

تراریزش گوجه‌فرنگی با استفاده از ناقل نوترکیب حاوی ژن‌های *PRI* کیتیناز و گلوکاناز

البرز رئوفی^۱، مسعود توحیدفر^{۲*}، محمود سلوکی^۳، مطهره محسن‌پور^۴، سمیه نجفی^۵،

بهناز دولت آبادی^۶، علی رنجبر^۷

۱ و ۳- به ترتیب کارشناس ارشد و دانشیار بیوتکنولوژی دانشگاه زابل

۲ و ۴- به ترتیب دانشیار و استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران

۵- کارشناس ارشد دانشگاه تبریز

۶ و ۷- به ترتیب دانشجوی کارشناس ارشد و استادیار دانشکده کشاورزی ساری

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: gtohidfar@abrii.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۹ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۸)

چکیده

گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین گیاهان با غی می‌باشد که به طور وسیعی در سراسر دنیا کشت می‌شود. هر ساله بیماری‌های قارچی از جمله فوزاریوم خسارت زیادی به این محصول وارد می‌کنند. در این پژوهش به منظور تقویت سیستم دفاعی گوجه‌فرنگی، ژن‌های *PRI*، کیتیناز و گلوکاناز را به صورت همزمان به گیاه مذکور انتقال دادیم. به این منظور، ابتدا ژن *PRI* از ژنوم گیاه توتون استخراج شد و تحت کنترل پیشر SS و پایانير Nos در ناقل نوترکیب pBI121 همسانه‌سازی شد. ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نیز تحت پیشبرهای مستقل 35S و پایانير Nos در ناقل مذکور و در مجاورت ژن *PRI* همسانه‌سازی شدند. سپس با استفاده از روش اگروباکتریوم تراریزش ریزنمونه‌های گیاه گوجه‌فرنگی توسط ناقل نوترکیب (-) pBI121-PRP-1ChiGlu، حاوی سه ژن *PRI*، کیتیناز و گلوکاناز، انجام گرفت. به این منظور، ابتدا ریزنمونه‌های برگ لپهای پس از قرارگیری بر روی محیط پیش کشت، به وسیله سویه LBA4404 اگروباکتریوم حاوی ناقل مورد نظر تلقیح شدند. ریزنمونه‌های حاصل به محیط هم کشته و پس از آن به محیط کشت باززایی انتقال یافتدند. ریزنمونه‌ها هر هفت روز یک بار واکشت شده و پس از گذشت چهار هفته به محیط کشت ریشه‌زایی حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر کاتامایسین انتقال یافتدند. آنالیزهای مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و لکه‌گذاری نقطه‌ای نشان دادند که گیاهان تراریخته حداقل یک نسخه از ژن‌های مورد نظر را در ژنوم خود، دریافت نموده‌اند.

واژه‌های کلیدی

اگروباکتریوم،
پروتئین‌های بیماری‌زا،
تراریزش،
سازه‌های نوترکیب،
گوجه‌فرنگی تراریخته،
همسانه‌سازی ژن.

مقدمه

مسعود توحیدفر و همکاران

(Muthukrishnan 1999). پروتئین‌های نوع PR مولکول‌های سبک با وزن مولکولی ۴۳ کیلو Dalton می‌باشدند که در pH کمتر از ۳ قابل استخراج و پایدار هستند، مقاومت دمایی داشته و در مقابل Van Loon et al. (1999). پروتئین‌ها مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند (Van Loon et al. 1999). این پروتئین‌ها دارای دو موقعیت مکانی واکوئلی و آپوپلاستیک می‌باشند که معمولاً ذخیره‌سازی در فضای آپوپلاستی صورت می‌گیرد (Van Loon et al. 1999). PR1، بیشترین میزان را در میان سایر پروتئین‌های خانواده PR به خود اختصاص داده است به طوری که میزان آن در گیاهان آلوده به ده هزار برابر حالت طبیعی می‌رسد و در این حالت یک تا دو درصد کل پروتئین‌های برگ را شامل می‌شود. بنابراین بیان ژن‌های PR1 می‌تواند القا کننده فعالیت سیستم دفاعی گیاه باشد (Datta and Van Loon et al. 1999). خانواده PR1 به شدت محافظت شده و تقریباً در تمامی گونه‌های گیاهی مورد مطالعه، مشاهده شده است و ساختار پروتئین‌های این خانواده در تمامی گونه‌های گیاهی یکسان می‌باشد (Cornelissen et al. 1987). این موضوع اهمیت ساختار و در نهایت عملکرد وابسته به این ساختار را در گونه‌های گیاهی نشان می‌دهد. در شرایط آزمایشگاهی، PR-1c سبب کاهش جوانه‌زنی اسپور و طول لوله تندش قارچ Phytophthora Infestans شد و در شرایط طبیعی باعث کاهش سطح آلودگی حاصل از قارچ آمایست گردید (Van Loon et al. 2006). خاموشی ژن PR1 در جو سبب شد تا قارچ‌های Blumeria graminis f.sp. hordei به میزان بسیار بیشتری در دیواره سلولی می‌بیان نفوذ نمایند (Schultheiss et al. 2003).

تونون‌های تاریخت دریافت کننده ژن PR1 تحت پیشبر دایمی، مقاومت معنی‌داری در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله Sels et al. 2008; Gianinazzi et al. (2008). از این خانواده، دو ژن اسیدی و بازی در گیاه توتون وجود دارد که در نقطه ایزوکلریک با یکدیگر متفاوت هستند. از زیاد انجام شده بر روی پروتئین‌های PR1 هنوز نقش بیوشیمیابی خاصی برای هیچ یک از انواع آن‌ها به اثبات نرسیده است اما نقش ضد قارچی این خانواده در سیستم دفاعی گیاه تا حد بسیار زیادی پذیرفته شده است (Sels et al. 2008; Gianinazzi et al. 2008). از این خانواده، دو ژن اسیدی و بازی در گیاه توتون وجود دارد که در نقطه ایزوکلریک با یکدیگر متفاوت هستند. از

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicum esculentum* یک محصول باقی است که مصارف گوناگونی دارد. هر ساله میزان بسیار زیادی از این محصول به واسطه بیماری‌هایی از جمله لکه-موجی گوجه‌فرنگی^۱، آتراکنوز گوجه‌فرنگی^۲، سپتوریوز گوجه-کلادوسپوریوز^۳، ورتیسیلیوز گوجه‌فرنگی^۴، پوسیدگی طوقه^۵، لکه سیاه برگ^۶ و پوسیدگی نرم^۷ از بین می‌رود (Agrios 2005). با توجه به این که برنامه‌های اصلاح سنتی جهت تولید گیاهان مقاوم به قارچ، زمانبر و طولانی می‌باشند و به ندرت می‌توانند با تکامل سریع عوامل بیماری‌زا همگام باشند، کشاورزان ناچار به استفاده از سوموم شیمیابی می‌باشند که پرهزینه بوده، به شدت باعث آلودگی محیط زیست شده و در اثر تکامل عوامل بیماری‌زا روز به روز کم اثرتر می‌گردد. مهندسی ژنتیک توانسته است مشکلات مذکور را تا حد زیادی برطرف نماید. در بین راهکارهای متنوع ایجاد مقاومت، تقویت سیستم دفاعی گیاه می‌بیان به وسیله دستکاری ژنتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر، اکثر راهبردها برای تولید گیاهان تاریخته مقاوم به بیماری‌های قارچی، روی معرفی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های ضد میکروبی مرتبط با بیماری‌زایی (PR^۸) و یا سایر پروتئین‌های ضد میکروبی مرکز شده است که فعالیت بیولوژیکی آن‌ها تا کنون نا معلوم باقی مانده است (Van Loon et al. 2006). ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR)، ژن‌هایی هستند که بیان آن‌ها سبب القای پاسخ فوق حساسیت به بسیاری از آلودگی‌های ویروسی، قارچی و باکتریایی می‌گردد (Edreva 2005). پس از کشف این پروتئین‌ها در برگ‌های توتون و در پاسخ فوق حساسیت به ویروس موزائیک توتون (TMV^۹) در سال ۱۹۷۰ مورد توجه بسیار قرار گرفته‌اند (Datta and

¹*Alternaria solani*²*Gloesporium lycopersici*³*Cladosporium fulvum*⁴*Verticillium albo-atrum*⁵*Septoria lycoper*⁶*Diplodina lycopersici*⁷*Phytophthora parasitica*⁸*Rhizopus nigricans*⁹Pathogenesis related¹⁰Tobacco Mosaic Virus

حضور آنها با استفاده از تجزیه مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و لکه‌گذاری دی‌ان‌ای بود.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از باکتری اشربیانا کلی^۱ سویه XLI-Blue (Cinna) pGEM®-T (Gen B16-50c) و پلاسمیدهای (-7Zf) pGEM®-T و pBI121 (Clontech, Washangton, DC) Easy pBI121- pGEM-Chi (-HindIII) (Promega) استفاده گردید. (Mohsenpour et al. 2008) (ChiGlu⁽⁺⁾) استخراج پلاسمید و واکنش هضم، واکنش اتصال^۲ و فسفرزدایی طبق دستورالعمل‌های Sambrook and Russel(2000) انجام شد. خالص‌سازی قطعات دی‌ان‌ای از روی ژل آگارز با استفاده از کیت خالص‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با خلوص بالا^۳ انجام شد. ساخت سازه‌های pBI121 PRP-1- ChiGlu(-) و PRP-1- ChiGlu(+)

ابتدا طراحی آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرمافزار الیگوتک^۴ برای ژن *PRP-1* انجام شد و پس از آن جداسازی ژن مذکور با استفاده از دی‌ان‌ای ژنومی توتون به عنوان الگو و انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز صورت گرفت. تایید درست بودن ژن جداسازی شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز داخلی^۵ تایید و سپس در داخل ناقل pGEM-T Easy (Promega) pGEM-Chi (-HindIII) پس از برش از ناقل pGEM-T توسط آنزیم برشی *EcoRI* در ناقل حد واسط *PRP-1* آنزیم برشی در ناقلهای *HindIII* موجود در ناحیه مکان‌های برشی چندگانه آن حذف شده بود (Mohsenpour et al. 2008).

همسانه‌سازی شد و پس از تایید جهت قرارگیری ژن توسط آغازگرهای رو به جلوی *M₁₃* و رو به عقب اختصاصی ژن مذکور، توسط آنزیم‌های برشی *XbaI* و *SacI* از این ناقل خارج شد و با خروج ژن *gus* در اثر هضم آنزیمی ناقل pBI121 با دو آنزیم نامبرده، قطعه مورد نظر تحت پیشبر 35S و پایانبر Nos در این ناقل همسانه‌سازی مجدد شد. در مرحله بعد ژن‌های کیتیناز و

دیگر پروتئین‌های این خانواده می‌توان به PR2 و PR3 اشاره نمود. خانواده PR2 با نام بتا-۱ و -۳ گلوکاناز، قادر است بتا-۱ و -۳ گلوکان‌ها را با اتصال به آن‌ها تجزیه نماید (Coling et al. 1993). پروتئین‌های PR3 گروهی از اندوکیتینازها می‌باشند که پیوند بتا-۱ و بتا-۳ N-استیل گلوکزآمین‌های کیتین را هیدرولیز نموده و الیگوساکاریدهای موجود در دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها را آزاد می‌کنند. کیتین در دیواره سلولی بسیاری از گیاهی وجود ندارد اما در دیواره سلولی بسیاری از قارچ‌ها و کوتیکول حشرات وجود دارد (Sela-Buurlage et al. 1993). عملکرد ضد قارچی این دو پروتئین به وسیله آزمایشات بسیار زیادی مورد تایید قرار گرفته است. به عنوان مثال قرارگیری ژن کیتیناز لوپیا تحت کنترل پیشبر 35S، رشد قارچ رایزوکتونیا سولانی را به میزان بسیار زیادی در گیاه توتون تراویخت محدود نماید (Broglie et al. 1991). آزمایشاتی که در شرایط آزمایشگاهی انجام شده‌اند نشان دادند که حضور دو آنزیم برای فعالیت ضد قارچی آنها نیاز می‌باشد (Punja and Zhang 1993). تأثیر هضم کنندگی آنزیم ایزووفرم اول بتا گلوکاناز توتون بر روی رشد قارچ فرزاریوم در حضور پروتئین کیتیناز به شدت افزایش نشان داد (Datta and Muthukrishnan 1999). گیاهان گوجه‌فرنگی تراویخت که ژن-های خارجی PR2 و PR3 را بیان می‌کردند، سبب کاهش حساسیت گیاه میزبان نسبت به عامل بیماری‌زای قارچی *Fusarium oxysporum lycopersici* جدا ایه *Cercospora nicotianae* شدند در حالی که بیان هر یک از ژن‌ها به تنها یک تأثیری در افزایش مقاومت نداشت (Jongedijk et al. 1995; Coling et al. 1993). طی آزمایش‌هایی که روی توتون تراویخته حاوی دو ژن کیتیناز و گلوکاناز، تحت کنترل پیشبر CaMV35S انجام شد، مشخص گردید که رشد قارچ جداگانه به کار رفتند به طور معنی‌داری کاهش یافت (Jach et al. 1995). با توجه به موارد ذکر شده، پیش‌بینی می‌شود که قرارگیری سه ژن یاد شده تحت پیشبرهای مستقل دایمی (به عنوان مثال 35S) می‌تواند مقاومت زیادی را در برابر طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا ایجاد نماید. هدف از این تحقیق انتقال هم‌زمان سه ژن یاد شده تحت پیشبرهای مستقل به گیاه گوجه‌فرنگی و بررسی

¹ *Escherichia coli*

² Ligation

³ High Pure Pcr Purification Kit (Roche)

⁴ Oligotech

⁵ Nested PCR

تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی ۹۰ میکرو مول بر متر مربع بر ثانیه قرار گرفتند. پس از چهار هفته، زمانی که طول گیاهچه‌های باززا شده به ۲-۳ سانتی‌متر رسید، جهت ریشه‌زایی به محیط کشت ریشه‌زایی (RTM^۵) (جدول ۱) منتقل شدند.

تجزیه مولکولی

برای استخراج دی‌ان‌ای از برگ‌های حاصل از گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی از روش Edreva (2005) استفاده شد. به منظور اثبات تلفیق ژن، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم ۲۵ میکرولیتری حاوی یک واحد آنزیم دی‌ان‌ای پلیمراز، ۲۵ نانوگرم دی‌ان‌ای ۴۰، F-) نانوگرم از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های کیتیناز R- و ۵'GAGTGGTGTGGATGCTGTTG3' F-) گلوکاناز ۵'GCCATAACCGACTCCAAGCA3' R- و ۵'GAACATCAAGTACATCGCCG3' F-) PRP-I ۵'GCTACACGTACTAGAACTGG3' R- و ۵'CTCAGCTATATTCTTCCC3' dNTP ۵'GCACTCATTAGACATCAG3' (۰/۵ میلی مولار)، ۲ میکرولیتر MgCl₂ (۰/۵ میلی مولار) و ۰/۲ میکرولیتر بافر X ۱۰ انجام گرفت. واکنش به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ چرخه (هر چرخه شامل یک دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد و یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت و تکمیل بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصول واکنش زنجیره‌ای سانتی‌گراد با تییدیوم بروماید، توسط دستگاه عکس برداری از ژل، آمیزی با اتیدیوم بروماید، ثبت گردید. همچنین برای تایید مجدد ژن تلفیق شده، آزمون لکه گذاری دی‌ان‌ای براساس روش Sambrook and Russel (2000) انجام شد.

نتایج و بحث

ساخت سازه‌های (-) pBI121 PRP-1- ChiGlu و (-) pBI121 PRP-1- ChiGlu(+) ۱-

صحت جداسازی ژن مورد نظر با مشاهده قطعه ۵۸۸ جفت بازی مربوط به ژن PRP-1 و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز داخلی و در نهایت توالی‌بایی قطعه جداسازی شده تأیید شد. حضور ژن

گلوکاناز با استفاده از آنزیم‌های BamHI و HindIII از ناقل pBI121-ChiGlu جداسازی و در مجاورت ژن PRP-1 قرار گرفتند. جهت‌گیری متفاوت قطعه حاوی قطعه ژن‌های مذکور pBI121 PRP-1 ChiGlu (+) و (-) pBI121 PRP-1 ChiGlu(-) نوترکیب با جهت‌گیری مخالف ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به PRP-1 جهت ترازیش گیاه گوجه‌فرنگی استفاده شد.

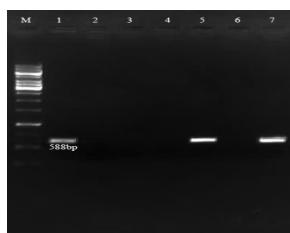
تاریخیش گیاه گوجه‌فرنگی با استفاده از ناقل pBI121 PRP-1 ChiGlu(-) بدراهای گوجه‌فرنگی با قرار گرفتن در الکل ۷۰ درصد به مدت ۳ دقیقه و کلرین فعال به مدت ۷ دقیقه ضدغونی شدند. بدراهای ضدغونی شده به مدت ۸ روز بر روی محیط کشت جوانه‌زنی (GM^۱) (جدول ۱) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد و در دوره نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی ۹۰ میکرومول بر مترمربع بر ثانیه قرار داده شدند. برگ‌های لپه‌ای و محورهای زیر لپه رشد یافته در شرایط ضدغونی جداسازی شده و بر روی محیط پیش‌کشت (PM^۲) (جدول ۱) قرار گرفتند و در تیمارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ روزه در Cortina تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Cortina 2004). سویه LBA4404 (and Culianez-Macia 2004) حاوی پلاسمید نوترکیب (-) pBI121 PRP-1 ChiGlu(-)، در محیط مایع رشد داده شد و پس از آن که غلظت نوری آن به ۰/۶ تا ۰/۸ رسید، ریزنمونه‌های گوجه‌فرنگی از روی محیط پیش‌کشت (جدول ۱) در داخل سوسپانسیون سلولی به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند. پس از آن ۲۰۰ ریزنمونه برگ لپه‌ای به مدت دو روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بر روی محیط هم‌کشتی (CM^۳) (جدول ۱) قرار گرفتند. سپس قطعات برگ لپه‌ای در محیط حاوی MS ۳۰ گرم در لیتر ساکارز و ۳۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتابکسیم شسته شده و پس از خشک شدن به محیط ساقه‌زایی (RM^۴) (جدول ۱) منتقل شدند. ریزنمونه‌های حاصل در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۷۰ درصد رطوبت و دوره نوری ۸ ساعت

^۱ Germination medium

^۲ Preculture Medium

^۳ Co-culture Medium

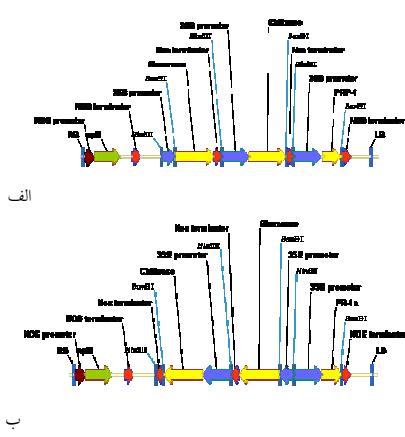
^۴ Regeneration Medium



شکل ۱- بررسی حضور ژن *PRP-I* در ناقل pBI121 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مذکور مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). در نهایت قطعه حاوی، ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در پایین دست قطعه ژنی *PRP-1*، قرار گرفت. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، حضور ژن‌های مذکور مورد تأیید قرار گرفت. بررسی جهت قرارگیری با استفاده از آنزیم *Xba*I مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که در ناقل نوترکیب *pBI121-PRP-1* مفهود ژن *PRP-I* قرار گرفته باشد، گلوکاناز به صورت همسو با قطعه ژن *PRP-I* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *Xba*I منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۵۴۶۰ و ۲۲۸۲ جفت باز می‌شود و جهتگیری عکس قطعات ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به قطعه ژن *PRP-I* ظهور قطعه‌هایی با طول ۱۴۰۸۴ و ۳۶۵۸ را سبب می‌شود (شکل ۲). نمای شماتیک پلاسمیدهای حاصل در شکل ۳ مشاهده می‌شوند.



شکل ۲- بررسی حضور و جهت ژن *PRP-I* در ناقل‌های پلاسمیدی ساخته شده با استفاده از هضم آنزیمی توسط آنزیم *Xba*I: M: نشانگر وزن مولکولی (Fermentase) 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentase). ۱) ناقل پلاسمیدی *pBI121-PRP-1ChGlu(+)* که در آن ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت همسو با قطعه ژن *PRP-I* قرار گرفته و هضم آنزیمی با *Xba*I سبب ظهور دو قطعه ۱۵۴۶۰ و ۲۲۸۲ جفت بازی شده است، ۲) ناقل پلاسمیدی *pBI121-PRP-1ChGlu(-)* که در آن قطعات ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت ناهمسو با قطعه ژن *PRP-I* قرار گرفته و هضم آنزیمی با *Xba*I سبب ظهور دو قطعه ۱۴۰۸۴ و ۳۶۵۸ جفت بازی شده است.



شکل ۳- شکل شماتیک دو ناقل پلاسمیدی نوترکیب (الف) *pBI121-PRP-1ChGlu(+)* و (ب) *pBI121-PRP-1ChGlu(-)*

مذکور در ناقل pBI121 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن مذکور مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۱). در نهایت قطعه حاوی، ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در پایین دست قطعه ژنی *PRP-1*، قرار گرفت. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز، حضور ژن‌های مذکور مورد تأیید قرار گرفت. بررسی جهت قرارگیری با استفاده از آنزیم *Xba*I مورد ارزیابی قرار گرفت. در صورتی که در ناقل نوترکیب *pBI121-PRP-1ChGlu* قطعه ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت همسو با قطعه ژن *PRP-I* قرار گرفته باشد، هضم آنزیمی با *Xba*I منجر به ظهور قطعاتی با طول ۱۵۴۶۰ و ۲۲۸۲ جفت باز می‌شود و جهتگیری عکس قطعات ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز نسبت به قطعه ژن *PRP-I* ظهور قطعه‌هایی با طول ۱۴۰۸۴ و ۳۶۵۸ را سبب می‌شود (شکل ۲). نمای شماتیک پلاسمیدهای حاصل در شکل ۳ مشاهده می‌شوند.

جدول ۱- ترکیب محیط‌های کشت در تاریخیش گوجه‌فرنگی (Cortina and Culiañez-Macia 2004)

RTM	RM	CM	PM	GM	MS
+	+	+	+	+	
۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	ساکارز (گرم در لیتر)
۸	۸	۸	۸	۸	آگار (گرم در لیتر)
۰/۴					تیامین-HCl (میلی‌گرم در لیتر)
				۲۰۰	استوپرینگون (میلی‌گرم در لیتر)
	۱	۱			NAA (میلی‌گرم در لیتر)
	۱	۱			BAP (میلی‌گرم در لیتر)
۰/۵					IAA (میلی‌گرم در لیتر)
۰/۵					زاتین ریبوزاید (میلی‌گرم در لیتر)
۱۰۰	۳۰۰				سفوتاکسیم (میلی‌گرم در لیتر)
۵۰	۵۰				کانامایسین (میلی‌گرم در لیتر)

MS: محیط کشت موراشیگ و اسکوگ

۱- افتالین استیک اسید.

۶- بنتیل آمینوپورین

۳- ایندول استیک اسید

ریزنمونه‌های کوتیلدون به مراتب بیشتر از هایپوکوتیل بود (شکل ۵). انتقال نوساقه‌ها به محیط کشت ریشه‌زایی در شرایطی صورت گرفت که طول آنها به ۲ تا ۳ سانتی‌متر رسیده بود (شکل ۶). پس از قرارگیری نوساقه‌ها بر روی محیط کشت ریشه‌زایی، ضعف شدیدی در آنها مشاهده شد که با زردی و گاه حذف نمونه‌ها همراه بود. به منظور کاهش فشار ناشی از آنتی‌بیوتیک که احتمالاً با بار متابولیکی ناشی از بیان بالای ژن‌های خارجی همراه شده بود، راهبرد کاهش میزان آنتی‌بیوتیک‌های محیط کشت ریشه‌زایی به ویژه کاناامایسین به حداقل ممکن و در مواردی حذف کامل آن صورت گرفت. پس از کاهش کاناامایسین، از زردی و سرعت نکروزه شدن گیاهچه‌ها کاسته شد. گیاهچه‌های حاصل پس از گذراندن مراحل سازگارسازی به گلدان انتقال یافته و نسل اول گیاهان تاریخت حاصل به دست آمد. بررسی بیان ژن‌های *PRI* کیتیناز و گلوکاتناز در گوجه‌فرنگی‌های تاریخت مستلزم در دست داشتن آنتی‌بادی ژن‌های مذکور بود که به علت عدم وجود آنتی‌بادی‌های مذکور مرحله بعد انجام نشد.

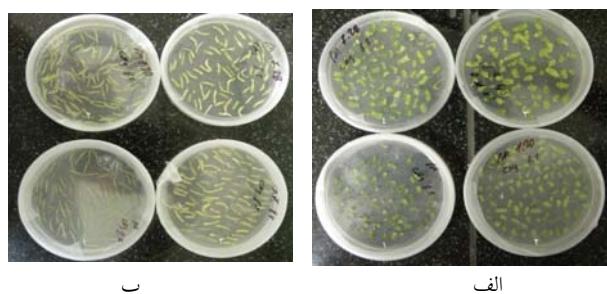


شکل ۵- گیاهچه‌های بازراشده پس از گذشت چهار هفته از انتقال ریزنمونه‌ها به روی محیط کشت بازیابی انتخابی. (الف) ریزنمونه بازراشده از محور زیر لپه، (ب) ریزنمونه بازراشده از برگ لپه‌ای



شکل ۶- القای ریشه زایی با قرار دادن گیاهچه‌های بازرا شده بر روی محیط کشت ریشه‌زایی. (الف) ضعف شدید همراه با زرد شدگی در برگ‌چه‌های قدیمی، که احتمالاً به علت بیان بالای ژن‌های خارجی همراه با اثر بازدارندگی آنتی‌بیوتیک می‌باشد، (ب) کاهش ضعف در گیاهچه‌های حاصل در اثر کاهش میزان آنتی‌بیوتیک بر روی محیط کشت ریشه‌زایی

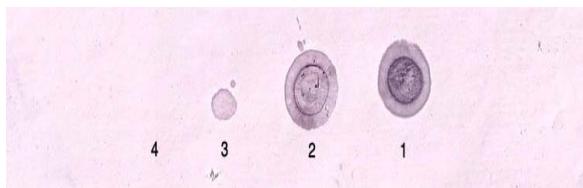
تاریخش گیاه گوجه فرنگی با استفاده از ناقل pBI121 *PRP-1* (-ChiGlu). انتقال ریزنمونه‌های محور زیر لپه و برگ لپه‌ای به محیط پیش کشت سبب ایجاد شرایط مناسب سلولی به منظور آلووه سازی با اگروباکتریوم و انتقال به محیط انتخابی شد. قرارگیری بر روی محیط پیش کشت با تیمارهای یک تا چهار روزه مورد بررسی قرار گرفتند. ریزنمونه‌هایی که به مدت یک روز بر روی محیط پیش کشت نگهداری شده بودند، اغلب بسیار ضعیف بوده و تورمی در آنها مشاهده نمی‌شد (شکل ۴) و پس از طی دوره هم‌کشتی و انتقال به محیط بازیابی به حالت پلاسمولیزه در آمدند. همچنین، قرارگیری ریزنمونه‌ها به مدت چهار روزه بر روی محیط پیش کشت سبب تورم شدید آنها شد که پس از انتقال به محیط بازیابی اغلب ریزنمونه‌ها به صورت شیشه‌ای و یا برفكی در آمدند و در مراحل بعدی حذف گردیدند. در مقایسه‌ی دو تیمار نهایی دو و سه روزه با توجه به این که تقریباً ۸۰ درصد گیاهچه‌های بازرا شده از ریزنمونه‌های مربوط به تیمار ۳ روزه بود، می‌توان بیان نمود که بهترین نتایج مربوط به تیمار سه روزه بود (شکل ۴).



شکل ۴- تورم ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای (الف) و محور زیر لپه (ب) پس از قرار گرفتن بر روی محیط پیش کشت. (۱) تیمار یک روزه، (۲) تیمار دو روزه، (۳) تیمار سه روزه و (۴) تیمار چهار روزه ریزنمونه‌ها

در این پژوهش، از دو سویه‌ی اگروباکتریوم (C58 و LBA4404) به منظور تاریخش گوجه‌فرنگی استفاده شد. نتایج نشان داد علاوه بر این که کنترل سویه‌ی LBA4404 با آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم نسبت به سویه‌ی C58 بهتر صورت گرفت، تعداد نوساقه‌های بازرا شده بر روی محیط کشت انتخابی نیز توسط آلووه با LBA4404 بیشتر بود. پس از گذشت دو تا سه هفته از انتقال ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای و محور زیر لپه به محیط بازیابی حاوی آنتی‌بیوتیک، نوساقه‌های بازراشده ظاهر شدند که تعداد آنها در

فسفوترانسферاز را در ژنوم گیاهان تاریخت اثبات نمود (شکل ۸) که خود تأیید دیگری بر تاریخته بودن گیاهان بدست آمده بود.

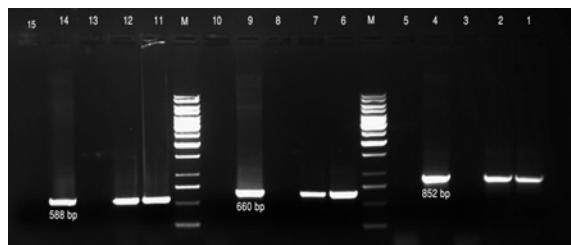


شکل ۸- آزمون لکه‌گذاری برای اثبات تاریختی گیاهان گوجه‌فرنگی، (۱) پلاسمید حاوی ژن نومایسین فسفوترانسферاز، (۲) گیاهان تاریخته، (۳) گیاه شاهد

ساخت پلاسمیدهای نوترکیب نکته حائز اهمیت در ساخت سازه، جهت‌گیری ژن‌های کیتیناز و گلوکاتاناز نسبت به ژن *PRP-I* در پلاسمیدهای نوترکیب *pBI121PRP-1ChiGlu(+)* و *pBI121PRP-1ChiGlu(-)* می‌باشد که به ترتیب به صورت همسو و ناهمسو قرار گرفته است. مطالعات انجام شده نشان می‌دهند که در صورت وجود توالی‌های همولوگ، احتمال حذف یا جابجایی قطعات مذکور بسته به جهت قرارگیری و اندازه این قطعات وجود دارد (Branzei and Foiani 2003; Kohli et al. 2003). با توجه به احتمال وقوع کراسینگ‌اور در بین قطعات همولوگ، احتمال می‌رود در صورت وقوع اتصال در ناحیه مربوط به پیشبر 35S، در صورتی که ژن‌های کیتیناز و گلوکاتاناز به صورت همسو با ژن *PRP-I* قرار گیرند حذف قطعه میانی صورت گیرد. این در حالی است که در صورت اتصال در قطعه حاوی ژن‌هایی با جهت‌گیری مخالف تنها جابجایی قطعات صورت می‌گیرد که تأثیری در توالی قطعات مذکور و در نهایت پروتئین حاصل ندارد (شکل ۹). در اغلب مطالعات مربوط به بررسی اثر ژن‌های بیماری‌زاوی، انتقال به صورت موازی و توسط ناقلین جداگانه صورت می‌گیرد. در این موارد هر ژن مربوط به بیماری‌زاوی به صورت جداگانه به گیاه منتقل شده و دستیابی به گیاهان تاریخته‌ای که چند ژن را دریافت کرده باشند تنها با تلاقی‌های مکرر برای هرمونی‌ژن‌ها امکان‌پذیر است (Broglie et al. 1991; Jongedijk et al. 1995; Fiocchetti et al. 2008). در این حالت با توجه به این‌که محل قرارگیری ژن‌های مورد مطالعه بر روی ژنوم قابل پیش‌بینی نیست، قرارگیری ژن‌ها در محل‌های ژنومی متفاوت می‌تواند شرایط درون سلولی متفاوتی

تجزیه مولکولی گیاهچه‌های حاصل

اگرچه رشد گیاهچه‌ها بر روی محیط کشت حاوی کانامایسین می‌تواند دلیلی بر تاریخت بودن آنها باشد، اما در گزینش گیاهان بر روی محیط گزینش‌گر امکان فرار گیاهچه‌های غیر تاریخت نیز وجود دارد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز نشان داد که گیاهچه‌های بازرا شده در مقایسه با شاهد حداقل یک نسخه از ژن‌های کیتیناز، گلوکاتاناز و *PRP-I* را در ژنوم خود دارا هستند. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تعدادی از گیاهان تاریخته احتمالی در شکل ۷ آورده شده است. همان طوری که در شکل مشاهده می‌شود، دو عدد از گیاهان مورد آزمایش قطعات مربوط به ژن‌های مورد نظر حضور داشته و تکثیر توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز صورت گرفته است. (شکل ۷).



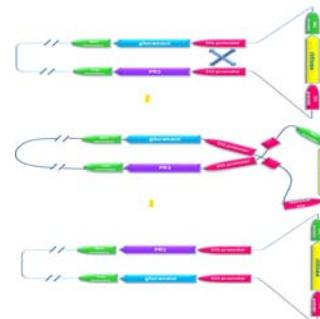
شکل ۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *PRP-I*. کیتیناز و گلوکاتاناز. M: نشانگر وزن مولکولی 1kb (Fermentase 14,۹، ۱۲، ۹، ۶، ۱۱، ۱۰، ۹، ۸، ۷، ۶، ۵، ۴، ۳، ۲، ۱) قطعه‌های مربوط به ژن‌های کیتیناز، گلوکاتاناز و *PRP-I* (۱ و ۲) قطعه‌های مربوط به ژن کیتیناز در دو گیاه تاریخت، (۶ و ۷) قطعه‌های مربوط به ژن گلوکاتاناز در دو گیاه تاریخت، (۱۱ و ۱۲) قطعه‌های مربوط به ژن *PRP-I* در دو گیاه تاریخت، (۳، ۸ و ۱۳) چاهک‌های مربوط به گیاه شاهد فاقد ژن‌های مذکور، (۵، ۱۰ و ۱۵) کنترل منفی

مشاهده قطعات ۸۵۲، ۶۶۰ و ۵۸۸ جفت‌بازی به ترتیب تأیید کننده حضور ژن‌های کیتیناز، گلوکاتاناز و *PRP-I* در گیاهچه‌های مورد بررسی بودند. استفاده از پلاسمید به عنوان الگو در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (کنترل مثبت) امکان تشخیص گیاهانی را که منفی هستند (فاقد ژن‌های مورد نظر می‌باشند) از گیاهانی که مثبت می‌باشند (واجد ژن‌های مورد نظر هستند) ولی به دلیل نقص در انجام واکنش، قطعه‌ای تشکیل نمی‌دهند به خوبی فراهم آورد. علاوه بر این از دی‌ان‌ای گوجه‌فرنگی نیز به عنوان الگو جهت شاهد منفی استفاده گردید.

به منظور تایید بیشتر تلفیق ژن، از آزمون لکه‌گذاری دی‌ان‌ای استفاده شد. نتایج آزمون لکه‌گذاری، حضور ژن نومایسین

(Loon et al. 2006). در گیاهان تاریخته حاصل از این تحقیق، ژن‌های PRP-1، کیتیناز و گلوکاناز به طور جداگانه تحت کنترل پیشبر قوی 35S قرار دارند و به این ترتیب انتظار می‌رود میزان بیان پروتئین‌های حاصل از این ژن‌ها در تمامی مراحل رشد گیاه به میزان کافی باشد (Lawrence et al. 1998). اما این بیان بالا می‌تواند باز متابولیکی شدیدی به گیاه وارد نماید و سبب ضعیف شدن و گاهی از بین رفتگی گیاهچه باززا شده شود. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، گیاهچه باززا شده بر روی محیط انتخابی پس از گذشت ۴ هفته در مقایسه با گیاه شاهد که بر روی محیط کشت فاقد آنتی‌بیوتیک قرار گرفته بود، نشانه‌هایی از زرد شدن برگ‌ها را، نشان داد که خود بیانگر ضعف در گیاهچه‌های مذکور بود. این ضعف در باززایی می‌تواند علاوه بر بیان بالای سه ژن، از اثر آنتی‌بیوتیک بر روی گیاهچه‌ها نیز ناشی شود. بررسی‌های بعدی می‌تواند علت اصلی کاهش قدرت گیاهچه‌ها را به طور دقیق‌تر مشخص نماید. از بین رفتگی گیاهان غیرتاریخته نیز در محیط حاوی کاناامایسین تا چندین ماه به طول می‌انجامد. این گیاهان به تدریج ضعیف می‌شوند. ضعف حاصل از مقاوم نبودن با ضعف باززایی روی محیط حاوی کاناامایسین که گیاهان تاریخته را نیز شامل می‌شود، قابل تشخیص نبوده و از آنجایی که حضور کاناامایسین در محیط کشت به میزان زیادی طویل شدن ساقه و رشد گیاه را با کندی مواجه کرده و برای القای ریشه نیز بهتر است کاناامایسین از محیط کشت گیاه حذف گردد، لذا با تشخیص گیاهان تاریخته احتمالی توسط آنالیزهای ملکولی نظری PCR در مراحل اولیه باززایی می‌توان گیاهان تاریخته احتمالی را روی محیط کشت بدون کاناامایسین قرار داده تا چهار کنده و متوقف شدن رشد نگردد. در نهایت بهتر است که در آزمایشات مشابه، میزان آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در محیط کشت به حداقل ممکن کاهش یابد و یا کاملاً حذف گردد تا فشار انتخاب از گیاهچه‌ها برداشته شود و از حذف گیاهچه‌های تاریخت ضعیف در اثر آنتی‌بیوتیک جلوگیری شود. البته حذف آنتی‌بیوتیک سبب باززاشدن گیاهان غیر تاریخت نیز می‌شود که در نهایت با حجم بالایی از گیاهچه‌هایی که باید مورد ارزیابی قرار گیرند روبرو خواهیم شد. بنابراین، محقق می‌تواند بر اساس میزان باززایی گیاه

ایجاد نماید که این امر ممکن است در عملکرد نهایی پروتئین‌های بیان شده تاثیر گذار باشد. قرارگیری ژن‌های مورد مطالعه در این پژوهش بر روی یک ناقل شاید سبب بزرگ شدن ناقل و در نهایت کاهش بازده فرایند انتقال گردد اما با این کار می‌توان قرارگیری ژن‌های مذکور را در یک موقعیت مکانی تضمین و اثرات جانبی حاصل از جایگیری قطعات در ژنوم را حذف نمود. استفاده از پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از این تحقیق برای تراریخش گیاهان، منجر به کاهش هزینه‌های انتقال جداگانه ژن‌های ایجاد کننده مقاومت در محصولات گیاهی شده و با وارد کردن همزمان این ژن‌های مقاومت به گیاه، دیگر نیازی به انجام مراحل وقت‌گیر و پرهزینه تولید گیاهانی که به طور جداگانه این ژن‌ها را دریافت نموده‌اند و به دنبال آن تلاقی آنها و انجام مراحل هرم‌بندي ژنی به منظور دستیابی و شناسایی گیاهان تاریخته‌ای که دارای هر سه ژن باشند، نخواهد بود..



شکل ۹- اهمیت جهت‌گیری ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز و PRP-1 در ناقل pBI121-PRP-1-ChiGlu(+) پس از فرایند کراسینگ اور در نسل‌های بعدی. الف: موقع کراسینگ اور بین پیشبر 35S ژن‌های گلوکاناز و PRP-1 پس از جایگانی قطعات در ناحیه کراسینگ اور که در نهایت هیچ گونه تغییر محرکی در ساختار قطعات مذکور به وجود نمی‌آید.

تاریخش گوجه‌فرنگی

با توجه به تنوع ریزنمونه‌ها مشاهدات نشان داد که ریزنمونه‌های برگ لپه‌ای نسبت به محور زیر لپه باززایی بهتری را نشان دادند. ژن‌های خانواده PRI تحت پیشبرهای القایی در گیاهان شاهد قرار دارند و سیستم دفاعی گیاه در اثر حمله عامل بیماری زا فعال می‌شود. در این حالت میزان خسارت ناشی از حمله قارچ رابطه مستقیمی با طول مدت پاسخ گیاه دارد. به عبارت دیگر هر چه زمان پاسخ‌دهی کمتر باشد، میزان خسارت کمتر خواهد بود (Van

(Goodman et al. 1993). روش انتقال هم زمان که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت می‌تواند به تمامی ابهاماتی از این نوع پاسخ مناسب دهد. برای تولید گیاهان مقاوم به بیماری با مقاومت پایدار، ضروری است که گیاهان به همه گونه‌های عامل بیماری‌زا مقاوم باشند. تهیه ناقل پلاسمیدی که دارای چندین ژن رمزکننده پروتئین‌های ضدقارچی تحت پیشبرهای مستقل قوی باشد، راهکار مناسبی جهت تولید گیاهان تاریخخته مقاوم می‌باشد. ناقل‌های حاصل از این تحقیق علاوه بر پتانسیل ایجاد اثرات هم-افزایی کیتیناز و β -1-گلوکاناز نگرانی حاصل از احتمال سازگاری عوامل بیماری‌زا و شکستن مقاومت را تا حد زیادی کاهش می‌دهند. از سوی دیگر بیان دائمی PR1 در این ناقل که القا کننده سایر ژن‌های PR در گیاه است، علاوه بر اثرات مثبت بر روی عملکرد آنزیم‌های کیتیناز و β -1-گلوکاناز، سایر ژن‌های مربوط به مکانیزم‌های دفاعی گیاه را نیز فعال می‌نماید که انتظار می‌رود باعث تولید گیاهانی با مقاومت بالا در برابر قارچ‌ها و حتی در برابر باکتری‌ها و دیگر تنفس‌های زنده و غیر زنده محیطی گردد.

مطلوب تشخیص دهد که چه غلطی از آنتی‌بیوتیک را مورد استفاده قرار دهد.

تجزیه مولکولی

همان‌طور که ذکر شد، مطالعات انجام شده در مورد گوجه‌فرنگی-های تاریخخت، اثر افزایشی ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز در افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زای متعدد قارچی را اثبات نموده است (Coling et al. 1993; Jongedijk et al. 1995) (Niderman et al. 1995). به این ترتیب انتظار می‌رود قرارگیری این سه ژن در کنار هم در گیاه گوجه فرنگی بتواند سبب افزایش مقاومت به طیف وسیعی از بیماری‌های قارچی گردد. در تمامی پژوهش‌هایی که تا کنون انجام گرفته است، انتقال ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز به صورت جداگانه و طی دو مرحله صورت گرفته است. این شیوه انتقال می‌تواند این سوال را در ذهن ما به وجود آورد که آیا قرارگیری ژن‌های مذکور در بخش‌های مختلف ژنوم گیاه هدف نمی‌تواند در بیان و یا حداقل میزان بیان ژن‌های مذکور تأثیر داشته باشد که در صورت وقوع در میزان مقاومت ایجاد شده نسبت به عوامل بیماری‌زا تاثیر گذار خواهد بود

منابع

- Agrios GN (2005) Plant Pathology pp:523-812. Department of Plant Pathology University of Florida. Elsevier Academic Press, California 922pp.
- Goodman AD, Gut-Rella RM, Glascott M, Weymann C, Friedrich K, Maddox L, Ahl-Goy D, Luntz P, Ward TE, Ryals J (1993) Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein-1a. Proc. National Academy of Sciences 123(6): 498-550.
- Branzei D, Foiani M (2010) Leaping forks at inverted repeats. Genes & development 24: 5-5
- Broglie K, Chet I Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais C J, Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen Rhizoctonia solani. Science 116 (8): 280-356.
- Coling DBK, Kra M, Krath K, Mikkelsen M J D, Vad K (1993) Plant chitinase. The Plant Journal 80 (5): 389-413.
- Cornelissen BJC, Horowitz J J, Van Kan A L, Goldberg R B, Bol J F (1987) Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. Nucleic Acids Research 86(4): 215-240.
- Cortina C, Culianez-Macia AF (2004) Tomato transformation and transgenic plant production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 76: 269-275.

- Datta SK, Muthukrishnan S (1999) Pathogenesis-Related Proteins In Plant pp: 12-280. Manila, CRC Press 303 pp.
- Edreva A (2005) Pathogenesis-Related Proteins: research. General and Applied Plant Physiology 115(9):289-304.
- Fiocchetti FD, Amore R, De Palma M, Bertini L, Caruso C, Caporale C, Testa A, Cristinzio G, Saccardo F, Tucci M (2008) Constitutive over-expression of two wheat pathogenesis-related genes enhances resistance of tobacco plants to Phytophthora nicotiana. Plant cell, tissue and organ culture 92: 73-84.
- Gianinazzi S, Pratt HM, Shewry PR, Miflin BJ (1977) Partial purification and preliminary characterization of soluble proteins specific to virus infected tobacco plants. Journal of General Virology 36(8): 159-194.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J, Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. The Plant Journal 56(9): 259-378.
- Jongedijk E, Tigelaar H, van Roekel J S C, Bres-Vloemans S A, Dekker I, vanden Elzen P J M, Cornelissen B J C, Melchers L S (1995) Synergistic activity of chitinase and a-1,3-glucanase enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. Euphytica 63(9): 378-429.

- Kohli A, Twyman RM, Abranches R, Wegel E, Stoger E, Christou P (2003) Transgene integration, organization and interaction in plants. *Plant Molecular Biology* 52: 247-258
- Lawrence CB, Joosten M H A J, Tuzun S (1996) Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. *Physiological and molecular plant pathology* 48(7): 337-361.
- Mohsenpour M, Babaeian jelodar NA, Tohidfar M, Habashi AA (2008) Design and construction of four recombinant plasmid vectors containing chitinase, glucanase and Bt genes, suitable for plant transformation. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources* 67(9): 320-448. (In Farsi)
- Niderman T, Genetet I, Bruyere T, Gees R, Stintzi A, Legrand M, Fritig B, Mosinger E (1995) Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiology* 108: 17-27.
- Punja ZK, Zhang Y (1993) Plant chitinase and their roles in resistance to fungal diseases. *Journal of Nematology* 45(5): 317-401.
- Sambrook J, Russel DW (2000) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sarowar S, Kim Y J, Kim E N, Kim K D, Hwang B K (2005) Overexpression of a pepper basic pathogenesis-related protein 1 gene in tobacco plants enhances resistance to heavy metal and pathogen stresses. *Plant Cell Reports* 45(9): 323-419.
- Schultheiss HC, Dechert L, Király J, Fodor K, Michel K-H, Kogel R, Hückelhoven A (2003) Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science* 165: 1275-1280.
- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA (1993) Only Specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and beta 1, 3- glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 55 (7): 192-289.
- Sels J, Mathys J, De Coninck BMA, Cammue BPA, De Bolle MFC (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant physiology and biochemistry* 46 (2): 941-950.
- Van Loon LC, Van Strien EA (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 19(4): 120-276.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Phytopathology* 45(9): 342-431.