دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا:۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال دهم، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۳۹۹
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 10(1), 2021

Research Article

The relationship between potato resistance to bacterial soft rot and expression of three PR genes

HOSSEIN PASALARI✉
Department of Agriculture, Minab Higher Education Center,
University of Hormozgan, Bandar Abbas, Iran

Received: 13.12.2020 Accepted: 20.07.2021

Pasalari H (2021) The relationship between potato resistance to bacterial soft rot and expression of three PR genes. Plant Pathology Science 10(1):76-85. Doi: 10.2982/PPS.10.1.76.

Abstract

Introduction: Changes in the resistance to bacterial soft rot in potatoes can be linked to the expression of pathogenesis-related (PR) genes. The aim of this study was to investigate the relationship between the accumulation of PR genes and the induction of resistance through infection of potato tuber cells with pathogenic bacteria at different temperatures in order to effectively combat bacterial soft rot disease in potatoes. **Materials and Methods:** *Pectobacterium carotovorum* 2A, *Pectobacterium atrosepticum* 36A, and *Dickeya dadantii* ENA49 were used in this study. For bacterial infection, the potato cultivars semi-resistant cultivar Scarab and susceptible cultivar Vesnianka, were used. The factorial experiment with three replications was carried out according to a completely randomized design. The relative level of mRNA copies of PR genes was determined by RT-PCR using primers of these genes. The mean values were compared according to the LSD test. **Results:** The experiments demonstrated the induction of PR-3, PR-5t and PR-10 in potato tuber cells in response to infection with *P. carotovorum* 2A, *P. atrosepticum* 36A and *D. dadantii* ENA49. It has been shown that the degree of induction of resistance genes depends on the temperature and the potato cultivar. **Conclusion:** It can be concluded that significant changes in potato resistance to bacterial soft rot at temperatures of 28 and 33 ° C are associated with the expression of these PR genes.

Key words: *Dickeya*, *Pectobacterium*, Scarab, Vesnianka

✉ hossein.pasalari @Hormozgan.ac.ir

مقاله پژوهشی

رابطه بین مقاومت سیب‌زمینی به پوسیدگی نرم باکتریایی و بیان سه ژن PR

حسین پاسالاری

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

دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۹

پاسالاری ح (۱۳۹۹) رابطه بین مقاومت سیب‌زمینی به پوسیدگی نرم باکتریایی و بیان سه ژن PR. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۰(۱): ۸۵-۷۶. .Doi: 10.2982/PPS.10.1.76

چکیده

مقدمه: تغییر در مقاومت سیب‌زمینی به پوسیدگی نرم باکتریایی ممکن است با بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی(PR) ارتباط داشته باشد. هدف از اجرای این پژوهش بررسی رابطه بین سطح بیان سه ژن PR و القای مقاومت در نتیجه آلوده‌سازی سلول‌های بافت غده‌ای سیب‌زمینی با باکتری‌های بیمارگر در دماهای مختلف به منظور مهار مؤثر بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی بود. **مواد و روش‌ها:** باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum* 2A ، *Pectobacterium atrosepticum*36A و *Dickeya-dadantii* ENA49 انتخاب شدند. رقم‌های سیب زمینی اسکارب نیمه‌مقاوم به بیماری و ویسنیانکا حساس به بیماری، نیز برای آلودگی با باکتری‌ها انتخاب شدند. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تعداد نسخه‌های بیان شده mRNA از ژن‌های PR از طریق PCR در زمان واقعی با کمک آغازگرهای مربوط به این ژن‌ها تعیین شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام شد. **یافته‌ها:** میزان بیان ژن‌های PR-3، PR-5t و PR-10 در سلول‌های غده‌های سیب‌زمینی در پاسخ به آلودگی به *P. carotovorum* 2A، *P.* 36A *atrosepticum* و *D. dadantii* ENA49، به دما و رقم سیب زمینی بستگی داشت. **نتیجه‌گیری:** تغییرات معنی‌دار در مقاومت سیب‌زمینی به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی در دماهای ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس با سطح بیان این سه ژن PR وجود دارد.

واژگان کلیدی: *Dickeya*, *Pectobacterium*, Scarab, Vesnianka

مقدمه Introduction

سیب‌زمینی نقش مهمی در تغذیه مردم جهان دارد و از نظر مقدار تولید، چهارمین محصول جهان پس از گندم، برنج و ذرت است که تقریباً در همه نقاط کره زمین کشت می‌شود (Hoque 2010). این محصول استراتژیک در طول دوران رشد و پس از برداشت با مشکلات عدیده‌ای مواجه می‌شود که از جمله آن‌ها بیماری‌های باکتریایی هستند که می‌توانند خسارت زیادی به آن وارد کنند

(Moslemkhani and Mozafari 2016). باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum*، *Pectobacterium atrosepticum* و *Dickeya dadantii* این توانایی را دارند که باعث ایجاد تخریب بافت سیب‌زمینی در گونه‌های مختلف، در طول فصل رشد و در طول انبار شوند. یکی از ویژگی‌های باکتری‌های مذکور، توانایی ترشح تعدادی آنزیم تجزیه کننده خارج سلولی (پکتولیتیک و پروتئولیتیک) است که به عنوان فاکتورهای بیماری‌زایی این باکتری‌ها عمل می‌کنند (Tratsiakova 2011). سلول‌های گیاهی قادر به درک نشانه‌های میکروبی تحت عنوان الگوهای مولکولی همراه بیمارگر هستند. این الگوهای مولکولی بیمارگری به‌وسیله گیرنده‌های تشخیص الگوی گیاه قابل شناسایی هستند. تشخیص الگوهای مولکولی همراه بیمارگر به وسیله گیرنده‌های تشخیص الگوی گیاه، باعث حفاظت گیاه در مقابل بیمارگرهای غیر میزبان و همچنین موجب محدودکردن بیماری‌هایی می‌شود که به وسیله بیمارگرهای پرآزار ایجاد می‌شوند (Sadravi 2012). از طرف دیگر، بیمارگرها می‌توانند با واردکردن پروتیین‌های مؤثر خود به داخل میزبان از وقوع واکنش‌های دفاعی توسط گیاه جلوگیری کنند و در مقابل، گیاهان نیز با استفاده از ژن‌های مقاومت یا ژن‌های R (Resistance genes) به صورت مستقیم یا غیرمستقیم باعث ممانعت از عمل پروتیین‌های مؤثر بیماریزایی بیمارگرها می‌شوند (Gholamnezhad 2017). همچنین این پاسخ‌های دفاعی می‌توانند به وسیله واکنش فوق حساسیت یا HR (Hypersensitive Reaction) و سیستم مقاومت اکتسابی یا SAR (Systemic Acquired Resistance) نیز تشدید شوند (Yasuda et al. 2008). یکی از مشکلات واقعی ژنتیک مولکولی نوین، مطالعه سازوکارهای تنظیم کننده فعالیت ژن‌ها به‌ویژه ژن‌های پاسخ دفاعی گیاهان می‌باشد. هنگامی که یک گیاه به‌وسیله بیمارگر مورد هجوم قرار می‌گیرد، سیستم پیچیده‌ای از پاسخ دفاعی گیاه فعال می‌شود. در این حالت، برنامه‌ریزی مجدد بیان ژن‌های مختلف در سلول‌ها آغاز می‌شود که منجر به فعال شدن بیان آبشار ژن‌های واکنش محافظتی و خاموش شدن ژن‌های دیگری می‌شود که در این پاسخ نقش ندارند (Liu 2010). مطالعه ویژگی‌های عملکرد این ژن‌ها نشان داد که در میان پروتیین‌های زیادی که در ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه نقش دارند، پروتیین‌های مرتبط با بیماری‌زایی(PR) نقش مهمی دارند. پاسخ گیاه به بیمارگرها با تجمع پروتیین‌های PR مرتبط است (Van Loon et al. 2011). ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، یک گروه خاص از پروتیین‌های محافظ هستند که در پاسخ به تأثیرات تنش‌زا و عفونت بیمارگرها بیان می‌شوند. پروتیین‌های PR در بسیاری از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند و در حال حاضر پروتیین‌های توصیف شده به ۱۷ خانواده اختصاص یافته است (Van Loon et al. 2011). رابطه بین تجمع پروتیین‌های PR و مقاومت اکتسابی سیستمیک در گیاهان، منجر به این فرض شده است که بیان این ژن‌ها به عنوان نشانگرهای این مقاومت محسوب می‌شود و نشان داده شده است که انباشت این پروتیین‌ها با توسعه مقاومت به دست آمده در گیاه ارتباط دارد (Van Loon et al. 2011). نشان داده شده که

سطح بیان ژن‌های PR-1، PR-3 و PR-5 در گیاهان سیب‌زمینی به مقاومت آن‌ها در برابر قارچ *Phytophthora infestans* ارتباط دارد. همچنین، نشان داده‌شده است که موقع آلوده‌شدن گیاهان سیب‌زمینی به باکتری‌های بیماری‌زای *Pectobacterium atrosepticum* 21A و *Dickeya dadantii* ENA49، گیاه با بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و ژن‌های پاسخ دفاعی و با ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمی (SAR) در برابر هجوم بیمارگر واکنش نشان می‌دهد (Pasalari and Evtushenkov 2016). هدف از اجرای این پژوهش بررسی رابطه بین سطح بیان سه ژن PR و القای مقاومت در نتیجه آلوده‌سازی سلول‌های بافت غده‌ای سیب‌زمینی با باکتری‌های بیمارگر در دماهای مختلف به منظور مهار مؤثر بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی بود.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

انتخاب رقم‌های سیب زمینی و سویه‌های باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم

باکتری‌های *P. carotovorum* 2A، *P. atrosepticum* 36A و *D. dadantii* ENA49 از کلکسیون باکتری‌های بخش زیست مولکولی دانشگاه دولتی روسیه سفید (بلاروس) انتخاب شدند. رقم‌های سیب زمینی اسکارب (Scarb) نیمه مقاوم و ویسنیانکا (Vesnianka) حساس به این باکتری‌ها از موسسه تحقیقاتی سیب‌زمینی و سبزیجات آکادمی ملی بلاروس نیز انتخاب شدند (Pasalari 2020, Retyakova and Evtushenkov 2010). برای رشد سویه‌های باکتری‌ها از محیط LB با ترکیبات (پپتون ده گرم، عصاره مخمر پنج گرم، سدیم کلرید پنج گرم و آب مقطر سترون تا حجم یک لیتر) استفاده شد. از محلول فیزیولوژیکی سدیم کلرید ۰/۸۵ درصد پس از اتوکلاو نمودن، برای رقیق‌سازی و رشد و رسوب جسم سلولی باکتری‌ها استفاده شد. باکتریها به مدت بیست ساعت در محیط LB در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شدند. غده‌های سیب‌زمینی که پس از برداشت به‌وسیله الکل ضدعفونی شده بودند به کمک اسکالپل سترون، تکه‌هایی به اندازه یک در یک سانتی‌متر و ضخامت تقریباً هیجده میلی‌متر برداشته شد. ده تکه از بافت غده‌ای سیب‌زمینی در داخل هر تشتک پتری روی فیلتر سترون قرار داده شد. ده میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها (تقریباً 2×10^7 CFU/ml) که توسط محلول فیزیولوژیکی کلریدسدیم سترون، رقیق شده بود، بر روی سطح آسیب دیده دیسک‌ها که بوسیله اسکالپل سترون ایجاد زخم شده بود، قرار داده شد (Tratsiakova 2011) و سپس دیسک‌ها به مدت ۲۴ ساعت با دمای ۱۸ درجه سلسیوس (شاهد)، ۲۸ درجه سلسیوس و ۳۳ درجه سلسیوس در تشتک پتری سترون نگه‌داری شدند. آزمایش به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی با سه تکرار از نمونه‌های موردآزمایش و نمونه‌های شاهد انجام شد. به عنوان شاهد از دیسک‌های غده‌ای سیب‌زمینی رقم‌ها موردنظر که بوسیله باکتری‌های فوق آلوده نشده بودند و تحت

دماهای ۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس انکوبه شده بودند، استفاده شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

استخراج RNA از بافت غده‌های سیب‌زمینی و سنتز cDNA

صد میلی‌گرم از بافت غده‌های سیب‌زمینی (در هر تیمار با سه تکرار) با نیتروژن مایع به صورت پودر درآمده و به لوله‌های اپندورف منتقل شدند. سپس، استخراج RNA کل از این موادگیاهی با استفاده از کیت تجاری (Macherey-Nagel، آلمان) NucleoSpin RNA Plant و طبق دستورالعمل شرکت سازنده آن انجام شد. از RNA کل جدا شده برای سنتز cDNA با استفاده از کیت تجاری سنتز cDNA (RevertAidTM First Strand Fermentas، لیتوانی) مطابق دستورالعمل سازنده استفاده شد. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در زمان واقعی (RT-PCR) با جفت آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن و یک جفت کنترل داخلی (EF-1α) در دستگاه DT-96 (DNA-Technology، روسیه) انجام شد (جدول ۱). هر واکنش ۲۰ میکرولیتری، شامل ۱ میکرولیتر مسترمیکس سایبرگرین (20X) (Amplicon, Denmark)، ۰/۲ میکرولیتر از هر آغازگر (۲ میکرومولار غلظت نهایی)، ۱۰/۹ میکرولیتر آب تیمار شده با دپس (DEPC water) و ۱ میکرولیتر سی‌دی‌ان‌ای الگو (۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر)

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش

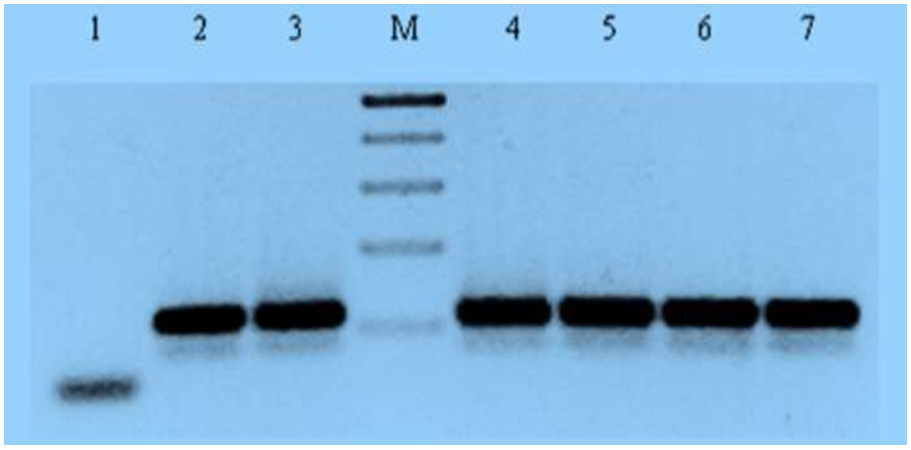
Table 1. Characteristics of the primers used in this research

آغازگر Primers	توالی آغازگرها Primer sequences	دمای انیلینگ Annealing	اندازه قطعه تکثیرشده Amplicon size	منبع آغازگر Primer source
PR-3-Potato	StPR3f ATAAGCCATCATGCCACAACG StPR3r GCAGTATTCGGACCCATCCC	56 °C	<110 bp	Tratsiakova 2011
PR-5-Potato (Thaumatin)	StPR5tf ATCTCCCGTCTCGCATTTGC StPR5tr GGGCCAAACTTGGAACCTTAATG	60 °C	<110 bp	Tratsiakova 2011
PR-10	LePR10f2 TATGAGTCAACAACAATTTCCC LePR10r TGGACCACCTTCAACAAAGTTC	60 °C	<110 bp	Tratsiakova 2011
EF-1α	StEF1αf TTGATGCTCTTGACCAGATTAACG StEF1α2r ACGGGCACAGTTCCAATACC	56 °C	~1100 bp	Tratsiakova 2011

بود. برنامه چرخه دمایی عبارت بود از: واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه سلسیوس ۵ دقیقه همراه با ۳۴ چرخه شامل ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، ۵۶-۶۰ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سلسیوس ۴۵ ثانیه. پس از آخرین چرخه، مخلوط به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس همراه با یک آنالیز منحنی ذوب آغازگرها که از ۵۰ تا ۹۴ درجه سلسیوس بود، نگهداری شد. جفت آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش (جدول ۱) مربوط به ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی سیب‌زمینی بودندکه از شرکت اپرون Eurofins MWG Operon-Company (Ebersberg, Germany) سفارش داده شد. مقدار نسبی کپی‌های mRNA توسط فرمول $N(mRNA)=2^{(\Delta Ct- \min(\Delta Ct))}$ تعیین شد (Livak and Schmittgen 2001).

یافته‌ها Results

آنالیز PCR نمونه‌های cDNA جداشده و سنتزشده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی از جهت بیان ژن‌های پاسخ دفاعی سیب‌زمینی، قطعاتی در حدود کمتر از ۱۱۰ جفت باز بر روی ژل آگارز ۱٪ (w/v) برای ژن‌های PR-3، PR-5 و PR-10 را نشان داد (شکل ۱).



شکل ۱. آنالیز PCR نمونه‌های cDNA جداشده و سنتزشده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی. لاین ۱- کنترل منفی، لاین ۲ و ۳- قطعه cDNA سنتزشده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی با ژن *PR-3*، لاین ۴ و ۵- قطعه cDNA سنتزشده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی با ژن *PR-5*، لاین ۶ و ۷ - قطعات cDNA سنتزشده از بافت غده‌ای سیب‌زمینی با ژن *PR-10* - لاین M (1kb DNA ladder Mix, Fermentas).

Figure 1. PCR analysis of cDNA isolated and synthesized from the tuber disc of potato. - Line 1 – negative control; Line 2,3 – the synthesized cDNA fragment of tuber disc of potato with the *PR-3*; Line 4,5 – the synthesized cDNA fragment of tuber disc of potato with the *PR-5*; Line 6,7 – the synthesized cDNA fragment of tuber disc of potato with the *PR-10*; Line M – Molecular DNA weight markers (1 kb DNA ladder Mix, Fermentas).

مقدار بیان ژن‌های PR-3، PR-5t و PR-10 در سلول‌های بافت غده‌های سیب‌زمینی رقم‌های اسکارب و ویسنیانکا که تحت دماهای مختلف (۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس) با باکتری‌های فوق مایه‌زنی شده بودند، محاسبه و تعیین شد. در جداول ۲ و ۳ مقدار متوسط سطح بیان ژن‌ها در سه تکرار با خطای استاندارد نشان داده شده است. بیشترین مقدار بیان ژن برای ژن *PR-3* در رقم اسکارب تحت آلودگی با باکتری *Pc* با انکوباسیون در دمای ۱۸ درجه سلسیوس اتفاق افتاد. بیان ژن *PR-3* در رقم اسکارب با افزایش دما، نسبت به شاهد افزایش پیدا کرد. همچنین، بیان ژن *PR-5t* در رقم *اسکارب* با افزایش دما، افزایش پیدا کرد و این افزایش نسبت به سطح بیان آن در رقم *ویسنیانکا* بالاتر بود. بالاترین سطح بیان ژن‌ها برای ژن *PR-3* در اثر آلودگی سلول‌های غده‌ای رقم *ویسنیانکا* با سویه‌های باکتری‌های *Pc* 2A و *Pa* 36A تحت دماهای ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس اتفاق افتاد. ژن *PR-10* در سطح بالایی در سلول‌های غده‌ای رقم *ویسنیانکا* در دمای ۱۸ درجه سلسیوس بیان شد. تحت دماهای بالاتر، بیان این ژن کمی کاهش پیدا کرد (جداول ۲ و ۳).

جدول ۲. سطح بیان ژن‌های *PR*-3، *PR*-5t و *PR*-10 در سلول‌های غده‌ای سیب‌زمینی رقم ویسنیانکا، که در دماهای ۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس با استرین‌های باکتری‌های *Pc*، *Pa* و *Dd* آلوده شده بودند. برای شاهد، از سلول‌های غده‌ای آلوده نشده با باکتری‌ها و انکوبه شده در دماهای ۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس استفاده شده بود*.

Table 2. Expression levels of genes *PR*-10, *PR*-5t, *PR*-3 in tuber discs, of potato cultivar, Vesnianka (Relative value of mRNA copies), under temperatures of 18, 28 and 33 °C, infected with strains of *Pc*, *Pa* and *Dd*. For control was been used of tuber discs, not infected with bacteria and incubated under temperatures of 18, 28 and 33 °C*.

Gene	Control			Infected with *Pc* 2A			Infected with *Pa* 36A			Infected with *Dd* ENA49		
	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C
PR-3	22.7	10.5	5.5	52.0 a	49.5ab	10.6bc	104.0a	99.0ac	78.8c	27.9a	10.8ab	11.3c
PR-5t	0.01	1.1	7.2	0.5 a	0.3 ab	9.8b	1.6 a	0.4 ac	2.6 ab	0.4a	0.2 ab	3.7 c
PR-10	51.2	40.5	1.1	100.9 a	2.7 ab	1.0 ac	116 b	0.5 ab	4.6 bc	84.4 a	0.8 ac	4.0 ab

* میانگین‌های دارای یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد در آزمون LSD ندارند.

*Means followed by the same letter in the columns are not significantly different according to LSD test ($p<0.05$)

جدول ۳. سطح بیان ژن‌های *PR*-3، *PR*-5t و *PR*-10 در سلول‌های غده‌ای سیب‌زمینی رقم اسکارب، آلوده شده با باکتری‌های *Pc*، *Pa* و *Dd*، تحت دماهای ۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس برای شاهد، از سلول‌های غده‌ای آلوده نشده با باکتری‌ها و انکوبه شده در دماهای ۱۸، ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس استفاده شده بود*.

Table 3. Expression levels of genes *PR*-10, *PR*-5t, *PR*-3 in tuber discs, of potato cultivar, Scarb(Relative value of mRNA copies), under temperatures of 18, 28 and 33 °C, infected with strains of *Pc*, *Pa* and *Dd*. For control was been used of tuber discs, not infected with bacteria and incubated under temperatures of 18, 28 and 33 °C*.

Gene	Control			Infected with *Pc* 2A			Infected with *Pa* 36A			Infected with *Dd* ENA49		
	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C	18°C	28°C	33°C
PR-3	9.7	33.05	43.5	38.9ab	5.3ab	4.8ac	29.9a	54.2ab	21.9ac	3.2b	36.8ab	32.4bc
PR-5t	1.1	5.5	19.2	3.7a	1.4ac	10.9b	3.7a	2.5ab	35.5c	1.0a	29.9ab	39.5c
PR-10	2.50	2.5	2,1	2.8b	0.03bc	0.1ab	10.6a	0.3ab	0.2ac	2.0b	0.03ab	11.7ab

*در هر ستون میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند.

* Means followed by the same letter in the columns are not significantly different according to LSD test ($p<0.05$).

بحث Discussion

پژوهشی نشان داده بود که غده‌های سیب‌زمینی رقم اسکارب نسبت به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی در مقایسه با رقم ویسنیانکا زمانی که به باکتری‌های بیماری‌زا آلوده می‌شوند، مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Retyakova and Evtushenkov 2010)، لذا در این پژوهش از این رقم‌ها برای مقایسه سطح بیان برخی از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و ارتباط بین بیان این ژن‌ها با القای مقاومت نسبت به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی که می‌تواند به وسیله این باکترها در دمای بهینه برای رشد آنها ایجاد شود، استفاده شد. دمای بهینه برای رشد این باکتری‌ها ۲۸ درجه سلسیوس تعیین شده بود اما این تحقیق نشان داد که در دماهای ۳۳ و ۱۸ درجه سلسیوس نیز سلول‌های این باکتری‌ها قادر به رشد هستند، لذا در مقدار بالا و پایین‌تر از دمای بهینه نیز مقدار بیان ژن‌های فوق اندازه‌گیری و تعیین شد (جدول‌های ۲ و ۳). نشان داده شد که اختلاف درجه مقاومت سیب‌زمینی به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی می‌تواند به سطح بیان ژن‌های PR ارتباط داشته باشد، همانطور که این حالت در اثر آلودگی سیب‌زمینی‌های مذکور با قارچ *Phytophthora infestans* (Masuda et al. 2001) و نیز روی رقم Vetraz سیب‌زمینی (Pasalari and Evtushenkov 2016) نیز رخ داده است.

آلودگی بافت‌های غده‌ای سیب‌زمینی با بیان همه ژن‌های مطالعه شده اتفاق افتاد و نشان داد که این سطح بیان ژن‌ها به دما، رقم سیب‌زمینی و سویه باکتری‌ها بستگی دارد. بیشترین سطح بیان ژن برای ژن PR-3 در رقم اسکارب در اثر آلودگی با سویه‌های 2A و 36A باکتری‌های *P. atrosepticum* و *P. carotovorum* اتفاق افتاده بود. ژن PR-10 در درجه بالایی در سلول‌های غده‌ای سیب‌زمینی رقم ویسنیانکا در دمای ۱۸ درجه سلسیوس القا شد. در دماهای بالاتر از ۱۸ درجه سلسیوس، بیان این ژن خیلی کاهش پیدا کرد. برای رقم *اسکارب* سطح القای ژن PR-5t به اندازه ۲-۳۰ بار نسبت به رقم ویسنیانکا در دماهای ۲۸ و ۳۳ درجه سلسیوس افزایش پیدا کرده بود. این میزان افزایش بیان ژن PR-5t با زمانی که سیب‌زمینی‌های مذکور به باکتری‌ها آلوده نشده بودند مقایسه شد که برای رقم اسکارب بالاتر از رقم ویسنیانکا بود، بنابراین می‌توان عنوان کرد که در رقم اسکارب مقاومت سیب زمینی به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی به افزایش سطح بیان ژن PR-5t همبستگی و ارتباط معنی‌دار دارد.

نتیجه‌گیری Conclusion

آزمایش‌های انجام شده، القای ژن‌های مقاومت PR-3، PR-5t و PR-10 را در سلول‌های بافت غده‌ای سیب‌زمینی در پاسخ به آلودگی با سویه‌های باکتریهای مولد پوسیدگی نرم نشان داد. درجه القای ژن‌های مقاومت بستگی به دما و رقم سیب‌زمینی دارد. در رقم اسکارب سطح بیان ژن PR-5t در اثر آلودگی با باکتری‌های مطالعه شده در مقایسه با رقم ویسنیانکا در همه دماهای اعمال شده کمی بیشتر بود، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که در رقم اسکارب که یک رقم نیمه‌مقاوم به باکتری‌های فوق می‌باشد، بین درجه القای ژن PR-5t و مقاومت سیب زمینی به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی وابستگی معنی‌داری وجود دارد.

منابع Refrences

Gholamnezhad J (2017) Plants defense mechanisms against pathogens. Plant Pathology Science 6:24-32. (In Persian with English Abstract).

Hoque ME (2010) *In vitro* tuberization in potato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Omics 3:7-11.

Liu J (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. Plant Cell Reports, 29:419-436.

Livak KJ, Schmittgen ThD (2001) Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta Ct}$ method. Methods 25:402-408.

Masuda S, Kamada H, Satoh S (2001) Chitinase in cucumber xylem sap. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 65:1883-1885.

Moslemkhani C, Mozafari J (2016) Management of bacterial wilt disease of potato by health assay of seed tubers. Plant Pathology Science 5:62-75. (In Persian with English Abstract).

Pasalari H (2020) Evaluating the resistance of potato tubers under different temperatures related to potato bacterial soft rot disease control. Plant Protection 43:35-44. (In Persian with English Abstract).

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 1:3-35. (In Russian).

Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, Lam E, Roby D (1998). Activation of hsr 203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. Molecular Plant-Microbe Interactions 11:544-554.

Sadravi M (2012) Application of genetic engineering in developing disease-resistant plants. Plant Pathology Science 1:1-9. (In Persian with English Abstract).

Retyakova OM, Evtushenkov AN (2010) Pectolytic and macerating activity of the strains of *Pectobacterium* carotovorum, *Pectobacterium atrosepticum* and *Dickeya dadantii* on the tissues of potato tubers. Potato-Growing: Proccedings 186-190.

Tratsiakova V (2011) Temperature dependence of PR genes expression and potato tissues maceration by strains *Pectobacterium* and *Dickeya*. Youth and Progress of Biology, Abstracts book of the VII International Scientific Conference of Students and PhD Students, Minsk, Belarus, P.141. (In Russian).

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2011) Significance of inducible Defense-related proteins infected plants. Annual Review of Phytopathology 44:135-162.

Yasuda M, Ishikawa A, Jikumaru Y (2008) Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid-mediated abiotic stress response in Arabidopsis. The Plant Cell 20:1678-1692.