مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۲، شماره ۱، ۱۳۹۰ (۶۱-۵۳)

انتقال ژن *pgip1* لوبیا رقم دانشجو به کلزا (رقم R line Hyola 308) جهت ایجاد مقاومت علیه قارچ *Sclerotina sclerotiorum* عامل پوسیدگی ساقه

علی عابدی[۱]، مصطفی مطلبی[۲]، محمدرضا زمانی[۳]* و خسرو پیری[۴]
۱، ۲، ۳، دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ۴، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
(تاریخ دریافت: ۸۸/۳/۲۷ - تاریخ تصویب: ۸۹/۶/۳۱)

چکیده

یکی از روش‌های ممانعت از نفوذ قارچ‌های بیماریزا به درون گیاهان، مهار فعالیت آنزیم‌های پکتینازی (مانند پلی‌گالاکتوروناز) این قارچ‌ها می‌باشد. پروتئین‌های مهارکننده فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز (PGIP) از جمله پروتئین‌هایی هستند که توسط برخی از گیاهان بیان می‌شوند و قادرند قدرت نفوذ قارچ به گیاه را مهار نمایند. در این تحقیق جهت ایجاد مقاومت به قارچ *Sclerotina sclerotiorum* در گیاه کلزا، ژن *pgip1* به این گیاه منتقل گردید و میزان مقاومت آن مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا ژن *pgip1* لوبیا رقم دانشجو در ناقل بیانی pBI121 تحت پیشبرنده CaMV 35S کلون و با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد تأئید قرار گرفت. جهت انتقال ژن به گیاه از باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 و ریزنمونه‌های کوتیلدونی استفاده گردید. جهت تأئید گیاهان تراریخت به دست آمده از الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی استفاده گردید. ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخت در برابر قارچ *S. sclerotiorum* به روش detached leaf assay انجام گرفت. آنالیز نتایج به دست آمده نشان داد که گیاهان تراریخت احتمالی، نسبت به گیاه شاهد (کلزای غیر تراریخت) در برابر قارچ *S. sclerotiorum* از مقاومت بیشتری برخوردار می‌باشند.

واژه های کلیدی: کلزا، ژن *pgip1*، انتقال ژن، باززایی، *Sclerotina sclerotiorum*.

مقدمه

کلزا گیاهی مهم از نظر تأمین مواد غذایی مورد نیاز بشر می‌باشد. با توجه به مصرف بالای روغن در کشور که حدود ۱/۵ میلیون تن است و ۸۰ درصد آن از واردات تامین می‌شود، 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 می‌گردد. هر ساله به علت بیماری‌های گوناگونی که انواع قارچ‌ها و باکتری‌های بیماریزا در گیاهان مختلف ایجاد می نمایند، خسارت فراوانی به محصولات کشاورزی وارد می‌شود. همزمان با شروع برنامه توسعه کشت کلزا (سال ۱۳۷۸) بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum* نیز

* نویسنده مسئول: محمدرضا زمانی تلفن: ۰۲۱-۴۴۵۸۰۳۶۳ E-mail: zamani@nigeb.ac.ir

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 بر این مناطق در استانهای فارس و کردستان نیز بصورت محدود مشاهده می‌گردد (Afshari-Azad, 2001).

متداول‌ترین روش برای مبارزه با بسیاری از این بیماری‌ها استفاده از انواع قارچ‌کش‌های شیمیایی است. اما این گونه مواد نه تنها از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشند، بلکه باعث آلوده شدن محیط زیست و نیز ایجاد گونه‌های بیماریزای مقاوم به قارچ‌کش می‌شوند. تلاش جهت یافتن جایگزینی مناسب برای این ترکیبات شیمیایی، منجر به استفاده از روش‌های مختلف کنترل بیولوژیک این گونه بیماری‌ها شده است (Seidl et al., 2006; Kubicek et al., 2001). کاربرد روش‌های ملکولی به منظور انتقال ژنهای مقاومت علیه بیماری‌های گیاهی به گیاهان زراعی، می‌تواند بعنوان یک روش تکمیلی مورد استفاده قرار گیرد. دیواره سلول گیاهی با داشتن ساختار پایدار، اولین سد دفاعی در مقابل پاتوژن‌ها است. از میان ترکیبات سازنده این دیواره، پلی‌ساکاریدهای پکتینی جزء اصلی دیواره اولیه دولپه‌ای‌ها (De Lorenzo et al., 1994; Favaron et al., 1994; Hahn et al., 1989)، و برخی از تک‌لپه‌ای‌ها (Dixon et al., 1996) می‌باشند. قارچ‌ها بسته به پتانسیل آنزیمی خود قادر به تخریب این سد دفاعی می‌باشند. پکتینازها جزء اولین آنزیم‌هایی هستند که در قارچ‌ها جهت نفوذ به سلول گیاهی ترشح می‌شوند. از میان پکتینازها، پلی‌گالاکتوروناز‌ها (Polygalacturonase /PG)، نقش مهمی در تجزیه دیواره سلول گیاهی دارند (Huang & Allen, 2000; Shieh et al., 1997; ten Have et al., 1998; Motallebi et al., 2003; Zamani et al., 2000). این آنزیم‌ها توسط پاتوژن بر روی بافت میزبان ترشح می‌شوند. تأثیر این آنزیم‌ها باعث ایجاد و رهاسازی قطعات اولیگوگالاکتورونیدی[1] می‌گردد، که این قطعات ضمن تأمین منبع کربنی لازم برای رشد قارچ، نفوذ و کلونیزاسیون پاتوژن قارچی را نیز تسهیل می‌نمایند (Shanmugam, 2004).

پروتئین‌های مهارکننده آنزیم پلی گالاکتوروناز[2] در به تأخیر انداختن پیشرفت هیف قارچی، کاهش پوسیدگی بافت میزبان، تحریک دیگر پاسخ‌های دفاعی گیاه و در نهایت توقف کلونیزاسیون قارچی نقش دارند (DeLorenzo et al., 1994; DeLorenzo et al., 1997; Hahn et al., 1989). این مهارکننده‌ها مولکولهای گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۵۵-۴۰ کیلودالتون می‌باشند که به ماتریکس خارج سلولی گیاه با پیوندهای یونی متصل شده‌اند (Salvi et al., 1990; Johnston et al., 1994).

ژنهای کدکننده PGIP به صورت خانواده ژنی سازمان‌دهی شده‌اند. اعضای مختلف هر خانواده ممکن است پروتئین‌هایی با صفات تقریباً مشابه کد کنند اما ویژگی و عمل تنظیمی آنها متفاوت است (De Lorenzo et al., 2001; Ferrari et al., 2003). گزارشات متعددی نشان می‌دهد که بیان پروتئین‌های مهارکننده فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز در گیاهان تراریخت جهت کنترل بیماری‌های قارچی مورد استفاده قرار گرفته است (Aguero et al., 2005; Manfredini et al., 2005; Powell et al., 2000; Tamura et al., 2004).

هدف از این تحقیق انتقال ژن *pgip1* رقم دانشجوی گیاه لوبیا به گیاه کلزا با استفاده از آگروباکتریوم و بررسی میزان مقاومت گیاهان تراریخت به دست آمده به قارچ *S. sclerotiorum* می‌باشد.

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 ۴ درجه سانتی‌گراد 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

در این تحقیق برای تهیه سازه‌های ژنی جهت انتقال به گیاه، از پلاسمید pBI121 (از شرکت Novagen)

1. Oligogalacturonide

2. Polygalacturonase-inhibiting proteins/ PGIP

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 ملکولی و نیز کیت خالص سازی DNA از شرکت Roche تهیه شد. مواد مورد نیاز جهت تهیه محیط کشت گیاهی و باکتریایی و نیز تنظیم‌کننده رشد گیاهی (BAP) از شرکت Sigma تهیه گردید.

کلون کردن ژن *pgip1* در ناقل بیانی گیاهی

پلاسمید pUC19 حاوی ژن *pgip*1 از واریته دانشجوی گیاه لوبیا (Fallahi, 2006) به روش لیز قلیایی (Sambrook & Russell, 2001) از باکتری *E. coli* DH5α استخراج شده و جهت تأیید حضور ژن از هضم آنزیمی مناسب و الگوی PCR استفاده گردید. پلاسمید pUC19 حاوی ژن *pgip*1 تأیید شده و نیز ناقل بیانی pBI121 با آنزیم‌های *Sac*I/*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 *pgip*1 به روش انجماد و ذوب با استفاده از کلرید کلسیم (۲۰ میلی‌مولار) و ازت مایع به باکتری *A. tumefaciens* سویه LBA4404 منتقل گردید (Sambrook & Russell, 2001).

آماده‌سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه

بذور کلزا به روش ارائه شده توسط Moloney et al. (1989) ضدعفونی شده و برای جوانه زدن روی محیط کشت جوانه‌زنی (1X MS, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) قرار داده شدند. بذور کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برگ‌های لپه‌ای گیاهان ۵ روزه که طول دمبرگ آنها حدود ۲ میلی‌متر بود، جدا شدند و پس از حذف جوانه انتهایی دمبرگ‌ها به مدت ۴۸ 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. ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم می‌باشند.

از کشت شبانه آگروباکتریوم ترانسفورم شده (OD_{650}=1) رسوب تهیه شد (با سرعت ۵۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه) سپس باکتری‌های رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. ریزنمونه‌های مورد استفاده شامل برگ‌های لپه‌ای بودند که ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (پیش کشت) بودند. دمبرگ‌های برگ‌های لپه‌ای به مدت ۹۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار داده شدند. این برگ‌های لپه‌ای بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا نسبتاً خشک گردند. سپس در محیط همکشتی (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 سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت ریزنمونه‌ها 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 ۱۵mg/l کانامایسین و ۲۰۰mg/l سفوتاکسیم است، منتقل شدند. ریزنمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. در هفته سوم نوساقه‌های متعددی در سطح فوقانی بعضی از ریزنمونه‌ها به وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه‌های 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 می‌رسد نوساقه‌های زنده مانده، پلاسمید pBI121 (حامل سازه ژنی مورد نظر) را دریافت نموده و تراریخت شده اند.

نوساقه‌های 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 ۲۰۰mg/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 آنتی‌بیوتیک‌های 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 ۴ هفته و پس از مشاهده

ریشه‌های 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 بذرگیری به طور مرتب آبیاری شدند.

استخراج DNA ژنومی گیاه و PCR

DNA ژنومی از برگ گیاه کلزا به روش زیر استخراج گردید: پانصد میلی‌گرم از برگ گیاهان مقاوم به کانامایسین و شاهد پس از انجماد با ازت مایع با استفاده از پودر شیشه در تیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ساییده گردید. سپس یک میلی‌لیتر بافر استخراج TNE (Tris-HCl ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۱۰۰ میلی‌مولار، NaCl ۱۵۰ میلی‌مولار با pH برابر ۸) به پودر اضافه شد و به شدت تکان داده شد. به هموژن حاصل ۶۰ میکرولیتر SDS 20% اضافه گردید و به مدت نیم ساعت بطور ملایم مخلوط گردید. سپس۱۵۰ میکرولیتر کلرید سدیم ۵ مولار و۱۳۰ میکرولیتر CTAB ۱۰ درصد اضافه شد. هموژن حاصله به آرامی مخلوط گردید و ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتیگراد (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 (۲۴:۱) اضافه شده و به آرامی به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. بعد از سانتریفیوژ ۱۵ 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) رسوب‌دهی 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 سانتی‌گراد نگهداری شد.

جهت تکثیر ژن *pgip*1 از آغازگرهای RB1 با جایگاه برش آنزیمی *Xba*I (5′- gct cta gaA TGA CTC AAT TCA ATA TCC CAG-3’) و RB2 با جایگاه برشی *Sac*I (5′- gca cga gct cTT AAG TGC AGG AAG GAA GAG-3’) استفاده گردید. PCR اختصاصی پس از بهینه سازی در مخلوط واکنشی به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۱/۵ میلی‌مولار $Mgcl_2$، ۳۰ نانوگرم DNA الگو، ۰/۳ میکرومولار آغازگر، ۰/۲ میلی‌مولار dNTP، و ۱ واحد آنزیم *Taq*-polymerase و ۲/۵ میکرولیتر بافر (10X) صورت گرفت. سپس واکنش برای ۳۰ دور، شامل دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت، دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه انجام گردید. بعد از اتمام ۳۰ دور، واکنش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز گردید.

ارزیابی مقاومت لاینهای تراریخت در شرایط آزمایشگاهی

به منظور مقایسه مقاومت گیاهان کلزای تراریخت با گیاهان شاهد از روش زیست‌سنجی استفاده گردید. در این روش از مایه‌زنی با دیسک‌های میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* بر روی برگ‌های جداشده از گیاهان مورد مطالعه استفاده گردید. برای این منظور از حاشیه کشت سه روزه کلنی قارچ، دیسک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر برداشته و روی رگبرگ اصلی برگ قرار داده شد. در هر پلیت یک برگ و برای هر گیاه ۳ تکرار در نظر گرفته شد. برگ‌ها پس از تلقیح در دمای اطاق و داخل پلیت حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند تا رطوبت نسبی بالای ۹۰ درصد در اطراف آنها فراهم گردد. بررسی و ثبت علائم نکروز روی برگ‌های تلقیح شده بصورت روزانه صورت گرفت و ارزیابی شدت علائم بیماری با در نظر گرفتن قطر نکروز ایجاد شده ثبت گردید.

نتایج

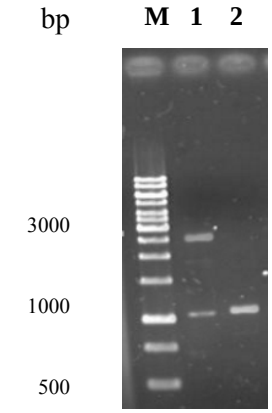
پلاسمید نوترکیب pUCFF2 حاوی ژن *pgip*1، با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد تأئید قرار گرفت. الگوی هضم آنزیمی با استفاده از دو آنزیم *Xba*I/*Sac*I، وجود ژن *pgip*1 را در پلاسمید pUCFF2 مورد تأئید قرار داد (شکل ۱). همچنین الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، حضور این ژن را در پلاسمید pUCFF2 مورد تأئید قرار داد (شکل ۱).

جهت انتقال ژن *pgip*1 به گیاه کلزا، قطعه DNA هضم شده (حاوی ژن *pgip*1) در وکتور بیانی pBI121

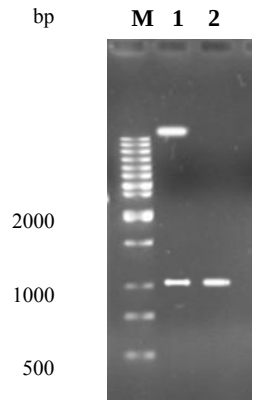
کلون گردید. سازه به دست آمده با استفاده از الگوی هضم آنزیمی و نیز الگوی PCR مورد تأئید قرار گرفت (شکل۲) و به نام pBIAA1 نامگذاری گردید. ژن *pgip*1 در این سازه تحت کنترل پیشبرنده CaMV 35S کلون گردیده است. این سازه دارای ژن *npt*II بوده که به منظور انتخاب گیاهان تراریخت دریافت‌کننده این T-DNA در محیط حاوی کانامایسین نقش ایفا می‌نماید (شکل ۳).

سازه ژنی pBIAA1 به اگروباکتریوم منتقل و پس از تأئید، جهت انتقال به ریزنمونه های کوتیلدونی استفاده گردید. سلولهای زخمی قاعده دمبرگ (به عنوان ریز نمونه) جهت دریافت T-DNA استفاده شد و از آنها گیاهان تراریخت احتمالی به دست آمد (شکل ۴).

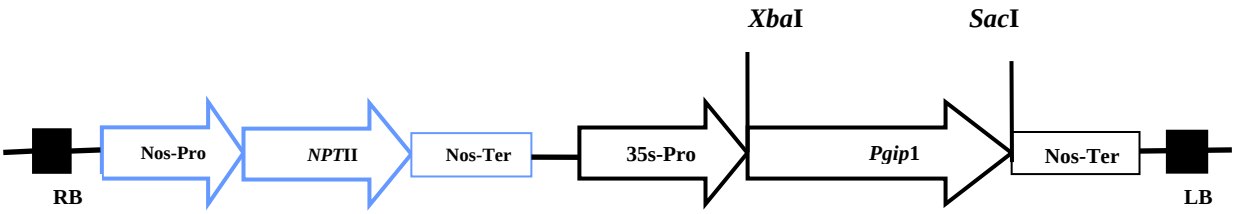
به منظور تأئید تراریختی گیاهان از روش مطالعه الگوی PCR بر روی DNA ژنومی برگ‌های جوان و سبز این گیاهان و گیاه شاهد استفاده گردید. نتایج به دست آمده تراریخت بودن گیاهان کلزا توسط ژن *pgip*1 را تأئید نمود که طی آن قطعه ای حدود Kb ۱ (طول مورد انتظار) تکثیر گردید (شکل ۵). از گیاهان رشد یافته پس از گلدهی و ایجاد غلاف، بذرگیری به عمل آمد.



شکل ۱- تایید پلاسمید pUCFF2 با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی:
۱) pUCFF2 هضم شده با آنزیم‌های *Sac*I و *Xba*I
۲) محصول PCR از پلاسمید نوترکیب pUCFF2 با آغازگرهای RB1 و RB2، M- مارکر DNA

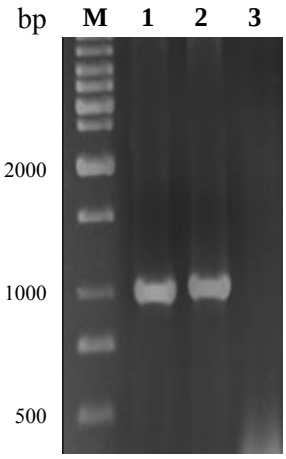


شکل ۲- تایید پلاسمید نوترکیب pBIAA1 حاوی ژن *pgip1* با استفاده از هضم آنزیمی و الگوی PCR:
۱) الگوی هضم آنزیم پلاسمید pBIAA1 نوترکیب با استفاده از *Xba*I/*Sac*I
۲) قطعه تکثیر شده بوسیله آغازگرهای اختصاصی RB1/RB2، M- مارکر DNA



شکل ۳- شکل شماتیک منطقه T-DNA سازه pBIAA1 حاوی ژن *pgip*1:
RB, right border; LB, left border; Nos-pro, nopaline synthase promoter; *NPT*II, neomycin phosphotransferase; Nos-ter, terminator of nopaline synthase; 35s-pro, 35S promoter of cauliflower mosaic virus; *pgip*1, bean polygalacturonase inhibiting protein gene.

شکل ۴- فرآیند انتقال ژن و باززایی گیاه کلزا:
الف) کوتیلدون‌های کشت شده بر روی محیط پیش‌کشت، ب) باززایی نوساقه از کوتیلدون، ج) گیاه تراریخت احتمالی کلزا بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین، د و هـ) سازگاری تدریجی گیاهچه‌های کلزا، و) تشکیل غلاف جهت بذرگیری از گیاه کلزای تراریخت



شکل ۵- محصول واکنش PCE برای اثبات حضور ژن *pgip1* در گیاه کلزا (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی RB1 و RB2) بر روی آگاروز یک درصد:
۱) محصول PCR تکثیر شده از DNA پلاسمید pBIAA1 (کنترل مثبت)
۲) محصول PCR تکثیر شده از گیاه تراریخت احتمالی حاوی ژن *pgip1*
۳) محصول واکنش PCR با استفاده از DNA گیاه کلزای غیر تراریخت (کنترل منفی)،
M- مارکر DNA

روش کیفی زیست‌سنجی با استفاده از قارچ *S. sclerotiorum* به منظور مقایسه مقاومت گیاهان کلزای PCR مثبت با گیاهان شاهد (با تکرارهای متعدد) نشان داد که میزان نکروز ایجاد شده در برگ گیاهان تراریخت نسبت به گیاه شاهد نشان‌دهنده مقاومت بیشتر این گیاهان می‌باشد (شکل ۶). گیاه شماره ۹ بیشترین مقاومت در برابر قارچ بیماریزا را از خود نشان داده، در حالی که میزان نکروز ایجاد شده در گیاه شماره ۵ تفاوت معنی‌داری را با گیاه شاهد نشان نمی‌داد. سایر گیاهان PCR مثبت درجات متفاوتی از مقاومت را نشان می‌دادند.

بحث

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

الف ب ج

شکل ۶- مقایسه میزان نکروز ایجاد شده پس از ۴۸ ساعت تلقیح قارچ *S. scletoriorum* بر روی برگ گیاه کلزا به روش Detached leaf assay: الف) برگ گیاه کلزای تراریخت شماره ۵، ب) برگ گیاه کلزای غیرتراریخت، ج) برگ گیاه کلزای تراریخت شماره ۹ (مشاهدات فوق به عنوان نمونه‌هایی از تکرارهای آزمایش با نتایج مشابه می‌باشد).

ژن مقاومت (*pgip1*) مد نظر بوده است. از آنجا که ارقام پرمحصولی از کلزا که به این بیماری مقاوم باشند در دسترس نمی‌باشد، لذا تنها اقدام جدی که برای کنترل این بیماری در کشور صورت می‌گیرد، استفاده از قارچ‌کش Folicur می‌باشد که علاوه بر تحمیل هزینه زیاد، موجب آلودگی زیست‌محیطی نیز می‌گردد.

در این تحقیق از ژن *pgip1* واریته دانشجوی گیاه لوبیا جهت تراریختی رقم R line Hyola 308 گیاه کلزا استفاده گردید و میزان مقاومت گیاهان تراریخت در برابر قارچ *S. sclerotiorum* مورد مطالعه قرار گرفت. اهمیت ژن *pgip* جهت افزایش مقاومت گیاهان در برابر قارچ‌های بیماریزا در سالهای اخیر توسط محققین مختلفی گزارش شده است. Manfredini et al. (2005) ژن *pgip* لوبیا را به گیاه آرابیدوپسیس و توتون منتقل نموده و نشان دادند که بیان این ژن قادر به ممانعت از فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز قارچ *Botrytis cinera* می‌باشد. همچنین ژن *pgip* گلابی به خرمالو، گوجه فرنگی و انگور منتقل شده و نشان داده شده است که این ژن در محدود کردن کلونیزاسیون قارچ بیماریزا در گیاه نقش ایفاء می‌کند (Aguero et al., 2005; Powell et al., 2000; Tamura et al., 2004). همچنین بیان PGIP سیب در گیاه توتون سبب مهار فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتورونازی قارچ‌های بیماریزا گردیده است (Oelofse et al., 2006).

از آنجا که در محل برش‌های ایجاد شده در انتهای دمبرگ کوتیلدونی (به عنوان ریزنمونه) گیاه کلزا سلولهای مناسبی برای انتقال ژن وجود دارد، لذا در این تحقیق جهت انتقال ژن *pgip1* به گیاه کلزا از برگ‌های کوتیلدونی استفاده گردید. گزارشات متعددی نیز مناسب بودن استفاده از ریزنمونه‌های کوتیلدونی جهت انتقال ژن به گیاه کلزا را نشان می‌دهد (Monoley et al., 1989; Sharma, 1987).

از آنجا که در مطالعات منتشر شده مربوط به نقش ژنهای *pgip* لوبیا در مهار فعالیت آنزیم پلی‌گالاکتوروناز قارچی از پروتئین‌های استخراج شده از این گیاه استفاده گردیده است (DeLorenzo & Ferrari, 2002; Desiderio et al., 1997)، و با در نظر گرفتن اینکه چهار ژن *pgip* در لوبیا گزارش شده است (D'Ovidio et al., 2004). مطالعه و تعیین میزان فعالیت بازدارندگی محصول هر یک از این ژنها بدون انجام فرآیندهای طولانی خالص‌سازی مقدور نمی‌باشد. لذا بیان هریک از ژنهای *pgip* کلون شده در سیستم هترولوگ می‌تواند راه مناسب تری جهت بررسی میزان باز دارندگی اختصاصی هر یک از آنها باشد. در این تحقیق امکان مطالعه نقش ژن *pgip1* به طور اختصاصی در گیاه کلزا فراهم شده است که نشان می‌دهد بیان این ژن می‌تواند میزان توسعه بیماری قارچ *S. sclerotiorum* را در برگ‌های گیاه کلزا مهار نماید.

در این تحقیق نتایج مربوط به بیان ژن *pgip1* در گیاه کلزا نشان داد که گیاه کلزای تراریخت شماره ۹ دارای بیشترین میزان مقاومت و گیاه تراریخت شماره ۵ دارای کمترین میزان مقاومت در مقابل گسترش قارچ

S. sclerotiorum می‌باشند. رشد گیاهان در محیط انتخابی حاوی کانامایسین و شواهد ملکولی نظیر الگوی PCR حضور ژن *pgip*1 را در این گیاهان تأیید نمود. براساس نتایج زیست‌سنجی، میزان مقاومت این گیاهان در برابر *S. sclerotiorum* بسیار متفاوت می‌باشد. از آنجا که هر یک از گیاهان تراریخت به دست آمده به عنوان یک لاین مستقل محسوب می‌گردد که ناشی از ورود تصادفی T-DNA حاوی ژن مورد نظر در ژنوم آن گیاه می‌باشد لذا به نظر می‌رسد که تفاوت میزان مقاومت آنها علیه قارچ استفاده شده می‌تواند ناشی از تفاوت موقعیت قرار گرفتن تراژن در نقاط مختلف ژنوم گیاه باشد. این نکته توسط محقیقن دیگری نیز مورد تأکید قرار گرفته است (Bhall & Smith, 1998; Stem & Kooper, 1997).

مطالعات مربوط به بررسی ایجاد مقاومت در گیاهان به دست آمده در شرایط گلخانه انجام شده است و لازم است این مقاومت در برابر قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط مزرعه ای نیز مورد بررسی قرار گیرد.

REFERENCES

1. Afshari-Azad, H. (2001). *The most important canola diseases*. Nashr-e- Amozesh-e- Keshavazi. Pp. 1-17. (In Farsi).
2. Aguero, C. B., Uratsu, S. L., Greve, C., Powell, A. T. Labavitch, J. M., Meredith, C. P. & Dandekar, A. M. (2005). Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene. *Molecular Plant Pathology*, 6(1), 43-51.
3. Bhalla, P. L. & Smith, N. (1998). *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of cauliflower, *Brassica oleracea* var. *botrytis. Molecular Breeding*, 4, 531-541.
4. D'Ovidio, R., Raiola, A., Capodicasa, C., Devoto, A., Pontiggia, D., Roberti, S., Galletti, R., Conti, E., O'Sullivan, D. & DeLorenzo, G. (2004). Characterization of the Complex Locus of Bean Encoding Polygalacturonase-Inhibiting Proteins Reveals Subfunctionalization for Defense against Fungi and Insects. *Plant Physiology*, 135, 2424–2435.
5. DeLorenzo, G. & Ferrari, S. (2002). Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi, *Curr Opin Plant Biol*, 5, 295–299.
6. DeLorenzo, G., Ovidio, R. D. & Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 39, 313-335.
7. DeLorenzo, G., Cervone, F., Bellicampi, D., Caprari, C., Clark, A. J., Desiderio, A., Devoto, A., Forrest, R., Leckie, F., Nuss, L. & Salvi, G. (1994). Polygalacturonase, PGIP and oligogalacturonides in cell–cell communication. *Biochem Sci Trans*, 22, 396–399.
8. DeLorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D. & Cervone, F. (1997). *Fungal invasion enzymes and their inhibition*. In: Carrol, G. and P. Tudzynski. Eds., *the Mycota. V. Plant Relationships Part B. Springer*, Berlin, pp. 61–83.
9. Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J. S. C., Baulcombe, D. C., Melchers, L. S. , DeLorenzo, G. & Cervone F. (1997). Polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) with different specificities are expressed in Phaseolus vulgaris. *Mol Plant-Microbe Interact*, 10, 852–860.
10. Dixon, M., Jones, D., Keddie, J., Thomas, C., Harison, K. & Jones, J. (1996). The tomato Cf-2 disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeats proteins. *Cell*, 84, 457–459.
11. Fallahi, F. (2006). *Inhibitory activity of PGIP on polygalacturonase of sclerotiorum , isolation and cloning of pgip1 and pgip2 genes from Juls and Daneshjoo bean cultivars*. M.Sc Thesis. Biology Dept., Faculty of Science, Razi Univ., Kermanshah, Iran.
12. Favaron, F., D'ovidio, R., Porceddu, E. & Alghisi, P. (1994). Purification and molecular characterization of a soybean polygalacturonase-inhibiting protein. *Planta*, 195, 80–87.
13. Ferrari, S., Vairo, D., Ausubel, F. M., Cervone, G. & DeLorenzo, G. (2003). Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase- inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *Plant Cell*, 15, 93-106.
14. Hahn, M. G., Buchell, P., Cervone, F., Doares, S. H., O'Neill, R. A., Darvill, A. & Albersheim, P. (1989). *Roles of cell wall constituents in plant pathogen interactions.* In: E. Nester and T. Kosuge, Eds., *Plant–Microbe Interactions*. McGraw-Hill, New York, pp 131–181.
15. Huang, Q. & Allen, C. (2000). Polygalacturonases are required for rapid colonization and full virulence of *Ralstonia solanacereaum* on tomato plants. *Physiol Mol Plant Pathol*, 57, 77–83.
16. Johnston, D. J., Williamson, B. & Mcmillan, G. P. (1994). The interactions in planta of polygalacturonases from Botrytis cinerea with a wall-bound polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP)

in raspberry fruits. *J Exp Bot*, 45, 1837–1843.
17. Kubicek, C. P., Mach, R. L., Peterbauer, C. K. & Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Journal of Plant Pathology*, 83(2), 11-23.
18. Manfredini, C., Sicilia, F., Ferrari, S., Pontiggia, D., Salvi, G., Caprari, C., Lorito, M. & DeLorenzo, G. (2005). Polygalacturonase-inhibiting protein 2 of *Phaseolus vulgaris* inhibits BcPG1, a polygalacturonase of *Botrytis cinerea* important for pathogenicity, and protects transgenic plants from infection. *Physiol Mol Plant Pathol*, 67(2), 108-115.
19. Moloney, M. M., Walker, J. M. & Sharma, K. K. (1989). High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Rep*, 8, 238–242.
20. Motallebi, M., Zamani, M. R. & Hosseinzadeh Colagar, A. (2003). Relationship between polygalacturonase activity and pathogenicity among Iranian isolates of *Ascochyta rabiei*. *J Sci & Technol Agric & Natur Resour*, 6(4),159-169. (In Farsi).
21. Oelofse, D. D., Meyer, I. A., Riaan Arendse, S., Gazendam, I. & Berger, D. K. (2006). Apple polygalacturonase inhibiting protein1 expressed in transgenic tobacco inhibits polygalacturonases from fungal pathogens of apple and the anthracnose pathogen of lupins. *Phytochemistry*, 67(3), 255-263.
22. Powell, A. L., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L. C., Bennett, A. B. & Labavitch, J. M. (2000). Transgenic expression of pear PGIP in tomato limits fungal colonization. *Mol Plant Microb Interact*, 13, pp. 942–950.
23. Salvi, G., Giarrizzo, F., DeLorenzo, G. & Cervone, F. (1990). A polygalacturonase-inhibiting protein in the flowers of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, 136, 513-518.
24. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, NewYork, NY.
25. 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
26. Shanmugam, V. (2004). Role of extracytoplasmic leucine rich repeat proteins in plant defence mechanisms. *J Microbiological Research*, 09-014
27. Sharma, K. K. (1987). *Control of organ differentiation from somatic tissues and pollen embryogenesis in anther culture of B. juncea*. Ph.D. thesis, Department of Botany, University of Delhi
28. Shieh, M. T., Brown, R. L., Whitehead, M. P., Cary, J. W., Cotty, P. J., Cleveland, T. E. & Dean, R. A. (1997). Molecular genetics evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in *cotton balls*. *Appl Environ Microbiol*, 63, 3548–3552.
29. Stam, M. M. & Kooper, J. N. M. (1997). The silence of genes in transgenic plants. *Ann Bot*, 79, 3-12.
30. Tamura, M. G., Tao, R., Labavitch, J. M. & Dandekar, A. M. (2004). Transformation of persimmon with a pear fruit polygalacturonase inhibiting protein (PGIP) gene. *Scientia Horticulturae*, 103, 19-30.
31. ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. & van Kan, J. A. (1998). The endopolygalacturonase gene Bcpg 1 is required for full virulence of Botrytis cinerea. *Mol Plant Microbe Interact*, 11, 1009–1016.
32. Zamani, M. R., Motallebi, M. & Arefpour, M. A. (2000). Comparative study of polygalacturonase activity from different Iranian isolates of *Fusarium oxysporum*. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 31, 293-302. (In Farsi).