بررسی وجود ژن SIX_1 و SIX_7 درفوزاریوم سولانی و تأثیرآن در بیماری‌زایی

بهاره پیران ویسه[۱]*، غلامرضا بلالی دهکردی[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد رشته سیستماتیک اکولوژی دانشگاه اصفهان *b.piran88@yahoo.com*

۲- دکتری قارچ شناسی، دانشیار دانشگاه اصفهان *Gr balali@gmail.com*

چکیده :

فوزاریوم سولانی (*Fusarium solani*) یک قارچ خاکزی و در بقایای گیاهی وجود دارد و باعث زردی برگ‌ها ، پوسیدگی ریشه و ساقه و پژمردگی قسمت‌های هوایی گیاه می‌شود. نخستین بار با تحقیقاتی که بر روی شیره پروتئوم آوند چوبی انجام گردید، متوجه حضور پروتئین‌های کوچکی در آن شدند، این پروتئین‌ها محصول ژن‌هایی به نام SIX (secreted in xylem) بودند. ژن‌های SIX بسیار متنوع بوده و توسط فوزاریوم در هر گیاه، بسته به نوع آن، شکل و نوع خاصی از این ژن‌ها بیان می‌گردد. که برای بررسی و انجام این پژوهش از *F.solani* استفاده شد. در این مطالعه ایزوله‌های جمع آوری شده، از مناطق جغرافیایی استان اصفهان برای حضور ژن SIX1 و SIX7 مورد بررسی قرار گرفتند. از PCR و توالی یابی استفاده شد، که امکان بررسی این ژن‌ها به عنوان مارکری برای بیماری زایی *F.solani* استفاده گردید.

واژگان کلیدی: *Fusarium solani* ، ژن SIX، Secreted in xylem ، بیماری زایی

مقدمه

فوزاریوم سولانی دامنه متنوعی از بیماری زایی را در گیاه و موجودات ایجاد می کند. به طور کلی نژادهای بیماری زایی *F.solani* موجب بیماری زایی بیش از ۱۰۰ جنس از گیاهان می شود(Coleman et al. 2009).

F.solani عامل پوسیدگی ریشه در سیب زمینی است، که در میان بیماری های سیب زمینی بیشترین خسارت را وارد می کند و باعث ترشح متابولیت های ثانویه از جمله میکوتوکسین ها در گیاه میزبان می گرد .

که این میکوتوکسین ها باعث بیماری در انسان و حیوانات نیز می شوند(Edel-Hermann et al. 2012) . گونه *F.solani* محدوده وسیعی از میزبان و سطوح مختلف بیماری زایی و ریخت شناسی را دارا می باشد (Chehri et al. 2011).

همچنین از طریق ژنوم شناسی ، کروموزوم های مرتبط با بیماری زایی در فوزاریوم سولانی شناسایی شده اند ، که حاوی ژن هایی برای بیماری زایی در میزبان خاص می باشند (Rep, Kistler 2010). در این میان چندین ناحیه از ژن های افکتور در دسترس است ، که به عنوان ژن های SIX(secreted in xylem) شناخته شده اند. همه ژن‌های SIX در کروموزوم ۱۴ بیان می‌شوند ، البته استثناهایی نیز در میان آنها وجود دارد (Ma et al. 2010) . برخی از این ژن ها قدرت بیماری زایی بالایی دارند. محصولات پروتئینی ژن‌های SIX ابتدا در پروتئوم شیره آوند چوبی گیاهان گوجه آلوده به *Fusarium oxysporum* شناسایی شدند. این ژن ها احتمالا به وسیله انتقال افقی کروموزوم بیماری زایی منتقل شده اند. ولی عملکرد آنها مستقل از ژنوم هسته نیست و بیان آنها نیاز به فاکتور رونویسی Sge1 (SIX gene expression 1) دارد، که بر روی کروموزوم هسته کد گذاری می شود(Schmidt et al. 2013). با این حال، هنوز نحوه بیان این ژن ها مشخص نیست. تاکنون ۱۴ ژن SIX در جنس فوزاریوم شناسایی شده ، که عملکرد بیولوژیکی بسیاری از آنها ناشناخته باقی مانده است (Fraser-Smith et al. 2014) . البته در بعضی

گیاهان ژن های ایمنی میزبان در مقابل ژن‌های SIX به خصوص ، انواع بیماری زای آن مقاوت‌هایی را ایجاد می‌کند (Houterman et al. 2008) .

SIX1 یک افکتور پروتئینی است ، که به داخل شیره آوند چوبی ترشح می شود و از جمله ژن هایی است ، که قدرت بیماری زایی بالایی دارد و تشخیص این ژن در میزبان نشان دهنده حضور و عملکرد بیماری زایی در آن می باشد. رابطه قوی بین ژن های SIX و بیماری زایی میزبان ، آنها را نشانگر بی نظیری برای بیماری زایی در میزبان و گونه کشاورزی خاص تبدیل کرده است. که این فرضیه با ارزیابی وجود ژن های SIX مختلف در یک مجموعه گسترده جهانی از ایزوله های قارچی مورد بررسی قرار گرفته است (Lievens et al. 2009). هر ژن SIX ، در هر گیاه خاص به طور منحصر به فردی بیان می گردد، به گونه ای که بیان یک ژن SIX خاص در دو گیاه مختلف ، متفاوت است (Fraser-Smith et al. 2014).

SIX7 این گونه به نظر می رسد که ژن نقش کلی تری را در بیماری زایی ایفا می کند (Lievens et al. 2009) و نقش اصلی در بیماری زایی توسط ژن SIX1 است. SIX7 براساس اطلاعات اسپکتوفتومتری نامگذاری شده است (Ma et al. 2010).

در این بررسی مجموعه وسیعی از ایزوله های *F.solani* با منشاهای جغرافیایی مختلف از استان اصفهان ، از لحاظ وجود ژن های SIX1 و SIX7 مورد آزمایش قرار گرفت. با استفاده از PCR ، وجود ژن های SIX1 و SIX7 شناسایی و به عنوان مارکری برای بررسی بیماری زایی گونه *F.solani* استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های فوزاریوم

تعداد ۲۰۰ نمونه از مناطق مختلف جمع آوری شد. که ۲۳ ایزوله به عنوان نماینده این مناطق برای بررسی انجام مطالعات و آنالیز انتخاب گردید. از ریسه های کشت داده شده ، ایزوله هایی به دست آمده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد فریز شدند. که تمامی آنها از مناطق کشاورزی استان اصفهان جمع آوری شدند.

ایزوله های DNA

ایزوله ها در محیط کشت PDA به مدت ۳-۷ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. که بافت هر ایزوله به وسیله اسکالپل استریل بر روی محیط کشت قرار داده شد. سپس ۵۰ میلی گرم از هر نمونه در میکروتیوپ ها قرار گرفته و در درون فریزر با دمای ۲۰- نگهداری شدند. تا زمانی که DNA آنها به روش کیت استخراج گردد.

آنالیز PCR

پرایمر های انتخاب شده، جهت انجام PCR ، پایه در ژن SIX1 و SIX7 دارد، به همین دلیل از پرایمر SIX1 و SIX7 برای انجام PCR استفاده گردید. که این پرایمرها به راحتی توالی های رفت و برگشت SIX1 وSIX7 را تکثیر می کنند. که در هر ایزوله از SIX1-F و SIX1-R و به طور مجزا از SIX7-F و SIX7-R استفاده ، به علاوه از فاکتور طویل سازی ۱ آلفا (EF1-) نیز برای کنترل پرایمرها استفاده شد. حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر که شامل ۱۲,۵ میکرولیتر Taq Green ، ۴ میکرولیتر پرایمر رفت ، ۴ میکرولیتر پرایمر برگشت ، ۳ میکرولیتر DNA و ۲ میکرولیتر آب مقطر بود. برنامه PCR به صورت ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳ دقیقه ، ۹۵ درجه به مدت ۳۰ ثانیه ، ۶۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه ، ۷۲ درجه به مدت ۱۰ ثانیه در ۳۵ سیکل انجام گردید.

نتیجه گیری

به دلیل اهمیت بیماری زایی قارچ فوزاریوم سولانی بر روی گیاهان ، به خصوص گیاه سیب زمینی رفتارهای بیماری زایی این قارچ بسیار حائز اهمیت می باشد (Ondrej et al. 2008) .

این قارچ به وسیله تخریب ریشه و در نتیجه آن تخریب قسمت های هوایی باعث از بین رفتن بوته های سیب زمینی شده و به دنبال آن تولید این محصول ارزشمند را تحت تاثیر قرار می دهد.

پس از انجام PCR و تکثیر توالی‌های SIX1 و SIX7، انجام تکثیر قطعات ، با استفاده از پرایمرهای SIX1 و SIX7 باند هایی به اندازه ۱۰۰ جفت باز نمایان گردید. همه نمونه های مورد بررسی توسط هر دو پرایمر باند تشکیل دادند و تمامی باندهای مشاهده شده از نمونه های مختلف جغرافیایی استان اصفهان در یک راستا و یک خط بوده و همگی یک اندازه را نشان می دادند. پس می‌توان گفت در تمامی گونه‌های فوزاریوم سولانی این ژن ها وجود دارند. SIX1 یک افکتور پروتئینی است، که به داخل شیره آوند چوبی ترشح می‌شود. این ژن دارای قدرت بیماری زایی بالایی بوده و به محض ورود به کورتکس ریشه شروع به بیان می‌کند(Lievens et al. 2009) .

به دلیل حضور SIX1 ، که عامل اصلی بیماری زایی فوزاریوم سولانی است ، این آزمایش نشان داد که در تمامی نمونه های مورد بررسی این ژن شروع به بیان کرده و باعث گسترش بیماری‌زایی خود در گیاه و در نتیجه بیمار کردن گیاه شده است.

در این پژوهش حضور SIX7 نیز اثبات گردید، که این ژن بر روی ژل آگارز مشخصاتی مانند SIX1 دارد ولی قدرت بیماری زایی این ژن بسیار کم می باشد.

برای مقابله با فوزاریوم سولانی در مزارع و گسترش آلودگی آن ، پیشنهاد می شود از کشت بذرهای آلوده به این قارچ در زمین کشاورزی و همچنین از انتقال نشاء این محصول از طریق واسطه ها جلوگیری شود و کشاورزان نشاء محصول خود را از مراکز مطمئن تهیه کنند. اگر کشاورزی متوجه آلوده شدن محصول خود گردید از کشت دوباره سیب زمینی و گیاهانی که مورد هجوم این قارچ قرار می گیرند ،خودداری کنند.

برای ادامه روند تحقیقات توسط محققان دیگر توصیه می گردد که ، ژن های مقاوم در برابر ژن های SIX1 را که توسط میزبان ایجاد می شوند، شناسایی و این ژن ها توالی یابی شده و امکان انتقال آنها به گیاهانی دیگر که این ژن ها را بیان نمی کنند ، برای مقابله با بیماری مورد بررسی قرار دهند.

منابع

1. Chehri K, Salleh B, Yli-Mattila T, et al. (2011) Molecular characterization of pathogenic Fusarium species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. Saudi Journal of Biological Sciences 18:341-351
2. Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, et al. (2009) The Genome of <italic>Nectria haematococca</italic>: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. PLoS Genet 5:e1000618
3. Edel-Hermann V, Gautheron N, Steinberg C (2012) Genetic diversity of Fusarium oxysporum and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. Plant Pathology 61:787-800
4. Fraser-Smith S, Czislowski E, Meldrum RA, et al. (2014) Sequence variation in the putative effector gene SIX8 facilitates molecular differentiation of Fusarium oxysporum f. sp. cubense. Plant Pathology 63:1044-1052
5. Houterman PM, Cornelissen BJC, Rep M (2008) Suppression of Plant Resistance Gene-Based Immunity by a Fungal Effector. PLoS Pathog 4:e1000061
6. Lievens B, Houterman PM, Rep M (2009) Effector gene screening allows unambiguous identification of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici races and discrimination from other formae speciales. FEMS microbiology letters 300:201-215
7. Ma L-J, van der Does HC, Borkovich KA, et al. (2010) Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. Nature 464:367-373
8. Ondrej M, Dostalova R, Trojan R (2008) Evaluation of virulence of Fusarium solani isolates on pea. Plant Protection Science-UZPI (Czech Republic(
9. Rep M, Kistler HC (2010) The genomic organization of plant pathogenicity in Fusarium species. Current Opinion in Plant Biology 13:420-426
10. Schmidt SM, Houterman PM, Schreiver I, et al. (2013) MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in Fusarium oxysporum. BMC genomics 14:119