

یازدهمین کنگره ملی سراسری
فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران
11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran

senaconf.ir

بررسی ژن های مؤثر برای مقاومت به تنش های زیستی در گیاهان

حسین پاسالاری (نویسنده مسئول)^۱، امین الله طهماسبی^۲

^۱ گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

Hossein.pasalari@hormozgan.ac.ir

^۲ گروه کشاورزی، مجتمع آموزش عالی میناب، دانشگاه هرمزگان، بندرعباس، ایران

tahmasebi.info@yahoo.com

چکیده

تنش های زیستی، یکی از مهمترین معضلات برای کشاورزی در سراسر دنیا هستند. یکی از مهمترین روش ها برای کاهش اثر تنش ها، یافتن ژنوتیپ هایی است که دارای ژن ها و صفات مطلوبی در این زمینه باشند. بدین منظور یکی از مهمترین اهداف تحقیقاتی، درک مکانیسم های مولکولی مرتبط با مقاومت به تنش ها در گیاهان می باشد. با پیشرفت های اخیر در زمینه ژنتیک مولکولی، صدها ژن که بوسیله تنش القاء می شوند، شناسایی شده و بعنوان ژن های کاندید برای مهندسی ژنتیک مورد استفاده قرار گرفته اند. این ژن ها و ترکیبات شناسایی شده، به چند دسته طبقه بندی می شوند که شامل: ژن های فانکشنال، ترکیبات فعال اسمزی، فاکتورهای رونویسی و عوامل سیگنالی می باشند. در این مقاله یافته های اخیر در مورد برخی ژن های مؤثر برای مقاومت به تنش های زیستی در گیاهان توضیح داده خواهد شد.

واژه های کلیدی

مقاومت به تنش های زیستی، ژن های القاء شده با تنش، مهندسی ژنتیک

یازدهمین کنگره ملی سراسری فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران

11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran

senaconf.ir

۱. متن مقاله

تنش نتیجه روند غیرعادی فرایندهای فیزیولوژیکی است که از تاثیر یک یا ترکیبی از عوامل زیستی و محیطی حاصل می شود. تنش زیستی (Biotic stress) گونه‌ای تنش است که در پیامد آسیب به یک جاندار توسط جانداران دیگر مانند باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، انگل‌ها، آفات مفید و مضر، گیاهان کشت شده یا گیاهان بومی پدید می‌آید. بسیاری از تنش‌ها ممکن است علائم مشابهی داشته باشند؛ به‌طور مثال قهوه‌ای شدن برگ‌های یک درخت بلوط ناشی از تنش خشکی ممکن است مشابه قهوه‌ای شدن برگ ناشی از بیماری پژمردگی بلوط که توسط نوعی قارچ ایجاد می‌شود باشد. بسیاری از تنش‌های زیستی بر روی فتوسنتز تأثیر می‌گذارند مانند جویدن حشرات (آفات) که سطح برگ را کاهش می‌دهد یا آلودگی ویروسی که نرخ فتوسنتز را کاهش می‌دهد [1]. یک راه حل اساسی برای برطرف کردن یا کاهش دادن اثرات تنش‌های زیستی یافتن ژنوتیپ‌های ویژه‌ای است که دارای مجموعه‌ای از صفات مطلوب و با قابلیت توارث بالا باشند. باتوجه به اهمیت تنش‌های زیستی و نقش آن در کاهش عملکرد در گیاهان، مهندسی مقاومت به تنش‌های زیستی در گیاهان، دارای مزایای اقتصادی مهمی می‌باشد. استراتژی اصلی مهندسی ژنتیک برای مقاومت به تنش‌های زیستی معرفی ژن‌هایی است که بطور مستقیم در این وقایع دخیل هستند. امروزه با استفاده از تکنیک‌های جدید تعداد زیادی از ژن‌هایی که موجب مقاومت می‌شوند شناسایی شده و در انتقال ژن در مهندسی ژنتیک از آن‌ها استفاده می‌گردد [12].

۱.۱. برخی ژن‌ها و پروتئین‌های مرتبط با تنش‌های زیستی در گیاهان

گیاهان همواره مورد حمله طیف وسیعی از بیمارگرها نظیر قارچ‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها و نماتدها قرار می‌گیرند. برای مدیریت عوامل بیماری‌زا، گیاهان باید سریعاً این عوامل بیماری‌زا را شناخته و سازوکارهای دفاعی خود را فعال نمایند. ژن‌های مقاومت در گیاهان (Resistance Genes) به صورت مستقیم یا غیرمستقیم از عمل پروتئین‌های موثر بیماری‌زایی بیمارگرها ممانعت می‌کند. همچنین این پاسخ‌های دفاعی می‌توانند به وسیله واکنش فوق حساسی یا (HR) (Hypersensitive reaction) و سیستم مقاومت اکتسابی یا (SAR) (Systemic Acquired Resistance) نیز تشدید شوند [6]. در اثر عملکرد سیستم دفاعی گیاهان، آنها میزبان بسیاری از بیمارگرها محسوب نشده (مقاومت غیرمیزبانی) و یا با تشخیص نژادهای خاصی از بیمارگرهای اختصاصی نسبت به آنها مقاومت (مقاومت میزبانی یا نژادی) نشان می‌دهند. در هر دو صورت، مسیرهای بیوشیمیایی که منجر به بروز مقاومت می‌شود بسیار مشابه بوده و پاسخ مناسبی در برابر حمله بیمارگر داده می‌شود. در نتیجه دریافت و تشخیص سیگنال‌های خارج سلولی به عنوان عوامل بیماری‌زا، انتقال این سیگنال‌ها به درون سلول و به دنبال آن راه‌اندازی واکنش‌های دفاعی روی می‌دهد [2].

اولین و مهمترین عاملی که موجب می‌شود گیاهی نسبت به یک بیمارگر خاص حساس یا مقاوم باشد به نوع برهمکنش ژن‌های مقاومت (Resistance gene) در گیاه و ژن بیماری‌زایی متناظر با آن بنام *Avr* در بیمارگر بستگی دارد. این مفهوم در قالب نظریه ژن برای ژن فلور مطرح می‌گردد و در نهایت پیشروی بیمارگر و یا القای مقاومت در گیاه را تعیین می‌کند. هنوز چگونگی برهمکنش بین گیاه و بیمارگر بخوبی مشخص نشده است. گرچه با تعیین توالی گیاه مدل آراییدوبسیس در تحقیقات مولکولی، امید زیادی به پیشرفت در این زمینه وجود دارد. این گیاه دارای ۱۵۰ ژن مقاومت است در حالی که در بسیاری از گیاهان دیگر دو تا سه برابر این میزان ژن مقاومت وجود دارد. تاکنون چند ژن مقاومت از گیاهان مهم زراعی که موجب بروز مقاومت به طیف وسیعی از بیمارگرها می‌شوند جدا گردیده اما عاملی که موجب راه‌اندازی یا خاموشی این ژن‌ها در خلال حمله بیمارگر می‌گردد هنوز مشخص نمی‌باشد [6]. در مقاومت میزبانی گیرنده‌هایی با عمل بسیار اختصاصی برای نژادهای بیمارگر وجود دارند که توسط ژن‌های *R* بیان می‌شوند. در یک گیاه تعداد بسیار زیادی ژن *R* با عملکردهای متفاوت وجود دارد که هرکدام بیمارگر خاصی را شناسایی می‌کنند. تاکنون ۲۰ ژن *R* با شناسایی اختصاصی برای ژن‌های *Avr* مشخص از هفت گونه مختلف گیاهی شامل دولپه‌ایها و تک‌لپه‌ایها جدا شده که در برابر باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها، نماتدها و شته‌ها موثرند. باتوجه به تنوع زیاد این بیمارگرها دیده شده است که تمامی پروتئین‌های *R* متناظر با آن‌ها دارای موتیف‌های مشخصی هستند که براساس آن‌ها تقسیم‌بندی شده‌اند [5].

خانواده ژنی Peptidyl-prolyl isomerases یا (*PPIs*) و آنزیم‌های کدکننده آنها در فرایندهای مختلف سلولی مانند کنترل چرخه سلولی، همکاری در تسهیل ایزومراسیون سیس و ترانس پیوندهای پپتیدی انتهایی *N* اسیدآمینو پرولین و همکاری در تاخوردگی

یازدهمین کنگره ملی سراسری فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران

11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran

senaconf.ir

پروتئین‌های تازه سنتز شده با چاپرون‌ها فعالیت می‌کنند. این آنزیم‌ها بصورت Ubiquitous هستند و در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها بطور مشابه‌ای بیان می‌شوند [10]. اشکال مختلف اکسیژن آزاد (Reactive Species Oxygen) و یا ROS از منابع مختلفی مانند تنفس سلولی و پاسخ دفاعی اولیه گیاهان به حمله انواع بیمارگرها تولید می‌شود. این مولکول بسیار فعال است و می‌تواند به ماکرومولکول‌های زیستی مانند پروتئین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها آسیب وارد کند. متیونین موجود در پروتئین در مقابل اکسیداسیون بسیار حساس است. در اثر اکسیداسیون ترکیبات نامطلوبی تولید می‌شود اما سلول‌های یوکاریوت و پروکاریوت دارای آنزیم‌های ترمیم کننده مانند methionine sulfoxide reductases یا *Msr* می‌باشند که این آنزیم برای بیماری‌زایی و زنده ماندن باکتری‌ها تحت تنش ضروری است [2]. مقاومت گیاه به بیمارگرها با تجمع پروتئین‌های PR مرتبط است. ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی (pathogenesis related genes)، یک کلاس ویژه از پروتئین‌های محافظ هستند که در پاسخ به تأثیرات تنش‌زا و عفونت بیمارگر بیان می‌شوند. پروتئین‌های PR در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و در حال حاضر پروتئین‌های توصیف شده به ۱۷ خانواده اختصاص یافته است. رابطه بین تجمع پروتئین‌های PR و توسعه مقاومت اکتسابی به دست آمده، منجر به این فرض شده است که بیان این ژن‌ها به عنوان نشانگرهای این مقاومت محسوب می‌شود. نشان داده شده است که انباشت این پروتئین‌ها با توسعه مقاومت به دست آمده از گیاه ارتباط دارد [11]. پژوهشی که بوسیله پاسالاری و همکاران در سال ۲۰۱۶ بر روی گیاه سیب زمینی تراریخته مقاوم به علف کش گلیفوسیت (حاوی ژن *aroA*، ژن مقاومت به علف کش و بیمارگرها) انجام شده بود [7]، نشان داد که تیمار گیاهان سیب زمینی آلوده شده با دو سویه باکتری‌های بیمارگر *Dickeya dadantii* ENA49 و *Pectobacterium atrosepticum* 21A با گلیفوسیت، بیان ژن‌های پاسخ دفاعی و ژن‌های وابسته به بیماری‌زایی را در سیب زمینی القا می‌کند. در این پژوهش، سطح بالایی از بیان ژن‌های وابسته به بیمارگر (*PR-2*، *PR-3*، *PR-5*)، بویژه ژن *PR-2* و ژن‌های پاسخ دفاعی (*HSR-203j*، *HIN1*) بویژه ژن *HSR-203j* مشاهده شد [8]. ژن *Bsi* پروتئین ترشچی *protease inhibitor* را که غنی از سیستمین و دارای ۸۹ اسید آمینه است را رمز می‌کند. این آنزیم در پاسخ به حمله بیمارگرها و حشرات القاء می‌شود. این پروتئین مانع از فعالیت پروتئازهای موجود در روده حشرات گیاهخوار و ترشحات میکروارگانیزم‌ها شده و در نتیجه اسید آمینه‌های لازم برای رشد و بلوغ آن‌ها تامین نمی‌شود [4]. ژن *Per* خانواده‌ای از پراکسیداز مونومر گلیکوپروتئینی دارای گروه هم را رمز می‌کند. در اثر فعالیت این آنزیم‌ها مولکول‌های ROS تولید می‌شود. مولکول‌های ROS به عنوان مولکول سیگنال در راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی، چوب پنبه‌ای شدن دیواره سلولی، بهبودی زخم‌ها، باز و بسته شدن روزنه‌ها، کنترل واکنش‌های اکسیداسیون-احیا و رشد طولی سلول عمل می‌کنند [3]. ژن *aroA* مقاومت گسترده‌ای در برابر تنش‌های زیستی مانند فشارهای ناشی از عوامل بیماری‌زای قارچی و باکتریایی را نشان می‌دهد. این ژن، آنزیم ۵-انول پیروویل شیکیمات ۳-فسفات سنتتاز، آنزیمی از مسیر شیکیمات را در هسته کد گذاری می‌کند. این آنزیم در پلاستیدهای گیاهی موضع می‌گیرد و واکنش پیشین این مسیر را کاتالیز می‌کند و برای سنتز اسید آمینه‌های معطر در باکتری‌ها، قارچ‌ها و گیاهان ضروری است. در تحقیقی که بوسیله پاسالاری و همکاران (۲۰۱۶) بر روی سیب‌زمینی تراریخته مقاوم به گلیفوسیت که با ژن *aroA* تراریخته شده بود نشان داده شد که تیمار گیاهان با گلیفوسیت علاوه بر ریشه‌کن کردن علف‌های هرز در مزارع کشاورزی نیز می‌تواند با القای پروتئین‌ها و ژن‌های پاسخ دفاعی، نوعی مقاومت اکتسابی سیستمی نسبت به بیمارگرهای گیاهی بخصوص قارچ‌ها و باکتری‌ها، ایجاد کند [9]. در زیست‌شناسی پیشرفته، بررسی دقیق بیان ژن‌ها اهمیت روزافزونی پیدا کرده است. در سال‌های پیش روش مرسوم برای بیان ژن‌ها لکه‌گذاری نورتون بلات، هیبریداسیون درجا و یا سنجش مقاومت به RNase بوده است. اگرچه این روش‌ها هنوز هم به طور گسترده استفاده می‌شوند ولی بطور کلی وقت‌گیر بوده و از حساسیت پایینی برخوردار می‌باشند. استفاده از روش Real time PCR برای بررسی بیان ژن و تشخیص نسخه‌های نادر RNA تحولی را در زمینه مطالعات بیان ژن بوجود آورده است [2].

۲. نتیجه‌گیری کلی

لازم به ذکر است که صفت مقاومت به تنش‌های زیستی صفتی پیچیده بوده که علاوه بر صفات مورفولوژیک گیاه، ژن‌ها و پروتئین‌های متعددی در آن نقش دارند که به برخی از آنها اشاره شد. امروزه با گسترش تعداد جمعیت که در قرن‌های آینده این

یازدهمین کنگره ملی سراسری فناوریهای نوین در حوزه توسعه پایدار ایران

11th National Congress of
the New Technologies in Sustainable Development of Iran

senaconf.ir

تعداد به هشت تا نه میلیارد نفر هم خواهد رسید بحث امنیت غذایی (Food security) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهد بود. با توجه به کم بودن منابع خاک غنی برای کشاورزی و تنوع و گسترش بیماری‌های گیاهی مختلف با دامنه میزبانی وسیع، افزایش تولید در واحد سطح از اهداف بلند مدت در بحث توسعه پایدار قلمداد می‌شود. امروزه علاوه بر روش‌های اصلاح کلاسیک گیاهان، اصلاح مولکولی به عنوان یک راهکار مهم در جهت ایجاد ارقام مقاوم به بیماری بکار می‌رود. با گسترش تکنولوژی جدید در سطح مولکولی امکان شناسایی و تعیین مشخصات ژن‌های موثر در افزایش مقاومت به تنش‌های زنده با استفاده از راهکارهای ترانسکریپتوم امکان‌پذیر شده است و توانایی بررسی صدها هزار ژن در هر آزمایش را فراهم ساخته است. این راهکارها در حال حاضر و در آینده‌ای نزدیک در راه رسیدن به ارقام و وارثه‌های مناسب جهت افزایش تولید در واحد سطح و ایجاد توسعه پایدار در بخش کشاورزی کارگشا خواهد بود.

۳. منابع

- [1] بهنام حبیبی خانیانی، ظهرا ادوی ۱۳۸۸. ژن‌های موثر برای مقاومت به تنش خشکی در گیاهان، همایش ملی آب، خاک، گیاه و مکانیزاسیون کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دزفول، ایران، ۱-۵.
- [2] مریم صادقی، رضا حاجی حسینی، قاسم عطایی، محسن مردی ۱۳۹۶. بررسی کمی بیان ژن‌های کاندیدای مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم آلوده به قارچ *Mycosphaerella graminicola*. مجله زیست فناوری گیاهان زراعی، ۲۰، ۷۵-۸۵.
- [3] Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III Plant peroxidases.. Plant Cell Physiol. 42: 462-468.
- [4] Lawrence, PK., Koundal, KR., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. EJB. 5: 5-6.
- [5] Moskovitz, J., Poston, JM., Berlett, BS., Nosworthy, NJ., Szczepanowski, R., Stadtman, ER., 2000. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. J. Biol. Chem, 275: 14167-14172.
- [6] Odjakova, M., Hadjiivanova, C., 2001. The complexity of pathogen defense in plants: Bulg. J. Plant Physiol. 27: 101-109.
- [7] Pasalari, HM., Tratsiakova, OM., Evtushenkov, AN., 2015. Glyphosate tolerance transgenic potato plants containing aroA gene. Proceeding of Belarusian State University. Series. Physiological, Biochemical, Molecular, Biological Sciences. 10: 123-126 (In Russ.).
- [8] Pasalari, H., Tretyakova, OM., Evtushenkov, AN., 2016. Induction of Potato defense response genes in Potato leaves during bacterial infection and glyphosate processing. Journal of Agriculture and Plant Protection. 3(106): 37-39.
- [9] Pasalari, H., Evtushenkov, AN., 2016. PR-genes expression in the leaves of transgenic potato plants after glyphosate treatment. Vestnik Belarusian State University. Series, 2, Chemistry. Biology. Geography. 1: 31-35 (In Russ.).
- [10] Schmid, FX., 1995. Protein folding: Prolyl isomerases join the fold. Curr Biol. 5: 993-994.
- [11] Van Loon, LC., 2011. Significance of inducible Defense-related proteins infected plants. Annual Review of Phytopathology. 2006: 135-162.
- [12] Vincour, B., Altman, A., 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: Achievements and limitations. Current Opinion in biotechnology. 16: 123-132.