مطالعه نقش المنتهای *cis*-acting در پروموترهای القاء شونده در برابر پاتوژنهای مختلف

فرهاد شکوهی فر[۱و۲]، محمدرضا زمانی[۱]، مصطفی مطلبی[۱]، امیر موسوی[۱]، محمدعلی ملبوبی[۱] و زهرا مقدسی جهرمی[۱]

[۱] *پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری*

[۲] *دانشگاه فردوسی مشهد*

کنترل دقیق بیان ژن توسط پروموتر نقش مهمی در پیشبرد برنامه های اصلاحی تولید ارقام مقاوم ایفا می کند. یک پروموتر مناسب برای بیان ژن مقاومت باید دارای ویژگی‌هائی باشد که از آن جمله می‌توان به عملکرد در زمان و به میزان مناسب، در پاسخ به طیف وسیعی از بیمارگرها اشاره کرد. ساخت پروموترهای مصنوعی بعنوان یک استراتژی بسیار انعطاف پذیر برای بیان تراژن مورد توجه می باشد. پروموترهای مصنوعی با اتصال المنت های cis-acting به یک توالی minimal promoter ساخته می شوند. در این مطالعه بمنظور ساخت پروموترهای القاء شونده توسط پاتوژنها سه المنت cis-acting شامل المنت های F، E17 و D باکس بعنوان المنتهای بالقوه القاء شونده توسط پاتوژنها انتخاب شدند. توالیهای دو نسخه ای و ترکیبی از المنت های انتخاب شده در بالادست توالی minimal promoter کلون گردید و سازه های مورد نظر ساخته شدند که پروموتر های SP-FF، SP-EE، SP-FFDD، SP-FFEE و SP-DDEE را در برداشتند. بمنظور بررسی عملکرد پروموترها ابتدا پتانسیل تکنیک agroinjection برای آنالیز بیان پروموترها در گیاه کلزا مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایشات بیان ژن GUS در گیاهان کلزا، توتون و لوبیا مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج agroinjection نشان داد که در برگ توتون و بافت غلاف لوبیا بیان ژن GUS قابل مشاهده می باشد. با استفاده از تکنیک particle delivery system نیز نشان داده شد که به بیان ژن GUS در برگ کلزا امکان پذیرمی باشد. نتایج هیستوشیمیائی مربوط به این پروموترها نشان داد که پروموترهای مورد استفاده در پاسخ به آلودگی مستقیم با قارچهای *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizoctonia solani* و *Fusarium graminearum* سطح بیان و القاء پذیری متفاوتی نشان دادند. در این مطالعه عملکرد پروموترها در پاسخ به تیمارهای کیتین، سالیسیلیک اسید و متیل جاسمونات نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده در این مطالعه مورد بحث و بررسی قرار می گیرد.

کلمات کلیدی: المنتهای Cis-acting، پروموترهای القاءشونده توسط پاتوژن ها، کلزا، ژن گزارشگر GUS، آلودگی قارچی

Study of the *cis*-acting elements in pathogen inducible promoters in response to phytopathogenes

Shokouhifar F. [a,b], Zamani MR. [a*], Motallebi M. [a.], Mousavi A.[a], Malboobi MA. and Moghadasi-Jahromi Z.[a]

[a]*National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Iran*

[b] *Ferdowsi University of Mashhad, Iran*

Defined gene expression using promoter plays a critical role in progress of a plant breeding program to produce a pathogen resistant variety. An ideal promoter should rapidly and strongly direct expression of resistance gene in interaction with wide range of plant pathogens. Synthetic promoter has been considered as a very flexible strategy for expressing the transgenes. The synthetic promoters were constructed using combining of some cis-acting elements with a minimal promoter sequence. In this study, to construct the pathogen-inducible promoters, three cis-acting elements, as the putative pathogen-inducible elements, were selected, and their functions were investigated in response to a general elicitor, two defense phytohormones, fungal pathogen elicitors and environmental factors. The synthetic promoter approach was used in this study to construct the dimerized and combined cis-acting elements upstream of minimal CaMV 35S promoter. The created constructs contain SP-FF, SP-EE, SP-FFDD, SP-FFEE and SP-DDEE promoters. The ability of agroinjection technique for transient gene expression analysis in canola has been evaluated using created vectors. Using this thacnique expression of GUS in canola, tobacco and bean have been compared. The axpression ability of the constructed vectors in canola leaves have been shown using particle delivery system. The transient expression results revealed that the constructs are able to direct GUS expression in the leaves of canola and bean. The histochemical assay experiment on stably transformed canola revealed that the responssivness of the promoters in reaction to infection of *Sclerotinia sclerotiorum, Rhizoctonia solani* and *Fusarium graminearum* pathogens are different. Fluorometric experiments showed that the cell wall released material of the fungus are able to induce the promoters.

Keywords: Cis-acting element, Synthetic pathogen-inducible promoter, Canola, Elicitor, GUS repoter gene, Fungal infection