ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ۳۴۵ - ۳۳۳

مقایسه تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری *Erwinia amylovora* روی ارقام گلابی در شرایط زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی فعال و غیرفعال

Comparison of the effects of *Erwinia amylovora* effector proteins on pear cultivars in active and inactive chloroplastic electron transport chain conditions

اعظم طاهری شهرستانی[۱]، حمید عبداللهی[*۲]، باقر یخچالی[۳]، رحیم مهرابی[٤]، امید عینی گندمانی[۱]

۱- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

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

۳- استاد، گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران

٤- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران

Taheri Shahrestani A[1], Abdollahi H[*2], Yakhchali B[3], Mehrabi R[4], Eini Gandomani O[1]

1- PhD Student, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, Zanjan University, Zanjan, Iran

2- Associate Professor, Temperate Fruits Research Centre, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Professor, Industrial and Environmental Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

4- Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: h.abdollahi@areeo.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۲۵ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

بیماری آتشک (Fire blight) مخرب‌ترین بیماری نکروزه آوندی درختان میوه دانه‌دار بوده و ترشح پروتئین‌های مؤثره باکتری شامل HrpN، HrpW و DspA/E از سلول باکتری به میزبان، مهم‌ترین مؤلفه بیماری‌زایی این باکتری محسوب می‌شود. به‌منظور بررسی اثر هر یک از پروتئین‌های مؤثره باکتری روی ارقام مختلف میزبان، اثر سه سویه جهش‌یافته شامل *hrpN*⁻، *dspA/E*⁻ و *hrpW*⁻ همراه با سویه شاهد غیر جهش‌یافته Ea273، روی ارقام مختلف درخت گلابی شامل ارقام بارتلت، هروسوئیت و درگزی بررسی شد. هم‌چنین با توجه به نقش کلروپلاست‌ها در این اثر متقابل، بررسی‌ها در دو شرایط زنجیره انتقال الکترون کلروپلاستی فعال و غیرفعال در شرایط درون‌شیشه انجام گرفت. ارزیابی نتایج با شاخص میزان پیشرفت نکروز در زمان‌های پس از آلوده‌سازی نشان داد که عدم تولید پروتئین HrpN و DspA/E به ترتیب در سویه *hrpN*⁻ و *dspA/E*⁻ سبب تأخیر در بروز اولین علائم نکروز و همچنین کاهش سرعت پیشرفت نکروز در مقایسه با سویه شاهد غیرجهش‌یافته در ارقام شد، اما شدت کاهش بیماری‌زایی در سویه *dspA/E*⁻ بیش‌تر بود. هم‌چنین سویه *hrpW*⁻، کم‌ترین کاهش در شدت بیماری‌زایی را نسبت به سویه شاهد به‌همراه داشت. تأثیر سویه‌های جهش‌یافته روی شدت بیماری‌زایی و مقایسه آن در شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال بیانگر بیش‌ترین سهم بیماری‌زایی پروتئین‌های مؤثره به ترتیب توسط DspA/E، HrpN و HrpW بود، به صورتی‌که تأثیر HrpW روی بیماری‌زایی باکتری، ناچیز ارزیابی شد. نتایج هم‌چنین نشان داد که برای تأثیر پروتئین HrpN روی میزبان، وجود کلروپلاست‌های فعال ضروری بوده، که این نشان‌دهنده این است که از بین پروتئین‌های مؤثره باکتری، HrpN می‌تواند اصلی‌ترین مؤلفه اثر متقابل باکتری با کلروپلاست‌های میزبان باشد که با نقش‌های گزارش شده آن در مقاومت و تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک نیز منطبق است.

واژه‌های کلیدی

آتشک
پروتئین‌های مؤثره
زنجیره انتقال الکترون
کلروپلاست
مقاومت اکتسابی سیستمیک

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

مقدمه

باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*)، یک باکتری بیمارگر نکروز آوندی مهاجم درختان میوه‌دانه‌دار[1] از خانواده گلسرخیان[2] می‌باشد. مطالعات ژنتیکی گسترده طی چندین دهه اخیر، مکانیسم مولکولی بیماری‌زایی این باکتری را تا حدی آشکار کرده است (Khan et al. 2012). بر این اساس، مشخص شده که بیماری‌زایی باکتری به تولید پروتئین‌های مؤثره و ترشح آنها از طریق سیستم ترشحی نوع III[3] و نیز به تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی آمیلووران[4] وابسته است (Zhao and Qi 2011). مطالعات ژنتیکی صورت گرفته در زمینه شناسایی ژن‌های مؤثره باکتری مذکور، اغلب از طریق تولید و بررسی سویه‌های جهش یافته صورت می‌گیرد. Belleman and Geider (1992) طی تحقیقی، خصوصیات ژنتیکی جهش‌یافته‌هایی از باکتری *E.amylovora* و اثر این جهش‌ها را بر کلاستر ژنی *ams* که درگیر در تولید آمیلووران یا پلی‌ساکارید خارج سلولی می‌باشد را مورد بررسی قرار دادند. Menggad and Laurent (1998)، کلاستر ژنی *ams* باکتری *E.amylovora* را از طریق واردسازی *Tn3Gus* دچار جهش و در نتیجه غیرفعال کردند و گزارش کردند که پلی‌ساکارید آمیلووران در تکثیر باکتری درون گیاه و نیز حفاظت باکتری از واکنش دفاعی نقش فعال دارد. Wang et al. (2012) مطالعه‌ای به منظور بررسی نقش تنظیمی AmyR در سنتز آمیلوران و بیماری‌زایی *E.amylovora* انجام دادند. در مطالعات آن‌ها معلوم شد که AmyR یک تنظیم کننده منفی تولید آمیلووران در *E. amylovora* می‌باشد. به طوری که تولید آمیلووران در یک جهش‌یافته حذفی[5]، حدوداً هشت برابر بیش‌تر از سویه شاهد بود. نتایج این افراد نشان داد که AmyR نقشی مهم در تولید آمیلووران و بیماری‌زایی باکتری دارد.

هم‌چنین در بررسی اولیه مکانیسم بیماری‌زایی باکتری *E.amylovora*، Steinberger et al. (1990) از ترانسپوزون‌ها برای ایجاد جهش در باکتری *E. amylovora* استفاده کردند. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که ژن‌های درگیر در بیماری‌زایی و ایجاد واکنش فوق حساسیت، با هم ارتباط نزدیک داشته و آن دسته از ژن‌هایی که در وقوع واکنش فوق حساسیت نقش دارند برای بیماری‌زایی نیز لازمند. این خوشه ژنی در بررسی‌های بعدی با نام کلاستر ژنی *hrp* مشخص شد. در پی فعالیت بیماری‌زایی باکتری و تولید و ترشح پروتئین‌های مؤثره به سلول میزبان و همچنین تولید و خروج آمیلووران از سلول باکتری، به‌ترتیب در اثر فعالیت دو کلاستر ژنی *hrp* و *hrc*، انفجار اکسیداتیو[6]، پراکسیده شدن لیپیدهای دیواره‌های سلولی و در پی آن خروج الکترولیت‌های سلول میزبان و در نهایت ایجاد نکروز (Venisse et al. 2001) و همچنین بسته شدن آوندها توسط آمیلووران و سرعصائی شدن سرشاخه‌ها (Zhao and Qi 2011)، بروز خواهد کرد. این علائم، هردو از علائم مشخصه بیماری آتشک روی میزبان می‌باشند.

بررسی‌های اولیه در رابطه با ساختار بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora*، بیانگر وجود یک کلاستر ژنی با طول حدود ٤٠ کیلو باز در باکتری بوده، که با توجه به نقش دوگانه این کلاستر در ایجاد بیماری و واکنش فوق‌حساسیت، کلاستر ژنی *hrp* نامیده شد (Wei et al. 1992). در این بررسی، اولین پروتئین مؤثره باکتری با نام هارپین[7] یا HrpN شناسائی و همچنین مشخص گردید که ژن‌های این کلاستر در اثر متقابل سازگار و غیرسازگار باکتری عامل بیماری، به‌ترتیب با گیاهان میزبان و غیرمیزبان، سطح تظاهر متفاوتی بروز خواهند داد. Kim and Beer (1998) هارپین ثانویه‌ای به نام HrpW را در باکتری *E. amylovora* گزارش و مشخص کردند که این هارپین نیز همانند HrpN یک پروتئین اسیدی، غنی از گلیسین و سرین[8] و خارج سلولی باکتری می‌باشد. علاوه بر دو پروتئین مؤثره فوق، Gaudriault et al. (1997) در مجاور کلاستر ژنی *hrp*، کلاستر کوچک‌تری با فاصله ٤ کیلو باز را شناسائی کردند که بر خلاف کلاستر *hrp* در واکنش فوق حساسیت باکتری نقشی نداشته، اما در بیماری‌زایی روی میزبان تأثیرگذار بوده و با نام کلاستر *dsp*[9] شناخته شد. پروتئین مؤثره تولیدی توسط این کلاستر DspA نامیده شد، اما به دلیل هم‌زمانی

[1] Pomoideae
[2] Rosaceae
[3] Type III secretion system
[4] Amylovoran
[5] knock out mutant
[6] Oxidative burst
[7] Harpin
[8] Glycine and Serine reach
[9] Disease specific

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

تحقیق Bogdanove et al. (1998a)، و نامگذاری آن به‌صورت DspE در این تحقیق، از آن پس پروتئین مؤثره DspA/E نام گرفت. پس از شناسائی سه پروتئین مؤثره HrpN، HrpW و DspA/E در باکتری عامل بیماری آتشک، تحقیقات بعدی در زمینه ژنتیک بیماری‌زایی عامل باکتریایی، بیش‌تر روی ساختارهای سیگنال و تنظیمی تظاهر ژن‌های کلاستر *hrp* و *dsp* و همچنین ساختارهای ترشحی نوع III باکتری متمرکز شد (Khan et al. 2012).

شواهد اولیه مبنی بر چگونگی تأثیر باکتری *E. amylovora* روی سلول‌های میزبان، توسط Venisse et al. (2001) گزارش و مشخص شد که بیماری‌زایی باکتری به واسطه یک انفجار اکسیداتیو روی بافت‌های درخت گلابی ایجاد می‌شود. Degrave et al. (2008) گزارش کردند که از بین سه پروتئین مؤثره باکتری، HrpN نقش مهمی در فعالیت‌های بیماری‌زایی و غیربیماری‌زایی داشته و سویه‌های جهش‌یافته *hrpN*$^-$، قادر به ایجاد بیماری در گلابی نبوده و در سیب، باعث ایجاد یک انفجار اکسیداتیو خفیف می‌شوند. همچنین مشخص شد که طی واکنش فوق‌حساسیت در گیاه غیرمیزبان، پروتئینHrpN، سبب تخریب عملکرد میتوکندریایی و در نتیجه مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی خواهد شد (Xie and Chen 2000). همچنین گزارش گردید که دیگر هارپین باکتری، HrpW دارای یک دومین پکتات‌لایز[1] است و به‌طور جزئی برای بیماری‌زایی باکتری روی میزبان مورد نیاز می‌باشد (Kim and Beer 1995). مشابه با پروتئین مؤثره HrpN، پروتئین DspA/E نیز برای بیماری‌زایی باکتری ضروری تشخیص داده شد و گزارش شد که سویه‌های *dsp*A/E$^-$ غیربیماری‌زا و قادر به رشد در گیاه میزبان نیستند (Bogdanove et al. 1998a, b). با این وجود، با توجه به تأثیر هر دو پروتئین مؤثره HrpN وDspA/E روی بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora*، تاکنون مشخص نشده که چه نسبتی از بیماری توسط هریک از این دو پروتئین مؤثره ایجاد و یا اینکه هر دو پروتئین مؤثره، شرط لازم برای ایجاد بیماری در میزبان خواهند بود.

علاوه بر اثرات بیماری‌زایی پروتئین‌های مؤثره باکتری *E.amylovora*، مشخص شده که پروتئین‌های مذکور دارای نقش(های) ثانویه‌ای روی گیاهان میزبان و همچنین غیرمیزبان می‌باشند. در رابطه با پروتئین مؤثره HrpN، گزارش شده که علاوه بر تأثیر در بیماری‌زایی، نقش تحریک سیستم سیگنالی خارج سلولی مرتبط با راه‌اندازی واکنش فوق‌حساسیت را نیز به عهده دارد (Oh and Beer 2005)، بر این اساس این پروتئین مؤثره می‌تواند در تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک[2] نیز نقش داشته باشد. شواهد ارائه شده توسط Dong et al. (1999) نشان داده که مقاومت گیاه توتون علیه باکتری *E. amylovora*، از طریق تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک، مرتبط با اسید سالیسیلیک صورت می‌پذیرد. واکنش مشابهی در رابطه با تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک در واکنش سازگار باکتری با گیاهان میزبان نیز گزارش شده‌است (Wei and Beer 1996). بر خلاف نقش تحریک‌کنندگی HrpN، روی سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک، نشان داده شده است که پروتئین DspA/E از تحریک و فعالیت سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک پایه‌ای وابسته به اسید سالیسیلیک جلوگیری کرده و به‌عنوان یک استراتژی بیماری‌زایی مهم جهت آلودگی گیاهان میزبان، سبب مرگ سلول میزبان می‌شود (DebRoy et al. 2004). بر این اساس، مشخص می‌شود که اگرچه نقش دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E در بیماری‌زایی همسو می‌باشد، اما در رابطه با سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان و یا غیرمیزبان، بر خلاف یکدیگر عمل نموده و لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که حداقل بخشی از بیماری‌زایی باکتری و شدت آن، به تعادل بین نقش‌های چندگانه دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E روی بیماری‌زایی و تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک مرتبط می‌باشد.

با توجه به مطالعات گسترده انجام گرفته روی ژنتیک بیماری‌زایی باکتری، اطلاعات مفیدی در رابطه با اثرات پروتئین‌های مؤثره باکتری به‌دست آمده است. این درحالی است که تأثیر دقیق پروتئین‌های مؤثره باکتری روی بخش‌های مختلف سلولی که منجر به ایجاد انفجار اکسیداتیو (Venisse et al. 2001) و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Xie and Chen 2000) می‌شود، به درستی مشخص نیست. اطلاعات محدود حاصله، نشانگر نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در این انفجار اکسیداتیو

[1] Pectatelyase domain

[2] Systemic Acquired Resistance (SAR)

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

(Abdollahi et al. 2015)، و نقش احتمالی کلروپلاست‌ها (Erfaninia et al. 2014) در تعیین میزان حساسیت رقم، نسبت به بیماری آتشک است. لذا با توجه به اینکه عامل اصلی ایجاد بیماری، پروتئین‌های مؤثره باکتری بوده و کلروپلاست‌ها به عنوان یکی از مراکز اصلی تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و در نتیجه انفجار اکسیداتیو در گیاهان (Bhattacharjee 2011) ایفای نقش می‌کنند، تحقیق اخیر با هدف رفع بخشی از ابهامات موجود مشتمل بر تعیین سهم بیماری‌زایی هر یک از دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E روی میزبان و همچنین تعیین میزان اهمیت کلروپلاست‌ها در اثر متقابل با هریک از سه پروتئین مؤثره HrpN، HrpW و DspA/E باکتری طرح‌ریزی و با استفاده از سویه‌های جهش‌یافته *hrp*N$^-$، *dsp*A/E$^-$ و *hrp*W$^-$ باکتری عامل بیماری، در مقایسه با سویه شاهد بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ارقام گلابی مورد استفاده در این تحقیق شامل ارقام درگزی[1]، به عنوان رقم متحمل، رقم هروسوئیت[2]، به‌عنوان رقم نیمه متحمل و رقم بارتلت[3]، به‌عنوان رقم حساس بودند. ارقام مورد نظر به‌وسیله کشت شاخه‌چه به صورت درون‌شیشه‌ای تکثیر شدند. به این منظور، از محیط کشت QL[4] (Leblay et al. 1991) به‌همراه ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر BAP[5]، یک میلی‌گرم در لیتر 2iP[6] و ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر NAA[7]، ۳۰ گرم در لیتر سوکروز، ۰/۸ درصد آگار و ۰/۵ میلی‌گرم در لیتر پکتین مرکبات برای پرآوری درون‌شیشه ارقام استفاده شد. pH محیط‌های رشد، قبل از افزودن آگار و پکتین روی ۱±۵/۷ تنظیم شده و پس از تهیه محیط، در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو، سترون شدند. شاخه‌چه‌های کشت داده شده، به اتاق رشد با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی توسط لامپ‌های فلورسنت سفید و زرد (Sylvania, Germany)، با شدت نور ۴۰ میکرومول بر مترمربع در ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. ساقه‌چه‌های پرآوری شده هر ۴۵ روز یک‌بار زیرکشت شده تا تعداد ساقه‌چه لازم برای ارزیابی‌ها روی سه رقم فوق، به دست آید.

ارزیابی تأثیر هر یک از پروتئین‌های مؤثره HrpN، HrpW و DspA/E روی میزبان با استفاده از مقایسه تأثیرسویه Ea273 باکتری *E. amylovora* تهیه شده از کشور آمریکا (American Type Culture Collection-ATCC49946) به‌عنوان شاهد غیرجهش‌یافته (تیپ وحشی[8])، همراه با سویه‌های جهش‌یافته *hrp*N$^-$، *dsp*A/E$^-$ و *hrp*W$^-$ که به‌ترتیب در هریک از این سویه های جهش‌یافته، ژن‌های*hrp*N، *dsp*A/E و *hrp*W مسئول تولید پروتئین مؤثره HrpN، DspA/E و HrpW، خاموش شده بود، استفاده شد. سویه‌های جهش‌یافته باکتری، از کشور فرانسه (CIRM-CFBP: International Centre for Microbial Resources – French) به‌صورت لیوفیلیز[9] شده خریداری و بر اساس دستورالعمل بانک ژن باکتریائی فرانسه در حضور ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک کانامایسین، که با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرومتر (Millipore-USA) سترون و به محیط کشت اضافه شده بودند، تکثیر شدند. همچنین برای تهیه مایه‌تلقیح، هر یک از سویه‌های شاهد و جهش‌یافته مورد نیاز به‌صورت شب‌گذران در محیط LB[10] مایع، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه روی شیکر انکوباتور کشت شدند. به‌منظور کاهش احتمال فرار سرشاخه‌های درون‌شیشه از آلوده‌سازی، کدورت مایه‌تلقیح باکتری، بر اساس روش Abdollahi et al.(2004) با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Shimazu 1100, Japan) در طول موج ۶۰۰ نانومتر و با استفاده از بافر فسفات (دارای pH خنثی و سترون شده در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۲ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو)، روی عدد یک تنظیم شد.

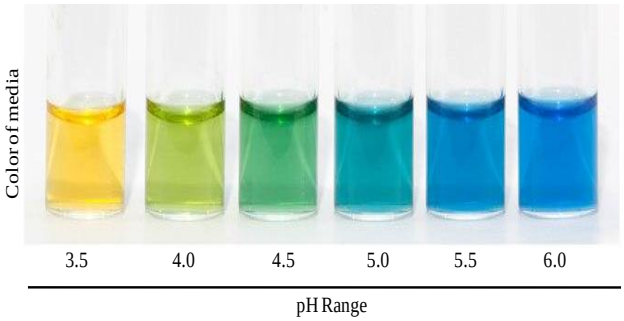
به‌منظور ارزیابی اثر متقابل سویه‌های جهش‌یافته و شاهد با ارقام مختلف گلابی مورد نظر، شاخه‌چه‌های درون‌شیشه گلابی با طول حدود ۳ تا ۴ سانتی‌متر که ۴۰ تا ۴۵ روز از زیرکشت آن‌ها

[1] Dargazi
[2] Harrow sweet
[3] Bartlett
[4] Quoirin and Lepoivre medium
[5] 6-Benzylamino Purine
[6] 6-ɤ-ɤ-(Dimethyl Allylamino)-Purine
[7] Naphthalene Acetic Acid
[8] Wild type
[9] Lyophilized
[10] Luria Bertani

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

گذشته بود، مورد استفاده قرار گرفتند. آلوده‌سازی شاخه‌چه‌های درون‌شیشه در لوله‌های آزمایش ضخیم با قطر ۳۰ میلی‌متر مخصوص این بررسی، انجام شد. به این منظور ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت QL (Leblay et al. 1991) همراه با تنظیم کننده‌های رشد ذکر شده در مرحله پرآوری، مورد استفاده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر مایه تلقیح از هر سویه در تیمارهای مجزا، به سطح محیط کشت هر لوله آزمایش اضافه شده و سپس ساقه‌چه‌های هر رقم روی سطح محیط کشت استقرار داده شدند. همچنین علاوه بر شاهد غیرجهش‌یافته، از بافر فسفات سترون شده به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در سرشاخه‌های گلابی هر سه رقم، به‌عنوان شاهد تقلیدی[1] استفاده شد. ارزیابی‌های اثر متقابل در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی توسط لامپ‌های فلورسنت سفید و زرد و با شدت نور ۴۰ میکرومول بر متر مربع در ثانیه و دمای شبانه‌روزی ۱±۲۳ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

با توجه به نقش تعیین‌کننده کلروپلاست‌ها به‌عنوان یکی از اندامک‌های مهم در تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن در سلول‌های گیاهی (Bhattacharjee 2011)، و نقش این اندامک در این اثر متقابل (Abdollahi et al. 2015)، و همچنین تأثیر حضور سوکروز در محیط کشت روی غیرفعال شدن زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها (Yabuta et al. 2007) و در نتیجه از دست رفتن فعالیت فتوسنتزی و تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن، کلیه ارزیابی‌ها در شرایط فوق در شرایط عدم حضور و حضور سوکروز به‌ترتیب به‌عنوان شرایط کلروپلاست فعال و غیر فعال، بر اساس روش Abdollahi et al. (2015)، مورد مقایسه قرار گرفت. همچنین به‌منظور مقایسه فعالیت جذب سوکروز از محیط که سبب افت pH محیط کشت می‌شود، تغییر pH محیط کشت با افزودن ۲۰ میلی‌گرم در لیتر معرف بروموکرزولگرین[2] (AnalytiClas, Cat No. 491207) با محدوده تعیین pH بین ۳/۵ تا ٦، به محیط کشت توأم باکتری-گیاه، بررسی شد. تعیین میزان pH محیط با استفاده از مقایسه رنگ آن با pHهای رفرنس محدوده ۳/۵ تا ٦ با فواصل نیم واحدی (شکل ۱) و هر ۲٤ ساعت یک‌بار صورت گرفت. همچنین به منظور بررسی اثر متقابل سویه‌های جهش‌یافته و شاهد و ارقام مختلف گلابی، میزان پیشرفت نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون‌شیشه با فواصل زمانی ۲٤ ساعت یک‌بار، و جمعاً به مدت ٤۸۰ ساعت (۲۰ روز) پس از آلوده‌سازی ارزیابی و ثبت شد. ارزیابی میزان پیشرفت نکروز به صورت درصد طول شاخه‌چه نکروزه بر اساس طول بخش نکروزه به طول کل شاخه‌چه، محاسبه شد. کلیه ارزیابی‌ها حداقل در پنج تکرار صورت گرفت و پس از ثبت داده‌ها رسم نمودارها با استفاده از اکسل (Microsoft, USA-Version 2007) انجام شد.



شکل ۱- pHهای رفرنس محدوده ۳/۵ تا ٦ با فواصل نیم واحدی تهیه شده با معرف بروموکرزولگرین، مورد استفاده برای ارزیابی روند تغییرات pH در محیط‌های کشت توأم باکتری-میزبان.

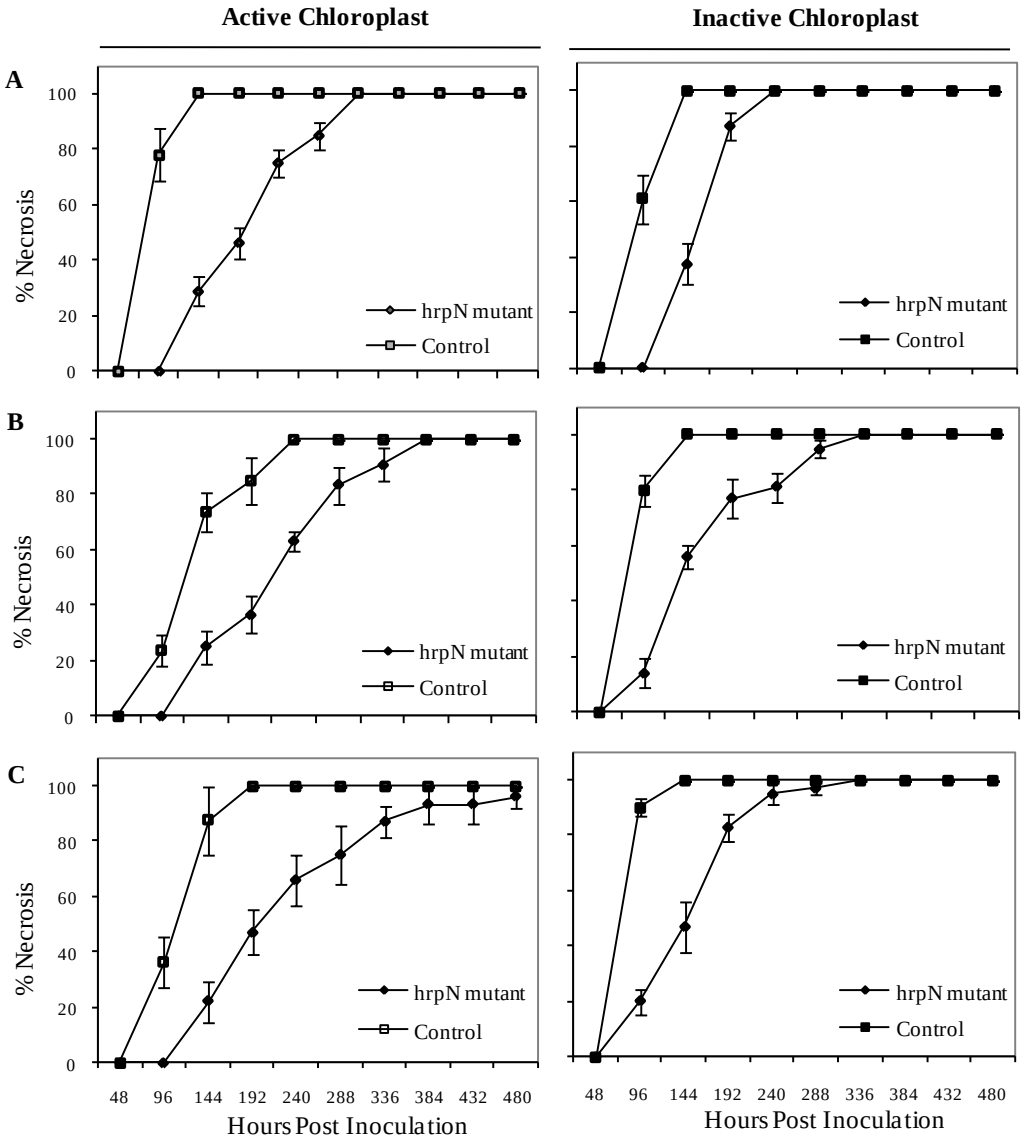
نتایج و بحث

در این بررسی به‌منظور ارزیابی تأثیر پروتئین‌های مؤثره باکتری *E. amylovora* در اثر متقابل با میزبان، اثر سویه‌های جهش‌یافته *hrpN*$^-$، *dsp*A/E$^-$ و *hrpW*$^-$ با سویه شاهد مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان‌دهنده موفقیت آلوده‌سازی و ایجاد نکروز در کلیه تیمارهای واجد سویه‌های مختلف شاهد و جهش‌یافته باکتری بود و تنها در شاهد تقلیدی، هیچ‌گونه بروز نکروز حتی پس از گذشت ٤۸۰ ساعت مشاهده نشد. نکته قابل توجه در نتایج، تفاوت در سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های مختلف تیمار شده با سویه‌های مختلف جهش‌یافته و سویه شاهد بود. از طرفی با توجه به ظرافت شاخه‌چه‌های درون‌شیشه مورد استفاده، تفاوت قابل توجهی در بروز اولین علائم نکروز و پیشرفت آن در آلوده‌سازی با سویه شاهد در بین ارقام مختلف مشاهده نشد. در واقع در سیستم درون شیشه‌ای، شاخه‌چه‌ها به اندازه کافی ضخیم

[1] Mock control
[2] Bromocresol green sodium salt

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

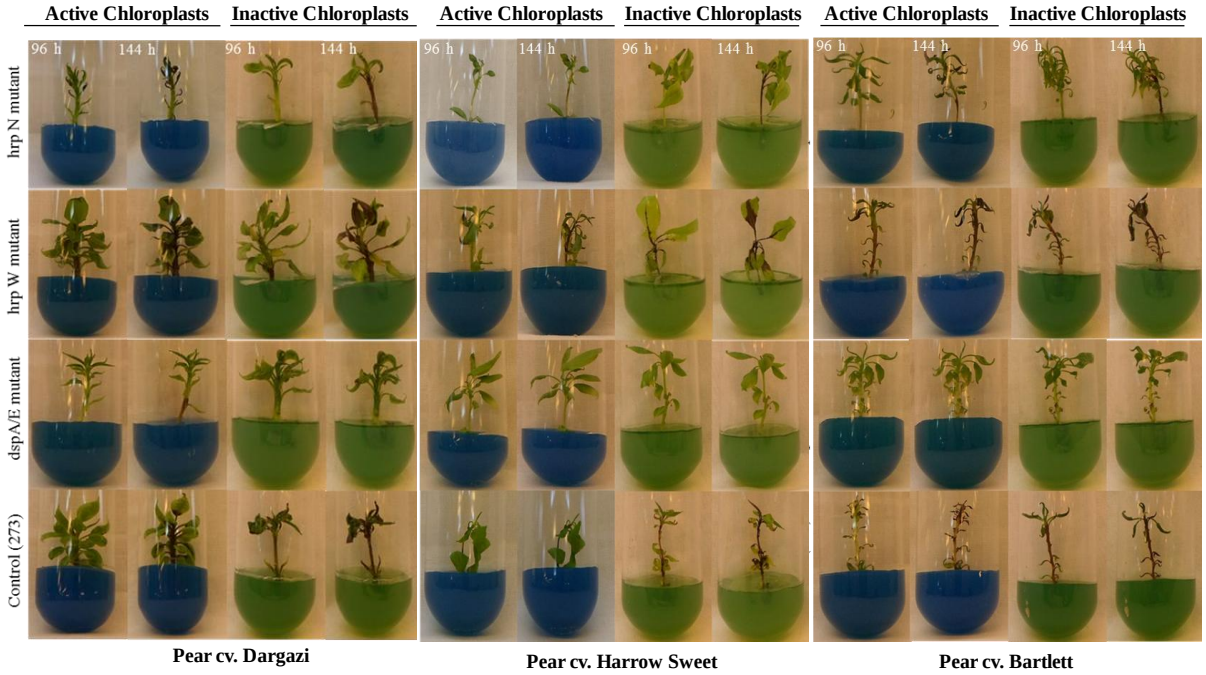
و چوبی نبوده و عملکرد سیستم‌های دفاعی گیاه، مانند چیزی که در شرایط گلخانه یا باغ وجود دارد، در گیاه در شرایط درون شیشه مشاهده نمی‌شود (شکل ۲). در حالی‌که، در شرایط گلخانه‌ای، با استفاده از سویه‌های موتانت و شاهد به کار رفته در این تحقیق، نتایج ما نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌دار بین ارقام مقاوم و حساس بود. (داده‌ها نشان داده نشده است). بر این اساس در هر سه رقم، اولین علائم نکروز در آلوده‌سازی با سویه شاهد پس از گذشت ٤٨ ساعت در هر دو شرایط کلروپلاست فعال (عدم حضور سوکروز) و کلروپلاست غیرفعال (حضور سوکروز) تظاهر پیدا کرد.



شکل ۲- مقایسه پیشرفت نکروز ناشی از سویه جهش‌یافته *hrpN*⁻ باکتری *Erwinia amylovora* با سویه شاهد غیرجهش‌یافته Ea273 در ارقام مختلف گلابی شامل: A) درگزی؛ B) هروسوئیت؛ C) بارتلت، در شرایط کلروپلاست غیر فعال (محیط دارای سوکروز) (راست) و کلروپلاست فعال (فاقد سوکروز) (چپ).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]



شکل ۳- مقایسه پیشرفت نکروز در سرشاخه‌های درون‌شیشه ارقام گلابی‌درگزی، هروسوئیت و بارتلت در شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال، در دو فاز ۹۶ و ۱۴۴ ساعته پس از آلوده‌سازی با سویه‌های مختلف باکتری *Erwinia amylovora* مشتمل بر سه سویه جهش‌یافته ژن‌های درگیر در تولید پروتئین‌های مؤثره باکتری شامل سویه‌های *hrp*N$^-$، *dsp*A/E$^-$ و *hrp*W$^-$ در مقایسه با سویه شاهد غیرجهش‌یافته. نکروز باکتری در طول شاخه‌چه‌ها به‌صورت بخش قهوه‌ای و یا سیاه شده آشکار می‌شود.

علاوه بر این، در شرایط کلروپلاست غیرفعال، پیشرفت علائم روی ارقام با استفاده از سویه شاهد غیر جهش‌یافته یکنواخت‌تر از شرایط کلروپلاست فعال بوده و تفاوت کم‌تری دیده شد (شکل ۲). بر اساس نتایج قبلی DebRoy et al. (2004) مبنی بر نقش تعیین‌کننده کلروپلاست‌ها در فعالیت سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان، پیشرفت یکنواخت‌تر نکروز در ارقام گلابی در شرایط سویه شاهد، می‌تواند به‌دلیل عدم امکان بروز فعالیت طبیعی کلروپلاست‌ها و نقش این اندامک در سیستم دفاع سیستمیک گیاه باشد. از طرفی، مقایسه سرعت پیشرفت نکروز عامل بیماری در سرشاخه‌های ارقام تیمار شده با شاهد غیر جهش‌یافته، در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال نشان می‌دهد که شرایط کلروپلاست فعال سبب تأخیر در ایجاد علائم در مقایسه با شرایط کلروپلاست غیرفعال شده‌است. برای روشن شدن مطلب، لازم به تأکید است که استفاده از باکتری‌های شاهد غیر جهش‌یافته، بدین معنی است که در این سویه علاوه بر HrpW، هر دو پروتئین مؤثره شامل HrpN و DspA/E تولید می‌شود. لذا با توجه به اثرات متضاد دو پروتئین مؤثره HrpN و DspA/E روی سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک و نقش مهم و تعیین‌کننده کلروپلاست‌ها در فعالیت سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان، خاموش کردن کلروپلاست‌ها و افزایش علائم شدت بیماری با سویه شاهد غیر جهش‌یافته و بر عکس فعال کردن کلروپلاست‌ها و کاهش علائم نشان‌دهنده این است که در این شرایط، نقش تحریک‌کنندگی سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک توسط HrpN بر نقش غیرفعال‌سازی آن توسط DspA/E غلبه یافته است.

مقایسه نقش پروتئین مؤثره HrpN

در شاخه‌چه‌های درون‌شیشه ارقام گلابی تیمار شده با سویه جهش‌یافته *hrp*N$^-$، در شرایط کلروپلاست فعال، اولین علایم نکروز در تمامی ارقام پس از ۹۶ ساعت پس از آلوده‌سازی مشاهده شد که نسبت به سویه شاهد غیر جهش‌یافته، تأخیر ۴۸ ساعته در بروز علائم اولیه داشت (شکل ۲). هم‌چنین به‌طور مشابهی، سرعت پیشرفت نکروز نیز در زمان‌های متناظر با سویه جهش‌یافته *hrp*N$^-$، در همین شرایط در مقایسه با سویه شاهد کم‌تر بود (شکل ۳). از سوی دیگر در شرایط کلروپلاست

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

غیرفعال، گرچه تنها در رقم درگزی تفاوت ٤٨ ساعته در ظهور اولین علایم نکروز مشاهده شد، اما روند کلی مشابهی به صورت کاهش سرعت پیشرفت نکروز با سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻، در مقایسه با سویه شاهد دیده شد (شکل ۲).

مقایسه سرعت پیشرفت نکروز در ارقام مختلف با استفاده از سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻، در دو شرایط کلروپلاست فعال و کلروپلاست غیرفعال در زمان‌های متناظر نشان دهنده کاهش نسبی سرعت پیشرفت نکروز در شرایط کلروپلاست فعال بود (شکل ۱). کاهش سرعت پیشرفت علائم نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون‌شیشه در تمامی شرایط و هم‌چنین تأخیر در بروز اولین علایم نکروز در اغلب موارد با استفاده از سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻ (شکل ۳) با توجه به نقش کلیدی گزارش شده پروتئین مؤثره HrpN روی ظهور و پیشرفت نکروز در میزبان توسط Venisse et al. (2003)، نشان دهنده تطابق نتایج این بخش از تحقیق با نتایج قبلی است. از سوی دیگر، Venisse et al. (2003) با استفاده از آلوده‌سازی برگی ارقام گلابی با سویه *hrp*N⁻ ، در شرایط خارج‌شیشه گزارش کردند که تنها ۲۵ درصد علائم نکروز در مقایسه با سویه شاهد مشاهده شد. در حالی‌که در این تحقیق با استفاده از شاخه‌چه‌های درون‌شیشه، در هر دو شرایط، میزان نهائی پیشرفت نکروز به ۱۰۰ درصد رسید، اما مشخصاً کاهش سرعت پیشرفت نکروز در تیمار با سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻ مشاهده شد (شکل‌های ۲ و ۳). این نتایج در وهله اول نشان‌دهنده برتری سیستم درون‌شیشه برای ارزیابی دقیق‌تر تأثیر جهش‌یافته‌های باکتری *E. amylovora* در اثر متقابل با میزبان بوده و تا حد زیادی با گزارش Abdollahi et al. (2004) مبنی بر کارآئی استفاده از سیستم درون‌شیشه برای ارزیابی دقیق اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با میزبان، منطبق است. از سوی دیگر، این نتیجه نشان‌دهنده این است که علاوه بر پروتئین مؤثره HrpN، سایر پروتئین‌های مؤثره باکتری نیز سهم قابل‌توجهی در بروز علائم نکروز داشته و حضور پروتئین مؤثره HrpN به‌صورت شرط لازم برای بروز نکروز نبوده و این پروتئین مؤثره، در کنار سایر پروتئین(های) مؤثره و به‌صورت موازی سبب شدت بخشیدن علائم بیماری می‌شود.

مقایسه افت pH در دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال نیز نشان داد که افت قابل‌توجه pH تنها در شرایط حضور سوکروز یا کلروپلاست غیرفعال مشاهده شد (شکل ۳). این افت pH در این شرایط می‌تواند به دلیل جذب سوکروز محیط بوده که پیرو فعالیت پمپ پروتونی یا H^+-ATPase و تراوش پروتون از بافت گیاهی به محیط صورت می‌گیرد. بر عکس در شرایط عدم حضور سوکروز یا کلروپلاست فعال، افت قابل‌توجه pH مشاهده نشد که دلیل آن می‌تواند عدم جذب سوکروز بوده باشد. این نتایج با گزارش Abdollahi and Ghahremani (2011) مبنی بر افت pH محیط کشت و فعال‌سازی زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست یا حذف سوکروز از محیط منطبق است.

مقایسه نقش پروتئین مؤثره HrpW

بر خلاف نتایج حاصل از آلوده‌سازی شاخه‌چه‌های درون‌شیشه ارقام گلابی تیمار شده با سویه جهش‌یافته *hrp*N⁻، آلوده‌سازی این شاخه‌چه‌ها با سویه جهش‌یافته *hrp*W⁻، سبب تأخیر در هیچ‌یک از دو شاخص ظهور اولین علایم نکروز و سرعت پیشرفت نکروز نشد (شکل‌های ۳ و ٤). این نتایج از طرفی به‌طور کامل با نتایج Venisse et al. (2003) که گزارش کردند جهش‌یافته‌های *hrp*W⁻، بیماری‌زایی مشابهی با سویه‌های شاهد غیرجهش‌یافته داشتند، در انطباق است. هم‌چنین در شرایط کلروپلاست فعال، در دو رقم هروسوئیت و بارتلت، آلوده‌سازی شاخه‌چه‌ها با جهش‌یافته *hrp*W⁻ سبب تسریع ظهور علائم در مقایسه با سویه شاهد غیر جهش‌یافته شد (شکل ٤). بر این اساس، می‌توان احتمال نقش محدود پروتئین مؤثره HrpW را به‌عنوان یک هارپین ثانویه روی تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان داد. به این صورت که در شرایط کلروپلاست فعال، امکان پیشرفت سریع‌تر علائم در شاخه‌چه‌های دو رقم فوق در اثر آلوده‌سازی با جهش‌یافته *hrp*W⁻ در مقایسه با شاهد غیر جهش‌یافته، به دلیل عدم وجود HrpW در باکتری جهش‌یافته، امکان تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک وجود نداشته و پیشرفت علائم نکروز با سرعتی مشابه با سویه شاهد غیر جهش‌یافته صورت گرفته است. در بررسی بیوانفورماتیک انجام گرفته توسط Abdollahi (2003)، با هدف تعیین اندامک هدف برای پروتئین‌های مؤثره باکتری

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

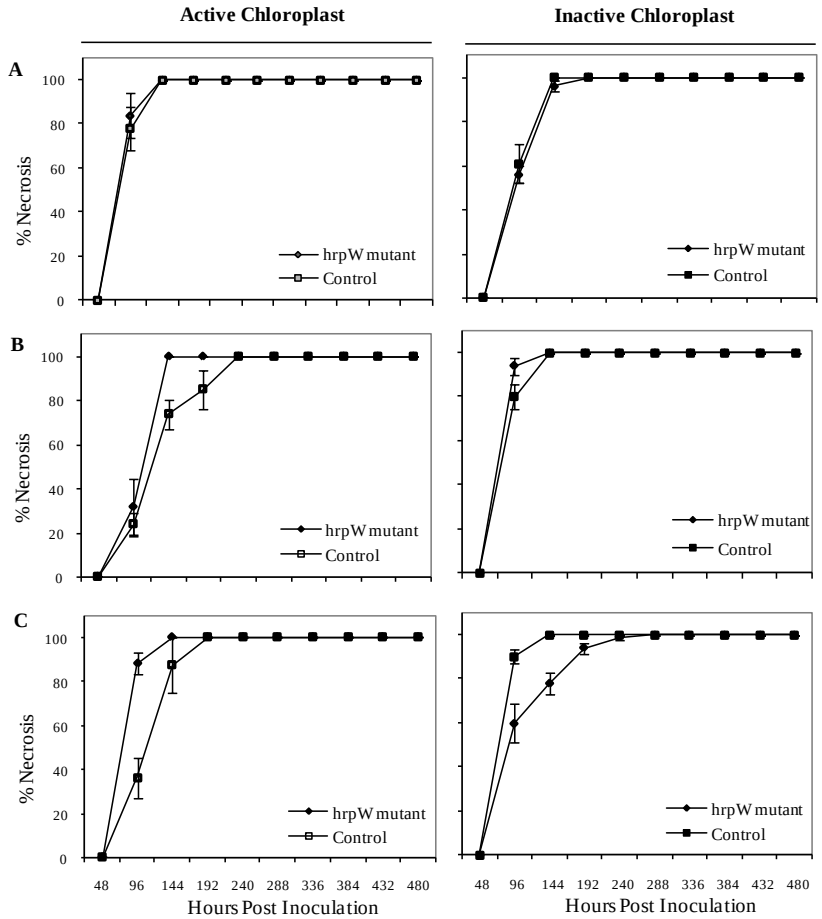
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

E.amylovora، نرم‌افزار پردوتار[1] هیچ توالی سیگنالی در ناحیه N-ترمینال پروتئین‌های مؤثره باکتری شامل HrpN، HrpW و DspA/E را شناسایی نکرد، در حالی که با استفاده از نرم‌افزار تارگت-پی[2] یک توالی سیگنال کلروپلاستی برای پروتئین مؤثره HrpW با احتمال ضعیف به‌دست آمد. این نتایج نشان می‌دهد که در صورت اثبات ورود پروتئین HrpW به کلروپلاست‌های میزبان، بر اساس این شواهد این پروتئین مؤثره ممکن است نقش محدودی در تحریک سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان داشته باشد اما منطبق با گزارشات قبلی، نقش تأثیرگذاری روی بیماری‌زایی باکتری ندارد (Kim and Beer 1995).

مقایسه نقش پروتئین مؤثره DspA/E

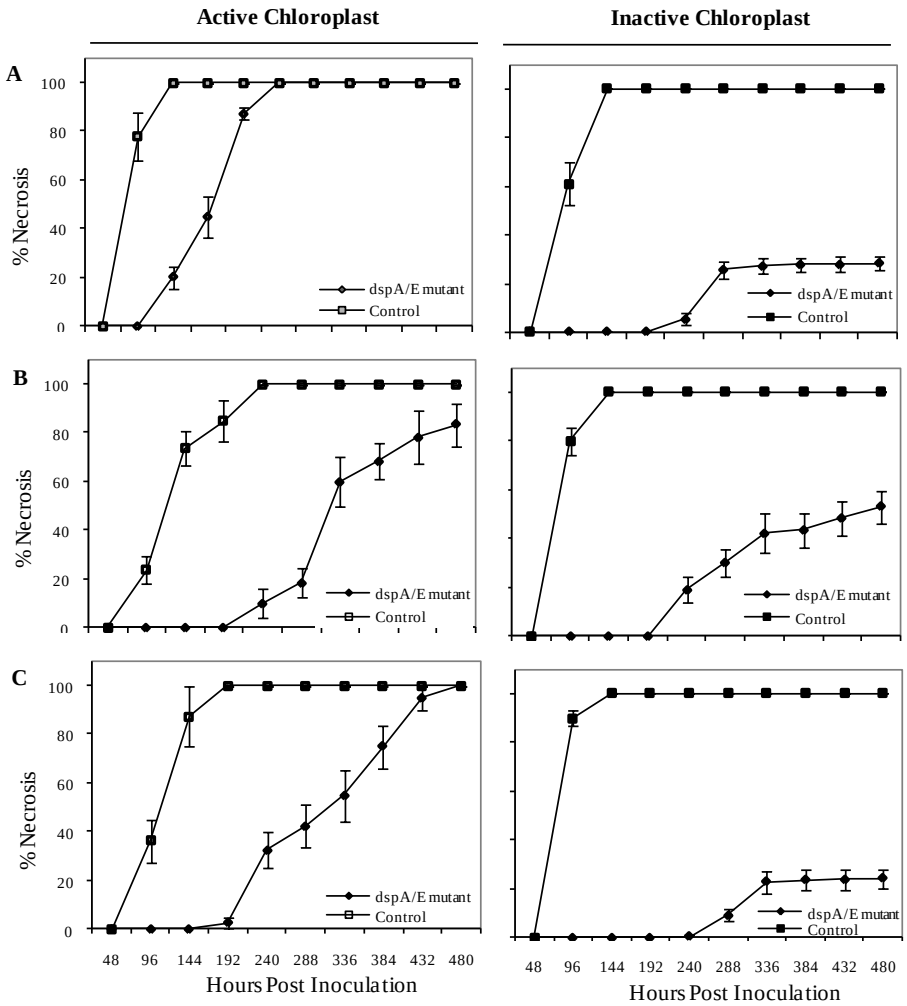
همانند نتایج حاصل از آلوده‌سازی ارقام با سویه جهش‌یافته *hrp*N، در تیمار شاخه‌چه‌های درون‌شیشه، ارقام گلابی تیمار شده با سویه جهش‌یافته *dsp*A/E نیز در هر دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال تأخیر در ظهور اولین علائم نکروز و هم‌چنین کاهش سرعت پیشرفت نکروز نشان دادند (شکل‌های ۳ و ۵). با این تفاوت که تیمار با سویه جهش‌یافته *hrp*N حداکثر میزان تأخیر در ظهور اولین علائم نکروز در مقایسه با شاهد غیر جهش‌یافته، ٤٨ ساعت مشاهده شد، اما در تیمار شاخه‌چه‌های درون‌شیشه با سویه جهش‌یافته *dsp*A/E، میزان تأخیر در ظهور اولین علائم نکروز در کلروپلاست فعال ٤٨ ساعت و در شرایط کلروپلاست غیرفعال تا ١٤٤ ساعت و بیش‌تر نیز در رقم بارتلت مشاهده شد (شکل ۵).

[1] Predotar
[2] Traget-P



شکل ٤- مقایسه پیشرفت نکروز ناشی از سویه جهش‌یافته *hrpW*⁻ باکتری *Erwinia amylovora* با سویه شاهد غیرجهش‌یافته Ea273 در ارقام مختلف گلابی شامل: A) درگزی؛ B) هروسوئیت؛ C) بارتلت، در شرایط کلروپلاست غیرفعال (محیط دارای سوکروز) (راست) و کلروپلاست فعال (فاقد سوکروز) (چپ).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]



شکل ۵- مقایسه پیشرفت نکروز ناشی از سویه جهش‌یافته dspA/E$^-$ باکتری *Erwinia amylovora* با سویه شاهد غیرجهش‌یافته Ea273 در ارقام مختلف گلابی شامل: A) درگزی؛ B) هروسوئیت؛ C) بارتلت، در شرایط کلروپلاست غیر فعال (محیط دارای سوکروز) (راست) و کلروپلاست فعال (فاقد سوکروز) (چپ).

این نتایج در مقایسه با نتایج Venisse et al. (2003) که سویه جهش‌یافته dspA/E$^-$ را غیر بیماری‌زا برای میزبان‌های باکتری گزارش کردند در تضاد است و همانند نتایج ارائه شده در این تحقیق برای سویه جهش‌یافته hrpN$^-$، نشان می‌دهد که سیستم درون‌شیشه استفاده شده در این تحقیق، برخلاف آلوده‌سازی برگ یا میوه نابالغ، دارای برتری تعیین دقیق سهم بیماری‌زایی هر یک از پروتئین‌های مؤثره باکتری می‌باشد. علاوه بر این، مقایسه دو شاخص ظهور اولین علائم نکروز و سرعت پیشرفت نکروز در طول شاخه‌چه‌های درون شیشه ارقام بین دو سویه جهش‌یافته hrpN$^-$ و dspA/E$^-$ نشان‌دهنده تأخیر بیش‌تر سرعت پیشرفت علائم در آلوده‌سازی در هر دو شرایط کلروپلاست فعال و غیرفعال با جهش‌یافته dspA/E$^-$ بود (شکل‌های ۲ و ۵). بر این اساس به‌نظر می‌رسد بر خلاف گزارشات اولیه که پروتئین مؤثره HrpN را به‌عنوان اصلی‌ترین پروتئین مؤثره باکتری *E.amylovora* معرفی نموده‌اند، پروتئین مؤثره DspA/E سهم مهم‌تری در مقایسه با HrpN در ایجاد نکروز و پیشرفت بیماری در میزبان بر عهده دارد. بر اساس مقایسه نتایج این تحقیق با گزارشات قبلی، این نتایج اولین گزارش تعیین سهم نسبی تأثیر پروتئین مؤثره DspA/E در بیماری‌زایی روی میزبان، در مقایسه با پروتئین مؤثره HrpN بوده و در بررسی‌های قبلی صرفاً به بررسی کیفی بیماری‌زا بودن و یا غیربیماری زا بودن سویه جهش‌یافته پرداخته شده بود (Wei et al. 1992; Gaudriault et al. 1997). هم‌چنین به نظر می‌رسد در صورت کسر مساحت زیرنمودار در دو شرایط استفاده از جهش‌یافته hrpN$^-$ و dspA/E$^-$ سهم کمی دقیق‌تری بتوان برای

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

هریک از پروتئین‌های مؤثره در بیماری‌زایی بیان کرد، که مقایسه شکل‌های ۲ و ۵ نشان‌دهنده این است که سهم بالاتری از بیماری‌زایی باکتری توسط پروتئین مؤثره DspA/E و سهم کم‌تری توسط پروتئین مؤثره HrpN ایجاد شده‌است.

DebRoy et al. (2004) و Boureau et al. (2006) گزارش کرده‌اند که DspA/E یکی از اعضای خانواده پروتئین‌های مؤثره باکتریایی حفاظت‌شده بوده و اعضای این خانواده در ارتباط با پیشرفت بیماری، نقش خود را از طریق جلوگیری از فعال‌سازی سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک وابسته به اسیدسالیسیلیک ایفا می‌کنند. هم‌چنین گزارش شده‌است که قطعه ۳/۲ کیلوبازی از ناحیه سی-ترمینال پروتئین مؤثره DspA/E، با پیش‌ماده سیتوپلاسمی یعنی فریدوکسین[1] که یک حامل الکترونی در فتوسیستم I کلروپلاست‌ها می‌باشد، با این پروتئین مؤثره اثر متقابل نشان می‌دهد (Bonasera et al. 2006). لذا در صورت تأثیر پروتئین مؤثره DspA/E روی کلروپلاست‌های میزبان برای ایجاد بیماری، بایستی در سویه جهش‌یافته *hrp*N$^-$ که پروتئین DspA/E تنها پروتئین مؤثره اصلی در بیماری‌زایی آن سویه است، در شرایط کلروپلاست غیرفعال، شدت بیماری کاهش چشمگیری داشته باشد. در صورتی‌که نتایج حاصل از شکل ۲ نشان‌دهنده خلاف این مطلب بوده و لذا به‌نظر می‌رسد DspA/E علاوه بر کلروپلاست‌ها، دیگر اندامک(های) سلولی (که در اینجا می‌تواند میتوکندری‌ها باشد) را نیز در راستای ایجاد بیماری تحت تأثیر قرار می‌دهد. در نهایت یکی از مهم‌ترین نتایج این تحقیق را شاید بتوان در عدم رسیدن میزان نکروز سرشاخه‌ها به ۱۰۰ درصد در شرایط آلوده‌سازی سرشاخه‌ها با سویه جهش‌یافته *dsp*A/E$^-$ در شرایط کلروپلاست غیرفعال ذکر کرد (شکل ۵). لذا با توجه به اینکه در سویه جهش‌یافته *dsp*A/E$^-$، پروتئین HrpN تنها پروتئین مؤثره و اثرگذار سویه است، نشان می‌دهد که پروتئین HrpN برای ایجاد بیماری‌زایی مؤثر، حتماً به کلروپلاست فعال نیازمند بوده و از این‌رو احتمالاً مؤثرترین اندامک درگیر در اثر متقابل پروتئین HrpN با سلول‌های میزبان، اندامک کلروپلاست است که بررسی و ارائه شواهد بیش‌تری برای اثبات این نظریه لازم است. از طرفی، گزارش اخیر Abdollahi et al. (2015) نشان‌دهنده نقش زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل میزبان با باکتری *E. amylovora* بود، لیکن در این بررسی که با استفاده از تأثیر بازدارنده‌های زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست انجام گرفت، نوع پروتئین مؤثره درگیر در این اثر متقابل مشخص نشد. از سوی دیگر Salehi (2016)، با استفاده از فعالیت فلورسانسی کلروفیل، نشان داد که یکی از مراکز تأثیر اصلی باکتری *E. amylovora* به‌طور عموم و صرف‌نظر از نوع پروتئین مؤثره، کلروپلاست‌های سلول‌های میزبان می‌باشد. لذا بر اساس شواهد ارائه شده در دو تحقیق فوق مبنی بر نقش مهم زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل باکتری *E. amylovora* با سلول‌های میزبان و مهم‌ترین نتیجه این تحقیق مبنی بر نقش عمده پروتئین HrpN روی کلروپلاست‌ها در فرآیند اثر متقابل، به‌نظر می‌رسد که زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست‌ها به‌عنوان اصلی‌ترین مرکز اثر پروتئین HrpN روی میزبان قابل ذکر بوده که با نقش کلروپلاست‌ها در مقاومت و تحریک کنندگی HrpN روی سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان نیز منطبق است.

علی‌رغم یافته‌های جدید در دو دهه اخیر در رابطه با ژنتیک بیماری‌زایی باکتری عامل بیماری آتشک، شناسائی انواع پروتئین‌های مؤثره، ساختار سیگنالی و هم‌چنین ساختار خروج پروتئین‌های مؤثره از باکتری توسط سیستم ترشح نوع III، اطلاعات محدودی در رابطه با مکانیسم اثر این پروتئین‌های مؤثره روی سلول‌های گیاهی و به‌ویژه سلول‌های میزبان کسب شده‌است. یافته‌های Venisse et al. (2001) بیانگر نقش تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن و انفجار اکسیداتیو سلول‌های میزبان در این اثر متقابل بوده، لیکن به درستی مشخص نشده‌است که از میان اندامک‌های مسئول در تولید این رادیکال‌ها، به‌ویژه کلروپلاست‌ها و میتوکندری‌ها، سهم هر یک در این انفجار اکسیداتیو تا چه اندازه اهمیت دارد. از سوی دیگر اینکه کدام یک از این پروتئین‌های مؤثره با اندامک‌ها دارای اثر متقابل مستقیم یا غیرمستقیم بوده و سبب این انفجار اکسیداتیو می‌شود، به‌خوبی روشن نیست. یافته‌های Xie and Chen (2000)، نشان‌دهنده تأثیر زنجیره انتقال الکترون میتوکندری در اثر متقابل ناسازگار و یافته‌های Abdollahi et al. (2015) نشان‌دهنده تأثیر زنجیره انتقال الکترون کلروپلاست در اثر متقابل سازگار با میزبان بوده است. اما

[1] Ferridoxin

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

با وجود این گزارش‌ها، همچنان بخش قابل‌توجهی از چگونگی و سهم اثر پروتئین‌های مؤثره نامشخص می‌باشد. یافته‌های این تحقیق به‌عنوان پیشرفت محدودی در تعیین این اثر متقابل در شرایط درون‌شیشه، سهم هر یک از این پروتئین‌های مؤثره را در ایجاد بیماری روی ارقام درخت گلابی مشخص نمود. علاوه بر این، شواهدی مبنی بر اثر متقابل پروتئین HrpN با کلروپلاست‌های میزبان ارائه داد که در مرحله بعد لازم است با استفاده از آزمایش‌های تکمیلی مورد اثبات نهایی قرار گیرد. این یافته اخیر هم‌چنین تا حد زیادی با بررسی Boccara et al.(2007) که گزارش کردند کلروپلاست‌ها طی واکنش فوق‌حساسیت از طریق اثر پروتئین HrpN دچار تغییرات فتوسنتزی و ساختاری تیلاکوئیدها می‌شوند در انطباق است. لذا چنین می‌توان جمع‌بندی کرد که ضمن اثبات هرچه بیش‌تر نقش کلروپلاست‌ها در اثر متقابل باکتری عامل بیماری آتشک و میزبان در این تحقیق، پروتئین مؤثره HrpN به‌عنوان اصلی‌ترین مؤلفه این اثر متقابل پیشنهاد می‌شود. هم‌چنین در ادامه لازم به ذکر است که مرکز اثر سایر پروتئین‌های مؤثره، سهم اثر آن‌ها روی تحریک یا تضعیف سیستم دفاع اکتسابی سیستمیک میزبان و چگونگی تعیین سطح حساسیت یا مقاومت در رقم تعیین شد. طبیعتاً چنین یافته‌هایی می‌تواند به درک بهتر ساختار مقاومت و کارآیی بهتر اصلاح به روش‌های معمول و زیست‌فناوری برای مقاومت به این بیماری مفید واقع شود.

منابع

Abdollahi H (2003) Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* and pear (*Pyrus communis* L.) genotypes with different susceptibility to fire blight. PhD. Dissertation, University of Florence, Italy.

Abdollahi H, Ghahremani Z (2011) The role of chloroplasts in the *Erwinia amylovora* and the host plants. ActaHorticulturae 896:215-221.

Abdollahi H, Ghahremani Z, Erfani Nia K (2015) Role of electron transport chain of chloroplasts in oxidative burst of interaction between *Erwinia amylovora* and host cells. Photosynthesis Research 124:231-242.

Abdollahi H, Rugini E, Ruzzi M, Muleo R (2004) In vitro system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79:90-95.

Bellemann P, Geider K (1992) Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of Erwinia amylovora and their biochemical characterization. Journal of General Microbiology 138: 931-940.

Bhattacharjee S (2011) Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. In: DuttaGupta S (ed) Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, 1-30.

Boccara M, Schwartz W, Guiot E, Vidal G, De Paepe R, Dubois A, Boccara AC (2007) Early Chloroplastic alterations analyzed by optical coherence tomography during a harpin-induced hypersensitive response. The Plant Journal 50:338-346.

Bogdanove AJ, Bauer DW, Beer SV (1998a) *Erwinia amylovora* secretes DspE, a pathogenicity factor and functional AvrE homolog, through the Hrp (type III secretion) pathway. Journal of Bacteriology 180:2244-2247.

Bogdanove AJ, Kim JF, Wei ZM, Kolchinsky I, Charkowski AO, Conlin AK, Collmer A, Beer SV (1998b) Homology and functional similarity of an hrp-linked pathogenicity locus, dspEF, of *Erwinia amylovora* and the avirulence locus avrE of *Pseudomonas syringae* pathovar *tomato*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95:1325-1330.

Bonasera JM, Meng X, Owens T, Beer SV (2006) Interaction of DspE/A, a pathogenicity/avriulence protein of *Erwinia amylovora*, with pre-ferredoxin from apple and its relationship to photosynthetic efficiency. Acta Horticulturae 704:473-477.

Boureau T, El Maarouf-Bouteau H, Garnier A, Brisset MN, Perino C, Pucheu I, Barny MA (2006) DspA/E, a type III effector essential for *Erwinia amylovora* pathogenicity and growth in planta, induces cell death in host apple and non-host tobacco plants. Molecular Plant Microbe Interaction 12:312-329.

DebRoy S, Thilmony R, Kwack YB, Nomura K, He SY (2004) A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 101:9927-9932.

Degrave A, Fagard M, Perino S, Brisset MN, Gaubert S, Laroche S, Patrit O, Barny MA (2008) *Erwinia amylovora* type three-secreted proteins trigger cell death and defense responses in *Arabidopsis thaliana*. Molecular Plant Microbe Interaction 21:1076-1086.

Dong H, Delaney T, Bauer D, Beer S (1999) Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. The Plant Journal 20:207-215.

Erfaninia K, Abdollahi H, Khosroshahli M (2014) Effect of several chloroplast electron transport chain inhibitors on

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

interaction of *Erwinia amylovora* with susceptible and tolerant apple and pear cultivars. Plant Pathology 49:201-214. (In Farsi).
Gaudriault S, Malandrin L, Paulin JP, Barny MA (1997) DspA, an essential pathogenicity factor of *Erwinia amylovora* showing homology with AvrE of *Pseudomonas syringae*, is secreted via Hrp secretion pathway in a DspB-dependent way. Molecular Microbiology 26:1057-1069.
Khan MA, Zhao YF, Korban SS (2012) Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. Plant Molecular Biology Reporter 30:247-260.
Kim JF, Beer SV (1995) HrpW of *Erwinia amylovora*, a new harpin that contains a domain homologous to pectatelyases of a distinct class. Journal of Bacteriology 180:5203-5210.
Leblay C, Chevreau E, Robin LM (1991) Adventitious shoot regeneration from in vitro leaves of several pear cultivar (*Pyrus communis* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25:99-105.
Menggad M, Laurent J (1998) Mutations in ams genes of Erwinia amylovora affect the interactions with host plants. European Journal of Plant Pathology 104: 313-322.
Oh CS, Beer SV (2005) Molecular genetics of *Erwinia amylovora* involved in the development of fire blight. FEMS Microbiology Letters 253:185-192.
Salehi Z (2016) Evaluation of salicylic acid effects on tolerance to the biotic and abiotic stresses in apple and pears. M. Sc Thesis, Azad University of Karaj, Karaj, Iran.
Steinberger EM, Cheng GY, Beer SV (1990) Characterization of a 56-kb plasmid of Erwinia amylovora Ea322: its non-involvement in pathogenicity. Plasmid 24:12-24.
Venisse JS, Barny MA, Paulin JP, Brisset MN (2003) Involvement of three pathogenicity factors of *Erwinia amylovora* in the oxidative stress associated with compatible interaction in pear. FEBS Letter 537:198-202.
Venisse JS, Gullner G, Brisset MN (2001) Evidence for the involvement of an oxidative stress in the initiation of infection of pear by *Erwinia amylovora*. Plant Physiology 125:2164-2172.
Wang D, Korban S, Pusey PL, Zhao Y (2012) AmyR Is a Novel Negative Regulator of Amylovoran Production in Erwinia amylovora. PLoS One 7: e45038.
Wei ZM, Beer SV (1996) Harpin from *Erwinia amylovora* induces plant resistance. ActaHorticulturae411:223-226.
Wei ZM, Laby RJ, Zumoff CH, Bauer DW, He SY, Collmer A, Beer SV (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257:85-88.
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.
Yabuta Y, Mieda T, Rapolu M, Nakamura A, Motoki T, Maruta T, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S (2007) Light regulation of ascorbate biosynthesis is dependent on the photosynthetic electron transport chain but independent of sugars in *Arabidopsis*. Journal of Experimental Botany 58:2661-2671.
Zhao YF, Qi M (2011) Comparative genomics of *Erwinia amylovora* and related *Erwinia* Species-What do we learn? Genes 2:627-639.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.2.6] [Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-20]