Archive of SID

Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 51, No 3, Autumn2020 (611-620)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.281885.1652

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۱، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۹ (ص ۶۲۰-۶۱۱)

تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در رقم های حساس و متحمل گلابی در واکنش به حمله عامل بیماری آتشک و بازدارنده‌های زنجیره الکترونی کلروپلاست و میتوکندری

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

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران

۲. دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۳. دانشیار، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۲)

چکیده

بیماری آتشک به عنوان مهم‌ترین بیماری درخت گلابی، از طریق تنش اکسیداتیو سبب بروز نکروز بافت‌های میزبان می‌شود. لذا شناخت رقم های متحمل و ساختارهای مقاومت به تنش اکسیداتیو بیماری، که عمدتاً با کلروپلاست‌های میزبان مربوط است، در برنامه‌های گزینشی این درخت کاربرد دارد. به‌منظور مطالعه رفتار کلروپلاست‌ها در این اثر متقابل، تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* به‌عنوان ژن کلیدی و تأثیرپذیر از سطح اکسیداسیون-احیا سلولی در دو رقم گلابی حساس (ویلیامز) و متحمل (هاروسوئیت) به بیماری، طی دوره ۴۸ ساعته پس از حمله باکتری عامل بیماری، *Erwinia amylovora* در شرایط درون شیشه ای در شاخه‌چه‌های شاهد و آلوده‌شده با سویه Ea273 بررسی شد. علاوه بر این شرایط، تظاهر ژن فوق در شرایط استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون دو اندامک میتوکندری و کلروپلاست به‌ترتیب شامل روتنون و گلوتارآلدهید هر دو در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر مقایسه شد. نتایج بیانگر سرعت بیش‌تر پیشرفت نکروز در سرشاخه‌ها درون شیشه ای رقم حساس بود. همچنین تظاهر ژن *psbA* در شرایط تیمار با بازدارنده‌های گلوتارآلدهید و روتنون در هردو شرایط حضور و عدم حضور عامل بیماری، به‌طور قابل‌توجهی در رقم هاروسوئیت افزایش تظاهر نسبی بیش‌تری در مقایسه با رقم بارتلت داشت. بر این اساس، تحمل بالاتر رقم هاروسوئیت به بیماری می‌تواند از تحریک‌پذیری و واکنش سریع‌تر کلروپلاست‌های این رقم در مقایسه با رقم بارتلت منشأ گیرد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین D1، تنش اکسیداتیو، زنجیره انتقال الکترون، *Erwinia amylovora*.

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

Neda Samei Farahani[1], Hamid Abdollahi[2*] and Seyed Alireza Salami[3]

1. M.Sc. Student, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
3. Associate Professor, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: May 29, 2019 - Accepted: Jul. 24, 2019)

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.

Keywords: D1 protein, electron transport chain, *Erwinia amylovora*, oxidative stress**.**

* Corresponding author E-mail: h.abdollahi@areeo.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora*، مهم‌ترین بیماری درخت گلابی است (Maroofi & Mostafavi, 1996). این بیماری در ابتدا در ایالات متحده آمریکا مشاهده (van der Zwet & Keil, 1979) و سپس پس از حدود یک قرن گسترش در مناطق مختلف جهان، برای اولین بار در برغان کرج توسط Zakeri & Sharifnabi (1991) گزارش شد. بیماری آتشک به تدریج در بخش‌های گسترده‌ای از استان‌های شمال غرب کشور انتشار یافت (Mazarei*et al*., 1994) و سپس در سایر استان‌های کشت و پرورش درختان میوه دانه‌دارسبب ایجاد خسارت گسترده به باغات شد.

باکتری عامل بیماری آتشک از تیره انتروباکتراسه (*Entrobacteraceae*) و گرم منفی است (van der Zwet and Keil, 1979). این باکتری پروتئین‌های مؤثره مختلفی، از جمله HrpA، HrpN، HrpW، AvrRpt2 و HopC1 و پروتئین‌های اختصاصی بیماری (Disease-Specific Proteins) نظیر DspA/Eتولید و با کلونیزه کردنبافت‌ها، سبب ایجاد نکروز و در نهایت مرگ سلولی و پیشرفت بیماری می‌شود (Oh & Beer, 2005; Oh *et al*., 2010). مشخص شده که تنش اکسیداتیو و تولید گونه‌های مختلف فعال اکسیژن (Reactive Oxygen Species-ROS)، در اثر متقابل عامل بیماری با گیاهان میزبان، نقش کلیدی در ایجاد علائم بیماری و همچنین ایجاد تحمل و یا مقاومت بر عهده دارد (Venisse *et al*., 2001; Azarabadi, 2014; Ebadi *et al*., 2014). به طور کلی دو ارگانل کلروپلاست و میتوکندری، نقش کلیدی در تولید گونه‌های مختلف اکسیژن فعال داشته (Bhattacharjee, 2011) و نقش هر دو ارگانل در اثر متقابل بین باکتری عامل بیماری آتشک با سلول‌های گیاهی گزارش شده است (Abdollahi *et al*., 2015; Xie & Chen, 2000). همچنین ارزیابی سطح تحمل ارقام مختلف درختان میوه دانه‌دار نسبت به بیماری آتشک در برنامه‌های تحقیقاتی متعدد در کشور، در رابطه با درختان سیب در شرایط گلخانه‌ای و باغی (Davoudi, 1998; Abdollahi & Majidi Heravan, 2005; Maleki Balajoo *et al*., 2011)، در ارقام و ژنوتیپ‌های درخت به در شرایط گلخانه‌ای و باغی (Abdollahi *et al*., 2008; Mehrabi Pour *et al*., 2010; Ahmadi *et al*., 2013) و در ارقام گلابی نیز همانند دو درخت قبلی در هر دو شرایط گلخانه‌ای و باغی (Davoudi, 1998; Erfani *et al*., 2013; TahzibiHagh & Abdollahi, 2009; Davoudi *et al*., 2005) انجام گرفته است. همچنین در بررسی‌های ارزیابی ساختارهای مقاومت ارقام گلابی به بیماری، گزارش شده که در بین گونه‌های مختلف اکسیژن فعال، نقش پراکسیدهیدروژن (H_2O_2) بیش‌تر به صورت دفاعی است، به نحوی که در رقم نیمه متحمل اسپادونا (Spadona)، تولید سریع‌تر پراکسیدهیدروژن سبب کاهش سرعت پیشرفت بیماری در مقایسه با رقم های حساس‌می‌شود (Abdollahi *et al*., 2015).

گزارش‌های فوق نشان می‌دهد که تعیین ارتباط بین تنش اکسیداتیو سلول‌های میزبان و ترتیب و میزان تولید هر یک از گونه‌های فعال اکسیژن پراکسیدهیدروژن، سوپراکساید (O_2^-) و هیدروکسیل (OH^-) و منشأ تولید هر یکی از آنها در کلروپلاست و میتوکندری و چگونگی واکنش‌های هریک از ارگانل‌های فوق با این تنش، می‌تواند نقش مؤثری در شناسائی مکانیسم‌های تحمل به بیماری داشته باشد. در این بین، ژن *psbA* به عنوان یکی از ژن‌های کلیدی کدکننده پروتئین D1 در زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست، از شاخص‌های مفید در شناسائی رفتار ارگانل کلروپلاست و تنش اکسیداتیو بیماری می‌باشد (Trebitsh and Danon, 2001). از سوی دیگر، استفاده از بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری هر کدام به‌نوبه خود می‌تواند با خاموش و یا روشن‌کردن تنش اکسیداتیو حاصل از عامل بیماری، تا حدودی بیانگر میزان تأثیر آن ارگانل در اثر متقابل عامل بیماری آتشک با سلول‌های میزبان باشد (Abdollahi *et al*., 2015; Xie & Chen, 2000). با توجه به موارد فوق، در این تحقیق به بررسی مقایسه‌ای تظاهر ژن *psbA* به عنوان یک ژن کلیدی و تأثیرپذیر از تنش‌اکسیداتیو در رقم‌های حساس و متحمل گلابی در طی حمله عامل

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری آتشک پرداخته شد. همچنین این تظاهر در شرایط حضور بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری با توجه به نقش این دو ارگانل در بروز تنش اکسیداتیو بیماری ارزیابی و مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و جدایه باکتری

بررسی رفتار رقم های گلابی حساس و متحمل به بیماری آتشک به‌ترتیب شامل رقم حساس ویلیامز (Williams) با نام معادل بارتلت (Bartlett) (van der Zwet&Keil, 1979) و رقم متحمل هاروسوئیت (HarrowSweet) در شرایط درون شیشه در واکنش به حمله عامل بیماری انجام شد. برای ارزیابی مقاومت در شرایط درون‌شیشه، ارقام فوق به وسیله کشت ریزقلمه در محیط درون شیشه مستقر شدند. به این منظور، در آغاز فصل بهار سرشاخه‌های نورسته و عاری از ویروس رقم های فوق از گیاهان مادری تهیه و در آزمایشگاه به قطعات تک جوانه تقسیم و بعد از شستشو و سترون کردن، آنها را به ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت پایه MS (Murashige and Skoog, 1962)، حاوی یک میلی‌گرم در لیتر BA (Benzyl adenine)(Merck, Catalog no. 101701)، ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA (1-Naphthylacetic acid) (Merck, Catalog no. 806862)، ۳۰ میلی‌گرم در لیتر سوکروز که با ۰/۶ درصد آگار جامد شده بود، منتقل و سپس در اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت نور (ایجاد شده با لامپ‌های فلئورسنت سفید با شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع بر ثانیه) و ۸ ساعت تاریکی و در دمای شبانه روزی ۱± ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از استقرار و رشد اولیه شاخه‌چه‌های تازه رشد کرده و فاقد آلودگی، به‌منظور تسریع در سرعت پرآوری، به محیط QL تغییریافته براساس روش Leblay *et al*. (1991) و Mansouryar *et al*. (2016) با افزایش میزان کلسیم به ۶/۴ میلی‌مول، آمونیوم به ۷/۵ میلی‌مول و نیترات به ۳۷/۶ میلی‌مول در مقایسه با QL معمولی (Quoirin & Lepoivre, 1977) و با نسبت تنظیم‌کننده‌های رشد بهینه‌سازی‌شده برای گلابی‌های گونه *P. communis* L. بر اساس Abdollahi *et al*. (2005) و Nourmohammadi *et al*. (2015)شامل یک میلی‌گرم بر لیتر BA، یک میلی‌گرم برلیتر 2iP (6-γ,γ-Dimethylallylaminopurine) (Sigma-Aldrich, Catalog no. D5912)، ۰/۱ میلی‌گرم بر لیتر NAA و همچنین یک گرم بر لیتر پکتین مرکبات منتقل شدند. همچنین مواد گیاهی مورد استفاده با فواصل زمانی ۶ هفته یکبار مورد زیر کشت قرار گرفتند.

پس از تولید ریزشاخه‌ها مورد نیاز، به‌منظور تلقیح با باکتری و ارزیابی میزان و سرعت پیشرفت نکروز در اثر متقابل بین باکتری عامل بیماری آتشک با رقم های گلابی، سویه Ea273 عامل بیماری (ATCC No. 49946, USA) در محیط کشت لوریا-برتانی (LB) مایع، شب‌گذران شد. به‌منظور تلقیح مواد گیاهی درون‌شیشه، روش Abdollahi *et al*.(2004) مورد استفاده قرار گرفت. به این منظور، غلظت مایه تلقیح مورد استفاده در بافر فسفات خنثی (pH برابر ۷) اتوکلاو شده، روی کدورت یک (OD=1) به‌منظور به حداقل رساندن احتمال فرار سرشاخه‌ها از آلودگی، تنظیم شد. به‌منظور کشت توام، ۷۵ میکرولیتر مایه تلقیح به لوله آزمایش حاوی محیط کشت QL افزوده و سپس ریزشاخه‌چه‌های ۳ تا ۴ سانتی‌متری که دارای طول میانگره‌های یکنواختی بودند، در محیط مستقر شدند. مقایسه سرعت پیشرفت نکروز بر اساس دو شاخص درصد طول شاخه‌چه نکروزه به طول کل شاخه‌چه و درصد میانگره‌های نکروزه به تعداد کل میانگره‌ها در بازه زمانی پس از آلوده‌سازی بر اساس حداکثر زمان مورد نیاز برای رسیدن نکروز به ۱۰۰٪ در شاخه‌چه‌های هر دو رقم گلابی و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت استفاده شد.

به‌منظور ارزیابی فعالیت باکتری در محیط رشد که سبب افت سریع pH در مقایسه با گیاه می‌گردد، محلول مادری نشانگر برموکرزول سبز (Green bromocersol) با غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر به محیط‌های کشت اضافه شد. تغییرات pH محیط با استفاده از محلول‌های استاندارد pHحاوی نشانگر فوق به صورت مقایسه‌ای در طول آزمایش‌ها بر اساس سیستم ارزیابی اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک و گلابی (Abdollahi *et al*., 2004) ردیابی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین با هدف ارزیابی تأثیر دو ارگانل میتوکندری و کلروپلاست، بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون این دو اندامک به‌ترتیب شامل دو بازدارنده روتنون و گلوتارآلدهاید در غلظت یک میلی‌گرم بر لیتر با استفاده از فیلترهای سرنگی ۰/۲ میکرومتر به محیط کشت توأم اضافه شد.

تظاهر ژن *psbA* در اثر متقابل در شرایط شاهد بدون حضور باکتری، شاهد آلوده شده با باکتری عامل باکتری در زمان‌های صفر، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد از آلوده سازی (دوره زمانی فاقد ظهور علائم نکروز) مورد مقایسه قرار گرفت. انتخاب زمان‌های فوق بر اساس زمان مورد نیاز به‌منظور برداشت شاخه‌چه‌های فاقد نکروز و جلوگیری از تداخل نتایج افت تظاهر ژن با نابودی بافت‌های ناشی از نکروز بود. کلیه آزمایشات در ۵ تکرار انجام و محاسبات آماری و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار اکسل(Microsoft Excel-USA, 2003) انجام شد.

استخراج RNA گیاهان میزبان در زمان‌های فوق بر اساس روش ارائه‌شده توسط Hassani *et al*. (2015) انجام و صحت استخراج RNAکل با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز ۰/۸٪ انجام شد. آغازگرها به کمک اطلاعات موجود در بانک های اطلاعاتی طراحی و دو آغازگر پیشرو و پسرو ژن*psbA* بر اساس پارامترهای مناسب برای Real-Time PCR و با استفاده از نرم‌افزارPrimer3Plus سفارش داده شد. پارامترهای فیزیکی آغازگر با استفاده از نرم‌افزار OligoCalculator تأیید و همچنین آغازگرهای ژن *rbcl-rt* به عنوان ژن خانه‌دار (Housekeeping) مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگر پیشرو و پسرو ژن *rbcl-rt* به‌ترتیب به‌صورت، CTACTGGTACATGGACAACTG و AATTGATTTTCTTCTCCAGCAACG بوده و واکنتش سنتز cDNA با استفاده از کیت iScriptcDNAsynthesis شرکت BIO-RAD مطابق دستورالعمل کیت این شرکت انجام شد. واکنش Real-TimePCR با استفاده از کیت Solisbiodyne و در شرکت اومیکس (کرج-ایران) انجام گرفت و نیز به‌منظور افزایش اختصاصیت از آنالیز منحنی ذوب نیز استفاده شد. میزان بیان ژن‌ها با ژن خانه‌دار *rbcl-rt* به‌عنوان کنترل داخلی نرمال شد و سپس میزان تغییرات بیان ژن در نمونه‌های مورد بررسی، مورد تجزیه و $\triangle\triangle CT$ تحلیل شد.

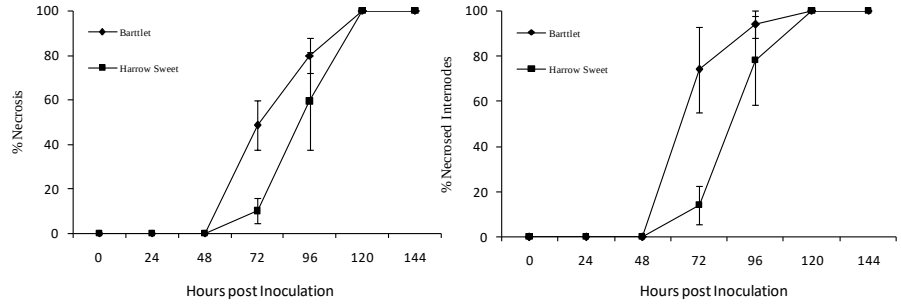
نتایج و بحث

نتایج بیانگر موفقیت کامل مایه‌زنی در دو رقم گلابی مورد آزمایش در محیط درون‌شیشه بود و در هیچیک از شاخه‌چه‌های تلقیح شده با باکتری عامل بیماری، فرار از آلودگی مشاهده نشد. همچنین هیچیک از شاخه‌چه‌های شاهد، علائم نکروز نشان ندادند. از سوی دیگر، با توجه به انتخاب دو رقم با میزان حساسیت متفاوت به بیماری آتشک، با استفاده از هر دو شاخص درصد پیشرفت نکروز و درصد میانگره‌های نکروزه، علائم در هر دو رقم پس از گذشت ۴۸ ساعت ظاهر شد، لیکن در رقم حساس بارتلت با سرعت بیش‌تری در طول سرشاخه‌ها پیشرفت کرد و در نهایت هر دو شاخص فوق پس از ۱۲۰ ساعت از آلوده‌سازی به ۱۰۰ درصد بالغ شد (شکل ۱). با توجه به نتایج ارزیابی‌های قبلی در شرایط درون شیشه، مشخص می‌گردد که ارزیابی مقاومت به آتشک در این شرایط به دلیل عدم حضور بافت‌های چوبی،فقط به صورت تأخیر در پیشرفت علائم و نه به صورت توقف بیماری تظاهر می‌یابد (Abdollahi *et al*., 2014). در بررسی Erfani *et al*. (2013) و Abdollahi & Salehi (2018) حتی در رقم گلابی مقاوم و یا بسیار متحمل به آتشک درگزی، ارزیابی درون‌شیشه‌ای حاکی از تأخیر پیشرفت نکروز در مقایسه با ارقام حساس‌تر در رقم فوق بود که با نتایج این تحقیق منطبق است.

علاوه بر تأخیر در پیشرفت علائم نکروز در رقم متحمل هاروسوئیت در واکنش به عامل بیماری آتشک، کاربرد دو بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید و میتوکندریایی روتنون در بررسی‌های قبلی انجام گرفته سبب تأخیر در بروز نکروز در سرشاخه‌های هر دو رقم گلابی مورد بررسی شده است (Abdollahi *et al*., 2015; Azarabdi *et al*., 2014). اثبات شده است که هر دو زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست و میتوکندری، دو ارگانل اصلی درگیر در تولید گونه‌های اکسیژن فعال می‌باشند (Bhattacharjee, 2011).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. مقایسه پیشرفت نکروز حاصل از عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* بر اساس دو شاخص درصد میانگره‌های نکروزه (چپ) و درصد طول شاخه نکروزه (راست) در شاخه‌چه‌های درون شیشه ای گلابی رقم حساس به آتشک بارتلت و رقم متحمل به آتشک هاروسوئیت.

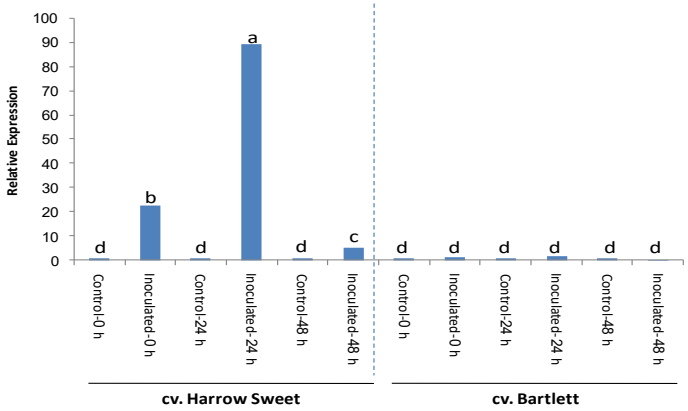
Figure 1. Comparison of the necrosis progress caused by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora*, in *in vitro* pear shootlets according to percentage of necrosed internodes (left) and percentage of necrosed shootlet length in susceptible cultivar, Bartlett, and tolerant cultivar, Harrow Sweet.

از سوی دیگر به‌خوبی ثابت شده که تنش حمله بیماری آتشک دارای ماهیت اکسیداتیو بوده (Venisse*et al*., 2001; Venisse *et al*., 2002) و گونه‌های اکسیژن فعال حاصل از این تنش، سبب اضمحلال بافت‌ها و بروز نکروز در بافت‌های میزبان و حتی ایجاد واکنش فوق حساسیت به‌منظور توقف گسترش باکتری عامل بیماری در بافت‌های غیر میزبان نظیر گیاه توتون و آرابیدوپسیس می‌شود (Abdollahi *et al*., 2015; Xie & Chen, 2000). بر این اساس، چنین انتظار می‌رود که استفاده از بازدارنده‌های زنجیره‌های الکترونی فوق در غلظت‌های پائین و غیرسمی برای بافت‌های میزبان، سبب تأخیر در بروز علائم بیماری و نکروز حاصل از آن شوند.

مقایسه تظاهر ژن *psbA* در دو رقم گلابی حساس بارتلت و متحمل هاروسوئیت نشان‌دهنده واکنش بسیار سریع افزایش تظاهر این ژن در کلروپلاست‌های رقم متحمل هاروسوئیت و عدم واکنش قابل توجه آن در رقم حساس بارتلت بود (شکل ۲). بر اساس نتایج میزان افزایش تظاهر این ژن در سرشاخه‌های آلوده شده رقم هاروسوئیت در زمان آلوده‌سازی به حدود ۲۰ برابر و در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از آلوده‌سازی ۹۰ برابر و پس از گذشت ۴۸ ساعت که ابتدای ظهور علائم در بافت‌ها بود کاهش قابل توجهی در مقایسه با دو بازه زمانی قبلی نشان داد (شکل ۲). این کاهش میزان تظاهر ژن *psbA* قبل از بروز علائم ظاهراً از آغاز نکروزه شدن بافت‌ها منشأ گرفته و بر این اساس بررسی تظاهر در بازه‌های زمانی بعدی فاقد کارایی خواهد بود که با بررسی Abdollahi (2003) در رابطه با مقایسه تظاهر ژن‌های هسته و ارگانل‌های کلروپلاست و میتوکندری در واکنش به حمله بیماری آتشک منطبق است. از طرف دیگر افزایش قابل توجه تظاهر ژن *psbA* در رقم هاروسوئیت و عدم واکنش محسوس در رقم بارتلت حاکی از واکنش سریع‌تر کلروپلاست‌های سلول‌های میزبان رقم هاروسوئیت می‌باشد. بررسی‌ها نشان داده است که تظاهر ژن *psbA* در کلروپلاست‌های گیاهی به‌شدت متأثر از سطح ردوکس یا همان اکسیداسیون و احیای سلولی است (Balmer *et al*., 2004). بر این اساس کوچک‌ترین تغییرات در سطح اکسیداسیون و احیا به سرعت در تظاهر این ژن خودنمایی می‌کند. داده‌های این تحقیق نشان می‌دهد که در رقم هاروسوئیت ظاهراً تغییرات سطح اکسیداسیون و احیایسلول‌های میزبان با سرعت بیش‌تری در مقایسه با رقم حساس بارتلت بروز می‌کند. این نتایج با بررسی‌های متعدد انجام گرفته که حاکی از سرعت بیش‌تر ارقام متحمل گلابی، به‌ویژه رقم هاروسوئیت در تولید پراکسید هیدروژن در مقایسه با رقم‌های حساس‌تر می‌باشد، منطبق است (Azarabadi *et al*., 2016; Abdollahi *et al*., 2015; Salehi & Abdollahi, 2018). بر اساس این مقایسه می‌توان چنین جمع‌بندی کرد که حداقل در سطح ردوکس سلولی (عامل تنظیم تظاهر ژن *psbA*)، کلروپلاست‌های میزبان‌های متحمل به آتشک واکنش سریع‌تری به حمله بیماری نشان می‌دهند. درحالی‌که در رقم حساس، این واکنش در تغییر سطح اکسیداسیون و احیای سلولی بسیار نامحسوس‌تر بوده و در نتیجه تظاهر ژن *psbA* در آنها نیز کم‌تر تحت تأثیر قرار می‌گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲. مقایسه تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA*در رقم های گلابی حساس (بارتلت) و متحمل (هاروسوئیت) به بیماری آتشک در اثر متقابل با عامل باکتریایی بیماری،*Erwinia amylovora* در بازه زمانی صفر تا ۴۸ ساعت بعد از آلوده‌سازی در شرایط درون شیشه ای با سویه Ea273.

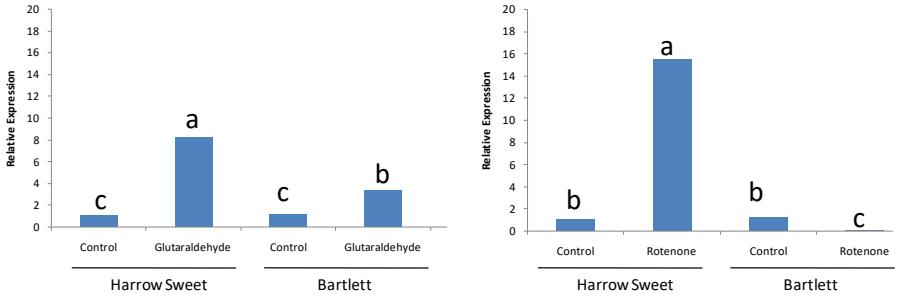
Figure 2. Comparison of the expression of chloroplastic *psbA* gene in susceptible (Bartlett) and tolerant (Harrow Sweet) pear cultivars in interaction with bacterial causal agent, *Erwinia amylovora* between 0 to 48 time-courses after in vitro inoculation by Ea273 strain.

مقایسه تأثیر بازدارنده‌های کلروپلاستی و میتوکندریایی گلوتارآلدهید و روتنون روی تظاهر ژن *psbA* در بافت‌های ارقام گلابی مورد بررسی نشان داد که استفاده از گلوتارآلدهید سبب افزایش تظاهر این ژن در هر دو رقم هاروسوئیت و بارتلت بود. لیکن میزان این افزایش در رقم هاروسوئیت با حدود ۸ برابر افزایش، قابل‌توجه‌تر بود (شکل ۳). در رابطه با بازدارنده روتنون، در رقم هاروسوئیت افزایش تظاهر ۱۴ برابری و در رقم بارتلت کاهش تظاهر را به‌همراه داشت (شکل ۳). به‌طورکلی، بازدانده‌های زنجیره الکترونی کلروپلاست سبب تغییر سطح اکسیداسیون و احیای این ارگانل و در نتیجه تغییر سطح اکسیداسیون و احیای سلولی می‌شوند (Trebitsh & Danon, 2001). لذا اثر استفاده از گلوتارآلدهید و تغییر میزان تظاهر ژن *psbA* با توجه به تأثیرپذیری بالای این ژن از سطح زدوکس سلولی چندان دور از انتظار نیست. لیکن به طور مشابهی با تأثیر تنش اکسیداتیو حمله بیماری آتشک روی تظاهر این ژن، در رقم هاروسوئیت اثر کاربرد گلوتارآلدهید اثرات بیش‌تری را به‌همراه داشت. این نتایج نیز تأکیدی بر وجود کلروپلاست‌های تحریک‌پذیرتر در رقم هاروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت خواهد بود. از سوی دیگر، استفاده از روتنون سبب افزایش تظاهر ژن *psbA* در رقم هاروسوئیت بود (شکل ۳). بررسی‌ها نشان داده که در سلول‌های گیاهی تعامل نزدیکی بین دو ارگانل کلروپلاست و میتوکندری از نظر تظاهر ژن‌ها و کنترل واکنش‌های دفاعی ناشی متأثر از سطح اکسیداسیون و احیای سلولی از طریق شبکه سنسوری تیوردوکسین (Thioredoxin) وجود دارد (Balmer *et al*., 2004). لذا دور از انتظار نخواهد بود که کاربرد بازدارنده میتوکندریایی روتنون سبب افزایش تظاهر ژن *psbA* در کلروپلاست شود. لیکن نکته قابل‌توجه، تأثیرپذیری بالاتر کلروپلاست رقم هاروسوئیت در این اثر متقابل در مقایسه با رقم بارتلت بود که خود دلیل سومی از نقش مؤثر و فعال‌تر این ارگانل در رقم هاروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت می‌باشد.

نتایج بررسی تظاهر ژن *psbA* در کلروپلاست‌های رقم ها در حضور و عدم حضور بازدارنده‌های زنجیره الکترون کلروپلاستی و میتوکندریایی نیز موید واکنش سریع‌تر کلروپلاست‌های رقم هاروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت بود (شکل‌های ۳ و ۴). در این رابطه اگرچه افزایش محسوسی در تظاهر این ژن در رقم بارتلت نیز در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در شاخه‌چه‌های آلوده شده با باکتری عامل بیماری آتشک و در حضور بازدارنده‌های مختلف مشاهده شد، لیکن میزان تأثیرپذیری کلروپلاست‌های رقم متحمل به آتشک هاروسوئیت، از این شرایط به‌طور قابل توجهی بیش‌تر بود (شکل‌های ۳ و ۴).

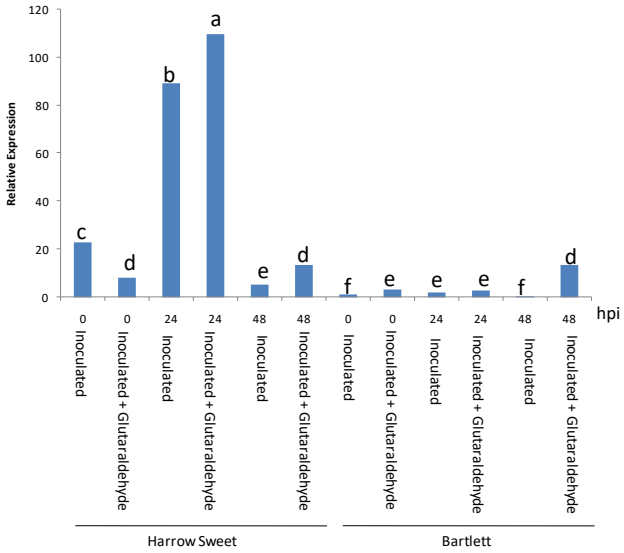
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. مقایسه تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در رقم های گلابی بارتلت و هاروسوئیت در شرایط عادی و حضور یک میلی‌گرم بر لیتر بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید و میتوکندریایی روتنون در شرایط درون شیشه ای.

Figure 3. Comparison of the expression of chloroplastic*psbA* gene in pear cultivars Bartlett and Harrow Sweet in normal condition and at presence of one mg per liter glutaraldehyde and rotenone, respectively as inhibitor of the electron transport chain of chloroplasts and mitochondria.



شکل ۴. مقایسه تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در شاخه‌چه‌های درون شیشه ای رقم های گلابی بارتلت (حساس) و هاروسوئیت (متحمل) در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی (hpi) با عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* Ea273 در حضور و عدم حضور یک میلی‌گرم بر لیتر بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی گلوتارآلدهید.

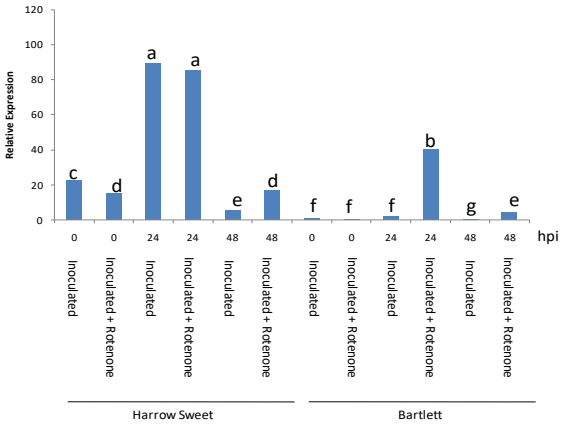
Figure 4. Comparison of the expression of chloroplastic *psbA* gene in in vitro shootlets of pear cultivars Bartlett (susceptible) and Harrow Sweet (tolerant) in 48 h post inoculation (hpi) time-course by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora* Ea273, at absence and presence of one mg per liter glutaraldehyde as inhibitor of the electron transport chain of chloroplasts.

این نتایج نیز همانند نتایج قبل، تأکید دیگری بر تحریک‌پذیری و واکنش قابل توجه‌تر کلروپلاست‌های رقم هاروسوئیت در مقایسه با رقم بارتلت از سطح ردوکس یا اکسیداسیون-احیای سلولی ناشی از هر دو ارگانل کلروپلاست و میتوکندری بود. در این رابطه، نتایج نشان می‌دهد که حتی بازدارنده میتوکندریایی روتنون، تأثیر قابل‌توجه و بیش‌تری روی ژن *psbA* در رقم هاروسوئیت دارد (شکل ۵).

در بررسی اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با میزبان با استفاده از سویه‌های موتانت در ژن‌های *hrpN*$^-$، *dsp*A/E$^-$ و *hrp*W$^-$ که ژن‌های دخیل در تولید سه پروتئین مؤثره اصلی این باکتری محسوب می‌شود، Taheri Shahrestani *et al.* (2017a,b) گزارش کرد که تأثیر متقابل دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E روی بیماری‌زایی و تحریک سیستم دفاع میزبان ارقام گلابی به‌ویژه توسط پروتئین مؤثره HrpN، به‌عنوان فاکتورهای اصلی تعیین سطح حساسیت بافت به بیماری آتشک به‌حساب می‌آید.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. مقایسه تظاهر ژن کلروپلاستی *psbA* در شاخه‌چه‌های درون شیشه ای رقم های گلابی بارتلت (حساس) و هاروسوئیت (متحمل) در بازه زمانی ۴۸ ساعت پس از آلوده‌سازی (hpi) با عامل بیماری آتشک، *Erwinia amylovora* Ea273 در حضور و عدم حضور یک میلی‌گرم بر لیتر بازدارنده زنجیره انتقال الکترون میتوکندریایی روتنون.

Figure 5. Comparison of the expression of chloroplastic *psbA* gene in *in* vitro shootlets of pear cultivars Bartlett (susceptible) and Harrow Sweet (tolerant) in 48 h post inoculation (hpi) time-course by fire blight causal agent, *Erwinia amylovora* Ea273, at absence and presence of one mg per liter rotenone as inhibitor of the electron transport chain of mitochondria.

از سوی دیگر بررسی‌های فوق در شرایط زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی فعال و غیر فعال بیانگر وجود شواهدی در نقش مؤثر پروتئین HrpNدر تحریک سیستم دفاعی میزبان در کلروپلاست‌ها و تعیین سطح مقاومت بافت به بیماری بوده است. این نتایج و گزارش‌های Taheri Shahrestani *et al.* (2017a,b) بیانگر وجود شواهد تعیین‌کننده مبنی بر نقش کلیدی کلروپلاست‌های تأثیرپذیر و فعال‌تر در ارقام متحمل گلابی نظیر رقم هاروسوئیت در مقابل حمله بیماری آتشک است. از سوی دیگر اگرچه این نتایج تا حد محدودی می‌تواند تعیین‌کننده واکنش این ارگانل در رقم های گلابی متحمل به بیماری آتشک باشد، مکانیسم‌های تحریک‌پذیری و دریافت سیگنال و همچنین نوع واکنش بروز داده‌شده از این ارگانل برای ایجاد ساختار دفاعی با هدف ایجاد تحمل به بیماری آتشک در بافت‌های میزبان دارای ابهام است. لذا لازم است در ادامه بررسی‌های اخیر، مکانسیم‌های دفاعی تأثیرپذیر از کلروپلاست‌ها و همچنین ساختارهای بیوشیمیایی و مولکولی دریافت سیگنال این ارگانل به‌منظور تعمیق هرچه بیش‌تر ساختارهای دفاعی علیه بیماری آتشک، به‌طور دقیق‌تری مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد به‌طورکلی کلروپلاست‌های رقم متحمل به آتشک هاروسوئیت تحریک‌پذیری و سرعت واکنش سریع‌تری در مقایسه با رقم حساس بارتلت برخوردار بوده و این امر در تظاهر ژن *psbA* در شرایط آلوده‌سازی با باکتری *E. amylovora* و حتی تیمارهای بازدارنده زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی و حتی میتوکندریایی به خوبی مشخص شد. با توجه به نقش کلیدی کلروپلاست‌ها در ساختارهای دفاعی بر علیه بسیاری از تنش‌های محیطی و از جمله نقش این ارگانل در اثر متقابل با عامل بیماری آتشک، تحمل به بین بیماری در رقم هایی نظیر هاروسوئیت می‌تواند از تحریک‌پذیری و واکنش سریع‌تر کلروپلاست‌های این رقم در مقایسه با رقم بارتلت منشأ گیرد. بر این اساس لازم است در آینده ساختارهای این تفاوت‌ها به طور عمیق‌تر و بنیادی‌تری مورد بررسی و مقایسه قرار گیرد.

سپاسگزاری

این تحقیق با تأمین مالی نگارنده اول مقاله به اجرا گذاشته شد. همچنین از زحمات پرسنل آزمایشگاه کشت بافت و بیوتکنولوژی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری مؤسسه تحقیقات باغبانی به‌ویژه سرکار خانم مهندس زینب صالحی به‌خاطر همکاری و کمک‌های شایان ایشان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

1. Abdollahi, H. (2010). *Pear, botany, cultivars and rootstocks*. Iranian Agricultural Ministry Publications. Tehran, Iran. (in Farsi)
2. Abdollahi, H. & Majidi Heravan, E. (2005). Relation between fire blight resistance and different vegetative and reproductive traits in apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. *Seed and Plant Journal*, 21, 501-513. (in Farsi)
3. Abdollahi, H., Ghahremani, Z., Erfani Nia, K. & Mehrabi, R. (2015). Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. *Photosynthesis Research*, 124, 231-242.
4. Abdollahi, H., Ghasemi, A. &Mehrabipour, S. (2008). Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, II. Resistance of genotypes to the disease. *Seed and Plant Journal* 24, 529-541. (in Farsi)
5. Abdollahi, H., Muleo, R. & Rugini, E. (2005). Study of basal growth media, growth regulators and pectin effects on micropropagation of pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. *Seed and Plant Journal*, 21, 373-384. (in Farsi)
6. Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E. & Muleo, R. (2004). *In vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*,79, 203-212.
7. Ahmadi, S., Alipour, M., Abdollahi, H. & Atashkar, D. (2013). Comparison of efficiency of indices for fire blight susceptibility evaluation in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) in orchard condition. *Seed and Plant Journal*, 29(1), 331-347. (in Farsi)
8. Azarabadi, S. R. (2014). *Assessment of resistance and survey on some tolerance mechanisms to fire blight (Erwinia amylovora) in some new pear cultivars and rootstocks*. M. Sc. Thesis. Varamin-Pishva Islamic Azad University, Tehran, Iran. (in Farsi)
9. Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z. & Nasiri, J. (2017). ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyruscommunis* L). *European Journal of Plant Pathology*, 147, 279-294.
10. Balmer, Y., Vensel, W. H., Tanaka, C. K., Hurkman, W. J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J. P., Manieri, W., Schürmann, P., Droux, M. & Buchanan, B. B. (2004). Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101, 2642-2647.
11. Bhattacharjee, S. (2011). Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: S. Dutta Gupta, (Ed.). *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. (pp. 1-30) CRC Press, Boca Raton, FL.
12. Davoudi, A. (1998). *Evaluation of fire blight resistance in some apple and pear cultivars*. M.Sc. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. (in Farsi)
13. Davoudi, A., Majidi, E., Rahimian, H. &Valizade, M. (2005). The intensity of disease of pear cultivars to fire blight with use the standard system of USDA. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Water and Soil Science*, 9, 159-168. (in Farsi)
14. Ebadi, A., Erfani, J., Abdollahi, H. & Fattahi Moghaddam, M. R. (2014). Investigation of changes in antioxidant enzyme and total phenol level in some pear cultivars inoculated with fire blight disease. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 45, 127-136. (in Farsi)
15. Erfani, J., Abdollahi, H., Ebadi, A., Fatahi Moghadam, M. R. & Arzani, K. (2013). Evaluation of fire blight resistance and the related markers in some European and Asian pear cultivars. *Seed and Plant Journal*, 29-1, 659-672. (in Farsi)
16. Hassani, M., Salami, S. A., Nasiri, J., Abdollahi, H. & Ghahremani, Z. (2015). Phylogeneticanalysis of PR genes in somepome fruit specieswith the emphasis on transcriptionalanalysis and ROS responseunder *Erwinia amylovora* inoculation in apple. *Genetica*, 1-14.
17. Leblay, C., Chevreau, E. &Robin, L.M. (1991). Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 99-105.
18. MalekiBalajoo, O., Keshavarzi, M., Rezaee-Danesh, Y., Damyar, S. & Jaafari, M. (2011). Fire blight resistance in a number of local Iranian apple germplasm. *Seed and Plant Journal*, 27, 25-36. (in Farsi).
19. Mansouryar, M., Erfani Moghadam, J., Abdollahi, H. & Salami, S A. (2016). Optimization of *in vitro* micropropagation protocol for some vigorous rootstocks of pear. *Iranian Journal of Horticultural Science* 47, 361-370. (in Farsi)
20. Maroofi, A. & Mostafavi, M. 1996. Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. *Acta Horticulturae*, 411, 395-400.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Mazarei, M., Zakeri, Z. & Hassanzadeh, N. (1994). Fire blight situation on fruit trees in West Azerbaijan and Ghazvin provinces. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 30, 25-32. (in Farsi)
22. Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
23. Nourmohammadi, N., Abdollahi, H., Moeini, A. & Roohalamin, E. (2015). Effects of growth media and Fe source on micropropagation and rooting of semi-dwarf pear rootstocks, Pyrodwarf and OH×F87. *Seed and Plant Journal*, 31(1), 265-278. (in Farsi)
24. Oh, C. S. & Beer, S. V. (2005). Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. *FEMS Microbiology Letters*, 253, 185-192.
25. Oh, C. S., Carpenter, S. C. D., Hayes, M. L., & Beer, S. V. (2010). Secretion and translocation signals and DspB/F-binding domains in the type III effector DspA/E of *Erwinia amylovora*. *Microbiology*, 156, 1211-1220.
26. Quoirin, M. &Lepoivre, P. (1977). Etude de mileuxadaptes aux cultures *in vitro* de *Prunus*. *Acta Horticulturae*, 78, 437-442.
27. Taheri Shahrestani, A., Abdollahi, H., Yakhchali, B., Mehrabi, R. & Eini Gandomani, O. (2017a). Comparison of the effects of *Erwinia amylovora* effector proteins on pear cultivars in active and inactive chloroplastic electron transport chain conditions. *New Genetic*, 3, 333-345. (in Farsi)
28. Taheri Shahrestani, A., Abdollahi, H., Yakhchali, B., Mehrabi, R. & Eini Gandomani, O. (2017b). Reponse of pear cultivars to invasion of mutant strains of fire blight causal agent (*Erwinia amylovora*) based on H_2O_2 generation. *Seed and Plant Journal*, 33-1, 315-323. (in Farsi)
29. Tahzibi Hagh, F. & Abdollahi, H. (2009). Histological and pomological characterization of sclereid cell clusters in some Iranian local and European pear cultivars. *Acta Horticulturae* 877, 765-769.
30. Trebitsh T. & Danon A. (2001). Translation of chloroplast *psbA* mRNA is regulated by signals initiated by both photosystems II and I. In: Proceedings of *the National Academy of Sciences of the USA* 98, 12289-12294.
31. van Der Zwet, T. & Keil, H. L. (1979). *Fire blight, a bacterial disease of rosaceous plants*. United States Department of Agriculture. Agricultural Handbook No. 510.
32. Venisse, J. S., Guller G. & Brisset M. N. (2001). Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. *Plant Physiology*, 125, 2164-2172.
33. Xie, Z. & Chen, Z. (2000). Harpin-induced hypersensitive cell death is associated with altered mitochondrial functions in tobacco cells. *Molecular Plant Microbe Interaction* 13,183-190.
34. Zakeri, Z. & Sharif Nabi, B. (1991). Fire blight disease in Karaj. In: Proceedings of *the 10th Iranian Plant Pathology Congress*, 30 May-4 June 1991, Kerman University, Kerman, Iran. p157. (in Farsi).

www.SID.ir