جداسازی ژن PR2 در گیاه به پس از تیمار با ماده محرک BTH

نسیم سرهنگی [1*]، علی محمدشکیب [2]، محمد علی ابراهیمی [3]، منصوره کشاورزی [4]، مانا احمدراجی [5]
1- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه پیام نور، تهران. 2- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران. 3- استادیار دانشگاه پیام نور تهران. 4- استادیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج، ایران. 5- کارشناس پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران.
nsarhangi91@gmail.com

چکیده

آتشک یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه‌دانه‌دار است و درخت به نیز یکی از حساس‌ترین گونه‌های میزبان بیماری به حساب می‌آید. در بین روش‌های مبارزه استفاده از ارقام مقاوم اقتصادی‌ترین روش می‌باشد. یکی از پاسخ‌های دفاعی گیاه به تنش-های محیطی انباشتن پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی PR است. خانواده PR2 شامل بتا 1و3- گلوکاناز بوده که به طور گسترده‌ای در بین گونه‌های گیاهی توزیع شده‌اند. این تحقیق با هدف بررسی بیان ژن PR2 در گیاه به (*Cydonia oblonga*) تحت تیمار با ماده BTH انجام می‌گیرد. بدین منظور درختچه‌های دو ساله "به" رقم اصفهان تحت تیمار با ماده BTH قرار گرفتند. RNA کل 5 روز بعد از تیمار استخراج و برای ساخت cDNA استفاده شد. تکثیر ژن PR2 توسط آغازگرهای عمومی برای این ژن، به وسیله واکنش PCR انجام گرفت. باند مورد انتظار پس از جداسازی از ژل روی ناقل pTZ57R/T الحاق و تعیین توالی شد. مقایسه توالی آن با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعات نشان داد که تشابه بالایی با ژن‌های شناخته شده گلوکاناز در گیاهان دیگر و از جمله سیب دارد. این بررسی ادامه دارد.

واژه‌های کلیدی: به، آتشک، PR پروتئین‌ها، BTH

مقدمه

بیماری آتشک[1] مهمترین بیماری درختان میوه‌دانه‌دار در کشور است. عامل این بیماری باکتری *Erwinia amylovora* است و به خانواده *Entro bactriaceae* تعلق دارد. این باکتری گرم منفی، دارای کپسول، تاژک‌های محیطی و بی‌هوازی اختیاری است. میزبان‌های عمده بیماری آتشک شامل جنس‌های به (*Cydonia*)، گلابی (*Pyrus*)، سیب (Malus)، ازگیل (*Mespilus*)، زالزالک (*Crataegus*)، پیراکانتا (*Pyracanta*) و شیر خشت (*Cotoneaster*) هستند. به، گلابی و سیب از حساس‌ترین میزبان‌ها می‌باشند (6). این بیماری برای اولین بار در ایران در سال 1368 در برغان کرج مشاهده و گزارش شد (7). به دنبال بروز بیماری، خسارات هنگفتی به باغات مناطق مختلف مانند آذربایجان شرقی، قزوین، زنجان، خراسان، گیلان، فارس و تهران تحمیل گردیده است (2،7،8). روش‌های مبارزه متعددی برای مهار این بیماری اعمال شده است ولی تاکنون هیچ‌کدام از این روش‌ها به عنوان روش مبارزه قطعی مؤثر واقع نشده است. در بین روش‌های مبارزه با بیماری آتشک، استفاده از ارقام متحمل اقتصادی‌ترین و مؤثرترین روش مبارزه به حساب می‌آید. یکی از استراتژی‌های کنترل بیماری‌ها در کشاورزی مدرن، استفاده از تکنیک مهندسی ژنتیک و ژن‌های رمزگردان پروتئین‌های PR برای تولید گیاهان مقاوم به رنج وسیعی از عوامل بیماریزا می‌باشد (5). ژن‌های مربوط به بیماریزایی دسته‌ای از این ژن‌ها می‌باشند که بیان آنها سبب القا پاسخ فوق حساسیت به بسیاری از آلودگی‌های باکتریایی، ویروسی و قارچی می‌گردد. مواد شیمیایی مثل سالیسیک، پلیاکریلیک، اسیدهای چرب، نمک‌های معدنی و به همین ترتیب محرک‌های فیزیکی مثل زخم، اشعه UV-B، شوک اسمزی، دمای پائین، کمبود یا زیادی آب سبب القای PR ها می‌شوند (4). خانواده PR-2

[1] . Fire blight

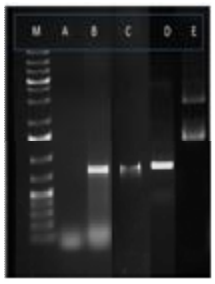
شامل بتا 1و3- گلوکانازها بوده که به طور گسترده‌ای در بین گونه‌های گیاهی توزیع شده‌اند. بتا 1و3- گلوکانازها با شکستن باندهای بتا 1و3- گلوکان به طور مستقیم دیواره سلولی قارچ‌ها را هیدرولیز و از رشد قارچ جلوگیری می‌کنند. فعالیت آنزیم‌های گلوکاناز، بویژه بتا 1و3- گلوکاناز، بخشی از دیواره که عمدتا از ترکیبات گلوکانی ساخته شده است را به طورکلی از بین می‌برد. از سوی دیگر، از آنجا که کیتین دیواره قارچ‌های بیماریزا در ماتریکسی از رشته‌های گلوکان محصور شده است، غالبا فعالیت گلوکانازی پیش از فعالیت کیتینازی مشاهده می‌شود (3،1). لذا این تحقیق با هدف بررسی اثر تیمار گیاه به با ماده شیمیایی بیون بر روی سطح بیان ژن PR2 انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نهال‌های دو ساله به رقم اصفهان کاشته شده در موسسه تحقیقات نهال و بذر در کرج تحت تیمار با ماده بیون قرار گرفت. قبل و بعد از تیمار نمونه‌گیری از برگ‌ها انجام شد. استخراج RNA کل با استفاده از کیت استخراج RNeasy plant Mini kit (50) و افزودن دو ماده شیمیایی پلی وینیل پیرولیدین (PVP) 4% و دیتیوتریتول (DTT) انجام شد. سپس ساخت cDNA با استفاده از کیت شرکت BioRad انجام شد. برای جداسازی قطعه ژنی موردنظر، از واکنش PCR و یک جفت آغازگر عمومی بر اساس توالی‌های حفاظت شده گیاهان مختلف استفاده گردید. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم 20 میکرولیتر انجام شد. چرخه‌های PCR شامل یک مرحله واسرشت اولیه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 دقیقه، سپس در هر چرخه دمای 94 درجه به مدت 30 ثانیه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای 49 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه، دمای تکثیر ژن 72 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 دقیقه و مرحله تکثیر نهایی در دمای 72 درجه به مدت 10 دقیقه بود. محصول واکنش PCR روی ژل آگارز 1% برده شد. محصول PCR توسط کیت تخلیص Fermentas طبق دستورالعمل ازروی ژل خالص گردید و با استفاده از روش T/A کلونینگ در ناقل پلاسمیدی pTZ57R/T الحاق و سپس با روش شوک حرارتی به باکتری *E.coli* سویه xl_1blue منتقل شد. 20 میکرولیتر مخلوط انتقال بر روی محیط کشت LB Agar حاوی 100 میلی‌گرم برمیلی‌لیتر آمپی سیلین جهت تشکیل کلنی کشت شد. پلاسمید نوترکیب با کشت یک کلنی استخراج گردید و حضور قطعه ژن درون پلاسمید با واکنش PCR تایید و برای توالی‌یابی ارسال شد. از نرم‌افزار های موجود جهت مقایسه توالی با سایر توالی‌های موجود در بانک اطلاعات DNA استفاده گردید.

نتایج و بحث

کیفیت RNA استخراج شده با کامل بودن دو باند 28_S RNA و 18_S RNA مشاهده شد. طول قطعه تکثیر شده حاصل از PCR با آغازگرهای عمومی این ژن، 650 جفت باز بود که این باند روی ژل مشاهده شد. پس از خالص‌سازی از ژل، این قطعه در ناقل pTZ57R/T الحاق و درون باکتری همسانه‌سازی شد. از کلون‌های تشکیل شده واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به منظور بررسی صحت انتقال قطعه ژن PR2 انجام شد و محصول PCR بر روی ژل آگارز 1% مشاهده گردید. پس از استخراج پلاسمید از کلون حاصله، قطعه الحاق شده توسط PCR تکثیر و بر روی ژل آگارز 1 درصد مشاهده گردید (شکل 1). نتایج توالی‌یابی در جستجو با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن نشان داد که قطعه تکثیر شده تشابه بالایی در سطح اسید نوکلئیک و پروتئین با ژن‌های PR2 از جمله سیب دارد. در ادامه بیان این ژن در گیاه تحت تیمار با ماده محرک و در مقایسه با شاهد با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بررسی خواهد شد.



شکل 1: الکتروفورز محصولات PCR، تکثیر ژن PR2.

M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb plus، A: کنترل منفی،

B: محصول PCR، C: محصول خالص‌سازی شده از ژل،

D: محصول تکثیر پس از همسانه سازی،

E: محصول استخراج پلاسمید.

References

1- **Haran S., Schickler H. and Chet I. 1996.** Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. Microbiology 142, 2321-2331.

2- **Hassanzadeh, N. 1995.** Fire blight of pear, apple and quince trees. Agricultural Research, Education and Extention organization publication, Technical issue, No. 1: 18p.

3- **Nobe, R., Sakakibara, Y., Ogawa, k. and Suiko, M 2oo4.** Cloning and expression of a novel *Trichoderma viride* laminarinase AI gene (lamAI). Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(10), 211-2119.

4- **Schaller AP, Roy N, Amrhein H(2000).** Salicylic acid- independent induction of pathogenesis- related gene expression by fusicoccin. Plant 210:599-606.

5- **Strittmatter, G., Wegner, D., 1993.** Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: present state of the art. Z. Naturforsch. 48c: 673-688.

6- **Van der zwet, T. and H.L.Keil, 1979.** Fire blight: A Bacterial Disease of Rosaceous plants. United states Department of Agriculture. Agricultural Handbook NO. 510:650 p.

7- **Zakeri, Z. and B. Sharifnabi, 1991.** Fire blight of pear in Karaj. Proceeding of the Iranian plant protection congress, Kerman, Iran, p. 157.

8- **Zohour, E. and N. Rahmani Moghadam, 2004.** Occurrence of fire blight in khorasan province. Proceading of the 16th Iranian plant protection congress, volume 2: Plant diseases and weeks, Tabriz, Iran, p. 423.

Isolation of a PR2 gene homologue from quince after treatment with BTH elicitor

N, Sarhangi[1*], A, M, Shakib[2], M, A, Ebrahimi[3,] M, Keshavarzi[4], M, Ahmadraji[5]

1- Dept. of Agricultural Biotechnology, Payame Nour University, Tehran- Iran. 2- Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj- Iran. 3- Payame Nour University, Tehran- Iran. 4- Seed and Plant Improvement Institute, Karaj-Iran. 5- Agricultural Biotechnology Research Institute, Karaj- Iran.

Abstract

Fire blight is one of the dangerous bacterial diseases in pome fruits. Quince tree is very susceptible to the disease. Using tolerant cultivars is the most economic method for disease control. One of the plant defense responses to environmental stresses is accumulating pathogenesis – related proteins (PR_s). PR2 family includes β – glucanase which is distributed in plant species. This research is neing carried out to investigate the induced expression of PR genes using BTH elicitor in quince (C*ydonia oblonga*). For this purpose, 2- year- old quince plants of cultivar Isfahan were treated with BTH. After 5 days, RNA was extracted and it was used for cDNA synthesis. Amplification of PR2 gene was done by PCR using the degenerate primers. After purification, this band was ligated into pTZ57R/T vector and sequenced.

Alignment with other sequences in the gene bank showed high similarity with glucanases in other plant species including apple. The work is continuing.

Keywords: quince, fire blight, PR2 protein, BTH