نقش ژن *AbreAtr*$_1$ در مکانیسم حفاظتی و بیماری‌زایی قارچ *Alternaria brassicae* عامل بیماری لکه برگی کلزا با استفاده از Real time PCR *

ROLE OF *AbreAtr*$_1$ GENE IN PROTECTIVE MECHANISM AND PATHOGENICITY OF *Alternaria brassicae*, THE CAUSAL AGENT OF LEAF SPOT IN CANOLA USING REAL TIME PCR

معصومه مصطفی[۱]، بهرام شریف نبی [۱]**، ابوالقاسم اسماعیلی[۲] و ناصر صفایی [۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۳/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۸/۱۹)

چکیده

قارچ *Alternaria brassicae* به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های بذر زاد آلترناریا و عامل بیماری لکه برگی در گیاه کلزا شناخته شده است. در فرایند بیماری‌زایی این قارچ، پیش از این ژن *AbreAtr*$_1$ به عنوان بخشی از خوشه بیماری‌زایی NRPS-ABC transporter معرفی شده بود. حضور پروتئین‌های ABC transporter در قارچ‌های بیمارگر گیاهی از تجمع ترکیبات سمی که توسط آنها تولید می‌شود، جلوگیری نموده و آنها را در مقابل این ترکیبات محافظت می‌کنند که به تبع آن باعث رشد مطلوب‌تر قارچ می‌شود. تا کنون ارتباط بین عملکرد این حمل کننده‌ها با توانایی رشد قارچ *A. brassicae* و شدت بیماری‌زایی این قارچ مورد توجه قرار نگرفته است. در این مطالعه به منظور تعیین این ارتباط، میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ با استفاده از تکنیک Real time PCR در شش جدایه از قارچ *A. brassicae* مقایسه شد. سرعت رشد روزانه پرگنه در محیط کشت PDA و شدت بیماری‌زایی نیز در مورد هر جدایه مطالعه شد. جدایه‌های مختلف از لحاظ شدت بیماری‌زایی و سرعت رشد میسلیومی در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند، هم‌چنین بین جدایه‌ها از نظر میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در راستای بررسی نقش این ژن در مکانیسم حفاظتی قارچ *A. brassicae* در مقابل توکسین‌های تولید شده توسط این گونه بیمارگر و تأثیر آن بر میزان رشد و شدت بیماری‌زایی، هم‌بستگی بین سرعت رشد میسلیومی قارچ ، میزان بیماری‌زایی و الگوی رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ در هر جدایه تعیین شد. نتایج حاصل از تعیین هم‌بستگی در سطح احتمال یک درصد مثبت و معنی‌دار بود. چنین به نظر می‌رسد که توانایی رشد و بیماری‌زایی در قارچ *A. brassicae* تا حدودی متأثر از عملکرد ABC transporter کد شده توسط ژن *AbreAtr*$_1$ می‌باشد به طوری که بیان بالای این ژن در قارچ *A. brassicae* آثار سمی فیتوتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ را برای گونه بیمارگر کاهش داده، رشد و بیماری‌زایی بیشتر آن جدایه را باعث می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Alternaria brassicae*، *AbreAtr*$_1$، ABC transporter، بیماری‌زایی، رشد میسلیومی، کلزا

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sharifna@cc.iut.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار بیوتکنولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

۳. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

مقدمه

بیماری لکه برگی آلترناریایی یکی از مهم‌ترین و پرخسارت ترین بیماری‌های قارچی گیاهان خانواده چلیپائیان مانند کلزا(*B. campestris* L., *Brassica napus* L.) در سراسر جهان است که همه ساله تولید این گیاهان را ازنظر کمی و کیفی تحت تأثیر قرار می‌دهد. قارچ *Alternaria brassicae*، به عنوان یکی از مهم‌ترین گونه‌های بذر زاد آلترناریا و عامل بیماری لکه برگی در گیاه کلزا شناخته شده است (Chucharek 2000) که به طور معمول باعث تخریب بافت میزبان و تشکیل زخم‌های نکروتیک می‌گردد. نواحی نکروز شده اغلب توسط هاله زرد رنگ احاطه می‌شود لذا علائم ایجاد شده توسط این‌گونه بیمارگر اغلب به صورت دوایر متحدالمرکز روی برگ، غلاف و ساقه‌های کلزا قابل مشاهده است (Agarwal *et al*. 1997). این قارچ، چهار فیتوتوکسین دپسی پپتید (Depsi peptid) حلقوی متعلق به خانواده‌ای از ترکیبات با نام Destruxin را تولید می‌کند (Ayer & Pena-Rodiguez 1987). دستروکسین B فیتوتوکسین اصلی تولید شده توسط این قارچ است (Parada *et al*. 2007) که برای تعدادی از گیاهان سمی بوده و علائم کلروز و نکروز را شبیه به عامل بیماری در گیاه ایجاد می‌کند (Pedras *et al*. 2002). تصور می‌رود که این توکسین‌ها علاوه بر ایجاد بیماری در گیاه میزبان برای گونه تولید کننده نیز سمی بوده و فعالیت‌های فیزیولوژیکی از قبیل رشد قارچ را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهند (De Waard 1997). تاکنون طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی شامل اثرات ضد باکتریایی، ضد ویروسی و نماتود کشی در مورد این ترکیبات شناسایی شده است (Theodoulou 2002 , Giulietti *et al*. 2001, Pedras *et al*. 2001). آثار سیتوتوکسیکی این ترکیبات نیز روی چندین اندامک سلولی از قبیل میتوکندری و شبکه اندوپلاسمیک نیز به اثبات رسیده است (Amiri *et al*. 1999, Genthner *et al*. 1998).

گیلمت و همکاران (Guillemette *et al*. 2004) با بررسی کتابخانه ژنومی این قارچ یک ژن سنتز کننده پپتیدهای غیر ریبوزومی (NRPS) به نام $AbrePsy_1$ را شناسایی‌کردند. این ژن در سنتز متابولیت‌های پپتیدی سمی مانند انواع فیتوتوکسین‌ها نقش‌دارد. در مجاورت این ژن، ژن $AbreAtr_1$ مشاهده شده است که پروتئینی با ساختار TMD_4-$(TMD_6$-$NBF)_2$ و متعلق به خانواده پروتئینی ABC transporter را کد می‌کند. این خانواده شامل طیف وسیعی از پروتئین‌های انتقال دهنده مرتبط با غشاء است(Higgins 2001). ABC ترانسپورترها به عنوان پمپ‌های بیولوژیکی عمل کرده و به منظور حذف ترکیبات سمی از سیتوپلاسم، به طور مستقیم با پیش ماده‌ها برهم‌کنش می‌کنند. مدارک اخیر نشان می‌دهد که تشخیص و دفع عوامل سمی، قبل از این که غلظت سمی ایجاد شده سیتوپلاسم را پرکند، انجام می‌شود و این عوامل سمی از طریق غشاء به فضاهای خارج سلولی منتقل می‌شوند. بر همین اساس، ABC ترانسپورترها به عنوان پمپ‌های تمیز کننده غشائی آب گریز شناخته شده اند به طوری که غلظت‌های پایین پیش ماده‌هایی از قبیل آلکالوئیدها، استروئید، استرول، قند و هم‌چنین ترکیبات ساختگی از قبیل انواع قارچ کش‌ها و داروها قادر به فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی سلول و القای این پمپ‌ها هستند (Stergiopoulos *et al*. 2002)

در قارچ‌های بیمارگر گیاهی، این حمل کننده‌ها به دلیل حفاظت قارچ در مقابل ترکیبات دفاعی گیاه میزبان شامل فیتوآلکسین‌ها و هم‌چنین به علت وساطت در ترشح فیتوتوکسین‌ها از گونه توکسین‌زا، تعیین کننده‌های مهم بیماری‌زایی در گیاه میزبان شناخته شده‌اند. اعتقاد بر این

است که حضور این پروتئین‌ها در قارچ‌ها از تجمع ترکیبات سمی که توسط آنها تولید می‌شود جلوگیری کرده و بنابر این وظیفه فیزیولوژیکی این انتقال دهنده‌ها حفاظت قارچ در مقابل ترکیبات سمی مانند انواع توکسین است (Stergiopoulos *et al*. 2002).

با وجود این‌که پیش از این اختلاف بیماری‌زایی در میان جدایه‌های *A. brassicae* توسط *موکادان* و *دشموک* گزارش شده است (Mukadan & Deshmukh 1977) ولی تاکنون نقش ABC ترانسپورتر کد شده توسط ژن *AbreAtr*$_1$ در میزان بروز این تفاوت وهم‌چنین در مکانیسم حفاظتی قارچ *A. brassicae* در مقابل توکسین‌های این گونه بیمارگر مورد توجه قرار نگرفته است. بدین لحاظ انجام آزمایش‌هایی از طریق کمی کردن آنالیز سطح بیان ژن‌های کد کننده این پروتئین‌ها به وسیله Real time PCR و مقایسه آن با شدت بیماری زایی و نحوه رشد میسلیومی جدایه‌های این قارچ ممکن است اطلاعات مهمی در مورد مکانیسم عمل و وظیفه این ترانسپورتر در نحوه بروز صفات فنوتیپی مانند بیماری‌زایی و رشد قارچ در اختیار بگذارد.

روش بررسی

جدایه‌های مورد استفاده

برای انجام این آزمون از شش جدایه مربوط به گونه *A. brassicae* جداسازی شده از مناطق مختلف استان گلستان (Nourani *et al*. 2008) استفاده شد (جدول۱).

بررسی الگوی رشدی جدایه‌ها

به منظور اندازه‌گیری سرعت رشد پرگنه، جدایه‌ها داخل ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شده و به مدت دو هفته در دمای ۲۵°C در انکوباتور نگهداری شدند. قطر پرگنه هر روز اندازه‌گیری شد و در نهایت سرعت رشد شعاعی روزانه پرگنه‌ها برای هر جدایه به دست آمد و مورد مقایسه آماری قرار گرفت.

انجام آزمون گلخانه‌ای

بیماری‌زایی جدایه‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شرایط گلخانه روی رقم Hayola401 از گیاهچه‌های۴۰ روزه *Brassica napus* انجام شد.

تعداد ۲۴ عدد گلدان، از هر گلدان یک گیاهچه و از هر گیاهچه دو برگ انتخاب شد. قرص‌های میسلیومی پنج میلی‌متری از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های۱۰ روزه جدایه‌های مورد نظر روی دو زخم ایجاد شده توسط سوزن سترون در هر برگ قرار داده شد. به همین ترتیب برای شاهد بلوک‌های آگار روی زخم‌ها قرار گرفت. قبل از قرار دادن بلوک‌ها سطح برگ‌های زخمی با توئین ۲۰ مه پاشی شد. بعد از قراردادن قرص‌ها روی هر برگ زخمی، مجددا سطح برگ مرطوب‌گردید و با پوشش پلاستیکی مرطوب پوشانده شد. بعد از ۲۴ ساعت پوشش‌ها برداشته شد ودمای گلخانه در ۲۴ °C تنظیم‌گردید. علائم بیماری بعد از سه الی ۱۰ روز بررسی شد. قطر لکه‌ها در روز سوم بعد از مایه‌زنی اندازه گرفته‌شد، مجددا بعد از ده روز هم قطر لکه‌ها اندازه‌گیری شد. پس از روز دهم، برگ‌ها جدا شدند و قطر لکه‌های مشاهده شده در دو جهت عمود بر هم از زیر سطح برگ اندازه‌گیری و سپس میانگین مساحت لکه‌ها در هر تکرار محاسبه شد. در نهایت شدت علائم بر حسب درصد سطح بافت آلوده بر حسب سانتی‌متر مربع نسبت به کل سطح برگ محاسبه شد.

ردیابی ژن *AbreAtr*$_1$

به منظور بررسی وجود ژن *AbreAtr*$_1$ در جدایه‌های مورد

جدول۱. مقایسه میانگین‌های میزان رونویسی ژن ***AbreAtr$_1$***، شدت بیماری‌زایی و سرعت رشد روزانه پرگنه در جدایه‌های ***Alternaria brassicae***

Table 1. Means of amount of pathogenicity amount of *AbreAtr$_1$* transcription and daily growth rate in six isolates of *Alternaria brassicae*

Daily growth rate سرعت رشد روزانه	Amount of pathogenicity شدت بیماری‌زایی	Amount of *AbreAtr$_1$* transcription میزان رونویسی ژن *Abre Atr$_1$*	Isolate کد جدایه
2.98 a	0.29 a	6.63 a	**H_2**
2.90 a	0.25 b	3.95 b	**H_8**
2.45 b	0.18 c	0.3 d	**K_4**
2.40 b	0.16 d	0.48 d	**K_{10}**
2.81 a	0.16 d	1 c	**K_5**
2.11 c	0.07 e	0.14 d	**K_7**

میانگین‌ها در هر ستون با حروف مختلف، در سطح احتمال آماری ۱٪ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Numbers with different letter in each column are significantly different at% 1 level by LSD test.

نظر، استخراج DNA با استفاده از روش *ریدر و برود*/ انجام گرفت (Reader & Broada 1985) و ۲/۵ میکرولیتر(۳۶۵ نانوگرم) از DNA حاصل به عنوان الگو در واکنش PCR به کار رفت.

واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۱۰ X)، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTPs، ۰/۳ میکرو مولار از هر یک از آغازگرهای AbreAtr–for (5'–TCCTTCgCTCCAggTTTCC-3') و AbreAtr- rev (5'–AAgTCAAggATTgTgTCgAgCTT-3')، یک واحد از آنزیم *Taq* DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر(۳۶۵ نانوگرم) DNA الگو و ۱۷ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Genius FGEN 05 TD) با برنامه دمایی شامل یک مرحله ۱۰ دقیقه ای در ۹۵ °C و سپس ۴۰ چرخه، ۹۵ °C برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ °C به مدت ۱ دقیقه و ۷۲ °C برای ۱ دقیقه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR پس از مخلوط کردن با بافر بارگذاری در ژل اکریل آمید ۱۲ درصد به مدت ۴ ساعت و با ولتاژ ثابت ۲۰۰ در بافر TBE (۱ X) الکتروفورز شد.

بررسی میزان رونویسی ژن ***AbreAtr$_1$***

۱- استخراج RNA کل قارچ

جهت استخراج RNA کل قارچی، میسلیوم‌های رشد یافته در محیط کشت مایع سیب زمینی-گلوکز (PGB)، پس از ۱۴ روز، شستشو و آب‌گیری شده و بلافاصله در یک هاون چینی سترون و سرد به کمک نیتروژن مایع پودر گردید. استخراج RNA کل قارچی با استفاده از (Plus) RNX^{TM} طبق روش توصیه شده شرکت سازنده(CinnaGen, Iran)

انجام‌شد. یک میلی لیتر از محلول RNX به‌۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم‌های پودر شده، اضافه شد. محلول حاصل به مدت ۱۵ ثانیه ورتکس و پس از آن به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. به لوله‌ها ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم سرد اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه به شدت با دست تکان داده شد و پس ازآن به مدت پنج دقیقه روی یخ قرار داده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C و در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شد. رویه بالایی جدا و به لوله های جدیدی منتقل گردید. معادل هم حجم از محلول به دست آمده، ایزوپروپانول سرد به نمونه‌ها اضافه شد و سه مرتبه مخلوط گردید. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار داده شدند و پس از این مدت نمونه ها به مدت ۱۵ دقیقه و دردمای ۴°C و در ۱۲۰۰۰ دور سانتریفیوژ شدند. فاز رویی حذف و به رسوب حاصل یک میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد سرد اضافه شد و رسوب حاصل با استفاده از ورتکس حل گردید. لوله‌ها به مدت هشت دقیقه در ۷۵۰۰۰ دور و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شدند. رویه بالایی حذف گردید و رسوب حاصل در دمای اتاق در زیر هود قرار داده شد تا خشک شود. پس از ۳۰ دقیقه، رسوب در ۴۰ میکرولیتر آب تیمار شده با DEPC (Diethyl Pyrocarbonate) حل گردید. استخراج RNA کل از جدایه‌های مورد نظر دو مرتبه و به فاصله ۱۵ روز انجام شد. کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با استفاده از دو روش الکتروفورز ژل آگارز و اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تیمار RNA با استفاده از آنزیم DNaseI, RNase-free

به منظور جلوگیری از وجود آلودگی DNA به همراه RNA کل، بقایای DNA از RNA کل استخراج شده با استفاده از آنزیم DNaseI, RNase-free حذف گردید. مقدار RNA در این واکنش یک میکروگرم بود. مقادیر بافر DNase، DNase، DEPC water و EDTA مورد نیاز نیز مطابق با روش توصیه شده توسط شرکت سازنده (Fermentas, Life sciences) محاسبه گردید. مقادیر محاسبه شده از بافر و RNA به لوله‌های ۲۰۰ میکرولیتری منتقل شد و حجم هر لوله به وسیله آب مقطر تیمار با DEPC به ۹ میکرولیتر رسانده شد. سپس یک میکرولیتر از DNase نیز به محلول حاضر اضافه گردید. لوله‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفتند و پس از این مدت یک میکرولیتر از EDTA نیز به لوله‌ها اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ °C قرار داده شدند.

واکنش ترانویسی معکوس- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (RT-PCR)

ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAid^{TM} First Strand cDNA Synthesis، و طبق روش توصیه شده توسط شرکت سازنده (Fermantas, Life sciences) انجام شد. به لوله‌های حاوی یک میکروگرم RNA تیمار شده با DNase، یک میکرومولار از آغازگر Random hexamer اضافه گردید و حجم نهایی توسط آب مقطر تیمار شده با DEPC به ۱۲ میکرولیتر رسانده شد. مجموعه حاضر به مدت پنج ثانیه در۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و لوله‌ها به مدت پنج دقیقه در دمای ۶۵ °C و بلافاصله پس از آن روی یخ قرار گرفتند. حجم کلی واکنش سنتز cDNA برای هر نمونه ۲۰ میکرولیتر بود و مقادیر مورد نیاز از بافر، dNTP، RNase Inhibitor و آنزیم ترانسکریپتاز مطابق با دستور سازنده کیت محاسبه و به هر لوله اضافه گردید و لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵ $^{\circ}C$ و پس از آن به مدت یک ساعت در دمای ۴۲ $^{\circ}C$ و سپس به مدت پنج دقیقه در دمای ۷۰ $^{\circ}C$ قرار داده شدند.

واکنش Real time PCR

به منظور بررسی میزان ترانویسی ژن *AbreAtr1*، واکنش Real time PCR با استفاده از کیت BioEasy SYBR Green I Real Time PCR، جفت آغازگر AbreAtr و یک جفت آغازگر مربوط به ژن خانه‌گردان، AbreITS-for ('5-CACAATATgAAggCAggCTgAA-3') و AbreITS-rev ('5-CgCAAAgACACgggTgAAT-3')، انجام‌گرفت. پس از تعیین بهترین دمای اتصال آغازگرها به توالی هدف و غلظت مناسب cDNA، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل دو میکرولیتر cDNA با غلظت ۱۰ نانوگرم، آغازگرها (هر یک ۰/۲ میکرومولار) ۱۲/۵ میکرولیتر (۲X) SYBR Mix، ۷۵ / واحد آنزیم *Taq* Polymerase و ۹/۳۵ میکرولیتر آب مقطر دو بار سترون انجام شد. مواد ذکر شده برای هر جدایه در شرایط سترون به لوله‌های مخصوص ۲۰۰ میکرولیتری اضافه شد. برای هر جفت آغازگر یک لوله نیز به عنوان کنترل، حاوی محلول پایه و فاقد cDNA الگو در نظر گرفته شد. سپس لوله‌ها در دستگاه ترموسایکلر Chromo 4 (Bio-Rad) قرار گرفتند. شرایط چرخه‌های واکنش مطابق شرایط واکنش ردیابی ژن بود. آزمایش‌ها در دو تکرار بیولوژیکی مرتبط با دو مرتبه استخراج RNA انجام گرفت. هم‌چنین برای هر جدایه از قارچ در هر مرتبه از آزمایش‌ها، دو تکرار تکنیکی در نظر گرفته شد جهت تأیید تکثیرمطلوب توالی مورد نظر و حصول اطمینان از عدم تکثیر توالی‌های غیر اختصاصی، محصول PCR در ژل اکریل آمید۱۲ درصد به مدت ۴ ساعت الکتروفورز گردید.

نتایج حاصل از این مرحله به صورت نسبی و با استفاده از روش $\Delta\Delta C_T$ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌های مربوطه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار برای هر کدام از تیمارها انجام شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج آزمون‌ها از نرم افزار آماری SAS(Institue Inc. Cary, NC, USA,2001) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD استفاده شد.

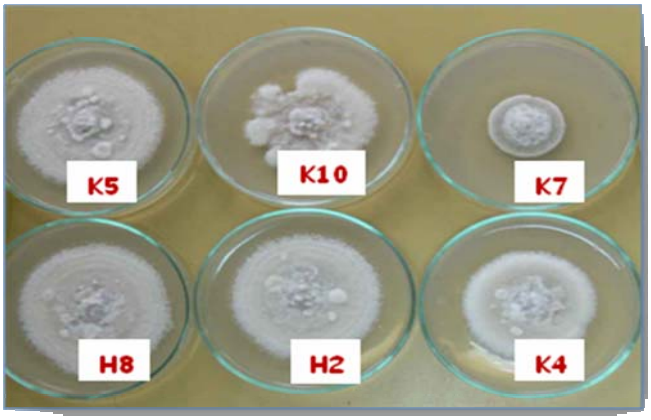
نتایج

بررسی الگوی رشدی جدایه‌ها

به منظور مقایسه الگوی رشدی جدایه‌های قارچ *A. brassicae* مورد بررسی، سرعت رشد شعاعی روزانه جدایه‌ها روی محیط کشت PDA محاسبه شد. جدایه‌های مختلف دارای الگوهای متفاوتی از رشد میسلیومی بودند (شکل۱). میانگین رشد شعاعی روزانه در مورد هر جدایه نیز متفاوت بود (شکل ۲). نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میزان رشد پرگنه جدایه‌های مختلف در سطح احتمال یک درصد وجود دارد. در بین جدایه‌ها، جدایه H_2 بیشترین و جدایه K_7 کمترین توان رشدی را نشان دادند (جدول۱). تفاوت در سرعت رشد جدایه‌ها احتمالاً به علت تفاوت در حساسیت پایه ای جدایه‌های مختلف به اثر سمی توکسین‌های این قارچ است. با توجه به این که در اغلب قارچ‌های تولید کننده توکسین، حفاظت در مقابل ترکیبات سمی خارج سلولی و داخل سلولی از طریق پروتئین‌های ABC transporter انجام می‌گیرد(Stergiopoulos *et al* 2002) لذا این گونه انتظار می‌رود که در قارچ *A. brassicae* نیز احتمالاً سطوح متفاوتی از بیان ژن *AbreAtr1* در هر جدایه می‌تواند با این پدیده در ارتباط باشد.

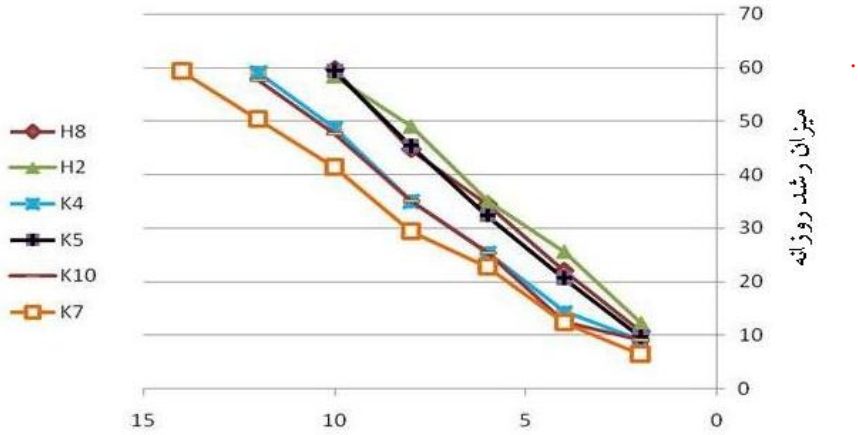
مقایسه شدت بیماری‌زایی

علائم ایجاد شده توسط همه جدایه‌ها درگیاهان کلزا به طور کل شامل مرکز بافت‌مرده بود که توسط هاله زرد



شکل۱. مقایسه الگوی رشدی جدایه‌های قارچ *Alternaria brassicae* رشد یافته در محیط کشت PDA و دمای۲۵°C

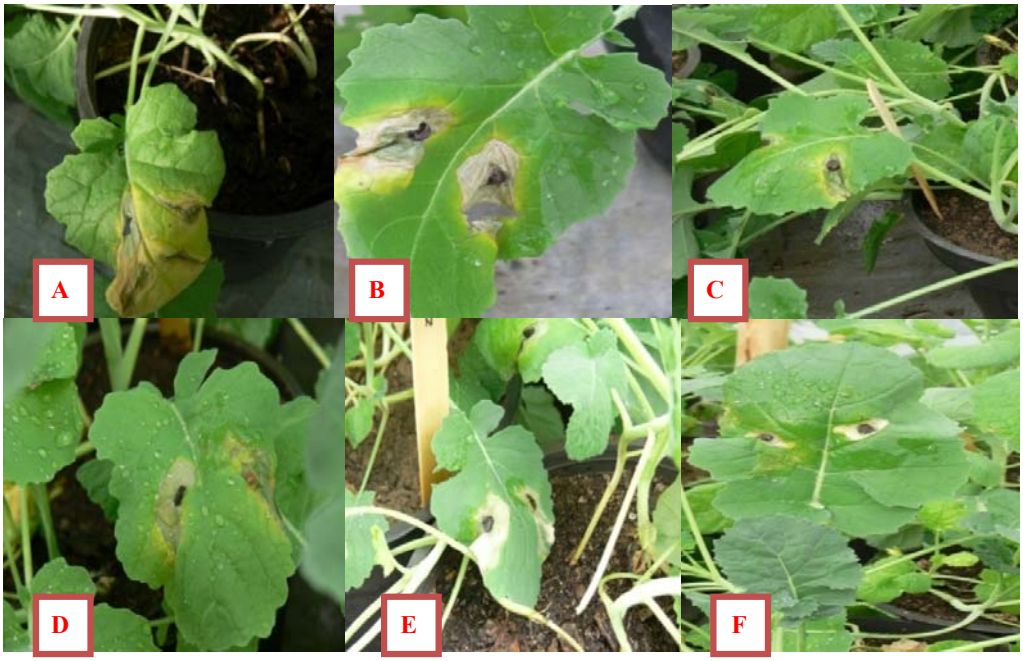
Fig. 1. Comparison of growth pattern in six isolate of *Alternaria brassicae* in PDA and 25°c



شکل۲. مقایسه سرعت رشد شعاعی جدایه‌های گونه *Alternaria brassicae* در محیط کشت PDA و دمای ۲۵ °C

Fig. 2. Comparison growth of radial rate in *Alternaria brassicae* isolates in PDA and 25 °C

رنگ احاطه شده بود ولی میزان توسعه علائم در جدایه‌های مختلف تفاوت قابل توجهی را نشان داد (شکل۳). تجزیه و تحلیل داده‌های مربوط به درصد سطح بافت آلوده و مقایسه میانگین با استفاده از آزمون LSD نیز نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های مختلف از نظر توسعه علائم وجود دارد به طوری که بیشترین درصد توسعه علائم مربوط به جدایه H_2 و کمترین درصد به جدایه K_7 متعلق بود (جدول۱). با توجه به اطلاعات به‌دست آمده از این آزمون می‌توان جدایه H_2 را به عنوان مهاجم‌ترین و K_7 را به عنوان ضعیف‌ترین جدایه بیماری‌زا قارچ *A. brassicae* در رقم Hayola 401 محسوب نمود. همان گونه که در پدیده بیماری‌زایی این قارچ مشاهده می‌شود، با وجود این‌که استراتژی‌های به کار رفته توسط جدایه‌های مختلف در ایجاد بیماری لکه برگی مشابه است ولی شدت توسعه علائم مربوط به این جدایه‌ها متفاوت می‌باشد، به نظر موکادان (Mukadan & Deshmukh 1977)



شکل ۳ . مقایسه شدت بیماری‌زایی شش جدایه قارچ *Alternaria brassicae* در گیاه کلزا .A: جدایه H_2، B: جدایه H_8، C: جدایه K_5، D: جدایه K_{10}، E: جدایه K_4، F: جدایه K_7

Fig. 3. Pathogenicity comparison among six isolates of *Alternaria brassicae* in canola plant. A: H2, B: H8, C: K5, D: K10, E: K4, F: K7.

نیز جدایه‌های *A. brassicae* که به کلزا حمله می‌کنند از نظر قدرت بیماری‌زایی متفاوت هستند که احتمالاً این تفاوت در بیماری زایی با مقدار ترشح فیتوتوکسین‌ها در ارتباط است.

ردیابی ژن *AbreAtr*$_1$

به‌منظور بررسی حضور یا عدم حضور ژن *AbreAtr*$_1$ در جدایه‌های قارچ *A. brassicae*، واکنش PCR با استفاده از آغازگر AbreAtr انجام‌شد. این آغازگر توسط *گیلمت* (۲۰۰۴) و بر مبنای توالی نوکلئوتیدی خوشه بیماری‌زای NRPS –ABC transporter در ژنوم این قارچ طراحی شده است. ژن *AbreAtr*$_1$ بخشی از این خوشه ژنی بوده و به عنوان کدکننده فاکتورهای بیماری‌زایی در قارچ *A. brassicae* مطرح است. ردیابی این ژن در جدایه‌های قارچ *A. brassicae* توسط جفت آغازگر مربوط به این ژن انجام شد. طی انجام واکنش‌های PCR با استفاده از DNA هر جدایه، جفت آغازگر AbreATR قطعه ۷۰ جفت بازی را تکثیر نمود. با استفاده از نرم افزار Primer-BLAST Primer designing مشخص شد که این قطعه به بخشی از ژن *AbreAtr*$_1$ در ژنوم قارچ *A. brassicae* مربوط است.

بررسی میزان ترانویسی ژن *AbreAtr*$_1$

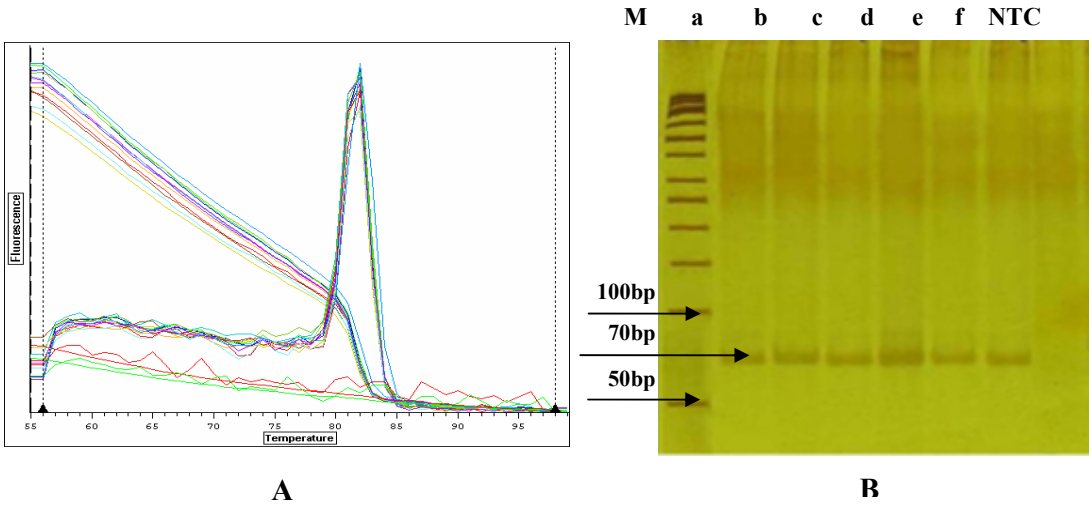
واکنش Real time PCR در دو تکرار بیولوژیکی مرتبط با دو مرحله استخراج RNA انجام شد. جهت کاهش خطاهای تکنیکی آزمایش، از RNA مربوط به هر جدایه در هر تکرار دو مرتبه استفاده گردید. مقایسه مقادیر C_T ثبت شده برای هر جدایه در هر دو تکرار بیولوژیکی، الگوی مشابهی را نشان داد. منحنی ذوب حاصل از همه جدایه‌ها

نیز تأیید کننده تکثیر مطلوب توالی هدف در هر جدایه بود (شکل۴-A). در الکتروفورز محصول PCR نیز مشاهده باند مربوط به تکثیر توالی ۷۰ جفت بازی، تأیید کننده تکثیر مطلوب توالی هدف در همه جدایه‌ها بود (شکل۴-B).

تجزیه و تحلیل آماری نتایج مربوط به میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ در شش جدایه قارچ مورد مطالعه نشان داد که بین جدایه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین نیز بیشترین میزان رونویسی این ژن را در جدایه H_2 نشان داد. ژن مورد نظر در سایر جدایه‌ها به میزان کمتری رونویسی گردید. بین میزان رونویسی این ژن در جدایه‌های K_7، K_4 وK_{10} اختلاف معناداری دیده نشد (جدول۱).

جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق از نظر شدت بیماری‌زایی خصوصیات کشت (میزان رشد پرگنه) و الگوی رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ تفاوت قابل توجهی را نشان دادند. گروه‌بندی جدایه‌ها نیز بر اساس مقایسه میانگین‌ها در مورد هر یک از صفات مذکور متفاوت بود. به طور کل جدایه H_2 در تمامی آزمون‌ها بیشترین و جدایه K_7 کمترین مقدار صفت مورد بررسی را نشان دادند. بنابراین به منظور تعیین رابطه بین شدت بیماری‌زایی و الگوی رشد رویشی قارچ *A. brassicae* با میزان بیان ژن *AbreAtr*$_1$، ارتباط بین الگوی رونویسی این ژن، الگوی رشد میسلیومی و شدت بیماری‌زایی در جدایه‌های مورد مطالعه بررسی شد. از نظر آماری هم‌بستگی بین میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ ، درصد آلودگی و سرعت رشد شعاعی روزانه در شش جدایه قارچ *A. brassicae* در سطح احتمال یک درصد مثبت و معنی‌دار بود (جدول۲). احتمالاً در این قارچ پروتئین ABC transporter کد شده توسط ژن *AbreAtr*$_1$ عملکرد قارچ را از نظر شدت بیماری‌زایی و سرعت رشد میسلیومی تحت تأثیر قرار می‌دهد، پروتئین‌های ABC transporter به عنوان فاکتورهای دخیل در بیماری‌زایی بسیاری از قارچ‌های بیمارگر گیاهی مطرح هستند. نقش این پروتئین‌ها در بیماری‌زایی این قارچ‌ها ممکن است با انتقال ترکیبات دفاعی گیاه و یا فاکتورهای بیماری‌زایی قارچ در ارتباط باشد (De Waard 1997). این ترانسپورترهای غشایی از مولکول‌های سمی به عنوان پیش ماده استفاده کرده وبدین وسیله از انباشتگی آنها در میسلیوم جلوگیری می‌نمایند.

تا کنون وظیفه چندین ABC transporter در بیمارگرهای گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا نقش ژن *BcatrB* در بیماری‌زایی قارچ *Botrytis cinerea*، ژن *atrA* و*atrB* در قارچ *Aspergilus nidulans*، ژن *PMR*$_1$ در قارچ *Penicillium digitatum* و ژن *ABC*$_1$ در قارچ *Magnaporthe grisea* از طریق ایجاد موتانت‌های فاقد ژن هدف و مشاهده خصوصیات فنوتیپی موتانت ایجاد شده تأیید شده است (De Waard 1997,Stergiopoulos *et al* 2002). در قارچ *A. brassicae* نیز وظیفه این پروتئین‌ها احتمالاً انتقال پپتیدهای سمی سنتز شده توسط قارچ به خارج از سلول است. لذا احتمال می‌رود علائم ایجادشده توسط این قارچ در گیاه میزبان با میزان بیان این ژن در ارتباط باشد (Guillemette *et al* 2004) به طوری که نتایج این تحقیق نیز نشان داد بیشترین میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ در جدایه‌های دارای سرعت رشدی بیشتر و قدرت تهاجم بالاتر حاصل شده است. هم‌چنین با توجه به هم‌بستگی مثبت بین میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ و سرعت رشد شعاعی روزانه در شش جدایه قارچ *A. brassicae* شاید بتوان این‌گونه تصور نمود که این ABC transporter از طریق تشخیص و دفع فیتوتوکسین‌ها مکانیسم دفاعی ایجاد کرده، از انباشتگی این توکسین‌ها در میسلیوم قارچ جلوگیری می‌کند و بدین وسیله قارچ را در مقابل این ترکیبات سمی محافظت می‌نماید.



شکل ۴- A : منحنی ذوب حاصل از تکثیر توالی هدف در ژن *AbreAtr*$_1$ در شش جدایه از قارچ ***Alternaria brassicae*** در واکنش Real time PCR. B: تکثیر قطعه ۷۰ جفت بازی مربوط به تکثیر توالی هدف در ژن *AbreAtr*$_1$. a : جدایه H_2، b: جدایه H_8، c: جدایه K_5، d: جدایه K_{10}، e: جدایه K_4، f: جدایه K_7. M: ۵۰ bp DNA Ladder، NTC: نمونه آب به عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شده است.

Fig. 4. A: Melting curve of amplification of target sequence in *AbreAtr*$_1$ gene in six isolate of *Alternaria brassicae* in Real time PCR. B: Amplification of a 70 bp fragment from amplification of target sequence in *AbreAtr*$_1$.a: H_2, b: H_8, c: K_5, d: k_{10}, e: K_4, f: K_7.M: 50bpDNA Ladder, NTC (non template control): H_2O was used as negative control in PCR.

جدول۲. ضرایب هم‌بستگی پیرسون بین درصد بیماری‌زایی میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$ سرعت رشد روزانه پرگنه در شش جدایه از قارچ ***Alternaria brassicae***

Table 2. Correlation between amount of pathogenicity amount of *AbreAtr*$_1$ transcription and daily growth rate in six isolates of *Alternaria brassicae*

	Amount of pathogenicity شدت بیماری‌زایی	Amount of *AbreAtr*$_1$ transcription میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$	Daily growth rate سرعت رشد روزانه
Amount of pathogenicity شدت بیماری‌زایی	1	0.829**	0.824**
Amount of *AbreAtr*$_1$ transcription میزان رونویسی ژن *AbreAtr*$_1$		1	0.765**
Daily growth rate سرعت رشد روزانه			1

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ ٪

** : Significant at 1%

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (84-83) متن انگلیسی مراجعه شود.