Archive of SID



# انتقال ژن کیتیناز کایمری به کلزا و بیان القایی تراژن، تحت پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر SP-FF

**مهدی مرادیار، محمد رضا زمانی*، مصطفی مطلبی و رستم آقازاده قولکی**

**تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی**

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۴/۶/۱۹

## چکیده

گیاهان به صورت دائمی، در محیط زیست شان، در معرض بیمارگرهای مختلف قرار دارند. بیان ژنهای مقاومت توسط پیشبرهایی که صرفاً در زمان حمله بیمارگرها فعال می شوند راهبردی بسیار کارآمد در تولید گیاهان تجاری مقاوم به بیماری می باشد. در این مطالعه، ژن مقاومت کیتیناز کایمری تحت کنترل پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر SP-FF، به گیاه کلزا منتقل شده و پتانسیل این سازه، در مهار رشد بیمارگرهای قارچی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا، سه سازه pGFC، pGMPC و pBISM2 به ترتیب حاوی پیشبر SP-FF ( شامل دوعنصر F بالادست پیشبر حداقل)، SP-MP (شامل فقط پیشبر حداقل) و CaMV35S ( شامل پیشبر دائمی) جهت تراریختی گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت. بررسی فعالیت کیتینازی نشان داد پیشبر القاء پذیر با بیمارگر (SP-FF)، نسبت به مسیر پیام رسانی متیل جاسمونات حساس می باشد در حالی که نسبت به مسیر سالیسیلیک اسید القاء پذیری چندانی مشاهده نشد. همچنین، بررسیها نشان داد عصاره پروتئینی برگ گیاهان تراریخت تیمار شده با متیل جاسمونات به نسبت گیاهان شاهد افزایش معنی داری در میزان مهار رشد بیمارگرهای قارچی *S. sclerotiorum* و *R. solani* داشت. به این ترتیب، پیشبر SP-FF، نه تنها نسبت به متیل جاسمونات به عنوان مولکول پیام رسان در مسیر مقاومت به بیمارگرهای نکروترف القاء پذیر می باشد، بلکه میزان بیان تراژن مقاومت، تحت کنترل این پیشبر نیز جهت افزایش مقاوت نسبت به بیمارگرهای قارچی مناسب به نظر می رسد.

**واژه های کلیدی**: پیشبر ساختگی ، کیتیناز کایمری، کلزا، فعالیت ضد قارچی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۹۷ ، پست الکترونیکی: zamani@nigeb.ac.ir

## مقدمه

بیماریهای گیاهی یکی از عمده‌ترین چالشهای کشاورزی در سراسر جهان می‌باشند. یک استراتژی اساسی و مهم در تولید ارقام مقاوم در برابر بیماریها، انتقال ژنهای مقاومت به گونه های مهم زراعی می باشد (۳). کلزا به عنوان یک محصول روغنی استراتژیک در ایران، در معرض بیماریهای قارچی مانند پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه قرار دارد. از آنجا که کیتین به عنوان یک پلیمر خطی از واحدهای N–استیل گلوکزآمین در ساختار دیواره بیمارگرهای قارچی نقش مهمی دارد (۲۴)، آنزیمهای کیتینازی به دلیل تجزیه این پلیمر می توانند به عنوان یک عامل ضد قارچ مناسب عمل نمایند. از این رو در بسیاری از برنامه های اصلاحی، انتقال ژنهای کیتینازی به ارقام تجاری به عنوان یک راهبرد مناسب جهت ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای قارچی مورد استفاده قرار گرفته است (۲۲).

در بین انواع آنزیمهای کیتیناز، کیتینازهای قارچی به ویژه انواع متعلق به جنس تریکودرما بسیار کارآمد بوده و گونه های مختلف این قارچ یکی از منابع مهم ژنهای مقاومت



www.SID.ir

Archive of SID



به بیماریهای قارچی در برنامه های انتقال ژن به گیاهان زراعی می باشند (۱۱).

به علاوه فعالیت آنزیمهای کیتینازی قارچها را می‌توان با استفاده از مهندسی پروتئین بهبود بخشید، از آنجا که کیتینازهای قارچ *Trichoderma atroviride* فاقد chitin-binding domain (ChBD) هستند، افزودن ناحیه متصل شونده به کیتین(ChBD) به آنها می تواند منجر به اتصال مؤثر آنزیم به کیتین، افزایش فعالیت ویژه و همچنین فعالیت مؤثرتر بر روی کیتین کریستالی شود (۷).

در تحقیق قبلی انجام شده در این گروه، به منظور افزایش کارآیی آنزیم کیتیناز۴۲ (chit42) قارچ *T. atroviride* در تجزیه ساختارهای کیتینی موجود در دیواره سلولی قارچهای بیمارگر، ناحیه اتصال به کیتین (ChBD)، از باکتری *Serratia marcescens* به انتهای کربوکسیلی آنزیم کیتیناز ۴۲ متصل شده و نتایج به دست آمده مؤید افزایش قابل توجه در میزان فعالیت کیتینازی و ضد قارچی کیتیناز کایمری به دست آمده، نسبت به Chit42 بود (۱۲).

از طرفی در بیشتر موارد در مهندسی ژنتیک گیاهان با هدف مقاومت در برابر بیمارگرها، از پیشبرهای دائمی برای بیان تراژن استفاده می شود. اما استفاده از این پیشبرها به دلیل کاهش رشد و تغییر نمو، در بسیاری موارد می تواند منجر به ایجاد گیاهان ضعیف و با کیفیت پایین شود (۴). از سوی دیگر پیشبرهای طبیعی القاء پذیر با بیمارگر در بسیاری موارد فعالیت غیر اختصاصی و واکنش در برابر محرکهای مختلف از خود نشان می دهند. همچنین الگوی بیان آنها در شرایط مختلف مناسب و قوی نیست (۳، ۱۹ و ۲۵). از این رو تولید پیشبرهای ساختگی شامل عناصر کنشی منفرد و شناخته شده می تواند به عنوان راهبردی مناسب مطرح شود (۲۰).

در استراتژی ساخت پیشبرهای ساختگی، از عناصر کنشی مختلف شناسایی شده در پیشبرهای طبیعی در ترکیب با توالیهای حداقل پیشبری (Minimal promoter) استفاده می شود (۱، ۳، ۱۴ و ۱۹).

از جمله عناصر کنشی سیس القاء پذیر توسط بیمارگرها، عنصر F متعلق به خانواده W-boxes با دارا بودن ویژگیهایی از جمله: القاء پذیری سریع و قوی در برابر بیمارگرها، بیان پایه خیلی کم و عدم القاء پذیری در برابر زخم و آسیب های فیزیکی، گزینه مناسبی برای ساخت پیشبر ساختگی می باشد (۳ و ۵).

بررسیهای قبلی انجام شده نشان می دهد که پیشبر ساختگی SP-FF (متشکل از دو عنصر F در بالادست توالی پیشبر حداقل CaMV35S) عملکرد مناسبی در پاسخ به برخی محرکها و بیمارگرهای قارچی نشان می دهد (۲۳).

در این تحقیق ژن کیتیناز کایمری جدید، تحت کنترل پیشبر ساختگی SP-FF ، به گیاه کلزا منتقل شد و القاء پذیری پیشبر و توان بالقوه تراژن تحت کنترل آن در مهار رشد بیمارگرهای قارچی *Sclerotinia sclerotiorum* و *Rhizoctonia solani* در محیط in vivo مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روشها

**مواد گیاهی و سویه های باکتریایی و قارچی**: بذرهای کلزا رقم R line Hyola 308 از شرکت دانه های روغنی تهیه گردیده و تا زمان استفاده در درجه حرارت 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. باکتری *Escherichia coli* سویه (DH5α) و باکتری*Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA 4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک تهیه گردید. قارچهای *S. sclerotiorum* جدایه ۲۳۱۰ (اهدایی آقای دکتر همایون افشاری آزاد، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی وزارت جهاد کشاورزی)، جدایه R2 قارچ *R. solani* (اهدایی آقای دکتر بهرام شریف نبی، دانشگاه صنعتی اصفهان) تهیه و استفاده شد.



www.SID.ir

Archive of SID



**پلاسمیدها و مواد مورد استفاده:** در این تحقیق از پلاسمید pJET1.2 (Roche) برای همسانه سازی و از پلاسمیدهای pGFF (۲۳) و pBISM2 (۱۲) برای ساخت ناقلین بیانی گیاهی استفاده شد.

**فرآیندهای عمومی و ساخت ناقلین بیانی:** مراحل تهیه DNA ژنومی و پلاسمیدی، الکتروفورز ژل آگارز، واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)، هضم آنزیمی، اتصال، تهیه سلول مستعد و تراریختی باکتریها مطابق روشهای مرسوم انجام گرفت (۲۱).

تکثیر ژن کیتیناز کایمری، با روش PCR و با استفاده از آغازگرهای به ترتیب رفتی و برگشتی chit42mmf و chit42mmr از روی DNA پلاسمیدی pBISM2 به عنوان الگو انجام گرفت (شکل۱) (جدول۱).

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق

| نام | توالی |
|---|---|
| chit42mmf | 5'-CGCCTCGAGCGGCCACCATGTTGGGTTTCCTCGGAAAG-3' |
| chit42mmr | 5'-GCCAGGGTTTTCCCAGTCAC-3' |
| ACC-f | 5'-CTATAGCTGGGGTCAATGACAACG-3' |
| ACC-r | 5'-GTCGACAGAAGAATGATCGCGAAC-3' |
| VirG-f | 5'-ATGATTGTACATCCTTCACG-3' |
| VirG-r | 5'-TGCTGTTTTTATCAGTTGAG-3' |
| Chit42 F3 | 5'-GCCTACGCCGATTATCAGAAGC-3' |
| Chit42 R3 | 5'-CGCCTCCGTTGATATAAGCC-3' |

محصول PCR پس از هضم آنزیمی با آنزیمهای *Eco*RI و *Xho*I در ناقل pJET1.2 وارد شد. پس از هضم ناقص آنزیمی این سازه، با آنزیمهای برشی *Sac*I و*Xho*I (به دلیل وجود یک محل شناسایی آنزیم *Sac*I درون ژن کیتیناز)، ژن کیتیناز کایمری از روی ژل جداسازی و در جایگاههای مشابه در ناقل بیانی pGFF همسانه سازی شد. در این سازه بیانی جدید که pGFC نامگذاری گردید، ژن کیتیناز کایمری تحت کنترل پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر (SP-FF) قرار گرفت.

برای ساخت سازه pGMPC حاوی پیشبر حداقل (به عنوان شاهد منفی)، از سازه pGFC استفاده شد. قطعه حاوی عناصر کنشی سیس F از بالادست توالی پیشبر حداقل، با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیمهای برشی *Spe*I و *Xba*I و سپس اتصال مجدد این دو محل حذف گردید (شکل۱).

**آماده سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه :** به منظور انتقال ژن از روش مولونی و همکاران استفاده شد (۱۵). در این روش بذور کلزا ضد عفونی شده و برای جوانه زدن روی محیط کشت جوانه زنی ( ½MS, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) قرار داده شدند. بذور کشت شده، در اتاق کشت بافت تحت شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برگهای لپه ای گیاهان ۵ روزه که طول دم برگ آنها حدود ۲ میلی متر بود، جدا شدند و پس از حذف جوانه انتهایی دمبرگها به مدت ۴۸ ساعت روی محیط پیش کشت (1X MS organic, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت شدند. ریزنمونه ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم بودند. از کشت شبانه آگروباکتریوم ترانسفورم شده (OD650=1) رسوب تهیه شد (با سرعت g ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) سپس باکتریهای رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. ریز نمونه های مورد استفاده، شامل برگهای لپه ای بودند که ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (پیش کشت) قرار گرفته بودند.

دمبرگهای برگهای لپه ای به مدت ۹۰ ثانیه در محیط سوسپانسیون آگروباکتریوم قرار داده شدند. این برگهای لپه ای بر روی کاغذ صافی استریل قرار داده شدند تا نسبتاً



www.SID.ir

Archive of SID



خشک گردند. سپس در محیط هم کشتی 1X MS, sucrose (30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت داده شدند و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، ریز نمونه ها به محیط انتخابی القاء نوساقه (1X MS, sucrose 30 g/l, BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) که حاوی۱۵ mg/l کانامایسین و ۲۰۰mg/l سفوتاکسیم است، منتقل شدند و ریز نمونه ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه واکشت شدند. در هفته سوم نوساقه های متعددی در سطح فوقانی بعضی از ریز نمونه ها به وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه های تولید شده بر روی محیط انتخابی فوق، سبز و زنده باقی ماندند و بقیه به علت عدم دریافت ژن مقاومت به کانامایسین سفید شده و از بین رفتند.

نوساقه های سبز باززایی شده در محیط گزینشگر، جدا شده و به محیط طویل شدن نوساقه (1X MS, sucrose 30 g/l, agar 8 g/l, pH 5.8) حاوی ۲۵ mg/l کانامایسین و حاوی ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم است منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مریستم فعال، نمونه ها به محیط ریشه زایی (1X MS, sucrose 30 g/l, IBA 2 mg/l, agar 8 به علاوه آنتی بیوتیکهای کانامایسین (۲۵ mg/l) و سفوتاکسیم (۲۰۰ mg/l) انتقال داده شدند. لازم به ذکر است بعضی از نمونه ها در همان محیط طویل شدن نوساقه ریشه دار می شدند و احتیاجی به انتقال به محیط ریشه زایی نداشتند.

گیاهان پس از حدود ۴ هفته و پس از مشاهده ریشه های کافی به گلدان منتقل شدند و بر روی آنها نایلون کشیده شد سپس با ایجاد تدریجی منفذها، کم کم به محیط سازگار شدند. خاک استفاده شده برای گلدانها استریل شده بود و تا اتمام بذر گیری به طور مرتب آبیاری شدند.

**استخراج DNA ژنومی و تأییدات مولکولی گیاهان تراریخت احتمالی:** استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت (۲۱). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، توسط الکتروفورز و آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای ژن استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز (ACC) گیاه کلزا (ACC-r و ACC-f) مورد بررسی قرار گرفت (جدول۱). برای اثبات حضور تراژن در گیاهان تراریخت احتمالی از آغازگرهای Chit42 F3 وChit42 R3 در داخل ژن کایمر استفاده گردید. همچنین به منظور حصول اطمینان از عدم آلودگی DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت به باکتری آگروباکتریوم، آزمون PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن VirG (VirG-f/r) موجود بر روی پلاسمید کمکی این باکتری انجام گرفت.

از آزمون لکه گذاری سادرن (Southern blotting) برای مشخص نمودن تعداد نسخه درج شده تراژن در ژنوم میزبان استفاده شد. بدین منظورDNA ژنومی استخراج شده، با استفاده از آنزیم برشی *Hin*dIII هضم شده و به روش موئینگی، به غشای نایلونی (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) منتقل شد. از آغازگرهای Chit42 F3 و Chit42 R3 و ناقل pBISM2 حاوی ژن کایمر به عنوان الگو، برای ساخت پروب نشاندار با استفاده از کیت غیر رادیواکتیو (Roche Applied Science, Basel, Switzerland) Dig labeled-dNTP و تکثیر به روش PCR استفاده گردید و پروب مورد نظر به طول ۵۸۹ جفت باز تهیه گردید.

**تیمار دیسکهای برگی با محرکها:** در هر آزمایش به منظور اعمال تیمارها، ابتدا از هر سازه (pGFC و pGMPC و pBISM2) و گیاه غیر تراریخت سه گیاه در مرحله پنج برگی انتخاب و از سه برگ باز شده جوان آنها دیسکهایی به قطر دو و نیم سانتیمتر تهیه شد. این دیسکها درون محرکهای سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) و متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) به عنوان دو فاکتور مهم فعال سازی پاسخهای دفاعی غوطه ور شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه دسیکاتور تحت فشار منفی قرار گرفتند وسپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه روی کاغذ صافی حاوی محیط کشت پایه MS درون پتری نگهداری



www.SID.ir

Archive of SID



شد. نمونه های شاهد، تحت تیمار آب مقطر قرار گرفتند. اثر فاکتورهای مطالعه به صورت آزمایش فاکوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

**آزمون رنگ سنجی:** به منظور بررسی تأثیر محرکها در افزایش بیان تراژن، از آزمون فعالیت کیتیناز استفاده شد. به این منظور واکنشی (۵۰۰µl) شامل کیتین کلوئیدی (۳٫۸ mg) به عنوان سوبسترا و محلول آنزیمی (حاوی عصاره پروتئینی دیسکهای برگی) به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن یک میلی لیتر NaCl (1%)، متوقف شد. به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ انجام شد. مایه رویی با اضافه کردن 100 µl بافر پتاسیوم تترابورات به مدت سه دقیقه جوشانده شد. مقدار ۳ml واکنشگر DMAB به محلول اضافه شد. میزان زیر واحد آزاد شده ان استیل گلوکزامین (GLcNAc) توسط روش زیلینگر و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (۲۶). تولید یک ماکرومول محصول واکنش، در ۶۰ دقیقه به عنوان یک واحد فعالیت آنزیمی در نظر گرفته شد.

**بررسی فعالیت ضد قارچی:** به منظور بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره سلولی گیاهان تراریخت، از روش آزمون نشر شعاعی (radial diffusion method) استفاده گردید. دیسکهای آگار با قطر mm ۵ از محیط رشد قارچهای بیمارگر جدا شده و در مرکز یک پلیت حاوی PDA قرار داده شد. پس از اینکه اندازه کلنی قارچ به حدود cm ۳ رسید در لبه های آن چند چاهک ایجاد شده و عصاره برگها هر ۳ ساعت به آنها اضافه شد. پلیتها به مدت ۴۸ ساعت در ۲۸ درجه نگهداری شد.

بررسی کمی میزان مهار رشد قارچها با روش Microspectrophotometric assay انجام گرفت. در این روش از پلیت ۹۶ خانه ای استفاده شد. هر چاهک حاوی PDB(۱۶ mg/ml)، حدود ۲۰۰۰ اسپور یا قطعات میسلیوم و عصاره پروتئینی (۴۰ µg) برگهای گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرک و آب تا حجم نهایی ۲۰۰ µl بود. پس از قرار دادن پلیت در دمای ۲۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه الایزا (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) خوانده شد. میزان جذب بعد از گذشت ۴۸ ساعت مجددا اندازه گیری و ثبت گردید. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. میزان مهار رشد بر اساس فرمول $[(\Delta C - \Delta T)/\Delta C] \times 100$ محاسبه شد. که در آن ΔC میزان جذب تصحیح شده برای نمونه شاهد و ΔT مقدار جذب تصحیح شده نمونه مورد بررسی می باشد. جذب تصحیح شده عبارت است از میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر بعد از ۴۸ ساعت منهای مقدار جذب اندازه گیری شده در ۳۰ دقیقه.

فعالیت ضد قارچی همچنین در سطح میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت. قطعه $3mm^3$ از محیط کشت حاوی قارچ *R. solani* روی سطح تمیز یک لام شیشه ای قرار گرفت و داخل محفظه ای مرطوب انکوبه شد. ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد، ۱۰۰ µl از عصاره پروتئینی برگهای تیمار شده با محرک یا آب روی میسلیوم های گسترده شده روی لام قرار گرفت. تأثیر عصاره پروتئینی هر یک ساعت یک بار توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

**آنالیز داده ها:** مراحل نرمال سازی داده ها و رسم گرافها به وسیله برنامه Excel 2010 و آنالیز آماری داده ها با استفاده از برنامه آماری SPSS 18 انجام شد.

## نتایج

در این تحقیق، ناقل بیانی pGFC ، با جایگزین کردن ژن کیتیناز کایمری(ChBD + *Chit42*) ساخته شده در این گروه تحقیقاتی (۱۲) به جای ژن gus در ناقل pGFF حاوی پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر (۲۳) ساخته شد (شکل۱). همچنین به منظور بررسی و مقایسه عملکرد پیشبر ساختگی القاء شونده با بیمارگر، سازه pGMPC که

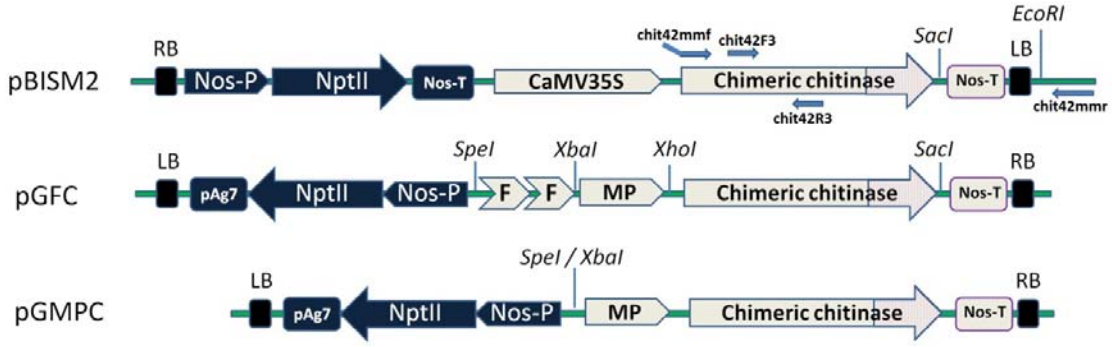


www.SID.ir

Archive of SID



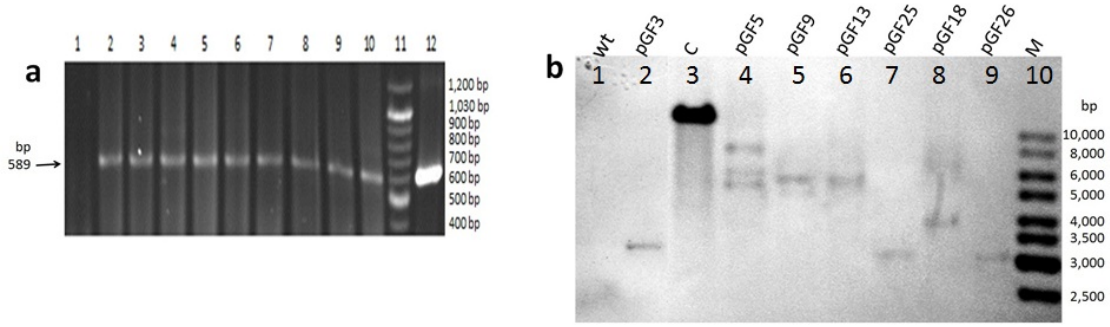
با حذف عناصر کنشی سیس FF از پیشبر pGFC به دست آمد، به عنوان شاهد منفی و سازه pBISM2 حاوی پیشبر دائمی CaMV35S به عنوان شاهد مثبت ساخته شد (شکل۱). صحت همسانه سازی توسط آزمون PCR و سپس توالی یابی، مورد تأیید قرار گرفت. سپس، این سازه ها با روش آگروباکتریوم به گیاه کلزا رقم R Line Hyolla 308 منتقل شدند.




شکل ۱- تصویر شماتیک ناحیه T-DNA پیشبرهای مصنوعی ساخته شده. سازه pGFC حاوی پیشبر SP-FF (دو عنصر F در بالادست ناحیه پیشبر حداقل)، سازه pGMPC حاوی فقط پیشبر حداقل (به عنوان شاهد منفی) و سازه pBISM2 حاوی پیشبر دائمی CaMV35S (به عنوان شاهد مثبت).

LB - left border, Nos-T - nopaline synthase terminator, NptII - neomycin phosphotransferase II, Nos-P - nopaline synthase promoter, MP - sequence of -46 to +8 from the CaMV35S promoter as minimal promoter, chimeric chitinase (chit42 gene + ChBD (chitin binding domain)) RB - right border. pAg7- agropine synthase gene poly (A) terminator. The position of primers are shown (top)

مراحل باززایی گیاهان، روی محیط کشت انتخابی انجام شده و تأیید تراریختی این گیاهان با استفاده از تکنیکهای مولکولی PCR و سادرن بلات انجام گرفت (شکل۲). نتیجه آزمون سادرن حضور یک تا سه نسخه از تراژن را در گیاهان تراریخت تأیید نمود. کلیه گیاهان تراریخت مورد بررسی دارای رشد و نمو و ظاهری طبیعی بودند. از بین گیاهان تراریخت دریافت کننده T-DNA سازه pGFC ، چهار لاین (گیاهان شماره ۳، ۱۳، ۲۵ و ۲۶) که حاوی تک نسخه از تراژن بودند برای بررسیهای بعدی انتخاب شدند (شکل ۲b).




شکل ۲- a) تأیید تراریختی گیاهان، با آزمون PCR. تکثیر قطعه ۵۸۹ جفت بازی از DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای Chit42F3 و Chit42R3. ۱: کلزای غیر تراریخت، ۲ تا ۱۰: لاینهای کلزای تراریخت، ۱۱: مارکر مولکولی Mix، ۱۲: پلاسمید pBISM2. b) آزمون سادرن بلات گیاهان تراریخت. DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان، با آنزیم برشی *Hind*III هضم شده و بعد از انجام الکتروفورز و انتقال به غشای نایلونی، هیبریداسیون با پروب ۵۸۹ جفت بازی نشان دارشده با دیگوکسی ژنین انجام گرفت. wt : گیاه غیر تراریخت، ۲ و ۴ تا ۹: لاینهای کلزای تراریخت، c : پلاسمید pBISM2، M: مارکر مولکولی Mix.



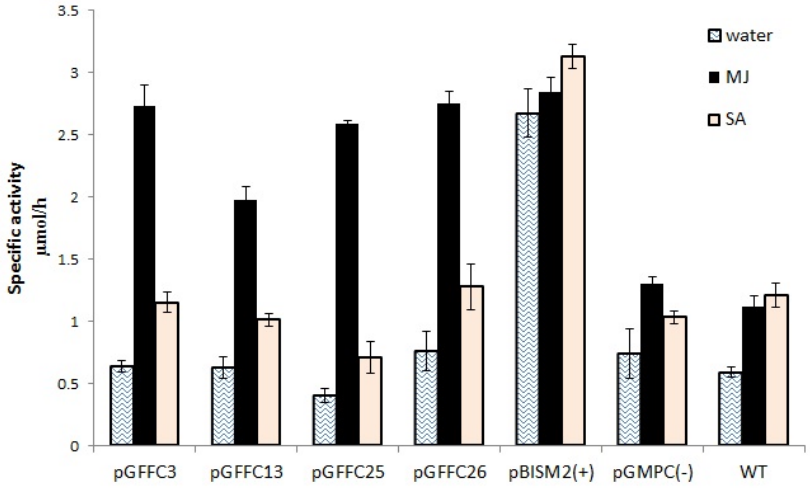
www.SID.ir

Archive of SID



**تیمار با محرکها و بررسی فعالیت آنزیمی:** تأثیر محرکهای متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید در بیان تراژن در گیاهان تراریخت حامل پیشبر SP-FF با استفاده از بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان فعالیت آنزیمی در برگ گیاهان تراریخت تیمار شده با متیل جاسمونات به صورت معناداری نسبت به حالت قبل از تیمار و همچنین نسبت به گیاهان حاوی پیشبر حداقل و گیاهان غیر تراریخت افزایش یافته است. این در حالی است که تغییر معناداری در پاسخ به محرک سالیسیلیک اسید مشاهده نشد (شکل۳).

بیست و چهار ساعت پس از تیمار دیسکهای برگی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت با محرکها و آب (به عنوان شاهد)، پروتئین تام از این برگها استخراج شده و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد کلیه لاینهای تراریخت بین ۳٫۱ تا ۶٫۴ برابر افزایش در فعالیت کیتینازی نسبت به حالت تیمار با آب نشان دادند که از نظر آماری تفاوت معنی داری محسوب می شود($p < 0.01$) (شکل۳).




شکل ۳- بررسی فعالیت کیتینازی لاینهای مختلف در پاسخ به تیمار محرکهای متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار). دیسکهای برگی پس از قرار گرفتن در معرض محرکها، ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه انکوبه شدند و سپس فعالیت کیتینازی مورد ارزیابی قرار گرفت. داده ها نشان دهنده میانگین ± خطای استاندارد با سه تکرار می باشد. تیمار آب به عنوان کنترل در نظر گرفته شد. تولید یک میکرومول محصول رنگی در ساعت به عنوان یک واحد آنزیمی در نظر گرفته شد.

در بین لاینهای مورد ارزیابی pGFC13 و pGFC25 به ترتیب کمترین و بیشترین میزان القاء را نشان دادند. به علاوه، میزان افزایش فعالیت آنزیمی در پیشبر القایی در پاسخ به محرک متیل جاسمونات تقریباً نزدیک به پیشبر دائمی بود. این در حالی است که فعالیت آنزیمی این پیشبر در مقایسه با گیاه غیر تراریخت و گیاه حامل سازه پیشبر حداقل (به عنوان شاهد منفی) کاملاً بیشتر بود. نتایج نشان داد که میزان فعالیت کیتینازی در پاسخ به محرک سالیسیلیک اسید در همه گیاهان تا اندازه ای افزایش یافت اما میزان این افزایش تفاوت معنی داری با میزان افزایش در گیاهان شاهد منفی نداشت، که مؤید عدم تحریک پیشبر القایی در پاسخ به این محرک می باشد. نتایج نشان می دهد هر دو محرک سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات تا اندازه ای موجب افزایش فعالیت کیتینازی در گیاهان شاهد و غیر شاهد می شوند (شکل۳) که احتمالاً می تواند به دلیل القاء ژنهای کیتینازی گیاه در برابر محرکها باشد.

**بررسی فعالیت ضد قارچی:** تأثیر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت، قبل و بعد از تیمار با محرکها بر روی رشد قارچهای بیمارگر *S. sclerotiorum* و

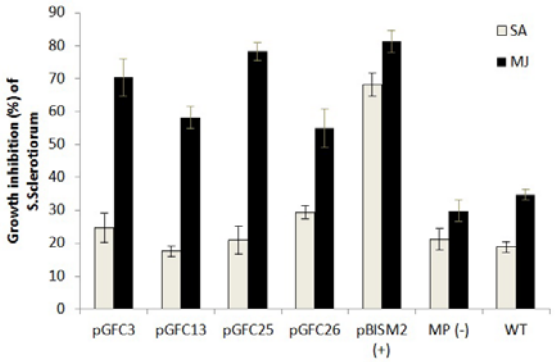


www.SID.ir

Archive of SID



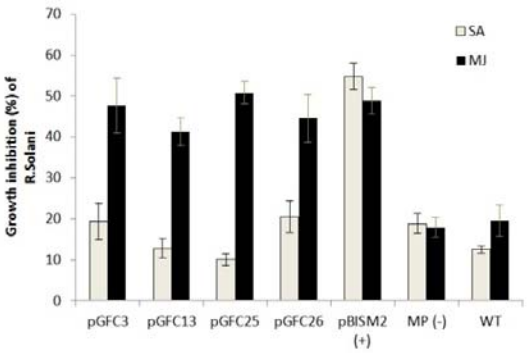
*R. Solani* با استفاده از آزمون microspectrophotometry مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد میزان مهار رشد قارچ توسط عصاره پروتئینی گیاهان حامل پیشبر القایی پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات تا حد قابل توجهی افزایش یافت. بیشترین فعالیت ضد قارچی و اثر مهار کنندگی در بین گیاهان تراریخت، مربوط به لاینهای




شکل۴- تأثیر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرکهای متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) بر میزان مهار رشد قارچ *S. sclerotiorum* . داده ها نشان دهنده میانگین ± خطای استاندارد با سه تکرار می باشد.

میزان مهار مشاهده شده بر علیه قارچ *S. sclerotiorum* (۷۸ – ۵۴ درصد) ، تقریباً در تمام لاینها بیش از *R. solani* (۵۰ – ۴۱ درصد) بود. به منظور تأیید این موضوع که مهار رشد مشاهده شده در آزمایش تا حد قابل توجهی به دلیل تأثیر بیان تراژن می باشد نه به دلیل ترکیبات دفاعی داخلی گیاه، عصاره پروتئینی از گیاهان غیر تراریخت و تراریخت حاوی پیشبر حداقل که به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده بودند مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. داده ها نشان داد تفاوت معنی داری میان گیاهان تراریخت حامل پیشبر القایی و گیاهان شاهد وجود دارد (شکل های ۴ و ۵).

بعلاوه، تأثیر عصاره پروتئینی بر قارچهای *S. sclerotiorum* و *R. solani* توسط آزمون نشر شعاعی ( radial diffusion assay)، مورد ارزیابی قرار گرفت. در این بررسی، لاینهای pGFC3 و pGFC25 بود که بالاترین میزان القاء پذیری و فعالیت آنزیمی را نشان داده بودند (شکل۴ و ۵). میزان فعالیت ضد قارچی در دولاین دیگر پایین تر بود، با این حال مقدار مهار مشاهده شده در آنها، در مقایسه با گیاهان غیر تراریخت و حامل پیشبر حداقل (pGMPC) به عنوان شاهد منفی به صورت معنی داری بیشتر بود.




شکل۵- تأثیر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرکهای متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) بر میزان مهار رشد قارچ *R. solani* . داده ها نشان دهنده میانگین ± خطای استاندارد با سه تکرار می باشد.

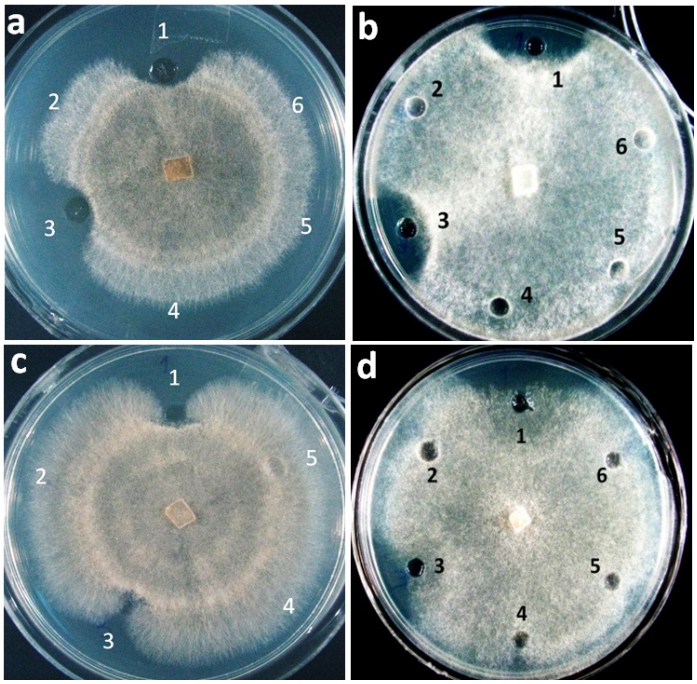
pGFC3 ، pBISM28 (به عنوان شاهد مثبت) و pGMPC11 (به عنوان شاهد منفی) که حاوی تک نسخه از تراژن بودند مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار ۵۰ میکروگرم از پروتئین تام از هر گیاه به چاهکهای ایجاد شده روی پلیت رشد قارچ افزوده شد و میزان مهار رشد بررسی گردید. نتایج نشان داد عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت تیمار شده با محرک، قادر به مهار بیمارگر های قارچی می باشند. همچنین پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات، سطح مهار در لاین حاوی پیشبر القایی با لاین حاوی پیشبر دائمی (شاهد مثبت) تقریباً مشابه می باشد. اما در حالت تیمار با سالیسیلیک اسید میزان مهار مشاهده شده در لاین تراریخت حاوی پیشبر القایی به طرز مشهودی از مهار عصاره پروتئینی گیاه شاهد مثبت در هر دو قارچ بیمارگر کمتر بود (شکل۶).



www.SID.ir

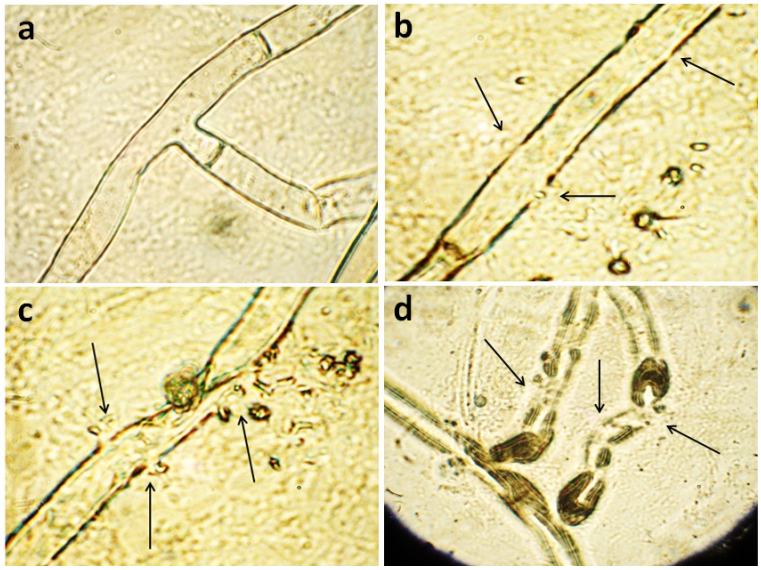
Archive of SID






شکل ۶- بررسی تأثیر عصاره پروتئینی لاینهای تراریخت تیمار شده با محرکها، بر مهار رشد قارچهای بیمارگر، با استفاده از آزمون نشر شعاعی. a) تأثیر روی قارچ *R. solani* پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات ، b) تأثیر روی قارچ *S. sclerotiorum* پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات ، c) تأثیر روی قارچ *R. solani* پس از تیمار با محرک سالیسیلیک اسید ، d) تأثیر روی قارچ *S. sclerotiorum* پس از تیمار با محرک سالیسیلیک اسید ، ۱: عصاره لاین pBISM28 ، ۲: عصاره لاین pGFC3 تیمار شده با آب، ۳: عصاره لاین pGFC3 تیمار شده با محرک، ۴: عصاره لاین pGMPC11، ۵: عصاره گیاه غیر تراریخت، ۶: بافر استراج پروتئین.

همچنین، تغییرات مورفولوژیک ناشی از تأثیر عصاره پروتئینی لاینهای pGFC3 و pGMPC11 (شاهد منفی) بر روی میسلیوم قارچ *R. solani* توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد عصاره پروتئینی برگ گیاه pGFC3 تیمار شده با محرک متیل جاسمونات قادر به هضم دیواره و نوک هیفها می باشد در حالی عصاره گیاه کنترل تأثیر قابل ملاحظه ای رو میسلیومها نداشت (شکل۷).




شکل ۷- تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در میسلیومهای قارچ *R. solani* پس از قرار گرفتن در معرض عصاره پروتئینی گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات. a) میسلیومها، ۶ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره لاین pGMPC11 به عنوان شاهد (تغییرات قابل ملاحظه مشاهده نمی شود). b-d) میسلیومها، به ترتیب ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از قرار گیری در معرض عصاره لاین pGFC3. هضم دیواره هیفها کاملاً مشهود می باشد.

## بحث

بیان ژنهای مقاومت تحت پیشبرهایی که صرفاً در زمان حضور بیمارگر فعال می شوند مزیت بزرگی در پروژه های تراریختی گیاهان محسوب می شود. ظرف سالهای اخیر بررسی پیشبرهای القاء شونده با بیمارگرها موجب شناسایی خانواده های مختلفی از عناصر کنشی سیس (از جمله W-box) شده که به دلیل ساختار مجزایی که دارند قابلیت



www.SID.ir

Archive of SID



مهندسی و تولید پیشبرهای ساختگی را افزایش داده است (۳و۵).

پیشتر مشخص شد که پیشبر ساختگی SP-FF که از دو عنصر کنشی سسیس F در بالادست ناحیه پیشبر حداقل CaMV35S تشکیل شده است، القاء پذیری قابل توجهی در پاسخ به محرکهای کیتین، متیل جاسمونات و محرکهای قارچی از خود نشان می دهد (۲۳). در این مطالعه پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر، جهت کنترل بیان ژن کیتیناز کایمری جدید (با ظرفیت اتصال به کیتین و فعالیت ضد قارچی بهتر) (۱۲)، در گیاه کلزا مورد استفاده قرار گرفت تا توان بالقوه آن برای استفاده در پروژه تراریختی گیاهان بر علیه بیماریهای قارچی مورد ارزیابی قرار گیرد.

شواهد بسیار نشان می دهد سطح مولکولهای پیام رسان دفاعی در زمان آلودگی به بیمارگرها افزایش می یابد (۱۷). از این رو دو مولکول پیام رسان مهم گیاهی یعنی متیل جاسمونات و سالیسیلیک اسید جهت ارزیابی میزان القاء پذیری پیشبر ساختگی و بیان تراژن مورد نظر در پاسخ به این محرکها مورد استفاده قرار گرفت.

تیمار دیسکهای برگی گیاهان تراریخت نشان داد پیشبر القایی در پاسخ به محرک متیل جاسمونات افزایش بیان قابل توجهی نشان داد در حالی که میزان افزایش فعالیت آنزیمی در زمان تیمار با سالیسیلیک اسید نسبت به حالت کنترل تفاوت معنی داری نداشت (شکل۳).

همچنین مشخص شد که در همه گیاهان شاهد مثبت و منفی تیمار با محرک موجب افزایش فعالیت کیتینازی می شود که احتمالاً به دلیل بیان القایی کیتینازهای داخلی گیاه می باشد. مقایسه بین میزان فعالیت آنزیمی در گیاهان مختلف در حالت تیمار با آب نشان داد تفاوت معنی داری بین آنها و گیاهان شاهد وجود ندارد (به جزء گیاه شاهد مثبت که دارای بیان دائمی تراژن می باشد) که نشان دهنده بیان پایه ضعیف پیشبر القایی می باشد (شکل۳).

داده های به دست آمده در این تحقیق نشان داد نه تنها پیشبر ساختگی SP-FF در برابر محرک متیل جاسمونات القاء پذیر می باشد بلکه سطح و میزان بیان تراژن در حالت القاء، حتی در لاینهایی با کمترین سطح بیان (pGFC13) برای مهار و کاهش رشد بیمارگرهای قارچی مناسب است. بعلاوه کلیه گیاهان تراریخت حتی لاینهایی با بالاترین سطح بیان تراژن (pGFC3)، در مقایسه با گیاهان غیرتراریخت، رشد و نمو و ظاهر طبیعی داشتند. مقایسه عصاره پروتئینی برگ گیاهان تراریخت، قبل و بعد از تیمار با محرک نشان داد که کیتیناز کایمری عامل تفاوت معنی دار میزان مهار می باشد نه سایر ترکیبات داخلی گیاه. به علاوه کیتینازهای گیاهی معمولاً فقط نوک هیف را تحت تأثیر قرار می دهند و توان تجزیه موثر و قوی اسپور و ساختارهای سخت کیتینی را ندارند (۶، ۱۳ و ۱۶). در حالی که کیتینازهای قارچی علاوه بر نوک هیفها، قادر به تجزیه دیواره های سخت کیتینی در میسلیوم های بالغ می باشند (۸، ۹، ۱۰ و ۱۱).

مشاهدات میکروسکوپی در این تحقیق مشخص نمود، عصاره پروتئینی لاینهای تراریخت تیمار شده با متیل جاسمونات قادر به هضم دیواره سلولی میسلیومهای قارچ *R. solani* می باشند. تصویر میکروسکوپی موید هضم دیواره بسیاری از هیفها نه فقط در نوک که در سرتاسر آن و بیرون ریختن پروتوپلاست آنها می باشند (شکل۷). در حالی که در میسلیومهای تیمار شده با عصاره پروتئینی شاهد، تغییرات قابل ملاحظه ای مشاهده نشد.

نتایج آزمون نشر شعاعی نشان داد عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت حاوی پیشبرهای دائمی (pBISM28) و القاء پذیر (pGFC3) تیمار شده با متیل جاسمونات، هر دو کم و بیش به یک اندازه و بسیار کارآمد قادر به مهار رشد بیمارگرهای *S. sclerotiorum* و *R. solani* می باشند.

از آنجاکه مسیرهای پیام رسانی متیل جاسمونات، مرتبط با ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای نکروتروف مانند



www.SID.ir

Archive of SID



*S. sclerotiorum* می باشند (۲ و ۱۸) و یافته های فعلی و قبلی، نشان دهنده القاء پذیری پیشبر SP-FF نسبت به این محرک می باشد. بنابراین در مجموع، نتایج به دست آمده در این تحقیق مشخص می کند ژن کیتیناز کایمری تحت کنترل پیشبر ساختگی القاء پذیر با بیمارگر SP-FF می تواند به عنوان گزینه ای مناسب برای ایجاد مقاومت به بیماریهای قارچی به ویژه پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد. به علاوه این پیشبر می تواند برای کنترل بیان سایر ژنهای مقاومت در گیاهان مورد استفاده قرار گیرد.

## منابع


1. Cazzonelli, C. I., & Velten, J. (2008). In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters. Transgenic Res, 17(3), 437-457.

2. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol, 43, 205-227.

3. Gurr, S. J., & Rushton, P. J. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? Trends Biotechnol, 23(6), 275-282.

4. Hammond-Kosack, K. E., & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. Curr Opin Biotechnol, 14(2), 177-193.

5. Heise, A., Lippok, B., Kirsch, C., & Hahlbrock, K. (2002). Two immediate-early pathogen-responsive members of the *AtCMPG* gene family in *Arabidopsis thaliana* and the W-box-containing elicitor-response element of *AtCMPG1*. Proc Natl Acad Sci, 99(13), 9049-9054.

6. Joosten, M., Verbakel, H., Nettekoven, M., Van Leeuwen, J., Van der Vossen, R., & De Wit, P. (1995). The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and β-1, 3-glucanase defence proteins of its host, tomato. Physiol Mol Plant Pathol, 46(1), 45-59.

7. Limon, M. C., Margolles-Clark, E., Benitez, T., & Penttila, M. (2001). Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol Lett, 198(1), 57-63.

8. Lorito, M., Farkas, V., Rebuffat, S., Bodo, B., & Kubicek, C. P. (1996a). Cell wall synthesis is a major target of mycoparasitic antagonism by *Trichoderma harzianum*. J bacteriol, 178(21), 6382-6385.

9. Lorito, M., Mach, R. L., Sposato, P., Strauss, J., Peterbauer, C. K., & Kubicek, C. P. (1996b). Mycoparasitic interaction relieves binding of the Cre1 carbon catabolite repressor protein to promoter sequences of the *ech42* (endochitinase-encoding) gene in *Trichoderma harzianum*. Proc Natl Acad Sci, 93(25), 14868-14872.

10. Lorito, M., Peterbauer, C., Hayes, C. K., & Harman, G. E. (1994). Synergistic interaction between fungal cell wall degrading enzymes and different antifungal compounds enhances inhibition of spore germination. Microbiology, 140(3), 623-629.

11. Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., et al. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. Proc Natl Acad Sci, 95(14), 7860-7865.

12. Matroodi, S., Motallebi, M., Zamani, M., & Moradyar, M. (2013). Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. World J Microbiol Biotechnol, 29(8), 1517-1523.

13. Mauch, F., Hadwiger, L. A., & Boller, T. (1988). Antifungal Hydrolases in Pea Tissue : I. Purification and Characterization of Two Chitinases and Two beta-1,3-Glucanases Differentially Regulated during Development and in Response to Fungal Infection. Plant Physiol, 87(2), 325-333.

14. Mazarei, M., Teplova, I., Hajimorad, M. R., & Stewart, C. N. (2008). Pathogen phytosensing: plants to report plant pathogens. Sensors, 8(4), 2628-2641.

15. Moloney, M. M., Walker, J. M., & Sharma, K. K. (1989). High efficiency transformation of




www.SID.ir

Archive of SID



*Brassica napus* using Agrobacterium vectors. Plant Cell Rep, 8(4), 238-242.

16. Neuhaus, J. M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., & Meins, F., Jr. (1991). High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. Plant Mol Biol, 16(1), 141-151.

17. Nurnberger, T., & Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. Curr Opin Plant Biol, 5(4), 318-324.

18. Pozo, M. a. J., Van Loon, L. C., & Pieterse, C. M. J. (2004). Jasmonates-signals in plant-microbe interactions. J. Plant Growth Regul, 23(3), 211-222.

19. Rushton, P. J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., & Somssich, I. E. (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. Plant Cell, 14(4), 749-762.

20. Salinas, J., Oeda, K., & Chua, N. H. (1992). Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco. Plant Cell, 4(12), 1485-1493.

21. Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition New York: Cold Spring Harbor.

22. Sharma, N., Sharma, K. P., Gaur, R. K., & Gupta, V. K. (2011). Role of chitinase in plant defense. Asian J Biochem, 6(1), 29-37.

23. Shokouhifar, F., Zamani, M. R., & Motallebi, M. (2011). Expression pattern of the synthetic pathogen-inducible promoter (SynP-FF) in the transgenic canola in response to *Sclerotinia sclerotiorum*. Iran J Plant Pathol, 9(1), 1-10.

24. Trudel, J., & Asselin, A. (1989). Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem, 178(2), 362-366.

25. Venter, M. (2007). Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. Trends Plant Sci, 12(3), 118-124.

26. Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., et al. (1999). Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. Fug Gent Biol, 26(2), 131-140.



www.SID.ir

Archive of SID



# Transformation of canola with a chimeric chitinase gene under control of the SP-FF synthetic pathogen-inducible promoter

**Moradyar M., Zamani M.R.., Motallebi M. and Aghazadeh R.**

**Plant Biotechnology Dept., National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, I.R. of Iran**

## Abstract

Plants are constantly challenged by the invading pathogens in their natural habitat. Expression of defensive genes from a promoter that is specifically activated in response to pathogen invasion is highly desirable for engineering disease-resistant plants. In this study, synthetic promoters were placed upstream of the chimeric chitinase defense gene to produce transformation vectors. Canola plants were transformed with three constructs, pGFC, pGMPC, pBISM2 containing synthetic promoters, SP-FF (FF elements + minimal promoter), SP-MP (only minimal promoter), and the CaMV 35S constitutive promoter, respectively. Enzyme activity assay indicated that the synthetic pathogen-inducible promoter (SP-FF) was responsive to the Methyl jasmonate (MJ) elicitor, whereas pGMPC, as a negative control did not respond. Transgenic lines were also evaluated for antifungal activity against two phytopathogenic fungi. Data show that leaf extracts from transgenic plants containing the SP-FF promoter treated with MJ, strongly inhibited fungal growth, especially that of *Sclerotinia sclerotiorum*, the major pathogen of canola. Results indicated that not only the SP-FF synthetic promoter is highly responsive to MJ, as an important chemical signal in necrotrophic pathogen defense, but the induced expression of the transgene under control of the synthetic promoter can increase the resistance of transgenic plants against pathogenic fungi.

**Key words**: Synthetic promoter; Canola; Chimeric chitinase; Antifungal activity.



www.SID.ir