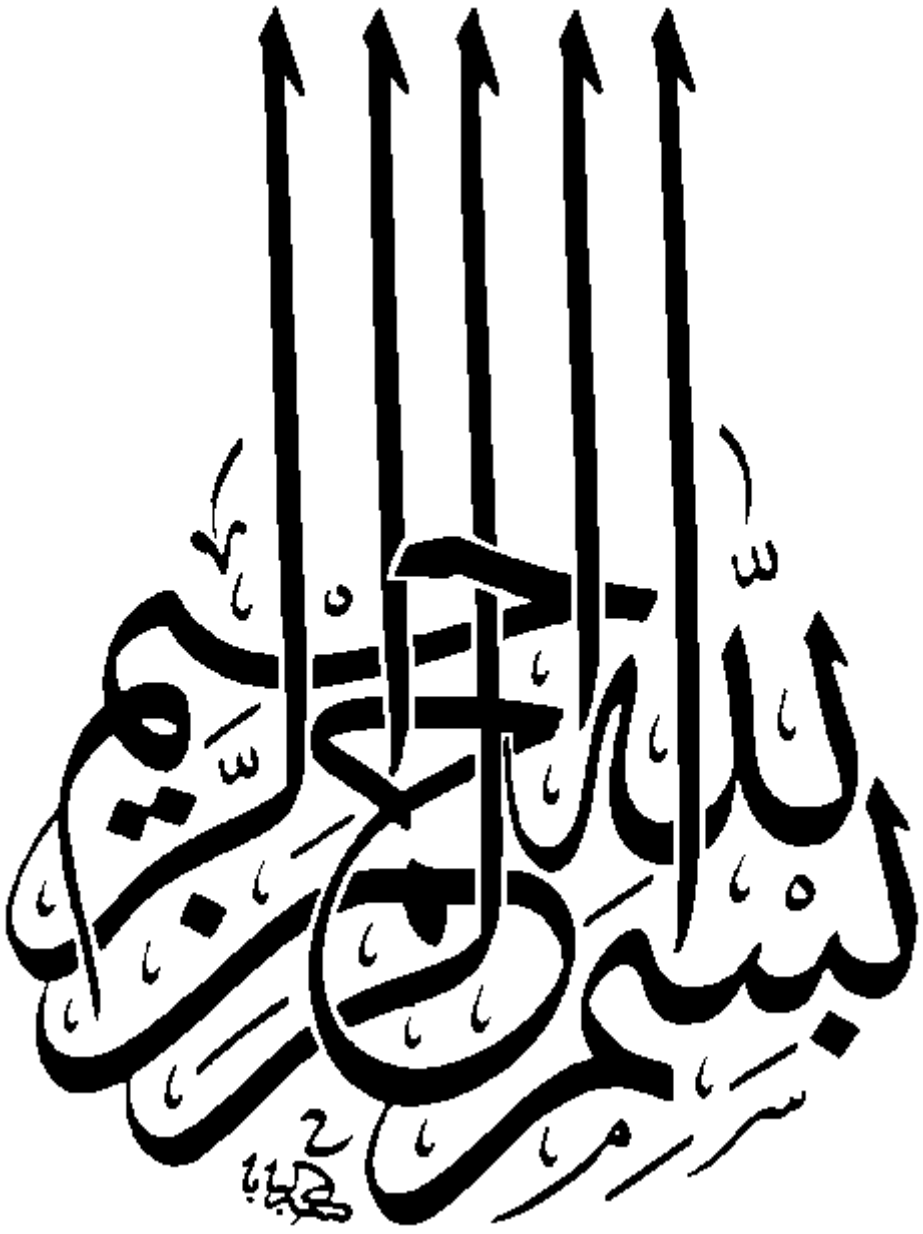
بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی

پایان نامه تحصیلی جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی

جداسازی ایزوله‌هایی از اکتینومیست‌های مولد آنزیم کیتیناز و کلونینگ ژن کیتیناز آنها در باکتری

اساتید راهنما :
دکتر غلامرضا شریفی
دکتر غلامحسین شهیدی بنجار

مؤلف :
اعظم بهارلوئی

شهریور ماه ۸۸

این پایان نامه به عنوان یکی از شرایط احراز درجه کارشناسی ارشد به

گروه مهندسی بیوتکنولوژی

دانشکده کشاورزی

دانشگاه شهید باهنر کرمان

تسلیم شده است و هیچ گونه مدرکی به عنوان فراغت از تحصیل دوره مربوطه شناخته نمی شود.

	نام و نام خانوادگی	امضاء
دانشجو	اعظم بهارلوئی	
استاد راهنما ۱	دکتر غلامرضا شریفی	
استاد راهنما ۲	دکتر غلامحسین شهیدی	
استاد داور	دکتر حسین معصومی	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محمد حسن فولادی	

حق چاپ محفوظ و مخصوص به دانشگاه شهید باهنر کرمان می باشد.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم

آنان که وجودم برایشان همه رنج بود و وجودشان برایم همه مهر؛ توانشان رفت تا به توانایی برسم و مویشان سفید گشت تا رویم سپید بماند.

آنان که فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایه های جاودانی زندگی من است؛ آنان که راستی قامتم در شکستگی قامتشان تجلی یافت.

والدینی که بودنشان تاج افتخاریست بر سرم و نامشان دلیلیست بر بودنم چرا که این دو وجود پس از پروردگار مایه هستی ام بوده اند.

اینک در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می زنم و با دلی مملو از عشق، محبت و خضوع بر دستشان بوسه می زنم، حال این برگ سبز یست تحفه درویش تقدیم به آنان...

تقدیم به:

روان پاک مهندس علیرضا افضلی پور و بانو فاخره صبا

تقدیم به:

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر شریفی به پاس تمامی خوبی هایش؛ به پاس عاطفه سرشار و گرمای امید بخش وجودش که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان بود و به پاس محبت های بی دریغش که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به:

خواهران و برادران مهربانم که همیشه و در همه حال بی ریاترین محبت ها را نثارم کردند.

به پاس قلب بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید.

سپاس گزاری:

پروردگارا، تو را سپاس که مرا در این مسیر قرار دادی و در هیچ زمان تنهایم نگذاشتی و به من آموختی که همانا پس از هر سختی آسایشی است.

برترین سپاس را تقدیم استاد ارجمندم جناب آقای دکتر شریفی می نمایم. پندار، گفتار و کردار نیک ایشان در وصول به این مقصود پیوسته چون چراغی فرارویم بود. بی گمان شاگردی این استاد فرزانه برای همیشه مایه فخر و مباهات من خواهد بود.

از استاد بزرگوارم جناب آقای پروفسور غلامحسین شهیدی بنجار که در طول این مدت مرا همفکری، راهنمایی و همراهی نمودند، از صمیم قلب سپاسگزارم.

با تشکر صمیمانه از استاد ارجمندم جناب آقای دکتر معصومی که زحمت داوری پایان نامه را به عهده گرفتند و در دوران تحصیل نیز همواره از علم و دانش بزرگوارانه ایشان بهره بردم.

از اساتید محترم دوران تحصیلم آقایان دکتر مقصودی، دکتر حیدر نژاد، دکتر صفاری، دکتر محمدی نژاد، دکتر آروین، دکتر فولادی، دکتر فرحبخش، دکتر درهکردی، دکتر حسینی پور، مهندس پورتبریزی، مهندس شعبانیان، مهندس عقیقی و مهندس صادقی سپاسگزارم.

همدلی دو خواهر مهربانم خانم ها ثریا پورتبریزی و مهدیه صادقیان را که لحظه ای در این مسیر صعب، همراهی مهربانانه شان را از من دریغ نداشتند، ارج می نهم.

از زحمات صمیمانه خانم ها پروانه شریفی و مهین صفایی در راستای انجام این پروژه کمال تشکر و سپاسگزاری را دارم.

از همکلاسی های خوب و کلیه دوستان عزیزم که در طول انجام این پروژه همواره یاریگرم بودند و نیز خانم‌ها تکلوزاده، شمشیری، شهدایی و شجاعی صمیمانه تشکر می نمایم.

چکیده:

کیتین، پلیمر پلی ساکاریدی بدون شاخه با اتصالات $\beta(1 \rightarrow 4)$ از واحدهای N- استیل گلوکز آمین است. این ماده فراوانترین آمینوپلی ساکارید و بعد از سلولز دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت است. این ماده ترکیب اصلی دیواره سلولی اکثرقارچ‌ها، کوتیکول حشرات، پوشش خارجی نماتدها و تخم و کیست آنها را تشکیل می‌دهد ولی در گیاهان عالی و مهره‌داران یافت نمی‌شود. لذا یکی از استراتژی‌های کاربردی در مبارزه بیولوژیک با بیماری‌های گیاهان، هدف قراردادن کیتین در پاتوژن‌ها می‌باشد. به این ترتیب، آنزیم کیتیناز به عنوان آفت کش محسوب شده و کیتیناز یکی از ترکیبات کنترل بیولوژیک قلمداد می‌شود. بر این اساس با هدف به دست آوردن یک آنتاگونیست مولد کیتیناز از خاک‌های زراعی مناطق سیرچ و ماهان استان کرمان، تعداد ۱۱۰ جدایه اکتینومیست غربالگری شد. پس از آن، جدایه‌های اکتینومیست به دست آمده از نظر فعالیت کیتینازی ارزیابی گردیدند و از ۱۱۰ جدایه موجود، تعداد ۳۲ جدایه با فعالیت کیتینازی جداسازی شد که از بین آنها ۱۸ جدایه فعالیت کیتینازی بیشتری از خود نشان دادند. سپس به منظور غربالگری جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی در تولید ماده ضد قارچی، آزمون زیستی علیه تعدادی قارچ بیماریزای خاکزی انجام شدکه از میان آنها، جدایه‌های ۴۰۰، ۴۰۱، ۴۰۳، ۴۱۰، ۴۲۰، ۴۲۲ و ۴۲۳ دارای بیشترین فعالیت آنتاگونیستی بودند. سپس برخی خصوصیات مورفولوژیکی، بیولوژیکی و بیوشیمیایی این جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. با انجام مطالعات گلخانه‌ای مشخص شد که این جدایه‌ها در شرایط گلخانه‌ای نیز قادر به کنترل قارچ‌های مورد بررسی هستند.

در ادامه به منظور جداسازی ژن کد کننده ی کیتیناز، استخراج RNA کل از این جدایه‌ها صورت گرفت و پس از ساخت cDNA و تکثیر قطعات توسط آغازگرهای اختصاصی، نمونه‌ها در وکتور pTZ57R/T کلون و سپس تعیین توالی شدند.

مقایسه توالی اسید آمینه‌ای ژن‌های کیتیناز جداسازی شده با استفاده از نرم افزار DNAMAN نشان داد که هیچ یک از ژن‌های کیتیناز جدایه‌های مورد بررسی با هم کاملا" مشابه نیستند. درخت فیلوژنتیکی رسم شده با استفاده از ترادف نوکلئوتیدی ژن‌های کیتیناز جداسازی شده نشان داد که دو ژن متعلق به جدایه ۴۰۰ در یک گروه، ژن‌های جدایه‌های ۴۰۳، ۴۱۰ و ۴۲۳ در یک گروه و ژن‌های جدایه‌های ۴۲۲ و ۴۲۳ در گروهی دیگر قرار می‌گیرند و ژن کیتیناز جداسازی شده از *S. plicatus* در یک زیر گروه جداگانه قرار می‌گیرد.

به طور کلی ژن‌های کیتیناز بدست آمده از جدایه‌های دارای فعالیت کیتینازی در این تحقیق، تشابه زیادی با کیتینازهای خانواده ۱۹ گلیکوزیل هیدرولازها داشتند. تحقیقات نشان داده که کیتینازهای متعلق به این خانواده، نقش اصلی را در ممانعت از رشد پاتوژن‌های گیاهی دارند.

لذا با توجه به قدرت تجزیه کنندگی قوی کیتین و اثبات اثرات آنتاگونیستی جدایه‌های استرپتومایسسی بررسی شده در این تحقیق در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، باید آنها به را به عنوان یک عامل مؤثر در کنترل بیولوژیک، مورد مطالعه فراتر مزرعه ای قرارداد. همچنین با تشدید بیان ژن همسانه‌سازی شده، می‌توان از آن به طور مستقیم به عنوان یک عامل بیوکنترل موثر علیه پاتوژن‌های کیتین دار استفاده کرد. از سوی دیگر، امکان استفاده از جدایه‌های دارای فعالیت کیتینازی و یا ژن همسانه‌سازی شده از آنها در مدیریت ضایعات کیتینی که یکی از مسائل مهم امروزی است، نیز وجود دارد.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول (مقدمه و کلیات)	۱
۱-۱- کنترل بیولوژیک	۲
۱-۱-۱- مبانی کنترل بیولوژیک	۳
۱-۱-۲- مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک	۴
۱-۱-۲-۱- پارازیتیسم	۴
۱-۱-۲-۲- رقابت	۵
۱-۱-۲-۳- شکارگری	۵
۱-۱-۲-۴-پادزیست	۵
۱-۱-۲-۴-۱- باکتریوسین	۶
۱-۱-۲-۴-۲- سیدروفورها	۶
۱-۱-۲-۴-۳- مواد فرار	۶
۱-۱-۲-۴-۴- آنزیم‌ها	۷
۱-۲- پاتوژن‌های خاکزاد گیاهی	۷
۱-۲-۱- *Sclerotinia sclerotiorum*	۸
۱-۲-۱-۱- علائم و چرخه بیماری	۱۰
۱-۲-۲- جنس *Fusarium*	۱۱
۱-۲-۲-۱- *Fusarium graminearum*	۱۲

۲-۲-۲-۱- علائم و چرخه بیماری ۱۳
۲-۲-۳-۱- *Fusarium solani*: ۱۴
۲-۲-۴-۱- علائم و چرخه بیماری ۱۴
۲-۲-۳-۱- جنس *Verticillium* ۱۵
۲-۳-۲-۱- علائم و چرخه بیماری روی گیاه پنبه ۱۵
۲-۲-۴-۱- جنس *Rhizoctonia* ۱۶
۲-۴-۲-۱- گروه‌های آناستوموزی ۱۷
۲-۴-۲-۱- علائم و چرخه بیماری ۱۸
۲-۲-۵-۱- *Pythium aphanidermatum* ۲۰
۲-۵-۲-۱- علائم و چرخه بیماری ۲۱
۳-۱- روش‌های کنترل قارچ‌های خاکزی گیاهی ۲۳
۳-۱-۱- فوماگاسیون خاک ۲۳
۳-۱-۲- استفاده از قارچ‌کش‌ها ۲۴
۳-۱-۳- روش‌های فیزیکی ۲۴
۳-۱-۴- تولید ارقام مقاوم ۲۵
۴-۱- کنترل بیولوژیک قارچ‌های خاکزی ۲۵
۵-۱- ساختمان دیواره قارچ ۲۶
۶-۱- کیتین ۲۷

۷–۱– کیتیناز ۳۰

۱–۷–۱– اندوکیتینازها ۳۱

۲–۷–۱– اگزوکیتینازها ۳۱

۳–۷–۱– ساختمان کیتینازهای باکتریایی ۳۳

۴-۷-۱- جایگاه کیتینازها در خانواده آنزیم‌های گلیکوزیل هیدرولاز ۳۳

۸-۱- اکتینومیست‌ها و اهمیت آنها ۳۶

۱-۸-۱- جایگاه تاکسونومیکی اکتینومیست‌ها ۳۹

۲-۸-۱- بیولوژی اکتینومیست‌ها ۴۰

۳-۸-۱- اکولوژی اکتینومیست‌ها ۴۱

۴-۸-۱- ژنتیک اکتینومیست‌ها ۴۲

۱-۴-۸-۱- خصوصیات DNA و کروموزوم استرپتومایست‌ها ۴۲

۲-۴-۸-۱- تنوع ژنتیکی اکتینومیست‌ها ۴۴

۳-۴-۸-۱- ویژگی ژن‌های استرپتومایسس ۴۵

فصل دوم (مواد و روش‌ها) **٤٧**

۱-۲- تهیه نمونه‌های خاک ۴۸

۲-۲- تهیه محیط کشت ۴۸

۳-۲- خالص سازی و نگهداری نمونه‌ها ۵۰

۴-۲- تهیه گونه خالص قارچ ۵۱

۵-۲- اثبات بیماریزایی قارچ‌های بیمارگر ۵۲

۱-۵-۲- تلقیح قارچ روی بذر گندم ۵۲
۲-۵-۲- تلقیح قارچ با استفاده از سوسپانسیون اسپور ۵۲
۳-۵-۲- خراش دهی روی ساقه و طوقه گیاه ۵۳
۶-۲- تهیه محیط کشت حداقل کیتین آگار ۵۳
۷-۲- تهیه کیتین کلوئیدال ۵۴
۸-۲- غربالگری جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی ۵۵
۹-۲- تعیین فعالیت ضد قارچی جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی ۵۵
۱-۹-۲- روش کشت متقابل ۵۵
۲-۹-۲- روش دیسک گذاری ۵۶
۱۰-۲- آزمایش حساسیت به کلروفرم ۵۶
۱۱-۲- کشت جدایه‌های فعال در محیط Casein Glycerin (CG) و تعیین منحنی تولید ماده موثر ۵۷
۱۲-۲- تهیه عصاره خام ۵۷
۱۳-۲- تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی ۵۸
۱۴-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (Minimum Inhibitory Concentration) (MIC) ۵۹
۱۵-۲- تعیین پایداری ماده مؤثر در شرایط آزمایشگاهی (Longevity *In Vitro*) (LIV) ۵۹
۱۶-۲- تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (Thermal Inactivation Point) ۵۹

۲-۱۷- بررسی فعالیت قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی ۶۰
۲-۱۸- تعیین مورفولوژی سطح اسپور ۶۰
۲-۱۹- مطالعات گلخانه ای ۶۱
۲-۱۹-۱- مکان و نحوه اجرای آزمایش ۶۱
۲-۱۹-۲- تهیه سوسپانسیون اسپور جدایه استرپتومایسس ۶۲
۲-۱۹-۳- نحوه اعمال تیمار در مورد قارچ‌های مختلف ۶۳
۲-۲۰- استخراج DNA ژنومی از اکتینومیست‌ها ۶۴
۲-۲۱- بافرها، محلول‌ها و پرگنه‌های مورد نیاز جهت استخراج DNA ۶۶
۲-۲۲- دستورالعمل استخراج DNA ۶۷
۲-۲۳- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۶۸
۲-۲۳-۱- روش اسپکتوفتومتری ۶۸
۲-۲۳-۲- الکتروفورز ژل اگارز ۷۰
۲-۲۴- ژل آگارز ۷۰
۲-۲۴-۱- طرز تهیه ژل آگارز ۷۱
۲-۲۴-۲- طرز تهیه محلول TBE (2x). ۷۲
۲-۲۴-۳- طرز تهیه محلول اتیدیوم بروماید ۷۲
۲-۲۴-۴- مواد تشکیل دهنده 6x loading dye ۷۲
۲-۲۴-۵- آماده سازی نشانگر مولکولی ۷۳
۲-۲۵- طراحی آغازگر ۷۳

۲۶-۲- سنتز و آماده سازی آغازگرها ۷۴

۲۷-۲- تکثیر DNA به کمک PCR ۷۵

۲۸-۲- اجزاء واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۷۵

۲۹-۲- راه اندازی واکنش PCR ۷۶

۳۰-۲- تخلیص محصول واکنش PCR ۷۹

۱-۳۰-۲- استخراج DNA از ژل با استفاده از AccuPrep® PCR Purification ۷۹
Kit, Bioneer, Korea

۲-۳۰-۲- خالص سازی محصول PCR با استفاده از AccuPrep® PCR ۸۱
Purification Kit, Bioneer, Korea

۳۱-۲- مراحل انجام همسانه سازی ۸۲

۱-۳۱-۲- قرار دادن قطعه DNA تکثیر شده درون ناقل ۸۳

۲-۳۱-۲- کشت باکتری *E.coli* روی محیط کشت *Lauria Bertani (LB)* ۸۳

۳-۳۱-۲- انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری (XL1-Blue) *Escherichia* ۸۴
coli

۴-۳۱-۲- تهیه سلول مستعد [۱] *E. coli* (XL1Blue) ۸۵

۵-۳۱-۲- آماده سازی محیط کشت حاوی آمپی سیلین /X-Gal / IPTG ۸۶

۶-۳۱-۲- تراریخته کردن سلول مستعد با استفاده از روش شوک حرارتی ۸۷

۷-۳۱-۲- انتخاب پرگنه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب ۸۸

۸-۳۱-۲- کشت پرگنه‌های انتخابی در محیط کشت مایع LB به منظور استخراج ۸۸

پلاسمید

۹-۳۱-۲- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری تراریخت ۸۸

۱۰-۳۱-۲- هضم آنزیمی پلاسمید ۹۰

۱۱-۳۱-۲- نگهداری باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب ۹۱

۳۲-۲- آماده سازی نمونه‌ها جهت توالی یابی DNA ۹۱

۳۳-۲- آنالیز و مقایسه توالی‌های بدست آمده با سایر توالی‌های موجود در NCBI ۹۲

۳۴-۲- استخراج RNA ۹۲

۱-۳۴-۲- مواد مورد نیاز جهت استخراج RNA ۹۳

۲-۳۴-۲- دستورالعمل استخراج RNA ۹۳

۳۵-۲- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به روش نسخه برداری معکوس (RT-PCR) ۹۵

۳۶-۲- تجزیه وتحلیل آماری داده‌ها ۹۶

فصل سوم (نتایج) **۹۷**

۱-۳- جداسازی اکتینومیست‌ها از خاک ۹۸

۲-۳- جداسازی اکتینومیست‌های دارای فعالیت کیتینازی ۹۸

۳-۳- اثبات بیماریزایی قارچ‌های بیمارگر ۹۹

۴-۳- تعیین فعالیت ضد قارچی جدایه‌های اکتینومیست دارای فعالیت کیتینازی ۱۰۲

۵-۳- تعیین منحنی تولید ماده مؤثر ۱۰۴

۶-۳- حساسیت به کلروفرم ۱۰۶

۷-۳- تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی ۱۰۷

۳-۸- تعیین حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) ماده مؤثر ۱۰۹
۳-۹- تعیین پایداری ماده مؤثر در شرایط آزمایشگاهی (LIV) ۱۱۱
۳-۱۰- تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP) ۱۱۲
۳-۱۱- ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی جدایه‌های استرپتومایسس ۱۱۳
۳-۱۲- تعیین مورفولوژی سطح اسپور ۱۱۳
۳-۱۳: مطالعات گلخانه‌ای: ۱۱۵
۳-۱۴: استخراج DNA ژنومی از اکتینومیست‌ها ۱۲۳
۳-۱۵- تکثیر ژن کیتیناز به کمک PCR ۱۲۴
۳-۱۶-استخراج Total RNA و تائید بیانی بودن ژن کیتیناز تکثیر شده ۱۲۷
۳-۱۷: همسانه سازی ژن کیتیناز ۱۲۸
۳-۱۸- هضم آنزیمی پلاسمید: ۱۳۰
۳-۱۹- آنالیز و مقایسه توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌های موجود در NCBI ۱۳۲
۳-۱۹-۱- ژن کیتیناز جداسازی شده از *Streptomyces plicatus* جدایه ۱۰۱: ۱۳۲
۳-۱۹-۲- ژن کیتیناز جداسازی شده از استرپتومایسس جدایه ۴۰۰: ۱۳۵
۳-۱۹-۳- ژن کیتیناز جداسازی شده از استرپتومایسس جدایه ۴۰۱: ۱۳۵
۳-۱۹-۴- ژن کیتیناز جداسازی شده از جدایه‌های ۴۰۳، ۴۱۰، ۴۲۰، ۴۲۲ و ۴۲۳: ۱۳۵
فصل چهارم (بحث و نتیجه گیری) ۱۳۷
۴-۱- فعالیت ضد قارچی جدایه‌های اکتینومیست ۱۳۸
۴-۲- منحنی تولید ماده مؤثر ۱۴۱

۴-۳- آزمون کلروفرم ۱۴۳

۴-۴- تعیین حلالیت ماده مؤثر ضد قارچی در حلال‌های آلی ۱۴۴

۴-۵- ارزیابی حداقل غلظت بازدارنده از رشد (MIC) ۱۴۸

۴-۶- تعیین پایداری در محیط ماده مؤثر (LIV) ۱۴۹

۴-۷- تعیین دمای غیر فعال کننده ماده مؤثر (TIP) ۱۵۰

۴-۸- ارزیابی فعالیت قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی جدایه‌های استرپتومایسس ۱۵۰

۴-۹- تعیین مورفولوژی میسلیوم و سطح اسپور ۱۵۱

۴-۱۰: مطالعات گلخانه‌ای ۱۵۴

۴-۱۱- جداسازی و همسانه‌سازی ژن کیتیناز ۱۶۳

۴-۱۲- آنالیز و مقایسه توالی‌های ژن کیتیناز ۱۶۴

منابع **۱۷۷**

ضمائم **۱۹۳**

Shahid Bahonar University of Kerman
Faculty of Agriculture
Department of Biotechnology

Isolation of Actinomycetes Produced Chitinase Enzyme and Cloning of Actinomycetes Chitinase Gene in Bacteria

Supervisor :
Dr. Gholam Reza Sharifi
Dr. Gholam Hosein Shahidi Bonjar

Prepared by :
Azam Baharlouei

A Thesis Submitted as a Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Agricultural Biotechnology (M.S.C)

September 2009

Abstract:

Chitin, a β- 1,4- linked polymer of N-acetyl-D-glucosamine, is the second most abundant biopolymer in natur after cellulose which constitutes the most fungi cell walls, cyst, egg and shell of nematodes and insects cuticule, but there isn't in higher plants and vertebrates. Therefore one of the applied strategies in biological control of plant pathogens is to point of chitin. In this maner, chitinase is a pesticide and one of the biocontrol agents. With the goal of finding a productive chitinase antagonist, 110 isolates of Actinomycetes were isolated from agricultural soils of Sirch and Mahan, Kerman province, Iran. Then, chitinase activity of isolates were evaluated from which 18 isolates showed highest chitinase activity. For screening of Actinomycetes with chitinase activity in production of antifungal agent, antagonistic activity against 12 soil-borne fungal plant pathogens were performed that among them, isolates No. 400, 401, 403, 410, 420, 422 and 423 showed highest antagonistic activity. *In vitro* studies of some biological morphological and biochemical effects of these isolates are being reported here. Greenhouse tests has already confirm that these isolates can control mentioned pathogens.

To isolation the chitinas gene, total RNA extraction from better isolates were performed and after cDNA synthesis, genes were cloned in pTZ54R/T vector and then sequenced.

Amino acid analysis of isolated chitinase genes by the DNAMAN software showed that none of them are similar to each other.

Phylogenetic trees and homology matrixes of nucleotide acids and amino acids sequences were drawn. Result showed that two chitinase genes from isolate No. 400 classified in similar qroup, the isolated genes from isolates No. 403, 410 and 423 are in simalar group and the genes from isolates No. 422 and 423 are in the other group.

All of the isolated chitinase genes in this research have high similarity with the chitinase genes from family 19 glycosyl hydrolase. Researches had been shown that chitinases of this family play the main role in control of plant pathogens activity.

Since based on laboratory and studies the antagonistic effect of isolates has been proven and greenhouse tests has already confirm this results, one should consider it as efficient factor on the biological control of the crops. Also by the overexpression of cloned genes, can use them directly as a effective biocontrol agent against pathogens. On the other hands, the

chitinolytic isolates and cloned genes can be used to wastage management of chitin which is is a very important topic in today's society.

۱-۱- کنترل بیولوژیک

مبارزه بیولوژیک با عوامل بیماریزای گیاهی به ویژه پاتوژن‌های خاکزاد که بیشترین و بالاترین خسارات اقتصادی را به محصولات کشاورزی در دنیا وارد می‌سازند، از جمله عملیاتی است که اصول آن به طور ناآگاهانه قرن‌ها با رعایت تناوب زراعی به کار گرفته می‌شد.