

جداسازی و ارزیابی تنوع ژن‌های وابسته به بیماری‌زایی (PR) تعدادی از گونه‌های درختان میوه دانه‌دار

Isolation and Evaluation of Variation in Pathogenesis Related (PR) Genes of some Pome Fruit Species

مریم حسنی^۱، حمید عبداللهی^۲، محمود خسروشاهلی^۳، سپیده ترابی^۴،
شهاب حاج منصور^۵ و یاشار مددکاری^۵

۱، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد، استادیار و کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، تهران
۲- دانشیار، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۱/۳

چکیده

حسنی، م.، عبداللهی، ح.، خسروشاهلی، م.، ترابی، س.، حاج منصور، ش. و مددکاری، ی. ۱۳۹۳. جداسازی و ارزیابی تنوع ژن‌های وابسته به بیماری‌زایی (PR) تعدادی از گونه‌های درختان میوه دانه‌دار. *مجله به‌نژادی نهال و بذر* ۱-۳۰: ۳۶۶-۳۴۷.

به دلیل پیچیدگی روابط گیاه با عوامل بیماری‌زا، شناخت ساختارهای ژنتیکی مقاومت گیاه در مقابل این عوامل از جمله ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR Genes) از اهمیت بالایی برخوردار است. این تحقیق با هدف جداسازی و ارزیابی تنوع این ژن‌ها در ژنوتیپ‌های سیب (*Malus × domestica*)، گلابی معمولی (*Pyrus communis*)، برگ‌بیدی (*P. salicifolia*) و به (*Cydonia oblonga*) انجام شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی و نیمه اختصاصی روی نواحی حفاظت شده ژن‌های *PR1a*، *PR3-Ch1*، *PR3-Ch2*، *PR3-Ch3*، *PR3-Ch5* و *PR8* از گونه‌های دولپه‌های نزدیک انجام و روی DNA استخراج شده با استفاده از روش تلفیقی CTAB-SDS ارزیابی شد. تعداد ژنوتیپ مورد بررسی در گونه سیب، گلابی اروپایی، گلابی برگ‌بیدی و به ترتیب ۷، ۷ و ۱۲ عدد بود. پس از بهینه‌سازی شرایط دمایی و غلظتی واکنش PCR مربوط به هر جفت آغازگر، مشخص شد که امکان انتقال پذیری جفت آغازگرهای طراحی شده به درختان میوه دانه‌دار در مورد اغلب ژن‌های PR مورد نظر وجود داشت. بر اساس نتایج بررسی هومولوژی برای اولین بار ژن‌های *PR1a*، *PR3-Ch1*، *PR3-Ch3*، *PR3-Ch5* و *PR8* در برخی ارقام بومی و یا وارداتی سیب، ارقام گلابی و به و ژن *PR3-Ch4* در سیب و گلابی جداسازی و پس از تعیین توالی در بانک اطلاعاتی به ودیعه گذاشته شدند. بررسی میزان تنوع ژنتیکی ژن‌های جداسازی شده با استفاده از توالی‌یابی نشان داد که ژن‌های حاصل با وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای، از هومولوژی نسبتاً بالایی در بین گونه‌های درختان میوه دانه‌دار برخوردارند.

واژه‌های کلیدی: ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، تنوع ژنتیکی، توالی‌یابی، سیب، گلابی، به.

مقدمه

گیاهان به طور مداوم در اثر متقابل فعال با عوامل بیماری‌زای موجود در محیط اطراف خود هستند. با وجود تفاوت در نحوه واکنش گیاهان و توانایی آن‌ها در تحمل به انواع تنش‌های زنده (Biotic)، بعضی از آن‌ها انواع مقاومت بالایی در جهت محدود کردن این عوامل بیماری‌زا از خود نشان می‌دهند. موضوع مقاومت و ژن‌های درگیر در مقاومت به انواع تنش‌های زنده و غیرزنده (Abiotic)، در سال‌های اخیر به عنوان یکی از روش‌های مؤثر مبارزه، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است (Brown, 2002). میزان موفقیت در برابر هر نوع عامل بیماری‌زایی بستگی به هماهنگی بین استراتژی‌های مختلف و میزان سرعت پاسخ دفاعی آن‌ها دارد (Morassutti *et al.*, 2002).

ژن‌های مختلف *PR* به عنوان مجموعه‌ای از ژن‌های پاسخ دفاعی در مقابل تنش‌های زنده با فعال شدن نظام دفاع اکتسابی گیاه (Systemic Acquired Resistance: SAR)، پروتئین‌های مختلفی از جمله پروتئین‌های ضد میکروبی و ضد قارچی را کد می‌کنند. این ژن‌ها پس از مواجه شدن با ماکرومولکول‌های میکروبی در سطح نسخه‌برداری فعال شده و باعث تجمع فرآورده‌های خود یعنی پروتئین‌های *PR* در بافت آلوده می‌شوند (Hopkins, 1999). این پروتئین‌ها همچنین به مجرد دریافت علائم (Signal) دخیل در اثر

متقابل باکتری، ویروس و یا قارچ با سلول‌های میزبان که باعث برهم ریختن فرآیندهای گیاهی و پیشرفت چرخه بیماری می‌شوند، آن‌ها را شناسایی و مقاومت گیاه را به طرق مختلفی افزایش می‌دهند (Martin *et al.*, 2003). تولید پروتئین‌های *PR* به دنبال تحریک فیتوهورمون‌ها و همچنین ترکیبات سیگنالی دفاعی مانند اسید سالیسیلیک (Salicylic Acid: SA)، اسید جاسمونیک (Jasmonic Acid-JA)، زخم، فشار اسمزی، تنش اکسیداتیو (Oxidative Stress)، نور فرابنفش (UV) و آلودگی با عوامل بیماری‌زا بر روی SAR القاء می‌شود (Jacobsen *et al.*, 1992؛ Collinge *et al.*, 1993).

پیشینه این ژن‌ها به دهه ۱۹۷۰ بازمی‌گردد که برای اولین بار ون‌لون و ون‌کامن (van Loon and van Kammen, 1970) در گیاه توتون تراکم پروتئین‌های جدیدی را پس از آلودگی با ویروس موزاییک توتون (Tobacco mosaic virus-TMV) مشاهده و شناسایی کردند. اهمیت ژن‌های *PR* در مقاومت گیاهان، راه را برای برداشتن اولین قدم برای شناسایی، جداسازی و بررسی رفتار آن‌ها در اثر متقابل بین عامل بیماری و گیاه هموار کرد. ژن‌های *PR* بر اساس پیشنهاد مجمع طبقه‌بندی ژن‌های گیاهی به صورت *ypri* نشان داده شده و در حال حاضر در هفده خانواده از *PRI* تا *PRI17* در گونه‌های مختلف گیاهی مورد شناسایی قرار گرفته‌اند. این ژن‌ها شامل

در سیب نیز بوناسرا و همکاران (Bonasera *et al.*, 2006) به بررسی تظاهر شماری از ژن‌های PR در گونه سیب در پاسخ به حمله عامل بیماری پرداختند. آن‌ها رفتار متفاوتی را در ژن‌های PR مورد بررسی در ارقام بالغ با دانه‌های نابالغ سیب گزارش کردند.

با توجه به شباهت پاسخ‌ها و همچنین گستره تأثیر بسیاری از عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی در گیاهان مختلف، این سؤال مطرح می‌شود که در درختان میوه دانه‌دار رفتار این ژن‌ها تا چه اندازه با میزان تحمل به تنش‌های محیطی در ارتباط است. شدت خسارت بیماری پوسیدگی طوقه (*Phytophthora* spp.) و همچنین بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) و پس از آن لکه سیاه (*Venturiae inequalis*) در برخی مناطق ایران اهمیت شناخت رفتار ژن‌های وابسته به عوامل بیماری‌زا را بیش‌تر مشخص می‌کند. در این میان بیماری آتشک، مهم‌ترین و خطرناک‌ترین معضلات این درختان در اغلب کشورهای تولیدکننده این محصولات به حساب می‌آید (Johnson *et al.*, 2004) و به دلیل فقدان روش قطعی مؤثر در کنترل این بیماری، هر گونه راهکاری که بتواند باعث ایجاد مقاومت بر علیه بیماری شود مورد توجه خواهد بود (van der Zwet and Bonn, 1999).

به دلیل حفاظت گسترده پروتئین‌های PR در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی (Jacobs *et al.*, 1999) در این تحقیق شناسایی

گروه‌های مختلفی از آنزیم‌ها با ویژگی‌های منحصر به فرد، نظیر بازدارنده‌های پروتئیناز جهت از کار انداختن آنزیم‌های بیمارگری تجزیه‌کننده پروتئین و همچنین آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ای مانند 1,3,β-glucanase و Chitinase جهت تجزیه دیواره سلول میکروب‌ها هستند (van Loon *et al.*, 2006).

علی‌رغم وجود اطلاعات بی‌شمار در رابطه با رفتار پاسخ دفاعی گیاهان در دو گونه آراییدوپسیس و توتون به عنوان گیاهان مدل (Jacobs *et al.*, 1999)، اطلاعات چندانی در مورد تظاهر این ژن‌ها در درختان میوه وجود ندارد. البته مطالعات اخیر حاکی از افزایش بیان ژن PR5 از خانواده توماتین (TLP) در گلابی آسیایی یا گونه *Pyrus pyrifolia* در شرایط گلخانه‌ای و درون شیشه در مهار قارچ‌های *Phomopsis* sp., *Sclerotinia sclerotiorum* *Alternaria* sp. و *Phytophthora parasitica* PpGlu بوده است. فعالیت ضد قارچی پروتئین PpGlu مربوط به ژن 1,3,β-glucanase نیز در گونه *P. pyrifolia* گزارش شده است (Liu *et al.*, 2012). همچنین در گونه *Malus hupehensis* ژن کیتیناز کلاس ۱ به عنوان بخش مهمی از استراتژی دفاعی از طریق ارتقاء مقاومت به تنش عوامل زنده و غیر زنده، بیان و عملکرد خود را در برابر آلودگی قارچ *Botryosphaeria berengeriana* نشان داده است (Zhang *et al.*, 2012b). به منظور بررسی ساختارهای مقاومت به بیماری آتشک

آلودگی‌های بازدارنده نظیر مواد فنولی و در نهایت رسوب و انعقاد DNA تخلیص شده و رقیق‌سازی، استخراج DNA به عمل آمد (KhorramDel Azad *et al.*, 2008). بررسی کیفیت و صحت فرآیند استخراج DNA ژنومی به دو صورت کیفی و کمی با استفاده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۶۰، ۲۳۰ و ۲۸۰ نانومتر انجام شد.

طراحی آغازگرها و واکنش PCR

برای تکثیر قطعات DNA به وسیله PCR، جفت آغازگرهایی به طول ۱۹ تا ۲۱ جفت باز طراحی شد. به این ترتیب که ابتدا اطلاعات کاملی از توالی‌های نوکلئوتیدی انواع ژن‌های *PR* متعلق به جنس *Malus*، *Pyrus* (در صورت وجود) و گونه‌های دوپه‌ای نزدیک‌تر به آن‌ها نظیر توتون و یا آرآیدوپسیس از مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری (National Center for Biotechnology Information: NCBI) دریافت شد. سپس برای یافتن توالی‌هایی با بالاترین درصد تشابه با توالی‌های مورد نظر از نرم‌افزار فستا (EMBL-EBI, FASTA) استفاده شد. توالی‌های مذکور در نرم‌افزار تحت وب مالت‌الاین (INRA-France, MultAlin) هم‌ردیف شدند. در نهایت از نتایج حاصل از هم‌ردیفی در طراحی هر آغازگر بهره گرفته شد و آغازگرها بر اساس توالی نوکلئوتیدی نواحی

و جداسازی ژن‌های *PR* در مهم‌ترین گونه‌های خانواده گل‌سرخیان (*Rosasea*) شامل سیب، گلابی و به با استفاده از روش PCR و به کارگیری آغازگرهای اختصاصی و نیمه اختصاصی طراحی شده روی نواحی حفاظت شده این ژن‌ها مد نظر قرار گرفت. همچنین بررسی میزان کارایی و امکان انتقال‌پذیری آغازگرها در سه گونه گیاهی مورد نظر بررسی شد. ارزیابی میزان تنوع بین گونه‌ای و داخل گونه‌ای این ژن‌ها پس از تعیین توالی ژن‌های جداسازی شده از دیگر اهداف این تحقیق بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و استخراج DNA

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق شامل هشت رقم گلابی و دوازده رقم و ژنوتیپ به، از کلکسیون باغ ملی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج (ایستگاه تحقیقاتی کمال‌شهر) و هفت رقم سیب از کلکسیون سیب ایستگاه تحقیقات گل‌مکان خراسان رضوی جمع‌آوری شد. برگ‌های جوان و سالم ارقام و ژنوتیپ‌های مورد بررسی، پس از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان استخراج DNA ژنومی درون فریزر ۸۰- نگهداری شدند. از ژنوتیپ‌های مختلف هر سه گونه گیاهی با استفاده از تلفیق روش CTAB-SDS، پس از هضم و حذف دیواره سلولی و چربی‌های غشاء، هضم و حذف پروتئین‌های سیتوپلاسمی و پروتئین‌های متصل به DNA، هضم و حذف RNA و سایر

برابر غلظت و رنگ آمیزی در اتیدیوم بروماید با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی میزان تنوع ژنتیکی با استفاده از

توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل داده‌ها

پس از حصول اطمینان از امکان یا عدم امکان تکثیر ژن‌های مورد نظر در ارقام و ژنوتیپ‌های مورد آزمایش و مقایسه طول باندهای حاصل توسط نرم‌افزار ژن‌روالر (GeneRuler DNA Ladder Mix)، توالی‌های تکثیر شده در تعدادی از ارقام جهت تعیین توالی با روش سنگر و کولسون (Sanger and Coulson, 1975) توسط شرکت‌های بیوبیسیک (Bio Basic) کانادا و بیونیر (Bio Neer) کره جنوبی توالی‌یابی شدند. برای صحت انجام توالی‌یابی از آغازگرهای پیشرو و پسرو بهره گرفته شد و دو توالی با یکدیگر مقایسه و منطبق شدند. نتایج تعیین توالی با استفاده از نرم‌افزار مگا-۵ (Mega5) خوشه‌بندی و با توجه به نتایج تجزیه خوشه‌ای با روش UPGMA و محاسبه مجذور فاصله اقلیدوسی، میزان تنوع ژنتیکی ژن‌های *PR* جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت هر یک از توالی‌های نوکلئوتیدی به همراه اسیدهای آمینه مربوط به خود به روش بانکیت (Bankit) از طریق سایت NCBI در بانک اطلاعاتی به ودیعه گذاشته شدند.

حفاظت شده ژن‌های مختلف *PR* گزینش شدند و برای تکثیر قطعات DNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی در دستگاه ترموسایکلر Corbett مدل CG1-96، مورد استفاده قرار گرفتند. واکنش PCR در حجم ۲۵ مایکرولیتر با اجزاء واکنش ۱۰ تا ۵۰ نانوگرم DNA الگو، ۲/۵ مایکرولیتر بافر PCR ۱۰ برابر (حاوی ۱۰۰ میلی‌مولار تریس اسید کلریدریک و ۵۰۰ میلی‌مولار کلرید پتاسیم با pH برابر ۸/۳)، ۰/۷۵ مایکرولیتر کلرید منیزیم ۵۰ میلی‌مولار، ۱ مایکرولیتر از هر یک از آغازگرهای پیشرو و پسرو با غلظت ۱۰ پیکومول بر مایکرولیتر، ۱ واحد آنزیم Taq DNA polymerase و ۰/۵ مایکرولیتر dNTP ۱۰ میلی‌مولار انجام شد. برنامه حرارتی واکنش نیز در مرحله واسرشت سازی اولیه و واسرشت سازی ۹۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۳ و ۱ دقیقه، اتصال و جفت شدن آغازگرها به توالی مورد نظر در دمای مناسب به دست آمده از PCR گرادیان دمایی و همچنین مرحله توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه جهت اتصال پلیمرز و پلیمریزاسیون (Polymerization) طی ۳۵ سیکل تکرار شد. سپس مرحله توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه به منظور تکمیل طول قطعات تکثیر شده در واکنش انجام شد. محصولات واکنش جهت تأیید صحت باند تکثیر شده در آزمون‌های کنترل مثبت و منفی، با استفاده از الکتروفورز افقی ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE یک

نتایج و بحث

نام ارقام درختان میوه دانه دار مورد استفاده در این بررسی در جدول ۱ نشان داده شده است. با استفاده از روش خطی کردن توالی محدودی از ژن‌های *PR* در گونه‌های مختلف گیاهی جنس‌های *Nicotiana*، *Arabidopsis*، *Malus* و *Pyrus* موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مشخص شد که نواحی حفاظت شده قابل استفاده‌ای برای طراحی آغازگرهای اختصاصی و یا عمومی برای جداسازی ژن‌های فوق از گونه‌های گیاهی جدید وجود دارد. تعداد توالی‌های ژن‌های *PR* مربوط به سیب بسیار محدود و در گلابی نیز ضمن محدودیت بیش‌تر در اغلب موارد متعلق به گلابی‌های آسیایی بودند. بر اساس این نتایج هشت جفت آغازگر اختصاصی یا نیمه اختصاصی با هدف شناسایی و جداسازی ژن‌های *PR1a*، *PR3-Ch1*، *PR3-Ch2*، *PR3-Ch3*، *PR3-Ch4*، *PR3-Ch5*، *PR5* و *PR8* طراحی شدند (جدول ۲). ارزیابی مقدماتی هشت جفت آغازگر طراحی شده نشان داد که امکان انتقال پذیری اغلب این آغازگرها در گونه‌های مختلف زیرخانواده دانه‌دارها وجود دارد. بر اساس نتایج بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی توسط گرادیانت دمایی و تغییر غلظت اجزاء واکنش، کلیه آغازگرهای طراحی شده توانستند قطعاتی منطبق با طول قطعه مورد انتظار تکثیر کنند، لیکن برخی از آغازگرها تنها در شماری از ارقام و ژنوتیپ‌های گونه‌های مورد

بررسی دارای کارآیی بودند که در بین آن‌ها ژن *PR3-Ch2* دارای کم‌ترین میزان انتقال‌پذیری بود (جدول‌های ۳ و ۴). همچنین دامنه تقریباً مشابه طول قطعات تکثیر شده مربوط به هر ژن *PR*، بر صحت انجام طراحی آغازگرها و اتصال صحیح آغازگرهای پیشرو و پسرو به DNA الگو دلالت داشت.

جفت آغازگر ژن *PR1a* قادر به تکثیر قطعه ۴۶۷ بازی در چهار گونه سیب، گلابی معمولی، گلابی برگ‌بیدی و به شد که با طول قطعه مورد انتظار در انطباق بود. بر این اساس ژن *PR1a* در گونه‌ی به و ارقام بومی و وارداتی گلابی (*P. communis*) تکثیر شد. همچنین این قطعه از ژن برای اولین بار در ارقام بومی گونه سیب جداسازی شد. بررسی هومولوژی قطعات تکثیری و توالی‌یابی شده این ژن با نرم‌افزار فستا حاکی از صحت قطعه تکثیری بود. توالی‌یابی این ژن در سه گونه سیب، گلابی معمولی و به شباهت بالای این ژن را در این سه گونه مشخص کرد. مقایسه توالی این ژن در سیب رقم بومی گلاب کهنز با رقم وارداتی ردلیشز بیانگر وجود جهش‌های نقطه‌ای و وجود تفاوت در حد ۱/۷ درصد بین دو رقم بود. این درحالی است که مقایسه توالی این ژن در سیب رقم بومی گلاب کهنز با گونه گلابی و به در حدود ۳ درصد بود (جدول ۴). تجزیه خوشه‌ای این ژن در سه گونه مورد بررسی و اغلب گونه‌های گیاهی به ودیعه گذاشته شده در بانک اطلاعاتی، حاکی از شباهت توالی این ژن

جدول ۱- ارقام درختان میوه سیب، گلابی و به مورد استفاده به منظور جداسازی ژنهای خانواده‌های مختلف PR

Table 1. Cultivars of apple, pear and quince trees used for isolation of PR gene families

Species	گونه	Foreign cultivars	ارقام خارجی	Foreign cultivars	ارقام خارجی
<i>Malus × domestica</i>	سیب	Golab Kohanz	گلاب کهنز	Gala	گالا
		Shafi Abadi	شفیع آبادی	Red Delicious	رد دلشز
		Morabbaei	مربایی	Golden Delicious	گلدن دلشز
<i>Pyrus communis</i>	گلابی	Dargazi	درگزی	Fuji	فوجی
		Beyrouti	بیروتی	Spadona	اسپادونا
		Shah Miveh	شاه میوه	Louise Bonne	لوئیزبون
		Khooj	خوج	Coscia	کوشیا
<i>Pyrus salicifolia</i>	گلابی برگ بیدی	Wild species	گونه وحشی		
<i>Cydonia oblonga</i>	به	ASP1			
		ASP2			
		AS2			
		PH2			
		KVD2			
		KVD3			
		Sahel Borje Moghavem(SBM)	ساحل برج مقاوم		
		Khosro(KH)	خسرو		
		Moghavem2(MV2)	مقاوم ۲		
		Torsh	ترش		
		Quince A	کوئینس آ		
Quince Adams	کوئینس آدامز				

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای طراحی شده برای واکنش‌های جداسازی ژن‌های *PR*
Table 2. Nucleotide sequences of designed primers for isolation of *PR* genes

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی 5'→3' آغازگر	نوع آغازگر
Primer name	Primer 5'→3' nucleotide sequence	Primer type
PR1a-F	GCTCAGTCCTTATCCAATCC	Specific
PR1a-R	GAGTGGTTGTTGATTCTTCC	Specific
PR3-Ch1-F	CAAATGGGCTGTGTTGTAGC	Specific
PR3-Ch1-R	CAGTACCTTCTGTAGAACCC	Specific
PR3-Ch2-F	CTGCTTTTCTCAATGGCAGC	Specific
PR3-Ch2-R	CCTCAAGAAGACGAAGACGA	Specific
PR3-Ch3-F	GCAACTCAGGCAACTACCAG	Specific
PR3-Ch3-R	GCTGTCCTTAATGGATGCAC	Specific
PR3-Ch4-F	GTGACATGAGCAGAGTACG	Specific
PR3-Ch4-R	CAGGTGAGATTGTCACCAGG	Specific
PR3-Ch5-F	CTCATCCACCTCAACTTCTC	Specific
PR3-Ch5-R	CCATTGGAGATGCTCTTAGC	Specific
PR5-F	GAACTAGCAWCCAAAGCTAGC	Semi-Specific
PR5-R	CACTGCAGGTAATGTGCTG	Specific
PR8-F	CTAGCAGAAGCTTGCAACTCG	Specific
PR8-R	GCTGTCCTTAATGGATGCAC	Specific

جدول ۳- دمای اتصال (T_m) بهینه‌سازی شده آغازگرها و طول قطعات مورد انتظار تکثیر شده ژن‌های *PR* مختلف

Table 3. Optimized annealing temperature (T_m) of primers and prevested fragment length of various *PR* genes

نام ژن	دمای اتصال	طول قطعه مورد انتظار	طول قطعه تکثیر شده
Gene name	Annealing temperature	Prevested fragment length	Amplified fragment length
<i>PR1a</i>	56°C	467bp	467bp (Apple, Pear, Quince)
<i>PR3-Ch1</i>	60°C	796bp	796bp (Apple, Pear, Quince)
<i>PR3-Ch2</i>	58°C	953bp	953bp (Apple)
<i>PR3-Ch3</i>	59°C	759bp	759bp (Apple, Pear, Quince)
<i>PR3-Ch4</i>	56°C	867bp	867bp (Apple, Pear)
<i>PR3-Ch5</i>	58°C	1163bp	1163bp (Apple, Pear, Quince)
<i>PR5</i>	58°C	541bp	541bp (Apple, Pear, Quince)
<i>PR8</i>	61°C	771bp	771bp (Apple, Pear, Quince)

جدول ۴- مقایسه درصد تفاوت (موتاسیون نقطه‌ای) ژن‌های مختلف *PR* در گونه‌های مختلف درختان میوه دانه‌دار مورد بررسی
 Table 4. Comparison of diversity percentage (point mutation) in sequence of *PR* genes among tested pome species

گونه Species	<i>PR1a</i>				<i>PR3-Ch1</i>			
	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>
<i>M.×domestica</i>	1.68	3.21	2.70	-	-	5.15	3.51	5.65
<i>P. communis</i>		-	4.49	-		-	2.63	1.00
<i>C. oblonga</i>			1.92	-			-	2.63
	<i>PR3-Ch2</i>				<i>PR3-Ch3</i>			
	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>
<i>M.×domestica</i>	-	-	-	-	-	4.34	4.21	-
<i>P. communis</i>		-	-	-		-	5.13	-
<i>C. oblonga</i>			-	-			1.44	-
	<i>PR3-Ch4</i>				<i>PR3-Ch5</i>			
	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>
<i>M.×domestica</i>	1.96	1.38	-	-	-	1.89	3.35	-
<i>P. communis</i>		-	-	-		-	3.09	-
<i>C. oblonga</i>			-	-			1.11	-
	<i>PR5</i>				<i>PR8</i>			
	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>	<i>Malus×domestica</i>	<i>Pyrus communis</i>	<i>Cydonia oblonga</i>	<i>Pyrus salicifolia</i>
<i>M.×domestica</i>	0	14.6	5.17	1.29	0	8.56	23.08	-
<i>P. communis</i>		-	17.37	13.49		-	24.25	-
<i>C. oblonga</i>			0	4.25			2.59	-

آراییدوپسیس حاکی از حفاظت شدگی قابل توجه این ژن در بین گونه‌های گیاهی و همچنین در بین زیر‌گروه‌های مختلف آن است (Niderman *et al.*, 1995). براساس این گزارش، علی‌رغم وجود تفاوت‌های اندک در توالی و در نتیجه ترکیب آمینواسیدی این گروه از ژن‌های *PR*، اثرهای متفاوتی برای آن‌ها در مقابله با مقاومت به عوامل قارچی مختلف ارائه شده است. جفت آغازگر مربوط به ژن *PR3-Ch1* یک

در گونه انگور (*Vitis pseudoreticulata*) با گونه‌های مورد بررسی بود (شکل ۱). سایر گونه‌های علفی، در خوشه‌های مجزائی قرار گرفتند. در نهایت قطعه‌ای از ژن فوق در ارقام بومی و وارداتی سیب، گلابی و به در بانک اطلاعاتی به ودیعه گذاشته شد که در مورد دو گونه گلابی معمولی و به اولین گزارش جداسازی و تعیین توالی بود (جدول ۵). مقایسه این نتایج با داده‌های حاصل از بررسی ژن‌های *PR1a*، *PR1b* و *PR1c* در توتون و

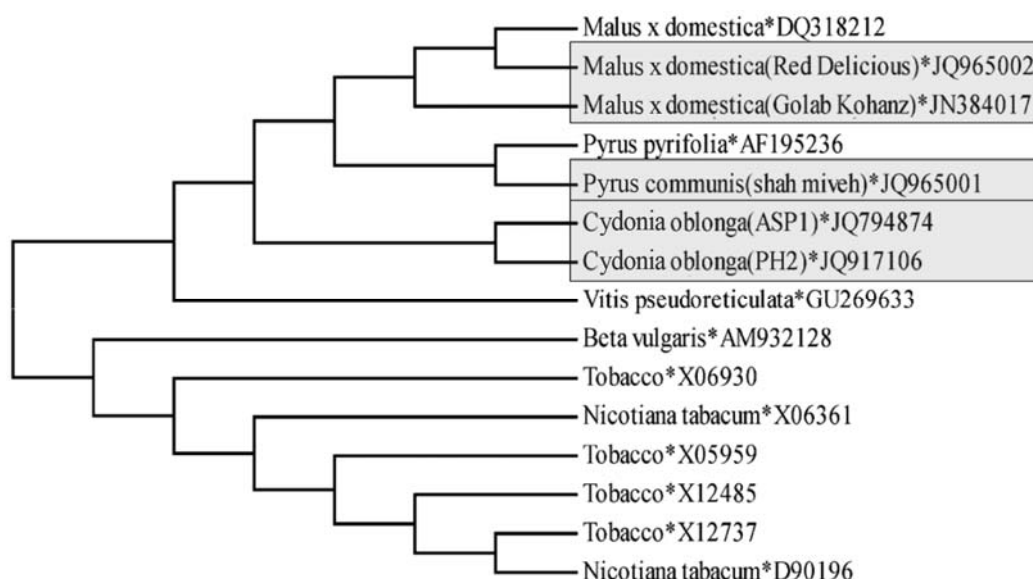
جدول ۵- ژن‌های جداسازی شده و توالی‌های ژنی مربوط به ژن‌های *PR* به ودیعه گذاشته شده در بانک اطلاعاتی

Table 5. Isolated genes and deposited sequences of *PR* genes in data bank

نام ژن Gene name	نام گونه Species name	نام رقم و ژنوتیپ Cultivar and genotype name	شماره ثبت در NCBI NCBI accession number	ویژگی توالی Feature sequence
<i>PR1a</i>	<i>C. oblonga</i>	ASP1, PH2	JQ794874, JQ917106	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh	JQ965001	
	<i>M. domestica</i>	Golab Kohanz, Red Delicious	JN384017, JQ965002	
<i>PR3-Ch1</i>	<i>C. oblonga</i>	KVD3	KC619534	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh, <i>Pyrus salicifolia</i>	KC619532, KC619533	
<i>PR3-Ch2</i>	<i>M. domestica</i>	Shafi Abadi	KC619531	Partial cds
	<i>M. domestica</i>	Shafi Abadi	KC778403	
<i>PR3-Ch3</i>	<i>C. oblonga</i>	AS2, KVD3	JQ965008, JQ965009	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh	JQ965010	
<i>PR3-Ch4</i>	<i>M. domestica</i>	Morabbaei	JQ965011	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh	JX566895	
	<i>M. domestica</i>	Golab Kohanz, Shafi Abadi, Golden Delicious	JX566896, JX566897, JX566898	
	<i>C. oblonga</i>	ASP2, PH2	JX524193, JX524194	
<i>PR3-Ch5</i>	<i>P. communis</i>	Louise Bonne	JX524195	Partial cds
	<i>M. domestica</i>	Shafi Abadi	JX524192	
<i>PR5</i>	<i>C. oblonga</i>	ASP2, Khosro	JQ965004, JQ965007	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh, <i>Pyrus salicifolia</i>	JX104647, JQ965006	
	<i>M. domestica</i>	Golab Kohanz, Shafi Abadi	JQ965003, JQ965005	
<i>PR8</i>	<i>C. oblonga</i>	ASP2, Khosro	JX174172, JX174174	Partial cds
	<i>P. communis</i>	Shah Miveh	JX195719	
	<i>M. domestica</i>	Shafi Abadi, Morabbaei	JX174173, JX174175	

اصفهان (کد KVD3) یک باند با وزن مشابه باند رویت شده در سیب و گلابی تکثیر شد، بنابراین با توجه به حضور این ژن در دو گونه سیب *M. hupehensis* و *P. pyrifolia*، جداسازی

باند با طول ۷۹۶ جفت باز در تمام ارقام دو گونه گلابی معمولی و گلابی برگ‌بیدی و گونه سیب تکثیر کرد که با الگوی مورد انتظار در انطباق بود. در مورد گونه به فقط در رقم به



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR1a* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

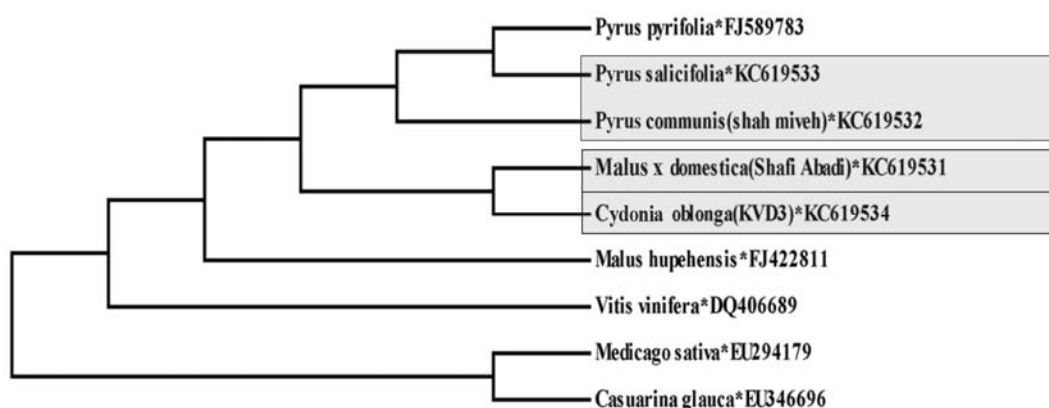
ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 1. Cluster analysis of genetic diversity in *PR1a* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits.

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

نتایج بررسی تجزیه خوشه‌ای این ژن حاکی از گروه‌بندی درختان میوه دانه‌دار در کنار گونه انگور *V. vinifera* در یک خوشه و جدا شدن آن‌ها از دو گونه علفی یونجه (*Medicago sativa*) و کاج گونه *Casuarina glauca* بود (شکل ۲). دیگر بررسی‌های انجام شده در انگور حاکی از حفاظت شدگی قابل توجه زیرگروه‌های خانواده کیتیناز در این گونه بوده است (Roubelakis-Angelakis, 2001) که با نتایج ارائه شده در این تحقیق مبنی بر شباهت بالای ژن *PR3-Ch1* در درختان میوه دانه‌دار در انطباق است.

آن برای اولین بار در ارقام بومی و وارداتی گلابی *P. communis* و *P. salicifolia*، سیب *M. domestica* و نیز یک رقم تجاری به انجام و در بانک اطلاعاتی به ودیعه گذاشته شد (جدول ۵). در مقایسه‌ای که پس از تعیین توالی تعدادی از ارقام هر گونه به عمل آمد، شباهت بالای این ژن آشکار شد. همچنین این ژن، تفاوت اندکی در سطح توالی نوکلئوتیدی در بین گونه‌های مورد بررسی نشان داد، به گونه‌ای که رقم سیب شفیع آبادی با رقم گلابی شاه میوه حدود ۵ درصد، با رقم به اصفهان حدود ۳/۵ درصد و گونه گلابی برگ‌بیدی در حدود ۵/۷ درصد اختلاف داشت (جدول ۴).



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR3-Ch1* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 2. Cluster analysis of genetic diversity in *PR3-Ch1* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

(جدول ۴).

انجام واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر *PR3-Ch3* با DNA استخراجی ارقام و ژنوتیپ‌های گونه‌های مورد بررسی، نشان داد که این جفت آغازگر قابلیت تکثیر ژن *PR3-Ch3* را در تمامی آن‌ها داراست. طول تمامی باندهای تکثیری در این واکنش با طول مورد انتظار در هنگام طراحی آغازگر (۷۵۹ جفت‌باز) منطبق بود. قطعه مورد انتظار ژن اخیر پس از ارزیابی صحت باند تکثیر شده، برای بار نخست در ارقام و ژنوتیپ‌های گونه به و گلابی شناسایی و جداسازی شد (جدول ۵). در ارقام بومی سيب نیز این ژن برای اولین بار گزارش شد. پس از تعیین توالی قطعات تکثیر شده حاصل از واکنش این جفت آغازگر، با وجود مشاهده جهش‌های نقطه‌ای در توالی‌های

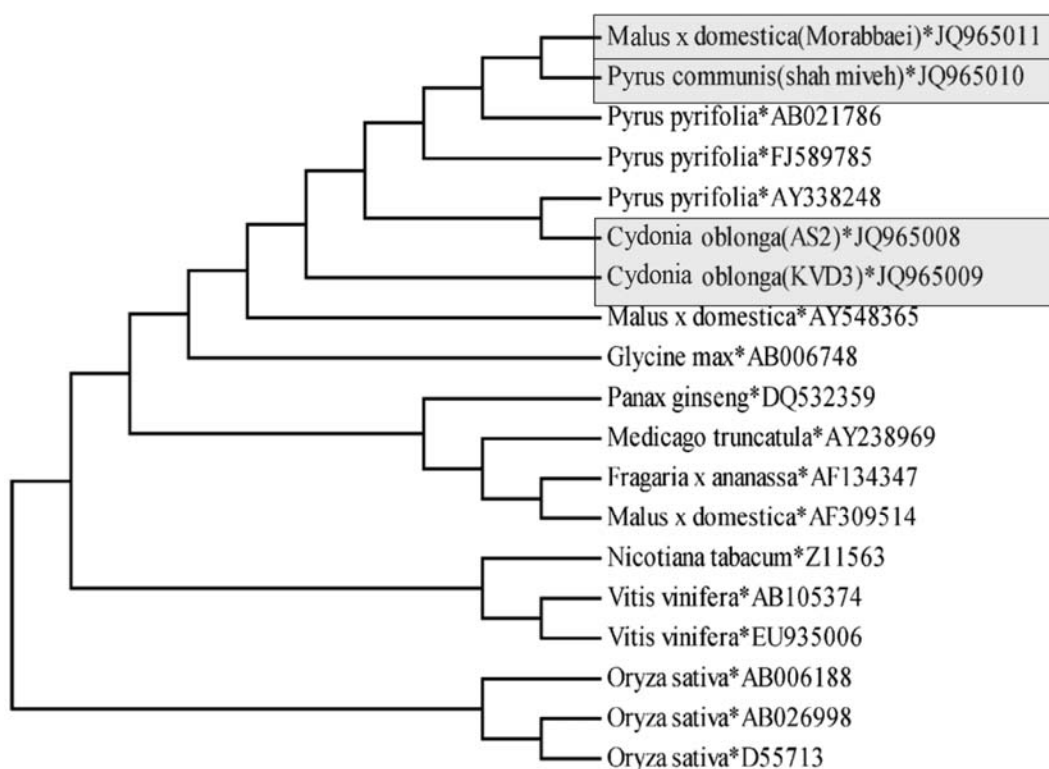
جفت آغازگر ژن *PR3-Ch2* علی‌رغم استفاده از ژنوم گونه *P. pyrifolia* برای طراحی آن، تنها یک باند با طول ۹۵۳ جفت‌باز در گونه سيب تکثیر کرد که از نظر طول با قطعه مورد انتظار در هنگام طراحی آغازگر مطابقت داشت. در مورد ارقام و ژنوتیپ‌های به و همچنین ارقام گلابی مورد بررسی، تکثیر این ژن علی‌رغم تغییرات اعمال شده در برنامه حرارتی، دمای اتصال و غلظت مواد واکنش PCR مشاهده نشد و به نظر می‌رسد تفاوت ژنتیکی این ژن در گونه‌های مختلف دانه‌دار مانع از اتصال آغازگرهای طراحی شده در گونه گلابی آسیایی برای سایر گونه‌ها و جنس‌های درختان میوه دانه‌دار شده باشد. به دلیل عدم امکان توالی‌یابی در سایر گونه‌های دانه‌دارها مقایسه میزان هومولوژی و تجزیه خوشه‌ای مقدور نشد

به تکثیر این ژن در تمامی ارقام سیب و گلابی بود. محصولات واکنش این جفت آغازگر برای تمام ارقام سیب و گلابی دارای وزن بانندی ۸۶۷ جفت باز و در محدوده مورد انتظار بود. در صورتی که در هیچ یک از ژنوتیپ‌ها و ارقام مورد آزمایش گونه به، بانندی به این وزن که بتواند حضور *PR3-Ch4* را توجیه کند، مشاهده نشد. این قطعه از ژن برای اولین بار از گونه سیب و همچنین گلابی معمولی جداسازی و گزارش شد (جدول ۵). نتایج تعیین توالی ضمن مشخص کردن تشابه بالای ژن‌های کدکننده پروتئین‌های کیتینازی کلاس ۴ ژن *PR3* بین ارقام گلاب کهنز، شفیع آبادی و گلدن دلیش از گونه سیب، دارای تفاوتی ۲ درصدی و تفاوت ۱/۴ درصدی بین گونه سیب و گلابی معمولی بود (جدول ۴). تجزیه خوشه‌ای قطعه مورد بررسی ژن فوق بیانگر شباهت بالای آن در همگی گونه‌های دانه‌دار بوده و گونه انگور در کنار گونه کاهو (*Latuca sativa*) قرار گرفت. سایر گونه‌های علفی دولپه‌ای در خوشه مجزائی در رابطه با این ژن طبقه‌بندی شدند (شکل ۴).

در رابطه با جفت آغازگر ژن *PR3-Ch5* مشخص شد که این آغازگرها توانایی تکثیر در تمامی ارقام سیب، گلابی و به را دارا هستند. طول قطعات تکثیری در واکنش این جفت آغازگر با وزن ۱۱۶۳ جفت باز پیش بینی شده روی mRNA گونه گلابی آسیایی مطابقت داشت و برای اولین بار این ژن از سه گونه

کیتینازی کلاس ۳، نواحی فعال این کیتینازها قویاً حفاظت شده بودند. این جهش با تفاوت ۴ درصدی در گونه سیب در مقایسه با دو گونه گلابی معمولی و به همراه بود (جدول ۴). در مطالعه و بررسی خوشه‌ای این کیتیناز گیاهی با استفاده از روش نزدیک‌ترین و دورترین همسایه‌ها، پوشش ژن‌های *PR3-Ch3* در تمام ارقام، حاکی از شباهت بالای این ژن و تعمیم آغازگر مربوط از گلابی آسیایی به گلابی اروپایی و سایر گونه‌های درختان میوه دانه‌دار بود. بررسی روابط خوشه‌ای این قطعه از ژن در گیاهان مختلف نیز حاکی از تفاوت قابل توجه آن در گونه‌های تک‌لپه از گونه‌های دولپه‌ای بود. همچنین اغلب گونه‌های دانه‌دار مورد بررسی شباهت قابل توجهی با یک دیگر و گونه گلابی آسیایی در این ژن نشان دادند، در حالی که گونه توت فرنگی (*Fragaria ananassa*) که متعلق به خانواده گل‌سرخیان است و همچنین جنس انگور که در مورد برخی ژن‌های قبلی نظیر *PR1a* قرابت زیادی با درختان میوه دانه‌دار نشان داده بود، در این جا بیش‌ترین شباهت را با گونه توتون نشان داد (شکل ۳). نتایج ارائه شده در مورد دو ژن *PR3-Ch2* و *PR3-Ch3* با نتایج ارائه شده در مورد زیرخانواده کیتینازهای انگور در انطباق است (Roubelakis-Angelakis, 2001).

الکتروفورز ژل آگارز محصولات واکنش جفت آغازگر ژن *PR3-Ch4* طراحی شده بر روی ناحیه حفاظتی گونه *P. pyrifolia*، نیز قادر



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR3-Ch3* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

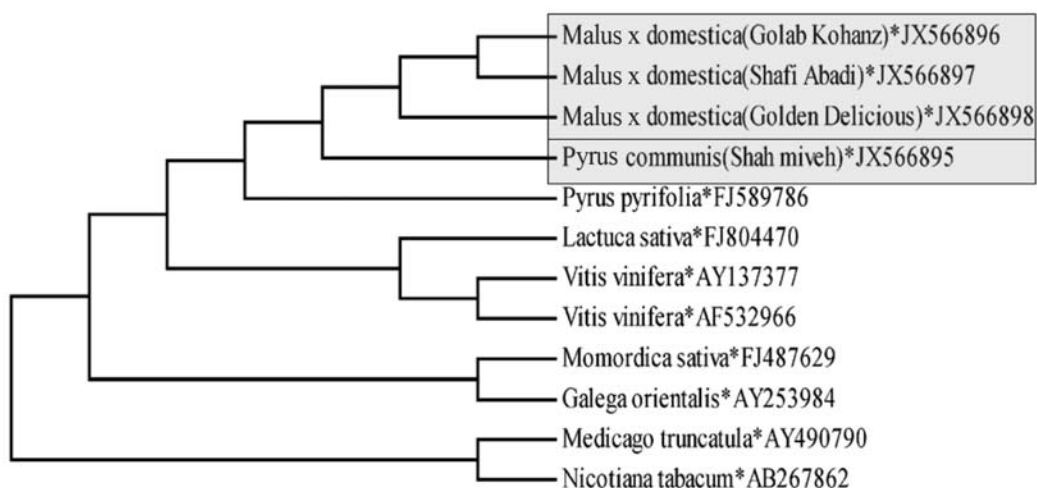
ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند

Fig. 3. Cluster analysis of genetic diversity in *PR3-Ch3* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

قطعه از ژن *PR3-Ch5* مشخص شد که این ژن تنها در گونه‌های گیاهی محدودتری نسبت به سایر ژن‌های *PR* مورد بررسی قرار گرفته است. بررسی این روابط خویشاوندی، کلیه گونه‌های درختان میوه دانه‌دار را در کنار یکدیگر و در مجاور گونه گلابی آسیایی قرار داد. اگرچه دو گونه گلابی و به قرابت بیش‌تری در بین گونه‌های مختلف دانه‌دارها نشان دادند، سایر گونه‌های دولپه‌ای‌ها در خوشه مجزائی طبقه‌بندی شدند (شکل ۵).

سیب، گلابی معمولی و به، جداسازی شد (جدول ۵). توالی‌یابی قطعه تکثیری ژن *PR3-Ch5* مؤید این موضوع بود که کیتینازهای کلاس ۵ ارقام سیب، گلابی معمولی و به از حفاظت شدگی بالا و تشابه شدیدی برخوردارند. مقایسه جهش‌های نقطه‌ای حاصل از تفاوت نوکلئوتیدی بین رقم شفیع‌آبادی از گونه سیب با گونه به در حد ۳/۴ درصد و با گونه گلابی معمولی در حد ۱/۹ درصد بود (جدول ۴). در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای این



شکل ۴- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR3-Ch4* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

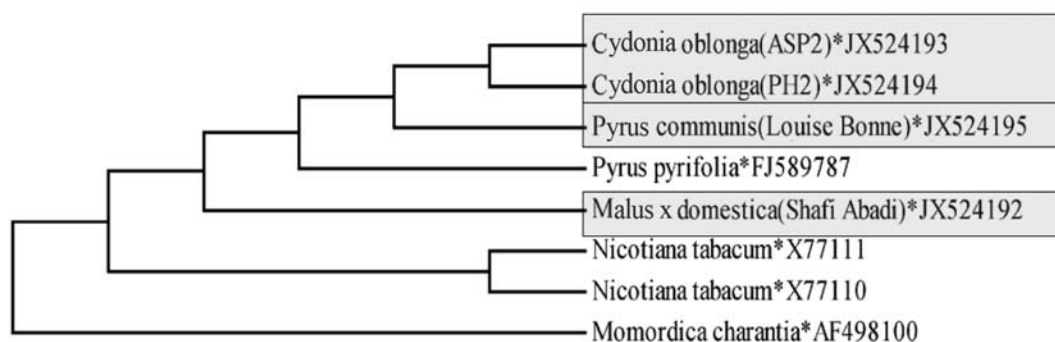
ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 4. Cluster analysis of genetic diversity in *PR3-Ch4* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

درست آمد مشخص کرد که این ژن با وجود جهش‌های نقطه‌ای در توالی ارقام مختلف گونه‌های گیاهی مورد آزمایش، از شباهت بالایی برخوردار است. نکته قابل توجه در بررسی روابط خویشاوندی این ژن فاصله نسبتاً قابل توجه توالی ژن *PR5* گونه گلابی آسیایی با سایر گونه‌های درختان میوه دانه‌دار بود. همچنین ارقام خارجی سیب در خوشه مجزائی از گلابی و به طبقه‌بندی شدند، درحالی که دو رقم سیب بومی گلاب کهنز و شفیع آبادی در است. همچنین شباهت قابل توجهی بین دو گونه گلابی معمولی و برگ‌بیدی مشاهده شد. این نتایج با گزارش پراسات و همکاران (Prasath *et al.*, 2011) که هومولوژی بسیار زیادی را بین ژن *PR5* دو گونه

در بررسی صحت باند تکثیر شده حاصل از جفت آغازگرهای ژن *PR5*، تکثیر یک باند منفرد با وزن ۵۴۱ جفت‌باز در محصول واکنش، گویای حضور این ژن در رقم مورد مطالعه بود و با طول قطعه مورد انتظار مطابقت داشت. گفتنی است که جفت آغازگر مربوط به این ژن که بر روی نواحی حفاظت شده دو گونه سیب و گلابی آسیایی طراحی شده بود، توانست این ژن را در دو گونه گلابی معمولی و گلابی برگ بیدی تکثیر کند، بنابراین قطعه مورد انتظار ژن فوق برای اولین بار از این دو گونه گلابی و گونه به جداسازی شد (جدول ۵). همچنین این جفت آغازگر قادر به تکثیر این ژن در ارقام بومی گونه سیب بود. نتیجه‌ای که از توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها در مورد ژن *PR5* به



شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR3-Ch5* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 5. Cluster analysis of genetic diversity in *PR3-Ch5* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

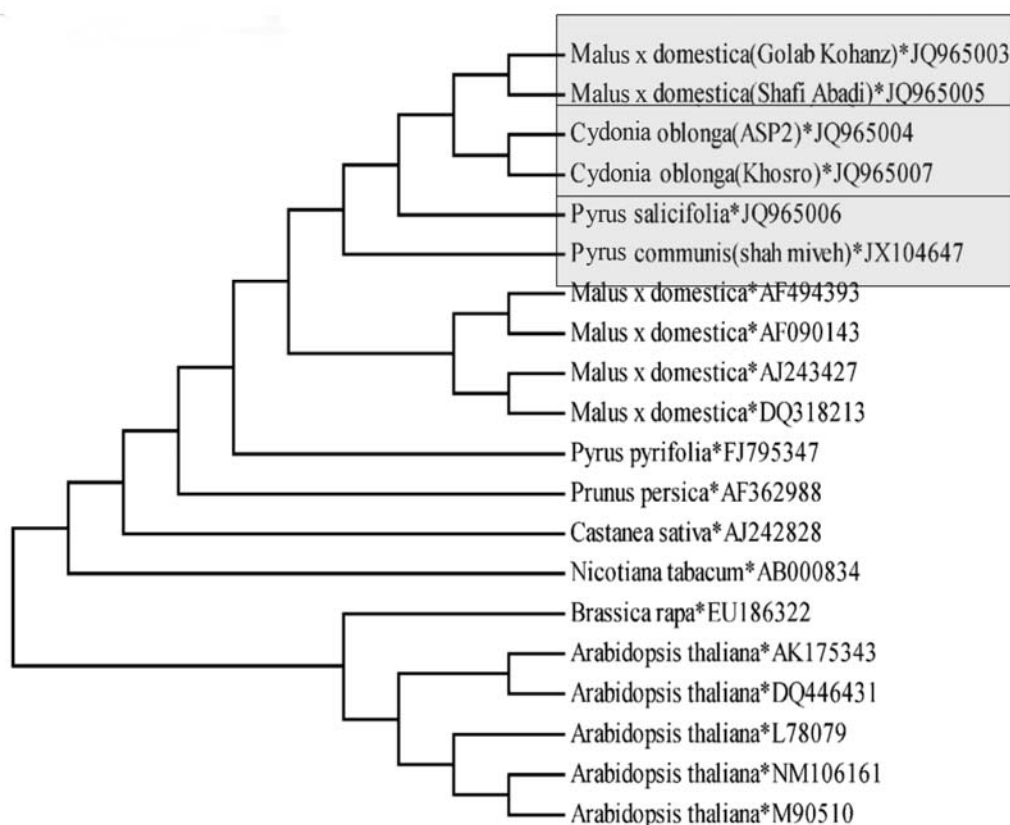
Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

نیز قابلیت انتقال پذیری آغازگرهای *PR8* را به دو گونه گلابی و به توجیه کرد (شکل ۷). نتایج شباهت نسبتاً بالای مشاهده شده در رابطه با ژن *PR8* و تعلق این ژن به گروه کیتینازها مؤید این است که در گروه ژن‌های *PR* طبقه‌بندی شده به عنوان ژن‌های کیتیناز، مشاهده سطح بالائی از هومولوژی همانند آنچه که برای ژن‌های کیتیناز مجموعه *PR3* مشاهده شد چندان دور از انتظار نیست (Roubelakis-Angelakis, 2001).

نتایج تحقیق اخیر مؤید امکان انتقال‌پذیری اغلب آغازگرهای مربوط به خانواده‌های مختلف ژن‌های *PR* در درختان میوه دانه‌دار بود. در بین آغازگرهای ژن‌های *PR* مورد بررسی، تنها جفت آغازگر ژن *PR3-Ch2*، علی‌رغم استفاده از ژنوم گونه *P. pyrifolia* برای جداسازی این ژن از سایر درختان میوه دانه‌دار فاقد کاربرد بود. با توجه به نتایج حاصل

Curcuma amada و *Zingiber officinale* مشاهده کردند تا اندازه‌ای متفاوت و نشانگر این است که میزان حفاظت شدگی در این ژن در خانواده‌ها و جنس‌های مختلف تا اندازه‌ای متغیر است.

نتایج همچنین نشان داد که جفت آغازگر ژن *PR8*، تحت واکنش PCR با DNA تمامی ارقام و ژنوتیپ‌ها محصولاتی به وزن ۷۷۱ جفت‌باز، مطابق با وزن مورد انتظار تکثیر کرده است، بنابراین برای اولین بار این ژن در ارقام گلابی معمولی و برگ‌بیدی و گونه به جداسازی و شناسایی شد (جدول ۵). توالی این ژن در NCBI تنها در گونه سیب معمولی در دسترس بود. پس از بررسی فیلوژنتیکی ژن *PR8* این نتیجه حاصل شد که مشابهت در توالی آمینواسیدی آن‌ها منجر به بالاترین درصد تشابه در بین گونه‌های مختلف سیب شده و همین امر



شکل ۶- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR5* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

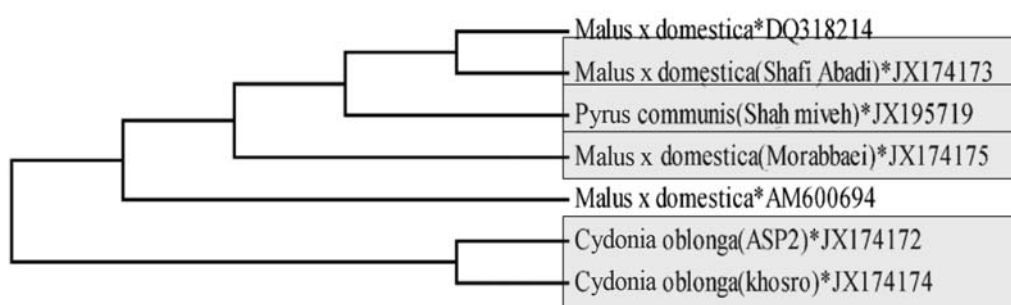
ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 6. Cluster analysis of genetic diversity in *PR5* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

شده در سیب، کلیه تحقیقات قبلی انجام شده در زمینه بررسی رفتار این ژن‌ها در پاسخ به تنش‌های زنده، به صورت جداسازی اولیه و بررسی تظاهر انجام و مورد گزارش قرار گرفته است (Bonasera *et al.*, 2006)؛ همکاران (Zhang *et al.*, 2012a,b) در بررسی بوناسرا و *PR1b*، *PR1a* (۲۰۰۶) تظاهر ژن‌های *PR1c* و مرتبط با نظام دفاع اکتسابی میزبان در حمله بیماری آتشک تشخیص داده نشد،

و بر اساس طول کامل ژن، بخش عمده‌ای از ناحیه کدکننده پروتئین در ژن‌های مختلف *PR* مورد بررسی توالی‌یابی و مشخص شد که امکان استفاده بعدی از آن‌ها به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی برای بررسی میزان تظاهر آن‌ها در اثر متقابل بین عوامل بیماری‌زا و گیاه میزبان از جمله بیماری‌های باکتریایی و قارچی فراهم آمده است. لازم به ذکر است که به دلیل محدود بودن طیف ژن‌های *PR* شناسایی



شکل ۷- تجزیه خوشه‌ای تنوع ژنتیکی ژن *PR8* در گونه‌های گیاهی مختلف و تعدادی از ارقام مورد بررسی درختان میوه دانه‌دار

ژن‌های توالی‌یابی شده در این تحقیق با زمینه خاکستری از بقیه تفکیک شده‌اند.

Fig. 7. Cluster analysis of genetic diversity in *PR8* gene in some plant species and tested cultivars of pome fruits

Sequenced genes in this resrach have been demonstrated in grayscale bacround

بین خصوصاً حساسیت قابل توجه‌تر این دو میزبان به بیماری آتشک، امکان استفاده از این نتایج را برای شناخت بهتر ساختارهای مقاومتی و رفتار سیستم دفاعی گیاهی در دو گونه اخیر تا اندازه‌ای مهیا می‌سازد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از آقایان مهندس مهدی زجاجی، کارشناس گروه صنایع غذایی و محمد عرفت‌پور، کارشناس گروه علوم باغبانی مجتمع آزمایشگاهی زکریای رازی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، به دلیل کمک‌های ارزنده‌شان سپاسگزاری می‌شود.

همچنین آن‌ها ژن‌های دیگر مربوط به دیگر خانواده‌های *PR* را مورد بررسی قرار ندادند. زانگ و همکاران (۲۰۱۲ الف و ب) در بررسی تظاهر ژن‌های *PR1*، *PR5* و *PR8* در سیب گونه *M. hupehensis* گزارش کردند که رفتار این ژن‌ها کاملاً از رفتار گزارش شده قبلی در گونه‌های علفی مدل نظیر آرابیدوپسیس و توتون در پاسخ به اسید سالیسیلیک و اسید جاسمونیک متفاوت است. نتایج محدود گزارش‌های انجام شده مؤید لزوم انجام نگرش جامع‌تری در زمینه بررسی پاسخ خانواده‌های مختلف *PR* در سیب و همچنین استفاده از توالی‌های به دست آمده برای انجام آزمایش‌های مشابه در گلابی و به است. در این

References

- Bonasera, J. M., Kim, J. F., and Beer, S. V. 2006.** *PR* genes of apple: identification and expression in response to elicitors and inoculation with *Erwinia amylovora*. *BioMed Central Plant Biology Journal* 6: 23.
- Brown, J. M. 2002.** Yield penalties of disease resistance in crops. *Current Opinions in Plant Biology* 5: 339-344.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Neilsen, K. K., Rasmussen, U., and Vad, K. 1993.** Plant chitinases. *Plant Journal* 3: 31-40.
- Hopkins, W. G. 1999.** *Introduction to Plant Physiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, USA. 512 pp.
- Jacobs, A. K., Dry, I. B., and Robinson, S. P. 1999.** Induction of different pathogenesis-related cDNAs in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology* 48: 325-336.
- Jacobsen, S., Hauschild, M. Z., and Rasmussen, U. 1992.** Induction by chromium ions of chitinases and polyamines in barley (*Hordeum vulgare* L.) and rape (*Barssica napus* L.ssp. *oleifera*). *Plant Science* 184: 119-128.
- Johnson, K. B., Tockwell, V. D., and Sawyer, T. L. 2004.** Adaptation of fire blight forecasting to optimize the use of biological controls. *Plant Disease* 85: 41-48.
- KhorrarnDel Azad, M., Abdollahi, H., and Taeb, M. 2008.** Optimization of DNA extraction from Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes. The 2nd International Student Conference of Biotechnology, 15-17 November, University of Tehran, Tehran, Iran (in Persian).
- Liu, D., He, X., Li, W., Chen, C., and Ge, F. 2012.** Molecular cloning of a thaumatin-like protein gene from *Pyrus pyrifolia* and overexpression of this gene in tobacco increased resistance to pathogenic fungi. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 111: 29-39.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., and Sessa, G. 2003.** Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual Review of Plant Biology* 54: 23-61.
- Morassutti, C., de Amicis, F., Skerlavaj, B., Zanetti, M., and Marchetti, S. 2002.** Production of recombinant antimicrobial peptide in transgenic plants using a modified VMA intein expression system. *FEBS Letters* 519: 141-146.

- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Möisinger, E. 1995.** Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal, Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 108: 17-27.
- Prasath, D., El-Sharkawy, I., Sherif, S., Tiwary, K. S., and Jayasankar, S. 2011.** Cloning and characterization of *PR5* gene from *Curcuma amada* and *Zingiber officinale* in response to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Cell Reports* 30: 1799-1809.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. 2001.** *Molecular Physiology and Biotechnology of the Grapevine*. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht, The Netherlands. 474pp.
- Sanger, F., and Coulson, A. R. 1975.** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Molecular Biology* 94 (3): 441-448
- van der Zwet, T., and Bonn, W. G. 1999.** Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. *Acta Horticulturae* 489: 167-168.
- van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. 2006.** Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- van Loon, L. C., and vanKammen, A. 1970.** Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. Samsun and Samsun NN. II. Changes in protein constitution after infection with *Tobacco mosaic virus*. *Virology* 40: 199-211.
- Zhang, J., Du, X., Wang, Q., Chen, X., Lv, D., Xu, K., Qu, S., and Zhang, Z. 2012a.** Expression of pathogenesis related genes in response to salicylic acid, methyl jasmonate and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in *Malus hupehensis* (Pamp.) Rehd. *BioMed Central Plant Biology* 3: 208.
- Zhang, J. Y., Guo, Z.R., Qu, S. C., and Zhang, Z. 2012b.** Identification and molecular characterization of a class I chitinase gene (*Mhchit1*) from *Malus hupehensis*. *Plant Molecular Biology* 30: 760-767.

