دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال نهم، جلد ۲، بهار و تابستان ۱۳۹۹
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 9(2), 2020

Research Article

The expression level of genes encoding LysM-RLKs of potato after stimulation with chitin

ZAHRA MOHAMMADI, FARHAD NAZARIAN-FIROUZABADI✉, ZIBA NAZARI
Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 08.12.2020 Accepted: 12.22.2020

Mohammadi Z, Nazarian-Firouzabadi F, Nazari Z (2020). The expression level of genes encoding LysM-RLKs of potato after stimulation with chitin. Plant Pathology Science 9(2):37-50. DOI: 10.2982/PPS.9.2.37.

Abstract

Introduction: Lysine motif receptor-like kinases (LysM-RLKs) play an important role in the defense reaction of plants to diseases and environmental stresses. This study was conducted to investigate the effect of chitin as a stimulus for the expression of genes that encode LysM-RLKs. **Materials and Methods:** The expression levels of three genes PGSC0003DMP400010799, PGSC0003DMP400010800 and PGSC0003DMP400061331, which encoded LysM-RLKs due to chitin treatment (150 µg / ml) in young seven-week potato leaves of Jely cultivar, were examined in treated and control leaves. **Results:** Analysis of the gene expression data showed that the expression of all three genes increased significantly due to the use of chitin compared to the control. **Conclusion:** Increasing the expression of genes encoding LysM-RLKs using chitin can be effective to induce systemic resistance to plant diseases and environmental stresses.

Key words: Disease, Gene cascade, Gene Expression, Potato, Receptor Kinase

✉Corresponding author: nazarian.f@lu.ac.ir

مقاله پژوهشی

میزان بیان ژن‌های کدکننده LysM-RLKs سیب‌زمینی پس از القا با محرک کیتین

زهرا محمدی، فرهاد نظریان فیروزآبادی✉، زیبا نظری
گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۲ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۲

محمدی ز، نظریان فیروزآبادی ف، نظری ز (۱۳۹۹) میزان بیان ژن‌های کدکننده LysM-RLKs سیب‌زمینی پس از القا با محرک کیتین. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۹(۲):۵۰-۳۷.
DOI:10.2982/PPS.9.2.37.

چکیده

مقدمه: گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین (LysM-RLKs) سهم مهمی در مسیر پاسخ دفاعی گیاهان به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی دارند. این پژوهش برای بررسی تاثیر کیتین به عنوان محرک بیان ژنهای کدکننده LysM-RLKs انجام شد. **مواد و روش‌ها:** میزان بیان سه ژن PGSC0003DMP400010799،PGSC0003DMP400010800 و PGSC0003DMP400061331 کدکننده LysM-RLKs در اثر تیمار با کیتین (۱۵۰ µg/ml) در برگ‌های جوان سیب‌زمینی هفت هفته‌ای رقم Jely در برگ‌های تیمار شده و شاهد بررسی گردید. **یافته‌ها:** تجزیه و تحلیل داده‌های بیان ژن‌ها نشان داد که بیان هر سه ژن نسبت به شاهد به صورت معنی‌داری در اثر استفاده از کیتین افزایش می‌یابد. **نتیجه‌گیری:** افزایش بیان ژن‌های کدکننده LysM-RLKs با استفاده از کیتین می تواند در القای مقاومت سیستمیک به بیماری‌های گیاهی و تنش‌های محیطی مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: آبشار ژنی، بیان ژن، بیماری، سیب‌زمینی، گیرنده‌های کینازی

مقدمه Introduction

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*.L) از مهم‌ترین محصولات غذایی جهان با تولید ۳۳۰ میلیون تن در سال است (Faostat 2016). ایران با تولید بیش از ۱۳ میلیون تن در سال، سیزدهمین تولید کننده مهم این محصول در جهان است (Abedini et al. 2020). بیماری‌های مهمی مانند، پوسیدگی ریشه سیب‌زمینی (*Rhizoctonia solani*. Kühn)، پوسیدگی خشک (*Fusarium* spp)، سوختگی

✉نویسنده مسئول: nazarian.f@lu.ac.ir

زودهنگام (*Alternaria solani*. Sorauer)، سوختگی دیرهنگام سیب‌زمینی (*Phytophthora infestans*. Mont)، پژمردگی ورتیسیلیومی (*Vericllium dahliae. Kleb and Vericllium albo-atrum* Reinke) و پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی (*Ralstonia solanacearum* Smith)، پوسیدگی نرم باکتریایی (*Pectobacterium carotovorum* Jones) بیماری جرب معمولی (*Sterptomyces scabies* Gussow) و لوله‌ای شدن برگ سیب‌زمینی (Potato Leafroll Virus: PLRV) و تعداد دیگری از بیمارگرهای مهم سیب‌زمینی را در طول مدت رشد و نمو آن تحت تأثیر قرار می‌دهند و خسارت زیادی به محصول و کیفیت آن وارد می‌کنند (Moslemkhani and Mozafari 2016).

گیاهان در مواجهه با عوامل بیماری‌زا پاسخ‌های متفاوتی از خود نشان می‌دهند، مقاومت سیستمیک اکتسابی یکی از این پاسخ‌ها است. این نوع پاسخ می‌توانـد به وسیله ژن‌های غیربیماری‌زای بیمارگرها و یا عوامل غیرزنده فیزیکی و شیمیایی موسوم به محرک‌ها القا شود (Durrant and Dong 2004). سلول‌های گیاهی قادر به درک نشانه‌های میکروبی تحت عنوان الگوهای مولکولی همراه بیمارگر می باشند. الگوهای مولکولی بیمارگری به وسیله گیرنده‌های تشخیص گیاه موسوم به گیرنده‌های شناساگر الگو قابل تشخیص می‌باشند (Zipfel 2009). تشخیص سریع الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب‌ها توسط گیرنده‌های شناساگر الگوها اولین مرحله در شروع ایمنی ذاتی در گیاه است که به آن ایمنی ناشی از الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب اطلاق می‌شود (Jones and Chisholm et al. 2006, Dangl 2006). تشخیص الگوی‌های مولکولی بیمارگری به وسیله گیرنده‌های تشخیص الگوی گیاه باعث حفاظت گیاه در مقابل بیمارگرهای غیرمیزبان و همچنین موجب محدود کردن بیماری‌هایی می شود که به وسیله بیمارگرها ایجاد می‌شود (Bittel and Robatzek 2007). به‌طور کلی، در زمان حمله یک قارچ بیمارگر، آبشاری از ژن‌های درگیر در سیستم‌های دفاعی در گیاه میزبان فعال می‌شوند (Couto and Zipfel 2016). به محض شناسایی الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب، واکنش‌های دفاعی خاص و موثری مانند افزایش نشر یونی در طول غشای پلاسمایی، بیوسنتز اتیلن و تحریک آبشار پروتیین کینازها توسط میتوژن رخ می‌دهد (Asai et al. 2002). تولید فرم‌های فعال اکسیژن، تجمع کالوز و تحریک نسخه‌برداری ژن‌های کدکننده پروتئین‌هایی مانند: دیفنسین (پروتیین‌های ضدمیکروبی)، آنزیم‌های لیزکننده و آنزیم‌های سنتزکننده فیتوالکسین‌ها (متابولیت‌های ثانویهٔ ضدمیکروبی)، از بارزترین واکنش‌های دفاعی معمول گیاه محسوب می‌شوند (Nürnberger et al. 2004).

خانواده پروتیینی گیرنده‌های کینازی/شبه‌کینازی از نظر طول، توالی، تعداد دومین و نحوه پروتیین فعالیت دومین‌های کاتالیتیکی متنوع هستند و بسیاری از آنها نقش مهمی در رشد و تکامل گیاهان

دارند که از جمله ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی گیاهان به تنش‌ها هستند. گیاه مدل آرابیدوپسیس تالیا، دارای بیش از ۶۱۰ عضو از گیرنده‌های کینازی/شبه کینازی است و تنها عملکرد تعداد اندکی از آنها مشخص شده است گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین از جمله اولین گیرنده‌های مهمی بودند که از طریق بررسی ژنوم‌های آرابیدوپسیس و بعداً برنج شناسایی شدند (Shiu and Bleecker 2001). مدتی بعد، نقش این پروتیین‌ها در گیاهان *Lotus japonicus* و *Medicago truncatula* در جریان برقراری ارتباط همزیستی بین باکتری‌های ریزوبیوم تثبیت کننده ازت مشخص گردید (Radutoin et al. 2003, Limpens et al. 2003). تحقیقات نشان می‌دهند که گیرنده‌های شبه-کینازی دارای موتیف لیزین خانواده بسیار بزرگی از گیرنده‌های شبه‌کینازی هستند که با IRAK/Pelle کینازها از نظر فیلوژنتیکی در یک گروه تک نیایی قرار می‌گیرند (Shiu and Bleecker 2001). خانواده گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین به وضوح به دو زیر گروه متمایز تقسیم می‌شوند که پروتیین‌های هر دو زیرگروه حاوی یک بخش خارج سلولی می‌شوند که دارای یک تا چند موتیف لیزین هستند (Arrighi et al. 2006, Zhang et al. 2007). دومین لیزین علاوه بر گیاهان، در سایر موجودات عالی و باکتری‌ها نیز دیده می‌شود (Bateman and Bycroft 2000, Buist et al. 2008,). محققان در برنج پروتیینی به نام CEBiP را شناسایی کردند که در اتصال به کیتین آزاد شده از دیواره بیمارگرهای قارچی نقش مهمی بازی می‌کند (Kaku et al. 2006). بر خلاف اکثر گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین، پروتیین CEBiP فاقد یک دومین کینازی درون سیتوپلاسمی است، بنابراین پس از اتصال به کیتین با برخی از گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین همسایه وارد ارتباط شده تا از طریق دومین کینازی آنها مبادرت به فعال سازی آبشار پروتیین کینازها توسط میتوژن کند. در ادامه تحقیقات، محققان در برنج پروتیین CERK1 را شناسایی کردند که برخلاف CEBiP، دارای دو دومین لیزین خارج سلولی است و در جریان حمله قارچ‌های کیتین‌دار و اتصال CEBiP به کیتین، به این کمپلکس متصل شده تا در نهایت آبشار پروتیین کینازها توسط میتوژن فعال گردد (Thomma et al. 2011). فسفریلاسیون برگشت‌پذیر نوعی تغییر پسا ترجمه‌ای در گروه زیادی از پروتیین‌ها است که فرآیندهای سلولی زیادی شامل: پاسخ به تنش تا فرآیندهای رشد و نمو را تنظیم می‌کنند. آبشارهای مپ کینازی تنظیم‌کننده‌های حفاظت شده مهم هستند که در انواع فرآیندهای سلولی مانند تمایز، تکثیر، رشد، مرگ سلولی شرکت می‌کنند. آبشارهای پروتیین کیناز نقش مهمی در پاسخ به تنش‌ها (زیستی، غیرزیستی) پاسخ‌های هورمونی به کمک فرم فعال اکسیژن بازی می‌کند (Jonak et al. 2002, Nakagami et al. 2005). هر آبشار پروتیین کیناز فعال شونده توسط میتوژن از مجموعه‌ای از حداقل سه پروتیین کیناز تشکیل شده است که به صورت متوالی عمل

می‌کنند (Takahashi et al. 2010). از آنجایی که در جریان نفوذ قارچ‌های کیتین‌دار بیمارگر، بیان بعضی ژن‌های میزبان تحت تأثیر قرار می‌گیرند، Nazarian Firuzabadi and Kushalappa (2019) نشان دادند که پس از حمله قارچ *Alternaria solani*، بیان برخی از ژن‌های کدکننده گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین تحت تأثیر قرار می‌گیرد، لذا این پژوهش، برای بررسی تأثیر تیمار کیتین به عنوان یک محرک در تغییر بیان ژن‌های کدکننده گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین (LysM-RLKs)، که سهم مهمی در مسیر پاسخ دفاعی گیاهان به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی دارند، در سیب‌زمینی انجام شد.

مواد و روش‌ها Materials and Methods

غده‌های سیب‌زمینی رقم Jely، در گلدآنهای پلاستیکی حاوی مخلوطی از خاک مزرعه ضدعفونی شده توسط بخار، ماسه، کود حیوانی، با نسبت ۱:۲:۳ در عمق ۱۰ سانتی‌متری محیط گلخانه کاشته شدند. در مرحله چهار برگی گیاهچه‌های سیب‌زمینی، محلول کیتین به غلظت ۱۵۰ µg/ml روی برگ‌ها اسپری شد. از آب مقطر به‌عنوان تیمار شاهد استفاده شد. روی برگ‌ها با نایلون پوشیده شد و بعد از ۲۴ ساعت، از برگ‌ها نمونه‌گیری انجام شد (Rezzonico et al. 2017). نمونه‌گیری از هر برگ از سه قسمت آن و از سه گیاه مستقل صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله در ازت مایع منجمد شدند و برای استفاده بعدی و تا زمان جداسازی RNA در فریزر ۸۰- °C نگهداری شدند.

جداسازی RNA و ساخت cDNA

برای استخراج RNA از روش Institute of Himalayan Bioresource Technology (IHBT) استفاده شد (Ghawana et al. 2011). برای بررسی کیفیت و کمیت RNA، از دستگاه اسپکتوفتومتری و الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ استفاده شد. برای حذف آلودگی احتمالی DNA موجود در نمونه‌ها، از روش تیمار با آنزیم DNase I (شرکت سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده استفاده گردید. تأیید عدم آلودگی نمونه‌های RNA با DNA ژنومی واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن کنترل داخلی (Elongation Factor 1α: elf1α) انجام گرفت و پس از تأیید عدم آلودگی از کیت Thermo Fisher Scientific, US برای ساخت cDNA مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای تمام نمونه‌ها، مقدار RNA یکسان و معادل ۱۰۰ نانوگرم در نظر گرفته شد.

طراحی آغازگرها

ابتدا توالی ناحیه کدکننده (CDS) ژن‌های PGSC0003DMP400010799،PGSC0003DMP40001080 و PGSC0003DMP400061331 از پایگاه داده‌های ژنومی سیب‌زمینی به نام Spud DB و به نام به آدرس http://solanaceae.plantbiology.msu.edu استخراج شد. سپس به منظور طراحی آغازگرها برای تکثیر بخشی از ژن‌های مذکور از نرم‌افزار AlleleID 6 (PREMIER Biosoft, Palo Alto, CA, USA) با پارامترهای پیش فرض (با تاکید بر توالی سر ´۳) استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱. فهرست آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین و ژن کنترل داخلی

Table 1. List of designed Primers for amplification of selected LysM-RLKs and the Housekeeping gene

شماره نسخه mRNA Transcript ID	شماره نسخه پروتیینی Protein ID	نام آغازگر Primer Name	(توالی آغازگر ۵' به ۳') Sequence (5'→3')
PGSC0003DMT400015591	PGSC0003DMP400010799	5591-F	GTCAGGGAAGGAGGCTATCG
		5591-R	CACAGTCATCACATTCACAACAC
PGSC0003DMT400015592	PGSC0003DMP400010800	5592-F	ACCTAACCGATGGCATTGTATCC
		5592-R	CCTTCCTCTCTTCACTCCCTTCC
PGSC0003DMT400001803	PGSC0003DMP400061331	1803-F	TCCGCCGCTGCCAACAAG
		1803-R	CATACTGATGGAGGTGGTCTTCG
PGSC0003DMT400059832	PGSC0003DMP400040249	elf1α-F	ATTGGAAACGGATATGCTCCA
		elf1α-R	TCCTTACCTGAACGCCTGTCA

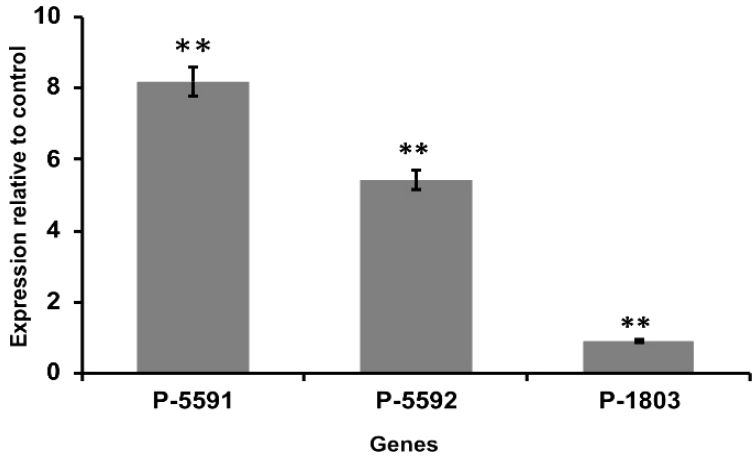
بررسی سطح بیان ژن‌ها

میزان بیان سه پروتیین PGSC0003DMP400010799،PGSC0003DMP40001080 و PGSC0003DMP400061331 همولوگ پروتیین CERK1 آرابیدوپسیس در سیب‌زمینی با استفاده از روش RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این کار از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی این ژن در پایگاه ژنومی سیب‌زمینی (http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/index.shtml) استفاده شد (جدول ۱). برای نرمال سازی داده‌ها از تکثیر ژن elf-1α استفاده شد. برای مقایسه میزان بیان ژن، از روش $\Delta\Delta$Ct موسوم به روش لیواک با استفاده از فرمول $2^{-(\Delta\Delta ct)}$ استفاده شد (Livak and Schmittgen 2001). برای هریک از

ژن‌ها دو تکرار تکنیکی و برای گیاه شاهد و گیاه تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. همچنین میانگین نهایی داده‌های بیان ژن با کمک آزمون t مورد مقایسه آماری قرار گرفتند.

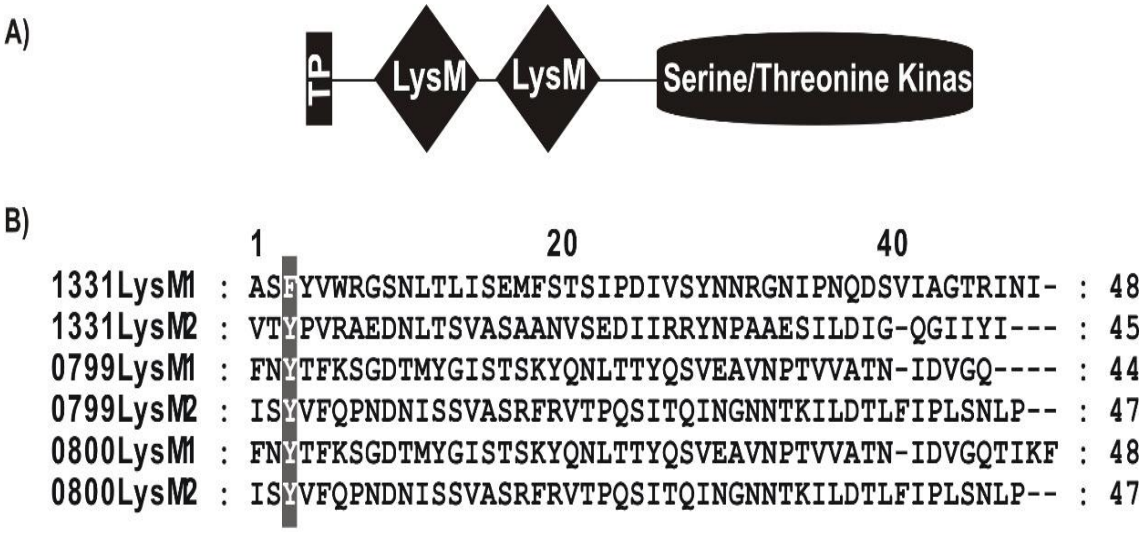
یافته‌ها Results

از توالی پروتیین CERK1 که عضوی از خانواده گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین در گیاه آرابیدوپسیس است، برای شناسایی اعضا این خانواده در پایگاه داده‌های ژنومی سیب‌زمینی استفاده شد. با استفاده از توالی این ژن، در مجموع تعداد ۳۵ ژن احتمالی از خانواده گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین شناسایی شدند که به نظر در مسیر پیام رسانی واکنش گیاه سیب‌زمینی به تنش بیماری‌های قارچی نقش دارند (Nazarian Firuzabadi and Kushalappa 2019). تغییرات بیان این سه ژن انتخابی نسبت به شاهد نشان داد که میزان بیان آنها در اثر تیمار با محلول کیتین به طور معنی‌داری افزایش یافت. همان طوری که در شکل ۱ دیده می‌شود، نتایج مقایسه میزان بیان این سه ژن در مقایسه با شاهد نشان داد که میزان بیان ژن PGSC0003DMP400061331 نسبت به دو ژن دیگر کمترین افزایش (۰/۹۲۲ برابر) را نسبت به شاهد نشان داد. این در حالی بود که بیان ژن PGSC0003DMP400010799 نسبت به شاهد ۸/۲ برابر و بیان ژن PGSC0003DMP400010800 نسبت به شاهد ۵/۴ برابر افزایش یافت.



شکل ۱. تغییرات بیان ژن‌های (P-1803) PGSC0003DMP400061331، (P- 5591) PGSC0003DMP400010799 و (P-5592) PGSC0003DMP400010800 در برگ‌ها گیاهچه‌های سیب‌زمینی پس از اعمال تیمار کیتین (۱۵۰µg/ml) اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار بیولوژیک برای هر ژن صورت گرفت. ** معنی‌دار در سطح α=۰,۰۱.

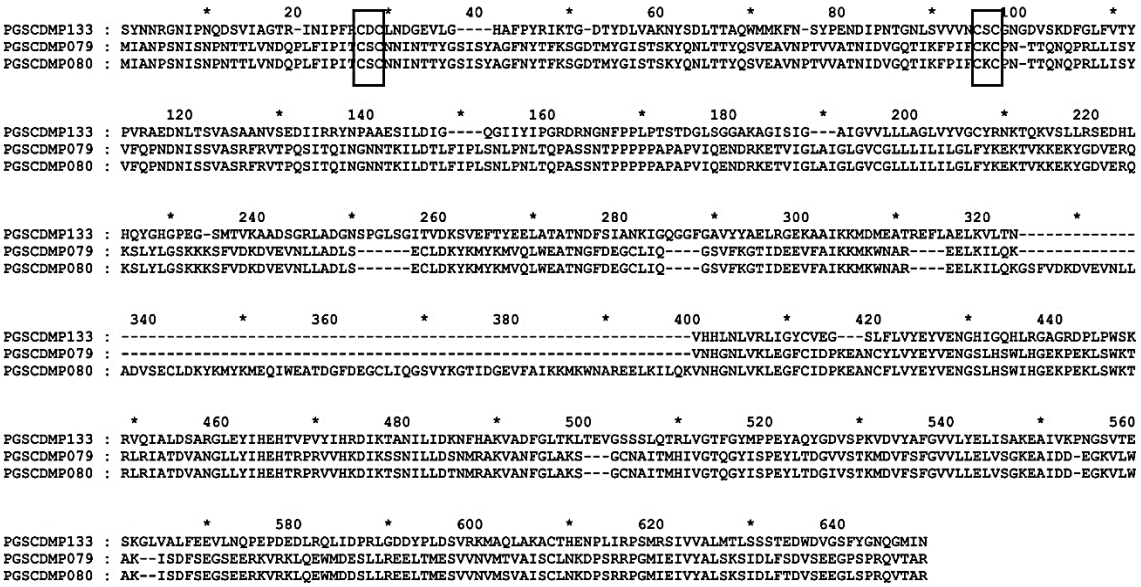
Figure 1. Expression analysis of PGSC0003DMP400061331 (P-1803), PGSC0003DMP400010799 (P-5591) and PGSC0003DMP400010800(P-5592) genes in leaves of potato seedling following chitin treatment (150 µg/ml). Measurements were made in three biological replicates for each gene. **Significant at α=0.01.



شکل ۲. تصویر شماتیک یک گیرنده شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین: A) هم‌ردیفی چندگانه موتیف لیزین مربوط به سه گیرنده شبه‌کینازی، B) TP: پپتید نشانه، LysM: موتیف لیزین،Serine/Threonine Kinas: دمین کاتالیتیکی. هم‌ردیفی موتیف لیزین در سه ژن PGSC0003DMP400010799،PGSC0003DMP400010800 و PGSC0003DMP400061331 با استفاده از الگوریتم Clustal W صورت گرفت.

Figure 2. Schematic representation of a LysM-RLK: A) Multiple sequence alignment of LysM three LysM-RLKs, B) TP: Signal Peptide; LysM: Lysin Motif; Serine/Threonine Kinas: Catalytic domain. Multiple Sequence Alignment of LysMs from PGSC0003DMP400010799, PGSC0003DMP400010800 and PGSC0003DMP400061331 genes was done using the Clustal W algorithm.

سه ژن انتخابی دارای دومین خارج سلولی متشکل از دو تکرار موتیف لیزین هستند (شکل ۲A). هم‌ردیفی موتیف‌های LysM در شکل B2 دیده می‌شود. همان‌طوری که در شکل دیده می‌شود، طول این موتیف‌ها، حتی دو موتیف مربوط به یک گیرنده شبه کینازی با هم متفاوت است. بین دو موتیف تشکیل دهنده یک گیرنده شبه کینازی مشابهت بیشتری نسبت به موتیف‌های دو پروتیین گیرنده شبه‌کینازی متفاوت وجود دارد. برای اتصال به کیتین، اسیدآمینه آروماتیک تیروزین (Y) در همه موتیف‌ها بجز موتیف اول پروتیین PGSC0003DMP400061331 حفظ شده است. در این موقعیت در موتیف اول پروتیین PGSC0003DMP400061331 اسیدآمینه آروماتیک فنیل آلانین (F) قرار دارد. هم‌ردیفی کلی سه پروتیین شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین نیز در شکل ۳ نشان داده شده است.



شکل ۳. هم‌ردیفی کلی سه پروتیین شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین. مستطیل‌ها توالی‌های حفظ شده CxC را نشان می‌دهند که در موتیف موسوم به LysM قرار دارند. هم‌ردیفی با استفاده از الگوریتم Clustal W صورت گرفت.

Figure 3. General multiple sequence alignment of three LysM-RLKs. Rectangles show the CxC consensus sequence present in LysM motifs. Multiple Sequence Alignment was performed by using the Clustal W algorithm.

Discussion بحث

در جریان حمله بیمارگرهای گیاهی و از آن جمله قارچ‌ها، آبشاری از ژن‌ها در سلول‌های گیاهی فعال می‌شوند که گیرنده‌های کینازی و شبه‌کینازی بخشی از این ژن‌های درگیر در پاسخ ایمنی گیاهان می‌باشند. گیرنده‌های شبه کینازی دارای موتیف لیزین در شروع استقرار بیمارگر در گیاه میزبان فعال می‌شود. از آنجایی که تحقیقات متعددی نشان داده بودند که بیان گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین در جریان آلودگی با قارچ‌های کیتین‌دار افزایش می‌یابند (Miya et al. 2007, Nazarian Firuzabadi and Kushalappa 2019).

اگرچه به نظر می‌رسد که این ژن‌ها در جریان حمله بیمارگرها فعال می‌شوند، اما ممکن است تنها تعدادی از آنها ژن واقعی و تعدادی از آنها نیز به دلایلی ژن‌های کاذب بوده و به هر دلیلی بیان نشوند (Nazarian Firuzabadi and Kushalappa 2019). کیتین یکی از اجزای سازنده دیواره برخی از قارچ و اوومیست‌ها است و نقش این مولکول به عنوان محرک شناخته شده است (Miya et al. 2007). با توجه به وجود دومین لیزین در ساختار سه ژن PGSC0003DMP400061331، PGSC0003DMP400010799 و PGSC0003DMP400010800 به نظر می‌رسد که کیتین و

اجزای کوچکتر آن پس از آزادشدن از دیواره پروتیین سلولی قارچ‌ها، به واسطه موتیف لیزین موجود در دومین خارج سلولی گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین شناسایی شود و بتواند میزان بیان این ژن‌ها را بالا ببرد. بنابر این بیان این ژن‌ها در نهایت منجر به بیان ژن‌ها مسیر مپ کینازی شده که در نهایت این وضعیت به بیان ژن‌های مقاومت گیاهی مانند بیان گوکانازها، کیتینازها و ژن‌های کدکننده پپتیدهای ضدمیکروبی منجر خواهد شد (Bolton et al. 2008). چنین افزایشی در میزان بیان ژن‌های همولوگ با ژن *CERK*1 آرابیدوپسیس قابل انتظار بود (Wang et al. 2017, Miya et al. 2007). این دومین خارج سلولی در اتصال به کیتین و القا مقاومت به بیمارگرها اهمیت فراوانی دارد. برای مثال، مطالعه مقاومت نخود به بیماری نشان داد که کیتوزان به عنوان یکی از مشتقات شیمیایی کیتین، می‌تواند نقش مهمی در افـزایش مقاومـت گیـاه نخود در برابر بیماری ایفا کند (Valadi et al. 2013). برخی جدایه‌های بیمارگر با استفاده از پروتیین‌های افکتورها سیستم مقاومتی گیاه را مهار یا مختل می‌کنند و باعث بروز بیماری می‌شوند (Jones and Dangl 2006). یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های بارز این پروتیین‌های افکتور وجود موتیف لیزین در توالی پروتیینی آنها می باشد (Bolton et al. 2008, Mentlak et al. 2011, Marshall et al. 2011). این پروتیین‌های افکتور قادرند مانند لایه‌ای محافظ اطراف هیف قارچ قرار بگیرند و مانع تجزیه شدن آن به وسیله آنزیم‌های هیدرولیتیک گیاهی شوند. همچنین این افکتورها می‌توانند با چسبیدن به قطعات کیتین مانع شناسایی کیتین توسط گیرنده‌های موجود در سطح گیاه شوند (Kombrink and Thomma 2013). گیرنده‌های کینازی مورد بررسی در این مطالعه دارای دو موتیف لیزین بودند که در توالی دو موتیف یک توالی حفاظت شده پروتیین CXC وجود دارد (Buist et al. 2008, Madsen et al. 2003, Radutoiu et al. 2003) که احتمالاً با تشکیل پل‌های دی سولفیدی به هر دو موتیف کمک می‌کند تا به لیگاند مربوطه متصل شوند (Petutschnig et al. 2010). این مسئله می‌تواند یکی از دلایل افزایش بیان این ژن‌ها باشد. به نظر می‌رسد که گیرنده‌های کیتین متعدد با هم همکاری می‌کنند، با این حال نحوه همکاری آن‌ها در تأثیر بر بیان ژن‌های پایین دست چندان مشخص نیست. بنابراین شاید بتوان نتیجه گرفت که سه ژن مورد مطالعه در این تحقیق با هم در تشخیص کیتین همکاری می‌کنند و از این رو میزان بیان آن‌ها افزایش یافته است. به عنوان مثال، تغییر در میزان بیان پروتیین تولیدی از این ژن‌ها می‌تواند میزان پاسخ ایمنی را در گیاهان تنظیم کند (Cui et al. 2018, Huang et al. 2020). از آنجایی که هر سه پروتیین از لحاظ تعداد اسیدآمینه و موتیف به یکدیگر شباهت بالایی دارند، ممکن است اختلاف بیان آنها مربوط به تعداد و ساختار دومین‌های تشکیل دهنده باشد. یکی از اختلافات که بین دومین‌های پروتیین‌های حاصل از دو ژن PGSC0003DMP400010799،

PGSC0003DMP400010800 و ژن PGSC0003DMP400061331 وجود دارد، جایگزینی اسیدآمینه پروتیین تیروزین با اسیدآمینه فنیل آلانین در جایگاه فعال آنزیم‌هاست که به دلیل کارکرد یکسان این دو اسیدآمینه به نظر نمی‌رسد که این موضوع بر عملکرد موتیف لیزین مؤثر باشد (شکل ۲B). به‌طور کلی، در سال‌های اخیر پیشرفت‌های شگرفی در خصوص نقش کیتین در تحریک سیستم ایمنی ذاتی گیاهان حاصل شده است. در حال حاضر، اجزای پائین دست گیرنده‌های شبه‌کینازی دارای موتیف لیزین چندان مشخص نیستند و به نظر می‌رسد که باید منتظر ماند تا تحقیقات بیشتر بتوانند نقش اجزاء دیگر این پازل را مشخص کنند (Gong et al. 2020).

نتیجه‌گیری Conclusion

گیاهان در طی دوره رشد با تنش‌های مختلفی مواجه می‌شوند. سازوکارهای مختلفی جهت سازش با تنش‌های زیستی و غیرزیستی در سطح سلولی و مولکولی در آن‌ها تکامل یافته است و به علت وجود این سازوکارها دریافت سیگنال خارجی، پاسخ مناسبی به شرایط محیطی نشان می‌دهند. القای مقاومت نسبت به بیمارگر از راهکارهایی است که گیاهان برای مقابله با تنش‌های زیستی به کار می برند و با توجه به این که امروزه از سموم شیمیایی مضر برای مبارزه در برابر بیمارگرها و عوامل تنش‌زا استفاده می‌شود، شاید القا مقاومت از طریق تیمار گیاهان با محرک‌ها به عنوان یک فناوری جدید جهت کنترل بیماری‌های گیاهی یک راهکار مناسب در این زمینه باشد.

منابع References

1. Abedini A, Amiri H, Karimi K (2020) Efficient biobutanol production from potato peel wastes by separate and simultaneous inhibitors removal and pretreatment. Renewable Energy 160:269-77.
2. Arrighi J F, Barre A, Amor BB, Bersoult A, Soriano LC, Mirabella R, de Carvalho-Niebel F, Journet E-P, Ghérardi M, Huguet T (2006) The Medicago truncatula lysine motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. Plant Physiology 142:265-279.
3. Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel F M, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. Nature 415:977-983.
4. Bateman A, Bycroft M (2000) The structure of a LysM domain from E. coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). Journal of Molecular Biology 299:1113-1119.
5. Bittel P and Robatzek S (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. Current Opinion in Plant Biology 10:335-341.

6. Bolton MD, Van Esse HP, Vossen JH, De Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJ, Van Den Berg GC, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, De Koster CG (2008) The novel Cladosporium fulvum lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. Molecular Microbiology 69:119-136.
7. Buist G, Steen A, Kok J, Kuipers OP (2008) LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. Molecular Microbiology 68:838-847.
8. Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. Cell 124:803-814.
9. Couto D, Zipfel C (2016) Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. Nature Reviews Immunology 16:537.
10. Cui Y, Li X, Yu M, Li, R, Fan, L, Zhu, Y, Lin, J (2018) Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in Arabidopsis. Development 145.
11. Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. Annual Review of Phytopathology 42:185-209.
12. Faostat (2016) Food and agriculture organization of the united nations, 2010. Roma, Italy.
13. Ghawana S, Paul A, Kumar H, Kumar A, Singh H, Bhardwaj P K, Rani A, Singh R S, Raizada J, Singh K (2011) An RNA isolation system for plant tissues rich in secondary metabolites. BMC Research Notes 4:1-5.
14. Gong BQ, Wang FZ, Li JF (2020) Hide-and-seek: chitin-triggered plant immunity and fungal counterstrategies. Trends in Plant Science (In press).
15. Huang C, Yan Y, Zhao H, Ye Y, Cao Y (2020) Arabidopsis CPK5 Phosphorylates the Chitin Receptor LYK5 to Regulate Plant Innate Immunity. Frontiers in Plant Science 11:702.
16. Jonak C, Ökrész L, Bögre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. Current Opinion in Plant Biology 5:415-424.
17. Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329.
18. Kaku H, Nishizawa Y, Ishii-Minami N, Akimoto-Tomiyama C, Dohmae N, Takio K, Minami E, Shibuya N (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences 103:11086-11091.
19. Kombrink A, Thomma BP (2013) LysM effectors: secreted proteins supporting fungal life. PLoS Pathogens 9:e1003769.
20. Limpens E, Franken C, Smit P, Willemse J, Bisseling T, Geurts R (2003) LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. Science 302:630-633.
21. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods 25:402-408.

22. Madsen EB, Madsen LH, Radutoiu S, Olbryt M, Rakwalska M, Szczyglowski K, Sato S, Kaneko T, Tabata S, Sandal N (2003) A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legumeperception of rhizobial signals. Nature 425:637-640.
23. Marshall R, Kombrink A, Motteram J, Loza-Reyes E, Lucas J, Hammond-Kosack KE, Thomma BP, Rudd JJ (2011) Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus Mycosphaerella graminicola reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. Plant Physiology 156:756-769.
24. Mentlak TA, Talbot NJ, Kroj T (2011) Effector translocation and delivery by the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. Effectors in Plant-Microbe Interactions 219-241.
25. Miya A, Albert P, Shinya T, Desaki Y, Ichimura K, Shirasu K, Narusaka Y, Kawakami N, Kaku H, Shibuya N (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences 104:19613-19618.
26. 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).
27. Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. Trends in Plant Science 10:339-346.
28. Nazarian Firuzabadi F, Kushalappa A (2019) Polymorphism and Expression Analysis of two Potato Receptor Genes (LysM-RLKs), Following Alternaria solani Infection. Applied Researches in Plant Protection 8:33-48. (In Persian with English Abstract).
29. Petutschnig EK, Jones AM, Serazetdinova L, Lipka U, Lipka V (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in Arabidopsis thaliana and subject to chitin-induced phosphorylation. Journal of Biological Chemistry 285:28902-28911.
30. Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Sandal N (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature 425:585-592.
31. Rezzonico F, Rupp O, Fahrentrapp J (2017) Pathogen recognition in compatible plant-microbe interactions. Scientific Reports 7:1-12.
32. Rich AE (2013) Potato Diseases. Academic Press.
33. Shiu SH, Bleecker AB (2001) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. Science's STKE 200:re22-re22.
34. Takahashi Y, Soyano T, Kosetsu K, Sasabe M, Machida Y (2010) HINKEL kinesin, ANP MAPKKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in Arabidopsis thaliana. Plant and Cell Physiology 51:1766-1776.
35. Thomma BP, Nürnberger T, Joosten MH (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. The Plant Cell 23:4-15.

36. Valadi S, Soleimani M J, Karamian G K, Ghiasvand T (2013) Effect of salicylic acid & chitosan on induction of resistance in chickpea against fusarial wilt and root rot. Iranian Journal of Plant Pathology 2:181-199. (In Persian with English Abstract).
37. Wang C, Wang G, Zhang C, Zhu P, Dai H, Yu N, He Z, Xu L, Wang E (2017) OsCERK1-mediated chitin perception and immune signaling requires receptor-like cytoplasmic kinase 185 to activate an MAPK cascade in rice. Molecular Plant 10:619-633.
38. Zhang XC, Wu X, Findley S, Wan J, Libault M, Nguyen HT, Cannon S B, Stacey G (2007) Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. Plant Physiology 144:623-636.
39. Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. Current opinion in Plant Biology 12:414-420.