

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 عمده 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، متحمل‌الس 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، ارائه 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

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 ویژه 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 اولین بار 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; Carneille 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). الیستورهای مشتق شده از باکتری *R. solanacearum* مانند محصول ژن‌های *avrulence* 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).

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 $40 \mu \text{mol/m}^2 \text{s}$ کشت گردیدند و به صورت گیاهچه‌های درون شیشه‌ای تکثیر شدند (Murashige & Skoog 1962).

تهیه و تکثیر جدایه‌های باکتری

جدایه SH₁₂ باکتری *R. solanacearum* (نژاد سه و بیووار دو، جدا شده از سیب‌زمینی آلوده در خوزستان) از بین جدایه‌های دریافت شده از دانشگاه صنعتی اصفهان (Nouri 2005)، به دلیل قدرت بیماری‌زایی زیاد روی رقم حساس مارفونا و تولید آگزوپلی ساکارید زیاد در محیط کشت SMSA (Selective Medium Southern Africa) (Moslemkhani et al. 2011) در این تحقیق استفاده شد.

آلوده‌سازی و بررسی واکنش گیاهان

به منظور القای گیاهان رشد یافته در شرایط درون شیشه‌ای به وسیله باکتری *R. solanacearum* نوک ریشه گیاهچه‌های رشد یافته در محیط MS به وسیله 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، به طوری که از هر ژنوتیپ ۲۴ گیاهچه هم اندازه و هم شکل که کاملاً ریشه‌دار

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 پروتیناز، 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 سوپرالیست ارقام سیب‌زمینی الس و مارفونا از مرکز تحقیقات کشاورزی اردبیل و بذره‌های گونه وحشی سیب‌زمینی *Solanum phureja* نیز از بخش تحقیقات ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران تهیه شده و

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 میکرولیتر 10X 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 رونیشین، 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 میکرولیتر 5xReaction 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

بوده و رشد ریشی مناسبی داشتند انتخاب گردید. شش گیاهچه که تنها با آب تیمار شدند به عنوان شاهد به کار رفتند. از ۱۸ گیاهچه که به وسیله 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 میلی گرم از بافت پودر شده در ازت مایع در یک میلی لیتر 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 متابی سولفیت اضافه شد) قرار گرفت و به خوبی مخلوط شد سپس ۸۰۰ میکرولیتر ترکیب فنل - کلروفرم - 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 جمع آوری 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

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 به ترتیب 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* به صورت 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 به طوری‌که 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).

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 10X PCR buffer، ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول آغازگر Reverse و Forward (جدول ۱)، ۰/۲ میلی مولار، 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، ۱ دقیقه 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 به وسیله نرم‌افزار photocapture انجام گردید.

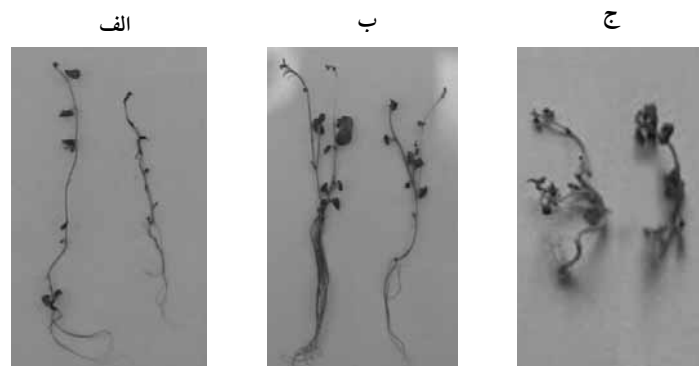
آزمون ممانعت‌کنندگی رشد (Inhibition Growth)

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 سانتی متری ریخته شد. دیسکی به قطر یک سانتی متر حاوی ریشه‌های قارچ رشد کرده در وسط پتری قرار داده شد. اندازه قطر کلنی‌ها روزانه به مدت یک هفته یادداشت‌برداری شد. سپس شاخص کاهش میزان رشد

جدول ۱. لیست توالی آغازگرهای ژن‌های دفاعی کیتیناز A و B، گلوکاناز، PR-10a و کنترل داخلی 18S-rRNA

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

نام ژن	نام آغازگر	توالی
Gene name	Primer name	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'TCCCAAACCTCTCTCAGACACCC3'
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

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

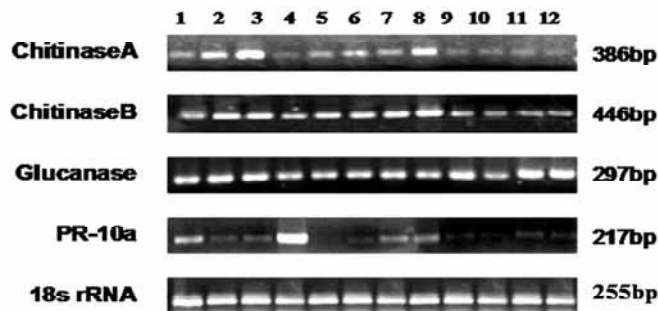
و بیان این ژن‌ها وجود دارد به نحوی که در گونه مقاوم *S. phureja* بیان ژن‌های کیتیناز A، B و PR10-a در سطح بالاتری در مقایسه با ژنوتیپ متحمل الس و حساس مارفونا است و در ژنوتیپ الس به استثنای ژن گلوکناز، سایر ژن‌ها سطح بیان بالاتری نسبت به ژنوتیپ حساس مارفونا داشته‌اند (شکل ۲ و ۳). به نظر می‌رسد یکی از دلایل اصلی مقاومت قابل قبول *S. phureja* به باکتری *R. solanacearum* بیان بالای ژن‌های دفاعی در بافت‌های گیاهی القا شده و نشده است و همین امر از گسترش و تجمع باکتری در بافت‌های آوندی گیاه ممانعت می‌نماید. طبق بررسی گریمالت و پریور (Grimault et al. 1994) بعد از آلوده‌سازی ریشه‌های رقم حساس و مقاوم گوجه‌فرنگی تنها در درصد بسیار پایینی از گیاهان مقاوم، باکتری در قسمت تحتانی و میانی ساقه مستقر شده بود. در واقع گیاهان مقاوم با استفاده از سدهای دفاعی از جمله مواد ضد میکروبی، انتشار و تجمع باکتری را در نقاط مختلف گیاه به شدت محدود نمود.

در مجموع تغییرات بیان ژن‌های تولیدکننده PR پروتئین مورد بررسی در این تحقیق در ارقام حساس و متحمل نسبت به رقم مقاوم یا رخ نداده (در رقم حساس مارفونا) و یا با تأخیر رخ داده (در رقم متحمل) و این موضوع گویای آن است که باکتری *R. solanacearum* نیز مانند سایر بیمارگرها مکانیسم‌هایی را به کار می‌برد تا از تجمع ترانسکریپت‌های دفاعی جلوگیری نموده و مکانیسم‌های دفاعی را سرکوب و یا با تأخیر مواجه نماید. البته بسته به حساسیت و مقاومت گیاه نتیجه عملکرد این مکانیسم‌ها متفاوت ظاهر می‌گردد وجود این نوع مکانیسم‌های سرکوب‌کننده دفاعی در باکتری‌های دیگر نیز گزارش شده است برای مثال در باکتری نوعی *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*

ژن‌ها در تعامل توتون و *X. axonopodis* pv *citri* را بسته به زمان ظهور علائم، قبل، حین و بعد از مشاهده اولین علائم ارزیابی کردند و نتایج آنها حاکی از آن بود که در این طیف زمانی تغییرات به خوبی قابل مشاهده هستند.

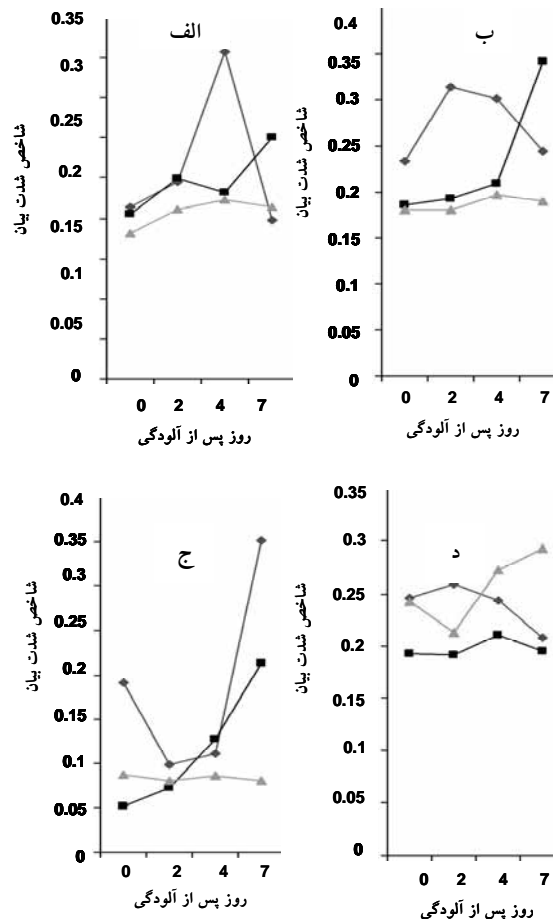
واکنش مولکولی ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی

برای شناخت و درک اساس مولکولی واکنش مقاومت و تحمل در مقایسه با حساسیت در این تحقیق بیان برخی از ژن‌های دفاعی شناخته شده با استفاده از PCR نیمه کمی در ژنوتیپ‌های حساس، متحمل و مقاوم سیب‌زمینی در برابر باکتری *R. solanacearum* بررسی شد. رقم حساس مارفونا و متحمل الس از گونه *S. tuberosum* و یک ژنوتیپ مقاوم از گونه *S. phureja* تفاوت قابل توجهی در بیان ژن‌های پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی شامل کیتیناز A و B، گلوکناز و PR-10a نشان دادند (شکل ۲). در این تحقیق RT-PCR به خوبی تفاوت بیان ژن‌های دفاعی را در ارقام مقاوم در مقایسه با رقم حساس نشان داد. علی‌رغم دقت بالای آزمون نورترن بلات واکنش RT-PCR نیمه کمی مزایای زیادی دارد از جمله نیاز به میزان اندک RNA، توانمندی تشخیص سطوح پایین بیان ژن و مقرون به صرفه بودن از نظر هزینه و زمان نسبت به روش نورترن بلات ارجحیت دارد (Dean et al. 2002). البته جهت حصول نتایج قابل اطمینان باید تکنیک PCR با دقت در این نوع آزمون‌ها بهینه‌سازی شود. استفاده از آغازگر اختصاصی کنترل داخلی 18s rRNA خطای ناشی از غلظت متفاوت cDNA الگو را به حداقل رسانده و غلظت یکسانی از cDNA مورد استفاده قرار می‌گیرد (Dean et al. 2002). الگوی کلی بیان ژن‌های مورد بررسی نشان داد که رابطه مستقیمی بین میزان مقاومت



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 ۱-۴: در *S. phureja* به ترتیب شاهد، دو، چهار و هفت روز بعد از آلودگی، ۵-۸: در رقم الس به ترتیب شاهد، دو، چهار و هفت روز بعد از آلودگی، ۹-۱۲: در رقم مارفونا به ترتیب 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*

(توتون و TMV) بیان ژن کیتیناز افزایش نشان داده است (Hong et al. 2000; Majeau et al. 1990; Godiard et al. 1990; Jakobek et al. 1993; Nasser et al. 1990) با توجه به نتایج به دست 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 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) مشاهده نشد درحالی که 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*) لویبا 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; Jakobek et al. 1993; Nasser et al. 1990) با توجه به نتایج حاصل 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. 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

توکسین به نام Phaseolotoxin وجود دارد که از تولید فیتوآلکسین در ارقام لویبا جلوگیری می‌نماید (Gnanamanickam & Patil 1977, Jakobek et al. 1993). در واقع مکانیسم‌های سرکوب کارآمد در پاتوژن‌های مختلف برای تجزیه ترکیبات دفاعی میزبان و جلوگیری از تجمع آنها به کار گرفته می‌شود (Jayakumar et al. 2005). تحقیقات گذشته نیز حاکی از این است که در تعامل‌های سازگار در مقایسه با ناسازگار تجمع ترانسکرپت ژن‌های دفاعی به تأخیر می‌افتد (Dixon & Harrison 1990; Dixon & Lamb 1990). هرچند چگونگی تأثیر عوامل ممانعت‌کننده در گیاهان مقاوم به روشنی مشخص نمی‌باشد، اما به نظر 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 درحالی که 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*) لویبا با *Pseudomonase syringae* pv *phaseolicola*) و ویروسی

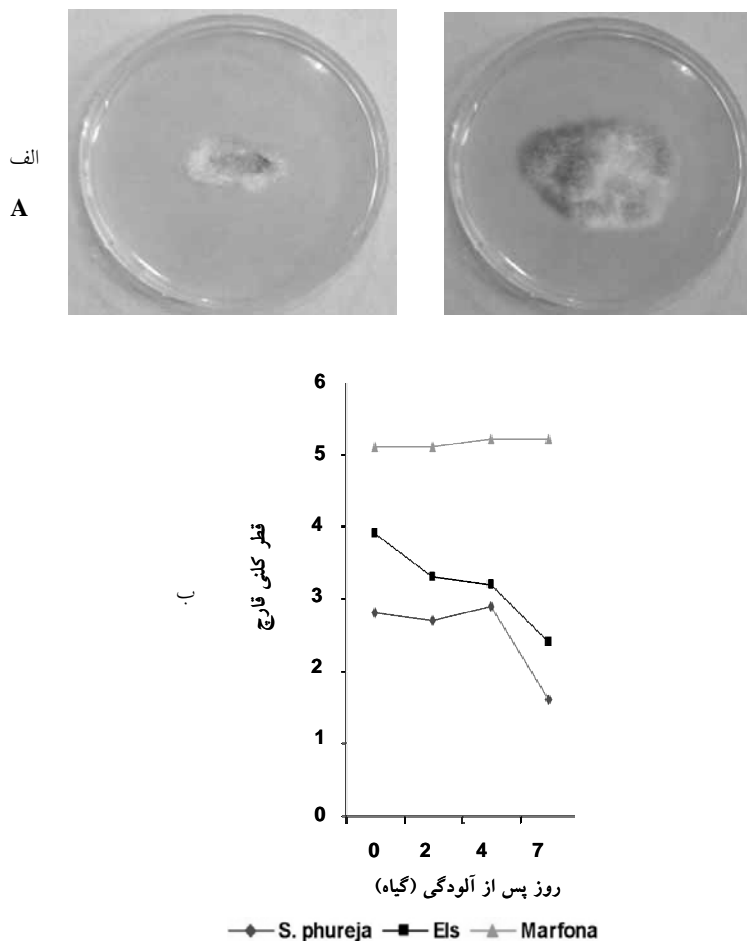
فوق حساسیت می‌گردد مشخص گردیده که بیان ژن‌های کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکناز و PR-S افزایش یافته اما این تجمع برای ظهور علائم نکروتیک کفایت نمی‌کرد (Godiard et al. 1990). هم‌چنین نقش تعیین‌کننده ژن PR-10a در عکس‌العمل ارقام مقاوم برنج علیه باکتری *X. campestris pv vesicatoria* به فعالیت ریونوکلاز آن تعمیم داده شده است (Kombriak 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 الیستاتور 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 عصاره‌های 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 به دلیل 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 به دلیل افزایش عناصر دفاعی مؤثر، کاهش یافته است. خصوصاً این نتایج با میزان

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 به وسیله 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



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*.

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

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

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.

پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی روی رشد قارپ‌های 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 پیش‌دفاع اهمیت دارند و در صورت تولید ایزوآنزیم‌های جدید مؤثر، توسعه میسلیم 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