برهمکنش‌های مولکولی میان *Leptospheria maculans* و گونه‌های براسیکا

رضا وجدان: کارشناس به نژادی مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر شرکت توسعه کشت دانه های روغنی

کلزا (Oilseed rape, *Brassica napus* L.)، با تولید سالانه‌ی بیش از ۷۰ میلیون تن، دومین گیاه دانه روغنی مهم در جهان است (۱۳۴و۱۵۲). بیماری ساق سیاه که توسط قارچ آسکومیست *Leptospharia maculans* ایجاد می‌شود، یکی از سه بیماری شایع در سراسر جهان بجز چین می‌باشد و هر ساله بطور میانگین موجب ۱۵-۱۰٪ کاهش عملکرد مزارع کلزا می گردد. یکی از گونه‌های بسیار نزدیک به این گونه‌ی قارچی، *L. biglobosa* می‌باشد که اغلب موجب بروز علائم آلودگی در کلزا می‌شود، اما این گونه علائم و صدمات کمتری را به این محصول وارد می‌آورد. برای مقابله با این بیماری روش‌های گوناگونی وجود دارد، از قبیل: مدیریت زراعی، شیمیایی و ژنتیکی، اما در میان روش‌های نامبرده، روش کنترل ژنتیکی و تولید ارقام از روش‌های بسیار موثر و عمومی در این مورد می‌باشد (۲۷و ۱۳۴). مقاوت ژنتیکی در ارتباط با کنترل بیماری ساق سیاه بطور کلی به دو بخش مقاومت کمی و کیفی و یا به عبارت دیگر، مقاومت در مرحله‌ی بلوغ و مقاومت در مرحله‌ی گیاهچه‌ای تقسیم می‌شود.

ژنتیک مقاومت به ساق سیاه: گذشته و حال

مبحث مقاومت کیفی و کمی (QR) در پاتوسیستم *B.napus – L.maculance* تا حدودی پیچیده است، این انواع مقاومت به اشکال مختلفی تعریف می شوند از قبیل مقاومت تک ژنی در مقابل چند ژنی، مقاومت در مرحله‌ی گیاهچه‌ای در مقابل مرحله‌ی گیاه بالغ، مقاومت نژاد اختصاصی در مقابل نژاد غیر اختصاصی و مقاومت عمودی در مقابل مقاومت افقی (۱۰۷). یکی از اهداف این مطالعه، تلاش برای تشریح این موضوع از دیدگاه مولکولی می‌باشد. بطور کلی مقاومت کیفی بعنوان مقاومت تک ژنی (R) در نظر گرفته می‌شود، در این حالت گیاه در مقابل عامل بیماریزا پاسخ دفاعی سریع و قوی نشان می‌دهد، این شیوه معمولاً به شکل یک واکنش ژن برای ژن تفسیر می شود که به موجب آن به پاتوژنی که ژن غیر بیماری‌زای[1] (*Avr*) مد نظر را حمل می‌کند، پاسخ داده می‌شود (۱۲). حضور یا عدم حضور ژن‌های *Avr*، نژاد جدایه‌ی پاتوژن را تعیین می‌نماید و بنابراین مقاومت با واسطه‌ی R[2] (RMR) معمولاً بعنوان نژاد اختصاصی تلقی می‌گردد. RMR بطور معمول با مرگ سلولی که بعنوان پاسخ حساس (HR) شناخته می‌شود، همراه است. در پاتوسیستم *B.napus – L.maculance*، این نوع مقاومت به راحتی با استفاده از سنجش کوتیلدون قابل ارزیابی است و ژن‌های R میزبان و Avr پاتوژن زیادی از این طریق شناسایی شده‌اند.

پیشرفت‌هایی در تعیین برهمکنش‌های ژن‌های مقاومت در میزبان و ژن‌های غیربیماری زا در پاتوژن، با استفاده از تک اسپور برگرفته از جدایه‌های *L.maculance* و بر مبنای نظریه ژن برای ژن فلور بدست آمده است (۶). از آن پس تلاش‌هایی در جهت غربال کردن واریته‌های تجاری کلزا و مجموعه‌های ژرم پلاسمی براسیکا، مجموعه‌ی عظیمی از ژن‌های مقاومت به فوما را در سه ژنوم براسیکا (A، B، C) ردیابی کرده است. در حال حاضر ۲۲ ژن مقاومت به فومای نژاد اختصاصی (Rlm1–14, RlmS, LepR1–6, RlmSTEE98) از لاین‌های *B.rapa* (AA)، *B.nigra* (BB)، *B.oleracea* (CC)، *B.napus* (AACC) و *B.juncea* (AABB) از طریق نقشه‌یابی ژنتیکی فنوتیپ مقاومت یا تفرق ژن‌های غیر بیماری‌زا (Avr) و یا نقشه‌یابی ژنتیکی پاتوژن تعریف شده‌اند.

با آنکه طی سال‌های اخیر مطالعات فراوانی بر روی این بیماری صورت گرفته است، اما ژنتیک کنترل کننده‌ی QR تا حدودی ناشناخته باقی مانده است و از جمله دلایل آن می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: پیچیدگی ژنتیک کنترل کننده این صفت، بطوری

[1] Avirulance
[2] R-mediated resistance (RMR)

که ژن‌های زیادی در مراحل مختلف در فرایند آلودگی نقش دارند و هر یک در شکل گیری مقاومت کلی نقش خود را دارند؛ اثرات شدید محیطی بر بروز علائم بیماری بویژه در شرایط مزرعه؛ و نهایتاً دشواری در تعیین فنوتیپ مقاومت که توسط آلل‌های R کوچک اثر و منفرد منتقل می‌شود.

RMR و QR دو مکانیزم مقاومت متمایز نیستند و این تصور که RMR داری مقاومت کامل و اختصاصی که در مرحله‌ی گیاهچه‌ای بیان می‌شود و در مقابل QR دارای مقاومتی ناقص، غیراختصاصی که در مرحله‌ی بلوغ بیان می‌شود، باید کنار گذاشته شود، زیرا شواهد زیادی به نادرست بودن این توصیفات تعمیم یافته، اشاره می‌کند. فنوتیپ‌های مقاومت ساق سیاه، گاهی بعنوان یک صفت کمی در نظر گرفته می‌شوند که صرفاً براساس بیان ناقص یا فنوتیپ مقاومت متوسط مشاهده شده در ساقه یا کوتیلدون است، اما این نیز نادرست است. در مطالعه‌ی صفات کمی می‌بایست ژنوتیپ را مورد توجه قرار داد و نه فنوتیپ را. RMR و QR براساس ژنتیک کنترل کننده‌ی این صفات تعریف می‌شوند، خواه تک لوکوس و یا چندین لوکوس در بروز فنوتیپ نقش داشته باشند. این مورد مستلزم بررسی نسل‌های درحال تفکیک (هم در میزبان و هم در پاتوژن) و همچنین تعیین تغییرات گسسته (مونوژنیک) و پیوسته (پلی ژنیک) فنوتیپ مقاومت در میزبان می‌باشد. هدف از نقشه یابی QTL این است که تنوع غیر مندلی پیوسته را به فاکتورهای مندلی گسسته تفکیک کند (۱۰۰)، (یعنی تفکیک QR به مجموعه‌ای از R ها) و این مورد مانع قرار گرفتن QTLهای تعریف شده تحت تاثیر نظریه ژن برای ژن نمی‌شود.

بیماری‌زایی قارچ فوما: میدان جنگ برای تاج و تخت

آلودگی براسیکا توسط فوما با جوانه زنی هاگهای قارچ بر روی کوتیلدون و برگ آغاز می‌شود، طی مراحل اوایله بیوترفیک که قارچ به فضای آپوپلاستی برگ هجوم می‌آورد، بیماری پیشروی می‌کند (شکل ۲). پیشروی بیماری بدون بروز علائم از طریق رشد هیف از طریق دمبرگ و ساقه و نهایتاً رسیدن به تاج ساقه شکل می‌گیرد. بنابراین سرکوب یا فرار از سیستم‌های تدافعی میزبان در چندین مرحله از فرایند آلودگی برای تکمیل چرخه‌ی زندگی فوما ضروری می‌باشد.

تقابل فوما و کلزا (*B. napus*) مدلی بالقوه، با تعداد زیادی جفت‌های Avr-R کلون شده، برای بررسی برهمکنش‌های ژن برای ژن در سطح مولکولی می‌باشد. در حال حاضر یازده ژن غیر بیماری‌زا (عملگر[3]) از *L. maculance* کلون شده است که بیش از هر قارچ پاتوژن گیاهی آپوپلاستی دیگریست که تا به امروز شناسایی شده است (۲۴-۱۱۵) و ژن‌ها شامل چهار لوکوس Avr می‌باشد که عملگرها را برای پنج ژن مقاومت کد می‌نمایند. تمام عملگرها منطقه‌ای بخصوصی را برای مقابله با ژن‌های غیر بیماری‌زا تشخیص می‌دهند. از ویژگی‌های این منطقه می‌توان به کوچکی، اختصاصی، غنی از اسیدآمینه‌ی سیستئین و مستقر در ناحیه غنی از بازهای آدنین و تیمین در ژنوم قارچ فوما اشاره کرد (۱۳۴). اگر چه عملگرها در منطقه‌ی خاصی با پروتئین‌های غیر بیماری‌زا برخورد می‌کنند، اما در برهمکنش با میزبان‌های گیاهی متفاوت هستند و نظریه فلور (ژن برای ژن) را به چالش می‌کشد. در میان عملگرهای Avr، برخی وجود دارند که مطابق نظریه‌ی ژن برای ژن با یکدیگر برهمکنش دارند، بعنوان مثال AvrLm2 با تک ژن R (Rlm2 در میزبان) شناسایی می‌شود. در این سناریو، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی درون ناحیه‌ی کد کننده‌ی AvrLm2، پروتئین بیماری‌زایی تولید می‌کند که دیگر توسط Rlm2 شناسایی نمی‌شود (۴۰). به هر حال دامنه‌ای از برهم کنش‌های ژن در برابر ژن معمول تر نیز وجود دارد. شرایطی وجود دارد که دو ژن Avr، AvrLm10a و AvrLm10b برای تحریک RMR توسط تک ژن مقاومت، Rlm10 مورد نیاز می‌باشد (۱۰۱). در این سناریو ژن مقاومت متناظر باید کلون شده باشد و هیچ نقشه‌ی ژنتیکی برای لوکوس گزارش نشده است، بنابراین ممکن است دو ژن مقاومت مرتبط، در برهمکنش نقش داشته باشند. بعلاوه شرایطی وجود دارد که تک ژن Avr مثل

3. Effector

AvrLm1-Lep3، توسط دو ژن مقاومت جداگانه، Rlm1 و LepR3 شناسایی شده است و حذف ژن AvrLm1-Lep3 مانع تشخیص پاتوژن توسط هر دو پروتئین R می‌شود. (۴۳-۷۲). در این سناریو دو ژن R در کروموزوم‌های متفاوت (بترتیب بر روی A07 و A10) درون ژنوم A در *B. napus* درون ناحیه‌ی ژنومی قرار دارند که هیچ همولوژی مشخصی را به اشتراک نمی گذارند (۵۲)، در این مورد سیر تکاملی همگرای مستقل دو لوکوس R جداگانه در جهت تشخیص Avr خاص پیشنهاد می‌شود. اگر چه شرایط گزارش شده است که در دیگر گونه‌هایی که دو R یک Avr خاص را شناسایی می کنند، نظیر ژن Pia در *Magnaporthe oryzae* (۹۶)، در این سناریو هر دو ژن برای تشخیص باید حضور داشته باشند. طبق گزارشات اخیر تنها *B. napus* به داشتن دو R مستقل، برای تشخیص Avr خاص نیاز دارد.

علاوه بر برهمکنش‌های ژن برای ژن، برهمکنش‌های اپیستاتیک نیز میان ژن‌های Avr رخ می‌دهد. لوکوس غیر بیماری‌زای AvrLm4-7 پروتئین AvrLm4-7 را تولید می‌نماید که هم بوسیله‌ی Rlm4 و هم Rlm7 تشخیص داده می‌شود، ولی لوکوس غیر بیماری‌زای AvrLm7 تنها توسط Rlm7 تشخیص داده می‌شود (۴۶-۹۹). وقتیکه پروتئین‌های AvrLm4-7 یا AvrLm7 حضور داشته باشند، بر AvrLm3 و AvrLm5-9 اپیستازی دارند، در نتیجه برهمکنش‌های AvrLm3-Rlm3 و AvrLm5-9–Rlm9 پوشانده می‌شود (۴۱-۱۰۳). بنابراین وقتیکه جدایه‌ای دارای AvrLm4-7 باشد، بدون در نظر گرفتن ژنوتیپ‌های AvrLm3 و AvrLm5-9 از نظر فنوتیپی بر Rlm3 و Rlm9 خاصیت بیماری‌زایی دارند.

برهمکنش پروتئین‌های غیربیماری‌زا

تا به امروز تنها میزبان هدف و عملکرد بیماری‌زایی برای پروتئین موثر[4] AvrLm1 در *L. maculance* شناسایی شده است (۸۸). سیستم غربالگری دوهیبریدی مخمر[5] مشخص کرده است که AvrLm1 با MAPK9 در *B. napus* برهمکنش دارد، که با رسوب همزمان[6] و سنجش تکمیلی فلورسانس دو مولکولی[7] تائید شده است. اتصال AvrLm1 نتیجه‌ی پایداری و فسفریلایون MPK9 است. بیان موقتی MPK9 در *Nicotiana benthamiana* منجر به مرگ سلولی می‌شود، تظاهری که در حضور AvrLm1 افزایش می‌یابد. بنابراین AvrLm1 با القای مرگ سولی به واسطه‌ی MPK9 به بیماری‌زایی قارچ فوما در مرحله‌ی نکروترفیک کمک می‌کند، که با اوج بیان AvrLm1 (۶-۴ روز بعد از آلودگی) در گیاه منطبق است. تراریخته‌های فوق بیان MPK9 در *B. napus* نسبت به *L. maculans* حساس‌تر هستند.

چالش‌های در ارتباط با پروتئین‌های عملگر در پاتوژن‌های گیاهی در طی آلودگی تا حدودی به دلیل عواملی نظیر حساسیت روش‌های تشخیص، سطح بیان کم یا موقتی عملگرها، تغییرات پس از ترجمه و پایداری پروتئین‌های عملگر می‌باشد. رویکردهای مستقل از پاتوژن (بعنوان مثال بیان موقت ژن‌های موثر در گیاه) برای تعیین مکان سلولی پروتئین‌های عملگر نظیر AvrLm4-7 (۱۵) بکار گرفته شده است. Blondaeu و همکاران (۱۵) گزارش کردند که AvrLm4-7 در سیتوپلاسم قرار دارد و بر این اساس پیشنهاد کردند که Rlm4 و Rlm7 احتمالاً ژن‌های مقاومت سیتوپلاسمی هستند. به هر حال همانطور که اخیراً گزارش شد (۴۶) Rlm4 و Rlm7 گیرنده‌های WAKL خارج سلولی اند و اگر چه این مورد دلیل محکمی بر سیتوپلاسمی بودن محل AvrLm4-7 نیست، ولی به احتمال قوی آپوپلاست بعنوان محل رویارویی AvrLm4-7 با Rlm4 و Rlm7 پیشنهاد می‌گردد. در نتیجه‌گیری

[4] Effector
[5] Yeast two-hybrid (Y2H) screening
[6] coimmunoprecipitation (Co-IP)
[7] bimolecular fluorescence complementation assays

در مورد تعیین مکان مستقل پاتوژن[8]، می‌بایست بیشتر بررسی شود، زیرا کاربرد این روش برای تعیین محل عملگرهای پاتوژن‌های گیاهی رشته‌ای نتایج گمراه کننده‌ای را بهمراه دارد (۱۴۲).

اثر پوششی AvrLm4-7 بر AvrLm3 و AvrLm5-9 بطور عملی تائید شده است (۴۱، ۱۰۳). اما در سطح مولکولی هیچ برهمکنش مستقیمی میان AvrLm5-9 و Rlm9، AvrLm4-7 و Rlm9، یا AvrLm4-7 و AvrLm3 یا AvrLm5-9 مشخص نشده است، از این رو پیشنهاد می‌شود که مولکول حد واسطی در میزبان مسئول این اتفاق باشد (۴۱، ۷۹، ۱۰۳). بطور مشابه تلاش برای شناسایی برهمکنش مستقیم میان عملگر و پروتئین‌های

مقاومت با استفاده از سیستم دو هیبریدی مخمر و رسوب همزمان در پروتئین‌های گیاهی که بطور موقت بیان شده‌اند یا شناسایی دیگر هدف‌های میزبان از چندین پروتئین عملگر شامل AvrLm2، AvrLm3، AvrLm4-7، AvrLm5-9 بی نتیجه بوده است. در برخی موارد، تشخیص اثرگذار RLP در آپوپلاست توسط پروتئین‌های ترشح‌شده توسط میزبان در آنچه که مدل نگهبان نامیده می‌شود، واسطه می‌شود (۳۰، ۶۶، ۱۳۸). تشخیص AvrLm1- Lep3 و AvrLm2 بترتیب بوسیله‌ی LepR3 و Rlm2، ممکن است به پروتئین حدواسط نیاز داشته باشد، که به موجب آن RLP ها به پروتئین‌های آپوپلاستی میزبان، بعد از غیرفعال شدن شان توسط عملگرهای *L. maculance* متصل می‌شوند نه از طریق تعامل مستقیم.

توالی نوکلئوتیدی مشابهی میان AvrLm4-7، AvrLm5-9 و AvrLm3 وجود ندارد، ولی بر پایه‌ی تحقیقات اخیر مشخص شده است که این سه پروتئین غیر بیماری‌زا علاوه بر یکدیگر با دیگر عوامل بیماری‌زا از سایر گونه ها نظیر Ecp11-1 و پروتئین عملگر از *Fulvia fulva* (عامل کپک فولویایی در گوجه فرنگی)، شباهت ساختاری دارند (۷۹). Lazar et al (۷۹) نشان دادند که این شباهت ساختاری عملگر از دیگر گونه‌ها می‌تواند به AvrLm3 در تشخیص Rlm3 کمک کند، اما این تشخیص می‌تواند بوسیله‌ی AvrLm4-7 پوشانده شود. جالب این که در این شرایط برهمکنش Rlm5–AvrLm5 بوسیله‌ی AvrLm4-7 پوشانده نمی‌شود. با وجود اینکه مکان ژنی AvrLm5-9 مسئول پروتئین‌های AvrLm5 و همچنین AvrLm5-9 است. این مورد پیشنهاد می‌کند که AvrLm4-7 می‌تواند برخی از اجزای کمپلکس سیگنال WAKL [9]را که اختصاصی Rlm3 و Rlm9 هستند را مختل نماید. Rlm4 و Rlm7 می‌توانند در تشخیص اجزای مختل شده بکار گرفته شوند، در حالیکه Rlm5 به نوعی درگیر این اختلال نمی‌شود. در عوض، Rlm5، شناسایی شده در B. juncea (۸، ۲۷) ممکن است نوع متفاوتی از ژن مقاومت را کد کنند و همانطور که در LepR3 و Rlm1 دیده می‌شود، نوع دیگری از تکامل ژن مقاومت را در جهت تشخیص همان Avr ارئه نماید.

منبع:

Hossein Borhan, M., Van de Wouw, A P., and Larkan, N J. 2022. Molecular Interactions Between *Leptosphaeria maculans* and *Brassica* Species. Annual Review of Phytopathology. 60: 237-257.

[8] pathogen-independent localization

[9] wall-associated kinase-like