

تراریزش گوجه‌فرنگی با استفاده از ناقل نوترکیب حاوی ژن‌های *PR1*،

کیتیناز و گلوکاناز

البرز رئوفی^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، محمود سلوکی^۳، مطهره محسن‌پور^۴، سمیه نجفی^۵،
بهناز دولت‌آبادی^۶، علی رنجبر^۷

۱ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار بیوتکنولوژی دانشگاه زابل

۲ و ۴- به ترتیب دانشیار و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۵- کارشناس ارشد دانشگاه تبریز

۶ و ۷- به ترتیب دانشجوی کارشناس ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹- تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین گیاهان باغی می‌باشد که به طور وسیعی در سراسر دنیا کشت می‌شود. هر ساله بیماری‌های قارچی از جمله فوزاریوم خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کنند. در این پژوهش به منظور تقویت سیستم دفاعی گوجه‌فرنگی، ژن‌های *PR1*، کیتیناز و گلوکاناز را به صورت هم‌زمان به گیاه مذکور انتقال دادیم. به این منظور، ابتدا ژن *PR1* از ژنوم گیاه توتون استخراج شد و تحت کنترل پیش‌ر 35S و پایان‌ر Nos در ناقل نوترکیب pBI121 همسانه‌سازی شد. ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نیز تحت پیش‌برهای مستقل 35S و پایان‌ر Nos در ناقل مذکور و در مجاورت ژن *PR1* همسانه‌سازی شدند. سپس با استفاده از روش اگروباکتریوم تراریزش ریزنمونه‌های گیاه گوجه‌فرنگی توسط ناقل نوترکیب pBI121-PRP-1ChiGlu(-)، حاوی سه ژن *PR1*، کیتیناز و گلوکاناز، انجام گرفت. به این منظور، ابتدا ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای پس از قرارگیری بر روی محیط پیش‌کشت، به وسیله سویه LBA4404 اگروباکتریوم حاوی ناقل مورد نظر تلقیح شدند. ریزنمونه‌های حاصل به محیط هم‌کشتی و پس از آن به محیط کشت باززایی انتقال یافتند. ریزنمونه‌ها هر هفت روز یک بار واکشت شده و پس از گذشت چهار هفته به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین انتقال یافتند. آنالیزهای مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرآز و لکه‌گذاری نقطه‌ای نشان دادند که گیاهان تراریخته حداقل یک نسخه از ژن‌های مورد نظر را در ژنوم خود، دریافت نموده‌اند.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
پروتئین‌های بیماری‌زایی،
تراریزش،
سازه‌ی نوترکیب،
گوجه‌فرنگی تراریخته،
همسانه‌سازی ژن.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicum esculentum* یک محصول باغی است که مصارف گوناگونی دارد. هر ساله میزان بسیار زیادی از این محصول به واسطه بیماری‌هایی از جمله لکه-موجی گوجه‌فرنگی^۱، آنتراکنوز گوجه‌فرنگی^۲، لکه برگ و کلادوسپوریوز^۳، ورتیسیلیوز گوجه‌فرنگی^۴، سپتوریوز گوجه-فرنگی^۵، پوسیدگی طوقه^۶، لکه سیاه برگ^۷ و پوسیدگی نرم^۸ از بین می‌رود (Agrios 2005). با توجه به این‌که برنامه‌های اصلاح سنتی جهت تولید گیاهان مقاوم به قارچ، زمان‌بر و طولانی می‌باشند و به‌ندرت می‌توانند با تکامل سریع عوامل بیماری‌زا همگام باشند، کشاورزان ناچار به استفاده از سموم شیمیایی می‌باشند که پرهزینه بوده، به شدت باعث آلودگی محیط زیست شده و در اثر تکامل عوامل بیماری‌زا روز به روز کم اثرتر می‌گردند. مهندسی ژنتیک توانسته است مشکلات مذکور را تا حد زیادی برطرف نماید. در بین راه‌کارهای متنوع ایجاد مقاومت، تقویت سیستم دفاعی گیاه میزبان به وسیله دست‌کاری ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر، اکثر راهبردها برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی، روی معرفی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضد میکروبی مرتبط با بیماری‌زایی (PR^۹) و یا سایر پروتئین‌های ضد میکروبی متمرکز شده است که فعالیت بیولوژیکی آن‌ها تا کنون نامعلوم باقی مانده است (Van Loon et al. 2006). ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR)، ژن‌هایی هستند که بیان آن‌ها سبب القای پاسخ فوق حساسیت به بسیاری از آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی می‌گردد (Edreva 2005). پس از کشف این پروتئین‌ها در برگ‌های توتون و در پاسخ فوق حساسیت به ویروس موزائیک توتون (TMV^{۱۰}) در سال ۱۹۷۰ مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند (Datta and

Muthukrishnan 1999). پروتئین‌های نوع PR مولکول‌هایی سبک با وزن مولکولی ۶ تا ۲۳ کیلودالتون می‌باشند که در pH کمتر از ۳ قابل استخراج و پایدار هستند، مقاومت دمایی داشته و در مقابل پروتئازها مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند (Van Loon et al. 1999). این پروتئین‌ها دارای دو موقعیت مکانی واکوئلی و آپوپلاستیک می‌باشند که معمولاً ذخیره‌سازی در فضای آپوپلاستی صورت می‌گیرد (Van Loon et al. 1999). PR1، بیشترین میزان را در میان سایر پروتئین‌های خانواده PR به خود اختصاص داده است به طوری‌که میزان آن در گیاهان آلوده به ده هزار برابر حالت طبیعی می‌رسد و در این حالت یک تا دو درصد کل پروتئین‌های برگ را شامل می‌شود. بنابراین بیان ژن‌های PR1 می‌تواند القا کننده فعالیت سیستم دفاعی گیاه باشد (Datta and Muthukrishnan 1999). خانواده PR1 به شدت محافظت شده و تقریباً در تمامی گونه‌های گیاهی مورد مطالعه، مشاهده شده است و ساختار پروتئین‌های این خانواده در تمامی گونه‌های گیاهی یکسان می‌باشد (Cornelissen et al. 1987). این موضوع اهمیت ساختار و در نهایت عملکرد وابسته به این ساختار را در گونه‌های گیاهی نشان می‌دهد. در شرایط آزمایشگاهی، PR-1c سبب کاهش جوانه‌زنی اسپور و طول لوله تندش قارچ *Phytophthora infestans* شد و در شرایط طبیعی باعث کاهش سطح آلودگی حاصل از قارچ آلامیست گردید (Van Loon et al. 2006). خاموشی ژن PR1 در جو سبب شد تا قارچ‌های *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* به میزان بسیار بیشتری در دیواره سلولی میزبان نفوذ نمایند (Schultheiss et al. 2003). توتون‌های تراریخت دریافت کننده ژن PR1 تحت پیشبر دایمی، مقاومت معنی‌داری در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *Peronospora tabacina* و *Phytophthora parasitica* واریته *nicotinae* نشان دادند (Sarowar et al. 2005). با وجود مطالعات زیاد انجام شده بر روی پروتئین‌های PR1 هنوز نقش بیوشیمیایی خاصی برای هیچ یک از انواع آن‌ها به اثبات نرسیده است اما نقش ضد قارچی این خانواده در سیستم دفاعی گیاه تا حد بسیار زیادی پذیرفته شده است (Sels et al. 2008; Gianinazzi et al. 1997). از این خانواده، دو ژن اسیدی و بازی در گیاه توتون وجود دارد که در نقطه ایزوالکتریک با یکدیگر متفاوت هستند. از

¹ *Alternaria solani*

² *Gloesporium lycopersiti*

³ *Cladosporium fulvum*

⁴ *Verticillium albo-atrum*

⁵ *Septoria lycoper*

⁶ *Diplodina lycopersici*

⁷ *Phytophthora parasitica*

⁸ *Rhizopus nigricans*

⁹ Pathogenesis related

¹⁰ Tobacco Mosaic Virus

حضور آن‌ها با استفاده از تجزیه مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و لکه‌گذاری دی‌ان‌ای بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از باکتری اشریشیا کلی^۱ سویه XLI-Blue (Cinna Gen B16-50c) و پلاسمیدهای pGEM®-7Zf(-) و pGEM®-T (Clontech, Washington, DC) pBI121 (Promega) Easy pBI121- و pGEM-Chi (-HindIII) نیز پلاسمیدهای نو ترکیب (ChiGlu⁽⁺⁾) (Mohsenpour et al. 2008) استفاده گردید. استخراج پلاسمید و واکنش هضم، واکنش اتصال^۲ و فسفرزایی طبق دستورالعمل‌های Sambrook and Russel (2000) انجام شد. خالص‌سازی قطعات دی‌ان‌ای از روی ژل آگارز با استفاده از کیت خالص‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با خلوص بالا^۳ انجام شد. ساخت سازه‌های pBI121 PRP-1- ChiGlu(-) و pBI121 PRP-1- ChiGlu(+) ابتدا طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار الیگوتک^۴ برای ژن PRP-1 انجام شد و پس از آن جداسازی ژن مذکور با استفاده از دی‌ان‌ای ژنومی توتون به عنوان الگو و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفت. تایید درست بودن ژن جداسازی شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز داخلی^۵ تایید و سپس در داخل ناقل Easy pGEM-T (Promega) همسانه‌سازی شد. PRP-1 پس از برش از ناقل pGEM-T توسط آنزیم برشی EcoRI، در ناقل حد واسط pGEM-Chi (-HindIII) که قبلاً جایگاه HindIII موجود در ناحیه مکان‌های برشی چندگانه آن حذف شده بود (Mohsenpour et al. 2008)، همسانه‌سازی شد و پس از تایید جهت قرارگیری ژن توسط آغازگرهای رو به جلوی M₁₃ و رو به عقب اختصاصی ژن مذکور، توسط آنزیم‌های برشی XbaI و SacI از این ناقل خارج شد و با خروج ژن gus در اثر هضم آنزیمی ناقل pBI121 با دو آنزیم نامبرده، قطعه مورد نظر تحت پیشبر 35S و پایانبر Nos در این ناقل همسانه‌سازی مجدد شد. در مرحله بعد ژن‌های کیتیناز و

دیگر پروتئین‌های این خانواده می‌توان به PR2 و PR3 اشاره نمود. خانواده PR2 با نام بتا-۳-گلوکاناز، قادر است بتا-۳-گلوکان‌ها را با اتصال به آن‌ها تجزیه نماید (Coling et al. 1993). پروتئین‌های PR3 گروهی از اندوکیترینازها می‌باشند که پیوند بتا-۴-بین N-استیل گلوکزآمین‌های کیتین را هیدرولیز نموده و الیگوساکاریدهای موجود در دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها را آزاد می‌کنند. کیتین در دیواره سلول‌های گیاهی وجود ندارد اما در دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها و کوتیکول حشرات وجود دارد (Sela-Buurlage et al. 1993). عملکرد ضد قارچی این دو پروتئین به وسیله آزمایشات بسیار زیادی مورد تایید قرار گرفته است. به عنوان مثال قرارگیری ژن کیتیناز لوبیا تحت کنترل پیشبر 35S، رشد قارچ رایزوکتونیا سولانی را به میزان بسیار زیادی در گیاه توتون تراویخت محدود نماید (Broglie et al. 1991). آزمایشاتی که در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌اند نشان دادند که حضور دو آنزیم برای فعالیت ضد قارچی آنها نیاز می‌باشد (Punja and Zhang 1993). تأثیر هضم‌کنندگی آنزیم ایزوفرم اول بتا گلوکاناز توتون بر روی رشد قارچ فوزاریوم در حضور پروتئین کیتیناز به شدت افزایش نشان داد (Datta and Muthukrishnan 1999). گیاهان گوجه‌فرنگی تراویخت که ژن‌های خارجی PR2 و PR3 را بیان می‌کردند، سبب کاهش حساسیت گیاه میزبان نسبت به عامل بیماری‌زای قارچی *Fusarium oxysporum* جدایه *lycopersici* شدند در حالی که بیان هر یک از ژن‌ها به تنهایی تأثیری در افزایش مقاومت نداشت (Jongedijk et al. 1995; Coling et al. 1993). طی آزمایش‌هایی که روی توتون تراویخته حاوی دو ژن کیتیناز و گلوکاناز، تحت کنترل پیشبر CaMV35S انجام شد، مشخص گردید که رشد قارچ *Cercospora nicotianae* در مقایسه با حالتی که ژن‌ها به طور جداگانه به کار رفتند به طور معنی‌داری کاهش یافت (Jach et al. 1995). با توجه به موارد ذکر شده، پیش‌بینی می‌شود که قرارگیری سه ژن یاد شده تحت پیشبرهای مستقل دایمی (به عنوان مثال 35S) می‌تواند مقاومت زیادی را در برابر طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا ایجاد نماید. هدف از این تحقیق انتقال هم‌زمان سه ژن یاد شده تحت پیشبرهای مستقل به گیاه گوجه‌فرنگی و بررسی

¹ *Escherichia coli*

² Ligation

³ High Pure Pcr Purification Kit (Roche)

⁴ Oligotech

⁵ Nested PCR

تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی ۹۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. پس از چهار هفته، زمانی که طول گیاهچه‌های باززا شده به ۳-۲ سانتی‌متر رسید، جهت ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زایی (RTM^۵) (جدول ۱) منتقل شدند.

تجزیه مولکولی

برای استخراج دی‌ان‌ای از برگ‌های حاصل از گیاهچه‌های گوجه فرنگی از روش (2005) Edreva استفاده شد. به منظور اثبات تلفیق ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم دی‌ان‌ای پلیمرز، ۲۵ نانوگرم دی‌ان‌ای، ۴۰ نانوگرم از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های کیتیناز (F- 5'GAGTGGTGTGGATGCTGTTG3' و R- 5'GCCATAACCGACTCCAAGCA3')، گلوکاناز (F- 5'GAACATCAAGTACATCGCCG3' و R- 5'GCTACACGTACTAGAACTGG3') و PRP-1 (F- 5'CTCAGCTATATTCTTCCC3' و R- 5'GCACTCATTAGACATCAG3')، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر MgCl₂ (۲۵ میلی مولار) و ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X انجام گرفت. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز روی ژل آگارز یک درصد، الکتروفورز شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، توسط دستگاه عکس برداری از ژل، ثبت گردید. همچنین برای تایید مجدد ژن تلفیق شده، آزمون لکه گذاری دی‌ان‌ای براساس روش (Sambrook and Russel 2000) انجام شد.

نتایج و بحث

ساخت سازه‌های pBI121 PRP- و pBI121 PRP-1- ChiGlu(-) 1- ChiGlu(+) صحت جداسازی ژن مورد نظر با مشاهده قطعه ۵۸۸ جفت بازی مربوط به ژن PRP-1 و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز داخلی و در نهایت توالی‌یابی قطعه جداسازی شده تأیید شد. حضور ژن

گلوکاناز با استفاده از آنزیم‌های BamHI و HindIII از ناقل pBI121-ChiGlu جداسازی و در مجاورت ژن PRP-1 قرار گرفتند. جهت‌گیری متفاوت قطعه حاوی ژن‌های مذکور سبب ایجاد دو ناقل نو ترکیب (+) pBI121 PRP-1 ChiGlu و (-) pBI121 PRP-1 ChiGlu شد که در این پروژه از ناقل نو ترکیب (-) pBI121 PRP-1 ChiGlu با جهت‌گیری مخالف ژن-های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به PRP-1 جهت تراریزش گیاه گوجه فرنگی استفاده شد.

تراریزش گیاه گوجه فرنگی با استفاده از ناقل pBI121 PRP-1 ChiGlu(-) بذره‌های گوجه فرنگی با قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه و کلرین فعال به مدت ۷ دقیقه ضدعفونی شدند. بذره‌های ضدعفونی شده به مدت ۸ روز بر روی محیط کشت جوانه‌زنی (GM^۱) (جدول ۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد و رطوبت ۷۰ درصد و در دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی ۹۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه قرار داده شدند. برگ‌های لپه‌ای و محورهای زیر لپه رشد یافته در شرایط ضدعفونی جداسازی شده و بر روی محیط پیش‌کشت (PM^۲) (جدول ۱) قرار گرفتند و در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ روزه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Cortina and Culianez-Macia 2004). سویه LBA4404 اگروباکتریوم حاوی پلاسمید نو ترکیب (-) pBI121 PRP-1 ChiGlu، در محیط مایع رشد داده شد و پس از آن‌که غلظت نوری آن به ۰/۶ تا ۰/۸ رسید، ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی از روی محیط پیش‌کشت (جدول ۱) در داخل سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از آن ۲۰۰ ریزنمونه برگ لپه‌ای به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بر روی محیط هم‌کشتی (CM^۳) (جدول ۱) قرار گرفتند. سپس قطعات برگ لپه‌ای در محیط حاوی MS، ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شسته شده و پس از خشک شدن به محیط ساقه‌زایی (RM^۴) (جدول ۱) منتقل شدند. ریزنمونه‌های حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۷۰ درصد رطوبت و دوره نوری ۸ ساعت

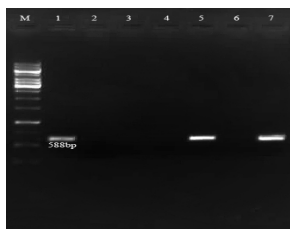
¹ Germination medium

² Preculture Medium

³ Co-culture Medium

⁴ Regeneration Medium

⁵ Rooting Medium



Agarose gel electrophoresis image showing PCR products. Lane M is a DNA ladder with markers at 20000bp, 15460bp, 14088bp, 3654bp, and 2282bp. Lane 1 shows a single band at 15460bp. Lane 2 shows a single band at 14088bp.

—

مذکور در ناقل pBI121 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن
مذکور مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). در نهایت قطعه حاوی،
ژنهای کیتیناز و گلوکاناز در پایین دست قطعه ژنی PRP-1،
قرارگرفت. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و استفاده از
آغازگرهای اختصاصی ژنهای کیتیناز و گلوکاناز، حضور ژنهای
مذکور مورد تأیید قرار گرفت. بررسی جهت قرارگیری با استفاده
از آنزیم *XhoI* مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که در ناقل
نوترکیب pBI121PRP-1ChiGlu، قطعه ژنهای کیتیناز و
گلوکاناز به صورت همسو با قطعه ژن *PRP-1* قرار گرفته باشد،
هضم آنزیمی با *XhoI*، منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۵۴۶۰ و
۲۲۸۲ جفت باز می‌شود و جهت‌گیری عکس قطعات ژنهای
کیتیناز و گلوکاناز نسبت به قطعه ژن *PRP-1* ظهور قطعه‌هایی با
طول ۱۴۰۸۴ و ۳۶۵۸ را سبب می‌شود (شکل ۲). نمای شماتیک
یلاسمیدهای حاصل در شکل ۳ مشاهده می‌شوند.

RTM	RM	CM	PM	GM	
+	+	+	+	+	MS
۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	ساکارز (گرم در لیتر)
۸	۸	۸	۸	۸	آگار (گرم در لیتر)
	۰/۴				تیامین-HCL (میلی گرم در لیتر)
		۲۰۰			استوسیرینگون (میلی گرم در لیتر)
		۱	۱		NAA (میلی گرم در لیتر)
		۱	۱		BAP (میلی گرم در لیتر)
	۰/۵				IAA (میلی گرم در لیتر)
	۰/۵				زآتین ربیوزاید (میلی گرم در لیتر)
۱۰۰	۳۰۰				سفوناکسیم (میلی گرم در لیتر)
۵۰	۵۰				کانامایسین (میلی گرم در لیتر)

IAA: ۳-ایندول استیک اسید

ریزنمونه‌های کوتیلدون به مراتب بیشتر از هایپوکوتیل بود (شکل ۵). انتقال نوساقه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی در شرایطی صورت گرفت که طول آنها به ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسیده بود (شکل ۶). پس از قرارگیری نوساقه‌ها بر روی محیط کشت ریشه‌زایی، ضعف شدیدی در آنها مشاهده شد که با زردی و گاه حذف نمونه‌ها همراه بود. به منظور کاهش فشار ناشی از آنتی‌بیوتیک که احتمالاً با بار متابولیکی ناشی از بیان بالای ژن‌های خارجی همراه شده بود، راهبرد کاهش میزان آنتی‌بیوتیک‌های محیط کشت ریشه‌زایی به ویژه کانامایسین به حداقل ممکن و در مواردی حذف کامل آن صورت گرفت. پس از کاهش کانامایسین، از زردی و سرعت نکروزه شدن گیاهچه‌ها کاسته شد. گیاهچه‌های حاصل پس از گذراندن مراحل سازگارسازی به گلدان انتقال یافته و نسل اول گیاهان تراریخت حاصل به دست آمد. بررسی بیان ژن‌های *PR1*، کیتیناز و گلوکاناز در گوجه‌فرنگی‌های تراریخت مستلزم در دست داشتن آنتی‌بادی ژن‌های مذکور بود که به علت عدم وجود آنتی‌بادی‌های مذکور مرحله بعد انجام نشد.

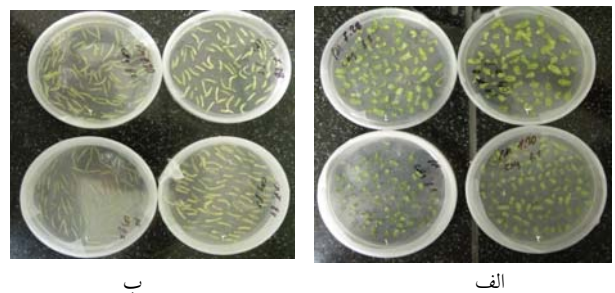


شکل ۵- گیاهچه‌های باززاشده پس از گذشت چهار هفته از انتقال ریزنمونه‌ها به روی محیط کشت باززایی انتخابی. (الف) ریزنمونه باززاشده از محور زیر لپه، (ب) ریزنمونه باززاشده از برگ لپه‌ای



شکل ۶- القای ریشه زایی با قرار دادن گیاهچه‌های باززا شده بر روی محیط کشت ریشه‌زایی. (الف) ضعف شدید همراه با زرد شدگی در برگچه‌های قدیمی، که احتمالاً به علت بیان بالای ژن‌های خارجی همراه با اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک می‌باشد، (ب) کاهش ضعف در گیاهچه‌های حاصل در اثر کاهش میزان آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت ریشه‌زایی

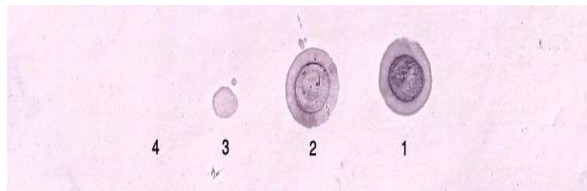
تراریزش گیاه گوجه‌فرنگی با استفاده از ناقل *pBI121 PRP-1* χ Glu(-) انتقال ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ لپه‌ای به محیط پیش کشت سبب ایجاد شرایط مناسب سلولی به منظور آلوده سازی با اگروباکتریوم و انتقال به محیط انتخابی شد. قرارگیری بر روی محیط پیش‌کشت با تیمارهای یک تا چهار روزه مورد بررسی قرار گرفتند. ریزنمونه‌هایی که به مدت یک روز بر روی محیط پیش‌کشت نگهداری شده بودند، اغلب بسیار ضعیف بوده و توری در آنها مشاهده نمی‌شد (شکل ۴) و پس از طی دوره هم‌کشتی و انتقال به محیط باززایی به حالت پلاسمولیزه در آمدند. همچنین، قرارگیری ریزنمونه‌ها به مدت چهار روز بر روی محیط پیش‌کشت سبب تورم شدید آنها شد که پس از انتقال به محیط باززایی اغلب ریزنمونه‌ها به صورت شیشه‌ای و یا برفکی در آمدند و در مراحل بعدی حذف گردیدند. در مقایسه‌ی دو تیمار نهایی دو و سه روزه با توجه به این‌که تقریباً ۸۰ درصد گیاهچه‌های باززا شده از ریزنمونه‌های مربوط به تیمار ۳ روزه بود، می‌توان بیان نمود که بهترین نتایج مربوط به تیمار سه روزه بود (شکل ۴).



شکل ۴- تورم ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای (الف) و محور زیر لپه (ب) پس از قرار گرفتن بر روی محیط پیش کشت. (۱) تیمار یک روزه، (۲) تیمار دو روزه، (۳) تیمار سه روزه و (۴) تیمار چهار روزه ریزنمونه‌ها

در این پژوهش، از دو سویه‌ی اگروباکتریوم (*LBA4404* و *C58*) به منظور تراریزش گوجه‌فرنگی استفاده شد. نتایج نشان داد علاوه بر این‌که کنترل سویه‌ی *LBA4404* با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به سویه‌ی *C58* بهتر صورت گرفت، تعداد نوساقه‌های باززا شده بر روی محیط کشت انتخابی نیز توسط آلودگی با *LBA4404* بیشتر بود. پس از گذشت دو تا سه هفته از انتقال ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه به محیط باززایی حاوی آنتی‌بیوتیک، نوساقه‌های باززاشده ظاهر شدند که تعداد آنها در

فسفوترانسفراز را در ژنوم گیاهان تراریخت اثبات نمود (شکل ۸) که خود تأیید دیگری بر تراریخته بودن گیاهان بدست آمده بود.



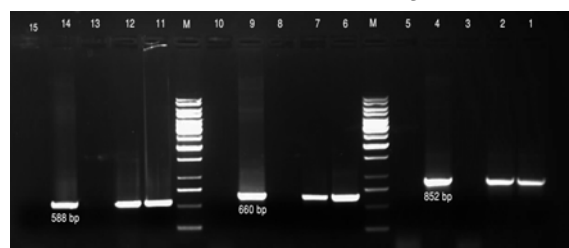
شکل ۸- آزمون لکه‌گذاری برای اثبات تراریختی گیاهان گوجه‌فرنگی، (۱) پلاسمید حاوی ژن نئومایسین فسفوترانسفراز، ۲ و ۳) گیاهان تراریخته، ۴: گیاه شاهد

ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب

نکته حائز اهمیت در ساخت سازه، جهت‌گیری ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به ژن *PRP-1* در پلاسمیدهای نو ترکیب $pBI121PRP-1ChiGlu(-)$ و $pBI121PRP-1ChiGlu(+)$ می‌باشد که به ترتیب به صورت همسو و ناهمسو قرار گرفته است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که در صورت وجود توالی‌های همولوگ، احتمال حذف یا جابجایی قطعات مذکور بسته به جهت قرارگیری و اندازه این قطعات وجود دارد (Branzei and Foiani 2003; Kohli et al. 2010). با توجه به احتمال وقوع کراسینگ‌اور در بین قطعات همولوگ، احتمال می‌رود در صورت وقوع اتصال در ناحیه مربوط به پیشبر 35S، در صورتی که ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت همسو با ژن *PRP-1* قرار گیرند حذف قطعه میانی صورت گیرد. این در حالی است که در صورت اتصال قطعه حاوی ژن‌هایی با جهت‌گیری مخالف تنها جابجایی قطعات صورت می‌گیرد که تأثیری در توالی قطعات مذکور و در نهایت پروتئین حاصل ندارد (شکل ۹). در اغلب مطالعات مربوط به بررسی اثر ژن‌های بیماری‌زایی، انتقال به صورت موازی و توسط ناقلین جداگانه صورت می‌گیرد. در این موارد هر ژن مربوط به بیماری‌زایی به صورت جداگانه به گیاه منتقل شده و دستیابی به گیاهان تراریخته‌ای که چند ژن را دریافت کرده باشند تنها با تلاقی‌های مکرر برای هرمبندی ژن‌ها امکان‌پذیر است (Broglie et al. 1991; Jongedijk et al. 1995; Fiocchetti et al. 2008). در این حالت با توجه به این‌که محل قرارگیری ژن‌های مورد مطالعه بر روی ژنوم قابل پیش‌بینی نیست، قرارگیری ژن‌ها در محل‌های ژنومی متفاوت می‌تواند شرایط درون سلولی متفاوتی

تجزیه مولکولی گیاهچه‌های حاصل

اگرچه رشد گیاهچه‌ها بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین می‌تواند دلیلی بر تراریخت بودن آنها باشد، اما در گزینش گیاهان بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار گیاهچه‌های غیر تراریخت نیز وجود دارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز نشان داد که گیاهچه‌های باززا شده در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *PRP-1* را در ژنوم خود دارا هستند. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تعدادی از گیاهان تراریخته احتمالی در شکل ۷ آورده شده است. همان طوری که در شکل مشاهده می‌شود، دو عدد از گیاهان مورد آزمایش قطعات مربوط به ژن‌های مورد نظر حضور داشته و تکثیر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفته است. (شکل ۷).

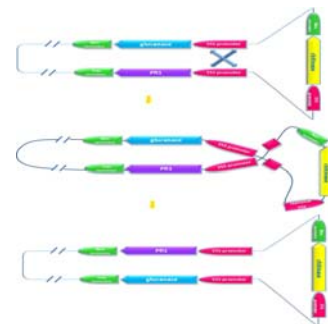


شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *PRP-1*، کیتیناز و گلوکاناز. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentase)، ۴، ۹، ۱۴: کنترل مثبت به ترتیب مربوط به ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *PRP-1*، ۱ و ۲) قطعه‌های مربوط به ژن کیتیناز در دو گیاه تراریخت، ۶ و ۷) قطعه‌های مربوط به ژن گلوکاناز در دو گیاه تراریخت، ۱۱ و ۱۲) قطعه‌های مربوط به ژن *PRP-1* در دو گیاه تراریخت، ۳، ۸ و ۱۳) چاهک‌های مربوط به گیاه شاهد فاقد ژن‌های مذکور، ۵، ۱۰ و ۱۵) کنترل منفی

مشاهده قطعات ۸۵۲، ۶۶۰ و ۵۸۸ جفت‌بازی به ترتیب تأیید کننده حضور ژن‌های کیتیناز، گلوکاناز و *PRP-1* در گیاهچه‌های مورد بررسی بودند. استفاده از پلاسمید به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (کنترل مثبت) امکان تشخیص گیاهانی را که منفی هستند (فاقد ژن‌های مورد نظر می‌باشند) از گیاهانی که مثبت می‌باشند (واجد ژن‌های مورد نظر هستند) ولی به دلیل نقص در انجام واکنش، قطعه‌ای تشکیل نمی‌دهند به خوبی فراهم آورد. علاوه بر این از دی‌ان‌ای گیاه گوجه‌فرنگی نیز به عنوان الگو جهت شاهد منفی استفاده گردید.

به منظور تأیید بیشتر تلفیق ژن، از آزمون لکه‌گذاری دی‌ان‌ای استفاده شد. نتایج آزمون لکه‌گذاری، حضور ژن نئومایسین

ایجاد نماید که این امر ممکن است در عملکرد نهایی پروتئین‌های بیان شده تاثیر گذار باشد. قرارگیری ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر روی یک ناقل شاید سبب بزرگ شدن ناقل و در نهایت کاهش بازده فرایند انتقال گردد اما با این کار می‌توان قرارگیری ژن‌های مذکور را در یک موقعیت مکانی تضمین و اثرات جانبی حاصل از جای‌گیری قطعات در ژنوم را حذف نمود. استفاده از پلاسمیدهای نو ترکیب حاصل از این تحقیق برای تاریخش گیاهان، منجر به کاهش هزینه‌های انتقال جداگانه ژن‌های ایجاد کننده مقاومت در محصولات گیاهی شده و با وارد کردن همزمان این ژن‌های مقاومت به گیاه، دیگر نیازی به انجام مراحل وقت‌گیر و پرهزینه تولید گیاهانی که به طور جداگانه این ژن‌ها را دریافت نموده‌اند و به دنبال آن تلاقی آنها و انجام مراحل هرم‌بندی ژنی به منظور دستیابی و شناسایی گیاهان تراریخته‌ای که دارای هر سه ژن باشند، نخواهد بود.



شکل ۹- اهمیت جهت‌گیری ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز و *PRP-1* در ناقل (+)ChiGlu-PRP-1-pB1121 پس از فرایند کراسینگ اور در نسل‌های بعدی. الف: وقوع کراسینگ‌اور بین پیشبر 35S ژن‌های گلوکاناز و *PRP-1*. ب: جایجایی ژن‌های گلوکاناز و *PRP-1* پس از جایجایی قطعات در ناحیه کراسینگ اور که در نهایت هیچ‌گونه تغییر مخربی در ساختار قطعات مذکور به وجود نمی‌آید.

تاریزش گوجه‌فرنگی

با توجه به تنوع ریزنمونه‌ها مشاهدات نشان داد که ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای نسبت به محور زیر لپه باززایی بهتری را نشان دادند. ژن‌های خانواده *PR1* تحت پیشبرهای القایی در گیاهان شاهد قرار دارند و سیستم دفاعی گیاه در اثر حمله عامل بیماری‌زا فعال می‌شود. در این حالت میزان خسارت ناشی از حمله قارچ رابطه مستقیمی با طول مدت پاسخ گیاه دارد. به عبارت دیگر هر چه زمان پاسخ‌دهی کمتر باشد، میزان خسارت کمتر خواهد بود (Van

Loon et al. 2006). در گیاهان تراریخته حاصل از این تحقیق، ژن‌های *PRP-1*، کیتیناز و گلوکاناز به طور جداگانه تحت کنترل پیشبر قوی 35S قرار دارند و به این ترتیب انتظار می‌رود میزان بیان پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها در تمامی مراحل رشد گیاه به میزان کافی باشد (Lawrence et al. 1998). اما این بیان بالا می‌تواند بار متابولیکی شدیدی به گیاه وارد نماید و سبب ضعیف شدن و گاهی از بین رفتن گیاهچه باززا شده شود. همان گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، گیاهچه باززا شده بر روی محیط انتخابی پس از گذشت ۴ هفته در مقایسه با گیاه شاهد که بر روی محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک قرار گرفته بود، نشانه‌هایی از زرد شدن برگ‌ها را، نشان داد که خود بیانگر ضعف در گیاهچه‌های مذکور بود. این ضعف در باززایی می‌تواند علاوه بر بیان بالای سه ژن، از اثر آنتی‌بیوتیک بر روی گیاهچه‌ها نیز ناشی شود. بررسی‌های بعدی می‌تواند علت اصلی کاهش قدرت گیاهچه‌ها را به طور دقیق‌تر مشخص نماید. از بین رفتن گیاهان غیرتراریخته نیز در محیط حاوی کانامایسین تا چندین ماه به طول می‌انجامد. این گیاهان به تدریج ضعیف می‌شوند. ضعف حاصل از مقاوم نبودن با ضعف باززایی روی محیط حاوی کانامایسین که گیاهان تراریخته را نیز شامل می‌شود، قابل تشخیص نبوده و از آنجایی که حضور کانامایسین در محیط کشت به میزان زیادی طولی شدن ساقه و رشد گیاه را با کندی مواجه کرده و برای القای ریشه نیز بهتر است کانامایسین از محیط کشت گیاه حذف گردد، لذا با تشخیص گیاهان تراریخته احتمالی توسط آنالیزهای ملکولی نظیر PCR در مراحل اولیه باززایی می‌توان گیاهان تراریخته احتمالی را روی محیط کشت بدون کانامایسین قرار داده تا دچار کندی و متوقف شدن رشد نگردند. در نهایت بهتر است که در آزمایشات مشابه، میزان آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در محیط کشت به حداقل ممکن کاهش یابد و یا کاملاً حذف گردد تا فشار انتخاب از گیاهچه‌ها برداشته شود و از حذف گیاهچه‌های تراریخت ضعیف در اثر آنتی‌بیوتیک جلوگیری شود. البته حذف آنتی‌بیوتیک سبب بازآشیدن گیاهان غیر تراریخت نیز می‌شود که در نهایت با حجم بالایی از گیاهچه‌هایی که باید مورد ارزیابی قرار گیرند روبرو خواهیم شد. بنابراین، محقق می‌تواند بر اساس میزان باززایی گیاه

(Goodman et al. 1993). روش انتقال هم زمان که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت می‌تواند به تمامی ابهاماتی از این نوع پاسخ مناسب دهد. برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری با مقاومت پایدار، ضروری است که گیاهان به همه گونه‌های عامل بیماری‌زا مقاوم باشند. تهیه ناقل پلاسمیدی که دارای چندین ژن رمزکننده پروتئین‌های ضدقارچی تحت پیشبرهای مستقل قوی باشد، راهکار مناسبی جهت تولید گیاهان تراریخته مقاوم می‌باشد. ناقل‌های حاصل از این تحقیق علاوه بر پتانسیل ایجاد اثرات هم-افزایی کیتیناز و β -1,3-گلوکاناز نگرانی حاصل از احتمال سازگاری عوامل بیماری‌زا و شکستن مقاومت را تا حد زیادی کاهش می‌دهند. از سوی دیگر بیان دایمی PR1 در این ناقل که القا کننده سایر ژن‌های PR در گیاه است، علاوه بر اثرات مثبت بر روی عملکرد آنزیم‌های کیتیناز و β -1,3-گلوکاناز، سایر ژن‌های مربوط به مکانیزم‌های دفاعی گیاه را نیز فعال می‌نماید که انتظار می‌رود باعث تولید گیاهانی با مقاومت بالا در برابر قارچ‌ها و حتی در برابر باکتری‌ها و دیگر تنش‌های زنده و غیر زنده محیطی گردد.

مطلوب تشخیص دهد که چه غلظتی از آنتی‌بیوتیک را مورد استفاده قرار دهد. تجزیه مولکولی همان‌طور که ذکر شد، مطالعات انجام شده در مورد گوجه‌فرنگی-های تراریخت، اثر افزایشی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زای متعدد قارچی را اثبات نموده است (Coling et al. 1993; Jongedijk et al. 1995). همچنین نقش خانواده PR1 نیز به عنوان یک پروتئین ضد قارچی به اثبات رسیده است (Niderman et al. 1995). به این ترتیب انتظار می‌رود قرارگیری این سه ژن در کنار هم در گیاه گوجه فرنگی بتواند سبب افزایش مقاومت به طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی گردد. در تمامی پژوهش‌هایی که تا کنون انجام گرفته است، انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت جداگانه و طی دو مرحله صورت گرفته است. این شیوه انتقال می‌تواند این سوال را در ذهن ما به وجود آورد که آیا قرارگیری ژن‌های مذکور در بخش-های مختلف ژنوم گیاه هدف نمی‌تواند در بیان و یا حداقل میزان بیان ژن‌های مذکور تأثیر داشته باشد که در صورت وقوع در میزان مقاومت ایجاد شده نسبت به عامل بیماری‌زا تأثیر گذار خواهد بود

منابع

- Agrios GN (2005) Plant Pathology pp:523-812. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier Academic Press, California 922pp.
- Goodman AD, Gut-Rella RM, Glascock M, Weymann C, Friedrich K, Maddox L, Ahl-Goy D, Luntz P, Ward TE, Ryals J (1993) Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein-1a. Proc. National Academy of Sciences 123(6): 498-550.
- Branzei D, Foiani M (2010) Leaping forks at inverted repeats. Genes & development 24: 5-5
- Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais C J, Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Science 116 (8): 280-356.
- Coling DBK, Kra M, Kragh K, Mikkelsen M J D, Vad K (1993) Plant chitinase. The Plant Journal 80 (5): 389-413.
- Cornelissen BJC, Horowitz J J, Van Kan A L, Goldberg R B, Bol J F (1987) Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. Nucleic Acids Research 86(4): 215-240.
- Cortina C, Culiañez-Macia AF (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 269-275.

- Datta SK, Muthukrishnan S (1999) Pathogenesis-Related Proteins In Plant pp: 12-280. Manila, CRC Press 303 pp.
- Edreva A (2005) Pathogenesis-Related Proteins: research. General and Applied Plant Physiology 115(9):289-304.
- Fiocchetti FD, Amore R, De Palma M, Bertini L, Caruso C, Caporale C, Testa A, Cristinzio G, Saccardo F, Tucci M (2008) Constitutive over-expression of two wheat pathogenesis-related genes enhances resistance of tobacco plants to *Phytophthora nicotianae*. Plant cell, tissue and organ culture 92: 73-84.
- Gianinazzi S, Pratt HM, Shewry PR, Mifflin BJ (1977) Partial purification and preliminary characterization of soluble proteins specific to virus infected tobacco plants. Journal of General Virology 36(8): 159-194.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. The Plant Journal 56(9): 259-378.
- Jongedijk E, Tigelaar H, van Roekel J S C, Bres-Vloemans S A, Dekker I, vanden Elzen P J M, Cornelissen B J C, Melchers L S (1995) Synergistic activity of chitinase and α -1,3-glucanase enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 63(9): 378-429.

- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247-258
- Lawrence CB, Joosten M H A J, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiological and molecular plant pathology* 48(7): 337-361.
- Mohsenpour M, Babaeian jelodar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008) Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and Bt genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 67(9): 320-448. (In Farsi)
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiology* 108: 17-27.
- Punja ZK, Zhang Y (1993) Plant chitinase and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* 45(5): 317-401.
- Sambrook J, Russel DW (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sarowar S, Kim Y J, Kim E N, Kim K D, Hwang B K (2005) Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* 45(9): 323-419.
- Schultheiss HC, Dechert L, Király J, Fodor K, Michel K-H, Kogel R, Hückelhoven A (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* 165: 1275-1280.
- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA (1993) Only Specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and beta 1, 3- glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 55 (7): 192-289.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry* 46 (2): 941-950.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 19(4): 120-276.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Phytopathology* 45(9): 342-431.