تراریختی چغندرقند با ژن *cry1Ab* به کمک آگروباکتریوم و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)

Transformation of *cry1Ab* gene to sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* and development of resistant plants against *Spodoptera littoralis*

مراد جعفری*[۱]، پیمان نوروزی[۲]، محمدعلی ملبوبی[۳]، بهزاد قره‌یاضی[۴]، مصطفی ولیزاده[۵] و سیدابولقاسم محمدی[۶]

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۲ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۱۷

م. جعفری، پ. نوروزی، م. ع. ملبوبی، م. ولیزاده و س. ا. محمدی. ۱۳۸۷. تراریختی چغندرقند با ژن *cry1Ab* به کمک آگروباکتریوم و ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*). **مجله چغندرقند ۲۴(۲): ۵۵- ۳۷.**

چکیده

آفات پروانه‌ای چغندرقند باعث خسارت شدید این محصول در اکثر نواحی زیر کشت دنیا به خصوص در ایران می‌شوند. به‌دلیل محدودبودن منابع ژنتیکی مقاومت به حشرات زیان‌آور و سیستم چندژنی مقاومت به این صفت، تهیه ارقام مقاوم به آفات آن از طریق اصلاح کلاسیک مشکل است. بهبود بیوتکنولوژیکی از طریق انتقال ژن‌های مختلف ازجمله ژن‌های *Bt* می‌تواند یک استراتژی مکمل و جایگزین برای مبارزه با آفات چغندرقند به حساب آید. دو رقم دیپلوئید ۷۲۳۳ و HM1990 جهت تراریختی به کمک *Agrobacterium tumefasiens* سویه GV3101 حاوی پلاسمید pBI35Scry حامل ژن *cry1Ab* 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 *cry1Ab* را در بیش از ۵۰ درصد گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین نشان داد. آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای (dot blotting) درج حداقل یک نسخه از تراژن در ژنوم گیاهان تراریخته را تایید کرد. آنالیز وسترن با استفاده پادتن پلی‌کلونال اختصاصی Cry1Ab، حضور پروتئین هدف با اندازه مورد انتظار ۶۷ kDa را در لاین‌های تراریخته T_0 مورد بررسی نشان داد. بر اساس نتایج حاصل از آزمایش زیست سنجی با استفاده‌از 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، چغندرقند، *Agrobacterium tumefasiens*، ژن *cry1Ab*، *Spodoptera littoralis*

۱- دانش آموخته دکترای دانشگاه تبریز *- نویسنده مسئول m.jafari@urmia.ac.ir
۲- استادیار مؤسسه تحقیقات چغندرقند- کرج
۳-دانشیار مرکز ملی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی
۴- دانشیار پژهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی
۵- استاد دانشگاه تبریز
۶- دانشیار دانشگاه تبریز

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

چغندرقند از مهم‌ترین گیاهان صنعتی در دنیا و ایران بوده و در حدود یک چهارم شکر جهان در مناطق معتدل، جایی که نیشکر کشت نمی‌شود، از آن تولید می‌گردد (Draycott 2006). در ایران نیز چغندرقند با دارا بودن ۵۳/۳۲درصد 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 چغندرقند می‌باشند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به کرم برگ‌خوار چغندرقند (کارادرنیا)، شب‌پره زمستانی (آگروتیس) و بید چغندرقند (لیتا) اشاره کرد که در سراسر کشور به خصوص در مناطق چغندرکاری مشاهده می‌شود (میردریکوند و همکاران ۱۳۷۸) و سهم خسارت ناشی از این آفات در مزارع چغندرقند ایران بین ۲۰ تا ۲۵ درصد برآورد شده است (بی‌نام ۱۳۸۵). بهبود بسیاری از صفات زراعی به دلیل وضعیت بیولوژیکی خاص چغندرقند (دوساله بودن، آلوگامی و خود ناسازگاری) و هم‌چنین بهبود مقاومت به حشرات مضر به دلیل محدود بودن منابع‌ژنتیکی مقاومت به آفات، عدم تنوع ژنتیکی کافی در ژرم‌پلاسم 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 چغندرقند می‌تواند به عنوان راهکاری برای حل این مشکل مورد بررسی قرار گیرد. ژن‌های مختلفی برای ایجاد گیاهان مقاوم چغندرقند به آفات و بیماری‌ها شامل ژن ALS برای مقاومت به علف‌کش کلروسولفورون (D'Halluin et al. 1992)، ژن *bar* برای مقاومت به علف‌کش گلوفسینات 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 تغییریافته 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 چغندرقند (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

Archive of SID

www.SID.ir

ریزومانیا (Mannerlof et al. 1996) و ژن dsRNA ویروسی (Lennefors et al. 2006) برای ایجاد مقاومت به بیماری ریزومانیا به چغندرقند منتقل شده است. گزارش‌های نادری مبنی‌بر استفاده‌از بعضی ژن‌های ایجادکننده مقاومت به حشرات آفت به خصوص ژن‌های Bt (*Bacillus thuringiensis*) در چغندرقند ارائه گردید. فقط یک گزارش در مورد تولید چغندرقند Bt با استفاده از ژن‌های *cry1Ab* و *cry1C* آن هم برای مقاومت به کرم کلم (*Mamestra brassicae*) (Kimoto and Shimamoto 2002) نشر شد و با بررسی های انجام شده از منابع علمی موجود در دسترس، هنوز در دنیا چغندرقند Bt تجاری وجود ندارد.

بهبود ژنتیکی چغندرقند 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 چغندرقند تاکنون تعداد کمی از ژنوتیپ‌ها با موفقیت تراریخت شده‌اند و اکثر ژنوتیپ‌ها نسبت به تراریختی عکس‌العمل مناسبی نداشتند. خوشبتانه تحقیقات بعدی تا حدودی سیستم انتقال ژن در چغندرقند 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 و دخالت دادن عوامل مؤثر در انتقال پایدار T-DNA، ژن سنتتیک *cry1Ab* به کمک آگروباکتریوم به چغندرقند منتقل شود و مقاومت گیاهان تراریخته حاصل در برابر یکی از آفات مهم چغندرقند بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از دو رقم مولتی‌ژرم دیپلوئید چغندرقند 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 چغندرقند 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. پس‌از 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($۱ mg l^{-1}$)، NAA($۰/۵ mg l^{-1}$) و TIBA($۰/۵ mg l^{-1}$) منتقل شدند. جوانه‌های ۱۴-۱۰

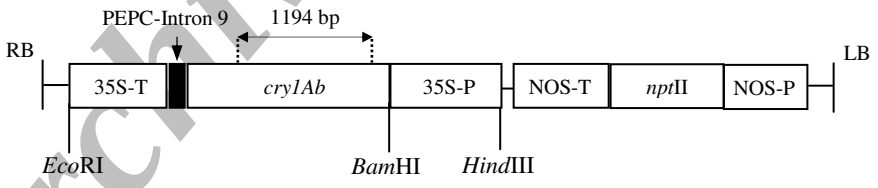
Archive of SID

www.SID.ir

روزه به محیط کشت پایه MS با ترکیبات هورمونی BA($1mgl^{-1}$)، NAA($1mg\ l^{-1}$) و IBA($0/1\ mg\ l^{-1}$) منتقل شدند و جهت القاء جوانه در برگ، برگ‌های جوان تولید شده در محیط کشت MS پایه با ترکیب هورمونی BA($0/25\ mg\ l^{-1}$) و BA($0/1\ mg\ l^{-1}$) قرار گرفتند و جوانه‌های حاصل بر روی برگ از پایه قطع شده و برگ حاوی پایه جوانه به عنوان ریزنمونه در فرآیند تراریختی استفاده گردید.

تهیه سازه

به منظور ساخت سازه حاوی ژن *cry1Ab* ابتدا پلاسمید pCIB4421 (Ciba-Geigy Ltd. Co, Basel, Sz) توسط آنزیم‌های *Eco*RI/*Bam*HI برش داده شد تا قطعه‌ای به طول ۲۱۶۲ bp (شامل ژن *cry1Ab*، قطعه مربوط به Intron 9 ژن PEPC ذرت و توالی پایان دهنده 35S) به‌دست آید. قطعه مزبور در پلاسمید pBI121 (Clontech, Palo Alto, CA, USA) به جایگاه *Eco*RI/*Bam*HI (با حذف ژن GUS) متصل شد و بدین ترتیب سازه جدید pBI35S*cry* حاوی ژن *cry1Ab* تحت پیشبر CaMW 35S، توالی پایان دهنده 35S و ژن گزینش‌گر *nptII* ساخته شد(شکل ۱) و پس از تایید مولکولی، به آگروباکتریوم تومفاسینس سویه GV3101 (Koncz and Schell 1986) به روش‌های مرسوم مولکولی منتقل گردید (Sambrook and and Russell 2001).



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

تلقیح ریزنمونه با آگروباکتریوم، گزینش و باززایی گیاهچه‌ها

آگروباکتریوم سویه GV3101 حامل پلاسمید pBI35S*cry* در ۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع دارای ۷۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپیسین و ۵۰ میلی‌گرم در

Archive of SID

www.SID.ir

لیتر کانامایسین کشت شد و در انکوباتور با دمای ۲۸ °C با تکان ۲۰۰ دور در دقیقه به طور شبانه نگه‌داری گردید تا زمانی که ۱- ۰/۵ =OD_{600} به‌دست آمد. سپس سلول‌های باکتری در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفوژ شد و رسوب باکتری در ۵۰ میلی‌لیتر محیط القاء (شامل محیط پایه MS با نصف غلظت نمک‌ها حاوی ۵۰ میکرومولار استوسرینگان) تعلیق گردید و پس‌از ۵-۳ ساعت ادامه کشت در انکوباتور (با همان شرایط فوق‌الذکر)، از سوسپانسیون باکتری حاصل برای تلقیح بافت‌های گیاهی مختلف استفاده گردید. ریز نمونه‌ها در سوسپانسیون باکتری حاصل با غلظت ۰/۴- ۰/۳ =OD_{600} به مدت ۵ دقیقه تلقیح شده غوطه‌ور شدند و سپس بر روی کاغذصافی استریل جهت حذف باکتری‌های اضافی قرار گرفتند. ریزنمونه های تلقیح شده به محیط کشت توام (شامل MS پایه با نصف غلظت نمک‌ها حاوی ۵۰ میکرومولار استوسرینگان منتقل شدند. پس از کشت توام، ریزنمونه ها در محیط شستشوی (شامل محیط پایه MS حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) شستشو شده و به محیط گزینش (شامل محیط پایه MS با ترکیبات هورمونی BA($mg\ l^{-1}$ ۰/۲۵)، IBA(mgl^{-1} ۰/۱) و ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت شدند. پس‌از یک دوره گزینش ۶۰ روزه، گیاهچه‌های تراریخته احتمالی به محیط ریشه‌زایی (شامل محیط پایه MS با ترکیب هورمونی NAA(mgl^{-1} ۱/۵) و IBA(mgl^{-1} ۱/۵)) و نهایتاً گیاهچه‌های ریشه‌دار شده جهت سازگاری به محیط طبیعی به گلدان انتقال یافتند. تمام نمونه‌های کشت بافتی در اتاقک رشد با دمای ۲۰± ۲ °C و رطوبت ۷۰درصد 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 *cry1Ab* انجام گرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه bp ۱۱۹۴ از ناحیه رمزکننده ژن *cry1Ab* به شرح زیر بودند: آغازگر مستقیم: 5′-GCGGCGAGAGGATCGAGAC-3′، آغازگر معکوس: 5′-TCGGCGGGACGTTGTTGTTC-3′. PCR طبق برنامهٔ یک سیکل ۵ دقیقه ۹۴°C و ۳۵ سیکل (۱ دقیقه ۹۴°C، ۱ دقیقه ۵۸°C، ۱/۲۰ دقیقه ۷۲°C) و۱۰دقیقه ۷۲°C در دستگاه ترموسایکلر Bio-Rad مدل ALS 1296 انجام گرفت. محصول PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز یک‌درصد تفکیک شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه Gel-Doc عکسبرداری شد.

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای (Dot blotting)

در حدود ۱۲ میکروگرم DNA ژنومی برگ گیاهان PCR مثبت به وسیله قراردادن در آب‌جوش و سردکردن فوری بر روی یخ واشرست شد و سپس بر روی غشاء نایلونی لکه‌گذاری گردید. غشاء حاوی نمونه‌های DNA با کاوش‌گر اختصاصی ژن *cry1Ab* به

Archive of SID

www.SID.ir

طول bp ۱۱۹۴ (محصول PCR با آغازگرهای فوق‌الذکر) نشاندار شده با دیگ‌اکسی‌جنین (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 لاین های PCR^+ انجام گرفت.

آنالیز لکه‌گذاری وسترن

پروتئین‌های کل برگ گیاهان تراریخته ۳-۲ 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) ۵/۱۰درصد بارگذاری شد و الکتروفورز با دستگاه Protean II (Bio-Rad) با ولتاژ ۶۰ انجام شد. هم‌چنین از پروتوکسین Cry1Ab (۱۳۲ kDa) با غلظت ۵۰ ng به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد. پس‌از الکتروفورز، پروتئین‌ها به‌وسیله دستگاه wet transblot (Bio-Rad) با ولتاژ ۳۵ در دمای 4^oC به‌طور شبانه (۱۲ ساعت) از ژل بر روی غشای نیتروسلولزی (Bio-Rad) منتقل شدند و تشخیص ایمونولوژیکی پروتئین هدف با استفاده از پادتن اختصاصی Rabbit polyclonal anti-Cry1Ab (Ghareyazie et al. 1997) هدف طبق روش فام (Pham 2003) انجام گرفت.

زیست‌سنجی گیاهان تراریخته نسل اول (T_0)

زیست سنجی گیاهان تراریخته با لارو سن اول (Neonate) کرم برگ‌خوار پرودنیا (*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 اتاقک رشد با شرایط دمایی ۲ ±۲۵ °C، رطوبت ۷۰درصد و تناوب نوری ۱۲ ساعت نور و ۸ ساعت منتقل شدند. آزمایش زیست سنجی ۴ بار تکرار گردید و میزان مرگ و میر و متوسط وزن لاروها پس از ۳ و ۷ روز آلودگی یاداشت‌برداری شد. داده‌های حاصل از زیست‌سنجی در نرم‌افزار SAS تجزیه شد. پس‌از 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 مقایسهٔ میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

بـاززایـی و گـزینـش گیـاهچه‌هـای مقاوم به کانامایسین

محیط کشت القا جوانه با ترکیب هورمونی BA (۰/۱ mg l^{-1}) IBA، (۰/۲۵ mg l^{-1}) به مدت تقریباً سه هفته، شرایط مساعد را برای ایجاد جوانه‌های زیادی در

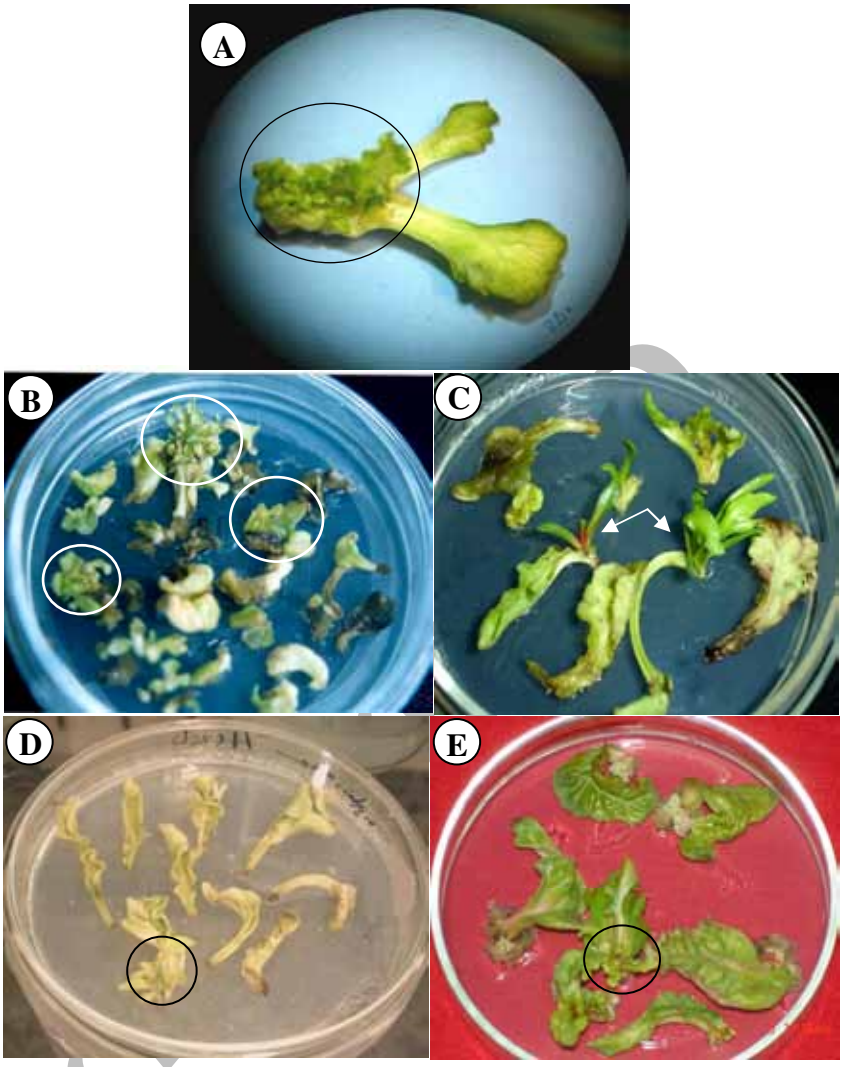
Archive of SID

www.SID.ir

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 چغندرقند 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 استفاده‌از ترکیب هورمونی BA (۱ $mg\ l^{-1}$) و NAA (۱ $mg\ l^{-1}$) در محیط گزینش باعث شیشه‌ای شدن بیشتر جوانه‌ها می‌شود ولی در حضور ترکیب هورمونی BA (۰/۲۵ $mg\ l^{-1}$) و IBA (۰/۱ $mg\ l^{-1}$) 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 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. پس‌از 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 کانامایسن در محیط ریشه‌زایی (محیط پایه MS حاوی ترکیبات هورمونی NAA به میزان ۱/۵ $mg\ l^{-1}$ و IBA به میزان ۱/۵ $mg\ l^{-1}$) به خوبی ریشه‌دار شدند (شکل ۳، C) و عدم ریشه‌زایی که یکی‌از مشکلات مرسوم در گیاهچه‌های تراریخته می‌باشد، خیلی به‌ندرت مشاهده گردید. سازگاری گیاهچه‌های ریشه‌دار به شرایط محیطی غیراستریل با موفقیت انجام گرفت (شکل ۳، D).

Archive of SID

www.SID.ir

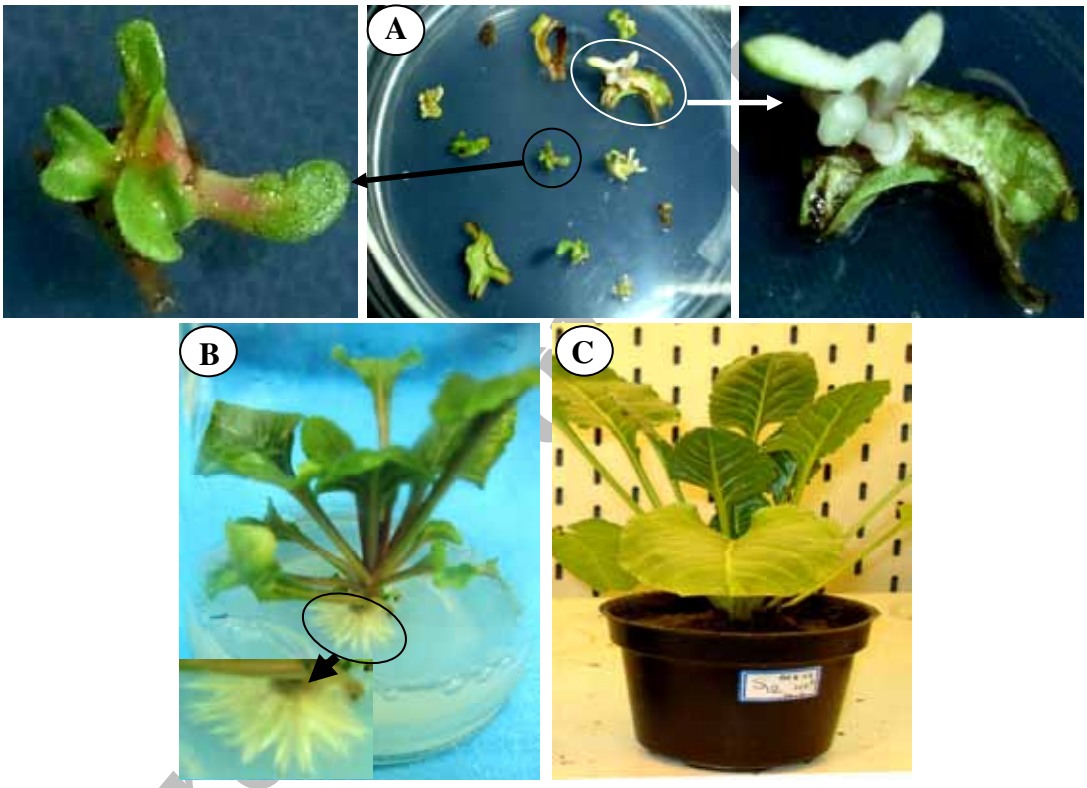


شکل ۲ A: برگ دو شاخه مانند حاوی جوانه‌های القاء شده (داخل کادر سیاه)، B: شیشه‌ای شدن جوانه‌های تولید شده (داخل کادر سفید) در محیط گزینش حاوی ترکیبات هورمونی BA ($1\ mg\ l^{-1}$) و NAA ($1\ mg\ l^{-1}$)، C: ظهور جوانه‌های سبز طبیعی در محیط گزینش حاوی ترکیبات هورمونی BA ($0/25\ mg\ l^{-1}$)، IBA ($0/1\ mg\ l^{-1}$)، 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)

www.SID.ir

جدول۱ کارایی تراریختی جداکشت برگ چغندرقند حاوی پایه جوانه به روش *آگروباکتریوم*

ژنوتیپ	تعداد جداکشت	تعدادجوانهٔ باززایی شده	تعدادگیاهچهٔ Kan^R (٪)	تعداد گیاهچهٔ PCR^+ (٪)	تعداد گیاه Dot^+/PCR^+ (٪)	فراوانی تراریختی† PCR	فراوانی تراریختی† Dot^+
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 احتمالا تراریخته و تصویر سمت راست جوانه غیرتراریخته که در حضور کانامایسین رنگ دانه کلروفیلی خود را از دست داده است (Chlorosis)، B: گیاهچهٔ احتمالا تراریخته ریشه‌دار شده در محیط رشیه زایی، C: گیاه تراریخته سازگار شده به شرایط محیطی غیراستریل

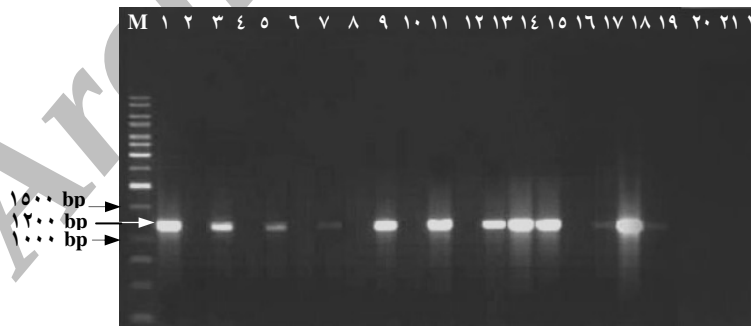
جداکشت مختلفی ازجمله کوتیلدون، هیپوکوتیل، دمبرگ، کالوس جنین‌زا، برگ، پایه جوانه و پروتوپلاست در تراریختی چغندرقند استفاده شده است و اکثرا باززایی گیاه از این جداکشت‌ها به‌طور غیرمستقیم و شامل فاز کالوس بوده است. باززایی غیرمستقیم زمان‌بر و طاقت‌فرسا است و معمولاً فراوانی باززایی کم و با توجه به زیرکشت‌های مختلف تحت ترکیبات محیط کشت مختلف در طول باززایی، باعث ایجاد گیاهان غیرطبیعی ازنظر صفات مورفولوژیکی و ژنتیکی می‌شود (Norouzi et al. 2005; Ivic-Haymes and Smigocki

www.SID.ir

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

آنالیز مولکولی گیاهان تراریخته T_0

آزمون PCR حضور ژن *cry1Ab* را در گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین تایید کرد. گیاهچه‌های تراریخته باندی به اندازه bp ۱۱۹۴ هم اندازه باند تکثیر شده با پلاسمید pBI35Scry حاوی ژن *cry1Ab* به عنوان شاهد مثبت نشان دادند، در حالی‌که گیاه غیرتراریخته هیچ باندی نشان نداد که دلیل بر نداشتن ژن *cry1Ab* در ژنوم آن است (شکل ۴). بیش از ۵۰٪ گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین PCR^+ شده‌اند و میزان گیاهچه‌های PCR^+ در ۷۲۳۳ و ژنوتیپ HM199 به ترتیب ۶۳ و ۳۸درصد بود. لیندسی و گالوئیس (Lindsey and Gallois 1990) با تراریختی پایه جوانه چغندرقند 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 جداکشت غنچه گل حاوی جوانه القاء شده چغندرقند و تحت عامل گزینشی هیگرومایسین، میزان گیاهچه‌های PCR^+ برای ژن انتقالی را بین ۳۸/۷-۱۵/۲ درصد در ژنوتیپ‌های مختلف چغندرقند گزارش کردند که نشان دهنده کارایی بالای استراتژی گزینشی مورد استفاده در این تحقیق می‌باشد.



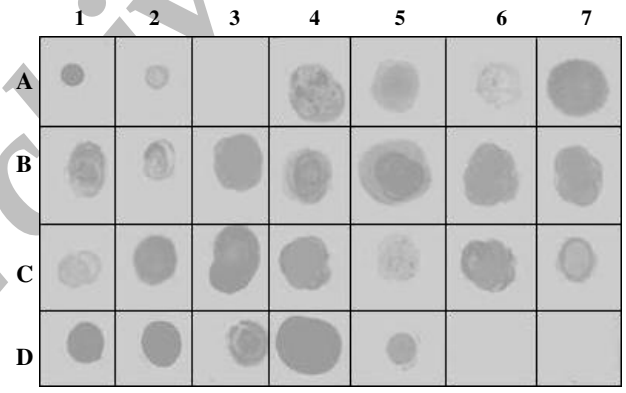
شکل ٤ آنالیز PCR گیاهچه‌های تراریخته احتمالی با ژن *cry1Ab* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S. : نشان‌گر 1 kb DNA ladder (شرکت Fermentas)، چاهک ۱: سازه نوترکیب pBI35S*cry* به عنوان شاهد مثبت، چاهک‌های ۱۴-۲: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از ژنوتیپ ۷۲۳۳، چاهک‌های ۱۹-۱۵: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از ژنوتیپ HM1990، 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

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای گیاهان PCR^+

آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای به عنوان روش سریع و تقریباً آسان برای غربال گیاهان تراریخته اسفاده شد. مقدار کمی DNA با کیفیت خوب (در حدود ۱۰ میکروگرم) از گیاهان PCR^+ (T_0) برای انجام این آنالیز استفاده گردید. براساس نتایج حاصل از این آنالیز (شکل ۵)، نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم (D_7) 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_6) نیز علامتی نداده است که دلیلی بر نداشتن توالی هومولوگ با کاوش‌گر اختصاصی ژن *cry1Ab* در ژنوم و غیر تراریخته بودن آن می‌باشد. نمونه‌های DNA گیاهان PCR^+ $(A_4\text{-}D_5)$ همانند پلاسمیدهای pBI35S*cry* $(A_1\text{-}A_2)$ سیگنال نشان داده‌اند. به عبارتی لکه‌های سیاه نشان دهنده هیبریدشدن کاوش‌گر اختصاصی ژن *cry1Ab* 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^+ شدند و ژنوتیپ ۷۲۳۳ با ۷۵ درصد گیاه dot^+ نسبت به ژنوتیپ HM1990 (۶۰٪) از کارایی تراریختی بالایی برخوردار است. به‌طور کلی کارایی تراریختی در ژنوتیپ ۷۲۳۳، ۲۰درصد و در ژنوتیپ HM1990، ۵درصد برآورد شد که بیان‌گر کارایی بالای تراریختی در روش مورد استفاده و وابسته بودن آن به ژنوتیپ است.



شکل ۵ آنالیز لکه‌گذاری گیاهان PCR^+ با کاوش‌گر اختصاصی ژن *cry1Ab* نشاندار شده با DIG. $A_1\text{-}A_2$: پلاسمید pBI35S*cry* به عنوان شاهد مثبت $A_4\text{-}A_7$ ، $B_1\text{-}B_7$، $C_1\text{-}C_7$، $D_1\text{-}D_2$: گیاهان Dot^+ از ژنوتیپ ۷۲۳۳، $D_3\text{-}D_5$: گیاهان Dot^+ از ژنوتیپ HM1990، D_6: گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی اول، D_7: نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم. لکه‌های سیاه نشان‌دهنده هیبریدشدن کاوش‌گر اختصاصی ژن *cry1Ab* با قطعه هومولوگ خودش در ژنوم گیاهان PCR^+ است.

Archive of SID

www.SID.ir

نوروزی و همکاران (Norouzi et al. 2005) کارایی تراریختی جداکشت برگ به روش آگروباکتری را ۶/۲٪ گزارش نموده‌اند، در حالی که هال و همکاران (Hall et al. 1996) کارایی تراریختی سلول‌های محافظ روزنه‌ای چغندرقند به روش الکتروپوریشن را ۳درصد، اشنایدر و همکاران (Snyder et al. 1999) کارایی تراریختی جداکشت کالوس جنین‌زای حاصل از برگ و کوتیلدون به روش تفنگ ژنی را ۷/۷درصد و آیویک- هیمز و اسمیکوکی (Ivic-Haymes and Smigocki 2005a) کارایی تراریختی جداکشت دیسک برگی کالوس‌زا به روش تفنگ ژنی براساس فعالیت ژن GUS را ۳/۷-۰/۹٪ گزارش کردند. می‌توان نتیجه گرفت که اولا نوع جداکشت و نحوه باززایی (باززایی مستقیم بدون داشتن فاز کالوس) در کارایی تراریختی بسیار مؤثر بوده است. ثانیاً کارایی بالای ترارایختی به‌دست آمده در این تحقیق همانند تحقیقات قبلی در نتیجه استفاده از سیستم تراریختی آگروباکتری می باشد.

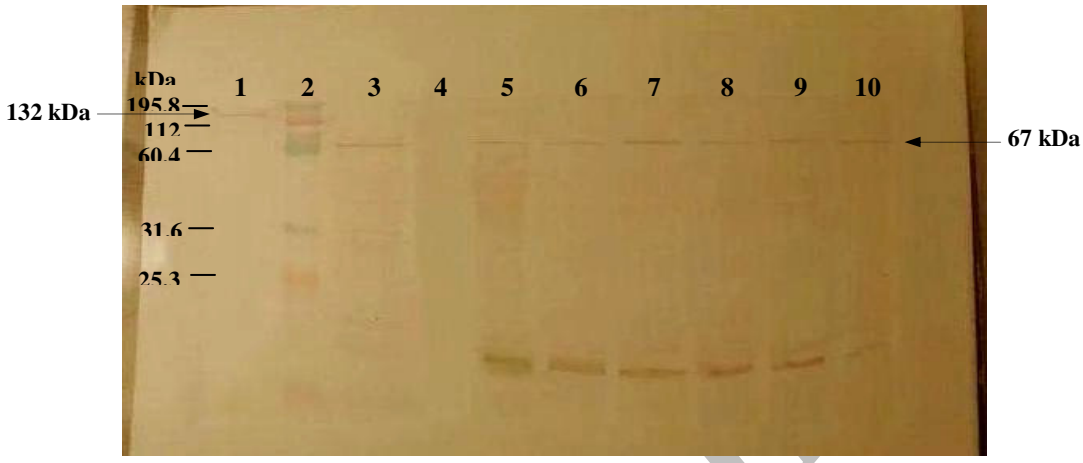
آنالیز بیان ژن *cry1Ab*

شکل ۶ آنالیز لکه‌گذاری وسترن برای گیاهان چغندرقند T_0 مورد بررسی نشان می‌دهد. با توجه به شکل، گیاهان تراریخته همانند گیاه برنج Bt که با همان ژن *cry1Ab* مورد استفاده در این تحقیق تراریخته شده است، نوار مورد انتظار ۶۷ kDa را نشان داده‌اند که همان پروتئین Cry1Ab می‌باشد که بیانگر تلفیق ژن هدف در ژنوم چغندرقند و تظاهر آن در این گیاهان است ولی در گیاه چغندرقند والدی غیرتراریخته مطابق با انتظار نواری مشاهده نشد که دلیلی بر غیرتراریخته بودن آن می‌باشد. با مقایسه شدت نوار مربوط به پروتئین استاندارد(۵۰ ng) با گیاهان تراریخته می‌توان گفت که میزان پروتئین بیان شده حداقل ۱ نانوگرم در هر میگروگرم (۰/۱ ٪) پروتئین‌های کل محلول برگ می‌باشد.

براساس نتایج حاصل‌از آنالیز وسترن، حضور پروتئین Cry1Ab با اندازه مورد انتظار (۶۷ kDa)، تلفیق کامل کاست ژنی (شامل راه‌انداز، ناحیه رمزکننده ژن و توالی پایان‌دهنده) را بار دیگر در لاین‌های 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 می‌تواند در اثر برش توسط پروتئازهای داخلی برگ (ANZFA 2001) یا ناشی‌از تخریب پروتئین Cry1Ab در طول تهیه نمونه پروتئینی (Ghareyazie et al. 1997; Breitler et al. 2004) شد، زیرا پروتئین‌های Bt ازجمله Cry1Ab در برابر عواملی مانند دمای بالا تخریب‌پذیر هستند (Betz et al. 2000). سطح بیان پروتئین Cry1Ab تحت کنترل یک راه‌انداز دائمی (Constitutive promoter) از ۰/۰۰۲٪ (Tu et al. 2000) تا ۰/۵-۰/۴درصد 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).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٦ آنالیز لکه‌گذاری وسترن برای گیاهان چغندرقند T_0 تراریخته با ژن *cry1Ab*. 1: پروتوکسین Cry1Ab (۱۳۲ kDa) با غلظت ۵۰ ng به عنوان پروتئین استاندارد، 2: نشان‌گر پروتئینی Plus protein kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad)، 3: بـرنج Bt تراریخته با ژن *cry1Ab* به عنوان شاهد مثبت، 4: گیاه چغندرقند والدینی غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، 10-5: لاین‌های چغندرقند تراریخـته به ترتیب ۳۵-۷۲۳۳، ۱۷-۷۲۳۳، ۱۵-۷۲۳۳، HM1990-2 و HM1990-3. نوار ۶۷ kDa پروتئین Cry1Ab بیان شده را نشان می‌دهد

آنالیز عملکردی تراژن در گیاهان تراریخته T_0

تعدادی از گیاهان تراریخته T_0 حاوی ژن *cry1Ab* به همراه دو گیاه غیرتراریخته برای بررسی اثر توکسین Cry1Ab و مقاومت بر علیه آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)، یکی از آفت پروانه‌ای مهم مزارع چغندرقند ایران، کشورهای آفریقایی و حاشیه دریای مدیترانه، انتخاب شدند. نتایج حاصل‌از زیست‌سنجی در جدول ۲ آمده است. درصد مرگ و میر لاروها در هفتمین روز آلودگی بر روی گیاهان تراریخته بین ۷۰-۳۷درصد متغییر است و ولی در گیاهان غیرتراریخته تقریبا ۲/۵درصد می‌باشد که بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته از لحاظ آماری تفاوت بسیار معنی‌دار وجود دارد. لاین‌های ۱۸-۷۲۳۳ و ۳۵-۷۲۳۳ با ۳۷درصد و لاین ۱۵-۷۲۳۳ با ۷۰درصد مرگ و میر لاروها دارای پایین‌ترین 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 میلی‌گرم متغییر است و در هفتمین روز آلودگی این میزان به ۴/۴۲-۲/۳۲ میلی‌گرم رسیده است در حالی‌که وزن لاروهای زنده روی برگ گیاهان شاهد پس از هفت روز آلودگی ۱۲/۱۱ میلی‌گرم است که تفاوت بسیار معنی‌دار با وزن لاروهای مربوط به گیاهان تراریخته دارد و این نشان می‌دهد که لاروهای روی گیاهان تراریخته در اثر توکسین Bt و نامناسب بودن غذا و بالاخره عدم ترجیح تغذیه آن نتوانسته‌اند رشد و توسعه سنی پیدا کنند و یا مرده‌اند (شکل ۷، C-۱) و یا

Archive of SID

www.SID.ir

رشد متوقف شده و کم داشته‌اند (شکل ۷، C-۲) ولی لاروهای تغذیه‌کننده از گیاه غیرتراریخته با توجه به مناسب بودن غذای مورد استفاده در حد عالی رشد و توسعه یافته‌اند (شکل ۷، C-۳). میزان خسارت برگی گیاهان شاهد ناشی از تغذیه آفت که به صورت لکه‌های قهوه‌ای فاسد شده و توری مانند نمایان است (شکل ۷، B)، ۳۶ تا ۵۵ درصد پس از سه روز تغذیه آفت می‌باشد که در هفتمین روز به ۱۰۰٪ رسید است در حالی‌که این شاخص در گیاهان تراریخته روند کند داشته است (شکل ۷، A) به طوری که میزان خسارت ۱۲ تا ۲۷ درصد و حداکثر ۵۰درصد که به‌ترتیب پس از ۳ و ۷ روز آلودگی برآورد شده است که از لحاظ آماری با گیاهان غیرتراریخته تفاوت کاملاً معنی‌دار دارد که باز بیان‌گر عدم توانایی رشد، توسعه آفت بر روی برگ گیاهان تراریخته است.

شکل ۷ زیست‌سنجی گیاهان تراریخته T_0 حاوی ژن *cry1Ab* بر علیه آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*). A: برگ گیاه تراریخته B: برگ گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد، C: مقایسه لاروهای زندهٔ 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.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲ آنالیز زیست سنجی گیاهان تراریخته T_0 با آفت پرودنیا (*Spodoptera littoralis*)

لاین	تعداد لارو مرده		وزن لاروهای زنده (mg)		خسارت برگ (٪)		مرگ و میر (٪)
	۳ DAI†	۷ DAI	۳ DAI	۷ DAI	۳ DAI	۷ DAI	۷ DAI
*۷۲۳۳	۰/۰۰±۰/۰۰^{e}	۰/۱۲±۰/۱۰^{d}	۷/۷۱±۰/۰۰^{a}	۱۰/۲۴±۱/۲۲^{a}	۵۵/۰۰±۳/۵۲^{a}	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۲/۳۱±۰/۰۱^{e}
*HM1990	۰/۰۰±۰/۰۰^{e}	۰/۲۵±۰/۰۸^{d}	۱/۹۲±۰/۲۰^{a}	۱۲/۱۱±۰/۳۱^{a}	۳۶/۴۵±۲/۱۱^{b}	۱۰۰/۰۰±۰/۰۰^{a}	۲/۵۲±۰/۴۴^{e}
۷۲۳۳-۱۵	۱/۹±۰/۱۱^{ab}	۴/۹۲±۰/۱۰^{a}	۱/۹۰±۰/۲۵^{bc}	۲/۵±۰/۱۵^{c}	۱۲/۵۴±۰/۱۳^{d}	۳۱/۳۴±۰/۷۰^{e}	۷۰/۰۰±۱/۲^{e}
۷۲۳۳-۱۷	۲/۳۱±۰/۱۱^{a}	۳/۹۱±۰/۲۲^{ab}	۲/۳۰±۰/۲۲^{b}	۲/۶۰±۰/۲۲^{bc}	۲۷/۲۵۱±۱/۴۵^{b}	۲۷/۵۴±۱/۴۰^{e}	۵۵/۷۳±۲/۳۳^{abc}
۷۲۳۳-۱۸	۱/۱۰±۰/۱۲^{cd}	۲/۶۱±۰/۳۰^{c}	۱/۹۲±۰/۴۰^{bc}	۳/۳۳±۰/۱۰^{bc}	۲۰/۱۲±۰/۸۰^{c}	۵۱/۳۴±۱/۳۱^{b}	۳۷/۳۰±۲/۶۰^{d}
۷۲۳۳-۳۵	۱/۲۰±۰/۱۲^{bcd}	۲/۶۳±۰/۳۰^{c}	۲/۳۳±۰/۱۰^{b}	۳/۸۰±۰/۱۱^{bc}	۱۸/۸۴±۰/۷۱^{c}	۴۰/۰۲±۱/۰۰^{d}	۳۷/۰۳±۲/۶۱^{d}
HM1990-2	۱/۴۱±۰/۲۱^{bcd}	۲/۸۴±۰/۲۰^{bc}	۲/۲۴±۰/۴۰^{b}	۴/۴۲±۰/۴۳^{b}	۲۰/۱۰±۱/۲۴^{c}	۵۳/۴۸۲±۳/۸۴^{b}	۴۰/۰۳۰±۱/۳۲^{cd}
HM1990-3	۱/۸۳±۰/۲۰^{ab}	۴/۳۱±۰/۲۰^{a}	۱/۸۳±۰/۱۰^{bc}	۲/۳۲±۰/۱۳^{c}	۲۰/۰۰±۰/۲۱^{c}	۴۸/۸۳±۲/۴۰^{c}	۶۱/۵۳±۲/۳۴^{ab}

* 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.

به طور کلی لاین‌های تراریخته حاصل در مقایسه با گیاهان شاهد در برابر آفت پرودنیا مقاومت مناسبی نشان دادند، اگر چه مقاومت ۱۰۰درصد در این گیاهان مشاهده نگردید که ممکن است به دلیل سطح ناکافی پروتئین Cry1Ab 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 ناشی‌از 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 فیزولوژیکی 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 پلاسم، به نظر می‌رسد تولید چغند قند Bt استراتژی مناسبی برای کنترل آفات آن و بهبود مدیریت تلفیقی آفات باشد. این تحقیق موفق به تولید گیاهان چغندرقند تراریخته حاوی ژن *cry1Ab* از هر دو نوع ژنوتیپ ۷۲۳۳ و HM1990 شد. نتایج زیست‌سنجی با یکی‌از آفات پروانه‌ای مهم مزارع چغندرقند (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_0 علاوه بر خودگشنی با گیاهان کلونی خود، با یک لاین نرعقیم ژنتیکی تلاقی داده شدند.

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

Archive of SID

www.SID.ir

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 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.

منابع مورد استفاده: **References:**

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 (چغندرقند و نیشکر) در سال‌های ۱۳۸۴-۱۳۶۷. وزارت جهاد کـشاورزی، 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

Archive of SID

www.SID.ir

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 δ-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, Kananzawa A, ShimamatoY (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

Archive of SID

www.SID.ir

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, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuvesson 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, Tuvesson S, Steen P, Tenning P (1997) Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. Euphytica, 94: 83-91

Archive of SID

www.SID.ir

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. Biotechn., 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* δ-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

Archive of SID

www.SID.ir