Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*

Jalal Gholamnezhad [1]*, Forough Sanjarian [2], Ebrahim Mohammadi Goltapeh [3], Naser Safaei [3] and Khadijeh Razavi [2]

[1] Faculty of Agriculture and Natural Resources, Ardakan University, Ardakan, Iran
[2] Agriculture Biotechnology Institute, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran
[3] Department of Plant Pathology, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

Abstract

The aim of this study was to examine the effect of salicylic acid on the gene expression pattern of four enzymes; Phenylalanine ammonialyase, Polyphenol oxidase, Peroxidase and Catalase in wheat-*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. For this reason, Salicylic Acid (2mm) were sprayed on wheat in two-leaf stage before inoculation with the fungal pathogen. Sampling of the plants was done at five time points (0, 3, 6, 12 and 24 h) after inoculation. The scanning of genes expression pattern of encoding enzymes were carried out by reverse northern dot blotting method. The results showed that within 24 hours post inoculation the gene expression of these enzymes significantly increased in this tolerant cultivar. SA enhanced the expression of Phenylalanine ammonialyase and Peroxidase genes in all time points. The expression of Polyphenol oxidase was increased by SA after 12h. On the other hand, increasing the expression level of these genes directly increases the activity of the enzymes which indicates direct role of these gens in plant defense system. SA caused a rapid rise in expression of Catalase gene, but this effect was not continued for 24h.

Keywords: Antioxidant enzymes, Gene expression pattern, *Mycosphaerella graminicola*, Salicylic Acid

* Corresponding Author: jalal.gholamnejad@modares.ac.ir

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

زیست‌شناسی گیاهی ایران، سال هشتم، شماره سی‌ام، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ۴۳-۵۴
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۱۲/۲۲
تاریخ بررسی مجدد: ۱۳۹۵/۰۷/۰۷
تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۵/۱۰/۱۳

بررسی تغییرات بیان ژن‌های دفاعی گیاه گندم در پاسخ به آلودگی به *Mycosphaerella graminicola*

جلال غلام‌نژاد [۱]*، فروغ سنجریان [۲]، ابراهیم محمدی گل‌تپه [۳]، ناصر صفایی [۳] و خدیجه رضوی [۲]
[۱] گروه محیط‌زیست، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران
[۲] پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران
[۳] بخش بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر، بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید بر میزان بیان ژن‌های رمزکنندهٔ چهار آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز، پلی‌فنل اکسیداز، پراکسیداز و کاتالاز در گیاه گندم (رقم متحمل زاگرس) در برهم کنش با قارچ بیماری‌زای *Mycosphaerella graminicola* بود. به این‌منظور، گیاه گندم در مرحلهٔ دو برگی با سالیسیلیک اسید (SA) تلقیح و سپس با قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شد. نمونه‌برداری از این گیاهان در پنج نقطهٔ زمانی (۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت) پس از مایه‌زنی قارچ بیماری‌زا انجام شد. سپس میزان بیان ژن‌های رمزکنندهٔ این آنزیم‌ها با روش نوردرن بلات معکوس بررسی شد. مقدار بیان ژن رمزکنندهٔ هر چهار آنزیم، بر اثر مایه‌زنی با قارچ بیماری‌زا و سالیسیلیک اسید، از نخستین نقطهٔ زمانی پس از مایه‌زنی در این رقم از گندم افزایش و تفاوت معنی‌دار داشت. تأثیر سالیسیک اسید بر افزایش بیان ژن آنزیم‌های فنیل‌آلانین آمونیالیاز و پراکسیداز در همهٔ نقاط زمانی مثبت بود. افزایش سالیسیلیک اسید پس از ۱۲ ساعت بر بیان ژن آنزیم پلی فنل اکسیداز مؤثر بود. سالیسیلیک اسید روند جهشی بیان ژن کاتالاز را ۱۲ ساعت پس از آلودگی با قارچ باعث شد؛ اما این تأثیر تا ساعت ۲۴ تداوم نداشت. بر اساس نتایج این پژوهش برای اینکه گیاه بتواند در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا مصون بماند باید بیان ژن‌های دفاعی در ساعات ابتدایی پس از تلقیح قارچ بیماری‌زا افزایش پیدا کند. از سویی افزایش بیان این ژن‌ها با افزایش میزان فعالیت آنزیم‌های متناظر ارتباط مستقیم دارد که نشان‌دهندهٔ نقش مستقیم ژن‌های دفاعی در فعالیت‌های سیستم دفاعی گیاه است. در پژوهش حاضر، از رقم مقاوم زاگرس استفاده شد، لذا افزایش زودهنگام بیان ژن‌ها، پدیده‌ای قابل توجیه در سازوکار مقاومت گیاه در برابر عامل بیماری‌زا به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: سالیسیلیک اسید، الگوی بیان ژن، آنزیم‌های اکسیداتیو، گندم، *Mycosphaerella graminicola*

* نگارنده مسؤول: نشانی پست الکترونیک: jalal.gholamnejad@modares.ac.ir، شماره تماس: ۰۳۵۳۲۲۴۰۹۱۱

Copyright©2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

گندم غذای اصلی حدود ۳۵٪ جمعیت جهان را تشکیل داده است و پیش‌بینی می‌شود در سال ۲۰۲۰، تقاضای جهانی برای این محصول بین ۸۴۰ تا ۱۰۵۰ میلیون تن باشد. برای رسیدن به این سطح تقاضا، تولید این محصول باید سالانه ۱/۶ تا ۲/۶٪ افزایش پیدا کند (Chartrain *et al*., 2004). گیاه گندم در مدت کشت تا برداشت، در معرض تنش‌های محیطی زنده و غیرزندهٔ مختلفی مانند بیماری‌ها و خشکی قرار می‌گیرد که رشد گیاه را محدود می‌کند. در گندم نیز مانند سایر گیاهان، سازوکارهای مختلفی برای سازش با این تغییرات و حفظ بقای گیاه تکامل یافته است که از آن جمله می‌توان به سازوکارهای مورفولوژیک، فیزیولوژیک و تغییرات مولکولی اشاره کرد (Kia and Torabi, 2008).

بیماری سوختگی برگ گندم (سپتوریوز برگی) از مهم‌ترین بیماری‌های گندم در جهان است که سالیانه خسارات فراوانی را به محصول گندم وارد می‌کند (Goodwin *et al*., 2003). عامل این بیماری قارچ بیماری‌زای *Mycosphaerella graminicola* (Fuckel) J.Schröt.in Cohen با شکل غیرجنسی *Zymoseptoria tritici* است (Quaedvlieg *et al*., 2011). گزارش‌هایی مبنی بر بروز اپیدمی‌های بیماری در بعضی از استان‌ها از جمله گلستان، خوزستان و فارس وجود دارد. میزان کاهش محصول ناشی از خسارت این بیماری بر تعدادی از ارقام متداول، در استان‌های خوزستان و گلستان تا حدود ۴۴٪ برآورد شده است (Kia and Torabi, 2008). کنترل این بیماری با قارچ‌کش، به‌کاربردن ارقام مقاوم و همچنین با روش‌های زراعی (تناوب زارعی و از بین بردن بقایای گیاهان آلوده) است (Adhikari *et al*., 2007). تلاش‌هایی نیز برای کنترل زیستی این قارچ انجام گرفته است که هنوز به نتایج کاربردی در مزرعه منجر نشده است (Zamani *et al*., 2016; Lynch *et al*., 2016; Gholamnezhad *et al*., 2012). با توجه به ناکارآمدی روش‌های زراعی در مهار موثر بیماری، مقاومت جدایه‌های قارچ به سموم سیستمیک، هزینه‌ها و آلودگی ناشی از مصرف سموم شیمیایی؛ استفاده از ارقام مقاوم، اقتصادی‌ترین، بهترین و از نظر زیست‌محیطی، سالم‌ترین روش مقابله با این بیماری است (Berraies *et al*., 2013).

تأثیر قوی رقم گندم بر بیان ژن‌های بیماری‌زایی *M. graminicola* با مطالعات نسل جدید توالی‌یابی (next generation sequencing) مشخص شده است (McDonald *et al*., 2016). تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم، شناسایی به موقع بیماری‌زای مهاجم و فعال‌سازی سریع و موثر سازوکارهای دفاعی گیاه مقاوم است. ژن‌های فراوانی در پاسخ گیاه به بیماری‌زا، فعال یا خاموش می‌شوند. همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش یابد. بررسی بیان متمایز ژن‌ها یکی از روش‌های مهم برای مشخص‌کردن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است (Wang *et al*., 2009).

دانش ژنتیک مقاومت، برای اصلاح گندم مقاوم به بیماری لکهٔ برگی گندم اهمیت زیادی دارد. مقاومت ژنتیکی در ارقام مختلف به دو شکل کمی و کیفی گزارش شده است (Vakili Bastam *et al*., 2010). تحقیقات در این زمینه نشان می‌دهد که مقاومت در برابر این بیماری با ژن‌های بارز کنترل می‌شود (Boukef *et al*., 2012). وجود تخصص‌یافتگی فیزیولوژیک در بیماری‌زای *M. graminicola* و رابطهٔ ژن برای ژن در این

پاتوسیستم، سال‌ها پیش به اثبات رسید و تعداد ۱۸ ژن مقاومت (*Stb1-Stb18*) به بیماری سپتوریای برگی در ژنوتیپ‌های مختلف گندم مکان‌یابی شد (Arraiano *et al*., 2007).

برادینگ و همکاران در سال ۲۰۰۲ با بررسی مقاومت ویژهٔ چند رقم گندم حساس و مقاوم و ژن‌های کنترل‌کنندهٔ مقاومت آن‌ها در مقابل جدایه‌های عامل بیماری لکهٔ برگی سپتوریایی، بر رابطهٔ ژن برای ژن بین مقاومت اختصاصی گندم و بیماری‌زایی *M. graminicola* تأکید کردند. مقاومت به این بیماری ممکن است کمّی یا اختصاصی باشد. مقاومت اختصاصی، تقریباً کامل و الیگوژنیک است و از رابطهٔ ژن برای ژن تبعیت می‌کند (Brading *et al*., 2002).

سالیسیلیک اسید (SA) تنظیم‌کنندهٔ طبیعی رشد گیاه است. علاوه براین، گیاهان مقدار داخلی این ماده را در برابر بیماری‌زای‌های مختلف افزایش می‌دهند. استفاده از SA خارجی برای القای مقاومت به بیماری‌زای‌های ویروسی، باکتریایی و قارچی در گیاهان بسیاری آزموده شده و تاثیر مثبت داشته است (Hayat *et al*., 2010).

در این مطالعه، بیان ژن‌های دفاعی که نقش مهمی در فرایند پاسخ به تنش در گیاه و به خصوص در متحمل بازی می‌کنند، در پاتوسیستم گندم – *M. graminicola* با روش نوردرن بلات معکوس مورد بررسی قرار گرفته است. بازهٔ زمانی برداشت نمونه تا ۲۴ ساعت اولیه پس از آلودگی بود تا گیاه با پاسخ سریع به عامل بیماری‌زا از ایجاد بیماری جلوگیری کند که این پاسخ سریع با افزایش بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های دفاعی انجام می‌شود. اگر گیاه نتواند واکنش سریع نشان دهد، عامل بیماری‌زا با گذشت زمان غلبه می‌کند؛ درنتیجه گیاه بیمار می‌شود (Ray *et al*., 2003; Adhikari *et al*., 2007). نوردرن بلات معکوس، یکی از روش‌هایی است که اطلاعات توالی (ژنومیکس ساختاری) را به ژنومیکس عملکردی (تعیین عملکرد و نوع فعالیت) ربط می‌دهد (Rabbani *et al*., 2003). هدف اصلی از این مطالعه نشان‌دادن افزایش بیان ژن‌های دفاعی در رقمی نسبتاً مقاوم است که متعاقباً افزایش سیستم‌های دفاعی گیاه را باعث می‌شود. در این مطالعه تأثیر غلظت‌های متفاوت سالیسیلیک اسید (عامل القای سیستم دفاعی) بر میزان بیان ژن‌های رمزکنندهٔ چهار آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، پلی‌فنل‌اکسیداز (PPO)، پراکسیداز (POX) و کاتالاز (CAT) در رقم متحمل زاگرس از گیاه گندم در برهم‌کنش با قارچ بیماری‌زا بررسی شد.

مواد و روش‌ها

کشت گیاهان و ایجاد تنش بیماری‌زا: در تحقیق حاضر، رقم گندم زاگرس استفاده شد. اصلاحی و همکاران این رقم را متحمل به قارچ بیماری‌زا *M. graminicola* تشخیص دادند (Esllahi *et al*., 2013). بذرها پس از استریل‌شدن با الکل ۷۰٪ به‌مدت ۳۰ ثانیه و دو بار شستشو با آب مقطر استریل، در عمق ۱ سانتی‌متری خاک گلدان (محتوی پرلیت، خاک سترون و خاک‌برگ با نسبت ۱:۱:۱) کشت شدند. در هر گلدان سه بذر کاشته شد و گلدان‌ها در شرایط ۱۶ ساعت نور و هشت ساعت تاریکی و دمای ۲۳ درجهٔ سانتیگراد روز و ۱۸ درجهٔ‌سانتیگراد شب نگهداری شدند. گیاهچه‌ها در مرحلهٔ دوبرگی (۱۲روزه‌گی) با سوسپانسیون جدایهٔ قارچ بیماری‌زا به روش Chartrain و همکاران (۲۰۰۴) تلقیح‌شدند. هم‌زمان، این گیاهان با سالیسیلیک اسید در غلظت‌های (۰ و ۲ میلی‌مولار) محلول‌پاشی شدند.

غلظت‌ها براساس مطالعهٔ انجام‌شدهٔ قبلی نگارندگان در گلخانه با همین رقم و عامل بیماری، انتخاب شد (Gholamnezhad *et a.l*, 2012). گیاهان شاهد تنها با آب مقطر استریل تلقیح شدند. برای بررسی پاسخ‌های اولیه و سریع گیاه، در زمان‌های ۰، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی قارچ بیماری‌زا، نمونه‌برداری از برگ‌های گیاه گندم انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله در محل نمونه‌برداری به ظرف نیتروژن مایع منتقل و سپس در فریزر ۷۰- درجهٔ سانتیگراد آزمایشگاه ذخیره شدند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و شامل دو سطح بیماری‌زا، دو سطح سالیسیلیک اسید و پنج سطح زمانی (مجموعا ۲۰ تیمار) بود.

انتخاب ژن‌ها و طراحی آغازگر: در پژوهش حاضر، بیان ژن چهار آنزیم آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل اکسیداز با شماره شناسایی AY515506، فنیل‌آلانین آمونیالیاز با شماره شناسایی AEX59143، پراکسیداز با شماره شناسایی CAA39486 و کاتالاز با شماره شناسایی CAA64077، ارزیابی شد. توالی این ژن‌ها از بانک اطلاعاتی ژنوم (NCBI) به دست آمد و آغازگرهای اختصاصی طراحی شد (جدول ۱). برای ژن خانه‌دار (کنترل داخلی) نیز از ژن آلفا توبولین استفاده شد.

استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA از بافت اندام‌های هوایی گندم با کیت RNXplus (سیناژن، ایران) مطابق دستورالعمل انجام شد. برای ساخت cDNA حدود ۵ میکروگرم از RNA استخراجی با مقدار ۰/۵ میکرولیتر آغازگرهای Oligo dT مخلوط شد و در دمای ۶۵ درجهٔ سانتیگراد به‌مدت ۵ دقیقه قرار گرفت و سپس روی یخ، سرد شد. واکنش رونویسی معکوس در حضور Thermo Scientific RiboLock RNase و Reverse Transcriptase (Thermo Scientific، آمریکا) و dNTP به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۴۲ درجهٔ سانتیگراد انجام شد. در مرحلهٔ پایانی برای غیرفعال‌کردن آنزیم واکنش، به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجهٔ سانتیگراد قرار گرفت. با الگوی cDNA و آغازگرهای اختصاصی، هر ژن با واکنش PCR تکثیر شد. مقدار هر ژن از مقایسهٔ میزان روشنایی باند محصول PCR روی ژل آگارز با میزان روشنایی باند متناظر نشانگر DNA در رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید و کمّی‌کردن آن با نرم‌افزار Totallab (Totallab، انگلیس) مشخص شد.

جدول ۱- نام ژن‌ها و توالی آغازگرهای استفاده‌شده در نوردن بلات معکوس

نام ژن	نام مخفف	توالی آغازگر (′۳-′۵)	طول توالی	دمای ذوب درجهٔ سانتیگراد
کاتالاز	CAT	**F:** AGGCTCACCTGGTTAAGTTC **R:** CAGTGGGATGATGTCCTCTG	۲۷۱	۶۰
پراکسیداز	POX	**F:** AATCAGACCGTCTCCTGCG **R:** GGTGGTGTCGTTGTTGAAC	۲۴۸	۶۰
فنیل آلانین آمونیالیاز	PAL	**F:** TTCTGTCCGTCCTTGCTGAG **R:** CAATGGGGGTGCCTTGGAAG	۲۸۴	۶۲
پلی‌فنل اکسیداز	PPO	**F:** AACGACCAGCTCTCCAACAT **R:** AACAGGGATGTGTAGGTCAG	۲۵۰	۶۰
آلفا – توبولین	α-Tub	**F**:GCTTTCAACACCTTCTTCAG **R**:GGGGCATAGGAGGAAAGCA		۵۶

ساخت پروب نشان‌دار: در بررسی الگوی بیان ژن‌ها، از RNA استخراجی از گیاهان تیمارشده برای تهیهٔ نشانگر (Probe) استفاده شد. مراحل تهیهٔ پروب یا نشانگر نشاندار، مانند تهیه cDNA معمولی بود با این تفاوت که به جای استفاده از dNTP معمولی از DIG labeled dNTP (Roche Life Science، آلمان) استفاده شد.

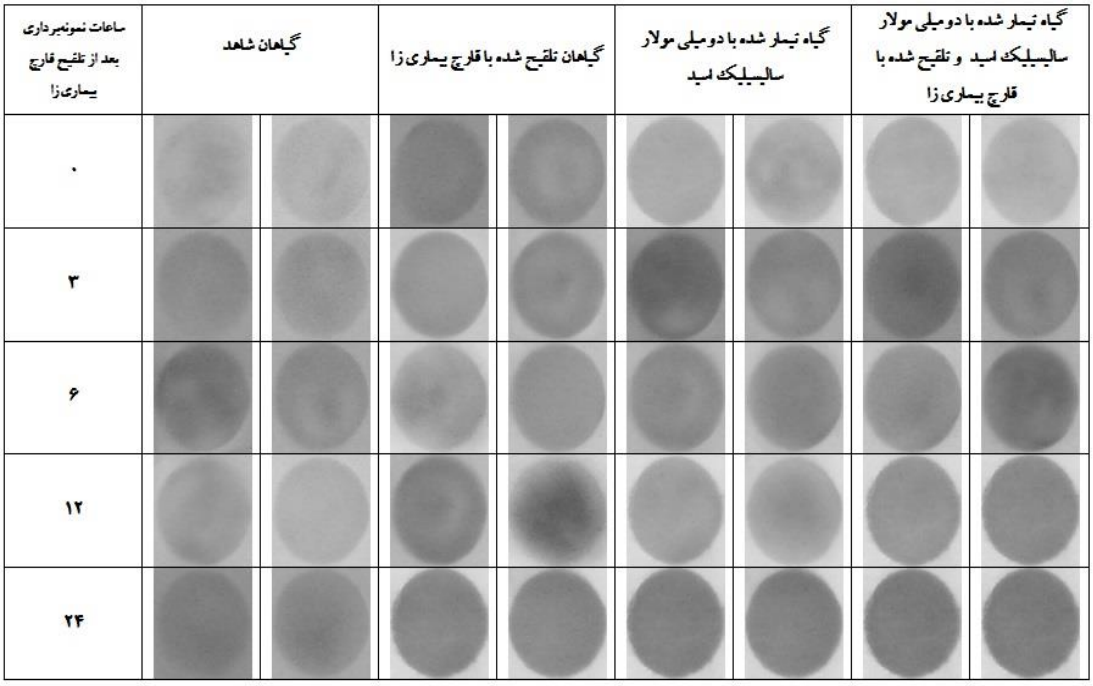
نوردرن بلات معکوس و بررسی بیان ژن‌ها: پس از بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR، ۰/۵ تا ۱ میکروگرم از محصول PCR هر ژن روی غشا لکه‌گذاری شد. محصول PCR ژن‌های انتخابی با محلول NaOH ۱ میلی‌مولار و محلول ۰/۲۵ مولار NaCl واسرشت شدند و در دستگاه بلاتر ۹۶ چاهکی روی غشا لکه‌گذاری شدند. پس از خشک‌شدن غشا در دمای اتاق، لکه‌ها به‌مدت ۱ ساعت در دمای ۱۰۰ درجهٔ‌سانتیگراد تثبیت شدند. از cDNA ژن آلفا- توبولین گندم برای کنترل داخلی و از آب مقطر و محلول واکنش PCR بدون الگو برای کنترل منفی استفاده شد. برای واسرشت‌کردن، نشانگرهای تهیه شده (cDNA نشاندارشده با DIG) به‌مدت ۵ دقیقه در آب‌جوش و به دنبال آن ۵ دقیقهٔ دیگر روی یخ قرار داده شدند. پیش‌دورگه‌سازی غشا با ۵۰ میلی‌لیتر از محلول پیش‌هیبریداسیون با pH= ۷/۲ (۳۵ میلی‌لیتر SDS ٪۷، ۱۰۰ میکرولیتر EDTA ۱ میلی‌مولار و ۱۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲۵ مولار) در دمای ۶۵ درجهٔ‌سانتیگراد به‌مدت ۱/۵ ساعت داخل دستگاه هیبریداسیون انجام شد. پس از تخلیهٔ محلول پیش‌دورگه‌سازی، ۵۰ میکرولیتر نشانگر واسرشته به ۵ میلی‌لیتر محلول پیش‌هیبریداسیون اضافه شد و دورگه‌سازی به‌مدت یک شب در دمای ۶۵ درجهٔ‌سانتیگراد و داخل دستگاه هیبریداسیون انجام شد. پس از تخلیهٔ مخلوط نشانگر و محلول دورگه‌سازی در لولهٔ استریل و نگهداری آن در ۲۰- درجهٔ سانتیگراد، غشا سه مرتبه شستشو داده شد. شستشوی اول با محلول SSC ۲X حاوی ۰/۱٪ SDS دو مرتبه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انجام شد. شستشوی دوم غشا با محلول SSC ۰/۵X حاوی ۰/۱٪ از SDS یک بار به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجهٔ سانتیگراد انجام شد و در شستشوی آخر، غشا با محلول SSC ۰/۲X بدون SDS به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق شستشوشد. در مرحلهٔ آخر، ۱۰ میکرولیتر گهرمایهٔ CDS-Star (Roche Life Science، آلمان) به غشای قرار گرفته در پاکت سلوفونی اضافه شد. سپس غشا در تاریک‌خانه در معرض فیلم رادیولوژی (X-ray) گذاشته شد و فیلم پس از ۳۰ دقیقه ظاهر شد. امتیازدهی به لکه‌ها با نرم‌افزار TotalLab، که میزان تیرگی لکه‌ها را براساس تعداد نقاط تیرهٔ موجود در محدودهٔ لکهٔ مد نظر مشخص می‌کند، انجام شد. پس از آنکه همهٔ لکه‌ها با نرم‌افزار، براساس لکهٔ آلفا - توبولین، استاندارد شدند، داده‌های حاصل از نرم‌افزار TotalLab وارد نرم‌افزار Excel شدند و با نرم افزار SAS ver.9 تجزیه و تحلیل شدند. میانگین مربوط به بیان هر ژن در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار زیستی و دو تکرار روشی) تجزیهٔ واریانس شد. پس از تجزیهٔ واریانس برای هر ژن، مقایسهٔ میانگین‌های مربوط به هر ژن با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۱٪ انجام شد.

نتایج

براساس اطلاعات به‌دست‌آمده از غشاها (برای مثال شکل (۱)، مربوط به آنزیم پلی‌فنل اکسیداز) در پاتوسیستم گیاهی مطالعه‌شده، بیان ژن آنزیم‌های بررسی‌شده، در دورهٔ ۲۴ ساعت نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد. خلاصهٔ تجزیهٔ واریانس برای تغییرات بیان ژن‌های بررسی‌شده در حالت تیمار با قارچ بیماری‌زا و سالیسیلیک اسید در جدول (۲) آمده است.

جدول ۲- خلاصهٔ تجزیهٔ واریانس میزان تغییرات بیان ژن‌های بررسی‌شدهٔ درگیر در برهم‌کنش گندم، و قارچ بیماری‌زای *M. graminicola*، در تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید. SA: سالیسیلیک اسید P: بیماری‌زا

منابع تغییرات	CAT	POX	PAL	PPO
	میانگین مربعات			
تیمار	۴۱۳۵/۹	۱۷/۱۱**	۱۶۸۱**	۶۳۱/۴**
خطا	۲/۲۷	۱/۴۶	۱/۷۱	۱/۰۳
ضریب تغییرات (C.V)	۲/۰۹	۲/۹۴	۴/۵۸	۳/۳۶



شکل ۱- تصویر درشت‌آرایه از پروفایل بیانی ژن PPO در تنش با قارچ و سالیسیلیک اسید. تیرگی لکه‌ها نشان‌دهندهٔ مقدار cDNA نشان‌دار متصل‌شده به DNA ژن PPO تثبیت‌شده در کاغذ نیترو سلولز (مقدار بیان ژن) است. برای آنالیزهای نهایی، تیرگی لکه‌ها براساس لکهٔ آلفا - توبولین با نرم‌افزار، استاندارد شدند.

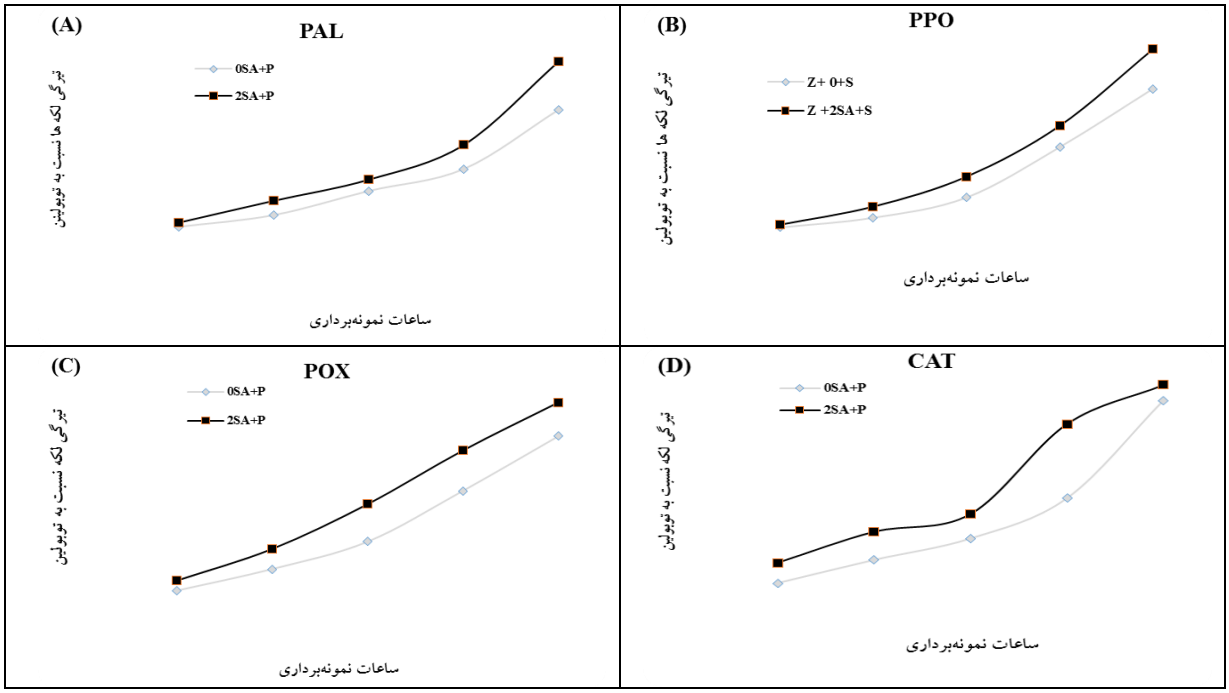
بیان ژن رمزکنندهٔ آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش نشان داد. با اینکه افزایش بیان در هر دو تیمار، روندی مشابه داشت، مایه‌زنی هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ بیشتر از تلقیح با قارچ تنها، بر بیان این ژن تاثیر داشت

که نشان‌دهندهٔ بیان بیشتر آن در حضور سالیسیلیک‌اسید و قارچ بیماری‌زا در رقم مقاوم است (شکل ۲-A).

بیان ژن رمزکنندهٔ پلی‌فنل اکسیداز (PPO) در طول ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید افزایش یافت. با اینکه افزایش بیان در هر دو تیمار از شش ساعت پس از تلقیح، با روند جهشی همراه شد و تا ۲۴ ساعت پس از تلقیح ادامه یافت. در همهٔ ساعات نمونه‌برداری بجز نقطهٔ زمانی ۲۴، بیان ژن رمزکنندهٔ این آنزیم در تیمار با قارچ، اختلاف معنی‌داری با تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید نشان نداد (شکل ۲-B).

بیان ژن رمز کنندهٔ آنزیم پراکسیداز در مدت ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و آب مقطر و نیز تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش یافت. روند افزایش بیان این ژن در هر دو تیمار سالیسیلیک اسید همراه با قارچ بیماری‌زا و همچنین قارچ بیماری‌زا به‌تنهایی مشابه بود و تا ۲۴ ساعت پس از نمونه‌برداری ادامه داشت. همچنین افزایش بیان ژن در تیمار با قارچ بیماری‌زا کمتر از تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ بود (شکل ۲- C).

بیان ژن رمزکنندهٔ آنزیم کاتالاز در مدت ۲۴ ساعت در هر دو تیمار قارچ و آب مقطر و نیز تیمار هم‌زمان قارچ و سالیسیلیک اسید (2SA+P) افزایش نشان داد (شکل ۲-D). در تیمار هم‌زمان SA و بیماری‌زای قارچی در ساعت ۱۲، روند جهشی افزایش دیده شد که در تیمار قارچ بدون سالیسیلیک اسید مشاهده نشد. پس از آن در ساعت ۲۴، تیمار با قارچ افزایش سریع داشت؛ اما تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید و قارچ، این افزایش را نشان نداد (شکل۲-D).



شکل ۲- تاثیر سالیسیلیک اسید و قارچ بیماری‌زا بر بیان ژن آنزیم‌های A) فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، B) پراکسیداز (POX)، C) پلی‌فنل اکسیداز (PPO) و D) کاتالاز (CAT) در گندم. SA: سالیسیلیک اسید ،P: بیماری‌زا. مقادیر میانگین چهار تکرار و بر اساس آزمون چندمتغیرهٔ دانکن در سطح ($P\leq0.01$) معنی‌دار هستند.

بحث

نتایج آزمایش مربوط به بیان ژن رمزکنندهٔ آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL) در گیاه گندم که با سالیسیلیک اسید تیمار شده بود، نشان داد که ۲۴ ساعت پس از تلقیح قارچ بیماری‌زا، بیان این ژن در هر دو تیمار افزایش داشت و سالیسیلیک اسید هم تأثیر معنی‌داری در افزایش بیان ژن این آنزیم داشت. با توجه به شکل (۱)، در گیاهان تیمارشده با قارچ و سالسیلیک اسید، افزایش بیان این ژن مشاهده می‌شود و شیب این افزایش از ساعت ۱۲ تا ۲۴ بیشتر شده است. ترکیبات فنیل پروپانوئیدی از سینامیک اسید مشتق می‌شوند و خود سینامیک اسید از آمینو اسید فنیل‌آلانین تشکیل شده است (Huang *et al*., 2010). آنزیم فنیل‌آلانین آمونیالیاز (PAL)، واکنش تبدیل فنیل‌آلانین را به ترانس سینامیک اسید کاتالیز می‌کند. این مرحله، نخستین قدم در مسیر فنیل پروپانوتید است و گلوگاه تنظیمی مهم بین متابولیسم اولیه و ثانویه به شمار می‌رود (Vogt, 2010; Huang *et al*., 2010). ترانس _ سینامیک اسید، پیش‌مادهٔ طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های فنلی و دیگر ترکیبات است. فعالیت آنزیم PAL با عوامل زنده و غیرزندهٔ مختلف القا می‌شود که در نتیجه تجمع ترکیبات فنلی مانند اسیدهای فنلی و فلاونوئیدها را موجب می‌شود. آنزیم PAL با تنظیم متابولیسم ترکیبات مختلف فنلی مقاومت گیاهان نسبت به تنش‌ها را سبب می‌شود (Wen *et al*., 2005). در آلودگی گندم با قارچ *Fusarium graminearum*، افزایش بیان ژن *PAL* در رقم حساس فلات، ۳ برابر گزارش شده است که تیمار هم‌زمان سالیسیلیک اسید، این افزایش را به ۷ برابر نسبت به گیاه شاهد تلقیح‌شده با آب مقطر رساند. افزایش فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز به‌دنبال افزایش بیان ژن آن مشاهده شد. در پژوهش حاضر، افزایش بیان ژن و فعالیت آنزیم PAL در واریتهٔ متحمل، پس از آلودگی با قارچ، مشاهده شد و تیمار سالیسیلیک اسید آن را تشدید کرد (Sorahinobar *et al*, 2015). افزایش بیان ژن *PAL* در گیاه توتون ۱۰ ساعت پس از آلودگی با *Pseudomonas syringae* گزارش شده است که این افزایش بیان با افزایش فعالیت این آنزیم نیز همراه بوده است (Denslow *et al*., 2005). همچنین، در برگ‌های گندم آلوده شده با *Botrytis cinerea*، در محل آلودگی با این قارچ بیماری‌زا، افزایش فعالیت آنزیم PAL مشاهده شده است (Huang *et al*., 2010).

آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در اکسیداسیون فنل به ترکیبات کینون و تشکیل لیگنین نقش دارد. پژوهش‌ها نشان داده است که آنزیم‌هایی مانند پلی‌فنل اکسیداز و فنیل‌آلانین آمونیالیاز در فعالیت‌های دفاعی و واکنش‌های فوق حساس در مقابل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی نقش دارند. این آنزیم همچنین مسئول واکنش‌های قهوه‌ای شدن بافت‌های زخمی و تشکیل سدهای دفاعی در مقابل بیماری‌زاها است. از سویی ترکیبات کینون حاصل از اکسیداسیون فنل‌ها، ترکیباتی به مراتب سمی‌تر از فنل‌ها هستند و نقش آن‌ها در دفاع از گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا در گیاهان کاملاً شناخته شده است (Mohammadi and Kazemi, 2002). نتایج مربوط به بیان ژن‌های رمزکنندهٔ پلی‌فنل‌اکسیداز (شکل ۲-B) در گیاه گندم شاهد و آلوده با قارچ بیماری‌زای القا شده با سالیسیلیک اسید نشان داد که این القاکننده، بیان ژن‌های یادشده را در گیاه گندم در حضور و غیاب قارچ

بیماری‌زا افزایش داد. اندازه‌گیری آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در برهم‌کنش گیاه گندم با قارچ *Alternaria triticina* مشخص کرد که گرچه فعالیت این آنزیم در رقم متحمل قبل از رویارویی با قارچ، بیشتر از رقم حساس است، تلقیح قارچ بیماری‌زا افزایش فعالیت در هر دو رقم را موجب می‌شود (Tyagi *et al*., 2000). تشدید فعالیت پلی‌فنل اکسیداز در جو دوسر بر اثر آلودگی با *Fusarium avenaceum* نیز گزارش شده است (Fuerst *et al*., 2014).

پراکسیداز و کاتالاز آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که غلظت H_2O_2 را تنظیم می‌کنند (Chandra *et al*., 2007). گیاهان برای ازبین‌بردن اثر رادیکال‌های آزاد ناشی از تنش‌های زنده و غیرزنده، سازوکارهای دفاعی خود را به کار می‌گیرند. نقش چندین آنزیم از جمله پراکسیداز، کاتالاز، سوپراکساید دیسموتاز، پلی‌فنل اکسیداز و ترکیباتی شبیه به فنل از انواع متابولیت‌های ثانویه که در پاسخ به تنش در گیاهان تجمع می‌یابند به اثبات رسیده است (Honty *et al*., 2005). بیان این دو آنزیم در گندم‌های آلوده به قارچ بیماری‌زا در غیاب و حضور سالیسیلیک اسید در زمان‌های نمونه‌برداری افزایش یافت (شکل۲- C,D). در پاتوسیستم بیماری زنگ برگی (قهوه‌ای) گندم، افزایش بیان ژن آنزیم‌های اکسیداتیو بر اثر قارچ بیماری‌زا گزارش شده است (Fofana *et al*, 2007). در برهم‌کنش گندم با قارچ بیماری‌زای *Blumeria graminis* افزایش فعالیت آنزیم‌های اکسیداتیو ۴۸ ساعت پس از آلودگی در گیاه متحمل نسبت به گیاه حساس مشاهده شد (Ma *et al*., 2015).

داده‌ها دربارهٔ نقش سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنزیم کاتالاز متناقض هستند. خیساندن دانه‌های ذرت در ۰/۱ میلی‌مولار SA فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را افزایش داد (Momeni *et al*., 2012). پیش‌تیمار گیاه شاهی با غلظت ۰/۰۵ میلی‌مولار SA به کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز منجر شد؛ اما با افزایش غلظت به ۰/۱ میلی‌مولار، فعالیت این آنزیم افزایش یافت. اگر چه در هر دو غلظت، فعالیت آنزیم نسبت به گیاه شاهد کمتر بود (Hashemi *et al*., 2010). گزارش شده است که پیش‌تیمار با SA ۰/۲ میلی‌مولار فعالیت آنزیم کاتالاز را در گیاه عدس پس از ۷ روز تنش شوری کاهش داد (Kayednezami and Balouchi, 2013). پاشیدن SA ۱ میلی‌مولار در گیاه بادرنجبویهٔ تیمارشده با اشعهٔ فرابنفش به افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز منجر شد (Pourakbar and Adedzadeh, 2014). به نظر می‌رسد غلظت SA استفاده شده و همچنین زمان برداشت نمونه در این تناقض دخیل باشند. در تحقیق حاضر سالیسیک اسید در غلظت ۲ میلی‌مولار، افزایش شدید بیان ژن کاتالاز را نسبت به نمونهٔ تلقیح شده با قارچ در مدت ۱۲ ساعت پس از اعمال تیمار به دنبال داشت؛ اما در مدت ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار، این تاثیر را نداشت.

جمع‌بندی

براساس نتایج این مطالعه، بیان ژن‌های رمزکنندهٔ هر چهار آنزیم که در این مطالعه بررسی شدند با افزایش ساعات نمونه‌برداری افزایش پیدا کرد. البته این روند افزایشی به‌علت زمان‌های ابتدایی نمونه‌برداری بود (شکل ۲). همان‌طورکه قبلاً هم در بسیاری از تحقیقات

به اثبات رسیده است برای این‌که گیاه بتواند در برابر تهاجم عوامل بیماری‌زا مصون بماند باید بیان ژن‌های دفاعی در ساعات ابتدایی پس از تلقیح بیماری‌زا افزایش پیدا کند. در پژوهش حاضر از رقم مقاوم زاگرس استفاده شد لذا افزایش زودهنگام بیان ژن‌ها پدیده‌ای قابل توجیه در سازوکار مقاومت گیاه در برابر عامل بیماری‌زا به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نگارندگان از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری و دانشگاه تربیت مدرس برای فراهم‌کردن امکان این پژوهش سپاسگزاری می‌کنند.

منابع

Adhikari, T. B., Balaji, B., Breeden, J. and Goodwin, S. B. (2007) Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involve early and late peaks of gene expression. Physiological and Molecular Plant Pathology 71: 55-68.

Arraiano, L. S., Chartrain, L., Bossolini, E., Slatter, H. N., Keller, B. and Brown, J. K. M. (2007) A gene in European wheat cultivars for resistance to an African isolate of *Mycosphaerella graminicola*. Plant Pathology 56: 73-78.

Berraies, S., Gharbi, M. S., Belzile, F., Yahyaoui, A., Hajlaoui, M. R., Trifi, M., Jean, M. and Rezgui, S. (2013) High genetic diversity of *Mycospaherella graminicola* (*Zymoseptoria tritici*) from a single wheat field in Tunisia as revealed by SSR markers. African Journal of Biotechnology 12(12): 1344-1349.

Boukef, S., McDonald, B. A., Yahyaoui, A., Rezgui, S. and Brunner, P. C. (2012) Frequency of mutations associated with fungicide resistance and population structure of *Mycosphaerella graminicola* in Tunisia. European Journal of Plant Pathology 132(1): 111-122.

Brading, P. A., Verstappen, E. C., Kema, G. H. and Brown, J. K. 2002. A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* Blotch Pathogen. Phytopathology, 92: 439-4.

Chandra, A., Saxena, R., Dubey, A. and Saxena, P. (2007) Change in phenyalalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of poly phenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhanced resistance in cowp ea against *Rhizoctonia Solani*. Acta Physiologiae Plantarum 29: 361–367.

Chartrain, L., Brading, P., Makepeace, J. and Brown, J. (2004) Sources of resistance to *Septoria tritici* blotch and implications for wheat breeding. Plant Pathology 53: 454-460.

Denslow, S. A., Walls, A. A. and Daub, M. E. (2005) Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamins during plant defense responses. Physiological and Molecular Plant Pathology 66: 244–255.

Esllahi M. R., Safaie, N. and Saidi, A. (2013) Study of resistant gene expression of wheat against to Mycosphaerella graminicola by cDNA - AFLP . PhD thesis, Tarbiat Modares university (in Persian with English abstract).

Fofana, B., Banks, T.W., McCallum, B., Strelkov, S.E. and Cloutier, S. (2007) Temporal gene expression profiling of the wheat leaf rust pathos stem using cDNA microarray reveals differences in compatible and incompatible defiance pathways. International Journal of Plant Genomics 2007: 1-13.

Fuerst, E.P., Okubara, P.A., Anderson, J. V. and Morris C.F. (2014) Poly phenol oxidaseas a biochemical seed defense mechanism. Plant Physiology 5 (689): 1-9.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi Goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. (2012) The evaluation of salicylic acid effect on septorios disease by *Mycospharella graminicola.* Researches Plant Pathology 2(2): 35-46. (in Persian).

Goodwin, S. B., McDonald, B. A. and Kema, G. H. J. (2003) The *Mycosphaerella* sequencing initiative. In: Global Insights into the Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals (Eds. Kema, G. H. J., van Ginkel, M. and Harrabi, M.) 149-151. In: Proceeding of the 6th International Symposium on Septoria and Stagonospora Diseases of Cereals, Tunis, Tunisia.

Hashemi, Sh., Asrar, Z. and Pourseyedi, Sh. (2010) Effects of seed pretreatment by salicylic acid on growth and some physiological and biochemical parameters in *Lepidium sativum.* Iranian Journal of Plant Biology 2(2):1-10. (in Persian).

Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M. and Ahmad, A. (2010) Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. Environmental and Experimental Botany 68: 14-25.

Honty, K., Hevesi, M., Toth, M. and Stefanovits-Banyai E. (2005) Some biochemical changes in pear fruit tissue induced by Erwinia aymlovora. Acta Biologica Szegediensis 49: 127-129.

Huang, J., Gu, M., Lai, Z., Fan, B., Shi, K., Zhou, Y. H., Yu, J. Q. and Chen, Z. (2010) Functional analysis of the Arabidopsis PALgene family in plant growth, development, and response to environmental stress. Plant Physiology 153:1526–1538.

Kayednezami, R. and Balouchi, H. (2013) Effect of salicylic acid priming on lens cultivars (*Lens culinaris* Medik.) germination and some physiological traits under salinity conditions. Iranian Journal of Plant Biology 5(18): 15-36. (in Persian).

Kia, S. and Torabi, M. (2008) Effects of infection with septoria leaf blotch (*Septoria tritici*) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. Seed and Plant 24: 237-250 (in Persian).

Lynch, K. M., Zannini, E., Guo, J., Axel, C., Arendt, E. K., Kildea, S. and Coffey, A. (2016) Control of Zymoseptoria tritici cause of septoria tritici blotch of wheat using antifungal Lactobacillus strains. Journal of Applied Microbiology 121: 485-494.

Ma, L. X.,. Zhong, S. F., Liu, N., Chen, W. Q., Liu, T. G., Li, X., Zhang, M., Ren, Z. L., Yang, J. Z. and Luo, P. G. (2015) Gene expression profile and physiological and biochemical characterization of hexaploid wheat inoculated with *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. Physiological and Molecular Plant Pathology 90: 39-48.

McDonald, M.C., McDonald, B.A., Solomon, P.S. (2015) Recent advances in the Zymoseptoria tritici –wheat interaction: insights from pathogenomics. Frontiers in Plant Science 6(102): 1-5.

Mohammadi, M. and Kazemi, H. (2002) Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. Plant Science 162: 491-498**.**

Momeni, N., Arvin, M., Khagoei nejad, Gh., Daneshmand, F. and Keramat, B. (2012) The effect of sodium chloride and salicylic acid on antioxidant defense system in maize (*Zea mays* L.). Journal of Plant Biology 4(14): 23-34. (in Persian).

Pourakbar, L. and Abedzadeh, M. (2014) Effects of UV-B and UV-C radiation on antioxidative enzymes activity of *Melissa officinalis* and influences of salicylic acid in UV-stress ameliorations. Iranian Journal of Plant Biology 6(21): 23-34. (in Persian).

Quaedvlieg, W., Kema, G. H. J., Groenewald, J. Z., Verkley, G. J. M., Seifbarghi, S., Razavi, M., Gohari, A. M. and Mehrabi, R. (2011) *Zymoseptoria* gen. Nov.: A new genus to accommodate *Septoria*-like species occurring on graminicolous hosts". Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 26: 57–69.

Rabbani, M. A., Maruyama, K., Abe, H., Khan, M. A., Katsura, K., Ito, Y., Yoshiwara, K., Seki, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003) Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. Plant Physiology 133: 1755-1767.

Ray, S., Anderson, J. M., Urmeev, F. I. and Goodwin, S. B. (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Molecular Biology 53: 741-754.

Sorahinobar, M., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H., Soltanloo, H., Behmanesh, M. and Tahmasebi nferad, S. (2015) Central Role of Salicylic Acid in Resistance of Wheat Against Fusarium graminearum. Journal of Plant Growth Regulation 35(2): 477–491.

Tyagi, M., Kayastha, A. M. and Sinha, B. (2000). The role of peroxidase and polyphenol oxidase isozymes in wheat resistwnce to Alternaria triticina. Biologia Plantarum 43(40): 559-562.

Vakili Bastam, S., Ramezanpour, S. S., Soltanloo, H., Kia, S., Kalatearabi, M. and Pahlavani, M. H. (2010) Inheritance of resistance to septoria tritici blotch (STB) in some Iranian genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). International Journal of Genetics and Molecular Biology 2(3): 034-042.

Vogt, T. (2010) Phenylpropanoid biosynthesis. Molecular Plant 3: 2-20.

Wang, X., Tang, C., Zhang, G., Li, Y., Wang, C., Liu, B. Z., Zhao, J., Han, Q. and Huang, L. (2009) cDNA-AFLP analysis reveals differential gene expression in compatible interaction of wheat challenged with *Puccinia striifonnis* f. sp. *tritici*. BMC Genomics 10: 289-304.

Wen, P., Chen, J. Y., Kong, W. F., Pan, Q. H., Wan, S. B. and Huang, W. D. (2005) Salicylic acid induced the expression of Phenylalanine ammonia-lyase gene in grape berry. Plant Science 169: 928-934.

Zamani, E., Sanjarian, F., Mohammadi-Goltapeh, E. and Safaie, N. (2016) Studying the resistance of wheat seedlings grown from treated seeds with salicylic acid against *Mycosphaerella graminicola*. Plant Protection 39(1): 1-14. (in Persian).