التقويم الجزيئي والوظيفي للمورثة كيتيناز *Chitinase* في الحمص المعدل وراثياً

فاتح خطيب[1]، باسل العسكر[1]، ناهد السخني[2] ومايكل باوم[3]

(1) قسم وقاية النبات، كلية الهندسة الزراعية، جامعة حلب، سورية، البريد الإلكتروني: khatib_fateh@yahoo.com؛ (2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، حلب، سورية؛ (3) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، الرباط، المغرب

الملخص

خطيب، فاتح، باسل العسكر، ناهد السخني ومايكل باوم. 2017. التقويم الجزيئي والوظيفي للمورثة كيتيناز *Chitinase* في الحمص المعدل وراثياً. مجلة وقاية النبات العربية، 35(3): 145-154.

تعمل الهندسة الوراثية في الوقت الحاضر على إيجاد طرائق حديثة لمكافحة الممرضات النباتية مما يسهم في تحسين الغلة كماً ونوعاً. تتطلب عملية تطوير نبات معدل وراثياً إجراء مجموعة من الاختبارات على المستوى الجزيئي والنمط الظاهري لتأكيد نجاح عملية التحوير واكتساب النبات للصفة المنقولة قبل اعتمادها كأصناف جديدة. هدفت هذه الدراسة إلى إجراء تقويم جزيئي ووظيفي للمورثة كيتيناز *Chitinase* في الحمص المعدل وراثياً والتي تمنح صفة المقاومة للفطور. استخدم التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR مع بادئات متخصصة للكشف عن وجود المورثة كيتيناز، كما استخدمت طريقة النسخ العكسي reverse transcription لدراسة تعبير المورثة، في حين استخدمت طريقة تهجين الـــ DNA لمعرفة عدد نسخ المورثة المنقولة للنبات. قوّمت المورثة وظيفياً بمعاملة أبواغ فطر الفيوزاريوم بمستخلص لنباتات حمص معدلة وراثياً. أكدت نتائج تفاعل الـــ PCR انتقال مورثة الكيتيناز واستقرارها في جينوم/مجين الأجيال المتعاقبة لنباتات الحمص، كما عبّرت المورثة بنجاح من خلال نسخها للحمض النووي الرسول mRNA دون أن تسجل حالة إخماد للمورثة في مرحلة ما قبل النسخ، وقد احتوت هذه النباتات على نسخة وحيدة من المورثة المنقولة مما يعزز دورها في منح صفة المقاومة للممرضات الفطرية. استطاع الأنزيم كيتيناز تثبيط إنتاش أبواغ فطر الفيوزاريوم عند معاملتها بالمستخلص النباتي، كما قلل بشكل كبير من عدد المستعمرات المتشكلة على مستنبت الزرع PDA.

كلمات مفتاحية: التفاعل المتسلسل للبوليميراز، النسخ العكسي، تهجين الـ DNA، الذبول الفيوزاريومي.

المقدمة

يعد الحمص (*Cicer arietinum* L.) من المحاصيل البقولية الغذائية المهمة على مستوى العالم ويحتل المرتبة الثالثة بين المحاصيل البقولية، حيث زرع منه في العام 2014 حوالي 13.98 مليون هكتار، أنتجت 13.73 مليون طن بغلّة مقدارها 982 كغ/هكتار (11). نبات الحمص من المحاصيل الحولية ثنائية الصيغة الصبغية (2 ن = 16 صبغياً)، ويبلغ حجم المجين فيه 738 ميغا زوج نكليوتيدي Mega base pairs (Mbp) (3).

يعد مرض لفحة الأسكوكيتا المتسبب عن الفطر *Ascochyta rabiei* (Pass.)، وذبول فيوزاريوم المتسبب عن الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc) من أهم الأمراض التي تسبب فقداً كبيراً في الغلة (20). لا تتوافر حتى اليوم وسائل فعالة واقتصادية لمكافحة هذين المرضين باستثناء استغلال مصادر المقاومة (21). يمكن أن تعتبر مقاومة الممرض الحل الأمثل لمكافحته على اعتبار أنها لا تحتاج لمساهمة المزارعين. قد لا تكون الأصناف المقاومة دائماً فعالة بشكل كافٍ نظراً لأن مجتمعات الممرض قادرة على تطوير نفسها وقد تكسر هذه المقاومة. علاوة على ذلك فإن مقاومة الممرض قد تستهدف عملية الاستقلاب في النبات الأمر الذي قد يترتب عليه خفض الغلة. تزود برامج التربية التقليدية للنبات استراتيجيات اقتصادية فعالة لإدخال مورثات مقاومة ضد العديد من ممرضات النبات، وفي الوقت نفسه هناك ممرضات لم يتم تعريف مورثات مقاومة إزاءها. تستطيع بذلك الهندسة الوراثية المساهمة في الحصول على مقاومة مستدامة للحالات الصعبة أو العنيدة التي لم تستطع برامج التربية التقليدية حلها (8).

يشير مصطلح الهندسة الوراثية أو الـ DNA المؤشب recombinant DNA أو التحوير الوراثي إلى تقنية يمكن من خلالها نقل مورثات من كائنات أخرى مانحة لها إلى الكائنات المستقبلة (12). وبذلك يمكن استخدامها في معالجة المادة الوراثية في الخلية لإنتاج صفات جديدة في الكائن الحي الذي نقلت إليه. وتتميز هذه التقنية بالقدرة على نقل مورثات من أي كائن حي كالنباتات أو الجراثيم ومن ثم إدخالها في

http://dx.doi.org/10.22268/AJPP-035.3.145154
© 2017 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

الكائن الحي المراد تحسين صفاته (4). يمكن من خلال الهندسة الوراثية نقل مورثات تعزز قدرة النبات على مقاومة الممرضات التي تصعب مكافحتها بالطرائق المتاحة حالياً، وبذلك تساعد في زيادة غلة المحصول (2). لاتزال النباتات المعدلة وراثياً المقاومة لأمراض النبات قليلة نسبياً حيث لا تتجاوز المساحة المزروعة بها 2% من إجمالي المساحة الكلية المزروعة بهذه النباتات (12). بالرغم من ذلك فقد أظهرت عدة دراسات نتائج إيجابية فيما يتعلق بتطوير نباتات معدلة وراثياً مقاومة للأمراض الفطرية (18، 29). وقد قسمت هذه النباتات إلى عدة مجموعات تبعاً لآلية مقاومة المرض مثل البروتينات المرتبطة بالقدرة الإمراضية والبروتينات المضادة للفطور والفيتوألكسينات والبروتينات المضادة للجراثيم والبروتينات والببتيدات المثبطة للريبوزومات النباتية ومورثات المقاومة (R-genes)، وتفكك نواتج الاستقلاب السامة التي ينتجها الممرض. يعد أنزيم الكيتيناز أحد أنواع البروتينات المضادة للفطور لكونه يحطم المكوّن الرئيس في جدار الخلية الفطرية وهو الكيتين والغلوكان (chitin and α-1,3 glucan)، ولذلك فإن التعبير المشترك للمورثة كيتيناز وغلوكاناز *glucanase* سوف ينتج عنه مستوى أعلى من المقاومة مما تمنحه كل مورثة على حدة (27).

استخدمت في هذه الدراسة نباتات حمص نقل إليها مورثة الكيتيناز *Chit30* التي مصدرها البكتريا *Streptomyces olivaceoviridis* ATCC 11238 بهدف زيادة مقاومته للمرضات الفطرية. تحتوي المورثة على إطار قراءة مفتوح مكوّن من 888 زوج نكليوتيدي، ويشفر 296 حمضاً أمينياً مع كودون بداية GTG ويشكل الغوانين والسيتوزين 70% من قوام السلسلة (70% GC) وينتج عنها بروتين وزنه الجزيئي 28.9 كيلو دالتون KDa (13).

استخدم البلازميد pGIIvst-Chit الذي يحمل المورثة chitinase مع الحاث *vst* promoter، إضافة إلى المورثة bar التي تمنح صفة المقاومة لمبيد الأعشاب Phosphinothricin (PPT)، والتي استخدمت كمورثة واسمة للانتخاب في النبات. أدخل البلازميد في البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* (السلالة EHA105)، والتي استخدمت كوسيط في تطوير نباتات حمص معدلة وراثياً في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا) (14). يتم تطوير النباتات المعدلة وراثياً حتى يومنا هذا بالإعتماد على الانتخاب على مستنبتات زراعة الأنسجة؛ الأمر الذي قد ينتج عنه هروب لبعض النباتات من عملية الانتخاب أو دخول عدد كبير من نسخ المورثة المنقولة للنبات، أو دخول المورثة دون أن تعبر عن الصفة المرغوبة أو عدم ثبات المورثة المنقولة في الذرية الناتجة (16)؛ لذلك هدف هذا البحث إلى إجراء تقويم للنباتات على المستوى الجزيئي للتأكد من نجاح عملية التحوير الوراثي ومن ثم اختيار السلالات النباتية الأفضل التي يمكن أن تمنح صفة المقاومة للأمراض الفطرية على الحمص.

مواد البحث وطرائقه

المادة النباتية

زرعت 6 نباتات من سلالة الحمص المعدلة وراثياً N-292-3 (من النبات الأب ICC12004) في أصص بلاستيكية سعة 1 كغ تحوي تربة معقمة مع بيتموس بنسبة 1:3، ونباتين من المدخل ICC12004 (النمط ديزي desi) غير المعدلة وراثياً كشاهد، وذلك ضمن حاضنة عند حرارة 24 ºس وإضاءة 6/18 ساعة (ضوء/ظلام)، حيث استخدمت النباتات الناتجة في عملية التقويم الجزيئي والوظيفي للمورثات المدخلة. تم تطوير هذه النباتات وإكثارها ضمن ظروف متحكم بها في المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (ايكاردا).

استخلاص الـ DNA

تم استخلاص الـDNA من حوالي 0.3 غ من أوراق الحمص بطريقة الـ CTAB المعتمدة من قبل (10) مع إجراء تعديل على طريقة الاستخلاص؛ حيث جمعت الأوراق مباشرة من النباتات الخضراء ثم سحقت في 1 مل من محلول الاستخلاص CTAB (CTAB 3%، 1.4 مولر NaCl، 0.1 مولر Tris-HCl، 0.02 مولر EDTA، pH=8.0، 0.5% PVP). نقلت كمية 800 ميكرولتر من الخلاصة إلى أنابيب سعة 2 مل، وحضنت لمدة 30 دقيقة في حمام مائي ساخن عند حرارة 60 ºس مع التحريك بهدوء. ثم أضيفت كمية 800 ميكرولتر من مزيج الكلوروفورم: الكحول الايزوميلي (1:24)، وخلطت المكونات بالتقليب بهدوء لتجنب تقطيع الـ DNA وفصلت الأوساط بالطرد المركزي عند سرعة 13000 دورة/الدقيقة لمدة 10دقائق. نقل الرائق العلوي (المائي) فقط الى أنابيب جديدة من ذات الحجم، وأهمل الجزء السفلي (المذيب العضوي)، وأضيف للرائق ثلثي حجمه من الايزوبروبانول البارد (−20 ºس) لترسيب الـ DNA في الوسط. جمع الراسب (DNA) أسفل الأنبوب بالطرد المركزي عند سرعة 13000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق. أهمل الرائق وأضيف فوق الراسب لغسيله كمية 200 ميكرولتر من سائل الغسيل washing buffer (10 ملليمولر خلات الأمونيوم، 76% كحول ايثيلي). تم التخلص من سائل الغسيل بعد عملية التثفيل عند الشروط السابقة، ثم تركت العينة في جو معقم لتجف. أذيب الراسب في 200 ميكرولتر من المحلول المنظم TE (10 ميلليمولر Tris-HCl، 8 pH، 1 ميلليمولر EDTA) الذي يحوي الأنزيم RNAse بتركيز 100 ميكروغرام/مل. حضنت العينات في حمام مائي عند حرارة 37 ºس لمدة

30 دقيقة. أضيفت كمية 100 ميكرولتر خلات الأمونيوم (7.5 مولر)، و750 ميكرولتر من الكحول الايثيلي المطلق (100%). أعيدت عملية الترسيب عند الشروط سابقة الذكر، ثم استبعد السائل وجفف الراسب عند درجة حرارة الغرفة ثم أضيف له 200 ميكرولتر ماء مقطر ومعقم. حفظت العينات عند حرارة 4 ºس لليوم التالي حتى ذاب الـ DNA بشكل كامل، ثم اختبرت نوعيته وتركيزه ونقاوته بوساطة المطياف الضوئي وبالرحلان على هلامة أغاروز تركيز 1%.

الكشف عن المورثتين *Chitinase* و *bar* gene

يعد التفاعل المتسلسل للبوليمراز (PCR) من أبسط الاختبارات التي يمكن من خلالها الكشف عن دخول المورثات إلى جينوم النبات المعدل وراثياً وذلك من خلال استخدام بادئات متخصصة لتعريف المورثات المنقولة. نفذ هذا الاختبار باستخدام زوج من البادئات لمكاثرة قطعة بطول 264 زوج نكليوتيدي من المورثة *bar* وهما: Bar-F: 5'- GCAGGAACCGCAGGAGTGGA-3' و Bar-R: 5'-AGCCCGATGACAGCGACCAC-3'، بينما استخدمت البادئات Chit 555-F: 5'-GGTGACATCGTCCGCTACAC-3' و Chit 555-R: GGTGTTCCAGTACCACAGCG-3' وذلك لمكاثرة قطعة بطول 555 زوج نكليوتيدي من المورثة كيتيناز. حضر مزيج التفاعل في حجم نهائي 20 ميكرولتر يتكون من 5 ميكرولتر DNA (250 نانوغرام)، 2 ميكرولتر محلول منظم للتفاعل (10x PCR buffer with 15 mM $MgCl_2$)، 3 ميكرولتر dNTP's (تركيز 2 ميلليمولر)، 1 ميكرولتر من كل بادئة (تركيز 10 ميكرومولر)، 0.2 ميكرولتر من أنزيم البلمرة DNA taq polymerase (5U/µl)، 7.8 ميكرولتر ماء معقم منزوع الشوارد. تمت عملية التدوير الحراري في جهاز من نوع Applied Biosystem, USA وفق البرنامج التالي للمورثة *bar*: فصل أولي عند حرارة 94 ºس لمدة 5 دقائق ولدورة واحدة، ثم 30 دورة تتضمن الفصل الثانوي عند حرارة 94 ºس لمدة 90 ثانية، التحام البادئات عند حرارة 60 ºس لمدة 90 ثانية، الامتداد عند 72 ºس لمدة 60 ثانية، ومن ثم الامتداد النهائي لدورة واحدة عند 72 ºس لمدة 7 دقائق. بينما تمت عملية المكاثرة للمورثة كيتيناز وفق البرنامج التالي: فصل أولي عند حرارة 95 ºس لمدة 3 دقائق ولدورة واحدة، ثم 29 دورة تتضمن الفصل الثانوي عند حرارة 94 ºس لمدة 1 دقيقة، التحام البادئات عند حرارة 60 ºس لمدة 1 دقيقة، الامتداد عند 72 ºس لمدة 1 دقيقة ومن ثم الامتداد النهائي لدورة واحدة عند 72 ºس لمدة 10 دقائق. فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2%، ومن ثم لونت الهلامة في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهّرت صورة الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام.

عزل الحمض النووي الريبي

تهدف عملية عزل الـ RNA إلى الكشف عن نشاط المورثة المنقولة، حيث يتم نسخ الحمض النووي الريبي الرسول mRNA عن سلسلة الـ DNA ومن ثم يترجم الـ mRNA إلى البروتين أو الأنزيم. تم في البداية تحريض الحاث vst المشغل للمورثة كيتيناز وذلك عن طريق وخز أوراق نباتات الحمص المعدلة وراثياً ونباتات الشاهد عدة مرات وهي على النبات؛ بوساطة إبرة رفيعة معقمة وذلك لضمان تراكم نسخ الـ mRNA عن المورثة المنقولة. تركت الأوراق لمدة 48 ساعة على النبات ثم فصلت عنه لاستخدامها في عزل الحمض النووي الريبي الكلي. تمت عملية الاستخلاص وفق تعليمات الشركة الصانعة (Promega, USA) مع إجراء تعديل بسيط وهو سحق العينة النباتية الطازجة في كمية 500 ميكرولتر من المحلول المنظم (RNA lysis buffer)، ثم نقل كمية 175 ميكرولتر من الخلاصة إلى أنابيب سعة معقمة 2 مل ثم متابعة الاستخلاص وفق الخطوات المقترحة. تتضمن عملية الاستخلاص معاملة العينات بالأنزيم DNase الذي يعمل على تحطيم الـ DNA في العينة. تم قياس تركيز الـ RNA ونقاوته بوساطة المطياف الضوئي.

تركيب سلسلة الـ DNA المكملة

يهدف هذا الاختبار إلى تكوين سلسلة DNA مفردة مكملة لسلسلة mRNA التي تنسخ عن المورثة، وذلك لاستخدامها في تفاعل PCR عادي للكشف عن نشاط المورثة المنقولة. أجريت عملية تكوين السلسلة المكملة من كمية 4 ميكروغرام RNA باستخدام البادئة $Oligo\ (dT)_{18}$ في حجم تفاعل 20 ميكرولتر وفق تعليمات الشركة الصانعة باستخدام كيت RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit من شركة Fermentas, Germany. استخدمت كمية 2 ميكرولتر من مزيج cDNA كقالب في تفاعل PCR عادي لمكاثرة المورثة كيتيناز باستخدام البادئات Chit555-F و Chit555-R وفق شروط التفاعل المذكورة سابقاً. كما استخدم ذات الكمية من المزيج في تفاعل آخر للكشف عن نشاط المورثة actin كشاهد للمقارنة؛ وهي مورثة داخلية المنشأ endogenous gene في الحمص، وذلك باستخدام البادئات: ACT-1-F: 5'-CGTCTTGACCTGGCTGGTCGC-3' و ACT-1-R: 5'-GGCTGTCTCCAGCTCTTGCTCG-3'. تمت عملية المكاثرة للمورثة actin وفق البرنامج التالي: فصل أولي لمرة واحدة عند حرارة 95 ºس لمدة 5 دقائق، ثم 35 دورة تتضمن الفصل الثانوي عند حرارة 94 ºس لمدة 1 دقيقة، التحام البادئات عند حرارة

55 ºس لمدة 1 دقيقة، الامتداد عند 72 ºس لمدة 1 دقيقة ومن ثم الامتداد النهائي لدورة واحدة عند 72 ºس لمدة 10 دقائق. تضاعف البادئات المستخدمة قطعة بطول 164 زوج نكليوتيدي من المورثة actin. فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2%، ومن ثم لونت الهلامة في محلول بروميد الايثيديوم تركيز 0.5 ميكروغرام/مل، وظُهّرت صورة الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية في جهاز توثيق الهلام.

تهجين الـ DNA

يفيد اختبار تهجين الـ DNA أو تشرب سذرن Southern blot (23) في الكشف عن عدد نسخ المورثة التي دخلت إلى النبات، والتي ترتبط بدورها بتعبير المورثة. تم وسم المسبر/المجس (probe) للمورثة كيتيناز بوساطة الـ PCR وبالطريقة غير الإشعاعية باستخدام مادة الوسم DIG-11-dUTP في حجم تفاعل 50 ميكرولتر، وذلك وفق تعليمات الشركة الصانعة (Roche Applied Science, Germany). تم تحميل كمية 5 ميكرولتر من ناتج التفاعل على هلامة أغاروز تركيز 1.2% ومن ثم لونت وظهرت للكشف عن نجاح عملية الوسم. تمت عملية التهجين بهضم كمية 20 ميكروغرام DNA بوساطة الأنزيم *Bam*HI وذلك خلال ليلة تحضين عند حرارة 37 ºس. فصلت نواتج القطع بالرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1%، ثم نقل الـ DNA بالخاصية الشعرية مع المحلول 20x SSC إلى غشاء نايلوني مشحون بشحنة موجبة (Roche Diagnostics GmbH, Germany). تمت عملية تهجين الـ DNA مع مسبر الكيتيناز الموسوم خلال ليلة تحضين عند حرارة 42 ºس. أجريت عملية غسيل للغشاء مرتين في المحلول 2x SSC, 0.1% SDS لمدة عشر دقائق، ثم مرة واحدة لمدة 15 دقيقة في المحلول 0.5x SSC, 0.1% SDS عند حرارة 65 ºس. وضع الغشاء النايلوني في محلول السد (Blocking solution) لمدة 30 دقيقة عند حرارة الغرفة مع التحريك، ثم أضيف محلول السد مع الأجسام المضادة (Anti-DIG alkaline phosphatase 1:5000)، وغسل الغشاء مرتين لمدة 15 دقيقة في كل مرة في محلول الغسيل (100 ميلليمولر حمض الماليك، 150 ميلليمولر كلوريد الصوديوم (pH= 7.5)، 0.3% Tween 20). استخدم محلول الكشف (100 ميلليمولر Tris-HCl، 100 ميلليمولر كلوريد الصوديوم، pH = 9.5) الذي يحوي المادة الملونة NBT/BCIP في تظهير مواقع التهجين على الغشاء النايلوني.

التقويم الحيوي للمورثة *bar*

تعتبر المادة الفعالة Phosphinothricin (PPT) مبيد أعشاب غير اختياري يعمل على مراكمة الأمونيا في الخلايا النباتية إلى مستويات سامة مما يؤدي إلى موت النبات خلال أيام. تشفر المورثة *bar* (bialaphos resistant) لتركيب الأنزيم *phosphinothricin acetyl transferase* (PAT) الذي يعطل سمية المبيد عن طريق أستلة (acetylation) المادة الفعالة للمبيد من خلال إنتاج المركب N-acetyl-L-phosphinothricin الذي ليس له صفة مبيد الأعشاب. يستخدم المركب PPT كعامل انتخاب selection agent في مستنبتات زراعة الأنسجة لتطوير النباتات المعدلة وراثياً عندما تكون المورثة الواسمة للانتخاب في التركيبة الوراثية المنقولة للنبات هي *bar* gene (14). كما يمكن الاستفادة من عمل هذه المورثة بالحصول على نباتات مقاومة لمبيد الأعشاب PPT. أجريت عملية التقويم الوظيفي للمورثة *bar* في نبات الحمص وذلك بدهن السطح العلوي للأوراق بمبيد PPT تركيز 600 مغ/ل، أضيف له مادة Tween 20 بتركيز 0.1% للمساعدة على نشر المبيد على سطح الأوراق، ثم أخذت النتائج بعد أسبوع من دهن الأوراق.

التقويم الوظيفي للمورثة كيتيناز

عزل البروتين الخام

حفزت مورثة الكيتيناز عن طريق وخز بعض أوراق النباتات المعدلة وراثياً ونباتات الشاهد بإبرة رفيعة معقمة، ثم جمعت كمية 1 غ من الأوراق بعد 3 أيام من الوخز. تم سحق كل عينة على حدة في 10 مل من مستنبت آجار دكستروز البطاطا (PDA) السائل ضمن هاون بورسلان معقم بالحرارة، ثم ترك المستخلص في البراد عند حرارة 4 °س لمدة ساعتين. تم فصل مكونات المستخلص عن طريق الطرد المركزي عند حرارة 4 °س وسرعة 4000 دورة/الدقيقة لمدة 10 دقائق. تم سحب الرائق وتعقيمه بالفلترة بوساطة مرشحات أقطار ثقوبها 0.22 ميكرومتر.

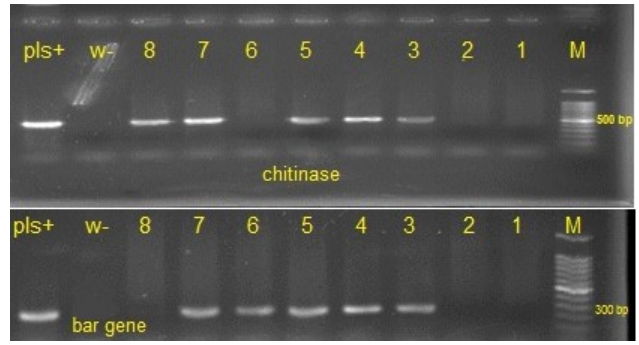
اختبار تثبيط إنبات الأبواغ

حصدت أبواغ الفطر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* من أطباق حديثة في كمية 10 مل من وسط PDA ضمن حجرة العزل وذلك بتحريكها رحوياً بهدوء، ثم سحب السائل وتم عد الأبواغ وضبط عددها عند 1×10^6 بوغة/مل. أضيفت كمية 20 ميكرولتر من المعلق البوغي إلى 980 ميكرولتر من مستخلص الأوراق لكل من النباتات المعدلة وراثياً ونباتات الشاهد غير المعدل ومستنبت PDA السائل، ثم حضنت عند حرارة 25 °س لمدة 4 أيام. أخذت عينات من كل معاملة ولونت بأزرق القطن للكشف عن النمو الفطري. تم عمل تخفيفات من مكررات المعاملات السابقة بنسبة 1000:1، ونشر منها كمية 100 ميكرولتر على مستنبت PDA الصلب، ثم حضنت عند حرارة 25 °س لمدة يومين، حيث عدت المستعمرات المتشكلة على الأطباق تحت المكبرة.

النتائج

الكشف عن المورثات *Chitinase* و *bar* في الحمص

أظهرت نتائج التفاعل المتسلسل للبوليميرز PCR باستخدام بادئات متخصصة على المورثات المنقولة لنبات الحمص بطريقة التعديل الوراثي وجود هاتين المورثتين في جينوم النباتات المختبرة، حيث أمكن مكاثرة القطعتين المتوقعتين وهما بطول 555 و 264 زوج نكليوتيدي (bp) لكل من مورثة *chitinase* والمورثة *bar*، على التوالي (شكل 1). تظهر هذه النتائج استقرار المورثتين المنقولتين في جينوم نبات الحمص وتوريثهما بشكل مستقر إلى الذرية الناتجة حتى الجيل الخامس T_5 الذي تم اختباره.

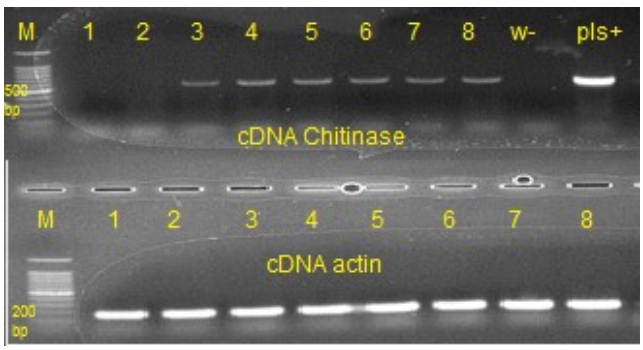


شكل 1. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1.2% لنواتج التفاعل المتسلسل للبوليميراز للمورثتين *chitinase* (أعلى) و *bar* (أسفل) في نباتات الحمص الجيل T_5. M= مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي، المساران 1 و2= نباتات حمص غير معدلة وراثياً، المسارات 3-8= نباتات حمص معدلة وراثياً، w-= عينة ماء (شاهد سلبي بدون DNA)، pls+= شاهد إيجابي (البلازميد pGIIvst-Chit).

Figure 1. Electrophoresis on 1.2% agarose gel for PCR products of the chitinase (up) and bar gene (down) derived from T_5 chickpea transgenic plants. M= Molecular weight marker 100 bp ladder, Lanes 1& 2= non-transformed chickpea plants, Lanes 3-8= Transgenic chickpea plants, w-= water sample (negative control, DNA free sample), pls+= positive control (pGIIvst-Chit plasmid).

تعبير المورثات المنقولة

يعد دخول المورثة المنقولة عن طريق التحوير الوراثي في مجين النبات وتأكيد ذلك بوساطة الـ PCR اختباراً أولياً لتأكيد عملية النقل لكن ليس له أي دلالة فيما يتعلق بتعبير هذه المورثة ومنحها للصفة المطلوبة. قد تتعرض المورثة بعد نقلها لعملية مثلتة (methylation) تعيق عملية النسخ وينشأ عن ذلك حالة إخماد لعمل المورثة gene silencing. تم تحريض المورثة chitinase عن طريق وخز الأوراق لارتباط تشغيلها بحاث متخصص (specific promoter)، درس تعبير المورثة المنقولة إلى نبات الحمص بالمقارنة مع المورثة actin من خلال الكشف عن الحمض النووي الريبي الرسول mRNA الذي تنسخه هاتين المورثتين وذلك بعد تحويله إلى سلسلة DNA مكملة له (cDNA). أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز تركيز 1.2% لنواتج تفاعل الـ PCR باستخدام سلاسل الـ DNA المكملة لكل من المورثتين chictinase و actin كقالب لعملية المكاثرة، وب بوساطة بادئات متخصصة على هاتين المورثتين الحصول على القطع المتوقعة من كل مورثة وهي 555 زوج نكليوتيدي للمورثة chitinase و 164 زوج نكليوتيدي للمورثة actin (شكل 2). تجدر الإشارة هنا إلى غياب تعبير المورثة كيتيناز في العينتين 1 و 2 لأنها من نباتات حمص غير معدلة وراثياً بهذه المورثة (نباتات شاهد)، في حين تم الكشف عن تعبير المورثة كيتيناز في باقي عينات النباتات المعدلة وراثياً (العينات 3–8). و تم الكشف عن تعبير المورثة actin في كل العينات المختبرة سواء كانت معدلة وراثياً أو غير معدلة (العينات 1–8) ويعود ذلك إلى أن هذه المورثة موجودة أصلاً (مورثة داخلية المنشأ endogenous gene) في النبات ولها تعبير ثابت في جميع مراحل نمو النبات ويمكن الاستدلال على ذلك من كثافة العصابات (bands) الناتجة عن تعبير المورثة في كل العينات المختبرة، في حين تتباين هذه الشدة بالنسبة للمورثات المنقولة تبعاً لكمية الحمض النووي الرسول mRNA الذي ينسخ عنها.

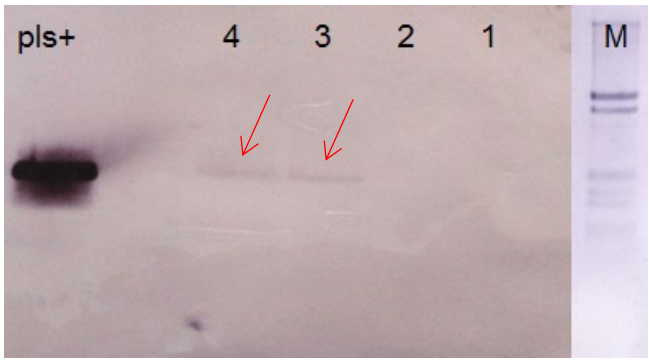


شكل 2. الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1.2% لنواتج تفاعل الـ PCR لسلسلة الـ DNA المكملة (cDNA) للمورثتين chitinase (أعلى) وactin (أسفل) في الحمص. M= مؤشر قياسي للوزن الجزيئي 100 زوج نكليوتيدي، المساران 1 و2 = نباتات حمص غير معدلة وراثياً، المسارات 3-8= نباتات حمص معدلة وراثياً، w-= عينة ماء (شاهد سلبي بدون DNA)، pls+= شاهد إيجابي (البلازميد pGIIvst-Chit).

Figure 2. Electrophoresis on 1.2% agarose gel for cDNA-PCR products of amplified chitinase (up) and actin genes (down). M= Molecular weight marker 100 bp, ladder, lanes 1& 2= non-transformed chickpea plants, lanes 3-8= Transgenic chickpea plants, w-= water sample (negative control, DNA free sample), pls+= positive control (pGIIvst-Chit plasmid).

تهجين الـ DNA

أظهرت نتائج تهجين الـ DNA بمسبر للمورثة chitinase موسوم بالطريقة غير الإشعاعية وجود نسخة وحيدة من المورثة المنقولة إلى نبات الحمص في العينتين المدروستين، وكذلك في الشاهد الإيجابي (التهجين مع ناتج تفاعل PCR للمورثة كيتيناز)، في حين لم يكن هناك أي عصابة في عينة الشاهد غير المعدل وراثياً (شكل 3).



شكل 3. تهجين الـ DNA على الغشاء النايلوني باستخدام مسبر موسوم بالطريقة غير الإشعاعية. M= مؤشر قياسي موسوم، المسارات 1-2: نباتات حمص غير معدلة وراثياً، 3-4= نباتات حمص معدلة وراثياً، pls+= شاهد إيجابي.

Figure 3. DNA hybridization on nylon membrane using non-radioactive labeled probe. M= labeled molecular weight marker, lanes 1 & 2= non-transformed chickpea plants, lanes 3 & 4= transgenic chickpea plants, pls+= positive control.

مقاومة مبيد الأعشابPPT

قومت المورثة *bar* وظيفياً بدهن أوراق نباتات الحمص الجيل T5 بمبيد الأعشاب phosphinothricin (PPT)، حيث أظهرت نباتات الحمص المعدلة وراثياً مقاومة للمبيد، في حين ماتت أوراق النباتات غير المحورة بعد أسبوع من عملية الدهن (شكل 4). ويستدل من ذلك على استقرار المورثة bar في جينوم النبات وقدرتها على التعبير عن الصفة التي تمنحها، حيث اكتسبت النباتات صفة المقاومة لمبيدات الأعشاب وهي صفة زراعية مهمة أخرى تم إدخالها لنباتات الحمص عن طريق التحوير الوراثي حيث يمكن مكافحة الأعشاب المزروعة بهذه النباتات بوساطة المبيد Basta®. تشغل هذه المورثة بوساطة حاث بنائي (constitutive promoter) يعمل على تحفيزها بشكل مستمر لذلك يمكن الاعتماد عليها في مكافحة الأعشاب في أي مرحلة من عمر النبات.

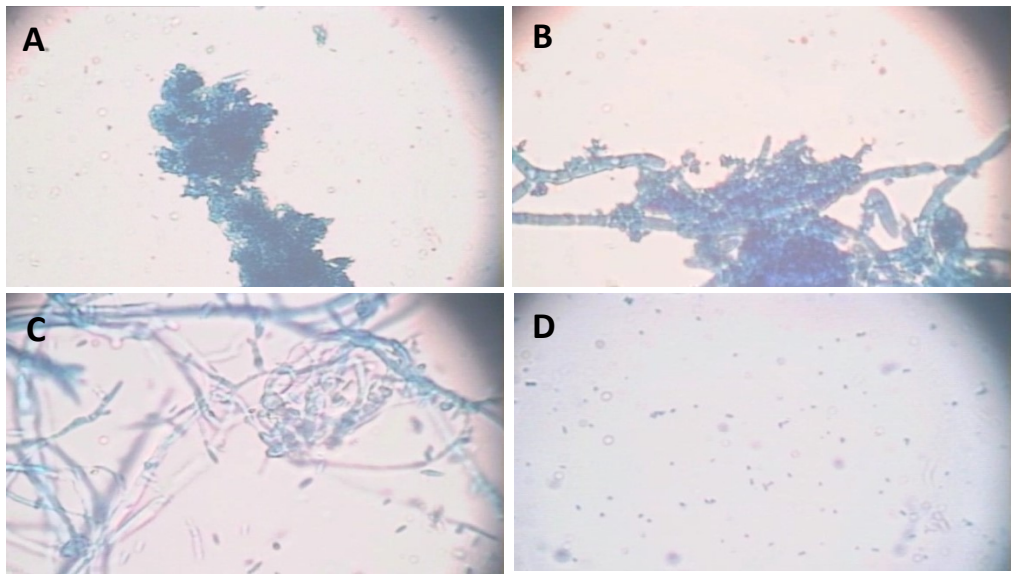
التقويم الوظيفي للمورثة كيتيناز

أظهرت نتائج الفحص المحضرات المجهرية وجود تأثير واضح لمورثة الكيتيناز في إنتاش أبواغ فطر الفيوزاريوم، حيث لم تتشكل أية نموات فطرية عند معاملة الأبواغ في مستخلص النباتات المعدلة وراثياً. بينما تشكلت كتل من ميسيليوم فطر الفيوزاريوم في المعاملتين اللتين استخدم فيهما إما مستخلص من نباتات حمص غير معدلة وراثياً، أو مستنبت PDA السائل (شكل 5).

أما عند تخفيف المعلق البوغي السابق ونشر كمية منه على مستنبت PDA الصلب ومن ثم عد المستعمرات المتشكلة؛ فقد بلغ متوسط عدد المستعمرات المتشكلة في المعاملات المختلفة 50 مستعمرة في معاملة الأبواغ على مستنبت PDA السائل (الشاهد)، 15 مستعمرة عند معاملة الأبواغ في مستخلص الحمص غير المعدل وراثياً، 3 مستعمرات عند معاملة الأبواغ في مستنبت مستخلص الحمص المعدل وراثياً. وقد تم تأكيد النتيجة من خلال متابعة زراعة الأطباق لفترة أطول حتى تتشكل مستعمرات يمكن رؤيتها بالعين المجردة، وقد تبين بنتيجة ذلك تطور محدود أو شبه معدوم على الأطباق التي نشر عليها أبواغ الفطر المعاملة بمستخلص نباتات الحمص المحورة، بينما تطور الفطر من معاملة الأبواغ بمستخلص نباتات الحمص غير المحورة، وكان النمو واضحاً في معاملة الشاهد غير الحاوي على مستخلص نباتي (وسط PDA السائل) (شكل 6).

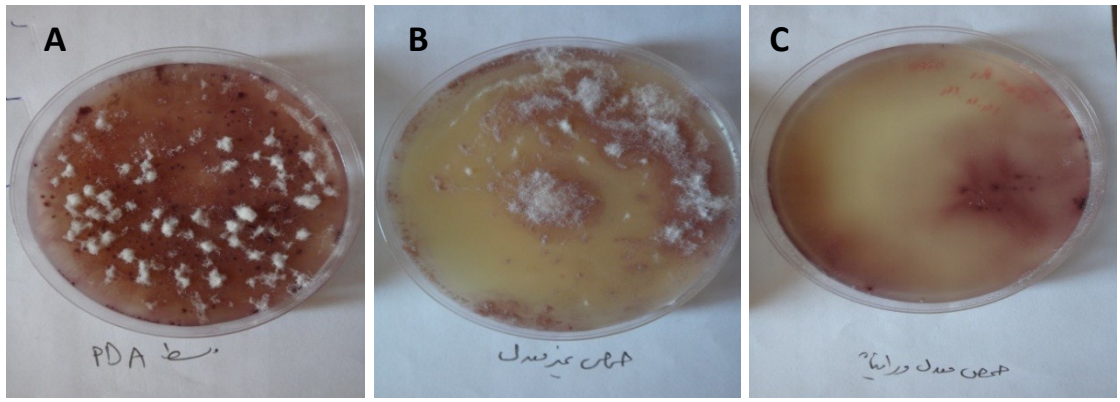
شكل 4. دهن أوراق الحمص بمبيد الأعشاب PPT تركيز 600 مغ/ل: (A) ورقة نبات معدل وراثياً مقاومة للمبيد، (B) موت أوراق نباتات الشاهد غير المعدل وراثياً.

Figure 4. Chickpea leaf painting test with 600 mg/l PPT: (A) transgenic chickpea leaf resistant to PPT, (B) Susceptible non-transformed chickpea leaf sensitive to PPT.



شكل 5. فاعلية المورثة كيتيناز في تثبيط إنتاش الأبواغ الكونيدية للفطر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*: (A) النمو الفطري في مستنبت PDA السائل، (B) النمو الفطري في مستخلص نباتات الحمص غير المحورة وراثياً، (C) محضر لميسيليوم فطر الفيوزاريوم تم إكثاره على مستنبت PDA الصلب، (D) تثبيط نمو الميسيليوم في مستخلص نباتات الحمص المحورة وراثياً.

Figure 5. Efficacy of *Chitinase* gene in the germination of *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* conidial spores. (A) Mycelium growth in liquid PDA, (B) mycelium growth in extract from non-transformed chickpea plant, (C) slide from *Fusarium* colony grown on solid PDA, (D) mycelium growth inhibition in extract from transgenic chickpea plant.



شكل 6. مستعمرات فطر الفيوزاريوم المتشكلة بعد المعاملة بالمستخلص النباتي ونشرها على مستنبت PDA الصلب: أبواغ معاملة في مستنبت PDA السائل (شاهد)، (B) أبواغ معاملة بمستخلص نباتي من نباتات حمص غير معدلة وراثياً، (C) أبواغ معاملة بمستخلص نباتي من نباتات حمص معدلة وراثياً.

Figure 6. Formation of *Fusarium* colonies after treatment with plant extracts and inoculation on PDA medium. (A) spores incubated in liquid PDA, (B) spores incubated in extract from non-transformed chickpea plants, (C) spores incubated in extract from transgenic chickpea plants.

المناقشة

تتطلب عملية الإنتاج النباتي والحصول على غلة ذات نوعية جيدة المحافظة على سلامة النبات من التغيرات في الظروف البيئية ومكافحة الآفات التي تهاجمها. وقد ساعدت الهندسة الوراثية المزارعين اليوم وعلى نطاق واسع في التصدي لبعض هذه التحديات، كما أن هناك العديد من هذه المحاصيل مازالت قيد التطوير، فقد تجد النباتات المنتجة بطريقة الهندسة الوراثية بحيث تتحمل درجات الحرارة المرتفعة، أو الملوحة، أو الجفاف طريقها للإنتاج في المستقبل. أم في الوقت الراهن فإن معظم

النباتات المعدلة وراثياً فإنها تحمل صفات زراعية تمنح النبات التحمل لمبيدات الأعشاب أو مقاومة الحشرات أو الممرضات (16).

بعد القيام بعملية إدخال المورثات الغريبة للنبات بالطرائق المختلفة للتحوير الوراثي، لا بد من إجراء مجموعة من الاختبارات على النباتات التي نتجت عن هذه التجارب، والتي يفترض أنها تعطي عدداً كبيراً من السلالات المستقلة عن بعضها تبعاً لموقع دخول المورثة في الجينوم، وبالتالي يجب أن نختار من بينها السلالة التي تحوي على نسخة وحيدة من المورثة، وتعبر بمستوى عالٍ عن الصفة التي نقلت إليها. كما يجب أن نميز ضمن هذا العدد الكبير من السلالات بين النباتات التي انتقلت إليها المورثة وتلك التي لا تحويها. ويتطلب هذا الأمر إجراء سلسلة من التحاليل المادية والمظهرية والوراثية (5).

تم خلال هذه الدراسة إجراء الاختبارات الوراثية والمظهرية ضمن ظروف متحكم بها لمورثة الكيتيناز التي تمنح صفة المقاومة للممرضات الفطرية، والمورثة bar التي تمنح صفة المقاومة لمبيد الأعشاب phosphinothricin (glufosinate ammonium) وذلك على بعض نباتات ذرية الجيل T5 للحمص المعدل وراثياً. تبين بنتيجة هذه الاختبارات تأكيد وجود هاتين المورثتين في النباتات المختبرة بوساطة التفاعل المتسلسل للبوليميراز PCR، مما يدل على استقرارهما في مجين النباتات المحورة، كما استطاعت النباتات التعبير على المستوى الجزيئي من خلال الكشف عن الحمض النووي الريبي الرسول mRNA الذي تشفر له المورثة كيتيناز وبالتالي عدم تعرض سلسلة DNA المورثة لعملية الإخماد (silencing) في مرحلة ماقبل النسخ pre-transcription. كما تم الكشف عن وجود نسخة وحيدة من المورثة المنقولة كيتيناز في مجين نباتات الحمص المختبرة بوساطة اختبار تهجين الـ DNA الأمر الذي يقلل من احتمالية تعرض المورثة للإخماد في مرحلة مابعد النسخ post-transcription وعدم تشكل الأنزيم الذي تشفر له المورثة في حال دخول عدد كبير من النسخ. تجدر الإشارة هنا إلى أن هذه النباتات قد عدلت وراثياً باستخدام البكتريا *A. btumefaciens* كوسيط في عملية النقل وهي طريقة تتميز بقلة عدد النسخ المدخلة للنبات إذا ما قورنت بطريقة القصف الحيوي biolistic (17).

هناك عدة احتمالات تشرح الاختلافات في مستوى تعبير المورثات بين سلالات النباتات المعدلة وراثياً غير عدد نسخ المورثة المنقولة. لا تعد المورثات المنقولة بطريقة التحوير الوراثي وحدة نسخ مستقلة، وإنما هي جزء من قطعة الـ T-DNA التي تنقلها البكتريا *A. tumefaciens* إلى مواقع مختلفة على صبغيات النبات، وعند دخول هذه المورثة في منطقة يوكروماتين euchromatin والتي تعد منطقة نسخ نشطة، عندها قد تتأثر المورثة المنقولة بالسلاسل المنظمة للمورثات المجاورة في هذا الموقع الوراثي. أما عند دخول المورثة بشكل قريب من منطقة تكرار لـ DNA أو كروماتين متباين heterochromatin عنده يمكن أن يثبط عمل المورثة. من العوامل المهمة الأخرى المؤثرة في تعبير المورثة هو عدد نسخ المورثة في موقع الإدخال. حيث يمكن لنظام الإدخال المستخدم في عملية التحوير الوراثي أن يدخل نسختين أو أكثر من قطعة الـ T-DNA في الموقع نفسه على الصبغي. وهذه النسخ يمكن أن تتوضع في هذا الموقع بتراتيب مختلفة (رأس إلى ذيل head to tail، تكرارات مباشرة، رأس إلى رأس أو ذيل إلى ذيل كتكرارات معكوسة حيث يظهر هذا الأخير مستويات منخفضة من تعبير المورثة (24).

تقليدياً استخدم اختبار تهجين الـ DNA في تحديد عدد النسخ التي أدخلت للنبات، مع بداية تقنية التعديل الوراثي للنبات وحتى يومنا هذا، حيث يستخدم مسبر يتم وسمه بطرائق مختلفة حيث نحصل على عصابات/حزم يستدل من خلال عددها على عدد النسخ التي دخلت إلى النبات. تم خلال السنوات الماضية الاعتماد على تقنية أخرى لمعرفة عدد النسخ المنقولة للنبات وهي التفاعل المتسلسل للبوليميراز بالزمن الحقيقي real time PCR أو تفاعل البوليميراز الكمي quantitative PCR (qPCR)، وتتميز هذه الطريقة بأنها توفر الوقت والجهد اللازم للتهجين بالطريقة التقليدية، كما أنها تحتاج لكمية قليلة من الـ DNA، ولا حاجة لعملية الهضم بالأنزيمات أو تحضير المسابر ووسمها أو استخدام أغشية لعملية النقل. إضافة إلى ذلك فإن طريقة التهجين التقليدية لا تستطيع الكشف عم وجود عدة نسخ في نفس الموقع الوراثي لأنها تكون بنفس الطول. استخدمت هذه الطريقة في معرفة عدد نسخ المورثة حسابية بطريقة qPCR في كل من فول الصويا والفول السوداني والبندورة والذرة والقمح والخردل الزيتي والتبغ والرز والقطن والحمضيات والعنب والكسافا (7).

أظهرت نتائج الدراسة الحالية دور المورثة كيتيناز في تثبيط نمو أبواغ الفطر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* في مستخلص البروتين للنباتات المعدلة وراثياً، وكذلك انخفاض عدد المستعمرات المتشكلة على مستنبت PDA الصلب بعد 48 ساعة، وعدم تطور مستعمرات الفطر على الأطباق الملقحة بالمستخلص. كما لوحظ تأثير بدرجة أقل لمستخلص نباتات الحمص غير المعدلة وراثياً في إنبات أبواغ فطر الفيوزاريوم، ويعزى ذلك إلى احتواء الحمص على مثل هذه المورثات بشكل طبيعي الأمر الذي ساهم في انخفاض عدد المستعمرات المتشكلة، لكن وجود المورثة المنقولة عزز من عملية التثبيط. حيث استطاع Shahid وآخرون (22) تحديد مورثات الكيتيناز والغلوكاناز والبروتينات المثبطة الريبوزومية RIP المضادة للفطور في الحمص ودورها في تعزيز مقاومة النبات إزاء لفحة الأسكوكيتا المتسببة عن الفطر *Ascochyta rabiei* ضمن ظروف متحكم بها.

استخدم مستخلص البروتين الخام من نباتات التبغ والبازلاء المعدلة وراثياً في دراسة التأثير المضاد للفطور للمورثة Chit30على الفطر *Trichoderma harzianum* حيث استطاع الأنزيم تثبيط نمو ميسليوم الفطر في الأطباق. وقد أمكن ملاحظة التأثير المضاد خلال 8 و 16 ساعة من المعاملة، في حين اعتبر أنه في معظم الحالات يمكن دراسة التأثير بعد 24–30 ساعة (13).

استخدمت طريقة النسخ العكسي reverse transcription في دراسة تباين تعبير المورثة كيتيناز للتمييز بين أنماط من الحمص مقاومة للفحة الأسكوكيتا وأخرى حساسة (1).

أشارت العديد من الدراسات إلى إدخال المورثة كيتيناز في العديد من الأنواع النباتية لتعزيز مقاومتها للفطور، فقد تم الحصول على نباتات كريزانتيم مقاومة للعفن الرمادي (25)، وتعزيز المقاومة للفطور عند العنب (28)، والخيار (15)، والبرتقال ثلاثي الأوراق (19)، وذلك بإدخال مورثة الكيتيناز RCC2 التي مصدرها الرز. كما تم تطوير نباتات رز مقاومة للفطر *Rhizoctonia solani* بوساطة مورثة الكيتيناز RC7 (9). عزلت المورثة الكيتيناز CTS1 من خميرة الخبز لتطوير نباتات تبغ مقاومة للفطور (6). كماتم تطوير نباتات فول صويا تحوي مورثة الكيتيناز chi من الفاصولياء مع مورثات البروتينات المثبطة الريبوزومية RIP من الشعير (17). كما استخدمت مورثة الكيتيناز *Ch11* من الرز لتطوير نباتات شعير مقاومة للفطور (26). أظهرت المورثة *Chit33* عند نقلها إلى نباتات كانولا canola نشاطاً مضاداً للفطر المسبب للعفن الأبيض *Sclerotinia sclerotiorum*، حيث انخفض حجم التقرحات بشكل معنوي عند المقارنة مع نباتات غير معدلة وراثياً وذلك في تجارب الورقة المفصولة (detached leaf).

أثبتت هذه الدراسة نجاح عملية نقل المورثة *Chit30* وتعبيرها واستقرارها في جينوم نباتات الحمص (النمط desi) على المستوى الجزيئي، وذلك باستخدام عدة طرائق مثل تفاعل الـ PCR والنسخ العكسي RT-PCR وتهجين الـ DNA، كما أظهرت الدراسة المخبرية دور المورثة كيتيناز في تثبيط نمو أبواغ فطر الفيوزاريوم على الحمص.

Abstract

Khatib, F., B. Al Askar, N. Al Skhny and M. Baum. 2017. Molecular and functional assessment of a *Chitinase* gene in chickpea. Arab Journal of Plant Protection, 35(3): 145-154.

To improve resistance of chickpea against a number of fungal diseases, a *chitinase* gene was introduced and tested for its antifungal activity. The present study confirmed the integration of the antifungal *chitinase* gene in chickpea plants using PCR with specific primers, gene expression using reverse transcription (RT–PCR) and the number of transferred DNA fragments through DNA hybridization. Conidial spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* were treated in transgenic plant extracts for functional assessment. Electrophoresis of PCR products confirmed the integration and stability of *chitinase* gene in chickpea progeny in subsequent generations. The *chitinase* gene was transcribed successfully into mRNA and no pre-transcription silencing was reported. Only one T-DNA copy was identified in the transgenic plants which enhanced the transgene expression and reduced the possibilities of gene silencing. *Chitinase* enzyme exhibited an antifungal effect through the inhibition of conidial spores germination and drastically reduced the number of *Fusarium* colonies on PDA medium.

Keywords: PCR, RT-PCR, DNA hybridization, *Fusarium* wilt

المراجع

References

5. **Birch, R.G.** 1997. Plant transformation: Problems and strategies for practical application. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 48: 297–326.
6. **Carstens, M., M.A. Vivier and I.S. Pretorius.** 2003. The Saccharomyces cerevisiae *chitinase*, encoded by the CTS1–2 gene, confers antifungal activity against *Botrytis cinerea* to transgenic tobacco. Transgenic Research, 12:497-508.
7. **Chen, G.Q. and J-T. Lin.** 2010. Use of Quantitative Polymerase Chain Reaction for Determining Copy Numbers of Transgenes in *Lesquerellafendleri*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 5: 415-421.
8. **Collinge, D.B., H.J.L. Jørgensen, O.S. Lund and M.F. Lyngkjær.** 2010. Engineering pathogen resistance in crop plants - current trends and future

1. **Albayrak G. and N. Gözükırmızı.** 2001. Assessment of differential expression of Chitinase genes using RT-PCR in chickpea. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 15: 90-92.
2. **Amalu, C.** 2004. Plant biotechnology and food crop development in Sub-Saharan Africa. Technology in Society, 26: 537-550.
3. **Arumuganathan, K. and E.D. Earle.** 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. Plant Molecular Biology Reporter, 9: 208-218.
4. **Azhaguvel, P., D. Vidya, A. Sharma and R.K. Varshney.** 2006. Methodological advancement in molecular markers to delimit the gene(s) for crop improvement. Pages 460-469. In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology. Advances and Topical Issues. J. Teixera da Silva (ed.) Global Science Books, London, UK.

prospects. Annual Review of Phytopathology, 48: 269-291.

9. **Datta, K., J. Tu, N. Oliva, I. Ona, R. Velazhahan, T.W. Mew, S.Muthukrishnan, S. K.Datta.** 2001. Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infection- related rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. Plant Science, 160: 405-414.
10. **Doyle, J.J. and J.L. Doyle**. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13–15.
11. **FAOSTAT.** 2014. http://faostat.fao.org/site/340/default.aspx
12. **Gold, R.** 2003. Exclusive rights in life: biotechnology, genetic manipulation, and intellectual property rights. In: Genetic Transformation of Plants. J. Jackson and H. Linskens (eds.) Springer. Germany, 23:2-6.
13. **Hassan, F.** 2006. Heterologous expression of a recombinant Chitinase from *Streptomyces alivaceoviridis* ATCC11238 in transgenic pea (*Pisum sativum* L.). PhD thesis. Wilhelm Leibniz Uneversität Hannover, Germany. 166 pp.
14. **Khatib, F.** 2008. Production of genetically modified legumes resistant to the herbicide phosphinothricin (PPT) by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. PhD thesis, Aleppo University, Syria, 158 pp.
15. **Kishimoto, K., Y. Nishizawa, Y. Tabei, T. Hibi, M. Nakajima and K. Akutsu.** 2002. Detailed analysis of rice *chitinase* gene expression in transgenic cucumber plants showing different levels of disease resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). Plant Science, 162: 655-662.
16. **Korth, K.L.** 2008. Genes and traits of interest for transgenic plants. Pages 193-206. In: Plant biotechnology and genetics: Principles, techniques, and applications. C.N. Stewart (ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, 416 pp.
17. **Li, H.Y., Y.M. Zhu, Q. Chen, R.L. Conner, X.D. Ding and B.B. Zhang.** 2004. Production of transgenic soybean plants with two anti-fungal protein genes via Agrobacterium and particle bombardment. Biologia Plantarum, 48: 367-374.
18. **Makandar, R., J.S. Essig, M.A. Schapaugh, H.N. Trick and J. Shah.** 2006. Genetically engineered resistance to *Fusarium* head blight in wheat by expression of *Arabidopsis NPR1*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 19: 123-129.
19. **Mitani, N, S. Kobayashi, Y. Nishizawa, T. Kuniga and R. Matsumoto**. 2006. Transformation of trifoliate orange with rice chitinase gene and the use of the transformed plant as a rootstock. SciHortic. 108: 439-441.
20. **Sarwar, N., K.P. Akhtar, T.M. Shah and B.M. Atta.** 2012. Evaluation of chickpea advance genotypes against blight and wilt diseases under field conditions. International Journal of Agriculture & Biology, 14: 993-996.
21. **Shah, T.M., M. Imran, B.M. Atta, M. Shafiq, M. Aslam and K.H. Hussain.** 2015. Screening of chickpea advanced lines for sources of resistance against blight and wilt two major diseases of chickpea. Pakistan Journal of Botany, 47: 2443-2448.
22. **Shahid, A.A., B. Chaudhry, M. Rahman and S. Riazuddin.** 2009. Detection of anti-fungal genes in chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their effects on fungal growth. Emirates Journal of Food and Agriculture, 21: 34-41.
23. **Southern, E.M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology, 98: 503-517.
24. **Stam, M., J.N.M. Mol and J.M. Kooter**. 1997. The silence of genes in transgenic plants. Annals of Botany, 79: 3-12.
25. **Takatsu, Y., Y. Nishizawa, T. Hibi and K. Akutsu.** 1999. Transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) expressing a rice chitinase gene shows enhanced resistance to gray mold (*Botrytis cinerea*). SciHortic, 82: 13-123.
26. **Tobias, D.J., M. Manoharan, C. Pritsch and L.S. Dahleen.** 2007. Co-bombardment, integration and expression of rice chitinase and thaumatin-like protein genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Conlon). Plant Cell Report, 26: 631-639.
27. **Wani, S.H.** 2010. Inducing fungus-resistance into plants through biotechnology. Notulae Scientia Biologicae, 2: 14-21.
28. **Yamamoto, T., H. Iketani, H. Ieki, Y. Nishizawa, K. Notsuka, T. Hibi, T. Hayashi and N. Matsuta.** 2000. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. Plant Cell Report, 19: 639-646.
29. **Yang, C.Y., Y.C. Hoa, J.C. Panga, S.S. Huang and J.S.M. Tschen.** 2009. Cloning and expression of an antifungal chitinase gene of a novel Bacillus subtilis isolate from Taiwan potato field. Bioresource Technology, 100: 1454-1458.

Received: February 13, 2017; Accepted: October 4, 2017

تاريخ الاستلام: 2017/2/13؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2017/10/4