز یک پلیت حاوی PDA قرار داده شد. پس از اینکه قطر کلنی قارچ به حدود ۲/۵ سانتیمتر رسید در اطراف آن چند چاهک ایجاد کرده و با افزودن محصول استخراج پروتئین گیاهان تراریخت به آنها با فاصله های زمانی هر ٦ ساعت یکبار (نباید محلول درون چاهکها خشک شود) پلیت ها انکوبه شده و اثر بازدارندگی استخراج پروتئین گیاهان تراریخت مورد مطالعه قرار گرفت. در این روش از پروتئینهای استخراج شده از برگ گیاهان غیرتراریخت به عنوان کنترل منفی و از محیط کشت مایع قارچ *T.virens* که توانایی ترشح آنزیمهای هیدرولازی را دارد به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

نتایج

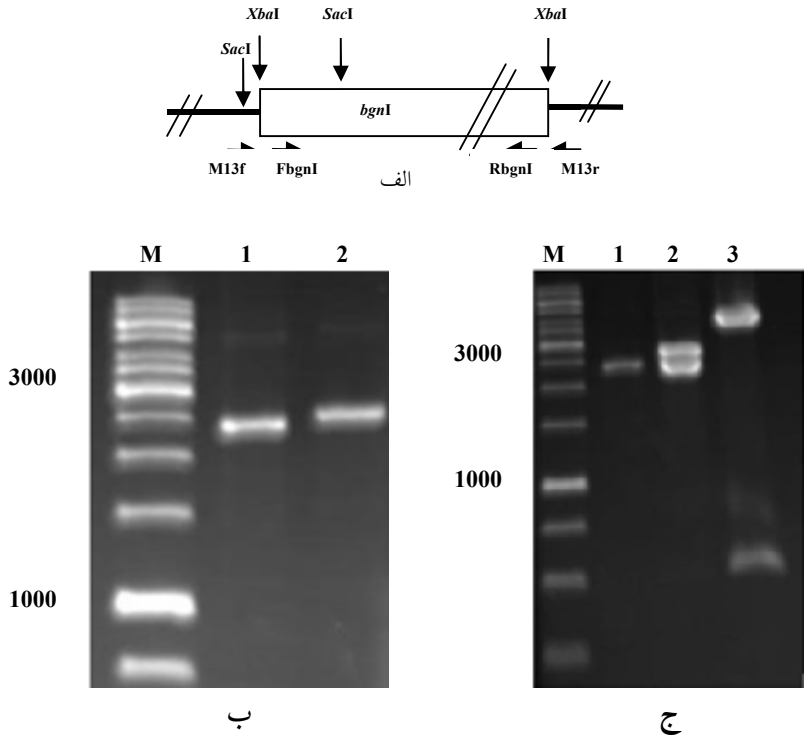
جهت افزایش مقاومت در گیاه کلزا (واریته R line Hyola 308) از ژن بتا گلوکاناز (*bgn*I) قارچ *Trichoderma virens* استفاده گردید. حضور ژن *bgn*I در پلاسمید PUCLR1 توسط الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن و وکتور و نیز الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای *Xba*I و *Sac*I، مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱).

جهت انتقال ژن *bgn*1 به گیاه کلزا از ناقل بیانی دوگانه گیاهی $pBI121^{Gus-}$ استفاده گردید. این ناقل به همراه پلاسمید pUCLR1 (حاوی ژن *bgn*I) توسط آنزیم *Xba*I هضم و واکنش اتصال انجام گردید. سازه pBI121 حاوی ژن مذکور با استفاده از الگوی هضم آنزیمی با آنزیمهای *Hind*III، *Sac*I و *Xba*I (شکل ۲) و نیز الگوی PCR مورد تأیید قرار گرفت. پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تأیید به نام pBILR1 نامگذاری گردید. به دلیل اینکه دو انتهای قطعه حاوی ژن *bgn*I دارای محل برش برای آنزیم *Xba*I می باشد، بنابراین در زمان کلون شدن در پلاسمید $pBI121^{GUS-}$، این قطعه ممکن است در مقایسه با پروموتور CaMV35S، در دو جهت و به صورت صحیح یا معکوس قرار گیرد. به منظور تعیین جهت صحیح ژن از الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن، اختصاصی وکتور و ترکیب آنها استفاده گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که در کلون شماره ۵، ژن در جهت صحیح کلون گردیده و قطعات به دست آمده از واکنش PCR همان قطعات مورد انتظار می باشند (شکل۳).

ژن *bgn*I در این سازه تحت کنترل پروموتر CaMV 35S کلون گردیده است. این سازه دارای ژن *npt*II بوده که به منظور انتخاب گیاهان تراریخت دریافت کننده این T-DNA در محیط حاوی کانامایسین نقش ایفا می نماید.

سازه ژنی pBILR1 به اگروباکتریوم منتقل و پس از تأیید الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، جهت انتقال به ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده گردید. ریز نمونه ها پس از تلقیح به محیط هم کشتی منتقل و پس از دو روز به محیط گزینشگر القاء نوساقه دارای سفوتاکسیم (برای جلوگیری از رشد آگروباکتریوم) وکانامایسین (جهت انتخاب ریزنمونه های تراریخت) منتقل شدند. سلولهای زخمی قاعده دمبرگ که با دریافت T-DNA، ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) در آنها بیان شده بود در مقابل کانامایسین محیط مقاومت کرده و سبز باقی ماندند. نوساقه های سبز مقاوم به کانامایسین به محیط طویل شدن نوساقه که دارای سفاتوکسیم و کانامایسین نیز بود منتقل شدند. پس از اینکه نوساقه ها به اندازه مناسب رسیدند، به محیط ریشه زایی انتقال داده شدند. گیاهان ریشه دار شده به گلدانهای کوچک حاوی خاک استریل منتقل شدند. برای سازگاری تدریجی با شرایط طبیعی از سرپوشهای شفاف استفاده گردید (شکل ٤). پس از سازگاری گیاهان، سرپوشها حذف گردیدند. از گیاهان رشد یافته پس از گلدهی و ایجاد غلاف، بذرگیری به عمل آمد.

به منظور تأیید تراریختی گیاهان مقاوم به کانامایسین به دست آمده، DNA ژنومی از برگهای جوان و سبز این گیاهان و گیاه شاهد استخراج گردید. بدین منظور از روش مطالعه الگوی PCR و همچنین PCR based RFLP (PBR) استفاده گردید. نتایج به دست آمده احتمال تراریختی گیاهان کلزا توسط ژن *bgn*I را تأیید نمود (شکل ۵).

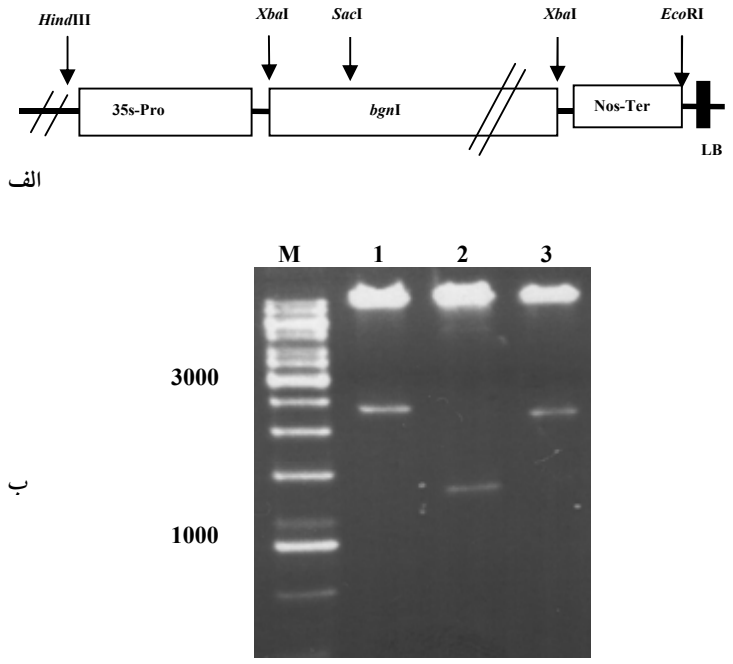


شکل ۱- تأیید پلاسمید نوترکیب pUCLR1 حاوی ژن *bgn*I با استفاده از الگوی PCR (الف) و هضم آنزیمی (ب)

الف) شکل شماتیک ژن *bgn*I ، آغازگرهای مورد استفاده و همچنین جایگاه آنزیمهای برشی؛

ب) ۱- محصول PCR از پلاسمید نوترکیب pUCLR1 با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I، ۲- محصول PCR با آغازگرهای M13f/M13r، M= 1kb ladder، (اندازه قطعات مورد انتظار می باشد).

ج) ۱- محصول PCR با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I ۲- pUCLR1 هضم شده با آنزیم *Xba*I ، ۳- pUCLR1 هضم شده با آنزیم *Sac*I، M= 1kb ladder، (اندازه قطعات مورد انتظار می باشد).

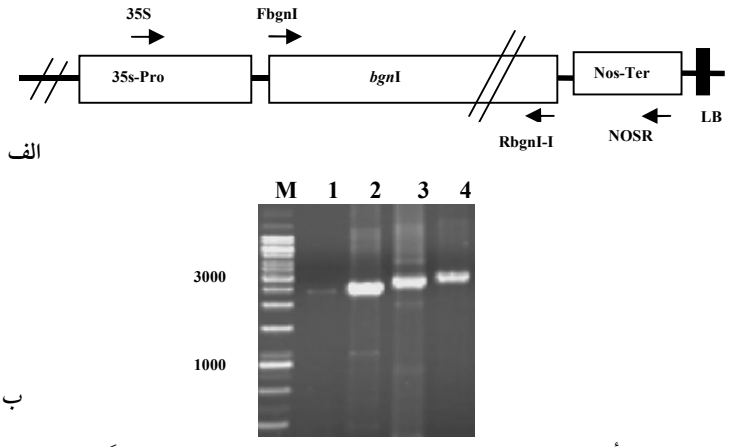


شکل ۲- تأیید پلاسمید نوترکیب pBILR1 حاوی ژن *bgn*I با استفاده از الگوی هضم آنزیمی

الف) شکل شماتیک ژن *bgn*I و جایگاه آنزیمهای برشی مورد استفاده؛

ب)۱-الگوی هضم انزیمی پلاسمید pBILR1 با استفاده از آنزیم *Xba*I، ۲- pBILR1 هضم شده با آنزیمهای*Hind*III/*Sac*I ، ۳- pBILR1 هضم شده با آنزیمهای *Eco*RI/*Sac*I، M= 1kb ladder. (اندازه قطعات مورد انتظار می باشد).

LB, left border; 35s-pro, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; Nos-ter, terminator of nopaline synthase; *bgn*I, beta 1,3-glucanase gene.

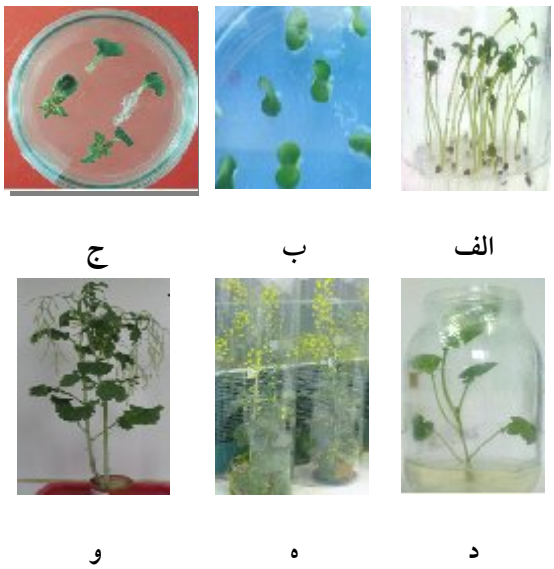


شکل ۳- تأیید پلاسمید نوترکیب pBILR1 حاوی ژن *bgn*I با استفاده از الگوی PCR

الف) شکل شماتیک کاست حاوی ژن *bgn*I و آغازگرهای مورد استفاده؛

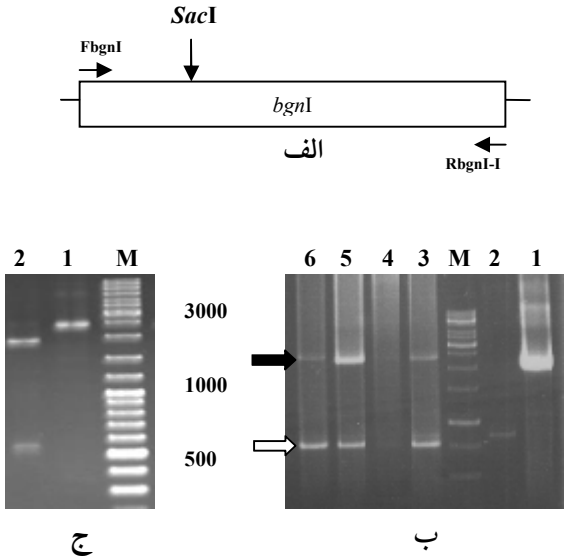
ب) ۱-محصول PCR با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I، ۲- محصول PCR با آغازگرهای FbgnI/NosR، ۳- محصول PCR با آغازگرهای35S/RbgnI-I، ٤- محصول PCR با آغازگرهای 35S/NosR، M = 1kb ladder.

LB, left border; 35s-pro, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; Nos-ter, terminator of nopaline synthase; *bgn*I, beta 1,3-glucanase gene.



شکل ٤- فرآیند انتقال ژن و باززایی گیاه کلزا

الف- بذرهای جوانه زده، ب- کوتیلدونهای کشت شده بر روی محیط پیش کشت، ج- باززایی نوساقه از کوتیلدون، د- رشد گیاه تراریخت احتمالی درون شیشه، ه- گلدهی، و- تشکیل غلاف جهت بذرگیری از گیاه کلزای تراریخت

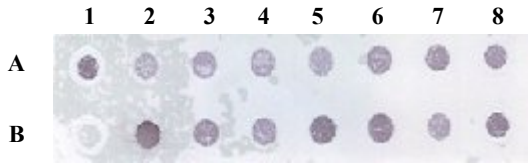


شکل ٥) تأیید حضور ژن *bgnI* در گیاهان تراریخت احتمالی با استفاده از الگوی PCR و تکنیک PBR

الف) شکل شماتیک ژن *bgnI* و آغازگرهای مورد استفاده و همچنین جایگاه برشی آنزیم *SacI*؛

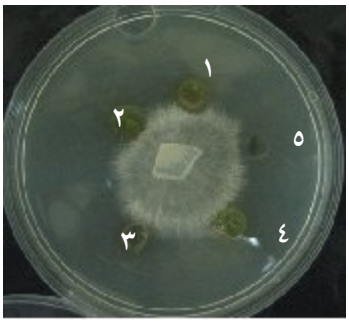
ب) الگوی PCR گیاهان تراریخت، ۱- محصول PCR با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I با استفاده از DNA پلاسمید pBILR1 (کنترل مثبت)، ۲- محصول PCR گیاه غیرتراریخت، ۳، ٤، ٥ و ٦ محصول PCR گیاهان تراریخت با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I (باند حدود ۲۳۰۰ جفت باز، فلش سیاه رنگ)، همچنین در گیاهان تراریخت و غیرتراریخت با استفاده از آغازگرهای ACCf/r (اختصاصی ژن استیل کوآنزیم-A کربوکسیلاز گیاه کلزا) باند حدود ۸۰۰ جفت باز تکثیر گردیده است (فلش سفید رنگ).

ج) تأیید صحت انتقال ژن با استفاده از تکنیک PBR، ۱- محصول PCR با آغازگرهای FbgnI/RbgnI-I، ۲- الگوی هضم آنزیمی محصول PCR با استفاده از آنزیم *SacI*، M= 1kb ladder، (اندازه قطعات مورد انتظار می باشد).



شکل ٦- تأیید گیاهان تراریخت با استفاده از لکه گذاری DNA (Dot blot)

A1 و B2 کنترل مثبت (DNA ناقل pBILR1)، B1 کنترل منفی (DNA گیاه غیرتراریخت)، A2 الی A8 و B3 الی B8 گیاهان تراریخت احتمالی



شکل ۷- آزمون زیست سنجی با استفاده از radial diffusion assay جهت مطالعه تأثیر بیان ژن *bgn*I در گیاهان تراریخت بر رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum*

۱- محیط کشت مایع قارچ تریکودرما (کنترل مثبت)، ۳- عصاره پروتئینی گیاه غیرتراریخت، ۲، ٤ و ۵ عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت، همانطور که مشاهده می شود عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت در رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* ممانعت ایجاد نموده اند.

برای بررسی بیشتر حضور ژن *bgn*I از طریق Dot blotting ابتدا پروب نشاندار از کیت غیر رادیواکتیو dig-labeled-dNTP و تکثیر به روش PCR استفاده گردید. بدین منظور از آغازگرهای FbgnI/R2bgnI که قطعه‌ای از ژن به طول۹۰۰ جفت باز را تکثیر می‌کند، استفاده شد. نتایج حاصل از آشکارسازی غشاء مورد استفاده در Dot blot نشان می‌دهد که نمونه مربوط به گیاهان تراریخت به صورت لکه تیره در مقایسه با نمونه شاهد (گیاه غیرتراریخت) ظاهر می‌گردد (شکل ٦). بنابراین Dot blot نیز مانند PCR حضور ژن *bgn*I در گیاه کلزای تراریخت را تأیید نمود.

به منظور مقایسه مقاومت گیاهان کلزایی که نتیجه PCR و همچنین Dot blot آنها مثبت بود از روش زیست سنجی radial diffusion assay استفاده گردید. در این روش از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* استفاده شد. مقایسه میزان ممانعت کنندگی عصاره برگ گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد (در سه تکرار) نشان داد که پروتئینهای موجود در عصاره گیاهان تراریخت باعث کاهش رشد میسلیوم قارچ *S. sclerotiorum* می گردند (شکل۷).

بحث

در بین محصولات کشاورزی، گیاهان روغنی از جایگاه ویژه‌ای برخوردار بوده و بیشترین روغن خوراکی بشر را تأمین می‌کنند. دانه‌های روغنی بعد از غلات به عنوان دومین منبع تأمین‌کننده انرژی برای جوامع بشری محسوب می‌شوند. کلزا در بین دانه‌های روغنی اهمیت جهانی کسب نموده است. دلیل اهمیت این گیاه روغنی به خاطر دارا بودن بیشترین درصد اسیدهای چرب خوراکی غیر اشباع و کمترین درصد مواد زائد و مضر برای انسان و همچنین بالا بودن مواد مطلوب در بازمانده‌های آن و خوش خوراکیهای

آن برای تغذیه دام است. لذا هر گونه تلاشی در جهت بهینه شدن محصول کلزا ارزش اقتصادی آن را افزایش داده و اثرات تجاری مهمی را به دنبال خواهد داشت (۸).

از جمله مواردی که زراعت کلزا را تحت تأثیر قرار می‌دهد، پاتوژن‌های بیماری زا می‌باشند و از میان این پاتوژن‌ها قارچها بیشترین خسارت را به این گیاه زراعی استراتژیک و دارای اهمیت اقتصادی وارد می‌کنند. قارچ *S. sclerotiorum* موجب افت شدید کیفیت و کمیت محصول گیاه کلزا می‌شود، خسارتی که این قارچ در مزارع کلزا در شمال قاره آمریکا وارد می‌کند سالانه بالغ بر ۱۶ میلیارد دلار تخمین زده شده است (۱۶). در ایران نیز بیماری پوسیدگی ساقه کلزا در استانهای شمال کشور گسترش داشته و در سایر استانها نیز به صورت محدود گزارش شده است (۱ و۲).

استفاده از قارچ کشها به منظور مبارزه با این فیتو پاتوژن ها علاوه بر داشتن مضرات زیست محیطی و گرانی، همیشه نتیجه قابل تضمینی را ارائه نمی‌دهند. استفاده از روشهای جدید زیستی برای کنترل این گونه بیماریها اخیراً رواج یافته است که از جمله آنها می توان به استفاده از تکنیکهای مهندسی ژنتیک اشاره نمود که با بهره گیری از انتقال ژنهای خاص به گیاه می توان به نتیجه مطلوبی دست پیدا کرد. از جمله صفاتی که توسط انتقال ژنهای مفید به گیاهان ظهور پیدا کرده‌اند می‌توان ژنهای مقاومت در برابر آفات و امراض گیاهی، علف‌کشها، تنشهای زیستی و غیرزیستی و بهبود کیفیت را نام برد (۱۳).

از مهمترین مکانیزمهای مقابله با پاتوژن های گیاهی تولید آنزیمهای هیدرولیتیک می باشد که با توجه به وجود گلوکان در ساختار دیواره قارچهای بیماری زا می تواند دیواره آنها را تجزیه نماید. آنزیمهای تخلیص شده از قارچ تریکودرما، در برابر پاتوژن های گیاهی مهم، نقش مهار کننده دارند و می توانند ساختار نرم نوک هیف را تجزیه کنند. علاوه بر این، این توانایی را دارند که دیواره سخت کیتینی هیفهای بالغ، conidia، کلامیدوسپور ها و اسکلروتها را هم تجزیه نمایند(۱۰). آنزیمهای گلوکانازی از جمله آنزیمهای هیدرولازی می باشند که قادرند با تجزیه گلوکان موجود در ساختار دیواره سلولی قارچها، این پلیمر خطی را به زیر واحد های تشکیل دهنده اش تجزیه و موجب تخریب ساختار دیواره سلولی قارچ شوند.

با توجه به اهمیت بیماری پوسیدگی ساقه توسط قارچ *S. sclerotiorum* در گیاه کلزا، در تحقیق حاضر مقاومت این گیاه به بیماری مذکور از طریق انتقال یک ژن مقاومت (*bgn*I) مد نظر بوده است. از آنجا که ارقام پرمحصولی از کلزا که به این بیماری مقاوم باشند در دسترس نمی باشد لذا تنها اقدام جدی که برای کنترل این بیماری در کشور صورت می گیرد استفاده از قارچ کش Folicur می باشد که علاوه بر تحمیل هزینه زیاد، موجب آلودگی زیست محیطی نیز می گردد.

اهمیت ژن بتا ۱و۳ گلوکاناز جهت افزایش مقاومت گیاهان در برابر قارچهای بیماری زا در سالهای اخیر توسط محققین مختلفی گزارش شده است. Cota و همکاران (۵) نشان دادند که آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز بخشی از سیستم دفاعی میوه گوجه فرنگی نسبت به آلودگی قارچی (*Alternaria alternata*) می باشد. همچنین Shetty و همکاران (۱۹) نقش آنزیم بتا ۱و۳ گلوکاناز را در ایجاد مقاومت در گیاه *Pennisetum glaucum* در مواجهه با قارچ *Sclerospora graminicola* گزارش نمودند. Yoshikawa و همکاران)۲۱(در تحقیقات خود ژن گلوکاناز با منشاء سویا را به گیاه توتون انتقال داده و اثرات مطلوبی در نتیجه بیان این ژن در کاهش توسعه قارچهای *phytophthora parasitica* و *Alternaria alternata* مشاهده نمودند. Masoud و همکاران (۱۱) ژن گلوکاناز را به گیاه یونجه انتقال دادند ودر گیاهان تراریخت کاهش علائم توسعه قارچ *phytophthora megaspora* را گزارش نمودند.

در این تحقیق از ژن *bgn*I قارچ *T. virens* جهت تراریختی رقم R line Hyola 308 گیاه کلزا استفاده گردید. از آنجا که در محل برشهای ایجاد شده در انتهای دمبرگ کوتیلدونی (به عنوان ریز نمونه) گیاه کلزا سلولهای مناسبی برای انتقال ژن وجود دارد، لذا در این تحقیق جهت انتقال ژن *bgn*I به گیاه کلزا از برگهای کوتیلدونی استفاده گردید. مناسب بودن استفاده از ریزنمونه های کوتیلدونی جهت انتقال ژن به گیاه کلزا در منابع گزارش شده است (۱۲). رشد گیاهان در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و شواهد مولکولی نظیر الگوی PCR و لکه گذاری DNA (Dot blot)، حضور ژن *bgn*I را در این گیاهان تأیید نمود.

آزمون PCR و هیبریداسیون (Southern dot blot) حضور ساختارهای مورد نظر را در ژنوم گیاه تراریخت اثبات می‌کنند ولی اطلاعاتی در رابطه با بیان ژن ارائه نمی‌دهند، این در حالی است که اگر ژن انتقال یافته بیان نشود، عملاً فاقد ارزش است. لذا ضروری است با آزمونهای خاص بیان ژن انتقال یافته را نیز مورد بررسی قرار داد. بدین منظور به موازات تأییدهای مولکولی که روی گیاهان تراریخت صورت گرفت، آزمون radial diffusion assay نیز انجام شد تا در صورت بیان ژن *bgn*I در گیاهان تراریخت، افزایش مقاومت در آنها مورد بررسی قرار گیرد. گیاهان تراریخت در مقایسه با گیاه کنترل مقاومت بیشتری نسبت به پیشروی قارچ *S. sclerotiorum* از خود نشان دادند. مطالعات مربوط به بررسی ایجاد مقاومت در گیاهان به دست آمده توسط آزمایشهای زیست سنجی انجام شده است و لازم است این مقاومت در برابر قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه ای و مزرعه ای نیز مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی:

بدین‌وسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به‌دلیل تأمین بودجه پژوهشی این تحقیق تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

منابع

۱-افشاری آزاد، همایون، ۱۳۸۰- بیماریهای مهم کلزا. نشر آموزش کشاورزی، ۹۹ صفحه .

۲-افشاری آزاد، همایون، ۱۳۸٤- بررسی وضعیت مزارع کلزا در استانهای مازندران و گلستان از نظر آلودگی به بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی. گزارش پژوهشی، موسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی.

3-Bolar J.P., Norelli J.L., Wong K.W., Hayes C.K., Harman G.E., and Aldwinckle H.S. 2000. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. Phytopathology, 90: 72-77.

4-Bolar J.P., Norelli J.L., Harman G.E., Brown S.K., and Aldwinckle H.S. 2001. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. Transgenic Research. 10(6): 533-543.

5-Cota I.E.R., Troncoso-Rojas R., Sotelo-Mundo R., Sánchez-Estrada A. and Tiznado-Hernández M.E. 2007. Chitinase and β-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties, *Sci. Hortic.* 112 : 42–50.

6-Deacon, J. W. 1997. Modern Mycology, 3rd edition Edition (Edinburgh: Blackwell Science Ltd).

7-Haran S., Schickler H. and Chet I. 1996. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology *142*, 2321-2331.

8-Holmes, M.R.J., 1980. Nutrition of Oilseed Rape Crop. Applied Scientific Publishing Ltd., London, UK.

9-Kubicek C.P., Mach R.L., Peterbauer C.K., and Lorito M. 2001. *Trichoderma*: from genes to biocontrol. Journal of Plant Pathology. 83(2): 11-23.

10-Lorito M., Woo S., Fernandez I.G., and Colucc G. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant Resistance to fungal pathogens. J. Agricultural Sciences. 95: 7860–7865

11-Masoud S.A., Zhu Q., Lamb C. and Dixon R.A. 1996. Constitutive expression of an inducible β-1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen*Phytophthora megasperma* f. sp*medicaginis*, but does not reduce disease severity of chitin-containing fungi. Biomedical and Life Sciences, 5(5): 313-323.

12-Moloney MM,Walker JM, Sharma KK. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. Plant Cell Rep., 8:238–242.

13-Nijs H.C.M den, D. Bartsch, and J. Sweet (eds.). 2004. Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK

14-Nobe,R., Sakakibara,Y., Ogawa,K. and Suiko,M. 2004. Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). Biosci. Biotechnol. Biochem. 68 (10), 2111-2119.

15-Pitson, S. M., Seviour, R. J., and McDougall, B. M. 1993. Noncellulolytic Fungal β-Glucanases: Their Physiology and Regulation. Enzyme Microbiology and Technology *15*, 178-192.

16-Punja Z.K. 2004. Fungal disease resistance plants: biochemistry, bilogy and genetic engineering. Food Products Press. 266p.

17-Sambrook J. and Russell D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.

18-Seidl V., Schmoll M., Scherm B., Balmas V., Seiboth B., Migheli Q., Kubicek C P., 2006. Antagonism of *Pythium* blight of Zucchini by *Hypocrea jecorina* does not require cellulase gene expression but is improved by carbon catabolism derepression. FEMS Microbiology Letters, Volume 257 Page 145 - April 2006

19-Shetty H.S., Vasanthi N.S., Sarosh B.R., Kini K.R. 2001. Inheritance of downy mildew resistance, β-1,3-glucanases and peroxidases in pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crosses. *Theor Appl Genet* 102:1221–1226.

20-Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. J. Exp. Bot. 52:487-511.

21- Yoshikawa, M., Tsuda, M., and Takeuchi, Y. 1993. Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, B-1,3-endoglucanase, from soybean. Naturwissenschaften 80, 417-420.

Transgenic canola plants harboring beta 1,3 glucanase (*bgn*I) gene from *Trichoderma virens* inhibit mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum.*

Roohi L.[1,2], Zamani M.R.[1] and Motallebi M.[1]

[1]**National Institute of Genetic engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran**

[2]**Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

Canola (*Brassica napus* L.) an agro-economically important crop in the world, is sensitive to many fungal pathogens including *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of stem rot disease. Glucanase is cell wall degrading enzyme which have been shown to have high antifungal activity against a wide range of phytopathogenic fungi. In the present study *bgnI* gene from *Trichoderma virens* was overexpressed under the control of the CaMV 35S constitutive promoter in *Brassica napus*, R line Hyola 308. Transformation of cotyledonary petioles was achieved via *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. After infection with *Agrobacterium*, the explants were transferred to selected regeneration medium. The transformed explants were screened in kanamycin containing media. The explants were excised and rooted using appropriate growth regulator. Putative transgenic lines obtained from independent transformation events transferred to the greenhouse for hardening. The presence of *bgn*I in putative transgenic lines confirmed by the polymerase chain reaction (PCR) using specific primers and PCR-based RFLP. Also, antifungal activity was detected in crude protein extracts from transgenic canola plants when compared to non-transgenic canola using radial diffusion assay.

Keywords: *Brassica napus, bgn*I, Transformation, Regeneration, *Sclerotinia sclerotiorum.*