ارائه روشی مناسب برای استخراج RNA و بررسی بیان ژن Ricin B, lectin در ارقام حساس و نسبتا مقاوم خرما به کنه تارتن

زهرا حق خواه[۱]، موسی موسوی*[۱]، پرویز شیشه بر[۲]
[۱] گروه علوم باغبانی دانشکده کشارزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
[۲] گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشارزی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
*نویسنده مسئول: m.mousavi@scu.ac.ir

چکیده

به منظور ارائه روشی مناسب جهت استخراج RNA کل از پوست میوه خرما در اواخر مرحله کیمری، دو پروتکل آزمایشگاهی تغییر یافته (کوئینزار و MRIP) و یک کیت استخراج RNA مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین پس از سنتز cDNA، میزان بیان ژن Ricin B, lectin (از خانواده ژنی لکتین های دخیل در مکانیسم دفاعی گیاهان با دمین حفاظت شده) به روش qRT-PCR در دو رقم نخل خرمای نسبتا مقاوم (استعمران و حلاوی) و دو رقم حساس (برحی و لیلوی) مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که روش MRIP مناسب برای استخراج RNA کل از بافت میوه خرما تشخیص داده شد، بطوری که RNA استخراج شده دارای غلظت و کیفیت خوبی نسبت به دو روش دیگر بوده و از آن cDNA به خوبی سنتز شد. همچنین بررسی آماری میزان بیان ژن لکتین در چهار رقم مورد آزمایش نشان داد که بیان این ژن در هر چهار رقم مورد مطالعه دارای الگوی متفاوتی بوده به‌طوری که رقم استعمران دارای حداکثر بیان نسبی بوده (۱۰۰درصد نسبت به بقیه ارقام) و بعد از آن لیلوی با ۴۴/۴ درصد، برحی با ۵/۵۵ درصد و کمترین میزان بیان ژن لکتین برای رقم حلاوی با ۱/۲۳ درصد مشاهده گردید. لذا بر اساس نتایج بدست آمده نمی توان بطور قطعی مقاومت و یا حساسیت ارقام نخل خرما به کنه تارتن را به این ژن لکتین نسبت داد.

کلمات کلیدی: خرما، کنه تارتن، لکتین، بیان ژن، RNA

مقدمه

نخل خرما با نام علمی *Phoenix dactylifera* L. گیاهی تک لپه از خانواده اریکاسه می‌باشد. این گیاه دارای ۳۶ کروموزوم (۲x=۲n=۳۶) بوده که ژنوم آن به اندازه ۶۴۵-۵۵۰ Mb تخمین زده شده است (Malek, 2010; Al-Dous, 2011). در ایران وجود ۴۰۰ رقم خرما گزارش شده است که غالبا دارای صفات ژنتیکی و مورفولوژیکی متفاوتی می‌باشند. حدود ۵۰ رقم آن ارزش صادرات به بازارهای خارجی را دارند (پژمان، ۱۳۸۶). یکی از آفات مهم خرما در ایران و به ویژه استان خوزستان کنه ی تارتن خرما *Oligonychus afrasiaticus* McGregor می‌باشد، که از میوه های خرما در اواخر مرحله کیمری و مرحله خلال تغذیه می‌کند و در اثر تغذیه شدید، خوشه ها کاملا چروکیده، خشک و غیر قابل مصرف می‌شوند. خوشه های آلوده به علت وجود تارهای تنیده شده توسط کنه، منظره‌ای غبار آلود به خود می‌گیرند و بازار پسندی آن به شدت کاهش می‌یابد (کجباف والا، ۱۳۷۰). در حال حاضر استفاده از سمومی مانند تدیون و اکتیلیک، متداول‌ترین روش کنترل این آفت در استان خوزستان به شمار می‌رود. انجام سمپاشی‌های مکرر علاوه بر خطرات زیست محیطی گوناگون و خطر باقی ماندن بقایای سموم روی میوه‌ی خرما، باعث از بین رفتن دشمنان طبیعی این آفت و در پی آن افزایش روز افزون جمعیت آفت می‌شود. در برابر هجوم تنش های زنده و غیرزنده، گیاهان استراتژی های مختلف را توسعه داده اند که شامل بسیاری از موانع از پیش ساخته مانند کوتیکول اپیدرم واکسی، دیواره سلولی و پوست (ساختارهای مورفولوژیکی ویژه)، پروتئین ها، مواد شیمیایی سمی، آنزیم ها، هورمون ها و ... می باشند. لکتین‌ها، پروتئین‌های گیاهی هستند که در دفاع عمومی گیاه در برابر چندین مهاجم مانند پاتوژن های گیاهی، نماتدها و یا آفات نقش دارند. بسیاری از لکتین‌های گیاهی به وفور در بذور یا بخش‌های مختلف رویشی، ذخیره‌ای و یا پوست یافت می‌شوند (Vandenborr *et al*. 2011; Dam *et al*. 1998). در دهه‌های اخیر، ثابت شده که برخی

IrHC2019

لکتین‌های گیاهی در نتیجه تنش‌های زنده و غیرزنده محیطی مانند حشره‌های گیاه‌خوار، زخم‌ها، تنش خشکی، سرما و یا غلظت بالای نمک تولید می‌شوند (Vandenborr *et al*. 2011). همچنین لکتین ها بر روی چندین پارامتر زندگی حشرات مانند وزن لارو، باروری، جمعیت و زنده ماندن آنها تاثیر دارند (Macedo *et al*. 2014). هدف از این پژوهش، علاوه بر ارائه روش مناسب برای استخراج RNA از پوست میوه خرما، شامل تعیین میزان بیان ژن لکتین در دو رقم نسبتا مقاوم (استعمران و حلاوی) و دو رقم حساس (برحی و لیلوی) نخل خرما به کنه تارتن به روش qRT-PCR می باشد.

مواد و روش‌ها

استخراج RNA

برای استخراج RNA کل از بافت مربوط به پوست میوه، سه روش مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش اول: استخراج RNA با استفاده از پروتکل تعدیل شده Quenzar و همکاران (1998): در این روش بافر استخراج استفاده شده مشابه پروتوکل اصلی بوده، تنها تفاوت آن در عدم استفاده از β-mercaptoethanol بود. این بافر شامل: ۵۰ میلی مول Tris-HCl با pH برابر با ۸، ۳۰۰ میلی مول مانیتول، ۳ میلی مول EDTA با pH برابر با ۸، ۱٪ (w/v) پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ و ۰/۱ ٪ BSA بود. همچنین در این روش از شن شسته شده با اسید به جای نیتروژن مایع استفاده گردید و برای حذف DNA از آنزیم DNase I استفاده شد. سایر مراحل آزمایش مشابه پروتکل گزارش شده انجام گردید.

روش دوم: استخراج RNA با کیت RNX-Plus

روش سوم: استخراج RNA با ترایزول بر اساس پروتکل MRIP (Xiao *et al*. 2012): در روش MRIP برای تهیه بافر استخراج، ۳/۰۵ گرم آمونیوم تیوسیونات، ۹/۴۴ گرم گوآنیدین تیوسیونات و ۳/۳۳ میلی لیتر استات سدیم ۳ مولار (pH=۵/۲) را درون بشر ریخته و pH را به ۵ رسانده و با آب دیپس به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. برای استخراج ۸۰ میلی‌گرم بافت پوست میوه‌ی خرما به‌وسیله نیتروژن مایع و با استفاده از هاون چینی (استریل شده به مدت یک ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سانتی گراد) به خوبی پودر گردید و درون میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری ریخته شد. یک میلی‌لیتر بافر استخراج به آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. به اندازه یک پنجم حجم آن، کلروفرم اضافه گردید. به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس شد و به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت. محلول رویی به میکروتیوپ استریل عاری از RNase منتقل شد و به اندازه‌ی هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه شد. ابتدا برای چند ثانیه با وارونه کردن تیوب، هم زده شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار گرفت. پس از آن، به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سوپرناتانت را حذف کرده و به پیلت موجود در ته میکروتیوپ یک میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۲۰۰۰ دور در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. اتانول را حذف و این مرحله دو بار تکرار شد. پیلت به مدت دو دقیقه زیر هود استریل قرار گرفت تا خشک شود و اتانول آن خارج شود. در نهایت پیلت در ۲۰ تا ۳۰ میکرولیتر آب RNase free حل شد و پس از پایپت کردن به مدت یک دقیقه، در فریزر ۸۰- نگهداری شد.

بررسی کیفیت RNA و سنتز cDNA

برای تعیین غلظت و کیفیت RNA استخراج شده علاوه بر غلظت سنجی با دستگاه اسپکت مدل eppendorf BioPhotometer plus ، از ژل آگارز یک درصد نیز استفاده شد. شرایط الکتروفورز شامل ولتاژ به میزان ۸۰ ولت در شدت جریان ۱۴۷ میلی آمپر و به مدت ۶۰-۴۰ دقیقه بود. برای سنتز cDNA از کیت (Thermo Science) استفاده گردید.

- بررسی بیان ژن Ricin B, lectin domain

پس از مطالعه بیوانفورماتیکی CDS های خانواده ژنی لکتین، ژن Ricin B, lectin domain با توجه به عملکرد مولکولی، سلولی و بیولوژیکی انتخاب و پرایمر اختصاصی برای این ژن بر اساس توالی حاصل از بلاست ژنوم نخل خرمای رقم خلاص

IrHC2019

موجود در پایگاه NCBI طراحی گردید. برای طراحی پرایمرها از پایگاه NCBI استفاده گردید. جهت ارزیابی پرایمرهای طراحی شده از لحاظ عدم تشکیل سنجاق سر، همودایمر و هترودایمر و همچنین مناسب بودن ΔG از نرم افزار اولیگو آنالایزر موجود در پایگاه IDT استفاده گردید. پرایمر رفت اختصاصی ژن شامل GACTATCAGCACTGGATCAAAGA و پایمر برگشت شامل CACAGAACCGACTCATCAAGATA بود. ژن مرجع مورد استفاده در این آزمایش شامل ژن 18S می باشد که پرایمرها آن بر اساس کارهای Patankar و همکاران ۲۰۱۶ طراحی گردید. توالی پرایمر رفت مرجع شامل CGAACCACTGCGAAAGCAT و توالی پرایمر برگشت ژن مرجع شامل CCCCCAACTTTCGTTCTTGA بودند. پرایمرها توسط شرکت metabion سنتز شدند.

میزان بیان ژن Ricin B, lectin domain در بین چهار رقم خرما با استفاده از روش سایبر و بوسیله دستگاه Real Time مدل Step One Plus تعیین گردید. مخلوط نهایی واکنش به حجم ۲۰ میکرولیتر بوده و شامل ۱۰ میکرو لیتر مستر سایبر، ۲ میکرو لیتر پرایمرها، ۴ میکرولیتر cDNA و ۴ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل عاری از RNase می باشد. سیکل های دمایی شامل یک سیکل با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و ۴۰ سیکل متناوب، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۵۸ درجه ساتی گراد به مدت یک دقیقه می باشند. آنالیز آماری میزان بیان ژن بر اساس داده های حاصل از Real time (ΔCt) و با استفاده از طرح کاملا تصادفی ساده با سه تکرار صورت گرفت.

نتایج و بحث

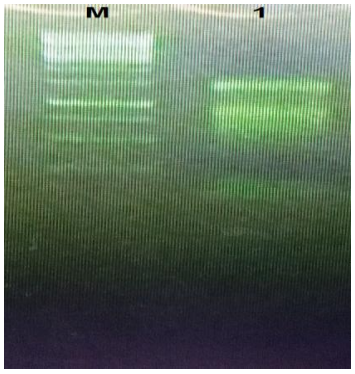
بر اساس نتایج بدست آمده، RNA به خوبی با روش کوئینزار و همکاران استخراج گردید. مزیت های این روش عدم نیاز به نیتروژن مایع و سانتریفیوژ یخچال دار می باشد همچنین cDNA بخوبی با استفاده از این RNA سنتز گردید. با وجود این، بدلیل طولانی و حساس بودن مراحل انجام، استفاده از این روش پیشنهاد نمی گردد. همچنین نتایج نشان داد که کیت RNX-Plus مناسب استخراج RNA از بافت های خرما نیست بطوری که پس از استخراج و انجام الکتروفورز، هیچ اثری از RNA بر روی ژل آگارز مشاهده نشد. روش MRIP مناسب استخراج RNA از بافت های خرما تشخیص داده شد بطوری که بخوبی از آن cDNA سنتز گردید (شکل ۱).

بیان ژن Ricin B, lectin domain در ارقام حساس و مقاوم خرما به کنه

نتایج حاصل از qRT-PCR با پرایمر اختصاصی این ژن نشان داد که این ژن در هر چهار رقم مورد مطالعه دارای فعالیت می باشد اما هر کدام از ارقام الگوی بیان متفاوتی داشتند. به‌طوری که رقم استعمران دارای حداکثر بیان ژن لکتین بوده (۱۰۰درصد نسبت به بقیه ارقام) و بعد از آن لیلوی با ۴۴/۴ درصد ، برحی با ۵/۵۵ درصد و کمترین میزان بیان ژن لکتین برای رقم حلاوی با ۱/۲۳ درصد مشاهده گردید (جدول ۱ و شکل ۲). با توجه به نتایج، به دلیل نبود الگوی یکسانی از بیان این ژن در ارقام حساس و ارقام مقاوم خرما به کنه نمی‌توان این ژن را به‌عنوان یکی از دلایل اصلی مقاومت یا حساسیت ارقام خرما به کنه دانست. البته این موضوع نیاز به مطالعات بیشتری دارد. McCafferty و همکاران (2006)، نشان دادند که انتقال ژن لکتین به پاپایا از طریق کم کردن توانایی زاد و ولد کنه‌ها، باعث افزایش نسبی مقاومت آن به کنه شد. مطالعات آنها نشان داد کنه‌ها از برگ گیاهانی که ژن GNA[1] را بیان می‌کنند نسبت به نمونه شاهد، کمتر تغذیه می‌کنند. یکی از ویژگی‌های اصلی پروتئین‌های حشره کش، که دارای اهمیت می باشد، میزان مقاومت آنها نسبت به تجزیه در دستگاه گوارش حشرات است. عموما لکتین‌های گیاهی نسبت به آنزیم های هضم کننده حشرات مقاوم هستند (Macedo *et al*. 2014).

[1] Galanthus nivalis agglutinin

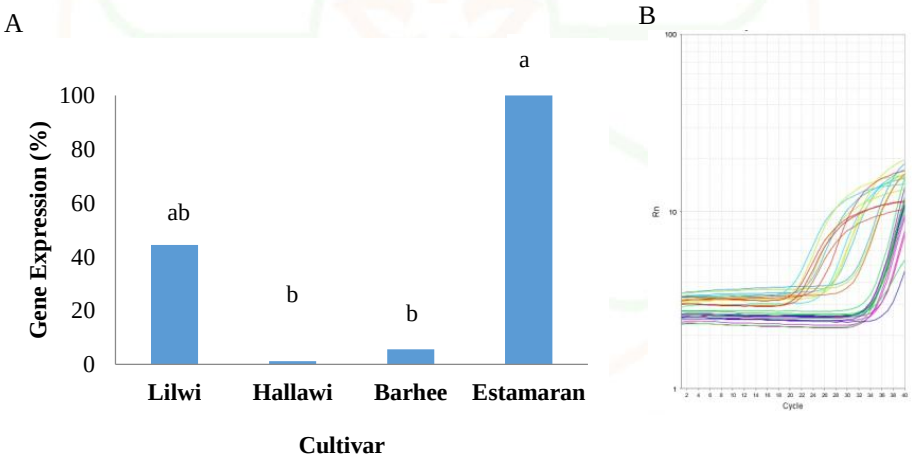
IrHC2019



شکل ۱: RNA استخراج شده به روش MRIP: M- سایز ماکر 1kb، 1- RNA از نمونه خرما.

جدول ۱:تجریه واریانس Δ Ct رونویسی ژن لکتین در پوست میوه خرما

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F	Pr > F
رقم	۳	۶۴/۵۸۹۱۶۶۶۷	۲۱/۵۲۹۷۲۲۲۲	۵/۱۰	۰/۰۲۹۰
خطا	۸	۳۳/۷۴۰۰۰۰۰	۴/۲۱۷۵۰۰۰۰		
Corrected Total	۱۱	۹۸/۳۲۹۱۶۶۶۷			



شکل ۲: A- درصد نسبی بیان ژن لکتین در پوست میوه نارس خرما B- الکوی تکثیر قطعات بر اساس پرایمر اختصاصی ژن لکتین در سیکل های دمایی Real Time PCR

منابع

پژمان، ح. ۱۳۸۶. راهنمای خرما: کاشت، داشت و برداشت. انتشارات نشر کشاورزی، کرج، صفحات ۲۸۶-۱.

کجباف والا، غ.، ۱۳۷۰. بررسی فونستیک کنه های Acari خرما در خوزستان و بیولوژی گونه های مهم پایان نامه کارشناسی ارشد حشره شناسی کشاورزی. دانشکده کشاورزی، دانشگاه چمران اهواز، ۱۶۶ صفحه.

Al-Dous, E.K., George, B., Al-Mahmoud, M.E., Al-Jaber, M.Y., Wang, H., Salameh, Y.M., Al-Azwani, E.K., Chaluvadi, S., Pontaroli, A.C., DeBarry, J. and Arondel, V. 2011. De novo genome sequencing and comparative genomics of date palm (*Phoenix dactylifera*). Nature Biotechnology, 29(6): 521-527.

IrHC2019

Dam, T.K., Cavada, B.S., Grangeiro, T.B., Santos, C.F., de Sousa, F.A.M., Oscarson, S. and Brewer, C. F. 1998. Diocleinae lectins are a group of proteins with conserved binding sites for the core trimannoside of asparagine-linked oligosaccharides and differential specificities for complex carbohydrates. The Journal of Biological Chemistry, 273: 12082-12088.

Macedo, M.L.R., Oliveira, C.F.R. and Oliveira, C.T. 2014. Insecticidal activity of plant lectins and potential application in crop protection. Molecules, 20: 2014-2033.

Malek, J.A. 2010. Next generation DNA sequencing applied to the date palm tree (*Phoenix dactylifera*). IV International Date Palm Conference 882.

McCafferty, H.R.K., Moore, P.H. and Zhu, Y.J. 2006. Improved Carica papaya tolerance to carmine spider mite by the expression of Manduca sexta chitinase transgene. Transgenic research, 15(3): 337–347.

Patankar, H.V., Assaha, D.V.M., Al-Yahyai, R., Sunkar, R. and Yaish, M.W. 2016. Identification of reference genes for quantitative Real-Time PCR in date palm (*Phoenix dactylifera* L.) subjected to drought and salinity, PloS one, 11(11): 1-21.

Quenzar, B., Hartmann, C., Rode, A. and Bensliman, A.A. 1998. Date palm DNA minipriparation without liquid nitrogen. Plant Molecular Biology Reporter, 16: 263-269.

Vandenborr, G., Smagghe, G. and Van Damme, E. 2011. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. Phytochemistry, 72(13): 1538–1550.

Xiao, Y., Yang, Y., Cao, H., Fan, H., Ma, Z., Lei, X., Mason, A.S., Xia, Z. and Huang, X. 2012. Efficient isolation of high quality RNA from tropical palms for RNA-seq analysis. Plant Omics, 5(6):584-589.

Providing a suitable method for extracting RNA and determine the expression of Ricin B, lectin gene in susceptible and relatively resistant cultivars of date palm to the spider mite

Zahra Haghkhah[1], Mousa Mousavi[1]*, Parviz Shishehbor [2]

[1] Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[2] Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

[*]*Corresponding Author: m.mousavi@scu.ac.ir*

Abstract

In order to provide an appropriate method for extraction of RNA from date palm fruit, two modified laboratory protocols (Quinizar and MRIP) and a kit of RNA extraction were examined. Also after cDNA synthesis, the expression level of Ricin B, lectin gene (from the gene family of lectins involved in the defense mechanism with conserved domain) by qRT-PCR method in two relatively resistance date palm cultivars (Estamaran and Hallawi) and two susceptible cultivars (Barhee and Lilwi) were evaluated. The results showed that the MRIP method is more suitable for extracting the entire RNA from date palm fruit compared to two other methods so that the cDNA was synthase as well. Also, the statistical analysis of the expression of the lectin gene in the four cultivars showed different patterns, so that the Estamaran cultivar had the maximum relative expression (100% compared to other cultivars) and then Lilwi with 44.4%, Barhee with 5.55%, and the lowest level of lectin gene expression was observed in Hallawi cultivar with 23.1%. Therefore, based on the results, it cannot be concluded that resistance/susceptibility of date palm cultivars to the spider mites was attributed to this gene.

Keywords: RNA, Ricin B, date palm

IrHC2019