هفتمین کنگره علوم باغبانی ایران، ١٤ تا ١٧ شهریور ماه ١٣٩٠،دانشگاه صنعتی اصفهان

افزایش مقاومت به بو تریتیس سینرا و تحریک رشد در تنباکوی تراریخت وسیله بیان ژن hrpN

فاطمه نجات زاده باراندوزی

عضو هیئت علمی گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی خوی

پروتئینهای گروه harpin جدا شده از باکتری *Erwinia amylovora* باعث افزایش مقاومت بـه بیماریهـای پـاتوژنی در سلولها می شوند. به منظور به‌دست آوردن گیاهان تنباکو تراریخت، ژن hrpN از بـاکتری *Erwinia amylovora* بـه یـک وکتور PMJC-GB که تحت کنترل پروموتور سیتوکروم برنج بود کلون شد و سپس به تنباکو انتقال داده شد. هیبریداسـیون Southern blot با یک قطعه hrpN که به عنوان Prob استفاده شده بود نشان داد کـه یـک Copy number در گیاهـان تراریخت وجود داشت در حالیکه در گیاهان وحشی وجود نداشت. آنالیز RAPD با ۱۲ پرایمر انجام شد که در گیاهان نـوع وحشی ۷۵ محصول دیده شد در حالیکه ۷۳ محصول در گیاهان تراریخت وجود داشت که اشاره به این داشت که در گیاهان تراریخت ژن hrpN در ژنوم DNA گیاهان تراریخت تلفیق شده بود. گیاهان تراریخت مقاومت زیادی بـه قـارچ بـوتریتیس نشان داده و رشد و نمو زیادی داشتند.

کلمات کلیدی: تنباکو ، ژن hrpN ، بوتریتیس ، گیاه تراریخت ، RAPD

مقدمه :

Harpin ها پروتئینهای مقاوم به گرما و حساس به آنزیم پروتئاز هستند که به وسیله پاتوژنهای گرم- منفی تولید می شوند(۱). فیتوپاتوژنهای باکتریایی باعث مرگ سریع بافتهایی مورد حمله می شوند(۲). *Botrytis cinerea* یک پاتوژن قارچی عامل نکروز و پوسیدگی است که بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی مثل آرابیدوپسیس و تنباکو را مورد حمله قرار می دهد و روی مکانیسم مقاومت گیاهی اثر می گذارد(۳). یک سری ژنهای ضروری به نام hrp از گیاهان در برابر حملات باکتریهای بیماریزای گرم – منفی محافظت می کند(٤). اینکه چطور برهمکنش بین سلولهای گیاهی وharpin اتفاق می افتد هنوز به طور کامل آشکار نشده است بهرحال در نتیجه فعالیت متوالی سیگنالهای دفاعی در گیاهان که به وسیله گیرنده های خاص گیاهی ایجاد می شود می باشد(۵).ازآنجایی که harpin ها ، یک وسیله مفید برای انتخاب گیاهان مقاوم به پاتوژن است انتقال ژنهای harp به منظور ایجاد مقاومت توسط مهندسان ژنتیک مورد استفاده قرار گرفته است(٦) . در این مطالعه بیان ژنهای hrpN درگیاهان تنباکوی تراریخت بررسی شده که باعث افزایش مقاومت به پاتوژن و تسریع رشد و نمو می شود.

مواد و روشها :

مواد گیاهی

بذرهای تنباکو از ایستگاه تحقیقاتی نهال و بذر کرج آورده شد، و تحت شرایط گلخانه کشت شدند.

ساختمان ژن و گیاه تراریخت

پرایمرهای '5-ATGAGTCTGAATACAAGTGGG-3' و

'5-TTAAGCCGCGCCCAGCTTGCC-3'

از توالی باز hrpN طراحی شدند. تنباکو ها بایک وکتور بیانی که از باکتری *Erwinia amylovora* گرفته شده بود با استفاده از تکنولوژی(Invitrogen) تراریخت شدند. محصولات PCR به یک پلازمید pMJC-GB که شامل ژنهای hrpN از باکتری Erwinia amylovora که تحت کنترل پروموتور سیتوکروم برنج و ترمیناتور Pin II با یک ژن نشانگر انتخابی bar که از پروموتور CaMV 35S گرفته شده بود کلون شدند. وکتور pMJC-GB به اگروباکتریوم LBA 4404 به وسیله روش Tri-parental mating انتقال داده شد. Agrobacterium tumefaciens به سطح قطعات استریل برگی انتقال پیدا کرد. سوسپانسیون اگروباکتریوم سانتریفوژ شد وصفحات در محیط کشت MS قرار داده شدند.

ساترن بلات :

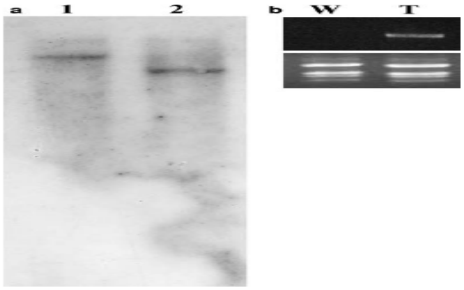
یک قطعه hrpN تکثیر یافته به وسیله PCR از پلازمید PMJC-GB به عنوان پروب استفاده شد. DNA ژنومی (5 µg) به وسیله آنزیم های محدودگر ECORI و Hind III به ترتیب برش داده شد. DNA به یک غشاء نایلونی Hybond-N+ انتقال و هیبریداسیون با prob نشاندار انجام داده شد. هیبریداسیون برطبق روش Sam brook و همکاران انجام شد.

RT-PCR

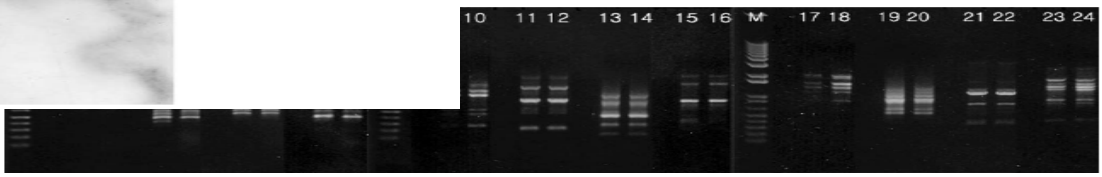
RNA کل با Trizol استخراج شد و کلروفرم به آن اضافه شد و بعد RNA با یک حجم مساوی از ایزوپروپانول رسوب کرد. RNA به وسیله سانتریفوژ با سرعت 12000 rpm به مدت 10min آشکار و در TE تجزیه شد. RT-PCR با استفاده از پرایمرهای forwardو '5'ATGAGTCTGAATACAAGTGGG-3 پرایمر reverse '5'-TTAAGCCGCGCCCAGCTTGCC-3 در دمای 48 ^{o}C به مدت 45min و 95 ^{o}C به مدت 5min انجام شد. تعداد سیکل ها 35 عدد (1min در دمای 95 ^{o}C، 1min در دمای 52 ^{o}C، 2min در دمای 72 ^{o}C و در مرحله آخر 10 min در دمای 72^{o}C) . محصولات RT- PCR به وسیله الکتروفورز ژل آگارز 0.8% جداسازی شدند.

آنالیز RAPD

DNA ژنومی از تنباکو برطبق روش Sam brook با تغییر کم جدا سازی شد. RAPD با ۱۲ پرایمر تصادفی انجام شد با 50ML مخلوط واکنش شامل : DNA الگو 20ng، مخلوط 20mM dNTP ، پرایمر 10PM، DNA Taqپلیمراز 2 unit، بافر PCR ×5ML 10. PCR برطبق توالی در دمای۹۲ درجه به مدت ۱ دقیقه ، ۳۵ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۷۲ درجه به مدت ۱/۵ دقیقه با ٤٤ سیکل با دمای ۹۲ درجه به مدت ۳ دقیقه و ۷۲ درجه به مدت ۷ دقیقه در مرحله اول دناتوره انجام شد. محصولات تکثیر یافته به وسیله الکتروفورز ژل آگارز 0.8% با استفاده از بافر TAE جداسازی شدند آزمایشات حدود ۳ بار تکرارشدند. محصولات RAPD براساس حضور و عدم حضورقطعات و اندازه قطعات درجه بندی شدند و با مقایسه یک مارکر 1kb-ladder شناسایی شدند.



شکل ۲ : آنالیز بیانی و ژنومی تنباکو تراریخت . DNA ژنومی با آنزیم ECOR I برش داده شد (لاین ۱) و (لاین ۲) با آنزیم Hind III و الکتروفورز روی ژل آگارز ۰/۸% .b نسخه های ژن hrpN در برگهای گیاه تراریخت (T) و نوع وحشی (W).



شکل ۳ – پلی مورفیسم قطعات تکثیر یافته تصادفی در گیاه وحشی و تراریخت با استفاده از پرایمرهای مختلف M اشاره دارد به مارکر 1 kb Ladder لاین های 23,21,19, 17,15,13,11,9,7,5,3,1 از نوع وحشی و لاین های دیگر از گیاه تراریخت .

نتایج و بحث

ساترن بلات و بیان ژن hrpN در گیاه تنباکوی تراریخت

۱۳لاین گیاه ترایخت بدست آوردیم و ۵ لاین گیاه تراریخت که رشد زیادی را نشان دادند را انتخاب کردیم. ساترن بلات با قطعه hrpN نشاندار شده نشان داد که ژن hrpN با یک Copy number در گیاه تراریخت وجود داشت (شکل ۲a).

مسیرهای وابسته به مقاومت به وسیله hrpN در گیاهان تراریخت فعال شد (شکل ۲b) . یک گیاه تراریخت فرضی به طور تصادفی از ۱۳ گیاه تراریخت انتخاب شد بیان ژن hrpN به وسیله RT-PCR تأیید شد. نسخه های hrpN می توانست در گیاه تراریخت تکثیر پیدا کند ولی در گیاه نوع وحشی نمی توانست تکثیر شود.

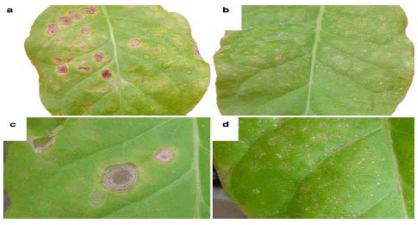
آنالیز RAPD

RAPD یا پلی مورفیسم قطعات DNA تکثیر یافته به طور تصادفی با استفاده از ۱۲پرایمر انجام شد. ۷۵ محصول در گیاه نوع وحشی ۷۳ محصول در گیاه تراریخت بدست آمد . چهار پرایمر OPAG-1704, OPAG-1604, OPAG-054, OPAG-04 تفاوت موجود بین گیاهان تراریخت و نوع وحشی را آشکار کرد که دیده شد که hrpN در ژنوم گیاه تراریخت تلفیق شده بود. بیان hrpN در گیاهان تنباکو تراریخت به عنوان یک محرک رشد عمل کرده و باعث افزایش رشد گیاه شد.

مقاومت به *Botrytis cinerea* در گیاه تنباکوی تراریخت

گیاهان تراریخت باعمر٦ هفته که دریک گلخانه رشد داده شده بودند برای مقاومت به قارچ *Botrytic cinerea* مورد آزمایش قرار گرفتند. حساسیت به آلودگی قارچی ۵ روز بعد از تلقیح ، با آزمایش ٦٠ برگ از گیاه کنترل و تراریخت ارزیابی شد. گیاهان تراریخت مقاومت زیادی به بوترتیس نشان دادند (شکل ٤).

بنابراین فعال کردن سیگنالهای مربوط به مقاومت به *Botrytic cinerea* از اهمیت زیادی برخوردار هست. در نهایت اثبات شد که بیان hrpN در گیاهان تنباکوی تراریخت باعث افزایش مقاومت به *Botrytic cinerea* و افزایش رشد و نمو می شود.



شکل ٤. آلودگی گیاه تراریخت و وحشی با قارچ بوترتیس .گیاهان با *Botrytic cinerea تلقیح شده و* عکس ها ۱۰ روز بعد از تلقیح با *Botrytic cinerea* گرفته شدند. a برگهای گیاه وحشی، b برگهای گیاه تراریخت.

References:

1. Peng JL, Bao ZL, Ren HY, Wang JS, Dong HS (2004) Expression of Harpinxoo in transgenic tobacco induces pathogen defense in the absence of hypersensitive cell death. J Bacteriol 94:1048–1055.

2. Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH (1996) Death don't have nomercy: cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8:1793–1807**.**

3. Prins TW, Tudzynski P, von Tiedemann A, Tudzynski B, Have A, Hansen ME, Tenberge K, van Kan JAL (eds) (2000) Infection Strategies of Botrytis cinerea and related necrotrophic pathogens. Kluwer, Netherlands**.**

4. Lehtima ki S, Rantakari A, Routtu J, Tuikkala A, Li J, Virtaharju O, Palva ET, Romantschuk M, Saarilahti HT (2003) Charaterization of the hrp pathogenicity cluster of Erwinia carotovora subsp. carotovora: high basal level expression in a mutant is associated with reduced virulence. Mol Gen Genomics 270:263–272**.**

5. Tripathy S, Kleppinger-Sparace K, Dixon RA, Chapman KD (2003) N-Acylethanolamine signaling in tobacco is mediated by a membrane-associated, high-affinity binding protein. Plant Physiol 131:1781–1791**.**
6. Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, Poupet A, Delon R, Verrier JL, Roby D, Ricci P (1999) Pathogen-Induced elicitin production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance. Plant Cell 11:223–235**.**
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor.

Increasing growth and resistance to *Botrytis cinerea with* hrpN gene of *Erwinia amylovora in* tobacco

Fatemeh Nejatzadeh Barandoozi
Department of Agricultural Engineering, Azad University of Khoy, Khoy, West Azarbayjan, Iran.
Fnejatzadeh@yahoo.com

Abstract
Erwinia amylovora is a member of the harpin proteins that induces pathogen resistance in plants. To obtain tobacco plants displaying a resistance response, the hrpN gene from *Erwinia amylovora* was cloned into vector pMJC-GB under the control of the rice cytochrome promoter and transfected into tobacco. Southern hybridization with a hrpN probe revealed that the gene was present in one copy in the transgenic plants. In addition, hrpN transcripts could be detected in transgenic plants but not in wild-type tobacco. The wild type gave 75 products in RAPD analysis with 12 primers while the transgenic plants gave 73, suggesting that hrpN gene had been integrated into the transgenic plant genomic DNA. The sizes of stomata and guard cells on transgenic leaves were similar to those of the wild type, but the epidermal cells were clearly smaller. The transgenic plants showed accelerated growth and development as well as enhanced resistance to *Botrytis cinerea*.
Keywords: *Botrytis cinerea* ; HrpN gene; Transgenic plant; Tobacco