مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۳، شماره ۲، سال ۱۳۹۶

تأثیر ژن‌های مقاومت انتقال یافته از نخودفرنگی (*Pisum sativum*) به کلزا (*Brassica napus*) علیه بیماری پوسیدگی اسکروتینیائی ساقه (*Sclerotinia scleritiorum*)

Effectiveness of Resistance Genes Transferred from Pea (*Pisum sativum*) to Canola (*Brassica napus*) Against Sclerotinia Stem Rot (*Sclerotinia scleritiorum*)

احد باقری[۱]، علیرضا عباسی[۲]، حسن زینالی[۳] و ولی‌الله محمدی[۴]

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری، استادیار، استاد و دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۵/۵

چکیده

باقری، ا.، عباسی، ع.ر.، زینالی، ح. و محمدی، و. ۱۳۹۶. تأثیر ژن‌های مقاومت انتقال یافته از نخودفرنگی (*Pisum sativum*) به کلزا (*Brassica napus*) علیه بیماری پوسیدگی اسکروتینیائی ساقه (*Sclerotinia scleritiorum*). **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۳:** ۲۶۳- ۲۴۳.

یکی از بیماری‌های مخرب کلزا در دنیا، پوسیدگی اسکروتینیائی ساقه ناشی از قارچ (*Sclerotinia scleritiorum*) است. اطلاعات کمی در مورد مقاومت به این بیماری در دست است. در این تحقیق، تأثیر سه ژن مربوط به مقاومت به بیماری که از گیاه نخودفرنگی منشأ گرفته و به کلزا منتقل شده‌اند علیه بیماری پوسیدگی ساقه با استفاده از سه ترانس‌ژن (Transgene) PR10.1، Chitinase و DRR206 در قالب دو آزمایش بررسی شد. در آزمایش اول سه ترانس‌ژن از رقم کلزای حامل آن‌ها (رقم Westar) به چهار رقم تجاری MillenniUM 03، Apollo، Sentry و OAC Triton منتقل شدند تا تأثیر پس‌زمینه‌های مختلف ژنتیکی پاسخ به بیماری بررسی شود. این کار از طریق تلاقی ارقام تجاری با لاین‌های تراریخته، و به دنبال آن تلاقی‌های برگشتی با ارقام تجاری انجام شد. در آزمایش دوم، ایده تجمیع دو به دوی ترانس‌ژن‌های سه‌گانه آزمون شد. برای این منظور تلاقی معمولی بین لاین‌های تراریخته Westar برای ترکیب‌های مختلف بین ترانس‌ژن‌ها انجام شد. برای غربالگری گلخانه‌ای بیماری از سه روش آزمون ساقه، مایه‌زنی دمبرگ و سنجش برگ استفاده شد. بر اساس نتایج آزمون‌های غربالگری، در آزمایش اول بهترین کاهش بیماری در ترکیب ترانس‌ژن PR10.1 در ارقام Sentry و Apollo مشاهده شد و در آزمایش دوم ترکیب PR10.1×DRR206 بهترین میانگین را داشت. در مجموع ترانس‌ژن PR10.1 بهترین عملکرد را در کاهش بیماری داشت. لاین‌های نویدبخش فوق‌الذکر را می‌توان در شرایط مزرعه‌ای نیز آزمون کرد تا در صورت تائید، به ثبت و تجاری‌سازی آنها منتهی می‌شود

واژه‌های کلیدی: بیماری پوسیدگی اسکلروتینیائی کلزا، گیاهان تراریخته، PR10.1، Chitinase، DRR206، بیماری‌سنجی گلخانه‌ای.

نویسنده مسئول: Ahad.Baghery@gmail.com تلفن: ۰۹۱۲۷۶۶۰۷۰۵

مقدمه

کلزا با نام علمی *Brassica napus* یکی از گیاهان دانه روغنی مهم در جهان است. آمار منتشره توسط سازمان خواروبار کشاورزی، فائو (Food and Agriculture Organization: FAO) نشان می‌دهد که در سال ۲۰۱۰ مهم‌ترین منبع روغن نباتی تولید داخل، کلزا با ۴۹٪ کل تولید کشور و بعد از آن سویا با ۲۱٪ در مقام دوم بوده است (Anonymous, 2010). پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه که توسط قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* ایجاد می‌شود یک بیماری مخرب است و در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب به سرعت گسترش پیدا می‌کند و اگر در مرحله گلدهی یا کمی بعد از آن اتفاق بیفتد می‌تواند افت شدید عملکرد را باعث شود. قارچ Sclerotinia فصل زمستان را به صورت اسکلروت در خاک و یا روی بقایای گیاهی سپری می‌کند. اسکلروت می‌تواند بذر را نیز آلوده کند. این قارچ، یک بیمارگر خاکزاد با دامنه میزبانی گسترده‌ای است که تقریباً در تمامی مزارع حضور دارد. این قارچ از طریق اسکلروت، بذر و باد منتشر می‌شود. در حال حاضر بهترین راه مبارزه با این بیماری شخم عمیق قبل از کاشت به منظور دفن اسکلروت‌ها و بقاای آلوده گیاهی و نیز اعمال تناوب بلند مدت (چهار سال یا بیشتر) بین محصولات حساس به این بیماری است. برخی ارقام کلزا گلبرگ ندارند (Apetalous). فقدان گلبرگ باعث حذف منبع غذایی اصلی آسکوسپورهای این قارچ می‌شود، لذا بنابراین ارقام بدون گلبرگ تا حد زیادی از آلودگی‌های شدید Sclerotinia فرار می‌کنند. اگر ارقام بدون گلبرگ کلزا بتوانند عملکرد مشابه ارقام معمولی داشته باشند ممکن است برای کنترل Sclerotinia مفید باشند. از دیگر راه‌های کنترل بیماری می‌توان به استفاده از سموم قارچکش، کنترل بیولوژیک و استفاده از ارقام مقاوم اشاره کرد.

در تلاش برای شناسایی ژنتیک این بیماری، ژنگ و همکاران (Zhang *et al.*, 2011)، موفق به شناسایی یک ژن مقاومت به بیماری شدند و آن را *Rsk* نامگذاری کردند. بررسی توالی اسید امینه این ژن نشان داد که شباهت زیادی به ژن کیناز در *Arabidopsis thaliana* دارد و این فرض را تقویت کرد که احتمالاً فعالیت بازدارندگی ریبونوکلئاز دارد و مشابه ژن PR10.1 استفاده شده در تحقیق حاضر است. ژن *BnEIN3* نیز به عنوان ژن مقاومت در *Brassica napus* شناسایی شده است (Xu *et al.*, 2009). منابع مقاومت به قارچ Sclerotinia هنوز در کلزا شناسایی نشده است با این حال، در تیپ‌های وحشی *B. oleracea* پتانسیل بالایی برای انتقال مقاومت به این بیماری به کلزا *(B. napus)* گزارش شده است که می‌تواند به عنوان منبعی برای انتقال مقاومت به ارقام تجاری در برنامه‌های به‌نژادی کلزا باشد (Garg *et al.*, 2010؛ Mei *et al.*, 2011). یین و همکاران (Yin *et al.*, 2010) با استفاده از

لاین‌های دابل هاپلوئید حاصل از تلاقی بین یک لاین حساس و یک لاین متحمل، موفق به شناسایی بیست و یک QTL همبسته با مقاومت به این بیماری شدند که برای بهره‌برداری در برنامه‌های به‌نژادی می‌تواند مفید واقع شود. در یک تحقیق دیگر مشخص شد که ژن *Ssaxp* در قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* آنزیمی را کد می‌کند که در تخریب دیواره سلول‌های گیاهی نقش دارد و از این طریق به نفوذ بیمارگر و ایجاد آلودگی در گیاهان حساس کمک می‌کند (Yajima *et al.*, 2009). این نتیجه با ایجاد اختلال در ژن مذکور و مقایسه قدرت بیماریزایی موتانت‌ها با جدایه وحشی قارچ به دست آمده است.

تصور می‌شود که ژن‌های دخیل در مقاومت گیاه نخود به قارچ‌های بیماریزا در صورت انتقال به کلزا بتوانند سطح مقاومت این گیاه را نیز به بیماری یاد شده بهبود بخشند. در این صورت، با ثبت و تجاری سازی ارقام کلزای حاوی این ژن‌های منشأ گرفته از نخود می‌توان به تولید پایدار کلزا و در نتیجه افزایش تولید روغن‌های خوراکی و صنعتی امیدوارتر بود. تعدادی لاین تراریخته کلزا (رقم Westar) حاوی سه ژن مرتبط با مقاومت به بیماری (PR10.1، Chitinase و DRR206) قبلاً توسط ونگ و همکاران (Wang *et al.*, 1999) تولید و ارزیابی شده است. مواد گیاهی تراریخته در این تحقیق (گیاهان کلزای حاوی یکی از سه ژن بیگانه مقاومت به بیماری) فرصتی را برای کاوش بیشتر میزان مفید بودن این ژن‌های بیگانه برای کنترل بیماری اسکلروتینیائی در پس‌زمینه‌های ژنتیکی متنوع فراهم می‌کند. این تحقیق، دو هدف عمده را از طریق دو آزمایش دنبال می کرد: انتقال سه ترانس‌ژن مذکور به ارقام تجاری کلزا و ارزیابی سطح مقاومت آن‌ها (آزمایش اول) و تجمیع دو به دوی ترانس‌ژن‌ها و ارزیابی سطح مقاومت آن‌ها (آزمایش دوم).

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

بخش اعظم تحقیق حاضر در دانشگاه مانیتوبا در کانادا و بخشی نیز در دانشگاه تهران در فاصله سال‌های ۱۳۸۴ تا ۱۳۹۱ انجام شد. در این تحقیق، پنج رقم کلزا به نام‌های Westar، Triton، OAC، Apollo، Sentry و MillenniUM 03 مورد استفاده قرار گرفت. رقم غیر تراریخته Westar به عنوان کنترل منفی و چهار رقم دیگر به عنوان گیرنده سه ترانس‌ژن در این تحقیق استفاده شدند. لاین‌های رقم تراریخته Westar حاوی یکی از سه ترانس‌ژن معرفی شده در جدول ۱ بودند. گیاهان در داخل مخلوط ®Metromix و در داخل اتاقک رشد با دمای روزانه ۲۰ و شبانه ۱۶ درجه سانتی‌گراد و با ۱۶ ساعت طول روز رشد داده شدند. سپس گیاهچه‌ها به داخل گلدان‌هایی حاوی مخلوط ۳:۲:۱ خاک برگ: ماسه: خاک منتقل و در شرایط دما و طول روز فوق‌الذکر نگهداری شدند.

آزمایش اول

انتقال سه ترانس‌ژن (GN1، GN2، و GN3) به چهار رقم تجاری کلزا (OAC Triton، Apollo، Sentry و MillenniUM 03) از طریق تلاقی بین لاین‌های تراریخته و ارقام تجاری و متعاقب آن انجام تلاقی برگشتی (Backcross) انجام شد.

چهار رقم تجاری با لاین‌های تراریخته سه‌گانه دورگ‌گیری شدند. تلاقی به صورت دستی و با حذف کاسبرگ‌ها، گلبرگ‌ها و پرچم‌های والد ماده در مراحل آخر غنچه‌دهی (قبل از شکفتن گل) انجام شد، سپس کلاله‌ها با گرده‌ی والد نر آغشته شدند. گل‌های دورگ‌گیری شده به منظور جلوگیری از ورود گرده‌های ناخواسته، با پاکت پلاستیکی پوشانیده شدند. با فرض این که کلیه لاین‌های تراریخته والدینی مورد استفاده برای دورگ‌گیری، نسبت به ترانس‌ژن‌ها هوموزیگوت (AA) بودند انتظار می‌رود که کلیه گیاهان F1 هتروزیگوت (Aa) باشند که در حقیقت همی‌زیگوت خوانده می‌شوند زیرا آلل مغلوب، وجود فیزیکی ندارد و نول (Null) است. هدف از این تلاقی‌ها این بود که تأثیر ترانس‌ژن‌ها روی مقاومت به بیماری در پس‌زمینه‌های مختلف ژنتیکی بررسی شود، لذا تلاش شد که محتوای ژنتیکی دورگ‌ها به والدین تجاری هر چه نزدیک‌تر شود. واضح است که F1 حدود ۵۰٪ مشابهت ژنتیکی با والد تجاری دارد. برای افزایش سهم والد تجاری در ژنوم دورگ‌ها دو بار تلاقی برگشتی انجام شد. انتظار می‌رفت که تلاقی‌های برگشتی (BC1 و BC2) به ترتیب ۷۵٪ و ۸۷/۵٪ از ژنوم والد تجاری را داشته باشند که برای منظور این تحقیق کافی در نظر گرفته شد. گیاهان دارای ژنوتیپ aa با استفاده از غربالگری PCR حذف شدند. به عنوان اولین تلاقی برگشتی، گیاهان F1 با والد تجاری خود تلاقی برگشتی داده شدند و دانه‌های BC1 برداشت شدند. بذرهای BC1 برای ایجاد بوته‌های BC1 رشد داده شدند و برگ‌های آن‌ها مورد آزمون غربالگری PCR برای ترانس‌ژن‌ها قرار گرفتند. گیاهانی که باند PCR را نشان دادند با ارقام تجاری تلاقی داده شدند تا نسل BC2 را تولید کنند. بذرهای BC2 کاشته شدند و برای حضور ترانس‌ژن با PCR آزمون شدند. گیاهان مثبت، شناسایی و خودگشن شدند و بذرهای آن‌ها به عنوان توده BC2S1 برداشت شد. بذرهای BC2S1 کاشته شد و برای حضور ترانس‌ژن توسط PCR آزمون شدند. گیاهان مثبت، خودگشن شدند و بذرهای به دست آمده به عنوان BC2S2 برداشت شد. نسل BC2S2 مورد آزمایش هوموزیگوسیتی قرار گرفت که در آن حداقل بیست و چهار گیاه برای حضور ترانس‌ژن آزمون شدند و خانواده‌هایی که تفرق نشان ندادند یعنی همگی مثبت شدند به عنوان ژنوتیپ هوموزیگوت شناخته شدند. دو بار آزمون غربالگری گلخانه‌ای برای بیماری‌ها انجام شد: یک بار در مرحله هتروزیگوت و به بیان دقیق‌تر همی‌زیگوت (Hemizygous) که

گیاهان نسل BC2 (که مخلوطی از ژنوتیپ‌های Aa و aa بودند) پس از حذف بوته‌های aa توسط PCR مورد بیماری‌سنجی قرار گرفتند و بار دوم در مرحله هوموزیگوت که گیاهان نسل BC2S2 (که عدم تفرق آن‌ها با PCR تأیید شد و ژنوتیپ AA داشتند) مورد غربالگری گلخانه‌ای برای بیماری قرار گرفتند.

انتظار می‌رفت که نسل‌های BC1 و BC2 مخلوط ۵۰:۵۰ از دو ژنوتیپ Aa و aa باشند. هدف این بود که تنها ژنوتیپ‌های Aa نسل بعد را ایجاد کنند لذا از PCR برای گزینش ژنوتیپ‌های Aa استفاده شد. گیاهان BC2 خودبارور شدند تا نسل BC2S1 تولید شود که مخلوطی از ژنوتیپ‌های AA، Aa، و aa بودند. گیاهان aa از طریق غربالگری PCR حذف شدند ولی گیاهان AA و Aa دوباره خودبارور شدند تا نسل BC2S2 تولید شوند تا بدینوسیله ژنوتیپ‌های AA و Aa نسل BC2S1 از هم تشخیص داده شوند.

آزمایش دوم

تجمیع دو به دوی ترانس‌ژن‌ها در Westar و ارزیابی سطح مقاومت آن‌ها از طریق انجام تلاقی‌های بین ترانس‌ژن‌ها انجام شد. با فرض این‌که هر کدام از دو والد در یک تلاقی، برای یکی از ترانس‌ژن‌ها هوموزیگوت و برای دیگری خالی یا نول بودند نتاج این تلاقی‌ها (F1) انتظار می‌رفت که برای هر دو مکان ژنی هتروزیگوت (در واقع، همی‌زیگوت) باشد. اولین مرحله غربالگری بیماری، در این مرحله هتروزیگوت انجام شد. به منظور انتخاب هوموزیگوت‌ها خودباروری انجام شد و دانه‌های آن‌ها برداشت شد که این‌ها بذرهای F2 را تشکیل دادند. مجموعه بذور F2 کاشته شدند و حضور ترانس‌ژن‌ها در آن‌ها با PCR آزموده شد. بوته‌های F2 که برای هر دو ترانس‌ژن مربوطه مثبت شدند خودبارور شدند و بذرهای F3 تولید شدند. گیاهان حاصل از بذرهای F3 نیز نسبت به حضور ترانس‌ژن‌ها بررسی شدند و خانواده‌هایی که تفرق نشان دادند (در حداقل ۲۴ بوته) کلاً حذف شدند و آن‌هایی که تفرق نشان ندادند به عنوان ژنوتیپ‌های هوموزیگوت مورد آزمایش‌های غربالگری گلخانه‌ای برای بیماری قرار گرفتند.

غربالگری با PCR برای حضور ترانس‌ژن‌ها

استخراج DNA برای PCR

قطعات برگ در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ ml شناور در نیتروژن مایع با استفاده از میله‌های پلاستیکی شبیه دسته هاون خرد شده و کاملاً کوبیده و بلافاصله روی یخ قرار گرفتند. سپس ۶۵۰µl از بافر CTAB (100mM TRIS pH = 8, 20mM EDTA, 1.4 mM NaCl, 2% CTAB) به آن اضافه و کاملاً مخلوط و در حمام آبگرم (بن ماری) ۶۵°C به مدت ۱۲۰-۹۰ دقیقه نگهداری شد. سپس نمونه‌ها بیرون آورده شدند و به آن‌ها ۶۵۰µl کلروفرم اضافه و با استفاده از دستگاه

لرزاننده ورتکس به خوبی مخلوط شدند. مخلوط به دست آمده سپس به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و قسمت بالایی به لوله جدید منتقل شد. به اندازه ۶/. – ۵/. حجم مایع موجود در لوله، ایزوپروپانول به آن‌ها اضافه و به خوبی مخلوط شد. سپس لوله‌های حاوی مایع به مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند و قسمت مایع دور ریخته شد و رسوب DNA با اتانول ۷۰٪ شسته شدند. لوله‌ها به طور مختصر سانتریفوژ شدند و مابقی اتانول هم با میکروپیپت حذف شد. رسوب DNA در مقدار ۴۰۰µl آب مقطر حل شد و به عنوان DNA الگو در PCR استفاده شد.

PCR

با استفاده از نرم افزار Primer3 آغازگرهای اختصاصی برای هر سه ترانس‌ژن طراحی شد تا در غربالگری PCR برای اثبات حضور ترانس‌ژن‌ها در گیاهان در نسل‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرند. محلول مورد استفاده برای PCR عبارت بود از: یک میکرولیتر از بافر 10X که شامل مواد زیر بود:

100 mM Tris-HCl pH 8.3 =، 500 mM KCl، ۰/۳ µl از 50mM $MgCl_2$، ۰/۱۵ میکرولیتر از مخلوط dNTP هر کدام با غلظت 25 mM، ۰/۱۵ µl آنزیم *Taq* polymerase، یک میکرولیتر از DNA الگو با غلظت ۵ ng/µl، حجم نهایی محلول هر تیوب به ۱۰µl با آب دیونیزه تنظیم شد. توالی آغازگرهای مورد استفاده برای ره‌گیری ترانس‌ژن‌ها با PCR به شرح زیر بود:

برای GN1 آغازگر 5'gcacctgctatactctacaaagctc3' به همراه 5'ggcagccaaattaagcacac3'، استفاده شد. برای GN2 آغازگرهای 5'acggggtctatccacaaaca3' و 5'cggtgtcgagaaggattgat3' و برای GN3 نیز 5'tggaaagaatgcagcaaatg3' به همراه 5'acccacgttcaaccagtttt3' مورد استفاده قرار گرفت. چرخه حرارتی مورد استفاده در PCR به شرح زیر بود:

۴ دقیقه در دمای ۹۴°C که به دنبالش چهل بار چرخه زیر تکرار شد: ۴۵ ثانیه دمای ۹۴°C، ۴۵ ثانیه دمای ۵۵°C، و یک دقیقه دمای ۷۲°C. واکنش با ده دقیقه دمای ۷۲°C خاتمه یافت. محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ به مدت ۴۵ دقیقه با ولتاژ ۱۲۰ ولت الکتروفورز شدند و با اتیدیوم بروماید قابل رؤیت شدند.

غربالگری گلخانه‌ای برای بیماری

آزمایش‌های غربالگری بیماری در دو مرحله انجام شد: اول، هنگامی که ترانس‌ژن‌های منتقل شده در مرحله هتروزیگوت بودند؛ دوم، زمانی که نسل‌های تراریخته تا رسیدن به مرحله هوموزیگوتی ترانس‌ژن‌ها در ارقام گیرنده، مدیریت شدند. از دیدگاه نظری، وقتی لوکوس A نسبت به a غالب است نباید هیچ تفاوتی در

فنوتیپ AA و Aa وجود داشته باشد. در مورد ترانس‌ژن‌های مورد بررسی در این تحقیق، A بیانگر حضور آن ترانس‌ژن است و a بیانگر خالی یا نول بودن یا عدم آن. اگر ترانس‌ژن، سطح بالاتری از مقاومت علیه یک بیماری خاص را اعطا می‌کند حضور حتی یک نسخه بیان شونده آن ژن نیز منجر به تولید محصول آن ژن و در پی آن، فنوتیپ مقاومت خواهد شد. بنابراین، بررسی تأثیر یک ترانس‌ژن در حالت هتروزیگوت نیز تصویر واضحی از نحوه عمل آن در حالت هوموزیگوت به دست می‌دهد. آزمون‌های استفاده شده برای غربالگری بیماری به شرح زیر بودند:

آزمون ساقه (Stem test)

بوته‌های کلزا در مرحله غنچه‌دهی یا اوایل گلدهی مطابق با روش معرفی شده توسط فانگ (Fang, 1993) برای سنجش مقاومت به *Sclerotinia sclerotiorum* مورد استفاده قرار گرفتند. گیاهان با رگه Can10-05 اخذ شده از گروه علوم گیاهی دانشگاه مانیتوبا مایه‌زنی شدند. کشت‌های جدید ۴-۳ روزه قارچ که هنوز کل تشتک پتری را اشغال نکرده بودند از قارچ رشد داده شده روی محیط کشت حاوی گلوکز (به عنوان تنها منبع غذایی) برای مایه‌زنی استفاده شدند (۱۵ g/l آگار، ۲۰٪ گلوکز). این محیط کشت به این دلیل استفاده شد که بیمارگر با ویژگی ضعیف‌تر تهاجمی (Less aggressive) تولید شود تا بتوان بین فنوتیپ‌های مقاوم و حساس تمایز ایجاد شود زیرا گلوکز کمتر منجر به پلی‌گالاکتورونـاز (Polygalacturonase) کمتر می‌شود که عامل مهمی در فرآیند آلوده‌سازی این بیمارگر به شمار می‌رود. مایه‌زنی با قرار دادن یک برش میسیلیومی دایره‌ای شکل به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت از حاشیه تشتک پتری بر روی ساقه کلزا مابین برگ‌های دوم و سوم انجام شد. ساقه در محل مایه‌زنی با لایه‌ای از پارافیلم پوشانده شد تا محیط مرطوبی برای بیمارگر حفظ شود. از گیاهان، چهارده روز بعد از مایه‌زنی یادداشت‌برداری انجام شد و قطر زخم به سانتی‌متر یادداشت شد.

روش مایه‌زنی دمبرگ (Petiole Inoculation Technique: PIT)

گیاهچه‌های چهار هفته‌ای برای این آزمون غربالگری مطابق با روش ژائو و همکاران (Zhao *et al.*, 2004) مورد استفاده قرار گرفت. نتایج تحقیقات ایشان حاکی از همبستگی مقاومت به این بیماری در مراحل گیاهچه و گلدهی بود. برگ سوم گیاهچه‌ها با به جا گذاشتن ۲/۵ سانتی‌متر از دمبرگ روی ساقه گیاه با تیغ تیز بریده شد. نوک ۲۵۰µl میکروپیپت برای برداشتن یک برش دایره‌ای میسیلیومی از حاشیه محیط کشت ۴-۳ روزه قارچ Sclerotinia استفاده شد. ترکیب محیط کشت، آگار-گلوکز بود که قبلاً توصیف شد. انتهای دمبرگ متصل به ساقه گیاه به داخل

نوک میکروپیپت حاوی برش میسیلیومی فشار داده شد تا با آن تماس خوبی پیدا کند و مطمئن شد که نوک میکروپیپت در جای خود محکم مستقر شده است. تعداد روزهای سپری شده از مایه‌زنی تا پژمردگی کامل گیاه به عنوان داده‌های آزمایشی یادداشت‌برداری شد.

آزمون برگ جدا شده (Detached Leaf Assay: DLA)

برگ‌ها از گیاهان چهار هفته‌ای جدا شدند و در داخل تشتک‌های پتری حاوی کاغذ صافی خیس گذاشته شدند. برش‌های میسیلیومی نظیر آن چه قبلاً برای آزمون ساقه توصیف شد تهیه و در وسط برگ گذاشته شد و در تشتک‌ها بسته و در دمای اتاق نگهداری شدند تا قارچ روی برگ رشد کند. داده‌برداری با یادداشت قطر زخم روی برگ (بر حسب سانتی‌متر) ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی مطابق آن چه که (Wu *et al.*, 2001) پیشنهاد کرده‌اند انجام شد.

نتایج و بحث

لاین‌های رقم تراریخته Westarو ژن‌های مقاومت به بیماری با منشاء نخودفرنگی ئر آن‌ها که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند در جدول ۱ نشان داده شده‌اند.

رهگیری ترانس‌ژن‌ها با PCR در طی نسل‌ها

استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای PCR ابزار ارشمندی بودند که در این تحقیق به طور مستقیم برای گزینش ترانس‌ژن‌ها استفاده شدند. پیش از هر گونه آزمایش بیماری سنجی، لازم بود که حضور ترانس‌ژن‌ها در لاین‌های تراریخته و عدم هر گونه توالی مشابه در ارقام والدینی و شاهدها یا کنترل‌های غیر تراریخته تأیید شود. این کار با انجام PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روی نمونه‌های DNA ژنومی استخراج شده از لاین‌های تراریخته و ارقام تجاری عملی شد. الکتروفورز محصولات PCR تأیید کرد که والدین تراریخته، حاوی ترانس‌ژن‌های مربوطه بودند و ارقام تجاری فاقد توالی‌های مشابه ترانس‌ژن‌ها بودند. اگر این گونه نبود توالی‌های مشابه در ارقام تجاری باعث ایجاد مشکل در رهگیری ترانس‌ژن‌ها در طی نسل‌های آزمایشی می‌شدند. لاین‌های والدینی تراریخته، برای ترانس‌ژن مربوطه هوموزیگوت (AA) بودند و ارقام تجاری، خالی یا نول (aa) تشخیص داده شدند.

تجزیه‌های آماری پاسخ به بیماری

مواد گیاهی در نسل‌های کاری مدیریت شدند تا به مرحله هوموزیگوتی رسیدند. اطمینان از هوموزیگوت بودن آن‌ها بر اساس عدم تفرق ژنی در لوکوس مربوطه با انجام غربالگری PCR در نتاج آن‌ها حاصل شد. خانواده‌های هوموزیگوت مورد استفاده برای بیماری‌سنجی پوسیدگی ساقه قرار گرفتند. از آن‌جایی که نتایج آزمون‌های بیماری‌سنجی در هر دو مرحله هتروزیگوت و هوموزیگوت عموماً شبیه

جدول ۱- سه ژن بیگانه مقاومت به بیماری با منشاء نخودفرنگی در سه لاین تراریخته رقم Westar کلزا

Table 1. Three alien resistance genes originated from pea in three lines of canola cultivar Westar

کد ترانس‌ژن Transgene code	نام ژن Gene name	شماره نمونه بانک ژن GenBank access no.	عمل Function
GN1	PR10.1	X13383	پروتئین مرتبط با بیماریزایی Pathogenesis Related protein : PR protein Contains 447bp,…
			حاوی ۴۷۷ جفت باز با عملکرد شبیه ریبونوکلئاز Ribonuclease-like protein
GN2	Chitinase	PEACHI2I	کیتیناز کلاس یک، ۹۶۶ جفت باز، تخریب دیواره سلولی قارچ Chitinase class 1, 96Gbp, degredation of fungal pathogen cell wall
			پروتئین پاسخ مقاومت به بیماری Disease Resistance Response : DRR
GN3	DRR206	AF115574	حاوی ۵۵۵ جفت باز، تقویت دیواره سلولی و بیوسنتز لیگنین Contains 555bp, cell wall strengthen, lignin biosynthesis

یک‌دیگر بودند در این‌جا برای رعایت اختصار، فقط نتایج آزمون‌های بیماری‌سنجی برای مرحله هوموزیگوت آورده می‌شود. مشابهت نتایج این دو مرحله نشان دهنده آن بود که گیاهان همی‌زیگوت و هموزیگوت از نظر تأثیر ژن، یکسان بودند.

برای بررسی تأثیر پس‌زمینه‌های ژنتیکی مختلف بر روی کارکرد ترانس‌ژن‌ها علیه بیماری Sclerotinia، یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۴ تکرار انجام شد. یکی از فاکتورها ترانس‌ژن در شش سطح (GN1+، GN1-، GN2+، GN2-، GN3+ و GN3-) و دیگری ارقام تجاری در چهار سطح بود. تبدیل داده به صورت تبدیل به جذر به منظور نرمال کردن توزیع خطاهای آزمایشی و یکنواخت کردن واریانس خطاها انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین ترانس‌ژن‌ها و بین ارقام از نظر تأثیر روی پاسخ به بیماری وجود داشت. این امر تأییدی بر طبیعت خیلی تهاجمی قارچ Sclerotinia بود. این مسئله به احتمال قوی عمدتاً به مکانیسم عمل سه ترانس‌ژن در گیاه برمی‌گردد. GN1 یک پروتئین با عملکرد شبیه ریبونوکلئاز را کد می‌کند که باعث بریده شدن و متلاشی شدن RNA سلول‌های مهاجم می‌شود. در حالی که GN2 با تولید کیتیناز به هضم دیواره سلولی قارچ که کیتین از اجزای سازنده آن است کمک می‌کند. GN3 نیز با تقویت دیواره سلولی گیاه از طریق بیوسنتز لیگنین به امر دفاع کمک می‌کند. اثر متقابل معنی‌دار در سطح یک دهم درصد نیز حاکی از آن بود که رفتار ترانس‌ژن‌ها در ارقام مختلف، متفاوت از هم بود، یعنی میزان کاهش بیماری یک ترانس‌ژن بستگی به رقم حامل آن داشت و این چیزی است که مورد سؤال این تحقیق بود، یعنی تأثیر پس‌زمینه ژنتیکی روی اثر ترانس‌ژن بر بیماری. این امر در نتیجه هم‌افزایی مثبت یا منفی ترانس‌ژن با ژن‌های بومی خود رقم است که جزئیات این هم‌افزایی مستلزم انجام بررسی‌ها و تحقیقات بیشتری است.

مقایسه میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ (جدول ۳) نشان داد که در مورد آزمون ساقه ترکیب GN1 با Sentry کمترین قطر زخم ساقه را داشت و GN1 در رقم Apollo به همراه GN3 در رقم Sentry نیز در همان ردیف جای گرفتند.

برای آزمون‌های بیماری‌سنجی در مرحله هوموزیگوت، دو آزمون جدید هم علاوه بر آزمون ساقه برای بیماری Sclerotinia اجرا شد که عبارت بودند از روش مایه‌زنی دمبرگ (PIT) و سنجش برگ جدا شده (DLA). جدول‌های ۴ و ۵ به ترتیب، تجزیه واریانس برای آزمون‌های PIT و DLA در آزمایش اول را نشان می‌دهند. در این‌جا هم اثر فاکتورها و اثر متقابل بین آن‌ها معنی‌دار بود. مقایسه میانگین‌ها (جدول‌های۶ و ۷) نیز حاکی از آن بود که نتایج این دو آزمون با اختلاف‌های ناچیزی تقریباً مشابه آزمون ساقه بود یعنی

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از آزمون ساقه در آزمایش اول

Table 2. Analysis of variance for data obtained from stem test in experiment 1

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	23	230.803	10.035	101.12***	<0.001
Transgene	ترانس‌ژن	5	155.600	31.120	313.60***	<0.001
Cultivar	رقم	3	9.213	3.071	30.95***	<0.001
Cultivar×Transgene	ترانس‌ژن × رقم	15	65.990	4.399	44.33***	<0.001
Error	اشتباه	552	54.778	0.099	-	-
Total	جمع	575	285.581	-	-	-

*** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد است: ضریب تغییرات= ۱۲/۷ درصد.

*** : Significant difference at 0. 1% level of probability: CV=12.7%.

جدول ۳- مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از آزمون ساقه در آزمایش اول

Table 3. Mean comparison of data obtained from stem test in experiment 1

پس‌زمینه ژنتیکی Genetic background	Transgene ترانس‌ژن					
	GN1		GN2		GN3	
	+	-	+	-	+	-
Sentry	1.82i	7.45d	4.91fg	13.77a	2.02i	6.16e
Apollo	2.01i	8.98bc	4.34g	9.45b	5.40efg	9.61b
OAC Triton	3.22h	5.65ef	7.52cd	12.86a	4.34g	10.36b
MillenniUM 03	5.41efg	5.25efg	5.72ef	7.77cd	7.88cd	8.85bcd

اعداد داخل جدول، قطر زخم ساقه (سانتی‌متر) حاصل از قارچ Sclerotinia چهارده روز پس از مایه‌زنی هستند.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

Figures in the table are stem lesion diameter (cm) resulted from Sclerotinia fourteen days after inoculation.

Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level according to Duncan`s multiple range test.

ترکیب GN1 و Sentry به همراه ترکیب GN3 و Sentry در صدر مقاوم‌ها قرار گرفتند. البته ترکیب ترانس‌ژن GN1 و Apollo نیز با دو ترکیب فوق در یک ردیف بودند.

آزمایش دوم برای بررسی اثر متقابل احتمالی بین ترانس‌ژن‌ها در حالت تجمیع دو به دو علیه بیماری Sclerotinia بود. برای آزمایش دوم در مرحله هوموزیگوت نیز آزمون‌های بیماری‌سنجی انجام شد. طرح آزمایشی مورد استفاده، عبارت از طرح کاملاً تصادفی با ۲۴ تکرار بود. تیمارها ترکیب‌های دو به دوی ترانس‌ژن‌ها به اضافه رقم Westar به عنوان شاهد بودند. نتایج تجزیه واریانس (جدول‌های ۸ تا ۱۰) در زیر درج شده‌اند. مشاهده می‌شود که تأثیر تیمار در هر سه نوع بیماری‌سنجی در سطح احتمال ۰/۱ درصد معنی‌دار بود که نشان

جدول ۴- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از روش مایه‌زنی برگ (PIT) در آزمایش اول

Table 4. Analysis of variance for data obtain from petiol inoculation technique (PIT) in experiment 1

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	23	49.675	2.160	24.05***	<0.001
Transgene	ترانس‌ژن	5	35.342	7.068	78.70***	<0.001
Cultivar	رقم	3	1.419	0.473	5.27**	<0.0014
Cultivar×Transgene	ترانس‌ژن × رقم	15	12.914	0.861	9.59***	<0.001
Error	اشتباه	552	49.580	0.090	-	-
Total	جمع	575	99.255	-	-	-

** و *** : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۰/۱ درصد : ضریب تغییرات= ۱۷/۸ درصد.

** and *** : Significant difference at 1% and 0. 1% levels of probability: CV=17.8%.

جدول ۵- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از آزمون برگ جدا شده (DLA) در آزمایش اول

Table 5. Analysis of data obtained from detatched leaf assay (DLA) in experiment 1

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	23	124.291	5.404	37.80***	<0.001
Transgene	ترانس‌ژن	5	87.098	17.420	121.85***	<0.001
Cultivar	رقم	3	7.158	2.386	16.69***	<0.001
Cultivar×Transgene	ترانس‌ژن × رقم	15	30.035	2.002	14.00***	<0.001
Error	اشتباه	552	78.911	2.143	-	-
Total	جمع	575	203.201	-	-	-

*** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد است: ضریب تغییرات= ۱۸/۴ درصد.

*** : Significant difference at 0. 1% level of probability: CV=18.4%.

دهنده تأثیر قابل توجه تجمیع ترانس‌ژن‌ها در پاسخ کلزا به این بیماری بود.

در مرحله هوموزیگوت آزمایش دوم، مقایسه میانگین تیمارها با روش دانکن در سطح احتمال ۱٪ برای پاسخ به بیماری در هر سه روش بیماری‌سنجی Sclerotinia انجام شد.

جدول ۱۱ نشان داد که در آزمون ساقه، ترکیب GN1×GN3 بیشترین کاهش بیماری را برای بیماری Sclerotinia داشت. در مورد آزمون‌های PIT و DLA اگرچه ترکیب دارنده بیشترین کاهش بیماری (GN1×GN3) یکسان بود با این وجود رتبه‌بندی دو ترکیب بعدی

جدول ۶- مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از روش مایه‌زنی دمبرگ (PIT)در آزمایش اول

Table 6. Mean comparison of data obtained from petiol inculation technique (PIT) in experiment 1

پس‌زمینه ژنتیکی Genetic background	Transgene ترانس‌ژن					
	GN1		GN2		GN3	
	+	−	+	−	+	−
Sentry	4.2ab	2.5fgh	3.7abcde	1.5ij	4.4a	3.0efg
Apollo	4.5a	2.2ghi	4.1abc	1.8hij	4.0abcd	2.0hi
OAC Triton	4.1abc	3.1def	2.8efg	1.5ij	4.0abcd	1.4j
MillenniUM 03	3.3bcdef	3.6abcde	3.2cdef	2.3gh	2.5fgh	2.0hi

اعداد داخل جدول، تعداد روزهای بعد از مایه‌زنی تا پژمردگی کامل گیاه هستند.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

Figures in the table are the number of days after inoculation until full plant wilt.
Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level according to Duncan`s multiple range test.

جدول ۷- مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده از آزمون برگ جدا شده (DLA) در آزمایش اول

Table 7. Mean comparison of data obtained from detached leaf assay (DLA) in experiment 1

پس‌زمینه ژنتیکی Genetic background	Transgene ترانس‌ژن					
	GN1		GN2		GN3	
	+	−	+	−	+	−
Sentry	1.4m	5.2efgh	3.7ij	7.4abc	1.7lm	4.5fgji
Apollo	1.5lm	6.1bcde	2.9jk	6.7abcd	3.5ij	6.5abcde
OAC Triton	2.2kl	4.2fghi	5.1efgh	8.0a	3.3ij	7.4ab
MillenniUM 03	3.9hij	3.5ij	4.2ghi	5.6cdef	5.3defg	6.4abcde

اعداد داخل جدول قطر زخم روی برگ (سانتی‌متر) هستند.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

Figures in the table are leaf lesion diameter (cm).
Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level according to Duncan`s multiple range test.

متفاوت از آزمون ساقه بود. در مجموع، با توجه به نتایج آزمایش اول و دوم، می‌توان گفت که ترانس‌ژن PR10.1 بهترین تأثیر را بر روی کاهش این بیماری داشت.

مشابهت نسبی نتایج به دست آمده از سه روش مختلف بیماری‌سنجی برای بیماری Sclerotinia قابل انتظار بود با این وجود، آزمون ساقه موقعی که تکرار شد یکنواختی (Consistency) بیشتری را نشان داد و نتایج تکرارپذیرتری تولید کرد مقایسه بین ضریب‌های تغییرات (CV) حاصل از تجزیه واریانس نیز شاهدی بر این تحلیل است، در

جدول ۸- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از آزمون ساقه در آزمایش دوم
Table 8. Analysis of variance for data obtained from stem test in experiment 2

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	3	7.417	2.472	4.177***	<0.001
Error	اشتباه	92	5.661	0.062	-	-
Total	جمع	95	13.78	-	-	-

*** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد: ضریب تغییرات= ۱۰/۴ درصد.
*** : Significant difference at 0. 1% level of probability: CV=10.4%.

جدول ۹- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از روش مایه‌زنی دمبرگ (PIT) در آزمایش دوم
Table 9. Analysis of variance for data oblained from petiol inculation technique (PIT) in experiment 2

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	3	5.497	1.832	21.27***	<0.001
Error	اشتباه	92	7.925	0.086	-	-
Total	جمع	95	5.497	1.832	21.27***	<0.001

*** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد: ضریب تغییرات= ۱۷/۹ درصد.
*** : Significant difference at 0. 1% level of probability: CV=17.9%.

جدول ۱۰- تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از آزمون برگ جدا شده (DLA) در آزمایش دوم
Table 10. Analysis of variance for data obtained from detached leaf assay (DLA) in experiment 2

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات SS	میانگین مربعات MS	F	سطح احتمال Pr>F
Treatment	تیمار	3	5.497	1.832	21.27***	<0.001
Error	اشتباه	92	7.925	0.086	-	-
Total	جمع	95	5.497	1.832	21.27***	<0.001

*** : اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۱ درصد: ضریب تغییرات= ۱۵/۳ درصد.
*** : Significant difference at 0. 1% level of probability: CV=15.3%.

حالی که ضریب تغییرات برای آزمون ساقه در آزمایش‌های دوگانه در هر دو مرحله هتروزیگوت و هوموزیگوت بین ۱۰/۴ و ۱۵/۹ درصد نوسان داشت این دامنه برای آزمون PIT حدود ۱۷/۹ درصد و برای آزمون DLA بین۱۵/۳ و ۱۸/۴ درصد بود. این امر نشانگر آن است که اندازه‌گیری‌ها برای آزمون ساقه از اشتباه کمتری برخوردار بود. بنابر این، آزمون

جدول ۱۱- مقایسه میانگین داده‌ها به دست آمده از سه نوع آزمون بیماری‌سنجی در آزمایش دوم

Table 11. Mean comparison of data obtained from three disease screening tests in experiment 2

ترکیب ترانس‌ژن‌ها Transgenes combination	آزمون ساقه ۱ Stem test[1]	آزمون برگ بریده ۲ Detatched leaf assay[2]	روش مایه‌زنی دمبرگ ۳ Petiol inoculation technique[3]
GN1×GN2	6.9a	4.41a	2.21a
GN1×GN3	4.1c	2.54b	3.67b
GN2×GN3	5.0b	3.13b	3.50b
شاهد (رقم غیر تراریخته Westar)	7.2a	4.12a	1.92a

۱ - قطر زخم روی ساقه (سانتی‌متر)؛ ۲- قطر زخم روی برگ (سانتی‌متر)؛ ۳- تعداد روزهای بعد از مایه‌زنی تا پژمردگی کامل گیاه.

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن هستند.

1. Stem lesion diameter (cm); 2. Leaf lesion diameter (cm); 3. Number of days to full wilt.

Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level according to Duncan`s multiple range test.

ساقه روشی مناسب برای بیماری‌سنجی پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه کلزا توصیه می‌شود. آزمون‌های PIT و DLA نیز از نظر سادگی اجرا و مدیریت قابل توصیه هستند و هر دو آزمون را می‌توان در فضای گلخانه‌ای کمتری به طور همزمان و روی همان گیاهان اجرا کرد یعنی برگ‌های جدا شده از گیاه را می‌توان برای DLA استفاده کرد و در عین حال، خود بوته را نیز با روش PIT مایه‌زنی کرد. این کار فرصتی را فراهم می‌کند که رفتار یک ژنوتیپ منفرد را در برابر هر دو آزمون به طور یک‌جا بررسی و همبستگی نتایج را محاسبه کرد. آزمون برگ جدا شده توسط محققین دیگر نیز پیشنهاد شده است (Fang, 1993). برخی محققین نیز مایه‌زنی پلاگ هیفی روی لپه‌های گیاهچه را پیشنهاد کرده‌اند که از نظر سادگی، سرعت و اقتصادی بودن، قابل توجه است (Wu *et al.*, 2001). همچنین گزارش شده که خصوصیات کلنی قارچ اسکروتینیا در محیط کشت PDA با طول زخم ساقه در مزرعه همبستگی دارد (Ge *et al.*, 2012). آن‌ها همچنین با توجه به اثر متقابل معنی‌دار بین جدایه قارچ و رقم کلزا، مجموعه‌ای از لاین‌های متمایز کننده بین جدایه‌های قارچ را پیشنهاد کردند. رحمانپور و همکاران (Rahmanpour *et al.*, 2011) کارایی سه روش مختلف بیماری‌سنجی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* را روی ارقام مختلف کلزا و گونه‌های خویشاوند آن بررسی کردند. روش‌های غربالگری مورد استفاده عبارت بودند از: مایه‌زنی دیسک برگی، مایه‌زنی میسیلیوم و اسید اگزالیک روی برگ‌های جدا نشده گیاه در شرایط آزمایشگاهی. آن‌ها گزارش کردند که روش مایه‌زنی دیسک برگی

نتوانست تمایزی بین ژنوتیپ‌ها ایجاد کند ولی دو روش دیگر، اختلافات معنی‌داری را بین ژنوتیپ‌ها نشان دادند و تأثیر اسید اگزالیک نیز مشابه تیمار میسیلیومی بود. این در حالی است که در تحقیق حاضر، روش مایه‌زنی دیسک برگی با وجود ضریب تنوع بالا هنوز قادر به تمایز بین ارقام حساس و مقاوم بود. رحمانپور و همکاران (۲۰۱۱) در بخشی از آزمایش‌ها زخم کردن برگ پیش از مایه‌زنی بیمارگر را انجام دادند که با توجه با مشاهدات در تحقیق حاضر و خاصیت تهاجمی بالای این بیمارگر به هیچ وجه توصیه نمی‌شود.

در تحقیق مشابهی زو و همکاران (Xu *et al.*, 2009) نشان دادند که سطح بیان ژن *BnEIN3* در کلزا در ارقام مقاوم به *Sclerotinia sclerotiorum* بالاتر از ارقام حساس است که مشابه نتایج در تحقیق حاضر است. ونگ و همکاران (۱۹۹۹) تأیید کردند که DRR206 و PR10.1 حساسیت رقم Westar کلزا به *Leptosphaeria maculans* و نیز قطر زخم ایجاد شده توسط *Sclerotinia sclerotiorum* را کاهش داد که مشابه نتایج تحقیق حاضر است. ونگ و فریستنسکی (Wang and Fristensky, 2001) در تحقیق دیگری به این نتیجه رسیدند که اگرچه گیاهان تراریخته دارای DRR206 به نظر می‌رسد که تا حدودی باعث کاهش سرعت گسترش نکروز قارچی در بافت برگ می‌شود اما گیاهان تراریخته حاوی DRR206 نمی‌توانند به عنوان مقاوم علیه Sclerotinia تلقی شوند بلکه بیماری را به تأخیر می‌اندازد. تحقیق حاضر نیز تأییدی بر اثر مثبت DRR206 در کاهش اثر بیمارگر مذکور بود.

ونگ و فریستنسکی (۲۰۰۱) همچنین نشان دادند که گیاهان کلزای تراریخته که ژن DRR206 را بیان می‌کنند پس از مایه‌زنی با جدایه‌های مهاجم PG3 و PG4 از قارچ *L. maculans* شدت کمتری از بیماری ساق سیاه را در مرحله بلوغ نشان می‌دهند. آن‌ها همچنین شدت کمتری از مرگ و میر گیاهچه در اثر بیمارگر بیوتروف ریشه یعنی *Rhizoctonia solani* مشاهده کردند و نهایتاً این که برگ‌های گیاهان تراریخته حاوی DRR206 که با قارچ نکروتروف *Sclerotinia sclerotiorum* مایه‌زنی شده بود زخم‌های کوچک‌تری در زمان ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی نشان دادند که منجر به تأخیر بیماری شد.

پپتیدهای ضد میکروبی غنی از سیستئین (Cysteine-rich antimicrobial peptides) که از گیاهان استخراج می‌شوند یک منبع بالقوه حفاظت از گیاهان علیه بیمارگرها به شمار می‌روند. نقش یک پپتید ضد میکروبی به نام *PmAMP1* را که از کاج سفید غربی (*Pinus monticola*) منشأ گرفته است در اعطای مقاومت به کلزا علیه قارچ‌های *Alternaria brassicae*، *Leptosphaeria maculans*، و

Sclerotinia sclerotiorum در کلزا تأیید شده است (Verma *et al.*, 2012). نتایج تحقیق حاضر نیز تأیید کننده این یافته‌ها بود چون PR10.1 که یک پپتید ضد میکروبی است سطح بالایی از مقاوت را اعطا کرد. در تحقیق دیگری مشابه تحقیق حاضر، ژن *scFv* نیز که تولید کننده یک آنتی‌بادی خاص بیمارگر است به کلزا در مقابل قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* تحمل بالاتری اعطا کرد (Yajima *et al.*, 2010). همچنین گزارش شده است که کلزای تراریخته که ژن *MPK4* را بیان می‌کند به طور قابل ملاحظه‌ای در برابر *Sclerotinia sclerotiorum* تحمل نشان می‌دهد (Wang *et al.*, 2009). در تحقیق دیگری همانند تحقیق حاضر نشان داده شد که انتقال ژن دیفنسین *Ovd* از گیاه *Orychophragmus violaceus* که از خانواده براسیکاسه است به کلزا مقاومت آن را علیه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* بالا می‌برد (Wu *et al.*, 2009). در این تحقیق نیز همانند آزمایش حاضر از روش برگ جدا شده برای غربالگری بیماری استفاده شد.

موفقیت استفاده از ژن‌های بیگانه چه از راه اصلاح نباتات کلاسیک (تلاقی دور و اینتروگرسیون) و چه از راه‌های مهندسی ژنتیک و ترانسفورماسیون به کرات به اثبات رسیده است ولی از سوی دیگر، پذیرش این گونه گیاهان به عنوان مواد غذایی هم از جانب مصرف‌کنندگان و هم از طرف سیاست‌گذاران سلامت غذایی جامعه باید مورد بررسی قرار گیرد.

در مجموع بر اساس تحقیق حاضر، نتایج آزمون‌های بیماری‌سنجی را می‌توان به شرح زیر خلاصه کرد که در آن ترکیب‌هایی که بیشترین کاهش شدت بیماری را داشتند معرفی شده‌اند. در آزمایش اول، ترانس‌ژن PR10.1 در رقم‌های Sentry و Apollo. در آزمایش دوم، تجمیع PR10.1 با DRR206. در مجموع، ثابت شد که ترانس‌ژن PR10.1 در بین ترانس‌ژن‌های سه‌گانه این تحقیق از نظر ارتقای مقاومت به بیماری بهترین گزینه است و DRR206 در رتبه بعدی واقع است. بنابراین، قابل توصیه است که این ژن به سایر ارقام کلزا و حتی سایر نباتات زراعی نیز وارد شود تا اثرهای مشابه احتمالی آن بررسی شود. اگرچه کارکرد دقیق این ژن و نیز دو ژن دیگر هنوز جای تحقیق و بررسی دارد، آن‌چه در تحقیق حاضر تأیید شد این است که PR10.1 قابلیت مقابله نسبی با بیماری‌های قارچی را دارد. همچنین تأیید شد که پس‌زمینه ژنتیکی یعنی رقم گیرنده یک عامل تعیین کننده این موضوع است که چقدر مقاومت بیشتری به رقم یا لاین گیرنده با ورود یک ژن جدید اعطا خواهد شد.

مراجعه به تحقیق‌های مشابه نشان می‌دهد که تلاش‌های زیادی برای بهره‌گیری از ژن‌های بیگانه در گیاهان زراعی علیه بیمارگرهای گیاهی انجام شده است. به‌نژادگران گیاهی به منظور انجام گزینش، همیشه به دنبال تنوع

هستند ولی اگر تنوع طبیعی در دسترس نباشد از دورگ‌گیری و جهش استفاده می‌شود. ژن‌های مقاومت به بیماری که از یک گونه گیاهی به گونه دیگر منتقل می‌شوند ممکن است مقاومتی را اعطا کنند که به طور طبیعی قبلاً در گیاه گیرنده یافت نشده است. استفاده از ژن‌های مقاومت به بیماری از سایر گونه‌ها به منظور اصلاح برای مقاومت در ارقام کلزا ممکن است راه مفیدی برای مبارزه با بیماری پوسیدگی ساقه باشد. بیان ژن‌های بیگانه که پپتیدهای ضد میکروبی را در گونه گیرنده کد می‌کنند یک استراتژی جایگزین برای مهندسی ژنتیک کلزا علیه بیمارگرهای قارچی است. این راهکار، به خصوص در مورد کنترل آن دسته از بیمارگرهای کلزا جذاب‌تر است که منابع طبیعی محدودی برای مقاومت علیه آن‌ها موجود است.

گام بعدی این تحقیق، می‌تواند حرکت در مسیر تجاری‌سازی مواد آزمایشی از طریق اجرای آزمایش‌های مناسب بیماری‌سنجی مزرعه‌ای باشد تاارزیابی شود که آیا لاین‌های برتر در آزمون‌های گلخانه‌ای بیماری‌سنجی می‌توانند به همان خوبی در شرایط مزرعه‌ای نیز عمل کنند یا خیر. سپس لاین‌های نویدبخش می‌توانند وارد فرآیندهای ثبت و تجاری‌سازی شوند البته به شرط این که قوانین و چهارچوب‌های کار با GMOها یا موجودات تغییر یافته ژنتیکی (Genetically Modified Organisms) اجازه این امر را بدهند.

سپاسگزاری

منابع مالی این تحقیق توسط وزارت علوم، فناوری و تحقیقات و نیز Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada تأمین شده که سپاسگزاری می‌شود.

References

Anonymous 2010. http://faostat.fao.org.

Fang, J. 1993. Evaluation of screening methodologies for selection of resistance in oilseed rape to sclerotinia stem rot. Available at http://amicus.collectionscanada.gc.ca/s4-bin/Main/ItemDisplay?l=0&l_ef_l=0&id=&v=1&lvl=2&coll=18&rt=1&itm=13902688&rsn=S_WWWtaafEDVkI&all=1&dt=+TW+%7Csclerotinia%7C+AND+UN+%7CManitoba%7C&spi=-&rp=2&v=1.

Garg, H., Atri, C., Sandhu, P.S., Kaur, B., Renton, M., Banga, S. K., Singh, H., Singh, C., Barbetti, M. J., and Banga, S. S. 2010. High level of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in introgression lines derived from hybridization between wild crucifers and the crop Brassica species *B. napus* and *B. juncea*. Field Crops

Research 117(1): 51–58Available at http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037842901000033X (verified 14 August 2012).

Ge, X. T., Li, Y. P., Wan, Z. J., You, M. P., Finnegan, P. M., Banga, S. S., Sandhu, P. S., Garg, H., Salisbury, P. A., and Barbetti, M. J. 2012. Delineation of *Sclerotinia sclerotiorum* pathotypes using differential resistance responses on *Brassica napus* and *B. juncea* genotypes enables identification of resistance to prevailing pathotypes. Field Crops Research 127: 248-258Available at http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378429011003893 (verified 17 August 2012).

Mei, J., Qian, L., Disi, J. O., Yang, X., Li, Q., Li, J., Frauen, M., Cai, D., and Qian, W. 2011. Identification of resistant sources against *Sclerotinia sclerotiorum* in Brassica species with emphasis on *B. oleracea*. Euphytica 177(3): 393–399Available at http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10681-010-0274-0 (verified 17 August 2012).

Rahmanpour, S., Backhouse, D., and Nonhebel, H. M. 2011. Reaction of Brassica species to *Sclerotinia sclerotiorum* applying inoculation techniques under controlled conditions. Crop Breeding Journal 1(2): 143–149.

Verma, S. S., Yajima, W. R., Rahman, M. H., Shah, S., Liu, J. J., Ekramoddoullah, A. K. M. and Kav, N. N. V. 2012. A cysteine-rich antimicrobial peptide from *Pinus monticola* (*Pm AMP1*) confers resistance to multiple fungal pathogens in canola (*Brassica napus*). Plant Molecular Bioloy 79 (1-2): 61-74 Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22351159 (verified 17 August 2012).

Wang, Y., and Fristensky, B. 2001. Transgenic canola lines expressing pea defense gene DRR206 have resistance to aggressive blackleg isolates and to *Rhizoctonia solani*. Molecular Breeding 2: 263-271.

Wang, Y., Nowak, G., Culley, D., Hadwiger, L. A., and Fristensky, B. 1999. Constitutive expression of pea defense gene DRR206 confers resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in transgenic canola (*Brassica napus*). Molecular Microbe Interaction.. 12(5): 410-418Available at http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/MPMI.1999.12.5.410.

Wang, Z., Mao, H., Dong, C., Ji, R., Cai, L., Fu, H., and Liu, S. 2009.

Overexpression of *Brassica napus MPK4* enhances resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape. Molecular Microbe Interaction. 22(3): 235-244Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19245318.

Wu, J., Fernando, W. G. D., and Scarth, R. 2001. Identification of disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in oilseed rape by greenhouse inoculation. p. 252-256. In: Proceedings of International Symposium on Rapeseed Science, Wuhan, China.

Wu, J., Wu, L., Liu, Z., Qian, L., Wang, M., Zhou, L., Yang, Y., and Li, X. 2009. A plant defensin gene from *Orychophragmus violaceus* can improve *Brassica napus*' resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. African Journal of Biotechnology 8 (22): 6101-6109.

Xu, L., Huang, J., Liu, X., Qin, R., and Liu, S. 2009. Cloning of *Brassica napus EIN3* gene and its expression induced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Agricultural Science and Technology 10(2): 33-36.

Yajima, W., Liang, Y., and Kav, N. N. V. 2009. Gene disruption of an arabinofuranosidase/β-xylosidase precursor decreases *Sclerotinia sclerotiorum* virulence on canola tissue. Molecular Plant-Microbe Interaction. 22(7): 783-789Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19522560.

Yajima, W., Verma, S. S., Shah, , Rahman, M. H., Liang, Y., and Kav, N. N. V. 2010. Expression of anti-sclerotinia scFv in transgenic *Brassica napus* enhances tolerance against stem rot. N. Biotechnol. 27(6): 816-821Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20933110 (verified 14 August 2012).

Yin, X., Yi, ., Chen, W., Zhang, W., Tu, J., Fernando, W. G. D., and Fu, T. 2010. Mapping of QTLs detected in a *Brassica napus* DH population for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in multiple environments. Euphytica 173(1): 25-35Available at http://www.springerlink.com/index/10.1007/s10681-009-0095-1 (verified 17 August 2012).

Zhang, Y., Hu, C., Zhang, C., and Gan, L. 2011. Cloning and expression analysis of *Rsk* in *Brassica napus* induced by *Sclerotinia sclerotiorum*. Acta Physiological Plantarum 33(4): 1277-1283Available at http://www.springerlink.com/index/10.1007/s11738-010-0658-8 (verified 18 August 2012).

Zhao, J., Peltier, A. J., Meng, J., Osborn, T. C., and Grau, C. R. 2004. Evaluation of

sclerotinia stem rot resistance in oilseed *Brassica napus* using a petiole inoculation technique under greenhouse Conditions. Plant Disease 88(9): 1033-1039Available at http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS.2004.88.9.1033.