دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی

مقاومت به شته در گل داوودی با القای افزایش بیان اکوستاتین شقایق دریایی

محمود ولی زاده[۱]، سید کمال کاظمی تبار[۲] و مارتن یونسما[۳]

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲- دانشیار دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: k.kazemitabar@sanru.ac.ir)
۳- محقق ارشد مرکز تحقیقات بین المللی گیاهی دانشگاه واخنینگن هلند

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۹۱/۸/۲۲

چکیده

گل داوودی متعلق به خانواده چتریان بوده و دومین محصول باغبانی مهم در دنیا می باشد. اکثر ژنوتیپهای این گیاه به شته حساس بوده و آلودگی ها به طور جدی می‌توانند ارزش اقتصادی آن را تحت تأثیر قرار داده و همچنین باعث انتقال ویروسها به این گیاه که به صورت رویشی تکثیر می‌شود، می‌گردند. در این تحقیق به منظور القاء مقاومت به شته، دو ژنوتیپ ۱۵۸۱ و ۴۰۴۳ از گل داوودی با استفاده از آگروباکتریوم نژاد AGL0 حاوی ناقل دوگانه pBINPLUS حامل ژن اکوستاتین شقایق دریایی تحت کنترل راه انداز رابیسکو گل داوودی تراریخت شدند. به منظور بررسی اثرات زیان آور اکوستاتین بر رشد جمعیت شته هلو (*Myzus persicae*) و شته پنبه (*Aphis gossypii*)، ارزیابی زیستی غیرانتخابی و انتخابی با استفاده از دیسکهای برگی و همچنین گیاه کامل انجام شد. لاین تراریخت با بیشترین بیان اکوستاتین در qRT-PCR کمترین رشد جمعیت در شته هلو و بیشترین مرگ و میر در شته پنبه را نشان داد.

واژه های کلیدی: گل داوودی، تراریخت سازی، مقاومت به شته، راه انداز رابیسکو، ریزنمونه میانگره

مقدمه

گل داوودی معروف به ملکه پاییز متعلق به خانواده چتریان بوده (۳۲) و در بسیاری از کشورهای دنیا اغلب به عنوان گل شاخه بریده بفروش می رود و ماندگاری زیادی دارد (۸). این گیاه بعد از گل رز مهمترین محصول باغبانی دنیا می‌باشد. طیف وسیع اشکال و رنگ هاو توانایی این گیاه در تولید انواع مختلف گل در تمام مدت سال به اهمیت اقتصادی آن می افزاید. برنامه های اصلاحی روی ویژگیهای مهم از جمله ویژگیهای تزئینی مثل رنگ گل، اندازه، شکل، کیفیت تولید و پاسخ به شرایط محیطی متمرکز می باشد (۲). اگر چه ویژگی های مطلوب با استفاده از

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

روش های اصلاحی کلاسیک[1] منتقل شده است، اما محدودیت های جدی در این تکنیک برای گونه های هگزاپلوئید[2] مثل گل داوودی وجود دارد. در طی ۲۰ سال گذشته گیاهان تراریخت گل داوودی به وسیله تراریخت سازی توسط آگروباکتریوم[3] تولید شده‌اند و تعدادی از ویژگی‌های عملی مرتبط با مقاومت به شته، کرم مسلح چغندر قند[4] و بوتریتیس[5] القاء شده است (۱۷، ۳۶، ۳۹، ۴۰). کنترل شته گل داوودی (*Macrosiphoniella sanborni*)، شته سبز هلو (*Myzus persicae*)، شته نخود (*Acyrthosiphon pisum*)، شته پنبه (*Aphis gossypii*)، تریپس (*Frankliniella occidentalis*) و عنکبوت قرمز (*Tetranychus urticae*) روی گل های داوودی بالغ مشکلی اساسی می‌باشد. در مبارزه شیمیایی با آفات، گلها به وسیله اسپری مواد شیمیایی آلوده شده و بقایای آن مطلوب نمی باشد (۲۱، ۴۰). با توجه به پیشرفت کند در اصلاح کلاسیک گل داوودی، مزایای مهندسی ژنتیک در القاء صفات جدید روشن است. یک یا چند ژن می تواند در زمینه ژنتیک یک رقم استقرار یافته وارد شود (۴۰). بیان ممانعت کننده های پروتئاز در گیاهان به عنوان روشی برای القاء مقاومت به حشرات مورد استفاده قرار گرفته است (۳۱). ممانعت کننده های پروتئاز[6] (PIs) پروتئین هایی هستند که با پروتئاز ها کمپلکس[7] تشکیل داده و مانع فعالیت پروتئولیتیک[8] آنها می شوند. بسیاری از ممانعت کننده های گیاهی نامناسب هستند زیرا بسیاری از حشرات نسبت به آنها مقاوم شده اند (۱۳، ۱۴، ۱۵). غربال گری گسترده ممانعت کننده های غیرگیاهی منجر به شناسایی پروتئینهای جدیدی شده است که میزان قابل قبولی از مقاومت را در محیط درون شیشه[9] و خارج از آن در برابر آفات مختلف (۱۰، ۱۱) از جمله شته ها (۳) نشان داده‌اند. بهرحال بیان این پروتئین‌ها در گیاه، آنها را بداخل محیط داخل سلولی[10] برده که احتمالاً برای تجمع با ثبات پروتئین بهینه نمی باشد در صورتی که کارآیی ممانعت کننده های پروتئاز در برابر حشرات به بیانی حدود ۱٪ از کل پروتئین محلول بستگی دارد (۱۳، ۳۱). اکوستاتین[11] یک ممانعت کننده پروتئاز از شقایق دریایی *Actinia equina* بوده و از سه دامنه تیروگلوبولین[12] نوع I تشکیل شده است. اولین دامنه N- ترمینال[13] به صورت یک ممانعت کننده سیستئین پروتئاز[14] و دومی به عنوان یک ممانعت کننده آسپارتیک[15] پروتئاز عمل می‌نماید در صورتی که عملکرد دامنه سوم هنوز شناخته شده نیست (۱۹، ۳۸). در آزمایشات قبلی این پروتئین بر ضد پروتئازهای روده سوسک کلرادو سیب زمینی فعالیت بسیار زیادی داشته (*Leptinotarsa decemlineata* Say) و در رژیم های غذایی مصنوعی این پروتئین باعث ممانعت کامل از رشد و مرگ و میر لاروها شده است (۱۰). در برگهای سیب زمینی تجمع اکوستاتین با فعالیت جزئی و به میزان بیش از ۷٪ کل پروتئین محلول حاصل شد

1- Classic 2- Hexaploid 3- Agrobacterium 4- Beet army worm
5- Botrytis 6- Protease inhibitors 7- Complex 8- Proteolitic
9- *In vitro* 10- Subcellular 11- Equistatin 12-Tiroglobulin
13- N-terminal domain 14- Cyctein protease 15-Aspartic

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

(۲۵). بهرحال برای بیان مؤثر لازم است در پروتئین بیان شده به طور مناسبی تا خوردگی ایجاد شود تا از تجزیه آن جلوگیری شود. چهار عضو مختلف سیستاتین[1] در گیاه سیب زمینی بیان شدند و اثرات آنها بر ترجیح غذایی تریپس مورد مطالعه قرار گرفت (۲۷). نتایج نشان داد که استفین A[2] و اکوستاتین به میزان زیادی برای تریپس زیان آور بود در صورتی که سیستاتین C و دامنه ۳ کینینوژن[3] زیان آور نبودند. در مطالعات قبلی نشان داده‌شد که دامنه ۳ کینینوژن و سیستاتین C مانع تجزیه اکوستاتین در عصاره های گیاه سیب زمینی می شود (۲۸). همچنین نشان داده شده‌است که سیستاتین سفید تخم مرغ و سیستاتین I تغییر یافته برنج (Oc-IDD86) رشد و بقاء نیمف های *Myzus persicae* را در ارزیابی های با رژیم غذایی مصنوعی[4] کاهش داده‌است (۴). همچنین ممانعت کننده های پروتئاز سرین اثرات حشره کشی روی شته ها نشان داده‌اند. به طور مثال مطالعه سیستمیک ایزوفرمهای[5] ممانعت کننده های پروتئاز نوع بومن- برک حاصل از دانه های نخود اثرات ضد متابولیکی مختلفی از جمله مرگ و میر معنی دار شته نخود را نشان داده اند که با فعالیت ممانعت کنندگی کیموتریپسین شته نخود مرتبط می باشد (۳۰). سسی و همکاران (۳) توانستند ممانعت کننده های جدید بر ضد تریپسین (MTI-2) و کیموترپسین را از خردل بدست آورند. Chy8 که بیشترین شباهت را با کیموترپسین گاوی داشت، قوی ترین ممانعت کننده کیموتریپسین نوترکیب شناخته شده از خانواده MTI-2 را ایجاد نمود. این ترکیب برای نیمفهای شته *Acyrthosiphon pisum* بسیار سمی و برای نیمفهای شته *Aphis gossypii* و *Myzus persicae* سمیت متوسط داشت.

در این مطالعه ژنوتیپ های ۱۵۸۱ و همچنین ۴۰۴۳ که قبلاً تراریخت نشده بود با استفاده از آگروباکتریوم نژاد AGL0 دارای ناقل دوگانه pBINPLUS حامل ژن اکوستاتین شقایق دریایی تحت کنترل راه انداز رابیسکو[6] گل داوودی تراریخت شده و اثرات کنترل کنندگی اکوستاتین روی رشد جمعیت و مرگ و میر شته هلو و پنبه و نیز مقاومت لاینهای تراریخت به این آفات با استفاده از ارزیابی های زیستی انتخابی و غیر انتخابی روی دیسکهای برگی و گیاه کامل مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

مواد گیاهی و حشرات

ارقام ۱۵۸۱ (از مرکز تحقیقات بین المللی گیاهی دانشگاه واخنینگن هلند) و ۴۰۴۳ (از Royal van Zanten BV) روی محیط کشت MS (۲۳) حاوی ۳٪ ساکارز و ۰/۸٪ آگار (w/v) تکثیر شدند. برای ارزیابی های زیستی، شته هلو و پنبه از کلنی های ایجاد شده واقع در بخش حشره شناسی دانشگاه واخنینگن هلند فراهم گردید. گیاهان تراریخت در گلخانه دارای لامپهای سدیم با فشار بالا تحت شرایط ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۱C° در روز و ۱۸C° در شب رشد یافتند و

1- Cystatin
2- Stefin A
3- Kininogen domain 3
4- Artificial diet bioassays
5- Isoforms
6- Rabisco

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

بـرای آنـالیز مولکـولی و بیوشـیمیایی و نیـز ارزیابی های زیستی مورد استفاده قرار گرفتند.

نحوه تراریخت سازی

میـانگره هـای ارقـام ۱۵۸۱ و ۴۰۴۳ گـل داوودی بمـدت دو روز روی محـیط کشـت باززایی (MS حاوی ۱ میلی گرم در لیتر BAP و ۰/۱ میلی گرم در لیتـر IAA) پـیش کشـت شـدند. در ایـن آزمـایش سـویه AGL0 بـا بیمـاریزایی بـالای آگروبـاکتریوم (۱۲) دارای ناقل دوگانه pBINPLUS و راه انـداز رابیسـکو بیـان کننـده ژن اکوسـتاتین (EIM) مـورد استفاده قرار گرفت (۲۶، ۲۷). ابتـدا کلنیهـای باکتری روی محیط کشـت جامـد LB حـاوی ۵۰ میلـی گـرم کانامایسـین[1] و ریفامپیسـین[2] ایجاد شده و سپس یک کلنی واحد در ۵ میلی لیتـر محـیط کشـت LB مـایع حـاوی آنتـی بیوتیک های مشابه روی شـیکر[3] در تـاریکی و دمای ۲۸C° انکوبـه[4] شـد. کشـت بـاکتری بـه نسبت ۱ به ۱۰۰ در محیط کشت LB مایع بـا آنتی بیوتیک های مشابه رقیق شـده و پـس از انکوبه شدن مجدد در طی شب با شرایط ذکـر شده جهت تراریخت سازی مورد استفاده قـرار گرفت. میانگره ها با طـول سـه میلـی متـر بـا اسـکالپل[5] بریـده شـده و بمـدت دو روز روی محیط کشت باززایی قرار گرفتند. میانگره های پیش کشت شـده بـرای جلـوگیری از خشـک شدن در ۲۹ میلی لیتر محیط کشت MS مایع نگهـداری شـدند. ۰/۶ میلـی لیتـر از کشـت بـاکتری و ۳۰ میکرولیتـر استوسـرینگون[6] بـه محیط کشـت مـایع MS حـاوی میـانگره هـا اضافه شده و بمدت ۳۰ دقیقـه انکوبـه شـدند. سـپس ریزنمونـه هـا بـرای حـذف باکتریهـای اضافی برای چند دقیقه بـه روی کاغـذ صـافی اسـتریل منتقـل شـدند و سـپس روی محـیط کشت جامد باززایی حـاوی ۱۰۰ میکـرو مـول استوسرینگون منتقل شده و بـه مـدت دو روز در تـاریکی و دمـای ۲۵C° همکشـتی صـورت گرفت. پس از همکشتی ریزنمونه ها به محیط کشت انتخابی (محـیط کشـت بـاززایی حـاوی ۴۰۰ میلـی گـرم در لیتـر ونکومایسـین، ۲۵۰ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۳۰ میلی گرم در لیتـر کانامایسـین) و در زیـر نـور منتقـل گردیدنـد. تمـام ریزنمونـه هـا هـر ۲۱ روز بـه محیط کشت انتخابی جدید انتقال داده شده و تـا ۶۵ روز بعـد از تلقـیح نگهـداری شـدند. ساقه های باززایی شده سبز به محـیط کشـت ریشـه زایـی (MS نصـف غلظـت حـاوی ۲۰۰ میلـی گـرم در لیتـر ونکومایسـین و ۱۲۵ میلی گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل گردیـد. گیاهان ریشه دار شده پس از سـخت شـدن و آزمون عاری بودن از باکتری به گلخانه منتقـل شدند. فراوانی تراریخت سازی بصـورت تعـداد گیاهان مثبـت و تراریخـت تقسـیم بـر تعـداد ریزنمونه های تلقیح شده محاسبه گردید.

آنالیز DNA و RNA

DNA ژنومی از برگ های جوان طبق روش پیریرا و آرتس (۲۹) اسـتخراج گردیـد و بـرای غربال گری PCR مورد اسـتفاده قـرار گرفـت. پرایمرها[7] با اندازه فـرآورده ۱۰۰ bp بـر طبـق تـوالی سـازه ژنـی EIM (EIM -Forward: GATGTTCGTGCCAGAGTGTT; EIM - (Reverse: TCGGAACCTGGAACCTTTAC

1- Kanamycin 2- Rifampicin 3- Shaker 4- Incubated
5- Scalpel 6- Acetosyringone 7- Primer

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

با استفاده از وب سایت http://www.genscript.com برای PCR و qRT-PCR طراحی گردید. ۴ میکرو لیتر از DNA، ۰/۵ میکرولیتر تک پلیمراز، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱ میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای پیشرو و پیرو (۱۰ mM) و ۰/۲۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ mM) در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت و حجم نهایی توسط آب MQ به ۲۵ میکرو لیتر رسانده شد. واکنش در یک سیستم GeneAmp PCR و تحت شرایط زیر صورت گرفت: $94^{\circ}C$ بمدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل با دمای $94^{\circ}C$ بمدت ۳۰ ثانیه، $55^{\circ}C$ بمدت ۳۰ ثانیه، $72^{\circ}C$ بمدت ۲۰ ثانیه و در نهایت ۷۲ °C بمدت ۷ دقیقه. محصول واکنش روی ژل آگارز[1] ۲٪ الکتروفورز[2] گردیده و توسط دستگاه ژل داک[3] عکسبرداری صورت گرفت. برای اندازه گیری میزان بیان ژن، لاینهای مثبت با qRT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفتند. کل RNA با استفاده از روش نمونه کوچک TriPure™ استخراج گردید. سنتز cDNA با استفاده از معرفهای رونویسی معکوس TaqMan™ صورت گرفت. رونویسی معکوس در سیستم GeneAmp PCR تحت شرایط $25^{\circ}C$ بمدت ۱۰ دقیقه، $48^{\circ}C$ بمدت ۳۰ دقیقه و $95^{\circ}C$ بمدت ۵ دقیقه انجام شد. ۱ میکرو لیتر از cDNA (۲ میکرو گرم) برای qPCR مورد استفاده قرار گرفت و به آن ۱۰ میکرو لیتر BIO-RAD iQ™ SYBR@ Green Supermix، ۲ میکرو لیتر از هر یک از پرایمرهای پیشرو و پیرو (۳ میکرو مول) اضافه گردیده و حجم نهایی توسط آب MQ به ۲۰ میکرو لیتر رسانده شد. ژن اکتین[4] به عنوان ژن مرجع در نظر گرفته شده و پرایمر برای آن طراحی گردید (Actin-Forward: CCTCTTAATCCTAAGGCTAATCAG ; Actin-Reverse: CCAGGAATCCAGCACAATACC).

واکنش در سیستم iCycler iQ5 (Bio-Rad، USA) تحت شرایط $95^{\circ}C$ بمدت ۳ دقیقه، ۴۰ سیکل با دمای $95^{\circ}C$ بمدت ۱۰ ثانیه، $60^{\circ}C$ بمدت ۳۰ ثانیه، $95^{\circ}C$ بمدت ۱ دقیقه و $60^{\circ}C$ بمدت ۱ دقیقه صورت گرفت. نتایج با استفاده از نرم افزار IQ5 Optical System و روش CT $2^{-\delta Ct}$ (۲۰) مورد آنالیز قرار گرفت.

آنالیز وسترن بلات

قطعه‌ای از برگ جوان توسعه یافته (۳۰۰-۲۰۰ میلی گرم) را در یک تیوب ۱/۵ میلی لیتری قرار داده شده و در نیتروژن مایع به پودر ریزی تبدیل می‌شود. این پودر با ۳۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (۱۰۰ میلی مول Tris-HCl با اسیدیته ۷/۶، ۲۵ میلی مول سدیم دی اتیل دی تیوکربامات[5]، ۵۰ میلی مول EDTA، ۱۰٪ (w/v) پلی وینیل پلی پیرولیدون[6] [PVPP] و یک قرص ممانعت کننده پروتئاز cocktail Complete [Roche Diagnostics] بازای هر ۲۵ میلی لیتر بافر استخراج مخلوط شده و دو بار بمدت ۵ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ و دمای $4^{\circ}C$ سانتریفوژ[7] گردید. هر بار محلول شناور رویی به تیوب جدید منتقل گردید. SDS-PAGE با استفاده از ژل ۱۵٪ (w/v) (Bio-Rad Laboratories) در دستگاه

1- Agarose 2- Electrophoresis 3- Gel-Doc 4- Actin
5- Sodium-diethyldithiocarbamate 6- Polyvinylpolypyrrolidone 7- Centrifuge

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

mini-Protean II slab cell (Bio-Rad Laboratories) انجام گردید. عمل بارگذاری پروتئین طبق دستورالعملهای شرکت سازنده انجام گردید. نمونه های تفکیک شده پروتئین از ژل SDS-PAGE به غشاهای نیتروسلولز[1] با استفاده از دستگاه mini-Protean II electrotransfer منتقل گردید. متعاقباً غشاها در بافر بلوکه کننده[2] (۱۰ میلی مول Tris-HCl با اسیدیته ۷/۵، ۱۵۰ میلی مول NaCl و ۰/۱٪ [v/v] توین ۲۰ حاوی ۲٪ [w/v] پودر شیر بدون چربی) بمدت ۱ ساعت بلوکه شده و سپس با آنتی بادی anti-EI خرگوش (Seraing،Eurogentec، Belgium) انکوبه گردید. کاغذ های نیتروسلولز متعاقباً با بافر شوینده شستشو داده شده و با IgG بز بر علیه خرگوش که با پراکسیداز[3] horseradish الحاق شده (Jackson Immunoresearch Laboratories، PA،West Grove) انکوبه گردید. کاغذهای نیتروسلولز با سوبسترای Lumi-Light وسترن بلات مرئی سازی شده و توسط دستگاه Lumi-Imager F1 تحت کنترل نرم افزار Lumi-Analist اسکن شدند (Roche Germany، Mannheim،Diagnostics).

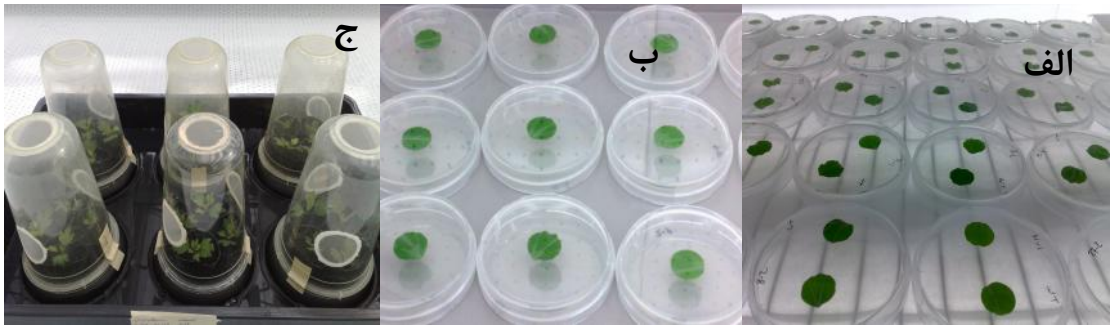
ارزیابی های زیستی گیاهی

ارزیابی های زیستی انتخابی و غیرانتخابی برای بررسی ترجیح غذایی شته ها برای برگهای لاینهای تراریخت و غیر تراریخت گل داوودی و همچنین برای آزمون اثر بیان اکوستاتین روی رشد جمعیت و مرگ و میر شته ها انجام گردید. شته های بالغ با سنین مختلف با یک برس نرم از یک کلنی موجود روی کلم چینی جمع آوری گردید. در ارزیابی زیستی انتخابی دوگانه دو دیسک برگی از برگهای سبز و بالغ با قطر مشابه ۲ سانتی متر (یکی از گیاه نرمال و دیگری از لاین تراریخت بیان کننده EIM) به طور وارونه روی لایه نازکی از آگار- آب به نسبت ۱٪ در پتری دیش به قطر ۹ سانتی متر قرار داده شدند (شکل ۱- الف). پنج پتری دیش مجزا به عنوان تکرار برای هر لاین تراریخت مورد آزمون در نظر گرفته شد. ۱۰ شته روی درب پتری دیش رها شده و پس از بستن، پتری دیش ها بصورت وارونه در ۲۰C° تحت شرایط روز بلند (۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی) با رطوبت نسبی ۷۰٪ قرار داده شدند. شته ها به آسانی قادر به حرکت به سمت برگها در داخل پتری دیش می باشند. موقعیت برگها برای حذف اثر جهت نور یا شیب دمایی بر انتخاب، تصادفی شده و برای فراهم شدن نور یکنواخت کاغذ سفیدی روی تمام پتری دیش ها قرار گرفت. تعداد شته ها روی هر دیسک برگی در دوره های زمانی مختلف پس از شروع آزمایش ثبت شد. برای ارزیابی زیستی غیر انتخابی تنها یک دیسک برگی از برگ سبز بالغ گیاه تراریخت یا نرمال با پنج تکرار و همچنین پنج شته مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۱- ب). برای ارزیابی زیستی گیاه کامل، گیاهان جوان در قفسه های مخصوصی با چهار تکرار برای هر لاین بکار گرفته شد (شکل ۱- ج). هر گیاه با ده شته تلقیح شده و تعداد شته ها روی هر گیاه بعد از یک هفته شمارش شد.

1- Nitrocellulose 2- Blocking buffer 3- Peroxidase

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]



شکل ۱- الف) ارزیابی زیستی انتخابی دوگانه با دیسک برگی. ب) ارزیابی زیستی غیر انتخابی با دیسک برگی. ج) ارزیابی زیستی گیاه کامل.

نتایج و بحث

باززایی و تراریخت سازی

برای باززایی گل داوودی محیط کشت MS حاوی ۰/۱ میلی گرم در لیتر IAA و ۱ میلی گرم در لیتر BAP که در مطالعات قبلی نیز گزارش شده بود (۹)، مورد استفاده قرار گرفت. ریزنمونه های میانگره با استفاده از اگروباکتریوم نژاد AGL0 دارای ناقل دوگانه pBIN حامل سازه های ژنی افزایش بیان EIM و NPTII با راه انداز رابیسکو تراریخت گردیدند. باززایی در ریزنمونه های تلقیح شده توسط اگروباکتریوم روی محیط کشت انتخابی دو هفته پس از تلقیح رخ داد. در این مطالعه پروتکل مشابهی برای باززایی و تراریخت سازی ژنوتیپ ۴۰۴۳ که قبلاً تراریخت نشده بکار برده شد اما فراوانی باززایی و تراریخت سازی در ژنوتیپ ۱۵۸۱ بیشتر از ۴۰۴۳ بود. فراوانی تراریخت سازی برای EIM در ژنوتیپ های ۱۵۸۱ و ۴۰۴۳ به ترتیب ۸/۷۵٪ و ۵٪ بود (جدول ۱). تراریخت سازی ژنتیکی موفق با استفاده از اگروباکتریوم در بسیاری از گونه های گیاهی جهت القاء مقاومت به حشرات از جمله مقاومت به شته در تنباکو تراریخت بیان کننده ژن *pta* (۴۴)، مقاومت به زنجره سبز و قهوه ای در برنج indica (۲۴) و مقاومت به شته در پنبه تراریخت دارای ژن *aca* (۴۳) گزارش شده است. ویسر و همکاران (۴۰) ژن *Cry1Ca* را با اندکی تغییر تحت کنترل راه انداز ۳۵S به گل داوودی منتقل کردند. تنها در ۲ گیاه از ۳۸ گیاه تراریخت مورد آزمون کاهش قابل ملاحظه (۵۰٪) در رشد لارو مشاهده شد. به هرحال کنترل گروه مهمی از حشرات که شیره گیاهی را از آوند آبکش می مکند مثل شته ها و زنجره ها از طریق روش های اصلاحی مرسوم و همین طور تکنولوژی Bt مشکل می باشد (۲۲). بنابراین به نظر می رسد تراریخت سازی گل داوودی با استفاده از اگروباکتریوم و استراتژیهای هرم سازی ژنی[1] روش مناسبی برای القاء مقاومت به آفات می باشد. همچنین جداسازی و بکارگیری ژنهای جدید القاء کننده مقاومت به حشرات مکنده شیره گیاهی برای اجرای

1- Gene pyramiding

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

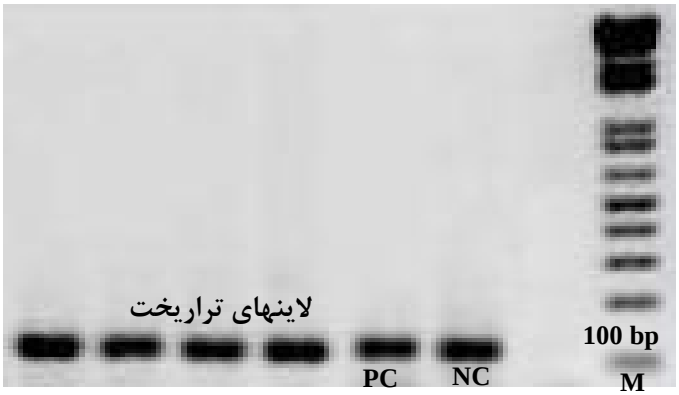
هرم سازی ژنی جهت افزایش و پایداری مقاومت به آفات ضروری می باشد. فراوانی باززایی و سرعت رشد بترتیب در ژنوتیپ ۱۵۸۱ و ۴۰۴۳ بیشتر بود. تنوع در باززایی ساقه در بین ژنوتیپ های مختلف گزارش شده است (۱۶). باززایی ساقه در گل داوودی بدنبال تلقیح با اگروباکتریوم کاهش یافت. تأثیر منفی آلودگی به اگروباکتریوم روی باززایی ساقه از ریزنمونه های برگی گل داوودی در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است (۶).

آنالیز مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان تراریخت

DNA از برگ های گیاهان تراریخت موجود در گلخانه استخراج شده و PCR با استفاده از پرایمرهای طراحی شده برای EIM با اندازه فراورده bp ۱۰۰ انجام گردید. فراورده های PCR روی ژل ۲٪ آگارز تفکیک شده و با اتیدیوم بروماید[1] رنگ آمیزی شد. نتایج PCR برای تعدادی از لاین های تراریخت در شکل ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- فراوانی باززایی و تراریخت سازی در ژنوتیپهای ۴۰۴۳ و ۱۵۸۱ گل داوودی.

ژنوتیپ	تعداد ریزنمونه های تلقیح شده	فراوانی باززایی	فراوانی تراریخت سازی
۱۵۸۱	۸۰	٪۳۸/۷۵	٪۸/۷۵
۴۰۴۳	۴۰	٪۳۰	٪۵



شکل ۲- آنالیز PCR برای حضور ژن EIM در گیاهان تراریخت گل داوودی . M: مارکر، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی.

RNA کل از گیاهان مثبت تأیید شده توسط PCR استخراج شده و cDNA تولید شد. برای اندازه گیری میزان بیان EIM در لاینهای تراریخت مختلف، qRT-PCR با استفاده از پرایمرهای مشابه استفاده شده در PCR انجام گردید. نتایج بیان بالای EIM را در لاینهای تراریخت نشان داد اما میزان بیان در ژنوتیپ ۴۰۴۳ پایینتر از ۱۵۸۱ بود. میزان بیان EIM در لاین ۴-۱۵ بالاترین میزان بود (جدول ۲). برای شناسایی پروتئین اکوستاتین تولید شده در گیاه، استخراج پروتئین و وسترن بلات[2] انجام شد. چهار باند مجزا برای پروتئین اکوستاتین در لاینهای تراریخت مشاهده شد. در بعضی از نمونه ها

1- Ethidium bromide

2- Western blot

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

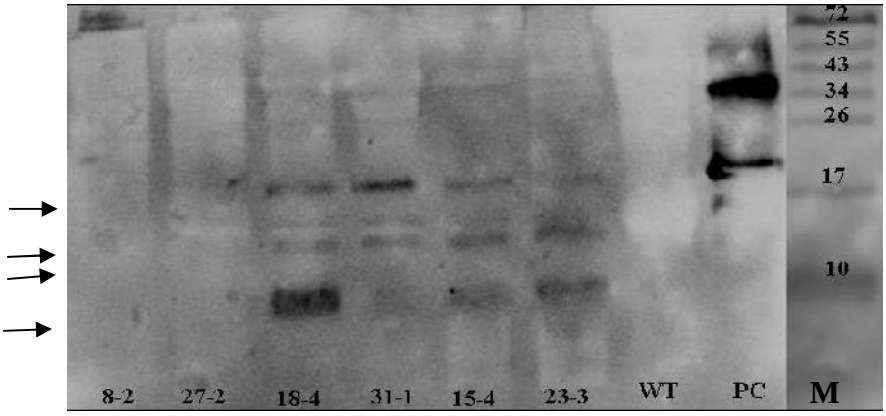
[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

بدلیل تجزیه پروتئین باندی مشاهده نشد (شکل ۳). تاکنون پیشرفت هایی در بهینه سازی نرخ رونویسی و ترجمه در سلول های گیاهی ایجاد شده است (۵، ۱۸، ۲۵). به هرحال تجزیه پروتئولیتیک پروتئینهای بیان شده هنوز عامل محدود کننده در تجمع بسیاری از پروتئین های خارجی در گیاهان می باشد (۷، ۳۴، ۳۵، ۳۷). یک روش معمول برای افزایش میزان تجمع پروتئین در گیاهان، تغییر تخصیص پروتئینهای بیان شده از طریق هدف گیری[1] و نگهداری آنها در شبکه آندوپلاسمی (۳۳، ۴۱) و کلروپلاست ها (۴۲) می باشد. در مطالعات قبلی توانایی سه راه انداز مختلف (CaMV35S، Lhca.3.St1 و RbcS1) در بیان حداکثری اکوستاتین مورد ارزیابی قرار گرفتند. راه انداز رابیسکو از گل داوودی (۲۵) بیشترین میانگین میزان بیان (۰/۳۶٪) را داشت. راه انداز مشابهی نیز در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. به هرحال تجزیه پروتئین و بیان دائمی راه انداز رابیسکو عملکرد و میزان تجمع پروتئین را تحت تأثیر قرار می دهد. باندهای مجزا در وسترن بلات نشان داد که اکوستاتین در مکانهای خاصی در داخل گیاه شکسته می شود (شکل ۳).

جدول ۲- رشد جمعیت و مرگ و میر شته در ارزیابی غیر انتخابی با استفاده از دیسک برگی گل داوودی ۱۵۸۱ تراریخت شده توسط EIM در ۱۲۰ ساعت پس از تلقیح

لاین	جمعیت (شته هلو)	مرگ و میر (شته پنبه)	میزان بیان نسبی EIM
۱۵-۴	۵/۴۰^{b}	۴/۴۰^{a}	۱۲۳/۵۵^{a}
۳۱-۱	-	۲/۸۰^{bc}	۸۹/۸۹^{b}
۲۷-۲	۶/۰۰^{b}	۲/۶۰^{bc}	۴۳/۱۵^{c}
۱۸-۴	-	۲/۸۰^{bc}	۴۱/۵۳^{c}
۸-۲	۸/۴۰^{ab}	۳/۰۰^{ab}	۱۴/۶۵^{cd}
۲۳-۳	۸/۶۰^{ab}	۳/۴۰^{ab}	۱۴/۵۹^{cd}
گیاه نرمال	۱۱/۰۰^{a}	۱/۶۰^{c}	۰^{d}
ضریب تغییرات	۴۰/۲۹	۳۶/۵۵	۴۰/۰۸

در هر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی دار ارقام را در آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ نشان می دهد.



شکل ۳- آنالیز وسترن بلات پروتئین اکوستاتین تجمع یافته در گیاهان گل داوودی. PC: پروتئین کنترل مثبت تولید شده در *E. coli* ، WT: گیاه نرمال. M: مارکر. فلشها: باندهای اختصاصی اکوستاتین.

1- Targeting

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

ارزیابی زیستی

در ارزیابی زیستی غیرانتخابی با دیسک برگی رشد جمعیت شته در گیاه نرمال نسبتاً سریع بود در حالی که در لاینهای تراریخت بسیار کند بود. ژنوتیپ ۴-۱۵ که بیشترین بیان EIM را در qRT-PCR داشت کمترین رشد جمعیت در شته هلو و بیشترین مرگ و میر در شته پنبه را نشان داد (جدول ۲). در ارزیابی زیستی با گیاه کامل لاینهای تراریخت ۴-۱۵ و ۱-۳۱ کمترین رشد جمعیت را داشتند (جدول ۳).

جدول ۳- رشد جمعیت شته هلو در ارزیابی زیستی گیاه کامل گل داوودی ۱۵۸۱ تراریخت شده با EIM یک هفته بعد از تلقیح

لاین	جمعیت
۱۸-۴	۵۰/۲۵^{ab}
۲۷-۲	۳۶/۲۵^{ab}
۳۱-۱	۲۰/۷۵^{b}
۱۵-۴	۲۷/۷۵^{b}
۸-۲	۳۶/۷۵^{ab}
۲۳-۳	۴۰/۷۵^{ab}
گیاه نرمال	۶۷/۰۰^{a}
ضریب تغییرات	۵۱/۸۴

در هر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی دار ارقام را در آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ نشان می دهد.

در ارزیابی زیستی انتخابی دوگانه در اکثر تکرارها، شته ها تغذیه از دیسکهای برگی گیاه نرمال را به گیاه تراریخت ترجیح دادند (جداول ۴ و ۵). البته تفاوت معنی دار بین لاینهای تراریخت و گیاه نرمال از جهت رشد جمعیت شته یا ترجیح دیسک برگی در تمام دوره های زمانی مشاهده نشد (جداول ۴ و ۵). همان طور که توسط اوچکورو و همکاران (۲۵) گزارش شده است دو سوم پروتئین اکوستاتین در ساعت ۱۰ صبح تجزیه و غیر فعال شده و در طی شب تنها ۲۰٪ از پروتئین اولیه تجمع یافته در صبح باقی می ماند. ظاهراً میزان بیان اکوستاتین فعال به میزان زیادی تحت تأثیر پروتئازهای داخلی گل داوودی قرار دارد. در ارزیابی زیستی غیر انتخابی دیسکهای برگی و گیاه کامل، تعدادی از شته ها بویژه در لاینهای تراریخت تولید بال نمودند که نشان می دهد شته ها علاقه ای به تغذیه از گیاهان تراریخت نداشته و سعی داشتند تا برای پیدا کردن منابع گیاهی دیگر پرواز نمایند. میانگین تعداد شته در کل تکرارهای لاینهای تراریخت یا گیاه نرمال برای آنالیز آماری و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و احتمال خطای ۵٪ مورد استفاده قرار گرفت.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

جدول ۴- مقایسه تعداد شته پنبه روی دیسکهای برگی در ارزیابی زیستی انتخابی دوگانه گل داوودی ۱۵۸۱ (اعداد میانگین کل لاینها در ساعت های مختلف پس از تلقیح می باشند)

ژنوتیپ	لاین	۱ ساعت	۲ ساعت	۳ ساعت	۴ ساعت	۱۸ ساعت	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت
۱۵۸۱	تراریخت	۱/۰۸^{a}	۱/۴۸^{a}	۱/۶۴^{a}	۱/۶۸^{a}	۴/۹۲^{a}	۶/۰۴^{a}	۸/۷۶^{b}
	نرمال	۰/۹۶^{a}	۱/۷۲^{a}	۲/۰۴^{a}	۲/۰۸^{a}	۵/۳۲^{a}	۷/۷۶^{a}	۱۱/۹۶^{a}
		۱۱۹/۰۷	۷۶/۱۶	۶۶/۸۹	۷۱/۷۳	۶۵/۱۰	۶۶/۰۰	۵۱/۳۳
۴۰۴۳	تراریخت	۰/۷۰^{a}	۰/۸۰^{b}	۱/۸۰^{a}	۰/۹۰^{b}	۲/۴۰^{a}	۳/۲۰^{b}	۵/۹۰^{a}
	نرمال	۱/۵۰^{a}	۲/۴۰^{a}	۲/۶۰^{a}	۴/۱۰^{a}	۴/۸۰^{a}	۷/۲۰^{a}	۱۰/۴۰^{a}

در هر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی دار ارقام را در آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ نشان می دهد.

جدول ۵- مقایسه تعداد شته هلو روی دیسک های برگی در ارزیابی زیستی انتخابی دوگانه گل داوودی ۱۵۸۱ اعداد میانگین کل لاینها در ساعتهای مختلف پس از تلقیح می باشند)

لاین	۱ ساعت	۲ ساعت	۳ ساعت	۴ ساعت	۲۰ ساعت	۲۴ ساعت	۲۸ ساعت	۴۸ ساعت
تراریخت	۰/۵۶^{b}	۲/۳۶^{a}	۲/۴۴^{a}	۲/۶۸^{a}	۴/۲۸^{a}	۳/۸۴^{b}	۴/۳۶^{a}	۴/۹۶^{a}
نرمال	۱/۳۶^{a}	۱/۸۸^{a}	۲/۶۰^{a}	۳/۳۲^{a}	۵/۱۲^{a}	۵/۲۸^{a}	۵/۴۴^{a}	۵/۵۶^{a}

در هر ستون حروف مشابه عدم تفاوت معنی دار ارقام را در آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ نشان می دهد.

در مطالعه حاضر گیاهان تراریخت گل داوودی بیان کننده ژن EIM با استفاده از آگروباکتریوم تولید شد. آنالیز PCR و وسترن بلات جهت تأیید تراریخت بودن آنها انجام گردید. آنالیز qRT-PCR نشان داد که اکثر گیاهان تراریخت مورد آزمون ژن EIM را در سطوح مختلفی بیان کردند (جدول ۲). مطالعه حاضر نشان داده است که بیان EIM در گل داوودی تراریخت میزان قابل ملاحظه ای از مصونیت را در برابر شته ها که یکی از جدی ترین آفات این گیاه است، فراهم می نماید. به نظر می رسد ژن EIM می تواند کاندیدای خوبی باشد تا به صورت مکمل با سایر ژنها برای افزایش مقاومت به آفات در مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گیرد. چنین سطح قابل قبولی از حفاظت در برابر آفات تنها می تواند از طریق آزمونهای مزرعه ای وسیع مورد تأیید واقع شود. به هرحال به عنوان جزئی از مدیریت تلفیقی آفات میزان کاهش مشاهده شده در نرخ رشد جمعیت آفت در این تحقیق انعطاف پذیری در بکارگیری سایر شاخصهای کنترل آفات و یا تلفیق در یک سیستم پایدارتر کشاورزی را فراهم می آورد.

منابع

1. Anderson, N.O. 1987. Reclassifications of the genus *Chrysanthemum* L. Horticultural Science, 22: 313.
2. Broertjes, C., P. Koene and J.H.W. Van Veen. 1980. A mutant of a mutant of a mutant of a: irradiation of progressive radiation-induced mutants in a mutation-breeding programme with Chrysanthemum morifolium RAM. Euphytica, 29: 525-530.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

3. Ceci, L.R., M. Volpicella, S. Conti, R. Gallerani, M.J. Beekwilder and M.A. Jongsma. 2003. Selection by phage display of a mustard chymotrypsin inhibitor toxic to pea aphid. Plant Journal, 33: 557-566.
4. Cowgill, S.E., C. Wright and H.J. Atkinson. 2002. Transgenic potatoes with enhanced levels of nematode resistance do not have altered susceptibility to non-target aphids. Molecular Ecology, 11: 821-827.
5. Dai Z., B.S. Hooker, D.B. Anderson and S.R. Thomas. 2000. Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: expression optimization and tissue targeting. Molecular Breeding, 6: 277-285.
6. De Jong, J., W. Rademaker and M.F. van Wordragen. 1993. Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 32: 263-270.
7. Dolja, V.V., V.V. Peremyslov, K.E. Keller, R.R. Martin and J. Hong. 1998. Isolation and stability of histidine-tagged proteins produced in plants via potyvirus gene vectors. Virology, 252: 269-274.
8. Erler, R. and I. Siegmund. 1986. Year Book of the International Horticultural Statistics, USA. 84 pp.
9. Fukai, S., J. De Jong and W. Rademaker. 1995. Efficient genetic transformation of chrysanthemum (Dendranth. ema grandtflorum (Ramat) Kitamura) using stem segments. Breeding Science, 45: 179-184.
10. Gruden, K., B. Strukelj, T. Popovic, B. Lenarcic, T. Bevec, J. Brzin, I. Kregar, J. HerzogVelikonja, W.J. Stiekema, D. Bosch. 1998. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. Insect Biochemical Molecular Biology, 28: 549-560.
11. Harsulkar, A.M., A.P. Giri, A.G. Patankar, V.S. Gupta, M.N. Sainani, P.K. Ranjekar and V.V. Deshpande. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. Plant Physiology, 121: 497-506.
12. Hood, E.E., G.L. Helmer, T. Fraley and M.D. Chilton. 1986. The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. Bacteriology, 168: 1291-1301.
13. Jongsma, M.A. and C. Bolter. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology, 43: 885-895.
14. Jongsma, M.A. and J. Beekwilder. 2011. Co-Evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. Current Protein and Peptide Science, 12: 437-447.
15. Jongsma, M.A., P.L. Bakker, B. Visser and W.J. Stiekema. 1994. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack، wounding and virus infection. Planta, 195: 29-35.
16. Kaul, V., R.M. Miller, J.F. Hutchinson and D. Richards. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). Plant Cell Tissue &. Organ Culture, 21: 21-30.
17. Kim, Y., S. Lim, K. Kang, Y. Jung, Y. Lee, Y. Choi and H. Sano. 2011. Resistance against beet armyworms and cotton aphids in caffeine-producing transgenic chrysanthemum. Plant Biotechnology, 28: 393-395.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

18. Koziel, M.G., N.B. Carozzi and N. Desai. 1996. Optimizing expression of transgenes with an emphasis on post-transcriptional events. Plant Molecular Biology, 32: 393-405.
19. Lenarcic, B. and V. Turk. 1999. Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. Journal of Biological Chemistry, 274: 563-566.
20. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\delta Ct}$ CT Method. Melthods 25: 402-408.
21. Marouski, F.J. 1971. Handling and opening bud-cut chrysanthemum flowers with 8-hydroxyquinoline citrate and sucrose. USDA-ARS Marketing Research Report. No. 905. 14 pp.
22. Mochida, O., A. Wahyu and T.K. Surjani. 1979. Some considerations on screening resistant cultivars/lines of rice plant to the brown planthopper, *Nilparvata lugens* (Stal) (Hom, Delphacidae). (pp: 1-9) IRRI, Los Banos, Philipines.
23. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiological Plantarum, 15: 473-497.
24. Nagadhara, D., S. Ramesh, I.C. Pasalu, R.Y. Kondala, N.V. Krishnaiah, N.P. Sarma, D.P. Bown, J.A. Gatehouse, V.D. Reddy and K.V. Rao. 2003. Transgenic indica rice resistant to sapsucking insects. Plant Biotechnology Journal, 1: 231-240.
25. Outchkourov, N.S., J. Peters, J. de Jong, W. Rademakers and M.A. Jongsma. 2003. The promoter-terminator of chrysanthemum *rbcS1*directs very high expression levels in plants. Planta, 216: 1003-1012.
26. Outchkourov, N.S., W.J. Kogel, G.L. Wiegers, M. Abrahamson and M.A. Jongsma. 2004. Engineered multidomain cyctein protease inhibitors yield resistance against western flower trips (*frankliniella occidentalis*) in green house trails. Plant Biotechnology Journal, 2:449-458.
27. Outchkourov, N.S., W.J. de Kogel, A. Schuurman-de Bruin, M. Abrahamson and M.A. Jongsma. 2004. Specific cysteine protease inhibitors act as deterrents of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande), in transgenic potato. Plant Biotechnology Journal, 2: 439-448.
28. Outchkourov, N.S., B. Rogelj, B. Strukelj and M.A. Jongsma. 2003. Expression of sea anemone equistatin in potato: effects of plant proteases on protein stability. Plant Physiology, 133: 379-390.
29. Pereira, A. and M.G.M. Aarts. 1998. Transposon tagging with the En-I system. In: J. Martinez-Zapater and J. Salinas, (eds.) Arabidopsis Protocols. pp: 329-338. Totowa, NJ, Humana Press.
30. Rahbé, Y., E. Ferrasson, H. Rabesona and L. Quillies. 2003. Toxicity to the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. Insect Biochemistry Molecular Biology, 33: 299-306.
31. Ryan, C.A. 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defences against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology, 28: 425-449.
32. Salinger, J.P. 1991. Production commercial de-Flores. Zaragoza:Acribia. 371 pp.
33. Schouten, A., J. Roosien, F.A. Engelen, G.A.M. Jong, A.W.M. Borst Vrenssen, J.F. Zilverentant, D. Bosch, W.J. Stiekema, F.J. Gommers and A. Schots. 1996. The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a singlechain antibody design to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco. Plant Molecular Biology, 30: 781-793.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

34. Sharp, J.M. and P.M. Doran. 2001. Characterization of monoclonal antibody fragments produced by plant cells. Biotechnological Bioengineering, 73: 338-346.
35. Sharp, J.M. and P.M. Doran. 2001. Strategies for enhancing monoclonal antibody accumulation in plant cell and organ cultures. Biotechnological Progress, 17: 979-992.
36. Sherman, J.M., J.W. Moyer and M.E. Daub. 1998b. Tomato spotted wilt virus resistance in Chrysanthemum expressing the viral nucleocapsid gene. Plant Disease, 82(4): 407- 414.
37. Stevens, L.H., G.M. Stoopern, I.J.W. Elbers, J.W. Molthoff, H.A.C Bakker, A. Lommen, D. Bosch and W. Jordi. 2000. Effect of climate conditions and plant developmental stage on the stability of antibodies expressed in transgenic tobacco. Plant Physiology 124: 173-182.
38. Strukelj, B., B. Lenarcic, K. Gruden, J. Pungercar, B. Rogelj, V. Turk, D. Bosch and M.A. Jongsma. 2000. Equitation, a protease inhibitor from the sea anemone *Actinia equine*, is composed of three structural and functional domains. Biochemical Biophysics Research Community, 269: 732-736.
39. Takatsu, Y., Y. Nishizawa, T. Hibi and K. Akutsu. 1999. Transgenic chrysanthemum Dendrantkema grandiflorum (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Science Horticulture. 82: 113-123.
40. Visser, P.B., R.A. Maagd and M.A. Jongsma. 2007. “III.3 Chrysanthemum” in Biotechnology in Agriculture and Forestry، In: E.C. Pua and M.R. Davey (eds.). Transgenic Crops. VI. Vol. 61, pp: 253-272. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
41. Wandelt, C.I., M.R.I. Khan, S. Craig, H.E. Schroeder, D. Spencer and T.J.V. Higgins. 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants. Plant Journal, 2: 181-192.
42. Wong, E.Y., C.M. Hironaka and D.A. Fischhoff. 1992. *Arabidopsis thaliana* small subunit leader and transit peptide enhance the expression of *Bacillus thurigiensis* proteins in transgenic plants. Plant Molecular Biology, 20: 81-93.
43. Wu, J., X. Luo, H. Guo, J. Xiao and Y. Tian. 2006. Transgenic cotton، expressing *Amaranthus caudatus* agglutinin, confers enhanced resistance to aphids. Plant Breeding, 125: 390-394.
44. Yao, J., Y. Pang, H. Qi, B. Wan, X. Zhao, W. Kong, X. Sun and K. Tang. 2003. Transgenic tobacco expressing *Pinellia ternate* agglutinin confers enhanced resistance to aphids. Transgenic Research, 12: 715-722.

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]

Aphid Resistance in Florist's Chrysanthemum Induced by Sea Anemone Equistatin Overexpression

Mahmoud Valizadeh[1], Seyed Kamal Kazemitabar[2] and Marten A. Jongsma[3]

1- PhD Student, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University
2- Associate Professor, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University (Corresponding author: k.kazemitabar@sanru.ac.ir)
3- Senior Researcher, Plant Research International, Wageningen University, Netherlands
Received: March 9, 2012 Acceptance: November 18, 2012

Abstract

Florist's chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) belongs to the Asteraceae family and represents the second most important floricultural crop in the world. Most genotypes are sensitive to aphids and infestations can seriously affect the economic value and cause transmission of viruses into this vegetatively propagated crop. The result of artificial diet bioassay showed that equistatin is readily toxic when digested by two tested aphids (*Acyrthosiphon pisum*, most susceptible and *Aphis gossypii*) and showed moderate growth inhibition of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. We transformed genotypes 1581 and 4043 using *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL-0 containing the binary vector pBINPLUS carrying the sea anemone equistatin gene under the control of the chrysanthemum RbcS promoter to induce aphid resistance. Leaf disk choice and non-choice as well as whole plant bioassays were carried out to analyze deleterious effect of SAE on population growth of both peach aphid *Myzus persicae* and cotton aphid *Aphis gossypii*. Transgenic line with highest expression of SAE in qRT-PCR showed the lowest population growth (about half of control population) in peach aphid and highest mortality (2.75 times of control) in cotton aphid.

Keywords: Florist́s chrysanthemum (*Chrysanthemum Morifolium* Ramat.), Transformation, Aphid resistance, RbcS promoter, Internode explants

[Downloaded from jcb.sanru.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22286128.1392.5.11.8.6]