

ردیابی و توالی‌یابی ژن کدکننده پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی PR10 در نخود (*Cicer arietinum* L.)

مریم نوری شکر تو^۱، فاطمه ذاکر تولایی^{۲*} و فرهاد شکوهی فر^۳

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، مجتمع آموزش عالی شیروان؛ mnoori20409@gmail.com

۲- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیئت علمی مجتمع آموزش عالی شیروان

۳- استادیار بیوتکنولوژی کشاورزی و عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ shokouhifar@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۲۷

چکیده

در بین حبوبات، نخود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است و از جمله عوامل محدودکننده عملکرد آن، می‌توان به برق‌زدگی نخود اشاره کرد. استفاده از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی یکی از راهکارهای مقابله گیاهان با عوامل بیماری‌زا به‌شمار می‌رود. یکی از ژن‌های کدکننده این نوع پروتئین‌ها، ژن کدکننده PR-10 است. این پژوهش با هدف ردیابی ژن PR-10 در ژنوم گیاه نخود انجام شد. بدین منظور DNA ژنومی شیش ژنوتیپ نخود با مقاومت متفاوت نسبت به بیماری شامل دو رقم مقاوم MCC142 و MDD528، دو رقم متحمل MCC150 و MCC20 و دو رقم حساس MCC507 و MCC506 به روش CTAB استخراج گردید. با استفاده از آغازگرهای PSH-91 و MN واکنش PCR طی دو مرحله انجام شد. مرحله اول با استفاده از DNA ژنومی نخود و با آغازگر PSH91 و مرحله دوم با استفاده از محصولات مرحله اول و آغازگر MN انجام شد. سپس تخلیص باندها به‌وسیله کیت صورت گرفت و جهت توالی‌یابی ارسال شد. حضور تک‌باند ۱۳۵۰ جفت بازی در مرحله اول و حضور تک‌باند ۱۲۸۹ بازی در مرحله دوم بیانگر حضور ژن PR-10 در ژنوم نخود می‌باشد. نتایج این آزمون حاکی از عدم تفاوت در توالی‌های ژن کدکننده پروتئین PR-10 در ارقام نخود با سطوح مقاومتی متفاوت بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، می‌توان نتیجه گرفت که تفاوت در واکنش ارقام نسبت به بیماری، به تفاوت در توالی این ژن مربوط نیست و دلایل دیگری مقاومت متفاوت را ایجاد می‌کنند.

واژه‌های کلیدی: نخود، (*Cicer arietinum* L.)، پروتئین‌های مرتبط با بیماری زایی، برق‌زدگی، PR-10

مقدمه

شمال آفریقا، شمال آمریکا، استرالیا، آسیای مرکزی و خاورمیانه محسوب می‌شود که توسط *Ascochyta rabiei* ایجاد می‌شود (Shokoohifar et al., 2003 & Taran et al., 2013). بروز و شیوع این بیماری به آب و هوا بستگی دارد. در برخی از سال‌ها، شرایط آب و هوای سرد و مرطوب، توسعه این بیماری را افزایش داده و اغلب موجب از دست رفتن ۱۰۰ درصد عملکرد محصول می‌شود (Udupa et al., 2003). در ایران پراکنش بیماری در شمال غرب، غرب، جنوب غربی و مرکز کشور گزارش شده است و در گلستان، کرمانشاه، ایلام، لرستان و فارس خسارات زیادی در برداشته است (Ghiai et al., 2012; Nourollahi et al., 2009). نخود پاسخ‌های فعال و غیرفعال برای مقابله با این بیماری دارد. سازوکارهای دفاعی غیرفعال، شامل ایجاد موانع ساختاری و شیمیایی مانند کرک‌های غده‌ای است که ایجاد ایزوفلاون ضدقارچ می‌کند. سیستم‌های دفاعی فعال در گیاه، ممکن است ژن‌های مقاومت را به‌کار بگیرند. این بیماری می‌تواند با قارچ‌کش‌های مختلفی کنترل شود، اما با توجه به نگرانی‌های زیست‌محیطی قارچ‌کش

ایران از نظر سطح زیرکشت نخود در جهان پس از هندوستان و پاکستان در رتبه سوم و از نظر تولید در رتبه هفتم قرار دارد (FAO, 2014). به گزارش فائو، ۱۲ درصد کل حبوبات تولیدشده در جهان مربوط به نخود بوده و این گیاه پس از نخودفرنگی و لوبیا در رتبه سوم قرار دارد (Yadav et al., 2015). سطح زیرکشت نخود کشور حدود ۵۲۸ هزار هکتار برآورد شده که معادل ۴/۴۶ درصد از کل محصولات زراعی و حدود ۶۴/۳ درصد از کل سطح برداشت حبوبات می‌باشد. میزان تولید نخود در کشور حدود ۲۶۹ هزار تن برآورد شده است که معادل ۰/۳۶ درصد از میزان تولید محصولات زراعی و ۴۳/۷ درصد از کل میزان تولید حبوبات می‌باشد (Ahmadi et al., 2016). یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده عملکرد نخود، بیماری‌های قارچی می‌باشد. بیماری برق‌زدگی یکی از بیماری‌های مهم نخود در سراسر جهان از جمله غرب کانادا،

*نویسنده مسئول: f.zaker.t@um.ac.ir

Beet necrotic yellow PR-10 در طی عفونت به ویروس *Benthamiana* (BNYVV) vein virus در چغندر *nicotiana* ایجاد می‌شود (Wu *et al.*, 2014). پروتئین PR-10 رشد و سازگاری با محیط‌زیست را تنظیم می‌کند و به طور گسترده در دانه گیاهان توزیع شده است. بر اساس شباهت در توالی اسیدآمینو آن، جایگاه زیرسلولی و عملکرد احتمالی، خانواده PR-10 شامل دو گروه مشخص است: پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی داخل سلولی (IPR) و *S-norcoclaurine synthases* (S) (NCS). گروه IPR شامل ناحیه (ژن رمزگردان) ORF متشکل از ۴۵۶ تا ۴۸۹ نوکلئوتید می‌باشد که پلی‌پپتید ۱۶۲-۱۵۱ آمینواسیدی با وزن مولکولی ۱۸-۱۵ کیلودالتون را کد می‌کند. اعضای گروه NCS شامل ORF طولانی تری با ۶۳۳-۶۹۶ نوکلئوتید با وزن مولکولی حدود ۲۶ کیلو دالتون می‌باشد (Liu *et al.*, 2006). برخی از PR-10 الگوهای بیان ساختاری غیرمرتبط با پاسخ به پاتوژن‌ها را نشان می‌دهند. تجمع ساختار PR-10 در طول رشد و تکامل گیاه در اندام گل شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2006). پروتئین PR-10 دارای عملکردهای مختلفی می‌باشند. شواهد مستقیمی از فعالیت ضد میکروبی که توسط PR-10 القاء می‌شود، در آزمایشگاه‌های میکروبی شناخته شده است. توانایی اتصال لیگاندها نیز در آن‌ها مشاهده شده است. همچنین دارای فعالیت آنزیمی در متابولیسم ثانویه گیاهان می‌باشد و در تنش‌های غیرزنده نیز ایفای نقش می‌کنند (Liu *et al.*, 2006). القای بیان ژن PR-10 گاهی در پاسخ به حمله عوامل بیماری‌زا به‌طور گسترده در تعدادی از گونه‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفته است. مقاومت به سرما، به عنوان یک عامل مهم زیست محیطی، بیان PR-10 را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Liu *et al.*, 2006). پروتئین PR-10 به‌طور وسیعی در همه خانواده‌های گیاهی یافت شده و در همه آن‌ها تقریباً اندازه و ساختار دوم پروتئین مشترک است. ساختار بعضی از آن‌ها با استفاده از اشعه ایکس و اسپکتروسکوپی NMR مشخص شده است. با وجود اطلاعات زیاد در مورد ساختار PR-10، اطلاعات در مورد عملکرد آن محدود است. پروتئین PR-10 نسبتاً کوچک و حدود ۱۶۰ اسیدآمینو می‌باشد و از سه مارپیچ و هفت رشته ناموازی b تشکیل شده است. این عناصر ساختاری یک حفره بزرگ آبرگیز را تشکیل می‌دهند که به احتمال زیاد کلید ارتباطات عملکردی آن باشد (Fernandes, 2013). این ژن معمولاً از دو اگزون قطع شده توسط اینترون با ۳۵۹-۷۶ جفت باز و ناحیه ORF با ۴۶۵-۴۸ جفت باز تشکیل شده است. منطقه متغیر در این ژن بیشتر در ناحیه C ترمینال آن واقع

ها، محققان به دنبال گزینه‌های دیگر مانند مقاومت در برابر پاتوژن‌ها و استفاده از عوامل زنده و غیرزنده برای ایجاد مقاومت هستند. مهم‌ترین سازوکار کنترل بیماری استفاده از ارقام مقاوم است (Ghazanfar *et al.*, 2011 & Leo *et al.*, 2016). مقاومت ژنتیکی خود در برابر این بیماری به دلیل سطح بالایی از تنوع در خزانه ژنی میزبان، پیچیدگی اساس مولکولی QTLها و متغیر بودن جمعیت پاتوژن با ظهور مداوم پاتوتایپ‌های جدید یک چالش است. افزایش فهم بشر از تعاملات بین گیاه-بیمارگر، ژن‌های دخیل در مقاومت و مسیرهای سیگنال‌دهی منتهی به مقاومت توانسته است راهکارهای ژنتیکی مناسب و کارآمدی به‌منظور افزایش مقاومت پیش روی محققان قرار دهد (Hashemi *et al.*, 2013). ژن‌های کُدکننده پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی که در بافت‌های گیاهان در تنش‌های مختلف تجمع می‌یابند، از جمله برجسته‌ترین ژن‌ها هستند که محققان سعی کرده‌اند با افزایش بیان این ژن‌ها در گیاهان مختلف مقاومت آنها را به بیمارگرها بهبود بخشند (Hashemi *et al.*, 2013). یکی از واکنش‌های دفاعی القاشونده گروهی از پروتئین‌ها است که تحت عنوان پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) نامیده می‌شوند. پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) گروه متنوعی از پروتئین‌ها از جمله گلوکانازها، سیتینازها، اندوپروتئینازها، پراکسیدازها، مهارکننده‌های پروتئاز و همچنین پروتئین کوچک مانند اسموتین (Osmotins)، تیونین‌ها (Thionins)، دفسین‌ها (Defensins) و پروتئین‌های انتقال چربی (Lipid Transfer Proteins) می‌باشند (Jain *et al.*, 2012). تاکنون هفده PR پروتئین شناسایی شده است (Liu *et al.*, 2006; Moosa *et al.*, 2017).

پروتئین PR-10 در گیاهان مختلفی شناسایی شده است. مثلاً در گیاه نخودفرنگی بر روی رشد و جوانه‌زنی تأثیر گذاشته و موجب فعال شدن هورمون سیتوکینین می‌شود (Srivastava *et al.*, 2006). در گیاه فلفل (*Capsicum baccatum*) در برابر قارچ *Colletotrichum acutatum* که مولد بیماری سیاه‌تاول (Aanthracnose) است، ایجاد مقاومت می‌کند (Sohet *et al.*, 2012). PR-10 در گیاه برنج پس از آلودگی با *Magnaporthe grisea* القاء می‌شود (McGee *et al.*, 2001). گیاهان توتون و تنباکو تراریخته با تظاهرات بالای ژن AhsiPR-10 افزایش تحمل به شوری، فلزات سنگین و تنش خشکی، محتوای کلروفیل و اندازه جوانه‌زنی نشان داده است (Jain *et al.*, 2012). در کشت کالوس بادام‌زمینی، در شرایط تنش شوری، خشکی و فلزات سنگین از کالوس، PR-10 جدا شده است (Jain *et al.*, 2012). تنظیم بیان

دو ژنوتیپ متحمل (MCC20 و MCC150) نخود در برابر بیماری برق‌زدگی استفاده شد. بذرها از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه گردید. بذرها قبل از کشت با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و پس از شستشو با آب مقطر، جهت جوانه‌زنی به پتری‌دیش‌های استریل حاوی کمی آب مقطر استریل انتقال داده شدند. سپس بذور جوانه‌زده، در گلدان‌هایی با قطر ۲۰ سانتی‌متر با سه ترکیب پرلیت، کوکوپیت، ورمی‌کمپوست با نسبت ۱:۲:۱ در عمق ۲/۵ سانتی‌متری کاشته حاوی خاک شدند. آبیاری گلدان‌ها در دو هفته اول به صورت دوبر در هفته انجام گرفت و سپس به سه‌بار در هفته افزایش پیدا کرد. هر ۱۴ روز آبیاری به صورت محلول آبیاری به اندازه ۱۵ گرم کود کامل NPK ۲۰:۲۰:۲۰ در ۱۰ لیتر آب انجام شد.

نمونه‌گیری و استخراج DNA

یک ماه بعد از کاشت، نمونه‌های برگ‌ها از گیاهان تهیه و استخراج DNA به روش CTAB (Probski et al., 1997) از آن‌ها انجام شد. به منظور بررسی کیفیت و کمیت DNA ژنومی مقدار چهار میکرولیتر از DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز یک درصد بارگذاری شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۸۰ ولت، به مدت ۴۵ دقیقه کیفیت DNA به کمک اشعه UV بررسی و عکس‌برداری شد. تخمین کمیت غلظت باندهای DNA براساس غلظت باند مارکر بر روی ژل آگارز یک درصد انجام شد.

طراحی آغازگر برای ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن PR10

آغازگرهای اختصاصی بر اساس توالی ژنومی نخود به شماره بازیابی PGT01000000 و با کمک توالی EST JZ585563.1 با استفاده از نرم‌افزار Primer premier شرکت Premier bio soft طراحی شد (جدول ۱).

توالی ژن PR10 و محل آغازگرها جهت ردیابی ژن PR10

شکل ۱، نمای شماتیک ژن PR10 در سطح نوکلئوتیدی و محل اتصال آغازگرها را نشان می‌دهد. این ژن در گیاه نخود روی کروموزوم شماره ۱ قرار دارد. انتظار می‌رود باندهای با اندازه ۱۳۵۶bp با آغازگر PSH91 و ۱۲۸۹bp با آغازگر MN مشاهده شود.

شده است. توالی این پروتئین در تعدادی از گیاهان شناسایی شده است (Fernandes et al., 2013). Shokoothifar et al. (2003) با مطالعه ۹۴ جدایه از استان‌های مختلف ایران توانستند شش سطح مقاومتی در ارقام افتراقی تعیین نمایند و بر اساس قدرت بیماری‌زایی لازم جهت شکستن این سطوح شش گروه پاتوتیپی را گزارش کردند. در مطالعه دیگری نیز تنوع ژنتیکی جدایه‌های ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی RAPD بررسی گردید و ۲۲ گروه ژنوتیپی شناسایی شد. همچنین در مطالعه دیگری از همین پژوهشگران (Shokoothifar et al., 2006) که در شرایط آزمایشگاه و مزرعه صورت گرفت، واکنش ۴۲۰ توده بومی و ۹۷ دودمان رقم خارجی نخود مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که ژنوتیپ‌های MCC311، MCC133، MCC496، MCC299، MCC528 و MCC142 از تیپ کابلی و ژنوتیپ‌های MCC54 و MCC523 از تیپ دسی در برابر شش پاتوتیپ از بیماری برق‌زدگی مقاومت بالایی نشان داد. بهبود مقاومت میزبان به عنوان مهم‌ترین، کاراترین، سازگارترین با محیط‌زیست و نسبتاً اقتصادی‌ترین راهکار برای مدیریت و مقابله با هر بیماری است (Li et al., 2015). بنابراین استفاده از ارقام مقاوم جهت دستیابی به عملکرد بالا اهمیت اساسی دارد (Hassan et al., 2012). اما به دلیل ظهور مداوم پاتوتایپ‌های جدید قارچ *A. rabiei*، تولید ژنوتیپ‌های مقاوم با چالش بزرگی مواجه است (Sharma & Ghosh 2016). جداسازی و توالی‌یابی پیش‌بر فعال‌شونده توسط بیمارگر *Ascochyta* که باعث القاء بیان ژن پروتئین مرتبط با بیماری‌زایی (PR-10) در نخود می‌شود، توسط Kaseb et al. (2017) انجام شده است.

با توجه به اهمیت مقاومت به برق‌زدگی در نخود و شناسایی ژن مرتبط با پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR) در گیاهان مختلف در این تحقیق ردیابی، توالی‌یابی و جداسازی ژن PR10 در ارقام مقاوم و حساس به برق‌زدگی نخود انجام شده است.

مواد و روش‌ها

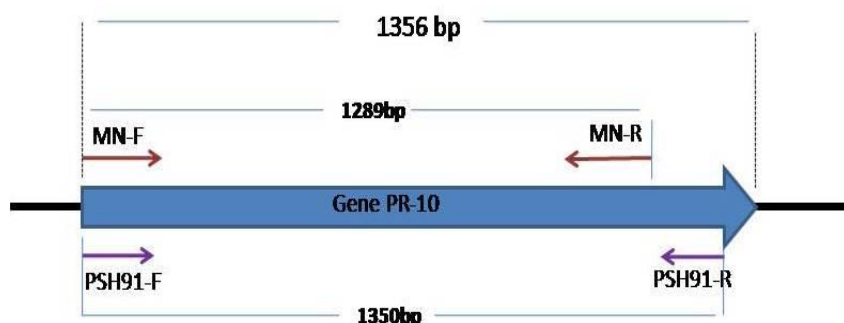
کشت و آماده‌سازی مواد گیاهی

در این آزمایش از دو ژنوتیپ حساس (MCC506 و MCC507)، دو ژنوتیپ مقاوم (MCC142 و MCC528) و

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن PR10

Table 1. Employed primers to detection and amplification of whole sequence of PR10 gene

نوع آغازگر Primer type	توالی آغازگر Primer sequence	تعداد نوکلئوتید Nucleotide number	Tm (°C)
PSH91.F	5' ATTCATCACCATGGGTGTTTTTCAG 3'	24	62.7
PSH91.R	5' ACACACGTGGTGAATAAAAAGCACTTA 3'	27	61.9
MN.F	5' ATGGGTGTTTTTCAGTT 3'	16	40.5
MN.R	5' ATAACCCTCAAGTGCC 3'	16	43.8



شکل ۱- نمای شماتیک ژن PR-10 و ناحیه اتصال آغازگرهای MN و PSH-91 به ژن PR-10

Fig. 1. Schematic view of PR-10 gene and connecting region of PSH-91 and MN primers to gene

دستورالعمل مربوطه انجام گردید و سپس جهت توالی‌یابی، سازه‌های ژنی PR-10 به همراه آغازگرها جهت توالی‌یابی ارسال گردید. نتایج حاصل از توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج و بحث

جوانه‌زنی گیاهان تقریباً به صورت همزمان صورت گرفت. شاخه‌زایی گیاهان مقاوم و متحمل بیشتر از ارقام حساس بود و رقم حساس گیاهی ضعیف و با شاخه‌های اندک تولید کرد. رقم‌های مقاوم و متحمل دارای بذر فراوان‌تر بوده و زودتر از ارقام حساس به گل رفته و تولید بذر کردند.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده

دسترسی به DNA با کیفیت و کمیت مناسب پیش‌نیاز اولیه بررسی‌های ژنتیکی مولکولی می‌باشد. غلظت و کیفیت پایین DNA اعتبار داده‌های حاصله را تحت تأثیر قرار داده و تکرارپذیری آن را کاهش می‌دهد. الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده از ارقام مقاوم، متحمل و حساس نخود، در شکل 1A نشان داده شده است. پس از استخراج نمونه‌ها به منظور انجام واکنش PCR نمونه‌ها در غلظت تقریبی ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر شدند.

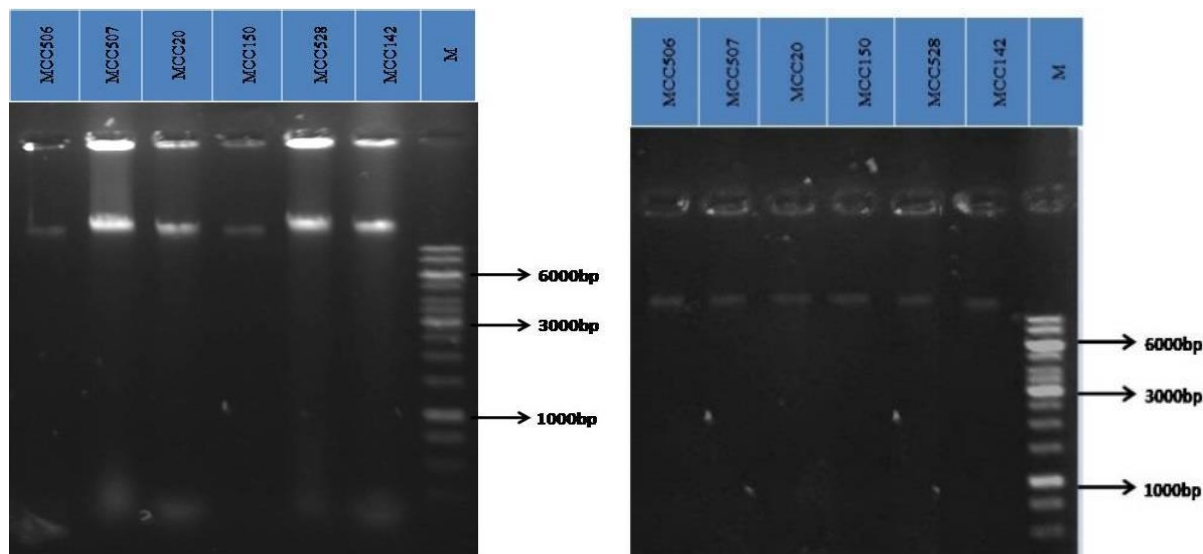
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

محتویات واکنش شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی ارقام مقاوم و حساس نخود در حجم کل ۲۰ میکرولیتر حاوی ۲ میلی مولار MgCl₂، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (GeNetBio, south Korea)، ۲ میکرولیتر بافر PCR 10X (GeNetBio, south Korea)، ۵ پیکومول از آغازگرهای رفت و برگشت PSH91- (BioNeer Co., south Korea) (سنترشده توسط MN-F/R و F/R Taq DNA Korea و یک واحد آنزیم تک‌پلیمرز (polymerase, GeNetBio, south Korea) تهیه شد.

برنامه دمایی واکنش در مرحله واسرشت اولیه به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۳۵ سیکل در ۹۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۳ ثانیه، مرحله اتصال به مدت ۴۵ ثانیه و در دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد، مرحله تکثیر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شد. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت به مدت یک ساعت الکتروفورز گردید. از غلظت 1X بافر SB در تهیه ژل و بافر تانک الکتروفورز استفاده شد.

تخلیص باند محصولات PCR از روی ژل و توالی‌یابی

استخراج ژن ردیابی شده با استفاده از کیت Gel extraction kit ساخت شرکت دنزیست و مطابق



شکل ۲- A: DNA استخراج شده از ارقام MCC506، MCC20، MCC150، MCC528، MCC142 و MCC507 نخود روی ژل الکتروفورز؛ B: DNA هم‌غلظت شده این رقم‌ها روی ژل الکتروفورز

Fig 2. A: Extracted DNA from chickpea cultivars of MCC142, MCC528, MCC150, MCC20, MCC506 and MCC507 on electrophoresis gel; B: Equal concentration of DNA from these cultivars on electrophoresis gel

توالی‌یابی ژن PR-10 در ارقام مقاوم، متحمل و حساس در این مطالعه حضور ژن PR-10 به عنوان عامل مقاومت به بیماری برق‌زدگی در ارقام مقاوم، متحمل و حساس مورد بررسی قرار گرفت. سپس قطعه ژن PR-10 در کلیه ارقام بالا با واکنش PCR تکثیر شد. به منظور تأیید نهایی توالی‌یابی دو جهته صورت گرفت که نتایج توالی‌یابی حضور ژن PR-10 را در کلیه نمونه‌های بالا مورد تأیید قرار داد. هدف مهم بعدی بررسی جهش‌های احتمالی موجود در این ارقام بود. جهش‌ها در دو سطح نوکلئوتیدی و بیان پروتئین قابل بررسی می‌باشد. نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار SeqMan بررسی شد. توالی‌یابی نمونه‌ها و مقایسه خوانش‌های رفت و برگشت حاصل از توالی‌یابی برای هر نمونه انجام شد. نتایج توالی‌یابی ارقام مختلف مقاوم و حساس در شکل‌های ۵ تا ۹ نشان داده شده است.

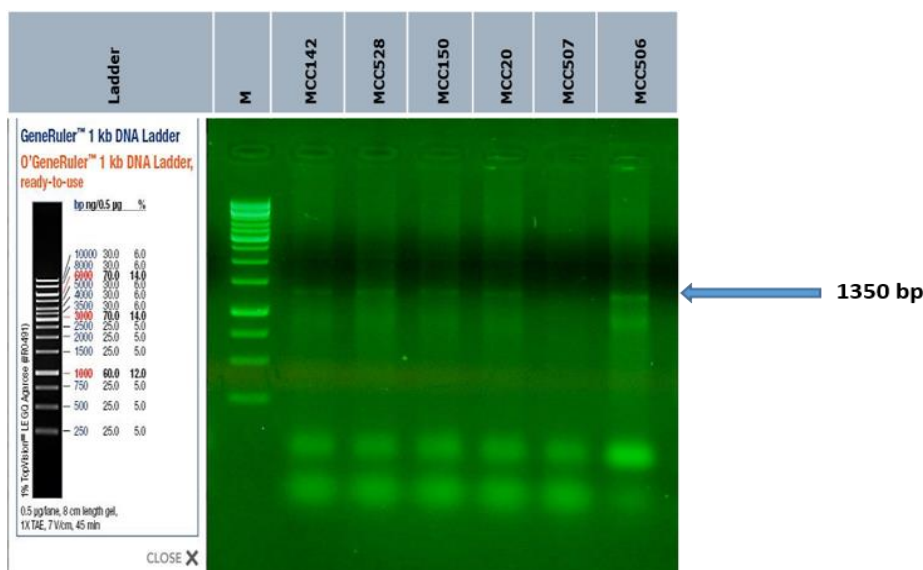
با توجه به تفاوت‌های حاصل بین توالی رفت و برگشت هر نمونه توالی نهایی به دست آمد که ظاهراً تعدادی جهش را نشان می‌داد. جهت بررسی تفاوت‌های مشاهده شده و اطمینان از صحت وجود جهش در توالی‌ها، آن‌ها با توالی رفرنس مقایسه شدند.

به دلیل اختصاصی بودن آغازگر در دامنه دمایی مختلف باند مشاهده شد، ولی بهترین باند در دمایی ۶۰ و ۶۲ درجه سانتی‌گراد حاصل گردید. نتایج این قسمت در هر چاهک نشان داد که آغازگرهای طراحی شده براساس توالی ژن PR-10 توانسته‌اند منطقه‌ای با اندازه مورد انتظار را تکثیر نمایند.

تکثیر قطعه هدف از ارقام مختلف و ارائه الگوی حضور باند هدف پس از انجام واکنش PCR جهت مشاهده نتیجه محصولات PCR را روی ژل یک درصد برده و ارقام مختلف مقایسه شدند. با توجه به آنچه گفته شد، اولین مرحله PCR با آغازگر PSH-91 انجام شد که حاصل آن مشاهده باند با اندازه مورد انتظار یعنی ۱۳۵۰bp در تمام نمونه‌ها به جز نمونه MCC507 که جزء ارقام حساس می‌باشد، بود.

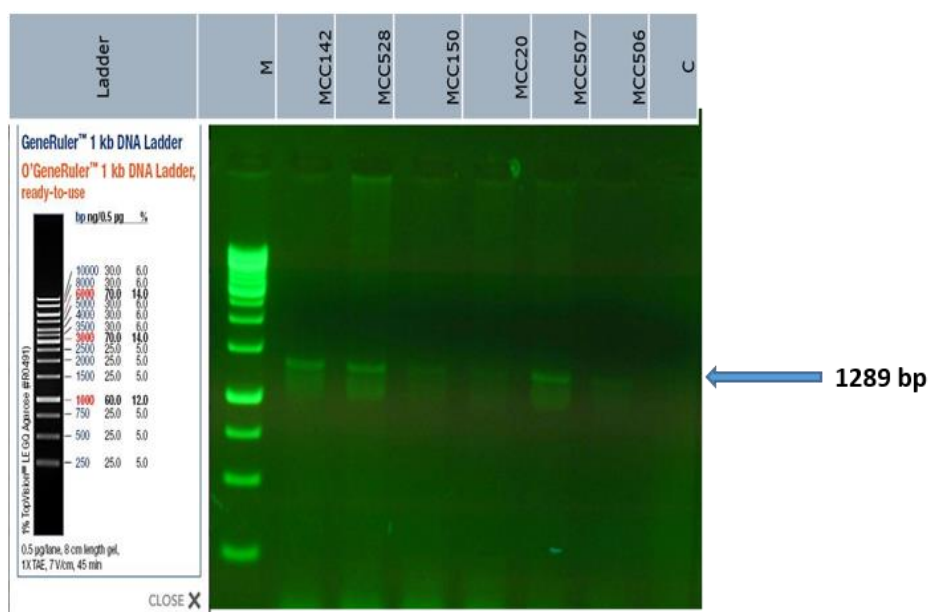
در مرحله دوم، PCR با استفاده از محصولات واکنش قبلی (به عنوان الگو) با آغازگر MN انجام شد. فقط در نمونه MCC20 جهت DNA الگو از خود DNA استخراج شده از گیاه استفاده شد و از محصول واکنش PCR استفاده نشد. در واقع تفاوتی بین این که از محصول PCR برای واکنش دوم استفاده شود یا از DNA اصلی استخراج شده از گیاه، وجود ندارد.

با توجه به حضور ژن در ارقام مقاوم، حساس و متحمل این فرضیه مطرح شد که شاید تنوع در توالی این ژن در ارقام با سطوح مقاومتی مختلف مشاهده گردد.



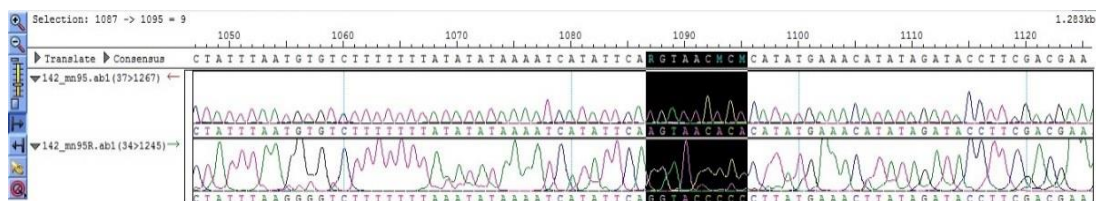
شکل ۳- تولید قطعه ۱۳۵۰ جفت بازی DNA به وسیله تکثیر PCR با استفاده از آغازگر PSH-91 در همه رقم‌ها، نشان‌دهنده وجود ژن PR-10 در ژنوم همه آن‌ها است.

Fig. 3. Production of 1350 bp DNA fragment by PCR amplification using PSH-91 primer in all cultivars indicated to existence of PR-10 gene in their genome.

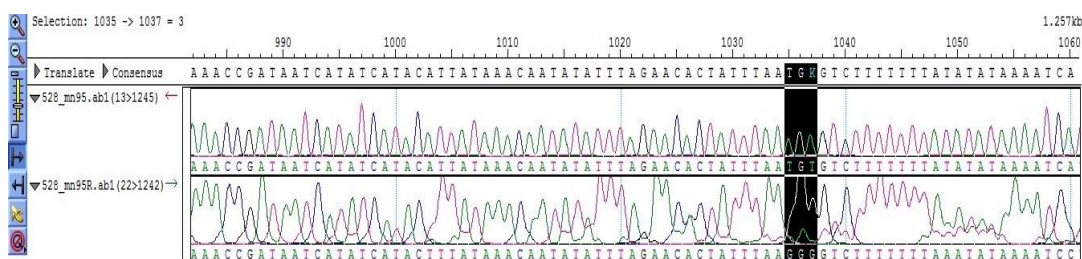


شکل ۴- تولید قطعه ۱۲۸۹ جفت بازی DNA به وسیله تکثیر PCR با استفاده از آغازگر MN در همه رقم‌ها نشان‌دهنده وجود ژن PR-10 در ژنوم همه آن‌ها است.

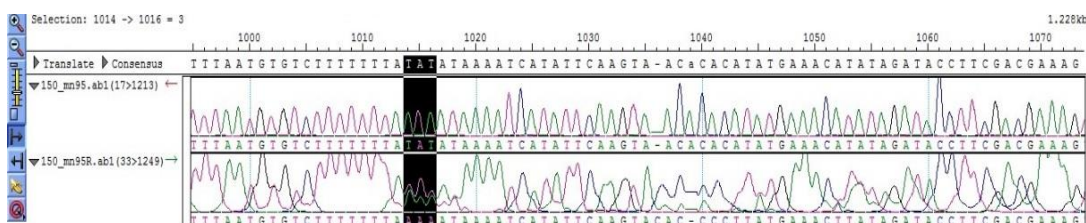
Fig. 4. Production of 1289 bp DNA fragment by PCR amplification using MN primer in all cultivars indicated to existence of PR-10 gene in their genome.



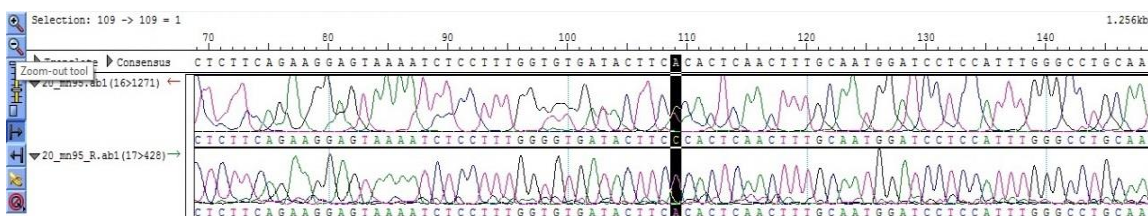
شکل ۵- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC142 (مقاوم به برق‌زدگی)
Fig. 5. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC142 variety (resistant to Ascochyta blight)



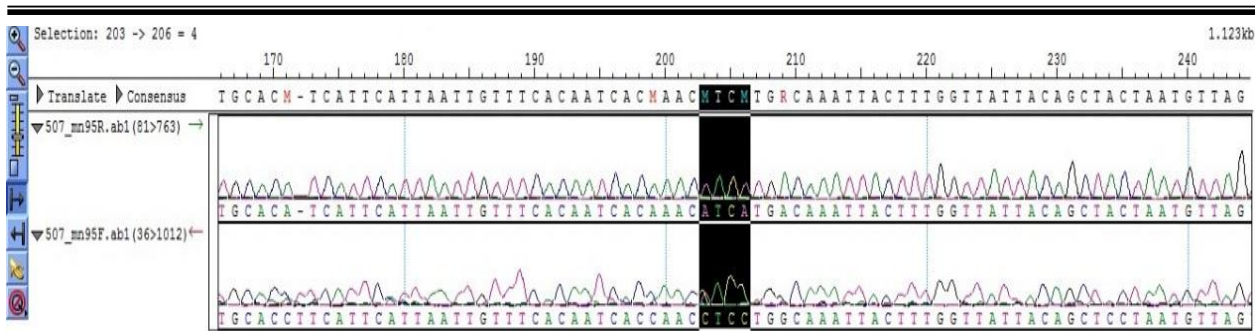
شکل ۶- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC528 (مقاوم به برق‌زدگی)
Fig. 6. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC528 variety (resistant to Ascochyta blight)



شکل ۷- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC150 (متحمل به برق‌زدگی)
Fig. 7. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC150 variety (tolerant to Ascochyta blight)



شکل ۸- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC20 (متحمل به برق‌زدگی)
Fig. 8. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC20 variety (tolerant to ascochyta blight)



شکل ۹- توالی‌یابی دوطرفه رفت و برگشت ژن PR-10 از واریته MCC507 (حساس به برق زدگی)
Fig. 9. Forward and reverse sequencing of PR-10 gene derived from MCC507 variety (susceptible to Ascochyta blight)

نخود و توالی رفرنس را نشان داد. در واقع چون این مناطق در انتهای منطقه خوانش بوده است، به همین دلیل کیفیت توالی‌یابی در این قسمت کاهش یافته است و به عنوان جهش در نظر گرفته نمی‌شود. نتیجه نهایی این‌که توالی این ژن در منطقه بررسی شده بین ارقام مقاوم و حساس و توالی رفرنس یکسان می‌باشد.

به دست آوردن توالی توافقی برای ژن PR-10 پس از بررسی توالی نمونه‌ها با یکدیگر یک توالی توافقی به دست آمد. این توالی در نرم‌افزار SeqMan با توالی رفرنس مقایسه شد. در این مقایسه مشخص شد که تفاوت‌های مشاهده شده در آزمون قبلی ناشی از خطای توالی‌یابی بوده است و لذا بررسی‌ها عدم وجود تفاوت بین این توالی توافقی، توالی ژنوم



شکل ۱۰- مقایسه توالی ژن PR-10 ارقام مختلف نخود با توالی رفرنس نشان دهنده عدم وجود تفاوت بین توالی با توالی رفرنس می‌باشد.

Fig. 10. Comparison of PR-10 gene sequence of different chickpea varieties with reference sequence indicated to lack of difference between sequences and reference sequence also.

نتایج الگوی الکتروفورزی محصول PCR با پرایمر PSH-91 در بین ارقام مقاوم، متحمل و حساس یکسان است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان کرد که در طی PCR با پرایمر مورد نظر در بین ارقام مقاوم، متحمل و حساس موفق به ردیابی ژن PR-10 شدیم و اندازه باندها در تمام ارقام ۱۳۵۰ bp می‌باشد که این نشان‌دهنده الگوی باندهای مشابه در بین ارقام مختلف بوده است. با توجه به وجود این ژن در ارقام حساس این نتیجه حاصل می‌شود که واکنش متفاوت ارقام مختلف در برابر بیماری برق‌زدگی نخود می‌تواند ناشی از تفاوت در بیان ژن PR-10 باشد. پروتئین‌های PR-10 پروتئین‌های

با توالی‌یابی ژنوم میزبان‌ها و بیمارگرها مشخص شد که نسبت زیادی از ژن‌ها برای دفاع در مقابل بیمارگرها یا از بین بردن مقاومت میزبان اختصاص یافته‌اند. دستیابی به توالی ژن‌های مقاومت در تولید ارقام مقاوم ارزش بالایی دارد. ژن کدکننده پروتئین PR-10 به عنوان عامل مقاومت در مقابل بیماری برق‌زدگی می‌تواند شناخته شود که جهت اطمینان از ایجاد مقاومت توسط این پروتئین نیاز به بررسی بیان پروتئین در شرایط مختلف می‌باشد. نتایج PCR با پرایمر PSH-91 حضور PR-10 را در شیش رقم نخود مورد مطالعه نشان داد.

بیماری سوختگی غلاف برنج، بیان ژن PR-10 در ارقام مقاوم در مقایسه با ارقام حساس به بیماری افزایش معنی‌داری نشان داده است (Babaiezhadeh & Sayyari, 2012).

تنها PR پروتئین شناسایی شده در نخود PR-2 می‌باشد. ۱۴ روز پس از تلقیح نخود با *Ascochyta rabiei* فعالیت آنزیم او ۳ و ۳ گلوکاناز مشاهده شده است (Hanselle & Barz, 2001). همچنین ۲ کتیناز و ۳ بتا ۱ و ۳ گلوکاناز در گیاه نخود علیه عامل بیماری برق‌زدگی کشف شده است (Saikia et al., 2005). به نظر می‌رسد که پروتئین PR-10 در گیاهان مختلفی ایجاد مقاومت می‌کند. به‌عنوان مثال در گیاه فلفل در برابر قارچ مولد بیماری سیاه‌تاول (Soh et al., 2012)، در برنج در برابر در چغندر *Magnaporthe grisea* (McGee et al., 2001)، در برابر BNYVV (Wu et al., 2014) و در سورگوم بر علیه قارچ فوزاریوم (Katile et al., 2010) بیان شده است.

دفاعی داخل سلولی می‌باشند که ساختاری شبیه ریبونوکلازها دارند. تمام پروتئین‌های PR-10 اسیدی بوده و در هیچ‌یک از آن‌ها سیگنال پپتیدی وجود ندارد. این موضوع نشان می‌دهد که پروتئین‌های این خانواده درون سلولی هستند و توسط بیمارگرها القاء می‌شوند (Vidhyasekaran, 2002). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان بیان کرد به علت عدم وجود تنوع در توالی نوکلئوتیدی، این احتمال وجود دارد که در هنگام بیان پروتئین در شرایط وجود عامل بیماری، تفاوت بین ارقام مختلف نشان داده شود که این احتمال با توجه به تحقیقاتی که بر ژن PR-10 برنج صورت گرفته است، تأیید می‌شود (Babaiezhadeh & Sayyari, 2012). ژن PR-10 در برنج به‌طور طبیعی در برگ‌ها بیان نمی‌شود و به زخم‌ها واکنش نشان نمی‌دهد، اما بالقوه در سطح بالایی به‌وسیله اتیلن و جاسمونیک اسید بیان می‌شود (Heidarinejad et al., 2014). همچنین در بررسی رقم مقاوم و حساس به عامل

منابع

- Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H.R., Hosseinpour, R., Hatami, F., Fazli, B., Kazemian, A. and Rafiee, M. 2016. Agricultural Statistics. First Volume. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Deputy Director of Planning and Economics, ICT Center. Iran. (In Persian).
- Babaiezhadeh, V., and Sayyari, M. 2013. Intervention of Lipoxigenase gene and multiple pathogenesis-related (PR) genes in the resistance of tarom and anonymous cultivars of rice to *Rhizoctonia solani* Disease. 12th Iranian Congress of Genetics. May 21-23, 2012. Tehran. (In Persian).
- FAO, 2014. FAOSTAT Database Results from FAO Website. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fernandes, H., Michalska, K., Sikorski, M., and Jaskolski, M. 2013. Structural and functional aspects of PR-10 proteins. FEBS Journal 280(5): 1169-1199.
- Ghiai, S., Razavi, M., and Shahriary, D. 2012. Study on pathogenic and molecular variability in some isolates of *Ascochyta rabiei* causal agent of *Ascochyta* blight of chickpea in Iran. Journal of Applied Entomology and Phytopathology 79: 199-218.
- Hanselle, T., and Barz, W. 2001. Purification and characterisation of the extracellular PR-2b β -1, 3-glucanase accumulating in different *Ascochyta rabiei*-infected chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars. Plant Science 161(4): 773-781.
- Heidarinezhad, M., Babayei Zadeh, A., and Rahimian, H.A. 2015. The role of genes related to pathogenicity PR10 and PR2 in rice in resistance to *Acidovorax avenae* subsp. *Avenae*. First National Congress of Biology and Natural Sciences of Iran. https://www.civilica.com/Paper-BSCONF01-BSCONF01_101.html (in Persian).
- Jain, S., Kumar, D., Jain, M., Chaudhary, P., Deswal, R., and Sarin, N.B. 2012. Ectopic overexpression of a salt stress-induced pathogenesis-related class 10 protein (PR10) gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.) affords broad spectrum abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 109(1): 19-31.
- Ghannadha, K., and Zahrawi, M. 2006. Areas of construction, operation and engineering of resistance genes in plants. The 9th Iranian Congress of Agronomy and Plant Breeding. Tehran University. Pardis Abooreihan. (in Persian). https://www.civilica.com/Paper-NABATAT09-NABATAT09_007.html
- Ghazanfar, M.U., Wakil, W., and Sahi, Sh.T. 2011. Induction of resistance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against *Ascochyta rabiei* by applying chemicals and plant extracts. Chilean Journal of Agricultural Research 71(1): 52-62.
- Hassan, S.I., Hameed, A., Tariq, M., and Arshad, M. 2012. Pearl: A high yielding and full season white maize variety. Journal of Agricultural Research 50(3): 329-334.

12. Hashemi, S., Babaeizad, V., Tajik, M.A., and Rahimian, H. 2013. Studying of several Pathogenesis-related genes role in rice resistance *Bipolaris oryzae*. Iranian Journal of Plant Pathology 49(2): 57.
13. Kaseb, A. 2017. Tracking and sequence analysis of the PR10 gene promoter from chickpea plant (MSc. Thesis). Retrieved from IRANDOC Database. (Accession No. 2443873).
14. Katile, S.O., Perumal, R., Rooney, W.L., Prom, L.K., and Magill, C.W. 2010. Expression of pathogenesis-related protein PR-10 in sorghum floral tissues in response to inoculation with *Fusarium thapsinum* and *Curvularia lunata*. Molecular Plant Pathology 11(1): 93-103.
15. Leo, A.E., Linde, C.C., and Ford, R. 2016. Defence gene expression profiling to *Ascochyta rabiei* aggressiveness in chickpea. Theoretical and Applied Genetics 129: 1333-1345.
16. Li, H., Rodda, M., Gnanasambandam, A., Aftab, M., Redden, R., Hobson, K., Rosewarne, G., Materne, M., Kaur, S., and Slater, A.T. 2015. Breeding for biotic stress resistance in chickpea: progress and prospects. Euphytica 204: 257-288.
17. Liu, J.J., and Ekramoddoullah, A.K. 2006. The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology 68(1): 3-13.
18. McGee, J.D., Hamer, J.E., and Hodges, T.K. 2001. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. Molecular Plant-Microbe Interactions 14(7): 877-886.
19. Moosa, A., Farzand, A., Sahi, S.T., and Aleem Khan, A. 2017. Transgenic expression of antifungal pathogenesis-related proteins against phytopathogenic fungi-15 years of success. Israel Journal of Plant Sciences, ISSN: 0792-9978 (Print) 2223-8980 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tips20>. DOI: 10.1080/07929978.2017.1288407.
20. Nourollahi, K., Javannikhah, M., Naghavi, M.R., and Okhvt, S.M. 2009. Pathogenic diversity in *Didymella rabiei* from the western Iranian Ilam and Kermanshah provinces. Journal of Plant Protection 23: 56-65.
21. Saikia, R., Singh, B.P., Kumar, R., and Arora, D.K. 2005. Detection of pathogenesis-related proteins-chitinase and β -1,3-glucanase in induced chickpea. Current Science 89: 659-663.
22. Sharma, M., and Ghosh, R. 2016. An update on genetic resistance of chickpea to ascochyta blight. Agronomy 6: 18. doi:10.3390/agronomy6010018.
23. Shokoohifar, F., Bagheri, A., and Falahati Rastgar, M. 2003. Identification of genetic diversity in the *Ascochyta* blight pathogen of chickpea [*Ascochyta rabiei* (Pass.) Lab.] Using RAPD markers. JWSS-Isfahan University of Technology 7(2): 193-204.
24. Shokoohifar, F., Bagheri, A.R., and Falahati Rastgar, M. 2006. Identification of resistant chickpea lines against pathotypes causing *Ascochyta* blight disease in Iran. Iranian Journal of Biology 19(1): 29-42.
25. Soh, H.C., Park, A.R., Park, S., Back, K., Yoon, J.B., Park, H.G., and Kim, Y.S. 2012. Comparative analysis of pathogenesis-related protein 10 (PR10) genes between fungal resistant and susceptible peppers. European Journal of Plant Pathology 132(1): 37-48.
26. Taran, B., Warkentin, T., and Vandenberg, A. 2013. Fast track genetic improvement of *Ascochyta* blight resistance and double podding in chickpea by marker-assisted backcrossing. Theoretical and Applied Genetics 126(6): 1639-1647.
27. Udupa, S., and Baum, M. 2003. Genetic dissection of pathotype-specific resistance to *Ascochyta* blight disease in chickpea (*Cicer arietinum* L.) using microsatellite markers. Theoretical and Applied Genetics 106(7): 1196-1202.
28. Vidhyasekaran, P. 2002. Bacterial Disease Resistance in Plants: Molecular Biology and Biotechnological Applications. Routledge. 322pp
29. Wu, W.Q., Fan, H.Y., Jiang, N., Wang, Y., Zhang, Z.Y., Zhang, Y.L., Wang, X.B., Li, D.W., Yu, J.L., and Han, Ch.G. 2014. Infection of Beet necrotic yellow vein virus with RNA4-encoded P31 specifically up-regulates pathogenesis-related protein 10 in *Nicotiana benthamiana*. Virology Journal 11(1): 118.
30. Yadav, P., Tripathi, D.K., Kafel Khan, K., and Yadav, A.K. 2015. Determination of genetic variation and heritability estimates for morphological and yield traits in chickpea (*Cicer arietinum*) under late sown conditions. The Indian Journal of Agricultural Sciences 85(7): 116-129.

Tracing and sequencing of pathogenesis-related (PR) protein 10 gene in chickpea (*Cicer arietinum* L.)

Noori Shekartoo¹, M., Zaker Tavallaie^{2*}, F. & Shokoohifar³, F.

1. MSc. in Plant Biotechnology, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran; mnoori20409@gmail.com
2. Assistant Professor, Plant Biotechnologist, Department of Plant Production, Higher Education Complex of Shirvan, Shirvan, Iran
3. Assistant Professor, Plant Biotechnology, Legumes Department, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad; shokouhifar@um.ac.ir

Received: 19 June 2018

Accepted: 18 July 2018

DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.73594

Introduction

Chickpea (*Cicer arietinum* L.) is an especial important crop among Pulse crops. One of the most important factors limiting the yield of chickpea is fungal diseases. Ascochyta blight is the most problematic disease of chickpea. The fungus *Ascochyta rabiei* (also called *Didymella rabiei*) causes ascochyta blight of chickpea. Pathogenesis related (PR) proteins are one of the ways to control plant pathogens. These proteins are encoded by the host plant, but their express done only in the presence of disease agent or the related conditions (Ghannadha *et al.*, 2006). PR-proteins are a variety group of proteins including: glucanase, chitinases, endoproteinase, peroxidases, protease inhibitors, as well as small proteins such as osmotins, thionins, defensins, and lipid transfer proteins (Jain *et al.*, 2012). So far seventeen PR proteins have been identified (Liu *et al.*, 2006). PR-2 is the only PR-protein that identified in chickpea. The PR-10 has many functions. Direct evidence of antimicrobial activity induced by PR-10 is known in microbiological labs. The ability to connect to ligands is also observed. It also has an enzymatic activity in the secondary metabolism of plants and plays a role in abiotic stresses (Liu *et al.*, 2006). This research was done to detect *pr-10* gene in chickpea genome.

Materials & Methods

In this experiment, six genotypes of chickpea, including two sensitive genotypes (MCC506 and MCC507), two resistant genotypes (MCC142 and MCC528) and two tolerant genotypes (MCC20 and MCC150), against ascochyta blight were used. The seeds were surface sterilized using 2% sodium hypochlorite and germinated in sterile petri dishes. The germinated seeds were planted in pots (with 20 cm in diameter) containing combination of perlite, coco peat and vermicompost with a ratio of 1: 2: 1 at a depth of 2.5 cm. After one month, DNA extraction was down from leaves using CTAB method. RCR reaction was down using primers of PSH-91 and MN in 2 steps. These primers were designed using Primer software Ver.5. The first step was performed using PSH-91 primer on genomic DNA and second step using MN primer on first PCR product. The detected gene was extracted using a Gel extraction kit manufactured by Denazist Company. Then PR-10 gene constructs were sequenced. Sequencing results were analyzed using SeqMan software.

Results & Discussion

Germination of plants was almost simultaneously. The shoot production of resistant and tolerant plants was more than sensitive cultivars. Resistant and tolerant varieties reached to flowering stage earlier and produced more abundant seed rather than sensitive cultivars. The presence of a single-band 1350 bp in the first PCR and a single-band 1289 bp in the second PCR indicated to presence of the PR-10 gene in the chickpea genome. The results of this research indicated that there is no difference in sequence of coding gene of PR-10 protein in chickpea genome with different resistance levels.

*Corresponding Author: f.zaker.t@um.ac.ir

Conclusion

Due to the lack of diversity in the nucleotide sequence of pr-10 gene among resistant and sensitive cultivars, it is likely that when the protein is expressed in the presence of the disease agent, the expression difference between the different varieties is shown. This seems reasonable considering research on the pr-10 rice genes (Babaiezadeh & Sayyari, 2012). The PR-10 gene in rice is naturally not expressed in leaves and does not respond to ulcers, but it has high expression potential in the presence of ethylene and jasmine acids (Heidarinejad *et al.*, 2014). Also, in evaluating the resistant and susceptible cultivar of rice blight pods disease, PR-10 gene expression in resistant cultivars was significantly increased compared with susceptible cultivars (Babaiezadeh and Sayyari, 2012). It seems that additional experiments are necessary in disease condition on expression of pr-10 gene in chickpea.

Keywords: Ascochyta blight, *Cicer arietinum* L., Pathogenesis related (PR) proteins, pr-10 gene