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

پیمان نوروزی[۱]، دگوان کای[۲]، محمد علی ملبوبی[۳] و بهمن یزدی صمدی[٤]

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 ناقلین گیاهی قابل بیان منتقل گردیدند. برای این منظور، ژن OF2 پس از جدا سازی، درون T-DNA ناقل دوگانه pAM194 در پایین‌دست پروموتر ذاتی CaMV35S و نیز درون T-DNA ناقل دوگانه pBin121 تغییر یافته در پایین‌دست پروموتر القایی ژن $Hs1^{pro-1}$ (ژن مسؤل ایجاد مقاومت به نماتد سیستی) قرار گرفت. ژن VAP نیز پس از جدا سازی از همسانه اولیه، در T-DNA پلاسمید pAM194 در پایین‌دست پروموتر 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 پلاسمید به آگروباکتریوم ریزوژنز سویه AR15834 جداگانه منتقل شدند و پس از آن، جداکشت دم‌برگ گیاه چغندرقند با آگروباکتری تلقیح شد. ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی، پس از تأیید اولیه با روش رنگ‌آمیزی GUS و یا PCR، به منظور بررسی مقاومت با لارو 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، مؤسسهٔ علوم گیاهی و اصلاح نباتات، دانشگاه کیل آلمان
۳. دانشیار زیست‌شناسی مولکولی، مرکز ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و تکنولوژی زیستی تهران
٤. استاد اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

مقدمه

نماتدهای بیماری‌زای گیاهی همه ساله به شمار بسیاری از گیاهان زراعی آسیب می‌رسانند، که هزینه جبران آن بسیار زیاد است (۱٤). مهم‌ترین نماتدهای گیاهی از جنس ملوییدوجاین (*Meloidogyne*)، گلوبودرا (*Globodera*) و هتترودرا (*Heterodera*) هستند، که مواد مغذی گیاه را پس از ایجاد ساختارهای تغذیه‌ای ویژه جذب می‌کنند (۱۳).

حدود ۲۹ گونه نماتد از ۱٦ جنس می‌توانند انگل چغندرقند باشند. کاهش عملکرد چغندرقند در اثر نماتدها حدود ۱۰ درصد برآورد شده، که نماتد سیستی (*Heterodera schachtii*) چغندرقند مسئول کاهش بیش از ۹۰ درصد این مقدار است، و به عنوان مهم‌ترین عامل بیماری‌زای چغندرقند در جهان شناخته شده است (۱۵). گیاه چغندرقند هیچ مقاومتی بر علیه نماتد سیستی ندارد (۱۳).

چرخه زندگی نماتد سیستی به چهار مرحله لاروی تقسیم می‌شود. لارو این نماتد به ریشه گیاه میزبان حمله کرده، درون استوانه آوندی تشکیل ساختارهای تغذیه‌ای خیلی اختصاصی به نام سینسیتیوم (Sincytium) می‌دهد. سینسیتیوم از سلول‌های بی‌شماری تشکیل شده است که پروتوپلاست آنها به یکدیگر متصل‌اند. نماتدها می‌توانند بر بیان ژن‌های موجود در سلول‌های تغذیه کننده 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 تناوب 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 می‌شوند. برای مثال، واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive response) منجر به نکروزه شدن موضعی سریع، افزایش فعالیت پراکسیدازی و رسوب 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 چغندرقند) 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 سیب 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 چغندرقند در گونه‌های زراعی جنس *Beta* یافت نمی‌شوند، و تنها منبع مقاومت در گونه‌های وحشی آن است (۹). ژن‌های مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند از خزانه ژنی گونه‌های وحشی جنس *Beta* به درون لاین‌های اصلاحی وارد شده‌اند (۱۰). مقاومت به نماتد سیستی در چغندرقند 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 تلاقی‌های بین گونه‌ای و تولید لاین‌های جا به جایی (Translocation lines) به چغندرقند انتقال یافته‌اند (۲ و ۱۳). گیاهان به دست آمده مقاوم به نماتد هستند، ولی خصوصیات زراعی خوبی ندارند. بنابراین، برای حذف اثر ژن‌های مجاور،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

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 قبلاً به کمک نشانگر مولکولی AFLP (Amplified fragment length polymorphism) و سیستم دو هیبریدی (Two-hybrid system) به ترتیب همسانه (Clone) شده بودند (D. Cai, Personal communication)، به درون ناقل دوگانه بیان شونده گیاهی انتقال یافتند. سازه‌های (Constructs) جدید به کمک آگروباکتریوم ریزوژنز (*Agrobacterium rhizogenes*) به بافت گیاهی چغندرقند منتقل شدند، و مقاومت به نماتد سیستی در ریشه‌های مویین تراریخته (Transformed) ارزیابی گردید.

کشت باکتری و استخراج پلاسمید

باکتری‌های *E. coli* حامل پلاسمید pGEMT easy دربردارنده ژن‌های *OF2* و *VAP* (D. Cai, Personal communication) در ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB (۱۱) به همراه ۵۰ میلی‌گرم 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 از آنزیم‌های *Eco*RI و *Xba*I، و برای جدا سازی ژن *VAP* از پلاسمید pGEMT easy از آنزیم *Eco*RI استفاده گردید. برای تعیین غلظت مناسب آنزیم *Eco*RI از یک سری غلظت آنزیمی ۱/۵، ۳، ٦ و ۱۲ واحد آنزیمی در ۲۰ میکرولیتر حجم کلی واکنش و نیز زمان هضم ۱۵ دقیقه به جای یک ساعت استفاده شد. ولی برش با *Xba*I به روش معمول با غلظت کامل آنزیم و زمان هضم یک ساعت انجام گرفت. دمای واکنش هضم آنزیمی ۳۷ °C بود.

جدا سازی و خالص سازی قطعات برش یافته از ژل

پس از الکتروفورز محصولات هضم آنزیمی پلاسمیدها در ژل آگارز یک درصد در بافر TAE (۱۱) با ولتاژ ٦۰، 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 *Eco*RI و پلاسمید pBin121 تغییر یافته با آنزیم *Xba*I 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 مخلوط 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 10xSAP (Shrimp alkaline phosphatase)، ٤۰ میکرولیتر آب 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 کلروفورم (۱۱)

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

استفاده شد.

اتصال (Ligation) ژن‌های *OF2* و *VAP* درون ناقلین 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 pBin121 تغییر یافته با آنزیم لیگاز (Ligase) مخلوط، و در دمای ۱٦ ºC برای یک شب نگه‌داری شد.

تهیه سلول‌های پذیرنده از *E. coli*

برای این کار کشت شبانه باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ با محیط 2YT (۱۱) رقیق شده، و ادامه کشت در ۳۷ ºC در شیکر دورانی ۲۰۰ دور در دقیقه برای دو ساعت انجام شد تا OD_{550} به حدود ۰/۵ رسید. سپس سلول‌های باکتری در ۳۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در ٤ ºC سانتریفوژ، و سپس در ۱۰ میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار تعلیق شده، روی یخ به مدت حداقل یک ساعت نگه‌داری شدند. مجدداً نمونه‌ها در ٤ ºC، به مدت ۱۰ دقیقه با ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ، و در یک میلی‌لیتر کلرید کلسیم ۲۰ میلی‌مولار تعلیق گردیدند. 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 میلی‌گرم در لیتر کانامایسین پخش، و محیط کشت در انکوباتور ۳۷ ºC برای یک شب، به منظور تشکیل کلونی نگه‌داری شدند.

کشت تک‌کلونی و استخراج DNA پلاسمیدی

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

هضم آنزیمی پلاسمیدهای استخراج شده

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

آزمون PCR برای پلاسمیدهای نوترکیب

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

Floxf2: in 5' UTR of *OF2* gene: 5' CCTCCTAGCCTCTTGTAATTCTAGC 3'
3NR13: in ORF of *OF2* gene: 5' GGCTACCGCGTTTGTTAGTTTGAATG 3'
FloxR: in 3' UTR of *OF2* gene: 5' GAATGGAAACAAGCAACATATGATATC 3'
5R13: in ORF of *OF2* gene: 5' GAACTGAATAGCTGGGTTTGCACC 3'
F2BVAP: in ORF of *VAP* gene: 5' GTTGGAAATTCAATCAAAACCTGC 3'
FLVAP: in ORF of *VAP* gene: 5' GACTTCAAATACGCTAAATGTTTT 3'
35S: in CaMV35S promoter: 5' CAATCCCACTATCCTTCGAACGTC 3'
1832DKT1: in $Hs1^{pro-1}$ promoter: 5' CCAATTCGCGGTACAATCTAGAGC 3'

شرایط PCR شامل یک سیکل ۹٤ ºC برای سه دقیقه، سپس ۳۵ سیکل [یک دقیقه ۷۲ ºC ، یک دقیقه ۵۵ ºC ، یک دقیقه ۹٤ ºC]، و سپس ۷۲ ºC به مدت ۱۰ دقیقه بود.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

انتقال پلاسمیدهای دوگانه به آگروباکتریوم ریزوژنز

برای این کار از روش انجماد 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 $37\ ^{o}C$ به مدت پنج دقیقه ذوب شدند. بدین ترتیب پلاسمید وارد آگروباکتری گردید.

تلقیح بافت‌های گیاهی با آگروباکتریوم ریزوژنز و تولید ریشه‌های مویین

در این مرحله، جداکشت‌های دم‌برگ با سلول‌های آگروباکتریوم ریزوژنز حامل پلاسمیدهای دوگانه pAMOF2، pBinOF2 و pAMVAP دربردارنده ژن‌های *OF2* و *VAP*، در سه سری تراریختی مستقل به شرح زیر به کار رفتند. عمل تلقیح جداکشت‌ها با کشت شبانه آگروباکتری‌های نوترکیب به مدت پنج دقیقه انجام گرفت. سپس جداکشت‌ها به محیط B_5 (٤) منتقل و برای مدت دو روز کشت توأم انجام شد. در این دوره، امکان انتقال ژن از باکتری به سلول‌های گیاهی فراهم گردید.

سنجش فعالیت آنزیم GUS و انجام PCR

برای تأیید حضور ژن‌های *OF2* و یا *VAP*، که در مجاورت gene 35S-GUS بودند، از روش رنگ‌آمیزی GUS در ریشه‌های مویین بر طبق روش جفرسون (۸) استفاده شد. برای تأیید حضور ژن‌های *OF2*، که در مجاورت GUS gene– $Hs1^{pro-1}$ قرار داشتند، روش PCR با آغازگر مربوط به ژن GUS به کار رفت.

تلقیح ریشه‌های مویین با لارو نماتد و بررسی مقاومت

ریشه‌های مویین تراریخته از هر سه سری تراریختی، نخست تکثیر، و سپس قطعات ریشه مویین با ٦–۸ تکرار در ظروف پتری کشت شدند. حدود ۳۰۰ لارو نماتد سیستی یک هفته سن بر طبق روش پائول و همکاران (۱۲) در مجاورت ریشه‌های 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 غلظت‌های مختلف به کار رفته آنزیم *Eco*RI برای هضم پلاسمیدها و جدا سازی ژن کامل *OF2* و یا *VAP*، با افزایش غلظت آنزیم از ۱/۵ به ۱۲ واحد آنزیمی، حالت گرادیان در قطعات مختلف ژنی ایجاد شد، که نشانه تأیید پلاسمیدها از نظر ژن‌های همسانه شده بود. هم‌چنین، غلظت مناسب آنزیم برای ایجاد نوار مورد انتظار، که همان قطعه کامل ژن‌های همسانه شده است، تعیین گردید.

در این آزمایش، غلظت سه واحد آنزیمی در ۲۰ میکرولیتر حجم کلی واکنش انتخاب، و با استفاده از ۱۵ واحد آنزیمی در ۱۰۰ میکرولیتر حجم واکنش، محصول زیادی از قطعه کامل ژن‌ها به دست آمد. در مورد هضم آنزیمی ژن‌های *OF2* و یا *VAP* با غلظت کامل آنزیم *Eco*RI، 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 *Eco*RI وجود داشت. بنابراین، پس از عمل برش نیازی به جدا سازی یک نوار خاص از سطح ژل نبود، و عمل دفسفریله کردن مستقیماً در باقی‌مانده مخلوط واکنش آنزیمی انجام گرفت. دفسفریله کردن ناقل پلاسمیدی برای جلوگیری از اتصال دوبارهٔ دو انتهای آن در هنگام اتصال با ژن‌های مورد همسانه است.

در مورد ناقل pBin121 تغییر یافته، نخست باید cDNA مربوط به ژن $Hs1^{pro-1}$ به کمک آنزیم *Xba*I از آن خارج می‌شد، و روی ژل آگارز یک قطعه کوچک ۱/۲ کیلوباز، که معرف

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

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 تراریختی محصولات آن در باکتری *E. coli* برای تأیید حضور ژن‌های *OF2* و *VAP* در پلاسمید pAM194 از هضم آنزیمی با *Eco*RI، و برای تأیید حضور ژن در پلاسمید pBin121 تغییر یافته از هضم آنزیمی با *Xba*I استفاده گردید. با توجه به حضور یک ناحیه برش *Eco*RI در 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 *Xba*I ، قطعه کوچک تولید شده نشانه ژن کامل *OF2* با اندازه مورد انتظار بود. هم‌چنین، 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 پروموتری و یا درون ORF (Open reading frame) 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 پلاسمید pAM194)، pAM-FLVAP یا به اختصار pAMVAP (ترکیب ژن *VAP* با پلاسمید pAM194) و pBin-FLOxF2R.2 یا به اختصار pBinOF2 (ترکیب ژن *OF2* با pBin121 تغییر یافته) تهیه شد. با انتقال این پلاسمیدها به آگروباکتریوم ریزوژنز و سپس تراریختی گیاه، اثر ژن‌های *OF2* و *VAP* با توجه به نوع پروموتر آنها در ایجاد مقاومت به نماتد چغندرقند ارزیابی گردید.

تولید ریشه‌های مویین، سنجش فعالیت آنزیم GUS و آزمون PCR

پس از ۱۰ روز از آغاز تلقیح 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 تراریختی مربوط به سه پلاسمید دوگانه پس از سه هفته از آغاز کشت شمارش گردیدند (جدول ۱).

رنگ‌آمیزی ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی با pAMOF2 و pAMVAP با محلول رنگ‌آمیزی GUS، نشان داد که به ترتیب ۳۳ و ۳۸ درصد از ریشه‌های مویین تراریخته هستند، و حامل T-DNA مربوط به ناقل‌های دوگانه مذکور می‌باشند (جدول ۱)، و رنگ آبی را در محل‌های مختلف ریشه نشان می‌دهند (شکل٤). تراریخته بودن ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی با pBinOF2، که ژن GUS در مجاورت پروموتر القایی $Hs1^{pro-1}$ 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 تراریختی حامل ژن GUS هستند (جدول ۱ و شکل ۵).

تلقیح ریشه‌های مویین با لارو نماتد و بررسی مقاومت

پس از گذشت ۱۰ روز، چند سیست نماتد، که آخرین مرحله تکامل لاروهای ماده هستند، روی ریشه‌های مویین تلقیح شده با لارو نماتد تشکیل گردید. با شمارش این سیست‌ها و مقایسه آنها مشخص شد که شماری از ریشه‌های مویین از هر یک از سه سری تراریختی، دارای مقاومت نسبی به خسارت نماتد در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی هستند (جداول ۲، ۳ و ٤).

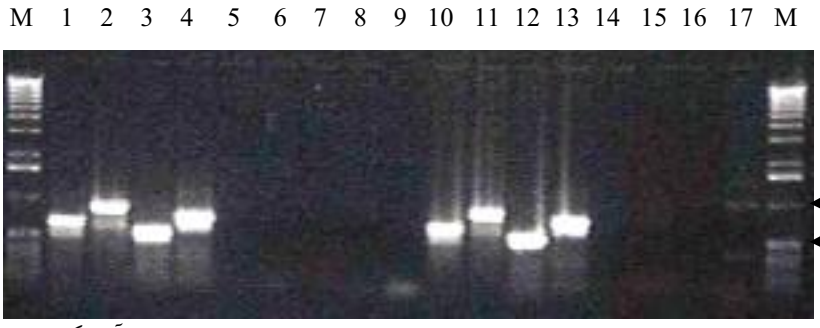
[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

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

نام پلاسمید	شمار جداکشت	درصد ریشه‌های مویین به شمار جداکشت	درصد ریشه‌های مویین GUS^+	درصد ریشه‌های مویین PCR^+
pAMOF2	۲۸۰	٦٥	۳۳	NA
pBinOF2	۲۸۰	٥٠	NA	۲٥
pAMVAP	۲۸۰	۳٥	۳۸	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 پروموتر CaMV35S

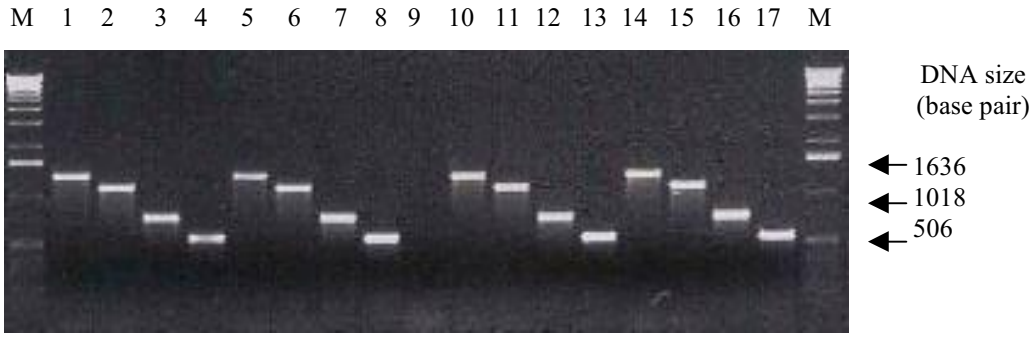
M : نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)

۱. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای 35S, 5R13
۲. محصولPCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای 35S, FLOxR
۳. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای FLOxF2, 5R13
٤. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگرهای FLOxR , FLOxF2
٥. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMOF2 با آغازگر- ,35S (اولین کنترل منفی)
٦. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر- ,FLOxF2 (دومین کنترل منفی)
۷. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر FLOxF2 , ــ (سومین کنترل منفی)
۸. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید PAMOF2 با آغازگر 5R13 , ــ (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 ۱-۸

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 پروموتر القایی ژن $Hs1^{pro-1}$، نسبت به ژن *OF2* در مجاورت پروموتر ذاتی CaMV35S، اثر قوی‌تری در کنترل لاروهای نماتد داشته است. به طوری که در برخی از ریشه‌های مویین تراریخته BinOF2 هیچ سیستی تشکیل نشده، و این ریشه‌ها از تکامل طبیعی لارو نماتد به سیست کاملاً جلوگیری کرده‌اند.

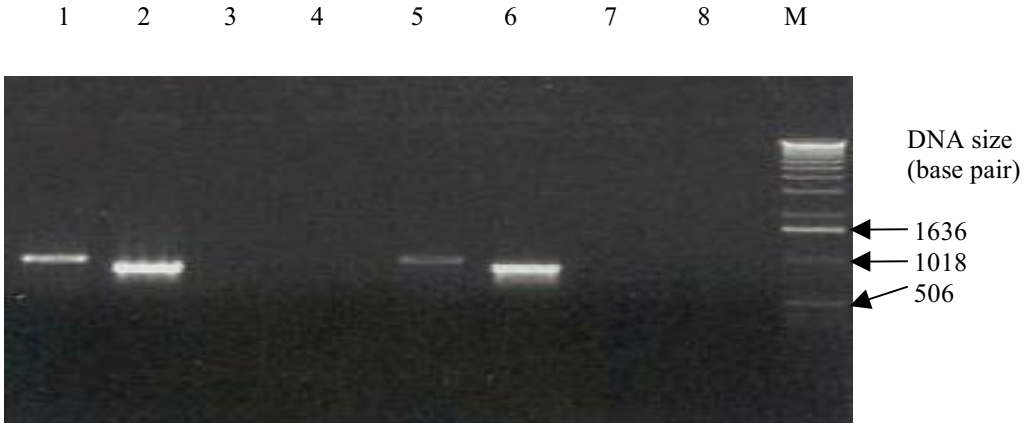
در مورد اثر ژن *VAP* بر لارو نماتد، به نظر می‌رسد که ریشه‌های مویین تراریخته AMVAP، در مقایسه با شاهد منفی، حداکثر تا ۵۲ درصد توانسته‌اند از تشکیل سیست جلوگیری کنند. پائول و همکاران (۱۲) برای تأیید توارث پذیری صفت مقاومت به نماتد سیستی چغندرقند، از روش تراریختی با کمک آگروباکتریوم ریزوژنز استفاده کردند. بدین ترتیب که یک واریته چغندرقند حساس به نماتد و یک لاین چغندر منوتلوزومیک (Monotelosomic) حامل ژن 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،

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]



شکل ۲. نتایج PCR چهار نمونه پلاسمید نوترکیب pBin-FLOxF2R.2 یا به اختصار pBinOF2 با آغازگرهای مختلف برای تأیید همسو بودن جهت ژن *OF2* در مجاورت پروموتر $Hs1^{pro-1}$

M : نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)
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
٤. 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 ستونهای ۱-٤
۹. محصول PCR برای Master Mix واکنش PCR بدون DNA الگو (کنترل منفی)
۱۰ تا ۱۳. محصولات PCR برای نمونه سه پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستونهای ۱-٤
۱٤ تا ۱۷. محصولات PCR برای نمونه چهار پلاسمید pBinOF2 با آغازگرهای به کار رفته به ترتیب در ستونهای ۱-٤



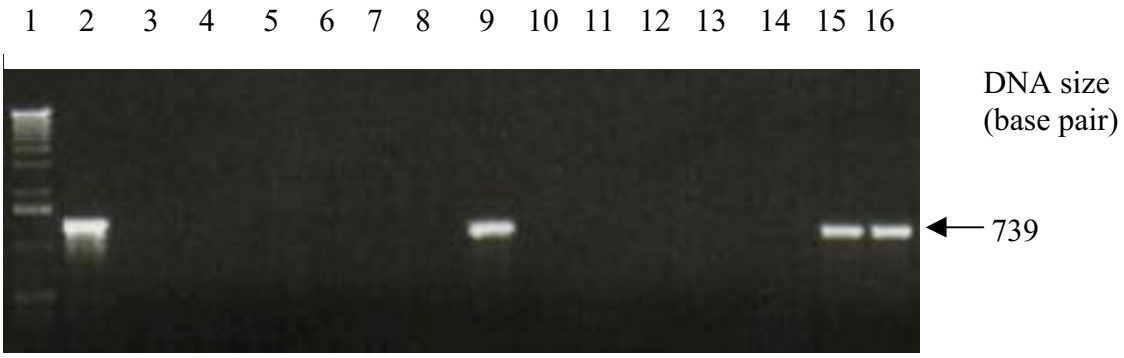
شکل ۳. نتایج PCR دو نمونه پلاسمید نوترکیب pAM-FLVAP یا به اختصار pAMVAP با آغازگرهای مختلف برای تأیید همسو بودن جهت ژن *VAP* در مجاورت پروموتر CaMV35S

M : نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)
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 --, F2BVAP (اولین کنترل منفی)
٤. محصول PCR برای نمونه یک پلاسمید pAMVAP با آغازگر FLVAP , -- (دومین کنترل منفی)
۵ تا ۸. محصولات PCR برای نمونه دو پلاسمید pAMVAP به کار رفته به ترتیب در ستونهای ۱-٤

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]



شکل ٤. ریشه‌های مویین تراریخته حامل ژن GUS با پروموتر CaMV35S پس از رنگ‌آمیزی. لکه‌های آبی در ریشه‌های مویین بیان ژن GUS را نشان می‌دهند.



شکل ٥. نتایج آزمون PCR برای ریشه‌های مویین تراریخته BinOF2 برای تشخیص ژن GUS

١. نشانگر مولکولی تعیین اندازه DNA (1KB ladder)
٢. محصول PCR برای DNA پلاسمید pAM194 (کنترل مثبت)
٣. محصول PCR برای DNA ژنومی ریشه مویین فاقد ژن GUS (اولین کنترل منفی)
٤. محصول PCR برای Master Mix بدون DNA الگو (دومین کنترل منفی)
٥ تا ٩. محصول PCR برای DNA های ژنومی ریشه‌های مویین حاصل از تراریختی سری BinOF2

جدول ٢. نتایج شمارش سیست‌های نماتد روی ریشه‌های مویین چغندرقند تراریخته AMOF2، پس از ١٠ روز از آغاز تلقیح با لارو نماتد

شمار ریشه‌های مویین تراریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماتد روی ریشه‌های مویین	درصد سیست‌های تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده
فاقد ژن *OF2* (شاهد منفی)	٧/٧	٢/٥٧
١٣	٥	١/٦٧
١٨	٦/٢	٢/٠٧
٢٠	٦/٣	٢/١٠
٢٢	٣/٣	١/١٠
٢٧	٢/٣	٠/٧٧
٣٧	١/٣	٠/٤٣
٤٣	٢/٣	٠/٧٧
٤٤	١/٨	٠/٦
٥٣	٥/٣	١/٧٧
٥٥	٥/٧	١/٩٠

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

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

شمار ریشه‌های مویین تراریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماتد روی ریشه‌های مویین	درصد سیست‌های تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده
فاقد ژن *OF2* (شاهد منفی)	۷/۷	۲/۵۷
٦	۲	۰/٦۷
۱۳	۳/۵	۱/۱۷
۱۹	۰	۰
۲۹	۲/۵	۰/۸۳
۳۱	۱/۵	۰/۵
۳۲	۵	۱/٦۷
۳۳	۰/۵	۰/۱۷
۳۹	۰/۵	۰/۱۷
٤۰	۰/۵	۰/۱۷

جدول ٤. نتایج شمارش سیست‌های نماتد روی ریشه‌های مویین چغندرقند تراریخته AMVAP، پس از ۱۰ روز از آغاز تلقیح با لارو نماتد

شمار ریشه‌های مویین تراریخته مستقل	میانگین شمار سیست نماتد روی ریشه‌های مویین	درصد سیست‌های تشکیل شده به لاروهای تلقیح شده
فاقد ژن*VAP* (شاهد منفی)	۷/۷	۲/۵۷
۸	۷/۵	۲/۵
۱٤	۵	۱/٦۷
۱۵	۷/۵	۲/۵
۱۷	۳/۷	۱/۲۳
۲٦	٦/۲	۲/۰۷
۲۷	۹	۲/٦۳
۲۸	۵	۱/٦۷
۳۰	۵/۳	۱/۷۷
٤٤	۷/۲	۲/٤
۵۰	٦	۲

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

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

کای و همکاران (۲) ژن $Hs1^{pro-1}$ 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 چغندر 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 ریشه های مویین تراریخته، 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 تراریخته 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.

هدف از مهندسی ژنتیک مقاومت به نماتد، ایجاد مقاومتی پایدار و مؤثر است که دامنه گسترده‌ای 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 (٦).

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش حاضر در زمینهٔ 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.

منابع مورد استفاده

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: ß–glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6: 3901-3907.
9. Jung, C., D. Cai and M. Kleine. 1998. Engineering nematode resistance in crop species. Trends in Plant Sci. 3: 266-271.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]

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 containig $Hs1^{Pro-1}$. 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.

[Downloaded from jstnar.iut.ac.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.24763594.1382.7.3.17.5]