

SID



ابزارهای
پژوهش



سرویس ترجمه
تخصصی



کارگاه های
آموزشی



بلاگ
مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری
STES



فیلم های
آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش مهارت های کاربردی
در تدوین و چاپ مقالات ISI



روش تحقیق کمی

روش تحقیق کمی



آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران

آموزش نرم افزار Word
برای پژوهشگران

بیان ژنهای کیتیناز (*nag1* و *ech42*) در قارچ *Trichoderma atroviride*

در برهمکنش با باکتری *Pseudomonas fluorescens*

The expression of chitinase genes (*nag1* and *ech42*) of *Trichoderma atroviride* in interaction with *Pseudomonas fluorescens*

اکبر شیرزاد*، عباس شریفی تهرانی، مسعود احمدزاده، کیوان بهبودی و محمد جواننیکخواه
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تربیت
معلم آذربایجان

پذیرش ۱۳۸۸/۲/۲۳

دریافت ۱۳۸۷/۱۲/۳

چکیده

بکارگیری مخلوطی از چند عامل بیوکنترل، به عنوان راهکاری برای افزایش میزان کارایی کنترل، ممکن است اثرات مثبت یا منفی در بیان ژنهای بیوکنترلی این عوامل داشته باشد. در این تحقیق، اثر چندین جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در بیان ژنهای *nag1* و *ech42* قارچ *Trichoderma atroviride* استرین P1 با استفاده از سیستم بیان ژن گزارشگر گلوکز اکسیداز، نشان داد که برهمکنش بین *T. atroviride* و *P. fluorescens* باعث کاهش بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* می‌گردد. کاهش بیان ژن در حضور جدایه‌های باکتریایی اعم از DAPG⁺ (2,4-diacetylphloroglucinol) یا DAPG⁻ مشاهده شد. این نشان می‌دهد که DAPG⁺ نقشی در این کاهش بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* ندارد. برعکس، بیان ژن *nag1* در تعامل با جدایه‌های DAPG⁺ افزایش نشان داد، ولی در حضور جدایه‌های DAPG⁻ تغییر معنی‌داری در بیان این ژن مشاهده نشد. میزان رشد میسلومی *T. atroviride* در تعامل با باکتری‌ها کاهش پیدا کرد. کاهش رشد در حضور جدایه‌های DAPG⁺ در مقایسه با جدایه‌های DAPG⁻، بیشتر بود که نشان دهنده نقش احتمالی آنتی‌بیوتیک DAPG در کاهش رشد قارچ می‌باشد. بطور خلاصه،

* مسئول مکاتبه

این نتایج نشان داد که برهمکنش اختصاصی بین آنتاگونیستهای مورد مطالعه، می تواند در بیان ژنهای مهم بیوکنترلی آنها تاثیرگذار باشد.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، کیتیناز، ژنهای *ech42* و *Trichoderma atroviride nag1* و *Pseudomonas fluorescens*

مقدمه

استفاده از عوامل بیولوژیکی از جمله گونه‌های مختلف تریکودرما و سودومونادهای فلورسنت، یکی از مهمترین پتانسیل‌های جایگزین در مدیریت بیماریهای گیاهی میباشد. متأسفانه کارایی متغیر عوامل بیوکنترل در مناطق و فصول مختلف، موجب کندی این عوامل در مدیریت بیماریهای گیاهی شده است (Duffy et al. 1996, Lorito et al. 1996). یکی از راههای فایده‌آمیز بر این مشکل، بکارگیری همزمان چند عامل بیوکنترل می‌باشد (Genowati 2001). بکارگیری مخلوطی از چند عامل بیوکنترل باعث نزدیکتر شدن جمعیت خاک به شرایط طبیعی شده و به عنوان یک استراتژی مناسب‌تر و با ثبات تر و یک راهکار برای افزایش میزان کارایی تیمارهای بیوکنترل در دامنه محیطی وسیع‌تر پیشنهاد شده است (Pierson & Weller 1994, Duffy & Weller 1995, Duffy et al. 1996, Raupach & Klopper 1998). (Genowati 2001, Rini & Sulochana 2006) البته این موضوع همیشه صادق نیست و گزارشهایی نیز نشانگر این است که کاربرد ترکیب برخی از عوامل بیوکنترل، تأثیری در کاهش بیماری نداشته و یا حتی توان کنترل کنندگی کمتری نسبت به کاربرد جدایه منفرد داشته‌اند (Dandurand & Knudsen 1993, Duffy et al. 1996, de Boer et al. 1999; Ryder et al. 1999). (Genowati 2001; Molina et al. 2003) بنابراین، مطالعه دقیق اینکه در هر سیستم، آیا عوامل بیوکنترل مورد نظر بصورت انفرادی بهتر عمل میکنند و یا در حالت تلفیق با همدیگر، ضروری می‌باشد. یک پیش‌نیاز اساسی و مهم در ترکیب عوامل بیوکنترل، انتخاب جدایه‌هایی میباشد که بجای مداخله، توان آنتاگونیستی همدیگر را تکمیل کنند (Lutz et al. 2004). از جمله عوامل بیوکنترلی که در سطح وسیع مطالعه شده و کاربرد تجارتي هم پیدا کرده‌اند، سودومونادهای فلورسنت و گونه‌های مختلف تریکودرما میباشد که کاربرد این عوامل بصورت تلفیقی نیز مطالعه شده و هر دو حالت کاهش (Duffy et al. 1996, Rini & Sulochana 2006) و افزایش میزان بیماری (Dandurand & Knudsen 1993, Duffy et al. 1996) گزارش شده است.

علی‌رغم مطالعات متعدد در ارتباط با کاربرد دو یا چند عامل بیوکنترل در مدیریت بیماری، گزارشها در سطح مولکولی بسیار محدود می‌باشند. وقتی عوامل بیوکنترل بصورت مخلوط بکار برده شوند، ممکن است در بیان ژنهای بیوکنترلی یکدیگر اثر مثبت یا منفی داشته باشند. گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* آنزیمهای تجزیه‌کننده کیتین (کیتیناز) ترشح می‌کنند که میتوانند دیواره سلولی آسکومیست‌ها و بازیدیومیست‌ها را تجزیه کنند (Mach et al. 1999). آنزیمهای کیتیناز تولیدشده توسط گونه‌های *Trichoderma*، مورد توجه زیادی قرار گرفته اند، زیرا کیتین یکی از ترکیبات اصلی ساختار دیواره سلولی بسیاری از قارچها می‌باشد (Viswanathan et al. 2006) و به همین دلیل، کیتینازها در کنترل تعداد زیادی از عوامل بیماریزای گیاهی نقش مهمی دارند (Collinge et al. 1993, Lorito et al. 1998, Gokul et al.).

2000 گونه *Trichoderma atroviride* استرین P1، چندین آنزیم تجزیه‌کننده دیواره سلولی تولید می‌کند که کیتیناز ECH42 (کد شده توسط ژن *ech42*) و N-acetyl-β-D-glucosaminidase (کد شده توسط ژن *nag1*) از مهمترین آنها می‌باشند (Mach et al. 1999, Woo et al. 1999). در این تحقیق، اثر چندین جدایه باکتری *Pseudomonas fluorescens* در بیان ژنهای *nag1* و *ech42* قارچ *T. atroviride* استرین P1 با استفاده از سیستم بیان ژن گزارشگر گلوکز اکسیداز (Mach et al. 1999)، و RT-PCR مورد مطالعه قرار گرفت.

روش بررسی

تهیه و نگهداری میکروارگانیسم‌ها

قارچ *Trichoderma atroviride* استرین P1 و مشتقات آن که حامل ژن گزارشگر *goxA* (ژن کد کننده گلوکز اکسیداز) در ترکیب با ژنهای *ech42* (مشتق *ech42-gox*) و یا *nag1-gox* (*nag1*) (اهدایی دکتر Lutz از موسسه علوم گیاهی، دانشگاه پلی‌تکنیک زوریخ، سوییس (ETH)) بودند، بطور مرتب در طول آزمایشها روی محیط PDA در ۲۵°C تکثیر شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت این استرین‌ها، سوسپانسیون اسپور قارچ در گلیسرول ۲۰٪ تهیه و در دمای ۲۰°C- نگهداری گردید (Lutz et al. 2004). این استرین‌ها، با بیان ژن گلوکز اکسیداز، می‌توانند الگوی فعالیت ژنهای *ech42* و *nag1* را تحت شرایط مختلف نشان دهند (Mach et al. 1999).

تعداد ۲۶ جدایه *Pseudomonas fluorescens* از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک

دانشگاه تهران تهیه و پس از بررسی‌های آزمایشگاهی اولیه در مورد قدرت بازدارندگی آنها از رشد میسلیمی قارچ عامل پاخوره گندم، *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) v. Arx & Olivier var. *tritici* Walker (Ggt) شامل CHA0، B119 و Z7 (دارای خاصیت بازدارندگی بالا)، P4 و P17 (با خاصیت بازدارندگی متوسط)، P21 و P6 (با خاصیت بازدارندگی ضعیف) جهت بررسی اثرات احتمالی آنها در بیان ژنهای *nag1* و *ech42* تریکو درما انتخاب شدند (جدول ۱). از استرین CHA0 بعنوان شاهد استاندارد جهت ارزیابی فعالیت بیوکنترلی استرین‌های دیگر استفاده شد. باکتری‌ها بطور معمول در محیط King's B (KMB) یا S₁ کشت شدند. برای نگهداری طولانی مدت، جدایه‌ها در گلیسرول ۴۰٪ سترون و در دمای ۲۰°C- قرار داده شدند (McSpadden *et al.* 2000, Duffy *et al.* 1996).

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Pseudomonas fluorescens* مورد مطالعه

Table 1. *Pseudomonas fluorescens* strains selected for study

Pseudomonas strain	Origin	Location
CHA0	Tobacco rhizosphere	Switzerland
B119	Sunflower rhizosphere	Orumieh
Z7	Wheat rhizosphere	Tabriz
P17	Wheat rhizosphere	Karaj
P4	Wheat rhizosphere	Karaj
P6	Wheat rhizosphere	Karaj
P21	Wheat rhizosphere	Karaj

ردیابی جدایه‌های باکتریایی واجد ژنهای کلیدی سنتز آنتی‌بیوتیک‌های 2,4-diacetylphloroglucinol (Phl) و phenazine-1-carboxylic acid (PCA) با استفاده از PCR

۱- ردیابی ژن *phlD*

منظور شناسایی جدایه‌های باکتریایی تولید کننده آنتی‌بیوتیک 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG)، ژن *PhlD* بعنوان یک ژن کلیدی در مسیر سنتز این آنتی‌بیوتیک، با استفاده از آغازگرهای *phl2b* (5'-ACC GCA GCA TCG TGT ATG AG-3') و *phl2a* (5'-GAG GAG GTC

GAA GAC CAC CA-3') (ساخت شرکت Sigma) مورد ردیابی قرار گرفت (Keel et al. 1996, Raaijmakers et al. 1997, McSpadden et al. 2000). این آغازگرها که براساس *phlD* ژن باکتری *P. fluorescens* Q2-87 (کد دسترسی بانک ژن U41818) طراحی شده‌اند، قطعه‌ای از DNA را بطول ۷۴۵ جفت باز تکثیر می‌کنند (Raaijmakers et al. 1997).

استخراج DNA، بر اساس روش وانگ و همکاران (Wang et al. 2001) انجام گرفت. ۲۰ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR، شامل ۱۰ میکروگرم آلبومین سرم گاوی (BSA)، ۵ درصد دی متیل سولفوکسید (DMSO)، ۲/۵ میلی مول $MgCl_2$ ، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از هر یک از نوکلئوتیدهای dATP، dTTP، dCTP و dGTP، ۱/۵ واحد DNA پلی مراز *Taq* و ۴ میکرولیتر DNA باکتری (حدود ۵۰ نانوگرم)، در ۱X بافر PCR بود.

عمل تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل TGRADIENT (ساخت شرکت Biometra آلمان) انجام گرفت. برنامه حرارتی PCR شامل یک چرخه $94^{\circ}C$ به مدت ۱۲۰ ثانیه و سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل ۳۰ ثانیه در $94^{\circ}C$ ؛ ۳۰ ثانیه در $65^{\circ}C$ و ۶۰ ثانیه در $72^{\circ}C$ و در پایان یک چرخه $72^{\circ}C$ برای ۱۰ دقیقه بود. محصول PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد در ۸۰ ولت به مدت دو ساعت الکتروفورز شده و نتایج، با استفاده از دستگاه Gel-Documentation مدل Bio Doc Analyze (شرکت Whatman آلمان) بررسی گردید.

۲- ردیابی ژنهای تولیدکننده فنازین (PCA)

آزمایش PCR، مطابق روش تکثیر ژن *phlD* و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PCA2a (5'- CCGCGTTGTTCTCGTTCAT-3') PCA3b و (5'- TTGCCAAGCCTCGCTCCAAC-3') برای ردیابی ژنهای *phzC* و *phzD* (که در مسیر بیوسنتز فنازین دخالت دارند)، مورد استفاده قرار گرفت (Raaijmakers et al. 1997). این آغازگرها، به ترتیب با استفاده از توالی ژنهای *phzC* و *phzD* در جدایه *P. fluorescens* 2-79 (کد دسترسی بانک ژن L48616) طراحی شده‌اند (Raaijmakers et al. 1997). برنامه سیکل حرارتی PCR شامل یک مرحله $94^{\circ}C$ به مدت ۱۲۰ ثانیه و یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای (هر چرخه شامل $94^{\circ}C$ ، ۶۰ ثانیه؛ $67^{\circ}C$ ، ۴۵ ثانیه؛ $72^{\circ}C$ ، ۶۰ ثانیه) و یک مرحله $72^{\circ}C$ به مدت ۱۰ دقیقه در پایان بود.

استخراج و اندازه‌گیری آنتی بیوتیک (DAPG) 2,4-diacetylphloroglucinol

برای تایید نتایج حاصل از PCR، جدایه‌های باکتری *P. fluorescens* از نظر تولید DAPG با

استفاده از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفتند. ابتدا جدایه ها در محیط LB (۲۷°C)، ۱۶۰rpm) به مدت یک شب رشد داده شدند و سپس با آب مقطر سترون تا حدود OD₆₀₀ = 0.001 رقیق گردیدند. ۴۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط yeast-malt extract (YME) (Schnider *et al.* 2000) کشت شده و در روی شیکر با ۱۶۰ دور در دقیقه در دمای ۲۷°C قرار داده شد. بعد از ۷۲ ساعت، آنتی‌بیوتیک DAPG با استفاده از روش دافی و دفاگو (Duffy & Defago, 1999) استخراج شد. بدین ترتیب که، ۱۵ میلی‌لیتر از هر نمونه در داخل لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و اسیدیته آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال، به ۲ تا ۲/۵ رسانده شد. پس از اضافه کردن اتیل استات به نسبت ۱ به ۱ (حجم به حجم)، محلول به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد. سپس محلول به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و فاز آلی به داخل ظروف شیشه ای ته گرد انتقال یافته و در زیر هود لامینار قرار گرفت. پس از تبخیر، باقیمانده در ۱ میلی‌لیتر متانول مخصوص HPLC حل گردید و برای تایید حضور آنتی‌بیوتیک، با استفاده از دستگاه HPLC مدل Shimadzu-SPD-6VA مورد مطالعه قرار گرفت. نمونه‌های ۱۰ میکرولیتری در ستون HPLC به ابعاد ۱۵۰×۴/۶ میلی‌متر از نوع Nucleosil 120-5 C18 با روش فاز معکوس در دمای اتاق، تزریق شدند. سرعت فاز متحرک (شامل ۶۰٪ فسفات پتاسیم ۰/۱ میلی‌مولار و ۴۰٪ استونیتریل با pH=۵/۸) یک میلی‌لیتر در دقیقه بود. پیک استاندارد برای آنتی بیوتیک DAPG، ۲۸۳ نانومتر و زمان تاخیر ۹/۲ دقیقه بود. بر این اساس، مقدار آنتی بیوتیک تولید شده توسط جدایه‌های *P. fluorescens* بر حسب میکروگرم در میلی لیتر محیط کشت محاسبه گردید.

بررسی میزان بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در برهمکنش با باکتری *P. fluorescens* با استفاده از سیستم گزارشگر گلوکز اکسیداز

بمنظور بررسی اثر احتمالی *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* (کدکننده آنزیم کیتیناز ECH42) و *nag1* (کد کننده آنزیم N-acetyl-B-D-glucosaminidase) در *T. atroviride*، از یک سیستم گزارشگر بر اساس بیان ژن گلوکز اکسیداز (*gox*) (Mach *et al.* 1999) استفاده شد. برای این کار، استرین *ech42-gox* (حامل ژن گزارشگر *goxA* در ترکیب با ژن *ech42*) و استرین *nag1-gox* (حامل ژن گزارشگر *goxA* در ترکیب با ژن *nag1*) بکار برده شدند

(Mach et al. 1999, Lutz et al. 2004). اثر هفت جدایه باکتری *P. fluorescens*، در بیان این دو ژن مهم بیوکنترلی *T. atroviride* مطابق روش لوتز و همکاران (Lutz et al. 2004) بررسی گردید. بدین منظور، جدایه‌های باکتریایی در محیط سترون LB (27°C ، 160rpm) به مدت یک شب رشد داده شده و سپس با آب مقطر سترون تا حدود 10^8cfu/ml ($\text{OD}_{600} = 0.125$) رقیق شد. از این سوسپانسیون باکتریایی، چهار لکه ۲۰ میکرولیتری پیرامون یک دایره به شعاع ۳ سانتیمتر با فواصل مساوی در یک تشتک پتری حاوی محیط کشت مالت آگار ۱/۵ درصد مایه‌زنی گردید. سپس، یک قرص از کشت تازه‌ی قارچ تریکودرمای حامل گزارشگر *ech42-gox* یا *nag1-gox* به طور وارونه در وسط محیط کشت گذاشته شده و در تاریکی در دمای 24°C نگهداری شد. بعد از ۶۶ ساعت، ناحیه سطح میسلیم قارچ توسط یک پلانی‌متر اندازه‌گیری شد. سپس، ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (شامل $1/2$ گرم در لیتر KH_2PO_4 ، $2/6$ گرم در لیتر K_2HPO_4 ، $\text{pH}=7/1$) به هر تشتک پتری اضافه شده و تشتک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در 80°C دور در دقیقه تکان داده شدند. مایع حاصل هر تشتک که حاوی قطعات میسلیمی قارچ نیز بود، در یک لوله ساتریفیوژ جمع‌آوری و در 1800 دور بمدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از برداشتن محلول رویی، از روش گیزن (Geisen 1995) و ماخ و همکاران (Mach et al. 1999) برای اندازه‌گیری میزان فعالیت گلوکز اکسیداز، استفاده گردید. ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی مربوط به هر یک از تیمارها با ۱۸۰ میکرولیتر از محلول واکنش (شامل ۵ میلی‌لیتر گلوکز ۱ مولار، ۲ میلی‌لیتر آنزیم Horseradish Peroxidase (Roche، آلمان) با غلظت 10U/ml)، ۱۰ میلی‌لیتر ABTS [(2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate)] ۲ میلی‌مولار (Roche، آلمان)، یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱۱۱ میلی‌مولار با $\text{pH} = 5/8$) مخلوط شده و در هر چاهک پلیت الیزا ریخته شد. پس از یک دقیقه، میزان افزایش جذب نوری در 420nm در سه مرتبه با فاصله زمانی سه دقیقه توسط دستگاه ELISA Reader Sunrise اندازه‌گیری شد. هر واحد فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز بصورت میزان آنزیم مورد نیاز برای اکسیداسیون یک میکرومول گلوکز در دقیقه در دمای 25°C ($\text{pH}=5/8$) تعیین گردید. این آزمایش برای هر یک از ژنهای *nag1* و *ech42* بطور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با هشت تیمار (شامل هفت جدایه باکتری همراه با قارچ و قارچ تنها) در شش تکرار انجام گرفت. همچنین، آزمایش سه بار در

طی زمانهای مختلف تکرار گردید. نهایتاً تجزیه آماری داده‌ها بصورت اسپلیت پلات در زمان در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS13 صورت گرفت. بدلیل معنی‌دار نبودن اثر متقابل زمان در تیمار، داده‌های حاصل از زمانهای مختلف برای هر کدام از تیمارها ادغام شدند. مقایسه میانگین‌ها با کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

بررسی میزان بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در تعامل با باکتری *P. fluorescens* از طریق RT-PCR

بمنظور تایید نتایج حاصل از بررسی اثر *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* (تیپ وحشی) با استفاده از گزارشگر *gox*، از روش RT-PCR استفاده شد. در این آزمایش، نحوه کشت قارچ و باکتری همانند روش بالا بود، و پس از ۶۶ ساعت نگهداری، ناحیه سطح میسلیم قارچ توسط یک پلانتری متر اندازه‌گیری و سپس با استفاده از یک تیغه سترون جمع‌آوری شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA

پس از جمع‌آوری میسلیمها، RNA با استفاده از (Sigma) Tri-Reagent طبق روش پیشنهادی کارخانه سازنده استخراج گردید. رسوب RNA حاصل با اتانول ۷۰٪ شسته و پس از خشک شدن، در آب مقطر سترون (RNase-free) حل گردید. بعد از تیمار با آنزیم (Roche) DNase، غلظت RNA در نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر بطور یکنواخت تنظیم گردیده و cDNA با استفاده از کیت RT Super Script III، بشرح زیر ساخته شد:

مخلوط ۵ میکروگرم از RNA به‌مراه یک میکرولیتر از آغازگر پلی T، یک میکرولیتر از آغازگر با توالی تصادفی (هر یک ۵۰ میکرومول) و یک میکرولیتر از مخلوط dNTPs (۱۰ میلی‌مول)، با افزودن آب مقطر به حجم ۱۳ میکرولیتر رسانده و پس از ۵ دقیقه نگهداری در ۶۵°C، بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ گذاشته شد. سپس یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) از آنزیم RT-Super Script III، یک میکرولیتر (۴۰ واحد) RNase و یک میکرولیتر DDT یکدهم مول اضافه شده و حجم نهایی با استفاده از بافر (شامل ۲۵۰ mM کلرید پتاسیم، ۲۵۰ mM Tris-HCl با pH=۸/۳، ۲۵۰ mM کلرید کلسیم) به ۲۰ میکرولیتر رسید. سپس این مخلوط به مدت یک ساعت در ۵۰°C نگهداری شد تا واکنش سنتز cDNA تکمیل شود.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)

یک میکرولیتر از cDNA تهیه شده در مخلوطی شامل ۲/۵ میلی‌مول از MgCl₂، ۰/۵ میلی‌مول dNTP، ۰/۵ میلی‌مول آغازگر Ech42-F1 (5'-ATG TTG GGT TTC CTC GGA -3')، ۰/۵ میلی‌مول آغازگر Ech42-R (5'-TCA TTC GGG ATG GTT GTC A -3') و ۵ واحد DNA پلیمراز *Taq*، اضافه شده و حجم نهایی آن با استفاده از بافر PCR و آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر رسید. برنامه چرخه حرارتی PCR شامل یک چرخه ۹۴°C، ۴ دقیقه و سپس یک دوره ۳۰ چرخه‌ای که هر چرخه شامل ۹۴°C، ۳۵ ثانیه؛ ۶۰°C، ۴۵ ثانیه؛ ۷۲°C، ۶۰ ثانیه و در پایان یک چرخه ۷۲°C، ۱۰ دقیقه بود. محصول واکنش قطعه cDNA ۱۲۶۳ جفت‌بازی می‌باشد. برای یکسان سازی مقدار cDNA استفاده شده در آزمایشات PCR، از ژن Actin استفاده گردید. برای واکنشهای PCR ژن اکتین از آغازگرهای Act-F (-5'-AGA AGT TGC TGC CCT CGT T -3') و Act-R (3'-CTC AGC CAG GAT CTT CAT C -5') استفاده شد که محصول آن قطعه ۵۷۵ جفت‌بازی می‌باشد. محصول PCR در ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. میزان بیان ژن در تیمارهای مختلف با استفاده از نرم افزار ImageJ مقایسه گردید.

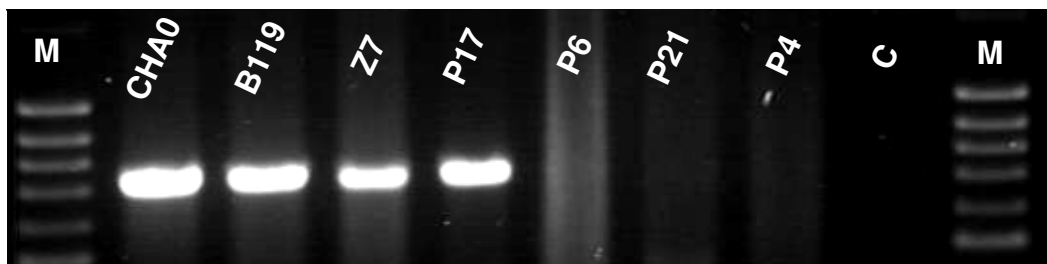
نتیجه

ردیابی جدایه‌های *P. fluorescens* واجد ژن‌های تولیدکننده آنتی‌بیوتیک‌های Phl و PCA

نتایج آزمایشهای اولیه نشان داد که جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی از نظر بازدارندگی رشد Ggt با هم متفاوت بودند (داده‌ها آورده نشده‌اند). از آنجائیکه آنتی‌بیوتیک‌های Phl و PCA در کنترل عوامل بیماریزا از جمله Ggt از اهمیت بالایی برخوردارند (Thomashow & Weller 1988, Keel *et al.* 1992, Harrison *et al.* 1993; Sharifi-Tehrani *et al.* 1998, Raaijmakers *et al.* 1998, 1999, McSpadden *et al.* 2000, Weller *et al.* 2002, Ownley *et al.* 2003) وجود ژنهای سنتزکننده این آنتی‌بیوتیکها در جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از روش PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج PCR با استفاده از جفت آغازگر phl2a و phl2b که قطعه‌ای بطول ۷۴۵ جفت باز تکثیر می‌کنند (Raaijmakers *et al.* 1997)، نشان داد که جدایه‌های CHA0، Z7، B119 و P17 واجد ژن *phlD* می‌باشند (شکل ۱).

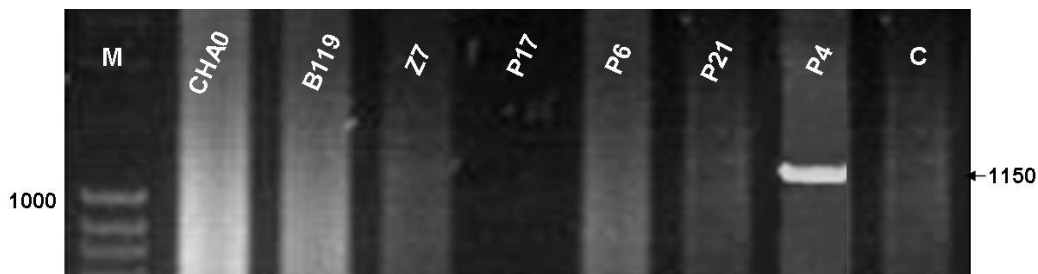
در آزمایش PCR با استفاده از جفت آغازگر PCA2a و PCA3b تنها از جدایه P4 قطعه

دNAی مورد انتظار بطول ۱۱۵۰ جفت باز تکثیر شد (شکل ۲). این نتایج وجود ژن فنازین در جدایه P4 را به اثبات می رساند.



شکل ۱- ردیابی ژن *phlD* در جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از جفت آغازگر *phl2a* و *phl2b*. قطعه دNAی مورد انتظار با اندازه ۷۴۵ جفت باز در جدایه‌های CHA0، B119، Z7 و P17 تکثیر گردید. اندازه باندهای نشانگر بر اساس جفت‌باز می‌باشد. M: نشانگر ژنومی (۱ kb)، C: شاهد منفی.

Fig.1. Detection of *phlD* gene in *P. fluorescens* isolates using *phl2a* and *phl2b* primers. The expected 745 bp DNA fragment was amplified from CHA0, B119, Z7 and P17 isolate. Marker fragment sizes are shown in base pair. M= Molecular marker (1 kb), C= Negative control.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه‌های *P. fluorescens* با استفاده از آغازگرهای PCA3b، PCA2a. قطعه دNAی ۱۱۵۰ جفت بازی مورد انتظار تنها در جدایه P4 تکثیر شد. اندازه باندهای نشانگر بر اساس جفت‌باز می‌باشد. M: نشانگر ژنومی (۱ kb)، C: شاهد منفی.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products of *P. fluorescens* isolates using PCA2a and PCA3b primers. The expected 1150 bp DNA fragment was amplified only from P4 isolate. Marker fragment sizes are shown in base pair. M= molecular marker (1 kb), C= Negative control.

تولید آنتی بیوتیک DAPG

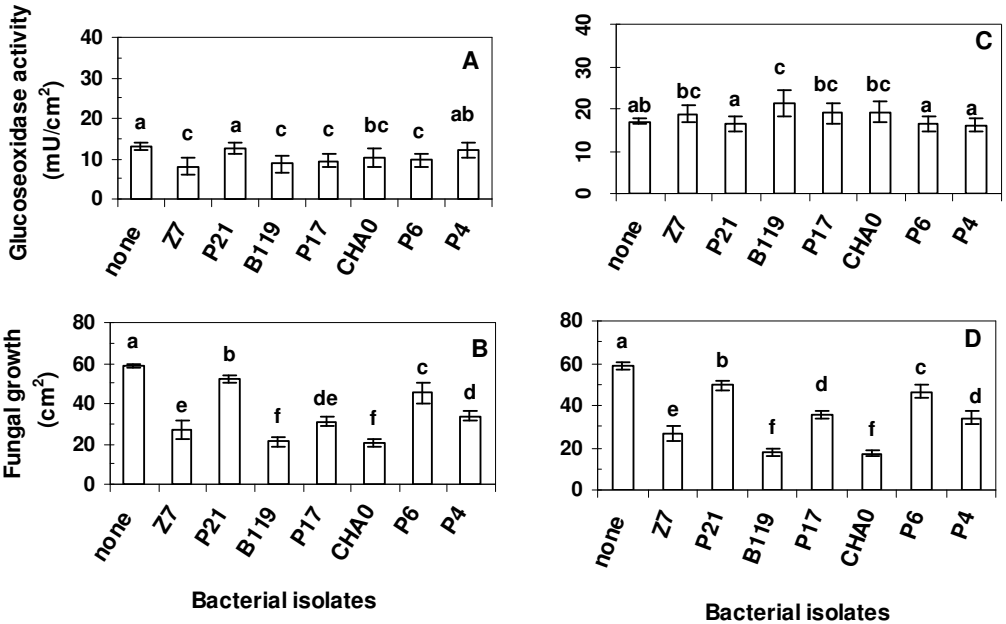
در تایید نتایج حاصل از PCR برای بررسی حضور ژن *phlD* در جدایه‌ها، تولید آنتی‌بیوتیک DAPG با استفاده از روش HPLC مورد بررسی قرار گرفت. میزان تولید DAPG در جدایه‌ها با هم متفاوت بود و جدایه CHA0 با ۱۱/۶ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، بیشترین مقدار را داشت، و جدایه‌های Z7، B119 و P17 به ترتیب ۸/۴، ۳/۵ و ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت، این آنتی‌بیوتیک را تولید کردند. جدایه‌های P21، P6 و P4 که *phlD*⁻ بودند، فاقد این آنتی‌بیوتیک بودند.

تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride*

وقتی *T. atroviride* استرین *ech42-gox* به تنهایی کشت شد، میزان بیان ژن *ech42-gox* که نشانگر بیوسنتز آنزیم ECH42 در سطح میسلیمی می‌باشد، به میزان ۱۲/۹۹ mU/cm² بود. این مقدار در حضور باکتری *P. fluorescens* کاهش یافت که نشان دهنده سرکوب بیان این ژن توسط جدایه‌های باکتریایی می‌باشد. البته، میزان کاهش بیان ژن در حضور جدایه‌های P4 و P21 معنی دار نبود (شکل ۳). بیشترین ممانعت از بیان این ژن در تعامل با جدایه Z7 دیده شد، که میزان بیان آن به ۸/۱۱ mU/cm² کاهش یافت. بعد از آن، برترتیب جدایه‌های P17، B119، P6 و CHA0 باعث کاهش بیان این ژن شدند (شکل ۳). از نظر میزان رشد، قارچ *T. atroviride* استرین *ech42-gox* پس از ۶۶ ساعت رشد در محیط مالت آگار، تقریباً سطح محیط کشت در تشتک پتری را پر کرد و میزان سطح رشد میسلیمی ۵۸/۶ cm² شد. اما حضور جدایه‌های باکتریایی باعث کاهش رشد میسلیمی قارچ گردید. جدایه CHA0 با ۶۵/۵ درصد ناحیه بازدارندگی، بیشترین اثر ممانعت‌کنندگی و جدایه P21 با ۱۱/۴۳ درصد بازدارندگی، کمترین اثر را در رشد میسلیمی قارچ داشتند (شکل ۳).

تاثیر جدایه‌های *P. fluorescens* در بیان ژن *nag1* در *T. atroviride*

نتایج حاصل از مطالعه تغییر میزان بیان ژن *nag1-gox* در حضور جدایه‌های باکتریایی متفاوت بود. در حضور جدایه‌های *phlD*⁺ میزان بیان *nag1* افزایش نشان داد. این افزایش در تعامل با جدایه B119 کاملاً معنی دار بود (شکل ۳). میزان بیان ژن در تیمار شاهد (بدون حضور باکتری) ۱۷ mU/cm² بود که در تیمار با جدایه B119 به ۲۱/۳۳ mU/cm² رسید. اما بیان این ژن در تعامل با جدایه‌های *phlD*⁻ (P21 و P4، P6)، اندکی کاهش نشان داد، که البته این



شکل ۳- بیان ژن *ech42-gox* (A) و *nag1-gox* (C) و رشد میسلیومی *T. atroviride* استرین (B) *ech42-gox* و *nag1-gox* (D) در حضور جدایه‌های *P. fluorescens*. باکتریها بصورت چهار لکه ۲۰ میکرولیتری به فاصله ۳ سانتی متری از *T. atroviride* کشت شدند و به مدت ۶۶ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. هر تیمار میانگین سه آزمایش با شش تکرار در هر آزمایش است. گروههایی که با حروف متفاوت نشان داده شده اند، بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار نشان دادند ($p \leq 0.05$).

Fig. 3. Expression of *ech42-gox* (A) and *nag1-gox* (C) fusion and growth of *T. atroviride* derivatives *ech42-gox* (B) and *nag1-gox* (D) in presence of the *P. fluorescens* strains. The bacteria were inoculated with four spots of 20 μ l in 3 cm distance of *T. atroviride* and plates were incubated for 66 h at 24°C in darkness. Each value is the mean of 3 experiments with 6 replicas per treatment. Bars with different letters are significantly different according to Duncan's multiple test ($p \leq 0.05$).

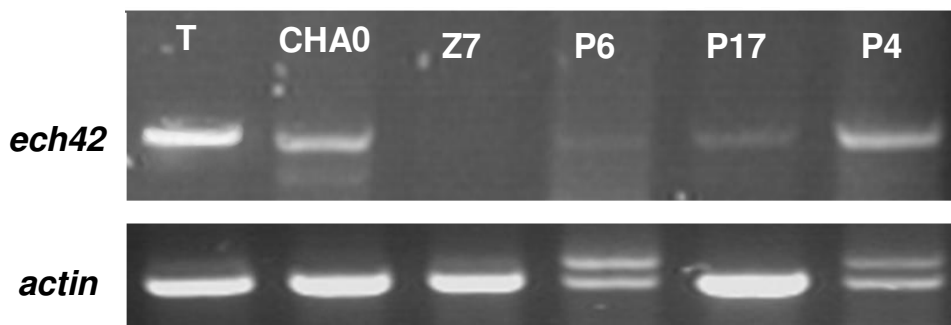
کاهش معنی دار نبود (شکل ۳). میزان رشد میسلیمیوم *T. atroviride* استرین گزارشگر *nag1-gox* نیز همانند میزان رشد استرین گزارشگر *ech42-gox* بود. در تیمار شاهد بدون حضور باکتری، ناحیه سطح میسلیموم قارچ 59 cm^2 بود که در حضور جدایه‌های باکتریایی کاهش یافت. میزان بازدارندگی رشد قارچ بین ۷۱ درصد (در تیمار با CHA0) تا ۱۶ درصد (در تیمار با جدایه P21) متفاوت بود (شکل ۳).

بررسی میزان تغییرات بیان ژن کیتیناز قارچ *T. atroviride* در تعامل با *P. fluorescens* از طریق RT-PCR

با توجه به نتایج حاصله از سیستم گزارشگر *gox* که نشانگر اختلاف معنی دار در بیان ژن *ech42* در تعامل با جدایه‌های مختلف باکتریایی بود، از روش RT-PCR برای بررسی این نتایج استفاده گردید. در این آزمایش، پنج جدایه *P. fluorescens* برای بررسی میزان رونوشت‌های *ech42* مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که میزان رونوشت‌های *ech42* تعامل با جدایه‌های باکتریایی کاهش می‌یابد. بیشترین مقدار کاهش رونوشت‌ها در تیمار Z7 مشاهده شد که کاملاً منطبق بر نتایج حاصله از سیستم گزارشگر *gox* بود. نتایج دیگر نیز با نتایج حاصله از سیستم گزارشگر همخوانی داشت (شکل ۴). در این آزمایش، از ژن اکتین بعنوان کنترل استفاده شد و میزان رونوشت‌های ژن *ech42* بر اساس میزان بیان ژن اکتین و با استفاده از نرم‌افزار ImageJ نرمالیزه شد.

بحث

استفاده از عوامل بیوکنترلی بصورت مخلوط، اعم از ترکیب باکتری با باکتری یا باکتری قارچ، بعنوان راه‌حلی برای افزایش ثبات و میزان کنترل عوامل بیماری‌زای خاکری پیشنهاد شده است (Weller & Cook 1983, Cook *et al.* 1988, Paulitz *et al.* 1990, Capper & Higgins 1993, Duffy & Weller 1995, Duffy *et al.* 1996, Raupach & Kloepper 1998, Rini & Genowati 2001, Pierson & Weller 1994, Sulochana 2006). علی‌رغم گزارش‌های متعدد در ارتباط با اثرات مثبت کاربرد دو یا چند عامل بیوکنترل در مدیریت و کنترل بیماری، مطالعات در زمینه تعامل این عوامل در سطح مولکولی بسیار محدود می‌باشند. از این مطالعات می‌توان به گزارش لوتز و همکاران (Lutz *et al.* 2004) اشاره کرد که در تحقیقات خود نشان دادند که وقتی یک عامل بیوکنترلی باکتریایی با یک عامل بیوکنترلی



شکل ۴- نتایج آزمایش RT-PCR برای مقایسه بیان ژن *ech42* در تعامل قارچ *T. atroviride* با جدایه‌های *P. fluorescens* ژن *actin* بعنوان شاهد استفاده شد. T: قارچ تنها، CHA0، Z7، P6، P17 و P4:

به ترتیب قارچ همراه با جدایه‌های باکتریایی CHA0، Z7، P6، P17 و P4.

Fig. 4. RT-PCR results to study the expression of *T. atroviride ech42* gene in co-inoculation with several *P. fluorescens* strains, including CHA0, Z7, P6, P17 and P4. T: *P. fluorescens* alone. Actin was used as a control.

قارچی بصورت مخلوط بکار روند، می‌توانند در بیان ژنهای بیوکنترلی کلیدی همدیگر اثرات مثبت و یا منفی داشته باشند. در مطالعه اخیر نیز این اثرات مشاهده شدند، بطوریکه جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش، در بیان ژن کیتیناز *ech42* قارچ تریکودرما اثر ممانعت‌کنندگی داشتند (شکل ۳ و ۴). البته این بازدارندگی در حضور جدایه‌های P4 و P21 که هر دو DAPG⁻ بودند، معنی‌دار نبود، در حالیکه در حضور بقیه جدایه‌ها، بیان این ژن بطور معنی‌داری سرکوب شد. از این آزمایشها می‌توان نتیجه گرفت که کاهش بیان ژن *ech42* توسط *P. fluorescens* نمی‌تواند ناشی از آنتی‌بیوتیک DAPG باشد، زیرا کاهش بیان ژن در هر دو جدایه DAPG⁺ و DAPG⁻ مشاهده گردید. میزان ممانعت از بیان ژن *ech42* در حضور جدایه P6 که DAPG⁻ بود، با میزان ممانعت در تعامل با جدایه‌های Z7، B119 و P17 (DAPG⁺) از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد. حتی اضافه نمودن این آنتی‌بیوتیک (غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مول) به محیط کشت در غیاب باکتری، باعث افزایش معنی‌دار بیان این ژن در *T. atroviride* گردید (داده‌ها نشان داده نشده). بیان ژن *ech42*، همچنین در حضور جدایه P4 که واجد ژن تولیدکننده فنازین (PCA⁺) بود، اندکی کاهش یافت، که البته معنی‌دار نبود (شکل ۳). نتایج بررسی حاضر نشان داد که

جدایه‌های *P. fluorescens* اعم از $DAPG^+$ ، $DAPG^-$ و یا PCA^+ هیچگونه اثر مثبت در بیان ژن *ech42* در *T. atroviride* نداشتند. این نتایج با یافته‌های لوتز و همکاران (Lutz et al. 2004) مطابقت دارد. این محققان در مطالعات خود نشان دادند که در حضور جدایه CHA0 (واجد آنتی بیوتیک DAPG) و یا جهش یافته‌هایی که DAPG تولید نمی‌کردند (از قبیل CHA631 و CHA660) بیان ژن *ech42* در تریکودرما کاهش می‌یابد. بنابراین، بنظر میرسد احتمالاً عامل دیگری غیر از این آنتی‌بیوتیک‌ها در *P. fluorescens* در کاهش بیان *ech42* در قارچ *T. atroviride* دخیل می‌باشد. نتایج حاصله از روش RT-PCR علاوه بر تایید نتایج بدست آمده از سیستم گلوکز اکسیداز، نشان داد که کنترل بیان ژن *ech42* در تعامل با باکتری *P. fluorescens* در مرحله رونویسی انجام می‌گیرد. این نتایج برای اولین بار گزارش می‌شوند.

در برهمکنش جدایه‌های $DAPG^-$ با قارچ تریکودرما، هیچگونه افزایشی در بیان ژن *nag1* در *T. atroviride* مشاهده نشد. برعکس، در حضور جدایه‌های CHA0، B119، P17 و Z7 که همگی $DAPG^+$ بودند، بیان ژن *nag1* افزایش یافت. این افزایش در تعامل با جدایه B119 کاملاً معنی دار بود (شکل ۳). این درحالیست که این جدایه بطور قابل توجهی باعث سرکوب بیان ژن *ech42* شده بود. بر اساس مطالعات ماخ و همکاران (Mach et al. 1999)، مکانیسمهای تنظیم بیان این دو ژن با یکدیگر متفاوت می‌باشند. لوتز و همکاران نیز (Lutz et al. 2003) نشان دادند که توکسین قارچی (DON) *deoxynivalenol* که توسط *Fusarium graminearum* و *F. culmorum* ترشح می‌شود، بیان ژن *nag1* را سرکوب می‌کند، در حالیکه روی بیان ژن *ech42* تاثیری ندارد. با این وجود، بیان هر دو ژن توسط دیواره سلولی قارچی تحریک می‌شوند (Carsolio et al. 1994, Peterbauer et al. 1996).

در حضور جدایه‌های باکتریایی *P. fluorescens*، رشد میسلومی هر سه استرین *T. atroviride* کاهش یافت. احتمالاً آنتی‌بیوتیک DAPG نقش عمده‌ای در این کاهش داشته است، چنانکه کاهش رشد میسلومی در حضور جدایه‌های تولیدکننده DAPG در مقایسه با جدایه‌های فاقد این آنتی‌بیوتیک، بطور معنی‌داری بیشتر بود (شکل ۳). این آنتی‌بیوتیک بعنوان یکی از موثرترین متابولیت‌های ضد میکربی تولید شده توسط جدایه‌های *P. fluorescens* می‌باشد (Keel et al. 1990, Sharifi-Tehrani et al. 1998) و نقش آن در کنترل قارچ‌های

Thielaviopsis basicola بیمارگر پوسیدگی سیاه ریشه توتون، *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی گوجه فرنگی، *Pythium ultimum* روی خیار و *Rhizoctonia solani* روی پنبه اثبات شده است (Sharifi-Tehrani et al. 1998, Weller 1988, Howell & Stipanovic 1979). لوتنز و همکاران (Lutz et al. 2004) نشان دادند که کاهش رشد میسلومی قارچ *T. atroviride* در حضور جهش یافته‌های *P. fluorescens* CHA0 که فاقد آنتی‌بیوتیک DAPG بودند، کمتر از کاهش رشد میسلومی در حضور تیپ وحشی آن بوده است. نتایج مطالعه اخیر نیز این فرضیه را تقویت می‌کند که آنتی‌بیوتیک DAPG نقش عمده‌ای در کاهش رشد میسلومی *T. atroviride* دارد. این نتایج با افزودن آنتی‌بیوتیک خالص (غلظت نهایی ۰/۱ میلی‌مول) به محیط کشت قارچ تریکودرما نیز تایید گردید (داده‌ها نشان داده نشده‌اند).

بطور کلی این نتایج نشانگر این است که برهم کنش‌های اختصاصی بین عوامل بیوکنترل در حالت ترکیبی می‌تواند در بیان ژنهای بیوکنترلی این عوامل، تاثیر مثبت یا منفی داشته باشد که در نهایت در کنترل بیماری تاثیر خواهد داشت و بنابراین، قبل از اختلاط، بایستی در مورد برهمکنش بین این عوامل شناخت کافی پیدا کرد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دکتر Lutz (دانشگاه پلی‌تکنیک زوریخ، سوییس (ETH)) بخاطر ارسال جدایه‌های قارچ و دکتر رشیدی (دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز) بخاطر همکاری در انجام آزمایش‌های HPLC و دکتر پژوهنده و دکتر احمدآبادی بخاطر همکاریهای ارزنده‌شان تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (81-86) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: اکبر شیرزاد، عباس شریفی تهرانی، مسعود احمدزاده، کیوان بهبودی و

شیرزاد و همکاران بیان ژنهای کیتیناز (*nag1* و *ech42*) در قارچ:....

محمد جوان نیکخواه، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه تربیت معلم آذربایجان و
گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

SID



ابزارهای
پژوهش



سرویس ترجمه
تخصصی



کارگاه های
آموزشی



بلاگ
مرکز اطلاعات علمی



سامانه ویراستاری
STES



فیلم های
آموزشی

کارگاه های آموزشی مرکز اطلاعات علمی



تازه های آموزش
آموزش مهارت های کاربردی در تدوین و چاپ مقالات ISI

آموزش مهارت های کاربردی
در تدوین و چاپ مقالات ISI



تازه های آموزش
روش تحقیق کمی

روش تحقیق کمی



تازه های آموزش
آموزش نرم افزار Word برای پژوهشگران

آموزش نرم افزار Word
برای پژوهشگران