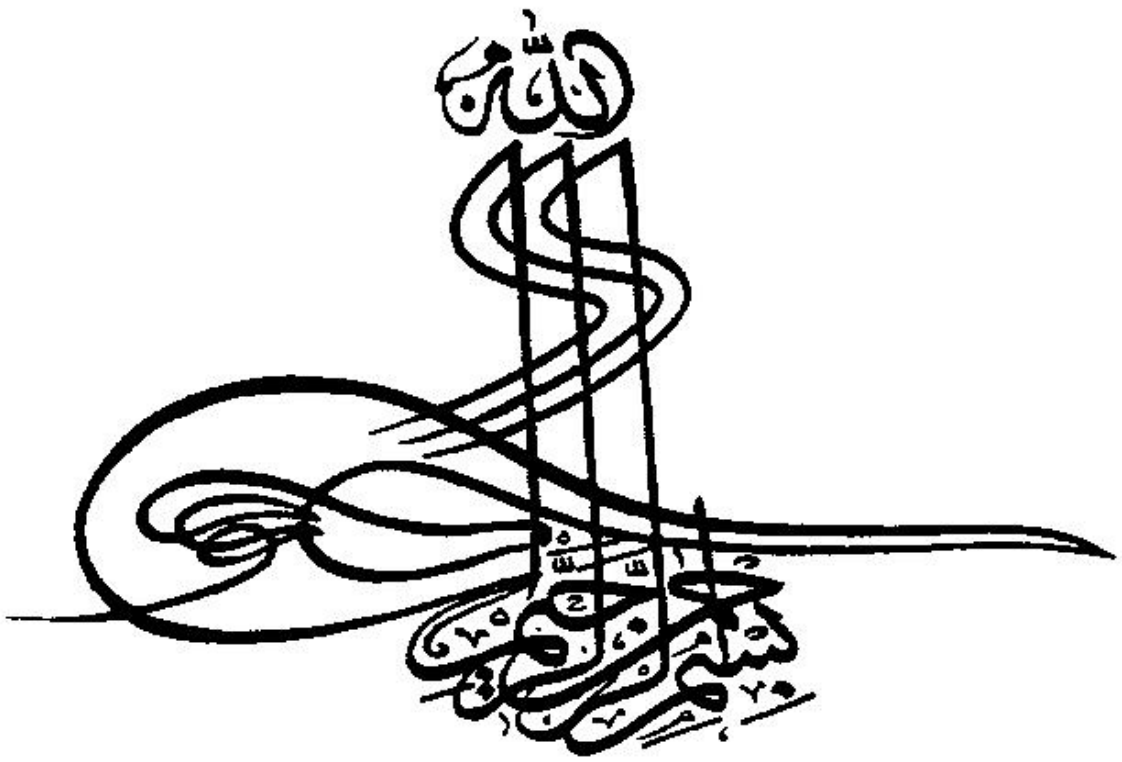

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
دانشکده علوم زراعی
گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M. Sc)
رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی

موضوع:

جداسازی و همسانه‌سازی ژن رمزگردان PGIP (Polygalacturonase Inhibiting Protein) از گیاه خربزه وحشی (*Cucumis melo* var. *agrestis*) و انتقال آن به آرابیدوپسیس

استاد راهنما:
دکتر حمید نجفی زرینی
دکتر علی دهستانی کلاگر

دانشجو:
شقایق جدی یزدان‌آباد

بهمن ۱۳۹۱

تقدیم به:

پیشگاه امام سجده‌کننده بر تربت کربلا

حضرت سجاد علیه‌السلام

و

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری
کشاورزی طبرستان

کلیه هزینه این پروژه توسط

پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان

تامین و پرداخت گردید.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول- مقدمه **۱**

فصل دوم- کلیات و بررسی منابع

۲-۱- زیان‌های ناشی از بیماری‌های گیاهی **۳**

۲-۲- گونه خربزه (*Cucumis melo*.L)، اهمیت و بیماری‌های آن **۳**

۲-۲-۱- خربزه وحشی (*Cucumis melo* var. *agrestis*) **۴**

۲-۳- آرابیدوپسیس **۵**

۲-۴- بیماری‌های قارچی و اهمیت آنها **۶**

۲-۴-۱- قارچ‌های بیماریزای گیاهی و خصوصیات آنها **۷**

۲-۴-۲- ساختار دیواره سلول‌های قارچی **۷**

۲-۴-۳- تشخیص قارچ و گیاه توسط یکدیگر **۸**

۲-۵- مکانیزم های دفاعی گیاهان در برابر پاتوژن‌های قارچی **۸**

۲-۵-۱- مکانیزم‌های دفاعی فعال قبل از حمله پاتوژن **۹**

۲-۵-۱-۱- دیواره سلولی گیاه **۹**

۲-۵-۲- مکانیزم‌های دفاعی بعد از نفوذ پاتوژن **۱۰**

۲-۵-۲-۱- مقاومت سیستمی اکتسابی **۱۰**

۲-۵-۲-۲- ایجاد واکنش‌های فوق حساسیت **۱۰**

۲-۵-۲-۳- تولید ترکیبات بیوشیمیایی بازدارنده **۱۱**

۲-۶- هوموگالاکتورونان (HGA) **۱۴**

۲-۷- آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز **۱۵**

۲-۸- پروتئین‌های ممانعت کننده از فعالیت آنزیم پلی گالاکتوروناز (*PGIP*) **۱۷**

۲-۸-۱- عمکرد *PGIP* در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک **۱۷**

۲-۸-۲- قدرت تشخیص PGIP **۱۸**

۲-۸-۳- ژن‌های کدکننده PGIP **۱۹**

۲-۸-۴- مکانیسم تنظیمی ژن‌های *PGIP* **۲۴**

۲-۸-۵- توالی‌های تکراری غنی از لوسین در پروتئین‌هایPGIP **۲۵**

۲-۸-۶- نقش PGIP در دفاع علیه قارچ‌های پاتوژنیک **۲۶**

۲-۹- جداسازی و مطالعهٔ ژن‌های مقاومت **۲۶**

۲-۹-۱- مهندسی مقاومت به بیماری‌ها **۲۷**

۲-۹-۲- مزایای انتقال ژن **۲۸**

۲-۹-۳- گیاهان مقاوم به آفات و بیماری‌ها **۲۹**

۲-۹-۳-۱- سطح زیر کشت محصولات تراریخته **۲۹**

۲-۱۰- روش تولید گیاهان تراریخته **۳۱**

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۱۰-۱- سیستم‌های انتقال زیستی ۳۱
۲-۱۰-۱-۱- انتقال ژن به سلول‌های گیاهی ۳۱
۲-۱۰-۱-۲- طبقه بندی آگروباکتریوم ۳۲
۲-۱۰-۱-۳- دامنه میزبانی آگروباکتریوم ۳۴
۲-۱۰-۱-۴- ساختار مولکولی پلاسمیدهای Ti و Ri ۳۴
۲-۱۰-۱-۵- ژن‌های تومورزا و ژن‌های ریشه‌زا ۳۴
۲-۱۰-۱-۶- وقایع مولکولی دخیل درانتقال T-DNA ۳۵
۲-۱۰-۱-۷- انتقال ژن بواسطه آگروباکتریوم (استراتژی و روش ها) ۳۸
۲-۱۰-۱-۸- استفاده از پلاسمید Ti و Ri برای انتقال ژن‌های جدید به سلول‌های گیاهی ۳۸
۲-۱۰-۱-۹- اجزای T-DNA تغییریافته ۳۹
۲-۱۰-۱-۱۰- روش‌های تراریختی با استفاده از آگروباکتریوم ۳۹
۲-۱۰-۲- سیستم‌های انتقال فیزیکی ۴۰
۲-۱۰-۲-۱- تفنگ ژنی ۴۰
۲-۱۰-۲-۲- پلی اتیلن گلیکول (PEG) ۴۱
۲-۱۰-۲-۳- لیپوزوم‌ها ۴۱
۲-۱۰-۲-۴- الکتروپوریشن ۴۱
۲-۱۰-۲-۵- فیبرهای سیلیکون-کاربید ۴۲
۲-۱۰-۲-۶- ریزتزریقی ۴۲
۲-۱۰-۲-۷- الکتروفورز ۴۲
۲-۱۰-۲-۸- خشکی ۴۳
۲-۱۱- روش‌های تائید تراریختی ۴۳
۲-۱۱-۱- هیبریداسیون ساترن ۴۳
۲-۱۱-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۳
۲-۱۱-۳- ژن‌های نشانگر ۴۳
۲-۱۱-۳-۱- استفاده از ژن‌های نشانگر گزینشگر ۴۴
۲-۱۱-۳-۲- استفاده از ژن‌های گزارشگر ۴۴
۲-۱۲- بتا گلوکورونیداز یا (β Glucuronidase) *GUS* ۴۴
۲-۱۳- همسانه سازی ژن ۴۵
۲-۱۴- cDNA ۴۶

فصل سوم- مواد و روش‌ها

۳-۱- کشت و شرایط رشد خربزه وحشی ۴۸
۳-۲- کشت و شرایط رشد آرابیدوپسیس ۴۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۳- طراحی آغازگر ۴۹
۳-۳-۱- تهیه استوک‌هایی با غلظت ۱۰pmol/µl از آغازگرهای رفت و برگشت ۴۹
۳-۴- استخراج RNA کل ۴۹
۳-۴-۱- تیمار RNA با آنزیم DNase ۵۰
۳-۴-۲- بررسی کیفیت RNA استخراج شده ۵۱
۳-۴-۲-۱- الکتروفورز ۵۱
۳-۴-۲-۲- اسپکتروفوتومتری ۵۱
۳-۵- سنتز cDNA ۵۲
۳-۶- تکثیر ژن PGIP ۵۲
۳-۷- همسانه‌سازی ژن درپلاسمید pGEM –T Vector ۵۴
۳-۷-۱- تهیه محیط کشت باکتری ۵۴
۳-۷-۱-۱- محیط کشت LB مایع ۵۴
۳-۷-۱-۲- محیط کشت LB - آگار ۵۴
۳-۷-۱-۳- محیط کشت انتخابی LB - آگار حاوی x-gal-IPTG و آمپی‌سیلین ۵۴
۳-۷-۲- تهیه سلول‌های مستعد ۵۵
۳-۷-۳- همسانه‌سازی محصولات PCR در پلاسمید pGEM –T Vector ۵۶
۳-۷-۴- اتصال قطعه DNA موردنظر به وکتور توسط آنزیم T4 DNA Ligase ۵۶
۳-۷-۵- تراریخته کردن سلول مستعد ایشرشیاکلای توسط محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی ۵۸
۳-۸- Colony PCR برای تایید تراریختی باکتری ۵۹
۳-۹- استخراج DNA پلاسمیدی با روش شکست قلیایی(سامبروک) ۶۰
۳-۱۰- تعیین توالی ژن PGIP ۶۱
۳-۱۱- ساخت سازه‌ی پلاسمیدی به منظور انتقال ژن PGIP به گیاه ۶۱
۳-۱۱-۱- هضم آنزیمی محصول PCR و ناقل PBI121 جهت همسانه‌سازی ۶۱
۳-۱۱-۲- مراحل واکنش Ligation ۶۲
۳-۱۱-۲-۱- انتخاب نسبت قطعه به ناقل ۶۲
۳-۱۱-۲-۲- آماده سازی مخلوط اتصال ۶۲
۳-۱۱-۳- تهیه سلول‌های مستعد از *E. coli* (DH5α) ۶۲
۳-۱۱-۴- تراریخته‌کردن سلول مستعد توسط محصول اتصال با استفاده از روش شوک حرارتی ۶۳
۳-۱۱-۵- تائید مولکولی محصولات همسانه‌سازی ۶۳
۳-۱۱-۵-۱- بررسی کلونی‌های مقاوم با PCR ۶۴
۳-۱۱-۵-۲- روش هضم آنزیمی ۶۴
۳-۱۲- انتقال ناقل‌های نوترکیب به سلول‌های اگروباکتریوم ۶۴

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۱۲-۱- آماده سازی سلول‌های مستعد اگروباکتریوم ۶۴
۳-۱۲-۲- ترانسفورماسیون سویه اگروباکتریوم GV_{3101} ۶۵
۳-۱۳- تهیه محیط تلقیح و تراریخت‌سازی گیاهان آرابیدوپسیس ۶۵
۳-۱۳-۱- رشد اگروباکتریوم و تهیه محیط تلقیح ۶۵
۳-۱۳-۲- تراریخته‌سازی گیاهان آرابیدوپسیس به روش فرو بردن گیاهچه ۶۶
۳-۱۳-۳- انتخاب گیاهان بالقوه تراریخت و انتقال آنها به اتاقک رشد ۶۶
۳-۱۴- استخراج RNA کل ۶۷
۳-۱۴-۱- تیمار RNA با آنزیم DNase ۶۸
۳-۱۴-۲- بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده ۶۸
۳-۱۴-۲-۱- الکتروفورز ۶۸
۳-۱۴-۲-۲- اسپکتروفوتومتری ۶۸
۳-۱۵- سنتز cDNA ۶۹
۳-۱۶- آزمون گیاهان تراریخت با RT- PCR ۶۹

فصل چهارم- نتایج

۴-۱- استخراج DNA ۷۱
۴-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و DNA ژنومیک ۷۱
۴-۳- استخراج RNA ۷۲
۴-۳-۱- بررسی RNA پس از حذف DNA ۷۳
۴-۴- ساخت cDNA و تکثیر ژن PGIP ۷۳
۴-۵- استخراج DNA از روی ژل آگارز و خالص‌سازی محصول PCR ۷۴
۴-۶- همسانه‌سازی ژن ۷۴
۴-۷- آزمون Colony PCR ۷۴
۴-۸- بررسی بیوانفورماتیک توالی ژن PGIP جدا شده از خربزه وحشی ۷۵
۴-۸-۱- توالی نوکلئوتیدی ژن *PGIP* ۷۵
۴-۸-۲- توالی اسیدآمینه‌های آنزیم ممانعت‌کننده از فعالیت پلی‌گلاکتوروناز قارچی ۷۶
۴-۸-۳- محاسبه فراوانی نوکلئوتیدی توالی ژن PGIP با نرم‌افزار BioEdit ۷۶
۴-۸-۴- محاسبه فراوانی اسیدآمینه توالی پروتئینی PGIP با نرم‌افزار BioEdit ۷۷
۴-۸-۵- انطباق توالی چندتایی و شناسایی نقاط حفاظت شده ۷۸
۴-۸-۶- تجزیه و تحلیل فیلوژنیکی ژن *PGIP* ۸۱
۴-۸-۷- نمایش لوگویی از انطباق توالی‌های گیاهان مختلف ۸۱
۴-۸-۸- پیش‌بینی ویژگی‌های اصلی فیزیکوشیمیایی یک پروتئین با ProtParam ۸۶
۴-۸-۹- پیش‌بینی ساختار دوم پروتئین PGIP با نرم‌افزار PSIPRED ۸۸

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۴-۸-۱۰- تعیین نقاط حفاظت شده پروتئین با نرم‌افزار ClustalW ۸۹
۴-۸-۱۱- بررسی ساختار اولیه پروتئین و یافتن قسمت‌های درون غشایی ۹۰
۴-۸-۱۲- جستجوی مارپیچ‌های پیچ‌خورده ۹۲
۴-۸-۱۳- جستجوی دمین‌های پروتئین PGIP ۹۲
۴-۸-۱۴- دست‌یابی به گیاهان حاوی PGIP از طریق (www.expasy.ch/UniProtKB) ۹۳
۴-۸-۱۵- هضم پروتئین PGIP در کامپیوتر با استفاده از PeptideCutter ۹۳
۴-۹- ساخت سازه‌ی پلاسمیدی ۹۴
۴-۹-۱- تکثیر ژن PGIP با آنزیم *pfu* ۹۴
۴-۹-۲- استخراج DNA از روی ژل آگارز ۹۵
۴-۹-۳- تهیه ناقل پلاسمیدی pBI121 ۹۵
۴-۹-۴- هضم آنزیمی قطعه ژنی *PGIP* و ناقل pBI121 ۹۶
۴-۹-۵- واکنش‌های اتصال ۹۷
۴-۹-۶- ترانسفورم کردن سلول‌های مستعد *E. coli* (DH5α) با محصولات اتصال ۹۷
۴-۹-۷- تایید کلونی‌ها با استفاده از آزمون Colony PCR ۹۷
۴-۹-۸- تأیید کلونی‌ها با آزمون آنزیم‌های برشی ۹۸
۴-۱۰- ترانسفورم کردن سویه GV_{3101} اگروباکتریوم ۹۹
۴-۱۱- انتقال ژن به آرابیدوپسیس ۹۹
۴-۱۱-۱- تنک‌سازی غلاف‌ها و حذف گلچه‌های انتهایی ۱۰۰
۴-۱۱-۲- فرآیند انتخاب گیاهان تراریخت ۱۰۰
۴-۱۲- بررسی و تأیید مولکولی گیاهان تراریخت با RT- PCR ۱۰۱

فصل پنجم- بحث ۱۰۲
فصل ششم- پیشنهادات ۱۰۶
فصل هفتم- منابع ۱۰۷

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- میوه خربزه وحشی، ساقه کرکدار، گیاه در مرحله گلدهی ۵
شکل ۲-۲- ساختمان دیواره *Neurospora crassa* ۸
شکل ۲-۳- نمایش شماتیک از ساختار عمومی دیواره سلولی قارچ‌ها و موقعیت قرارگیری ترکیبات مختلف سازندهٔ آن ۸
شکل ۲-۴- استراتژی های نفوذ پاتوژن به اپیدرم میزبان ۱۰
شکل ۲-۵- ساختار شماتیک گالاکتورونان‌ها ۱۵
شکل ۲-۶- نمایش شماتیک فعالیت‌های پکتینازی روی مولکول گالاکتورونان با دنباله‌های متیله و غیر متیله ۱۵
شکل ۲-۷- تعامل پلی‌گالاکتوروناز و پروتئین ممانعت کننده از فعالیت پلی‌گالاکتوروناز ۱۸
شکل ۲-۸- شمایی از نحوه‌ی انتقال ژن بوسیله‌ی اگروباکتریوم به ژنوم سلول گیاهی ۳۸
شکل ۲-۹- مراحل ساخت cDNA ۴۷
شکل ۳-۱- اختلاف بین باکتری های فاقد پلاسمید (A) و حاوی پلاسمید (B) و پلاسمید نوترکیب (C) بر روی محیط کشت انتخابی ۵۵
شکل ۳-۲- نقشه ژنتیکی pGEM –T Vector شرکت Promega ۵۶
شکل ۳-۳- ترانسفورماسیون باکتری به روش شوک حرارتی ۵۹
شکل ۴-۱- DNA استخراجی از برگ گیاه خربزه وحشی ۷۱
شکل ۴-۲- تکثیر ژن PGIP با استفاده از آنزیم DNA پلیمراز *pfu* و غلظت‌های مختلف DNA برگ ۷۱
شکل ۴-۳- الکتروفورز RNA استخراج شده از گیاه خربزه وحشی بر روی ژل آگارز ۱/۲درصد ۷۲
شکل ۴-۴- RNA استخراجی بعد از تیمار با DNase بر روی ژل آگارز ۱.۲ درصد ۷۳
شکل ۴-۵- ژن PGIP گیاه خربزه وحشی ۷۳
شکل۴-۶- تکثیر ژن PGIP جهت برش از روی ژل و خالص‌سازی آن ۷۳
شکل ۴-۷- نمای میکروسکوپی از کلنی‌های سفید و آبی ۷۴
شکل ۴-۸- نتایج حاصل از colony PCR با پرایمرهای دقیق و تایید ورود ژن به پلاسمید pGEM ۷۴
شکل ۴-۹- توالی نوکلئوتیدی ژن PGIP ۷۵
شکل ۴-۱۰- توالی پروتئینی ژن PGIP ۷۶
شکل ۴-۱۱- فراوانی نوکلئوتیدی توالی ژن PGIP ۷۶
شکل ۴-۱۲- فراوانی آمینواسیدی توالی پروتئینی PGIP ۷۷
شکل ۴-۱۳- نتایج حاصل از همترازی توالی نوکلئوتیدی ژن *PGIP* از گیاه خربزه وحشی با تعدادی از گیاهان خانواده Cucurbiraceae ۸۰
شکل ۴-۱۴- تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ژن *PGIP* ۸۱
شکل ۴-۱۵- نمایش لوگویی انطباق توالی چندتایی توالی نوکلئوتیدی PGIP ۸۵
شکل ۴-۱۶- نمایش لوگویی انطباق توالی چندتایی توالی پروتئینی PGIP ۸۶
شکل ۴-۱۷- نمای شماتیک از پیش‌بینی ساختار دوم آنزیم ممانعت‌کننده از فعالیت پلی‌گالاکتوروناز با استفاده از نرم افزار PSIPRED ۸۸
شکل ۴-۱۸- نتایج حاصل از همترازی توالی پروتئینی PGIP از گیاه خربزه وحشی با تعدادی از گیاهان ۹۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱۹- نمودار آبدوستی برای *PGIP* با برنامه‌ی TMHMM **۹۱**

شکل ۴-۲۰- الگوی آبگریزی برای PGIP با برنامه ProtScale و روش Kyte and Doolittle **۹۱**

شکل ۴-۲۱- جستجوی مارپیچ‌های پیچ‌خورده در پروتئین PGIP **۹۲**

شکل ۴-۲۲- نمایی شماتیک از دمین‌های پروتئین PGIP **۹۲**

شکل ۴-۲۳- گیاهان دارای پروتئین PGIP **۹۳**

شکل ۴-۲۴- هضم پروتئین PGIP در کامپیوتر **۹۴**

شکل ۴-۲۵- محصولات PCR با cDNA حاصل از RNA جدا شده از گیاه خربزه وحشی و پرایمرهای PGIP و *pfu* **۹۵**

شکل ۴-۲۶- پلاسمید pBI121 بر روی ژل آگارز ۱٪ **۹۵**

شکل ۴-۲۷- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های برشی SacI و XbaI **۹۶**

شکل ۴-۲۸- هضم آنزیمی پلاسمید pBI121 با آنزیم‌های برشی SacI و XbaI به منظور خالص سازی از روی ژل **۹۶**

شکل ۴-۲۹- هضم آنزیمی *PGIP* با آنزیم‌های برشی SacI و XbaI **۹۷**

شکل ۴-۳۰- نتیجه PCR کلونی‌های *E. coli* ترانسفورم شده با ناقل‌های نوترکیب و پرایمرهای اختصاصی PGIP **۹۸**

شکل ۴-۳۱- نتیجه PCR کلونی‌های *E. coli* ترانسفورم شده با ناقل‌های نوترکیب و پرایمرهای ۳۵S طراحی شده از روی pBI121 و پرایمرهای اختصاصی PGIP **۹۸**

شکل ۴-۳۲- پلاسمیدهای نوترکیب حاوی ژن PGIP به جای ژن نشانگر GuSA **۹۹**

شکل ۴-۳۳- آزمون برش آنزیمی کلون‌های *E. coli* تاریخت پس از تأیید اولیه با روش Colony PCR **۹۹**

شکل ۴-۳۴- گیاهچه‌های انتخاب شده در محیط انتخابی با غلظت mgl^{-1} ۵۰ کانامایسین و تیمار ۳ روز تاریکی و ۲ هفته در شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی **۱۰۰**

شکل ۴-۳۵- RNA استخراج شده از گیاهان بالقوه تاریخت آرابیدوپسیس **۱۰۱**

شکل ۴-۳۶- تیمار RNA گیاهان بالقوه تاریخت با آنزیم DNAse جهت از بین بردن آلودگی DNA **۱۰۱**

شکل ۴-۳۷- آزمون گیاهان بالقوه تاریخت به روش RT-PCR و با آغازگرهای اختصاصی ژن PGIP **۱۰۱**

شکل ۵-۱- وکتور نوترکیب pBI121 ایجاد شده به منظور تاریخته سازی آرابیدوپسیس **۱۰۴**

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- رده بندی علمی و جایگاه خربزه وحشی ۵

جدول ۲-۲- طبقه بندی انواع پروتئین های مرتبط با بیماریزایی بر اساس ساختار مولکولی، خواص بیولوژیک و نحوه اثر آنها ۱۲

جدول ۲-۳- سطح زیر کشت جهانی محصولات تراریخته بر حسب کشور ۳۰

جدول ۲-۴- طبقه‌بندی پلاسمیدهای Ti و Ri براساس نوع اوپین ۳۳

جدول ۳-۱- ترکیبات میکرو و ماکرو محیط کشت هوگلند ۴۸

جدول ۳-۲- مشخصات پرایمرها ۴۹

جدول ۳-۳- ترکیبات واکنش تیمار RNA با آنزیم DNase ۵۱

جدول ۳-۴- ترکیبات واکنش ساخت رشته اول cDNA ۵۲

جدول ۳-۵- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر، تأیید و شناسایی نواحی ژنی PGIP ۵۳

جدول ۳-۶- اجزاء مخلوط واکنش PCR با استفاده از آنزیم Taq DNA polymerase ۵۳

جدول ۳-۷- برنامه چرخه‌ای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آنزیم Taq ۵۳

جدول ۳-۸- مشخصات سویه باکتریایی *E. coli* ۵۵

جدول ۳-۹- محاسبه نسبت ۳ به ۱ قطعه موردنظر به وکتور ۵۷

جدول ۳-۱۰- اجزای مخلوط واکنش اتصال (Ligation) ۵۷

جدول ۳-۱۱- برنامه کلونی PCR ۶۰

جدول ۳-۱۲- توالی‌های مربوط به پرایمرهای عمومی M13 ۶۱

جدول ۳-۱۳- ترکیب و مقدار واکنشگرها برای هضم آنزیمی محصولات PCR ژن *PGIP* و ناقل pBI121 ۶۱

جدول ۳-۱۴- واکنش اتصال قطعه PGIP به ناقلpBI121 ۶۲

جدول ۳-۱۵- ترکیبات تشکیل دهنده محیط تلقیح آرابیدوپسیس و غلظت هر کدام ۶۵

جدول ۴-۱- نتایج اسپکتروفوتومتری DNA ۷۱

جدول ۴-۲- نتایج اسپکتروفوتومتری RNA ۷۲

جدول ۴-۳- برخی خصوصیات اولیه توالی DNA ۷۵

جدول ۴-۴- لیست توالی‌های ژن *PGIP* از خانواده کدوئیان به همراه شماره‌ی دست‌یابی آنها در NCBI ۷۸

جدول ۴-۵- نتایج حاصل از ProtParam برایPGIP ۸۷

جدول ۴-۶- دمین‌های پروتئین PGIP گیاه خربزه وحشی ۹۲

سپاسگزاری:

افسوس که دامنه‌ی لغت کوتاه است و هیجان ضمیرم بی‌پایان و کو آن واژه‌ای که بتواند ترجمان بندگی و سپاسم باشد. گرچه در بیانم نگنجد، ولی از من بپذیر سپاسم را، به پاس تمام لحظه‌های بودنم و اینکه طی کردن این مرحله بی‌لطفت ممکن نبود.

رهین منت هستی بخشان وارسته‌ای هستم که مهرشان بی‌دریغ نثارم شد و تا ابد سپاسگزار مهربانی‌ها و صبوری‌های **پدر و مادر عزیز و فداکارم** در گذار از این مرحله خواهم بود و نعمت سلامتی و سعادت دنیا و آخرت و طول عمر با عزت را برایشان آرزومندم.

خدای را شاکرم که در مسیر پر فراز و نشیب دانش‌اندوزی از رهنمایی راهنمایان بیداردل توشه‌ها اندوختم. از زحمات بی‌دریغ و تلاش‌های بی‌وقفه استادان بزرگوارم جناب آقای **دکتر حمید نجفی زرینی و دکتر علی دهستانی کلاگر** که همواره و همه جا اشارات و راهنمایی‌هایشان چون فانوسی در این تاریک راه، کارگشا و راه گشا بود، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید بزرگوار جناب آقای **دکتر کاظمی‌تبار** و جناب آقای **دکتر رنجبر** که زحمت مطالعه و داوری این رساله را تقبل نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای **دکتر عباسی** نهایت تشکر را دارم.

از جناب آقایان **دکتر پاکدین پاریزی و مهندس حق‌پناه** که تجربیات و دانش خود را با صبر و حوصله‌ی فراوان در اختیار من قرار دادند، نهایت تشکر را نموده و همواره بذل لطف الهی را در کارهایشان مسئلت دارم.

همچنین از مسئولین محترم پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری طبرستان به واسطه کمک‌های مالی، علمی و زحمات بی‌دریغشان قدردانی می‌نمایم.

و در پایان از تمامی **دوستان عزیزم** به پاس خلوص لحظات با هم بودن کمال سپاس و قدردانی را دارم.

چکیده

یکی از مشکلات تولید محصولات جالیزی بخصوص گیاهان خانواده کدوئیان خسارت بالای پاتوژن‌های قارچی است که استفاده بی‌رویه از سموم را در پی داشته است. از طرفی بعضی از خویشاوندان وحشی خانواده کدوئیان مقاومت خوبی را در تقابل با انواع پاتوژن‌ها بروز داده‌اند و می‌توان از آنها به عنوان ذخایر ژنتیکی برای اصلاح گیاهان زراعی حساس بهره برد. در این پژوهش توالی‌های ژنی کدکننده ژن رمزگردان PGIP (Polygalacturonase Inhibiting Protein) از خربزه وحشی (*Cucumis melo* var. *agrestis*) جداسازی شد. برای این کار از DNA ژنومی و cDNA سنتز شده از RNA کل به عنوان الگو برای جداسازی توالی مورد نظر استفاده شد. پس از بررسی‌های بیوانفورماتیکی روی توالی‌های مشابه موجود در بانک ژن، پرایمرهای دقیق و دژنره از توالی‌های اجماعی طراحی شدند و توالی‌های مذکور پس از تکثیر با PCR در وکتورهای TA همسانه‌سازی و توالی‌یابی شدند. در مرحله بعد پرایمرهای حاوی سایت برشی XbaI و SacI طراحی شدند و قطعات ژنی پس از تکثیر مجدد در وکتورهای دوتایی pBI121 همسانه‌سازی و پس از بررسی‌های اولیه و اطمینان از صحت آنها، به اگروباکتریوم نژاد GV3101 منتقل شدند. گیاهان آرابیدوپسیس با اگروباکتریوم‌ها تلقیح و گیاهان تراریخت در محیط انتخابی گزینش شدند. سپس این گیاهان با روش‌های PCR و RT-PCR ارزیابی شدند. نتایج نشان داد با استفاده از هر دو نوع الگوی DNA ژنومی و cDNA، قطعه ژنی به طول ۹۸۱ جفت باز که شامل ORF کامل ژن PGIP بود، ایجاد شد که نشان‌دهنده عدم وجود اینترون در ژن مذکور بود. آزمون PCR گیاهان انتخابی نشان داد که این گیاهان ژن PGIP را دریافت کرده‌اند و آزمون RT-PCR بیانگر نسخه‌برداری این ژن در اکثر لاین‌های تراریخت بود. بررسی‌های اولیه نشان داد تغییرات مورفولوژیک یا فیزیولوژیک خاصی در گیاهان تراریخت ایجاد نشده است و نمو آنها مشابه گیاهان شاهد غیر تراریخت بوده است.

کلمات کلیدی: خربزه وحشی، PGIP، گیاه تراریخت، آرابیدوپسیس، جداسازی ژن.

فصل اول

مقدمه

مقدمه

جمعیت جهان و نیاز به غذا به طور روزافزون در حال افزایش است به‌طوری که تأمین غذای این جمعیت یکی از مهم‌ترین مسائل جهانی در عصر حاضر می‌باشد. این موضوع باعث شده دولت‌ها، مؤسسات پژوهشی و محققین کشاورزی بطور پیوسته در جستجوی روش‌های جدید و مؤثرتر برای افزایش تولید محصولات کشاورزی و تأمین امنیت غذایی این جمعیت در حال رشد باشند. علاوه بر افزایش مصرف تولیدات کشاورزی به عنوان غذا، استفاده فزاینده از این تولیدات در صنایع مختلف و بویژه در تولید سوخت‌های زیستی[1] موجب شده تولید فعلی تکافوی نیازها را نکند که یکی از نشانه‌های آن افزایش قیمت جهانی تولیدات اصلی کشاورزی در سال ۲۰۰۸ بود (فائو، ۲۰۰۸). با توجه به اینکه بیشتر زمین‌های قابل استفاده برای کشاورزی در حال حاضر زیر کشت می‌باشند و امکان افزایش سطح زیر کشت وجود ندارد، راهکارهای افزایش تولید در واحد سطح و کاهش خسارات ناشی از آفات و بیماری‌ها در سال‌های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. از طرفی با پیشرفت‌های ایجاد شده پس از انقلاب سبز و انتقال دستاوردهای آن به کشورهای در حال توسعه، عملکرد محصولات زراعی افزایش زیادی یافته و به خط تراز عملکرد[2] نزدیک شده است و افزایش بیشتر عملکرد به دلیل محدودیت‌های زیستی عملاً امکان‌پذیر نمی‌باشد (تونیسن و همکاران[3]، ۲۰۰۳). این موضوع باعث شده کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز و سایر عواملی که علاوه بر هدررفتن محصول تولید شده و افزایش هزینه تمام شده، موجب کاهش کیفیت آن نیز می‌شوند بیش از پیش مورد توجه قرار گیرد. حمله انواع مختلف پاتوژن‌های گیاهی از جمله ویروئیدها، ویروس‌ها، فیتوپلاسماها، ریکتسیاها، پروتوزوئرها، قارچ‌ها، نماتدها و باکتری به گیاهان و بیماری‌های ناشی از آنها از مهمترین عوامل اتلاف محصولات کشاورزی محسوب می‌شوند. با کنترل این عوامل و کاهش خسارت ناشی از آنها می‌توان علاوه بر افزایش عملکرد و کیفیت محصولات تولیدی کیفیت آنها را نیز ارتقاء داد. از میان پاتوژن‌های گیاهی مختلف قارچ‌ها از اهمیت خاصی برخوردارند. پراکندگی جغرافیایی زیاد و سازگاری به دامنه وسیعی از شرایط زیستی، تنوع ژنتیکی بالا در سویه‌های بیماریزا، طیف وسیع بیماریزایی روی گونه‌های گیاهی مختلف و سرعت زیاد رشد و تکثیر و سرعت همه گیری موجب شده مبارزه با قارچ‌های بیماریزای گیاهی دشوار و هزینه‌بر باشد (اگریوس[4]، ۲۰۰۵). روش‌های مختلفی برای کنترل پاتوژن‌های قارچی وجود دارد که یکی از معمول‌ترین آنها استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیائی در سطح وسیع می‌باشد. این امر علاوه بر هزینه‌های سنگین اثرات سوء متعددی بر محیط زیست دارد طوری‌که باقیماندن این سموم در منابع آب و خاک صدمه‌های جبران ناپذیری به اکوسیستم‌های طبیعی وارد کرده است. علاوه‌بر این مسائل، مصرف بی‌رویه این سموم بخصوص در میوه‌ها و سبزیجات و باقی ماندن آنها در این محصولات سلامت مصرف‌کنندگان را تهدید می‌کند. تلاش جهت یافتن جایگزینی مناسب برای این ترکیبات شیمیایی، منجر به استفاده از روش‌های مختلف کنترل بیولوژیک شده است. این روش‌ها شامل بکارگیری مستقیم قارچ‌ها، باکتری‌ها و سایر ارگانیزم‌های مفید کنترل‌کننده پاتوژن‌های گیاهی بوده و مخاطرات مصرف سموم را ندارند. هزینه بالا و عدم کارایی مناسب در شرایط متنوع محیطی از معایب روش‌های کنترل بیولوژیک می‌باشند. با پیشرفت‌های دو دهه اخیر در روش‌های انتقال ژن به گیاهان، انتقال ژن‌های مرتبط با واکنش‌های دفاعی و تولید گیاهان تراریخته مقاوم به یکی از راهکارهای ایده‌آل در مبارزه با بیماری‌های قارچی تبدیل شده است. هم اکنون پژوهش‌های زیادی روی شناخت مکانیزم‌های دفاعی گیاه، جداسازی ژن‌های

---

1. Biofuel
2. Yield plateau
3. Toenniessen *et al.*
4. Agrios
5. Iglesias *et al.*
6. Wako *et al.*

فرآیندهای دفاعی گیاه و تولید گیاهان تراریخت مقاوم انجام می‌شود. شناسایی ارقام مقاوم به پاتوژن‌ها و همچنین انتقال ژن‌های مقاوم به این پاتوژن‌ها به محصولات زراعی، می‌تواند باعث افزایش تولید محصول و بالا رفتن کیفیت آن گردد. طبق بررسی‌های به عمل آمده مشخص گردید که خربزه وحشی به پاتوژن‌های قارچی *Monosporascus cannonballus* (ایگلسیاس[1] و همکاران، ۲۰۰۰)، *Acremonium cucurbitacearum* (ایگلسیاس و همکاران، ۲۰۰۰)، *Didymella bryoniae* (واکو[2] و همکاران) و نژادهای ۱ و ۲ قارچ *Fusarium oxysporum f.sp.melonis* (ایومولود[3] و همکارن، ۲۰۰۹) و ویروس *Trialeurodes vaporariorum* (سوریا[4] و همکاران، ۱۹۹۴) مقاوم است. بنابراین این گیاه می‌تواند به عنوان منبع ژن‌های مقاومت برای ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی و ویروسی در خانواده کدوئیان به کار رود. تک‌لپه‌ای‌ها ترکیبات پکتین کمتری را در دیواره‌های خود دارا بوده و در نتیجه فاقد ممانعت کننده‌های پروتئینی (PGIP) در برابر پروتئین PG پاتوژن‌ها می‌باشند. از آنجایی که غلات فاقد PGIP می‌باشند، جایگزینی و بیان ژن *pgip*، این گیاهان را مقاوم به بیماری خواهد نمود. گیاهان تراریخت حامل ژن *pgip* می‌توانند درجهت مبارزه با پروتئین‌های PG آفاتی از قبیل نماتدها، حشرات و باکتری‌های ایجادکننده پوسیدگی نرم به کار روند.

لذا در این تحقیق مسئله جداسازی ژن *pgip* از خربزه وحشی، انتقال ژن به گیاه آرابیدوپسیس و ارزیابی بیان آن مورد بررسی قرار می‌گیرد.

اهداف تحقیق

۱- جداسازی ژن *pgip* از خربزه وحشی.
۲- بررسی بیوانفورماتیکی ژن *pgip* جداشده از خربزه وحشی.
۳- انتقال ژن *pgip* جداشده از خربزه وحشی به گیاه آرابیدوپیس.
۴- ارزیابی بیان ژن انتقالی در آرابیدوپیس.

[1]. Iglesias *et al.*
[2]. Wako *et al.*
[3]. Oumouloud *et al.*
[4]. Soria *et al.*

فصل دوم

کلیات و بررسی منابع

۲-۱- زیان‌های ناشی از بیماری‌های گیاهی

بیماری‌های گیاهی برای انسان اهمیت فوق‌العاده دارند زیرا به گیاهان و محصولات گیاهی که انسان برای غذا، پوشاک، وسایل خانه، محیط‌زیست و در بسیاری از موارد سکونت به آنها وابسته است، آسیب می‌رسانند. برای میلیون‌ها انسان در سراسر جهان که هنوز برای ادامه‌ی زندگی وابسته به محصولات گیاهی هستند، بیماری‌های گیاهی عامل ایجاد تفاوت میان یک زندگی آسوده از یک سو و زندگی همراه با گرسنگی و حتی مرگ ناشی از قحطی از سوی دیگر خواهند بود. مرگ ناشی از قحطی ۱.۴ میلیون آیرلندی در سال ۱۸۴۵ و بخش عمده‌ی گرسنگی میلیون‌ها انسان نیم‌گرسنه که هم‌اکنون در کشورهای در حال توسعه به‌سر می‌برند، مثال‌هایی از عواقب بیماری‌های گیاهی هستند. در کشورهایی که غذا فراوان است، بیماری‌های گیاهی در درجه اول از لحاظ خسارت اقتصادی به تولیدکنندگان درخور اهمیت هستند. اما بیماری‌های گیاهی علاوه‌بر آن باعث بالا رفتن بهای محصولات برای مصرف‌کنندگان نیز می‌شوند. آنها در مواردی مستقیماً موجب بیماری شدید در انسان و حیواناتی می‌شوند که محصولات گیاهی بیمار را مصرف می‌کنند. آنها همچنین زیبایی محیط‌زیست را با خسارت رساندن به گیاهان در اطراف خانه‌ها، حاشیه خیابان‌ها، پارک‌ها و جنگل‌ها از بین می‌برند. به‌علاوه، کوشش برای کنترل بیماری‌ها، موجب پخش میلیاردها کیلوگرم مواد سمی می‌شود که آب و محیط‌زیست را آلوده می‌کنند (اگریوس، ۲۰۰۵) شناخت و کنترل این عوامل خسارت‌زا می‌تواند در افزایش کیفیت و کمیت محصولات کشاورزی بسیار مؤثر باشد.

۲-۲- گونه خربزه (*Cucumis melo*.L)، اهمیت و بیماری‌های آن

گیاهان جالیزی، مخصوصاً طالبی و خربزه نقش مهمی در زراعت صیفی کشور و درآمد ملی دارد (پوستچی، ۱۳۵۰). سطح زیر کشت کدوئیان بیش از ۵۰ ٪ سطح زیر کشت سبزیجات درکشور می باشد. تنوع در گونه *Cucumis melo* شاید بیشتر از سایر کدوئیان در ایران باشد. گونه خربزه با ۲n=2x=۲۴ کروموزوم دارای گروه های زراعی مختلف شامل خربزه زراعی (*C.melo* var. *inodor*us)، طالبی (*C.melo* var. *cantalupenses*) ، گرمک (*C.melo* var. *reticulatus*)، خیار چنبر (*C.melo* var *flexusus*) و دستنبو (*C. melo* var. *dudaims*) و همچنین گروه‌های وحشی نظیر (*C.melo* var *agrestis*) می باشد. در ایران کشت خربزه در مناطق خشک و حاشیه کویری مثل ورامین، ایوانکی، گرمسار، اصفهان و خراسان از تولید کمی و کیفی بهتری برخوردار است، ولی کشت آن به این مناطق محدود نشده و در سایر نقاط از جمله ساوه، قزوین، گیلان، مازندران، آذربایجان و همدان نیز گسترش یافته است (پوستچی، ۱۳۵۰). به نظر برخی محققان منبع اولیه طالبی و خربزه به شکل کنونی کشور ایران، قفقاز و کشورهای همسایه ایران است (کِرج و گِرام[1]، ۲۰۰۰). از طرفی با توجه به توزیع ملون های وحشی در مونوگراف کیرکبراید (kirkbride) به نظر می رسد آفریقا مرکز اولیه تنوع باشد و هند، ایران، افغانستان و چین مراکز ثانویه تنوع ملون باشند (تاپلی و همکاران[2]، ۱۹۳۷). طبق آمار فائو کل سطح زیر کشت این محصول در جهان در سال ۲۰۱۰ میلادی، ۱۳۰۸۰۱۸ هکتار با عملکرد متوسط ۲۱/۶ تن در هکتار و تولید ۲۸۳۲۱۱۵۹ تن می باشد که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با ۱۵۱۳۸۰۰۰ تن (۵۳/۵٪ از تولید جهان) است که از سطحی معادل ۵۷۸۵۰۰ هکتاربه دست می‌آید. سطح زیر کشت خربزه در ایران ۷۹۹۹۲ هکتار بوده و حدود ۶/۱٪ از سطح زیر کشت جهان را به خود اختصاص داده است، بیشترین سطح زیر کشت متعلق به استان خراسان با ۴۵۵۵۳ هکتار می باشد که حدود ۵۷٪ از سطح کل کشور را شامل می‌شود. متوسط عملکرد خربزه در ایران ۱۵/۴ تن در هکتار و بیشترین عملکرد را استان تهران با حدود ۳۲ تن در هکتار داشته است. میانگین عملکرد

[1]. Kerje and Grum

[2]. Tapley *et al*.

جهانی ۲۱/۶ تن و بیشترین عملکرد متعلق به کانادا با ۱۲۰ تن در هکتار بوده و کشور چین به عنوان مهم‌ترین کشور تولید کننده ۲۶/۱ تن در هکتار عملکرد دارد. در ایران استان خراسان به عنوان مهترین تولید کننده خربزه در ایران دارای عملکرد متوسط ۱۴ تن در هکتار می‌باشد (فائو، ۲۰۱۰).

۲-۲-۱-خربزه وحشی (*Cucumis melo* var. *agrestis*)

این گیاه که به خربزه آفریقایی نیز شهرت دارد، در سراسر مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری جهان پراکنده شده است و به نظر می‌رسد از قدیم کشت می‌شده ولی جایگاه بومی آن ناشناخته است و احتمال می‌رود در ابتدا از غرب آفریقا منشاء گرفته باشد. قاره آسیا احتمالاً دومین جایگاهی است که تنوع گونه‌ای خربزه وحشی در آن رخ داده است. خربزه وحشی گیاهی یک‌ساله و دوره ی زندگی آن حدود ۱۵۰-۱۱۰ روز است که با توجه به فصل متغیر می باشد. تعداد متوسط میوه‌ها در هرگیاه متغیر بوده (۱۵-۵ عدد) و مقدار بذر آن در هر میوه کم می باشد. خربزه وحشی گیاهی است نر - یک پایه که گل های نر و گلهای دو جنسی(نر – ماده) روی یک گیاه قرار دارند و بین زمان ظهور آنها از نظر فنولوژیکی وقفه‌ای رخ می دهد (دجه و همکاران[1]، ۲۰۰۶). گیاه برای رشد خود به خاک‌های سبک (شنی یا ماسه ای) یا خاک های متوسط (رسی) و همچنین خاک‌هایی با زهکشی مناسب نیاز دارد. این علف هرز در خاک‌های مرطوب با pH اسیدی، خنثی و یا قلیایی به خوبی رشد می‌کند. خربزه وحشی گیاهی است علفی، بسیارمنشعب، به صورت خوابیده یا بالارونده که تا حدود ۱.۵ متر می تواند رشد کند. ساقه آن معمولاً دارای کرک‌های زبر است. برگ‌ها به صورت تخم مرغی تا قلبی شکل و به طور مشخص لوبدار می‌باشند دارای (۳-۵ لوب) که توسط کرک های زبر پوشیده شده‌اند. دمبرگ‌ها به طول ۳-۱ سانتی‌متر هستند. گل‌ها کوچک، منفرد، به ندرت ۲ یا ۳ تایی و به رنگ زرد بوده که مشابه گل‌های خیار می‌باشند. دم‌گل به طول ۷-۳ میلی‌متر است. گل‌های این گیاه تک جنسی یا ندرتاً دوجنسی بوده که در محور برگ‌ها تشکیل می‌شوند. گل‌های ماده دارای قطعات پوششی کوچک‌تر و تخمدان در قسمت پایین کاسه و جام گل قرار دارد. تخمدان ۳-۵ برچه‌ای با تخمک‌های متعدد و دارای پوشش گل کامل است. جام گل آن پیوسته گلبرگ و از پایین به کاسه گل متصل می‌شود. تعداد گل‌های نر خیلی بیشتر از ماده بوده و زودتر از آن ظاهر می‌شود. پرچم‌ها ۵ عدد بوده و گرده گل سنگین و چسبناک و مادگی کوتاه و کلفت است (بلانکارد و همکاران[2]، ۱۹۹۴). میوه (میوه سته) تقریباً سبز رنگ و بیضی شکل بوده، گاهی به طور نامشخص سه‌وجهی و سطح آن صاف و دارای کرک است، طول آن حداکثر ۷ سانتی‌متر بوده و عموماً رگه‌هایی به رنگ سبز تیره روی آن وجود دارد. بذرهای این گیاه بدون آلبومین و در مقایسه با سایر melonها کوچک‌تر بوده و دارای پوشش رشته ای شکل (لیف مانند) هستند. زمان گلدهی این گیاه از اواخر خرداد تا اواخر شهریورماه می‌باشد.

[1]. Djè *et al*.

[2]. Blancard *et al*.