

## طراحی و ساخت چهار حامل پلاسمیدی نو ترکیب مناسب برای انتقال ژن های کیتیناز، گلوکاناز و Bt به گیاهان

\*مطهره محسن پور<sup>۱</sup>، نادعلی بابائیان جلودار<sup>۲</sup>، مسعود توحیدفر<sup>۳</sup> و علی اکبر حبشی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، <sup>۲</sup>استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه علوم

کشاورزی و منابع طبیعی ساری، <sup>۳</sup>استادیار موسسه تحقیقات بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:

### چکیده

چهار ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاه، از طریق ساخت کاست های ژنی برای ژن های بتا-۱ و ۳- گلوکاناز از منشأ جو، کیتیناز از منشأ لوبیا و *(Bt) cryIA(b)*، با قرار دادن هر یک از این ژن ها تحت پیشبر *CaMV35S* و پایان بر *Nos* در حامل پلاسمیدی دوگانه *pBI121* تهیه گردید. ژن های کیتیناز و بتا-۱ و ۳- گلوکاناز با کد کردن پروتئین هایی ضدقارچی، به ترتیب کیتین و گلوکان را که از اجزای اصلی دیواره سلولی بسیاری از قارچ های بیماری زا می باشند، تجزیه کرده و مقاومت گیاهان را در برابر بیماری های قارچی، افزایش می دهند. ژن *cryIA(b)* نیز با کد کردن پروتئین حشره کش، باعث از بین رفتن آفات پروانه ای خواهد شد. پلاسمیدهای نو ترکیب *pBI-Glu* و *pBI-Chi* به ترتیب با کلون سازی ژن های کیتیناز و بتا-۱ و ۳- گلوکاناز در محل ژن *gus* پلاسمید *pBI121*، ساخته شدند. ساخت پلاسمید نو ترکیب *pBI-ChiGlu* به گونه ای انجام گرفت که کاست های کامل هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز را برای ایجاد اثرات هم افزایی این دو ژن، در برابر عوامل بیماری زا قارچی در برگیرد. پلاسمید نو ترکیب *pBI-ChiBt* نیز که حاوی کاست های کامل ژن های کیتیناز و *Bt* می باشد، با هدف استفاده از آن برای انتقال ژن به منظور ایجاد مقاومت همزمان گیاهان به عوامل بیماری زا قارچی و آفات، در یک رویداد واحد انتقال ژن، تهیه گردید. این چهار حامل پلاسمیدی نو ترکیب می توان در انتقال ژن به گیاهان، با استفاده از آگروباکتریوم و نیز سایر روش های انتقال ژن، نظیر تفنگ ژنی، استفاده کرد.

**واژه های کلیدی:** پلاسمید نو ترکیب، کلون سازی، کیتیناز، گلوکاناز، *Bt*

### مقدمه

متمرکز شده است. آنزیم کیتیناز، کیتین را که یکی از اجزای مهم تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ هایی از قبیل آسکومیست ها، بازیدیومیست ها و دتوترومیست ها می باشد، تجزیه می کند (کولینگ و همکاران، ۱۹۹۳). کیتینازهای مختلف، از گونه های مختلف گیاهی و منابع دیگر، در تعدادی از محصولات بیان شدند و اثراتی در برابر پاتوژن های متنوع قارچی از خود نشان دادند

در حال حاضر، اکثر استراتژی ها برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به بیماری های قارچی، بر ژن های کدکننده پروتئین های مربوط به بیماری زایی *PR*<sup>۱</sup> به ویژه خانواده های *PR2* (گلوکانازها) و *PR3* (کیتینازها)،

\*- مسئول مکاتبه: mthrh@yaho.com

1- Pathogenesis Related Protein

(توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۵؛ مرسدزدانا و همکاران، ۲۰۰۶؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۷). این اثرات عمدتاً کاهش توسعه قارچ و تعداد و اندازه آسیب‌ها را اثبات می‌کرد. از طرفی آنزیم بتا-۱ و ۳-گلوکاناز نیز قادر است گلوکان موجود در دیواره سلولی ریشه قارچ را تجزیه کند و موجب تشدید خسارات وارده به قارچ شود. از طرف دیگر ثابت شده است که این آنزیم سبب تشدید فعالیت آنزیم کیتیناز نیز می‌شود و بنابراین در صورت وجود این دو آنزیم در یک گیاه تراریخته، گیاه مذکور قادر خواهد بود که مقاومت بهتر و پایداری را در برابر طیف وسیعی از قارچ‌ها از خود نشان دهد (ماوچ و همکاران، ۱۹۸۸؛ ژانگ و همکاران، ۲۰۰۵). بنابراین مهندسی ژن‌های کدکننده کیتیناز به همراه سایر ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی در گیاهان، حفاظت آنها را در برابر پاتوژن‌های قارچی افزایش می‌دهد. این مسیر می‌تواند به کنترل طیف وسیعی از پاتوژن‌های منجر شود. انتقال ژن‌های حشره‌کش *Bt* برگرفته از باکتری *Bacillus thuringiensis* به گیاهان، حفاظت آنها را در مقابل حمله حشره، بدون کمک سموم شیمیایی میسر می‌سازد. پروتئین کریستالی *CryIA(b)* که به وسیله استرین *Krustaki HD-1* کد می‌شود، علیه لارو پروانه‌ها موثر می‌باشد (ساتون و همکاران، ۱۹۹۲). کاربرد گیاهان تراریخته با ژن‌های حشره‌کش *Bt*، می‌تواند به‌طور معنی‌داری هزینه کنترل آفات را کاهش دهد. بیش از ۳۰ گونه گیاهی هم‌اکنون به‌طور موفقیت‌آمیزی با این ژن تراریخت شده‌اند (رانجان، ۲۰۰۲).

این تحقیق با هدف کلی طراحی و ساخت ناقل‌های پلاسمیدی مناسب و قابل استفاده برای انتقال ژن‌های مقاومت به بیماری‌های قارچی و آفات به گیاهان، انجام گرفت. این هدف کلی موارد زیر را شامل می‌شد:

- طراحی و ساخت کاست ژنی برای ژن کیتیناز با افزودن پیشبر و پایانبر مناسب به منظور بیان خودسرشت و بالا در گیاهان و کلون‌سازی آن در ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان دارای پتانسیل ایجاد

مقاومت به بیماری‌های قارچی.

- طراحی و ساخت کاست ژنی برای ژن بتا-۱ و ۳-گلوکاناز با افزودن پیش‌بر و پایان‌بر مناسب به‌منظور بیان خودسرشت و بالا در گیاهان و کلون‌سازی آن در ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان دارای پتانسیل ایجاد مقاومت به بیماری‌های قارچی.

- طراحی و ساخت ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان حاوی کاست‌های کامل هر دو ژن کیتیناز و بتا-۱ و ۳-گلوکاناز، دارای پتانسیل ایجاد اثرات هم‌افزایی این پروتئین‌ها و ایجاد مقاومت در برابر انواع بسیاری از قارچ‌ها و جلوگیری از احتمال شکسته شدن مقاومت، با انجام یک رویداد واحد انتقال ژن و بدون نیاز به هرم‌بندی این ژن‌ها.

- طراحی و ساخت ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان حاوی کاست‌های کامل دو ژن کیتیناز و *(b cryIA)* (*Bt*)، دارای پتانسیل ایجاد محصولات گیاهی مقاوم، هم در برابر بیماری‌های قارچی، هم در برابر آفات و تنها با انجام یک رویداد واحد انتقال ژن.

- قابلیت استفاده از این ناقل‌های پلاسمیدی نوترکیب برای استفاده هم در روش انتقال به واسطه آگروباکتریوم، هم در روش انتقال با تفنگ ژنی به گیاهان.

## مواد و روش‌ها

**باکتری و پلاسمیدهای مورد استفاده:** در این تحقیق از باکتری *E. coli* سویه *Cinna Gen XLI-blue* (*Cinna Gen B76-50c*) استفاده شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل پلاسمیدهای *pCambia1390* حامل ژن گلوکاناز جو، با نشانگر انتخابی مقاومت به کانامایسین، پلاسمید *pGEM-7Z* (*Cinna Gene P76-07v*)، حاوی نشانگر انتخابی مقاومت به آمپی‌سلین و ژن *LacZ'* دارای جایگاه برشی چندگانه<sup>۱</sup>، پلاسمید دوگانه *pBI121 gus* (Clontech, Washington, DC) حاوی ژن

تحت پیش‌بر CaMV35S و ژن *nptII* با پیش‌بر Nos به‌عنوان نشانگر انتخابی<sup>۱</sup> مقاومت به کانامایسین و نیز پلاسمید pGEM4Z-Bt حامل ژن *cryIA(b)* بود.

علاوه بر اینها از پلاسمیدهای نو ترکیب *pGEM-Chi* (توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۵) حاوی ژن کیتیناز لوبیا و پلاسمید نو ترکیب *pCaMV-Glu* (محسن‌پور و همکاران، ۲۰۰۷) حاوی ژن گلوکاناز جو نیز استفاده گردید. آنزیم‌های به کار رفته در این تحقیق از شرکت Roche تهیه گردیدند.

استخراج پلاسمید، واکنش هضم با آنزیم‌های اندونوکلاز نوع II، تهیه باکتری‌های مستعد، واکنش اتصال<sup>۲</sup>، فسفرزدایی و استفاده از آنزیم کلنو، طبق دستورالعمل‌های سمبروک و راسل (۲۰۰۰) انجام شد.

ساخت پلاسمید نو ترکیب *pBI-Glu*: ابتدا قطعه مربوط به ORF ژن گلوکاناز که در حامل پلاسمیدی pCAMBIA1390 قرار داشت توسط آنزیم *EcoRI* هضم و قطعه مورد نظر با طول ۱۲۲۱bp از روی ژل آگارز خالص سازی گردید. پلاسمید pGEM7Z، نیز با *EcoRI* هضم و برای جلوگیری از خوداتصال پلاسمیدی با استفاده از آنزیم آلکالین فسفاتاز فسفرزدایی شد. پس از انجام واکنش اتصال، مخلوط حاصل به سلول‌های مستعد، با استفاده از روش شوک حرارتی تراریزش شد (آن، ۱۹۸۷). غربال‌گری باکتری‌های تراریخته در محیط LB آگار حاوی آمپی‌سیلین به‌عنوان نشانگر انتخابی و سوبسترای به نام X-gal<sup>۳</sup> (شبه لاکتوز) و یک القاکننده به نام IPTG<sup>۴</sup> براساس انتخاب کلونی‌های سفید از میان کلونی‌های آبی انجام گرفت (سمبروک و راسل، ۲۰۰۰). پس از تأیید پلاسمید نو ترکیب *pGEM7Z-Glu* (شکل ۱- الف) از لحاظ حضور ORF با جهت صحیح، قطعه مربوط به ORF با استفاده از آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* از MCS ناقل پلاسمیدی

حدواسط، خارج و خالص‌سازی شد. pBI121 نیز توسط آنزیم‌های *XbaI* و *SacI* برش خورده، قطعه مربوط به پلاسمید پس از خروج بتاگلوکورونیداز، از روی ژل آگارز (با استفاده از Agarose Gel DNA Extraction Kit شرکت Roche) خالص‌سازی گردید. واکنش اتصال ORF گلوکاناز با pBI121 انجام شد و مخلوط اتصال به درون سلول‌های مستعد<sup>۵</sup> *E. coli* تراریزش گردید (آن، ۱۹۸۷)، و روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین که نشانگر انتخابی پلاسمید pBI121 می‌باشد، پخش شد (چن و همکاران، ۲۰۰۳). کلونی‌های حاصل پس از استخراج پلاسمید با استفاده از هضم آنزیمی به منظور بررسی ورود ژن گلوکاناز ارزیابی گردیدند.

ساخت پلاسمید نو ترکیب *pBI-Chi*: پلاسمید *pBI-Chi* به منظور اهداف بعدی (ساخت *pBI-ChiGlu* و *pBI-ChiBt*) باید طوری ساخته می‌شد که محل شناسایی واحدی برای آنزیم *HindIII* داشته باشد. بنابراین ابتدا می‌بایست محل شناسایی آنزیم *HindIII* در ناقل حدواسط *pGEM7Z-Chi* (حاوی ORF ژن کیتیناز که قبلاً توسط توحیدفر و همکاران (۲۰۰۵)، ساخته شده بود) حذف شود. به این منظور ابتدا *pGEM7Z-Chi* با آنزیم *HindIII* هضم آنزیمی گردید. پلاسمید حاصل خطی شده با *HindIII* از روی ژل آگارز خالص‌سازی شد. پایانه‌های چسبنده *HindIII* در دو سوی *pGEM7Z-Chi*، تحت واکنش با آنزیم کلنو قرار داده شد تا پایانه‌های صاف در دو سوی قطعه ایجاد گردند (سمبروک و راسل، ۲۰۰۰) و سپس در معرض آنزیم T4 لیگاز، برای حلقوی شدن مجدد پلاسمیدی قرار داده شد. استخراج پلاسمید از کلونی‌های حاصل در محیط انتخابی به منظور بررسی حذف جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* از انتهای ORF ژن گلوکاناز انجام شد. پلاسمید حاصل موسوم به *pGEM7Z-Chi(-H)* (شکل ۱- ب)، با آنزیم‌های *XbaI* و *SacI*

- 1- Selectable Marker
- 2- Ligation
- 3- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-Galactopyranoside
- 4- Isopropyl-1-β-D-Thio-1-Galactopyranoside

5- Competent

توسط آنزیم *HindIII* جدا و قطعه مربوطه با طول ۲۹۹۷bp، خالص سازی گردید. پلاسمید نو ترکیب pBI-35SP + *Chi*، حاوی کاست کامل ژن کیتیناز (*Chi*)، که مراحل ساخت آن قبلاً توضیح داده شد نیز با آنزیم *HindIII* هضم و پلاسمید خطی شده، پس از خالص سازی برای جلوگیری از خود اتصالی پلاسمیدی فسفرزدایی شد. پس از انجام واکنش اتصال، مخلوط حاصل به باکتری های *E. coli* مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی، تراریزش شد و باکتری های نو ترکیب در محیط انتخابی LB آگار به همراه کانامایسین تشکیل کلونی دادند. کلونی های حاصل پس از استخراج پلاسمید از نظر حضور ژن های *Bt* و کیتیناز با استفاده از هضم آنزیمی و PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از پرایمرهای

اختصاصی طراحی شده برای کیتیناز (رو به جلو

5'GAGTGGTGTGGATGCTGTTG3'

و رو به عقب

5'GCCATAACCGACTCCAAGCA3'

گلوکاناز (رو به جلو

5'GAACATCAAGTACATCGCCG3'

و رو به عقب

5'GCTACACGTACTAGAAGCTGG3'

و *Bt* (رو به جلو

5'CTCTAGGTTGGAAGGATTGAG

و رو به عقب

5'GTGAGCATCGGTGTAGATAG3'

و ترکیب واکنش ۲۵ میکرو لیتری حاوی یک واحد آنزیم Taq پلی مراز، ۱۵ نانوگرم DNA، ۶۰ نانوگرم پرایمر، یک میکرو لیتر dNTP (۱۰ میلی مولار)، ۳/۲ میکرو لیتر  $MgCl_2$  (۱۵ میلی مول)، ۲/۵ میکرو لیتر بافر PCR (۱۰X) در ۳۰ چرخه و هر چرخه شامل یک دقیقه دمای واسرشته شدن ۹۴ درجه، یک دقیقه دمای چسبیدن ۶۰ درجه و سه دقیقه دمای تکثیر ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. تکثیر با پرایمرهای اختصاصی مذکور برای

هضم و قطعه مربوط به ORF ژن کیتیناز با طول ۱۲۱۱ bp از روی ژل آگارز (با استفاده از Agarose Gel DNA Extraction Kit شرکت Roche)، خالص گردید. واکنش اتصال ORF ژن گلوکاناز با pBI121 انجام شد و مخلوط اتصال به درون سلول های مستعد *E. coli* تراریزش گردید (آن، ۱۹۸۷) و روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین (چن و همکاران، ۲۰۰۳) پخش شد. کلونی های حاصل پس از استخراج پلاسمید به منظور تأیید ورود ژن مورد بررسی قرار گرفتند.

**ساخت پلاسمید نو ترکیب pBI-ChiGlu:** مراحل ساخت این پلاسمید که با هدف دارا بودن کاست های کامل ژن های کیتیناز و گلوکاناز در ناحیه T-DNA پلاسمید دوگانه pBI121 طراحی شد، به این صورت انجام گرفت: ابتدا pCaMV-Glu که قبلاً توسط نویسنده ساخته شده بود (محسن پور و همکاران ۲۰۰۷)، توسط *HindIII* هضم آنزیمی شد. قطعه مربوط به ژن گلوکاناز (35SP + *Glu* + NosT) با اندازه ۱۹۱۳bp از روی ژل آگارز خالص سازی گردید. پلاسمید نو ترکیب pBI-Chi حاوی کاست کامل ژن کیتیناز (*Chi* + NosT) که مراحل ساخت آن قبلاً توضیح داده شد نیز با آنزیم *HindIII* هضم و پلاسمید خطی شده، پس از خالص سازی، برای جلوگیری از خود اتصالی پلاسمیدی، فسفرزدایی شد. پس از انجام واکنش اتصال مخلوط حاصل به باکتری های *E. coli* مستعد، با استفاده از روش شوک حرارتی تراریزش شد و باکتری های نو ترکیب در محیط انتخابی LB آگار به همراه کانامایسین، تشکیل کلونی دادند. کلونی های حاصل پس از استخراج پلاسمید از لحاظ دارا بودن هر دو ژن کیتیناز و گلوکاناز توسط هضم آنزیمی و PCR مورد بررسی قرار گرفتند.

**ساخت پلاسمید نو ترکیب pBI-ChiBt:** این پلاسمید با هدف دارا بودن کاست های کامل ژن کیتیناز و *cryIA(b)* (Bt)، طراحی و به این صورت ساخته شد: کاست کامل ژن *cryIA(b)* تحت پیشبر CaMV35S و پایانبند Nos از ناقل حد واسط pGEM4Z-*cryIA(b)*

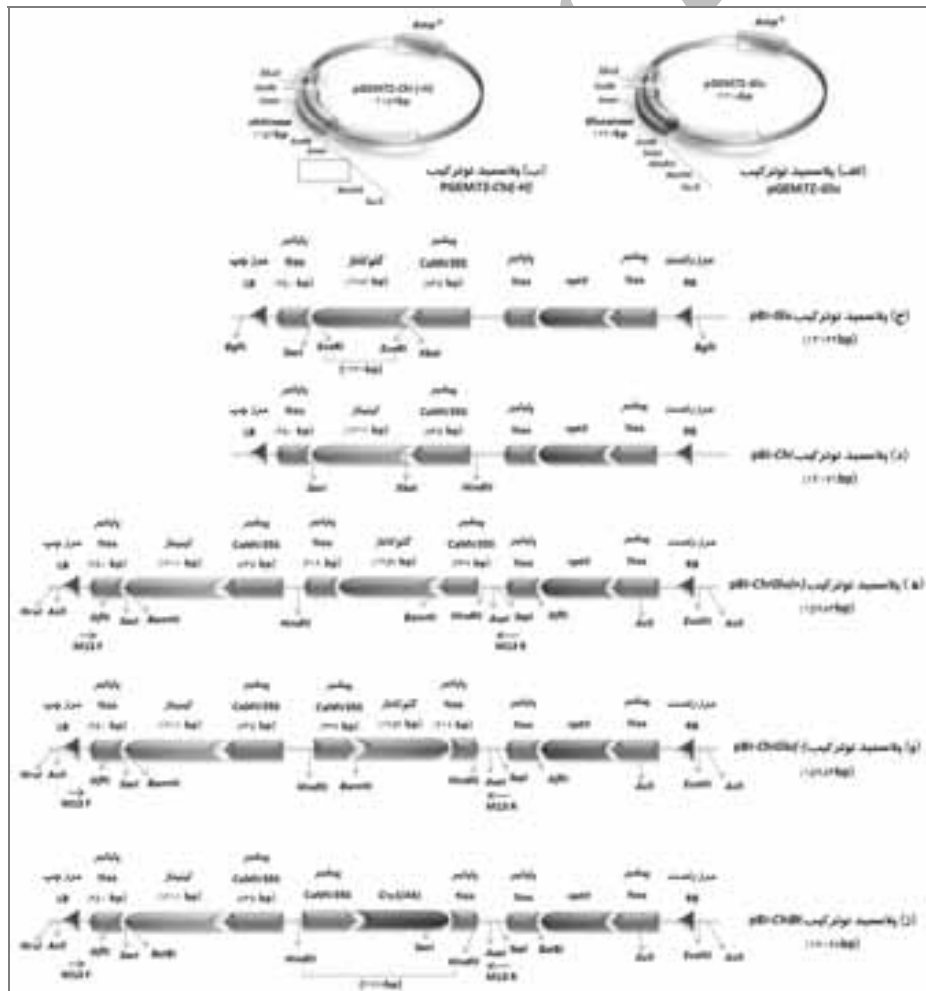
کیتیناز، گلوکاناز و Bt به ترتیب با انتظار ظهور باندهای ۸۷۲bp، ۶۸۰bp و ۶۴۰bp همراه خواهد بود.

کلون سازی مجدد این ژن در pBI121 با خروج ژن *gus* و مشاهده قطعه ۱۲۲۱bp مورد انتظار برای گلوکاناز تأیید گردید (شکل ۲-د).

### نتایج و بحث

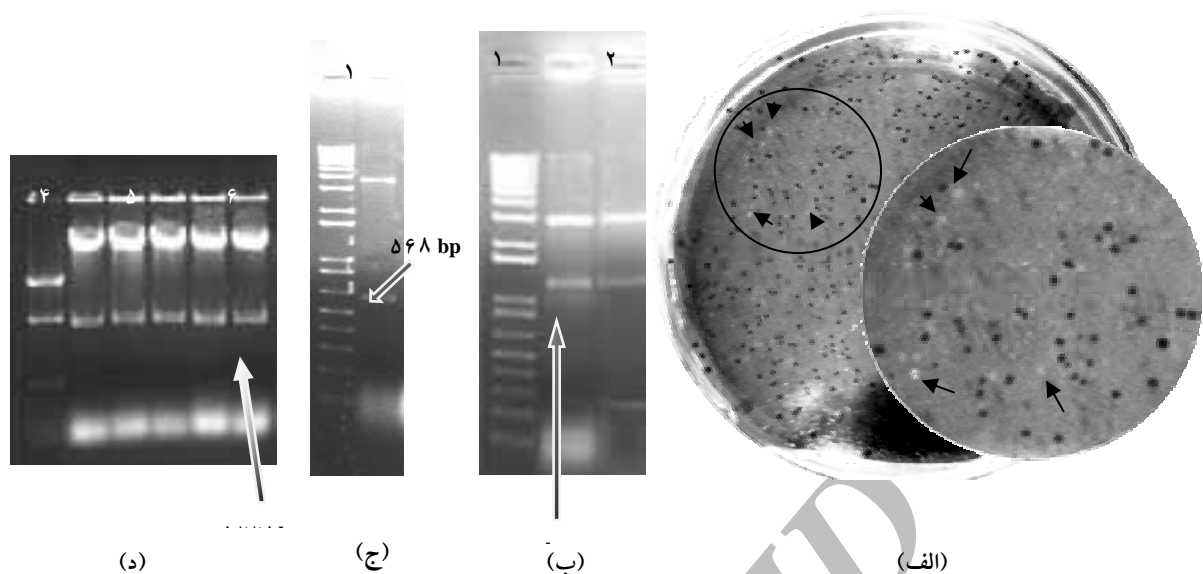
ساخت پلاسمید نو ترکیب **pBI-Glu**: ورود ORF ژن گلوکاناز به وکتور حدواسط **pGEM7Z-Glu**، پس از غربالگری اولیه روی محیط LB آگار حاوی آمپی سیلین، IPTG و X-gal به روش کلونی آبی- سفید (شکل ۲-الف) و سپس استخراج پلاسمید از کلونی های سفید و هضم با آنزیم *EcoRI* تأیید شد (شکل ۲-ب). صحت جهت قطعه مربوط به ORF با آنزیم *SmaI* مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲-ج) و الحاق ORF ژن گلوکاناز با

به این ترتیب پلاسمید نو ترکیب **pBI-Glu** (شکل ۱-ج)، که ژن گلوکاناز را تحت پیش بر *CaMV35S* و پایان بر *Nos* در ناحیه T-DNA ی خود به همراه نشانگر انتخابی *nptII* تحت پیش بر و پایان بر جداگانه *Nos* دارا می باشد، ساخته شد. این پلاسمید نو ترکیب، مناسب برای انتقال ژن به محصولات گیاهی به منظور ایجاد مقاومت به عوامل بیماری زای قارچی است.



شکل ۱- نمای شماتیک کاست های ژنی نو ترکیب و هفت ناقل پلاسمیدی نو ترکیب ساخته شده در این تحقیق:

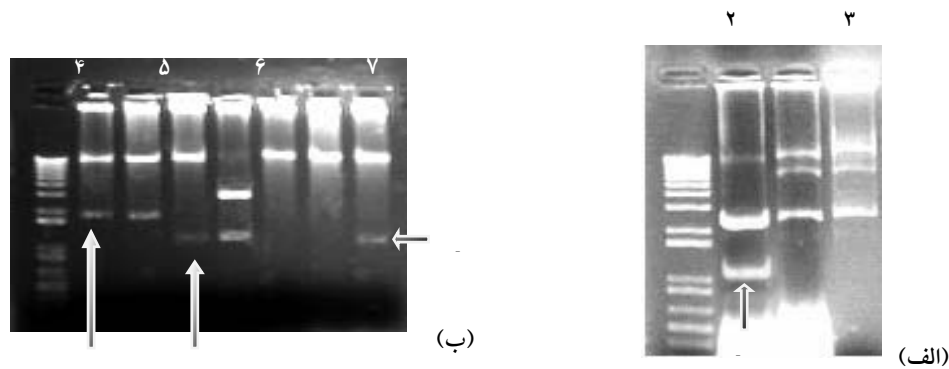
الف) pGEM7Z-Glu، ب) pGEM7Z-Chi(-H)، ج) pBI-Glu، د) pBI-Chi، ه) pBI-ChiGlu(+)، و) pBI-ChiGlu(-)، ز) pBI-ChiBt (فقط ناحیه T-DNA از ناقلین پلاسمیدی نو ترکیب: ج)، د)، ه)، و) و ز) در شکل نشان داده شده است).



شکل ۲- (الف) غربالگری براساس کلنی‌های آبی و سفید حاصل از تراریخته کردن باکتری‌های مستعد *E. coli* با مخلوط اتصال pGEM-7Z و ORF ژن گلوکاناز (فلش‌ها کلونی‌های سفید را نشان می‌دهند). (ب) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pGEM7Z-Glu، به منظور بررسی ورود ژن گلوکاناز: M- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder)، ۱- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pGEM7Z-Glu با آنزیم *EcoRI* (باند ۱۲۲۱ bp حضور ORF گلوکاناز را نشان می‌دهد). ۲- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pCaMV-Glu با آنزیم *EcoRI* (به‌عنوان شاهد اندازه ژن گلوکاناز). (ج) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pGEM7Z-Glu با آنزیم *SmaI* به‌منظور بررسی جهت قرار گرفتن ORF ژن گلوکاناز (باند ۵۶۸ bp جهت صحیح ORF گلوکاناز را نشان می‌دهد). (د) هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pBI-Glu به‌منظور بررسی ورود ژن گلوکاناز: ۱- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pCaMV-Glu با آنزیم *EcoRI* به‌عنوان شاهد اندازه ژن گلوکاناز. ۲- هضم آنزیمی پلاسمیدهای نو ترکیب pBI-Glu با آنزیم *EcoRI* به‌منظور بررسی حضور ژن گلوکاناز (باند خارج شده مربوط به ORF ژن گلوکاناز می‌باشد).

نمود (شکل ۳-ب). پلاسمید حاصل موسوم به pBI-Chi (شکل ۱-د)، ژن کیتیناز را تحت پیش‌بر CaMV35S و پایان‌بر Nos در ناحیه T-DNA خود به‌همراه کاست کامل ژن نشانگر مقاومت به کانامایسین (*nptII*) دارا بوده و مناسب برای انتقال ژن به محصولات گیاهی به‌منظور ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای فارچی می‌باشد.

ساخت پلاسمید نو ترکیب pBI-Chi عدم توانایی آنزیم *HindIII* برای خطی کردن پلاسمید نو ترکیب pGEM7Z-Chi(-H) با مشاهده الگوی بانندی مشابه این واکنش هضم با پلاسمید هضم‌نشده، تأیید گردید (شکل ۳-الف). هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب pBI-Chi با آنزیم‌های *SacI*، *XbaI* و *EcoRI*، کلون‌سازی صحیح ORF کیتیناز را در کلونی‌های نو ترکیب، تأیید

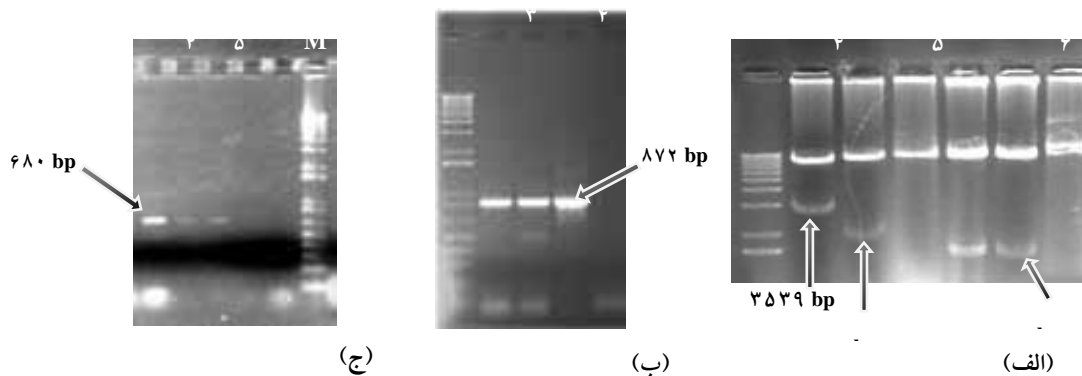


شکل ۳- الف) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pGEM7Z-Chi(-H)* به منظور بررسی حذف جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* و نیز حضور ژن کیتیناز. *M*- نشانگر اندازه ملکولی (*1Kb Plus DNA Ladder*). ۱- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pGEM7Z-Chi(-H)* با آنزیم های *XbaI* و *SacI* (باند ۱۲۱۱bp حضور *ORF* ژن کیتیناز را نشان می دهد). هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pGEM7Z-Chi(-H)* با آنزیم *HindIII*. ۳- پلاسمید اولیه *pGEM7Z-Chi* (هضم نشده). الگوی بانندی مشابه در ستون های ۳ و ۴، حذف جایگاه شناسایی آنزیم *HindIII* را در پلاسمید نو ترکیب تأیید می کند. سه باند مشاهده شده مربوط به اشکال مختلف پلاسمید (سوپرکویل، حلقوی و خطی) می باشد.

ب) هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pBI-Chi* به منظور بررسی ورود ژن کیتیناز. *M*- نشانگر اندازه ملکولی (*1Kb Plus DNA Ladder*). ۱ و ۲- هضم آنزیمی پلاسمید *pBI121* با آنزیم های *XbaI* و *SacI* (باند خارج شده مربوط به ژن *gus* می باشد). ۳- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pBI-Chi* با آنزیم های *XbaI* و *SacI* به منظور بررسی حضور ژن کیتیناز (باند خارج شده مربوط به *ORF* ژن کیتیناز می باشد). ۴- هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب *pGEM7Z-Chi(-H)* با آنزیم *XbaI* و *SacI* (باند خارج شده مربوط به *ORF* ژن کیتیناز می باشد). ۵ و ۶- هضم آنزیمی پلاسمید *pBI121* با آنزیم *EcoRI*. ۷- هضم آنزیمی پلاسمید *pBI-Chi* با آنزیم *EcoRI* به منظور بررسی حضور ژن کیتیناز (باند خارج شده مربوط به *ORF* ژن کیتیناز می باشد).

PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده برای ژن های کیتیناز و گلوکاناز نیز به ترتیب باندهای مورد انتظار ۷۸۲bp (شکل ۴- ب) و ۶۸۰bp (شکل ۴- ج) را ظاهر نمود. بدین ترتیب پلاسمید نو ترکیب *pBI-ChiGlu* که دارای ژن های کیتیناز و گلوکاناز، تحت پیشبرهای جداگانه *CaMV35S* و پایان برهای جداگانه *Nos*، در ناحیه T-DNA خود بوده و ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) را به عنوان نشانگر انتخابی حمل می کند، ساخته شد. این پلاسمید مناسب برای انتقال ژن به محصولات گیاهی است و هر یک از ژن های کیتیناز و گلوکاناز، پس از ادغام موفقیت آمیز در ژنوم گیاهی، با دارا بودن نواحی تنظیمی خود، به طور مستقل از هم، رونویسی و ترجمه خواهند شد.

ساخت پلاسمید نو ترکیب *pBI-ChiGlu* ورود کاست کامل ژن گلوکاناز به پلاسمید نو ترکیب *pBI-Chi* توسط هضم با آنزیم *HindIII* و ظهور باند ۱۹۱۳bp تأیید گردید (شکل ۴- الف). به منظور بررسی جهت ژن های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به هم از آنزیم *BamHI* استفاده گردید (شکل ۴- الف). اگر کاست های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به هم در یک جهت قرار گرفته باشند هضم با این دو آنزیم منجر به ظهور باند ۳۵۳۹bp خواهد شد (این پلاسمید *pBI-ChiGlu(+)* (شکل ۱- ه) نامیده شد) و در صورتی که کاست های این دو ژن در خلاف جهت یکدیگر قرار گرفته باشند، واکنش آنزیمی چنین پلاسمیدی با آنزیم *BamHI* بانندی با طول ۲۴۹۹bp ایجاد خواهد نمود (این پلاسمید به *pBI-ChiGlu(-)* (شکل ۱- و) موسوم شد). انجام واکنش



شکل ۴- (الف) هضم آنزیمی پلاسمیدهای نوترکیب *pBI-GhiGlu*، به منظور بررسی حضور و جهت ژن های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به یکدیگر: M- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder). ۱ و ۲ و ۳- هضم با آنزیم *BamHI* به ترتیب برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI-GhiGlu(+)*، *pBI-GhiGlu(-)* و *pBI-Chi(-H)* و ۴ و ۵ و ۶- هضم با آنزیم *HindIII* به ترتیب برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121-ChiGlu(+)*، *pBI121-ChiGlu(-)* و *pBI121-Chi(-H)*. (ب) واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI-GhiGlu* برای بررسی حضور ژن کیتیناز: M- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder). ۱ و ۲ و ۳- واکنش PCR به ترتیب برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI-GhiGlu(+)*، *pBI-GhiGlu(-)* و *pBI-Chi(-H)* برای بررسی حضور ژن کیتیناز. ۴- واکنش PCR برای مخلوط مادری بدون DNA. (ج) واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI-GhiGlu* جهت بررسی حضور ژن گلوکاناز: ۱ و ۲ و ۳- واکنش PCR به ترتیب برای پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121-Glu*، *pBI-GhiGlu(-)* و *pBI-GhiGlu(+)* برای بررسی حضور ژن گلوکاناز. ۴- واکنش PCR برای پلاسمید نوترکیب *pBI-Chi(-H)* به عنوان شاهد منفی برای ژن گلوکاناز. ۵- واکنش PCR برای مخلوط مادری بدون DNA M- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder).

بوچنوئر، ۱۹۹۷؛ راسچر و همکاران، ۱۹۹۹؛ تونون و همکاران، ۲۰۰۲ و آناند و همکاران، (۲۰۰۴).  
 برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری با مقاومت پایدار، ضروری است که گیاهان به همه ژنوتیپ‌های عامل بیماری‌زا مقاوم باشند. عوامل بیماری‌زای خیلی تغییرپذیر ممکن است در راه ایجاد ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم مشکل ایجاد نمایند. مقاومت تک‌ژنی در گیاهان منجر به نتیجه سریع‌گزینش در ژنوتیپ‌های عوامل بیماری‌زا می‌گردد که مقاومت گیاهان را می‌شکنند. بنابراین تهیه ناقل پلاسمیدی که دارای چندین ژن کدکننده پروتئین‌های ضدقارچی، تحت پیش‌برهای مستقل قوی باشد، راهکار مناسبی برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به قارچ می‌باشد. پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiGlu* با دارا بودن ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز دارای پتانسیل ایجاد مقاومت بالا به دلیل اثرات هم‌مغزایی حاصل از حمل دو گروه از ژن‌های کدکننده پروتئین‌های مربوط به بیماری‌زایی (PR2 و PR3) و نیز مقاومت به انواع زیادی از بیماری‌های قارچی می‌باشد.

مدارک بسیاری مبنی بر اینکه PR پروتئین‌ها به عنوان فاکتورهای مقاومت به بیماری عمل می‌کنند، تأیید شده است. بیان خودسرشت PR پروتئین‌ها در گیاهان تراریخته‌ای که ژن‌های PR در آنها به میزان بالایی بیان شده است، به‌طور معنی‌داری با افزایش مقاومت به پاتوژن‌ها همراه بوده است (الکساندر و همکاران، ۱۹۹۳؛ باچمن و همکاران، ۱۹۹۸؛ ملچرز و همکاران، ۱۹۹۳ و ۱۹۹۸؛ داتا و همکاران، ۱۹۹۹؛ فاگوآگا و همکاران، ۲۰۰۱؛ اسچولتزیز و همکاران، ۲۰۰۳؛ توحیدفر و همکاران، ۲۰۰۵؛ ژائو و همکاران، ۲۰۰۷؛ گومز‌آریزا و همکاران، ۲۰۰۷). تجمع PRها در گیاهان، سبب القای ژن‌های SAR (سیستم اکتسابی مقاومت) می‌شود (وان لون، ۱۹۹۷؛ کوک، ۲۰۰۱؛ ادروا، ۲۰۰۴). به‌طوری‌که PRها در گیاهان تراریخته مقاوم، فعالیت ضد میکروبی بالایی را نشان داده‌اند (اینکرلی و همکاران، ۱۹۹۳؛ آنفوکا و

1- Overexpress



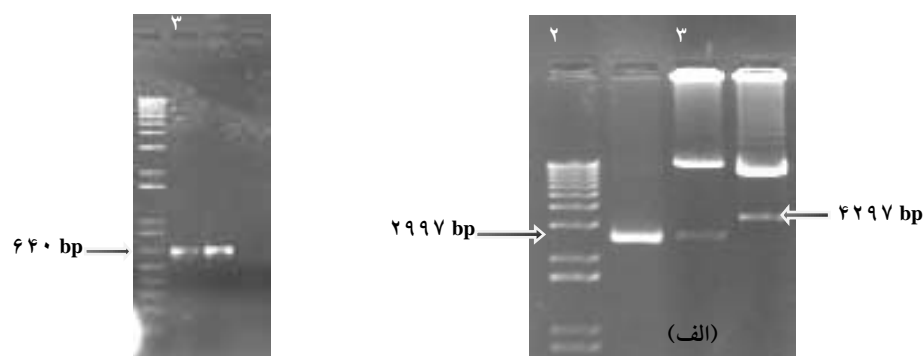
بوده و ژن مقاومت به کانامایسین (*nptII*) را به‌عنوان نشانگر انتخابی حمل می‌کند، مناسب برای انتقال ژن به گیاه بوده و انتظار می‌رود ژن‌های کیتیناز و *Bt* با دارا بودن نواحی تنظیمی خود، پس از ادغام کامل و موفقیت‌آمیز در ژنوم گیاه، به‌طور مستقل از هم رونویسی و ترجمه شوند. انتظار می‌رود ادغام موفقیت‌آمیز ناحیه *T-DNA* پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiBt* در ژنوم گیاهی، با بیان هر دو ژن کیتیناز و *Bt* گیاه را در برابر گروهی از عوامل بیماری‌زای قارچی و نیز آفات به‌طور همزمان مقاوم نماید. استفاده از پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiBt* برای تراریزش گیاهان، منجر به کاهش هزینه‌های انتقال جداگانه ژن‌های ایجادکننده مقاومت به قارچ و آفت در محصولات گیاهی شده و با وارد کردن همزمان این ژن‌های مقاومت به گیاه، دیگر به انجام مراحل وقت‌گیر و پرهزینه ایجاد گیاهانی که به‌طور جداگانه این ژن‌ها را دریافت نموده و سپس تلاقی آنها و انجام مراحل هرمنبندی ژنی به‌منظور دستیابی و شناسایی گیاهان تراریخته‌ای که دارای هر دو ژن باشند، نیازی نخواهد بود.

پلاسمیدهای نوترکیب طراحی شده در این تحقیق را علاوه‌بر استفاده به روش انتقال ژن توسط آگروباکتریوم، می‌توان در سایر روش‌ها از جمله تفنگ ژنی نیز مورد استفاده قرار داد. به‌منظور استفاده کارا از این پلاسمیدها در روش تفنگ ژنی، امکان برش کامل ناحیه *T-DNA* پلاسمیدهای نوترکیب طراحی شده در این تحقیق، با آنزیم‌های برشی فراهم است.

علاوه‌بر این دارا بودن این دو ژن، نگرانی حاصل از احتمال سازگاری عامل بیماری‌زا و شکستن مقاومت را تا حدود زیادی کاهش می‌دهد. تفاوت در جهت قرار گرفتن کاست‌های ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز و نواحی تنظیمی آنها نسبت به یکدیگر، در دو نوع مختلف پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiGlu(+)* و *pBI-ChiGlu(-)* ممکن است اثرات هم‌فزایی متفاوتی را در برابر بیماری‌های قارچی ایجاد نماید، که بررسی این اثرات پس از انتقال ژن به گیاه توصیه می‌گردد.

**ساخت پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiBt* و ورود کاست کامل ژن گلوکاناز به پلاسمید نوترکیب *pBI-Chi* توسط هضم با آنزیم *HindIII* و ایجاد باندهای ۲۹۹۷bp (شکل ۵-۵-الف) و نیز انجام واکنش PCR با پرایمر اختصاصی طراحی شده برای ژن *Bt* و ظهور باندهای مورد انتظار ۶۴۰bp (شکل ۵-۵-ب)، تأیید گردید. آنزیم *SacI* در *pBI-Chi* دارای جایگاه شناسایی منفرد در انتهای ORF کیتیناز می‌باشد. در صورتی که کاست ژن *Bt* با موفقیت به درون *pBI-Chi* وارد شده باشد، آنزیم *SacI* که درون ORF ژن *Bt* نیز دارای محل شناسایی است، منجر به خروج باندهای ۴۲۹۷bp خواهد شد که نشان‌دهنده حضور هر دو ژن کیتیناز و *Bt* در این پلاسمید نوترکیب است (شکل ۵-۵-الف).**

پلاسمید حاصل موسوم به *pBI-ChiBt* (شکل ۱-۱-ز)، که دارای کاست‌های کامل ژن‌های کیتیناز و *cryIA(b)*، تحت پیش‌برهای جداگانه *CaMV35S* و پایان‌برهای جداگانه *Nos* در ناحیه *T-DNA* خود



شکل ۵- (الف) هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب *pBI-GhiBt*، به منظور بررسی حضور و جهت ژن‌های کیتیناز و *Bt* نسبت به یکدیگر. *M*- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder). ۱- شاهد اندازه ژن *(b) cryIA* (*Bt*). ۲ و ۳- هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiBt* به ترتیب با آنزیم‌های *HindIII* و *SacI* (دو ژن کیتیناز و *Bt* مخالف جهت یکدیگر قرار گرفته‌اند). (ب) واکنش PCR با *M*- نشانگر اندازه ملکولی (1Kb Plus DNA Ladder). ۱ و ۲- واکنش PCR به ترتیب برای پلاسمید نوترکیب *pBI-GhiBt* و پلاسمید *pGEM4Z-Bt* (به عنوان شاهد ژن *Bt*) ۳- واکنش PCR برای مخلوط مادری بدون DNA

برای سلامت انسان ندارد (WHO، ۱۹۹۳). طبق گزارش سازمان نظارت بر غذا و داروی آمریکا (US FDA، ۱۹۹۸) و فدراسیون بیوتکنولوژی اروپا هیچ‌گونه گزارشی مبنی بر اثرات سوء NPTII یا ژن *nptIII* بر انسان، حیوانات و محیط زیست گزارش نشده است و به همین دلیل NPTII توسط FDA به عنوان یک افزودنی غذایی مجاز مورد تأیید قرار گرفته است. ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نیز هر دو از منشأ گیاهی انتخاب گردیدند. براساس گزارش اژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا پروتئین *CryIA(b)* دارای هیچ‌گونه اثر سمی یا آلرژی‌زایی بر روی پستانداران نیست (مندلسون و همکاران، ۲۰۰۳). با وجود این، برچسب زدن بر محصولات تراریخته حاصل از انتقال این ژن‌ها ضروری است، زیرا حق مسلم مردم است که از چگونگی ماده‌ای که مصرف می‌کنند، آگاه باشند.

بنابراین در مجموع، حاصل این تحقیق ساخت و معرفی چهار ناقل پلاسمیدی مناسب برای انتقال ژن به گیاهان، برای ایجاد مقاومت در برابر بیماری‌های قارچی و آفات (۱- *pBI-Glu*، ۲- *pBI-Chi*، ۳- *pBI-* *ChiGlu* و ۴- *pBI-ChiBt*) بود که امید است برای

امکان جداسازی کاست‌های کامل ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز متصل به هم از پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiGlu* توسط انجام واکنش PCR با پرایمرهای عمومی M13 Forward (-20) و M13 Reverse نیز امکان‌پذیر است. همین عمل را می‌توان در مورد جداسازی کاست‌های کامل ژن‌های کیتیناز و *Bt* با استفاده از پرایمرهای مذکور، در پلاسمید نوترکیب *pBI-ChiBt* نیز انجام داد. با جداسازی کاست‌های کامل ژن‌های مزبور (کیتیناز+گلوکاناز و کیتیناز+*Bt*)، می‌توان آنها را به نشانگرهای انتخابی غیرآنتی‌بیوتیکی که از نظر ایمنی زیستی مطلوب‌ترند، متصل نموده و در انتقال ژن به گیاه مورد استفاده قرار داد. این نشانگرها می‌توانند طوری انتخاب شوند که صفات مفید و مطلوبی مانند مقاومت به خشکی (BADH: بتائین آلدهید دهیدروژناز) یا مقاومت به علفکش (EPSPS: انول پیروویل شیکیمیک اسید ۳- فسفات سیتتاز) و غیره را در گیاه ایجاد نمایند.

در سال ۱۹۹۳ در کارگاه آموزشی سازمان بهداشت جهانی (WHO) اعلام شد که استفاده از ژن نشانگر *nptIII* در گیاهان تغییر ژنتیکی یافته، هیچ‌گونه خطری

این تحقیق گام مؤثری باشد. برای دستیابی به گیاهان

## سپاسگزاری

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج به جهت  
در اختیار نهادن امکانات و بودجه این تحقیق سپاسگزاری  
می‌نمایم.

تراریخته مقاوم که به سموم شیمیایی بی‌نیازند.

## منابع

1. Alexander, D., Goodman, R.M., Gut Rella, M., Glascock, C., Weyman, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E., and Ryals, J. 1993. Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogen-related protein 1a. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90:7327-7331.
2. An, G. 1987. Binary TI vectors for plant transformation and promoter analysis. Methods Enzymol. 153: 292-293.
3. Anand, A., Lei, Z.T., Summer, L.W., Mysore, K.S., Arakane, Y., Backus, W.W., and Muthukrishnan, S. 2004. Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. Plant-Microbe Interact. 17:1306-1317.
4. Anfoka, G., and Buchenauer, H. 1997. Systemic acquired resistance in tomato against *Phytophthora infestans* by pre-inoculation with tobacco necrosis virus. Physiological and Molecular Plant Pathology. 50:85-101.
5. Bachmann, D., Rezzonico, E., Retelska, D., Chetelat, A., Schaerer, S., and Beffa, R. 1998. Improvement of potato resistance to *Phytophthora infestans* by overexpressing antifungal hydrolases. In: P-57, Abstracts, 5th International Workshop on pathogenesis-related proteins. Signalling pathways and biological activities. March 29-April 2, 1998, Aussois, France.
6. Chen, P.Y., Wang, C.K., Soong, S.C., and To, K.Y. 2003. Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Molecular Breeding. 11: 287-293.
7. Coling, D.B., Kra, K.M., Kragh, K.M., Mikkelsen, J.D., and Vad, K. 1993. Plant Chitinase. The Plant Journal. 3: 31-40.
8. Datta, K., Velazhahan, R., Oliva, N., Ona, I., Mew, T., Khush, G.S., Muthukrishnan, S., and Datta, S.K. 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.
9. Edreva, A. 2004. A novel strategy for plant protection: induced resistance. Molecular And Cellular Biology. 3:61-69.
10. Enkerli, J., Gisi, U., and Mosinger, E. 1993. Systemic acquired resistance to *Phytophthora infestans* in tomato and the role of pathogenesis-related proteins. Physiological and Molecular Plant Pathology. 43:161-171.
11. Fagoaga, C., Rodrigo, I., Conejero, V., Hinarejos, C., Tuset, J.J., Arnau, J., Pina, J.A., Navarro, L., and Pena, L. 2001. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5. Molecular Breeding. 7:175-185.
12. Gomez Ariza, J., Campo, S., Rufat, M., Estopa, M., Messeguer, J., San Segundo, B., and Coca, M. 2007. Sucrose-mediated priming of plant defense responses and broad-spectrum disease resistance by overexpression of the maize pathogenesis-related PRms protein in rice plants. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20(7):832-842.
13. Kuc, J. 2001. Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. European Journal of Plant Pathology. 107:7-12.
14. Mauch, F., Mauch-Mani, B., and 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.

15. Melchers, L.S., Lageweg, W., and Stuiver, M.H. 1998. The utility of PR genes to develop disease resistance in transgenic crops. In: P-46, Abstracts, 5th International Workshop on pathogenesis-related proteins. Signalling pathways and biological activities. March 29-April 2, 1998, Aussois, France.
16. Melchers, L.S., Sela-Buurlage, M.B., Vloemans, S.A., Woloshuk, C.P., Van Roekel, J.S.C., Pen, J., Van den Elzen, P.J.M., and Cornelissen, B.J.C. 1993. Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and beta-1, 3-glucanase in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*. 21: 583-593.
17. Mendelsohn, M., Kough, J., Vaituzis, Z., and Matthews K. 2003. Are *Bt* crops safe? The US EPA's analysis of *Bt* crops finds they pose no significant risk to the environment or to human health. *Nature Biotechnology*. 21 (9): 1003-1009.
18. Mercedes Dana, M.D.L., 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(2):722-730.
19. Mohsenpour, M., Tohidfar, M., Babaeian jelodar, N.A., and Habashi, A.A. 2007. Design and construction of a recombinant plasmid pBI121-*Glu* in order to *Agrobacterium* mediated transformation of cotton. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, University of Gorgan*. 14(4): 112-124.
20. Ranjan, R. 2002. Transgenic plants. *Agrobios*. 108p.
21. Rauscher, M., Adam, A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K., and Deising, H.B. 1999. PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant Journal*. 19:625-633.
22. Sambrook, J., and Russel, D.W. 2000. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
23. Schultheiss, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R., 2003. Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*. 165:1275-1280.
24. Sutton, D.W., Havstad, P.K., and Kemp, J.D. 1992. Synthetic *cryAIII* gene from *Bacillus thuringiensis* improved for high expression plants. *Transgenic Research*. 1:228-236.
25. Tohidfar, M., Ghareyazie, B., and 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.
26. Tonon, C., Guevara, G., Oliva, C., and Daleo, G. 2002. Isolation of a potato acidic 39 kDa b-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-phytopathologische zeitschrift*. 150:189-195.
27. US Food and Drug Administration (FDA). 1998. Draft Guidance for industry: Use of antibiotic resistance gene in transgenic plants. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html>.
28. Van Loon, L.C. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology*. 103:753-765.
29. WHO. 1993. Health aspects of markers in genetically modified plants. Report of WHO workshop. World health organization, Geneva.
30. Xiao, YH., Li, XB., Yang, XY., Luo, M., Hou, L., Guo, SH., Luo, XY., and Pei, Y. 2007. Cloning and characterization of a balsam pear class I chitinase gene (*Mchit1*) and its ectopic expression enhances fungal resistance in transgenic plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 71(5):1211-1219.
31. Zhang, S.Y., Wang, J.B., Wang, H.F., Shao, J.W., Li, G.L., and Li, X.D. 2005. The relationship between activities of chitinase and beta-1,3-glucanase and resistance to *rhizomania* in sugar beet. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*. 31(3):281-286.

## **Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and BT genes, suitable for plant transformation**

**\*M. Mohsenpour<sup>1</sup>, N.A. Babaeian<sup>2</sup>, M. Tohidfar<sup>3</sup> and A.A. Habashi<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Ph.D. Student Dept, of Plant Breeding University of Agricultural and Natural Resources, Sari, Iran,

<sup>2</sup>Prof. Dept. of Agronomy and Plant Breeding, University of Agricultural and Natural Resources, Sari, Iran,

<sup>3</sup>Assistant Prof. of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran

---

---

### **Abstract**

Four plasmid vectors that are suitable for plant transformation were constructed by preparation of gene cassettes for  $\beta$ -1, 3-glucanase from barley, chitinase from bean and *cryIA (b)* from *Bacillus thuringiensis* (BT). Each of these genes was cloned under the control of the CaMV35S promoter and the Nos terminator in pBI121 binary vector. Chitinase and  $\beta$ -1,3- glucanase genes that encode antifungal proteins, can hydrolyze  $\beta$ -1,3- glucans and chitin, respectively, which are major components of the cell walls of many pathogenic fungi and increase plants resistance against fungal infection. *CryIA (b)* gene also encodes an insecticide protein that is generally active against lepidopteran insects. pBI-*Glu* and pBI-*Chi* recombinant plasmid vectors were constructed via cloning of  $\beta$ -1,3- glucanase and chitinase genes, respectively, instead of the *gus* gene in T-DNA region of pBI121 vector. Construction of pBI-*ChiGlu* recombinant plasmid vector was performed by means of cloning both of the complete chitinase and glucanase gene cassettes in pBI121 vector, with the intention of production synergistic effects against fungal infection. pBI-*ChiBt* recombinant plasmid vector containing both of the complete chitinase and Bt gene cassettes was also constructed in order to simultaneous plants resistance to fungal and pest pathogens in a single transformation event. These four recombinant plasmid vectors can be useful for plant transformation via *Agrobacterium* and other transformation approaches such as biolistic.

**Keywords:** BT; Chitinase; Cloning; Glucanase; Recombinant Plasmid

---

\*- Corresponding Author; Email: mthrh@yaho.com