کاهش بیان ژن *PGase* از خانواده‌ی آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز‌ها در گیاه آرابیدوپسیس و حساسیت به آلودگی با بیمارگر

رعنا پور ایوبی [۱]

چکیده

در این پژوهش موتانتی از گیاه که آرابیدوپسیس که دارای حساسیت شدیدی به آلودگی با بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* بود و در طول فرآیند تولید گیاهان تراریخته‌ی آرابیدوپسیس جهت مطالعه‌ی ژن‌های مقاومت ایجاد شده بود، تحت مطالعه و ارزیابی‌های مولکولی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حساسیت این موتانت به بیمارگر، به علت درج شدن یک DNA جابجا شونده از آگروباکتریوم در ژن رمزگردان به آنزیم پلی‌گالاکتوروناز، که از آنزیم‌های مهم دیواره‌ی سلولی گیاهان که نقش کلیدی را در پاسخ به تحریکات خارجی زنده و غیر زنده بازی می‌کنند، می‌باشد. زیرا اولاً، موتانت غیر وابسته‌ی دوم برای همین ژن که دارای DNA جابجا شونده در مکان دیگر توالی این ژن بود، فنوتیپ یکسانی را نشان داد. ثانیاً، با بیان بیشتر ژن مذکور (Overexpression)، در موتانت‌های جهش یافته که ژن مذکور فاقد عملکرد بود و سطح بیان ژن فوق در آنها ۷۰ درصد کاهش یافته بود، حساسیت گیاه نسبت به بیمارگر برطرف شد. نتایج به‌دست آمده دخالت دیواره‌های سلولی گیاهان در پاسخ به بیمارگرها را تأیید نمودند.

واژگان کلیدی: آرابیدوپسیس، پلی گالاکتوروناز، حساسیت، دیواره‌ی سلولی.

۱– استادیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز (نگارنده‌ی مسئول) rpourayyubi@bio3.rwth-aachen.de

تاریخ دریافت:۸۸/۸/۲۳
تاریخ پذیرش:۸۹/۳/۱۰

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

سلول‌های گیاهی بر خلاف سلول‌های جانوری توسط دیواره‌های نسبتاً ضخیم و مستحکمی احاطه می‌شوند که شکل، خصوصیات ظاهری و بیومکانیکی گیاهان و اندام‌هایشان را تعیین می‌کنند (۱ و ۳). دیواره‌های سلولی نه تنها باعث استحکام پیکره‌ی گیاهان می‌شوند، بلکه نقش اساسی را در زمینه‌ی رشد و نمو گیاهان، تمایز سلول‌ها، مقاومت گیاهان در برابر بیمارگرها، تبادلات بین سلولی و جابجایی آب در سلول‌ها را نیز بر عهده دارند. سلولز، همی سلولز و پکتین از عمده پلی ساکاریدهای تشکیل‌دهنده‌ی دیواره‌های سلولی گیاهان می‌باشند (۴). علاوه بر پلی ساکاریدها، دیواره‌های سلولی دارای انواع متعددی از آنزیم‌ها نیز می‌باشند که در فرآیندهای مختلف سلولی مانند تشکیل دیواره‌های سلولی، توسعه و انبساط سلول‌ها، جدا شدن سلول‌های دختری در تقسیمات سلولی و واکنش‌های متقابل سلول‌های گیاهی با بیمارگرها شرکت می‌کنند (۴). حضور آنزیم‌ها در دیواره‌های سلولی گویای این واقعیت می‌باشد که آن‌ها مستعد تحمل تغییرات زیاد در ساختارها و ترکیباتشان، در طول رشد و نمو سلول‌ها و حتی بعد از بالغ شدن آنها می‌باشند (۷ و ۹). پلی گالاکتورونازها (PGases)، یک گروه از آنزیم‌های مهم وابسته به دیواره‌های سلولی هستند، که نقش‌های اساسی را در طول چرخه‌ی زندگی گیاهان مانند جوانه زنی بذرها، رشد سلول‌ها، بالغ شدن دانه‌های گرده، رسیدن میوه‌ها، ریزش برگ‌ها، گل‌ها و شکوفایی بساک توسط تنظیم دیواره‌های سلولی بر عهده دارند.

مطالعات نشان می‌دهند که ژنوم گیاه آرابیدوپسیس دارای ۶۹ ژن رمزگردان به آنزیم‌های پلی گالاکتورونار می‌باشد که محصولات این ژن‌ها بر اساس تشابهات واحدهای اسید آمینه‌ای و سازماندهی رونوشت‌هایشان (mRNA) یک گروه از آنزیم‌ها تحت عنوان پلی گالاکتورونازها را تشکیل می‌دهند که می‌توان آن‌ها را به شاخه‌های مختلفی تقسیم کرد (۱۰ و ۱۱). همان‌طور که ذکر شد دیواره‌های سلولی علاوه بر تعیین شکل گیاهان و دخالت در رشد و نمو آنها، در تنظیم عکس‌العمل گیاهان به تحریکات خارجی مانند حمله‌ی بیمارگرها نیز دخالت دارند (۱۲ و ۱۳). تمامی بیمارگرهای گیاهی دارای فعل و انفعالات داخلی با دیواره‌های سلولی گیاهان و اجزای تشکیل‌دهنده‌ی آنها می‌باشند و مانند یک سد فیزیکی بین بیمارگرها و محتوای درونی سلول‌های گیاهان عمل می‌کنند. علاوه براین، دیواره‌های سلولی یک مخزن پویایی از پروتئین‌های ضد میکروبی و متابولیت‌های ثانویه هستند که مانع از رشد و پیشرفت بیمارگرها می‌شوند (۱۲).

از طرف دیگر، بیشتر بیمارگرهای قارچی و باکتریایی آنزیم‌هایی نظیر پلی گالاکتورونازها (PGases) که از آنزیم‌های مهم دیواره‌ها هستند، پکتات لیازها (PELs) و پکتین متیل استرازها (PMEs) را به عنوان فاکتورهای آزارگر[۱] رها می‌سازند که پلی ساکاریدهای دیواره‌های سلولی را تجزیه و تخریب می‌کنند.

۱- Virulence

Archive of SID

www.SID.ir

علاوه بر آنزیم‌های مذکور، گیاهان و بیمارگرها داری یک‌سری پروتئین‌های بازدارنده[۱]، می‌باشند که فعالیت آنزیم‌های یکدیگر را مسدود می‌کنند. تجزیه و تخریب پلی ساکاریدهای پکتینی توسط پروتئین‌های میکروبی و یا پروتئین‌های مخرب دیواره‌های سلولی (CWDPs)[۲]، به تولید الیگوساکاریدهایی می‌انجامند که می‌توانند به‌عنوان مولکول‌های سیگنال دهنده‌ای عمل کرده و پاسخ‌های دفاعی گیاهان را تحریک کنند (۸ و ۹). بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* عامل بیماری سفیدک درونی در گیاهان خانواده کروسیفرا[۳] بوده و در مناطقی که اعضای این خانواده مخصوصاً محصولات کشاورزی متعلق به این خانواده، پرورش داده می‌شوند پراکنده می‌باشد. این بیماری بیشتر در مناطق خنک و مرطوب که برای تولید اسپور و پراکنش آنها مساعد باشد شیوع دارد. این بیمارگر متعلق به شاخه‌ی Chromicota و رده‌ی Omycota بوده که به علت دارا بودن سلولز و عدم دارا بودن کیتین در دیواره‌های سلولی در سال‌های اخیر از قارچ‌های حقیقی جدا شده‌اند (۲۰).

Hyaloperonospora arabidopsidis دارای دو ایزوله‌ی NOCO و WELA بوده که در اکوتیپ‌های مختلف گیاه آرابیدوپسیس بیماری‌زا می‌باشند. اکوتیپ Col فقط توسط نژاد NOCO دارای واکنشی سازگار می‌باشد که منجر به ایجاد بیماری می‌شود (۲۰). ولی این بیمارگر قادر به آلوده سازی دو موتانت *pmr۶* و *pmr۵* گیاه آرابیدوپسیس از اکوتیپ Col نمی‌باشد. محصول ژن *PMR۶* یک آنزیم PELs مانندی می‌باشد که دارای نقش تخریبی روی پکتین‌ها است و ژن *PMR۵* هم متعلق به یک خانواده‌ی بزرگ ژنی با عملکردی نامشخص است (۱۴).

مقاومت مشاهده شده در این موتانت‌ها مربوط به فعال شدن مسیرهای دفاعی از پیش شناخته شده‌ی گیاهان، که به مقاومت گیاهان می‌انجامد نمی‌باشد. بلکه این‌طور به‌نظر می‌رسد، که نوع جدیدی از مقاومت است که بیشتر به از دست دادن یک فاکتور حساسیتی مربوط می‌باشد. لذا در موتانت *pmr۶*، محصول ژن *PMR۶* به‌عنوان یک فاکتور حساسیتی درگیاه می‌باشد که فقدان عملکرد آن باعث مقاومت گیاه می‌شود (۱۴ و ۱۵).

از گفته‌های فوق می‌توان این چنین نتیجه‌گیری کرد که ساختار و ترکیب پلی ساکاریدهای پکتینی دیواره‌های سلولی نقش بسیار مهمی را در تعیین و تنظیم پاسخ‌های دفاعی گیاه در برابر حمله‌ی بیمارگرها بر عهده دارند. در طول فرآیند تولید لاین‌های تراریخته جهت مطالعه‌ی ژن‌های مقاومت، لاین جهش یافته ای از گیاه آرابیدوپسیس شناسایی شد که با بررسی‌های مولکولی مشخص گردید که در این موتانت یک DNA جابجا شونده[۴] از آگروباکتریوم در ژن کد کننده‌ی برای آنزیم PGase (AT3g07970)، که عضوی از خانواده‌ی پلی گالاکتورونازها می‌باشد، درج شده است. بنابراین این موتانت تحت عنوان *pgase* نام‌گذاری شد.

۱- inhibitory proteins
۲- cell wall degrading proteins
۳- *Cruciferae*
۴- Transfer DNA=T-DNA

Archive of SID

www.SID.ir

متعاقباً، با بررسی‌های فیزیولوژیکی مشخص گردید که این موتانت دارای حساسیت بالایی به آلودگی با نژاد آزارگر بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

شرایط رشد گیاهان و تولید گیاهان تراریخته

در تمامی مطالعات این تحقیق از اکوتیپ Colombia (Col-0) گیاه آرابیدوپسیس استفاده شد. گیاهان در گلخانه‌هایی با شرایط محیطی کنترل شده، با ۸/۵ ساعت روشنایی و ۱۵/۵ ساعت تاریکی و ۲۲ درجه‌ی سانتی‌گراد با شدت نور در حدود ۱۰۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه[۱] فوتون و رطوبت نسبی ۶۵ درصد رشد داده شدند.

برای ایجاد لاینی که سطح بالایی از ژن *PGase* را بیان کند (35S::*PGase*)، ابتدا ناحیه‌ی رمز گردان (CDS) ژن *PGase* توسط واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) تکثیر شد. چرخه‌های حرارتی مورد استفاده در موارد مختلف واکنش‌های PCR با توجه به آغازگرهای مختلف، متفاوت بود.بعد از اطمینان از صحت توالی‌های نوکلئوتیدی قطعات تکثیری، ژن *PGase* در حامل دوگانه‌ی pJawohl3 (که از انستیتوی تحقیقاتی ماکس پلانک کلن تهیه شد)، درتوالی پایین دست پیشبر 35S از ویروس موزاییک کلم (CaMV) به‌طوری‌که تحت کنترل آن بیان شود، همسانه شد (شکل ۱). سپس حامل نوترکیب حاصله از لحاظ صحت توالی‌های نوکلئوتیدی ارزیابی شده و به نژاد GV3101 باکتری *Agrobacterium tumefaciens* انتقال داده شد. آگروباکتریوم تراریخته حاصله، برای ایجاد لاین تراریخته‌ی 35S::*PGase* توسط روش شناورسازی گل‌ها[۲]، به نحوی که گل‌های جوان گیاه با محلول آگروباکتریوم حاوی حامل مربوطه آغشته می‌شد و در شرایط خاص دمایی و رطوبتی نگه‌داری می‌شد، به گیاهان Col-0 و موتانت *pgase* انتقال داده شد (۱۶).

بررسی مولکولی موتانت‌ها

برای بررسی لاین‌های جهش یافته توسط درج T-DNA، نوع خاصی از PCR به‌نام daptor ligation PCR، به‌همان شیوه‌ای که در کیت پیمایش ژنومی[۳] شرکت Clontech توصیف شده است، و راهنمای استفاده از این روش در وب‌سایت این شرکت قابل دسترس می‌باشد، مورد استفاده قرار گرفت.

در این واکنش‌ها، آغازگرهای ۱، ۳ و ۴ (جدول ۱)، برای شناسایی ناحیه‌ای که T-DNA درج شده بود، استفاده شد. حضور T-DNA در موتانت جهش یافته‌ی دوم GK-058B07، که از مجموعه‌ی GABI-Kat (مجموعه‌ای که لاین‌های جهش یافته برای تمام ژن‌های آرابیدوپسیس را دارا می‌باشد) تهیه شده بود، توسط آغازگرهای ۵ ،۶ و۷ (جدول ۱) مورد بررسی قرار گرفت. صحت توالی‌های نوکلئوتیدی تمامی قطعات DNA تولید شده توسط PCR، امتحان شدند.

۱- $\mu mol/m^{-2}s^{-1}$

۲- floral dip method

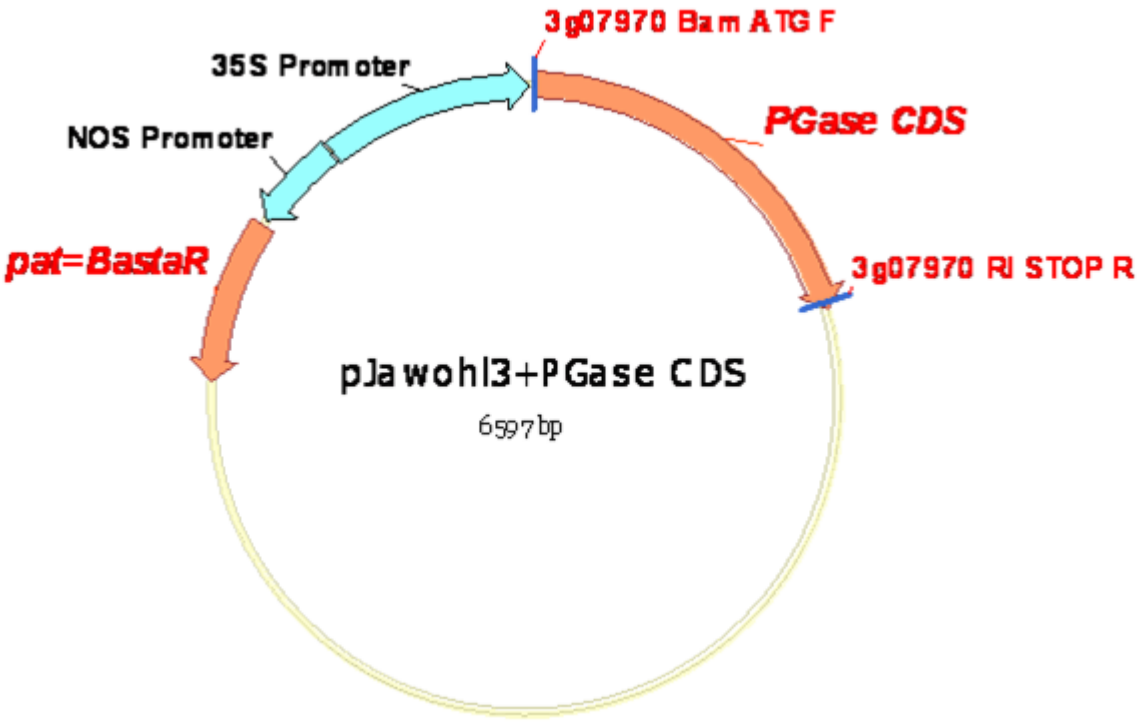
۳- Genom walker kit

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی بیان ژن توسط روش (RT-PCR)[۱]

قسمت‌هایی از ریشه، برگ‌های اولیه، ساقه و گل‌های ژنوتیپ‌های مختلف در حضور نیتروژن مایع منجمد شده و پودر شد. RNA کل از این بافت‌ها توسط روش استاندارد توصیف شده استخراج شد (۱۷).



شکل ۱- نقشه‌ی فیزیکی وکتور نوترکیب pJawohl3+*PGase* CDS توالی رمزگردان ژن *PGase* در توالی پایین دست و تحت کنترل پیشبر 35S بین نقاط محدود کننده‌ی *Bam*HI و *EcoR*I کلون شد.

۱- Semi Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

نیم میکروگرم از RNAی کل استخراج شده، به‌عنوان الگو برای ساختن DNAی مکمّل (cDNA)، با استفاده از کیت Revert Aid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase از کمپانی MBI Fermentase مورد استفاده قرار گرفت. RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن و آغازگرهای اکتین (جدول ۱)، به‌عنوان یک شاخص استاندارد درونی در حجم کلی ۵۰ میکرو لیتر و با چرخه‌های حرارتی زیر انجام گرفت:

۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه، ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، به‌مدت ۱۵ ثانیه، ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴ دقیقه، به تعداد ۲۳، ۲۵، ۲۷ و ۳۰ چرخه.

آلوده سازی گیاهان با بیمارگر

آلوده ساختن گیاهان با نژاد NOCO بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* و تحلیل رشد آن درون برگ‌های ژنوتیپ‌های مختلف و شمارش اسپورهای آن، همان‌طور که هرمانز و همکاران (۱۸) توصیف کرده‌اند، انجام گرفت.

جدول ۱- لیست آغازگرهای استفاده شده و تهیه شده توسط شرکت Sigma

۱	Long adaptor oligos	5′GTAATACGACTCACTATAGGGCACGGTGGTCGACGGCCC GGG3′
۲	Short adaptor oligo	5’-ACCAGCCC-3’
۳	T-DNA left border oligo	5′-CGCTTGGTGCTTATGTGATCTA-3′
۴	T-DNA nested oligo	5′-TCGACATCGAGTTTCTCATAA-3′
۵	GABI-Kat T-DNA LB	5′-GTTTCTCATCTAAGCCCCCATTTG-3′
۶	GABI-Kat LB nested	5′-TAACGCTGCGGACATCTACATTTT -3′
۷	PGase exon 1 reverse	5′-TTTAGCACCGAAAGTGTTGACGTT-3′
۸	PGase BamHI ATG forward	5′-TGGATCCATGTATGAAAAGATCATAATCTTA-3′
۹	PGase EcoRI STOP reverse	5′-TGAATTCTCAAGTGCAAAGAGGAGAAACATT-3′
۱۰	PGase exon7/8 forward	5′-AAGACTTGGCAGGGAGGACATGGA-3′
۱۱	PGase exon 9/8 reverse	5′-TACCGCGGATTTCTGTTCGGGGCA-3′
۱۲	Actin RT-PCR forward	5′-CGTACAACCGGTTTGTGCTGGATT-3′
۱۳	Actin RT-PCR reverse	5′-GCTTTTTAAGCCTTTGATCTTGAGAG-3′

www.SID.ir

نتایج و بحث

در فرایند تولید و انتخاب لاین تراریخته‌ی 35S::*PCC1* (۱۷)، موتانتی از آرابیدوپسیس شناسایی شد که حساسیت شدیدی به بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* نشان می‌داد. این موتانت بر اساس این‌که T-DNA در یکی از اعضای خانواده‌ی ژنی پلی گالاکتوروناز‌ها، AT3g07970، درج شده بود، تحت عنوان موتانت *pgase* نامیده شد. نتایج بررسی‌های مولکولی موتانت‌های *pgase*، GABI-Kat و بررسی‌های بیان ژن در لاین‌های مختلف بعضی از خصوصیات مورفولوژیکی تغییر یافته موتانت *pgase*، ما را تشویق به بررسی‌های مولکولی جهت یافتن نقطه الحاقی T-DNA در این موتانت کرد.

نتایج بررسی‌های مولکولی نشان داد که در این موتانت یک T-DNA در توالی آغازگر ژن AT3g07970 درج شده است. محل دقیق نقطه‌ی الحاق T-DNA، ۳۷۱ جفت باز در توالی بالادست از رمزهایی سه تایی (Codon) آغازین ترجمه‌ای این ژن بود (شکل ۲). جهت اطمینان از این موضوع که درج T-DNA مذکور در ژن مربوطه، مسئول خصوصیات مورفولوژیکی تغییر یافته در موتانت *pgase* می‌باشد، موتانت دوم GB-058B07 توسط T-DNA در همین جایگاه ژنی، از مجموعه‌ی GABI-Kat تهیه شد. بررسی‌های مولکولی بر روی موتانت GABI-Kat نشان داد که محل دقیق درج T-DNA در توالی اولین اگزون، ۵ جفت باز در پایین دست رمزهای سه تایی آغازین ترجمه‌ای می‌باشد (شکل ۳). از لحاظ مورفولوژیکی موتانت GABI-Kat کاملا شبیه موتانت *pgase* بود.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل بیان ژن *PGase* توسط Semi quantitative RT-PCR نشان‌دهنده‌ی سطح یکسان کاهش یافته‌ی بیان ژن *PGase* (تقریباً معادل ۷۰ درصد سطح بیان ژن در تیپ وحشی گیاه Col-0) درهر دو موتانت *pgase* و GABI-Kat می‌باشد (شکل ۴). داده‌های فوق دلالت بر این موضوع دارند که فقدان عملکرد ژن *PGase* درموتانت‌های مذکور، مسئول فنوتیپ مورفولوژیکی مشاده شده در آنها می‌باشد.

از طرفی دیگر تراریزش موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat با حامل حاوی 35S::*PGase*، فنوتیپ مورفولوژیکی مشاهده شده در آنها را کاملاً برطرف کرد. به‌طوری‌که، صد در صد گیاهان نسل اول حاصل از تغییر شکل، از لحاظ مورفولوژیکی شبیه گیاهان تیپ وحشی گیاه Col-0 بودند.

در نسل دوم هم، یک چهارم گیاهان شبیه موتانت‌های جهش یافته (*pgase* و GABI-Kat) و سه چهارم آن‌ها شبیه گیاهان تیپ وحشی گیاه Col-0 بودند (داده‌ها آورده نشده‌اند). این یافته‌ها نیز، وابسته بودن صفات فنوتیپیکی تغییر یافته‌ی مشاهده شده در موتانت‌ها به فقدان عملکرد ژن *PGase* را تأیید می‌کنند.

سطح بیان ژن در لاین 35S::*PGase* توسط واکنش Semi quantitative RT-PCR مورد بررسی قرار گرفته و با سطح بیان آن در موتانت *pgase* و تیپ وحشی گیاه Col-0 مقایسه شد (شکل ۵). همان‌طور که در شکل مشخص می‌باشد سطح بیان ژن *PGase* در لاین

Archive of SID

www.SID.ir

PGase::35S تقریباً به‌ترتیب ۹ برابر و ۲/۴ برابر بیشتر از سطح بیان آن در موتانت *pgase* و تیپ وحشی گیاه Col-0 می‌باشد (شکل ۵). این داده‌ها نیز دلالت به این موضوع دارند که سطح کاهش یافته بیان *PGase* مسئول فنوتیپ مورفولوژیکی مشاهده شده در موتانت‌های مذکور می‌باشد.

حساسیت شدید موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat به آلودگی با بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis* و بر طرف شدن حساسیت در لاین *PGase*::35S

از آن‌جایی که دیواره‌های سلولی موانع بسیار مهمی برای عوامل تنش‌زای زنده و غیر زنده خارجی می‌باشند، لذا عکس‌العمل موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat که تصور می‌شود در آنها درج شدن T-DNA درتوالی ژن *PGase* باعث تغییراتی در دیواره‌های سلولی آنها شده است، تحت بررسی و مطالعه قرار گرفت. به این منظور موتانت‌های *pgase*، GABI-Kat و لاین *PGase*::35S با اسپورهای نژاد NOCO بیمارگر *Hyaloperonospora arabidopsidis*، که بر روی Col-0 آزارگر می‌باشد، تلقیح شدند و نتایج رشد بیمارگر و پیشرفت آن در روزهای سوم و هفتم بعد از آلودگی مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از این آلودگی نشان داد که میزان ریسه‌های ظاهر شده در برگ‌های موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat در روز سوم بعد از تلقیح بیمارگر، کمابیش با میزان ریسه‌های ظاهر شده در موتانت شناخته شده حساس *eds1*[۱] یکسان می‌باشد (شکل ۶). همان‌طوری‌که در شکل ملاحظه می‌شود میزان ریسه‌های ظاهر شده در این ژنوتیپ‌ها بسیار بیشتر از گیاه Col-0 است و سطح حساسیت این موتانت‌ها در لاین تراریخته‌ی *PGase*::35S نیز تا حد زیادی برطرف شده است. زیرا توده‌ی ریسه‌های رشد یافته در این لاین کمابیش با گیاه Col-0 یکسان می‌باشد. مقدار کنیدیوسپورهای شمارش شده‌ی ظاهر شده در سطح برگ‌ها ۷ روز پس از تلقیح در موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat با تعداد آنها برای موتانت *eds1* متفاوت نمی‌باشد (شکل ۷). از طرف دیگر کنیدیوسپورهای شمارش شده برای لاین *PGase*::35S هم تقریباً در حدود تعداد کنیدیوسپورهای شمارش شده برای Col-0 می‌باشد.

تجزیه و تحلیل بیان ژن *PGase* در اندام‌های مختلف گیاه

به‌منظور شناسایی محل‌های فعال برای بیان ژن *PGase* در اندام‌های مختلف گیاه، ریشه، برگ، ساقه و گل توسط Semi Quantitative RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله از این آزمایش‌ها نشان داد که، ژن *PGase* در حالت کلی از سطح پایین بیان mRNA برخوردار می‌باشد و عمدتاً بیان آن مربوط به ریشه‌ها و ساقه‌ها بوده و سطح بسیار پایینی از mRNAی آن در برگ‌ها و گل‌ها قابل ردیابی می‌باشد.

ژنوم گیاه آرابیدوپسیس دارای ۶۹ عدد ژن رمزگردان به آنزیم‌های پلی گالاکتوروناز‌ها که دارای تشابهات توالی‌های نوکلئوتیدی هستند می‌باشد (۱۰). همان‌طور که ذکر شد این آنزیم‌ها در پدیده‌های مختلفی نظیر جوانه‌زنی بذرها، رشد

۱- enhanced disease susceptibility

Archive of SID

www.SID.ir

سلول‌ها، بالغ شدن دانه‌های گرده، رسیدن میوه‌ها، ریزش برگ‌ها، گل‌ها و شکوفایی بساک توسط تنظیم دیواره‌های سلولی نقش دارند (۱۰ و ۱۱).

تاکنون اشاره‌ای به نقش مستقیم آنها در مقاومت یا حساسیت گیاهان به بیمارگرها نشده است و نتایج این تحقیق برای اولین بار به نقش آنها در این زمینه اشاره دارد. درخت فیلوژنتیکی مربوط به این ژن‌ها توسط گونزالز - کورانزا و همکاران (۱۰) تهیّه شده است. مطالعه و ارزیابی مولکولی پنج ژن از دو شاخه‌ی جداگانه این درخت فیلوژنتیکی، (PGAZAT = AT2g41850، PGDZAT = AT3g57510، AT3g07970، AT1g80170 و AT2g43860) با استفاده از ساختارهایی که در آن ژن‌های نشان‌گر به توالی‌های رمزگردان این ژن‌ها پیوند یافته بودند و واکنش‌های رونویسی معکوس زنجیره‌ای پلی مرازی (RT-PCR) مشخص کرد، اگر چه همه‌ی این پنج ژن دارای تشابهات زیادی از لحاظ توالی‌های نوکلئوتیدی می‌باشند ولی دارای الگوهای بیان متفاوتی هستند (۱۰). بنابراین، الگوهای مختلف بیان ژن‌های مورد مطالعه می‌توانند اشاره به نقش‌های متفاوت ژن *PGase* = AT3g07970 با ژن‌های PGAZAT و PGDZAT که به‌ترتیب در جدا شدن و شکوفایی اندام‌های گیاهی نقش دارند، داشته باشد. هم‌چنین، آنها نشان دادند زمانی که قطعه‌ای ۱۴۲۹ جفت بازی از توالی آغازگر ژن AT3g07970 به ژن نشان‌گر GUS پیوند داده شود، بیان ژن نشانگر در هیچ نقطه‌ای از گیاه به‌طور مشخص قابل ردیابی نخواهد بود (۱۰)، که این بخش از نتایج آنها با نتایج آزمایش‌های این تحقیق، که اشاره به سطح پایین بیان ژن *PGase* در اندام‌های گیاهی دارد، سازگار می‌باشد. متابولیزم درونی دیواره‌های سلولی به‌وسیله‌ی آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی آنها مانند PGases، PELs، PMEs و expansinها، که در فرآیندهای مختلف سلولی نقش‌های مهمی دارند، آلودگی گیاهان به بیمارگرها را تسهیل می‌کنند (۱۲). این امر احتمالاً به این دلیل می‌باشد که در اثر فعالیت این آنزیم‌ها، مواد موجود در دیواره‌ها از لحاظ فیزیکی قابل دسترس‌تر برای پروتئین‌های مخرب دیوارهای سلولی CWDPs خواهند بود و یا این که ممکن است آنزیم‌های مذکور، پلی ساکاریدهای دیواره‌ها را به مواد مناسب تغذیه‌ای برای بیمارگرها تبدیل کنند و به این ترتیب گیاهان به آلودگی بیمارگرها حساس‌تر می‌شوند (۸، ۹ و ۱۲).

مقاومت مشاهده شده در موتانت *pmr۶* مثال خوبی برای گفته‌های فوق می‌باشد. ژن *PMR۶* یکی از ۲۹ ژن رمزگردان برای آنزیم‌های PELs مانند می‌باشد و وجود این ژن آلودگی گیاه به بیمارگر *Erysiphe cichoracearum* بر روی بافت‌های رویشی گیاه را حمایت می‌کند. از آن‌جایی‌که مقاومت مشاهده شده در این موتانت مربوط به فعال شدن هیچ‌یک از مسیرهای شناخته شده دفاعی گیاه نمی‌باشد و چون در دیواره‌های سلولی این موتانت تغییرات قابل ملاحظه‌ای در محتوای پکتین در مقایسه با دیواره‌های سلولی گیاه تیپ وحشی وجود دارد، که تغییرات فوق منجر به ظهور تغییرات مورفولوژیکی در این موتانت‌ها نیز می‌شود، لذا مقاومت مشاهده شده در این موتانت در برابر این

Archive of SID

www.SID.ir

بیمارگر به فقدان عملکرد این ژن‌ها نسبت داده می‌شود (۱۴، ۱۵ و ۱۹).

به عبارتی دیگر، ژن *PMR۶* نقش تجزیه‌ای روی پکتین داشته و با فقدان عملکرد آن، بیمارگر به‌راحتی قادر به تغذیه از گیاه نبوده و به این ترتیب گیاه نسبت به بیمارگر مقاوم‌تر می‌شود.

بنابراین، در حالت کلی این‌طور می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آنزیم‌های تجزیه کننده‌ی دیواره‌های سلولی به‌عنوان فاکتورهای حساسیتی گیاه عمل می‌کنند و معمولاً بیمارگرهای گیاهان از آنها به‌عنوان عوامل آزارگری جهت مورد هدف قرار دادن و تجزیه‌ی پلی ساکاریدهای دیواره‌ها استفاده می‌کنند و اغلب گیاهان با از دست دادن این آنزیم‌های درونی تجزیه کننده، در برابر بیمارگرها مقاوم‌تر می‌شوند.

نتایج این تحقیق نشان دادند که موتانت‌های جهش یافته برای ژن *PGase* که تنها دارای ۳۰٪ بیان ژن هستند، دارای حساسیت بالاتری مشابه با حساسیت موتانت حساس *eds1* به آلودگی با بیمارگر فوق الذکر بوده (شکل ۶ و ۷) و این حساسیت در لاین 35S::*PGase* تا حد زیادی برطرف شده و به حد حساسیت گیاه تیپ وحشی رسید (شکل ۶).

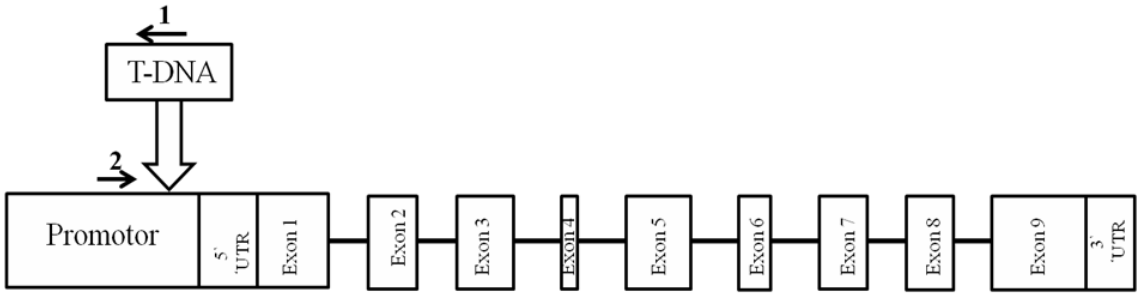
حال سؤالی که مطرح می‌باشد این است که چرا در موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat که دارای ۳۰٪ سطح فعال از آنزیم پلی گالاکتوروناز هستند، در مقایسه با نتایج موتانت‌های *pmr۵* و *pmr۶* به‌جای این‌که گیاه نسبت به آلودگی بیمارگر مقاوم‌تر شوند، حساس‌تر شده‌اند.

حساسیت افزایش یافته‌ی این موتانت‌ها به آلودگی با بیمارگر که به‌صورت افزایش میزان رشد ریسه‌های بیمارگر و سطح بالاتری از کنیدی اسپورهای ظاهر شده دیده می‌شود، به‌صورت‌های زیر ممکن است توجیه شود. چون نقش اساسی پکتین‌ها، که تصور می‌شود دراین موتانت‌ها به‌علت فقدان عملکرد آنزیم پلی گالاکتوروناز تحت تأثیر قرار گرفته است، برقراری ارتباط بین سلول‌های مجاور و چسباندن آنها به یکدیگر می‌باشد، بنابراین ممکن است در این موتانت‌ها سلول‌های مجاور به‌طور مناسبی به یکدیگر نچسبیده و در نتیجه باعث تسهیل ورود بیمارگر و حساس‌تر شدن گیاه می‌شوند.

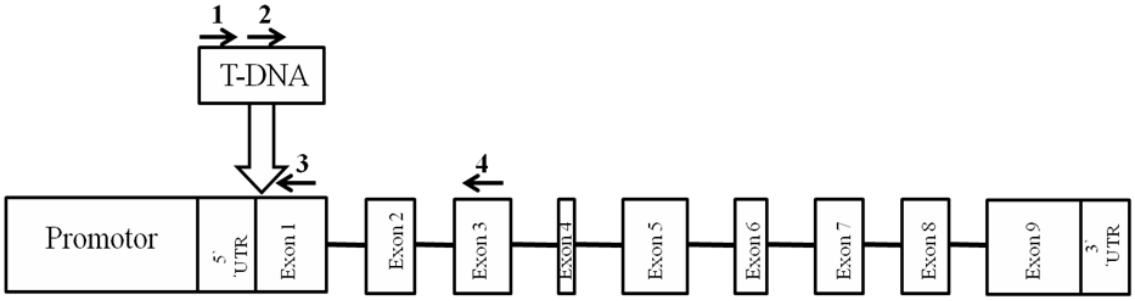
علاوه بر این، همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد، دیواره‌های سلولی گیاهان منابع بالقوه‌ای از الیگوساکاریدهای تحریک کننده‌ی پاسخ‌های دفاعی گیاهان می‌باشند. لذا ممکن است ژن جهش یافته‌ی *PGase* در تولید این الیگوساکاریدها نقش داشته و کاهش بیان آن و فقدان عملکرد آنزیم کد شونده توسط آن، باعث عدم تولید این الیگوساکاریدها و عدم تحریک سیستم‌های دفاعی گیاه شده و به این ترتیب موتانت‌های فوق نسبت به آلودگی بیمارگر حساس‌تر می‌شوند و در مقابل در لاین 35S::*PGase* و گیاه تیپ وحشی با فعالیت معمولی این آنزیم این نقص‌ها برطرف شده، سلول‌های مجاور به‌طور مناسبی به یکدیگر پیوند داشته و هم چنین الیگو ساکاریدهای محرک سیگنال‌دهنده تولید شده و منجر به پاسخ‌های دفاعی معمول گیاه در برابر آلودگی به بیمارگر می‌شوند.

Archive of SID

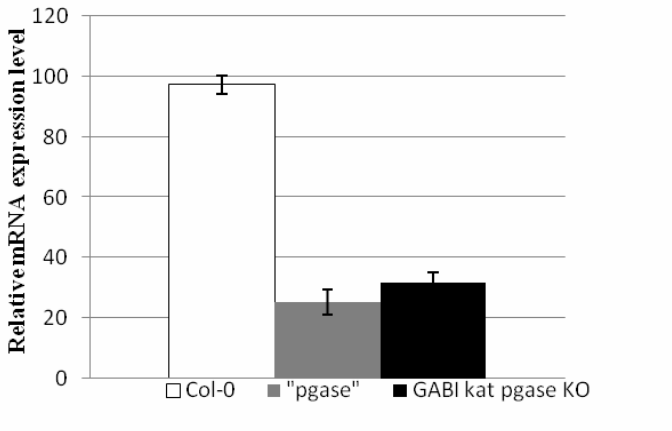
www.SID.ir



شکل ۴- سازماندهی ژنومی مکان درج شدن T-DNA در موتانت *pgase* T-DNA در این موتانت در توالی آغازگر ژن AT3g07970، ۳۷۱ جفت باز در بالادست Codon آغازین ترجمه‌ای این ژن، درج شده است. شماره‌های ۱ و ۲ اشاره به آغازگرهای استفاده شده جهت ارزیابی مولکولی این موتانت دارند.

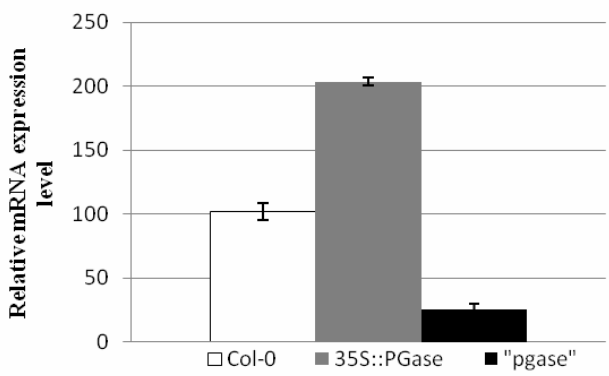


شکل ۴ - سازماندهی ژنومی مکان درج شدن T-DNA در موتانت T-DNA GABI-Kat در این موتانت در توالی اولین اگزون AT3g07970، ۵ جفت باز در پایین دست رمزهای سه تایی آغازین ترجمه‌ای آن درج شـده است. شماره‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ اشاره به آغازگرهای استفاده شده جهت ارزیابی مولکولی این موتانت دارند.

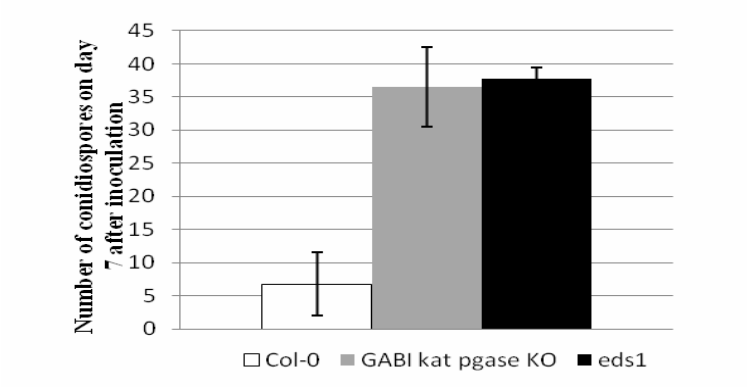


شکل ۴- میزان سطح mRNA تولید شده ژن *PGase* در برگ بر اساس نتایج واکنش‌های Semi quantitative RT-PCR در موتانت‌های *pgase* و GABI-Kat میزان بیان mRNA ژن *PGase* ۳۰ درصد سطح بیان آن در Col-0 می‌باشد.

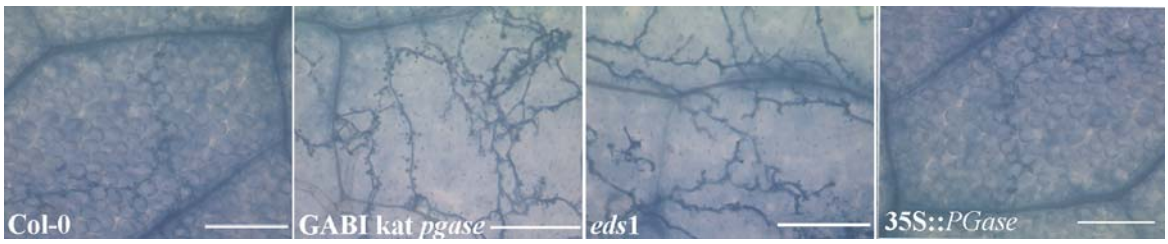
www.SID.ir



شکل ۷–میزان سطح mRNA تولید شده ژن *PGase* دربرگ بر اساس نتایج واکنش های Semi quantitative RT-PCR در لاین 35S::*PGase* میزان بیان mRNA ژن *PGase*، تقریبا به ترتیب ۹ برابر و ۲/۴ برابر بیشتر از سطح بیان آن در موتانت *pgase* و گیاه Col-0 می‌باشد.



شکل ۷ - تعداد کنیدسپورهای ظاهر شده درسطح برگ‌های ژنوتیپ‌های مختلف ۷ روز بعد از آلودگی بیمارگر تعداد کنیدسپورهای ظاهر شده در موتانت GABI-Kat کمابیش مشابه با تعداد آنها در موتانت حساس *eds*1 می‌باشد.



شکل ۷– تعداد ریسه های رشد کرده دربرگ‌های ژنوتیپ‌های مختلف سه روز پس از آلودگی با نژاد NOCO بیمارگر که با Trypan blue رنگ آمیزی شدند، خط مقیاس= ۵۰ میکرومتر تعداد ریسه‌های رشد یافته در موتانت GABI-Kat کمابیش مشابه با ریسه‌های رشد یافته در موتانت حساس *eds1* می‌باشد و حساسیت مشاهده شده در لاین 35S::*PGase* برطرف شده است.

www.SID.ir

منابع مورد استفاده

1- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. Functional Plant Biology. 33(2): 103-119.

2- Smith, L.G. and D.G. Oppenheimer. 2005. Spatial control of cell expansion by the plant cytoskeleton. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 21(1): 271-295.

3- Thompson, D.S. 2008. Space and time in the plant cell wall: relationships between cell type, cell wall rheology and cell function. Annuals of Botany. 101(2): 203-211.

4- Cosgrove, D.J. 2005. Growth of the plant cell wall. Natural Review of Molecular Cell Biology. 6(11): 850-861.

5- Gibeaut, D.M. and N.C. Carpita. 1994. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides. FASEB Journal. 8(12): 904-915.

6- Mohnen, D. 2008. Pectin structure and biosynthesis. Current Opinion in Plant Biology. 1(3): 266-277.

7- Taiz, L.a.Z., Eduardo. 1998. Plant physiology. 2nd edition ed.: Singapour Association.

.

8- Cantu, D., A.R. Vicente, J.M. Labavitch, A.B. Bennett, and A.L.T. Powell. 2008. Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. Trends in Plant Science. 13(11): 610-617.

9- Cantu, D., A.R. Vicente, L.C. Greve, F.M. Dewey, A.B. Bennett, J.M. Labavitch, and A.L.T. Powell. 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 105(3): 859-864.

10- Gonzalez-Carranza, Z.H., K.A. Elliott, and J.A. Roberts. 2007. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in *Arabidopsis thaliana*. Journal Experimental Botany. 58(13): 3719-3730.

11- Gonzalez-Carranza, Z.H. 2002. Temporal and spatial expression of a polygalacturonase during leaf and flower abscission in oilseed rape and Arabidopsis. Plant Physiology. 128 (2): 534-543.

12- Vorwerk, S., S. Somerville, and C. Somerville. 2004. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. Trends in Plant Science. 9(4): 203-209.

13- Humphrey, T.V., D.T. Bonetta, and D.R. Goring. 2007. Sentinels at the wall: cell wall receptors and sensors. New Phytologist. 176 (1): 7-21.

14- Vogel, J.P., T.K. Raab, C.R. Somerville, and S.C. Somerville. 2004. Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. The Plant Journal. 40 (6): 968-978.

Archive of SID

www.SID.ir

15- Vogel, J.P., T.K. Raab, C. Schiff, and S.C. Somerville. 2002. *PMR6,* a pectate lyase-like gene required for powdery mildew susceptibility in arabidopsis. Plant Cell. 14(9): 2095-2106.

16- Clough, S.J. and A.F. Bent. 1998. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana.* The Plant Journal. 16(6): 735-743.

17- Sauerbrunn, N. and N.L. Schlaich. 2004. PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. Planta. 218: 552-561.

18- Hermanns, M., A.J. Slusarenko, and N.L. Schlaich. 2003. Organ-specificity in a plant disease is determined independently of R gene signaling. Molecular Plant- Microbe Interaction. 16(9): 752-759.

19- Hernandez-Blanco, C. 2007. Impairment of cellulose synthesis required for *Arabidopsis* secondary cell wall formation enhances disease resistance. Plant Cell. 19(3): 890-903.

20- Slusarenko, A.J. and N.L. Schlaich, 2003. Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *peronospora parasitica*). Molecular Plant Pathology. 4(3): 159-170.

Archive of SID

www.SID.ir