مطالعه بیان ژن کلروپلاستی *psbA* در واکنش به حمله عامل بیماری آتشک در ارقام حساس و متحمل به بیماری گلابی

ندا سمیعی فراهانی[۱]، حمید عبداللهی[۲]، علیرضا سلامی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی-دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ، کرج

[۲] دانشیار پژوهشکده میوه های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج ، ایران

[۳] استادیار گروه علوم باغبانی ، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی دانشگاه تهران ، کرج

چکیده

آتشک از مخرب‌ترین بیماری‌های گلابی در جهان می‌باشد. استفاده از ارقام و پایه‌های مقاوم یکی از موثرترین روش‌های مبارزه با این بیماری است. در این تحقیق از دو رقم حساس بارتلت (Barttlet) و رقم متحمل هاروسوئیت (Harrow Sweet) برای بررسی تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در روی محیط کشت QL تغییر یافته در شرایط درون شیشه (*In vitro*) استفاده شد. مواد گیاهی پس از تکثیر از جدایه باکتری Ea273 به عنوان باکتری استاندارد بیماری‌زایی مایه‌زنی شدند. آغازگرها به کمک اطلاعات موجود در بانک‌های اطلاعاتی طراحی شدند. در این روش همه داده‌ها با ژن خانه‌دار rbcL به عنوان کنترل داخلی نرمال شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در نمونه‌های مورد بررسی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. همچنین الگوی بیان ژن کلروپلاستی *psbA* را در فواصل زمانی صفر، ۲۴ و ۴۸ پس از حمله پاتوژن با Real Time qPCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داده که بیان ژن *psbA* در رقم متحمل هاروسوئیت دارای ثبات بیشتری نسبت به رقم حساس بارتلت بوده است.این افزایش چشمگیر بیانگر نقش کلیدی و همچنین تایید کننده گزارشات قبلی در رابطه با نقش کلروپلاست در ایجاد تحمل به بیماری می‌باشد.

کلمات کلیدی: آتشک، گلابی، تظاهرژن، کلروپلاست، In vitro

مقدمه

آتشک (Fire blight) از مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه‌دار است. این بیماری فاقد یک روش مبارزه قطعی بوده و استفاده از ارقام مقاوم و متحمل اقتصادی‌ترین و موثرترین روش مبارزه می‌باشد (van der Zwet and Keil., 1979). به دلیل پیچیدگی روابط گیاه با عوامل بیماری‌زا، شناخت ساختارهای ژنتیکی مقاومت گیاه در مقابل این عوامل از جمله ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی از اهمیت بالایی برخوردار است. لذا تحقیقات زیادی بر روی تاثیر متقابل عامل بیماری آتشک با میزبانش انجام شده است که در تحقیقاتی بررسی نقش ارگانل‌ها در این اثر متقابل (Abdollahi and Ghahremani, 2011)، بررسی تظاهر ژن‌ها (Abdollahi, 2003؛ Hassani et al., 2013) و تحریک سیستم دفاع اکتسابی میزبان (Shahini Sogh et al., 2010؛ Erfani Nia et al., 2013) بررسی شده است.

در تحقیقی روی تظاهر ژن‌های کلروپلاست، میتوکندری و هسته مشاهده شد که تغییر الگوی تظاهر ژن‌های کلروپلاستی در اثر متقابل میزبان-پاتوژن سریع‌تر از تغییر الگوی ژن‌های میتوکندری اتفاق می‌افتد. در این تحقیق احتمال عبور HrpW به عنوان یکی از پروتئین‌های موثره باکتری از غشاء کلروپلاست سلول‌های میزبان مورد بحث قرار گرفت (Abdollahi, 2003). عرفانی‌نیا و همکاران (۱۳۹۲) بر روی تاثیر بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با ارقام حساس و متحمل سیب و گلابی تحقیقی انجام دادند. داده‌های آن‌ها نشان داد که بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست سبب تاخیر در بروز علائم بیماری در اقام مذکور شدند. این نتایج ضمن تاکید نتایج قبلی حاصل از

IrHC2019

بازدارندگی این زنجیره با اوراسیل، بیانگر شواهد محکم‌تری مبنی بر نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در این اثر متقابل بود. هدف کلی این پژوهش بررسی تظاهر ژن کلروپلاستی psbA در اثر متقابل بیمارگر- میزبان در بیماری آتشک گلابی بود.

موادوروش‌ها

دو رقم حساس بارتلت (Barttlet) از کشور انگلیس و رقم متحمل هاروسیت (Harrow Sweet) از کشور کانادا در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفتند. این ارقام روی محیط کشت QL تغییر یافته همراه با ویتامین‌های محیط کشت MS، ۳۰ گرم بر لیتر سوکروز، ۰/۳ گرم بر لیتر پکتین مرکبات، ۱ میلی‌گرم بر لیتر BAP و ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA پرآوری شدند. مواد گیاهی درون شیشه، در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور ایجاد شده با استفاده از لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴ میکرومول بر ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۲۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. همچنین به منظور بررسی تظاهر ژن از جدایه¬باکتری عامل،شامل جدایه آمریکائی Ea273 به عنوان باکتری استاندارد بیماری‌زایی استفاده شد. به این منظور کشت-های شب گذران باکتری که در محیط عمومی LB در انکوباتور شیکردار به مدت یک شبانه روز رشد کرده بود به کار برده شد. جهت بررسی صحت استخراج RNAی کل از روش مشابه کنترل کیفیت در مورد DNAی ژنومی استخراجی بهره گرفته شد و نتایج حاصل از حرکت دادن RNAهای استخراج شده با استفاده از روش الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸٪ در بافر TBEIX و سپس رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، تحت نور فرابنفش مشاهده گردید. آغازگرها به کمک اطلاعات موجود در بانک های اطلاعاتی طراحی شدند. دو آغازگر مستقیم و معکوس برای ژنpsba بر اساس پارامترهای مناسب برای Real-Time PCR طراحی شدند. آغازگر به گونه ای طراحی شدند که قطعات کوچک تر از ۲۰۰ جفت باز را از نواحی منحصر به فرد ژن تکثیر کنند. برای طراحی این آغازگر از نرم افزار Reverse complement و Primer3 Plus استفاده شد و پارامترهای فیزیکی آغازگر توسط نرم افزار Oligo Calculator تایید شد. با کمک نرم افزار Primer3 Plus دو آغازگر مستقیم و معکوس طراحی شد. توالی آغازگر مستقیم و معکوس ژن خانه دار rbcl-rt-F، CTACTGGTACATGGACAACTGوrbcl-rt-R، AATTGATTTTCTTCTCCAGCAACG می باشد. واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript cDNA synthesis شرکت BIO-RAD مطابق دستوراالعمل کیت تجاری به شرح زیر صورت گرفت :

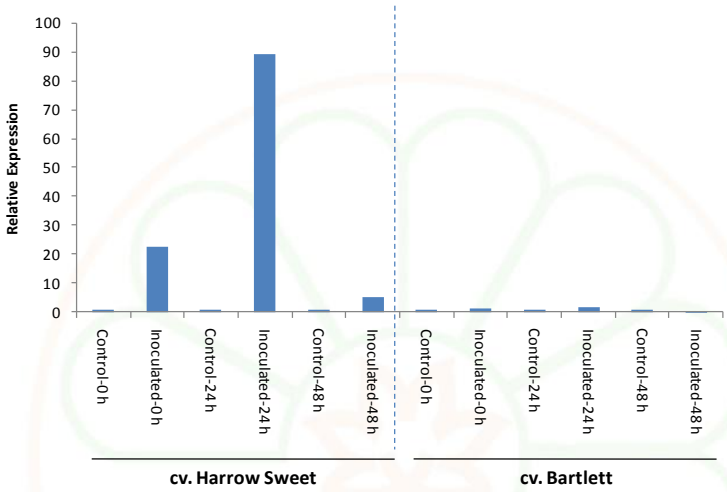
ابتدا با توجه به تعداد واکنش های مورد نظر محلول مادری تهیه گردید. سپس محلول مادری به میزان ۹ میکرولیتر در میکروتیوب های ۰/۲تقسیم شد و بعد از آن RNA تیمارهای مورد نظر جداگانه به هر واکنش اضافه گردید. به منظور ساخت رشته cDNA نمونه ها در دستگاه ترمال سایکلر قرار گرفتند . انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه ساخت cDNA در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه و غیر فعال سازی آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.cDNA به دست آمده ۱۰ برابر رقیق و کاملا مخلوط شد (برای ۱۰ برابر رقیق کردن کل cDNA ساخته شده با حجم ۲۰ میکرولیتر ، ۱۸۰ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز به آن اضافه شد تا نسبت ۱:۱۰ به دست آمد) برای اطمینان از ساخت cDNA با استفاده از آغازگر های ژن مرجع 18S rRNA بر روی همه cDNA های ساخته شده PCR انجام شد. مخلوط واکنش همانند قبل تهیه گردید وجود باند تقریبا ۲۰۰ جفت بازی بر روی ژل آگاروز پس از دیده شدن در زیر دستگاه ژل داک ، ساخت cDNA را تایید کرد. واکنشReal-Time PCR با استفاده از کیت Solis biodyne انجام گرفت و نیز به منظور افزایش اختصاصیت از آنالیز منحنی ذوب نیز استفاده شد. به منظور اجتناب از بروز هرگونه اختلاف در تهیه واکنش بین تیمارهای مختلف ، همواره محلول مادری با حجم متناسب با تعداد واکنش ها تهیه گردید و پس از اضافه شدن در چاهک های Real-Time PCRبه همراه cDNAو آغازگرها ، روی پلیت با چسب شفاف مخصوص پوشانده می شود. پس از آن پلیت سانتریفیوژ گردید و در دستگاه Real-Time PCRقرار گرفت. کنترل منفی (چاهک بدون cDNA) نیز اجرا شد . در نهایت میزان بیان ژنها با روش محاسبه گردید . در این روش همه داده ها با ژن خانه دار rbcL به عنوان کنترل داخلی نرمال شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در نمونه های مورد بررسی ، مورد تجزیه وCT△△ تحلیل قرار گرفت. در این مطالعه، ژن کلروپلاستی psbA به عنوان یک ژن تحت کنترل ردوکس یا وضعیت اکسیداسیون و احیاء سلولی را را در دو رقم هاروسوئیت و بارتلت پس از آلوده شدن با پاتوژن E.amylovora برای اثبات نقش این دو انزیم در پاسخ های دفاعی گیاه مورد بررسی قرار

IrHC2019

گرفت. الگوی بیان ژن کلروپلاستیpsbA را در فواصل زمانی ۰، ۲۴ و ۴۸ پس از حمله پاتوژن با Real Time qPCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج وبحث

نتایج بدست آمده نشان داده که بیان ژن *psbA* در رقم متحمل هاروسوئیت و حساس بارتلت در شرایط عدم حضور عامل بیماری آتشک از ثبات بالائی برخوردار بوده و طی مدت ۴۸ ساعت از بررسی، تغییر چندانی در الگوی تظاهر این ژن مشاهده نشد. بر خلاف این مورد در شرایط حضور عامل بیماری آتشک در میزبان، تظاهر ژن *psbA* در رقم بارتلت به طور چندانی تحت تاثیر بیماری واقع نشد، در صورتی که تظاهر این ژن تا مدت ۲۴ ساعت از آلودگی در رقم متحمل هاروسوئیت افزایش و پس از این مرحله کاهش نسبی داشت (شکل ۱). این نتایج با بررسی قبلی انجام گرفته در رابطه با نقش احتمالی کلروپلاست ها در دفاع از تنش های زنده، به ویژه بیماری آتشک در گلابی منطبق است (Erfani Nia et al., 2013).



شکل ۱-الگوی تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در واکنش به حمله عامل بیماری آتشک *Erwinia amylovora* در رقم حساس بارتلت و متحمل به بیماری هاروسوئیت طی مدت ۴۸ ساعت بعد از آلوده سازی گیاهچه های درون شیشه با عامل بیماری. اعداد صفر (شاهد)، ۲۴ و ۴۸ بیانگر تعداد ساعت بعد از آلوده سازی شاخه‌چه ها می‌باشند.

منابع

عرفانی‌نیا، ک. عبداللهی، ح. و خسروشاهلی، م. ۱۳۹۲. تأثیر بازدارنده‌های مختلف زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل *Erwinia amylovora* با ارقام حساس و متحمل سیب و گلابی. بیماری‌های گیاهی ۴۹: ۲۰۱-۲۱۴.

Abdollahi, H. 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. Ph.D, Thesis, University of Florence, Italy. 200pp.

Abdollahi, H. and Ghahremani, Z. 2011. The role of chloroplasts in interaction of *Erwinia amylovora* with host plants. Acta Horticulturae 896: 215-221.

Erfani Nia, K., Hassani, M., Hamzaban, L. and Abdollahi, H. 2013. Mechanism of different salicylic acid effects on fire blight control of apple and pear. Proceedings of the 13th ISHS International Workshop on Fire Blight, Zurich, Switzerland. Page 67 (Abstract).

Hassani, M., Salami, A.R., Hamzaban, L. and Abdollahi, H. 2013.expression of some pr genes of apples in responses to attack of *Erwinia amylovora*. *13th International Fire Blight Workshop 2-5 July 2013, Zürich, Switzerland.*

Shahini Sogh, F., Kheshavarzi, M., Hasanzade, N., Hashemi, M., Abdollahi, H. and Tavousi, M. 2010.*In vitro* evaluation of acibenzolar-s-methyl on inhibition of fire blight in apple cv. Golden delicious. Iranian Journal of Plant Pathology. 49: 267-278.

van der Zwet, T. and Keil, H. L. 1979. Fire Blight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department of Agriculture, Agricultural Handbook Number 510, Washington D. C., USA. 650pp.

Wang J, Fan Zh, Liu Zh, Xiang J, Chai L, Li X, Yang Y. 2011. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase increases resistance to salt stress and drought in Brassica napus. African Journal of Biotechnology, Vol. 10(41), pp. 8039-8045.

IrHC2019

Expression of Chloroplastic *psbA* Gene in Susceptible and Tolerant Pear Cultivars in Response to Invasion of Fire Blight Agent and Inhibitors of Electron Chains of the Chloroplasts and Mitochondria

Abstract

Fire blight, the most important disease of pear tree causes necrosis by an oxidative stress in tissues. Therefore identification of resistant cultivars and mechanisms of resistance to the oxidative stress of disease that are mainly related to the chloroplasts are important in breeding programs of this tree. In order to study the role of chloroplasts in this interaction, expression of chloroplastic gene psbA that are under control of oxidation/reduction (redox), was evaluated in susceptible (Williams) and resistant (Harrow Sweet) cultivars during 48 h post inoculation by *Erwinia amylovora* in *in vitro* condition. In addition, expression of this gene was studied at presence of glutaraldehyde and rotenone as the inhibitors of the electron transport chain of chloroplast and mitochondria, respectively. The results showed higher necrosis progress rate in the in vitro shootlets of susceptible cultivar. Expression of *psbA* gene at presence of inhibitors in both presence and absence of *E. amylovora* was higher in cultivars Harrow Sweet. According to the results, the higher resistance level of cultivars Harrow Sweet to the disease could be due to the higher rapid responses and reaction of the chloroplasts of this cultivar in comparison to the cultivar Williams.

Key word: *Erwinia amylovora*, D1 protein, Electron transport chain, Oxidative stress**.**

11th IrHC 2019
IrHC2019