

جداسازی و کلون کردن دو ژن از خانواده PR1 و ساخت پلاسمیدهای سه گانه حاوی سه گروه مختلف از ژن های PR، به منظور تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری های قارچی

البرز رئوفی¹، مسعود توحیدفر^{2*}، محمود سلوکی³، مطهره محسن پور⁴

¹ دانشجوی کارشناسی ارشد پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)

² استادیار، عضو هیئت علمی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)

³ استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل

⁴ دکتری اصلاح نباتات - بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)

تاریخ دریافت: 1390/03/22، تاریخ پذیرش: 1390/12/28

چکیده

با توجه به میزان خسارت ناشی از بیماری های قارچی، استفاده از تکنیک های بیوتکنولوژی برای تولید گیاهان مقاوم، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از آنجایی که بیان ترکیبی از پروتئین های مربوط به بیماری زایی منجر به مقاومت چندژنی خواهد شد که از یک سو دوام مقاومت را به همراه داشته و از سوی دیگر باعث مقاومت به انواع گسترده ای از گونه های بیماری زا می گردد، لذا این پژوهش با هدف جداسازی ژن و ساخت سازه های پلاسمیدی چندگانه، حاوی سه گروه مهم از پروتئین های مربوط به بیماری زایی PR1، PR2 و PR3، انجام گردید. ابتدا دو ژن دارای ویژگی های متفاوت از خانواده PR1، با طراحی پرایمرهای اختصاصی، از ژنوم گیاه توتون جداسازی گردیدند و پس از آنالیزهای مربوط به صحت جداسازی ژن، طی مراحل تحت پیشبر 35S و پایانبر Nos در پلاسمید دوگانه pBII21 کلون سازی شدند. در مرحله بعد، کلون سازی دو ژن ضدقارچی مهم دیگر، PR2 (β -1 و 3-گلوکاناز) و PR3 (کیتیناز)، تحت کنترل نواحی تنظیمی مستقل در ناحیه T-DNA حامل مذکور، به دو صورت همسو و غیرهمسو به همراه PR1، طی چندین مرحله انجام شد. انتظار می رود که حامل های سه گانه حاصل از این پژوهش، علاوه بر ایجاد مقاومت پایدار به طیف وسیعی از عوامل بیماری زای قارچی، دارای پتانسیل ایجاد مقاومت به باکتری و سایر تنش های زنده و غیرزنده نیز باشند. در نهایت حامل های مذکور را می توان برای انتقال ژن به گیاهان مختلف با روش اگروباکتريوم و تغنگ ژنی مورد استفاده قرار داد.

واژه های کلیدی: پروتئین های مربوط به بیماری زایی، کلون سازی ژن، کیتیناز، گلوکاناز، PR1.

از آنجا که برنامه‌های اصلاح سنتی جهت تولید گیاهان مقاوم به قارچ براساس فنون زمان بر و طولانی استوار بوده و به ندرت می‌توانند با تکامل سریع عوامل بیماری‌زا کنار بیایند، لذا کشاورزان اغلب ناچار به استفاده از سموم شیمیایی می‌باشند که پرهزینه بوده، باعث آلودگی محیط زیست شده و بالاخره به دلیل تکامل عوامل بیماری‌زا کم‌اثرتر می‌گردند. فن‌آوری‌های جدید نظیر جداسازی ژن‌های مقاومت و شیوه‌های انتقال ژن جهت ایجاد گیاهان تراریخته از هر نظر می‌توانند نقایص موجود را برطرف کنند. در حال حاضر اکثر استراتژی‌ها برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی، روی معرفی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی (PR^1) متمرکز شده است (Edreva, 2005). ژن‌های مربوط به بیماری‌زایی دسته‌ای از این ژن‌ها می‌باشند که بیان آنها سبب القاء پاسخ فوق حساسیت به بسیاری از آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی می‌گردد. PRها دارای دو نوع بازی و اسیدی می‌باشند، که به ترتیب دارای مکان‌های واکوئولی و آپوپلاستیک هستند. موادشیمیایی مثل سالیسیک، پلیاکریلیک، اسیدهای

چرب، نمک‌های معدنی و به همین ترتیب محرک‌های فیزیکی مثل زخم، اشعه UV-B، شوک اسمزی، دمای پایین، کمبود یا زیاده‌ای آب سبب القای PRها می‌شوند (Schaller et al., 2000). گروه PR-1، بیشترین میزان را در بین پروتئین‌های خانواده PR دارد، که به میزان 10000 برابر در بافت‌های آلوده شده القا می‌شود و میزان آن به 1 تا 2 درصد کل پروتئین‌های برگ می‌رسد (Alexander & Goodman, 1993). مشخصه بسیار مهم PRها اثر ضدقارچی آنها می‌باشد. آنزیم‌های هیدرولیتیک (مثل β -1 و 3-گلوکاناز، کیتیناز و پروتئاز) می‌توانند ابزاری برای سست کردن و از بین بردن دیواره‌های قارچی حاوی گلوکان‌ها، کیتین (قارچ‌هایی از قبیل آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و دئوترومیست‌ها) و پروتئین باشند. همچنین PRها می‌توانند مسیر دفاعی متمایزی شامل تجزیه هیدرولیتیک قطعات گلوکانوکیتین را از دیواره قارچی به کار بیندازند. تأثیر بازدارندگی PR-1 بازی گوجه و لوبیا در برابر پاتوژن‌های قارچی به وسیله آزمایش‌های سلولی و اینویترو² به اثبات رسیده است (Niderman et al., 1999; Rauscher et al., 1995). به عنوان مثال، خاموشی ژن PR-1b در جو، سبب تسهیل نفوذ

² Invitro

¹ Pathogenesis Related Protein

اوومیست را فعال کند. از طرفی دیگر کیتین که سوبسترای آنزیم کیتیناز است، یکی از اجزای مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌هایی از قبیل آسکومیست‌ها، بازیدیومیست‌ها و دثوترومیست‌ها است و آنزیم بتا-1 و 3-گلوکوناز نیز قادر است گلوکان موجود در دیواره سلولی ریشه قارچ را تجزیه کند و موجب تشدید خسارات وارده به قارچ شود. ثابت شده که این آنزیم سبب تشدید فعالیت آنزیم کیتیناز نیز می‌شود. با توجه به مطالعات انجام شده، همچنین به کارگیری همزمان چند ژن با فعالیت مکمل، تولید جدایه‌های قارچی شکننده مکانیسم‌های مقاومت در گیاهان تراریخته را به تأخیر می‌اندازد. لذا هدف از این پژوهش جداسازی ژن PR1 کد کننده پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی از ژنوم توتون، ایجادکننده مقاومت به پاتوژن‌های قارچی (و بعضی استرس‌های زنده و غیر زنده دیگر)، کلون‌سازی ژن PR1 تحت کنترل پروموتور 35S جهت بیان بالای آن در گیاهان هدف و کلون‌سازی دو نوع مختلف از ژن PR1 (اسیدی و بازی)، تحت پروموتور 35S به همراه سایر پروتئین‌های ضد قارچی نظیر کیتیناز و گلوکاناز به طور همزمان، در وکتوری مناسب برای انتقال ژن به گیاهان می‌باشد.

پاتوژن قارچی *Blumeriagraminis* در برگ شد (Schultheiss et al, 2003). بتا-1 و 3-گلوکان ترکیب اصلی در دیواره‌های سلولی آمایست‌ها می‌باشد (Wessels & Sietsma, 1981). در بسیاری از موارد زمانی که بتا-1 و 3-گلوکوناز و کیتیناز با یکدیگر در گیاه تراریخته بیان می‌شوند، مقاومت بیشتری در گیاه مشاهده می‌شود. گوجه‌های تراریخت که ژن گلوکاناز و کیتیناز کلاس I توتون را بیان می‌کنند، حساسیت کمتری را در مواجهه با *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* از خود نشان دادند. یونجه‌های بیان کننده تراژن‌های بتا-1 و 3-گلوکوناز اسیدی یونجه و کیتیناز بازی برنج در آلودگی با *Phytophthora megasperma* f. *sp. medicaginis* که فاقد کیتین در دیواره سلولی خود بود، علائم بیماری اندکی از خود نشان می‌دادند، در حالی که تحت تأثیر چندین قارچ دارای کیتین، در کاهش علائم بیماری در گیاه اثری نبود (Masoud & Zhu 1996). همچنین بیان تراژن‌های نامبرده سبب افزایش چشمگیر مقاومت توتون در برابر قارچ‌های *Cercospora nicotianae* نسبت به بیان منفرد هر یک از ژن‌های نامبرده شد (Zhu 1994). بیان در سطح زیاد PR1 در گیاهان تراریخته ممکن است سایر مکانیسم‌های دفاعی مختص پاتوژن‌های

مواد و روش‌ها

روی ژل و نیز با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز داخلی² تأیید و سپس در داخل حامل pGEM-Teasy کلون‌سازی شدند. از آنجایی که هدف، قرار دادن هر یک از این ژن‌ها در حامل pBII21 تحت پیشبر³ 35S و پایانبر⁴ Nos بود، ساخت چنین حاملی نیازمند اضافه نمودن جایگاه *XbaI* در فرادست⁵ و *SacI* در فرودست⁶ ژن‌های مذکور بود. از سویی دیگر نیاز بود تا جایگاه آنزیمی *HindIII* که در حامل اولیه pBII21 منحصر به فرد⁷ است جهت مراحل بعدی همچنان منفرد باقی بماند. از این رو هر یک از ژن‌های PR-1a و PRP-1 پس از خروج از pGEM-T با آنزیم برشی *EcoRI*، در حامل حد واسط (pGEM-Chi *HindIII*-)، که قبلاً جایگاه *HindIII* موجود در MCS آن حذف شده بود (Mohsenpour et al., 2008)، کلون‌سازی شدند و پس از آنالیزهای مربوط به صحت قرارگیری جهت ژن‌ها توسط آغازگر رو به جلوی M13 و آغازگر رو به عقب اختصاصی ژن‌های مذکور، توسط آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* از این حامل خارج شد و با خروج ژن *gus*

در این تحقیق از باکتری *E.coli* سویه XLI-Blue (Cinna Gen B16-50c) و پلاسمیدهای pGEM[®]-7Zf(-) و pGEM[®]-T Easy (Promega)، (Clontech, Washangton, DC)pBII21 و پلاسمیدهای نو ترکیب (*HindIII*-pGEM-Chi (Mohsenpour, M., et al., 2008) استفاده گردید. استخراج پلاسمید و واکنش هضم با آنزیم‌های نوکلئاز نوع II و تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش اتصال¹ و فسفرزدایی طبق دستورالعمل‌های Sambrook و Russel (2000) انجام شد. خالص سازی قطعات DNA از روی ژل آگارز با استفاده از High Pure Pcr Purfication Kit (Roche) انجام شد. در ابتدا طراحی آغازگرهای اختصاصی برای دو ژن از خانواده PR-1a (اسیدی) و PRP-1 (بازی) انجام شد و پس از آن جداسازی این ژن‌ها با استفاده از DNA ژنومی توتون به عنوان الگو و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز صورت گرفت. ترادف پرایمرهای طراحی شده برای جداسازی ژن‌ها در جدول 1 نشان داده شده است. صحت جداسازی هر یک از این ژن‌ها با بررسی اندازه قطعات بدست آمده بر

² Nested PCR

³ Promoter

⁴ Terminator

⁵ Upstream

⁶ Downstream

⁷ Unique

¹ Ligation

در اثر هضم آنزیمی حامل pBI121 با دو آنزیم پایانبر Nos در این حامل کلونسازی مجدد شدند. نامبرده، قطعات مورد نظر تحت پیشبر 35S و

جدول 1- ترادف پرایمرهای طراحی شده برای جداسازی ژنهای PR-1a و PRP1.

Table 1- Designed primer for isolation of PR-1a and PRP1

پرایمر	توالی
PR-1a F	GTCATGGGATTTGTTCTC
PR-1a R	TTAGTATGGACTTTCGCC
PRP1 F	CTCAGCTATATTCTTCCC
PRP1 R	GCACTCATTAGACATCAG
PR1 In	CAAACCACCTGAGTATAG

با طول 3539 جفت باز از روی ژل آگارز خالصسازی و در محل منحصر به فرد آنزیم *HindIII* در دو حامل pBI-PR-1a و pBI-PRP-1 کلونسازی مجدد شد. در نهایت چهار نوع حامل سه‌گانه مختلف حاصل گردید که سه ژن PR-1a، کیتیناز و بتا 1 و 3-گلوگوناز را با جهت‌های مختلف نسبت به هم و تحت نواحی تنظیمی مستقل در ناحیه T-DNA حامل pBI121 دارا بودند. حامل‌های حاصل به + ChiGlu PR-1a pBI121، + ChiGlu PR-1a pBI121 PRP-1 و + ChiGlu PRP-1 pBI121 نامگذاری شدند که مناسب برای انتقال به روش اگروباکتريوم و تفنگ ژنی هستند.

گام بعدی افزودن ژن‌های کیتیناز و گلوگوناز به دو حامل حاصل بود که این حامل‌ها به ترتیب pBI-PR-1a و pBI-PRP-1 نامگذاری شدند. بدین منظور ابتدا قطعه گلوکناز با پایانبر Nos به همراه قطعه کیتیناز تحت پیشبر Glu-NosT- 35S (CaMV35S P-Chi) از حامل pBI121-ChiGlu توسط آنزیم *BamHI* خارج و در حامل حدواسط pCaMV کلونسازی مجدد گردید. پس از این که صحت کلونسازی و جهت ورود قطعات توسط آنزیم *EcoRV* به اثبات رسید، حامل نوترکیب حاصل موسوم به pCaMV-ChiGlu توسط آنزیم *HindIII* مورد هضم آنزیمی ناقص قرار گرفت و کاست کامل ژن‌های کیتیناز و β -1 و 3-گلوگوناز با پیشبرهای جداگانه 35S و پایانبرهای جداگانه Nos

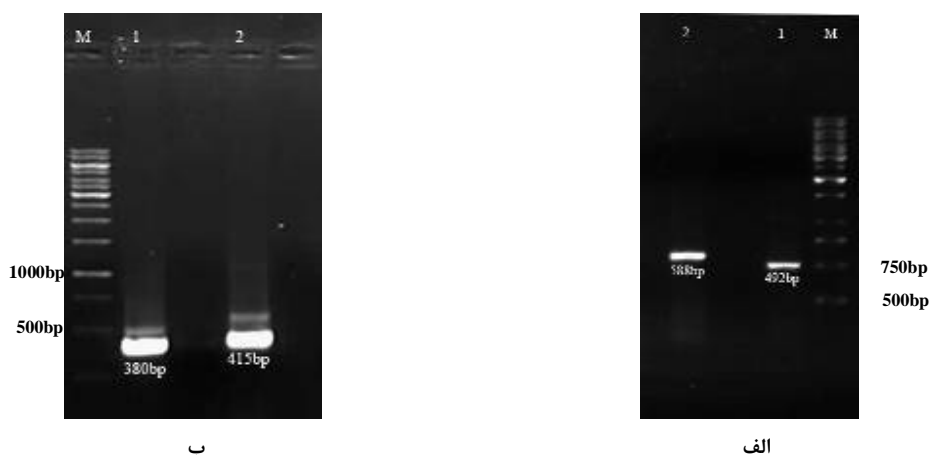
نتایج و بحث

سفید در محیط حاوی Xgal و IPTG و در نهایت با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز تأیید شد (شکل 2).

جهت صحیح ژن‌ها پس از قرارگیری ژن‌های PRP-1 و PR-1a در حامل pGEM7Z(-HindIII) با مشاهده باندهای 583 جفت‌بازی برای PR-1a و 699 جفت‌بازی برای PRP-1، حاصل از تکثیر با آغازگر رو به جلوی M13 و رو به عقب اختصاصی ژن‌های مذکور به اثبات رسید (شکل 3).

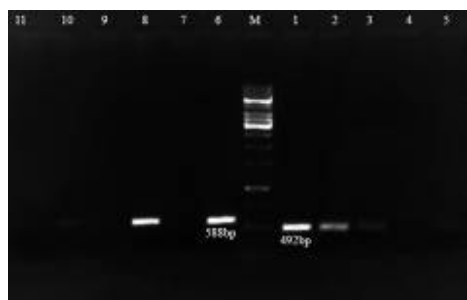
در نهایت با استفاده از جایگاه‌های برشی *SacI* و *XbaI* ژن‌های PR-1a و PRP-1 از حامل pGEM7Z(-HindIII) جداسازی شدند و پس از خالص‌سازی از روی ژل در حامل pBI121 فاقد ژن *gus* قرار گرفتند. حضور ژن‌های مذکور با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی دو ژن تأیید شد (شکل 4).

صحت جداسازی ژن‌ها به طور اولیه با مشاهده باندهای 492 و 588 جفت‌بازی که به ترتیب در مورد ژن‌های PR-1a و PRP-1 مورد انتظار بود، مورد تأیید قرار گرفت (شکل 1-الف). نتیجه واکنش زنجیره ای پلیمرز داخلی نیز به ترتیب با ظهور باندهای 380 و 415 جفت‌بازی به ترتیب برای PR-1a و PRP-1 تأیید دیگری بر صحت جداسازی ژن‌های مذکور بود (شکل 1-ب). در نهایت توالی‌یابی ژن‌های مورد نظر به طور صد در صد صحت ژن‌های جداسازی شده را تأیید کرد. توالی‌های حاصل پس از دریافت، از طریق Blast نوکلئوتیدی NCBI مورد آنالیز قرار گرفتند و نتایج، همولوژی صد در صدی ژن‌های جداسازی شده در این پژوهش را با ژن‌های خانواده PR-1 توتون نشان داد. ورود ژن‌های PR-1a و PRP-1 به داخل حامل pGEMTeasy در ابتدا با مشاهده کلونی‌های



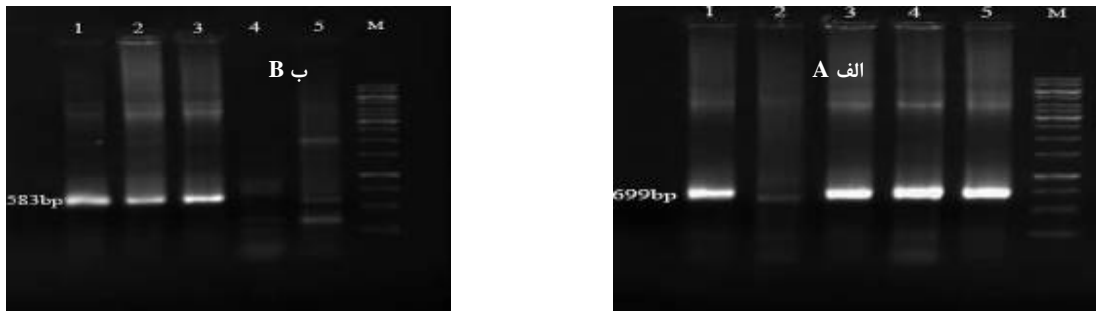
شکل 1- انجام PCR برای جداسازی ژن PR1 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas)، (الف) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PR-1a و PRP-1. 1: باند حاصل از تکثیر ژن PR-1a، 2: باند حاصل از تکثیر ژن PRP-1، (ب) واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور تأیید اولیه ژن‌های جداسازی شده. 1: PCR آشیانه‌ای برای PR-1a، 2: PCR آشیانه‌ای برای تکثیر ژن PRP-1.

Figure 1- PCR for isolation of PR1 gene using specific primers. M. DNA Ladder 1Kb (Fermentas), (a) PCR using specific PR-1a and PRP1 primers: 1. PR-1a gene; 2. PRP-1 gene. (b) Verification of isolated gene using PCR: 1. Nested PCR for PR-1a; 2. Nested PCR for PRP-1.



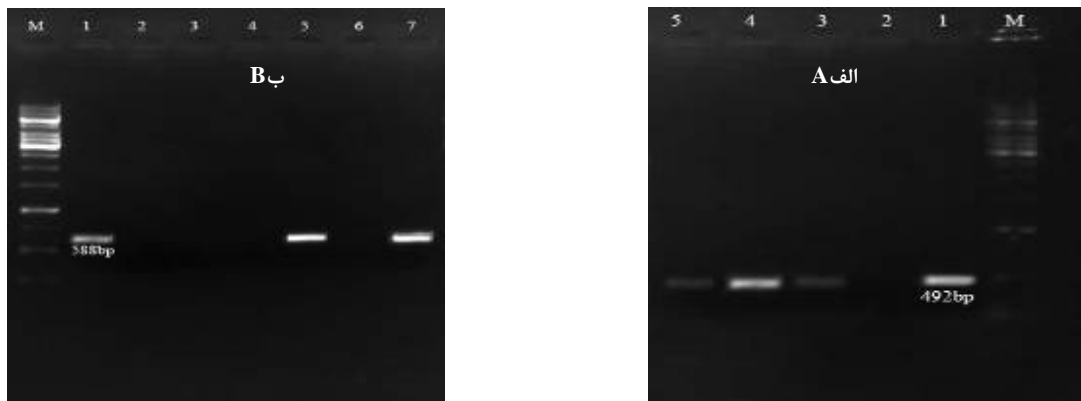
شکل 2- بررسی حضور ژن‌های PR-1a و PRP-1 در حامل pGEMTeasy با استفاده از PCR و آغازگرهای اختصاصی دو ژن PR-1a و PRP-1. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas)، 1 و 6: کنترل مثبت، 2 تا 5: آنالیز کلونی‌ها برای بررسی حضور PR-1a، 6 تا 11: آنالیز کلونی‌ها برای بررسی حضور PRP-1.

Figure 2- PCR for verification of PR-1a and PRP-1 in pGEMTeasy using specific primers. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas), 1 and 6: Positive control, 2-5: Analysis of colony for PR-1a gene, 6-11: Analysis of colony for PRP-1.



شکل 3- بررسی ژن‌های PR-1a (الف) و PRP-1 (ب) با استفاده از آغازگر M13 و آغازگر اختصاصی از ژن‌های مذکور. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas). (الف) 1 تا 3: کلونی‌های حاوی ژن PR-1a با جهت صحیح، 4 و 5: کلونی‌های حاوی ژن PR-1a با جهت‌گیری عکس. (ب) 1، 3، 4 و 5: کلونی‌های حاوی ژن PRP-1 با جهت‌گیری صحیح، 2: کلونی‌های حاوی ژن PRP-1 با جهت‌گیری عکس.

Figure 3- Analysis for determination of gene orientation (a) PR-1a and (b) PRP-1 using M13 and a gene specific primer. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas), (a) 1-3: Colonies containing PR-1a gene with correct orientation; 4 and 5: Colonies containing PR-1a gene with incorrect orientation. (b) 1, 3, 4 and 5: Colonies containing PRP-1 gene with correct orientation; 2. Colony containing PRP-1 gene with incorrect orientation.

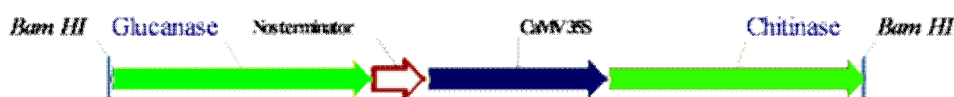


شکل 4- PCR ژن‌های PR-1a (الف) و PRP-1 (ب) در حامل pBI121 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas). (الف) 1: کنترل مثبت، 3 و 4 و 5: کلونی‌های حاوی حامل نوترکیب pBI121-PR-1a، 2: کلونی‌های حاوی حامل pBI121 فاقد ژن مذکور؛ (ب) 1: کنترل مثبت، 5 و 7: کلونی‌های حاوی حامل نوترکیب pBI121-PRP-1، ۲، ۳، ۴ و 6: کلونی‌های حاوی حامل pBI121 فاقد ژن مذکور.

Figure 4- PR-1a (A) and PRP-1 (B) Genes in PBI121 using specific primer. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas), (a) Positive control; 3, 4 and 5: Colonies containing recombinant pBI121-PR-1a vector, 2: Colonies containing non-recombinant pBI121 vector.

پس از قرارگیری این قطعه در حامل pCaMV حضور ژن‌های مذکور با آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز مورد بررسی قرار گرفت. پس از تأیید حضور دو ژن مذکور، جهت قرارگیری قطعه در کلونی‌های بدست آمده، با استفاده از آنزیم *EcoRV* بررسی گردید (شکل 6).

پس از هضم آنزیمی حامل پلاسمیدی pBI121-ChiGlu (Mohsenpour et al., 2008) به وسیله آنزیم *Bam*HI، قطعه 3544 جفت بازی (حاوی کاست ژن بتا 1 و 3-گلوگاناز بدون پیشبر و کاست ژن کیتیناز بدون پایان دهنده) (شکل 5) از روی ژل آگارز خالص سازی گردید.

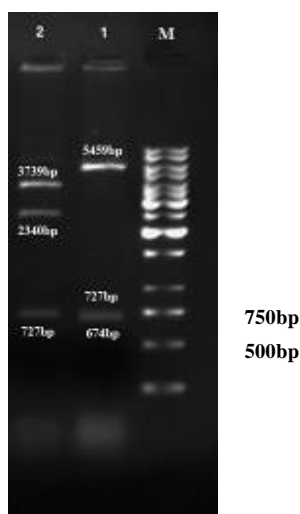


شکل 5- قطعه 3544 جفت بازی حاصل از برش حامل پلاسمیدی pBI121-ChiGlu به وسیله آنزیم *Bam*HI.

Figure 5- A 3544bp *Bam*HI fragment resulting pBI121-ChiGlu digestion.

با هضم کامل pCaMV-ChiGlu با آنزیم *Hind*III قطعاتی با طول 2666، 2282 و 1912 جفت باز مورد انتظار است (شکل 8) که در صورت هضم ناقص، باند مورد نظر با طول 4194 جفت باز نیز ظاهر خواهد شد (شکل 8). این قطعه حاوی کاست کامل دو ژن کیتیناز و گلوگاناز می‌باشد به طوری که ژن‌های کیتیناز و گلوگاناز هر یک حاوی یک پیشبر 35s و پاینبر NOS می‌باشند (شکل 9).

در صورت قرارگیری قطعه با جهت صحیح ظهور باندهای ۳۷۹۳، ۲۳۴۰ و 727 جفت بازی مورد انتظار است و در صورت قرارگیری قطعه در جهت عکس باندهایی با اندازه‌های 5459، 727 و 674 جفت باز مشاهده خواهد شد (شکل 6). جداسازی کاست کامل ژن‌های کیتیناز و بتا 1 و 3-گلوگاناز از حامل pCaMV-ChiGlu تنها با آنزیم *Hind*III امکان‌پذیر بود، که با توجه به وجود جایگاه داخلی این آنزیم در وسط این کاست (شکل 7)، از استراتژی هضم ناقص استفاده شد.

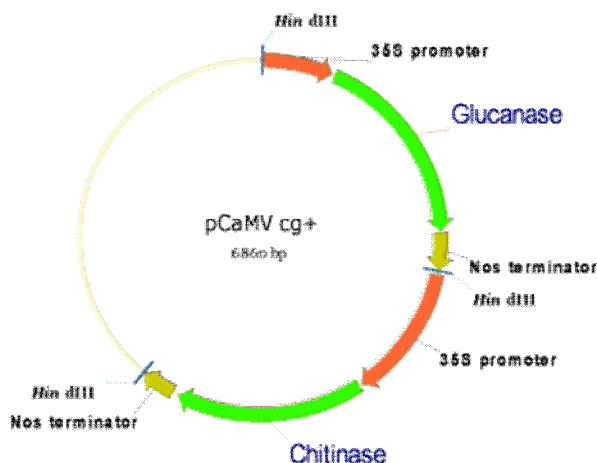


شکل 6- بررسی جهت قطعه ChiGlu در حامل پلاسمیدی pCaMV با استفاده از هضم آنزیمی به وسیله آنزیم *EcoRV*. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas). 1: پلاسمید pCaMV حاوی قطعه ChiGlu با جهت گیری عکس، 2: پلاسمید pCaMV حاوی قطعه ChiGlu با جهت گیری صحیح.

Figure 6- Verification of ChiGlu orientation in pCaMV using *EcoRV*. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas), 1: Correct orientation of ChiGlu fragment in pCaMV; 2: Incorrect orientation of ChiGlu fragment in pCaMV.

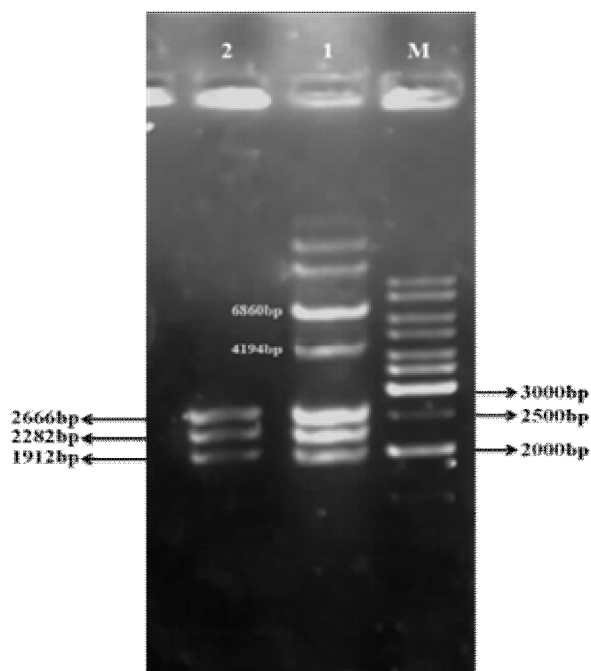
کامل دو ژن کیتیناز و گلوکاناز می‌باشد به طوری که ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز هر یک حاوی یک پیشبر 35s و پایانبر NOS می‌باشند (شکل 9).

با هضم کامل pCaMV-ChiGlu با آنزیم *HindIII* قطعاتی با طول 2282، 2666 و 1912 جفت باز مورد انتظار است (شکل 8) که در صورت هضم ناقص، باند مورد نظر با طول 4194 جفت باز نیز ظاهر خواهد شد (شکل 8). این قطعه حاوی کاست



شکل 7- جایگاه برشی آنزیم *HindIII* بر روی حامل پلاسمیدی pCaMVcg.

Figure 7- *HindIII* recognition sites in pCaMVcg vector.

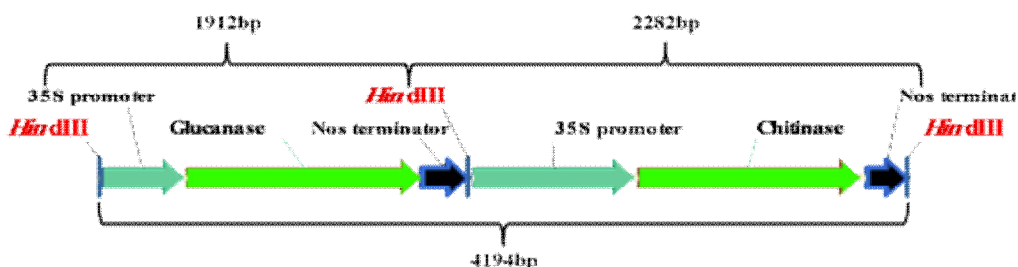


شکل 8- جداسازی کاست کامل دو ژن کیتیناز و گلوکاناز با استفاده از آنزیم *HindIII*. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas)، 1: قطعات حاصل از هضم ناقص حامل pCaMV-ChiGlu توسط آنزیم *HindIII*، 2: هضم کامل حامل pCaMV-ChiGlu توسط آنزیم *HindIII*.

Figure 8- Isolation of chitinase and glucanase gene cassette using *HindIII*. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas), 1: pCaMV-ChiGlu partial digestion using *HindIII*. 2: pCaMV-ChiGlu complete digestion using *HindIII*.

جایگاه برشی *HindIII* خطی شدند. در نهایت کاست کامل ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در فرودست کاست ژنی PR-1a و PRP-1 قرار گرفت. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کیتیناز، حضور ژن مذکور و به طبع آن ژن گلوکاناز در حامل‌های نهایی به صورت اولیه تأیید شد. سپس به منظور بررسی جهت قرارگیری کاست کیتیناز و گلوکاناز، از آغازگر رو به جلوی کیتیناز و رو به عقب PR-1a و PRP-1 استفاده شد (شکل 10).

همان طور که در شکل 8 مشاهده می‌شود، علاوه بر سه باند ۲۶۶۶، ۲۲۸۲ و ۱۹۱۲ جفت باز حاصل از هضم کامل، در چاهک شماره 1 چندین باند دیگر از جمله سه باند حاصل از عدم هضم حامل، باند 6860 جفت بازی حاصل از برش حامل تنها در یکی از جایگاه‌های برشی و باند 4194 جفت بازی حاصل از برش در جایگاه‌های ابتدای پیشبر 35S گلوکاناز و انتهای پاینبر کیتیناز مشاهده می‌شود. باند مطلوب (قطعه 4194 جفت بازی) از روی ژل ریکآوری شد پس از انجام مراحل فوق حامل‌های pBI121PRP-1 و pBI121PR-1a با استفاده از



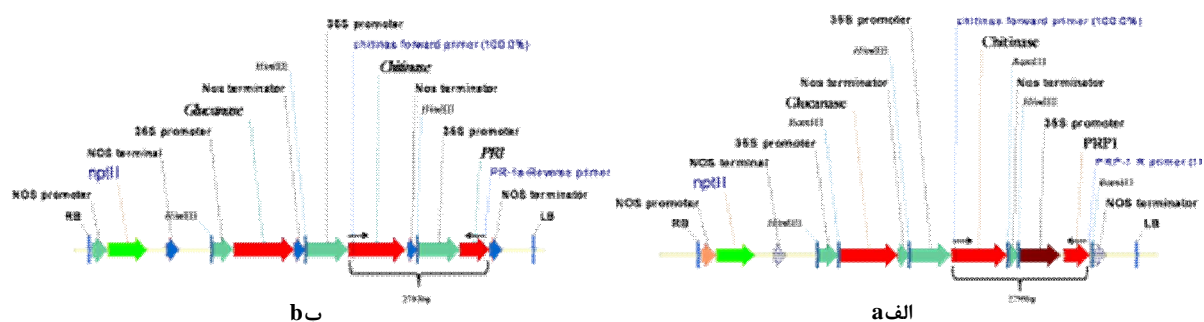
شکل 9- نقشه فیزیکی کاست‌های کامل دو ژن کیتیناز و گلوکاناز حاصل از هضم ناقص حامل پلاسمیدی pCaMV-ChiGlu با استفاده از آنزیم برشی *HindIII*.

Figure 9- Physical map of chitinase and glucanase cassettes driven from pCamV-ChiGlu partial *HindIII* digestion.

باند 2703 جفت بازی در حامل pBI121PR-1aChiGlu و باند 2799 جفت بازی در حامل pBI121PRP-1ChiGlu جهت‌گیری قطعه

و بدین ترتیب حامل‌های نوترکیب pBI121PRP-1 و pBI121PR-1aChiGlu(+) و شناسایی شدند که در آنها مشاهده

ChiGlu را به صورت همسو با کاست های PR-1a و PRP-1 نشان داد (شکل 11).



شکل 10- محل آغازگرهای رو به جلوی کیتیناز و رو به عقب ژن های PR-1a و PRP-1. (الف): محل و جهت قرارگیری کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز در فرودست ژن PR-1a. (ب): محل و جهت قرارگیری کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز در فرودست ژن PRP-1.

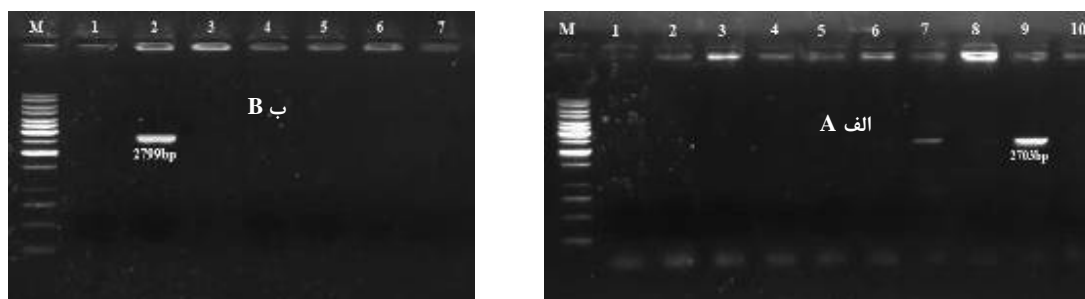
Figure 10- Position of specific PR-1a and PRP-1 primers. (a) Position and orientation of chitinase and glucanase cassettes in downstream of PR-1a gene. (b) Position and orientation of chitinase and glucanase cassettes in downstream of PRP-1 gene.

گیری عکس کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به کاست ژن PR-1a ظهور باندهایی با طول 13988 و 3658 جفت باز را سبب می شود. به همین ترتیب در صورتی که در حامل نوترکیب pBI121PRP-1ChiGlu کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز به صورت همسو با کاست ژن PRP-1 قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *XhoI* منجر به ظهور قطعاتی با طول 15460 و 2282 جفت باز می شود و جهت گیری عکس کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به کاست ژن PR-1a ظهور باندهایی با طول 14084 و 3658 را سبب می شود (شکل 12). با توجه به پژوهش هایی که در زمینه

در نهایت پس از بررسی جهت کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز به وسیله واکنش زنجیره ای پلیمرز، حضور و جهت ژن های مذکور با استفاده از هضم آنزیمی، مورد تأیید قرار گرفت (شکل 12). بدین منظور با استفاده از آنزیم *XhoI* پلاسمید حاصل از کلونی های مذکور مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. در صورتی که در حامل نوترکیب pBI121PR-1aChiGlu کاست ژن های کیتیناز و گلوکاناز به صورت همسو با کاست ژن PR-1a قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *XhoI* منجر به ظهور قطعاتی با طول 15364 و 2282 جفت باز می شود و این در حالیست که جهت

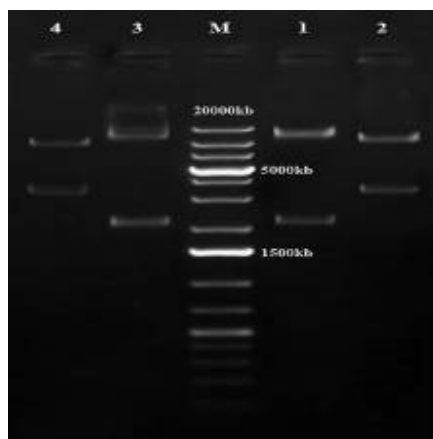
رئوفی و همکاران، 1390

نوترکیبی‌های همولوگ انجام شده، انتظار می‌رود حامل‌های pBI121PR-1aChiGlu(-) و pBI121PRP-1ChiGlu(-) (شکل 13) در طی همانند سازی در سیستم باکتری و نیز در طی نسل‌های بعد گیاهان تراریخت، از پایداری بسیار بیشتری (عدم حذف بخشی از کاست‌های سه ژن) نسبت به حامل‌های نوترکیب pBI121PR-1aChiGlu(+) و pBI121PRP-1ChiGlu(+) (شکل 14) از خود نشان دهند.



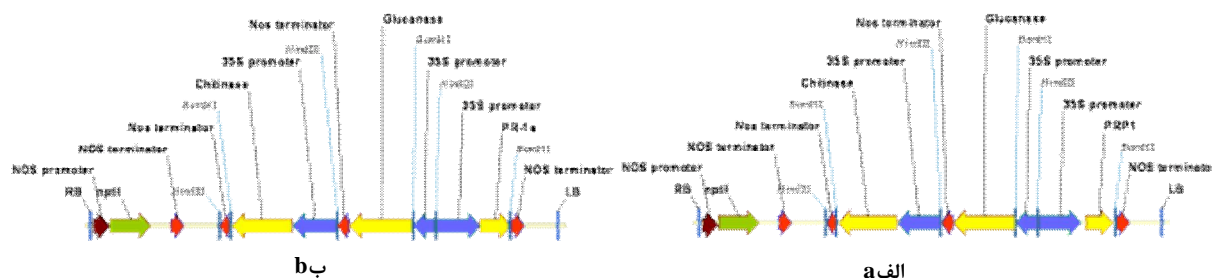
شکل 11- بررسی جهت قرارگیری کاست ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در حامل‌های پلاسمیدی pBI121PR-1a و pBI121PRP-1 با استفاده از آغازگر رو به جلوی کیتیناز و رو به عقب PR-1a و PRP-1. نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentas)، (الف): 1، 2، 3، 4، 5، 6، 8 و 10: کلونی‌های حاوی حامل پلاسمیدی pBI121PR-1aChiGlu، که جهت‌گیری قطعه ChiGlu در آن به صورت ناهمسو با کاست PR-1a می‌باشد، 7 و 9: کلونی‌های حاوی حامل پلاسمیدی pBI121PR-1aChiGlu، که جهت‌گیری قطعه ChiGlu در آن به صورت همسو با کاست PR-1a می‌باشد (ب): 1، 3، 4، 5، 6 و 7: کلونی‌های حاوی حامل پلاسمیدی pBI121PRP-1ChiGlu، که جهت‌گیری قطعه ChiGlu در آن به صورت ناهمسو با کاست PRP-1 می‌باشد، 2: کلونی‌های حاوی حامل پلاسمیدی pBI121PRP-1ChiGlu، که جهت‌گیری قطعه ChiGlu در آن به صورت همسو با کاست PRP-1 می‌باشد.

Figure 11. Determination of orientation chitinase and glucanase genes in pBI121PR-1a and pBI121PRP-1 using chitinase forward and PR-1a and PRP-1 reverse primers. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas). (a) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 and 10: Colonies containing pBI121PR-1aChiGlu with indirect orientation of ChiGlu fragment with PR-1a. 7 and 9: Colonies containing pBI121PR-1aChiGlu with direct orientation of ChiGlu fragment with PR-1a. (b) 1, 3, 4, 5, 6 and 7: Colonies containing pBI121PRP-1ChiGlu with indirect orientation of ChiGlu fragment with PRP-1. 2: Colonies containing pBI121PRP-1ChiGlu with direct orientation of ChiGlu fragment with PRP-1.



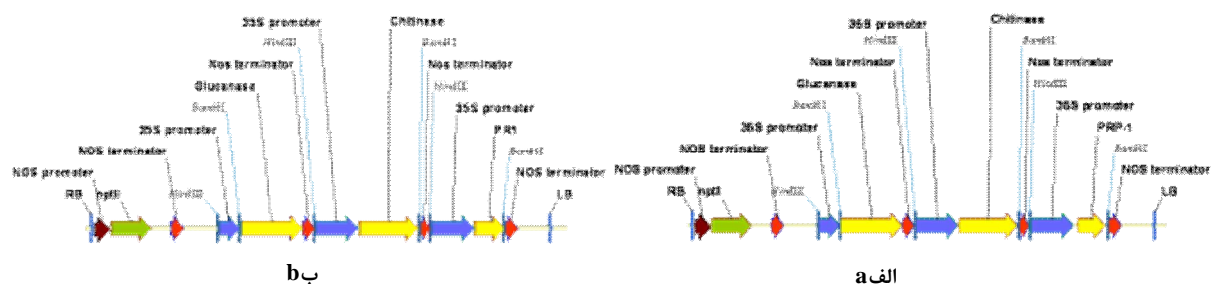
شکل 12- بررسی حضور و جهت ژن‌های PR-1a و PRP-1. در حامل‌های پلاسمیدی ساخته شده با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم *XhoI*. M: نشانگر وزن مولکولی 1 kb Plus DNA Ladder. 1: حامل پلاسمیدی pBI121PR-1aChiGlu(+) شامل کاست ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز (Fermentas)، 2: حامل پلاسمیدی pBI121PR-1aChiGlu(-) شامل ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز ناهمسو با کاست ژن PR-1a، 3: حامل پلاسمیدی pBI121PRP-1ChiGlu(+) شامل کاست ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز همسو با کاست ژن PR-1a، 4: حامل پلاسمیدی pBI121PRP-1ChiGlu(-) شامل کاست ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز ناهمسو با کاست ژن PRP-1.

Figure 12- Determination of present and orientation chitinase and glucanase genes in pBI121PR-1a and pBI121PRP-1 using *XhoI*. M. DNA ladder 1Kb (Fermentas). 1. pBI121PR-1aChiGlu(+) with direct orientation of ChiGlu fragment with PR-1a; 2. pBI121PR-1ChiGlu(-) with indirect orientation of ChiGlu fragment with PR-1a; 3. pBI121PRP-1aChiGlu(+) with direct orientation of ChiGlu fragment with PRP-1; 4. pBI121PRP-1ChiGlu(-) with indirect orientation of ChiGlu fragment with PRP-1.



شکل 13- نقشه فیزیکی دو حامل پلاسمیدی (الف): pBI121PRP-1ChiGlu(-) و (ب): pBI121PR-1aChiGlu(-).

Figure 13- Physical map of (a) pBI121PRP-1ChiGlu(-) and (b) pBI121PR-1aChiGlu(-).



شکل 14- نقشه فیزیکی دو حامل پلاسمیدی (الف): pBI121PRP-1ChiGlu(+) و (ب): pBI121PR-1aChiGlu(+).

Figure 14- Physical map of (a) pBI121PRP-1ChiGlu(+) and (b) pBI121PR-1aChiGlu(+).

ژنوتیپ‌های عامل بیماری‌زا مقاوم باشند. مقاومت تک‌ژنی در گیاهان منجر به نتیجه سریع‌گزینش در ژنوتیپ‌های عوامل بیماری‌زا می‌گردد که مقاومت گیاهان را می‌شکند. بنابراین تهیه ناقل پلاسمیدی که دارای چندین ژن کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی تحت پیشبرهای مستقل قوی باشد، راهکار مناسبی جهت تولید گیاهان تراریخته مقاوم می‌باشد. حامل‌های حاصل از این تحقیق علاوه بر پتانسیل ایجاد اثرات هم‌فزایی کیتیناز و بتا 1 و 3-گلوکاناز نگرانی حاصل از احتمال سازگاری عوامل بیماری‌زا و شکستن مقاومت را تا حدود زیادی کاهش می‌دهد. از سوی دیگر بیان خود سرشت PR1 در این حامل که القاکننده سایر ژن‌های PR در گیاه است، علاوه بر اثرات مثبت بر روی عملکرد آنزیم‌های کیتیناز و بتا 1 و 3-گلوکاناز، سایر ژن‌های مربوط به مکانیزم‌های دفاعی گیاه را نیز

انتظار می‌رود پس از انتقال هر یک از حامل‌های نوترکیب حاصل از این پژوهش به گیاه، با توجه به این که سه ژن از خانواده PR را با جهت‌های مختلف نسبت به هم دارا هستند اثرات هم‌فزایی مقاومت به طیف وسیعی از پاتوژن‌های قارچی ایجاد گردد. تاکنون تعدادی سازه انتقال ژن به گیاه حاوی ژن‌های مربوط به پروتئین‌های ضدقارچی در کشور ساخته شده است که تک ژنی یا نهایتاً دو ژنی بوده یعنی یک یا دو ژن رمزکننده پروتئین‌های ضد قارچی را حمل می‌کنند (Esfahani et al., 2010; Mohsenpour et al., 2008; Tohidfar et al., 2005). در این پژوهش سازه‌ای حاوی سه نوع مختلف از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی یعنی گروه‌های PR1, PR2 و PR3 ساخته شد. از آنجایی که برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری با مقاومت پایدار، ضروری است که گیاهان به همه

فعال نموده که انتظار می‌رود باعث تولید گیاهانی برابر با بکتری‌ها و دیگر تنش‌های زنده و غیر زنده با مقاومتی بالا نه‌تنها در برابر قارچ‌ها بلکه حتی در محیطی گردد.

منابع

- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993). Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein-1a. Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A. 90: 7327-7329.
- Brogliè K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ, Brogliè R (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen, *Rhizoctonia solani*. Science 254: 1194-1198.
- Cornelissen BJC, Horowitz J, Van Kan JAL, Goldberg RB, Bol JF (1987). Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. Nucleic Acids Research 15: 6799-6811.
- Datta K, Velazhahan R, Oliva N, Ona I, Mew T, Khush GS, Muthukrishnan S, Datta SK (1999). Over-expression of the cloned rice thaumatin-like protein (PR-5) gene in transgenic rice plants enhances environmental friendly resistance to *Rhizoctonia solani* causing sheath blight disease. Theoretical and Applied Genetics 98:1138-1145.
- Edreva A (2005). Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology 31: 105-124.
- Esfahani K, Motallebi M, Zamani M R, Hashemi Sohi H, 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.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf R, Leah R, Schell J, Maas C, (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. Plant Journal 8: 97-106.
- Jongedijk E, Tigelaar H, van Roekel JSC, Bres-Vloemans SA, Dekker I, Van den Elzen PJM, Cornelissen BJC, Melchers LS (1995). Synergetic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 85: 173-180.
- Lusso M, Kuc J (1966). The effect of sense and antisense expression of the PR-N gene for β -1,3-glucanase on disease resistance of tobacco to fungi and viruses. Physiology Molecular Plant Pathology 49: 267-270.
- Masoud SA, Zhu Q, Lamb C, Dixon R A (1996). Constitutive expression of an inducible β -1,3-glucanase in alfalfa reduces disease severity caused by the oomycete pathogen *Phytophthora megasperma* f. sp *medicaginis*, but does not reduce disease severity of chitin-containing fungi. Transgenic Research 5:313-318.
- Matsuoka M, Yamamoto N, Kano-Murakami Y, Tanaka Y, Ozeki Y, Hirano H, Kagawa H, Oshima M, Ohashi Y (1986). Classification and structural comparison of full-length cDNAs for pathogenesis-related proteins. Plant Physiology 85: 942-950.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue, II: Inhibition of fungal growth by combination of chitinase and beta-1,3-glucanase. Plant Physiology 88: 936-942.

- Mohsenpour M, Babaeian jelodar NA., Tohidfar M, Habashi AA (2008). Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and Bt genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, University of Gorgan 14: 112-124.
- Moore AE, Stone BA (1972). Effect of senescence and hormone treatment on the activity of a β -1,3-glucan hydrolase in *Nicotiana glutinosa* leaves. *Planta* 104: 93-101.
- Payne G, Middlesteadt W, Desai N, Williams S, Dincher S, Carnes J, Ryals J (1989). Isolation and sequence of a genomic clone encoding the basic form of pathogenesis-related protein 1 from *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology* 12: 595-603.
- Pfzner AJP, Pfzner UM, Goodman HM (1990). Nucleotide sequences of two *PR-1* pseudogenes from *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38. *Nucleic Acids Research* 18: 3404-3414.
- Pfzner UM, Goodman HM (1987). Isolation and characterization of cDNA clones encoding pathogenesis-related proteins from tobacco mosaic virus infected tobacco plants. *Nucleic Acids Research* 15: 4449-4455.
- Pfzner UM, Pfzner AJP, Goodman HM (2011). DNA sequence analysis of a *PR-1a* gene from tobacco: molecular relationship of heat shock and pathogen responses in plants. *Molecular Gene and Genetic* 211: 290-295.
- Poupard P, Parisi L, Campion C, Ziadi S, Simoneau P (2003). A wound- and ethenoninducible *PR-10* gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and incompatible race of *Venturia inaequalis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 3-12.
- Robert N, Ferran J, Breda C, Coutos-Thevenot P, Boulay M, Buffard D, Esnault R (2001). Molecular characterization of the incompatible interactions of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*: expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein. *European Journal of Plant Pathology* 107: 249-261.
- Sambrook J, Russel DW (2000). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sarowar S, Jin KY, Nam KE, Kim KD, Hwang BK, Islam R, Shin JSH (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* 24: 216-224.
- Sarowar SYJ, Kim E.N, Kim KD, Kim BK, Hwang R, Islam J S, Shin K (2005). Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* 24: 216-224.
- Schaller AP, Roy N, Amrhein H (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin. *Planta* 210: 599-606.
- Schultheiss HLC, Dechert J, Kiraly K, Fodor KH, Michel R, Kogel H (2003). Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* 165: 1275-1280.
- Tohidfar M, Ghareyazie B, Mohammadi M (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using a heterologous bean chitinase gene, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 83:83-96.
- Tonon CG, Guevara C, Oliva G (2002). Isolation of a potato acidic 39 kDa β -1,3- glucanase with antifungal activity against *Phytophthora infestans* and analysis of its expression in potato cultivars differing in their degrees of field resistance. *Journal of Phytopathology* 150: 189-195.
- Van Loon LC (1985). Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 4: 111-116.

- Wessels JGH, Sietsma J H (1981). Fungal cell walls: a survey, in *Encyclopedia of Plant Physiology. Plant Carbohydrates II*, Vol. 13B, Tanner, W. and Loewus, F. A., Eds., Springer Verlag, Berlin, pp 352.
- Wu J H, Dimitman JE (1970). Leaf structure and callose formation as determinants of TMV movement in bean leaves as revealed by UV irradiation experiments. *Virology* 40: 820-826.
- Yoshikawa M, Tsuda M, Takeuchi Y (1993). Resistance to fungal diseases in transgenic tobacco plants expressing the phytoalexin elicitor-releasing factor, β -1,3-endoglucanase, from soybean, *Naturwiss* 80: 417-423.

Isolation and Cloning of Two Genes from PR1 Family and Construction of Treble Plasmids Containing 3 Groups of Genes for Producing Transformed Plants Resistant to Fungal Diseases

Raufi A.¹, Tohidfar M.*², Soluki M.³, Mohsenpour M.⁴

¹ MSc. Student Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

² Assistant Professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran.

Assistant Professor of Zabol University, Agricultural College, Zabol, Iran.

⁴ PhD, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Karaj, Iran

Abstract

Fungal diseases are among the most important biotic stresses causing considerable losses in agricultural products. Improving crop plants with broad resistance to fungal diseases is one of the main challenges in agriculture. Classical plant breeding is too timely and has many other limitations, hence using biotechnology for this purpose is inevitable. Expression of a complex of Pathogen Related proteins induces polygenic resistance in plants. This technique leads to a broad and stable resistance to fungal pathogens. Hence, in this study we isolated resistance genes and constructed treble plasmid vectors with multiple genes involving three important families of disease-related proteins namely PR1, PR2, and PR3. For this purpose we isolated two genes of PR1 family with special primer design from tobacco genome, first. After analysis the accuracy of gene isolation using 35S promoter and Nos terminator, they were cloned in binary vector pBI121. Then, we cloned two important antifungal genes including PR2 (glucanase) and PR3 (chitinase) under the control of regulatory independent regions in T-DNA of the above mentioned vector with parallel and antiparallel orientations. These treble vectors have good antibacterial potential too and can be used for resistance to bacteria and other biotic and abiotic stresses. They can be introduced into plants using particle gun or through Agrobacterium mediated transformation.

Key words: *Gene cloning, Chitinase, Glucanase, Pathogen Related proteins, PR1.*

* Corresponding Author: Tohidfar M.

Tel: 02632703536

Email: gtohidfar@abrii.ac.ir