هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی
جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران، پژوهشگاه نیرو
The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep., 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran

تأیید مولکولی توارث پایدار ژن ایجاد کننده مقاومت از طریق پلنتی‌بادی از نسل T_0 به F_1 در گیاهان دورگه چغندرقند تراریخت مقاوم به بیماری ریزومانیا

*حمیده مردانی مهرآباد[۲و۱]، فرشته مشیری[۵و۱]، بهاره زارع[۱]، نگین پژوم شریعتی[۱]، محمدعلی ملبوبی[۱]، علیرضا گل‌نراقی[۳]، پیمان نوروزی[۴]
[۱]پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، بلوار پژوهش، اتوبان کرج، تهران؛ [۲]گروه بیماری شناسی گیاهی، [۳]گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران؛ [۴]مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، کرج؛ [۵]گروه بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه فردوسی مشهد
h_mardanimehrabad@yahoo.com

چکیده

بیماری ویروسی ریزومانیا که عامل آن ویروس رگبرگ‌زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV[1]) می‌باشد، از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند بوده و سالانه خسارات زیادی را به عملکرد این محصول وارد می‌سازد. در تحقیق پیش‌رو، با استفاده از فناوری مهندسی آنتی‌بادی‌های نوترکیب و بیان آنتی‌بادی در گیاهان اقدام به تولید گیاهان مقاوم به ویروس BNYVV در نسل T_0 گردید. توارث پایدار ژن رمزکننده پلنتی‌بادی تک‌زنجیره (ScFV) بر علیه پروتئین پوششی (CP 21) پاتوتیپ A ویروس BNYVV، از نسل T_0 به T_1 با استفاده از آزمون‌های پی‌سی‌آر و لکه گذاری سادرن، و بیان ژن مورد نظر توسط آزمون وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. همچنین زیست‌سنجی همسانه‌های حاصل از لاین‌های تراریخت چالش داده شده با ویروس BNYVV، توسط آزمون الایزا انجام شد. بر اساس نتایج آزمون‌های فوق، هفت لاین تراریخت A_2، B_4، B_7، B_8، B_{12}، B_{13} و SF برای بررسی‌های بیشتر انتخاب گردیدند. گیاهان این لاین‌ها (نسل T_0) با گیاهان چغندرقند نرعقیم تلاقی داده شدند و از آن‌ها بذرگیری به عمل آمد. گیاهان دورگه حاصل از این بذور (نسل F_1) از نظر حضور ژن عامل مقاومت توسط آزمایش لکه گذاری سادرن مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج، بیانگر حضور ژن ScFV در تعدادی از گیاهان نسل F_1 بود که این امر نشان‌دهنده انتقال تراژن از نسل T_0 به F_1 و در نتیجه مؤید توارث پایدار آن می‌باشد.

کلمات کلیدی: چغندرقند، BNYVV، پلنتی‌بادی، دورگه، توارث پایدار

[1] *Beet necrotic yellow vein virus*

مقدمه

گیاه چغندرقند (*Beta vulgaris* L.) از گیاهان مهم زراعی- صنعتی می‌باشد که به دلیل دارا بودن مقادیر فراوان شکر یا ساکارز در ریشه‌های خود از اهمیت اقتصادی قابل توجهی برخوردار می‌باشد (Harju, 2003). بیماری ویروسی ریزومانیا یکی از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند می‌باشد که در اکثر مناطق چغندرقندکاری کشور مشاهده گردیده است (Farzadfar et al., 2007). میزان خسارت این بیماری اغلب از ۳۰ درصد تجاوز کرده و گاهی به ۱۰۰ درصد می‌رسد (Scholten & Lange, 2000). عامل این بیماری، ویروس رگبرگ‌زرد نکروتیک چغندرقند (BNYVV)، عضو تیپ جنس *Benyvirus*، می‌باشد (Rush et al., 2006). این ویروس توسط قارچ خاکزاد *Polymyxa beta* Keskin از شاخه Plasmodiophoromycota انتقال می‌یابد که اسپورهای استراحتی آن تا حدود ۳۰ سال در خاک باقی می‌مانند. بنابراین روش‌های کنترل معمول در مورد این بیماری کاربرد زیادی ندارد (Abe and Tamada, 1986). امروزه یکی از امیدبخش‌ترین راهبردها برای کنترل بیماری‌های ویروسی، فناوری مهندسی آنتی‌بادی‌های نوترکیب و بیان آنتی‌بادی در گیاهان می‌باشد (Goldbach et al., 2003). این راهبرد به صورت موفقیت‌آمیز جهت ایجاد گیاهان چغندرقند مقاوم به پاتوتیپ A، شایع‌ترین پاتوتیپ (Farzadfar et al., 2005) عامل بیماری ویروسی ریزومانیا در کشور مورد استفاده قرار گرفته است (Pajoum-Shariaty, 2005). در این تحقیق، گیاهان مقاوم به پاتوتیپ A ویروس BNYVV با استفاده از فناوری مهندسی آنتی‌بادی‌های نوترکیب و بیان آنتی‌بادی در نسل T_0 تولید و توارث پایدار ژن ایجاد کننده مقاومت (ScFV، تهیه شده در برابر پروتئین پوششی مربوط به پاتوتیپ A ویروس BNYVV) از نسل T_0 به F_1 در گیاهان چغندرقند دورگه مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، ژن رمزکننده پلنتی‌بادی تک‌زنجیره (ScFV) بر علیه پروتئین پوششی (CP21) پاتوتیپ A ویروس BNYVV همسانه‌سازی گردید. این ژن به حامل گیاهی منتقل شده و گیاه چغندرقند به وسیله اگروباکتریوم تراریخت گردید. ۲۰ لاین تراریخت احتمالی، حاوی سازه ScFV-cp21 برای مطالعه بیشتر مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور تأیید حضور ژن ScFV-cp21 انتقالی در ژنوم سلول‌های لاین‌های فوق، آزمون لکه گذاری سادرن برای همسانه‌های بدست آمده از گیاهان تراریخت احتمالی انجام گرفت. برخی از این لاین‌ها جهت تأیید بیان ژن مورد نظر با آزمون وسترن بلات بررسی شدند. آزمایش‌های زیست‌سنجی نیز از طریق چالش گیاهان تراریخت با ویروس BNYVV و توسط آزمون الایزا انجام شد. تکرارهای مناسب از طریق همسانه‌سازی گیاهان تراریخت در شرایط کشت استریل حاصل شدند. این گیاهان با آزمون‌های پی‌سی‌آر و لکه گذاری سادرن برای حضور ژن مورد نظر بررسی گردیدند. به منظور تولید بذور نسل F_1، ابتدا گیاهان لاین‌های تراریخت مذکور (نسل T_0) به همراه گیاهان غیر تراریخت تیپ وحشی (Wild Type) نر عقیم (لاین CMS، موسسه اصلاح بذر چغندرقند) به مدت ۱۰ هفته در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سردخانه با شرایط نوری ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس انطباق تدریجی در اتاقک رشد قابل برنامه ریزی با افزایش روزانه ۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. گیاهان در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی پس از حدود ۲ هفته وارد فاز زایشی شدند. در این مرحله هر یک از لاین‌ها به همراه یک والد نر عقیم با استفاده از چادرهای گرده افشانی تا پایان دوره گرده افشانی ایزوله شدند و بذر گیاهان دورگه تراریخت (نسل F_1) جمع آوری شد. بذور F_1 بدست آمده استریل گردیده و در محیط کشت استریل، کشت گردیدند. گیاهچه‌های استریل F_1 در مرحله رشدی مناسب، پس از گذراندن دوره سازگاری به گلدان منتقل شدند. سپس، جهت تأیید توارث پایدار سازه ScFV-cp21 از نسل T_0 به F_1، آزمون لکه گذاری سادرن بر روی گیاهان نسل F_1 لاین‌های تراریخت A_2، B_4، B_7، B_8، B_{12}، B_{13} و SF، و با استفاده از پروب نشاندار ژن ScFV-cp21 انجام گرفت. به منظور انجام آزمون لکه گذاری سادرن ابتدا DNA ژنومی از بافت برگی این گیاهان استخراج گردید (Delaporta ، ۱۹۸۳). آزمون لکه گذاری سادرن مطابق با دستورالعمل کیت DIG DNA detection and labeling

kit (شرکت Roche) صورت گرفت. پس از انجام مراحل دورگ‌سازی و شستشوهای مربوطه در شرایط انتخاب سخت، غشاء با استفاده از NBT/BCIP رنگ آمیزی شد. برای کمی کردن شدت رنگ لکه‌ها، از نرم‌افزار Total lab1.1 (شرکت Phoretix) استفاده شد. با مقایسه تفاوت داده‌های مربوط به گیاه WT (کنترل منفی) و گیاهان نسل F_1، حضور سازه ScFV-cp21 در آن‌ها بررسی شد. به این ترتیب، گیاهانی که داده حاصل از لکه مربوط به آن‌ها بیشتر از داده مربوط به لکه گیاه WT (کنترل منفی) بود به عنوان تراریخت در نظر گرفته شدند که این امر مؤید حضور ژن مورد نظر در این گیاهان می‌باشد.

نتایج و بحث

از بین ۲۰ لاین تراریخت احتمالی و حاوی سازه ScFV-cp21، تعداد ۱۱ لاین در آزمون لکه گذاری سادرن از نظر شدت رنگ لکه با نمونه های WT (غیر تراریخت) تفاوت نشان دادند. برخی از این لاین‌ها جهت تأیید بیان ژن با آزمون وسترن بلات بررسی شدند که در حداقل ۴ لاین نتایج بدست آمده مؤید بیان پروتئین مورد نظر بود. آزمایش‌های زیست‌سنجی با قرار دادن گیاهان تراریخت در خاک آلوده به ویروس و سپس عصاره گیری از ریشه آن‌ها و با آزمون الایزا انجام شد. این گیاهان با آزمون پی‌سی‌آر و لکه گذاری سادرن برای حضور ژن مورد نظر، بررسی و مورد تایید قرار گرفتند (جدول۱). با توجه به جدول ۱ همسانه‌های تهیه شده از لاین‌های SF، A_2، B_7، B_8 و B_{12} همگی توانستند با آزمون لکه گذاری سادرن حضور نسخه یا نسخه‌هایی از ژن مورد نظر را نشان دهند. همچنین مقاومت به ویروس BNYVV پس از انجام آزمون الایزا بر روی عصاره ریشه آلوده به ویروس BNYVV، تنها در گیاهان لاین‌های SF، B_7 و B_8 مورد تأیید قرار گرفت. تکرارهای حاصل از گیاهان لاین‌های A_2 و B_{12} همگی حساس تشخیص داده شدند که احتمالاً به دلیل عدم بیان کافی ژن مورد نظر در آن‌ها می‌باشد. در همسانه‌های حاصل از لاین‌های B_4 و B_{13} نتایج متنوعی حاصل شده است. به نظر می‌رسد شرایط محیطی و فیزیولوژیکی گیاهان در حال رشد، مرحله رشدی، طول دوره آلودگی و یا تنوع ژنتیکی احتمالی همسانه‌های مختلف یک لاین در بروز نتایج متنوع مؤثر باشد. بررسی انتقال صفت ایجاد شده و میزان پایداری بیان قطعه دریافت شده، در نسل بعدی حاصل از آمیزش گیاهان تراریخت با گیاه نرعقیم (لاین CMS) منوط به انجام آزمایش‌های فوق در نسل F_1 بود. داده‌های جدول ۲ خلاصه نتایج آزمون لکه گذاری سادرن روی همسانه‌های لاین‌های تراریخت گیاهی A_2، B_4، B_7، B_8، B_{12}، B_{13} و SF در نسل F_1 را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، کلیه لاین‌های مورد نظر در نسل F_1 با آزمون لکه گذاری سادرن توانستند حداقل در یک تکرار حضور ژن مورد نظر را تأیید نمایند. بدیهی است به دلیل هتروزیگوسیتی ژن وارد شده پس از دگرگشنی، نتاج غیرتراریخت نیز حاصل شوند. در مجموع نتایج حاصل از این آزمون بیانگر حضور ژن ایجاد کننده مقاومت در تعدادی از گیاهان نسل F_1 بود. حضور ژن در گیاهان نسل F_1 نشان دهنده انتقال ژن از نسل T_0 به F_1 و مؤید توارث پایدار ژن ایجاد کننده مقاومت در این گیاهان می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری برای در اختیار قرار دادن امکانات، و از دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران برای فراهم نمودن زمینه این پژوهش تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع و مراجع مورد استفاده

Abe, H. Tamada, T. 1986. Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Plomyxa betae* Keskin. *Annual Phytopathological Society of Japan* 52: 235-247.

Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A. R., and Ahoonmanesh, A. 2005. First report of *Beet virus Q* on sugar beet in Iran. *Plant Disease* 89:1359.

Farzadfar, Sh., Pourrahim, R., Golnaraghi, A.R. and Ahoonmanesh, A., 2007. Surveys of *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil-borne virus*, *Beet virus Q* and *Polymyxa betae* in sugar beet fields in Iran. *Journal of Plant Pathology* 89: 277-281.

Goldbach Rob, Bucher Etiene, Prins Marcel., 2003. Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus research* 92: 207-212.

Harju, V. 2003. Protocol for the diagnosis of quarantine organism *Beet necrotic yellow vein virus*. Virology teams Plant Health 6 and Plant Health 2, Central Science Laboratory, Sand Hutton, York YO41 1LZ UK.

Pajoum Shariaty,N., Malboobi, M. A., Arababi, M., Lohrasebi, T., Zamani K. 2005. Transfer of single-chain antibody fragment (ScFv) specific for *Beet necrotic yellow vein virus* coat protein to sugar beet. 4th National Biotechnology Congress, 15-17 Aug., Kerman, Iran.

Rush, C.M., Liu, H.Y., Lewellen, R.T. and Acosta-Leal, R., 2006. The continuing saga of Rhizomania of sugar beets in the United States. *Phytopathology* 90: 4-15.

Scholten, O.E., and Lange, W., 2000. Breeding for resistance to rhizomania in sugar beet, a review *Euphytica* 112: 219-231.

جدول ۱: خلاصه نتایج ارزیابی گیاهان تراریخت شده احتمالی با ژن ScFV-cp21 در نسل T_0

لاین	ارزیابی لکه گذاری سادرن*	ارزیابی الایزا
SF	++	مقاوم یا متحمل
A_2	++	حساس
B_4	+ و -	متحمل یا حساس
B_7	++	مقاوم
B_8	+	متحمل
B_{12}	++	حساس
B_{13}	+ و -	مقاوم یا حساس

*شدت رنگ ۵ به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. لکه‌هایی که شدت رنگ آن‌ها بیشتر از ۱۰ بود + و لکه‌هایی که شدت رنگ آن‌ها از ۵۰ بیشتر بود با ++ نشان داده شده‌اند که احتمالاً حضور نسخه یا نسخه‌هایی از ژن ScFV-cp21 را نشان می دهند.

جدول ۲: توزیع نتاج تراریخت و غیرتراریخت بر اساس نتایج لکه گذاری سادرن در نسل F_1

لاین	تکرار	ارزیابی لکه گذاری سادرن	
		تراریخت	غیر تراریخت
SF	2	1	1
A_2	2	1	1
B_4	8	5	3
B_7	1	1	-
B_8	4	2	2
B_{12}	7	5	2
B_{13}	7	4	3

The 7th National Biotechnology Congress of I.R. Iran
12-14 Sep , 2011, Niroo Research Institute, Tehran, Iran
هفتمین همایش ملی بیو تکنولوژی جمهوری اسلامی ایران
زمان: ۲۱ تا ۲۳ شهریورماه ۱۳۹۰
مکان: تهران، پژوهشگاه نیرو

Molecular confirmation of the stable inheritance of a plantibody-encoding gene from T_0 to F_1 generations in hybrid transgenic sugar beet plants resistant to rhizomania disease

*Mardani Mehrabad H.[1,2], Moshiri F.[1,5], Zare B.[1], Pajoom Shariati N.[1], Malboobi M. A.[1], Golnaraghi A. R.[3], Norouzi P.[4]

[1]National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran. [2]Department of Plant Pathology; [3]Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran 14515-775, Iran. [4]Sugar Beet Seed Institute, Karaj, Iran. [5]Department of Plant Biotechnology, College of Agriculture and Natural Resources, Ferdowsi University of Mashhad
h_mardanimehrabad@yahoo.com

Rhizomania disease, caused by *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV), is one of the most important diseases in sugar beet that produce high yield losses to this crop annually. In the present work, we produced BNYVV-resistant sugar beet plants in the T_0 generation by the recombinant antibodies engineering technology and expression of plantibody. The stable inheritance of a gene encoding single chain monoclonal antibody (ScFV) against coat protein (CP21) of pathotype A of BNYVV from T_0 to T_1 gnenerations was confirmed by using PCR and dot-blotting methods as well as western blot assays to detect gene expressions. Also, bioassays of the cloned plants of transgenic lines, challenged by BNYVV, were performed by ELISA technique. Based on the results of the above investigations, seven transgenic lines, named A_2, B_4, B_7, B_8, B_{12}, B_{13} and SF, were selected for further studies. These plants (T_0) were crossed with cytoplasmically male sterile plants to produce hybrid seeds. The hybrid progenies (F_1) were examined by southern blotting. The presence of the transgene in F_1 plants confirmed stable heredity of the gene responsible for resistance in some of these hybrid plants, which indicate the stable inheritance of the transgene from T_0 to F_1 generation.

Key words: Sugar beet, BNYVV, plantibody, hybrid, stable inheritance