



## تراریخت سازی چغندر قند با ژن کیتیناز لویا و افزایش مقاومت به بیمارگر *Alternaria alternata*

آزاده گودرزی<sup>۱</sup>، ناصر صفایی<sup>۱\*</sup>، مراد جعفری<sup>۲\*</sup>، سید باقر محمودی<sup>۳</sup>، مسعود توحیدفر<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

<sup>۲</sup> استادیار، گروه اصلاح و بیوتکنولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

<sup>۳</sup> استادیار، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه.

<sup>۴</sup> استادیار، مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندر قند.

<sup>۵</sup> دانشیار، بخش تحقیقات کشت بافت و انتقال ژن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۸/۱۶، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۱۰

### چکیده

بیماری های قارچی از عوامل عمده کاهش رشد و باروری چغندر قند در سراسر جهان به شمار می روند. بیان پروتئین های مرتبط با بیماری زایی نظیر کیتینازها، یکی از پاسخ های دفاعی گیاهان در مقابل بیمارگرهای قارچی به شمار می رود. آنزیم های کیتیناز از طریق تجزیه دیواره های سلولی قارچی، در افزایش مقاومت گیاهان در مقابل دامنه گسترده ای از قارچ های بیماری زا نقش قابل توجهی دارند. در این تحقیق از دو رقم دیپلوئید چغندر قند، SBSI-02 و SBSI-04، جهت تراریختی با *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 حاوی پلاسمید pBI-BCH حامل ژن کیتیناز (*chi*) تحت کنترل راه انداز CaMV 35S و ژن *nptII* گزینشگر استفاده شد. برگ های حاوی پایه جوانه به عنوان ریزنمونه در فرآیند تراریخت سازی به کار برده شدند. جوانه های سبز در محیط کشت MS حاوی غلظت های مختلف کانامایسین با موفقیت غربال شدند. آنالیز PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *chi*، حضور ژن هدف را در بیش از ۵۰ درصد گیاهچه های مقاوم به کانامایسین تأیید کرد. آنالیز لکه گذاری نقطه ای (Dot blot) درج حداقل یک نسخه از ژن هدف را در ژنوم گیاهان تراریخته احتمالی تأیید نمود. آنالیز وسترن بلات تجمع پروتئین کیتیناز را در گیاهان تراریخته آشکار نمود. آزمون های زیست سنجی با استفاده از قطعات جدا شده برگ و در سطح گیاه کامل، مقاومت افزایش یافته لاین های تراریخته T<sub>0</sub> چغندر قند در برابر بیمارگر قارچی *Alternaria alternata* را در مقایسه با گیاهان شاهد غیرتراریخته آشکار ساخت.

واژه های کلیدی: چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)، *Agrobacterium tumefaciens*، تراریختی، ژن کیتیناز،

*Alternaria alternata*

## مقدمه

قارچ‌هاست، کاتالیز می‌نمایند. این پروتئین‌ها به دلیل دارا بودن فعالیت لیزوزیمی، قادرند پیتیدوگلیکان موجود در دیواره‌های سلولی باکتریایی را تجزیه نمایند (Bowles, 1990). از سوی دیگر، کیتینازها در بهبود مقاومت گیاهان در مقابل تنش‌های غیرزیستی نظیر شوری و فلزات سنگین نیز نقش دارند (Datta *et al.*, 2001). فعالیت ضد قارچی کیتینازهای گیاهی، این پروتئین‌ها را به عنوان یک کاندیدای مناسب جهت مهندسی ژنتیک گیاهان جهت افزایش مقاومت به بیمارگرهای قارچی معرفی نموده است. تا کنون، به منظور بیان فراوان کیتینازهای گیاهی همولوگ و هترولوگ در گیاهان تحقیقات متعددی صورت گرفته است (de las Mercedes *et al.*, 2006). بیان ژن‌های مختلف رمزکننده کیتیناز در توتون (de las Mercedes *et al.*, 2006)، برنج (Datta *et al.*, 2001)، پنبه (Ganesan *et al.*, 2009)، جو (Prasad *et al.*, 2007)، بادامزمینی (Tobias *et al.*, 2007)، خیار (Kishimoto *et al.*, 2002) و مو (Nookaraju & Agrawal, 2012) با افزایش مقاومت گیاهان تراریخته در مقابل بیمارگرهای قارچی همراه بوده است. در خصوص تراریختی ژنتیکی چغندر قند به منظور افزایش مقاومت این محصول در مقابل عوامل بیماری‌زای قارچی گزارش محدودی وجود دارد. در این خصوص می‌توان به تراریختی چغندر قند با ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های دفاعی شامل ژن‌های

واکنش‌های دفاعی القاء شده گیاهان در مقابل بیمارگرها از طریق دریافت عوامل بیماری‌زا و یا ملکول‌های مشتق شده از آنها به نام الیسیتور آغاز می‌گردد. مقاومت به بیماری‌ها یک فرآیند فعال و وابسته به سنتز مجموعه‌ای از RNAها و پروتئین‌هاست که به بروز واکنش‌های دفاعی منجر می‌شود. از جمله تغییرات ایجاد شده در الگوی سنتز RNA میزبان به دنبال دریافت الیسیتورهای قارچی، می‌توان به فعال‌سازی نسخه‌برداری ژن‌های دفاعی رمزکننده گلیکوپروتئین‌های غنی از هیدروکسی پرولین دیواره سلولی، آنزیم‌های دخیل در سنتز لیگنین و فیتوالکسین‌ها و نیز پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PRs)<sup>۱</sup> اشاره نمود (Hedrick *et al.*, 1988). واژه "پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی" یک اصطلاح عمومی است که برای تمامی پروتئین‌های القاء شده با عوامل میکروبی و همولوگ‌های آنها به کار برده می‌شود. بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاهان با بروز واکنش‌های فوق حساسیت و مقاومت القایی در ارتباط است (Tuzun *et al.*, 1989). پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، آنزیم‌هایی نظیر کیتینازها، گلوکانازها و لیزوزیم‌ها را شامل می‌شوند. کیتینازها، تجزیه پیوند بتا-۱و۴- از پلیمر *N*-استیل گلوکز آمین (GlcNAc)<sup>۲</sup> کیتین را که یکی از اجزای اصلی دیواره سلولی

<sup>1</sup> Pathogenesis-related proteins<sup>2</sup> N-acetylglucosamine

## مواد و روش‌ها

تهیه ریزنمونه، فرآیند تراریختی و گزینش گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

در این تحقیق از دو رقم مولتی‌ژرم دیپلوئید چغندر قند شامل SBSI-02 و SBSI-04، تهیه شده از مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندر قند کرج، جهت تراریختی استفاده شد. بذور استریل در محیط کشت MSB شامل نمک‌های MS (Murashige & Skoog, 1962) همراه با ویتامین B<sub>5</sub> (Gamborg *et al.*, 1968) حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر TDZ<sup>۲</sup> کشت شدند. به منظور تهیه ریزنمونه‌های برگ بر اساس روش جعفری و همکاران (Jafari *et al.*, 2009) با اندکی تغییر به شرح ریز عمل شد. گیاهچه‌های درون شیشه-ای پس از حذف قسمت‌های کوتیلدون و ریشه، مجدداً به محیط MSB حاوی ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر TDZ انتقال یافتند. برگ گیاهچه‌های ۱-۲ ماهه جهت القای جوانه به محیط پایه MSB با ترکیب هورمونی یک میلی‌گرم بر لیتر BAP<sup>۳</sup> و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA<sup>۴</sup> منتقل شدند. جوانه‌های رشد یافته بر روی برگ‌ها از پایه برش داده شد و برگ‌های حاوی پایه جوانه به عنوان ریزنمونه در فرآیند تراریختی مورد استفاده قرار گرفتند.

به منظور تراریختی از *A. tumefaciens* سویه LBA4404 حامل پلاسمید pBI-BCH (شکل ۱) (Tohidfar *et al.*, 2005) حاوی ژن

اسموتین (*osm*) و PR-S توتون، آلفا-تیونین DB4 (*thi*) جو و سکروپین MB39 (*cec*) (Snyder *et al.*, 1999)، پروتئین‌های سرکوبگر فعالیت آنزیم‌های پلی‌گالاکتوروناز لوبیا (Mohammadzadeh *et al.*, 2012) و ژن رمزکننده پروتئین پوششی (Mannerlof *et al.*, 1997) و dsRNA (Lennefors *et al.*, 2006) ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند (عامل ریزمانیا) (BNYVV)<sup>۱</sup> اشاره نمود. *A. alternata* به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای قارچی در چغندر قند گزارش شده است (Hudec & Rohacik, 2002). کاهش قند و همچنین کلروفیل و کاروتن در برگ‌های چغندر قند از جمله خسارت‌های ناشی از وقوع لکه برگ‌ی آلترناریایی به شمار می‌روند (Hudec & Rohacik, 2002). در منابع علمی قابل دسترس، تا کنون گزارشی مبنی بر انتقال ژن کیتیناز لوبیا به چغندر قند موجود نیست. با توجه به تأثیر قابل توجه ژن کیتیناز در بهبود مقاومت به عوامل بیماری‌زای قارچی در تعدادی از گیاهان زراعی ذکر شده، هدف از این تحقیق، انتقال ژن کیتیناز لوبیا (*chi*) به وسیله *A. tumefaciens* به دو رقم اصلاحی پیشنهادی مؤسسه اصلاح و تهیه بذر چغندر قند (SBSI) به منظور بهبود مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زای قارچی بود.

2 Thidiazuron

3 N6-benzyladenine

4  $\alpha$ -naphthaleneacetic acid

1 Beet Necrotic Yellow Vein Virus

ریشه‌زایی فوق از ۳ درصد به ۲ درصد کاهش داده شد. در محیط‌های ریشه‌زایی جهت جلوگیری از رشد مجدد آگروباکتري، تیمارهای مختلف آنتی‌بیوتیک شامل ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم، ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تایمنتین<sup>۴</sup> و یا مخلوطی از هر دو مورد استفاده قرار گرفت. تمامی نمونه‌های کشت شده در اتاق رشد با دمای  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  و رطوبت ۷۰ درصد، تحت تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند.

#### آنالیزهای ملکولی

DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین و نیز گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی به روش دلاپورتا و همکاران (Dellaporta *et al.*, 1983) استخراج شد و در آنالیزهای PCR و لکه‌گذاری نقطه‌ای<sup>۵</sup> مورد استفاده قرار گرفت.

#### آنالیز PCR

به منظور تأیید حضور تراژن کیتیناز در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی، آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تراژن *chi* صورت پذیرفت. آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر قطعه ۸۷۲ bp از ناحیه رمزکننده ژن *chi* به شرح زیر بودند: آغازگر پیشرو: 5'-GAGTGGTGTGGATGCTGTTG-3' و

*chi* تحت کنترل راه‌انداز CaMV 35S و ژن *nptII*<sup>۱</sup> به عنوان ژن گزینشگر استفاده شد. کلیه مراحل تراریختی و باززایی طبق روش جعفری و همکاران (Jafari *et al.*, 2009) انجام گرفت. گزینش جوانه‌های تراریخته احتمالی در محیط انتخابی حاوی ۱۲۵-۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر سفوتاکسیم<sup>۲</sup> انجام شد. گیاهچه‌های سبز و مقاوم به کانامایسین، از سطح ریزنمونه‌ها برش داده شده و به محیط ریشه‌زایی شامل محیط پایه MSB حاوی غلظت‌های ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی IBA<sup>۳</sup> و NAA، به تنهایی و یا ترکیب هر دو انتقال داده شدند. به دلیل واکنش ریشه‌دهی ضعیف گیاهچه‌ها در مقابل ترکیبات هورمونی ذکر شده، از ۶ تیمار مختلف دیگر، شامل محیط پایه MSB حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر پرولین، محیط پایه MSB حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۳ گرم بر لیتر زغال فعال<sup>۳</sup>، محیط پایه MSB حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر پرولین، محیط پایه MSB حاوی ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۳ گرم بر لیتر زغال فعال، محیط پایه MSB مایع حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر IBA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر پرولین و محیط پایه MSB مایع حاوی ۵ میلی‌گرم بر لیتر NAA و ۱/۵ میلی‌گرم بر لیتر پرولین استفاده شد. به علاوه، میزان ساکاروز در تمامی ۶ تیمار

<sup>۱</sup> Neomycin phosphotransferase

<sup>۲</sup> Cefotaxime

<sup>۳</sup> Indole-3-butyric acid

<sup>۴</sup> Timentin

<sup>۵</sup> Dot blot

گرفت. محصول PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ تفکیک شد و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، در دستگاه Gel-doc عکس برداری گردید.

آغازگر پس رو: 5'-GCCATAACCGACTCCAAGCA-3'  
واکنش PCR طبق برنامه حرارتی زیر: یک چرخه واسرشت سازی ۵ دقیقه در ۹۵°C و ۳۵ چرخه (۵۰ ثانیه ۹۵°C، ۱ دقیقه ۵۶°C و ۷۰ ثانیه ۷۲°C) و بسط انتهایی ۱۰ دقیقه ۷۲°C انجام



شکل ۱- نقشه T-DNA پلاسمید نو ترکیب pBI21-BCH حاوی ژن کیتیناز لوبیا. LB: left border، RB: right border، chi: chitinase، nptII: neomycin phosphotransferase، P-CaMV 35S: Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter، P-nos: nopaline synthase promoter، T-nos: nopaline synthase terminator

**Figure 1- The T-DNA map of the recombinant pBI21-BCH plasmid containing bean chitinase gene. LB: left border, RB: right border, chi: chitinase, nptII: neomycin phosphotransferase, P-CaMV 35S: Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter, P-nos: nopaline synthase promoter, T-nos: nopaline synthase terminator.**

دورگ سازی شد. کلیه مراحل دورگ سازی، شستشو و تشخیص علائم بر اساس دستورالعمل DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche applied science) صورت گرفت.

#### آنالیز لکه گذاری وسترن<sup>۱</sup>

به منظور استخراج پروتئین کل، ۲۰۰ میلی گرم بافت برگ تازه و جوان از ۵ لاین ۲-۳ ماهه تراریخته T<sub>0</sub> و گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی در نیتروژن مایع منجمد شد و با استفاده از هاون و کرزه چینی آسیاب شد. سیصد میکرولیتر بافر استخراج پروتئین، شامل تریس-

#### آنالیز لکه گذاری نقطه‌ای

حدود ۱۰ میکروگرم DNA ژنومی گیاهان PCR مثبت برای تراژن *chi*، گیاهان غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی و محصول PCR مربوط به ژن *chi* به عنوان شاهد مثبت به وسیله قرار دادن در آب جوش و سرد کردن فوری بر روی یخ واسرشت گردید و بر روی غشای نایلونی لکه گذاری شد. کاوشگر اختصاصی نشاندار با استفاده از سیستم DIG از ناحیه رمزکننده ژن *chi* بر اساس PCR DIG probe synthesis kit (Roche applied science) تهیه شد. غشای حاوی نمونه‌های DNA با کاوشگر اختصاصی طبق دستورالعمل DIG DNA Labeling and Detection kit (Roche applied science)

<sup>1</sup> Western blot

سنجی انتخاب شدند. سه برگ جوان، سالم و تقریباً هم سن، به عنوان ۳ تکرار از هر یک از لاین‌های تراریخته و نیز گیاه غیرتراریخته انتخاب شده و با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. قطعاتی از پهنک برگ به صورت دوایری به قطر ۲ سانتی‌متر تهیه شد و در دیش پتری محتوی کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شدند. قطعات آگار حاوی *A. alternata* به قطر ۵ میلی‌متر بر روی سطح بالایی برگ‌ها قرار داده شد و دیش‌های پتری در دمای ۲۸°C در شرایط تاریکی نگهداری شدند. قطعات برگ‌های مایه‌زنی شده طی مدت ۱۰ روز مورد بازبینی قرار گرفته و برآورد مقاومت بر اساس گسترش علائم ناشی از آلودگی قارچی تعیین شد.

#### ارزیابی مقاومت در سطح گیاه کامل

توانایی لاین‌های تراریخته T<sub>0</sub> برای مقاومت علیه *A. alternata* در سطح گیاه کامل نیز مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور، ۵ لاین تراریخته T<sub>0</sub> مورد استفاده در آنالیز لکه‌گذاری وسترن و نیز دو گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد انتخاب شدند. در هر گیاه ۳ برگ مشابه به عنوان ۳ تکرار انتخاب شد و مایه‌زنی بر اساس روش ذکر شده در قسمت قبل صورت گرفت. هر برگ با یک کیسه پلاستیکی شفاف حاوی قطرات آب آزاد پوشانده شد و گیاهان در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. مقاومت به *A. alternata* طی یک دوره ۱۴ روزه مورد ارزیابی قرار گرفت و

اسید کلریدریک<sup>۱</sup> ۱۰۰ میلی‌مولار و ۲-مرکاپتواتانول<sup>۲</sup> ۵۰ میلی‌مولار، به بافت آسیاب شده اضافه شد و به شدت تکان داده شد. مخلوط حاصل در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴°C سانتریفوژ شد و روشن‌آور به تیوب جدید انتقال داده شد. غلظت نمونه‌های پروتئینی به روش برادفورد (Bradford, 1976) تعیین گردید. پنجاه میکروگرم پروتئین از گیاهان تراریخته و شاهد، پس از واسرشت سازی، بر روی ژل SDS-PAGE (۵/۱۰٪) بارگذاری شد و به وسیله الکتروفورز تفکیک شد. پروتئین‌ها به وسیله دستگاه (Bio-Rad) Semi-dry transblot با ولتاژ ۲۰ از ژل بر روی غشای نیتروسلولوزی (Bio-Rad) منتقل شدند. تشخیص ایمونولوژیکی پروتئین کیتیناز با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال anti-chit-I anti-serum طبق روش فام (Pham, 2003) صورت گرفت.

#### زیست سنجی لاین‌های تراریخته نسل اول (T<sub>0</sub>) ارزیابی مقاومت با استفاده از قطعات جدا شده برگ

به منظور ارزیابی مقاومت لاین‌های تراریخته T<sub>0</sub> در مقابل بیماری‌های برگ، از جدایه بیماری‌زای *A. alternata* به عنوان بیمارگر استفاده شد. قارچ بر روی محیط PDA کشت شد و به مدت یک هفته در دمای اتاق نگهداری شد. دو لاین تراریخته T<sub>0</sub> و یک گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی برای انجام آزمون زیست

<sup>1</sup> Tris-HCl

<sup>2</sup> 2-mercapthoethanol

یافته بر روی ریزنمونه‌های تلقیح نشده در حضور عامل انتخابی کانامایسین به زرد تا سفید تغییر یافت (شکل ۲C). بیش از دو سوم جوانه‌های باززا شده نسبت به عامل انتخابی کانامایسین مقاومت نشان دادند. بین تیمارهای مختلفی که جهت ریشه‌زایی گیاهچه‌های تراریخته و تراریخته احتمالی به کار برده شدند، در سطح  $P \leq 0/001$  اختلاف آماری معنی‌دار وجود داشت (جدول ۱). پس از گذشت ۳ ماه از نگهداری گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین و احتمالاً تراریخته در حضور IBA و NAA، تنها تعداد اندکی از آنها قادر به ریشه‌زایی بودند. نرخ گیاهچه‌های ریشه‌دار شده در محیط‌های حاوی IBA+NAA و یا در حضور هر یک از تنظیم‌کننده‌های رشد به تنهایی، به ترتیب صفر، ۰/۵۴ و ۹/۵۳ درصد بود. در مقابل، افزودن پرولین و یا زغال فعال به محیط، مشکل ریشه‌دهی گیاهچه‌ها را تقریباً به طور کامل برطرف نمود. بیشترین میزان ریشه‌زایی شامل ۴۴/۴۱ درصد در محیط حاوی IBA و پرولین برآورد گردید و پس از آن، محیط حاوی IBA و زغال فعال با ۱۷/۹۸ درصد ریشه‌زایی در درجه دوم قرار داشت. ظهور اولین ریشه‌ها، ۱۱ روز پس از نگهداری گیاهچه‌ها در محیط‌های ذکر شده قابل رؤیت بود. درصد ریشه‌زایی در محیط‌های حاوی NAA به همراه پرولین و یا زغال فعال به ترتیب ۵/۷۲ و صفر برآورد گردید. متوسط طول ریشه در محیط‌های ریشه‌زایی حاوی زغال فعال در مقایسه با محیط‌های حاوی پرولین بیشتر بود (شکل ۲D).

شدت بیماری بر اساس اندازه لکه برگگی در اطراف محل مایه‌زنی تعیین گردید.

### تجزیه و تحلیل‌های آماری

تمامی آزمایش‌ها به صورت طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل با ۳ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS (Statistical Package for Social Science) نسخه ۱۸ انجام شد و آنالیز واریانس و مقایسه میانگین در سطح  $P \leq 0/001$  بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت پذیرفت.

### نتایج

#### القای جوانه‌های نابجا و گزینش گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین

پس از نگهداری ریزنمونه‌های برگگی در محیط القای جوانه به مدت یک هفته، نرخ بالایی از باززایی بر روی دمبرگ و نیز اطراف رگبرگ اصلی مشاهده شد (شکل ۲A). تعداد جوانه‌های القاء شده از یک تا ۱۰ عدد در هر ریزنمونه متغیر بود، گرچه اغلب آنها دارای ۱-۳ جوانه بودند. جوانه‌های القاء شده بر روی ریزنمونه‌های تلقیح یافته، شادابی و سبزی خود را در مقابل کانامایسین حفظ نمودند (شکل ۲B). این امر بیانگر تأثیر مناسب کانامایسین به عنوان یک عامل انتخابی در فرآیند گزینش است، هرچند که رنگ برخی از این جوانه‌ها نیز در محیط مذکور به سفیدی گرایش داشت که نشان دهنده عدم حضور ژن مقاومت به کانامایسین و عدم تراریخته شدن جوانه‌هاست. رنگ جوانه‌های رشد

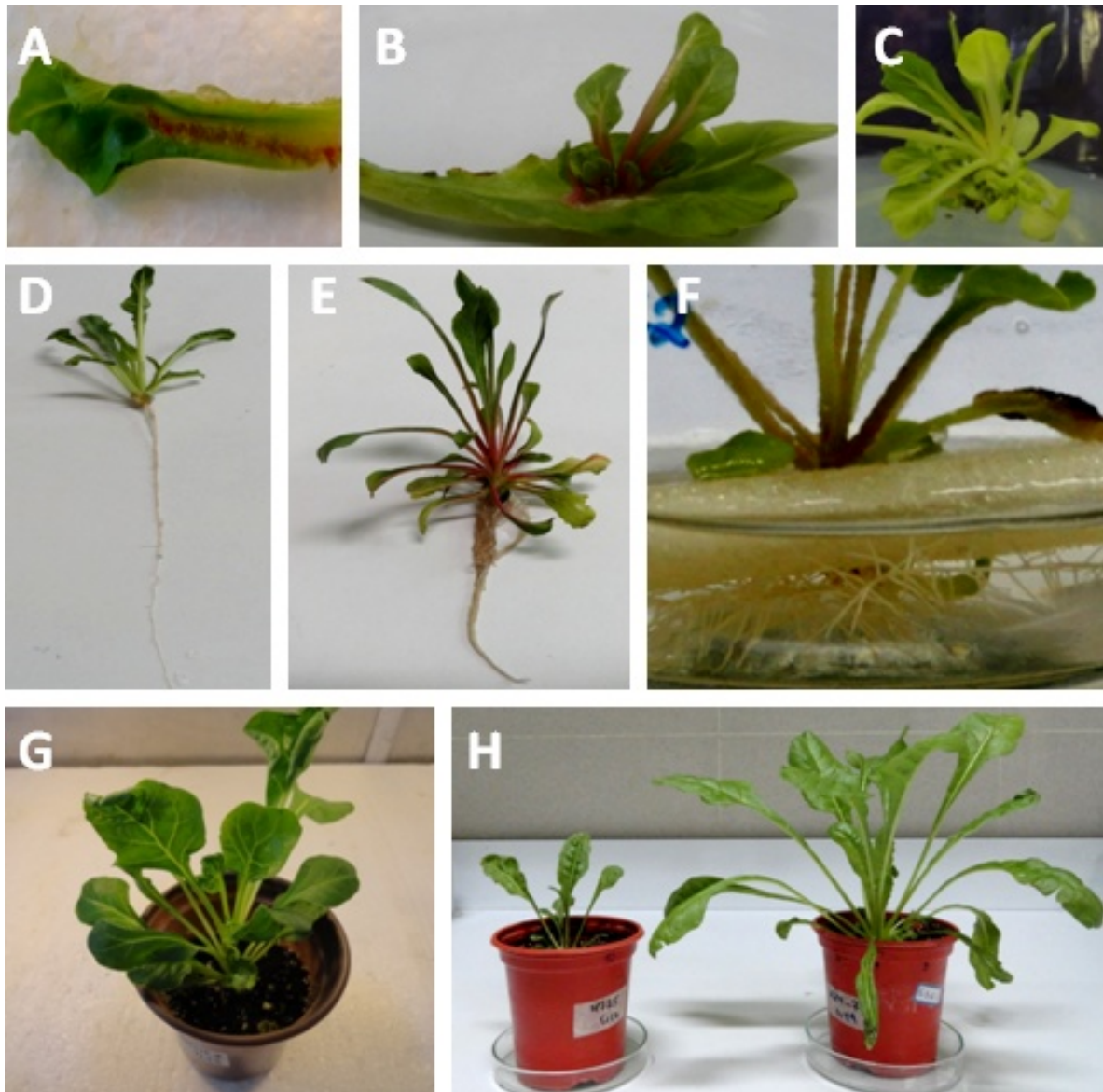
بدشکلی برگ‌ها و جوانه‌های مرکزی، عدم ریشه‌دهی، ضعف و در برخی موارد مرگ مشاهده شد (شکل‌های ۲G-H). در مجموع، ۲۸/۲۶ و ۲۶/۴۳ درصد از گیاهچه‌های تراریخته و تراریخته احتمالی به ترتیب در شرایط درون شیشه‌ای و پس از انتقال به مرحله سازگاری دچار مرگ شدند.

### حضور ژن *chi* در گیاهچه‌های تراریخته احتمالی

آنالیز PCR حضور ژن *chi* را در گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین تأیید نمود (شکل ۳). در این گیاهچه‌ها، تکثیر نوار ۸۷۲ bp صورت گرفت که با نوار تکثیر شده با آگروباکتري حامل پلاسمید pBI-BCH حاوی ژن *chi* به عنوان شاهد مثبت مطابقت داشت. در گیاهان غیرتراریخته هیچ گونه باندي تکثیر نشد که نشان دهنده عدم حضور تراژن در ژنوم این گیاهان بود. بر اساس نتایج حاصل از این آزمون، بیش از ۵۰ درصد از گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین تراژن هدف را دارا بودند.

در مقابل، ریشه‌های تشکیل شده در حضور پرولین از ضخامت بیشتری برخوردار بودند (شکل ۲E). نگهداری گیاهچه‌ها در محیط مایع حاوی غلظت بالای هورمون‌های IBA و NAA همراه با پرولین به ظهور علائم ریشه‌زایی طی مدت ۱۴ روز منجر گردید (شکل ۲F). هرچند که میزان ریشه‌زایی بسیار ناچیز و به ترتیب ۱/۶۳ و ۱۱/۴۴ درصد برآورد شد. به علاوه، نگهداری طولانی مدت گیاهچه‌ها در محیط ریشه‌زایی مایع با مقادیر بالای هورمونی، شیشه‌ای شدن تعدادی از گیاهچه‌ها را موجب گردید. در ابتدا، حذف سفوتاکسیم از محیط ریشه‌زایی رشد مجدد آگروباکتري در قسمت پایه گیاهچه‌ها، نکروزه شدن بافت‌ها و در مواردی مرگ برخی از گیاهچه‌ها را به همراه داشت. افزودن ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر تایمنتین به محیط ریشه‌زایی در کاهش آلودگی آگروباکتري چندان مؤثر نبود. در مقابل، استفاده از سفوتاکسیم به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر، تأثیر قابل ملاحظه‌ای را در توقف رشد آگروباکتري در مقایسه با تایمنتین نشان داد. در تعداد قابل توجهی از گیاهچه‌های مقاوم به کانامایسین، ویژگی‌های فنوتیپی غیرطبیعی مانند رشد بسیار کند، کوتولگی،





شکل ۲- A: جوانه‌های القاء شده بر روی ریزنمونه برگ‌گی در محیط القای جوانه، B: ظهور جوانه‌های سبز و احتمالاً تراریخته در ریزنمونه تلقیح شده، و C: سفید شدن جوانه‌های باززا شده در ریزنمونه تلقیح نشده در محیط حاوی کانامایسین، D و E: تشکیل ریشه در گیاهچه‌های تراریخته به ترتیب در محیط ریشه‌زایی حاوی زغال فعال و پرولین، F: تشکیل ریشه در گیاهچه‌های تراریخته در محیط مایع حاوی مقادیر بالای IBA، G: نمونه‌ای از بدشکلی برگ‌ها در گیاهچه تراریخته حاوی ژن *chi*، H: رشد طبیعی (راست) و رشد بسیار کند (چپ) در دو لاین تراریخته هم سن.

**Figure 2-** A: Leaf blade with induced shoot in shoot-inducing medium, B: Regenerated green kanamycin-resistant shoots, and C: Chlorotic shoot formed on selection medium, D and E: Root formation of transgenic lines on root-inducing medium containing activated charcoal and proline, respectively, F: Root formation of transgenic lines in liquid root-inducing medium with high levels of IBA, G: Leaf malformation in a representative transgenic line containing *chi* gene, H: Normal (right) and very slow growth (left) of two transgenic lines.

جدول ۱- درصد ریشه‌زایی در گیاهچه‌های تراریخته و تراریخته احتمالی چغندر قند با استفاده از تیمارهای مختلف ریشه‌زایی. میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح  $P \leq 0.001$  طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

**Table 1- Root inducing percentage in transgenic and putative transgenic sugar beet plants using various root inducing treatments. Means followed by the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.01$  according to Duncan's Multiple Range Test.**

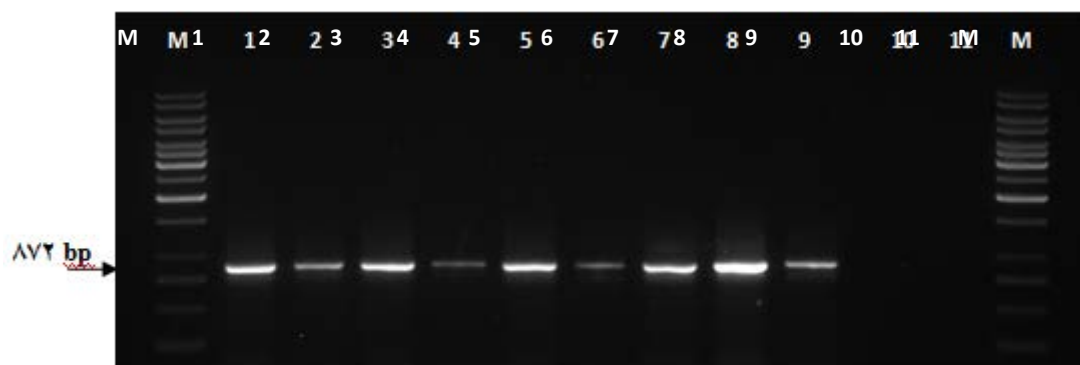
ریشه‌زایی (%) Root-inducing (%)	تیمارهای ریشه‌زایی Root-inducing treatments
44.41±0.06 <sup>a</sup>	IBA + پرولین
17.98±1.002 <sup>b</sup>	IBA + زغال فعال
11.44±0.43 <sup>c</sup>	NAA (۵ میلی‌گرم در لیتر) + پرولین
9.53±0.35 <sup>d</sup>	IBA
5.72±0.21 <sup>e</sup>	NAA + پرولین
1.63±0.06 <sup>f</sup>	IBA (۵ میلی‌گرم در لیتر) + پرولین
0.54±0.02 <sup>f</sup>	NAA
0±0.00 <sup>f</sup>	IBA + NAA
0±0.00 <sup>f</sup>	NAA + زغال فعال

#### آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای

بر اساس نتایج این آنالیز، نمونه‌های DNA مربوط به لاین‌های PCR مثبت مشابه با محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* (به عنوان کنترل مثبت) دارای علامت<sup>۱</sup> بودند (شکل ۴). لکه‌های تیره نشان دهنده دورگ شدن کاوشگر اختصاصی ژن *chi* با قطعه همولوگ خود از ژنوم گیاهان PCR مثبت بود. بر این اساس، می‌توان گفت که این گیاهان حداقل دارای یک نسخه از تراژن در ژنوم خود هستند. در تکثیر DNA مربوط به گیاهان غیرتراریخته علامتی مشاهده نشد که بیانگر فقدان توالی

همولوگ با کاوشگر اختصاصی ژن *chi* در ژنوم این گیاهان و غیرتراریخته بودن آنهاست. در تکثیر بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم نیز هیچ علامتی مشاهده نگردید که نشان می‌دهد سیستم هیبریداسیون هیچ گونه آلودگی نداشته است.

<sup>1</sup> Signal



شکل ۳- آنالیز PCR گیاهچه‌های تراریخته احتمالی چغندر قند با آغازگرهای اختصاصی ژن *chi*. M: نشانگر 1 kb DNA ladder. چاهک ۱: آگروباکتری حاوی پلاسمید pBI-BCH به عنوان شاهد مثبت، چاهک‌های ۲-۵: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از رقم SBSI-02، چاهک‌های ۶-۹: گیاهچه‌های تراریخته احتمالی از رقم SBSI-04، ۱۰: گیاه مایه‌زنی نشده از رقم SBSI-02 به عنوان شاهد منفی اول، ۱۱: واکنش PCR بدون DNA الگو به عنوان شاهد منفی دوم.

**Figure 3- PCR analysis of putative transgenic sugar beet plants with the *chi* gene specific primers. M: 1 kb DNA ladder, 1: a 872 bp amplified fragment within *Agrobacterium* containing pBI-BCH plasmid as positive control, 2-5: putative transgenic plants of SBSI-02, 6-9: putative transgenic plants of SBSI-04, 10: non-transformed plant as the first negative control, 11: A PCR reaction without DNA template as the second negative control.**

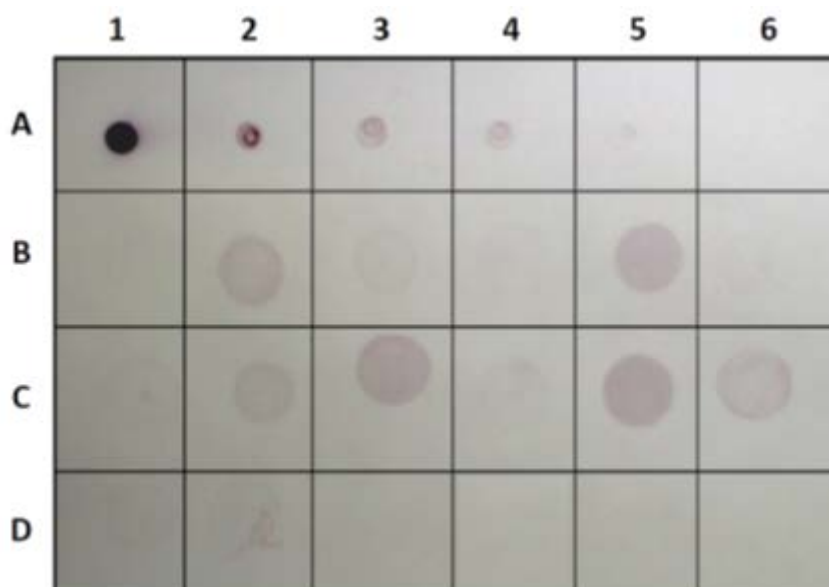
#### A. زیست‌سنجی لاین‌های تراریخته در برابر *alternata*

بر اساس نتایج حاصل از آزمون زیست‌سنجی، کاهش علائم آلودگی *A. alternata* در قطعات برگ لاین‌های تراریخته در مقایسه با شاهد منفی مشاهده شد. دو روز پس از مایه‌زنی با قارچ، اولین علائم آلودگی به صورت زرد شدن قطعات برگ گیاهان شاهد بروز یافت که تا روز ششم به نکروزه شدن تمام بافت برگ منجر گردید (شکل‌های ۶A و ۷). قطعات برگ لاین‌های تراریخته تا روز ششم پس از مایه‌زنی عاری از آلودگی بودند و پس از آن علائم ناشی از آلودگی قارچی به صورت لکه‌های نکروتیک

بیان پروتئین کیتیناز در گیاهان تراریخته  $T_0$  بر اساس نتایج حاصل از آنالیز لکه گذاری وسترن، در تمامی لاین‌های مورد بررسی نوار مورد انتظار ۳۱ kDa به وسیله آنتی‌بادی اختصاصی علیه پروتئین کیتیناز تشخیص داده شد که تأیید کننده بیان این پروتئین در برگ گیاهان تراریخته  $T_0$  است. در نمونه پروتئینی مربوط به گیاهان غیرتراریخته نواری مشاهده نشد که نشان دهنده عدم وجود پروتئین هدف در این گیاهان است (شکل ۵). نتایج این آنالیز درج تراژن را در ژنوم گیاهان تراریخته مجدداً مورد تأیید قرار داد.

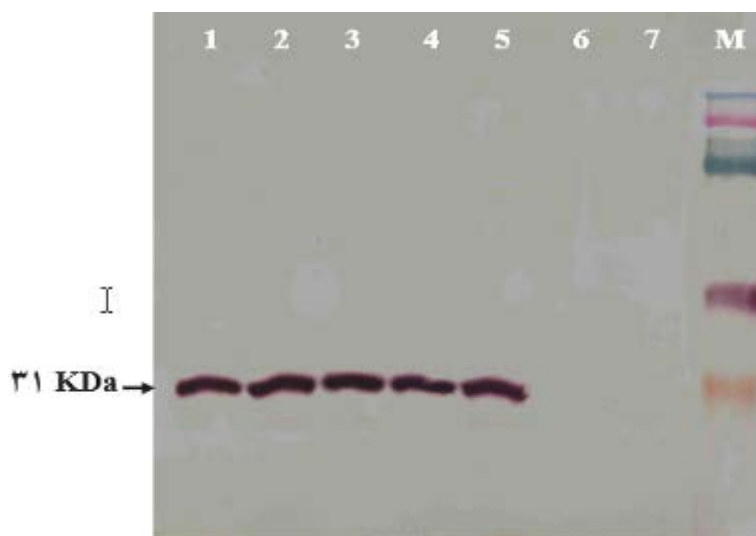
مایه‌زنی لاین‌های تراریخته T<sub>0</sub> با *A. alternata* هیچ گونه علائم آلودگی را تا پایان دوره ۱۴ روزه آزمایش به دنبال نداشت (شکل‌های ۸B و ۹). جدول‌های ۲ و ۳ نشان می‌دهند که در مجموع بین گیاهان تراریخته و غیرتراریخته از نظر درصد آلودگی برگی آلترناریایی و همچنین زمان‌های مورد بررسی در هر دو نوع آزمون زیست‌سنجی در سطح  $P \leq 0/001$  اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

جزئی مشاهده شد (شکل‌های ۶B و ۷). در سطح گیاه کامل، پنج لاین تراریخته مورد آزمون، مقاومت افزایش یافته‌ای را در برابر آلودگی قارچی نشان دادند. ظهور اولین علائم آلودگی شامل زردی برگ‌ها، در گیاهان شاهد غیرتراریخته، ۶ روز پس از مایه‌زنی با قارچ مشاهده شد که در نهایت به زردی برگ و نکروزه شدن جزئی بافت برگ در اطراف محل مایه‌زنی منجر گردید (شکل‌های ۸A و ۹). در مقابل،



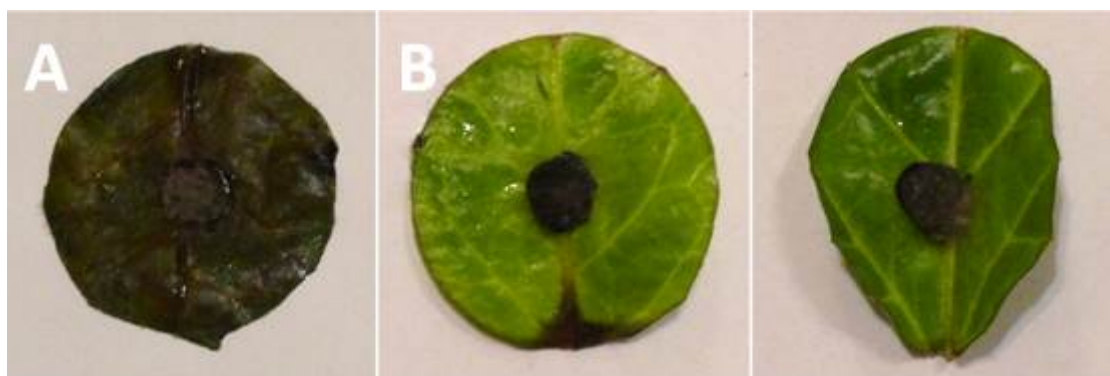
شکل ۴- آنالیز لکه‌گذاری لاین‌های PCR مثبت چغندر قند با کاوشگر اختصاصی ژن *chi* نشان‌دار شده با DIG. A1-A5: رقت‌های مختلف از محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* به عنوان شاهد مثبت، B1-B6 و C1-C6: گیاهان PCR مثبت از ارقام SBSI-02 و SBSI-04، D1-D2: نمونه‌های DNA حاصل از اختلاط DNA گیاه غیرتراریخته با محصول PCR تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ژن *chi* به ترتیب رقت‌های ۵ و ۱۰ پیکوگرم (Reconstruction)، D3-D4: گیاه غیر تراریخته به عنوان شاهد منفی اول، D5-D6: نمونه بدون DNA (آب) به عنوان شاهد منفی دوم.

**Figure 4-** Dot blot analysis of PCR positive sugar beet lines with the DIG-labeled specific probe. A1-A5: Various dilutions of PCR product using *Agrobacterium* containing pBI-BCH plasmid as positive control, B1-B6 and C1-C6: PCR positive lines of SBSI-02 and SBSI-04 genotypes, respectively, D1 and D2: A mixture including extracted DNA of non-transformed plant and 5 and 10 pg dilutions of PCR product using *Agrobacterium* containing pBI-BCH plasmid (Reconstruction), D3-D4: non-transformed plant as the first negative control, D5-D6: water as the second negative control.



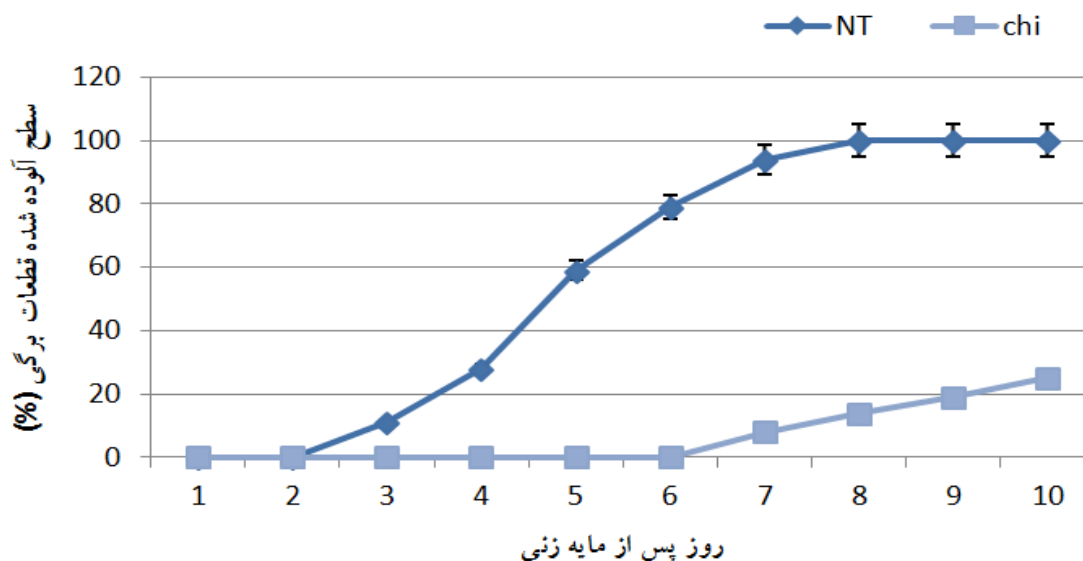
شکل ۵- آنالیز لکه‌گذاری وسترن لاین‌های تراریخته  $T_0$  چغندر قند حاوی ژن *chi* لوییا. M: نشانگر پروتئینی Kaleidoscope prestained standards (Bio-Rad). ۱-۵: گیاهان تراریخته، ۶ و ۷: گیاهان غیرتراریخته SBSI-02 و SBSI-04 به عنوان شاهد منفی. نوار ۳۱ kDa، پروتئین بیان شده به وسیله ژن کیتیناز را در گیاهان تراریخته نشان می‌دهد.

**Figure 5- Western blot analysis of  $T_0$  transgenic sugar beet lines contains bean *chi* gene. Lane M: Bio-Rad's kaleidoscope prestained protein standard, Lanes 1-5, transgenic plants, Lanes 7 and 8: non-transgenic plants SBSI-02 and SBSI-04 as negative control. The arrow marks the expected 31 kDa chitinase protein band.**



شکل ۶- علائم آلودگی قارچی در قطعات برگ چغندر قند ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با *Alternaria alternata*. A: گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، B: لاین‌های تراریخته  $T_0$ .

**Figure 6- Fungal infection symptoms in sugar beet leaf discs 10 days after inoculation with *Alternaria alternata*. A: non-transformed control plant, and B:  $T_0$  transgenic lines.**



شکل ۷- درصد آلودگی قطعات برگ‌گی چغندر قند مایه‌زنی شده با *Alternaria alternata* (chi) لاین‌های تراریخته  $T_0$  و گیاهان شاهد غیرتراریخته (NT).

Figure 7- Percentage of infection of sugar beet detached leaf discs inoculated with *Alternaria alternata*. (chi)  $T_0$  transgenic lines and (NT) non-transformed control plants.



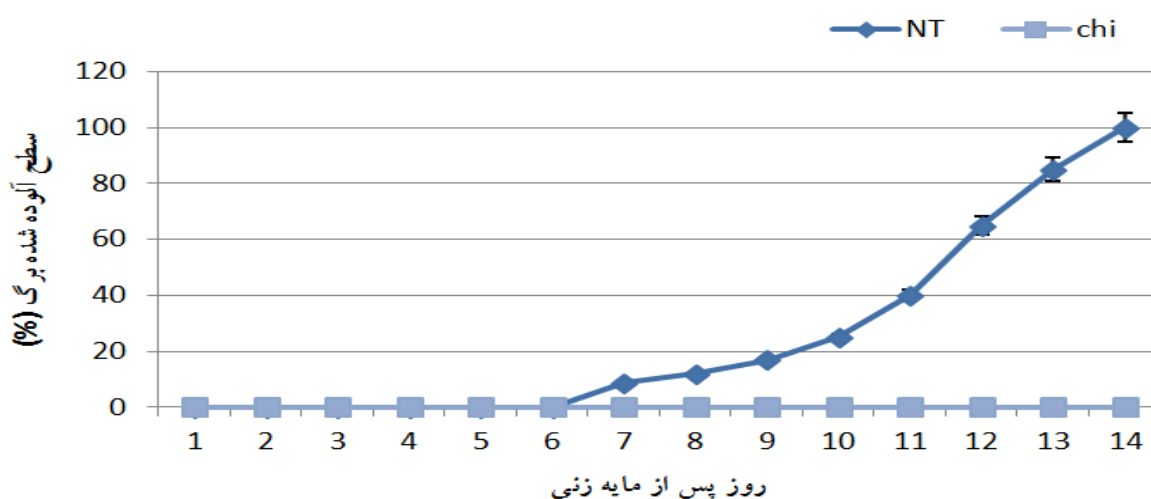
شکل ۸- زیست‌سنجی لاین‌های تراریخته  $T_0$  چغندر قند حاوی ژن *chi* در برابر *Alternaria alternata* در سطح گیاه کامل. A: زردی برگ و لکه‌های نکروتیک در اطراف محل مایه‌زنی در گیاه غیرتراریخته به عنوان شاهد منفی، B: نمونه‌ای از فقدان علائم آلودگی قارچی در لاین‌های تراریخته. عکس ۱۴ روز پس از مایه‌زنی گرفته شده است.

Figure 6- Bioassay of transgenic  $T_0$  sugar beet lines containing *chi* gene against *Alternaria alternata* at the whole plant level. A: Leaf chlorosis and necrotic lesions around the inoculation site in non-transformed control plant, B: A transgenic line without any disease symptoms as representative. The photo was taken 14 days after inoculation.

جدول ۲- درصد آلودگی قطعات برگي چغندر قند مایه زنی شده با *Alternaria alternata* میانگین های دارای حروف مشترک در سطح  $P \leq 0.001$  طبق آزمون چند دامنه ای دانکن فاقد اختلاف معنی دار می باشند.

**Table 2- Percentage of infection of sugar beet detached leaf discs inoculated with *Alternaria alternata*. Means followed by the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.01$  according to Duncan's Multiple Range Test.**

میانگین سطح آلوده شده قطعات برگي (%)		روز پس از مایه زنی
Average of infected leaf discs area (%)		Day after inoculation
گیاه تراریخته	گیاه شاهد غیر تراریخته	
Transgenic plant	Non-transformed control plant	
0±0.00 <sup>k</sup>	0±0.00 <sup>k</sup>	1
0±0.00 <sup>k</sup>	0±0.00 <sup>k</sup>	2
0±0.00 <sup>k</sup>	11.00±0.57 <sup>i</sup>	3
0±0.00 <sup>k</sup>	28.00±0.57 <sup>e</sup>	4
0±0.00 <sup>k</sup>	59.00±0.57 <sup>d</sup>	5
0±0.00 <sup>k</sup>	79.00±0.57 <sup>c</sup>	6
8.00±0.57 <sup>j</sup>	94.00±0.57 <sup>b</sup>	7
14.00±0.57 <sup>h</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	8
19.00±0.57 <sup>g</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	9
25.00±0.57 <sup>f</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	10



شکل ۹- درصد آلودگی برگ در گیاهان چغندر قند مایه زنی شده با *Alternaria alternata* (chi) لاین های تراریخته T<sub>0</sub> و (NT) گیاهان شاهد غیر تراریخته.

**Figure 11- Percentage of infection of sugar beet leaf plants inoculated with *Alternaria alternata*. (chi) T<sub>0</sub> transgenic lines and (NT) non-transformed control plants.**

جدول ۳- درصد آلودگی برگ در گیاهان چغندر قند مایه‌زنی شده با *Alternaria alternata* میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح  $P \leq 0.001$  طبق آزمون چند دامنه‌ای دانکن فاقد اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

**Table 3- Percentage of infection of sugar beet leaf plants inoculated with *Alternaria alternata*. Means followed by the same letters are not significantly different at  $P \leq 0.01$  according to Duncan's Multiple Range Test.**

میانگین سطح آلوده شده برگ (%)		روز پس از مایه‌زنی Day after inoculation
گیاه تراریخته Transgenic plant	گیاه شاهد غیر تراریخته Non-transformed control plant	
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	1
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	2
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	3
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	4
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	5
0±0.00 <sup>i</sup>	0±0.00 <sup>i</sup>	6
0±0.00 <sup>i</sup>	9.00±0.57 <sup>h</sup>	7
0±0.00 <sup>i</sup>	12.00±0.57 <sup>g</sup>	8
0±0.00 <sup>i</sup>	17.00±0.57 <sup>f</sup>	9
0±0.00 <sup>i</sup>	24.00±0.33 <sup>e</sup>	10
0±0.00 <sup>i</sup>	40.00±0.57 <sup>d</sup>	11
0±0.00 <sup>i</sup>	65.00±0.57 <sup>c</sup>	12
0±0.00 <sup>i</sup>	85.00±0.57 <sup>b</sup>	13
0±0.00 <sup>i</sup>	100.00±0.00 <sup>a</sup>	14

غیرمستقیم، بافت‌هایی نظیر کالوس (Harpster *et al.*, 1988; Krens *et al.*, 1988; D'Halluin *et al.*, 1992) و پایه جوانه (Lindsey & Gallois, 1990; Konwar, 1994; Mannerlof *et al.*, 1997; Hisano *et al.*, 2004; Norouzi *et al.*, 2005; Jafari *et al.*, 2009) در تراریختی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. لیندسی و گالوئیس (Lindsey & Gallois, 1990) در نخستین گزارش از تراریختی پایه جوانه چغندر قند به وسیله *A. tumefaciens* نشان دادند که پایه جوانه

#### بحث

کشت بافت چغندر قند دشوار است (Saunders & Doley, 1986). طی سه دهه گذشته، برای تراریختی ژنتیکی چغندر قند از روش‌های مستقیم [(نظیر الکتروپوریشن و تراریختی با واسطه PEG) (Lindsey & Jones, 1987; Hall *et al.*, 1996; Sevenier *et al.*, 1998)] و غیرمستقیم انتقال ژن تلاش‌های فراوانی صورت گرفته است. در روش



گیاهچه را افزایش می‌دهد (Orlikowaska, 1988). زغال فعال نیز به تنهایی و یا در ترکیب با یک اکسین در تشکیل ریشه مؤثر است. گزارش‌های متعددی مبنی بر بهبود ریشه‌زایی در گونه‌های مختلف گیاهی نظیر هیبرید نارون هلندی (Jouira et al., 1998)، توت فرنگی (Jemmali et al., 2002) و جوجوبا (Tyagi & Prakash, 2004) در محیط کشت حاوی زغال فعال و IBA موجود است که با نتایج حاصل از تحقیق حاضر در این خصوص مطابقت دارد. وقوع اندام‌زایی و بهبود وضعیت رشدی گیاهان، عمدتاً با عملکرد زغال فعال در جذب غیرقابل برگشت ترکیبات بازدارنده محیط کشت، کاهش متابولیت‌های سمی و ترشحات فنلی و نیز جمع‌آوری تراوشات قهوه‌ای رنگ در ارتباط است. به علاوه، زغال فعال در جذب ویتامین‌ها، یون‌های فلزی و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه، شامل آبسزیک اسید و اتیلن‌گازی مداخله دارد. ممانعت از رسیدن نور به گیاهچه‌ها و فراهم نمودن شرایط تاریکی برای ناحیه ریشه‌دهی از دیگر دلایل تحریک ریشه‌زایی به وسیله زغال فعال است (Thomas, 2008).

یک فرآیند تراریختی موفق به وسیله آگروباکتری، به شیوه‌های کارآمدی جهت توقف رشد باکتری پس از مرحله هم‌کشتی نیاز دارد. یک آنتی‌بیوتیک مطلوب که به منظور ممانعت از رشد *A. tumefaciens* به کار برده می‌شود بایستی پایدار، قابل حل، فاقد اثرات جانبی و برای سلول‌های گیاهی غیرسمی باشد و به علاوه به

باززایی نسبتاً سریع و با فراوانی بیشتری را در مقایسه با دمبرگ و قطعات بافت برگی مقدور می‌سازد. نتایج حاصل از مطالعه حاضر و تحقیقات اخیر نیز بیانگر این حقیقت است که برگ‌های حاوی جوانه از مزایایی چون سادگی تهیه، قابلیت باززایی فراوان، کاهش مدت زمان لازم برای باززایی جوانه‌های تراریخته به دلیل باززایی مستقیم و نیز به حداقل رسیدن تنوع سوماکلونی به دلیل نداشتن مرحله کالوس برخوردار می‌باشند (Hisano et al., 2004; Norouzi et al., 2005; Jafari et al., 2009). چنین خصوصیتی، تولید گیاهان تراریخته یکسان در یک مقیاس وسیع را تضمین نموده و سیستم مناسبی را برای اهداف عملی تراریختی فراهم می‌سازد.

ریشه‌دار شدن گیاهچه‌های کشت بافتی یک مرحله کلیدی در آزمایشات کشت بافت و انتقال ژن به شمار می‌رود. IBA معمول‌ترین اکسین در القای تشکیل ریشه شناخته شده است (Sharma et al., 2007). در تحقیق حاضر، استفاده از IBA ریشه‌زایی را در تعداد اندکی از گیاهچه‌ها القاء نمود. بیشترین درصد ریشه‌زایی با استفاده از محیط‌های حاوی IBA همراه با پرولین و یا زغال فعال حاصل شد. بر اساس یافته‌های موجود، افزودن برخی آمینواسیدها به محیط کشت، اندام‌زایی گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Kavikishor, 1989). نتایج حاصل از مطالعه کشت بافت درخت به نشان داد که پرولین درصد گیاهچه‌های ریشه‌دار شده و تعداد ریشه‌ها در هر

آنالیزهای ملکولی، حضور تراژن کیتیناز در اغلب لاین‌های مقاوم به کانامایسین تأیید شد. بنابراین، روش تراریختی مورد استفاده در این تحقیق، نتایج تحقیقات پیشین (Hisano *et al.*, 2004; Norouzi *et al.*, 2005; Jafari *et al.*, 2009) مبنی بر تکرارپذیری روش و کارایی بالای تراریختی را تأیید می‌نماید. نرخ بالای تراریختی تا حدود زیادی مرهون انتخاب سویه مناسب آگروباکتری است. هیسانو و همکاران (Hisano *et al.*, 2004) در مقایسه کارایی سویه‌های EHA101 و LBA4404 آگروباکتری در تراریختی *B. vulgaris* نشان دادند که با استفاده از سویه LBA4404 و در حضور ۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، حدود دو سوم ریزنمونه‌های تلقیح شده در مقابل عامل انتخابی مذکور دارای مقاومت بوده و تقریباً نیمی از گیاهچه‌های باززا شده تراژن کیتیناز را دریافت نموده‌اند. در مقابل، استفاده از سویه EHA101 و سیستم‌گزیشتی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر هیگرومایسین هیچ جوانه تراریخته‌ای را حاصل نکرد که این امر ممکن است با نامناسب بودن سویه آگروباکتری برای تراریختی و یا سطح انتخابی هیگرومایسین در ارتباط باشد (Hisano *et al.*, 2004). چنین یافته‌هایی با نتایج حاصل از تحقیق حاضر در خصوص فراوانی تراریختی با استفاده از سویه LBA4404 و سطح انتخابی کانامایسین کاملاً مطابقت دارد. نتایج حاصل از آنالیز لکه‌گذاری نقطه‌ای در خصوص درج تراژن کیتیناز در ژنوم لاین‌های تراریخته چغندرقد، تأییدی بر آزمون

وسيله pH و ترکیبات محیط کشت تأثیر نپذیرد. سفوتاکسیم آنتی‌بیوتیکی است که به صورت گسترده در آزمایشات تراریختی با آگروباکتری مورد پذیرش واقع شده است. این آنتی‌بیوتیک به گروه بتا-لاکتان تعلق دارد و برای اغلب بافت‌های گیاهی از سمیت حداقلی برخوردار است (Cheng *et al.*, 1998). در تحقیق حاضر، زمانی که گیاهچه‌های چغندرقد باززایی شده فاقد آلودگی آگروباکتری به محیط ریشه‌زایی بدون سفوتاکسیم انتقال داده شدند، رشد آگروباکتری مجدداً از سر گرفته شد. این امر بیانگر تأثیر سفوتاکسیم به عنوان یک عامل متوقف‌کننده رشد باکتری، و نه یک عامل کشنده باکتری است. استفاده از دو تیمار مختلف آنتی‌بیوتیک نشان داد که سفوتاکسیم در مقایسه با تایمنتین می‌تواند به عنوان یک بازدارنده قوی، رشد سویه LBA4404 آگروباکتری را در محیط ریشه‌زایی کنترل نماید. در تحقیقی با آزمون عملکرد ۱۰ آنتی‌بیوتیک مختلف علیه سویه‌های مختلف *A. tumefaciens* مشخص شد که سفوتاکسیم از بیشترین کارایی در حذف آلودگی سویه LBA4404 برخوردار است (Shackelford & Chlan, 1996).

تراریختی گیاهان با آگروباکتری روشی مطلوب به شمار رفته که به دلیل نرخ بالای تراریختی، درج مناسب تراژن در ژنوم میزبان، بازآرایی کمتر، تعداد کم نسخه‌های درج شده و بیان صحیح تراژن به صورت متداول برای تولید گیاهان تراریخته مورد استفاده قرار می‌گیرد (Gelvin, 2003). بر اساس نتایج به دست آمده از

هیف‌های قارچی، از رشد بیمارگر ممانعت می‌کند (Kishimoto *et al.*, 2002). بیان تراژن کیتیناز تحت کنترل یک راه‌انداز دائمی تضمین می‌کند که عملکرد کیتیناز، که پیش از تهاجم بیمارگر قارچی در گیاه فراهم شده، کیتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر مهاجم را مورد هدف قرار خواهد داد. به علاوه، افزایش مقاومت لاین‌های تراریخته ممکن است از مکانیسم حفاظتی غیرمستقیم تراژن کیتیناز در آزادسازی الیگومرهای دیواره‌های سلولی قارچی ناشی گردد. عملکرد این الیگومرها به عنوان الیسیتور، واکنش‌های دفاعی طبیعی را در گیاه القاء نموده که در نهایت به بروز وضعیت شبه مقاومت اکتسابی سیستمیک در سلول‌های احاطه کننده محل آلودگی منجر خواهد شد (de las Mercedes Dana *et al.*, 2006). مطالعات نشان داده‌اند که عملکرد اجزای کیتین به عنوان الیسیتور، فعالیت‌های گوناگون مرتبط با دفاع، نظیر لیگنیفیکاسیون در برگ‌های گندم (Barber *et al.*, 1989) و بیان ژن بتا-۱ و ۳ گلوکاناز را در کشت سلول‌های جو (Kaku *et al.*, 1997) القاء نموده است. الیگوساکاریدهای کیتین در سلول‌های کشت شده برنج، سنتز فیتوالکسین (Ren & West, 1992)، تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (Kuchitsu *et al.*, 1995) و بیوسنتز جاسمونیک اسید (Nojiri *et al.*, 1996) را القاء می‌نمایند. حضور آنزیم کیتیناز در سلول می‌تواند سایر مکانیسم‌های دفاعی گیاه را نیز القاء نماید. به عنوان مثال، در لاین‌های تراریخته توتون با بیان فراوان کیتیناز، میزان پروتئین PR-1a و

PCR بود و امکان وجود آلودگی آگروباکتری در آنالیز PCR را غیرمحمول ساخت. نتایج حاصل از آنالیز لکه‌گذاری وسترن آشکار نمود که تولید پروتئین کیتیناز لوبیا در گیاهان تراریخته T<sub>0</sub> چغندرقد صورت گرفته است. بر اساس شدت نوارهای پروتئینی، سطح بالایی از بیان در تمامی لاین‌ها مشاهده شد. آنالیز عملکردی پروتئین کیتیناز لوبیا از طریق انجام آزمون‌های زیست‌سنجی در ۵ لاین تراریخته چغندرقد نشان داد که پروتئین کیتیناز حفاظت قابل توجهی را برای تمامی لاین‌های مورد بررسی در مقابل *A. alternata* فراهم نموده است. در تحقیقات مختلف، افزایش بیان پروتئین کیتیناز به میزان ۲-۳ (Nandakumar *et al.*, 2007) و ۱۴ (Lin *et al.*, 1995) برابر در برنج، ۳-۴ برابر در توتون (Terakawa *et al.*, 1997) و ۴-۱۵ برابر در رز (Marchant *et al.*, 1998) در مقایسه با گیاهان غیرتراریخته برآورد گردیده است. در مطالعه حاضر، نوار پروتئینی در گیاهان شاهد غیرتراریخته ردیابی نشد. بر این اساس، مقاومت افزایش یافته لاین‌های تراریخته چغندرقد در مقایسه با گیاهان شاهد را می‌توان پیامدی از بیان فراوان ژن *chi* دانست که به عملکرد تجزیه‌کنندگی این آنزیم به تنهایی و یا در ترکیب با کیتینازهای میزبان مربوط می‌گردد. مقاومت بهبود یافته لاین‌های تراریخته چغندرقد، ویژگی ضدقارچی کیتیناز را در مقابل بیمارگر قارچی مورد تأیید قرار می‌دهد. این ویژگی ضدقارچی از طریق تجزیه انتهای

تراریخته در برابر بیمارگر خاکزاد *Rhizoctonia solani* همراه بوده است ( Broglie et al., 1991). بیان کیتینازهای برنج در مقابل آلودگی‌های *Uncinula necator* در مو *Botrytis cinerea* (Yamamoto et al., 2000) در خیار *Puccinia coronata* در چاودار ایتالیایی (Takahashi et al., 2005) و *A. alternata* در پنبه (Ganesan et al., 2009) افزایش سطح مقاومت را به دنبال داشته است. بیان کیتیناز توتون در *Nicotiana sylvestris* و هویج، مقاومت این گیاهان را در مقابل *R. solani* و نیز مقاومت گیاهان بادام‌زمینی را علیه *Cercospora arachidicola* افزایش داده است (Rohini & Rao, 2001). بیان ژن‌های رمزکننده کیتیناز در گیاهان همواره با مقاومت بهبود یافته در برابر بیمارگرهای قارچی همراه نیست. میزان کارایی این گونه مقاومت‌ها، به منشأ تراژن، گونه گیاهی و درجه حساسیت بیمارگر به ترکیبات ضد میکروبی وابسته است. از سوی دیگر، سطح بیان آنزیم‌های کیتیناز، محل تجمع آنها در سلول‌های گیاهی و نیز روش آلوده سازی بیمارگرهای قارچی نیز در افزایش مقاومت گیاهان از نقش مهمی برخوردارند. مکان‌یابی دقیق فرآورده‌های تراژن در بافت‌های گیاه به منظور ایجاد مقاومت مؤثر گیاهان در برابر بیمارگرها اهمیت بسیاری دارد (Kishimoto et al., 2002). همان گونه که پیشتر ذکر شد، انتقال ژن کیتیناز به چغندرقد اثرات زیان‌آور مورفولوژیک و یا حتی کشنده‌ای را در گیاهچه‌های تراریخته به

پراکسیداز مرتبط با دیواره سلولی به طور معنی‌داری افزایش یافته است (de las Mercedes Dana et al., 2006). بیان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که معمولاً با القای مقاومت‌های موضعی و سیستمیک همراه است، به بروز پاسخ‌های فیزیولوژیکی مختلف در برابر چالش‌های محیطی منجر خواهد شد (de las Mercedes Dana et al., 2006). نتایج مطالعه حاضر مبنی بر مقاومت افزایش یافته چغندرقد در برابر عامل بیماری‌زای قارچی با استفاده از ژن *chi*، گزارش انجام شده در خصوص ممانعت رشد هیفی *Verticillium dahliae* با استفاده از آنزیم کیتیناز لوبیا جدا شده از برگ‌های پنبه تراریخته را مورد حمایت قرار می‌دهد (Tohidfar et al., 2005).

این تحقیق، دومین گزارش از انتقال یک ژن کیتیناز گیاهی به چغندرقد می‌باشد. نخستین گزارش از این نوع، مربوط به انتقال ژن کیتیناز کدو تنبل به چغندرقد است (Hisano et al., 2004)، هرچند که این مطالعه با هدف بهینه سازی روش انتقال ژن به گیاهان جنس *Beta* به وسیله آگروباکتري انجام شده و هیچ گونه آزمون زیست‌سنجی به منظور ارزیابی مقاومت گیاهان تراریخته در مقابل بیمارگرهای قارچی صورت نگرفته است. گزارش‌های مختلفی در مورد افزایش مقاومت به بیماری‌های قارچی در گیاهان تراریخته حاوی ژن‌های کیتیناز گیاهی موجود می‌باشد. به عنوان مثال، انتقال ژن کیتیناز لوبیا به توتون و کلزا با مقاومت بهبود یافته گیاهان

موجودند (Benhamou *et al.*, 1990). بر این اساس، بیان فراوان ژن‌های هیدرولیتیک نظیر کیتیناز ممکن است در تجزیه دیواره‌های سلولی گیاه گیرنده نقش داشته و اثرات زیان‌باری را در رشد و نمو گیاه به دنبال داشته باشد (Liu *et al.*, 2007). مطالعه حاضر مقاومت بهبود یافته ناشی از ژن *chi* در لاین‌های تراریخته چغندرقد را علیه *A. alternata* آشکار نمود. از آنجایی که انتقال ژن‌های هیدرولیتیک و بیان فراوان آنها در گیاهان ممکن است علاوه بر بهبود مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، اثرات جانبی نامطلوبی را نیز در پی داشته باشد، شناخت گروه‌های مختلف پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و نحوه عملکرد آنها برای مدیریت افزایش مقاومت محصولات مهم کشاورزی از اهمیت شایانی برخوردار است.

### سپاسگزاری

از پژوهشکده علوم و فناوری زیستی دانشگاه ارومیه به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات آزمایشگاهی مورد نیاز تشکر و قدردانی می‌شود.

همراه داشت. مطالعات دیگری نیز تأثیر منفی آنزیم کیتیناز را بر رشد گیاه گزارش نموده‌اند. به عنوان مثال، میزان بیان آنزیم‌های کیتوبیوسیداز و اندوکیتیناز *Streptomyces albidoflavus* در گوجه‌فرنگی با ارتفاع گیاه دارای همبستگی منفی بود (Gongora & Broadway, 2002). در گیاهان تراریخته سیب حاوی ژن کیتیناز کاهش رشد شامل روزت شدن گیاهچه‌ها، کاهش تعداد برگ‌ها و زردی برگ‌ها مشاهده شد (Bolar *et al.*, 2000). در دو بررسی مختلف مشخص شد زمانی که ژن‌های اندوکیتیناز از *S. albidoflavus* و *Trichoderma harzianum* به گیاهان سیب انتقال داده می‌شوند، گیاهان باززاشده قادر به استقرار در خاک نمی‌باشند (داده‌های منتشر نشده، به Gongora & Broadway, 2002 رجوع شود). از طرفی، در گیاهان تراریخته توتون و کلزا (Tohidfar *et al.*, 1991) و نیز پنبه (Broglie *et al.*, 2005) حتی سطوح بسیار بالای بیان آنزیم کیتیناز لوبیا تحت کنترل یک راه‌انداز دائمی هیچ گونه اثر زیان‌آوری بر رشد گیاه در پی نداشت. این احتمال وجود دارد که خصوصیات غیرطبیعی گیاهان تراریخته از برهمکنش اختصاصی ژن کیتیناز با گیاه گیرنده ناشی گردد. آنزیم‌های تجزیه کننده کیتین در گیاهان برخی عملکردهای غیردفاعی، نظیر هضم دیواره‌های سلولی، تقسیم سلولی، تمایز و نمو را بر عهده دارند. بر اساس مطالعات ایمنولوژیکی صورت گرفته، بقایای  $N$ -استیل گلوکز آمین احتمالاً به صورت گلیکولپیدها، در دیواره‌های سلولی ثانویه گیاهان

منابع

- Barber MS, Bertram RE, Ride JP (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 34: 3–12.
- Benhamou N, Joosten M, De Wit JGM (1990). Subcellular localization of chitinase and of its potential substrate in tomato root tissues infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Physiology* 92: 1108–1120.
- Bolar JP, Norelli JL, Wong KW, Hayes CK, Harman GE, Aldwinkle HS (2000). Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor. *Phytopathology* 90: 72–77.
- Bowles DJ (1990). Defense-related proteins in higher plants. *Annual Review of Biochemistry* 59: 873–907.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- Brogie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogie R (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194–1197.
- Cheng M, Schnurr JA, Kapaun JA, (1998). Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports* 17: 646–649.
- Datta K, Tu JM, Oliva N, Ona I, Velazhahan R (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection-related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science* 160: 405–414.
- de las Mercedes Dana M, Pintor-Toro JA, Cubero B (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. *Plant Physiology* 142: 722–730.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep preparation Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19–21.
- D'Halluin K, Bossut M, Bonne E, Mazur B, Leemans J, Botterman J (1992). Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) and evaluation of herbicide resistance in transgenic plants. *Biotechnology* 10: 309–314.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50: 151–158.
- Ganesan M, Bhanumathi P, Ganesh Kumari K, Lakshmi Prabha A, Song P-S, Jayabalan N (2009). Transgenic Indian cotton (*Gossypium hirsutum*) harboring rice chitinase gene (*Chi II*) confers resistance to two fungal pathogens. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 5: 63–74.
- Gelvin SB (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Review* 67: 16–37.
- Gongora CE, Broadway RM (2002). Plant growth and development influenced by transgenic insertion of bacterial chitinolytic enzymes. *Molecular Breeding* 9: 123–135.
- Hall RD, Riksen-Bruinsma T, Weyens GJ, Rosquin IJ, Denys PN, Evans IJ, Lathouwers JE, Lefebvre MP, Dunwell JM, van Tunen A, Krens FA (1996). A high efficiency technique for the generation of transgenic sugar beets from stomatal guard cells. *Nature Biotechnology* 14: 1133–1138.
- Harpster MH, Townsend JA, Jones JDG, Bedbrook J, Dunsmuir P (1988). Relative strengths of the 35S cauliflower mosaic virus, 10, 20 and nopaline synthase promoters in

- transformed tobacco, sugar beet and oilseed rape callus tissue. *Molecular and General Genetics* 212: 182–190.
- Hedrick SA, Bell JA, Boller T, Lamb CJ (1988). Chitinase cDNA cloning and mRNA induction by fungal elicitor, wounding, and infection. *Plant Physiology* 86: 0182–0186.
- Hisano H, Kimoto Y, Hayakawa H, Takeichi J, Domae T, Hashimoto R (2004). High frequency *Agrobacterium*-mediated transformation and plant regeneration via direct shoot formation from leaf explants in *Beta vulgaris* and *Beta maritima*. *Plant Cell Reports* 22: 910–918. doi: 10.1007/s00299-004-0773-3.
- Hudec K, Rohacik T (2002). *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler - new pathogen on sugar beet leaf in Slovakia. *Plant Protection Science* 38(2): 81–82.
- Jafari M, Norouzi P, Malboobi MA, Ghareyazie B, Valizadeh M, Mohammadi SA, Mousavi M (2009). Enhanced resistance to a *lepidopteran* pest in transgenic sugar beet plants expressing synthetic *cryIAb* gene. *Euphytica* 165: 333–344.
- Jemmali A, Elloumi N, Kevers C, Dommes J (2002). Morphological and hormonal characterization of strawberry vitro plants raised through axillary or stipular adventitious shooting. *Plant Growth Regulation* 38: 273–278.
- Jouira HB, Hassairi A, Bigot C, Dorion N (1998). Adventitious shoot production from strips of stem in the Dutch elm hybrid 'Commelin': plantlet regeneration and neomycin sensitivity. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 53: 153–160.
- Kaku H, Shibuya N, Xu P, Aryan AP, Fincher GB (1997). N-acetylchitooligosaccharide elicited expression of a single (1-3)- $\beta$ -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiologia Plantarum* 100: 111–118.
- KaviKishor PB (1989). Aromatic amino acid metabolism during organogenesis in rice Callus culture. *Physiologia Plantarum* 75: 395–398.
- Kishimoto K, Nishizawa Y, Tabei Y, Hibi T, Nakajima M (2002). Detailed analysis of rice chitinase gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). *Plant Science* 162: 655–662.
- Konwar BK (1994). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 3: 37–41.
- Krens FA, Zijlstra C, van der Molen W, Jamar D, Huizing HJ (1988). Transformation and regeneration in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) induced by "shooter" mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *Euphytica* 5: 185–194.
- Kuchitsu K, Kosaka H, Shiga T, Shibuya N (1995). EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by Nacetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188: 138–142.
- Lennefors BL, Savenkov EI, Bensefelt J, Wremerth-Weich E, Roggen P, Tuvevsson S (2006). dsRNA-mediated resistance to Beet Necrotic Yellow Vein Virus infections in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Molecular Breeding* 18: 313–325. doi:10.1007/s11032-006-9030-5.
- Lin W, Anuratha CS, Datta K, Potrykus I, Muthukrishnan S, Datta SK (1995). Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Bio:Technology* 13: 686–691.
- Lindsey K, Gallois P (1990). Transformation of sugarbeet (*Beta vulgaris*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany* 41: 529–536.
- Lindsey K, Jones MGK (1987). Transient gene expression in electroporated protoplasts and intact cells of sugar beet. *Plant Molecular Biology* 10: 43–52.
- Liu M, Zhu J, Sun Z-X, Xu T (2007). Possible suppression of exogenous  $\beta$ -1,3-glucanase gene *gluc78* on rice transformation and growth. *Plant Science* 172: 888–896.
- Mannerlof M, Tuvevsson S, Steen P, Tenning P (1997). Transgenic sugar beet tolerant to glyphosate. *Euphytica* 94: 83–91.

- Marchant R, Davey MR, Lucas JA, Lamb CJ, Dixon RA, Brain Power J (1998). Expression of a chitinase transgene in rose (*Rosa hybrida* L.) reduces development of blackspot disease (*Diplocarpon rosae* Wolf). *Molecular Breeding* 4: 187–194.
- Mohammadzadeh R, Zamani MR, Motallebi M, Norouzi P, Jourabchi E, Benedetti M, De Lorenzo G (2012). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated introduction of polygalacturonase inhibiting protein 2 gene (PvPGIP2) from *Phaseolus vulgaris* into sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Australian Journal of Crop Science* 6(8): 1290-1297.
- Murashige T, Skoog F, (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–476.
- Nandakumar R, Babu S, Kalpana K, Raguchander T, Balasubramanian P, Samiyappan R (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with chitinase gene for enhanced sheath blight resistance. *Biologia Plantarum* 51 (1): 142–148.
- Nojiri H, Sugimori M, Yamane H, Nishimura Y, Yamada A, Shibuya N, Kodama O, Murofishi N, Omori T (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiology* 110: 387–392.
- Nookaraju A, Agrawal DC (2012). Enhanced tolerance of transgenic grapevines expressing chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase genes to downy mildew. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. doi: 10.1007/s11240-012-0166-1.
- Norouzi P, Zamani K, Malboobi MA, Yazdi-Samadi B (2005). Using a competent tissue for efficient transformation of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41: 11–16.
- Orlikowska T (1988). Influence of arginine on vitro rooting of dwarf apple rootstock. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 31: 9–14.
- Pham V (2003). SDS-PAGE and Western blotting protocols. <http://micro.mic.ucdavis.edu/edu/singer/protocols/SDS-PAGEandWesternBlotting.pdf>
- Prasad K, Bhatnagar-Mathur K, Waliyar F, Sharma KK (2013). Overexpression of a chitinase gene in transgenic peanut confers enhanced resistance to major soil borne and foliar fungal pathogens. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 22: 222–233.
- Ren YY, West CA (1992). Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. *Plant Physiology* 99: 1169–1178.
- Rohini VK, Rao KS (2001). Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease. *Plant Science* 160: 889–898.
- Saunders JW, Doley WP (1986). One step regeneration from callus of whole plant leaf explants of sugar beet lines and a somaclonal variant for *in vitro* behaviour. *Journal of Plant Physiology* 124: 473–479.
- Sevenier R, Hall RD, van der Meer IM, Hakkert HJC, van Tunen AJ, Koops AJ (1998). High level fructan accumulation in a transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843–846.
- Shackelford NJ, Chlan CA (1996). Identification of antibiotics that are effective in eliminating *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Reporter* 14: 50–57.
- Sharma T, Modgil M, Thakur M (2007). Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. *Indian Journal of Experimental Biology* 45: 824–829.
- Snyder GW, Ingersoll JC, Smigocki AC (1999). Introduction of pathogen defense genes and a cytokinin biosynthesis gene into sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by *Agrobacterium* or particle bombardment. *Plant Cell Reports* 18: 829–834. doi: 10.1007/s002990050669.
- Takahashi W, Fujimori M, Miura Y, Komatsu T, Nishizawa Y (2005). Increased resistance to crown rust disease in transgenic Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) expressing the rice chitinase gene. *Plant Cell Reports* 23: 811–818.



- Terakawa T, Takaya N, Horiuchi H, Koike M, Takagi M (1997). A fungal chitinase gene from *Rhizopus oligosporus* confers antifungal activity to transgenic tobacco. *Plant Cell Reports* 16: 439–443.
- Thomas TD (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26: 618–631.
- Tobias DJ, Manoharan M, Pritsch C, Dahleen LS (2007). Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon). *Plant Cell Reports*. 26: 631–639.
- Tohidfar M, Mohammadi M, Ghareyazie B (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 83: 83–96. doi: 10.1007/s11240-004-6155-2.
- Tuzun S, Nageswara R, Vogeli U, Schardl C, Kuc J (1989). Induced systemic resistance to blue mold: Early induction and accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanases, chitinases and other pathogenesis-related proteins (b-proteins) in immunized tobacco. *Phytopathology* 79: 979-983.
- Tyagi RK, Prakash S (2004). Genotype and sex-specific protocols for in vitro micropropagation and medium term conservation of jojoba. *Biologia Plantarum* 48: 19–23.
- Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports* 19: 639–646.

## Transformation of sugar beet with a bean chitinase gene and enhanced resistance to *Alternaria alternata*

Goudarzi A.<sup>1</sup>, Safaie N.\*<sup>2</sup>, Jafari M.<sup>2,3</sup>, Mahmoudi S.B.<sup>4</sup>, Tohidfar M.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

<sup>2</sup> Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.

<sup>3</sup> Department of Agricultural Biotechnology, Institute of Biotechnology, University of Urmia, Urmia, Iran.

<sup>4</sup> Sugar Beet Seed Institute, Karaj, Iran.

<sup>5</sup> Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), P.O. Box 31535-1897, karaj, Iran.

### Abstract

Fungal diseases are the major factors of sugar beet yield losses worldwide. Expression of pathogenesis-related proteins such as chitinases is considered as one of the plant defense responses against pathogens. Chitinases are cell wall degrading enzymes which have been shown to have high antifungal activity against a wide range of phytopathogenic fungi. In this study, two diploid sugar beet genotypes, SBSI-02 and SBSI-04, were used for transformation through *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 harboring the pBI-BCH plasmid containing the *chi* gene under the control of the CaMV35S promoter and the *nptII* selectable marker gene. Leaf blade with attached shoot bases were used as explant substratum for transformation. Green shoots were successfully screened using different concentration of kanamycin. PCR screening with *chi*-specific primer showed the presence of the transgene in more than 50% of regenerated kanamycin-resistant plants. Dot blot analysis confirmed the integration of at least one copy of the *chi* gene into the genome of putative transgenic plants. Western blot analysis revealed chitinase protein accumulation in transgenic plants. The content of chitinase protein varied among the five T<sub>0</sub> transgenic plants. Bioassay analysis using detached leaves and at the whole plant level revealed increased resistance of T<sub>0</sub> transgenic sugar beet lines against the fungal pathogen *Alternaria alternata* compared to non-transformed control plants.

**Keywords:** *Sugar beet (Beta vulgaris L.)*, *Agrobacterium tumefaciens*, *chitinase gene*, *transformation*, *Alternaria alternata*.

\* Corresponding Author: Safaie N.

Tel: 02148292346

Email: [nsafaie@modares.ac.ir](mailto:nsafaie@modares.ac.ir)