١٤١٧٤٧

دانشکده علوم کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

کلونینگ ژن کتیناز برنج (*Oryza sativa*) به منظور مطالعه مکانیزم مقاومت به عامل سوختگی غلاف (*Rhizoctonia solani*)

از:

اندیشه پورمسئله گو

استاد راهنما:

دکتر محمد مهدی سوهانی

استاد مشاور:

دکتر محمد رضا زمانی

۱۳۸۹/۷/ ۳

شهریور ۸۸

۱۴۱۷۳۷

به نام خداوند آموزگار

سپاس پروردگار را که به من توفیق داد تا مرحله‌ای دیگر از تحصیل را پشت سر گذاشته و این پایان نامه را به سرانجام برسانم. از این رو بر خود وظیفه میدانم از زحمات بی دریغ استاد محترم جناب آقای دکتر سوهانی که همیشه مرا از راهنمایی های خویش بهره مند ساخته اند تشکر و قدردانی کنم. همچنین از جناب آقای دکتر زمانی که مشاوره این پایان نامه را بر عهده داشتند سپاسگزارم.

از آقایان دکتر سمیع زاده و دکتر شیرزادیان که زحمت بازخوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند و آقای دکتر نخشی به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی سپاسگزاری می کنم.

از همکلاسیهای خوبم و دوستان عزیزم که در این مدت همواره به من یاری رساندند تشکر می نمایم.

در پایان از محبتها و زحمات خانواده خوب و عزیزم که در تمام مراحل زندگی پشتیبان و مشوقم بودند و از هیچ کوششی در بیع نورزیدند صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می کنم.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

چکیده فارسی.....ژ

چکیده انگلیسی.....س

مقدمه.....۲

فصل اول: کلیات ومرور منابع

۱-۱ گیاه برنج.....۵

۱-۱-۱- مرحله رویشی.....۵

۱-۱-۲- مرحله زایشی.....۵

۱-۲- اهمیت بیماری سوختگی غلاف برنج.....٦

۱-۲-۱- علایم بیماری سوختگی غلاف.....۷

۱-۲-۲- ارگانیسم عامل بیماری و چرخه آن.....۷

۱-۲-۳- روشهای کنترل بیماری سوختگی غلاف.....۸

۱-۳- شناسایی پاتوژن توسط گیاه و برانگیختن سیستم دفاعی آن.....۹

۱-۳-۱- ایمنی برانگیخته شده PAMP.....۱۰

۱-۳-۲- ایمنی برانگیخته شده افکتور (ETI).....۱۱

۱-٤- پروتئنهای مرتبط با مقاومت (R).....۱۲

۱-۵- پاسخ فوق حساسیت.....۱۲

۱-٦- پروتئنهای مرتبط با پاتوژن.....۱٤

۱-۷- کیتینازها..... ۱۶

۱-۷-۱- سوبستراهای اصلی کیتیناز..... ۱۶

۱-۷-۲- طبقه بندی کیتینازها..... ۱۷

۱-۷-۳- تنظیم فعالیت کیتیناز..... ۲۱

۱-۷-٤- تاثیر هورمونها بر القاء کیتیناز..... ۲۲

۱-۷-٤-۱- اتیلن..... ۲۲

۱-۷-٤-۲- القاء کیتیناز در شرایط *in vitro*..... ۲۳

۱-۷-۵- عملکردهای کیتیناز..... ۲۳

۱-۷-۵-۱- نقش کیتیناز در زمان بیماری گیاه..... ۲٤

۱-۷-۵-۲- نقش کیتیناز در همزیستی..... ۲۵

۱-۷-۵-۳-جنین زایی و رشد ونمو..... ۲۵

۱-۷-۵-۳- ایجاد مقاومت در برابر یخ زدگی..... ۲٦

۱-۷-٦- گیرنده های کیتوالیگوساکاریدی..... ۲٦

۱-۸- بررسی گیاهان تراریخته..... ۲۷

۱-۹- انتقال ژن به روش *in planta*..... ۲۸

فصل دوم: مواد وروشها

۲-۱- مواد گیاهی مورد استفاده..... ۳۱

۲-۲- تلقیح گیاهان برنج با قارچ *Rhizoctonia solani*..... ۳۱

۲-۳- نمونه برداری برگی..... ۳۱

۲-٤- پلاسمیدهای مورد استفاده..... ۳۲

۲-٤-۱- ناقل کلونینگ pTZ57R/T..... ۳۲

۲-٤-۲- ناقل بیانی pAJ21..... ۳۳

۲-٤-۳- ناقل بیانی pPZP112..... ۳٤

۲-٥- محیط های مورد استفاده برای کشت باکتری ۳٥

۲-٥-۱- محیط کشت LB (Luria Bertani)..... ۳٥

۲-٥-۲- محیط کشت SOB ۳٥

۲-٥-۳- محیط کشت SOC..... ۳٥

۲-٦- آنتی بیوتیکهای مورد استفاده..... ۳٦

۲-۷- استخراج پلاسمید به روش لیز قلیایی..... ۳۷

۲-۸- رسوب با اتانل..... ۳۹

۲-۹- سلولهای مستعد باکتری و آماده سازی آن..... ٤۰

۲-۱۰- ترانسفورماسیون نژادهای مختلف باکتری *E. coli* به روش شوک حرارتی..... ٤۱

۲-۱۱- تهیه استوگ گلیسرول باکتری..... ٤۱

۲-۱۲- الکتروفورز ژل آگارز..... ٤۲

۲-۱۲-۱ بافرTAE..... ٤۲

۲-۱۲-۲- ژل آگارز..... ٤۲

۲-۱۳- نشانگرها..... ٤۲

۲-۱٤- استخراج RNA ٤٣

۲-۱٤-۱- الکتروفورز ژل آگارز ٤٤

۲-۱٤-۲- تیمار DNase ٤٤

۲-۱٤-۳- ساخت DNA مکمل (cDNA) ٤٥

۲-۱٤-٤- واکنش PCR به منظور تکثیر DNA مکمل ٤٥

۲-۱٤-٤-۱- آغازگرهای مورد استفاده برای تکثیر cDNA ٤٥

۲-۱٤-٤-۲- محلولها و بافر مورد استفاده در PCR ٤٦

۲-۱٤-٤-۳- چرخه های واکنش PCR ٤٧

۲-۱٤-٤-٤- الکتروفورز محصول PCR ٤٧

۲-۱٥- استخراج DNA ٤٧

۲-۱٥-۱- بررسی کیفیت DNA ژنومی ٤٨

۲-۱٥-۲- واکنش PCR برای تکثیر قطعه ژن RCH10 احتمالی ٤٨

۲-۱٥-۳- الکتروفورز محصول PCR ٤٩

۲-۱٥-٤- استخراج ژن از ژل ٤٩

۲-۱٥-٥- تعیین غلظت و کیفیت DNA استخراجی از ژل ٤٩

۲-۱٥-٦- واکنش اتصال بین ژن وناقل کلونینگ pTZ57R/T ٤٩

۲-۱٥-۷ ترانسفورماسیون شیمیایی باکتری اشریشیاکلی JM 107 (کیت™ Ins TA clone) ٥٠

۲-۱٥-۸- بررسی کلونیهای ترانسفورم شده ٥١

۲-۱٦- تهیه EST برای جداسازی ژن کتیناز دارای فعالیت ضد قارچی ٥١

۲-۱٦-۱- هضم دوگانه آنزیمی ناقل pFLCI و ناقل pAJ21 ..... ٥٢

۲-۱٦-۲- رسوب با اتانل ٥٣

۲-۱٦-۳- واکنش لایگیشن..... ٥٤

۲-۱٦-٤- ترانسفورماسیون سلولهای باکتری JM107 با ناقل pAJ21 به روش شوک حرارتی..... ٥٤

۲-۱٦-٥- بررسی موفقیت ترانسفورماسیون سلولهای باکتری JM107 ..... ٥٤

۲-۱۷- تهیه سلولهای مستعد اگروباکتریوم..... ٥٥

۲-۱۸- ترانسفورماسیون اگروباکتریوم به روش ذوب و یخ..... ٥٥

۲-۱۸-۱ بررسی ترانسفورماسیون ٥٦

۲-۱۹-۱- ضدعفونی بذور و آماده سازی آن ٥٦

۲-۱۹- ترانسفورماسیون برنج توسط اگروباکتریوم به روش *in planta* ٥٦

۲-۱۹-۲- آماده سازی باکتری برای ترانسفورماسیون بذور برنج..... ٥٧

۲-۱۹-۳- ترانسفورماسیون بذور برنج..... ٥٧

۲-۱۹-٤-شرایط نگهداری بذور ترانسفورم شده..... ٥٧

۲-۱۹-٥- بررسی موفقیت ترانسفورماسیون گیاهان با استفاده از واکنش PCR ٥٨

فصل سوم: نتایج و بحث

۳-۱- بررسی های بیوانفورماتیکی ژن کتیناز..... ٦٠

۳-۲- آلوده سازی گیاهان با قارچ *Rhizoctonia solani* ٦٩

۳-۳- استخراج RNA ۷۰

۳-٤- استخراج DNA ۷۲

۳-٥- جداسازی ژن از ژل ۷۳

۳-٦- واکنش اتصال بین ژن کتیناز احتمالی وناقل کلونینگ pTZ57R/T ۷۳

۳-۷- بررسی ترانسفورماسیون باکتری اشریشیاکلی JM 107 ..... ۷٤

۳-۸- نتیجه توالی یابی ناقل نو ترکیب pTZ57R/T ۷٤

۳-۹- جداسازی cDNA ژن کتیناز با طول کامل ۷۶

۳-۱۰ نتیجه توالی یابی ناقل pFLCI ۷۸

۳-۱۱- واکنش هضم و لایگیشن ناقل pAJ21 و ژن AK099339 ..... ۷۹

۳-۱۲- بررسی صحت پلاسمید pPZP112 ..... ۸۰

۳-۱۳- اندازه گیری غلظت پلاسمید pPZP112 ..... ۸۱

۳-۱٤- واکنش PCR جهت تائید ترانسفورماسیون اگروباکتریوم ۸۲

۳-۱۵- ترانسفورماسیون برنج ۸۳

۳-۱٦- واکنش PCR جهت بررسی تراریزش گیاه ۸۳

پیشنهادات ۸۵

منابع ۸۷

فهرست جداول

جدول ۱-۱- پروتئینهای PR و عملکرد شناخته شده آنها..... ۱۵

جدول۱-۲-آنتی بیوتیکهای مورد استفاده و غلظت آنها..... ۳۶

جدول ۲-۲- محلولها و بافرهای مورد استفاده استخراج پلاسمید..... ۳۸

جدول۲-۳- مقادیر لازم برای تهیه بافر 10X TAE..... ۴۲

جدول ۲-٤-پرایمرهای مورد استفاده برای سنتز cDNA و واکنش PCR مربوط به آن..... ٤٦

جدول۲-۵-مواد غلظت و مقادیر بهینه شده مواد در واکنش PCR..... ٤٦

جدول ۲-٦ درجه حرارت و زمان بهینه شده برای PCR ٤٧

جدول۲-۷-پرایمرهای مستقیم و معکوس ژن کتیناز..... ٤٩

جدول ۲-۸-واکنش اتصال ژن وناقل کلونینگ pTZ57R/T..... ۵۰

جدول ۲-۹-پرایمرهای مستقیم و معکوس cDNA با طول کامل ژن کیتیناز AK099339 ..... ۵۲

جدول۲-۱۰- ترکیبات مورد استفاده برای واکنش هضم دوگانه آنزیمی ناقل pFLCI و ناقل pAJ21 ..... ۵۳

جدول۲-۱۱- مواد مورد استفاده برای رسوب با اتانل قطعه Ak099339 و ناقل pAJ21..... ۵۳

جدول ۲-۱۲- واکنش لایگیشن قطعه Ak099339 و ناقل pAJ21..... ۵٤

جدول۲-۱۳- پرایمرهای مستقیم و معکوس قطعه ای از پروموتر CaMV35s..... ۵٦

جدول۲-۱٤-مواد غلظت و مقادیر بهینه شده مواد در واکنش PCR در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر..... ۵۸

جدول ۲-۱۵- درجه حرارت و زمان بهینه شده برای واکنش PCR..... ۵۸

جدول ۳-۱- کد بانک ژنی کلاسهای کیتینازها در تعدادی از گونه های گیاهی..... ٦۳

فهرست شکلها

شکل ۱-۱- ساختار کتین، کیتوزان، پپتیدوگلیکان و مکان هضم آنزیمی ۱۷

شکل ۱-۲- ساختار سه بعدی پروتئین کیتیناز ۱۹

شکل ۱-۳- طرح شماتیک کلاسهای مختلف کتیناز و مقایسه دومینهای پروتئینی آنها ۲۰

شکل ۱-٤- کتیناز کلاس VII گندم ۲۰

شکل ۱-٥- کتیناز کلاس I برنج ۲۰

شکل ۲-۱- نقشه ناقل و آنزیم‌های برشی pTZ57R/T ۳۲

شکل ۲-۲-نقشه ناقل pAJ21 و آنزیم‌های برشی ۳۳

شکل ۲-۳- نقشه ناقل pPZP112 و آنزیم‌های برشی ۳٤

شکل ۲-٤- نقشه ناقل pFLCI و آنزیم های برشی ٥۱

شکل ۳-۱ توالی نوکلئوتید ژن RCH10 ..... ٦۰

شکل ۳-۲ توالی پروتئین ژن RCH10 ..... ٦۰

شکل ۳-۳- پلست پروتئین توالی اسید آمینه RCH10 ..... ٦۱

شکل ۳-٤- گراف نشان دهنده سیگنال پپتید از سایت Signal p ٦۲

شکل ۳-٥- دومینهای مختلف پروتئین RCH10 ..... ٦۲

شکل ۳-٦ ردیف سازی کیتینازها ی مختلف در تعدادی از گونه های گیاهی ٦٤

شکل ۳-۷ آنالیز فیلوژنی توالی اسید آمینه کتیناز ٦۸

شکل ۳-۸-علایم بیماری سوختگی غلاف ٦۹

شکل ۳-۹ الکتروفورز RNA استخراجی ۷۰

شکل۳-۱۰- الکتروفورز محصولات PCR از cDNA ۷۱

شکل۳-۱۱- تعیین کیفیت DNA استخراجی..... ۷۲

شکل ۳-۱۲- اکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده از DNA ژنومی..... ۷۲

شکل۳-۱۳- الکتروفورز ژن استخراج شده از ژل جهت..... ۷۳

شکل۳-۱٤-.الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده از کلونی‌های رشد کرده..... ۷٤

شکل ۳-۱۵- توالی حاصل از توالی یابی ناقل نوترکیب pTZ57R/T ۷۵

شکل ۳-۱٦- بلست توالی حاصل از توالی‌یابی ناقل نوترکیب pTZ57R/T..... ۷٦

شکل ۳-۱۷ بلست نوکلئوتید توالی نوکلئوتید ژن RCH10 در سایت KOME..... ۷۷

شکل۳-۱۸- هضم آنزیمی ناقل pFLCI با آنزیمهای XhoI و BamHI ۷۸

شکل ۳-۱۹-الف: توالی طول کامل cDNA ژن AK099339؛ ب: نتیجه بلست ژن توالی یابی شده در NCBI ۷۸

شکل ۳-۲۰- بررسی ترانسفورماسیون با هضم آنزیمی ناقلpAJ21 ..... ۸۰

شکل ۳-۲۱- بررسی صحت پلاسمید pPZP112 با هضم آنزیمی ۸۱

شکل۳-۲۲- تعیین غلظت پلاسمید استخراجی pPZP112 ..... ۸۱

شکل۳-۲۳- محصولات PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی پروموتر CaMV35s..... ۸۲

شکل۳-۲٤- گیاهان ترانسفورم شده احتمالی در اتاقک رشد آزمایشگاه بیوتکنولوژی..... ۸۳

شکل۳-۲۵- واکنش PCR با پرایمرهای پروموتر CaMV35s برای اثبات موفقیت ترانسفورماسیون گیاه..... ۸٤

فهرست ضمائم

ضمیمه ۱- بلاست پروتئین توالی اسید آمینه RCH10 در NCBI ۹۸

ضمیمه ۲- بلست نوکلئوتید توالی نوکلئوتید ژن RCH10 ..... ۱۰۰

ضمیمه ۳- توالی نوکلئوتید و اسید آمینه AK099339 ..... ۱۰٤

ضمیمه ٤- ردیف سازی توالی اسید آمینه AK099339 و RCH10 ..... ۱۰٤

ضمیمه ٥- اطلاعات مربوط به پروتئین ژن AK099339 در سایت KOME ۱۰٥

ضمیمه ٦- بلاست توالی حاصل از توالی یابی ناقل pFLCI ۱۰٦

چکیده

عنوان: کلونینگ ژن کتیناز برنج (*Oryza sativa*) به منظور مطالعه مکانیزم مقاومت به عامل سوختگی غلاف (*Rhizoctonia solani*)

اندیشه پورمسئله‌گو

در میان بیماریهای قارچی برنج سوختگی غلاف یا شیت بلایت یکی از مهمترین بیماریهای گسرش یافته است که در تمامی کشورهای تولید کننده برنج وجود دارد. تاکنون ژن مقاومتی که بتواند نسبت به این بیماری مصونیت ایجاد کند شناخته نشده است. گیاهان تعداد زیادی از ژنهای کد کننده پروتئینهای مرتبط با پاتوژن را بیان می کنند که شناخته شده ترین آنها آنزیم کتیناز است. کتیناز پیوند $\beta \rightarrow 1,4$ را در N استیل گلوکز آمین موجود در پلیمر کتین دیواره سلولی قارچها را هیدرولیز می کند. در اولین مرحله از تحقیق، ژن کتیناز بازی از مجموعه طول کامل cDNA جدا شد و درون ناقل باینری اگروباکتریوم pAJ21 تحت کنترل پروموتر CaMV35s کلون شد. همچنین در این تحقیق یک آزمایش اولیه به منظور استفاده از روش ترانسفورماسیون *in planta* با اگروباکتریوم در برنج به اجراء گذاشته شد. بدین منظور، بذرهای برنج در آب ۲ روز خیسانده شد. سپس جنین حاوی مریستم انتهایی با سوسپانسیون باکتری حاوی پلاسمید pPZP112 تلقیح شد. بذرها رشد و ترانسفورم شدن تعدادی از گیاهان با واکنش PCR در نسل T_0 تایید شد.

کلمات کلیدی: برنج، پروتئینهای ضدقارچی، سوختگی غلاف، *Rhizoctonia solani* ، پیام‌رسانی در دفاع گیاه، پروتئین-های مرتبط با پاتوژن، ترانسفورماسیون، کیتیناز، *In planta*

Abstract

Titel: Clonning of a rice chitinase gene to study resistance mechanism to sheat blight (*Rhizoctonia solani*)

Andisheh poormassalehgou

Among the fungal diseases, sheath blight, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn, is one of the most important, widespread diseases found in all the rice growing countries. Resistance gene which can cause immunity to the disease have not been found. Plants express a wide variety of pathogenesis-related (PR) protein encoding genes of which the best characterized are those encode the lytic enzyme chitinase A chitinase (EC 3.2.1.14) which, catalyzes the hydrolysis of the β→1,4 linkages of the N-acetyl-D-glucosamine of the fungal cell wall polymer chitin, was chosen for cloning. A Full-length cDNA of chitinase was cloned into a *Agrobacterium* binary vector called pAJ21 under the control of CaMV35 promoter. A pilot experiment was carried out in order to set up an *in planta Agrobacterium*-mediated transformation. Rice seeds were soaked in water for 2 days. Thereafter, the embryo containing an apical meristem was inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* harboring pPZP112 vector. Then seeds were grown to maturity and transformation was confirmed by PCR in T_0 generation.

Key words: Rice, Antifungal protein, Sheath blight, *Rhizoctonia solani*, Plant defence signalling, pathogenesis-related (PR) protein, Chitinase, Transformation, *in planta*

مقدمہ

مقدمه

برنج یک منبع غذایی مهم برای درصد بزرگی از جمعیت جهان بویژه آسیا است. حفاظت گیاه یک مسئله مهم در دنیای وسیع،کشاورزی است وبیماری‌های قارچی گیاهان از نگرانی‌های بزرگ بوده است. تخمین زده شده که خسارت کلی بیماری-های گیاهی به ۲۵٪ محصول در کشورهای غربی و ۵۰٪ در کشورهای در حال توسعه رسیده است که یک سوم آن بواسطه بیماریهای قارچی می‌باشد [Singh et al., 2007].

در میان بیماری‌های قارچی برنج، سوختگی غلاف از لحاظ اهمیت، بعد از بلاست در ردیف دوم قرار دارد ودر مواردی با آن برابری می‌کند [صحراگرد و خداپرست۱۳۸۳]. این بیماری نخستین بار در سال ۱۹۱۰ از ژاپن گزارش شد و در سال ۱۳۵۷ با کشت برنج حساس رقم آمل ۲ در بعضی مناطق برنج خیز شمال خصوصاً مازندران شیوع پیدا کرد. هم اکنون این بیماری در گیلان و مازندران روی ارقام مختلف دیده می‌شود و هر ساله بطور معنی داری باعث وارد آوردن خسارت به محصول می-شود. عامل سوختگی غلاف برنج در ایران را تاکنون فرم غیر جنسی قارچ یا *Rhizoctonia solani* گزارش کرده اند. این قارچ پلی فاژ بوده و علاوه بر برنج به بسیاری از گیاهان دیگر حمله می کند [الهی نیا ۱۳۷۵]. پژوهشگران در چندین کشور مقاومت به سوختگی غلاف را مطالعه کرده‌اند. هیچ گونه مصونیتی یافت نشده، اما چندین رقم دارای مقاومت متوسط تا زیاد از طریق میزان گسترش بیماری روی گیاه میزبان، تشخیص داده شده است [الهی نیا ۱۳۷۵]. ایجاد مقاومت از طریق اصلاح برای این بیماری، به دلیل ناشناخته بودن ژرم پلاسم مقاومت، هنوز ممکن نیست [Datta., 2004].

تولید آنزیم‌هایی با قابلیت تخریب دیواره سلولی قارچهای بیماری‌زای گیاهی یک جزء مهم پاسخ دفاعی گیاهان است. گیاهان به حمله قارچهای پاتوژن با بکارگیری شبکه پیچیده دفاعی فعال پاسخ می‌دهند. [Bowles,. 1990]. اغلب روشهای دفاعی شامل سنتز ترکیبات ضد میکروبی سمی(فیتوآلکسین ها)، القاء و تجمع مهار کننده‌های پروتئاز و آنزیم‌های لیزکننده دیواره سلولی پاتوژن مانند کتیناز , $\beta \rightarrow 1,3$ glucanase وپروتئین شبه تائوماتین هستند. موفقیت در دفع حمله پاتوژن به هماهنگی بین استراتژی های دفاعی مختلف و سرعت پاسخ گویی کلی بستگی دارد [Benhamou., 1990].

در زمینه شناسایی ژنهای مهمی که می‌توانند در افزایش مقاومت به بیماری در گیاه استفاده شوند پیشرفتهایی حاصل شده است. تعداد زیادی از ژنهای مقاومت، مسیرهای سیگنال دهنده، وبسیاری از ترکیبات ضد قارچی مانند پروتئینهای PR

شناسایی شده اند. همه این اطلاعات توسعه استراتژی‌های مختلف برای تولید گیاهان تراریخته مقاوم به قارچ را افزایش خواهد داد [Singh et al., 2007].

در بین پروتئین‌های PR کتینازها بواسطه تواناییشان در هضم کتین –ساختار اصلی دیواره سلولی بسیاری از قارچهای بیماریزا– احتمالا نقش حیاتی در برابر پاتوژنهای قارچی و مکانیسم‌های دفاعی گیاه دارند. مطالعات اخیر ثابت کردند که الیگو ساکارید کتین تولید شده بوسیله کتیناز بعنوان مولکولهای سیگنال دهنده در طی عملکردهای رشد و نموی عمل می‌کند [Kasprzewska., 2003]. هم اکنون به نظر می‌رسد که مهندسی ژنتیک برای کنترل سوختگی غلاف یک ابزار قدرتمند و جذاب است زیرا بیان ژنهای PR را در گیاهان تراریخته بهینه می‌کند [Datta., 2004].

به همین منظور در این تحقیق cDNA با طول کامل ژن کتیناز که ثابت شده دارای فعالیت ضد قارچی است در ناقل بیانی pAJ21که دارای پروموتر قوی CaMV 35s می‌باشد، کلون شد. این ناقل برای انتقال ژن به ارقام بومی برنج توسط اگروباکتریوم مورد استفاده قرار خواهد گرفت .

همچنین در این تحقیق یک روش انتقال ژن به گیاه برنج به واسطه اگروباکتریوم، در شرایط *in planta* ، به صورت اجمالی در مقیاس کوچک انجام شد که آنالیزهای بعدی ثابت کردند T_0 حاوی ناقل خارجی و ژن ترانسژنیک بوده است.

فصل اول

کلیات و مرور منابع

۱-۱ گیاه برنج

Oryza sativa L. یک گیاه گندمی دیپلوئید (۲٤ کروموزوم) با ساقه‌های ماشوره‌ای بنددار و گرد، برگهای صاف و سیستم ریشه‌ای افشان و خوشه‌های انتهایی است. برنج معمولا در محیط‌های آبی یا نیمه آبی کشت می‌شود اما، نمی‌تواند بدون اکسیژن زنده بماند. برنج به دلیل وجود یک سیستم داخلی منافذ هوایی که نفوذ اکسیژن را از روزنه‌های برگ به بافت مریستمی و ریشه امکان پذیر می‌سازد، قادر است در خاک غرقابی زنده بماند. *Oryza sativa* در بخشهایی از چرخه رشد توانایی محدودی برای تنفس غیرهوازی دارد [صحراگرد و خداپرست.، ۱۳۷۸].

۱-۱-۱- مرحله رویشی

مرحله رویشی با جوانه زنی بذر آغاز می‌شود. ابتدا ریشه‌چه و بدنبال آن کلئوپتیل از رویان بذر خارج می‌شود. در مدت پیش-پنجه‌زنی بعدی، ریشه‌های بذری و جانبی و اولین برگها رشد می‌کنند. مزوکوتیل، بسته به شرایط نوری ، تقریبا همزمان رشد می‌کند و در سطح خاک طوقه گیاه را تشکیل می‌دهد و ریشه اصلی را بوجود می‌آورد. مرحله پنجه‌زنی رشد رویشی معمولا وقتی آغاز می‌شود که گیاهچه‌ها چهار تا پنج برگی و خودکفا هستند.

اولین پنجه معمولا از یک جوانه جانبی در یکی از اولین یا پایین‌ترین گرههای ساقه اصلی خارج می‌شود. پنجه‌های بعدی (یکی برای هر یک یا دو برگ) تشکیل، و هر یک بعد جایگزین یک برگ می‌شود. این پنجه های اولیه در گره‌های خود پنجه-های ثانوی را بوجود می‌آورند و آنها نیز پنجه‌های سوم را تولید می‌کنند. اغلب ارقام طی ۱۲۰ تا ۱۷۰ روز این مرحله را سپری می‌کنند [صحراگرد و خداپرست.، ۱۳۷۸].

۱-۱-۲- مرحله زایشی

آغاز خوشه‌دهی معمولا بعد از اینکه تعداد پنجه‌ها به حداکثر رسید انجام می‌شود، که نشان دهنده آغاز مرحله زایشی است. مریستم اولیه خوشه یا جوانه‌ها، ابتدا در پنجه‌های اصلی تشکیل می‌شود و به صورت نوک خز داری در نقطه رویشی داخل ساقه ماشوره‌ای قابل رویت است. آغاز خوشه‌دهی با طویل شدن میانگره‌های فوقانی و تشکیل همزمان منافذ هوایی داخلی