چهارمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
کرمان مردادماه ۱۳۸٤
The 4th National Biotechnology congress
Islamic Republic of Iran
Kerman august 2005
مرکز بین المللی علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی
International Center For Science & high Technology and Environmental Sciences

تولید گیاهان بدون گلبرگ آرابیدوپسیس با خاموش نمودن ژن (*PISTILLATA*(*PI*) از طریق RNAi

علي محمد شكيب، علي رضا سيفي، مهناز عروجلو، مانا احمد راجي
پژوهشكده بيوتكنولوژي كشاورزي ايران. بلوار شهيد فهميده، قبل از ترمينال شهيد كلانتري كرج
فاكس ۲۷۰۳۵۳۶ e-mail: amshakib@lycos.com

چكيده
تكنيك RNAi روش جديد و كارآيي است براي خاموش نمودن ژن كه در سال هاي اخير مورد توجه زيادي قرار گرفته است. در اين آزمايش ژن *PISTILLATA*(*PI*) كه در كنترل تشكيل و نمو گلبرگ دخالت دارد با استفاده از تكنيك RNAi خاموش گرديد. براي اين منظور قطعه ۲۰۹ جفت بازي از ژن *PI* از طريق RT-PCR تكثير و روي ناقل مناسب در جهت سنس- آنتي سنس براي توليد RNA دو رشته اي كلون گرديد. سازه مولكولي سپس از طريق آگروباكتريوم به گياهان آرابيدوپسيس منتقل شد كه موجب خاموشي ژن *PI* و بروز فنوتيپ بدون گلبرگ در گياهان تراريخته شد.

مقدمه
بيماري پوسيدگي اسكلروتينيايي ساقه (Sclerotinia Stem Rot) كه در اثر قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ايجاد مي شود مشكل اساسي كلزا در بيشتر نقاط دنيا است. شدت بيماري در شرايط آب و هوايي گرم و مرطوب شمال كشوركه مصادف با زمان گلدهي كلزا مي باشد بيشترين شدت را دارد (۳) ، و لذا خسارت قابل توجهي به كشت و كار كلزا در اين مناطق وارد مي آورد(۱). از آنجايي كه ارقام مقاوم وجود ندارد مبارزه با اين بيماري از طريق رعايت تناوب چند ساله و استفاده از قارچ كشها توصيه گرديده است كه خود مشكلاتي به همراه دارند. وجود گلبرگ در شيوع بيماري بسيار مهم است چرا كه جوانه زدن اسپور هاي قارچ روي گلبرگ هاي كلزا شروع و سپس به برگ ها و ساقه ها (نقاط حمله قارچ به ميزبان) منتقل مي شود(۴). بنابراين توليد واريته هاي بدون گلبرگ كلزا مي تواند از خسارت هاي ناشي از بيماري پوسيدگي اسكلروتينيايي ساقه جلوگيري نمايد. حذف گلبرگ ها همچنين مي تواند باعث بالا رفتن كارايي فتوسنتز و افزايش عملكرد شود(۶،۲). تشكيل و رشد اعضاي گل توسط ژن هاي خانواده MADS-box كه فاكتورهاي نسخه برداري را كد مي كنندكنترل مي شود(۷). از بين اين ژنها، ژن (*PISTILLATA*(*PI*) تشكيل گلبرگ را كنترل مي كند. مطابق مدل ژنتيكي ABC مي توان پيش بيني نمود خاموش نمودن ژن *PI* باعث ايجاد فنوتيپ بدون گلبرگي نمايد. خاموش نمودن ژن از طريق RNAi روش جديد و كارآيي است كه در سال هاي اخير مورد توجه زيادي قرار گرفته است. هدف از اين مطالعه بررسي امكان حذف گلبرگ گياه مدل آرابيدوپسيس از طريق تكنيك RNAi بوده است.

مواد و روش ها
از گياهان آرابيدوپسيس اكوتيپ كلمبيا در مرحله گلدهي RNA استخراج شده و سپسmRNA از آن جدا شد. ۱۰۰ نانوگرم از mRNA بعنوان الگو براي ساخت cDNA مورد استفاده قرار گرفت. cDNA ساخته شده به عنوان الگو براي واكنش PCR با استفاده از آغاز گر هاي اختصاصي ژن *PI* استفاده شد. نيمي از محصول تكثير شده همراه با ناقل با آنزيم هاي *Asc*I و سپس *Swa*I هضم شده و پس از الكتروفورز از ژل تخليص شد. قطعه تكثير شده روي ناقل در جهت سنس الحاق شد. نيم ديگر محصول PCR و نيز كلون سنس مرحله قبل با آنزيم هاي *Pac*I و *Spe*I هضم شده و پس از خالص سازي به هم ديگر الحاق شدند تا سازه نهايي سنس- آنتي سنس ژن *PI* بدست آيد. سازه ساخته شده به كمك آگروباكتري به و به روش floral dip به گياهان آرابيدوپسيس منتقل گرديد. بذور حاصل از گياهان تيمار شده در پايان دوره رشد برداشت و كشت گرديدند. گياهان رشد يافته با محلول حاوي فسفينوتريسين بعنوان عامل گزينش تيمار شدند. گياهان تراريخته مقاوم در ادامه رشد مورد ارزيابي هاي فنوتيپي قرار گرفتند.

نتايج و بحث
با استفاده از پرايمرهاي اختصاصي و به كمك RT-PCR قطعه ۲۰۹ جفت بازي از ژن *PI* تكثير و روي ناقل مناسب در جهت سنس و آنتي سنس مناسب براي توليد RNA دو رشته اي كلون گرديد. پلاسميد نوتركيب ساخته شده توسط روش آگروباكتريوم به گياهان آرابيدوپسيس منتقل شد. گياهان تراريخته با استفاده از ماده علف كش فسفينوتريسين گزينش گرديدند. گل هاي توليد شده توسط گياهان تراريخته در مقايسه با گياهان شاهد فاقد گلبرگ بودند و در ادامه رشد توليد ميوه و بذر نمودند. رشد و نمو ميوه و دانه عادي و مانند گياهان شاهد بود. نتايج اين تحقيق نشان داد كه با استفاده از قطعه كوچكي از ژن *PI* مي توان آنرا از طريق RNA دو رشته اي خاموش كرده و از تشكيل و رشد گلبرگ جلوگيري نمود. توليد RNA دو رشته اي مي تواند در يك فرايند دقيق و بطور اختصاصي بيان ژن هدف را تحت تاثير قرار داده و ازآن جلوگيري نمايد. با توجه به خويشاوندي بين كلزا وآرابيدوپسيس انتظار مي رود كه انتقال اين ژن به كلزا نيز توليد فنوتيپ

بدون گلبرگ نماید که در این صورت بکار گیري گیاهان داراي این صفت مي تواند مانع از خسارت بیماري اسکلروتینیا گردد . انتقال سازه حاوي *PI* به کلزا در دست اقدام است.

منابع مورد استفاده:

۱- رودي، د. رحمانپور، س. جاویدفر، ف. ۱۳۸۲ . زراعت کلزا. مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر.

2- Becker, H C, Loptien, H and Robbelen, G 1999. Breeding: an overview. In: C. Gómez-Campo C (ed). Biology of *Brassica* Coenospecies. Elsevier, Amsterdam. pp: 413-447

3- Jamaux D l, Gelie B, and lamarque C, 1994. Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. Plant Phatology (Oxford) 44: 22-30.

4- Larmarque C, 1983. Conditions climatiques qui favorisent le processus naturel de la contamination du colza par le *Sclerotinia sclerotiorum*. Proc. 6th international Congress Paris France. 957-962.

5- Lefol C, and Morrall, R A A 1996. Immunofluorescent staining of sclerotinia ascospores on canola petals. Canadian Journal of plant path. 18: 237-241.

6- Pierre, J, Pierre, J S, Marilleau R, Pham- Delegue M H, Tanguy X and Renard, M 1996. Influence of the apetalous character in rape (*Brassica napus*) on foraging behaviour of honeybees (Apis mellifera). Plant Breed. 115: 484-487.

7- Riechmann, J L, and Meyerowitz, E M 1997. MADS box proteins in plant development. Biological Chemistry 378, 1079-1101.