

## مطالعه نقش پیشبر مصنوعی *SP-DDEE* القاء‌پذیر توسط بیمارگرهای قارچی جهت بیان ژن مقاومت در گیاه *Brassica napus*

مهدی مرادیار<sup>۱</sup>، مصطفی مطلبی<sup>۱\*</sup>، محمدرضا زمانی<sup>۱</sup> و رستم آقازاده<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۱۹)

### چکیده

بیان ژن‌های مقاومت توسط پیشبرهایی که صرفاً در پاسخ به بیمارگرها فعال می‌شوند مزیت بزرگی در تولید گیاهان مقاوم به بیماری محسوب می‌شود. در این بررسی ژن کیتیناز کایمری تحت پیشبر القاء‌پذیر با بیمارگر *SP-DDEE* به گیاه کلزا منتقل شد و پتانسیل این گیاهان در مهار رشد بیمارگرهای قارچی در محیط *in vivo* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این راستا، سه سازه *pGMPC*، *pGDEC* و *pBISM2* به ترتیب حاوی پیشبر *SP-DDEE* (شامل دو عنصر *D* و دو عنصر *E17* بالادست پیشبر حداقل)، *SP-MP* (شامل فقط پیشبر حداقل) و *CaMV35S* (شامل پیشبر دائمی) جهت تراریختی گیاهان مورد استفاده قرار گرفت. بررسی‌ها با استفاده از آزمون فعالیت آنزیمی مشخص نمود که پیشبر القائی مورد نظر نسبت به محرک متیل جاسمونات القاء‌پذیر بوده ولی پاسخ مشخصی به محرک سالیسیلیک اسید نشان نداد. بعلاوه، نتایج مشخص نمود عصاره دیسک‌های برگ گیاهان تراریخت حاوی پیشبر *SP-DDEE* تیمار شده با متیل جاسمونات به نسبت گیاهان شاهد قادر به مهار رشد بیمارگرهای قارچی *Sclerotinia sclerotiorum* و *Rhizoctonia solani* می‌باشند. در مجموع مشخص شد پیشبر *SP-DDEE*، نه تنها نسبت به محرک متیل جاسمونات به عنوان مولکول پیام رسان در مسیر مقاومت به بیمارگرهای نکروتروف القاء‌پذیر می‌باشد، بلکه میزان بیان ژن کیتیناز کایمری، تحت کنترل این پیشبر نیز جهت افزایش مقاومت نسبت به بیمارگرهای قارچی مناسب به نظر می‌رسد.

کلیدواژه: پیشبر مصنوعی، کیتیناز کایمری، کلزا، *Rhizoctonia solani*، *Sclerotinia sclerotiorum*

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: motalebi@nigeb.ac.ir

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

## Study of the role of the synthetic fungal pathogen inducible SP-DDEE promoter for expression of resistant gene in *Brassica napus*

M. Moradyar<sup>1</sup>, M. Motallebi<sup>1\*</sup>, M.R. Zamani<sup>1</sup>, and R. Aghazadeh<sup>1</sup>

(Received: 27.12.2015; Accepted: 8.2.2018)

### Abstract

The 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, chimeric chitinase gene under the control of SP-DDEE pathogen inducible promoter transformed to the canola plants and these plants were evaluated for their in vivo biocontrol potential against fungal pathogens. In this regard, three constructs, pGDEC, pGMPC, pBISM2 containing synthetic promoters, SP-DDEE (two D and two E elements + minimal promoter), SP-MP (minimal promoter), and the CaMV35S constitutive promoter, respectively were used. Enzyme activity assay demonstrated that the synthetic pathogen-inducible promoter was responsive to the Methyl jasmonate (MJ) elicitor, but not responsive to the salicylic acid. Moreover, results indicated that leaf total protein from transgenic lines harboring the SP-DDEE promoter treated with MJ, inhibited the growth of the fungal pathogens of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*. Overall, data show that not only the SP-DDEE synthetic promoter is highly responsive to MJ, as an important chemical signal in necrotrophic pathogen defense, but the inducible expression of the chimeric chitinase gene, when controlled by the SP-DDEE promoter, is also seems to be appropriate to increased resistance to fungal pathogens.

**Keywords:** Canola; Chimeric chitinase; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotinia sclerotiorum*; Synthetic promoter

---

\*Corresponding author's E-mail: motalebi@nigeb.ac.ir

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

## مقدمه

اتصال ناحیه اتصال به کیتین (ChBD)، از باکتری *Serratia marcescens* به انتهای کربوکسیلی آنزیم کیتیناز ۴۲ (chit42) قارچ *T. atroviride* موجب افزایش قابل توجه در میزان فعالیت کیتینازی و ضد قارچی کیتیناز کایمری به دست آمده، نسبت به Chit42 شد (Matroodi et al. 2013).

از سوی دیگر در بیشتر موارد در مهندسی ژنتیک گیاهان با هدف مقاومت در برابر بیمارگرها، از پیشبرهای دائمی برای بیان تراژن استفاده می‌شود. اما استفاده از این پیشبرها به دلیل کاهش رشد و تغییر نمو، در بسیاری موارد می‌تواند منجر به ایجاد گیاهان ضعیف و با کیفیت پایین شود (Hammond-Kosack & Parker 2003). این موضوع، اهمیت استفاده از پیشبرهای القاءپذیر با بیمارگر را نمایان می‌سازد. تاکنون تعداد زیادی پیشبر طبیعی القاءپذیر با بیمارگر شناسایی و مورد مطالعه قرار گرفته اند. بررسی‌ها نشان می‌دهند که اغلب این پیشبرها در بسیاری موارد دارای فعالیت غیر اختصاصی بوده و واکنش در برابر محرک‌های مختلف از خود نشان می‌دهند. همچنین الگوی بیان آنها در شرایط مختلف مناسب و قوی نیست (Gurr & Rushton 2005, Rushton et al. 2002, Venter 2007) این رو تولید پیشبرهای مصنوعی شامل عناصر کنشی منفرد و شناخته شده می‌تواند به عنوان راهبردی مناسب مطرح شود (Salinas et al. 1992).

تحقیقات متعدد نشان دهنده وجود عناصر کنشی متفاوت مانند جعبه‌های S، D و W در ناحیه پیشبرهای طبیعی القاءپذیر با بیمارگرها می‌باشد (Dey et al. 2015). از این رو در بسیاری از استراتژی‌های ساخت پیشبرهای مصنوعی، از این عناصر کنشی در ترکیب با توالی‌های حداقل پیشبری (Minimal promoter) استفاده می‌شود (Rushton et al. 2002, Gurr & Rushton 2005).

کلزا به عنوان یک محصول روغنی عمده و استراتژیک دنیا و ایران در معرض بیماریهای مهم قارچی از جمله پوسیدگی اسکلووتینیایی ساقه قرار دارد. استفاده از قارچ کش‌ها و آفت کش‌های شیمیائی در سطح وسیع برای مبارزه با این بیمارگرها علاوه بر هزینه‌های سنگین، اثرات سوء متعددی بر محیط زیست می‌گذارند و همچنین در طی زمان سبب ایجاد مقاومت در بیمارگرها می‌شوند (Limon & Codon 2004). در این راستا انتقال ژنهای مقاومت به گیاهان می‌تواند راه حل مناسبی باشد. از آنجا که کیتین، در ساختار دیواره بیمارگرهای قارچی نقش مهمی دارد (Trudel & Asselin 1989)، آنزیم‌های کیتینازی به دلیل تجزیه این پلیمر می‌توانند به عنوان یک عامل ضد قارچ مناسب عمل نمایند. از این رو در بسیاری از برنامه‌های اصلاحی، انتقال ژنهای کیتینازی به ارقام تجاری به عنوان یک راهبرد مناسب جهت ایجاد مقاومت در برابر بیمارگرهای قارچی مورد استفاده قرار گرفته است (Sharma et al. 2011).

در این بین کیتینازهای قارچی به ویژه کیتینازهای متعلق به جنس تریکودرما بسیار کارآمد بوده و یکی از منابع عمده ژنهای مقاومت در برنامه‌های انتقال ژن به گیاهان می‌باشند (Lorito et al. 1998). علیرغم این کارآمدی، کیتینازهای قارچ *Trichoderma atroviride* عموماً فاقد ناحیه اتصال به کیتین (ChBD) chitin-binding domain هستند. تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد استفاده از مهندسی پروتئین و افزودن ChBD به آنها می‌تواند منجر به اتصال مؤثرتر آنزیم به کیتین، افزایش فعالیت ویژه و همچنین فعالیت مؤثرتر بر روی کیتین کریستالی شود (Limon et al. 2001). نتایج تحقیقات قبلی ما نشان داد

(Mazarei et al. 2008, Cazzonelli & Velten 2008).

از جمله این عناصر کنشی، عناصر E17 و D می‌باشند که بررسی‌های انجام شده موید نقش آنها در پاسخ به حمله بیمارگرها یا محرک‌های مربوطه می‌باشد (Heise et al. 2001, Kirsch et al. 2002). بعلاوه این عناصر به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند القاء‌پذیری سریع و قوی در برابر بیمارگرها، بیان پایه خیلی کم و عدم القاء‌پذیری در برابر زخم و آسیب‌های فیزیکی، گزینه مناسبی برای ساخت پیشبر مصنوعی می‌باشند (Gurr & Heise et al. 2002, Rushton 2005).

تحقیقات اولیه انجام شده ما مشخص نمود پیشبر مصنوعی *SP-DDEE* (متشکل از دو عنصر D و دو عنصر E17 در بالادست توالی پیشبر حداقل *CaMV35S*) در پاسخ به محرک‌ها و بیمارگرهای قارچی عملکرد مناسبی از خود نشان می‌دهد. از این رو در این تحقیق ژن کیتیناز کایمری جدید، تحت کنترل پیشبر مصنوعی *SP-DDEE*، به گیاه کلزا منتقل شد و القاء‌پذیری پیشبر و توان بالقوه‌ی تراژن تحت کنترل آن در مهار رشد بیمارگرهای قارچی *Rhizoctonia solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* در محیط *in vivo* مورد ارزیابی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد گیاهی و سویه‌های باکتریایی و قارچی

بذرهای کلزا رقم R line Hyola 308 از شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی (تهران، ایران) تهیه گردیده و تا زمان استفاده در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری *Escherichia coli* سویه (DH5 $\alpha$ ) و باکتری *Agrobacterium tumefaciens* سویه LBA4404 از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک (تهران، ایران) تهیه گردید. قارچ‌های *S. sclerotiorum* جدایه ۲۳۱۰ (اهدایی آقای

دکتر همایون افشاری آزاد، موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور)، جدایه R2 قارچ *R. solani* (اهدایی آقای دکتر بهرام شریف نبی، دانشگاه صنعتی اصفهان) تهیه و استفاده شد.

### پلاسمیدها و مواد مورد استفاده

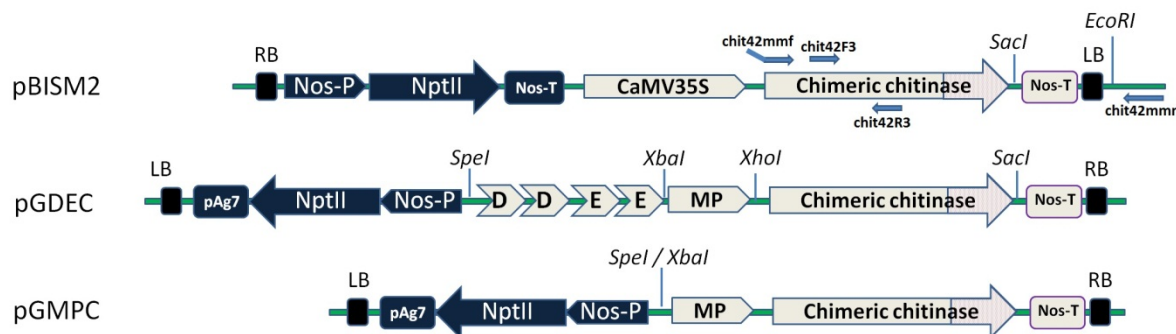
در این تحقیق از پلاسمید (Fermentas, Vilnius, pJET1.2 Lithuania) برای همسانه‌سازی و از پلاسمیدهای pGDDEE (حاوی عناصر D و E17 بالادست ناحیه پیشبر حداقل) و pBISM2 (Matroodi et al. 2013) برای ساخت ناقلین بیانی گیاهی استفاده شد. همچنین توالی یابی سازه‌ها توسط شرکت ژن‌فن‌آوران (تهران، ایران) انجام شد.

### فرایندهای عمومی و ساخت ناقلین بیانی

مراحل تهیه DNA ژنومی و پلاسمیدی، الکتروفورز ژل آگارز، واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR)، هضم آنزیمی، اتصال، تهیه سلول مستعد و تراریختی باکتری‌ها مطابق روش‌های مرسوم انجام گرفت (Sambrook & Russell 2001).

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 (شکل ۱) (جدول ۱).

محصول PCR پس از هضم آنزیمی با آنزیم‌های *EcoRI* و *XhoI* در ناقل pJET1.2 وارد شد. پس از هضم ناقص آنزیمی این سازه، با آنزیم‌های برشی *SacI* و *XhoI* (به دلیل وجود یک محل شناسایی آنزیم *SacI* درون ژن کیتیناز)، ژن کیتیناز کایمری از روی ژل جداسازی و در جایگاه‌های مشابه در ناقل بیانی pGDDEE همسانه‌سازی



شکل ۱. تصویر شماتیک ناحیه T-DNA پیشبرهای مصنوعی ساخته شده. سازه pGDEC حاوی پیشبر SP-DDEE (دو عنصر D و دو عنصر E17 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).

**Fig.1** Schematic representations of the T-DNA region of constructed synthetic promoters. The pGDEC contains the SP-DDEE synthetic promoter (carrying dimerized form of D and E cis-acting elements upstream of the CaMV35S minimal promoter), the pGMPC containing only the CaMV35S minimal promoter (as a negative control) and pBISM2 containing the constitutive CaMV35S promoter (as a positive control). 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)

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق. تکثیر ژن کیتیناز کایمری، با استفاده از آغازگرهای chit42mmf و chit42mmr انجام گرفت. جهت اطمینان از کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای ACC-f و ACC-r استفاده شد. به منظور حصول اطمینان از عدم آلودگی DNA استخراج شده از گیاهان تراریخت به باکتری آگروباکتریوم، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن VirGene (VirG-f/r) انجام گرفت. برای اثبات حضور تراژن در گیاهان تراریخت احتمالی از آغازگرهای Chit42 R3 و Chit42 F3 در داخل ژن کایمر استفاده گردید.

**Table 1.** Oligonucleotides (primers) used in this study. The chimeric chitinase was amplified using chit42mmf and chit42mmr primers. DNA extraction quality and quantity was checked using PCR with ACC-f and ACC-r primers. Vir Gene specific primers (VirG-f/r) were used to checking possibility of agrobacterium DNA contamination. PCR was carried out for confirmation of the existence of the transgenes in putative transgenic plants using a combination of Chit42F3 and Chit42R3 primers.

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'

شد. در این سازه بیانی جدید که pGDEC نامگذاری گردید، ژن کیتیناز کایمری تحت کنترل پیشبر مصنوعی القاءپذیر با بیمارگر (SP-DDEE) قرار گرفت. برای ساخت سازه pGMPC حاوی پیشبر حداقل (به عنوان شاهد منفی)، از سازه ی pGDEC استفاده شد. قطعه حاوی عناصر کنشی سیس DDEE از بالادست توالی پیشبر

محیط انتخابی القاء نوساقه (1X MS, sucrose 30 g/l, ۱۵ mg/l حاوی BAP 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کانامایسین و ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم، منتقل شدند و ریز نمونه‌ها هر دو هفته یکبار به محیط مشابه واگشت شدند. در هفته سوم نوساقه‌های متعددی در سطح فوقانی بعضی از ریز نمونه‌ها به وجود آمدند. تعدادی از این نوساقه‌های 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.

نوساقه‌های 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) کانامایسین و حاوی ۲۰۰ mg/l سفوتاکسیم منتقل گردیدند. پس از رشد کافی گیاهچه و تشکیل مرستم فعال، نمونه‌ها به محیط ریشه‌زایی (1X MS, sucrose 30 g/l, IBA 2 mg/l, agar 8 mg/l) به علاوه آنتی بیوتیک‌های کانامایسین (۲۵ mg/l) و سفوتاکسیم (۲۰۰ mg/l) انتقال داده شدند. لازم به ذکر است بعضی از نمونه‌ها در همان محیط طویل شدن نوساقه ریشه دار شدند و احتیاجی به انتقال به محیط ریشه‌زایی نبود.

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

#### آزمون مولکولی گیاهان تراریخت

از گیاهان به دست آمده استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت (Sambrook and Russell 2001). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، توسط الکتروفورز و

حداقل، با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم‌های برشی *XbaI* و *SpeI* و سپس اتصال مجدد این دو محل حذف گردید (شکل ۱).

#### آماده‌سازی مواد گیاهی و روش انتقال ژن به گیاه

به منظور انتقال ژن از روش مولونی و همکاران استفاده شد (Moloney et al. 1989). در این روش بذور کلزا ضدعفونی شده و برای جوانه زدن روی محیط کشت جوانه‌زنی (1/2 Murashige and Skoog's medium (MS), 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 سانتی‌گراد نگهداری شدند. برگهای لپه ای گیاهان ۵ روزه که طول دمبرگ آنها حدود ۲ میلی‌متر 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, Benzil Amino Purin (BAP) 3.5 mg/l, agar 8 g/l, pH 5.8) کشت شدند. ریزنمونه‌ها پس از این مرحله آماده دریافت آگروباکتریوم بودند. از کشت شبانه آگروباکتریوم ترانسفورم شده (OD650=1) رسوب تهیه شد (سانتریفوژ با سرعت ۵۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه) سپس باکتریهای رسوب یافته در محلول MS به حالت سوسپانسیون در آورده شد. ریز نمونه‌های مورد استفاده، شامل برگهای لپه ای بودند که ۴۸ ساعت بر روی محیط کشت القاء نوساقه (محیط 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 خشک گردند. سپس در محیط هم کشتی (مشابه محیط پیش کشت)، قرار داده شدند و در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت، ریز نمونه‌ها به

فاکتور مهم فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی غوطه ور شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه دسیکاتور تحت فشار منفی قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه روی کاغذ صافی حاوی محیط کشت پایه MS درون پتری نگهداری شد. نمونه‌های شاهد، تحت تیمار آب مقطر قرار گرفتند. اثر فاکتورهای مطالعه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی مورد بررسی قرار گرفت.

### آزمون رنگ سنجی

به منظور بررسی تاثیر محرک‌ها در افزایش بیان تراژن، از آزمون فعالیت کیتیناز استفاده شد. به این منظور واکنشی (۵۰۰ μl) شامل کیتین کلونیدی (۳/۸ mg) به عنوان سوبسترا و محلول آنزیمی (حاوی عصاره پروتئینی دیسک‌های برگ) به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه قرار گرفت. واکنش آنزیمی با اضافه کردن یک میلی لیتر NaCl (1%)، متوقف شد. پس از انجام سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ g، مایع رویی جدا شده و با اضافه کردن ۱۰۰ μl بافر پتاسیم تترابورات به مدت سه دقیقه جوشانده شد. سپس مقدار ۳ ml واکنشگر DMAB به محلول اضافه شد. میزان زیر واحد آزاد شده ان استیل گلوکزآمین (GlcNAc) توسط روش زیلینگر و همکاران (Zeilinger et al. 1999) مورد بررسی قرار گرفت. 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 ۵ mm از محیط رشد قارچ‌های بیمارگر جدا شده و

آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای ژن استیل کوانزیم آ کربوکسیلاز (ACC) گیاه کلزا (ACC-r و ACC-f) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). برای اثبات حضور تراژن در گیاهان تراریخت احتمالی از آغازگرهای Chit42 F3 و Chit42 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 پلاسמיד 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 منظور DNA ژنومی استخراج شده، با استفاده از آنزیم برشی HindIII هضم شده و به روش موئینگی، به غشاء نایلونی (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) منتقل شد. از آغازگرهای Chit42 F3 و Chit42 R3 ناقل pBISM2 حاوی ژن کایمر به عنوان الگو، برای ساخت پروب نشاندار با استفاده از کیت غیر رادیواکتیو (Roche Applied Science, Basel, Dig labeled-dNTP Switzerland) و تکثیر به روش PCR استفاده گردید و پروب مورد نظر به طول ۵۸۹ جفت باز تهیه گردید.

### تیمار دیسک‌های برگ با محرک‌ها با هدف تحریک بیان تراژن

در هر آزمایش به منظور اعمال تیمارها، ابتدا از هر سازه (pGDEC و pGMPC و pBISM2) و گیاه غیر تراریخت سه گیاه در مرحله پنج برگ انتخاب و از سه برگ باز شده جوان آنها دیسک‌هایی به قطر دو و نیم سانتی متر تهیه شد. این دیسک‌ها درون محرک‌های سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) و متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) به عنوان دو

بعد،  $100 \mu\text{l}$  از عصاره پروتئینی برگ‌های تیمار شده با محرک یا آب روی میسلیم‌های گسترده شده روی لام قرار گرفت. تاثیر عصاره پروتئینی بر میزان هضم، نازک شدن و پارگی دیواره میسلیم‌ها هر یک ساعت یک بار توسط میکروسکوپ نوری (Nikon, Eclipse 80i, Japan) مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

### آنالیز داده‌ها

مراحل نرمال‌سازی داده‌ها و رسم گراف‌ها به وسیله برنامه Excel 2010 و آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از برنامه آماری SPSS 18 انجام شد.

### نتیجه

در این تحقیق، ناقل بیانی pGDEC، با جایگزین کردن ژن کیتیناز کایمری (*ChBD + Chit42*) ساخته شده در گروه (Matroodi et al. 2013) به جای ژن *gus* در ناقل pGDDEE حاوی پیشبر مصنوعی القاء‌پذیر با بیمارگر، ساخته شد (شکل ۱). همچنین به منظور بررسی و مقایسه عملکرد پیشبر مصنوعی القاء‌شونده با بیمارگر، سازه pGMPC که با حذف عناصر کنشی سیس DDEE از پیشبر pGDEC به دست آمد، به عنوان شاهد منفی و سازه pBISM2 حاوی پیشبر دائمی *CaMV35S* به عنوان شاهد مثبت ساخته شد (شکل ۱). صحت این همسانه‌سازی با استفاده از آزمون PCR و سپس توالی‌یابی، مورد تأیید قرار گرفت. سپس، این سازه‌ها به کمک باکتری آگروباکتریوم به گیاه کلزا رقم R Line Hyolla 308 منتقل شدند.

مراحل بازرایی گیاهان، روی محیط کشت انتخابی حاوی کانامایسین انجام گرفت. برای تأیید تراریختی این گیاهان از تکنیک‌های مولکولی PCR و سادرن بلات

در مرکز یک پلیت حاوی PDA قرار داده شد. پس از اینکه اندازه کلنی قارچ به حدود  $3 \text{ cm}$  رسید در لبه‌های آن چند چاهک ایجاد شده و عصاره برگ‌ها هر  $3$  ساعت به آنها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت  $48$  ساعت در  $28$  درجه در تاریکی نگهداری شد.

بررسی کمی میزان مهار رشد قارچ‌ها با روش Microspectrophotometric assay انجام گرفت (Broekaert et al. 2006). در این روش از پلیت  $96$  خانه ای استفاده شد. هر چاهک حاوی ( $16 \text{ mg/ml}$ ) Potato Dexterous Broth (PDB)، حدود  $2000$  اسپور یا قطعات میسلیم و عصاره پروتئینی ( $40 \mu\text{g}$ ) برگ‌های گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرک و آب تا حجم نهایی  $200 \mu\text{l}$  بود. پس از قرار دادن پلیت در تاریکی در دمای  $27$  درجه به مدت  $30$  دقیقه، جذب در طول موج  $595$  نانومتر توسط دستگاه الیزا (ASYS Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) خوانده شد. میزان جذب بعد از گذشت  $48$  ساعت مجدداً اندازه‌گیری 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  $\Delta C$  میزان جذب تصحیح شده برای نمونه شاهد و  $\Delta T$  مقدار جذب تصحیح شده نمونه مورد بررسی می‌باشد. جذب تصحیح شده عبارت است از میزان جذب در  $595$  نانومتر بعد از  $48$  ساعت از زمان شروع اعمال تیمارها منهای مقدار جذب اندازه‌گیری شده پس از  $30$  دقیقه از زمان شروع آزمایش.

فعالیت ضد قارچی همچنین در سطح میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفت (Kronland & Stanghellini 1988). قطعه  $3 \text{ mm}^3$  از محیط کشت حاوی قارچ *R. solani* روی سطح تمیز یک لام شیشه‌ای قرار گرفت و داخل محفظه‌ای مرطوب انکوبه شد.  $24$  تا  $48$  ساعت

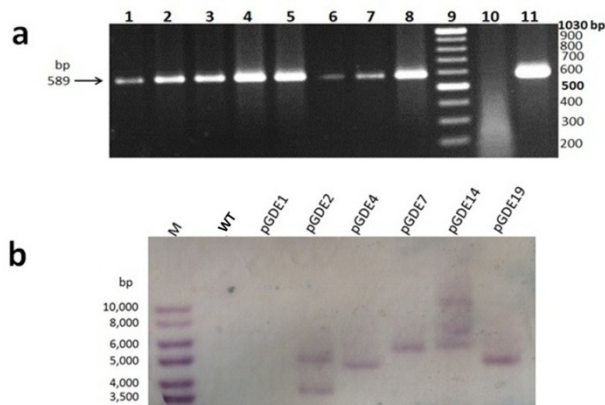


کننده T-DNA سازه pGDEC، سه لاین (گیاهان شماره ۴، ۷، و ۱۹) که حاوی تک نسخه از تراژن بودند برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند (شکل ۲b).

### فعالیت آنزیمی

نتایج بررسی‌های آنزیمی نشان داد که میزان فعالیت کیتینازی در دیسک‌های برگ گیاهان تراریخت تیمار شده با متیل جاسمونات به صورت معناداری نسبت به حالت تیمار با آب 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 (شکل ۳).

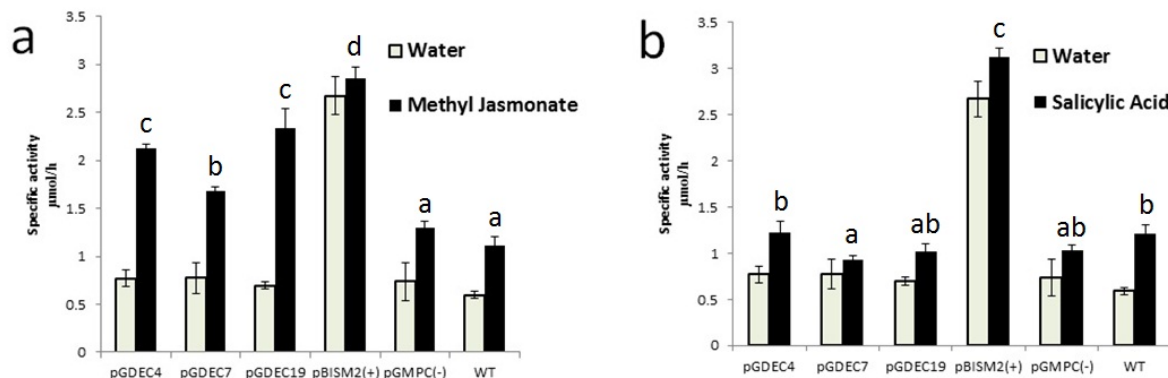
نتایج نشان داد کلیه لاین‌های تراریخت بین ۲/۱ تا ۳/۳ برابر افزایش در فعالیت کیتینازی نسبت به حالت تیمار با آب نشان دادند که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری محسوب می‌شود ( $p < 0.01$ ) (شکل ۳). در بین لاین‌های مورد ارزیابی pGDEC7 و pGDEC19 به ترتیب کمترین و بیشترین میزان القاء را نشان دادند. بعلاوه، میزان افزایش فعالیت آنزیمی در لاین pGDEC19 حاوی پیشبر القائی در پاسخ به محرک متیل جاسمونات تقریباً نزدیک به لاین pBISM28 حاوی 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 به دست آمده از تیمار دیسک‌های برگ با محرک سالیسیلیک اسید نشان داد که اگرچه میزان فعالیت کیتینازی در پاسخ به این محرک در همه ی گیاهان تراریخت تا اندازه ای افزایش یافت اما افزایش مشابهی در گیاهان شاهد منفی نیز مشاهده شد و از این نظر تفاوت معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد که مویید عدم تحریک‌پذیری پیشبر القائی در پاسخ به این محرک



شکل ۲. a) تائید تراریختی گیاهان، با آزمون PCR. تکثیر قطعه ۵۸۹ جفت بازی از DNA ژنومی با استفاده از آغازگرهای Chit42R3 و Chit42F3. ۱ تا ۸: لاین‌های کلزای تراریخت، ۹: مارکر مولکولی Mix، ۱۰: کلزای غیر تراریخت، ۱۱: پلاسמיד DNA pBISM2. b) آزمون سادرن بلات گیاهان تراریخت. ژنومی استخراج شده از گیاهان، با آنزیم برشی HindIII هضم شده و بعد از انجام الکتروفورز و انتقال به غشاء نایلونی، هیبریداسیون با پروب ۵۸۹ جفت بازی نشان دار شده با دیگوکسی ژنین انجام گرفت. M: مارکر مولکولی Mix، Wild type (WT)، گیاه غیر تراریخت، ۳ تا ۸: لاین‌های کلزای تراریخت.

Fig.2 a: The PCR analysis of putative transgenic canola plants. 589 bp fragments were amplified by nested PCR using a combination of Chit42F3 and Chit42R3 primers and the DNA of different putative transgenic plants as template; Lane 1-8: transgenic canola lines, Lane 9: DNA ladder mix, Lane 10: non-transgenic canola as WT, Lane 11: Plasmid pBISM2. b: Southern blot analysis of transgenic plants. Canola DNA was digested with HindIII, electrophoresed and hybridized with the digoxigenin-labelled 589 bp partial internal fragment of the chimeric chitinase gene as a probe. The number of bands reflects the number of transgene insertions. M: DNA ladder mix, wt: non-transgenic, Lanes 3-8: transgenic canola lines. Molecular weight DNA markers are shown on the left

استفاده شد (شکل ۲). نتیجه آزمون سادرن حضور یک تا سه نسخه از تراژن را در گیاهان تراریخت تائید نمود. کلیه گیاهان تراریخت مورد بررسی دارای رشد و نمو و ظاهری طبیعی بودند. از بین گیاهان تراریخت دریافت



شکل ۳. نتایج فعالیت کیتینازی لاین های کلزای دارای پیشبر مصنوعی در پاسخ به تیمار محرک های (a) متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و (b) سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار). دیسک های برگ پس از قرار گرفتن در معرض محرک ها، ۲۴ ساعت در دمای ۲۲ درجه انکوبه شدند و سپس فعالیت کیتینازی مورد ارزیابی قرار گرفت (داده ها میانگین سه تکرار) (حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار با آزمون دانکن ۵٪ است). 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.

**Fig.3 Results of chitinase activity of the synthetic promoters in canola plants exposed to 50 µM methyl jasmonate (a) or 2 mM salicylic acid (b).** Leaf discs incubated at 22°C for 24 h after exposure to the elicitors. Each value represents the mean (± standard error) of three independent experiments. Mean with the same letter are not significantly different by Duncan grouping at (P<0.05). Control: leaf discs treated with water. Production of 1 µmole of colorful product per hour was considered as one unit of activity (U). P < 0.01

با میزان مهار مشاهده شده در گیاهان غیر تراریخت و لاین‌های تراریخت حاوی پیشبر حداقل (به عنوان شاهد منفی) تفاوت قابل توجهی داشت (شکل ۴ و ۵).

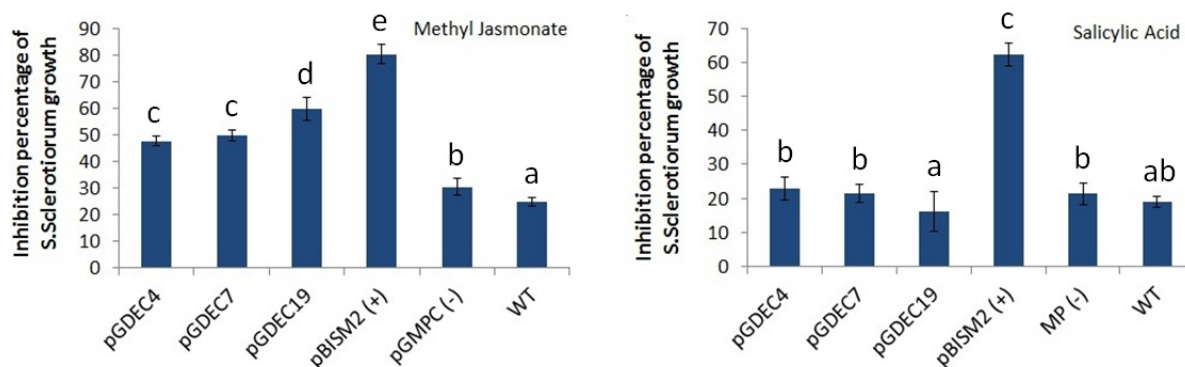
همچنین، نتایج حاصل از آزمون نشر شعاعی (radial diffusion assay) جهت بررسی تاثیر عصاره پروتئینی بر مهار رشد قارچ‌های *S. sclerotiorum* و *R. solani* نشان داد که عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت تیمار شده با محرک متیل جاسمونات، قادر به مهار بیمارگرهای قارچی می‌باشند. بعلاوه، میزان مهار ایجاد شده توسط لاین pGDEC19 تقریباً نزدیک به میزان مهار ایجاد شده توسط لاین pBISM28 می‌باشد (شکل ۶). در حالی که در حالت تیمار با سالیسیلیک اسید میزان مهار مشاهده شده در لاین تراریخت حاوی پیشبر القائی به طرز مشهودی از مهار عصاره پروتئینی گیاه شاهد مثبت در هر دو قارچ بیمارگر کمتر بود (شکل ۶).

می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد هر دو محرک سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات تا اندازه ای موجب افزایش فعالیت کیتینازی در گیاهان شاهد و غیر شاهد می‌شوند (شکل ۳) که احتمالاً می‌تواند ناشی از القاء ژنهای کیتینازی گیاه در برابر محرک ها باشد.

### فعالیت ضد قارچی

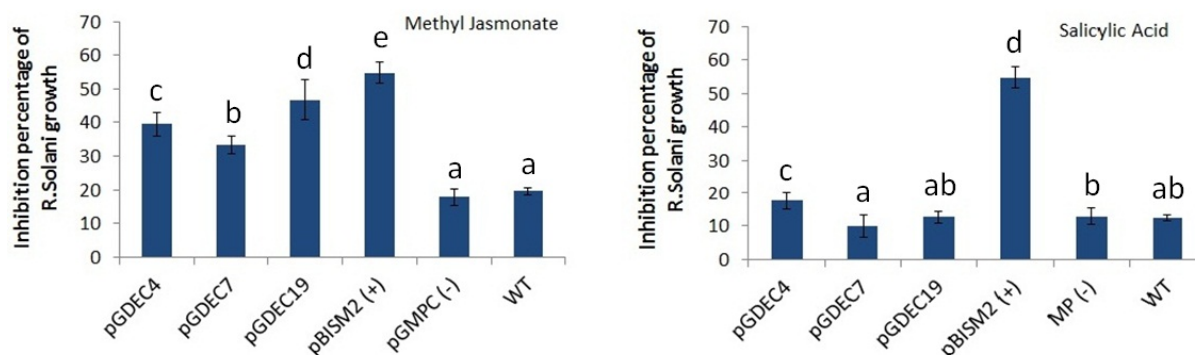
نتایج نشان داد که عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت حاوی پیشبر القائی، پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات تا اندازه قابل توجهی موجب مهار رشد هر دو بیمارگر *R. Solani* و *S. sclerotiorum* شد.

میزان مهار قارچ *S. sclerotiorum* (۴۷٪ - ۵۹٪)، در تمام لاین ها بیش از *R. solani* (۳۳٪ - ۴۶٪) بود. نتایج مشخص نمود که میزان مهار ایجاد شده توسط لاین‌های تراریخت حاوی پیشبر القائی در مورد هر دو قارچ بیمارگر



شکل ۴. تاثیر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرک های متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) بر میزان مهار رشد قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*. داده ها نشان دهنده میانگین با سه تکرار می باشد (حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار با آزمون دانکن ۵٪ است).

Fig.4 The growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by crude extracts of stable transgenic and non-transgenic plants following MJ and SA elicitors treatment. Each value represents the mean ( $\pm$  standard error) of three independent experiments. Mean with the same letter are not significantly different by Duncan grouping at ( $P<0.05$ ).



شکل ۵. تاثیر عصاره پروتئینی گیاهان تراریخت و غیر تراریخت تیمار شده با محرک های متیل جاسمونات (۵۰ میکرو مولار) و سالیسیلیک اسید (۲ میلی مولار) بر میزان مهار رشد قارچ *Rhizoctonia solani*. داده ها نشان دهنده میانگین سه تکرار می باشد (حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار با آزمون دانکن ۵٪ است).

Fig. 5. The growth inhibition of *Rhizoctonia solani* by crude extracts of stable transgenic and non-transgenic plants following MJ and SA elicitors treatment. Each value represents the mean of three independent experiments. Mean with the same letter are not significantly different by Duncan grouping at ( $P<0.05$ ).

## بحث

استفاده از پیشبرهای دائمی در بیان تراژن در گیاهان تراریخت ظرف سال‌های اخیر امری معمول بوده ولی در عین حال گزارش‌های متعدد حاکی از بروز ناهنجاری در رشد و نمو و هرز رفتن انرژی این گیاهان می‌باشد (Gurr

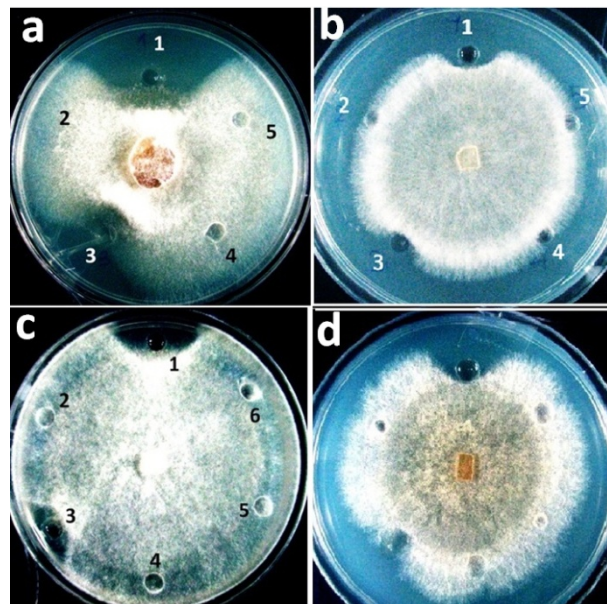
در نهایت بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که عصاره پروتئینی برگ لاین pGDEC19 تیمار شده با محرک متیل جاسمونات موجب هضم نوک و دیواره میسلیم قارچ *R. solani* می‌شود در حالی که عصاره گیاه شاهد (pGMPC11) تیمار شده با محرک تاثیر چندانی رو میسلیم‌های مورد نظر نداشت (شکل ۷).

مزیت بزرگی در پروژه‌های تراریختی گیاهان محسوب می‌شود.

مطالعات اخیر نشان می‌دهند برخی عناصر کنشی شناخته شده، در ترکیب با ناحیه پیشبر حداقل *CaMV35S* می‌توانند موجب بیان کارآمد تراژن مقاومت، در زمان حمله بیمارگر شوند (Cazonelli & Velten 2008, Mazarei et al. 2008, Rushton et al. 2002). بسیاری از پیشبرهای طبیعی القاء‌پذیر با بیمارگرها دارای عناصر کنشی مجزا مثل جعبه‌های S, D, و W می‌باشند (Dey et al. 2015). مشخص شده است که در ناحیه پیشبر بسیاری از ژنهای مقاومت در گیاهان، جعبه‌های W به صورت خوشه ای و به تکرار زیاد وجود داشته و در این حالت اثر هم افزایی دارند (Lebel et al. 1998, Rushton & Somssich 1998). هرچند اولگم و همکاران (Eulgem et al. 2000) گزارش کردند که حتی یک جعبه W نیز می‌تواند برای بیان القائی کافی باشد.

راشتون و همکاران (Rushton et al. 2002) با استفاده از عناصر کنشی S, D, و W موفق به ساخت پیشبرهای مصنوعی شدند که القاء‌پذیری قابل توجهی به طیف وسیعی از محرک‌ها و بیمارگرها نشان دادند. مطالعات نشان می‌دهد عنصر کنشی E17 که شامل دو جعبه W می‌باشد نقشی کلیدی در پاسخ دفاعی پس از حمله بیمارگر ایفا می‌نماید (Heise et al. 2002, Kirsch et al. 2001, Shokouhifar et al. 2013). همچنین تحقیقات مشخص نموده است عنصر کنشی D به دست آمده از ژن *PcPR2* گیاه جعفری علاوه بر تحریک‌پذیری بالا نسبت به محرک‌ها در پاسخ‌های دفاعی نیز نقش اساسی دارد (Heise et al. 2002).

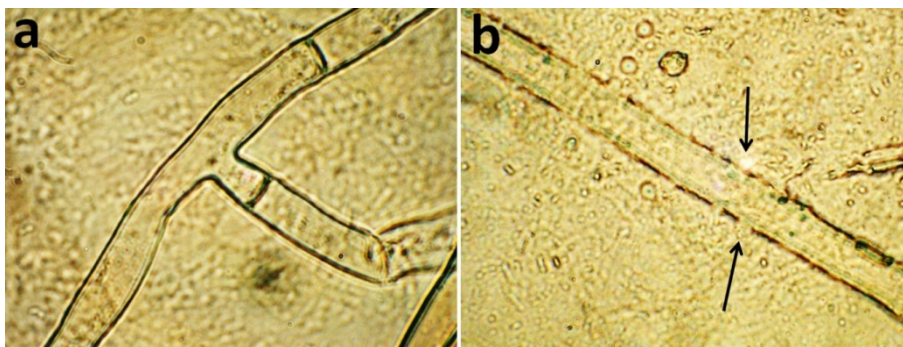
چن و همکاران (Chan et al. 2015) با استفاده از



شکل ۶. نتایج تاثیر عصاره پروتئینی لاین‌های تراریخت تیمار شده با محرک‌ها، بر مهار رشد قارچ‌های بیمارگر، با استفاده از آزمون نشر شعاعی. (a) تاثیر روی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات، (b) تاثیر روی قارچ *Rhizoctonia solani* پس از تیمار با محرک متیل جاسمونات، (c) تاثیر روی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* پس از تیمار با محرک سالیسیلیک اسید، (d) تاثیر روی قارچ *Rhizoctonia solani* پس از تیمار با محرک سالیسیلیک اسید، ۱: عصاره لاین pBISM28، ۲: عصاره لاین pGDEC19 تیمار شده با آب، ۳: عصاره لاین pGDEC19 تیمار شده با محرک، ۴: عصاره لاین pGMPC11، ۵: عصاره گیاه غیر تراریخت، ۶: بافر استخراج پروتئین.

Fig. 6. The radial diffusion assay of crude protein extracts of transgenic canola induced by methyl jasmonate, against a) *Sclerotinia sclerotiorum* and b) *Rhizoctonia solani* or induced by salicylic acid against c) *Sclerotinia sclerotiorum* and d) *Rhizoctonia solani*. 1) pBISM28 crude protein extract as a positive control, 2) pGDEC19 induced by water, 3) pGDEC19 induced by elicitor, 4) pGMPC11, 5) non-transgenic canola, 6) protein extraction buffer. (2,4,5 and 6 as negative control)

(Rushton 2005). از این رو بیان ژن‌های مقاومت تحت پیشبرهایی که صرفاً در زمان حضور بیمارگر فعال می‌شوند



شکل ۷. تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده در میسلیوم های قارچ *Rhizoctonia solani* پس از قرار گرفتن در معرض عصاره پروتئینی گیاهان تیمار شده با متیل جاسمونات. (a) میسلیوم ها، ۶ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره لاین pGMPC11 به عنوان شاهد (تغییرات قابل ملاحظه‌ی مشاهده نمی‌شود). (b) میسلیوم ها، ۶ ساعت پس از قرارگیری در معرض عصاره لاین pGDEC19. هضم دیواره هیف ها کاملا مشهود می‌باشد.

**Fig. 7. Morphological changes induced in *Rhizoctonia solani* hyphae after exposure to crude protein extract. (a) Control hyphae exposed to induced pGMPC11 crude extract showing a regularly septate mycelium. (b) Mycelium of *Rhizoctonia solani*, 6h after addition of the induced pGDEC19 crude extract. Cell wall lysis was observed (as indicated by arrows)**

حاوی پیشبر القائی، میزان متفاوتی از فعالیت کیتینازی نشان دادند که این امر می‌تواند ناشی از اثرات درج شدن T-DNA در نواحی متفاوت ژنوم باشد ولی با این حال حتی در مورد لاین pGDEC7 با کمترین میزان القاء و فعالیت کیتینازی، میزان مهار رشد قارچ‌های بیمارگر قابل توجه و کاملا بالاتر از گیاهان شاهد بود. بعلاوه بیشترین فعالیت ضد قارچی در لاین pGDEC19 مشاهده شد که بالاترین میزان القاء‌پذیری و فعالیت آنزیمی را نشان داده بود.

یافته‌های مختلف نشان می‌دهد کیتینازهای گیاهی عموماً روی نوک هیف قارچ‌های بیمارگر موثر بوده و قادر به هضم کارآمد اسپور یا دیواره محکم میسلیوم‌ها نیستند (Joosten *et al.* 1995, Mauch *et al.* 1988, Neuhaus *et al.* 1991). در حالی که کیتینازهای قارچی قادر به تاثیر روی همه‌ی این ساختارها می‌باشند. مشاهدات میکروسکوپی از میسلیوم‌ها پس از تیمار با عصاره گیاهان تراریخت نشان داد تخریب‌های عمده‌ای در

پیشبر مصنوعی جهت بیان دو ژن مقاومت، یکی باز دارنده پروتئیناز سیستئین (*CeCPI*) و دیگری یک کیتیناز قارچی (*PjCHI-1*) موفق به مهار یک نوع نماتد غده و ریشه به نام *Meloidogyne incognita* در گیاه گوجه فرنگی شدند. در مطالعه‌ی دیگر بیان یک ژن مقاومت تحت کنترل یک پیشبر مصنوعی متشکل از عناصر کنشی سیس D و S منجر به افزایش مقاومت نسبت به بیماری گال طوقه در گیاه توتون شد (Niemeyer *et al.* 2014).

نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان می‌دهد که پیشبر SP-DDEE نسبت به محرک متیل جاسمونات به شکل مناسبی پاسخ می‌دهد در حالی که چندان نسبت به محرک سالیسیلیک اسید قابل القاء نیست. این یافته‌ها موید نتایج تحقیقات اولیه (چاپ نشده) انجام شده در گروه با استفاده از ژن گزارشگر GUS بر پیشبر SP-DDEE می‌باشد. بررسی‌های اولیه ما با استفاده از ژن GUS نشان داد پیشبر SP-DDEE نسبت به محرک متیل جاسمونات پاسخ مناسبی نشان می‌دهد. هرچند لاین‌های تراریخت

سرتاسر میسلیموم روی داده که می‌تواند موید تاثیر کیتیناز  
کایمری باشد.  
در نهایت نتایج به دست آمده در این بررسی نشان  
می‌دهد ژن کیتیناز کایمری تحت کنترل پیشبر مصنوعی  
القاء‌پذیر با بیمارگر *SP-DDEE* احتمالاً ابزاری کارآمد  
جهت افزایش مقاومت گیاهان زراعی به بیمارگرهای  
قارچی به ویژه *S. sclerotiorum* می‌باشد.

## منابع

- Broekaert, W. F., Delaure, S. L., De Bolle, M. F. C., and Cammue, B. P. A. 2006. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology*. 44:393-416.
- Cazonelli, C. I., and Velten, J. 2008. In vivo characterization of plant promoter element interaction using synthetic promoters. *Transgenic Research*. 17: 437-457.
- Chan, Y. L., He, Y., Hsiao, T. T., Wang, C. J., Tian, Z., and Yeh, K. W. 2015. Pyramiding taro cystatin and fungal chitinase genes driven by a synthetic promoter enhances resistance in tomato to root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Plant Science*. 231: 74-81.
- Dey, N., Sarkar, S., Acharya, S., and Maiti, I. B. 2015. Synthetic promoters in planta. *Planta*. 242: 1077-1094.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S., and Somssich, I. E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in plant science* 5: 199-206.
- Gurr, S. J., and Rushton, P. J. 2005. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends in Biotechnology*. 23: 275-282.
- Hammond-Kosack, K. E., and Parker, J. E. 2003. Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology*. 14: 177-193.
- Heise, A., Lippok, B., Kirsch, C., and 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 99: 9049-9054.
- Joosten, M., Verbakel, H., Nettekoven, M., Van Leeuwen, J., Van der Vossen, R., and De Wit, P. 1995. The phytopathogenic fungus *Cladosporium fulvum* is not sensitive to the chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase defence proteins of its host, tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 46: 45-59.
- Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E., and Hahlbrock, K. 2001. A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. *The Plant Journal*. 26: 217-227.
- Kronland, W., and Stanghellini, M. 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*. 78: 820-822.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E. 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 16: 223-233.
- Limon, M. C., Margolles-Clark, E., Benitez, T., and Penttila, M. 2001. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS Microbiology Letters*. 198: 57-63.
- Limon, M. C., and Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International microbiology*. 7: 249-260.
- Lorito, M., Woo, S. L., Fernandez, I. G., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Muccifora, S., Lawrence, C.B., Zoina, A. 1998. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95: 7860-7865.
- Matroodi, S., Motallebi, M., Zamani, M., and Moradyar, M. 2013. Designing a new chitinase with more chitin binding and antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29: 1517-1523.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., & Boller, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase. *Plant physiology*. 88: 936-942.

- Mazarei, M., Teplova, I., Hajimorad, M. R., and Stewart, C. N. 2008. Pathogen phytosensing: plants to report plant pathogens. *Sensors*. 8: 2628-2641.
- Moloney, M. M., Walker, J. M., and Sharma, K. K. 1989. High efficiency transformation of *Brassica napus* using *Agrobacterium* vectors. *Plant Cell Reports*. 8: 238-242.
- Neuhaus, J.-M., Ahl-Goy, P., Hinz, U., Flores, S., and Meins Jr, F. 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana sylvestris*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Molecular Biology*. 16: 141-151.
- Niemeyer, J., Ruhe, J., Machens, F., Stahl, D. J., and Hehl, R. 2014. Inducible expression of p50 from TMV for increased resistance to bacterial crown gall disease in tobacco. *Plant Molecular Biology*. 84: 111-123.
- Rushton, P. J., Reinstädler, A., Lipka, V., Lippok, B., and Somssich, I. E. 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. *The Plant Cell*. 14: 749-762.
- Rushton, P. J., and Somssich, I. E. 1998. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Current opinion in plant biology*. 1: 311-315.
- Salinas, J., Oeda, K., and Chua, N.-H. 1992. Two G-box-related sequences confer different expression patterns in transgenic tobacco. *The Plant Cell*. 4: 1485-1493.
- Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Volume 1-3. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- sharma, N., sharma, K. P., gaur, R. K., and gupta, V. K. 2011. Role of chitinase in plant defense. *Asian journal of biochemistry*. 6: 29-37.
- Shokouhifar, F., Zamani, M. R., Motallebi, M., Mousavi, A., and Malboobi, M. A. 2011. Construction and functional analysis of pathogen-inducible synthetic promoters in *Brassica napus*. *Biologia Plantarum*. 55: 689-695.
- Trudel, J., and Asselin, A. 1989. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*. 178: 362-366.
- Venter, M. 2007. Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in Plant Science*. 12: 118-124.
- Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S. L., Mach, R. L., Fekete, C., Lorito, M., Kubicek, C.P. 1999. Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genetics and Biology*. 26: 131-140.