تأثیر GR24، یک ترکیب مصنوعی مشابه با استریگولاکتون‌ها، بر فعالیت‌های فیزیولوژیکی و ریخت‌شناختی *Ustilago maydis*

EFFECT OF GR24, A SYNTHETIC ANALOG OF STRIGOLACTONES, ON PHYSIOLOGICAL AND MORPHOLOGICAL ACTIVITIES OF *Ustilago maydis*

سید کاظم صباغ[۱*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۶؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۳/۳)

چکیده

Ustilago maydis از شاخه بازیدیومیکوت‌ها و عامل بیماری مخرب سیاهک عمومی ذرت و سورگوم می‌باشد. این‌گونه در طول چرخه زندگی خود دارای مراحل مختلف هاپلوئید، دیکاریوتیک و دیپلوئید است. در اثر تلاقی بین دو سلول هاپلوئید سازگار روی سطح برگ مرحله دیکاریوتیک ایجاد می‌شود که قادر به بیماری‌زایی در گیاه می‌باشد. اگر چه ***U. maydis*** از طریق اندام‌های هوایی و ریشه قادر به نفوذ است ولی علایم بیماری تنها روی اندام‌های هوایی ظاهر می‌شود. با توجه به اینکه ترشحات ریشه نقش بسیار مهمی در تعاملات بین گیاه و سایر میکروارگانیسم‌ها دارد در این مطالعه نقش **GR24** (یک ماده شیمیایی مشابه با استریگولاکتونها) در تحریک فعالیت‌های فیزیولوژیک و ریخت‌شناسی ***U. maydis*** بررسی شد. با استفاده از روش‌های مختلف اندازه‌گیری تنفس سلولی میزان تغییرات تنفس سلولی بعد از تحریک سویه‌های مختلف ***U. maydis*** با **GR24** اندازه‌گیری شد. مشاهدات ما نشان داد که یک ساعت بعد از تحریک، میزان تنفس سلولی ۱۱ درصد افزایش یافت اما بعد از سه و پنج ساعت تحریک، میزان تنفس سلولی به‌ترتیب به میزان هشت و پنج درصد کاهش یافت که این کاهش می‌تواند به‌علت آثار سم‌زدایی قارچ در برخورد با مولکول خارجی باشد. میزان بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در بیوتروفی و تنفس سلولی با استفاده از روش **Real-time PCR** مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که بیان ژن‌های تنفس سلولی در سلول‌های تحریک شده با **GR24** نسبت به شاهد افزایش یافت. با این حال **GR24** تأثیری در تغییر شکل ظاهری و تبدیل حالت مخمری به فاز میسلیومی سویه هاپلوئید ***U. maydis*** نداشت. این مولکول با افزایش تنفس سلولی می‌تواند در نفوذپذیری قارچ به ریشه و واکنش‌های دفاعی گیاه مؤثر باشد ولی نقشی در بیماری‌زایی قارچ ایفا نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: تغییرات فیزیولوژیکی، تنفس سلولی، ژن‌های بیوتروف، **GR24**، ***Ustilago maydis***.

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sk.sabbagh@uoz.ac.ir

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچ *Ustilago maydis* (Dc) Corda. (syn. *U. zeae*) متعلق به شاخه بازیدیومیکوتا و عامل بیماری مخرب سیاهک عمومی ذرت و سورگوم می‌باشد. این‌گونه علاوه بر دو میزبان فوق از بازدانگان، دو لپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها شامل *Carica papaya*, *Asparagus officinalis*- *Allium sativum* , *Solanum tuberosum* , *Nicotiana tabacum- Phaseolus vulgaris*, L. cv. *Negro queretaro*, *Sorghum bicolor* Moench cv. Esmeralda, *Oryza sativa* L. cv. Morelos A92, نیز گزارش شده است (Leon-Ramirez *et al.* 2004). با توجه به خصوصیات منحصر به فرد این قارچ در مطالعات زیست‌شناسی و هم‌چنین آنالیز جنبه‌های مختلف عوامل مؤثر در بیماری‌زایی، مطالعاتی در خصوص توانایی آلوده‌سازی گیاه مدل آرابیدوپسیس توسط این گونه مورد ارزیابی قرار گرفته است. *منادز و همکاران* (Méndez *et al.* 2005) نشان دادند که سویه دیپلوئید *U. maydis* در شرایط آزمایشگاهی قادر به آلوده کردن *Arabidopsis thaliana* می‌باشد. چرخه زندگی *U. maydis* از جوانه زدن اسپور مقاوم (تلیوسپور) حاوی چهار اسپوریدی آغاز می‌شود که هر یک از این اسپورها حاوی نیمی از اطلاعات ژنتیکی لازم برای جفت شدن و تولید ریسه بیماری‌زا می‌باشد.

پس از جفت شدن سلول‌های سازگار، دو هسته در ریسه جدید در کنار هم قرار می‌گیرند و میسلیوم دیکاریوتیک (n+n) بیماری‌زا را تشکیل می‌دهند. سازگاری جنسی در این قارچ به‌صورت چهار قطبی و توسط دو آلل a وb کنترل می‌شود که آلل‌های a مسئول تولید فرمون و دریافت‌کننده‌ها و آلل‌های b مسئول رشد و توسعه رشد ریسه‌ای در گیاه میزبان می‌باشند (Banuett 1989). در پاره‌ای از موارد در اثر یک ناهنجاری میوزی در تلیوسپور یک سلول دیپلوئیدی از جوانه زدن آن به‌وجود می‌آید که بدون نیاز به جفت سازگار، قادر به تولید ریسه رویشی و نفوذ می‌باشد (Sabbagh *et al.* 2010). تمام مطالعات انجام شده تاکنون بر روی اندام‌های هوایی گیاهان مورد مطالعه صورت گرفته است (Méndez *et al.* 2005, Snetselaar & Mims 1994, Snetselaar *et al.* 1996). *U .maydis* قادر است از طریق ریشه ذرت نیز وارد بافت‌های میزبان شود و در سیستم ریشه و حتی اندام‌های هوایی نیز گسترش یابد (Sabbagh *et al.* 2006). ریشه گیاهان در ریزوسفر همواره در معرض عوامل مختلف و متنوع زیستی است و در این میان ترشحات ریشه نقش بسیار مهمی در تعاملات بین گیاه و میکروارگانیسم‌ها دارد. دریافت سریع ترشحات ریشه توسط هر یک از عوامل موجود در خاک باعث افزایش قدرت تهاجمی و رقابتی آنها در برابر سایر موجودات خواهد شد که در مراحل بعد، این رابطه می‌تواند منجر به بیماری‌زایی یا همزیستی مسالمت‌آمیز شود. یکی از ترکیبات موجود در ترشحات ریشه استریگولاکتونها (ترکیبات ترپنوئیدی سنتز شده از مسیر بیوسنتز فلاونوئیدها) هستند (Akiyama *et al.* 2005, Bouwmeester *et al.* 2003, Tamasloukht *et al.* 2003) که اولین‌بار از گیاه پنبه به‌عنوان یک محرک در جوانه زدن بذر گیاه پارازیت استریگا معرفی شد و مورد ارزیابی قرار گرفت (Cook *et al.* 1972). این ترکیبات به‌عنوان هورمون‌های گیاهی در ترشحات ریشه تمام گیاهان معرفی شده‌اند که باعث تحریک و جوانه زنی اسپور قارچ‌های میکوریز و هم‌چنین رشد و توسعه ریسه‌های آنها در داخل گیاه می‌شوند (Umehara *et al.* 2008). نقش این ترکیبات در روابط همزیستی بین قارچ‌های میکوریز و

www.SID.ir

گیاهان ترشحه‌کننده به اثبات رسیده است (Akiyama *et al.* 2005, Besserer *et al.* 2006). کاربرد غلظت‌های مختلف یک ماده شیمیایی مشابه با استریگولاکتون‌ها (GR24) در سطح ریشه گیاه یونجه (*Medicago sativa*) تلقیح شده با باکتری *Sinorhizobium meliloti* باعث افزایش قابل توجه تعداد گره‌های حاوی باکتری در سطح ریشه شده است. نتایج نشان داده است که این تغییر به‌دلیل تأثیر ماده ذکر شده در افزایش میزان بیان ژن‌های مسئول تشکیل گره (nod factor) می‌باشد (Soto *et al.* 2010). با توجه به نقش مؤثر این ترکیبات در تعاملات ریشه‌ای و هم‌چنین ورود *U. maydis* از طریق ریشه ذرت، بررسی و مطالعه اثر این مواد در تنظیم و بیان ژن‌های بیوتروفی و مطالعات دقیق‌تر تعاملات ریشه‌ای لازم و ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق تعیین نقش استریگولاکتون‌ها (GR24) در تحریک بیان ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی (ژن‌های بیوتروفی)، تغییرات ریخت شناختی و فیزیولوژیکی *U. maydis* می‌باشد.

روش بررسی

سویه‌های قارچی و شرایط کشت

در این مطالعه از سویه‌های هاپلوئید FB6a and FB6b (Banuett 1989) و سویه‌های سولوپاتوژن FBD11/pOTEF (Spellig *et al.* 1996) استفاده شد. سویه‌های ذکر شده به شکل مخمری به ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB (Potato Dextrose Broth, Sigma) اضافه گردید و در دمای ۲۴ °C و تاریکی روی شیکر دورانی با ۱۰۷ دور در دقیقه قرار گرفتند.

تهیه GR24

مولکول شیمیایی مشابه استریگولاکتون، GR24 (Chiralix, Nijmegen, Netheland)، در غلظت 10^{-2}مولار در استون ۱۰ درصد تهیه شد و در استون رقیق شده در آب (۱٪ استون / آب) غلظت نهایی 10^{-4} مولار تهیه گردید. ۱۰ میکرولیتر از GR24 با غلظت 10^{-4}مولار و ۱۰ میکرولیتر از محلول استون ۱٪ به ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون قارچی حاوی 10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر به‌ترتیب برای تیمار و شاهد مورد استفاده قرار گرفت.

اثر GR24 بر تغییرات ریخت شناختی

ارزیابی اثر GR24 بر رفتار فیزیولوژیکی قارچ با دو روش استفاده از محیط کشت مایع و جامد انجام گردید. برای محیط مایع، ۱۰ میکرولیتر از محلول GR24 با غلظت 10^{-4}مولار (غلظت نهایی در محیط کشت 10^{-7}مولار) برای تیمار و برای نمونه‌های شاهد از ۱۰ میکرولیتر استون ۱٪ به عنوان حلال GR24 در ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون تازه کشت شده با غلظت 10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری استفاده شد. ارلن‌های حاوی سلول‌های قارچ تحت تأثیر این مولکول بر روی دستگاه لرزان به مدت یک، سه و پنج ساعت قرار داده شد و در ساعت‌های تعیین شده تغییرات ظاهری (مخمر- میسلیوم) سلولها با میکروسکوپ نوری مورد بازبینی قرار گرفت. برای محیط جامد از محیط کشت فیتاژل (Phytagel, Sigma) حاوی عناصر کم‌مصرف و پرمصرف استفاده شد. تعدادی چاهک کوچک در محیط کشت ایجاد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از ماده GR24 با غلظت 10^{-4}مولار در آنها ریخته، سپس تعداد ۱۰۰ سلول مخمر تازه از هر سویه بر روی محیط کشت پخش شد. برای شاهد از ۱۰۰ میکرو لیتر استون ۱٪ در چاهک‌ها

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. تشتک‌های پتری حاوی قارچ و ماده محرکه در دمای ۱۷°C در شرایط تاریکی قرار داده شدند. بعد از دو روز به‌مدت یک هفته احتمال تغییرات ظاهری سلول‌ها با بیناکولر مورد بررسی قرار گرفت.

اثر GR24 بر تنفس سلولی

اندازه‌گیری میزان تنفس سلولی با استفاده از دو روش پولاروگرافی و فلورسانس انجام شد. در روش پولاروگرافی ثبت نمودار تغییرات تنفسی با استفاده از یک کلارک الکترود طبق روش بسرر و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. در روش فلورسانس از معرف CellTiterBlue در پلاک‌های شفاف ۹۶ تایی استفاده شد. بدین منظور از محلول رنگی رزازورین که آبی رنگ است استفاده شد. این ماده در اثر اکسیداسیون تبدیل به رزافورین قرمز رنگ و در محیط حاوی بازدارنده‌های تنفس سلولی نظیر سیانید هیدروژن به سرعت سفید می‌شود. در هر چاهک ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سلول تحریک شده و سپس ۲۰ میکرولیتر محلول معرف CelltiTerBlue اضافه شد. برای نمونه‌های شاهد از محیط کشت بدون سلول زنده و محلول قارچی تحریک نشده (استون) استفاده گردید. برای اطمینان از زنده بودن سلول‌ها و انجام تنفس سلولی در محیط، ازسیانید هیدروژن به میزان یک میلی‌گرم در هر چاهک استفاده گردید. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام شد. پلاک‌های مورد نظر در دستگاه Fluoroskan FL600 (Bio-tek, Vermont, USA). و با طول موج القائی ۵۶۰ و خروجی ۵۹۰ نانومتر در دمای ۲۵ °C قرار داده شدند و میزان تغییرات تنفس سلولی در سه زمان اعمال شده اندازه‌گیری و داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار MSTAT آنالیز واریانس شدند.

تعیین غلظت بهینه GR24 در تحریک تنفس سلولی

جهت تعیین تأثیر غلظت بهینه GR24 در فعالیت‌های تنفسی *U. maydis* ده میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلول‌های قارچی دو سویه سولوپاتوژن و هاپلوئید به محیط کشت PDB حاوی غلظت‌های 10^{-5}، 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-11} و 10^{-13} مولار از ترکیب GR24 اضافه گردید و برای شاهد تنها از استون یک درصد استفاده شد. میزان تغییرات تنفس سلولی با دستگاه طیف‌سنجی و ماده رنگی CellTiter Blue و بعد از گذشت یک ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر سویه سه تکرار در شرایط رشدی مشابه در نظر گرفته شد و متوسط میزان افزایش یا کاهش تنفس سلولی در سلول‌های تیمار نسبت به شاهد مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

برای ارزیابی بیماری‌زایی *U. maydis* از بذور ذرت ال.ام.زد۶۶ (LMZ66 - France) به‌عنوان میزبان حساس و طبیعی استفاده شد. برای این کار ابتدا بذرها به مدت ۱۵ دقیقه توسط کلر آمین تی سه درصد گندزدایی و سپس سه دفعه و هر دفعه به مدت پنج دقیقه با آب مقطر دیونیزه شستشو داده شدند. بذرها جهت جوانه‌زنی به محیط کشت PDA منتقل و پس از جوانه‌زنی در گلدان‌های حاوی خاک سترون شده (دو بذر در هر گلدان) کشت داده شدند. بلافاصله پس از کاشت، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون با غلظت 10^{7} سلول در هر میلی‌لیتر از سلول‌های تیمار شده قارچ توسط GR24 در کنار ریشه تازه جوانه‌زده اضافه و با خاک سترون پوشیده شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در دمای ۵ ± ۱۸/۲۴°C و شرایط نوری و تاریکی (۱۴ ساعت نوری و ۱۰ ساعت تاریکی) به‌مدت سه تا پنج هفته نگهداری و سپس برای

www.SID.ir

تشکیل خوشه به گلخانه منتقل شدند.

استخراج RNA

برای استخراج RNA ابتدا سلول‌های تیمار شده با GR24 و شاهد (استون/آب) در سه زمان یک، سه و پنج ساعت با۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و پس از جمع‌آوری در ۸۰°C- نگهداری شدند. کل RNA سلول‌های قارچی با استفاده از روش استاندارد فنل- کلروفورم استخراج و با استفاده از کیت خالص‌سازی RNA (Promega, France) شستشو شد. سپس با توجه به دستورالعمل زمان‌بندی شده توسط شرکت سازنده، با آنزیم RNase-Free DNase Set (Promega, France) تیمار شدند. بررسی کمیت و کیفیت RNA به‌دست آمده به‌ترتیب با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی نانودراپ (Nanodrop ND -1000, USA) و ژل آگارز ۱% رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید انجام شد. جهت ارزیابی دقیق‌تر کیفیت مولکول‌های RNA از کیت اژیلانت (Agilent 2100 Bioanalyzer; USA) و مقایسه باندهای RNA با rRNA استفاده شد. جهت انجام نسخه‌برداری معکوس و ساخت cDNA از آنزیم ImPromII (Promega, France) و مطابق دستور شرکت سازنده استفاده گردید و رشته نخست cDNA خالص‌سازی و کمیت آن با استفاده از دستگاه طیف‌سنجی نانودراپ ارزیابی گردید. ۱۰۰-۵۰ نانوگرم از رشته اول cDNA جهت سنتز رشته دوم با استفاده از کیت cDNA SmartTM (Bioscience, Clontech, USA.) و طبق دستور شرکت سازنده استفاده شد.

طراحی آغازگرها و انجام qRT-PCR

در این مطالعه براساس توالی ژن‌های شناخته شده مرتبط با بیوتروفی (Kahmann & Kamper 2004) و هم‌چنین ژن‌های مسئول تنفس سلولی و از طریق سایت پرایمر۳ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi- bin/primer3/ primer3_www.cgi) از آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی استفاده شد. به‌طورکلی ۱۱ ژن مسئول فعالیت‌های بیوتروفی (جدول ۱) و هفت ژن مرتبط با چرخه فعالیت‌های تنفسی (جدول۲) در نظر گرفته شد و میزان بیان آنها در اثر تحریک با GR24 در مقایسه با شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژن‌های *GNAT* و *EF1* به‌عنوان ژن‌های مرجع به‌ترتیب برای مرحله بیوتروفی و تنفس سلولی استفاده شد. افزایش و یا کاهش ژن‌های مورد مطالعه پس از یک، سه و پنج ساعت با آزمون سنجش کمی (qRT-PCR) در پلاک‌های ۳۸۴ چاهکی و با دستگاه ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems; USA) انجام شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول واکنش به هر چاهک اضافه شد و سپس هشت میکرولیتر از مخلوط معرف سایبر گرین (SYBR Green PCR MasterMix)، ۱۰ میکرو مولار از هر آغازگر چند نوکلئوتیدی (غلظت نهایی) و دو میکرولیتر (۵۰ نانوگرم) از cDNA با هم مخلوط و اضافه گردید.

برای هر زمان دو تکرار بیولوژیکی (تحریک با GR24) و سه تکرار تکنیکی (کمیت سنجی) در نظر گرفته شد. تکرارها در پلاک مورد آزمایش با خطای تکنیکی اختلاف زیر ۰/۵ سیکل مورد تأئید قرار گرفتند. مراحل واکنش زنجیره پلی مراز نوری به‌صورت زیر تنظیم شد: ۹۵ °C برای ۱۰ دقیقه و برای ۴۰ چرخه متوالی با برنامه زمانی و دمایی ۹۵ °C برای ۱۵ ثانیه و ۶۰ °C برای یک دقیقه انجام شد. شیب منحنی استاندارد برای محاسبه ضریب راندمان با استفاده از فرمول $E = 10^{-1/slope}$ محاسبه گردید (Ptaffi 2001). برای تعیین غلظت cDNA مورد نیاز از رقت‌های ۱۰ تا ۱۰۰ نانوگرم استفاده شد. از ژن

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن‌های مربوط به فعالیت‌های بیوتروفی در *Ustilago maydis*

Table 1. The primers used to amplify region genomic of genes related to biotrophy activities in *Ustilago maydis*

Name of Gene	Function	Left primer (5'-3')	Right primer (5'-3')	Reference
Smu1	p21-activated protein kinase	TAGCGTGCCTCGTCG GGGT	TAGCAGCTCGCGGT TGAGCG	Smith *et al.* (2004)
ubc2	conjugation tube formation	TCGCCACTACAGGT CGGAGCA	CCCGAATTCCGCGC CACTGT	Mayorga & Gold (2001)
ras2	small G protein	ACCATTGAGGACTC TTACC	CGGCAGTATCCAAC ACATC	Lee & Kronstad (2002)
kpp4	MAPKKK	GGCGTTAACCGCGG GTGTGA	GCCATGACGCCTGT GCCCAT	Andrews *et al.* (2000)
ubc4	formation of appressoria	ACGGGCTCGCCCAC AAATGG	TGCGACGACCTAGG CAAAGCA	Müller *et al.* (2003)
fuz7	MAPKK	TCGCCACTACAGGT CGGAGCA	CCCGAATTCCGCGC CACTGT	Banuett & Herskowitz (1994)
ubc5	conjugation tube formation	ACGGGCTCGCCCAC AAATGG	TGCGACGACCTAGG CAAAGCA	Andrews *et al.* (2000)
Kpp6	MAPK	GGCAGATCGTCGTG CTCTGGC	CCAGCGCAGCCCGG TTCTAC	Brachmann *et al.* (2003)
ubc3	filamentation and formation	TGCTGATGGGCAGC TGTTCACA	GCTGCTGTCCGTGG GCATGT	Müller *et al.* (1999)
crk1	MAP kinase	AGCTCGACCATGCC TCTGCGA	AACAAGATCGCGGT GCGGGG	Kämper *et al.* (1995)
GNAT	Glycine N-acyltransferase	TGCCATCCTCGACTT TATCC	TCAGCAATCAACAC CTCTGC	Kämper *et al.* (1995)

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر نواحی مربوط به توالی‌های بیان شده نشاندار (EST) در *Sporisorium reilianum*

Table 2. The primers used to amplify region related to Express Sequence Tag (ESTs) in *Sporisorium reilianum*

Name of gene	Gene Ontology	Left primer (5'-3')	Right primer (5'-3')
Cytochrome-coxidase activity	0004129	GTGGCATACCACCAAGACCT	GGACGAATCCATTTCTGGAC
Isocitrate dehydrogenase (NAD+) activity	0004449	GGCGGACTACGTTTACAAGC	ACGCCATCTTCAAGACCATC
FAD Binding	0050660	CGGAGAGGGATGATGTCAAT	AAGCTCGACTACCGTGCTGT
NADH Dehydrogenase (ubiquinone) activity	0008137	CGCCTTCAAGACGTACAACA	TGCTTGGGTCACTTGAGTTG
Oxidoreductase activity	0016491	TTTGATTTCCAGTCGGTTCC	GACTTGAGTGCAGCCAATGA

Archive of SID
www.SID.ir

GNAT به‌عنوان ژن مرجع و برای یکنواخت‌سازی شرایط آزمایش استفاده شد. تمام داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار سیستم تشخیص توالی (Sequence Detection System software , SDS 2.2) و نرم‌افزار اکسل مرتب و آنالیز شدند.

نتایج

تأثیر GR24 بر ژن‌های تنفسی

ژن‌های سیتو کروم اکسیداز و اکسیدو ردوکتاز که از ژن‌های مهم در چرخه واکنش‌های تنفسی می‌باشند یک ساعت پس از استفاده از GR24، بیشترین میزان سطح بیان را نشان دادند. افزایش بیان ژن‌های ایزوسیترات دهیدروژناز و یوبی کینون نسبت به شاهد برای زمان‌های سه و پنج ساعت هم مشاهده گردید ولی میزان افزایش آنها نسبت به تیمار زمانی یک ساعت به‌ویژه برای دو ژن سیتو کروم اکسیداز و اکسیدو ردوکتاز کمتر بود. کمترین میزان بیان بعد از یک ساعت تحریک مربوط به ژن *FAD binding protein* و *Hydrolase activity* تعیین شد. به‌طورکلی در تیمارهای اعمال شده پس از سه و پنج ساعت اگر چه میزان بیان ژن‌های مربوط به فعالیت‌های تنفسی افزایش داشت ولی میزان افزایش آنها نسبت به یک ساعت اول کمتر بود (شکل۲).

تأثیر GR24 بر فعالیت‌های تنفسی

میزان تغییرات تنفس سلولی در مواجه با غلظت‌های مختلف GR24 در سه زمان یک، سه و پنج ساعت مورد بررسی قرر گرفت(جدول ۳). نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از ترکیب GR24 با غلظت 10^{-5} مولار باعث کاهش میزان تنفس سلولی در هر دو سویه می‌شود و دو غلظت 10^{-11} و 10^{-6} نیز به‌ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در افزایش میزان تنفس سلولی داشتند. غلظت‌های 10^{-7} و 10^{-13} مولار به‌ترتیب بر روی سویه‌های سولوپاتوژن FD11 و هاپلوئید FB6 باعث تحریک بهینه و افزایش فعالیتهای تنفسی گردید (شکل۳).

تأثیر GR24 بر ژن‌های مربوط به فعالیت‌های بیوتروفی

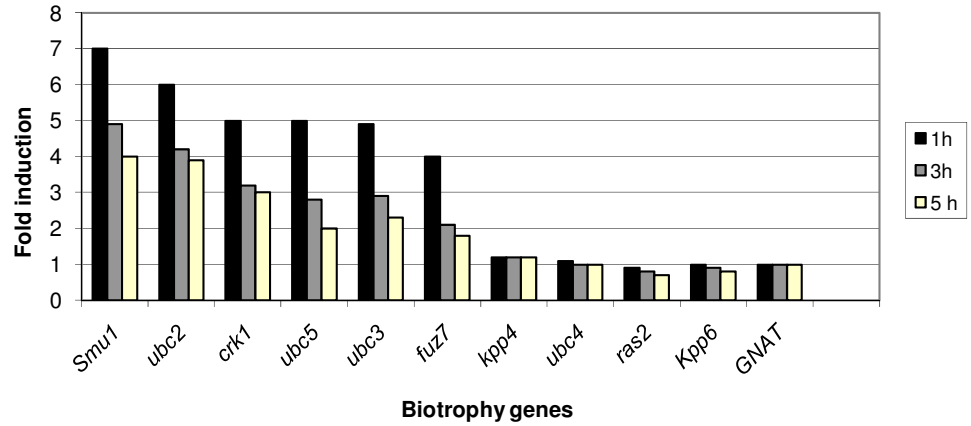
برای ارزیابی اثر ماده GR24 بر روی خصوصیات بیوتروفی، تغییرات بیان تعدادی از ژن‌های دخیل در مراحل اولیه بیوتروفی از نظر کلی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان تغییرات بیان ژن‌های مختلف در یک زنجیره ژنی متفاوت است. به‌عنوان مثال ژن‌های *Smu1* و *Ubc2* که در بالا دست یک زنجیره ژنی قرار داشتند به‌ترتیب هفت و شش برابر نسبت به شاهد افزایش بیان نشان دادند ولی ژن‌های پایین دست این مجموعه نظیر *Kpp6* و *Ubc4* دارای تغییر قابل ملاحظه‌ای در سطح بیان نبودند. بیشترین بیان ژن‌های مطالعه شده، یک ساعت بعد از اضافه شدن GR24 و پس از سه و پنج ساعت یک شیب کاهشی در سطح بیان همه ژن‌های بررسی شده مشاهده شد (شکل۱).

نقش GR24 در تغییرات ظاهری و بیماری‌زایی

اثر ماده GR24 روی تغییرات ظاهری سلول‌های قارچی با دو روش کشت در محیط جامد و مایع مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج این آزمایش نشان داد که GR24 تأثیری در تغییر شکل ظاهری سلول‌های هاپلوئیدی نظیر انشعابات فرعی یا حالت رشد هیفی و قطبی شدن مجموعه میسلیومی ندارد. استفاده از این ماده با غلظت‌های مختلف بر روی تلیوسپور قارچ نتوانست منتج به تولید سلول‌های دیپلوئیدی سولوپاتوژن در محیط کشت جامد شود. براساس نتایج به‌دست آمده، GR24 تأثیری در وضعیت

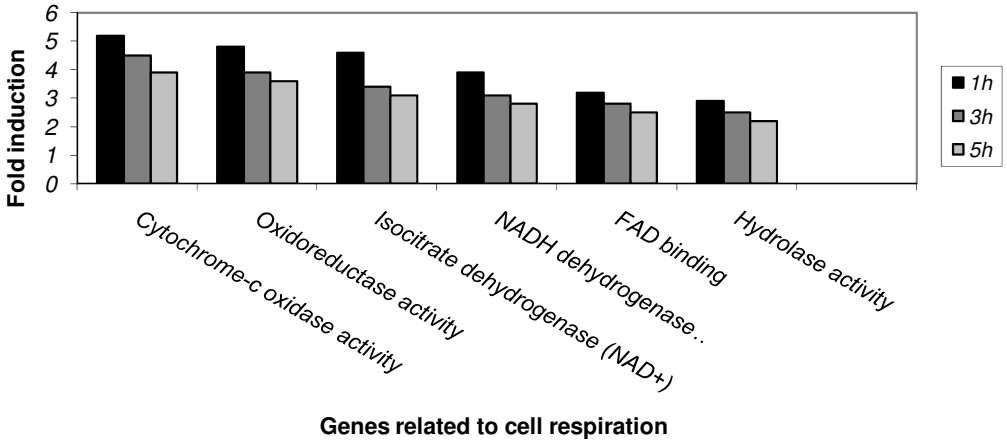
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. میزان بیان ژن‌های مربوط به فعالیت‌های بیوتروفی *Ustilago maydis* در اثر تحریک با GR24 در سه بازه زمانی (یک، سه و پنج ساعت)

Fig. 1. Gene expression level related to biotrphy activities of *Ustilago maydis* by induction with GR24 at three time point (1h, 3h, 5h).



شکل۲. میزان بیان ژن‌های مربوط به تنفس سلولی *Ustilago maydis* در اثر تحریک با ماده GR24 در سه بازه زمانی(یک، سه و پنج ساعت)

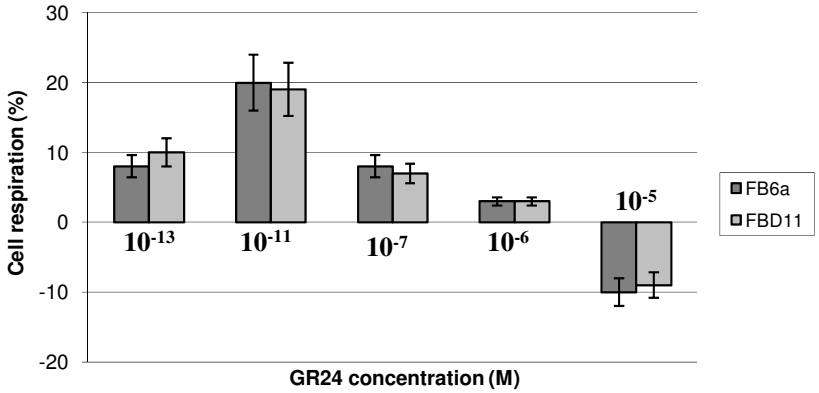
Fig. 2. Gene expression level related to cell respiration of *Ustilago maydis* by induction with GR24 molecule at three time point (1h, 3h, 5h)

انتقالی قارچ از حالت هاپلوئید به دیکاریوتیکی یا دیپلوئیدی (برای اسپوریدی) ندارد. آزمون بیماری‌زایی از طریق ریشه با استفاده از سلول‌های سویه سولوپاتوژن تحریک شده با GR24 در دوره فاز رویشی به مدت ۱۹ ساعت نتوانست علائم بارز بیماری نظیر ایجاد گال روی ساقه و سیاهک روی خوشه حتی بعد از یک ماه از آلوده‌سازی در شرایط آزمایشگاه ایجاد نماید.

بحث

قارچ *U. maydis* عامل بیماری مخرب سیاهک عمومی

www.SID.ir



شکل ۳. تعیین غلظت بهینه GR24 در تحریک فعالیت‌های تنفس سلولی در دو سویه هاپلوئید و سولوپاتوژن *Ustilago maydis*

Fig. 3. Determination of dose response of GR24 on stimulation of cell respiration activities in haploid and Solopathogenic strains of *Ustilago maydis*.

ذرت و سورگوم از قارچ‌های شاخه بازیدیومیکوتا می‌باشد و هر ساله خسارت زیادی را در مناطق کشت ذرت در ایران و سایر مناطق جهان ایجاد می‌کند. این‌گونه یکی از میکروارگانیسم‌های مدل در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی برای درک بهتر و صحیح‌تر بر هم کنش‌های بین موجودات بیماری‌زا و گیاهان مورد استفاده قرار گرفته است (Kahmann & Kamper 2004). قارچ *U. maydis* دارای خصوصیات منحصر به فرد نظیر شرایط آسان کشت، وجود فرم‌های مختلف ژنتیکی و هم‌چنین ژنوم کامل قابل دسترس می‌باشد (Kamper *et al.* 2006) ولی چنان‌که در مقدمه ذکر شد تاکنون مطالعات انجام شده در ارتباط با این‌گونه محدود به اندام‌های هوایی بوده است. مطالعات نشان داده است که این‌گونه قادر است از طریق ریشه ذرت وارد گیاه و حتی به طرف اندام‌های هوایی نیز حرکت کند (Sabbagh *et al.* 2006). نظر به این‌که موجودات مدل در سطح ریشه برای بررسی بر هم کنش‌های بیمارگر و گیاه که دارای شرایط ایده‌آل *U. maydis* باشند بسیار کم می‌باشد در صورت وجود شرایط رشدی در خاک در اثر وجود مواد محرک مترشحه توسط ریشه این قارچ می‌تواند یکی از مدل‌های تحقیقاتی بسیار خوب برای این منظور مورد استفاده قرار بگیرد. در این مطالعه تأثیر GR24 در میزان تغییرات تنفسی *U. maydis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد در یک ساعت اولیه بعد از افزودن این ماده، میزان تنفس سلولی به مقدار قابل توجهی افزایش یافت و در ساعات بعدی این مقدار اگر چه نسبت به شاهد افزایش داشت ولی نسبت به تیمار یک ساعت کاهش چشمگیری نشان داد که در نتیجه احتمالات برای فرضیه تأثیر فیزیولوژیکی و به دنبال آن ژنتیکی در راستای بیماری‌زایی به‌ویژه در مراحل اولیه تماس با ریشه قوی‌تر شد تا تغییرات فیزیولوژیکی، ژنتیکی و ریخت‌شناسی قارچ در اثر تحریک با این ماده نیز مورد بررسی قرار گیرد.

در غلظت 10^{-5} مولار از GR24 تنفس سلولی منفی و در غلظت 10^{-11}مولار بالاترین میزان افزایش تنفس سلولی دیده شد. افزایش میزان تنفس در غلظت بهینه ماده فوق می‌تواند ناشی از افزایش مقدار یون اکسیژن آزاد در میتوکندری باشد که این عامل باعث تحریک تولید NA(P)DH توسط آنزیم NA(P)DH اکسیدو ردوکتاز می‌شود. نقش این آنزیم در فعالیت‌های مختلف

Archive of SID

www.SID.ir

فیزیولوژیکی نظیر رشد و نمو و تمایز سلولی پیشنهاد شده است (Takemoto *et al.* 2007). با توجه به نتایج به‌دست آمده در ارتباط با کاهش میزان تنفس در ساعات بعدی تحریک (سه و پنج ساعت) می‌توان استریگولاکتون‌ها را به‌عنوان عوامل تنش‌زا که توسط سلول‌های قارچ شناسایی و سم‌زدایی می‌شوند در نظر گرفت که در این حالت می‌تواند در پدیده‌های دفاعی گیاه میزبان با افزایش اولیه تنفس سلولی مورد توجه قرار گیرد.

در فرآیند بیماری‌زایی، این قارچ از ابتدای تشکیل ریسه دیکاریوت از طریق جفت شدن سلول‌های هاپلوئید سازگار جنسی در سطح میزبان تا مراحل انتهایی در داخل گیاه، ژن‌های متعددی با نقش و کارآیی مختلف به‌صورت گروهی و زنجیره ژنی دخالت می‌کنند (Kahmann & Kamper, 2004). با توالی‌یابی کامل ژنوم *U. maydis* مشخص شد که ژن‌ها به‌صورت خوشه‌ای عمل کرده و مجموع دو یا چند ژن یک پروتئین را کد و یک پدیده را هدایت می‌کند (Kamper *et al.* 2006). این حالت شناسائی دقیق ژن و یا ژن‌های اصلی مرتبط با بیوتروفی را دچار مشکل و در نتیجه معرفی یک ژن واحد را غیرممکن می‌سازد ولی با شناسایی پروتئین‌های مربوطه شاید بتوان توالی مشابه واحدی را یافت که توالی ژن آن در برگیرنده خوشه‌های ژنی قارچ باشد. در این تحقیق با مطالعه مجموعه ژنی مشخص شد که تمام ژن‌های یک زنجیره ژنی در یک زمان تحریک با هم افزایش ندارند. با توجه به عدم افزایش بیان ژن‌های پایین دست که مستلزم بیان بالای ژن‌های بالا دست می‌باشد نتایج چنین تفسیر می‌شود که این ماده به‌عنوان یک فاکتور محیطی در شروع چرخه بیوتروفی نمی‌تواند مهم و تعیین‌کننده باشد. با توجه به مشاهدات موجود در مورد افزایش بیان ژن‌ها، بیشترین میزان افزایش در همان دقایق اولیه تحریک صورت می‌گیرد و پس از مدتی قارچ پاسخی به این تحریک نمی‌دهد. در مورد کاهش میزان بیان بعضی از ژن‌های مورد مطالعه میزان کاهش برای سه ساعت مختلف تحریک برابر است (شکل ۱). هم‌چنین با توجه به اینکه ژن‌های مرتبط با هم افزایش و یا کاهش مشابه نداشته و در یک زمان با یک غلظت مشابه از ماده تحریک‌کننده، میزان تغییرات مشابه نیست چنین استنباط می‌شود که ماده GR24 نمی‌تواند به‌عنوان یک عامل محیطی در فعال‌سازی این مجموعه ژنی مؤثر باشد و در مراحل اولیه نفوذ، قدرت نفوذپذیری قارچ را از طریق ریشه افزایش دهد. از زمان شناخت اولیه استریگولاکتون‌ها توسط *کوک و همکاران* در سال ۱۹۷۲ مطالعات زیادی در ارتباط با این مواد موجود در ترشحات ریشه انجام شده است (Cook *et al.* 1972).

با توجه به مقدار کم این مواد در ترشحات ریشه برای استخراج این مواد به حجم زیادی از ریشه نیاز است که بسیار زمان بر است. Gerald Roseberry در شرایط آزمایشگاهی مولکول‌های شیمیایی مشابه استریگولاکتون‌ها را سنتز و در اختیار محققان قرار داد. تاکنون ۶۳ مولکول از این ماده ساخته شده است که GR24 از بقیه مولکول‌ها پایدارتر و در حجم بسیار پایین‌تری مورد استفاده قرار می‌گیرد. ولی عیب بزرگ این مولکول‌ها ناپایداری در شرایط خاک به‌علت از دست دادن حلقه D در ساختمان مولکولی می‌باشد. این مولکول توسط محققان متعددی به‌عنوان تحریک‌کننده رشد قارچ‌های میکوریز و تحریک جوانه‌زنی اسپورهای قارچ مورد بررسی قرار گرفته است (Johnson 1981, Johnson *et al.* 1967). در یک مطالعه *مارتینز و همکاران* (۲۰۰۱) نقش ترشحات ریشه ذرت را روی سلول‌های هاپلوئید *Sporisorium reilianum* مورد بررسی قرار دادند نتایج این تحقیق نشان داد که این ترکیبات می‌توانند در تولید ریسه دیکاریوتیک از سلول‌های

www.SID.ir

مخمری هاپلوئیدی مؤثر باشند (Martinez *et al.* 2001). با توجه به این مشاهدات، احتمال این تغییر در *U. maydis* مورد آزمایش قرار گرفت. در این تحقیق اگر چه غلظت‌های مختلف استریگولاکتون روی سلول‌های هاپلوئید مورد آزمایش قرار گرفت ولی تغییر حالت‌هاپلوئیدی به دیکاریوتیک مشاهده نشد. که این می‌تواند به‌علت وضعیت ذاتی قارچ که هوازی بودن است باشد و یا می‌تواند ناشی از ساختمان مولکولی متفاوت ترشحات ریشه ذرت (ترکیبات چربی دوست) و استریگولاکتون‌ها (ترپنوئید) باشد(Akiyama & Hayashi 2006, Gomez-Roldan *et al.* 2007). نقش استریگولاکتون‌ها در تحریک بیماری‌زایی با آزمون بیماری‌زایی از طریق ریشه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به‌دست آمده حاکی از عدم تأثیر آن در بیماری‌زایی می‌باشد. با توجه به اینکه جنبه مثبت استفاده از این مواد در جهت بهینه‌سازی شرایط اولیه رشدی برای قارچ‌های میکوریز بسیار مهم می‌باشد می‌توان اذعان نمود که در صورت امکان استفاده از این مواد در خاک، در چرخه زندگی قارچ بیمارگر *U. maydis* تغییر چندانی ایجاد نخواهد کرد و حتی در شرایط رقابتی می‌تواند برگ برنده‌ای برای میکروارگانیسم‌های مفید ریزوسفر نظیر میکوریزها و باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت باشد که با توجه به نقش مثبت و مشخص شده این مواد بر روی باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت خاک (Soto *et al.* 2010)، استفاده صنعتی این مواد می‌تواند توصیه شود.

با توجه به اینکه قارچ *U. maydis* ذاتاً یک قارچ خاکزی نیست نمی‌توان نتایج را به همه قارچ‌های خاکزی تعمیم داد. در مطالعه‌ای با استفاده از روش تهیه بانک ژن از توالی‌های بیان شده و سرکوب شده و آنالیز بیان ژن با روش درشت آرایه (ماکروآرِی) و دورگه گیری‌های متعدد با کاوشگرهای رادیواکتیو در مورد قارچ *S. reilianum* (بیوتروف و خاکزی) نشان داده شده است که استریگولاکتون‌ها فقط باعث تحریک ژن‌های مسئول تنفس سلولی نظیر اکسیدو ردوکتاز شدند و درصد تشابه توالی‌های به‌دست آمده با ژن‌های مسئول بیماری‌زایی در بانک ژن بسیار پایین بوده است (Sabbagh 2008). با توجه به عدم تشابه بیان ژن‌های دخیل در یک زنجیره ژنی به‌طور هم‌زمان، این ناهمگنی می‌تواند ناشی از تأثیر این ماده در پروتئین‌های مربوط به فاکتورهای نسخه‌برداری و پروتئین‌های آغازگر باشد که برای دو ژن مشابه از نظر فعالیت می‌تواند نامشابه باشد. در نتیجه این ماده نمی‌تواند به‌عنوان عامل مستقیم و تنها در بیماری‌زایی مؤثر باشد ولی می‌تواند به‌عنوان یک هورمون گیاهی برای بررسی مطالعات عکس‌العمل‌های متقابل بین گیاه و قارچ مورد استفاده قرار گیرید.

آزمایش‌های مشابه‌ای با استفاده از فلاونوئیدها روی جوانه‌زنی ماکرو و میکروکنیدیوم‌های گونه‌های *Fusarium* انجام و مشخص شده است که این مواد تأثیری در جوانه‌زنی اسپورها ندارند (Steinkellner *et al.* 2007). با توجه به مطالعات ارائه شده در فوق لازم است نقش این مواد و مواد دیگر موجود در ترشحات ریشه گیاهان مختلف با بیمارگرهای اختصاصی آنها انجام شود تا بتوان به‌طور یقین این مواد را به‌عنوان مولکول‌های مفید برای عوامل همزیست در خاک معرفی نمود. با توجه به عدم تأثیر GR24 در انتقال فرم‌هاپلئوئیدی به دیکاریوتیکی یا ریسه‌ای می‌توان چنین استنباط می‌شود که این ماده نمی‌تواند در یک سلول‌هاپلوئید نقش تکمیل‌کننده در ژن‌های سازگاری جنسی ایفا نماید و باعث ایجاد میسلیوم و فرم بیماری‌زایی قارچ شود.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۳. اندازه‌گیری مصرف اکسیژن در سلول‌های تحریک شده با GR24 (10^{-7} مولار) از سویه‌های مختلف *U. maydis* در سه بازه زمانی (یک، سه و پنج ساعت) با استفاده از روش پلاروگرافی و CellTiterBlue. ND: اندازه‌گیری نشد.

Table 3. Measurement of oxygen consumption in cells stimulated by GR24 (10^{-7}M) from different strains of *Ustilago maydis* at three time point (1h, 3h, 5h) using Polarography and CellTiterBlue method. ND: Not Determined.

	Cell respiration measurement					
Ustilago maydis strain	O_2 consumption (Polarography) %			Redox potential (CellTiterBlue) %		
	1h	3h	5h	1h	3h	5h
Haploid strain FB6a	+11.9%	+6.5	+2	+19.1	+12.2	+8
Haploid strain FB6b	12	+5.5	+2.5	+18.2%	+12	+8.5
Two haploid strain compatible	+13.1%	+3	-2.2	+11.6 %	+11.5	+8.2
solopathogenic FBD11	ND	ND	ND	+11.8%	10.7	-1.2

با توجه به اینکه برای *U. maydis* سویه سولوپاتوژن طبیعی در دسترس نیست و تمامی سویه‌های موجود با انتقال ژن‌های سازگار جنسی به یک سویه هاپلوئید تهیه شده‌اند به‌دست آوردن سویه طبیعی می‌تواند دسترسی به این نوع سویه را برای چنین مطالعاتی آسان‌تر و مطمئن‌تر نماید. در این تحقیق، GR24 نقشی در جوانه‌زنی تلیوسپور و تولید سویه سولوپاتوژن از تلیوسپورهای جوانه زده نداشت. در مورد *S. reilianum* در شرایط آزمایشگاهی و بدون دخالت GR24 سویه سولوپاتوژن از تلیوسپورهای جوانه زده تهیه شد که این جداسازی بسیار مشکل و زمان‌بر بوده است (Sabbagh *et al.* 2010). در این مطالعه سعی شد تمام جوانب تأثیر GR24 روی سویه‌های مختلف *U. maydis* مورد بررسی قرار گیرد. تمام فرضیات در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد و نتایج مثبت و منفی نیز با هم مقایسه شد. اگر چه GR24 به تنهایی اثر قابل توجهی در فرآیند بیماری‌زایی نداشت ولی احتمال اثر آن با مولکول‌های دیگر موجود در ترشحات ریشه و یا سایر عوامل محیطی دیگر بعید نیست و می‌تواند در مطالعات همه گیر شناسی به‌عنوان یک عامل محیطی در تحریک قارچ حداقل در افزایش میزان تنفس سلولی و بالا بردن فعالیت‌های فیزیولوژیکی مورد توجه قرار بگیرد.

سپاسگزاری

بخشی از این تحقیق در گروه تحقیقاتی قارچ‌های میکوریز در آزمایشگاه سیگنال‌های گیاهی دانشگاه پل ساباتیه تولوز فرانسه انجام شد که لازم است از راهنمایی‌های پروفوسور گیوم بکارد و کریستوف روکس تشکر به‌عمل آید.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (105- 103) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID
www.SID.ir