نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۱۷۴-۱۶۷

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 167-174

مطالعه بیان ژن‌های *SUT1*، *Chi3* و *CYP1* در گوجه‌فرنگی پارازیت شده با گل جالیز (*Orobanche aegyptica*)

محمدرضا فیاض[۱*]- سیدحسن مرعشی[۲] – امین میرشمسی کاخکی[۳] – منصوره کرمانی[٤]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۱۰/۳۰
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۳۱

چکیده

گل جالیز (*Orobanche spp*) گیاه انگلی مطلق بوده که به ریشه بسیاری از گیاهان زراعی مهم همچون گوجه فرنگی، آفتابگردان، خیار، توتون و متصل شده و باعث کاهش قابل توجهی در عملکرد گیاه زراعی به ویژه در مناطق گرم و خشک همچون اروپا، آفریقا و آسیا می‌شود. تاکنون روش‌های متعددی برای کنترل گل جالیز استفاده شده است، اما عموماً این روش‌ها گران بوده و موثر عمل نمی‌کنند. درک بهتر نحوه واکنش گیاه میزبان و همچنین مکانیسم مولکولی مقاومت به این گیاه انگل به منظور یافتن روش‌های بهتر جهت کنترل آن ضروری به‌نظر می‌رسد. در این مطالعه بررسی بیان دو ژن کدکننده آنزیم‌های کیتیناز (*Chi3*) و سیستئین پروتئیناز (*CYP1*)، و همچنین یک ژن کدکننده انتقال دهنده ساکارز (*SUT1*)، در واکنش گیاه گوجه‌فرنگی به آلودگی با گل جالیز، در دو ژنوتیپ متحمل و حساس با استفاده از تکنیک Real time PCR انجام شد. هر سه ژن در ساعات اولیه پس از آلودگی افزایش بیان را نشان دادند. بیان انتقال دهنده ساکارز و همچنین آنزیم سیستئین پروتئیناز در هنگام تنش در دو ژنوتیپ با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشته اما در مورد آنزیم کیتیناز این تفاوت مشاهده نشد. نحوهٔ بیان ژن‌ها در دو ژنوتیپ حساس و مقاوم نشان داد که فعالیت‌های دفاعی گیاه گوجه‌فرنگی از همان ساعات اولیه پس از آلودگی شروع شده و رقم متحمل پاسخ دفاعی سریع‌تری به علائم منتقل شده از گیاه انگل می‌دهد. همچنین احتمالاً آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین (پروتئینازها)، یکی از ابزارهای دفاعی زودهنگام گیاهان در جلوگیری از نفوذ گل جالیز به ریشه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: انتقال دهنده ساکارز، سیستئین پروتئیناز، کیتیناز، گل جالیز، گوجه فرنگی

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicum esculentum*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های خانواده *Solanaceae* می‌باشد که غنی از ویتامین A و مواد معدنی می‌باشد، و در ایران دارای سطح زیر کشت ۱۴۶۹۸۵ هکتار می‌باشد (۱۷).

یکی از مشکلات عمده در کشت گوجه فرنگی گل جالیز (*Orobanche aegyptica*) می‌باشد. گل جالیز انگل اجباری ریشه گیاهان دولپه به‌خصوص گیاهان تیره بقولات، چتریان، کدوئیان و کاسنی است و به دلیل نداشتن کلروفیل با جذب آب و مواد غذایی از میزبان سبب کاهش رشد و عملکرد، پژمردگی و در نهایت مرگ آن می‌شود. میزان خسارت گل‌جالیز براساس میزان آلودگی بین صفر تا نابودی کامل می‌باشد (۱۴). راه‌های مختلفی برای کنترل این علف هرز انگل، از جمله؛ مکانیکی، زراعی، بیولوژیکی و شیمیایی توصیه شده است، اما همه آن‌ها دارای محدودیت بوده و به‌طور کامل موجب موفقیت نشده‌اند. بنابراین اصلاح گوجه‌فرنگی برای ایجاد مقاومت ژنتیکی به عنوان مؤثرترین، اقتصادی‌ترین، عملی‌ترین و پایدارترین روش مدنظر است (۵). مکانیسم‌های مختلفی جهت پیشگیری و ایجاد مقاومت در مقابل گل جالیز در گیاهان میزبان شناخته شده‌است که از آن جمله می‌توان به عدم ترشح مواد محرک جوانه‌زنی بذر گل‌جالیز از سوی ریشه گیاه میزبان اشاره کرد (۱). یکی دیگر از مکانیسم‌های دفاعی بلوکه‌شدن بافت‌های میزبان برای جلوگیری از اتصال یا رخنه گیاه پارازیت به ریشه است (۱۸). تحقیقات مختلفی نشان داده است که قبل از اتصال، بین دو گیاه سیگنال‌هایی مبادله می‌شود و ارقام مقاوم قبل از نفوذ یا رخنه در بیان برخی از ژن‌ها، تفاوت‌هایی را نشان داده‌اند (۲). اطلاع از مکانیسم مولکولی اثر متقابل بین گیاه میزبان و انگل جهت پیشبرد اهداف اصلاحی ضروری بوده و به دلیل وجود محدودیت‌های زیاد در مورد تغییرات بیان ژن‌ها در زمان فعل و انفعال بین گیاه انگل و میزبان، اطلاعات بسیار کمی در این زمینه در دسترس است (۴). شناسایی و متعاقب آن توصیف ژن‌هایی که اختصاصاً و یا به‌صورت متغیر در زمان برقراری رابطه انگلی در میزبان بیان می‌شوند اولین قدم در درک این مکانیسم پیچیده است.

۱، ۲ و ۳ – به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، استادیار و دانشیار گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*–نویسنده مسئول: (Email: M.rfayyaz@yahoo.com
۴ – استادیار گروه کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران

تاکنون مطالعات کمی در زمینه بررسی ژن‌های بیان شده در هنگام مواجهه گیاه میزبان با گل جالیز انجام گرفته است. از آن جمله می‌توان به مطالعهٔ بیان ژن‌های مسیرهای دفاعی در آرابیدوپسیس تالیانا در مواجهه با گل جالیز مصری به (*Orobanche aegyptica*) توسط ویرا دوس سانتوس و همکاران (۱۸) اشاره نمود که گزارش کردند بیان این ژن‌ها در گیاه میزبان افزایش داشته است. ژن‌های انتخاب شده از این مسیرها در این آزمایش گلوتاتیون ترانسفراز از مسیر تنش‌های اکسیداتیو، فنیل آلانین آمونیولیاز و سینامیت۴-هیدرکسیلاز از مسیر پروپانوئید، لیپوکسیژناز و الن اکسیداز از مسیر جاسمونات، آمینوسیکلوپروپان ۱ کربوکسیلاز سنتاز از مسیر اتیلن و هیدروکسی متیل گلوتاریل CoA ردوکتاز از مسیر ایزوپرونوئید بودند. در مطالعه بیان ژن‌های آفتابگردان آلوده‌شده توسط *O. cumana* معلوم شد که مسیر فنیل پروپانوئید که باعث سنتز اسیدسالیسیلیک، فیتوالکسین، کومارین یا لیگنین می‌شود، القا گردیده‌است. در مطالعه‌ای توسط کستیلجو و همکاران (۳) بر روی گیاه یونجه مشخص شد که *Chi3* در پاسخ به گیاه انگل، افزایش بیان پیدا می‌کند. همچنین در مطالعه‌ای مشخص شد که کیتیناز در آرابیدوپسیس نیز در مواجهه با *O. ramosa* افزایش بیان پیدا کرده است (۱۸). مطالعه پروتئوم نخود نیز نشان داد که ژن کیتیناز (*Chi3*) در شرایط حضور گل جالیز در محیط در ارقام مقاوم افزایش بیان پیدا می‌کند (۲). آن‌ها همچنین می‌توانند به‌صورت متفاوتی تنظیم شوند و به احتمال زیاد نقش‌های متفاوتی ایفا می‌کنند. مقاومت به بیماری‌ها می‌تواند از طریق فعال‌شدن ترکیباتی که واکنش‌های دفاعی را افزایش می‌دهد القا شود (۱۵).

همچنین مطالعاتی برروی انتقال‌دهنده سوکروز انجام گرفته و القای بیان آن در مراحل اولیه آلودگی مشخص گردیده است. در مطالعه‌ای توسط ویرا دوس سانتوس و همکاران (۱۸) ترانسکریپتوم گیاه نخود مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش مشخص شد که ژن *SUC1* در مراحل اولیه آلودگی، القای بیان مثبتی یافته‌است. همچنین در مطالعه پروتئوم گیاه یونجه، بر القای بیان ژن‌های دخیل در مسیرهای گلیکولیتیک و کلیکونئوژنیک تأکید شد (۲). همچنین مطالعهٔ سال (۱) همین محقق و همکارانش برروی نخود نیز افزایش بیان *SUC1* در پاسخ به گل‌جالیز در گیاه نخود مشاهده گردید.

در مطالعه پروتئوم گیاه یونجه در مقابل آلودگی با *O. cumana* علاوه بر القای بیان ژن‌های ذکرشده در مطالعات پیشین، ژن سیستئین پروتئیناز (*CYP*) به عنوان گزینه‌ای از ژن‌های تغییر بیان یافته معرفی شد. گزارش کستیلجو و همکاران (۱ و ۳) بر روی نخود نیز بر اهمیت پروتئازها تأکید داشت.

هدف اصلی این آزمایش مطالعه بیان ژن دو گونه گوجه‌فرنگی در حضور جوانه‌های *O. aegyptica* بود. این ژن‌ها شامل ژن *Chi3* (کدکننده آنزیم کیتیناز) از ژن‌های دفاعی، ژن *CYP1* (کدکننده آنزیم سیستئین پروتئیناز) از خانواده پروتئازها و همچنین *SUT1* (کدکننده پروتئین انتقال‌دهنده سوکروز) بودند و افزایش بیان را در زمان‌های پس از آلودگی و قبل از اتصال گیاه پارازیت به میزبان نشان دادند. به همین منظور در این مطالعه تمرکز بر تغییر در بیان سه ژن کیتیناز، سیستئین پروتئاز و سوکروز ترانسفراز در دو ژنوتیپ گوجه‌فرنگی حساس و متحمل به گل جالیز مصری در مراحل اولیه آلودگی و قبل از اتصال انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و آزمون آلودگی

ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل گونه *S. pimpinelifolium acc:Loo134* به عنوان رقم متحمل بنا بر گزارش کرمانی و همکاران (۱۷) از مرکز جهانی بذر و ذخایر ژنتیکی سبزیجات از تایوان (AVRDC[1]) و *S. lycopersicum acc: eo111* به عنوان ژنوتیپ حساس از شرکت فلات ایران تهیه شد. بذر گل جالیز گونه *O. aegyptica* از مزارع آلوده مشهد جمع‌آوری گردید و بعد از شناسایی توسط هرباریوم پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد در آزمایشات به‌کار برده شد.

بذر گوجه‌فرنگی ابتدا در اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۱/۵ درصد حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه، ضدعفونی شده و با آب مقطر استریل چندبار آبشویی شدند. سپس درون پتری دیش‌های حاوی یک لایه کاغذ صافی مرطوب استریل جوانه‌دار گردیدند و سپس در مرحله ۵ برگی به ارلن‌های حاوی محیط کشت MS مایع فاقد هورمون به‌همراه ۳۰ گرم در لیتر سوکروز انتقال یافتند. گیاهان در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد برروی شیکر و با ۹۰ دور در دقیقه نگهداری شدند.

بذرهای گل جالیز مصری ابتدا در محلول کاربندازیم ایپرودیون ۵ در هزار حاوی ۰/۱ درصد توئین ۲۰ به مدت ۲۴ ساعت تیمار شده و سپس در اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد حاوی ۰/۱درصد توئین ۲۰ به مدت ۲۰ دقیقه، ضدعفونی شده و با آب مقطر استریل چند بار آبشویی شدند. مرحله پیش شایسته‌سازی[2] بذور در پتری دیش‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب استریل به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و تاریکی انجام گرفت. سپس بذور گل جالیز به کمک هورمون مصنوعی القاکننده جوانه‌زنی (GR24) که به‌طور دوستانه از دکتر باومیستر در هلند دریافت شده بود، با غلظت ۵ (پی‌پی‌ام) جوانه‌دار شدند و به ارلن‌های حاوی گیاهان با عمر ۳۰ روز (در مرحله ۵ برگی) انتقال

1- The World Vegetable Center, TAIWAN
2 -preconditioning

یافتند. ریشه‌های گیاهان پس از همکشتی در زمان‌های ۲، ۱۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از آلودگی برداشت شدند و پس از شستشو به فریزر ۸۰- منتقل گردیدند. برای هر سطح از اندازه‌گیری (ساعت پس از آلودگی) ۳ تکرار آلوده و ۳ تکرار غیرآلوده در نظر گرفته‌شد.

RNA کل به روش ترایزول با استفاده از کیت Rnx plus از شرکت سیناکلون استخراج شد و کمیت و کیفیت RNA استخراج شده به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ و همچنین ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی الگوی بیان ژن

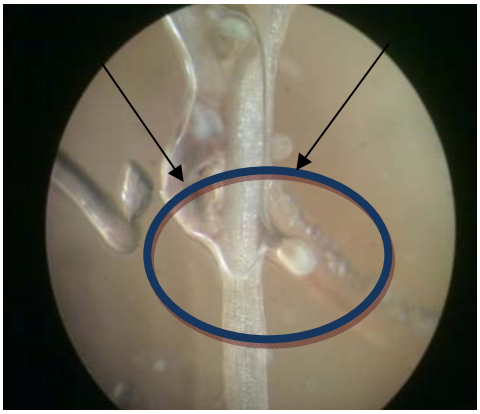
الگوی بیان ژن‌های *SUT1*، *Chi3* و *CYP1* در ریشه گوجه‌فرنگی در مرحله رویشی مورد ارزیابی قرار گرفت. ژن *Elongation factor 1α* به عنوان ژن خانه‌دار، و ژن‌های نام‌برده به عنوان ژن‌های هدف دخیل در تحمل به گل جالیز انتخاب شدند. طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی با بهره‌گیری از برنامه Primer primier vr 5 صورت گرفت (جدول۱). RNA استخراج شده جهت اطمینان کامل از حذف DNA ژنومی با آنزیم DNaseI ساخت شرکت فرمنتاس تیمار شد. پس از همسان‌سازی غلظت‌های مختلف RNA، واکنش سنتز cDNA با استفاده از کیت ساخت شرکت فرمنتاز انجام گرفت. الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه BioRad Realtime PCR بررسی شد و میزان بیان ژن (Efficiency adjusted ΔΔCt) محاسبه گردید . در این روش میزان بیان ژن‌ها براساس ژن Ef1α (ژن خانه‌دار) با بیان ثابت نرمال شده، سپس میزان تغییرات ژن در همه تیمارها نسبت به رقم Eo111 (شاهد) سنجیده شد.

آنالیزهای آماری

آنالیز واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین سطوح مختلف و نتایج بدست آمده از Realtime PCR با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح خطای ۵ درصد با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

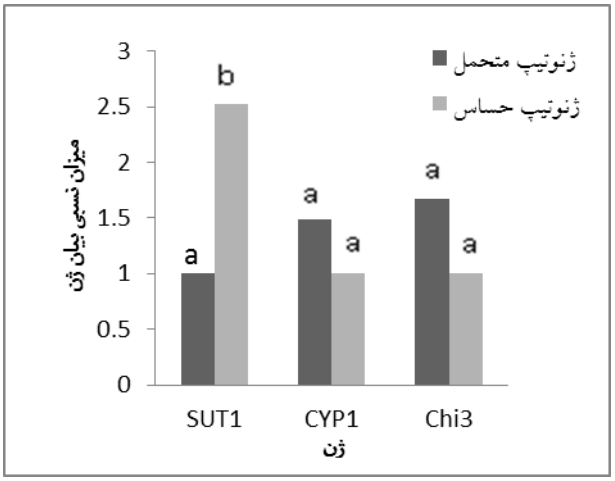
آلوده‌سازی گیاهان گوجه‌فرنگی در روز سی‌ام پس از جوانه‌زنی صورت گرفت. از آن‌جایی که ابزار دقیقی جهت بدست آوردن زمان دقیق رخنه گل‌جالیز به ریشه گیاه میزبان وجود ندارد زمان دقیقی برای این اتفاق نمی‌توان ذکر کرد اما بصورت تقریبی می‌توان بیان کرد که پس از گذشت ۱۰-۷ روز از آلوده‌سازی، رخنه صورت گرفت. شکل ۱ نمایش‌دهندهٔ اتصال بذور گل‌جالیز به ریشه میزبان است.



شکل۱- ریشه‌های آلوده شده توسط گل جالیز، محدوده مشخص شده با فلش نشان دهندهٔ ناحیه رخنه است

آنالیز مرحله ذوب ژن‌های هدف و حیاتی نشان دهنده وجود تنها یک نقطه پیک با دمای ذوب مشخص بود که در واقع تاییدی بر تک محصوله بودن آغازگرهای مورد استفاده بود. همچنین جهت اطمینان از تکثیر با کیفیت مناسب، منحنی‌های مربوط به تکثیر[1] هر۴ ژن با استفاده از سیستم ترموسایکلر Bio Rad رسم گردید.

پس از محاسبه Ct مربوط به رقت‌های مختلف cDNA نمودار استاندارد رسم گردید و پس از محاسبه شیب مشخص شد که تمامی آغازگرها دارای بازدهی قابل قبول می‌باشند (شکل۲).



شکل۲- مقایسه بیان نسبی ژن‌های *SUT1*، *Chi3* و *CYP1* در دو ژنوتیپ مورد آزمایش در شرایط کنترل (ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند $P < 0.05$).

میزان نسبی بیان ژن‌ها در شرایطی که به گیاه تنش وارد نشده بود اندازه‌گیری و دو ژنوتیپ با یکدیگر مقایسه گردیدند. در حالت بدون تنش دو ژنوتیپ فقط در ژن *SUT1* اختلاف معنی‌داری با هم نشان دادند و در دو ژن دیگر تفاوتی مشاهده نشد (شکل۳).

1- Amplification curve

همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود اثر متقابل بین زمان‌های اندازه‌گیری و ژنوتیپ در مورد ژن‌های *SUT1* و *CYP1* در سطح ۰/۰۵ تفاوت معنی‌داری نشان دادند. ولی در مورد ژن *Chi3* این تفاوت معنی‌دار نبود.

گوجه‌فرنگی در شرایط این‌ویترو رشد داده شد که این روش اجازه می‌دهد آلودگی با گل جالیز به‌صورت گام به گام انجام شود و مشکلاتی از جمله پیچیدگی و یا زخم بافت در ریشه‌ها به‌وجود نیاید. این روش کشت در شرایط استریل بوده و پاسخ‌های دفاعی صرفاً مربوط به پاسخ به گل جالیز است و احتمال آلودگی باکتریایی و قارچی وجود ندارد.

آزمایشات گذشته ثابت کرده بود که سیگنال‌هایی بین دو گیاه میزبان و مهاجم قبل از اتصال به هم منتقل شده و باعث تغییرات مختلفی در بیان ژن‌های گیاه میزبان می‌شود. در آزمایشی که توسط لجئون و همکاران (۱۲) انجام شد، آنالیز بیان ژن‌ها در کشت سوسپانسیون سلولی انجام گرفت و تأیید گردید که بیان ژن‌ها تحت تأثیر قرار گرفته است. همچنین در آزمایشی فیزیولوژیک نشان داده شده بود که سوسپانسیون سلولی آرابیدوپسیس تالیانا به حضور جوانه‌های گل‌جالیز در محیط ریشه پاسخ داده و سنتز کاماالکسین را باعث شده‌است (۶). ویرا دوس سانتوس و همکاران نیز (۱۸) از آرابیدوپسیس تالیانا بافت کالوس تولید کردند و پس از آلوده‌سازی محیط کشت با جوانه‌های گل جالیز مطالعات بیان ژن‌ها را انجام دادند و تغییرات بیان را مشاهده نمودند. از آن‌جایی که بیشترین مقاومت در گونه‌هایی از گیاهان مشاهده شد که گل جالیز قادر به اتصال به آن‌ها نبوده‌است (۱۶)، این آزمایش به‌گونه‌ای طراحی شد که بررسی‌های انجام شده برروی ژنوتیپ‌های کاندیدای متحمل و حساس در زمان قبل از اتصال انجام گیرد، تا هم مکانیسم تحمل در ژنوتیپ مدنظر شناخته‌شود و هم ژن‌های دخیل در پاسخ زود هنگام گوجه‌فرنگی به گل جالیز مشخص شود. البته در این آزمایش بجای بافت کالوس و یا سوسپانسیون سلولی از بافت تخصصی ریشه استفاده شد تا تغییرات در بیان ژن‌ها در همین بافت بررسی گردد.

بذور گل‌جالیز ابتدا به‌وسیله GR24 که نوعی القاکنندهٔ مصنوعی جوانه‌زنی است، تیمار شد. در تمامی آزمایشات بررسی بیان برهمکنش گیاهان میزبان و گل جالیز، از همین ماده جهت جوانه‌دار کردن بذر استفاده می‌شود. دلیل اصلی استفاده از بذرهای جوانه‌دار شده در این مطالعات، اطمینان از آلودگی است. همچنین هم‌کشتی در فضای تاریک انجام گرفت تا شرایط نوری به فضای زیر خاک شباهت داده شود. هرچند که هیچ مورد مقاومت کاملی از گوجه‌فرنگی در مقابل گل‌جالیز مصری (*O. aegyptica*) گزارش نشده است، اما کرمانی و همکاران (۱۷) گونه *S. pimpinelifolium acc:Loo134* را به عنوان رقمی متحمل عنوان کردند. در این گزارش از بین ۲۱ ژنوتیپ مورد آزمایش، گونه معرفی شده کمترین میزان زگیل را داشته است که درنتیجه عدم توانایی بذور برای اتصال است.

مطالعات بیان ژن‌ها

بررسی بیان کیتیناز

بررسی ژن *Chi3* نشان داد که بیان این ژن در شرایط بدون تنش در دو ژنوتیپ تفاوت معنی‌داری ندارد. اما همان‌طور که در شکل ۳، مشخص می‌شود بیان ژن کیتیناز در رقم مقاوم پس از گذشت دو ساعت از حضور جوانه‌های گل‌جالیز در مجاورت ریشه‌ها دو برابر می‌شود و پس از گذشت هشت ساعت تفاوت معنی‌داری نسبت به زمان نمونه‌گیری قبلی مشاهده می‌گردد، ولی بیان ژن تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی بدون تغییر مانده‌است، اما در زمان ۴۸ ساعت تغییرات بیان نسبت به زمان ۲۴ ساعت کاملاً معنی دار می‌شود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مورد آزمایش و *Elongation factor* جهت مطالعه بیان نسبی ژن‌ها

آغازگر	توالی آغازگر	اندازه محصول(Bp)	دمای اتصال
(gi|350534583)Chi 3-F	5' AGATACTATGGCAGAGGACC 3'		۵۰/۶
Chi 3-R	5' GTCGCAACTAAATCAGGG 3'	۱۱۳	۵۰/۷
(gi|2828251) CYP 1-F	5' CCAAATCCTCCTAAACCC 3'		۵۱/۶
CYP 1-R	5' AGAGAAGCAAGACCTACGG 3'	۱۳۲	۵۱/۷
(gi|575298) SUT 1 -F	5' GATTGGATGGCTAAGGAGG 3'		۵۴/۴
SUT1 –R	5' TGACATAAACCCTAGAACAACA 3'	۱۲۰	۵۲/۸
(gi|350537380 E f1α -F	5' GACAGGCGTTCAGGTAAGG 3'		۵۵/۳
E f1α -R	5' CCCAATGGAGGGTATTCAG 3'	۱۲۸	۵۴/۹

بررسی بیان این ژن در ژنوتیپ حساس نیز همان روند صعودی را نشان داد. البته تفاوت فاحش بین دو ژنوتیپ این است که در هشت ساعت اول، ژنوتیپ مقاوم به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد، اما در ژنوتیپ حساس پس از گذشت ۱۶ ساعت تغییرات بیان معنی‌دار می‌شود. این نتایج با نتایج آنالیز بیان بافت کالوسدر آرابیدوپسیس تالیانا مطابقت کامل دارد (۱۸). مطالعه برروی آرابیدوپسیس تالیانا با یک ژنوتیپ و به جهت شناسایی ژن‌های دخیل در فعل و انفعال بین گیاه انگل وگیاه میزبان انجام شد. در آزمایش برروی آفتابگردان که از دو ژنوتیپ مقاوم و حساس استفاده شده بود، تفاوت بیان در ژن *Chi* در دو ژنوتیپ مقاوم و حساس مشاهده شد (۱۴). طوری‌که افزایش بیان پس از دو ساعت در ژنوتیپ مقاوم چندین برابر ژنوتیپ حساس بود که از این نظر با آنالیزهای تحقیق حاضر در گیاه گوجه‌فرنگی تفاوت بود. در مطالعه‌ای دیگر که برروی یونجه انجام گرفته‌بود بررسی بیان ژن‌ها در واکنش گیاه میزبان به گل‌جالیز در سطح پروتئین در دو ژنوتیپ بررسی گردید. این دو ژنوتیپ از نظر پاسخ دفاعی زودهنگام و دیرهنگام باهم تفاوت داشتند (۲). در این مطالعه مشخص شد که در هر دو ژنوتیپ در اثر آلودگی با گل جالیز کیتینازها تغییر بیان پیدا کرده‌اند. اما در ژنوتیپی که به عنوان مقاومت دیرهنگام به گل جالیز انتخاب شده بود، پس از آلودگی میزان این پروتئین (آنزیم کیتیناز) کاهش یافت، ولی در ریشه‌های سالم ژنوتیپ دارای مقاومت زودهنگام افزایش نشان داد. مهم‌ترین وظیفه‌ای که برای آنزیم کیتیناز ذکرشده تجزیه بافت کیتین (که در دیواره‌سلولی قارچ‌ها و حشرات وجود دارد) است، ولی در گل جالیز مانند سایر بازدانگان[1] کیتین وجود ندارد. لذا باید وظیفه ناشناخته‌ی دیگری برای این آنزیم وجود داشته باشد. همان‌طور که در بخش مقدمه ذکر شد کیتیناز علاوه بر نقش تجزیه‌کنندگی می‌تواند در پاسخ به تنش‌های مختلف و همچنین تنش‌های فیزیولوژیک نقش ایفا کند و یا با بیان خود باعث تغییر در بیان سایر ژن‌های دفاعی و یا مؤثر در پاسخ دفاعی تأثیر گذارد. با بررسی مطالعات گذشته و همچنین مطالعه حاضر می‌توان نتیجه گرفت که کیتیناز یکی از بازیگران اصلی در پاسخ دفاعی به گل جالیز است و افزایش بیان زود هنگام این آنزیم در القای مقاومت ژنوتیپ‌های مقاوم مؤثر می‌باشد. البته کماکان نقش اصلی این آنزیم و مکانیسم عمل آن ناشناخته می‌ماند.

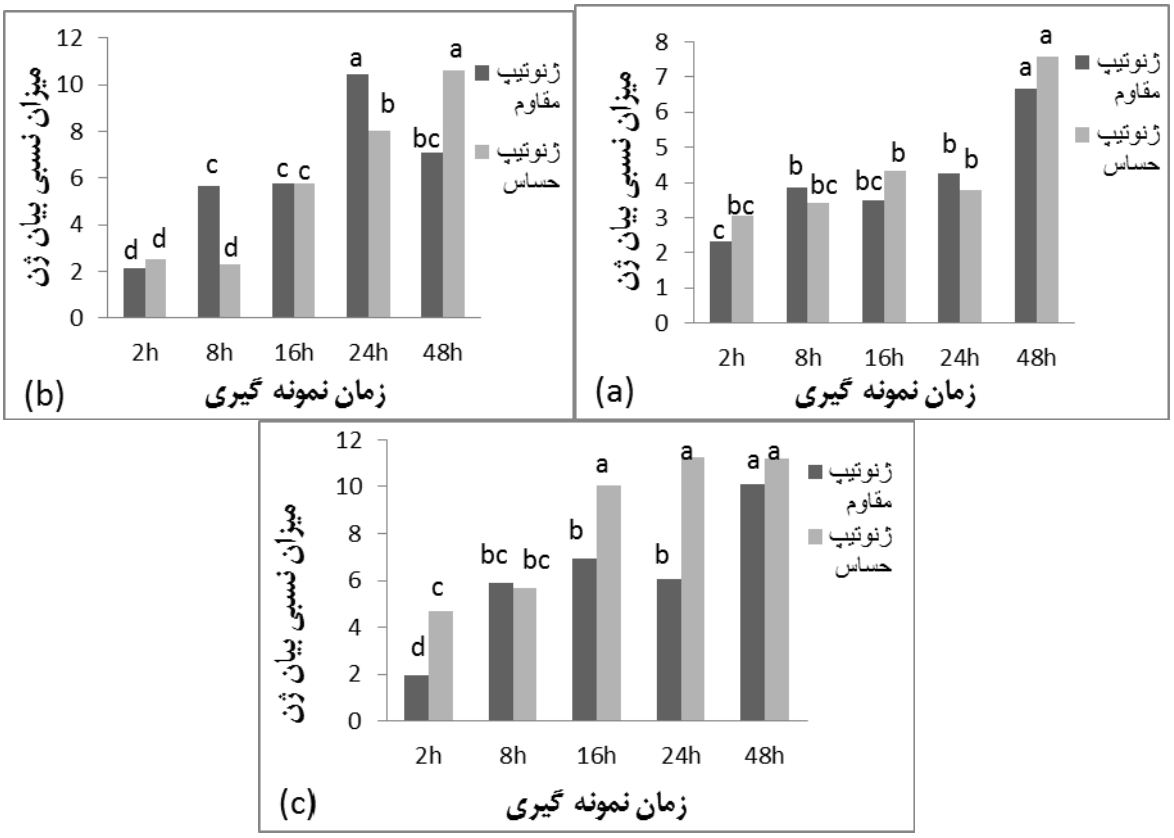
سیستئین پروتئیناز

ارزیابی بیان ژن *CYP1* در شرایط بدون تنش نشان داد که در هر دو ژنوتیپ این دو ژن تفاوتی با یکدیگر ندارند. اما با بررسی مشخص می‌شود که در ساعات اولیه بعد از تنش افزایش قابل ملاحظه‌ای در بیان اتفاق افتاده‌است. مشاهده می‌شود بعد از روند صعودی بیان در ۲۴ ساعت اول پس از آلودگی در ۲۴ ساعت دوم تغییرات بیان *CYP1* دچار روند کاهشی شده است. این مطلب نشان می‌دهد که پروتئینازها می‌توانند یکی از سریع‌ترین پاسخ‌ها به سیگنال‌های منتقل‌شده از سوی گیاه مهاجم باشد که بررسی‌های گذشته نیز گواه همین مطلب است. بررسی بیان در ژنوتیپ حساس روند صعودی را نشان می‌دهد و مقایسه آن با ژنوتیپ متحمل نشان می‌دهد که سرعت افزایش بیان در ساعات اولیه در ژنوتیپ متحمل بیشتر از ژنوتیپ حساس می‌باشد. این موضوع اصلی‌ترین تفاوت بین دو ژنوتیپ است. در مطالعه ای که (۲) جهت بررسی بیان یونجه آلوده شده به گل جالیز در سطح پروتئین انجام شد مشخص شد که پروتئینازها و بازدارنده‌های پروتئینازها در ارقام با مقاومت زودهنگام افزایش بیان پیدا می‌کند. همچنین در سال‌های (۱ و ۳) آنالیز پروتئوم گیاه نخود فرنگی در مواجهه با گل‌جالیز اختصاصاً مشخص کرد که سیستئین پروتئیناز در زمان آلودگی در ارقام مقاوم افزایش داشته‌است. در مطالعه حاضر نیز مشخص شد که در ساعات اولیه آلودگی (حضور گل‌جالیز در محیط) در گوجه‌فرنگی نیز این خانواده از پروتئینازها القای بیان یافته‌اند.

سیستئین‌پروتئینازها در بسیاری از جنبه‌های فیزیولوژیک، رشد و توسعه نقش دارند. همچنین آن‌ها در مرگ برنامه‌ریزی شدهٔ سلول‌ها، ذخیره و آزادسازی پروتئین‌های مخصوص جوانه‌زنی، پیری و مقاومت انواع استرس‌های محیطی نقش دارند. شاید مهم‌ترین نقش دفاعی احتمالی سیستئین‌پروتئینازها مشارکت آن‌ها در مسیر پروتئولیتیکی است که بربسیاری از فرایندهای متابولیکی، مثل انتقال پیام هورمونی، مورفوژنز، چرخه سلولی، جنین‌زایی، توسعه گل و نقش اکسیداتیو تأثیر می‌گذارد (۳). همانطور که گفته‌شد سیگنال‌هایی از گیاه مهاجم (گل جالیز) به گیاه میزبان منتقل می‌شود، حضور پروتئینازها می‌تواند انجام فعالیت این سیگنال‌ها را محدود کرده و حتی در صورتی که ماهیت آن‌ها پروتئینی باشد، این آنزیم باعث تجزیه آنان شده و القای مقاومت یا تحمل را سبب می‌شود. از آنجایی که در اکثر بررسی‌های فیزیولوژیک جهت اندازه‌گیری میزان مقاومت در گیاهان به گیاه انگل، مقاومت به صورت عدم توانایی اتصال دو گیاه به هم گزارش شده است (۲)، فرضیه دخالت مستقیم پروتئینازها در مقاومت قوت می‌گیرد. همچنین ذکر شد که نفوذ پارازیت به ریشه گیاه میزبان با کمک آنزیم پکتین متیل استراز صورت می‌گیرد (۱۰). حضور پررنگ پروتئینازها در ریشه‌های آلوده می‌تواند مانع عمل این آنزیم شده و عدم فعالیت این آنزیم نیز میزان اتصال و آلودگی را کاهش خواهد داد.

با توجه به همه موارد ذکر شده می‌توان نتیجه گرفت که پروتئینازها نقش بسیار مهمی در القای مقاومت به گل‌جالیز ایفا کرده و احتمالاً فعالیت آن‌ها از مراحل اولیه آغاز شده و تا مراحل پیشرفته ادامه دارد.

1- Angiosperm



شکل ۳- میزان بیان نسبی ژن‌های *Chi3*، *CYP1* و *SUT1* در زمان‌های مختلف بعد از تنش گل جالیز در دو ژنوتیپ متحمل و حساس ستون‌های دارای حرف یا حروف مشترک از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری ندارند ($P < 0.05$) . a: ژن *Chi3*، b: ژن *CYP1*، c: ژن *SUT1*.

انتقال دهنده‌های سوکروز

در بررسی‌های انجام‌شده در این پروژه روی ژن *SUT1* (کدکننده انتقال‌دهنده سوکروز)، مشخص شد که بیان این ژن پس از آلودگی گیاه به صورت صعودی افزایش می‌یابد. برخلاف دو ژن قبلی (*Chi3* و *CYP1*)، ژن *SUT1* در ژنوتیپ حساس، افزایش بیان سریع‌تری (خصوصاً در ساعات اولیه آلودگی) نسبت به ژنوتیپ مقاوم نشان داده‌است. البته باید متذکر شد که این ژن در شرایط بدون تنش نیز در ژنوتیپ حساس بیان بیشتری داشت. بیان ژن در دو ساعت اول بعد از آلودگی تقریباً دو برابر ژنوتیپ متحمل است و در ساعات بعدی به صورت صعودی افزایش می‌یابد و در روز دوم پس از آلودگی، تقریباً بی‌تغییر می‌ماند. ژنوتیپ کاندیدای متحمل طی ۲۴ ساعت اول آلودگی تقریباً بیان ثابتی دارد، اما در روز دوم ناگهان افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا می‌کند (شکل ۳).

در آزمایشی که برروی گیاه آرابیدوپسیس تالیانا در سال ۲۰۰۳ انجام گرفته بود نیز القای بیان همین ژن در مراحل اولیه آلودگی (ساعات اول) به اثبات رسید. در این مطالعه افزایش بیان ژن انتقال‌دهنده از همان ساعات اولیه پس از آلودگی مشاهده شد و این افزایش بیان تا ۲۴ ساعت پس از آلودگی ادامه داشت، اما پس از آن تا ۷ روز روند بیان کاهشی بود. البته در این آزمایش فقط یک ژنوتیپ (حساس) مورد استفاده قرار گرفته بود و هدف شناخت ژن‌های دخیل در واکنش به گل‌جالیز است (۱۸). مطالعات آنالیز پروتئوم در یونجه نیز افزایش بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم گیاه را گزارش داده‌اند. البته در این گزارش صرفاً به انتقال‌دهنده‌های سوکروز اشاره نشده است ولی اظهار داشته که آنزیم فروکتوز بی‌فسفات آلدولاز که یکی از آنزیم‌های مهم در واکنش‌های گلیکولیتیک/ گلیکونئوژنیک بوده، در ژنوتیپ حساس بیان بیشتری نسبت به ژنوتیپ مقاوم داشته است (۲). این آنزیم همچنین در مطالعه‌ای دیگری در واکنش نخود به گل‌جالیز شناسایی شد (۱). مطالعات جدیدتر برروی نخود نیز افزایش بیان پروتئین‌های متابولیک بیشتری را محرز کرده است. برای مثال مطالعه‌ای برروی اثر متقابل گل‌جالیز و نخودفرنگی افزایش بیان پروتئین‌هایی از جمله انولاز[1]، ادنوزیل هموسیستئیناز[2] و لاکتوگلوتاتیون لیاز[3] به اثبات رسید. قابل توجه است که باز هم در این آزمایش افزایش بیان در ژنوتیپ حساس بیشتر از ژنوتیپ مقاوم و در مراحل

1 - Enolase
2 - Adenosylhomocysteine
3 - Lactoylglutathione lyase

اولیه آلودگی بوده‌است (۱).

ژنی که در این آزمایش به عنوان ژن نماینده از بین ژن‌های متابولیک انتخاب شد ژن کدکننده یک انتقال‌دهنده‌ی سوکروز در گیاه گوجه‌فرنگی است. از آن‌جایی که بافت ریشه قادر به فتوسنتز و تولید قند نیست، باید قند مورد نیاز خود را از اندام هوایی و مخصوصاً برگ‌ها تأمین کند. انتقال قندها از اندام هوایی به ریشه به شکل دی‌ساکارید سوکروز انجام می‌گیرد. بعد از انتقال، سوکروز تجزیه شده و مورد استفاده ریشه قرار می‌گیرد (۱۳). به‌همین دلیل انتقال دهنده سوکروز به عنوان نماینده‌ای از بین ژن‌های متابولیک انتخاب شد.

همان‌طور که از این مطالعه و سایر مطالعات مشابه برداشت می‌شود، ژن‌های متابولیکی در ساعات اولیه آلودگی افزایش بیان پیدا می‌کنند. در مقدمه بیان شد که انتقال‌دهنده‌های سوکروز علاوه بر نقش انتقال دهندگی و فراهم‌سازی انرژی جهت فعالیت‌های سلولی و دفاعی، به عنوان مولکول علامت دهنده نیز عمل می‌کند. و متابولیسم منبع و مخزن را تنظیم می‌کند (۱۷). بنابراین افزایش بیان این پروتئین را می‌توان به افزایش نیاز انرژی جهت انجام مکانیسم‌های دفاعی ربط داد. ذکر شده که عکس‌العمل‌های دفاعی نیز پیوستگی زیادی به تنظیم متابولیسم سوکروز در مخزن به منظور تأمین انرژی مورد نیاز و فعال‌سازی آبشار فعالیت‌های دفاعی دارد. بنابراین سوکروز و زنجیره انتقال پیام مربوط به تنش با هم مرتبط‌اند. افزایش بیان سریع در ژنوتیپ حساس را نیز می‌توان به افزایش بیشتر نیاز به انرژی در متابولیسم سلولی در پی فعالیت سیگنال‌های انتقالی از گیاه پارازیت و یا فعالیت پروتئولیتیکی برخی از آنزیم‌های مترشحه از گیاه مهاجم نسبت داد.

منابع

1- Castillejo M., Amiour N., Dumas-Gaudot E., Rubiales D., and Jorrin J. 2004. A proteome approach to studying plant response to crenate broomrape (*Orobanche crenata*) in pea (*Pisum sativum*). Phytochemistry, 65: 1817-1828.

2- Castillejo M.A., Maldonado A., Dumas-Gaudot E., Fernandez-Aparicio M., Susin R., Diego R., and Jorrin J. 2009. Differential expression proteomics to investigate responses and resistance to *Orobanche crenata* in *Medicago truncatula*. BMC Genomics, 10: 294.

3- Castillejo M.Á., Fernández-Aparicio M., and Rubiales D. 2012. Proteomic analysis by two-dimensional differential in gel electrophoresis (2D DIGE) of the early response of *Pisum sativum* to *Orobanche crenata*. Journal of Experimental Botany, 63: 107-119.

4- Die J.V., González Verdejo C.I., Dita M.Á., Nadal S., and Román B. 2009. Gene expression analysis of molecular mechanisms of defense induced in *Medicago truncatula* parasitized by *Orobanche crenata*. Plant Physiology and Biochemistry, 47: 635-641.

5- Echevarria-Zomeno S., Perez-de-Luque A., Jorrin J., and Maldonado A. 2006. Pre-haustorial resistance to broomrape (*Orobanche cumana*) in sunflower (*Helianthus annuus*): cytochemical studies, Journal of Experimental Botany, 57: 4189 - 4200.

6- El-Maarouf-Bouteau H., Moreau E., Errakhi R., and Sallé G. 2008. A diffusible signal from germinating *Orobanche ramosa* elicits early defense responses in suspension-cultured *Arabidopsis thaliana*. Plant Signaling & Behavior, 3: 189-193.

7- Garcia-Torres L., Castejon-Munoz M., Lopez-Granados F., and Jurado-Exposito M. 1995. Imazapyr applied postemergence in sunflower (*Helianthus annuus*) for broomrape (*Orobanche cernua*) control. Weed technology : a Journal of the Weed Science Society of America, 9**:** 819-824.

8- Gharbi I., Ricard B., Smiti S., Bizid E., and Brouquisse R. 2009. Increased hexose transport in the roots of tomato plants submitted to prolonged hypoxia. Planta, 230: 441-448.

9- González-Andújar J.L., Martínez-Cob A., López-Granados F., and García-Torres L. 2001. Spatial distribution and mapping of crenate broomrape infestations in continuous broad bean cropping. Weed Science, 49: 773-779.

10- Hanounik S., and Bisiri M. 1991. Status of disease of faba bean in the mediterraneun region and their control

11- Kermani M., Asgari H., Marashi H., Mirshamsi A. 2012. Evaluation of tomato genotype (*Lycopersicon esculentum*) and (*solanum spp.*) for egyption brooprape (*Orobanche agyptica*) resistance. Journal of Plant Protection, 28: 539-546.

12- Lejeune A., Constant S., Delavault P., Simier P., Thalouarn P., and Thoiron S. 2006. Involvement of a putative *Lycopersicon esculentum* wall-associated kinase in the early steps of tomato–*Orobanche ramosa* interaction. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69: 3-12.

13- Lemoine R. 2000. Sucrose transporters in plants: update on function and structure. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. 1465: 246-262.

14- Letousey P., De Zélicourt A., Vieira Dos Santos C., Thoiron S., Monteau F., Simier P., Thalouarn P., and Delavault P. 2007. Molecular analysis of resistance mechanisms to Orobanche cumana in sunflower. Plant Pathology, 56: 536-546.

15- Pozo M.J., Azcón-Aguilar C., Dumas-Gaudot E., and Barea J.M. 1998. Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or Phytophthora parasitica. Journal of Experimental Botany, 49: 1729-1739.
16- Rispail N., Dita M., Gonzalez-Verdejo C., Perez-de-Luque A., Castillejo M., Prats E., Roman B., Jorrin J., and Rubiales D. 2007. Plant resistance to parasitic plants: molecular approaches to an old foe. New Phytol. 173: 703 - 712.
17- Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. Current Opinion in Plant Biology, 2: 198-206.
18- Vieira dos Santos C., Delavault P., Letousey P., and Thalouarn P. 2003. Identification by suppressive subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defence genes during *Orobanche ramosa* infection. Physiological and Molecular Plant Pathology, 62: 297 - 303.