بیان برخی ژن‌های دفاعی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در ارقام حساس و مقاوم سیب‌زمینی در شرایط *in vitro* *

EXPRESSIONS OF DEFENSE GENES AGAINST *Ralstonia solanacearum* IN SUSCEPTIBLE AND RESISTANT POTATO GENOTYPES UNDER *IN Vitro* CONDITIONS

کبری مسلم‌خانی[۱]، جواد مظفری[۲]**، مسعود شمس‌بخش[۱] و ابراهیم محمدی گل‌تپه[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۹؛ تاریخ پذیرش:۱۳۹۰/۱۱/۱۲)

چکیده

باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یکی از عوامل عمدهٔ کاهش محصول سیب‌زمینی در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر است. استفاده از ارقام مقاوم اهمیت زیادی در کنترل این بیماری دارد. به منظور توسعه ارقام مقاوم، درک مکانیسم‌های مقاومت و عکس‌العمل‌های القا شده گیاه در تعامل با بیمارگر ضروری است. در این مطالعه میزان تغییر بیان برخی از ژن‌های مهم دفاعی در ارقام تجاری سیب‌زمینی شامل رقم حساس مارفونا، متحمل الس گونه زراعی (*Solanum tuberosum*) و یک ژنوتیپ مقاوم از گونه *Solanum phureja* در زمان‌های مختلف بعد از آلوده‌سازی با باکتری *Ralstonia solanacearum* بررسی شد. نتایج نشان داد میزان بیان ژن‌های دفاعی بررسی شده شامل کیتیناز**A**، کیتیناز**B**، گلوکاناز و **PR-10a** در گونه مقاوم *S. phureja* نسبت به دو رقم تجاری دیگر در سطح بالاتری بود. هم‌چنین بیان ژن کیتیناز **A** و **PR-10a** در رقم متحمل نسبت به رقم حساس مارفونا افزایش نشان داد. بیان پروتئین‌های دفاعی و مواد ضد میکروبی در شرایط دفاعی القا شده ارقام مقاوم و حساس براساس میزان رشد قارچ *Fusarium solani* در محیط کشت حاوی عصاره گیاهان القا شده بررسی شد. میزان رشد قارچ در عصاره رقم مقاوم نسبت به عصاره رقم حساس کمتر بود.

واژه‌های کلیدی: *Ralstonia solanacearum*، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، مقاومت به بیماری، سیب‌زمینی، *tuberosum Solanum, Solanum phureja*

---

*: بخشی از پایان‌نامه دکتری نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jmozafar@yahoo.com

۱. به‌ترتیب دانشجوی سابق دکتری، دانشیار و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۲. دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین عوامل بیماری‌زا در سیب‌زمینی زراعی، باکتری *R. solanacearum* (Yabauuchi *et al*. 1995) است که باعث بیماری پژمردگی باکتریایی می‌گردد (Allen *et al*. 2005; Hayward 1991). مؤثرترین و عملی‌ترین راه برای کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی استفاده از ارقام مقاوم است. علی‌رغم خسارت زیادی که این باکتری به ارقام مختلف سیب‌زمینی وارد می‌کند هنوز رقم تجاری قابل اعتمادی که در مقابل بیماری مقاومت پایدار نشان دهد معرفی نشده است البته برخی ارقام حساسیت کمتری به این بیماری دارند و حتی در صورت شیوع بیماری محصول زیادی تولید می‌نمایند (French *et al*. 1998). به منظور ایجاد و معرفی ارقام مقاوم، شناسایی منابع مقاومت به بیماری در ارقام زراعی و خویشاوندان وحشی آنها و هم‌چنین شناسایی و درک مکانیسم مقاومت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

منابع ژنتیکی مقاومت شناخته شده برای نژادهای ۱ و ۳ باکتری *R. solanacearum* در ارقام تجاری گونه زراعی (*S. tuberosum*) بسیار محدود است (Tung *et al*. 1987). ولی منابع مقاومت مناسبی در چندین گونه دیگر از جمله *S. phureja* و *S. stenotomum* و *S. microdontum* و *S. sparsipilum* گزارش شده است (Tung & Rasco 1987). در بین این ارقام *S. phureja* سطح بالایی از مقاومت نسبت به جدایه‌های مختلف *R. solanacearum* نشان داده که منجر به جلب توجه ویژهٔ متخصصین اصلاح نباتات به این گونه شده است و از آن برای ارتقای سطح مقاومت ارقام تجاری استفاده شده است(Sequeira & Rowe 1969). مقاومت به بیماری پژمردگی باکتریایی اگرچه یک خصوصیت پیچیده بوده و کاملاً درک نشده است ولی مطالعات ژنتیکی مقاومت به پژمردگی باکتریایی، ژن‌های غالب مقاومت(Grimault *et al*. 1994)، کمی و یا مقاومت پلی ژنیک (Danesh *et al*. 1994; Thoquet *et al*. 1996) را گزارش نموده‌اند. منابع مقاومت به بیماری پژمردگی باکتریایی اولین‌بار در گوجه‌فرنگی شناسایی شد. مطالعات ژنتیکی منجر به معرفی تعداد کمی از ژن‌های غالب و چند ژن با اثرات کمی گردید (Jaunet & Wang 1999).

طی دهه‌های اخیر تلاش‌های زیادی در شناسایی ژن‌های مرتبط با دفاع و مقاومت و انتقال آنها به سیب‌زمینی انجام شده است تاکنون ۱۰ ژن مقاومت و QTL برای مقاومت به این باکتری از گونه‌های مختلف گیاهی معرفی شده است (Deslandes *et al*. 1998; Feng *et al*. 2003; Carmeille *et al*. 2006). با وجود این، اطلاعات محدودی در زمینه تعامل گیاه و باکتری *R. solanacearum* وجود دارد. درک مکانیسم‌های مقاومت و عکس‌العمل‌های القای شده گیاه در این پاتوسیستم برای ایجاد ارقامی با سطح مقاومت بالا به منظور کنترل مؤثر بیماری ضروری است. یافته‌ها نشان می‌دهند که اجزایی در سطح بیمارگر وجود دارد که نقش اصلی را در تشخیص و تعامل بین باکتری و گیاه میزبان دارد و بعد از آلوده‌سازی گیاه با استرین‌های بیماری‌زا و حتی مرده و غیربیماری‌زا القای مقاومت صورت می‌گیرد (Allen *et al*. 2005). الیسیتورهای مشتق شده از باکتری *R. solanacearum* مانند محصول ژن‌های avirulence و آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی مثل پلی گالاکتروناز باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی از جمله ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis- related protein) می‌شوند (Hennin *et al*. 2001). عکس‌العمل‌های دفاعی القا شده می‌تواند به‌حدی سریع باشد که مانع انتشار بیمارگر از محل آلودگی گردند (Armero *et al*. 1993; Barz *et al*. 1990).

www.SID.ir

در راستای شناسایی این عکس‌العمل‌های دفاعی، آنالیز بیان ژن‌های القای شده طی تعامل گیاه و بیمارگر مؤثرترین استراتژی برای کسب دیدگاه مناسب در خصوص حوادثی است که در این فرآیند رخ می‌دهد. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR پروتئین‌ها) در بسیاری از گونه‌های گیاهی در برابر پاتوژن‌های مختلف و در خلال حمله آنها یا شرایط تنش به عنوان مولکول‌های القاپذیر، بیان و انباشت می‌شوند (Edreva 2005; Borad & Sriram 2008). آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز، اندو پروتئیناز، پراکسیداز و پروتئین‌های انتقال‌دهنده چربی از خانواده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی هستند که در گیاهان مورد بررسی قرار گرفته‌اند. القای این پروتئین‌ها در برابر قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌های بیماری‌زا در زمان آلوده شدن گیاهان مختلف گزارش شده که با انباشت آنها از رشد و توسعه بیمارگر و تخریب بافت‌های گیاهی جلوگیری می‌گردد (Hammond-Kosack & Jones 1997; Singh & Smith 1977). با توجه به فعالیت ضد میکروبی و نقش پروتئین‌های در ایجاد مقاومت به بیماری، در این مطالعه میزان بیان RNA برخی از ژن‌های دفاعی شامل کیتیناز A و B، گلوکاناز و PR-10a در شرایط حساسیت، تحمل در ارقام تجاری سیب‌زمینی و مقاومت در گونه *S. phureja* در عکس‌العمل به باکتری *R. solanacearum* بررسی و مقایسه شد.

روش بررسی

تهیه و تکثیر مواد گیاهی

غده‌های بذری طبقه سوپرالیت ارقام سیب‌زمینی الس و مارفونا از مرکز تحقیقات کشاورزی اردبیل و بذرهای گونه وحشی سیب‌زمینی *Solanum phureja* نیز از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه شده و در گلخانه با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت شدند. سپس قطعاتی از گیاهان پس از ضدعفونی، در شرایط درون شیشه‌ای در دمای ۲۴-۲۲ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی با شدت نور ۴۰μ mol/m^2s کشت گردیدند و به‌صورت گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تکثیر شدند (Murashige & Skoog 1962).

تهیه و تکثیر جدایه‌های باکتری

جدایه SH_{12} باکتری *R. solanacearum* (نژاد سه و بیوار دو، جدا شده از سیب‌زمینی آلوده در خوزستان) از بین جدایه‌های دریافت شده از دانشگاه صنعتی اصفهان (Nouri 2005)، به‌دلیل قدرت بیماری‌زایی زیاد روی رقم حساس مارفونا و تولید اگزوپلی ساکارید زیاد در محیط کشت SMSA (Selective Medium Southern Affrica) (Moslemkhani *et al*. 2011) در این تحقیق استفاده شد.

آلوده‌سازی و بررسی واکنش گیاهان

به منظور القای گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای به‌وسیله باکتری *R. solanacearum* نوک ریشه گیاهچه‌های رشد یافته در محیط MS به‌وسیله قیچی استریل بریده شده و در سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU/ml به مدت نیم ساعت غوطه‌ور گردید و سپس در محیط MS مایع قرار داده شد. امتیاز دهی میزان مقاومت و یا حساسیت گیاه در برابر بیمارگر براساس روش قبل (Moslemkhani *et al.* 2011) صورت گرفت. این مطالعه با سه ژنوتیپ، چهار تیمار و در ۶ تکرار برای هر ژنوتیپ و هر تیمار انجام شد، به‌طوری‌که از هر ژنوتیپ ۲۴ گیاهچه هم اندازه و هم‌شکل که کاملاً ریشه‌دار

Archive of SID

www.SID.ir

بوده و رشد رویشی مناسبی داشتند انتخاب گردید. شش گیاهچه که تنها با آب تیمار شدند به عنوان شاهد به کار رفتند. از ۱۸گیاهچه که به‌وسیله باکتری تیمار شده بودند شش تکرار دو روز پس از آلودگی، شش تکرار دیگر چهار روز پس از آلودگی و شش تکرار آخر هفت روز پس از آلودگی برداشت و پس از پودر شدن در ازت مایع در ۸۰- درجه سلسیوس تا زمان استخراج RNA نگهداری شدند.

استخراج Total RNA

استخراج RNA کل براساس روش کلرید لیتیم (Mekuria *et al.* 2003) انجام شد. حدود ۱۰۰-۵۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده در ازت مایع در یک میلی‌لیتر بافر استخراج استریل (شامل LiCl یک دهم مولار، Tris-HCl یک دهم مولار با pH هشت، EDTA یک صدم مولار و SDS یک درصد که در زمان استفاده به آن پنج درصد PVP-40 و سدیم متا بی سولفیت اضافه شد) قرار گرفت و به خوبی مخلوط شد سپس ۸۰۰ میکرولیتر ترکیب فنل- کلرفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) به هر لوله افزوده شد و به مدت یک دقیقه به کمک ورتکس مخلوط و ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. فاز مایع رویی جمع‌آوری و با میزان هم حجم LiCl چهار مولار ترکیب و به مدت چهار ساعت در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد تا RNA رسوب نماید. در مرحله بعدی ترکیب به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و سپس رسوب حاصله در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد و دو حجم اتانول سرد و ۴۰ میکرولیتر استات سدیم سه مولار با pH پنج و دو دهم اضافه شد این مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. بعد از شستشوی رسوب با اتانول ۷۰ درصد و خشک شدن رسوب ۵۰ میکرولیتر آب فاقد RNase به لوله افزوده گردید. پس از بررسی کمی و کیفی RNA حدود ۱۰ میکروگرم RNA، ۱۰ میکرولیتر10X Reaction buffer، ۵۵ میکرولیتر آب، ۱۰ میکرولیتر آنزیم DNase(1U/µl) (شرکت فرمنتاس آمریکا) و یک میکرولیتر Ribonuclease inhibitor با هم ترکیب و به مدت نیم ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس ترکیب فوق به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و به نسبت هم حجم فنل- کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۱:۲۴:۲۵) اضافه و ترکیب شد. پس از سانتریفوژ، فاز رویی به لوله جدید منتقل و یک دهم حجم آن استات سدیم سه مولار (pH ۵/۲) و دو نیم برابر حجم اتانول ۹۵ درصد افزوده شد. ترکیب حاصل به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار گرفت و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از حذف رونشین، رسوب با اتانول ۷۰ درصد شسته شده و بعد از خشک شدن رسوب (به مدت نیم ساعت در ۳۷ درجه) در ۱۵ میکرولیتر آب فاقد RNase حل شد.

واکنش RT-PCR

واکنش RT-PCR برای ساخت cDNA طبق دستورالعمل شرکت فرمنتاس (آمریکا) انجام شد. واکنش در حجم ۱۱ میکرولیتر شامل ۵۰ میکروگرم RNA با نیم میکروگرم آغازگر oligodT(18) به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس انجام شد. در مرحله بعد چهار میکرولیتر5xReaction buffer، یک میکرولیتر Ribonuclease inhibitor(20u /µ) و دو میکرولیتر dNTP (10mM) به ترکیب فوق افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری گردید سپس

www.SID.ir

۲۰۰ واحد (یک میکرولیتر) آنزیم Revert Aid M-MulV Revers transcriptase به ترکیب قبلی افزوده و در ۴۲ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت نگهداری و به منظور متوقف نمودن واکنش، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. از cDNA حاصله جهت مطالعه بیان ژن در واکنش PCR استفاده شد. واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 10X ، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۱۰ پیکومول آغازگر Reverse و Forward (جدول ۱)، dNTPs ۰/۲ میلی‌مولار، ۱/۲ واحد *Taq* DNA Polymerase و دو میکرولیتر cDNA انجام شد. سیکل‌های حرارتی واکنش PCR شامل ۴ دقیقه در ۹۴ درجه (یک چرخه)، ۱ دقیقه در ۹۴، ۱دقیقه در ۵۶ و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس (۴۰ چرخه) و ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس استفاده شد. ارزیابی کمی محصولات PCR و تجزیه و تحلیل داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار photocapture انجام گردید.

آزمون ممانعت‌کنندگی رشد (Inhibition Growth)

به منظور بررسی شدت و اثرات بیان پروتئین‌های دفاعی گیاهان آلوده شده با باکتری *R. solanacearum*، عصاره فیلتر شده تیمارهای مختلف روی رشد قارچ *F. solani* در محیط کشت PDA بررسی گردید. برای این کار یک سی سی عصاره فیلتر شده (حاصل از گیاه برداشت شده در زمان خاصی پس از القای با باکتری) با ۱۰ سی سی محیط نسبتاً خنک PDA ترکیب شده و در پتری‌های ۱۰ سانتی‌متری ریخته شد. دیسکی به قطر یک سانتی‌متر حاوی ریسه‌های قارچ رشد کرده در وسط پتری قرار داده شد. اندازه قطر کلنی‌ها روزانه به مدت یک هفته یادداشت‌برداری شد. سپس شاخص کاهش میزان رشد کلنی برای هر یک از تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد تعیین شده و مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج و بحث

واکنش فنوتیپی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی

از میان ارقام و ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی بررسی شده در مطالعه قبلی (Moslemkhani *et al*. 2011)، واکنش رقم مارفونا و رقم الس که در آزمایش‌های گلخانه‌ای به‌ترتیب به عنوان رقم حساس و متحمل ارزیابی شده بودند به همراه یک ژنوتیپ مقاوم از گونه *S. phureja* در برابر جدایه SH12 باکتری *R. solanacearum* به‌صورت مجدد در شرایط درون شیشه‌ای ارزیابی گردید و منطبق با نتایج قبلی (Moslemkhani *et al*. 2011)، در این شرایط و ده روز پس از آلوده‌سازی رقم مارفونا واکنش حساس (با میانگین درجه آلودگی ۵) و رقم الس واکنش متحمل (با میانگین درجه آلودگی ۰/۳) از خود نشان دادند. در رقم مارفونا ۱۰ روز بعد از آلودگی پژمردگی کامل دیده شد، درحالی‌که در رقم الس پس از طی این مدت علائم مختصری از شروع بیماری نمایان شد. ژنوتیپ مورد بررسی از گونه وحشی *S. phureja* در برابر این جدایه باکتری *R. solanacearum* کاملاً مقاوم بود به‌طوری‌که بعد از گذشت ۱۵ روز علائمی از بیماری در آن دیده نشد (شکل ۱). در این تحقیق با آلوده‌سازی گیاهچه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای، امکان ارزیابی تغییرات بیان ژن‌ها در RNA استخراج شده از کل گیاه در یک نمونه فراهم شد. هم‌چنین با توجه به فاکتورهای محیطی کنترل شده، حذف استرس‌های زنده و غیرزنده ناخواسته این روش ارزیابی نسبت به روش آلوده‌سازی گیاهچه‌ها در گلخانه ارجحیت دارد (Fock *et al*. 2000; Moslemkhani *et al*. 2011).

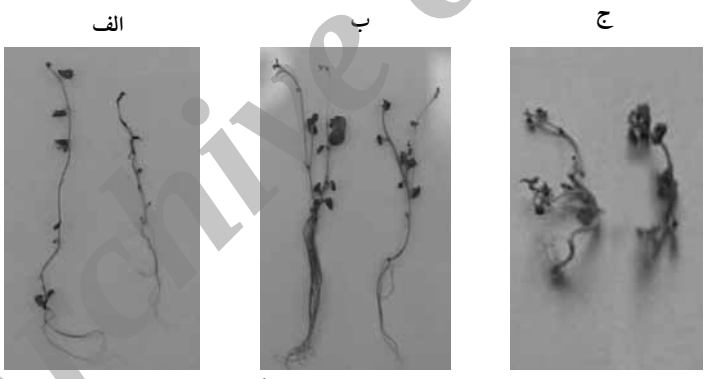
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱. لیست توالی آغازگرهای ژن‌های دفاعی کیتیناز A و B، گلوکناز، PR-10a و کنترل داخلی18S-rRNA

Table 1. Primer sequences of defense genes chitinase A and B, glucanase, PR-10a and internal control 18Sr RNA

نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی Sequence
Potato chitinase A (ChtA)	PC-A1	5´ACTACGAACGAGCTGGACAAGG3´
	PC-A2	5´ATGTAACGACGCTTAGCCCTGG3´
Potato chitinase B (ChtB)	PC-B2	5´GCTGCTTTCCTTGCCCAAAC3´
	PC-B3	5´TGACCACATTCCAAGCCACC3´
Potato glucanase (Glu)	Pg-F	5´TGCTGCGATGGAACGAACAG3´
	Pg-R	5´TCCCAAACTCTCTCAGACACCC3´
Potato PR-10a	PR-F	5´GAAGGAGATGTTCTTGGAGACAAACTTG3
	PR-R	5´ AGCGTAGACAGAAGGATTGGCG3´
18S-rRNA (internal control)	18s-F	5´GAGAAACGGCTACCACATCCA 3´
	18s-R	5´CGTGCCATCCCAAAGTCCAAC 3´



شکل ۱. واکنش دو رقم سیب‌زمینی مارفونا (الف) و الس (ب) و یک ژنوتیپ از گونه *Solanum phureja* (ج) در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum* در شرایط درون شیشه‌ای. در هر شکل، گیاه سمت راست آلوده و گیاه سمت چپ بدون آلودگی است.

Fig. 1. Responses of potato cultivars Marfona (A), Els (B) and *S. phureja* (C) against *Ralstonia solanacearum* under *in vitro* conditions. In each picture the plant in the right is infected and the plant in the left is mock inoculated.

در تحقیق حاضر ارزیابی‌های صورت گرفته در فواصل زمانی دو، چهار و هفت روز پس از آلودگی به خوبی نمایانگر تغییرات بیان ژن‌های دفاعی مورد مطالعه بوده است. نتایج این تحقیق و بررسی *اسپوزیتو و همکاران* (Esposito *et al.* 2008) حاکی از آن است که انتخاب بهترین زمان بررسی تغییرات بیان ژن‌ها، بستگی به مدت زمان ظهور علائم در هر روش آلوده‌سازی دارد. *دارلیو و همکاران* (Daurelio *et al.* 2010) نیز تغییرات بیان

www.SID.ir

ژن‌هـا در تعامـل توتـون و *X. axonopodis* pv *citri* را بسته به زمان ظهور علائم، قبـل، حـین و بعـد از مـشاهده اولین علایم ارزیابی کردند و نتایج آنها حاکی از آن بود که در این طیف زمانی تغییرات به خوبی قابل مشاهده هستند.

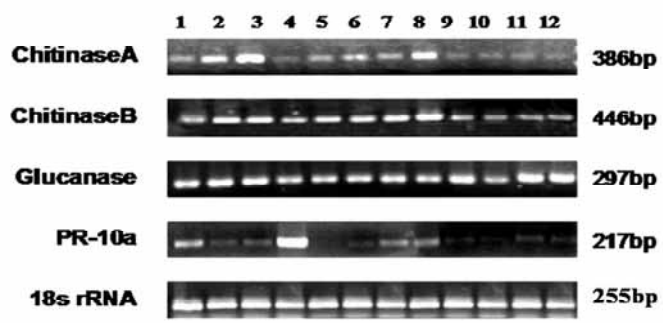
واکنش مولکولی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی

برای شناخت و درک اساس مولکولی واکـنش مقاومـت و تحمل در مقایسه با حساسیت در این تحقیق بیان برخـی از ژن‌های دفاعی شناخته شده با استفاده از PCR نیمـه کمـی در ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقـاوم سـیب‌زمینـی در برابـر بـاکتری *R. solanacearum* بررسـی شـد. رقـم حساس مارفونا و متحمل الس از گونـه *S. tuberosum* و یـک ژنوتیـپ مقـاوم از گونـه *S. phureja* تفـاوت قابـل توجهی در بیان ژن‌های پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی شامل کیتیناز A و B، گلوکناز و PR-10a نـشان دادنـد (شـکل ۲). در این تحقیـق RT-PCR بـه خـوبی تفـاوت بیـان ژن‌هـای دفـاعی را در ارقـام مقـاوم در مقایـسه بـا رقـم حساس نشان داد. علی‌رغم دقت بـالای آزمـون نـورترن بلات واکنش RT-PCR نیمه کمی مزایای زیـادی دارد از جمله نیاز بـه میـزان انـدک RNA، توانمنـدی تـشخیص سطوح پایین بیان ژن و مقـرون بـه صـرفه بـودن از نظـر هزینه و زمان نـسبت بـه روش نـورترن بـلات ارجحیـت دارد (Dean *et al*. 2002). البتـه جهـت حـصول نتـایج قابل اطمینان باید تکنیـک PCR بـا دقـت در ایـن نـوع آزمون‌ها بهینه‌سازی شود. استفاده از آغـازگر اختـصاصی کنتـرل داخلـی 18s rRNA خطـای ناشـی از غلظـت متفاوت cDNA الگـو را بـه حـداقل رسـانده و غلظـت یکـسانی از cDNA مـورد اسـتفاده قـرار مـی‌گیـرد (Dean *et al*. 2002). الگوی کلی بیـان ژن‌هـای مـورد بررسی نشان داد که رابطه مستقیمی بین میـزان مقاومـت و بیان این ژن‌ها وجود دارد به نحوی که در گونـه مقـاوم *S. phureja* بیـان ژن‌هـای کیتینـاز A ، B و PR10-a در سطح بالاتری در مقایسه با ژنوتیپ متحمل الس و حساس مارفونا است و در ژنوتیپ الس بـه اسـتثنای ژن گلوکنـاز، سایر ژن‌ها سطح بیان بالاتری نسبت بـه ژنوتیـپ حـساس مارفونا داشته‌اند (شکل ۲ و ۳). بـه‌نظـر مـی‌رسـد یکـی از دلایل اصلی مقاومت قابل قبـول *S. phureja* بـه بـاکتری *R. solanacearum* بیان بالای ژن‌های دفاعی در بافت‌هـای گیاهی القا شده و نـشده اسـت و همـین امـر از گـسترش و تجمع باکتری در بافت‌های آوندی گیـاه ممانعـت مـی‌نمایـد. طبق بررسـی *گریمالـت و پریـور* (Grimault *et al*. 1994) بعـد از آلـوده‌سـازی ریـشه‌هـای رقـم حـساس و مقـاوم گوجه‌فرنگی تنها در درصد بسیار پایینی از گیاهـان مقـاوم، باکتری در قسمت تحتانی و میانی ساقه مستقر شده بود. در واقع گیاهان مقاوم با استفاده از سـدهای دفـاعی از جملـه مواد ضد میکروبـی، انتـشار و تجمـع بـاکتری را در نقـاط مختلف گیاه به شدت محدود نمود.

در مجمـوع تغییـرات بیـان ژن‌هـای تولیدکننـده PR پروتئین مورد بررسی در ایـن تحقیـق در ارقـام حـساس و متحمل نسبت به رقم مقاوم یا رخ نداده (در رقم حـساس مارفونا) و یا بـا تـأخیر رخ داده (در رقـم متحمـل) و ایـن موضوع گویای آن است کـه بـاکتری *R. solanacearum* نیز مانند سایر بیمارگرها مکانیسم‌هایی را به‌کار می برد تـا از تجمع ترانـسکریپت‌هـای دفـاعی جلـوگیری نمـوده و مکانیسم‌های دفـاعی را سـرکوب و یـا بـا تـأخیر مواجـه نماید. البته بـسته بـه حـساسیت و مقاومـت گیـاه نتیجـه عملکرد این مکانیسم‌ها متفاوت ظاهر می‌گردد وجود این نوع مکانیسم‌های سرکوب‌کننـده دفـاعی در بـاکتری‌هـای دیگـر نیـز گـزارش شـده اسـت بـرای مثـال در بـاکتری *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* نـوعی

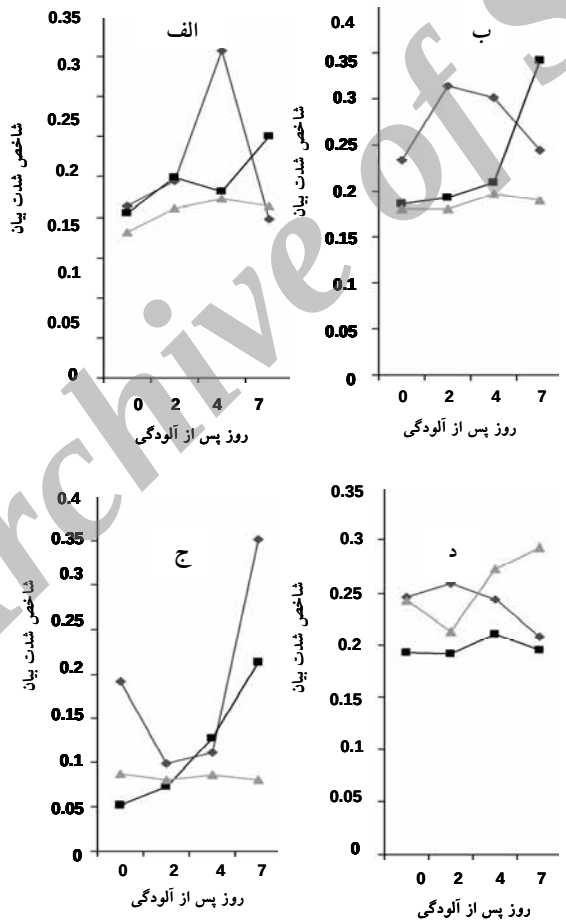
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. مقایسه میزان بیان ژن‌های کیتیناز A و B، گلوکناز و PR-10a براساس شدت و یا میزان نسخه‌برداری ژن‌های مربوطه در واکنش دفاعی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی در برابر باکتری *Ralstonia solanacearum*، نوارهای ۴-۱: در *S. phureja* به‌ترتیب شاهد، دو، چهار و هفت روز بعد از آلودگی، ۸-۵: در رقم الس به‌ترتیب شاهد، دو، چهار و هفت روز بعد از آلودگی، ۱۲-۹: در رقم مارفونا به‌ترتیب شاهد، دو، چهار و هفت روز بعد از آلودگی

Fig. 2. Differential gene expression of chitinase A and B, glucanase and PR-10a potato genotypes against *Ralstonia solanacearum*. Lanes 1-4: in *S. phureja* Mock, 2, 4 and 7 days post inoculation respectively, 5-8: in Els cultivar Mock, 2, 4 and 7 days post inoculation respectively, 9-12: in Marfona cultivar Mock, 2, 4 and 7 days post inoculation respectively.



شکل ۳. نمودار الگوی بیان ژن‌های کیتیناز A (الف) ، کیتیناز B (ب)، گلوکناز (ج) و PR-10a (د) در عکس‌العمل دفاعی ارقام مختلف گیاه سیب‌زمینی به آلودگی با باکتری *Ralstonia solanacearum* .

Fig. 3. Gene expression pattern of chitinase A (A), chitinase B (B), glucanase (C), PR-10a in different potato cultivar against *Ralstonia solanacearum*

Archive of SID
www.SID.ir

توکسین به نام Phaseolotoxin وجود دارد که از تولید فیتوآلکسین در ارقام لوبیا جلوگیری می‌نماید (Gnanamanickam & Patil 1977, Jekobek *et al*. 1993). در واقع مکانیسم‌های سرکوب کارآمد در پاتوژن‌های مختلف برای تجزیه ترکیبات دفاعی میزبان و جلوگیری از تجمع آنها به‌کار گرفته می‌شود (Jayakumar *et al*. 2005). تحقیقات گذشته نیز حاکی از این است که در تعامل‌های سازگار در مقایسه با ناسازگار تجمع ترانسکریپت ژن‌های دفاعی به تأخیر می‌افتد (Dixon & Harrison 1990; Dixon & Lamb 1990). هرچند چگونگی تأثیر عوامل ممانعت‌کننده در گیاهان مقاوم به روشنی مشخص نمی‌باشد، اما به‌نظر می‌رسد مکانیسم‌هایی در گیاهان مقاوم و متحمل وجود دارد که قادر بوده سریعاً اثر مکانیسم‌های ممانعت‌کننده باکتریایی را خنثی نماید و باعث بروز به موقع عکس‌العمل دفاعی گردد.

بیان ژن‌های کیتیناز A و B، گلوکناز و PR-10a

روند کلی بیان ژن کیتیناز A و B تقریباً یکی بوده به گونه‌ای که در رقم حساس مارفونا تغییر محسوسی در میزان بیان نسبت به گیاه شاهد (گیاهی که به جای سوسپانسیون باکتری، آب به آن تزریق شده) دیده نشد درحالی‌که در گونه مقاوم *S. phureja* بیان این ژن ۴ روز بعد از آلودگی به حداکثر میزان خود رسید و در رقم متحمل الس این بیان در روز هفتم بعد از آلودگی به نقطه اوج خود رسید (شکل ۲ و ۳) در پاتوسیستم‌های گونه‌های مختلف گیاهی با پاتوژن‌های قارچی (زنجبیل با *Fusarium* و *Colletotrichum*)، باکتریایی (زنجبیل با *Ralstonia solanacearum*، لوبیا با *Pseudomonase syringae* pv *phaseolicola*) و ویروسی (توتون و TMV) بیان ژن کیتیناز افزایش نشان داده است (Hong *et al*. 2000; Majeau *et al*. 1990; Godiard *et al*. 1990; Jekobek *et al*. 1993; Nasser *et al*. 1990) با توجه به نتایج به‌دست آمده از این تحقیق به نظر می‌رسد زمان و سرعت عکس‌العمل دفاعی در میزان مقاومت ارقام حائز اهمیت زیادی است به گونه‌ای که در گونه مقاوم *S. phureja* ژن‌های کیتیناز نسبت به رقم متحمل الس و حساس مارفونا خیلی سریع‌تر افزایش بیان نشان داده‌اند.

روند کلی بیان ژن کیتیناز A و B تقریباً یکی بوده به‌گونه‌ای که در رقم حساس مارفونا تغییر محسوسی در میزان بیان نسبت به گیاه شاهد (گیاهی که به‌جای سوسپانسیون باکتری، آب به آن تزریق شده) مشاهده نشد درحالی‌که در گونه مقاوم *S. phureja* بیان این ژن ۴ روز بعد از آلودگی به حداکثر میزان خود رسید و در رقم متحمل الس این بیان در روز هفتم بعد از آلودگی به نقطه اوج خود رسید (شکل ۲ و ۳) در پاتوسیستم‌های گونه‌های مختلف گیاهی با پاتوژن‌های قارچی (زنجبیل با *Fusarium* و *Colletotrichum*)، باکتریایی (زنجبیل با *Ralstonia solanacearum*، لوبیا با *Pseudomonase syringae* pv *phaseolicola*) و ویروسی (توتون و TMV) بیان ژن کیتیناز افزایش نشان داده است (Hong *et al*. 2000; Majeau *et al*. 1990; Godiard *et al*. 1990; Jekobek *et al*. 1993; Nasser *et al*. 1990) با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق به‌نظر می‌رسد زمان و سرعت عکس‌العمل دفاعی در میزان مقاومت ارقام حائز اهمیت زیادی است به‌گونه‌ای که در گونه مقاوم *S. phureja* ژن‌های کیتیناز نسبت به رقم متحمل الس و حساس مارفونا خیلی سریع‌تر افزایش بیان نشان داده‌اند. بیان ژن گلوکناز در هر سه رقم مقاوم، متحمل و حساس نسبتاً در یک سطح بوده و تغییرات محسوسی در بیان این ژن در واکنش به

Archive of SID

www.SID.ir

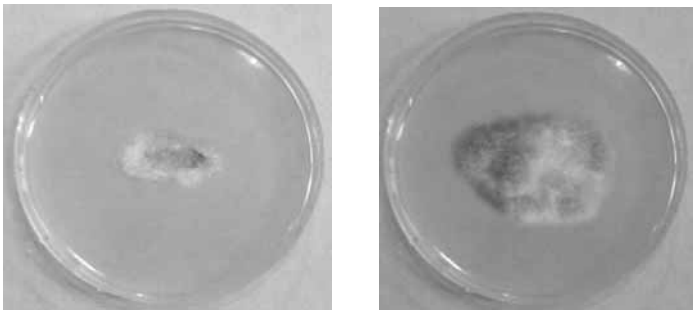
باکتری *R. solanacearum* دیده نشد (شکل ۲ و ۳). لذا به نظر می‌رسد در این پاتوسیستم نقش مهمی ایفا نمی‌نماید. القاء و افزایش بیان ژن گلوکناز به‌وسیله زخم، سیگنال‌های هورمونی از جمله اتیلن و متیل جاسمونات و نیز برخی پاتوژن‌های گیاهی خصوصاً قارچ‌ها در قسمت‌های مختلف گیاه گزارش شده است (Borad & Sriram 2008). البته گزارشاتی از کاهش بیان ژن گلوکناز در واکنش به عواملی مانند غلظت‌های بالای ABA (آبسیزیک اسید) در گیاهان وجود دارد که برخلاف آن ژن کیتیناز طی این واکنش افزایش بیان نشان داده است (Wu *et al*. 2003).

سطح بیان ژن PR-10a در گیاه مقاوم با گیاه متحمل و حساس در شرایط معمول اختلاف مشخصی داشته و در مجموع بیان این ژن در گونه مقاوم *S. phureja* در مقایسه با ارقام حساس و متحمل در حد بالاتری است. نکته جالب توجه اینکه بیان این ژن دو و چهار روز بعد از آلودگی در رقم مقاوم نسبت به شاهد کاهش داشته و هفت روز بعد از آلودگی به میزان چشمگیری تجمع ترانسکریپت این ژن مشاهده گردید (شکل ۲ و ۳). احتمالاً ممانعت‌کننده‌هایی از باکتری *R. solanacearum* باعث محدود نمودن بیان این ژن طی دو تا چهار روز اول گشته اما در نهایت مکانیسم‌هایی در گیاه بر این ممانعت‌کنندگی فائق آمد و منجر به افزایش بیان این ژن دفاعی مهم شد. به نظر می‌رسد این پروتئین به عنوان یکی از عوامل دخیل در مقاومت *S. phureja* علیه باکتری *R. solanacearum* باشد. نتایج تحقیقات گذشته نشان می‌دهد که احتمالاً PR-10a در فرآیند تولید پروتئین در بسیاری از قارچ‌ها و برخی باکتری‌ها مانند *R. solanacearum* و *Erwinia amylovora* اختلال ایجاد می‌نماید (Borad & Sriram 2008). در برهمکنش باکتری *R. solanacearum* و توتون که منجر به واکنش فوق حساسیت می‌گردد مشخص گردیده که بیان ژن‌های کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکناز و PR-S افزایش یافته اما این تجمع برای ظهور علائم نکروتیک کفایت نمی‌کرد (Godiard *et al*. 1990). هم‌چنین نقش تعیین‌کننده ژن PR-10a در عکس‌العمل ارقام مقاوم برنج علیه باکتری *X. campestris* pv *vesicatoria* به فعالیت ریبونوکلئازی آن تعمیم داده شده است (Kombrink *et al*. 2001; Ponciano *et al*. 2007) در مجموع با عنایت به نحوه عملکرد متفاوت PR پروتئین‌های مورد بررسی در این تحقیق و تفاوت در الگوی بیان آنها به نظر می‌رسد مسیرهای القاء و بیان متفاوتی در فعال‌سازی این عکس‌العمل‌های دفاعی در گیاه سیب‌زمینی به باکتری *R. solanacearum* وجود دارد در واقع تعامل بین مولکول‌های الیسیتور با منشاء پاتوژن و رسپتورهای گیاهی منجر به فعال شدن آبشارهای متفاوت Signal transduction می‌شود که برخی از ژن‌ها در این مسیر فعال می‌شوند (Wu & Bradford 2003).

اثر بازدارندگی ژن‌های دفاعی القا شده

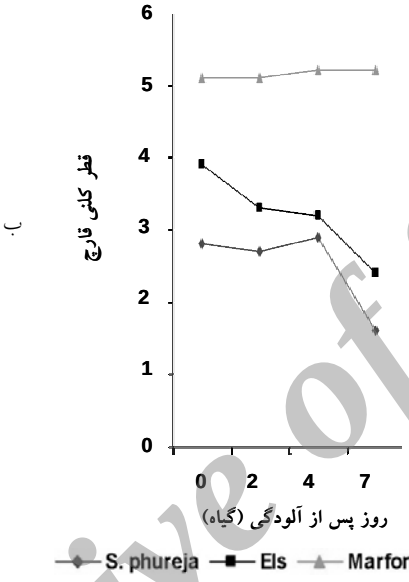
در آزمایش ممانعت‌کنندگی رشد (Inhibition growth)، قارچ *F. solani* در محیط حاوی عصارهای القاء شده و نشده رقم مارفونا با باکتری *R. solanacearum* به سرعت و به یک اندازه رشد نمود که با نتایج PCR کمی همخوانی دارد و احتمالاً به‌دلیل القای ضعیف‌تر مکانیسم‌های دفاعی در این رقم، قارچ به راحتی در محیط کشت توسعه یافته است (شکل ۴) اما در رقم متحمل الس میزان رشد قارچ در محیط حاوی عصاره گیاه شاهد نسبت به محیط حاوی عصاره گیاهان آلوده بیشتر بود و در گیاهان تلقیح شده، میزان رشد قارچ به‌دلیل افزایش عناصر دفاعی مؤثر، کاهش یافته است. خصوصاً این نتایج با میزان

www.SID.ir



الف

A



ب

شکل ۴. الف) مقایسه میزان رشد قارچ *Fusarium solani* پنج روز پس از در محیط کشت PDA حاوی عصاره گیاه سیب‌زمینی گونه *Solanum phureja* آلوده شده با باکتری *Ralstonia solanacearum* (سمت چپ) و عصاره گیاه تیمار شده با آب (سمت راست). ب) نمودار میزان ممانعت‌کنندگی رشد قارچ *Fusarium solani* در محیط کشت PDA به‌وسیله عصاره *Solanum phureja*، الس و مارفونا مربوط به ۰، ۲، ۴ و ۷ روز بعد از آلودگی با باکتری *Ralstonia solanacearum*.

Fig. 4. A) Comparison growth rate of *Fusarium solani* after 5 days on PDA culture media that contains extract of 7 days post inoculated *Solanum phureja* that infected with *Ralstonia solanacearum* (left picture) and extract of mock inoculated *S. phureja* (right picture). B) Inhibition growth pattern of *F. solani* in PDA culture media that contain extract of *S. phureja*, Els and Marfona , 0, 2, 4 and 7 days post inoculation with *Ralstonia solanacearum.*

بیان ژن کیتیناز A و PR-10a که به مرور بعد از آلودگی افزایش نشان داده مطابقت داشت. در گونه *S. phureja* و ژنوتیپ متحمل الس میزان رشد قارچ هفت روز بعد از آلودگی که بیان PR-10a به بیشترین حد خود رسیده نسبت به تمامی تیمارها و نمونه‌های دیگر بسیار اندک بود که می‌تواند حاکی از این امر باشد که رشد قارچ *Fusarium solani* در محیط حاوی عصاره گیاهان تلقیح شده و نشده تا حد زیادی منطبق بر میزان بیان ژن PR-10a بود (شکل ۴). بررسی‌های انجام گرفته قبلی در خصوص اثر بازدارندگی عصاره گیاه حاوی این

Archive of SID

www.SID.ir

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی روی رشد قارچ‌های مختلف از جمله *Alternaria alternata* گویای آن است که ایزوآنزیم‌های متفاوتی قبل و پس از القای به‌وسیله پاتوژن در گیاه تولید می‌گردد. ایزوآنزیم‌هایی که به‌طور معمول در گیاه وجود دارند به‌عنوان مولکول‌های پیش دفاع اهمیت دارند و در صورت تولید ایزوآنزیم‌های جدید مؤثر، توسعه میسلیوم قارچ محدود می‌گردد (Fanta *et al.* 2003).

جهت اطمینان از اثر ممانعت‌کنندگی پروتئین‌های دفاعی (نه متابولیت‌های ثانویه و یا سایر عوامل ممانعت‌کننده) روی رشد پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی لازم است اثر این پروتئین‌ها بعد از خالص‌سازی بررسی گردد. در مجموع براساس نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد برخی پروتئین‌های دفاعی مانند PR-10a و کیتینازها نقش مهمی در مقاومت سیب‌زمینی به بیماری پژمردگی باکتریایی دارند. هم‌چنین مشخص شده این عوامل در سازگاری گیاه با استرس‌های محیطی نیز اهمیت بسیار زیادی دارند. کسب اطلاعات بیشتر در مورد آنها باعث ایجاد دیدگاه‌های جدید در زمینه توسعه سیستم دفاعی گیاهان می‌گردد. اگرچه اطلاعات مناسبی در مورد تنظیم بیان ژن‌های دفاعی است اما مطالعه دقیق بر روی مکانیسم‌های تنظیم بیان ژن و آبشارهای سیگنالینگ پنجره‌ای جدید در تکنولوژی مهندسی ژنتیک برای اصلاح محصولات کشاورزی می‌گشاید. علاوه بر این تشخیص ممانعت‌کننده‌های پاتوژن کمک به درک نحوه عملکرد این ممانعت‌کننده‌ها در تشخیص نقاط هدف فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری در گیاه و نقش مهم آنها در تعامل باکتری و گیاه می‌نماید و امکان توسعه استراتژی‌های جدید برای کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی را فراهم می‌کند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (60- 57) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir