

طراحی و ساخت سازه های بیانی گیاهی جهت انتقال ژنهای *chit 42* و *bgn13.1* قارچ تریکودرما به صورت منفرد و توأم

کسری اصفهانی، مصطفی مطلبی* و محمدرضا زمانی

تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۸۸/۷/۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۲۵

چکیده

قارچهای بیماریزا از جمله مهم‌ترین عوامل ایجاد خسارت در محصولات کشاورزی می‌باشند. یکی از روشهای مبارزه با بیماریهای قارچی استفاده از مهندسی ژنتیک برای انتقال ژنهای رمزکننده آنزیمهای هیدرولازی، خصوصاً کیتینازها و گلوکانازها به گیاهان زراعی است. قارچهای آنتاگونیست مانند تریکودرما، با تولید آنزیمهای هیدرولازی قدرتمند کیتیناز و گلوکاناز، اثر بازدارنده قابل توجهی بر رشد قارچهای بیماریزا داشته و آنزیمهای جدا شده از گونه های مختلف این قارچ، بسیار مؤثرتر از آنزیمهای جدا شده از منابع دیگر می‌باشند. در این تحقیق از ژنهای کیتیناز *chit42* و گلوکاناز *bgn13.1* به ترتیب جدا شده از قارچهای *Trichoderma atroviride* و *T. virens*، جهت ساخت سه سازه بیانی گیاهی شامل دو سازه تک ژنی کیتیناز (*pBIKE1*) و گلوکاناز (*pBIKE2*) و یک سازه واجد هر دو ژن مذکور تحت کنترل پرموتر *CaMV 35S* و ترمیناتور نوپالین سینتاز (*NOS*) جداگانه (*pBIKE3*) استفاده شده است. همچنین در طی مراحل ساخت این سازه‌ها، ناقلی با نام *pBI121^{GUS-}* مبتنی بر ناقل *pBI121* طراحی و ساخته شد که فاقد ژن *gus* بوده و ضمن داشتن کاست کامل بیانی ژن مقاومت به کانامایسین، دارای دو جایگاه آنزیمهای برشی *XbaI* و *BamHI* برای همسانه‌سازی ژنهای مورد نظر بین پرموتر *CaMV 35S* و ترمیناتور *NOS* می‌باشد. از سازه‌های ساخته شده در این تحقیق می‌توان برای پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان مدل و زراعی برای بررسی اثرات این ژنها و تولید گیاهان تراریخته مقاوم برابر قارچها استفاده کرد. همچنین می‌توان با انتقال همزمان سازه‌های تک ژنی یا سازه واجد هر دو ژن، روشهای مختلف انتقال توأم دو ژن را با هم مقایسه و بررسی کرد.

واژه های کلیدی: سازه بیانی گیاهی، کیتیناز، گلوکاناز، تریکودرما، بیماریهای قارچی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۳۶۳، پست الکترونیکی: motalebi@nigeb.ac.ir

مقدمه

تولید گیاهان تراریخته‌ای که به صورت زوددهنگام، میزان بالایی از پروتئینهای ضد قارچ را بیان نمایند، راهبرد مناسبی جهت مبارزه با بیماریهای قارچی می‌باشد.

گسترده ترین پژوهش های صورت گرفته در بخش مبارزه با بیماری‌های قارچی با استفاده از فنون مهندسی ژنتیک، افزایش بیان آنزیم‌های هیدرولازی، خصوصاً کیتینازها و گلوکانازها در گیاهان بوده است (۵، ۷، ۲۰، ۲۵، ۲۷، ۳۰).

سالانه بخش عمده‌ای از محصولات کشاورزی بر اثر آفات و بیماریهای گیاهی از بین می‌روند و در این بین قارچها از جمله مهم‌ترین عوامل بیماریزا می‌باشند. روشهای مرسوم استفاده از قارچ‌کشها در کشاورزی باعث آلودگی محیط زیست و افزایش هزینه‌های عملیات کشاورزی می‌شوند. برای جلوگیری از آلودگی محیط زیست و کاهش عملیات کشاورزی، فنون مهندسی ژنتیک از سالها قبل برای تولید گیاهان مقاوم به بیماریهای قارچی استفاده شده‌اند.

مواد و روشها

باکتری و ناقلهای مورد استفاده: در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه DH5 α استفاده گردید.

سازه‌های مورد استفاده در این تحقیق شامل pMJH1 واجد cDNA ژن *chit42* با منشاء قارچ *T. atroviride* (۳۲) و سازه pUCSO2 واجد cDNA ژن *bgn13.1* با منشاء قارچ *T. virens* (۳۱) می‌باشد. همچنین از ناقل pBI121 واجد ژن *gus* و نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین و نیز ناقل pRTL استفاده گردید.

آنزیم و محلولهای مورد نیاز برای واکنش PCR از شرکت سیناژن و سایر آنزیمها از شرکت فرمنتاس تهیه گردید. تهیه باکتریهای مستعد، واکنش اتصال و انتقال محصول به باکتریهای مستعد، استخراج DNA پلاسمیدی و هضم آنزیمی طبق دستورالعمل Sambrook و Russell (۳۴) انجام شد.

ساخت سازه بیانی pBIKE1: cDNA ژن *chit42* که در ناقل پلاسمیدی pMJH1 همسانه سازی شده بود (۳۲) با واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Pfl و CHIT42_RSsm (جدول ۱) و شرایط ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۸۰ ثانیه و نهایتاً ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد با آنزیم *Pfu* پلیمرز (شرکت فرمنتاس) تکثیر شد.

محصول PCR با آنزیمهای *XbaI* و *SmaI* هضم شد به طوری که یک انتهای غیر صاف حاصل از برش آنزیم *XbaI* و یک انتهای صاف حاصل از برش آنزیم *SmaI* در قطعه cDNA ژن *chit42* به طول ۱۲۷۵ جفت باز ایجاد گردید. ناقل pBI121 نیز با آنزیمهای *XbaI* و *Ecl136II* (ایزوشیزومر *SacI* که جایگاه تشخیص مشابه آنزیم *SacI* را شناسایی ولی آن را به صورت صاف برش می دهد)

این آنزیمها فعالیت ضد قارچی مناسبی را در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان می‌دهند (۱، ۳، ۴۰).

قارچهای آنتاگونیست مانند تریکودرما، با تولید آنزیمهای هیدرولازی قوی، اثر بازدارنده مطلوبی بر رشد طیف وسیعی از قارچهای بیماری‌زا دارند. ژنهای کیتیناز قارچ تریکودرما آنزیمهای کیتینولایتیکی را بیان می‌کنند که فعالیت ضد قارچی آنها در حد قارچ‌کشهای شیمیایی گزارش شده است و تاکنون هیچ پاتوژن کیتینی در شرایط *in vitro* نتوانسته است در برابر این آنزیمها مقاومت کند (۲۳).

استفاده از این ژنها در پروژه‌های انتقال ژن به گیاهان زراعی، باعث ایجاد مقاومت بسیار بالایی در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای قارچی شده است (۳۶) و (۳۸).

گرچه برخی ژنهای رمز کننده آنزیمهای هیدرولازی قارچ تریکودرما مثل ژن *chit42* که یک کیتیناز را رمز می‌کند، قادرند به تنهایی مقاومت بالایی در برابر عوامل بیماری‌زا ایجاد نمایند (۱۰، ۱۲، ۲۳، ۳۷) اما فعالیت ضد قارچی این آنزیمها در صورتی که با ژنهای دیگری نظیر گلوکانازها استفاده شوند، هم‌افزایی مثبت داشته و تاثیر ضد قارچی یکدیگر را افزایش می‌دهند (۱۴، ۱۶، ۲۳، ۲۵، ۲۹، ۳۳) و (۳۷).

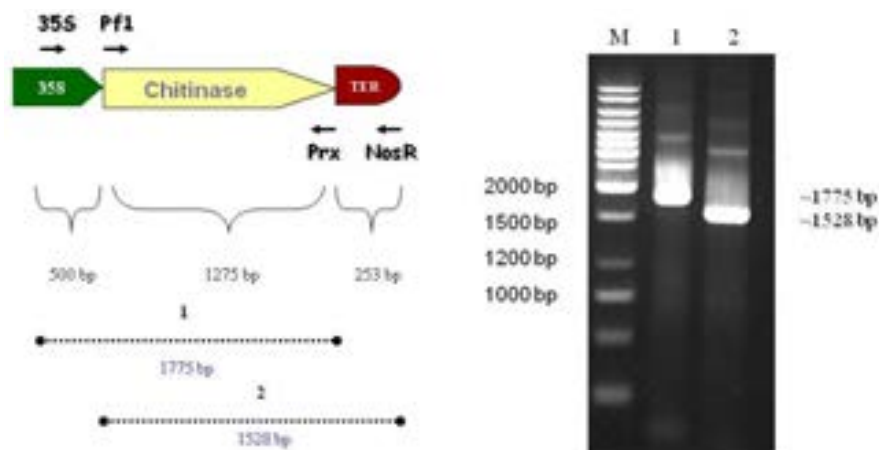
در این تحقیق از ژنهای کیتیناز (*chit42*) و گلوکاناز (*bgn13.1*) بترتیب جدا شده از قارچهای *Trichoderma atroviride* و *T. virens*، جهت ساخت سه سازه بیانی گیاهی شامل دو سازه تک ژنی واجد ژن کیتیناز یا ژن گلوکاناز و یک سازه واجد هر دو ژن مذکور تحت کنترل پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور نوپالین سینتاز (*NOS*) به صورت جداگانه استفاده شده است. این ژنها به صورت منفرد یا توأم می‌توانند به گیاهان مختلف منتقل شده تا میزان مقاومت گیاهان تراریخته را در مقابل قارچهای بیماری‌زای گیاهی افزایش دهند.

واکنش اتصال، محصول به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5 α با استفاده از شوک حرارتی منتقل شد. پس از کشت باکتریها بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان نشانگر انتخابی، کلنی‌های مختلف جهت تأیید ساخت سازه واجد cDNA ژن *chit42* با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی مورد بررسی قرار گرفتند.

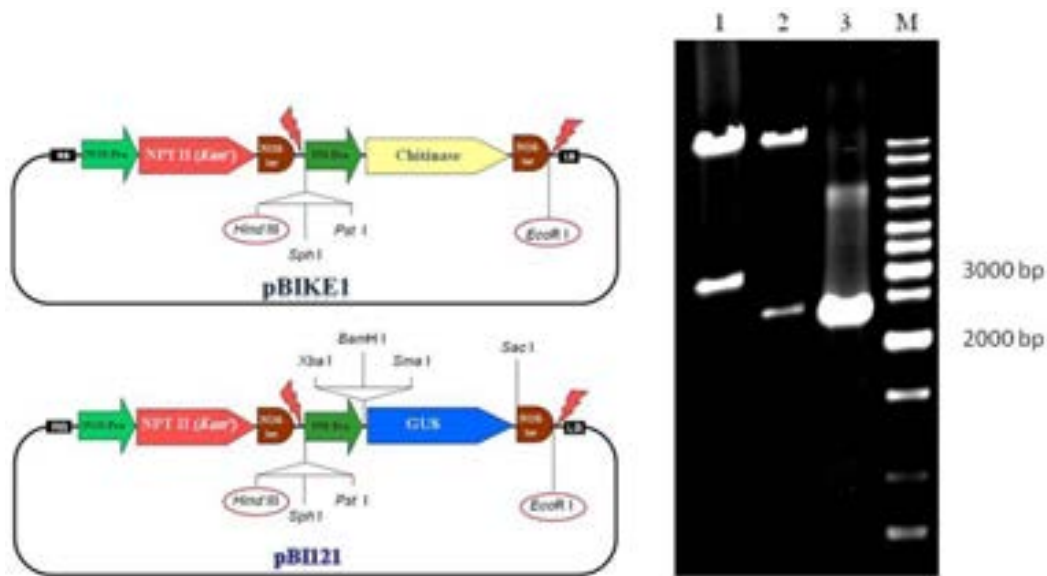
هضم شد و ژن *gus* از ناقل جدا گردید به طوری که در بدنه ناقل، بعد از پروموتور یک انتهای غیر صاف حاصل از برش *XbaI* و قبل از ترمیناتور نیز یک انتهای صاف حاصل از برش *EclI36II* ایجاد شد. پس از هضم آنزیمی، هر دو قطعه (محصول PCR مربوط به cDNA ژن *chit42* با آغازگرهای ذکر شده و بدنه ناقل pBI121) روی ژل آگارز یک درصد جداسازی و خالص سازی شدند. پس از

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

نام آغازگر	توالی
35S	5'-GGCGAACAGTTCATACAGAGTCT-3'
NOS-TER	5'-GTGAAGCTTCCCAGTCTAGTAACAT-3'
Fbgn13.1 (F)	5'-GCTCTAGAATGTTGAAGCTCACGGCGC-3'
Rbgn13.1 (R)	5'-GCTCTAGATTAAGTAGTATAACGGCAACG-3'
F2	5'-AGAGCTTCTTTCGCCGTAGCTATTAAG-3'
R2	5'-CTGAAGTCTCAGCGATGTGATCCG-3'
pF1	5'-GCTCTAGAATGTTGGGTTTCCCTCGGAAAG-3'
Prx	5'-GCTCTAGACTAGTTGAGACCGCTTCGGAT-3'
R3	5'-CGCTCCGTTGATATAAGCC-3'
Chs5	5'-GGAAGACAACATGTCTCCTGTAAGTCAAACG-3'
GUSF (GF)	5'-GGTGGTCAGTCCCTTATGTTACG-3'
GUSR (GR)	5'-CCGTCATAGTTAAAGAAATCATG-3'
CHIT42_RSsm	5'-TCCCCCGGGCTAGTTGAGACCGCTTCGG-3'
FE35S	5'-CGGAATTTCGCATGCCTGCAGGTCCCCAG-3'
RENOS	5'-CCAGTGAATCCCAGTCTAGTAAC-3'



شکل ۱- تأیید سازه pBIKE1 واجد ژن *chit42* توسط الگوی PCR؛ با توجه به جهت مورد نظر برای ورود ژن، جایگاه اتصال آغازگرها و همچنین اندازه قطعات مورد انتظار در واکنش PCR در شکل شماتیک سازه pBIKE1 نشان داده شده است. (۱) محصول PCR ناقل نوترکیب pBIKE1 واجد ژن *chit42* با آغازگرهای 35S و Prx و مشاهده قطعه ۱۷۷۵ جفت بازی مورد انتظار؛ (۲) محصول PCR ناقل نوترکیب pBIKE1 واجد ژن *chit42* با آغازگرهای Pf1 و Nos R و مشاهده قطعه ۱۵۲۸ جفت بازی مورد انتظار؛ (M) مارکر Ladder Mix.



شکل ۲- تأیید سازه pBIKE1 واجد ژن *chit42* با الگوی هضم آنزیمی؛ جایگاه شناسایی آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* در سازه های pBI121 و pBIKE1 در شکل شماتیک نشان داده شده است.

(۱) هضم ناقل pBI121 با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* و خروج کاست ۲۹۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *gus* به همراه پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور (*NOS*) هضم ناقل نو ترکیب pBIKE1 با آنزیم های *HindIII* و *EcoRI* و خروج کاست ۲۴۰۰ جفت بازی مربوط به ژن *chit42* به همراه پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور (*NOS*) محصول PCR ناقل نو ترکیب pBIKE1 با آغازگر های ابتدای پروموتور *CaMV 35S* (FE35S) و انتهای ترمیناتور (*NOS*) (RENOS) و تکثیر قطعه به ژن *chit42* و پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور *NOS* برای مقایسه با قطعه خارج شده از ناقل نو ترکیب pBIKE1 (M) مارکر Ladder Mix

ساخت سازه $pBI121^{GUS-}$ به منظور حذف ژن *gus* از ناقل pBI121 ابتدا ناقل مذکور با آنزیم های *Ecl136II* و *SmaI* به ترتیب در پایین دست و بالادست ژن *gus* برش داده شد تا ژن *gus* از بدنه ناقل جدا شود. قطعه DNA حاوی بدنه ناقل از روی ژل آگارز خالص شده و دو انتهای صاف حاصل از برش آنزیمهای مذکور به وسیله آنزیم لیگاز مجدداً متصل گردیدند. پس از انتقال محصول واکنش اتصال به باکتریهای مستعد و کشت باکتریها بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، DNA پلاسمیدی از آنها به منظور تأیید ساخت ناقل $pBI121^{GUS-}$ با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی استخراج گردید

ساخت سازه بیانی $pBIKE2$: cDNA ژن *bgn13.1* که در سازه pUCSO2 همسانه سازی شده بود (۳۱)، با واکنش PCR با استفاده از دو آغازگر اختصاصی Rbgn13.1 و Fbgn13.1 (جدول ۱) و شرایط ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه، ۳۲ چرخه ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۶۰ ثانیه، ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۸۰ ثانیه و نهایتاً ۱۰ دقیقه ۷۲ درجه سانتی گراد با آنزیم *Pfu* پلیمرز تکثیر شد. محصول PCR با آنزیم *XbaI* هضم شد و قطعه مورد نظر به طول ۲۲۸۶ جفت باز از روی ژل آگارز یک درصد خالص سازی گردید. ناقل $pBI121^{GUS-}$ نیز با آنزیم *XbaI* هضم شده و از روی ژل آگارز یک درصد خالص سازی شد. پس از انجام واکنش اتصال، محصول به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5 α با استفاده از شوک حرارتی منتقل و باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. کلنی های حاصل پس از استخراج پلاسمید با استفاده از الگوی PCR و هضم

ساخت سازه $pBI121^{GUS-}$ به منظور حذف ژن *gus* از ناقل pBI121 ابتدا ناقل مذکور با آنزیم های *Ecl136II* و *SmaI* به ترتیب در پایین دست و بالادست ژن *gus* برش داده شد تا ژن *gus* از بدنه ناقل جدا شود. قطعه DNA حاوی بدنه ناقل از روی ژل آگارز خالص شده و دو انتهای صاف حاصل از برش آنزیمهای مذکور به وسیله آنزیم لیگاز مجدداً متصل گردیدند. پس از انتقال محصول واکنش اتصال به باکتریهای مستعد و کشت باکتریها بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، DNA پلاسمیدی از آنها به منظور تأیید ساخت ناقل $pBI121^{GUS-}$ با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی استخراج گردید

ساخت سازه بیانی $pBIKE2$: cDNA ژن *bgn13.1* که در سازه pUCSO2 همسانه سازی شده بود (۳۱)، با واکنش PCR با استفاده از دو آغازگر اختصاصی

باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. کلنی‌های حاصل پس از استخراج پلاسمید با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی به منظور تأیید ساخت سازه و نیز تعیین جهت ورود کاست ژن *bgn13.1* مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج

ساخت سازه بیانی pBIKE1: برای همسانه سازی cDNA ژن *chit42* محصول PCR این ژن پس از هضم با آنزیم-های *XbaI* و *SmaI* در ناقل pBI121 هضم شده با آنزیم-های *XbaI* و *Ecl136II* وارد شد. نتایج حاصل از الگوی PCR (شکل ۱) و همچنین الگوی هضم آنزیمی (شکل ۲) سازه مورد بررسی را تأیید نمود و این سازه به نام pBIKE1 نامگذاری گردید. سازه ساخته شده واجد کاست کامل پروموتور *CaMV 35S*، cDNA ژن *chit42* و ترمیناتور *NOS* به همراه کاست کامل ژن مقاومت به کانامایسین در گیاه بوده و برای انتقال ژن رمز کننده آنزیم کیتیناز به گیاهان مختلف جهت ایجاد مقاومت در برابر قارچهای بیماریزا مناسب می باشد.

ساخت سازه بیانی pBIKE2: جهت ساخت سازه واجد cDNA ژن *bgn13.1* نیز از راهبرد مورد استفاده در ساخت سازه pBIKE1 استفاده گردید. علی رغم چند بار تکرار، همسانه سازی cDNA ژن *bgn13.1* در ناقل pBI121 امکان پذیر نبود. لذا برای ساخت این سازه، راهبرد دیگری در نظر گرفته شد. بدین منظور، ابتدا با حذف ژن *gus* از ناقل pBI121، ناقلی موسوم به pBI121^{GUS-} (بدون GUS) ساخته شد. بدین منظور آنزیم *Ecl136II* که جایگاه تشخیص مشابه آنزیم *SacI* (در پایین دست ژن *gus*) را شناسایی ولی آن را به صورت صاف می‌برد، انتخاب شد. پلاسمید pBI121 با آنزیمهای *Ecl136II* و *SmaI* هضم شده و پس از خالص سازی بدنه ناقل از روی ژل آگارز، دو انتهای صاف حاصل از برش آنزیمهای مذکور به وسیله

آنزیمی به منظور تأیید ساخت سازه و نیز تعیین جهت cDNA ژن *bgn13.1* در سازه مورد بررسی قرار گرفت.

ساخت سازه pRTLKE2: cDNA ژن *bgn13.1* موجود در سازه pBIKE2 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Rbgn13.1* و *Fbgn13.1* با آنزیم *Pfu* پلیمرز تکثیر شده و پس از هضم با آنزیم *XbaI* و جداسازی از روی ژل آگارز، خالص سازی گردید. ناقل pRTL نیز با آنزیم *XbaI* هضم و سپس برای جلوگیری از خود الحاقی (Self-ligation) از آنزیم آلکالاین فسفاتاز استفاده شد. پس از انجام واکنش اتصال، محصول به سلولهای مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α با استفاده از شوک حرارتی منتقل و باکتریهای تراریخت بر روی محیط LB حاوی کانامایسین با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به عنوان نشانگر انتخابی رشد داده شدند. کلنی‌های حاصل پس از استخراج پلاسمید با استفاده از الگوی PCR و هضم آنزیمی به منظور تأیید ساخت سازه و نیز تعیین جهت cDNA ژن *bgn13.1* در سازه مورد بررسی قرار گرفتند.

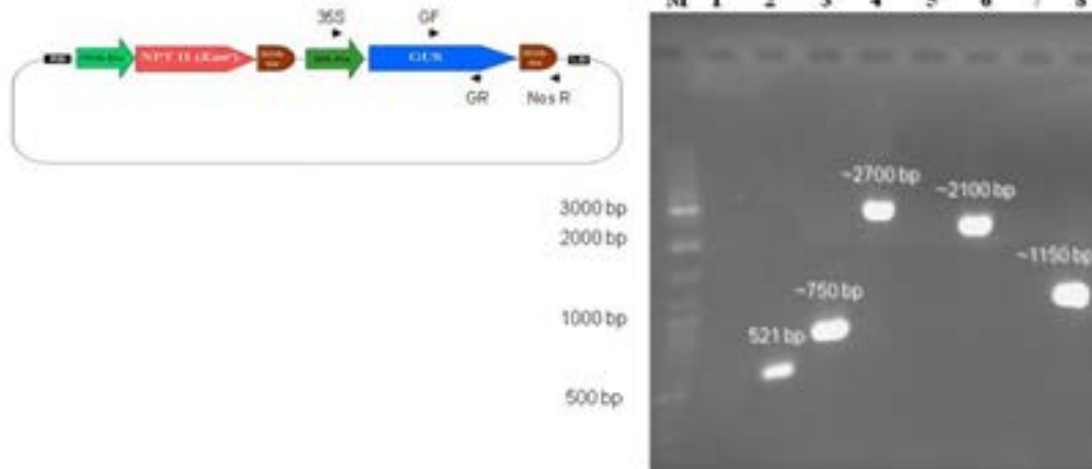
ساخت سازه بیانی pBIKE3: به منظور همسانه سازی کاست بیانی ژن *bgn13.1* در بالادست ژن *chit42* در سازه pBIKE1 با توجه به وجود جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* در بالادست پروموتور و پایین دست ترمیناتور سازه pRTLKE2، این سازه با آنزیم *HindIII* برش خورده و کاست کامل واجد پروموتور، cDNA ژن *bgn13.1* و ترمیناتور از روی ژل جداسازی شد. از طرف دیگر سازه pBIKE1 واجد کاست بیانی cDNA ژن *chit42* نیز با آنزیم *HindIII* هضم شد تا کاست ژن *bgn13.1* در تنها جایگاه *HindIII* سازه pBIKE1 همسانه سازی گردد. به دلیل هضم تک آنزیمی برای جلوگیری از خود الحاقی فسفرزدایی با استفاده از آنزیم آلکالاین فسفاتاز انجام شد. پس از انجام واکنش اتصال، محصول به سلول های مستعد باکتری *E. coli* سویه DH5α منتقل شد.

نیز جهت ورود cDNA ژن *bgn13.1* به سازه مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج حاصل از الگوی PCR (شکل ۵) و همچنین الگوی هضم آنزیمی (شکل ۶) ساخت سازه مورد بررسی را تأیید نمود.

سازه ساخته شده واجد کاست کامل پروموتور *CaMV 35S*، cDNA ژن *bgn13.1* و ترمیناتور *NOS* به همراه کاست کامل ژن مقاومت به کانامایسین بوده و برای انتقال ژن رمز کننده آنزیم گلوکاناز به گیاهان مختلف جهت ایجاد مقاومت در برابر قارچهای بیماریزا مناسب می باشد. این سازه بیانی به نام pBIKE2 نامگذاری گردید.

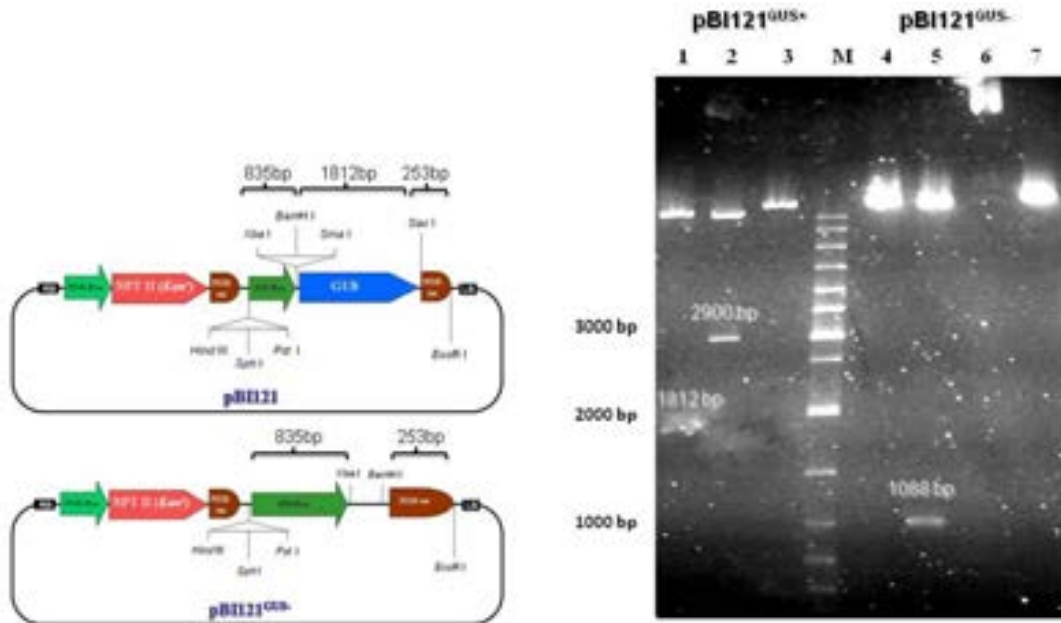
آنزیم لیگاز مجدداً متصل گردیدند. نتایج حاصل از PCR با آغازگرهای مختلف (شکل ۳) و الگوی هضم آنزیمی با استفاده از آنزیمهای برشی مختلف (شکل ۴) صحت ساخت ناقل $pBI121^{GUS-}$ را تأیید نمود.

برای همسانه سازی cDNA ژن *bgn13.1* در $pBI121^{GUS-}$ محصول PCR این ژن (با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *Rbgn13.1* و *Fbgn13.1*) و ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم *XbaI* هضم شده و ژن مذکور در جایگاه شناسایی این آنزیم در ناقل $pBI121^{GUS-}$ وارد گردید. به دلیل هضم تک آنزیمی، پس از کشت باکتریها بر روی محیط LB حاوی کانامایسین، کلنیهای مختلف جهت تأیید ساخت سازه و



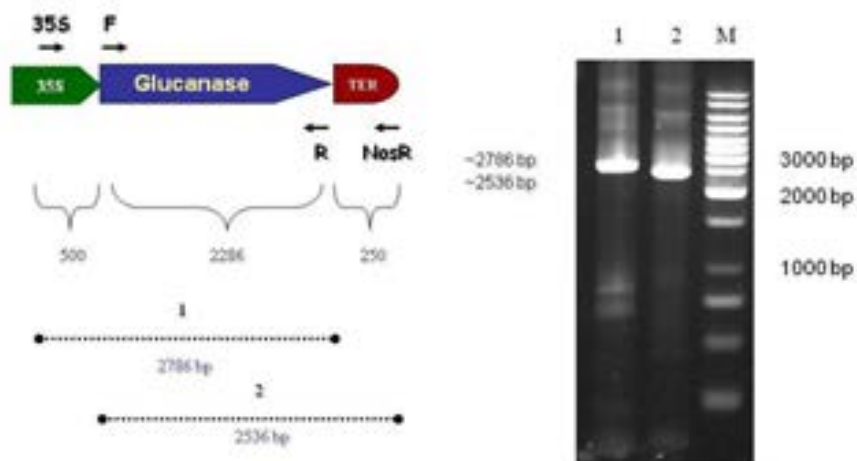
شکل ۳- تأیید ناقل $pBI121^{GUS-}$ با استفاده از الگوی PCR؛ جایگاه اتصال آغازگرهای مورد استفاده در شکل شماتیک ناقل $pBI121$ نشان داده شده است.

(۱) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (GF/GR)؛ مشاهده هیچ بانندی مورد انتظار نیست؛ (۲) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای اختصاصی ژن *gus* (GF/GR)؛ تکثیر قطعه ۵۲۱ جفت بازی؛ (۳) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور *NOS* (35S/Nos R)؛ مشاهده قطعه حدوداً ۷۵۰ جفت بازی مورد انتظار (به علت حذف ژن *gus*)؛ (۴) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای پروموتور *CaMV 35S* و ترمیناتور *NOS* (35S/Nos R)؛ مشاهده قطعه حدوداً ۲۷۰۰ جفت بازی مورد انتظار (با حضور ژن *gus*)؛ (۵) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای پروموتور *CaMV 35S* و ژن *gus* (35S/GR)؛ مشاهده هیچ بانندی مورد انتظار نیست؛ (۶) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای پروموتور *CaMV 35S* و ژن *gus* (35S/GR)؛ مشاهده باند ۲۱۰۰ جفت بازی؛ (۷) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای ترمیناتور *NOS* و ژن *gus* (GF/Nos R)؛ مشاهده هیچ بانندی مورد انتظار نیست؛ (۸) محصول PCR ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آغازگرهای ترمیناتور *NOS* و ژن *gus* (GF/Nos R)؛ مشاهده باند ۱۱۵۰ جفت بازی؛ (M) مارکر Ladder Mix.

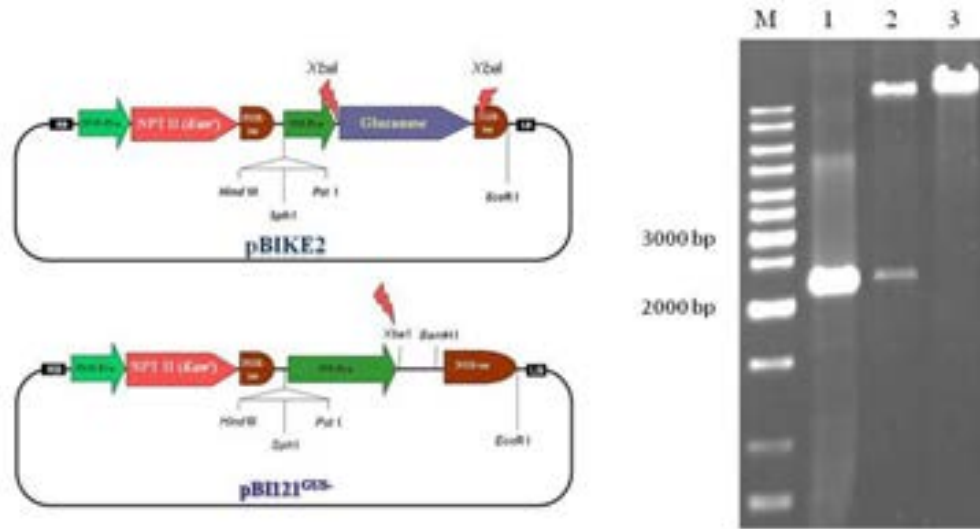


شکل ۴- نتایج الگوی هضم آنزیمی ناقل جدید $pBI121^{GUS-}$ در مقایسه با ناقل $pBI121$ ؛ جایگاه اثر هضم آنزیمها در شکل شماتیک ناقلها $pBI121$ و $pBI121^{GUS-}$ نشان داده شده است.

(۱) هضم ناقل $pBI121$ با آنزیمهای $XbaI$ و $SacI$ و خروج قطعه ۱۸۱۲ جفت بازی مربوط به ژن gus (۲) هضم ناقل $pBI121$ با آنزیمهای $HindIII$ و $EcoRI$ و خروج کاست ۲۹۰۰ جفت بازی مربوط به ژن gus و پروموتور $CaMV 35S$ و ترمیناتور NOS ؛ (۳) هضم ناقل $pBI121$ با آنزیم $HindIII$ (پلاسمید صرفاً خطی شده و قطعه ای خارج نمی شود)؛ (۴) هضم ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم های $XbaI$ و $SacI$ (پلاسمید صرفاً خطی شده و قطعه ای خارج نمی شود)؛ (۵) هضم ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم های $HindIII$ و $EcoRI$ و خروج قطعه ۱۰۸۸ جفت بازی شامل پروموتور $CaMV 35S$ و ترمیناتور NOS ؛ (۶) هضم ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم $SacI$ (جایگاه شناسایی این ناقل جدید از بین رفته و بنابراین هضم آنزیمی صورت نمی گیرد)؛ (۷) هضم ناقل $pBI121^{GUS-}$ با آنزیم $XbaI$ (پلاسمید صرفاً خطی شده و قطعه ای خارج نمی شود)؛ (M) مارکر 1 Kb Ladder.

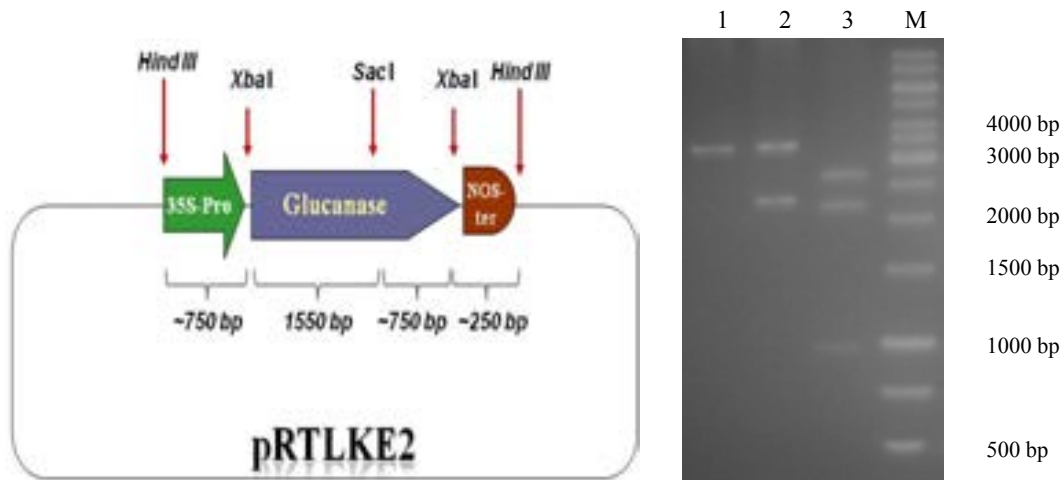


شکل ۵- تأیید سازه $pBIKE2$ و اجد ژن $bgn13.1$ با الگوی PCR؛ جایگاه اتصال آغازگرها و همچنین اندازه قطعات مورد انتظار در واکنش PCR در شکل شماتیک سازه $pBIKE2$ نشان داده شده است. (۱) محصول PCR ناقل نو ترکیب $pBIKE2$ و اجد ژن $bgn13.1$ با آغازگر های 35S و R (Rbgn 13.1) و مشاهده قطعه ۲۷۸۶ جفت بازی مورد انتظار؛ (۲) محصول PCR ناقل نو ترکیب $pBIKE2$ با آغازگرهای F (Fbgn 13.1) و Nos R و مشاهده قطعه ۲۵۳۶ جفت بازی مورد انتظار؛ (M) مارکر 1 Kb Ladder.



شکل ۶- تأیید سازه pBIKE2 واجد ژن *bgn13.1* با الگوی هضم آنزیمی؛ جایگاه اثر هضم آنزیم *XbaI* در شکل شماتیک ناقله‌های pBIKE2 و pBI121^{GUS} نشان داده شده است.

(۱) محصول PCR ناقل نو ترکیب pBIKE2 با آغازگر های اختصاصی ژن *bgn13.1* و تکثیر قطعه ۲۲۸۶ جفت بازی مربوط به ژن *bgn13.1* برای مقایسه با قطعه خارج شده از ناقل نو ترکیب pBIKE2؛ (۲) هضم ناقل نو ترکیب pBIKE2 با آنزیم *XbaI* و خروج قطعه ۲۲۸۶ جفت بازی مربوط به ژن *bgn13.1*؛ (۳) هضم ناقل pBI121^{GUS} با آنزیم *XbaI*؛ (M) مارکر 1 Kb Ladder.



شکل ۷- تأیید سازه pRTLKE2 واجد ژن *bgn13.1* با استفاده از الگوی هضم آنزیمی؛ جایگاه اثر هضم آنزیم‌ها در سازه pRTLKE2 و اندازه قطعات مورد انتظار حاصل از هضم در شکل شماتیک نشان داده شده است.

(ب) نتایج بررسی حضور قطعه ژن و جهت صحیح ورود آن با استفاده از الگوی هضم آنزیمی با آنزیم های *XbaI* و *HindIII/SacI*؛ (۱) ناقل خطی شده pRTLKE2؛ (۲) هضم آنزیمی ناقل pRTLKE2 با آنزیم *XbaI* و خروج قطعه ۲۲۸۶ جفت بازی ژن *bgn13.1*؛ (۳) هضم آنزیمی ناقل pRTLKE2 با آنزیم های *HindIII* و *SacI* به طور همزمان و دو قطعه ۱۰۰۰ و ۲۳۰۰ جفت بازی از بدنه ناقل؛ (M) مارکر 1 Kb Ladder.

هم جهت به همراه کاست کامل ژن مقاومت به کاناماسین قرار گرفته اند.

با توجه به قدرت بالای ژنهای رمز کننده آنزیم های هیدرولازی با منشا قارچ تریکودرما که در این ناقل قرار گرفته اند و همچنین اثر هم افزایی آنها با یکدیگر، ناقل بیانی pBIKE3 می تواند گزینه مناسبی برای انتقال به گیاهان زراعی جهت ایجاد مقاومت برابر اکثر بیماریهای قارچی باشد.

بحث

علی رغم آن که جداسازی ژنهای کیتینازی و گلوکانازی از باکتری و گیاهان مختلف مانند جو، برنج، نخود و لوبیا و انتقال آنها به تنهایی یا به صورت انتقال توأم به گیاهان مانند سیب زمینی، برنج، پنبه و توتون به منظور ایجاد مقاومت در برابر بیماریهای قارچی صورت گرفته است (۵، ۲۶ و ۲۷) ولی معمولاً منجر به ایجاد مقاومت در برابر طیف وسیع بیماریهای قارچی در گیاهان تراریخته نشده اند (۱۰، ۱۷، ۲۶، ۲۷ و ۲۸).

از لحاظ فعالیت ضد قارچی، آنزیمهای تخریب کننده دیواره سلولی قارچهای آنتاگونیست مثل تریکودرما بسیار قوی تر از آنزیمهای مشابه با منشا گیاهی هستند. آنزیمهای هیدرولازی خالص شده از *T. harzianum* بازدارنده قوی بسیاری از قارچهای بیماریزای گیاهی بوده و قادرند ساختارهای شکننده ای مثل نوک هیف تا ساختارهای محکم تری مانند دیواره کیتینی هیفهای بالغ، کنیدی، کلامیدوسپور و اسکروتیا را تخریب نمایند. این آنزیمهای تخلیص شده که منشا قارچی دارند، گاهی تا ۱۰۰ برابر آنزیمهای تخلیص شده از منابع دیگر مثل آنزیمهای گیاهی فعالیت ضد قارچی داشته و بر علیه طیف وسیع تری از گونه های بیماریزا عمل می کنند (۴، ۱۵، ۱۹، ۲۱، ۲۳). به نظر می رسد ایجاد گیاهان تراریخته با استفاده از این آنزیمهای قارچی، سطح تحمل بالاتری در گیاهان زراعی بر

ساخت سازه بیانی pBIKE3: برای ساخت سازه دو ژنی واجد cDNA ژن های *chit42* و *bgn13.1* به همراه پروموتورها و ترمیناتورهای مربوط به هر یک از آنها، با توجه به عدم حصول نتیجه از راهبرد انتقال مستقیم بوسیله تکثیر کاست واجد هر یک از ژنها با PCR و انتقال این کاست کامل به سازه واجد کاست ژن دیگر، از راهبرد دیگری استفاده گردید. بدین منظور ناقل حدواسط pRTL مورد بهره برداری قرار گرفت و ژن *bgn13.1* در جایگاه شناسایی آنزیم *XbaI* بلافاصله بعد از پروموتر *CaMV 35S* و قبل از ترمیناتور *NOS* این ناقل همسانه سازی شد. با توجه به هضم تک آنزیمی همسانه سازی ژن مذکور، آنالیز حضور قطعه ژن در محل مورد نظر و جهت صحیح ورود آن با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیمهای *XbaI* و *HindIII/SacI* (شکل ۷) و الگوی PCR با آغازگرهای مختلف انجام شد (شکل ۸). نتایج حاصل، همسانه سازی ژن را در جهت صحیح تأیید نمود. این سازه پس از تأیید به نام pRTLKE2 نامگذاری گردید.

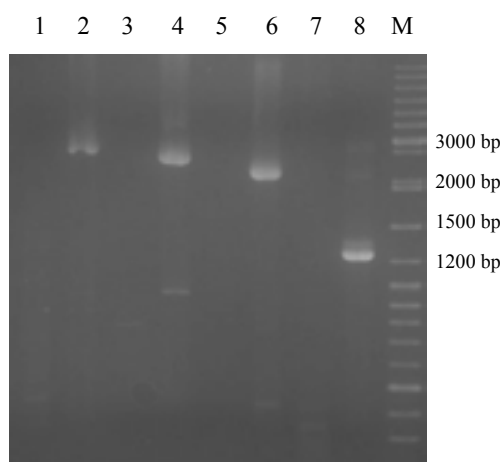
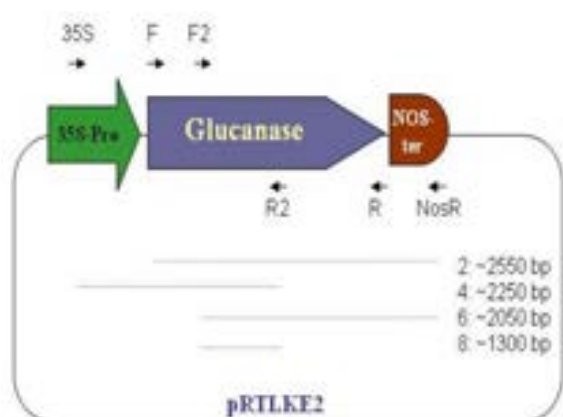
با توجه به تأیید سازه pRTLKE2 (واجد کاست کامل پروموتر *CaMV 35S*، cDNA ژن *bgn13.1* و ترمیناتور *NOS*)، ناقل pRTLKE2 با آنزیم *HindIII* هضم شد و کاست کامل ژن *bgn13.1* در جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* ناقل بیانی pBIKE1 در بالادست پروموتر کاست ژن *chit42* همسانه سازی شد.

نتایج به دست آمده از الگوی PCR با استفاده از آغازگرهای مختلف نشان داد که همسانه سازی کاست کامل پروموتر *CaMV 35S*، cDNA ژن *bgn13.1* و ترمیناتور *NOS* از ناقل pRTLKE2 در جایگاه *HindIII* ناقل pBIKE1 صورت گرفته است (شکل ۹) و سازه تأیید شده به نام pBIKE3 نامگذاری گردید.

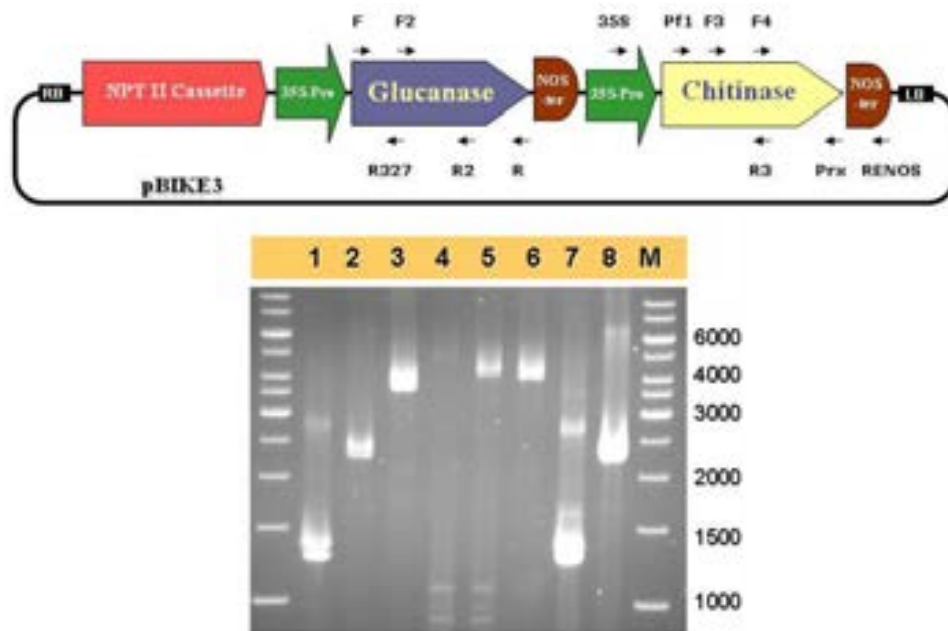
در این سازه، کاست کامل پروموتر *CaMV 35S*، cDNA ژن *bgn13.1* و ترمیناتور *NOS* و کاست کامل پروموتر *CaMV 35S*، cDNA ژن *chit42* و ترمیناتور *NOS* به طور

۲۳). مطالعات همچنین نشان می دهد که این آنزیمها سمی نبوده و اثر مضرى بر گیاهان و جانوران ندارند (۱۰ و ۲۳).

علیه انواع قارچهای بیماریزا ایجاد نماید و بر خلاف ژنهای با منشا گیاهی شاید به تنهایی هم موثر باشند (۲۱، ۲۲ و



شکل ۸- تأیید سازه pRTLKE2 و جهت صحیح ورود ژن *bgn13.1* با استفاده از الگوی PCR؛ جایگاه اتصال آغازگرها و همچنین اندازه قطعات مورد انتظار در واکنش PCR در شکل شماتیک سازه pRTLKE2 نشان داده شده است. (۱) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای R2 و Nos R که در صورت همسانه سازی ژن در جهت صحیح نباید باندى مشاهده شود؛ (۲) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای F و Nos R و تکثیر قطعه ۲۵۵۰ جفت بازى مورد انتظار؛ (۳) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای R و Nos R که در صورت همسانه سازی ژن در جهت صحیح نباید باندى مشاهده شود؛ (۴) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای 35S و R2 و تکثیر قطعه ۲۲۵۰ جفت بازى مورد انتظار؛ (۵) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای F2 و 35S که در صورت همسانه سازی ژن در جهت صحیح نباید باندى مشاهده شود؛ (۶) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای F2 و Nos R و تکثیر قطعه ۲۰۵۰ جفت بازى مورد انتظار؛ (۷) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای F و 35S که در صورت همسانه سازی ژن در جهت صحیح نباید باندى مشاهده شود؛ (۸) محصول PCR ناقل pRTLKE2 با آغازگرهای F2 و R2 و تکثیر قطعه ۱۳۰۰ جفت بازى مورد انتظار؛ M مارکر Ladder Mix.



شکل ۹- تأیید سازه pBIKE3 با استفاده از الگوی PCR؛ در شکل شماتیک سازه pBIKE3 موقعیت کاستها نسبت به

یکدیگر و همچنین موقعیت آغازگرهای مورد استفاده نشان داده شده اند. ۱) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای Pfl و Prx و تکثیر قطعه ۱۳۰۰ جفت بازی مورد انتظار؛ ۲) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای F و R و تکثیر قطعه ۲۳۰۰ جفت بازی مورد انتظار؛ ۳) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای F2 و R3 و تکثیر قطعه ۳۷۰۰ جفت بازی مورد انتظار؛ ۴) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای F و Prx؛ به دلیل طویل بودن قطعه، تکثیری صورت نگرفت؛ ۵) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای F و R3 و تکثیر قطعه ۴۲۰۰ جفت بازی مورد انتظار؛ ۶) محصول PCR ناقل pRTLKE3 با آغازگرهای F2 و Prx و تکثیر قطعه ۴۱۰۰ جفت بازی مورد انتظار؛ ۷) محصول PCR ناقل pBIKE1 با آغازگرهای Pfl و Prx به عنوان کنترل مثبت؛ ۸) محصول PCR ناقل pBIKE2 با آغازگرهای F و R به عنوان کنترل مثبت؛ M) مارکر Ladder Mix؛ (اندازه قطعات تقریبی است).

شده‌اند. اولین استراتژی روش مخلوط دو باکتری است که دو ناحیه T-DNA در دو پلاسمید جداگانه و در دو سلول آگروباکتریوم جداگانه قرار گرفته‌اند (۵، ۱۱ و ۳۹).

در راهبرد دیگر، یک باکتری به کار گرفته می‌شود. در این راهبرد از چند روش استفاده می‌گردد. در یکی از این روش‌ها، دو ژن در یک ناحیه T-DNA و در یک پلاسمید و در فاصله کمی از هم قرار می‌گیرند (۱۳، ۱۶، ۲۰ و ۴۱). در حالت دیگر، پلاسمیدهای جداگانه، حامل T-DNAهای مختلف بوده ولی در یک سلول آگروباکتریوم قرار می‌گیرند (۸ و ۹). در حالت آخر، چند ناحیه T-DNA در یک پلاسمید ولی با فاصله کمی از هم قرار می‌گیرند (۶، ۱۸ و ۲۴).

در انتقال سازه واجد کاست هر دو ژن به گیاه، در صورت انتقال کامل ناحیه T-DNA، به دلیل اینکه هر دو ژن در منطقه یکسانی از ژنوم قرار می‌گیرند، شرایط بیان هر دو شبیه به یکدیگر خواهد بود در حالی که در انتقال دو سازه جداگانه هر یک از ژنها در منطقه کاملاً متفاوتی از ژنوم ادغام خواهند شد و در نتیجه الگوی بیانی مشابهی نخواهند داشت. بر این اساس به نظر می‌رسد انتقال کاست هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز در یک T-DNA تحت کنترل پیشبرها و عوامل ختم رونویسی جداگانه راهبرد بهتری باشد بنابراین در صورت ادغام ژن در منطقه مناسبی از ژنوم، امکان رونویسی هر دو ژن فراهم می‌شود. ضمناً راهبرد استفاده از سازه های جداگانه ژنها ممکن است به

در این تحقیق با توجه به اثر مطلوب ژنهای ضد قارچ در تریکودرما و عدم اثر مضر آنها بر گیاهان و مهره داران عالی، ژنهای کیتینازی (*chit42*) و گلوکانازی (*bgn13.1*) از این قارچ انتخاب و به عنوان منبع ژنی جهت ساخت سازه‌های بیانی گیاهی برای تولید گیاهان تراریخته متحمل به بیماریهای قارچی استفاده گردید. گزارشهای مختلفی نشان داده است که این آنزیمها در شرایط آزمایشگاهی اثر هم‌افزایی مثبت بر فعالیت یکدیگر دارند (۲، ۲۵، ۳۵).

همچنین گزارش‌های متعددی نشان می‌دهد که ابراز توأم دو یا چند تراژن ضد قارچ از جمله کیتیناز و گلوکاناز در یک گیاه تراریخته، به دلیل اثر هم‌افزایی آنها، مؤثرتر از انتقال تک ژنی آنها می‌باشد (۲۰، ۲۵، ۲۷ و ۴۱).

لذا در این تحقیق علاوه بر طراحی سازه های بیانی تک ژنی که می‌توانند همزمان به یک گیاه منتقل شوند، سازه ای واجد هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز با پروموتور ترمیناتور جداگانه نیز ساخته شد تا امکان بیان همزمان هر دو ژن و ایجاد اثر هم‌افزایی مثبت آنها فراهم شده و مقاومت بیشتری در گیاه در برابر بیماریهای قارچی ایجاد شود. به نظر می‌رسد به کار بردن هم‌زمان این دو آنزیم تخریب‌کننده دیواره سلولی قارچهای بیماریزا، اثر مضاعفی را در مبارزه موثر برابر طیف گسترده ای از قارچهای بیماری زا داشته باشد.

در پروژه‌های مختلف، چندین راهبرد برای طراحی ناقلهای آگروباکتریوم به منظور انتقال توأم چند ژن به کار گرفته

از سازه های ساخته شده در این تحقیق می توان برای پروژه های انتقال ژن به گیاهان مدل و زراعی مختلف جهت بررسی اثر این ژنها در ایجاد مقاومت برابر قارچهای بیماریزا استفاده کرد.

همچنین می توان با انتقال همزمان سازه های تک ژنی یا سازه واجد هر دو ژن، روشهای مختلف انتقال توأم دو ژن را با هم مقایسه و بررسی کرد.

تشکر و قدردانی: بدینوسیله از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری به دلیل تامین بودجه پژوهشی این تحقیق (طرح ۲۴۸) تشکر و قدردانی می گردد. همچنین از آقای حبیب رضا نژاد و خانم سمیه رئوف زاده جهت تهیه cDNA ژنهای مورد استفاده سپاسگزاری می گردد.

ادغام آنها در کروموزومهای مختلف منجر شده و در نسلهای بعدی به دلیل تفرق صفات، هر دو ژن در گیاهان تراریخت باقی نمانند. همچنین راهبرد دوم به دلیل انتقال تنها یک کاست ژن مقاومت به آنتی بیوتیک مزیت نسبی دارد. تنها مشکل انتقال هر دو ژن بر روی یک سازه، بزرگی ناحیه T-DNA و امکان عدم انتقال کامل آن می باشد. انتقال T-DNA به سلول گیاهی ممکن است به طور کامل یا به طور ناقص صورت گیرد. جهت تأیید انتقال T-DNA کامل می توان از روشهای مولکولی از جمله PCR با آغارگرهای مربوط به بخش انتهایی T-DNA استفاده نمود. گزارشهای متعددی انتقال توأم چند ژن با استفاده از یک T-DNA را تأیید نموده است (۱۶، ۲۰ و ۴۱).

منابع

- Adams, D.J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology* 150, 2029-2035.
- Anand, A., Zhou, T., Trick, H.N., Gill, B.S., Bockus, W.W., and Muthukrishnan, S. (2003). Greenhouse and field testing of transgenic wheat plants stably expressing genes for thaumatin-like protein, chitinase and glucanase against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany* 54, 1101-1111.
- Bowman, S.M., and Free, S.J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28, 799-808.
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutiérrez, A., Chet, I., and Herrera-Estrella, A. (1999). Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 929-935.
- Chang, M.M., Culley, D., Choi, J.J., and Hadwiger, L.A. (2002). Agrobacterium-mediated co-transformation of a pea β -1,3-glucanase and chitinase genes in potato (*Solanum tuberosum* L. c.v. Russet Burbank) using a single selectable marker. *Plant Science* 163, 83-89.
- Chen, S., Li, X., Liu, X., Xu, H., Meng, K., Xiao, G., Wei, X., Wang, F., and Zhu, Z. (2005). Green fluorescent protein as a vital elimination marker to easily screen marker-free transgenic progeny derived from plants co-transformed with a double T-DNA binary vector system. *Plant Cell Reports* 23, 625-631.
- Dai, Z., Hooker, B.S., Anderson, D.B., and Thomas, S.R. (2000). Expression of *Acidothermus cellulolyticus* endoglucanase E1 in transgenic tobacco: Biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Research* 9, 43-54.
- Daley, M., Knauf, V.C., Summerfelt, K.R., and Turner, J.C. (1998). Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants. *Plant Cell Reports* 17, ۴۹۶-۴۸۹.
- de Framond, A.J., Back, E.W., Chilton, W.S., Kayes, L., and Chilton, M.D. (1986). Two unlinked T-DNAs can transform the same tobacco plant cell and segregate in the F1 generation. *MGG Molecular & General Genetics* 202, 125-131.
- De Las Mercedes Dana, M., Pintor-Toro, J.A., and 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.
- De Neve, M., De Buck, S., Jacobs, A., Van Montagu, M., and Depicker, A. (1997). T-DNA integration patterns in co-transformed plant cells suggest that T-DNA repeats originate from co-

- integration of separate T-DNAs. *Plant Journal* 11, 15-29.
12. Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia* 161, 345-360.
 13. Esfahani, K., Motallebi, M., Zamani, M.R., Sohi, H.H., and Jourabchi, E. (2010). Transformation of potato (*Solanum tuberosum* cv. Savalan) by chitinase and β -1,3-glucanase genes of mycoparasitic fungi towards improving resistance to *Rhizoctonia solani* AG-3. *Iranian Journal of Biotechnology* 8, 73-81.
 14. Evans, I.J., and Greenland, A.J. (1998). Transgenic approaches to disease protection: Applications of antifungal proteins. *Pesticide Science* 54, 353-359.
 15. Gokul, B., Lee, J.H., Song, K.B., Rhee, S.K., Kim, C.H., and Panda, T. (2000). Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum* - A review. *Bioprocess Engineering* 23, 691-694.
 16. Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J., and Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant Journal* 8, 97-109.
 17. Joosten, M.H., Verbakel, H.M., Nettekoven, M.E., van Leeuwen, J., van der Vossen, R.T., and de Wit, P.J. (1995). The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and beta-1,3-glucanase defence proteins of its host, tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 46, 45-59.
 18. Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N., and Kumashiro, T. (1996). Vectors carrying two separate T-DNAs for cotransformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers. *Plant Journal* 10, 174-175.
 19. Leubner-Metzger, G., and Meins F, Jr. (1999). Functions and regulation of plant β -1,3-glucanases (PR-2). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, 49-76.
 20. Liu, M., Sun, Z.X., Zhu, J., Xu, T., Harman, G.E., and Lorito, M. (2004). Enhancing rice resistance to fungal pathogens by transformation with cell wall degrading enzyme genes from *Trichoderma atroviride*. *Journal of Zhejiang University: Science* 5, 133-136.
 21. Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C.K., and Harman, G.E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. *Microbiology* 140, 623-629.
 22. Lorito, M., Woo, S.L., D'Ambrosi, M., Harman, G.E., Hayes, C.K., Kubicek, C.P., and Scala, F. (1996). Synergistic interaction between cell wall degrading enzymes and membrane affecting compounds. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9, 206-213.
 23. Lorito, M., Woo, S.L., Fernandez, I.G., Colucci, G., Harman, G.E., Pintor-Toro, J.A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A., Tuzun, S., and Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7860-7865.
 24. McCormac, A.C., Fowler, M.R., Chen, D.F., and Elliott, M.C. (2001). Efficient co-transformation of *Nicotiana tabacum* by two independent T-DNAs, the effect of T-DNA size and implications for genetic separation. *Transgenic Research* 10, 143-155.
 25. Melchers, L.S., and Stuver, M.H. (2000). Novel genes for disease-resistance breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 147-152.
 26. MoravĀ Ā-kovĀĵ, J., MatuĀĵĀ-kovĀĵ, I., LibantovĀĵ, J., Bauer, M., and MlynĀĵrovĀĵ, L. (2004). Expression of a cucumber class III chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* class I glucanase genes in transgenic potato plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 79, 161-168.
 27. MoravĀ Ā-kovĀĵ, J., LibantovĀĵ, J., HeldĀĵk, J., Salaj, J., Bauer, M., MatuĀĵĀ-kovĀĵ, I., GĀĵlovĀĵ, Z., and MlynĀĵrovĀĵ, Ā .(Y00Y) . Stress-induced expression of cucumber chitinase and *Nicotiana plumbaginifolia* β -1,3-glucanase genes in transgenic potato plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 133-141.
 28. Neuhaus, J.M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., and Meins Jr, F. (1991). High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology* 16, 141-151.
 29. Neuhaus, J.M. (1999). Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*, 77-105.
 30. Raham, S.K., Rinaldi, S., Ikuo, N., and Masahiro, M. (2008). Production of transgenic potato exhibiting enhanced resistance to fungal

- infections and herbicide applications. *Plant Biotechnol Rep* 2, 13-20.
31. Raoufzadeh, S. (2007). Amplification and Cloning of DNA and CDNA of Beta-1,3-glucanase (bgn13.1) Gene From *Trichoderma Virens*.
 32. Rezanezhad, H., Zamani, M.R., Motallebi, M., and Harighi, M.J. (2009). Cloning of chit42 gene from *Trichoderma atroviride* PTCC5220 and its structure analysis, in persian. *Iran J Biol* 22, 53-62.
 33. Salmeron, J.M., and Vernooij, B. (1998). Transgenic approaches to microbial disease resistance in crop plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 347-352.
 34. Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, New York. Sheerman S, Bevan MW (1988). A rapid transformation method for *Solanum tuberosum* using binary *Agrobacterium tumefaciens* vectors. *Plant Cell Rep* 7, 13-16.
 35. Sela-Buurlage, M.B., Ponstein, A.S., Bres-Vloemans, S.A., Melchers, L.S., Van Den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. (1993). Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 101, 857-863.
 36. Stone, B.A., and Clarke, A.E. (1992). *Chemistry and Biology of (1 \rightarrow 3)- β -Glucans*.
 37. Theis, T., and Stahl, U. (2004). Antifungal proteins: Targets, mechanisms and prospective applications. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61, 437-455.
 38. Walsh, T.J., Viviani, M.A., Arathoon, E., Chiou, C., Ghannoum, M., Groll, A.H., and Odds, F.C. (2000). New targets and delivery systems for antifungal therapy. *Medical Mycology* 38, 335-347.
 39. Wang, Y., Kausch, A.P., Chandlee, J.M., Luo, H., Ruummele, B.A., Browning, M., Jackson, N., and Goldsmith, M.R. (2003). Co-transfer and expression of chitinase, glucanase, and bar genes in creeping bentgrass for conferring fungal disease resistance. *Plant Science* 165, 497-506.
 40. Yun, D.J., Bressan, R.A., and Hasegawa, P.M. (1997). Plant antifungal proteins. *Plant Breeding Reviews* 14, 39-88.
 41. Zhu, H., Xu, X., Xiao, G., Yuan, L., and Li, B. (2007). Enhancing disease resistances of super hybrid rice with four antifungal genes. *Science in China, Series C: Life Sciences* 50, 31-39.

Construction of plant expression vectors harboring chitinase (*chit42*) and glucanase (*bgn13.1*) genes from *Trichoderma* species

Esfahani K., Motallebi M. and Zamani M.R.

National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Pathogenic fungi are including the most important causes of damage in agricultural products. One way to combat fungal diseases is using genetic engineering to transfer genes encode hydrolase enzymes, especially chitinase and glucanase to crops. Antagonistic fungi such as *Trichoderma*, producing hydrolase enzymes chitinase and glucanase, have a significant inhibitory effect on the growth of pathogenic fungi. Enzymes isolated from different species of these fungi are more effective than those isolated from other sources. In the present study, *chit42* and *bgn13.1* genes isolated from *T. atroviride* and *T. virens*, were used to make three plant expression constructs consists of two constructs harboring one chitinase gene (pBIKE1) or glucanase gene (pBIKE2) and a construct harboring both of these genes (pBIKE3) under the control of *CaMV* 35S promoter and *NOS* terminator. Also during the construction of these vectors, new vector which was named pBI121^{GUS-} was developed based on pBI121, without the *gus* gene. Constructs in this research project can be transferred to plants to produce GM plants resistant against fungi or to analyze the effects of these genes on pathogens.

Keywords: Plant expression constructs, Chitinase, Glucanase, *Trichoderma*, Fungal diseases.