دانشگاه مازندران
مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم زراعی

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد (M.Sc)
رشته مهندسی کشاورزی گرایش بیوتکنولوژی

موضوع:

ارزیابی مولکولی مقاومت به بیماری ریزومانیا در گیاهان چغندرقند تراریخت حامل سازه های خاموش کنندۀ ژن CP_{21}

استادان راهنما:

دکتر محمدعلی ملبوبی دکتر سیدکمال کاظمی تبار

نگارش:

راضیه ستاری

شهریور ۱۳۸۵

دانشگاه مازندران
مجتمع آموزش عالی کشاورزی و منابع طبیعی
دانشکده علوم زراعی

موضوع:

ارزیابی مولکولی مقاومت به بیماری ریزومانیا در گیاهان چغندرقند تراریخت حامل سازه های خاموش کنندهٔ ژن CP_{21}

استادان راهنما:
دکتر محمدعلی ملبوبی دکتر سیدکمال کاظمی تبار

استاد مشاور:
دکتر علی نیازی

نگارش:
راضیه ستاری

شهریور ۱۳۸۵

تقدیم به پدر که در آستانه در ایستاده و
مرا با نگاه خویش فرا می خواند
به نهایت بی نهایت.

تقدیم به مادرکه نگاه پدر را در من نگاه می دارد
تا فراموشی مرا نرباید،
اشاره اش به آسمان است
تا خاک را فراموش کنم،
تبسم دارد تا در عبور لحظه ها،
زیبایی را به تماشا بنشینم.

واژه واژه جستجو کردم تا مگر بیابم...
او خواسته هایم را خواست و برای توانستنم برخاست.
همراه بودن او بهانه کافی برای ستودن اوست.
اما برای سپاس او فقط سکوت می کنم.
چون بودن های او بیشمار است و حروف اندک.
ای کاش می دانستم بر کدام خاک، به خاطر با او بودن، سجده شکر بگذارم.
هر آنچه زیبایی که در سطر سطر این نوشته ها برای من تجسم یافت،
هر اندازه شعفی که در یافتن ها نصیبم گشت
و هر هست شدنی که پیش رو دارم،
تقدیم به مجتبی عزیزم باد.

سپاسگزاری

بدین وسیله مراتب سپاس و امتنان خود را نسبت به راهنمایی های ارزنده جناب آقای دکتر ملبوبی ابراز داشته، زحمات ایشان را ارج می نهم و از همراهی علمی و معنوی این استاد بزرگوار سپاسگزارم.

از رهنمودهای جناب آقای دکتر کاظمی تبار در طی تحصیل در آن دانشکده و در زمان انجام پایان نامه قدردانی و تشکر می نمایم.

از راهنمایی های جناب آقای دکتر نیازی در مراحل انجام این تحقیق کمال سپاسگزاری و امتنان را دارم.

از جناب آقای دکتر رحیمیان، آقای دکتر برزگر و خانم دکتر لهراسبی که در داوری این پایان نامه، اینجانب را از رهنمودهای خویش بهره مند ساختند نهایت سپاس و تشکر را دارم.

بر خود لازم می دانم مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاری اساتید ارجمند و کارمندان در مجتمع عالی علوم کشاورزی و منابع طبیعی به ویژه دانشکده علوم زراعی و اساتید، کارشناسان و دوستان خود در پژوهشکده بیوتکنولوژی گیاهی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به ویژه خانم ها دکتر رضوی، شریعتی، رادکیش و مشیری ابراز دارم.

در پایان از همکاری پژوهشگران مؤسسه چغندرقند کرج، خانم مهندس یاوری و آقایان دکتر صادقیان، دکتر رنجی، دکتر محمودی، دکتر نوروزی و کارشناسان مرکز تحقیقات ویروس شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز و آقای مهندس دارابی سپاسگزاری و تشکر می نمایم.

ارزیابی مولکولی مقاومت به بیماری ریزومانیا در گیاهان چغندرقند تراریخت حامل سازه های خاموش کنندۀ ژن CP_{21}

چکیده

در این تحقیق مقاومت به بیماری ریزومانیا در گیاهان چغندر قند تراریخت تحت تأثیر فرایند خاموش کنندگی ژنی مورد بررسی قرار گرفت. دو نوع سازه مورد استفاده، S_3 و S_6 ، به ترتیب ژن رمز کننده ی پروتئین پوششی ویروس BNYVV و توالی 5´-UTR ژن مزبور را به صورت سنس ـ اینترون ـ آنتی سنس حمل می کنند و mRNA حاصل از رونویسی آنها حالت سنجاق سری پیدا می کند. بنابراین انتظار می رود در گیاهان واجد این سازه ها فرایند خاموشی ژنی بر علیه پروتئین پوششی فعال شده باشد. آزمون های اثبات تراریختی لکه گذاری و PCR نشان داد ۷۶ درصد گیاهان موجود تراریخت هستند. پس از اثبات تراریختی، گیاهان چغندر قند به روش های جنسی و غیرجنسی تکثیرشده و در نهایت جهت بررسی مقاومت، به خاک آلوده منتقل شدند. پس از القاء بهاره سازی، همزمان با تهیه همسانه های گیاهان T_0، بذر T_1 به دست آمد. گیاهان T_0 و همسانه ها با BNYVV چالش یافته و نمونه ها در هفته های پنجم، هشتم یا نهم جمع آوری شد. جهت تشخیص ویروس از آزمون الایزا استفاده شد. ۷۳ درصد از لاین‌های حامل S_3 و ۸۸ درصد از لاین‌های S_6 و در مجموع ۸۳ درصد از کل لاین های چالش یافته درجاتی از مقاومت به بیماری ریزومانیا را نشان دادند.

کلمات کلیدی: *ریزومانیا، تراریخت، همسانه، الایزا، مقاومت، BNYVV.*

فهرست

عنوان	صفحه
۱- مقدمه	۲
۲- کلیات	
۲-۱- گیاه شناسی چغندر قند	۷
۲-۱-۱- تکثیر جنسی	۷
۲-۱-۲- تکثیر غیرجنسی	۸
۲-۲- ریزومانیا	
۲-۲-۱- عامل بیماری ریزومانیا	۹
۲-۲-۲- ناقل قارچی	۱۰
۲-۲-۳- علائم بیماری ریزومانیا	۱۲
۲-۲-۴- اهمیت اقتصادی بیماری ریزومانیا	۱۳
۲-۲-۵- روش های تشخیص آزمایشگاهی	۱۴
۲-۲-۵-۱- میکروسکوپ الکترونی	۱۴
۲-۲-۵-۲- روش های مبتنی بر PCR	۱۵
۲-۲-۵-۳- روش های سرولوژیکی	۱۵
۲-۲-۵-۳-۱- آزمون ELISA	۱۶
۲-۲-۵-۳-۲- روش های ردیابی در جا	۱۹
۲-۲-۶- روش های چالش ویروسی	۱۹
۲-۲-۶-۱- انتقال مکانیکی	۱۹
۲-۲-۶-۲- انتقال از طریق پیوند زنی	۲۱
۲-۲-۶-۳- انتقال به وسیلهٔ حشرات و کنه ها	۲۲
۲-۲-۶-۴- انتقال توسط موجودات زندهٔ ساکن در خاک	۲۲
۲-۲-۶-۴-۱- حشرات	۲۲
۲-۲-۶-۴-۲- نماتدها	۲۲
۲-۲-۶-۴-۳- قارچ ها	۲۲
۲-۲-۷- مقاومت به ریزومانیا	
۲-۲-۷-۱- منابع ژنتیکی	
۲-۲-۷-۱-۱- منابع ژنتیکی مقاومت به BNYVV	۲۵
۲-۲-۷-۱-۲- منابع ژنتیکی مقاومت به *P. betae*	۲۶

۲-۲-۷-۲- استفاده از نشانگر های ملکولی پیوسته با مقاومت به ریزومانیا ۲۸
۲-۲-۷-۳- روش های مهندسی ژنتیک ۲۹
۲-۲-۷-۳-۱- بیان ژن های مقاومت گیاهی یا مقاومت وابسته به میزبان ۲۹
۲-۲-۷-۳-۲- بیان ژن آنتی بادی پاتوژن در گیاه ۲۹
۲-۲-۷-۳-۳- مقاومت پاتوژن زاد ۲۹
۲-۲-۸-۱- PTGS یا خاموش کنندگی پس از نسخه برداری ۳۱
۲-۲-۸-۲- اجزای دخیل در خاموشی ژن پس از نسخه برداری ۳۳
۲-۲-۸-۳- مقاومت وابسته به RNA ۳۴

۳- بررسی منابع
۳-۱- خاموش کنندگی ژنی و مقاومت القاء شده نسبت به ویروس های گیاهی ۳۹
۳-۲- ایجاد مقاومت پاتوژن زاد در BNYVV ۴۰
۳-۳- بذر دهی و تکثیر چغندر قند ۴۱
۳-۴- ریزازدیادی چغندرقند ۴۳
۳-۵- چالش گیاهان چغندرقند با BNYVV ۴۴
۳-۶- روش های شناسایی BNYVV ۴۵

۴- مواد و روشها
۴-۱- مواد گیاهی ۴۹
۴-۲- اثبات تراریختی ۴۹
۴-۲-۱- استخراج DNA ۴۹
۴-۲-۲-۱- آزمون PCR ۵۰
۴-۲-۲-۲- لکه گذاری نقطه‌ای
۴-۲-۲-۲-۱- سنتز کاوشگر ۵۱
۴-۲-۲-۲-۱-۱- استخراج پلاسمید ۵۲
۴-۲-۲-۲-۱-۲- PCR برای تکثیر قطعه اینترون به عنوان کاوشگر ۵۲
۴-۲-۲-۲-۱-۳- خالص سازی کاوشگر نشان‌دار ۵۴
۴-۲-۲-۲-۲- لکه گذاری بر روی غشا ۵۴
۴-۲-۲-۲-۳- پیش دو رگ سازی و دورگ سازی ۵۵
۴-۲-۲-۲-۴- شستشوهای غشا ۵۶

۴-۲-۲-۲-۵- آشکارسازی ۵۶
۴-۳- تکثیر جنسی گیاهان چغندرقند T_0 و تولید بذر T_0 ۵۷
۴-۴- تکثیر غیر جنسی گیاهان تراریخت To
۴-۴-۱- محیط‌های کشت ۵۸
۴-۴-۲- خاک ۵۹
۴-۴-۳- روش های تکثیرغیر جنسی ۵۹
۴-۴-۳-۱- کشت مستقیم جوانه در خاک ۵۹
۴-۴-۳-۲- کشت درون شیشه ۵۹
۴-۵- چالش ویروسی ۶۰
۴-۵-۱- تهیه خاک آلوده ۶۰
۴-۵-۲- چالش ویروسی گیاهان غیر تراریخت (چالش آزمایشی)
۴-۵-۲-۱- تهیه گیاهان غیر تراریخت چغندر قند ۶۱
۴-۵-۲-۲- آلوده سازی ۶۲
۴-۵-۳- چالش ویروسی گیاهان T_0 ۶۲
۴-۵-۴- چالش ویروسی همسانه های گیاهان T_0 ۶۲
۴-۵-۵- آزمون الایزا ۶۳
۴-۵-۵-۱- دستورنامه ی الایزا در چالش آزمایشی ۶۳
۴-۵-۵-۲- دستورنامه الایزای نمونه های تراریخت ۶۴

۵- نتایج
۵-۱- اثبات تراریختی
۵-۱-۱- استخراج DNA ی ژنومی ۶۶
۵-۱-۲- آزمون PCR ۶۶
۵-۱-۳- آزمون لکه گذاری نقطه ای ۶۶
۵-۲- تکثیرجنسی گیاهان چغندرقند T_0 و تولید بذرT_1 ۷۱
۵-۳- تکثیر غیر جنسی گیاهان چغندرقند T_0
۵-۳-۱- کشت مستقیم جوانه در خاک ۷۵
۵-۳-۲- کشت درون شیشه ۷۵
۵-۴- چالش ویروسی ۷۸
۵-۴-۱- چالش گیاهان چغندرقند غیرتراریخت ۷۹
۵-۴-۱-۱- الایزای نمونه‌های ریشه ۸۰

۵-۴-۱-۲- الایزای نمونه‌های برگ و دمبرگ ۸۱
۵-۴-۱-۳- نتایج حاصل از چالش گیاهان چغندرقند غیرتراریخت ۸۲
۵-۴-۲- چالش گیاهان T_0 ۸۲
۵-۴-۲-۱- الایزای هفته پنجم ۸۳
۵-۴-۲-۲- الایزای هفته نهم ۸۳
۵-۴-۲-۳- نتایج چالش گیاهان T_0 ۸۴
۵-۴-۲-۴- گیاهان مقاوم و حساس با توجه به نتایج آزمون های الایزای گیاهان T_0 ۸۴
۵-۴-۳- چالش ویروسی همسانه ها ۹۰
۵-۴-۳-۱- مرحله اول ۹۰
۵-۴-۳-۲-۱- الایزای هفته پنجم ۹۰
۵-۴-۳-۲-۲- الایزای هفته نهم ۹۰
۵-۴-۳-۲- مرحله ی دوم ۹۱
۵-۴-۳-۲-۱- الایزای هفته پنجم ۹۲
۵-۴-۳-۲-۲- الایزای هفته هشتم ۹۲
۵-۴-۳-۳- همسانه های مختلف مربوط به یک گیاه ۹۳
۵-۴-۴- مقایسه رفتار همسانه ها و گیاهان مادری T_0 ۹۳
۵-۴-۵- گیاهان مقاوم پس از چالشهای ویروسی گیاهان مادری T_0 و همسانه ها ۹۸

۶- بحث
۶-۱- ارزیابی مقاومت ۱۰۲
۶-۱-۱- اطمینان از دریافت آلودگی ویروسی توسط گیاهان چالش یافته ۱۰۲
۶-۱-۲- تحلیل داده های آزمون های الایزا ۱۰۳
۶-۲- تراریختی و مقاومت ۱۰۴
۶-۳- بررسی مخاطرات گیاهان چقندر قند تراریخت مقاوم به ویروس ۱۰۵
۶-۴- پیشنهادات ۱۰۸

۷- منابع ۱۱۰
۸- ضمیمه
۸-۱- مواد تشکیل دهنده محیط کشت MS ۱۲۶
۸-۲- موادتشکیل دهنده بافر×PBS۱۰ ۱۲۷

فهرست شکل ها

عنوان	صفحه
شکل ۱- سازه های طراحی شده در پژوهش پیشین	۵
شکل ۲- ژنوم ویروس BNYVV	۱۰
شکل ۳- چرخه زندگی بیماری ریزومانیا	۱۱
شکل ۴- PCR مربوط به ۵ گیاه S_3	۶۷
شکل ۵- لکه گذاری نقطه ای جهت اثبات تراریختی گیاهان S_3 و S_6	۶۸
شکل۶- گیاهان چغندرقند در اتاق سرد برای القاء بهاره سازی	۷۱
شکل۷- گیاه چغندرقند در ابتدای مرحله ساقه دهی	۷۱
شکل ۸- گیاه چغندر قند دراواسط دوره ساقه دهی	۷۱
شکل ۹- گل آذین گیاهان چغندر	۷۱
شکل۱۰ - قیمهای چوبی به عنوان تکیه گاه گیاهان چغندرقند در هنگام ساقه روی	۷۲
شکل ۱۱- روکش های خودگرده افشانی جهت جلوگیری از دگرگشنی گیاهان چغندر قند	۷۲
شکل ۱۲- مراحل رشدی گیاهان چغندرقند از بهاره سازی تا چالش ویروسی	۷۴
شکل ۱۳- گیاهان چغندرقند در فاز رویشی پس از بذر دهی	۷۴
شکل ۱۴- انتقال مستقیم جوانه جانبی گیاه چغندرقند به خاک	۷۵
شکل ۱۵- جوانه های رأسی گل آذین برای تکثیر گیاهان چغندرقند در کشت درون شیشه	۷۶
شکل ۱۶- جوانه های رأسی گل آذین در محیط القا ی رشد رویشی	۷۶
شکل ۱۷- تولید جوانه های رویشی در انتهای جوانه های راسی انتقال یافته به محیط القا	۷۶
شکل ۱۸- جوانه تکثیر یافته در محیط ازدیاد	۷۷
شکل ۱۹- گیاهچه در محیط ریشه زایی	۷۷
شکل ۲۰- همسانه به دست آمده از کشت جوانه رأسی	۷۷
شکل۲۱ - همسانه های تکثیر شده در فیتوترون	۷۸
شکل ۲۲- گیاه چغندرقند قبل از انتقال به خاک آلوده	۸۰
شکل ۲۳- گیاه خارج شده برای نمونه برداری از ریشه برای الایزا	۸۰
شکل ۲۴- مقایسه همسانه های مختلف مربوط به یک گیاه مادری	۹۹
شکل ۲۵- مقایسه همسانه های مقاوم و گیاهان مادری آنها	۹۹

شکل ۲۶- نمایشی از میزان تحمل یا مقاومت لاین های تراریخت S3 و S6 ۱۰۰

فهرست جدول ها

عنوان **صفحه**

جدول ۱- قارچ های زئوسپوری انتقال دهنده ویروس ۲۴
جدول ۲- اجزای واکنش PCR برای DNA ژنومی گیاهان چغندرقند و مقادیر آنها ۵۱
جدول ۳- اجزای تشکیل دهنده واکنش PCR به منظور سنتز کاوشگر ۵۳

جدول ۴- بافرهای آزمون الایزا ۶۴
جدول ۵- نتایج PCR گیاهانS_3 ۶۷
جدول ۶- اثبات تراریختی گیاهان S_3 با آزمون لکه گذاری نقطه ای ۶۹
جدول ۷- اثبات تراریختی گیاهان S_6 با آزمون لکه گذاری نقطه ای ۷۰
جدول ۸- بررسی جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های ریشه گیاهان غیر تراریخت در نمونه برداری ۸۱
جدول ۹- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان مادری T_0 در هفته ی پنجم چالش ۸۶
جدول ۱۰- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان مادری T_0 در هفته ی نهم چالش ۸۷
جدول ۱۱- مقایسه ی نتایج آزمون های الایزای گیاهان مادری T_0 ۸۸
جدول ۱۲- معرفی گیاهان مقاوم احتمالی و حساس پس از چالش گیاهان ماادری T_0 ۸۹
جدول ۱۳- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان همسانه در هفته ی پنجم مرحله ی اول ۹۴
جدول ۱۴- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان همسانه در هفته ی نهم مرحله ی اول ۹۵
جدول ۱۵- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان همسانه در هفته ی پنجم مرحله ی دوم ۹۵
جدول ۱۶- جذب نور در nm ۴۰۵ نمونه های گیاهان همسانه در هفته هشتم مرحله ی دوم ۹۶
جدول ۱۷- نتایج نهایی الایزای همسانه ها ۹۷
جدول ۱۸- فهرست گیاهان مقاوم احتمالی پس از چالش های ویروسی ۹۸

University of Mazandaran
High Educated Complex of Agricultural and Natural Resource Science
Collage of Agronomy Science

A Thesis Submitted for Degree of Master of Science
in Agricultural Engineering
Biotechnology

Subject:
Molecular Analysis of Resistance to Rhizomonia Disease in Transgenic Sugar Beet Plants Carrying Silencing Construct of CP_{21} Genes

Supervisor:
Dr Mohammad Ali Malboobi
Dr Seyed Kamal Kazemitabar

Adviser:
Dr Ali Niazi

By:
Razieh Sattari

September 2006

Molecular Analysis of Resistance to Rhizomonia Disease in Transgenic Sugar Beet Plants Carrying Silencing Construct of CP_{21} Genes

Abstract

In this research, resistance to rhizomonia disease in transgenic plants by gene silencing mechanism was investigated. Two types of constructs, S_3 and $S_{6,}$ carry sense, intron and

antisense fragments of CP_{21}-encoding gene or its 5´-UTR sequences, respectively, such that the resultant transcripts have hairpin structures. Thus, it is expected that the gene silencing process is active in the transgenic plants.

The application of dot blotting and PCR methods showed 76 percent of these plants are transgenic. After confirmation of transformation, the plants were propagated sexually and asexually, and then were transferred to soil for examination the resistance level. After vernalization, production of T_1 seeds and cloning of T_0 plants were conducted at the same time. A number of T_0 parent plants and their clones were used for challenging with BNYVV. Collecting samples on week 5, 8 or 9. The viral propagation was assayed by ELISA method. 73 percent of S_3 Plants and 88 percent of S_6 plants and in total 83 percent of challenged lines were resistant to the disease at some levels.

Key words: *rhizomania, transgenic, clone, ELISA, resistance, BNYVV*

فصل اول

مقدمه

چغندرقند از مهمترین منابع تأمین کننده ی ساکارز، یکی از عناصر ارزشمند غذایی، به شمار می آید. از این گیاه علاوه بر تولید شکر فراورده های ثانوی مانند تفاله و ملاس که در سطحی وسیع برای تغذیه دام و تولید مواد مفید دیگر مانند اسید سیتریک، لیزین، اسید گلوتامیک، ویتامین B_{12} و بسیاری محصولات فرعی دیگر نیز به دست می‌آید که در صنایع غذایی، شیمیایی، تولید سوخت مایع و الکل استفاده می‌شود.

تا قرن نوزدهم، نیشکر تنها منبع تولید شکر در جهان بود، اما در آن زمان، با آغاز کشت چغندرقند در فرانسه، سهم قابل ملاحظه ای از تولید شکر به این محصول جدید اختصاص یافت (۳۰).

تولید جهانی شکر پیوسته در حال افزایش است به طوری که تولید آن از ۵۰ میلیون تن در سال ۶۰-۱۹۵۹ به ۱۴۴ ملیون تن در سال۲۰۰۴ رسیده است.

در ایران اولین کارخانه قند درسال ۱۲۷۷ هجری شمسی مطابق با ۱۸۹۸ میلادی با همت و کوشش حاج میرزا علیخان امین الدوله و کمک کشور بلژیک درکهریزک تأسیس شد. همزمان با تأسیس این کارخانه، کشت چغندرقند در محدودهٔ فعالیت کارخانه در روستاهای اطراف کهریزک آغاز گردید. در حال حاضر در ایران ۳۷ کارخانه قند فعالیت دارند که ۳۵ کارخانه به روش چغندری و ۲ کارخانه به روش نیشکری اداره می‌شوند. ظرفیت تولیدی کل قند و شکر بیش از ۱/۵ میلیون تن و میزان مصرف سالیانه شکر در کشور بین ۱/۷ میلیون تن تا ۲ میلیون تن است که ارزشی معادل ۳۳۴ میلیون دلار به واردات شکر خام اختصاص می یابد.

افزایش محصول با افزایش سطح زیر کشت، و بالا بردن راندمان محصول در واحد سطح با به کارگیری روش های نوین کشاورزی و مبارزه با آفات و بیماری ها میسر است. از جمله بیماری های مهم و تهدید کننده ی چغندرقند بیماری ریزومانیا می باشد. به علت رشد غیر طبیعی، رنگ سیاه وحالت نکروتیک ریشه های جانبی، این بیماری را ریزومانیا یا دیوانگی ریشه می نامند (۳۰). ریزومانیا ابتدا در سال ۱۹۵۹ برای اولین بار توسط کانوا از شمال ایتالیا گزارش گردید (۲۶). ایزد پناه و همکاران در سال ۱۹۹۶ در ایران آنرا شناسایی نمودند. امروزه بیماری ریزومانیا در بیشتر مناطق چغندر کاری دنیا

گسترش یافته است که این امر بیان کننده اهمیت مطالعه آن می‌باشد (۱۲۳). این بیماری در ایران در حال گسترش بوده و در برخی مناطق حالتی بحرانی در زراعت چغندر قند پیدا کرده است. ریزومانیا خسارات زیادی را سالانه به مزارع چغندر قند وارد می‌سازد. میزان خسارت این بیماری اغلب از ۳۰ درصد تجاوز کرده و گاهی به ۱۰۰ درصد می‌رسد (۲۴، ۳۸، ۱۲۳ و ۱۳۹). روش‌های متفاوتی برای مبارزه با آن پیشنهاد شده اما هیچ یک از این روش‌ها در مزرعه مؤثر نبوده یا از نظر اقتصادی عملی نمی‌باشند (۱۲۱ و ۱۲۳). بهترین راه مقابله با این بیماری و ادامه کشت در مزارع آلوده، اصلاح چغندر قند به منظور ایجاد مقاومت به ریزومانیا با روش های سنتی یا زیست فناوری می‌باشد.

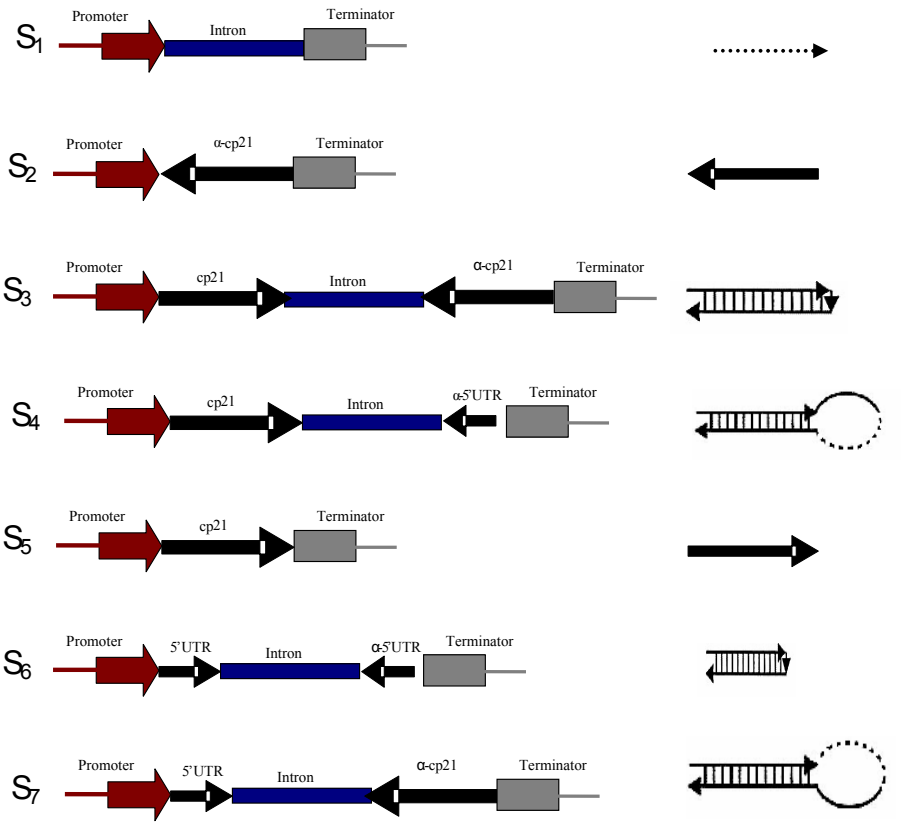
برای ایجاد مقاومت ها مهندسی ژنتیک به عنوان یکی از بهترین روش های کاربردی در چندسال اخیر به شمار می آید که می توان از مقاومت پاتوژن‌زاد[1] در آن استفاده کرد (۱۲۰). اساس این راهبرد، انتقال ژن ها یا توالی‌هایی با منشأ ویروسی به گیاه میزبان است که در این صورت گیاه مزبور در برابر عامل بیماریزا مقاومت نشان خواهد داد (۵۳). بر این اساس، محققان سه راهبرد استفاده از ژن پروتئین پوششی، ژن پروتئین حرکتی و استفاده از روش مقاومت با واسطه ی RNA (تکنیک آنتی سنس و خاموش کنندگی ژنی) را برای ایجاد مقاومت پاتوژن‌زاد در مقابل ریزومانیا پیشنهاد می نمایند (۱۲۳). با بهره‌گیری از خاموشی ژنی القاء شده به واسطه ی وجود توالی های سنس و آنتی سنس ژن ویروسی بر روی یک واحد رونویسی، ژنوم در همان بخش تجزیه شده و در نتیجه مسیر تکثیر و انتشار ویروس مسدود می‌گردد.

بر همین اساس نیازی و همکاران در قالب طرح پژوهشی شماره ی ۱۶۵ در پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، ۷ سازه جهت القا مقاومت نسبت به ویروس BNYVV طراحی و پس از انجام عملیات تراریختی موضعی به گیاهان چغندرقند واکنش گیاهان مزبور نسبت به آلودگی ویروسی بررسی گردید، با استفاده از نتایج به دست آمده، دو سازه ی S_3 و S_6 جهت تراریختی پایدار انتخاب و به رقم ۹۵۹۷ چغندرقند منتقل شد. مشخصات سازه‌های مزبور در شکل۱ آورده شده است.

1. Pathogene-Derived Resistance

۱۸ گیاه مربوط به سازه S_3، توالی های سنس و آنتی سنس ژن پوشش پروتئینی ویروس BNYVV به وزن ۲۱ کیلو دالتون (CP_{21}) با قطعه اینترون در حد فاصل این دو توالی و ۱۲ گیاه از انتقال سازه S_6، دارای توالی های سنس و آنتی سنس توالی های غیر قابل ترجمه با قطعه اینترون در بین توالی های نامبرده، به دست آمده بودند (شکل۱). حاصل رونویسی توالی های سنس و آنتی سنس در گیاهان تراریخت، تشکیل یک mRNA ی سنجاق سری است که توالی اینترون قسمت حلقه و توالی های مکمل ساقه ی آن را تشکیل می‌دهند. RNA ی دو رشته‌ای مزبور پدیده خاموش کنندگی ژنی را فعال کرده و موجبات تجزیه خود را فراهم می‌آورد. siRNA های تولید شده، به عنوان شناساگر ویروس BNYVV عمل نموده و با اتصال به آن RNA ی دو رشته‌ای تشکیل می دهد که هدف مکانیسم خاموشی ژنی قرار می گیرد و به این ترتیب چرخه قبل تکرار می شود. بنابراین با فعال شدن خاموشی ژنی بر علیه ژن رمز کننده پروتئین پوششی CP_{21} از تکثیر BNYVV در گیاهان چغندر قند تراریخت ممانعت به عمل می‌آید.

در این تحقیق آنالیزهای مولکولی و زیست سنجی بر روی گیاهان حاصل از انتقال دو سازه S_3 و S_6 انجام گرفت. در ابتدا اثبات تراریختی گیاهان مزبور، توسط آزمون های لکه گذاری نقطه ای (Dot Blot) و PCR انجام شد. پس از تهیه ی همسانه ها و بذرگیری، با انتقال آنها به خاک آلوده، آلودگی ویروسی در آنها بررسی گردید.



شکل۱ – سازه های طراحی شده در پژوهش پیشین.

در این سازه‌ها از پروموتور 35S-CaMV و منطقه رمز کننده پروتئین پوششی ۲۱ کیلو دالتونی (CP_{21}) و منطقه غیر قابل ترجمه سمت 5’ (5′ UTR) و خاتمه دهنده OCS (Terminator) استفاده شده است. ساختار RNA حاصل از رونویسی سازه های فوق در سمت راست نشان داده شده است. سازه های S_3 و S_6 به طور پایدار به ریزنمونه های چغندرقند منتقل شد و گیاهان حاصل در پژوهش اخیر برای انجام بخش زیست سنجی استفاده شدند.