مجله علوم دانشگاه تهران
جلد سی‌ام (۱۳۸۳) شماره ۳ (۳۸۰-۳۶۷)

تراریزش گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) به کمک اگروباکتریوم با استفاده از ژن کیتیناز لوبیا

مسعود تو حید فر[۱]، بهزاد قره یاضی[۱] و مجتبی محمدی[۲]
[۱]کرج –پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی صندوق پستی ۱۸۹۷-۳۱۵۳۵
gtohidfar@yahoo.com
[۲] دانشکده کشاورزی کرج- گروه گیاهپزشکی ۱۱۶۷-۳۱۵۸۷
(دریافت: ۸۱/۲/۳۰ ؛ پذیرش:۸۲/۴/۴)

چکیده

بهینه سازی انتقال ژن کیتیناز (از لوبیا) به پنبه (*Gossypium hirsutum* L.) که باعث مقاومت به بیماری‌های قارچی ورتیسیلیوز و فوزاریوز می‌شود با کمک اگروباکتریوم و پلاسمید pBI121 بررسی شد. به منظور تهیه پلاسمید حاوی ژن کیتیناز(pBI121-BCH)، ابتدا قطعه یک کیلو بازی کیتیناز لوبیا (CHI) درمکان *Eco*RI اپران *lacZ* درناقل همسانه ساز pGEM–7Zf(+) همسانه مجدد شد. ژن کیتیناز(*chti*) الحاق شده متعاقباً با دو آنزیم برشی *Sac*I/*Xba*I هضم و درمکان همولوگ به وکتور باینری pBI121 متصل شد. دراین حالت، تظاهر ژن (*chti*) تحت کنترل مستقیم پیشبرذاتی 35S ویروس موزاییک گل کلم قرار گرفت. جهت ژن *chti* براساس الگوی بدست آمده دراثر هضم دوگانه مورد تأیید واقع شد. قطعات بافت هیپوکوتیل واریته‌های ساحل و کوکر پنبه با سه سویه C58، LBA4404 وEHA101 از*Agrobacterium tumefaciens* تیمار شدند. تمام سویه‌های باکتری دارای پلاسمید Ti و ناقل دوتاییpBI121 حاوی پروموتر CaMV35S و ژن کیتیناز لوبیا بودند. ریزنمونه‌های (محور زیر لپه) تیمار شده با باکتری به مدت ٤٨ ساعت درمحیط کشت کالوس‌زایی هم‌کشت شدند. بیشترین درصدکالوس‌ها (۸۷ درصد) و گیاهان مقاوم به کانامایسین (۶۸ درصد) مربوط به سویه LBA4404 بود. تجلی ژن *gus* در برگ رقم کوکر مؤید انتقال ژن بود. واکنش رنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که گیاهان فرضی تراریخته در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز و *nptII* را در ژنوم دارا هستند.

واژه‌های کلیدی: *اگروباکتریوم، پنبه (Gossypium hirsutum L.) باززایی، کیتیناز و تراریزش.*

مقدمه

بیماری پژمردگی پنبه یا ورتیسیلیوز (*Verticillium dahliae*) یکی از بیماری‌های مهم در مناطق پنبه خیز کشور ازقبیل استان‌های گلستان، فارس، خراسان، لرستان، آذربایجان، اصفهان و مرکزی می باشد. خسارت زیاد بیماری درمزارع پنبه شهرستان استهبان از استان فارس و مناطق کردکوی و بندرگز از استان گلستان عامل محدود کننده کشت ارقام پرمحصول و حساس به بیماری پژمردگی ورتیسیلیوز می‌باشد. کاهش محصول ناشی از تیپ برگ ریز این بیماری ۳۰-۲۰ درصد و در تیپ غیر برگ ریز، ۵۰-۱۰ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). درایران میزان خسارت تیپ SS4 ، ۲۰-۱۵ درصد برآورد شده است (حمدا...زاده، ۱۳۷۲). ضدعفونی خاک با گاز متیل بروماید یا مخلوط متیل بروماید و کلرو پیکرین به میزان زیاد و عمق زیاد و کشیدن ورقه پلاستیکی پلی‌اتیلن روی خاک می‌تواند موجب از بین رفتن عامل بیماری شود ولی هزینه این روش بسیار زیاد بوده و اثرات زیانباری نیز روی ارگانیسم‌های خاک در ناحیه ریزوسفر داشته و آلودگی محیط را نیز به همراه دارد. بنا براین، بهترین روش در کنترل پژمردگی ورتیسیلیوزی پنبه، (همانند آفات و بیماری‌های دیگر) استفاده از رقم متحمل یا مقاوم است. استفاده از روش‌های اصلاح نباتات سنتی تنها در سطح تلاقی‌های درون گونه‌ای کارآمد بوده و در استفاده از سایر منابع ژنتیک ناتوان می باشد. دستکاری‌های ژنتیک بوسیله انتقال ژن در پنبه به منظور ایجاد مقاومت در مقایسه با اغلب گیاهان پیشرفت نسبتاً زیادی داشته و این به خاطر مستعد بودن این گیاه برای دستکاری‌های ژنتیک می‌باشد. درمیان روش‌های انتقال ژن، استفاده از اگروباکتریوم در گیاهان دولپه‌ای مناسب ترین روش است. تاکنون از ریزنمونه محور زیرلپه و مریستم برای تهیه گیاهان تراریخته پنبه از طریق آلودگی با اگروباکتریوم استفاده شده است (Zapata *et al.*, 1998; Umbeck *et al.*, 1987; Perlak *et al.*, 1990; Firoozabadi *et al.*, 1987) . با توجه به اهمییت اقتصادی پنبه، ایجاد ارقام مقاوم به بیماری‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

آنزیم کیتیناز، از پروتئین‌های مربوط به بیماریزایی می‌باشد که پلیمر کیتین را با شکستن پیوندهای بتا- ۱و۴ که می‌تواند بصورت داخلی یا خارجی باشد به اولیگومرهای اِن - استیل‌گلوکوز امین، هیدرولیز می‌کند. کیتین عبارت از یک هموپلیمر خطی از اِن استیل - دی گلوکز آمین است که با پیوندهای بتا -۱ و ۴ به هم متصل شده‌اند. کیتین، یکی از اجزای مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌هایی از قبیل آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و دئوترومیست‌ها می‌باشد (Coling *et al.*, 1993). یاماماتو و همکاران (Yamamato *et al.*, 2000) گزارش کردند انگورهای تراریخته حاوی ژن کیتیناز کلاس یک،

مقاومت بالایی به سفیدک سطحی دارند. بروگلی و همکاران (Broglie *et al.*, 1991) توانستند یک ژن اگزوکیتینازی حاصل از باکتری *Serratia marcescens* را وارد ژنوم توتون کنند و بعدها مشاهده نمودند که ژن کیتیناز A ناشی از باکتری فوق توانایی ممانعت از رشد چندین قارچ زراعی از جمله *Rizoctonia solani* را دارد. در همین تحقیق گیاهچه‌های توتون تراریخته در خاک آلوده به *R. solani* کاشته شدند. پس از ۱۵ روز ۸۰ درصد گیاهان حامل ژن کیتیناز باقی مانده ولی از گیاهان شاهد ۳۰-۲۰ درصد زنده ماندند.

طی آزمایش‌هایی که بر روی بادام زمینی تراریخته حاوی ژن کیتیناز تحت کنترل پیشبر CaMV35S انجام شد مشخص گردیده است که رشد قارچ لکه برگی (*Cercospora arachidicola*) درمقایسه با شاهد بطور معنی داری کاهش یافته است (Rohin and Shankara , 2001).

این پژوهش به منظوربهینه سازی انتقال ژن‌های گزارشگر *gus* و کیتیناز (مقاومت به ورتیسیلیوز) به پنبه با استفاده از آگروباکتریوم انجام شد.

مواد و روش‌ها:

۱- *ساخت پلاسمید* pBI121-BCH

به منظور ساخت پلاسمید حاوی ژن کیتیناز **(pBI121-BCH)** ابتدا پلاسمید حاوی ژن کیتیناز لوبیا (ZENECA MOGEN Lab) با نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سیلین وپلاسمید pGEM (-7z) (Cinna Gen p76-07C) حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی سیلین و ژن *lacZ′* با *Eco*RI برش داده شدند. به منظور جلوگیری از عمل خود اتصالی، پلاسمید(pGEM(-7z پس از برش دفسفره شد(Sambrook, 1987). قطعه مربوط به ژن کیتیناز و پلاسمید(pGEM(-7z از روی ژل آگارزجدا شد. سپس قطعه جدا شده به پلاسمید(pGEM(-7z متصل شد. پلاسمیدهای نوترکیب که دارای نشانگر مقاومت به آمپی‌سیلین بودند به باکتری *E.Coli* سویه XLI-Blue (Cinna Gen B76-05C) منتقل شدند. ارزیابی باکتری‌های نوترکیب از طریق غیرفعال شدن ژن *lacZ′* بود. نوترکیب‌ها از طریق عدم توانایی سنتز بتاگالاکتوزیداز شناسایی شدند. جهت ژن در نوترکیب‌ها با استفاده از آنزیم *Sma*1 (در ابتدای ژن و محدوده‌ای در پلاسمید) بررسی شد. با استفاده از آنزیم‌های *Sac*1/*Xba*1 ژن کیتیناز از وکتور pGEM (-7z) جدا و در وکتور pBI121 (شکل۱) قرار گرفت. پلاسمید pBI121 حاوی ژن *gus* باپیشبر ویروس موزائیک گل کلم (CaMV35S) و ژن *nptII* با پیشبر Nos به عنوان ژنهای نشانگر می‌باشد.

۳۷۰ ـــــــ

واحد آنزیم DNA پلیمراز، ۲۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم پرایمر، ۲/۵ میکرولیتر dNTP (یک میلی مولار)، ۳/۳ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱۵ میلی مولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰X انجام گرفت. واکنش در۹۳ درجه سانتیگراد ۲ دقیقه و۴۰ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در۹۴ درجه، یک دقیقه در۶۲ درجه برای ژن کیتیناز و ۵۵ درجه برای ژن*nptII* و سه دقیقه در۷۲ درجه سانتیگراد انجام گرفت) و تکمیل بسط در۷۲ درجه ۵ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بوسیله دوربین پولارویـد عکس برداری گردید.

وجود ژن از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده گردید. ابتدا با توجه به توالی نوکلئوتیدی ژن کیتیناز و *nptII* با استفاده از برنامه نرما فزاری Oligo(USA) چهار آغازگر اختصاصی برای دوانتهای ´5 و ´3 طرا حی گردید.

کیتیناز رو به جلو **3´** -´GAGTGGTGTGGATGCTGTTG- **5´**

معکوس **5´** – ACGAACCTCAGCCAATACCG- ´**3´**

NPTII رو به جلو **3´** -´GAACAAGATGGATTGCACGC - **5´**

معکوس **5´** - GAAGAACTCGTCAAGAAGGC - ´**3´**

نتـــایج

۱- انتخاب کالوس‌های تراریزش شده

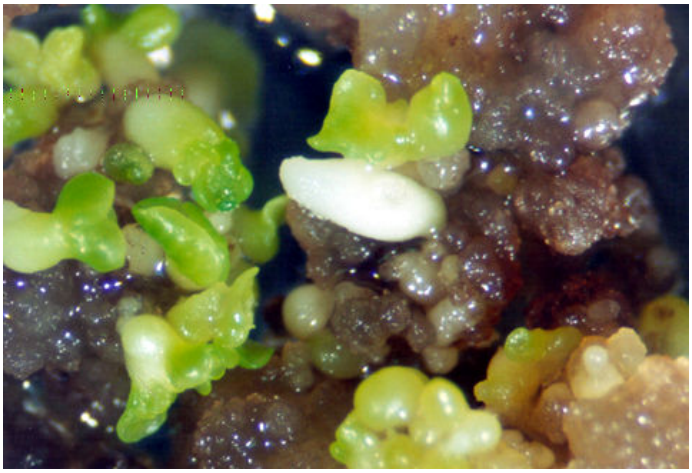
برای حذف باکتری‌ها از سه نوع آنتی‌بیوتیک استفاده شد. مشاهدات حاصل نشان داد که آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده بهتر می‌تواند رشد باکتری‌ها را کنترل کند. در همین تحقیق مشخص شد که کاربرد سویه۱۰۱ EHA آلودگی شدید نمونه‌ها را به همراه داشت. بطوریکه سبب از بین رفتن ریزنمونه‌ها گردید. شستشوی نمونه‌ها درمحلول آب مقطر استریل حاوی غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم یا ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم به مدت یک ساعت یا از ترکیب سفوتاکسیم به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر و وانکومایسین به میزان ۵۰ میلی‌گرم در لیتر توانست فعالیت باکتری را کنترل نماید، و باعث حذف واکشت گردید. سویه‌های LBA4404 و C58 آلودگی کمتری در محیط کشت ایجاد نمودند. بدلیل وجود کانامایسین پس از ۸ هفته ریز نمونه‌هایی که غیرتراریخته بودند قهوه‌ای گشته و از بین رفتند و تنها کالوس‌های تراریخته قادر به ادامه حیات بودند(شکل۲). هشت

۳۷۲ ـــــــ

۲- باززایی کالوس‌های انتخاب شده

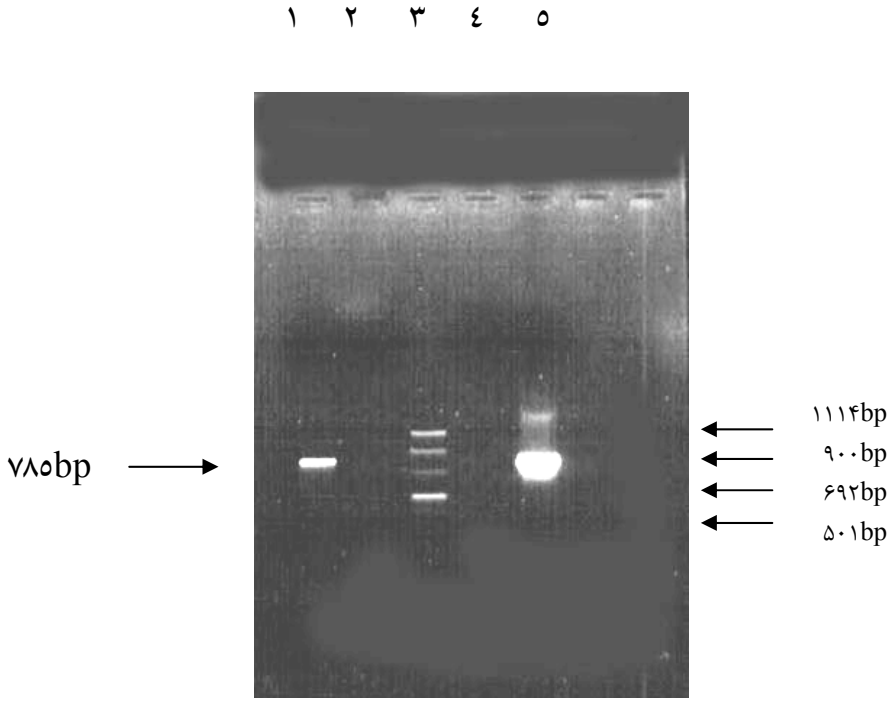
دراین مرحله کالوس‌های تراریخته احتمالی به محیط کشت انتخابی جنین‌زایی و جوانه‌زنی سوماتیکی انتقال یافتند. کالوس‌های گرانوله، کرم رنگ و شکننده جنین‌های سوماتیکی تولید کردند این جنین‌ها از نظر شکل و اندازه با هم فرق داشتند با وجود اینکه اندازه کالوس‌های منتقل شده به محیط باززایی کوچک بود، اما از یک قطعه کالوس رقم کوکرچندین جنین سوماتیکی که حاوی دو برگ بودند حاصل می‌شد (شکل۳) که این امر به دلیل قدرت خوب باززایی رقم کوکر ۳۱۲ و کیفیت خوب کالوس‌های انتخاب شده بود. در رقم ساحل جنین‌زایی سوماتیکی مشاهده نشد، لذا باززایی هم در آن صورت نگرفت.

جوانه‌زنی جنین‌های سوماتیکی در رقم کوکر با تشکیل ریشه های به طول دو میلی‌متر یا شاخه‌های بیش از سه میلی‌متر آغاز شد. طویل شدن برگچه‌ها یا قبل از آغاز ریشه‌دهی یا همراه با ریشه‌دهی بود.



شکل۳- جنین‌های سوماتیکی حاصل از رویش کالوس‌های جنین زا درمحیط انتخابی

۳۷۴ ـــــــ



شکل۵-- آنالیز PCR برای پنبه‌های تراریخته به منظور تشخیص ژن *nptII* با آغازگرهای اختصاصی

۱- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه‌های تراریخته

۲- محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA(کنترل منفی)

۳- نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (نشانگرVIII=1114bp, 900bp, 692bp, 501bp.....)

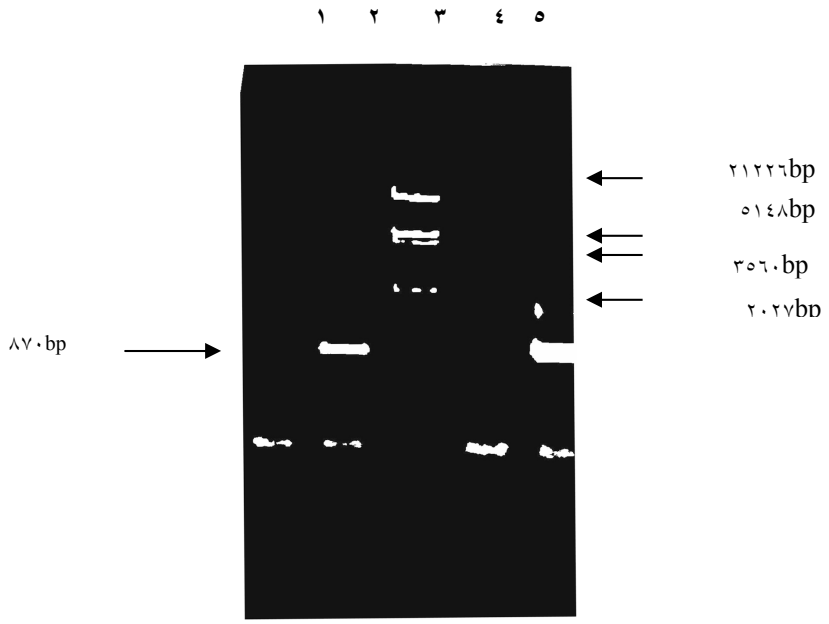
۴- محصول PCR برای DNAژنومی پنبه فاقد ژن *nptII*

۵-محصول PCR برای DNA پلاسمید pBI121 حاوی ژن *nptII* (کنترل مثبت).

در این پژوهش کارایی سویه‌های EHA105, LBA4404 و C58حاوی وکتور دوگانه‌ی pBI121 بمنظور استفاده در تراریزش پنبه مورد مقایسه قرارگرفتند. میزان تراریزش از طریق درصد جنین‌ها یا گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین و بر اساس رشدکالوس برگ‌ها در محیط انتخابی حاوی کانامایسین محاسبه شدند. جدول۲ نتایج حاصل از این مطالعه را نشان می‌دهد. همانگونه که درجدول۲ ملاحظه می‌گردد. با توجه به تعداد محدود نمونه استفاده شده در این آزمایش درصد گیاهان مقاوم به کانامایسین درسویه LBA4404 نسبت به بقیه سویه‌ها بیشتر بود.

۳۷۶ ـــــــ

تعدادی از جنین‌های جوانه زده در محیط انتخابی شاخه تولید کردند. ولی بقیه بتدریج از بین رفتند. شکل۷ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گیاهان تراریخته ا حتمالی رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین را از نظر وجود ژن کیتیناز همراه با شاهد مربوطه را نشان می‌دهد. عدم وجود بند درشاهد بدون دی. ان. آ حاکی از این است که هیچ آلودگی در کار نبوده است. وجود بند ۸۷۰ جفت بازی مربوط به ژن کیتیناز نشا ن دهنده این مطلب است که گیاهان تراریخته احتمالی در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن کیتیناز را دارا می‌باشند.



شکل۷ - نتایج PCR برای پنبه های تراریخته به منظور تشخیص ژن کیتینازبا آغاز گرهای اختصاصی

۱-محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۱۵

۲-محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه تراریخته شماره ۲۶

۳- محصول PCR برای DNA ژنومی پنبه فاقد ژن کیتیناز

۴- نشانگر مولکولی تعین اندازه DNA (Marker III)

۵-محصول PCR برای مخلوط مادری بدون الگو DNA (کنترل منفی)

۶-محصول PCR برای DNA پلاسمید pCH18 حاوی ژن کیتیناز(کنترل مثبت)

۳۷۸ ـــــــ

از آنجا که تراریزش در برخی از جنین‌های جوانه زده صورت گرفت می‌توان امیدوار بود که با همین روش و یا روش‌های دیگر جنین‌های سوماتیکی و نیز استفاده از سویه‌های دیگر اگروباکتریوم که بافت پنبه نسبت به آ نها مستعدتر باشد بتوان رویان‌های تراریخته و در نهایت گیاه پنبه تراریخته بدست آورد.

بطورکلی، اصلاح پنبه با استفاده از کشت بافت جهت دستکاری ژنتیکی، به سهولت باززایی بستگی دارد و سهولت باززایی تحت تاثیر ژنوتیپ می‌باشد، واغلب ژنوتیپ‌ها ی مهم ایران دارای پتانسیل باززایی پائینی هستند، لذا استراتژی بلند مدت باید در جهت انتقال صفت جنین‌زایی سوماتیکی به ارقام زراعی باشد. بنابراین افزایش ژنتیکی پتانسیل باززایی ارقام پنبه ایرانی همراه با بهینه کردن روش‌های انتقال ژن جهت استفاده معمول این روش در اصلاح پنبه ضروری بوده و پیشنهاد می‌گردد که در اولویت‌های تحقیقاتی آینده این گیاه قرار بگیرد. از آنجائیکه اغلب ژنوتیپ‌های زراعی پنبه پتانسیل باززایی پائینی دارند و دستکاری‌های ژنتیکی درآنها مشکل می باشد، بهینه سازی باززایی از طریق کشت مریستم که وابسته به ژنوتیپ نمی‌باشد و مدت زمان باززایی را کاهش می‌دهد مناسب به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از موسسه تحقیقات پنبه کشور بخاطر در اختیار گذاردن بذور مورد نیاز و جناب آقای دکتر ملبوبی از مرکز ملی مهندسی ژنتیک بخا طر در اختیار گذاردن پلاسمید سپاسگزاری می‌گردد.

References

Broglie, K., Chet, I., Holliday, M., Robert, C., Biddle, P., Knolton, S., Mauvais, C.J., and Broglie, R. (1991) *Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia Solani*. Science. **254,** 1194-1197.

Colling, D.B., Kra, K.M., Kragh., K.M., Mikkelsen, J.D., Nilson, K.K., Rasmussen, UR., and Vad, K. (1993) *Plant chitinase*. The Plant Journal, **3,** 31-40.

Donaldson , P.A., and Simmonds, D.H. (2000) *Susceptibility to Agrobacbacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short-season soybean*. Plant Cell Rep, **19,** 478-484.

Firoozabadi, E., Debeer, D., Melo, D., Halk, E., and Murray, E. (1987) *Transformation of cotton (Gossypium hirsutum) by Agrobacterium tumefaciens and regeneration of transgenic plant*. Molecular Biology, **10,** 105-116.

Jefferson, RA. (1987) *Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system*. Plant Mol Biol Rep, **5,** 387-405.

۳۸۰ ـــــــ