بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه مازندران
مجتمع آموزش عالي علوم كشاورزي و منابع طبيعي ساري
دانشكده علوم زراعي

پايان نامه دوره كارشناسي ارشد در رشته
بيوتكنولوژي در كشاورزي

موضوع:

انتقال ژن cry1Ab به كلزا به منظور مقاومت به آفات پروانه اي

اساتيد راهنما:
دكتر سيد كمال كاظمي تبار
دكتر حسن رهنما

استاد مشاور:
دكترحشمت الله رحيميان

اساتيد داور:
دكتر نادعلي بابائيان جلودار
دكتر غلامعلي رنجبر

نام دانشجو:
محسن شيخ حسن

بهمن ماه 1388

سپاسگزاري

با سپاس و ستايش داناي دانشها، آگاه به اسرار و توانا به هر آنچه كه در ذهن آدمي مي‌گنجد و فراتر از آن.

با سپاس فراوان از تمامي بزرگوارانی كه چراغ راه علم را هميشه روشن نگاه داشته و با عزتنفس و تلاش پيگير، به بشريت كمك نموده‌اند. اميد است كه ارزش راستين دانش هرگز از يادمان نرود و تمامي عزيزان پوينده‌ي راه حقيقت و دانش باشند.

تقدیم به :

پدر و مادر عزیزم

به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است

به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید

و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند

.چكيده

كلزا يكي از گياهان مهم روغني مي باشد كه تنها بعد از سويا و نخل روغني جايگاه سوم را در توليد جهاني به خود اختصاص داده است. اين گياه عضو خانواده براسيكا مي باشد. يكي از مهمترين عوامل محدود كننده توليد دانه هاي روغني از جمله كلزا مجموعه اي از آفات هستند كه به اين گياه خسارت وارد مي كنند. آفات حشره اي گياهان روغني كلزا، منحصراً مختص خانواده شب بو هستند كه از جمله اين آفات، آفات پروانه اي مي باشند. آفات پروانه اي اختصاصي خانواده شب بوئيان از جمله Plutella Xylostella و Pieris brassicae جز مهمترين آفات سبزيجات مي باشند و همواره كلزا را مورد حمله خود قرار مي دهند. يكي از عوامل مهم در حفظ و افزايش عملكرد گياهان زراعي، كنترل آفات و كاهش خسارت ناشي از آن است. انتقال ژن هاي مقاومت به حشرات از جمله ژن هاي Bt يك راهبرد جديد و مكمل اصلاح كلزا براي مبارزه با آفات اين محصول به حساب مي آيد. در اين تحقيق، جهت تراريخت نمودن گياه كلزا، از هيپوكوتيل به عنوان ريزنمونه در تراريختي رقم SLM046 كلزا به واسطه Agrobacterium tumefaciens استفاده شد. ژن cry1Ab تحت كنترل پيشبر PEPC و پايانبر35S به گياه كلزا انتقال داده شد. گياهان تراريخته احتمالي در محيط گزينش حاوي غلظت هاي مختلف فسفينوتريسين غربال شدند. آناليز PCR با آغازگرهاي اختصاصي ژن cry1Ab، حضور ژن انتقال يافته در گياهان را نشان دادند. همچنين آناليز PCR با آغازگرهاي اختصاصي ژن bar نيز حضور اين ژن را در گياهان تراريخت تأييد كردند. بيان اين ژن و توليد پروتئين Cry1Ab نيز با استفاده از آزمون جريان جانبي مورد تاييد قرار گرفت.

كلمات كليدي: كلزا، انتقال ژن، ژن cry1Ab، ژن bar، آفات پروانه اي، علف كش

فهرست

عنوان

صفحه

فصل اول : مقدمه 1
فصل دوم : کلیات 8
2-1-کلزا 9
2-2- Bt 9
2-2-1- ویژگیهاي زیست شناختي سم Bt : 9
2-2-2- مهندسي ژن هاي Bt : 14
2-3-اهمیت مبارزه با آفات گیاهان زراعي: 15
2-4- کنترل بروز مقاومت در آفات: 16
2-5- مزایاي محصولات تراریخته مقاوم به آفات: 18
2-6- وضعیت جهاني محصولات تراریخت تا سال 2009 19
2-7- گیاهان تراریخت Bt در ایران 21
2-8- اثرات بوم شناختي گیاهان تراریخته: 22
2-9- ایمني زیستي پروتئینcrylAb : 23
2-10- چشم اندازهاي آینده: 26
فصل سوم : بررسي منابع 27
3-1- روشهاي ایجاد گیاهان تراریخت 27
3-1-1- روشهاي انتقال مستقیم ژن 27
3-1-1-1- الکتروپوریشن 27
3-1-1-2- ریز تزریقي 28
3-1-1-3- درشت تزریقي 29
3-1-1-4- بمباران ژني 29
3-1-1-5- لیپوزوم 30
3-1-1-6- پلي کاتیونها 31
3-1-1-7- استفاده از لوله گرده 31
3-1-2- انتقال بیولوژیک 32
3-1-2-1- آگروباکتریوم 32
3-1-2-2- ناقلین جایگزیني 35
3-1-2-3- ناقلین دوتایي 36
3-1-3- سایر روشهاي انتقال ژن 36
3-2- تاریخچه کشت بافت و تراریختي در گونه هاي براسیکا 37
3-3- تاریخچه انتقال ژن Bt به گیاهان 45
فصل چهارم : مواد و روش 49
4-1- کشت بافت گیاهي و انتقال ژن 49
4-1-1- مواد گیاهي 49
4-1-2- محیطهاي کشت 50
4-1-3- تلقیح و کشت ریزنمونه هاي محور زیر لپه 50
4-2- بخش مولکولي 53
4-2-1- باکتري و پلاسمید مورد استفاده 53
4-2-2- محیط کشت باکتریایي 53

4-2-3- استخراج پلاسميد به روش ليزقليايي از اگروباكتريوم 54
4-2-4- هضم آنزيمي پلاسميد pCAMBIA3300 واجد كاست ژني cry1Ab..... 55
4-2-5- استخراج DNA ژنومي از گياه كلزا 56
4-2-5-1 اندازه گيري كيفيت و كميت DNA..... 60
4-2-5-2 الكتروفورز با ژل آگارز..... 60
4-3- آناليز گياهان تراريخته 61
4-3-1- آزمون گياهان تراريخته فرضي با استفاده از واكنش زنجيره اي پليمراز..... 61
4-3-2- آزمون PCR براي ژن مقاومت به فسفينوتريسين (bar) 61
4-3-3- تأييد حضور سازه مولكولي حاوي ژن مورد نظر با استفاده از PCR 63
4-3-4-1- استخراج RNA از گياه كلزا 64
4-3-4-2- - بررسي كمي و كيفي RNA استخراج شده..... 65
4-3-4-3- تهيه آب تيمار شده با DEPC 66
4-3-4-4- ساخت cDNA ژن cry1Ab..... 67
4-3-5-آزمون نوار جانبي با استفاده ازكيت Bt-cry1Ab/1Ac Immunostrip® Test 70
5-1-3-4-مواد مورد نياز..... 71
5-2-3-4-طرز تهيه محلول بافر 1x از پودر بافر SEB4: 71
5-3-3-4- روش كار:..... 71
فصل پنجم : نتايج و بحث..... 73
5-1-1- تأييد ناقل دريافتي 73
5-1-2- تراريخته نمودن كلزا با استفاده از ريزنمونه محورزيرلپه 75
5-1-2- سازش‌دهي گياهان تراريخته 75
5-1-4- استخراج DNA ژنومي از گياه كلزا:..... 77
5-1-5- تعيين غلظت DNA ژنومي 77
5-1-6- واكنش زنجيره اي پليمراز بر روي گياهان تراريخته احتمالي 78
5-1-8- انجام RT-PCR..... 79
5-1-9- آزمون جريان انتهايي بر روي گياهان تراريخت 79
5-2- بحث 80
پيشنهادات: 90
منابع و ماخذ 91
چكيده انگليسي 104

فهرست تصاویر
عنوان
صفحه

5-1-1 الف- هضم پلاسمید نوترکیب AMBIAPEPcry توسط 2 آنزیم *Eco*RI و *Hind*III 61
5-1-1 ب - تایید حضور کاست ژني در ناقل pCAMBIA3300 با استفاده از کلوني PCR 61
5-1-1 ج- جایگاه هاي برشي بر روي کاست ژني حاوي ژن *cry*1Ab .. 61
5-1-2-1 الف- تولید کالوس در ریزنمونه ها در محیط القاء کالوس 63
5-1-2-1 ب - تشکیل اندام ها بر روي محیط اندام زایي و شکل گیري نوساقه ها 63
5-1-2-2 الف- نوساقه هاي تراریخته سبز در محیط کشت 63
5-1-2-2 ب - گیاهچه تراریخته در محیط ریشه زایي گلدهي گیاهان تراریخت 63
5-1-2-2 ج - نوساقه هاي غیر تراریخته سفید شده در محیط انتخابي 63
5-1-3 الف- سازش دهي گیاهچه هاي منتقل شده به گلدان در فیتوترون 63
5-1-3 ب - گیاهان تراریخته در گلخانه 63
5-1-4- الکتروفورز DNA ژنومي گیاهان کلزا بر روي ژل آگارز 0/8 درصد 64
5-1-6-1- نتایج واکنش زنجیره اي پلي مراز توسط آغازگرهاي اختصاصي ژن *cry*1Ab 65
5-1-6-2- نتایج واکنش زنجیره اي پلي‌مراز توسط آغازگرهاي اختصاصي ژن مقاومت به فسفینوتریسین.....65
5-1-8- تایید سنتز cDNA از روي mRNAي حاصل از رونویسي ژن *cry*1Ab با استفاده از روش RT-PCR..... 66
5-1-9- تایید ساخت پروتئین مربوط به ژن *cry*1Ab توسط آزمایش جریان جانبي 67

فهرست جدولها
عنوان
صفحه

1-1:برنامه 5 ساله توليد دانه‌هاي روغني سال‌هاي(1388-1392) ... 2
2-2-1: مثال هايي از پروتئين هاي Cry و حشرات مورد هدف 9
3-2-4 نحوة تهية بافر ليز كننده مورد استفاده در استخراج پلاسميد به روش ليز قليايي از اگروباكتريوم 45
4-2-4- مقادير مواد مورد استفاده در هضم آنزيمي پلاسميد pCAMBIA3300 واجد كاست ژني *cry1*Ab... 46
4-3-2-الف- مقادير مواد مورد نياز جهت آزمون PCR براي ژن مقاومت به فسفينوتريسين (*bar*) 51
4-3-2- شرايط انجام واكنش زنجيره اي پليمراز براي تكثير ژن *bar* . 52
4-3-3- شرايط انجام واكنش زنجيره اي پليمراز براي تكثير ژن *cry*1Ab 53
4-3-4-3-4- الف- تركيب و ميزان مواد به كار رفته براي تهيه ژل آگارز 1%..... 55
4-3-4-3-4- ب- تركيب و ميزان مواد به كار رفته براي تهيه بافر (pH=7) 10X MOPS 56
4-3-4-3-4- ج- تركيب و ميزان مواد به كار رفته براي تهيه بافر بارگذاري RNA 56
4-3-4-5 - غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واكنش PCR براي تكثير قطعه cDNA ژن *cry*1Ab 58
5-1-7- فراواني تراريختي 66

فصل اول
مقدمه

کلزا به عنوان یک گیاه دانه روغني خوراکي از زمان جنگ جهاني دوم مورد توجه واقع شد و تلاشهاي به نژادي براي حذف مواد مضره آن طي دو دهه گذشته شدت یافت. ارقام کلزا به دو گونه براسیکا نیپوس[1] یا کلزاي معمولي و براسیکا کمپستریس[2] یا شلغم روغني تعلق دارند[1].

دانه روغني کلزا سومین منبع مهم روغن مصرفي گیاهي در جهان بعد از نخل روغني و سویا مي‌باشد[2]. روغن گیاهي جایگاه ویژه اي در سبد غذایي خانوار دارد. با این وجود علي رغم مصرف سرانه بالاي این محصول در کشور، در 7ماهه سال 87 مقدار 642 هزارتن دانه روغني به ارزش 354 میلیون دلار وارد شد که در مقایسه با مدت مشابه سال قبل از نظر وزني 15 درصد کاهش و از لحاظ ارزش دلاري با 43 درصد افزایش روبرو بوده است[3]. 70- 75 درصد روغن خوراکي کشور از خارج وارد مي شود. اگر نیاز کشور به جاي واردات روغن خام از محل واردات دانه روغني تامین شود هم ظرفیت کارخانه ها تکمیل شده و هم باعث ایجاد اشتغال مي شود. کلزا با

---

[1]- ***Brassica napus*** **L.**
[2]- ***B. campestris*** **L.**

داشتن 40-45% روغن و 38-45 % پروتئين در فهرست دانه هاي روغني قابل كشت در كشور قرار گرفته است. مهمترين كشت محصول دانه هاي روغني، كلزا است كه از نظر زراعي در تناوب با محصولاتي مانند گندم و جو قرار گرفته و به صورت پاييزه كاشته مي شود. براساس برنامه پنجم توسعه سطح زيركشت كلزا از 200 هزار هكتار به 755 هزار هكتار در كشت آبي و ديم افزايش خواهد يافت[جدول1_1] [3]. وابستگي شديد كشور به اين محصول غذايي و ضرورت ايجاد امنيت غذايي، لزوم انجام مطالعاتي به منظور افزايش توليد دانه هاي روغني و در نهايت خودكفايي در اين زمينه احساس مي شود.

جدول1-1:برنامه 5 ساله توليد دانه‌هاي روغني سال‌هاي(1388-1392) [3].

نام محصول	سال	سال اول 88-87	سال دوم 89-88	سال سوم 90-89	سال چهارم 91-90	سال پنج 92-91
كلزا	سطح زيركشت	250000	395000	525000	640000	755000
	متوسط عملكرد	1587	1787	1920	2047	2094
	توليد دانه	398900	705865	1008000	1310080	1581000

از كلزا علاوه بركارايي بالاي آن در تهيه غذا، به عنوان يك سوخت زيستي براي حمل ونقل نيز استفاده مي‌شود. همچنين مي توان از آن به طور كارآمدتري نسبت به ساير گونه‌هاي گياهي در پروژه‌هاي تصفيه زيستي براي تصفيه

آلودگي ناشي از تجمع فلزات سنگين خاكها سود جست[4]. زمانيكه روغن هاي *Brassica* كمترين Aliphatic glucosinolates و اسيد اروسيك را داشته باشد، عموماً تحت عنوان Canola خوانده مي‌شوند. در اغلب اوقات لفظ Canola به *B.napus* اشاره دارد[5].

كلزا با نام علمي براسيكا نيپوس گياهي است يک ساله از تيره چليپاييان خردل[*Crusiferae*]، آلوتراپلوييد با 19 جفت كروموزم (2n=38)كه به صورت بوته‌اي استوار، با انشعابات محدود و ارتفاع متوسط تا بلند رشد مي‌كند. طول دوره رشد كلزا در ارقام زودرس و كشت بهاره از 90 تا 150 روز و در كشت پاييزه از 200 تا 330 روز مي رسد[1]. اين گياه دربرابر خشكي و سرما مقاوم بوده و به دليل سازگاري، دامنه كشت وسيعي دارد[6]. كلزا گياهي خودگشن/دگر گشن مي باشد و درصد دگرگشني آن در ارقام مختلف 22-33% گزارش شده است [7].

يكي از مهمترين عوامل محدود كننده توليد دانه هاي روغني، مجموعه اي از حشرات آفتي هستند كه به اين گياهان خسارت وارد مي‌كنند. كلزا هم مانند ساير دانه هاي روغني در معرض آفات و بيماريهاي زيادي قرار داشته كه توليد و عملكرد اين محصول را بشدت كاهش مي دهد. از جمله آفات كلزا مي توان به ككهاي نباتي، كک ساقه كلم، سرخرطومي‌هاي ساقه و آفات پروانه‌اي اشاره نمود. يكي از مهمترين اين آفات آفات پروانه‌اي مي باشد. از آفات پروانه‌اي مي توان به پروانه كلمي يا بيد پشت الماسي[1] ، كرم مغز كلم[2]، كرم طوقه بر قهوه اي[3] ، كرم قهوه اي مرتع[4] ، سفيده كلم[1] ، كرم

[1] - ***Plutella xylostella***
[2] - ***Hellua hydralis***
[3] - ***Agrotis munda***
[4] - **Ciampa arietaria**

برگخوار آرژانتي فرا[2] ، كرم غنچه بومي[3] اشاره نمود. مهمترين روش مقابله با آفات و خسارتهاي اقتصادي ناشي از آنها، استفاده از سموم شيميايي مي باشد. استفاده از آفت كشهاي شيميايي در افزايش توليد محصولات كشاورزي نقش مهمي ايفا كرده است، اما مصرف بيش از حد آن منجر به بروز مسائل و مشكلات مختلفي مي گردد. از جمله اين مشكلات مي توان به آلودگي محيط زيست، مقاومت به آفت كش، ظهور مجدد آفات، طغيان آفات ثانوي، قيمت بالاي آفت كش، افزايش هزينه توليد، خطر مسموميت هنگام سمپاشي و همچنين مشكلات حاصل براي مصرف كنندگان محصولات كشاورزي اشاره نمود.

در كلزا، كنترل شيميايي اين آفات با توجه به گلدار بودن گياه در زمان خسارت و وجود زنبور عسل و حشرات مفيد ديگر در مزارع كلزا بسيار مشكل و پيچيده است. كنترل بيولوژيكي آفات هم در بسياري از موارد با موفقيت همراه بوده است. با اين وجود اين روش هم داراي معايبي مي باشد. به عنوان مثال در زمان استفاده از سموم Bt زمان سمپاشي از اهميت زيادي برخوردار است. بعلاوه به دليل حساسيت اين سم به اشعه ماوراي بنفش خورشيد پايداري آن بسيار پائين است. همچنين همانند سموم شيميايي هزينه كارگري براي سمپاشي هم از مواردي است كه باعث بالا رفتن هزينه توليد مي گردد. اين معايب باعث شده با وجود مزاياي فراوان سم Bt ، محدوديتهايي در استفاده از آن در جهت كنترل آفات وجود داشته باشد. يكي از راههاي استفاده مؤثر براي رفع معايب و مشكلات استفاده از سموم Bt و بهره گيري از مزاياي فراوان آن، انتقال ژنهاي مولد توكسين از باكتري باسيلوس

---

[1] - ***Pieris rapas***
[2] - ***Chrysodeixis argentifera***
[3] - ***Helicoverpa punctigera***

تورينجينسيس[1] (Bt) به گياهان زراعي با استفاده از روشهاي مهندسي ژنتيك مي باشد. باكتري Bt يك باكتري خاكزي است كه توليد پروتئين هاي شبه كريستالي از ويژگي هاي منحصر به فرد آن مي باشد كه اين پروتئين ها روي گروههاي خاصي از حشرات خاصيت كشندگي دارند.در حشرات با خوردن كريستال پروتئيني، در اثر فعاليت آنزيم هاي معده، شكل سمي پروتئين ايجاد مي شود. يكي از علت هاي اختصاصي بودن سميت كريستال هاي پروتئيني Bt براي حشرات، اتصال كريستال به گيرنده هاي اختصاصي ديوارة معده حشرات مي باشد.

حشرات دو ساعت پس از خوردن اوّلين كريستال، تغذيه را متوقف كرده و در صورتي كه سم كافي خورده شود در عرض 3 روز مي ميرند. محققين بيش از 60 نوع پروتئين كريستالي مختلف از Bt تشخيص داده اند كه علية انواع حشرات نظير سوسك سيب زميني كلرادو (*Cry3*)، كرم طوقه بر (براي مثال *Cry1A*)، كرم قوزة توتون (*Cry1Ab*) و كرم ساقه خوار اروپايي ذرت (*Cry1Ab* و*Cry9c*) مؤثر هستند. محصولات تراريخته كه توليد پروتئين سمي از باكتري Bt مي كنند مي توانند سرماية ارزشمندي براي كشاورزي باشند. انتقال ژنهاي مربوط به اين پروتئينها به گياهان يك مقاومت ذاتي در مقابل آفات در آنها ايجاد مي نمايد. امروزه، محصولات Bt براي كنترل آفات كليدي متعددي مورد استفاده بوده و بنابراين نياز به سمپاشي انواع حشره كش ها را رفع نموده اند. ضمناً، كاهش مصرف حشره كش ها درآمد كشاورزان را نيز افزايش داده و مي تواند موفقيت زيادي در راستاي مديريت تلفيقي آفات ايجاد نمايد.

با توجه به روند رو به رشد بي سابقه كشت محصولات تراريخته در دنيا، سرمايه گذاري بر روي اين دسته از

[1] - ***Bacillus thuringiensis***

محصولات بسيار حايز اهميت مي باشد. در سال 2006 سطح زير كشت محصولات تراريخته بالغ بر 102 ميليون هكتار بوده است [81] و پيش بيني مي شود كه در سالهاي آينده اين مقدار افزايش يابد. بخش عمده اي از اين محصولات مربوط به گياهان مقاوم به آفات هستند بنابراين توليد كلزاي تراريخته مقاوم به انواع آفات و بيماريها ضمن اينكه مي تواند آثار زيانبار كنترل شيميايي آفات را از بين ببرد تأثير فراواني بر افزايش توليد اين محصول هم داشته باشد. يكي از عوامل محدودكننده كشت كلزا در تمامي نقاط دنيا وجود علف هاي هرز است. اين گياهان كه اغلب با كلزا هم خانواده اند در طول دوره ي رشد با گياه كلزا رقابت تنگاتنگي انجام داده و به صورت معني داري بر عملكرد كلزا موثرند. همچنين در زمان برداشت مشكل جدي ايجاد مي كنند زيرا در زمان رسيدن بذور كلزا، علف هاي هرز به صورت خيس و نارس در سطح مزرعه پراكنده اند و ادوات برداشت را با مشكل مواجه مي كنند و اغلب راننده ي كمباين مجبور به پياده شدن و رفع گرفتگي چرخ دنده هاي قسمت جلوي كمباين مي گردد. ضمن اينكه بذور علف هاي هرز وارد مخزن شده و موجب ناخالصي بخصوصي در توليد مي گردند. استفاده از علف كش ها تبديل به يك امر مهم در كشاورزي مدرن شده است. اين موضوع روشي براي كنترل گونه هاي علف هرزي است كه مي توانند بر سر منابع موردنياز با گياهان زراعي در حال نمو رقابت كنند. توليد علف كش هاي اختصاصي جهت استفاده در مورد يك گونه گياه زراعي خاص از نظر اقتصادي مقرون به صرفه نمي باشد.در نتيجه با توليد گياهان مقاوم به علف كش مي توان توليد علف كش هاي اختصاصي براي يك گونه خاص كه عملي غير اقتصادي محسوب مي شود را كاهش داد. براي نيل به اين هدف از ژن هاي توليد كننده مقاومت به علف كش كه معمولا از باكتري ها جداسازي

شده اند استفاده مي شود. از جمله اين ژن ها، ژن *bar* مي باشد. ژن *bar* آنزيم فسفينوتريسين استيل ترانسفراز را كد مي كند كه اين آنزيم با استيل كردن علف كش فسفينوتريسين باعث غيرفعال شدن آن مي شود [114]. بيش از 80% از گياهان تراريخته كشت شده در جهان در سال 2008 ميلادي به گياهان مقاوم به علف كش اختصاص داشته و كشت اين گياهان نسبت به سال قبل از آن بيش از 10% رشد داشته است كه اين آمار اهميت داشتن انتقال اين صفات زراعي به گياهان و اهميت توليد و كشت اين گياهان در جهان را نشان مي دهد. همچنين گياهان مقاوم به آفات حدود 10% از كل گياهان تراريخت كشت شده در جهان را به خود اختصاص داده اند و كشت گياهان تواماً مقاوم به علف كش و آفات با رشد حدود 10% نسبت به سال قبل از آن، بيش از 20% از گياهان تراريخت كشت شده در سال 2008 را به خود اختصاص داده اند [80]

هدف از اين مطالعه انتقال سازه حاوي ژن*cry1Ab* و *Bt* به كلزا به منظور ايجاد مقاومت نسبت به آفات پروانه اي و علف كش در آن مي باشد.

فصل دوم
کلیات

2-1-کلزا

کلزا گیاهي است از خانواده شب بو[1]، یك ساله، دگرگشن و یکي ازمهم ترین گیاهان زراعي که از دانه آن جهت تولید روغن استفاده مي‌شود که به دو تیپ بهاره و پاییزه تقسیم مي شود . در دهه اخیر این محصول روغني از نظر متوسط عملکرد روغن جهاني از رتبه پنجم به رتبه سوم صعود کرده است که کشورهاي اروپائي و کانادا و چین و هند قسمت اعظم روغن خود را از آن تهیه مي‌کنند. به دلیل وجود گونه هایي با خصوصیات متفاوت ، امکان کشت آن در شرایط سرد ، گرم و معتدل دنیا وجود دارد. مبداء آن کشورهاي آسیاي میانه و اروپا است. این گیاه یکي از سه گیاه روغني گونه براسیکا مي باشد که به دلیل دارابودن خصوصیات مطلوب زراعي و خوراکي در ایران نیز کشت مي شود. کلزا جز یکي از مهمترین منابع روغن گیاهي و کنجاله غني از پروتئین به حساب مي آید. این گیاه پنجمین گیاه از لحاظ خصوصیات اقتصادي به شمار مي رود.

Bt -2-2

2-2-1- ویژگیهاي زیست شناختي سم Bt :

باکتري *Bacillus thuringiensis* یک حشره کش زیستي است که به طور طبیعي قادر به تولید توکسیني است که مي تواند گونه هاي مختلف حشرات را از بین ببرد. یکي از شناخته شده ترین سموم میکروبي که بطور گسترده اي مطالعه شده است سمي است که توسط باکتري Bt تولید مي شود و آن را توکسین Bt نامیده اند. این باکتري شامل سویه هاي مختلفي است که هر کدام توکسین هاي ویژه اي را مي سازند که مي توانند گونه هاي مختلف حشرات را از میان ببرد. براي مثال باکتري Bt زیر

[1] - ***Brasicaceae***

گونه kurstaki، سمي را توليد مي كند كه لارو حشرات راسته بال پولك داران از جمله كرم كلم و كرم جوانه صنوبر را از بين مي برد. همچنين زير گونه *israelensis* حشرات راسته دو بالان[1] مانند پشه مالاريا را از بين مي برد. زير گونه tenebrionis نيز اثر مشابهي بر روي حشرات راسته قاب بالان مانند سوسك سيب زميني[2] دارد. اثرات سمي سويه هاي مختلف باكتري Bt به علت دارا بودن ساختارهاي پروتئيني بزرگي بنام پاراسپورال كريستال[3] مي باشد كه در طي مرحله اسپوري شدن باكتري سنتز شده و با يكديگر جمع مي شوند و مجموعه هاي[4] پروتئيني را به وجود مي آورند. اين مجموعه هاي پروتئيني حدود 20 الي 30% از وزن خشك محيط كشت اسپوري شده را تشكيل مي دهند و معمولاً از حدود 95% پروتئين و 5% كربوهيدرات تشكيل شده اند. اين ساختار كريستالي كه به صورت تجمع پروتئيني است در اثر يك تيمار قليايي ملايم به زير واحدهاي سازنده خود تجزيه مي شود. اين زير واحدها مي توانند در شرايط *in vitro* و با تيمار توسط β-مركاپتواتانل[5]، كه پيوندهاي دي سولفيدي را مي شكند، به واحدهاي كوچكتري تجزيه شوند [72 و133].

جدول 2-2-1: مثال هايي از پروتئين هاي Cry و حشرات مورد هدف [133]

سروتيپ	حشرات هدف	اندازه بر حسب kD	كلاس
1	[بال پولك داران] *Lepidoptera*	130-140	Cry I

[1]- Diptera

[2]- Potato beetle

[3] - Parasporal crystal

[4]- Aggregats

[5] - β- Mercaptoethanol