

## انتقال ژن‌های *OF2* و *VAP* به چغندرقند با کمک آگروباکتریوم ریزوژنز برای بررسی مقاومت به نماتد

پیمان نوروزی<sup>۱</sup>، دگوان کای<sup>۲</sup>، محمد علی ملبوبی<sup>۳</sup> و بهمن بزدی صمدی<sup>۴</sup>

### چکیده

ژن‌های *OF2* (نوعی اکسالات اکسیداز) و *VAP* که در مسیر پیام رسانی مقاومت به نماتد سیستی در چغندرقند هستند، قبلاً به ترتیب به کمک نشانگر مولکولی *AFLP* و سیستم دو هیبریدی در ناقل باکتریایی همسانه شده‌اند. برای آزمون قابلیت این ژن‌ها در ایجاد مقاومت در چغندرقند، ژن‌ها به تاقلین گیاهی قابل بیان منتقل گردیدند. برای این منظور، ژن *OF2* پس از جدا سازی، درون *T-DNA* ناقل دوگانه *pAM194* در پایین دست پرومودر ذاتی *CaMV35S* و نیز درون *T-DNA* ناقل دوگانه *pBin121* تغییر یافته در پایین دست پرومودر القایی ژن *Hsl<sup>pro-1</sup>* (ژن مسؤول ایجاد مقاومت به نماتد سیستی) قرار گرفت. ژن *VAP* پس از جدا سازی از همسانه اولیه، در پلامید *pAM194* در پایین دست پرومودر ذاتی *CaMV35S* قرار گرفت. بدین ترتیب، سه سازه جدید که بیان کننده ژن‌هایی از مسیر پیام رسانی مقاومت به نماتد چغندرقند بودند ساخته شد. سپس این سه پلامید به آگروباکتریوم ریزوژنز سویه ۴ جدآگانه منتقل شدند و پس از آن، جدا کشت دم برگ گیاه چغندرقند با آگروباکتری تلقیح شد. ریشه‌های مویین حاصل از تراویختی، پس از تأیید اولیه با روش رنگ‌آمیزی *GUS* و یا *PCR* به منظور بررسی مقاومت بالارو نماتد تلقیح شدند. نتایج اولیه وجود مقاومت نسبی در برابر لارو نماتد را در شماری از ریشه‌های مویین نشان داد. این مقاومت را می‌توان به اثر ژن‌های *OF2* و *VAP* نسبت داد.

**واژه‌های کلیدی:** چغندرقند، آگروباکتریوم ریزوژنز، نماتد سیستی، پیام رسانی، نشانگر مولکولی

۱. استادیار اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند کرج
۲. استاد ژنتیک مولکولی، مؤسسه علوم گیاهی و اصلاح نباتات، دانشگاه کیل آلمان
۳. دانشیار زیست‌شناسی مولکولی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهران
۴. استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

## مقدمه

می‌شوند. برای مثال، واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive) منجر به نکروزه شدن موضعی سریع، افزایش (response) فعالیت پراکسیدازی و رسوپ لیگنین می‌گردد. تیپ‌های آلوده کننده بیماری غالباً مکانیزم‌های مقاومت را در هم شکسته، و نیز به علت فقدان ژن مقاومت در یک گونه مورد نظر (مانند چغnderقند) همواره نیاز به تنوع ژنتیکی جدید برای استفاده در اصلاح مقاومت به بیماری وجود دارد (۹).

با استفاده از نشانگرهای مولکولی چندین ژن مقاومت به نماتد در گیاهان مختلف شناسایی شده است. ژن *Gro1* به همه تیپ‌های آلوده کننده بیماری نماتد سیستی ریشه (*Globodera*) (*restochiensis*) در سبب زمینی مقاومت نشان می‌دهد (۱ و ۷). ژن‌های *Hero* و *Mi-1* از خویشاوند وحشی گوجه فرنگی (*Lycopersicon pimpinellifolium*)، به ترتیب مسئول ایجاد مقاومت به نماتد سیستی ریشه و گونه‌های ملوییدوجاین (*Meloidogyne spp*) می‌باشند (۳ و ۵). ژن *rhg1* در سویا مقاومت نسبی به نماتد *Heterodera glycines* ایجاد می‌کند (۳). ژن‌های مسئول ایجاد مقاومت به نماتد سیستی چغnderقند در گونه‌های زراعی جنس *Beta* یافت نمی‌شوند، و تنها منبع مقاومت در گونه‌های وحشی آن است (۹). ژن‌های مقاومت به نماتد سیستی چغnderقند از خزانه ژنی گونه‌های وحشی جنس *Beta* به درون لاین‌های اصلاحی وارد شده‌اند (۱۰). مقاومت به نماتد سیستی در چغnderقند به سبب یک سری ژن در مسیر پیام رسانی (Signal transduction pathway) است، که پس از حمله نماتد به ریشه، این ژن‌ها به ترتیب فعال شده و محصول نهایی مسیر آنزیمی، که تاکنون ناشناخته است، منجر به ایجاد مقاومت می‌گردد.

با کمک نشانگرهای مولکولی و یا دیگر روش‌ها، شماری از این ژن‌ها شناسایی و همسانه شده‌اند (۱۳). برخی از این ژن‌ها با تلاقي‌های بین گونه‌ای و تولید لاین‌های جا به جایی (Translocation lines) به چغnderقند انتقال یافته‌اند (۲ و ۱۳). گیاهان به دست آمده مقاوم به نماتد هستند، ولی خصوصیات زراعی خوبی ندارند. بنابراین، برای حذف اثر ژن‌های مجاور،

نمادهای بیماری‌زای گیاهی همه ساله به شمار بسیاری از گیاهان زراعی آسیب می‌رسانند، که هزینه جبران آن بسیار زیاد است (۱۴). مهم‌ترین نماتدهای گیاهی از جنس ملوییدوجاین (*Globodera*), گلوبودرا (*Meloidogyne*) و هسترودرا (*Heterodera*) هستند، که مواد مغذی گیاه را پس از ایجاد ساختارهای تغذیه‌ای ویژه جذب می‌کنند (۱۳).

حدود ۲۹ گونه نماتد از ۱۶ جنس می‌توانند انگل چغnderقند باشند. کاهش عملکرد چغnderقند در اثر نماتدها حدود ۱۰ درصد برآورد شده، که نماتد سیستی (*Heterodera schachtii*) چغnderقند مسئول کاهش بیش از ۹۰ درصد این مقدار است، و به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای چغnderقند در جهان شناخته شده است (۱۵). گیاه چغnderقند هیچ مقاومتی بر علیه نماتد سیستی ندارد (۱۳).

چرخه زندگی نماتد سیستی به چهار مرحله لاروی تقسیم می‌شود. لارو این نماتد به ریشه گیاه میزان حمله کرده، درون استوانه آوندی تشکیل ساختارهای تغذیه‌ای خیلی اختصاصی به نام سینسیتیوم (Sincytium) می‌دهد. سینسیتیوم از سلول‌های بی شماری تشکیل شده است که پروتوبلاست آنها به یکدیگر متصل‌اند. نماتدها می‌توانند بر بیان ژن‌های موجود در سلول‌های تغذیه‌ای اثر منفی بگذارند و تشکیل ساختار سینسیتیوم را فعال کنند. سیکل زندگی نماتد سیستی ماده پس از تشکیل تخم درون یک سیست به پایان می‌رسد. این سیست‌ها تا ۱۰ سال قدرت زیست خود را در خاک حفظ می‌کنند (۲). علائم آلودگی نماتد معمولاً کاهش رشد، تغییر در مورفولوژی ریشه و چروکیدگی گیاه است (۹).

کنترل نماتد با استفاده از تنابوب گیاهی و کاربرد نماتدکش‌ها می‌تواند تا حدی مؤثر باشد. ولی بهترین و مؤثرترین روش کنترل نماتد، استفاده از ارقام اصلاح شده مقاوم به نماتد است. اصلاح واریته‌های مقاوم هدفی مهم در برنامه‌های اصلاح نبات است (۹).

ژن‌های مقاومت سبب واکنش‌های موضعی یا سیستمیک

۳۷ °C بود.

جدا سازی و خالص سازی قطعات برش یافته از ژل پس از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی پلاسمیدها در ژل آکارز یک درصد در بافر TAE (۱۱) با ولتاژ ۶۰، قطعه ژنی مورد نظر تفکیک شده، با استفاده از کیت سفاگلاس Sephaglas Band prep kit (Amersham Pharmacia Biotech) قطعات DNA از ذرات ژل و دیگر ناخالصی‌ها جدا و خالص شدند. این قطعات به عنوان ژن‌های انتقالی درون ناقلین بیان شونده گیاهی به کار می‌روند.

#### تهیه ناقل‌های خطی (Linear vector)

پلاسمید pAM194 با آنزیم *EcoRI* و پلاسمید pBin121 تغییر یافته با آنزیم *XbaI* به روش معمول با غلظت کامل آنزیمی و حجم کلی ۵۰ میکرولیتر در دمای ۳۷ °C هضم شدند. پس از یک ساعت، چهار میکرولیتر از محلوت واکنش آنزیمی برداشت، و به منظور تأیید عمل هضم آنزیمی، در ژل یک درصد آگارز الکتروفورز شد. برای pBin121 تغییر یافته، قطعه بزرگ DNA (حدود ۱۲ کیلوباز) از سطح ژل جدا، و با استفاده از کیت سفاگلاس خالص گردید. برای pAM194، باقی‌مانده واکنش آنزیمی در حمام آب گرم ۳۷ °C تا زمان دفسفریله کردن نگهداری شد.

#### دفسفریله کردن ناقل‌های خطی

برای این کار، به قطعه بزرگ DNA حاصل از pBin121 تغییر یافته، و نیز به باقی‌مانده واکنش آنزیمی مربوط به pAM194، به طور جداگانه ترکیبات زیر افزوده شد: پنج میکرولیتر بافر دو بار تقطیر و ۱۰ میکرولیتر آنزیم آلکالین فسفاتاز (از شرکت Roche) با غلظت نهایی ۰/۱ واحد در میکرولیتر برای دفسفریله کردن دو انتهای ناقل خطی شده. سپس برای خالص سازی DNA پلاسمید خطی شده از روش فنل کلروفوروم (۱۱)

بایستی ژن یا ژن‌های مقاومت با استفاده از روش‌های مختلف نخست همسانه شده، سپس به گونه زراعی چغندرقند انتقال یابند.

#### مواد و روش‌ها

در این پژوهش، دو ژن *OF2* و *VAP*، که قبلًا به کمک نشانگر مولکولی AFLP (Amplified fragment length) (Two-hybrid system) و سیستم دو هیریدی (polymorphism D. Cai, Personal communication) شده بودند (Clone)، به درون ناقل دوگانه بیان شونده گیاهی انتقال یافتد. سازه‌های (Constructs) جدید به کمک آگروباکتریوم ریزوژنر (*Agrobacterium rhizogenes*) به بافت گیاهی چغندرقند منتقل شدند، و مقاومت به نماتد سیستمی در ریشه‌های مویین ترا ریخته (Transformed) ارزیابی گردید.

#### کشت باکتری و استخراج پلاسمید

باکتری‌های *E. coli* حامل پلاسمید pGEMT easy در بردارنده ژن‌های *OF2* و *VAP* (D. Cai, Personal communication) در ۲۵ میلی لیتر محیط LB (۱۱) به همراه ۵۰ میلی گرم در لیتر آمپیسیلین، در شیکر دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ °C کشت شبانه شدند. سپس استخراج پلاسمید با استفاده از کیت کیاژن (QIAGEN filter midiprep kit) انجام گرفت.

#### هضم آنزیمی پلاسمیدهای pGEMT easy

برای جدا سازی ژن *OF2* از پلاسمید pGEMT easy آنژیم‌های *EcoRI* و *XbaI* و برای جدا سازی ژن *VAP* از پلاسمید pGEMT easy از آنژیم *EcoRI* استفاده گردید. برای تعیین غلظت مناسب آنژیم *EcoRI* از یک سری غلظت آنزیمی ۱/۵، ۱/۶، ۱/۳ و ۱/۱۲ واحد آنزیمی در ۲۰ میکرولیتر حجم کلی واکنش و نیز زمان هضم ۱۵ دقیقه به جای یک ساعت استفاده شد. ولی برش با *XbaI* به روش معمول با غلظت کامل آنزیم و زمان هضم یک ساعت انجام گرفت. دمای واکنش هضم آنزیمی

### کشت تک کلونی و استخراج DNA پلاسمیدی

از هر کشت باکتری حدود ۲۰-۱۰ تک کلونی برداشت و در محیط مایع LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین به صورت جداگانه کشت گردید. از باکتری‌های رشد یافته برای استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی (Alkaline lysis) (۱۱) استفاده شد.

استفاده شد.

**اتصال (Ligation)** ژن‌های *OF2* و *VAP* درون ناقلين خطی برای این کار حدود ۵۰ نانوگرم DNA خالص شده *OF2* و یا *VAP* با ۵۰ نانوگرم DNA خالص شده ناقل خطی pAM194 و یا ۱۲۱ pBin121 تغییر یافته با آنزیم لیگاز (Ligase) مخلوط، و در دمای ۱۶ °C برای یک شب نگهداری شد.

### هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده

برای تأیید حضور ژن *OF2* یا *VAP* در ناقلين پلاسمیدی pAM194 و یا pBin121 تغییر یافته، از هضم آنزیمی کامل با آنزیم *XbaI* و یا *EcoRI* بسته به نوع ناقل استفاده شد، و نمونه‌های دارای ژن‌های *OF2* یا *VAP* انتخاب گردید.

### تهیه سلول‌های پذیرنده از *E. coli*

برای این کار کشت شبانه باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط ۲YT (۱) رقیق شده، و ادامه کشت در ۳۷ °C در شیکر دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه برای دو ساعت انجام شد تا OD<sub>550</sub> به حدود ۰/۵ رسید. سپس سلول‌های باکتری در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ °C سانتریفوژ، و سپس در ۱۰ میلی لیتر کلرید کلسیم ۲۰ میلی مولار تعليق شده، روی یخ به مدت حداقل یک ساعت نگهداری شدند. مجدداً نمونه‌ها در ۴ °C، به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰ rpm ترکیب شدند. این سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه روی یخ نگهداری شدند. در این مرحله، سلول‌ها حالت پذیرنده پیدا کرده و آماده دریافت پلاسمید خارجی گردیدند.

### تراریختی سلول‌های پذیرنده با محصولات اتصال

در این مرحله، ۱۰ میکرولیتر از هر یک از محصولات اتصال ژن‌های *OF2* و *VAP* به طور جداگانه به ۱۵۰ میکرولیتر سلول‌های پذیرنده باکتری افزوده شد، و به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری گردید. سپس با استفاده از روش شوک حرارتی (۱۱)، انتقال محصولات اتصال به درون باکتری انجام گرفت. باکتری‌ها روی محیط کشت LB حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر کانامایسین پخش، و محیط کشت در انکوباتور ۳۷ °C برای یک شب، به منظور تشکیل کلونی نگهداری شدند.

**آزمون PCR برای پلاسمیدهای نوترکیب**  
برای تأیید جهت همسوی (Sense) ژن‌های *OF2* و یا *VAP* در مجاورت پرومتر (در این صورت ژن قابل ترجمه و بیان می‌باشد)، آزمون PCR روی پلاسمیدهای دارای ژن‌های فوق (Primers) انجام گرفت. برای این منظور از جفت آغازگرهای (Primers) متغروتی که در ناحیه پرومتری و درون ژن‌های مورد نظر وجود داشتند استفاده شد، که مشخصات آنها به شرح زیر است:

FloxF2:	in 5' UTR of <i>OF2</i> gene:	5'
	CCTCCTAGCCTCTTGTAAATTCTAGC 3'	
3NR13:	in ORF of <i>OF2</i> gene:	5'
	GGCTACCGCGTTGTTAGTTGAATG 3'	
FloxR:	in 3' UTR of <i>OF2</i> gene:	5'
	GAATGGAAACAAGCAACATATGATATC 3'	
5R13:	in ORF of <i>OF2</i> gene:	5'
	GAACTGAATAGCTGGGTTGCACC 3'	
F2BVAP:	in ORF of <i>VAP</i> gene:	5'
	GTTGGAAATTCAATAAAACCTGC 3'	
FLVAP:	in ORF of <i>VAP</i> gene:	5'
	GACTTCAAATACGCTAAATGTTT 3'	
35S:	in CaMV35S promoter:	5'
	CAATCCCACATATCCTCGAACGTC 3'	
1832DKT1:	in <i>Hsl</i> <sup>I</sup> <sup>pro-I</sup> promoter:	5'
	CCAATTCGCGGTACAATCTAGAGC 3'	

شرایط PCR شامل یک سیکل ۹۴ °C برای سه دقیقه، سپس ۳۵ دقیقه [یک دقیقه ۹۴ °C، و سپس ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه] و یک دقیقه ۵۵ °C برای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه بود.

مویین تلقیح گردید. هم‌چنین، ریشه‌های مویین فاقد ژن‌هایی از پلاسمید دوگانه به عنوان کنترل منفی در آزمایش تلقیح با نماتد به کار رفتند.

## نتایج و بحث

### هضم آنزیمی پلاسمیدهای pGEMT easy

با توجه به غلاظت‌های مختلف به کار رفته آنزیم *EcoRI* برای هضم پلاسمیدها و جدا سازی ژن کامل *OF2* و *VAP*، با افزایش غلاظت آنزیم از ۱/۵ به ۱۲ واحد آنزیمی، حالت گردايان در قطعات مختلف ژنی ایجاد شد، که نشانه تأیید پلاسمیدها از نظر ژن‌های همسانه شده بود. هم‌چنین، غلاظت مناسب آنزیم برای ایجاد نوار مورد انتظار، که همان قطعه کامل ژن‌های همسانه شده است، تعیین گردید.

در این آزمایش، غلاظت سه واحد آنزیمی در ۲۰ میکرولیتر حجم کلی واکشن انتخاب، و با استفاده از ۱۵ واحد آنزیمی در ۱۰۰ میکرولیتر حجم واکشن، محصول زیادی از قطعه کامل ژن‌ها به دست آمد. در مورد هضم آنزیمی ژن‌های *OF2* و *VAP* با غلاظت کامل آنزیم *EcoRI* به علت وجود یک ناحیه برش اضافی در وسط هر یک از ژن‌ها، قطعه کامل ژن دیده نشد.

### ناقلین خطی

برای تهیه ناقل خطی از پلاسمید pAM194 فقط یک ناحیه برش برای آنزیم *EcoRI* وجود داشت. بنابراین، پس از عمل برش نیازی به جدا سازی یک نوار خاص از سطح ژل نبود، و عمل دفسفریله کردن مستقیماً در باقی مانده مخلوط واکنش آنزیمی انجام گرفت. دفسفریله کردن ناقل پلاسمیدی برای جلوگیری از اتصال دوباره دو انتهای آن در هنگام اتصال با ژن‌های مورد همسانه است.

در مورد ناقل pBin121 تغییر یافته، نخست باید cDNA مربوط به ژن *HsI<sup>pro-1</sup>* به کمک آنزیم *XbaI* از آن خارج می‌شد، و روی ژل آگارز یک قطعه کوچک ۱/۲ کیلویاز، که معرف

انتقال پلاسمیدهای دوگانه به آگروباکتریوم ریزوژنر برای این کار از روش انجاماد و ذوب (Freeze and thaw) (۱۱) استفاده شد. در این روش سلول‌های آگروباکتری که در مجاورت کلرید کلسیم برای دریافت ژن حالت پذیرنده پیدا کرده‌اند، پس از افزودن DNA پلاسمید به آنها، در ازت مایع به سرعت منجمد، و سپس در انکوباتور  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج دقیقه ذوب شدند. بدین ترتیب پلاسمید وارد آگروباکتری گردید.

### تلقیح بافت‌های گیاهی با آگروباکتریوم ریزوژنر و تولید ریشه‌های مویین

در این مرحله، جداکشت‌های دمبرگ با سلول‌های آگروباکتریوم ریزوژنر حامل پلاسمیدهای دوگانه pBinOF2، pAMOF2 و pAMVAP در بردارنده ژن‌های *OF2* و *VAP*، در سه سری تاریخی مستقل به شرح زیر به کار رفتند. عمل تلقیح جداکشت‌ها با کشت شباهه آگروباکتری‌های نوترکیب به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. سپس جداکشت‌ها به محیط B<sub>5</sub> (۴) منتقل و برای مدت دو روز کشت توأم انجام شد. در این دوره، امکان انتقال ژن از باکتری به سلول‌های گیاهی فراهم گردید.

### سنجهش فعالیت آنزیم GUS و انجام PCR

برای تأیید حضور ژن‌های *OF2* و *VAP*، که در مجاورت GUS gene ۳۵S-GUS بودند، از روش رنگ‌آمیزی در ریشه‌های مویین بر طبق روش جفرسون (۸) استفاده شد. برای تأیید حضور ژن‌های *OF2*، که در مجاورت -GUS gene HsI<sup>pro-1</sup> قرار داشتند، روش PCR با آغازگر مربوط به ژن GUS به کار رفت.

تلقیح ریشه‌های مویین با لارو نماتد و بررسی مقاومت ریشه‌های مویین تاریخته از هر سه سری تاریخی، نخست تکثیر، و سپس قطعات ریشه مویین با ۶-۸ تکرار در ظروف پتری کشت شدند. حدود ۳۰۰ لارو نماتد سیستی یک هفته سن بر طبق روش پائول و همکاران (۱۲) در مجاورت ریشه‌های

یا به اختصار pBinOF2 (ترکیب ژن *OF2* با pBin121 تغییر یافته) تهیه شد. با انتقال این پلاسمیدها به آگروباکتریوم ریزوژنز و سپس تاریختی گیاه، اثر ژن‌های *OF2* و *VAP* با توجه به نوع پروموترا نهادها در ایجاد مقاومت به نماد چغندر قند ارزیابی گردید.

### تولید ریشه‌های مویین، سنجش فعالیت آنزیم GUS و آزمون PCR

پس از ۱۰ روز از آغاز تلچیح بافت‌های گیاهی با آگروباکتریوم ریزوژنز، نخستین ریشه‌های مویین ظاهر شدند. ریشه‌ها، عمدتاً از دو انتهای دمبرگ به صورت یک تا چند ریشه تولید شدند. ریشه‌های مویین در سه سری تاریختی مربوط به سه پلاسمید دوگانه پس از سه هفته از آغاز کشت شمارش گردیدند (جدول ۱).

رنگ‌آمیزی ریشه‌های مویین حاصل از تاریختی با pAMVAP و pAMOF2 با محلول رنگ‌آمیزی GUS، نشان داد که به ترتیب ۳۳ و ۳۸ درصد از ریشه‌های مویین تاریخته هستند، و حامل T-DNA مربوط به ناقل‌های دوگانه مذکور می‌باشند (جدول ۱)، و رنگ آبی را در محل‌های مختلف ریشه نشان می‌دهند (شکل ۴). تاریخته بودن ریشه‌های مویین حاصل از تاریختی با pBinOF2 که ژن GUS در مجاورت پروموترا القایی *HslI<sup>pro-1</sup>* قرار داشت و فاقد ابراز در شرایط طبیعی بود، تنها از طریق PCR تأیید گردید. همان طور که در شکل ۵ دیده می‌شود، ۲۵ درصد ریشه‌های مویین حاصل از تاریختی حامل ژن GUS هستند (جدول ۱ و شکل ۵).

تلچیح ریشه‌های مویین با لارو نماد و بررسی مقاومت پس از گذشت ۱۰ روز، چند سیست نماد، که آخرین مرحله تکامل لاروهای ماده هستند، روی ریشه‌های مویین تلچیح شده با لارو نماد تشکیل گردید. با شمارش این سیست‌ها و مقایسه آنها مشخص شد که شماری از ریشه‌های مویین از هر یک از سه سری تاریختی، دارای مقاومت نسبی به خسارت نماد در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی هستند (جدوال ۲، ۳ و ۴).

Hs1-cDNA بوده، و یک قطعه بزرگ که باقی‌مانده ناقل پلاسمیدی فاقد Hs1-cDNA است، تشکیل می‌گردید. این قطعه که از ژل جدا، خالص و دفسفریله شد، به عنوان ناقل پلاسمیدی جدید برای دریافت ژن *OF2* به کار رفت.

### هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب

پس از مرحله اتصال و تاریختی محصولات آن در باکتری *E. coli* برای تأیید حضور ژن‌های *OF2* و *VAP* در پلاسمید pAM194 از هضم آنزیمی با *EcoRI*، و برای تأیید حضور ژن *XbaI* در پلاسمید pBin121 تغییر یافته از هضم آنزیمی با *XbaI* در استفاده گردید. با توجه به حضور یک ناحیه برش *EcoRI* میان ژن‌های *OF2* و *VAP* (علاوه بر دو انتهای هر یک از ژن‌ها) پس از هضم کامل آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pAM194، قطعات مربوط به ژن‌های *OF2* و یا *VAP* تولید شد.

در مورد هضم آنزیمی *OF2* با غلظت کامل آنزیم *XbaI*، قطعه کوچک تولید شده نشانه ژن کامل *OF2* با اندازه مورد انتظار بود. هم‌چنان، پس از هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب pBin121 تغییر یافته، قطعه کاملی از ژن *OF2* ایجاد گردید.

### نتایج PCR پلاسمیدهای نوترکیب

روش PCR با جفت آغازگرهای متفاوت، که در ناحیه پرموتی و یا درون (Open reading frame) ORF مربوط به ژن‌های *OF2* و یا *VAP* قرار داشتند، برای پلاسمیدهای تأیید شده با روش هضم آنزیمی صورت گرفت. پس از الکتروفورز و رنگ‌آمیزی نمونه‌ها، ظهور نوار مورد انتظار در ژل، نشانه همسو یا صحیح بودن جهت ژن، و عدم ظهور نوار مورد انتظار نشانه ناهمسو (Antisense) یا ناصحیح بودن جهت ژن در پلاسمید بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳).

بدین ترتیب، سه پلاسمید یا سازه جدید به نام‌های pAM-*FLOxF2R.2* یا به اختصار pAMOF2 (ترکیب ژن *OF2* با pAM-*FLOxF2R.2* پلاسمید)، pAMVAP یا به اختصار pAM-FLVAP (ترکیب ژن *VAP* با پلاسمید pAM194) و pBin-*FLOxF2R.2* (ترکیب ژن *VAP* با پلاسمید pAM194) به نام pAM-*FLOxF2R.2* معرفی شدند.

جدول ۱. نتایج رنگ‌آمیزی GUS و آزمون PCR برای ریشه‌های مویین حاصل از تراویختی دم‌برگ چغندرقند با آگروباکتریوم ریزوژنر حامل یکی از پلاسمیدهای pAMVAP، pBinOF2 و pAMOF2

نام پلاسمید	شمار جداکشت	به شمار جداکشت	درصد ریشه‌های مویین	GUS <sup>+</sup>	PCR <sup>+</sup>
pAMOF2	۲۸۰	۶۵	۳۳	NA	۲۵
pBinOF2	۲۸۰	۵۰	NA	NA	۲۵
pAMVAP	۲۸۰	۳۵	۳۸	NA	NA

NA : نیاز به آزمون نبوده است.



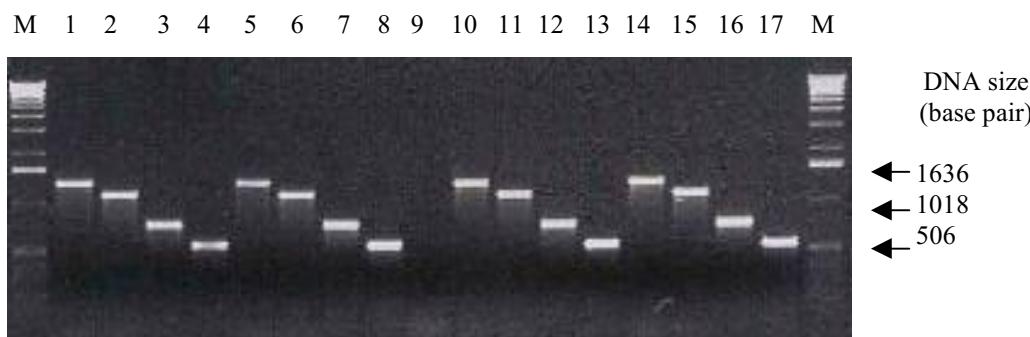
شکل ۱. نتایج PCR دو نمونه پلاسمید نوترکیب pAM-FLOxF2R.2 یا به اختصار pAMOF2 با آغازگرهای مختلف برای تأیید همسو بودن جهت ژن *OF2* در مجاورت پرومومتر CaMV35S

M: نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)

۱. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای 35S, 5R13
۲. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای 35S, FLOxR
۳. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای FLOxF2, 5R13
۴. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای FLOxF2, FLOxR
۵. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگر - 35S (اولین کنترل منفی)
۶. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر - FLOxF2, (دومین کنترل منفی)
۷. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر FLOxF2, — (سومین کنترل منفی)
۸. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر 5R13, — (چهارمین کنترل منفی)
۹. محصول PCR برای Master Mix واکنش PCR بدون DNA الگو (پنجمین کنترل منفی)
- ۱۰ تا ۱۷. محصولات PCR برای نمونه دو پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستون‌های ۸-۱

ریشه‌های مویین تراویخته AMVAP، در مقایسه با شاهد منفی، حداقل تا ۵۲ درصد توانسته‌اند از تشکیل سیست جلوگیری کنند. پائول و همکاران (۱۲) برای تأیید توارث پذیری صفت مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند، از روش تراویختی با کمک آگروباکتریوم ریزوژنر استفاده کردند. بدین ترتیب که یک واریته چغندرقند حساس به نماتد و یک لاین چغند منوتلوزومیک (Monotelosomal) (Monotelosomal) مقاومت به نماتد را با باکتری فوق تلقیح کرده، ریشه‌های مویین حاصل را در مجاورت ۳۰۰ لارو نماتد قرار داده و پس از چهار هفته،

در مورد اثر ژن‌های *OF2* و *VAP* در ریشه‌های مویین حاصل بر اساس درصد سیست‌های تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده، مشخص شد که ژن *OF2* در مجاورت پرومومتر القایی ژن *Hs1pro-1* نسبت به ژن *OF2* در مجاورت پرومومتر ذاتی CaMV35S، اثر قوی‌تری در کنترل لاروهای نماتد داشته است. به طوری که در برخی از ریشه‌های مویین تراویخته هیچ سیستی تشکیل نشده، و این ریشه‌ها از تکامل BinOF2 طبیعی لارو نماتد به سیست کاملاً جلوگیری کرده‌اند. در مورد اثر ژن *VAP* بر لارو نماتد، به نظر می‌رسد که



شکل ۲. نتایج PCR چهار نمونه پلاسمید نوترکیب pBinOF2 یا به اختصار **pBin-FLOxF2R.2** با آغازگرهای مختلف برای تأیید همسو بودن جهت ژن **OF2** در مجاورت پروموتور **HsI<sup>pro-1</sup>**

M : نشانگر مولکولی تعیین اندازه (1KB ladder) DNA

۱. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای 1832DKT1, FLOxR

۲. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای 5R13, 1832DKT1

۳. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای FLOxF2, FLOxR

۴. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای FLOxF2, 5R13

۵ تا ۸. محصولات PCR برای نمونه دو پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستون های ۱-۴

۹. محصول PCR برای Master Mix و اکنش PCR بدون DNA الگو (کترل منفی)

۱۰ تا ۱۳. محصولات PCR برای نمونه سه پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستون های ۱-۴

۱۴ تا ۱۷. محصولات PCR برای نمونه چهار پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستون های ۱-۴



شکل ۳. نتایج PCR دو نمونه پلاسمید نوترکیب pAM-FLVAP یا به اختصار **pAM-FLVAP** با آغازگرهای مختلف برای تأیید همسو بودن جهت ژن **VAP** در مجاورت پروموتور **CaMV35S**

M : نشانگر مولکولی تعیین اندازه (1KB ladder) DNA

۱. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMVAP با آغازگرهای 35S, FLVAP

۲. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMVAP با آغازگرهای F2BVAP, FLVAP

۳. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMVAP با آغازگر --, -- (اوین کترل منفی)

۴. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMVAP با آغازگر --, FLVAP, -- (دومین کترل منفی)

۵ تا ۸. محصولات PCR برای نمونه دو پلاسمید pAMVAP به کار رفته به ترتیب در ستون های ۱-۴



شکل ۴. ریشه‌های موین تاریخته حامل ژن GUS با پروموتر CaMV35S پس از رنگ‌آمیزی. لکه‌های آبی در ریشه‌های موین بیان ژن GUS را نشان می‌دهند.



شکل ۵. نتایج آزمون PCR برای ریشه‌های موین تاریخته BinOF2 برای تشخیص ژن GUS

۱. نشانگر مولکولی تعیین اندازه (1KB ladder DNA)
۲. محصول PCR برای DNA پلاسمید pAM194 (کنترل مثبت)
۳. محصول PCR برای DNA ژنومی ریشه موین فاقد ژن GUS (اوین کنترل منفی)
۴. محصول PCR برای DNA الگو (دومین کنترل منفی)
- ۵ تا ۹. محصول PCR برای DNA های ژنومی ریشه‌های موین حاصل از تاریختن سری BinOF2

جدول ۲. نتایج شمارش سیسته‌های موین چغندرقند تاریخته AMOF2، پس از ۱۰ روز از آغاز تلقیح با لارو نماد

شمار ریشه‌های موین تاریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماد روی ریشه‌های موین	درصد سیسته‌های تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده	فاقد ژن <i>OF2</i> (شاهد منفی)
۲/۵۷	۷/۷		
۱/۶۷	۵		۱۳
۲/۰۷	۷/۲		۱۸
۲/۱۰	۶/۳		۲۰
۱/۱۰	۳/۳		۲۲
۰/۷۷	۲/۳		۲۷
۰/۴۳	۱/۳		۳۷
۰/۷۷	۲/۳		۴۳
۰/۶	۱/۸		۴۴
۱/۷۷	۵/۳		۵۳
۱/۹۰	۵/۷		۵۵

جدول ۳. نتایج شمارش سیستهای نماتد روی ریشه‌های مویین چغندرقند تاریخته BinOF2، پس از ۱۰ روز از آغاز تلقیح با لارو نماتد

شمار ریشه‌های مویین تاریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماتد روی ریشه‌های مویین	درصد سیستهای تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده	۲/۵۷
فاقد ژن OF2 (شاهد منفی)	۷/۷		
۶	۲	۰/۶۷	
۱۳	۳/۵	۱/۱۷	
۱۹	۰	۰	
۲۹	۲/۰	۰/۸۳	
۳۱	۱/۰	۰/۵	
۳۲	۰	۱/۶۷	
۳۳	۰/۰	۰/۱۷	
۳۹	۰/۰	۰/۱۷	
۴۰	۰/۰	۰/۱۷	

جدول ۴. نتایج شمارش سیستهای نماتد روی ریشه‌های مویین چغندرقند تاریخته AMVAP، پس از ۱۰ روز از آغاز تلقیح با لارو نماتد

شمار ریشه‌های مویین تاریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماتد روی ریشه‌های مویین	درصد سیستهای تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده	۲/۵۷
فاقد ژن VAP (شاهد منفی)	۷/۷		
۸	۷/۵	۲/۵	
۱۴	۵	۱/۶۷	
۱۵	۷/۵	۲/۵	
۱۷	۳/۷	۱/۲۳	
۲۶	۶/۲	۲/۰۷	
۲۷	۹	۲/۶۳	
۲۸	۵	۱/۶۷	
۳۰	۵/۳	۱/۷۷	
۴۴	۷/۲	۲/۴	
۵۰	۶	۲	

سیستهای تشکیل شده روی ریشه را شمردند. ایشان دریافتند سیست تبدیل شده بودند. در حالی که این میزان در واریته حساس چغندرقند در حدود ۱۵-۸ درصد بود. که در لاین منوتلوزومیک مقاوم تنها یک درصد لاروها به

هدف از مهندسی ژنتیک مقاومت به نماتد، ایجاد مقاومتی پایدار و مؤثر است که دامنه گستردگی از نماتدهای انگل گیاهی را کنترل کند. در هر مرحله از حمله نماتد به بافت ریشه گیاه می‌توان سیستم‌های دفاعی مختلفی طراحی و ژن‌های مؤثر را درون گیاه میزبان وارد کرد. چنین ژن‌های انتقالی به کمک مهارکننده‌های آنزیمی که مانع انجام فرایندهای فیزیولوژیک نماتد شوند، یا ترکیبات سمی که به مصرف نماتد برسند، یا ترکیباتی که به مولکول‌های پیام‌رسان متصل شوند، یا آنزیم‌هایی که با نماتد برهم‌کنش دهند، و یا موادی که سبب اختلال در ساختارهای تغذیه‌ای ویژه نماتد گردند، عمل می‌کنند (۶).

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در زمینه اثر ژن‌های *OF2* و *VAP* در کنترل نسبی نماتد سیستی، می‌توان یکی از مکانیزم‌های فوق را مسئول ایجاد مقاومت دانست. البته آزمایش‌های تکمیلی بیشتری برای تعیین اثر قطعی این ژن‌ها، و همچنین مکانیزم عمل آنها مورد نیاز است.

کای و همکاران (۲) ژن *Hs1<sup>pro-1</sup>* را با روش همسانه سازی موضعی (Positional cloning) از گونه وحشی *Beta procumbens* جدا، و پس از انتقال به چغندرقند حساس، ریشه‌های مویین مقاوم به نماتد سیستی ایجاد کردند. لاروهای این نماتد به ریشه‌های مقاوم و حساس چغندرقند حمله می‌کنند، ولی لاروهای ماده در گیاهان مقاوم قادر به تکمیل چرخه زندگی خود و تشکیل سیست حاوی تخم نیستند (۲).

مقایسه نتایج بررسی‌های حاضر با نتایج آزمایش‌های فوق نشان می‌دهد که در بعضی از ریشه‌های مویین تاریخته، نحوه و میزان بیان ژن *OF2* به گونه‌ای است که منجر به مقاومتی کامل در برابر لاروهای نماتد سیستی چغندرقند شده است. هم‌چنین، دیده می‌شود که درصد سیست‌های تشکیل شده در ریشه‌های مویین تاریخته مستقل برای هر یک از ژن‌های وارد شده متفاوت از یکدیگر هستند. یکی از دلایل احتمالی این تنوع، به اثر موقعیت مکانی (Position effect) ژن وارد شده در گیاه مربوط است.

#### منابع مورد استفاده

- Ballvora, A., J. Hesselbach, J. Newohner, D. Leister, F. Salamini and C. Gebhardt. 1995. Marker enrichment and high resolution map of the segment of potato chromosome VII harbouring the nematode resistance gene *Gro1*. Mol. Gen. Genet. 249: 82-90.
- Cai, D., M. Kleine, S. Kifle, H. J. Harloff, N. N. Sandal, K. A. Marcker, R. Klein-Lankhorst, E. M. J. Salentijn, W. Lange, W. Stiekema, U. Wyss, F. M. W. Grundler and C. Jung. 1997. Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. Sci. 275: 832-834.
- Concibido, V. C., D. Lauge, R. Denny, J. Orf and N. D. Young. 1997. Genome mapping of soybean cyst nematode resistance genes in "Peking", PI 90763, and PI 88788 using DNA markers. Crop Sci. 37: 258-264.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50(1): 151-158.
- Ganal, M. W. and S. D. Tanksley. 1996. Recombination around the *Tm2a* and *Mi* resistance genes in different crosses of *Lycopersicon peruvianum*. Theor. Appl. Genet. 92: 101-108.
- Gheysen, G., W. Van Der Eycken, N. Barthels, M. Karimi and M. Van Montagu. 1996. The exploitation of nematode-responsive plant genes in novel nematode control methods. Pestic. Sci. 47: 95-101.
- Jacobs, J. M. E. 1996. Mapping of resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis* from the wild potato species *Solanum vernei*. Molecular Breed. 2: 51-60.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
- Jung, C., D. Cai and M. Kleine. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. Trends in Plant Sci. 3: 266-271.

10. Kleine, M., H. Voss, D. Cai and C. Jung. 1998. Evaluation of nematode resistant sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines by molecular analysis. *Theor. Appl. Genet.* 97: 896-904.
11. Maniatis, T., E. F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY.
12. Paul, H., J. E. M. Deelen B. Henken, S. M. Bock, W. Lange and F. A. Krens. 1990. Expression *In vitro* of resistance to *Heterodera schachtii* in hairy roots of an alien monotelosomic addition plant of *Beta vulgaris*, transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *Euphytica* 48: 153-157.
13. Sandal, N. N., E. M. J. Salentijn, M. Kleine and D. Cai. 1997. Backcrossing of nematode-resistant sugarbeet: a second nematode resistance gene at the locus containing *Hs1<sup>Pro-1</sup>*. *Molecular Breed.* 3: 471-480.
14. Sasser, J. N. and D. W. Freckmann. 1987. Vistas on Nematology. Society of Nematologists, Hyattsville, USA.
15. Whitney, E. D. and E. Duffus. 1991. Compendium of Beet Diseases and Insects. The American Phytopathological Society Press, USA.