

تجمع رونوشت ژن-های PAL و PR-1 قبل از مواجهه با آلودگی پوسیدگی بلال در ذرت، عاملی موثر در مقاومت به قارچ فوزاریوم

سید افشین مساوات^۱، حجت الله مظاهری لقب^{۲*}، حسن سلطانیلو^۳

دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، دانشگاه بوعلی سینا همدان و مربی پژوهش بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.
^۲ دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران.
^۳ دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
 تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۸

چکیده

پوسیدگی فوزاریومی بلال با عامل *Fusarium verticillioides* یکی از مهمترین بیماری‌های ذرت در سراسر دنیا می‌باشد. گیاهان از طریق فعال‌سازی راهبردهای دفاعی پیچیده به حمله پاتوژن‌ها پاسخ می‌دهند. پاسخ دفاعی به عفونت پاتوژن شامل تغییرات در بیان شمار زیادی از ژن‌های گیاه است که ممکن است بیان ژن افزایش یا کاهش یابد. سه لاین با سطح مقاومت متفاوت به قارچ فوزاریوم (C7, B73, MO17) در قالب طرح بلوک کامل تصادفی کشت شدند. بعد از ظهور ابریشم، گرده افشانی دستی انجام گرفت و ۱۵ روز پس از آن مایه‌زنی با قارچ فوزاریوم با استفاده از سرنگ (آلوده سازی دانه) و سرسرنگ (آلوده سازی ابریشم) انجام گرفت. سپس در ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از آلودگی نمونه برداری از ابریشم و دانه ذرت صورت گرفت. بلال تلقیح نشده به عنوان شاهد استفاده شد. بعد از استخراج RNA و ساخت cDNA، با استفاده از تکنیک Real-time PCR الگوی بیان نسبی ژن‌های PAL و PR-1 اندازه‌گیری و داده‌ها با استفاده از نرم افزار REST تجزیه شدند. همه ژنوتیپ‌ها قادر به بیان ژن‌های PAL و PR-1 بعد از آلودگی به قارچ فوزاریوم هستند و تنها تفاوت آن‌ها در سطح بیان ژن‌ها است. تغییرات عمده در بیان ژن‌های دفاعی در لاین مقاوم و حساس قبل از آلودگی اتفاق می‌افتد. لاین مقاوم قبل از ایجاد آلودگی دارای سطح بالایی از بیان ژن‌های PAL و PR-1 است و شاید همین به عنوان مانع اولیه در برابر حمله پاتوژن عمل کند ولی لاین حساس نسبت به لاین مقاوم، بعد از آلودگی بیان ژن‌های PAL و PR-1 را آغاز می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیان ژن، ذرت، قارچ فوزاریوم، PAL، PR-1

بیماری زای بلال، ساقه، ریشه و گیاهچه شناخته شده است (Drepper and Renfro, 1990). نشانه آلودگی در بلال، ابتدا به صورت لکه‌ها و مناطق تغییر رنگ یافته صورتی عنابی تا قرمز قهوه‌ای روی نوک دانه‌ها ظاهر می‌شود. این لکه‌ها ممکن است به صورت پراکنده یا پیوسته روی دانه‌ها در قسمت نوک بلال به وجود بیایند. در صورت پیشرفت بیماری کپک پودر مانند یا پنبه‌ای صورتی رنگ روی دانه‌های آلوده رشد می‌نمایند. عامل این بیماری می‌تواند یک متابولیت ثانویه از خانواده مایکوتوکسین به نام *moniliform* بسازد که یک ماده سرطان‌زاست و با نقص لوله عصبی در انسان و بیماری شدید در دام ارتباط داده می‌شود (Gelderblom *et al.*, 1988).

مقاومت به بیماری در گیاهان با فعال شدن مجموعه وسیعی از پاسخ‌های دفاعی همراه است که برای جلوگیری از آلودگی با بیمارگر استفاده می‌شود. این مکانیسم‌ها شامل موانع فیزیکی و شیمیایی است که از قبل در گیاه وجود دارد و واکنش‌های دفاعی القایی است که در قالب بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در برابر بیمارگر فعال می‌شوند. تعادل بین بیمارگر-میزبان، گیاه را وادار به ایجاد برخی تغییرات در متابولیسم سلول می‌کند که عمدتاً شامل تغییر در فعالیت آنزیم‌های سلول، از قبیل ^۱PAL، ^۲POX، ^۳PPO، ^۴LOX، ^۵SOD و

ذرت (*Zea mays*) با عدد کروموزومی $2n=2x=20$ به عنوان یک محصول غذایی راهبردی، قسمت عمده‌ای از زمین‌های قابل کشت جهان را به خود اختصاص داده و برای غذا، خوراک دام، سوخت و فیبر، نه تنها در مناطق معتدل بلکه در مناطق گرمسیری و نیمه-گرمسیری مورد استفاده قرار می‌گیرد. چنانچه عوامل بازدارنده رشد این محصول از جمله بیماری‌های ذرت به خوبی شناخته و با آنها مقابله اصولی انجام گیرد، افزایش سطح کشت و تولید بیشتر آن کاملاً قابل پیش بینی است. بنابراین با توجه به افزایش روند روز افزون جمعیت، ضرورت افزایش تولیدات زراعی و نقشی که ذرت می‌تواند در این ارتباط داشته باشد ایجاب می‌کند که ضمن به‌کارگیری دستاوردهای تحقیقاتی به عوامل دیگری از جمله بیماری‌ها و خسارات ناشی از آنها پرداخته گردد.

از میان بیماری‌های گوناگون مبتلا کننده ذرت که در مجموع تعداد آنها به ۶۰ مورد می‌رسد، یکی از مهمترین و زیان‌بارترین آنها پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت (*Fusarium ear rot*) می‌باشد که علاوه بر خسارت‌های کمی و کیفی به محصول، با تولید مایکوتوکسین‌های مختلف، سلامت انسان و دام را نیز به خطر می‌اندازد (Bacon *et al.*, 2004). تاکنون گونه‌های مختلفی از فوزاریوم به عنوان عامل این بیماری معرفی شده‌اند ولی گونه *Fusarium verticillioides* به عنوان یکی از مهمترین عوامل

¹ Phenylalanine ammonia lyase

² Peroxidase

³ Poly phenol oxidase

⁴ Lipxygenase

⁵ Superoxide dismutase

عفونت ممکن است باعث فعال سازی مسیرهای سیگنالی شود که هماهنگ با آن باعث مقاومت در برابر بیمارگر در بافت‌های دور از نقطه آلودگی شود (Lanubile *et al.*, 2010). پروتئین‌های PR¹ تا حدی جلوی رشد، تکثیر یا گسترش بیمارگر را می‌گیرند. بیان ژن‌های PR همچنین فعال سازی مقاومت اکتسابی عمومی در هر دو بافت آلوده و سالم را نشان می‌دهد (Ward *et al.*, 1991). PR-1 معمولاً به عنوان نشانگر برای افزایش مقاومت اعطاء شده و یا مقاومت اکتسابی عمومی گزارش شده است و به طور گسترده برای فعالیت‌های ضد قارچی استفاده می‌شود (Sekhon *et al.*, 2006). ساختار یکی از اعضای خانواده PR-1 (PR1-b گوجه فرنگی) توسط رزونانس مغناطیسی هسته‌ای شناخته شده و ساختار مولکولی منحصر به فرد را نشان داد.

پروتئین‌های PR اولین بار در اجزای دانه مشاهده شدند. بسیاری از ژن‌های PR بسته به سطح مقاومت ژنوتیپ‌های ذرت در سطوح مختلفی بعد از آلودگی به *Fusarium verticillioides* بیان شدند (Lanubile *et al.*, 2010). تمام گیاهان از جمله گیاهان حساس، به حمله بیمارگرها پاسخ می‌دهند که عمدتاً وابسته به تغییرات فعالیت ژن است. تفاوت در پاسخ ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم، ممکن است منعکس کننده تفاوت در سرعت، شدت، الگوی فضایی و محدوده بیان ژن‌های مختلف، به

Fukasawa-Akada *et al.* (B-1,3 glucanase است) (al., 1996).

بر اساس مطالعات PAL آنزیم اولیه در مسیر فنیل پروپانوئید است که با حذف آمونیاک منجر به تبدیل فنیل آلانین به اسید ترانس-سینامیک می‌شود. PAL در فعالیت متابولیکی بسیاری از گیاهان نقش دارد و آنزیم کلیدی در سنتز چندین ترکیب ثانویه مرتبط با دفاع، مانند فنول‌ها و لیگنین است (Hemm *et al.*, 2004). قطع و برش و زخم‌های حاصل از آن منجر به افزایش فعالیت PAL در بسیاری از بافت‌های گیاه می‌شود (Camm *et al.*, 1977). بیشتر تحقیقات روی القاء PAL پس از آلودگی توسط قارچ، و یا قرار گرفتن در معرض پلی ساکاریدهای مشتق شده از آنها متمرکز شده است (Hahlbrock & Grisebach, 1979).

بسیاری از مطالعات نشان داده که فعالیت PAL در گیاهانی که با بیمارگر مواجه هستند افزایش می‌یابد (Niranjanraj *et al.*, 2006). PAL اولین و کلیدی‌ترین آنزیم مسیر فنیل پروپانوئیدی است که منجر به بیوسنتز فیتوالکسین‌ها، پیش‌سازهای لیگنین و ترکیبات فنولی می‌شود (Daayf *et al.*, 1997). مطالعات زیادی نشان داده است که القاء PAL بعد از آلودگی بیمارگر منجر به واکنش‌های دیگر، مانند چوب‌شدگی و تولید ترکیبات فنولی می‌شود که به نوبه خود محافظت در برابر بیماری‌ها را فراهم می‌کند (Umeha, 2006).

¹ Pathogenesis-Related Protein

مواد و روش‌ها

سه ژنوتیپ ذرت با فنوتیپ‌های متفاوت از نظر تحمل به پوسیدگی فوزاریومی بلال ذرت به نام‌های C7 (لاین مقاوم)، B73 (لاین نیمه‌مقاوم) و MO17 (لاین حساس) مورد بررسی قرار گرفتند. آزمایشات مزرعه‌ای در ایستگاه تحقیقات کشاورزی عراقی محله گرگان انجام شد. این ایستگاه در فاصله ۵ کیلومتری شمال شهر گرگان واقع شده است. خاک مزرعه از نوع لومی رسی، عمق خاک زراعی ۳۰ تا ۴۵ سانتی‌متر و اسیدیته آن بین ۷.۵ الی ۸ می‌باشد. از لحاظ آب و هوایی ایستگاه جزء مناطق گرم و معتدل به شمار می‌رود و میزان بارندگی سالیانه آن ۴۰۰ الی ۴۵۰ میلی‌متر است. آزمایش در ۳ تکرار و هر لاین در دو خط ۵ متری به فاصله بوته ۲۰ سانتی‌متر در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد.

برای تهیه اسپور قارچ، *Fusarium verticillioides* بر روی صفحه‌های پتری دیش به قطر ۹cm در محیط کشت آگار سیب زمینی دگستروز (PDA) در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. کنیدیوم‌ها پس از شستشوی صفحات با آب مقطر، خراش دادن سطح آگار با اسکالپل و عبور دادن سوسپانسیون اسپور از پارچه استریل جمع‌آوری شدند. در نهایت، سوسپانسیون اسپور با اضافه کردن ۲۰۰ میلی‌لیتر آب استریل تهیه شد.

برای ارزیابی ژنوتیپ‌ها، بلال‌ها ۱۵ روز پس از گرده افشانی دستی (به منظور داشتن بلال-

خصوص ژن‌های دفاعی، است. این تفاوت ممکن است باعث تفاوت پاسخ ارقام مختلف به بیمارگر خاص شود (Alexander et al., 1993). مشاهدات میکروسکوپی سلولی نشان می‌دهد که حمله قارچ *Fusarium verticillioides* به سلول‌های گیاه حساس، کمی زودتر از گیاه مقاوم رخ می‌دهد (Yuan et al., 2013). همچنین عکس‌های گرفته شده از منطقه آلوده نشان داد منطقه آلوده در گیاه مقاوم کوچکتر از گیاه حساس است. منطقه آلوده کوچکتر و تأخیر در حمله *Fusarium verticillioides* در گیاه حساس ممکن است به پیشگیری حمله و پیشرفت بیماری کمک کند (Yuan et al., 2013).

تجمع سطوح بالای پروتئین‌های دفاعی در سلول‌هایی که برای اولین بار با بیمارگر تماس پیدا کرده‌اند، یک مانع دفاعی در مقابل نفوذ قارچ ایجاد می‌کند. میزبان و بیمارگر قارچی به احتمال زیاد ترکیبات فعال را به منظور حمله به یکدیگر تولید می‌کنند. در همین راستا ضروری است که با مکانیسم‌های ایجاد شده در گیاهان بعد از ورود پاتوژن آگاه شویم. با مطالعه و درک تفاوت‌هایی که در بیان ژن‌های دفاعی در گیاهان مقاوم نسبت به حساس وجود دارد، می‌توان راهبردهایی را برای مقاومت بیشتر گیاهان حساس اتخاذ کرد. به همین منظور، در این تحقیق هدف بررسی روند تغییرات و تفاوت میزان بیان ژن PAL و PR-1 در پاسخ به آلودگی قارچ فوزاریوم در رقم مقاوم، نیمه‌مقاوم و حساس ذرت است.

نمونه ابریشم با قیچی استریل جدا و در نیتروژن مایع منجمد و در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. نمونه‌های جمع آوری شده کوبیده و جهت استخراج RNA از بافر پی‌بی‌ایوزول (p-Biozol Buffer) بر اساس دستورالعمل شرکت (BioFlux, Japan) استفاده شد. برای تعیین کمیت RNA استخراج شده از دستگاه Nanophotometer مدل p300 محصول شرکت IPMLN و جهت تعیین کیفیت، نمونه‌های RNA ابریشم و دانه، بر روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد.

cDNA تک‌رشته‌ای با استفاده از دستور شرکت Fermentase ساخته شد. آغازگرهای مورد نیاز بر اساس اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI و با استفاده از نرم افزار primer3 و با در نظر گرفتن خصوصیات مطلوب برای استفاده در روش qRT-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز کمی) طراحی شد. در این تحقیق از ژن خانه‌دار β -actin استفاده شد. در جدول ۱ اطلاعات و توالی مربوط به ژن‌های β -actin، PR-1 و PAL نشان داده شده است.

های یکنواخت) با استفاده از روش مایه‌کوبی سرنگ، مایه‌زنی شدند. مایه‌کوبی از یک سوم بالایی بلال برای آلوده سازی نمونه دانه و از نوک بلال برای آلوده سازی ابریشم با سوسپانسیون *Fusarium verticillioides* انجام شد و برای بالا بردن رطوبت و ایجاد شرایط بیماری با کیسه پلاستیکی تا ۴۸ ساعت پوشیده شدند. بلال‌های دوم هر بوته نیز با دو روش آلوده سازی از طریق دانه و ابریشم به صورت جداگانه آلوده سازی و برای ارزیابی فنوتیپی تا زمان رسیدگی فیزیولوژیکی نگهداری شدند. در زمان رسیدگی فیزیولوژیکی، تعداد ۱۰ بلال از هر ردیف برداشت شد و نسبت به یادداشت‌برداری شاخص شدت بیماری (DS)^۱ هر تیمار اقدام گردید. نمره-دهی شدت بیماری بر اساس مقیاس ۱ تا ۷ بر مبنای درصد آلودگی و پیشرفت بیماری در بلال از صفر تا ۱۰۰٪ انجام شد (Reid & Zhu, 2005).

بلال مایه‌کوبی نشده (T0) به عنوان شاهد انتخاب و از بلال‌های آلوده در زمان‌های (T1) ۱۲، (T2) ۲۴، (T3) ۴۸، (T4) ۷۲ و (T5) ۹۶ ساعت پس از مایه‌زنی نمونه‌برداری شد و برای هر زمان، ابریشم و دانه سه بلال با هم مخلوط شدند. برای جلوگیری از خطای ناشی از آسیب مکانیکی، نمونه‌گیری از بذرها مجاور قسمت مایه‌کوبی شده انجام شد (Lanubile et al., 2010). نمونه دانه با استفاده از اسکالپل استریل و

¹ Disease Severity

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در qRT-PCR.

Table 1- Sequence of primers used in qRT-PCR.

اندازه محصول (جفت باز) Product Size(bp)	دمای اتصال (درجه سانتیگراد) Annealing Temperature (0°)	توالی آغازگر (5'→3') Primer Sequence	نام آغازگر Primer Name	شماره دسترسی Accession Number	نام ژن Gene Name
173	59.68	GCG TTA CCG GCT CAT TGT	F	AB022041	β-actin
	59.21	GAG GCA ACA CGT TAC ACC AG	R		
223	55.9	CCG GCG TCT TCA TCA TCT	F	M59196	PR-1
	55.4	CAA ATC GCC TGC ATG GTT	R		
166	58.4	AGA ACG CCA AGG AGA AGA GG	F	P45725	PAL3
	58	GAA AGA GCA ACG CCA CAC A	R		

تحلیل قرار گرفتند و نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم شدند.

نتایج و بحث

بر اساس روش پیشنهادی Tenuta (2006) شدت آلودگی از طریق دانه و ابریشم به صورت جداگانه اندازه گیری شد. در شکل ۱ بلالهایی که از طریق ابریشم آلوده شده اند با خط قرمز مشخص شده اند. نتایج نشان داد آلودگی از طریق ابریشم شدت آلودگی بیشتری را نسبت به آلودگی از طریق دانه ایجاد کرد (شکل ۱). بلالهایی که از طریق ابریشم آلوده شده بودند تعداد دانه کمتر و بلالهای ضعیف تری را تولید

واکنش زنجیره ای پلی مرز کمی با استفاده از تکنولوژی رنگ SYBR Green I و کیت سایبر بیوپارس (شرکت زیست فرایند تولید پایدار، ایران) در دستگاه iQ5 (شرکت بیورد، آمریکا) انجام شد. شرایط بهینه برای اجرای واکنش Real-time PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر و از هر نمونه سه تکرار تکنیکی فراهم گردید. برای ارزیابی و محاسبه میزان بیان ژن دو روش کمی کردن نسبی وجود دارد که از روش C_t مقایسه ای (Comparative C_T ($2^{-\Delta\Delta C_T}$)) (Souaze et al., 1996). داده های بدست آمده از دستگاه توسط نرم افزار Rest مورد تجزیه و

این مقاومت بستگی زیادی به سطح بیان ژن دارد و هر چه بیان ژن قبل از آلودگی بیشتر باشد گیاه توانایی بیشتری برای مقابله با بیمارگر و تنظیم مکانیسم‌های دفاعی دارد. سنتز و حضور ترکیبات فنولی در پاسخ به آلودگی بیمارگر، با مقاومت به بیماری همراه بوده است. تفاوت در مکانیسم‌های دفاعی در ارقام مقاوم و حساس ممکن است به علت تفاوت در سطح فعالیت PAL مربوط باشد (El Modafar & El Boustani, 2001).

در بافت ابریشم لاین مقاوم، حداکثر بیان ژن PAL در ساعات اولیه آلودگی (۱۲ ساعت) بود و بعد از آن بیان تا ۴۸ ساعت پس از آلودگی کاهش و دوباره در ۹۶ ساعت بیان ژن افزایش یافت. در نمونه ابریشم لاین نیمه‌مقاوم همانند لاین مقاوم حداکثر بیان در ساعات اولیه آلودگی مشاهده شد و بعد از آن بیان کاهش و در ۷۲ ساعت بیان مجدداً افزایش یافت. در بافت ابریشم لاین حساس، افزایش بیان کمی دیرتر از لاین مقاوم و نیمه‌مقاوم، و در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد. در نمونه ابریشم لاین حساس، نمودار به صورت باینومیال بود و در ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی بیان ژن افزایش و بعد از آن در ۴۸ و ۹۶ ساعت بیان ژن کاهش یافت (شکل ۳).

کرده بودند (شکل ۱). همچنین مشاهده شد که لاین C7 با بروز کمترین شدت آلودگی به عنوان مقاوم‌ترین و لاین MO17 با بیشترین شدت آلودگی به عنوان حساس‌ترین لاین شناخته شد (شکل ۱). تفاوت دیگری که در این دو لاین به صورت فنوتیپی مشاهده شد این بود که آلودگی در لاین مقاوم محدود به همان قسمت مایه‌کوبی شده بود و کمتر به دانه‌های مجاور آلودگی پخش شد ولی در لاین حساس تعداد دانه در بلال آلوده شده، کمتر مشاهده شد و آلودگی در کل بلال گسترش پیدا کرده بود (شکل ۱).

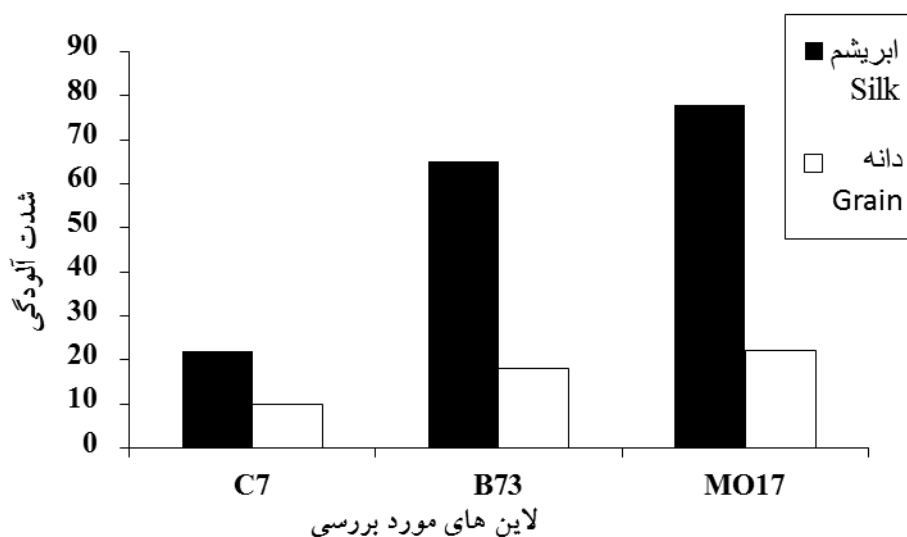
شکل ۲ تفاوت شدت آلودگی را در بین لاین‌های مورد بررسی و همچنین تفاوت شدت آلودگی با تزریق از طریق دانه و ابریشم را نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود C7 در هر دو روش مایه‌کوبی شدت آلودگی کمتری را نشان داده است. لاین B73 نیز به عنوان لاین نیمه‌مقاوم شناخته شد. مایه‌زنی از طریق ابریشم خسارت بیشتری را به بلال وارد کرد.

قبل از آلودگی (صفر ساعت) بیان ژن PAL در ابریشم لاین مقاوم حدود ۸ برابر لاین حساس و ۲ برابر لاین نیمه‌مقاوم مشاهده شد (شکل ۴ و ۵). این نتایج نشان داد هر چه بیان ژن PAL در لاین‌های ذرت قبل از مایه‌زنی بیشتر باشد مقاومت آن لاین به بیماری قارچ فوزاریوم افزایش می‌یابد.



شکل ۱- مقایسه بلال‌های آلوده شده به وسیله سوسپانسیون قارچ فوزاریوم در سه لاین مورد مطالعه (A) لاین C7، (B) لاین B73 و (C) لاین MO17.

Figure 1- Comparison of inoculated ears by *Fusarium* fungi suspension in the three studied lines, A) Line C7, B) Line B73, C) Line MO17.



شکل ۲- شدت آلودگی تزریق از طریق تارهای ابریشمی و دانه در لاین‌های مورد مطالعه.

Figure 2- The severity of infestation by silk and grain in the studied lines.

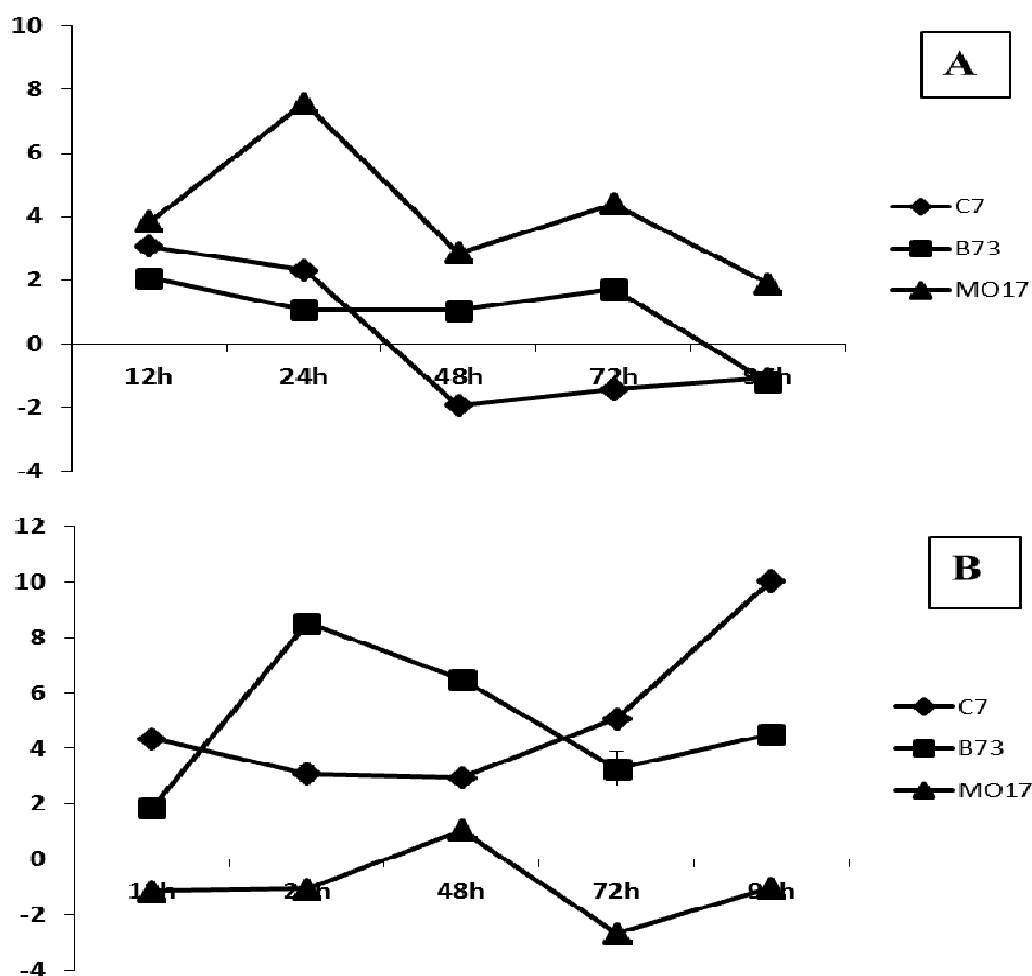
ارقام نیمه‌مقاوم و حساس این افزایش بیان مشاهده نشد (شکل ۳). حداکثر بیان ژن در نمونه دانه رقم مقاوم در ۹۶ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد. این داده‌ها با نتایج El Modafar et al. (2001) مشابه بود. بر طبق گزارش El Modafar et al. (2001) فعالیت ژن PAL در رقم مقاوم در ۹۶ ساعت به حداکثر فعالیت خود رسید. همچنین آنها اعلام کردند فعالیت ژن PAL در ۹۶ ساعت، ۷ برابر بیشتر از نمونه کنترل بود و در ۱۲۰ ساعت، فعالیت ژن PAL به حدود ۴ برابر نمونه کنترل رسید.

نمودار بیان ژن PAL در دو نمونه ابریشم و دانه لاین مقاوم تقریباً روند مشابهی را نشان داد. نقطه مشترک در نمونه ابریشم و دانه لاین مقاوم در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی بود که در هر دو نمونه بیان در این ساعت کاهش شدیدی را نشان داد و بعد از آن بیان در ۷۲ ساعت و ۹۶ ساعت افزایش یافت (شکل ۳). ولی در ارقام حساس و نیمه‌مقاوم وضعیت به صورت متفاوتی مشاهده شد. در این دو لاین در ساعاتی که دانه افزایش بیان ژن PAL را نشان داد، در نمونه ابریشم بیان در همان ساعت کاهش یافت و برعکس.

نتیجه این است که نمودار مقاوم و نیمه-مقاوم در ساعات اولیه آلودگی بیان بالایی دارد و توانایی این را دارند که در ساعات اولیه آلودگی به بیماری پاسخ دهند ولی لاین حساس دیرتر حضور پاتوژن را تشخیص داده و در ساعات دیرتری بیان را افزایش می‌دهد. نکته دیگر این است که لاین مقاوم و نیمه‌مقاوم توانایی این را دارد که در ساعات پایان آلودگی بیان را دوباره افزایش دهد.

در دانه لاین مقاوم، بعد از آلودگی افزایش تدریجی در بیان ژن PAL مشاهده و حداکثر بیان ژن در ۹۶ ساعت بعد از تزریق قارچ فوزاریوم دیده شد. ولی در دانه لاین نیمه‌مقاوم بیشینه بیان در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد ولی بعد از آن افت شدیدی نمود و در ساعات پایان آلودگی بیان مجدداً افزایش یافت. در دانه لاین حساس، همانند نمونه ابریشم نمودار به صورت باینومیال بود و اوج بیان در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد. در ساعات دیگر بیان به پایین‌تر از شاهد رسید (شکل ۳). نتایج نمونه دانه، همانند نمونه ابریشم بود. هر دو لاین مقاوم و نیمه‌مقاوم در ساعات اولیه و اواخر آلودگی بیان ژن را نشان دادند.

نکته قابل توجه در الگوی بیان ژن PAL در ارقام مقاوم و حساس در ساعات اولیه و اواخر آلودگی است. در نمونه ابریشم لاین مقاوم بیان ژن در ۹۶ ساعت افزایش یافت در حالی که در



شکل ۳- الگوی بیان ژن PAL در نمونه ابریشم (A) و نمونه دانه (B) لاین‌های مقاوم C7، نیمه‌مقاوم B73 و حساس MO17 ذرت (محور عمودی: تغییر نسبی بیان ژن و محور افقی: زمان پس از آلودگی).

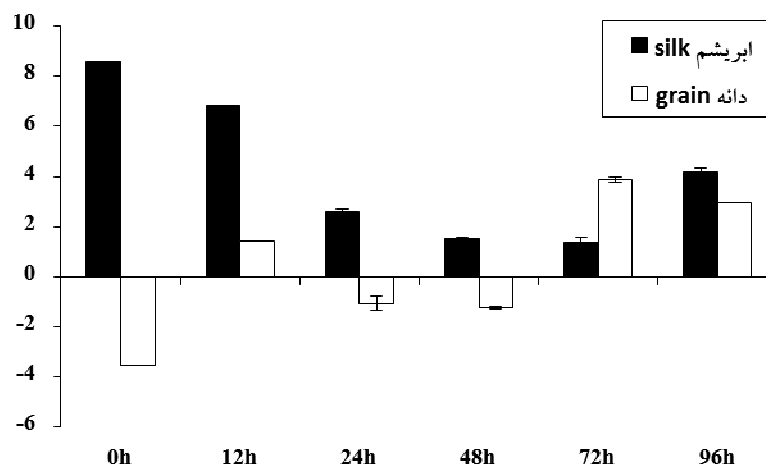
Figure 3- PAL gene expression pattern in grain (A) and silk samples (B) of resistant (C7), semi resistant (B73) and sensitive (MO17) corn lines. Bars: Relative changes of gene expression and Horizontal: Time after inoculation.

اما حداکثر فعالیت خود در ۹۶ ساعت رسید، اما حدود ۳ برابر کمتر از رقم مقاوم بود. فعالیت PAL در رقم حساس پس از ۱۲۰ ساعت در حدود ۲ برابر کمتر از رقم مقاوم بود (El Modafar *et al.*, 2001). با توجه به نمودار بیان ژن PAL در نمونه دانه رقم حساس، افزایش بیان ژن در ۹۶ ساعت بود. این افزایش بیان در رقم مقاوم

در نمونه دانه رقم حساس بیان ژن PAL تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی روند نسبتاً پایداری را نشان داد و در ۴۸ ساعت بیان به شدت افزایش یافت و در ۷۲ ساعت افت شدید بیان رخ داد (شکل ۳). در پژوهشی El Modafar *et al.* (2001) گزارش کردند که فعالیت ژن PAL در رقم حساس در ۲۴ ساعت اول کاهش یافت و به

کمترین تفاوت رسید ولی در ۹۶ ساعت بیان در لاین حساس کاهش یافت ولی در لاین مقاوم همچنان رو به افزایش بود (شکل ۴). در دانه وضعیت متفاوتی دیده شد. بیان ژن PAL در دانه لاین حساس قبل از آلودگی حدود ۳٫۵ برابر بیشتر از لاین مقاوم بود ولی بعد از آلودگی بیان به شدت در لاین مقاوم افزایش یافت و در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به بیشتر از لاین حساس رسید. همچنین بیان ژن در ساعات پایان آلودگی (۷۲ و ۹۶ ساعت) در دانه لاین مقاوم بیشتر از لاین حساس مشاهده شد (شکل ۴). بیشترین تفاوت در لاین مقاوم و حساس در ساعات اولیه و اواخر آلودگی مشاهده گردید.

نیز مشاهده شد ولی بیان ژن در نمونه دانه رقم مقاوم حدود سه برابر بیشتر از نمونه دانه رقم حساس بود (شکل ۴). تفاوت در میزان بیان ژن PAL در دو رقم مقاوم و حساس، می‌تواند نشان دهنده تفاوت در سرعت و شدت واکنش‌های دفاعی در دو رقم باشد (El Modafar & El Boustani, 2001). با مقایسه لاین مقاوم با حساس مشخص گردید که بیان ژن PAL در لاین مقاوم پایدارتر و بیشتر از لاین حساس است. ضمناً در زمان قبل از آلودگی (شاهد صفر ساعت) بیان ژن PAL در نمونه ابریشم لاین مقاوم ۸ برابر لاین حساس مشاهده شد (شکل ۴). بعد از آلودگی بیان ژن در هر دو لاین مقاوم و حساس بالا رفت به طوری که در ۷۲ ساعت به



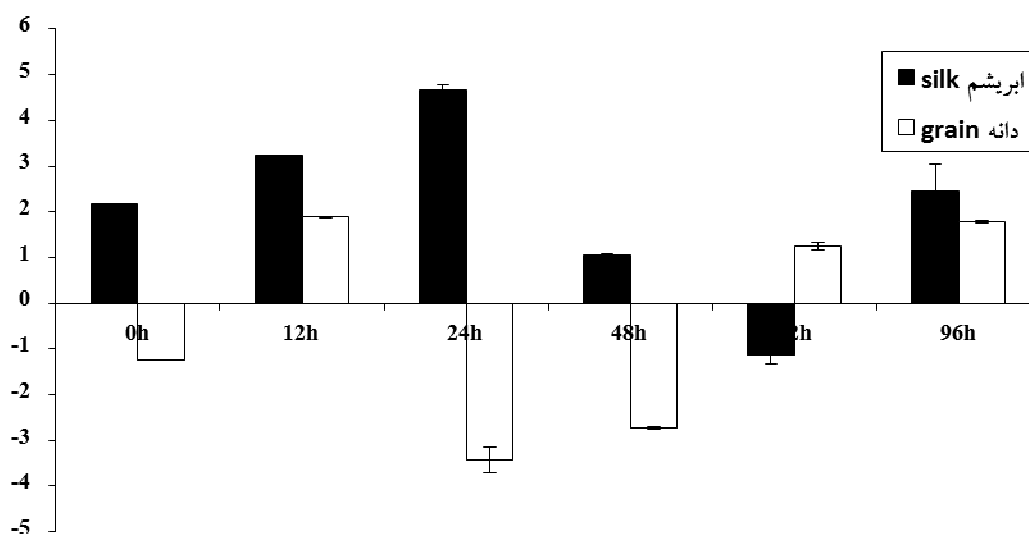
شکل ۴- مقایسه الگوی بیان ژن PAL در لاین مقاوم نسبت به حساس (محور عمودی: میزان بیان ژن در لاین C7 نسبت به MO17، محور افقی: زمان‌های مورد مطالعه بعد از آلودگی).

Figure 4- Comparison of the PAL gene expression pattern in resistant to sensitive line. Bars: Amount of gene expression in line C7 compare to line MO17, Horizontal: Studied times after inoculation.

کرد در حالی که در لاین مقاوم بیان همچنان افزایش یافت (شکل ۵).

در نمونه دانه لاین مقاوم بیان ژن PAL در قبل از آلودگی کمتر از لاین نیمه مقاوم بود. ولی بعد از آلودگی بیان در لاین مقاوم به سرعت بالا رفته و در ۱۲ ساعت به حدود ۲ برابر نسبت به لاین نیمه مقاوم رسید. همانگونه که در ابریشم مشاهده شد تفاوت این دو لاین در ساعات پایان آلودگی است. لاین مقاوم در ساعات پایان آلودگی (۹۶ ساعت) بیان ژن PAL را افزایش داد در حالی که در لاین نیمه مقاوم بیان ژن بعد از ۴۸ ساعت افت پیدا کرد (شکل ۵).

با مقایسه الگوی بیان ژن PAL در لاین مقاوم نسبت به نیمه مقاوم مشخص گردید که بیان ژن در قبل از آلودگی در ابریشم لاین مقاوم حدود ۲ برابر لاین نیمه مقاوم بود. بعد از آلودگی بیان در لاین مقاوم با شدت بیشتری نسبت به لاین نیمه مقاوم افزایش یافت به طوری که در ۲۴ ساعت به بیشترین تفاوت رسید. در ۴۸ ساعت لاین نیمه مقاوم بیان را افزایش داد به طوری که در ۴۸ ساعت به بالاتر از مقدار لاین مقاوم رسید. تفاوت اصلی لاین مقاوم و نیمه مقاوم در ساعات پایان آلودگی مشاهده شد. در ۹۶ ساعت بیان در نمونه ابریشم لاین نیمه مقاوم به شدت افت پیدا



شکل ۵- مقایسه الگوی بیان ژن PAL در لاین مقاوم نسبت به نیمه مقاوم (محور عمودی: میزان بیان ژن در لاین C7 نسبت به B73، محور افقی: زمانهای مورد مطالعه بعد از آلودگی).

Figure 5- Comparison of the PAL gene expression pattern in resistant to semi resistant e line. Bars: Amount of gene expression in line C7 compare to line B73, Horizontal: Studied times after inoculation.

فنولها محصولات (Ebel *et al.*, 1984). متابولیسمی در مسیر فنیل پروپانوئیدی است که در

PAL آنزیم کلیدی در سنتز فیتوالکسینها، پیش سازهای لیگنین و ترکیبات فنولی است

زمینی توسط تعدادی از متابولیت‌های ثانویه مشتق شده از ترنس-سینامیک نشان داده شده است که در واکنش‌های غیراختصاصی به حمله بیمارگرها، عوامل تنش‌زا و واکنش به بهبود زخم درگیر هستند. Corsini & Pavék (1980). در مطالعه *et al.* Vanitha (2009) تغییرات فعالیت PAL در تمام گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بعد از مایه‌زنی در مقایسه با گیاهچه‌های کنترل دارای تغییرات معنی‌داری بود. در گیاهان مقاوم گوجه‌فرنگی، فعالیت آنزیم PAL به تدریج افزایش یافت و در ۱۲ ساعت پس از آلودگی به حداکثر مقدار خود رسید. بیشترین سطح آلودگی در گیاهان حساس و کمترین سطح آلودگی در گیاهان مقاوم مشاهده شد. در پژوهشی *Chen et al.* (2000) نشان دادند که سطح بالای از ژن PAL در ریشه‌های خیار تلقیح شده با بیمارگر ایجاد شده است. بر طبق گزارش Kavitha & Umesha (2008) فعالیت ژن PAL در رقم مقاوم گوجه‌فرنگی بیشتر از ارقام حساس و نیمه‌مقاوم پس از تلقیح بیمارگر است. در ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی، فعالیت PAL بعد از تلقیح بیمارگر افزایش یافت در حالی که در رقم حساس، فعالیت ژن کاهش یافته است (Umesha, 2006). طبق مطالعه *Geetha et al.* (2005) ژن PAL در سازگاری مقاومتی ارزن مرواریدی نیز دخیل است. همچنین افزایش زودرس ژن PAL در برنج بعد از آلودگی با بیمارگر *Pyricularia oryzae* Wang *et al.* (2004) و در جو در پاسخ به

اثر پاسخ سلول‌های گیاهی به استرس‌های محیطی افزایش می‌یابند. افزایش انباشت فنول‌ها نشان‌دهنده افزایش متابولیسم‌های ثانویه در گیاه است. طبق گزارش *Rai et al.* (2011) تجمع فنول‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی، در ۵ روز بعد از آلودگی به حداکثر مقدار رسیده است. در گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با بیمارگر، انباشت در روز دوم آغاز شد و به طور چشم‌گیری ۴ روز بعد پس از مایه‌زنی کاهش یافت. همچنین طبق گزارشات *Lanubile et al.* (2010) مقدار کل فنول در گیاه ذرت رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس گزارش شد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، در رقم مقاوم حداکثر فعالیت ژن PAL در زمان‌های ۲۴ و ۹۶ ساعت بعد از آلودگی است. یعنی در ساعاتی که بیان ژن PAL افزایش یافته، در همان زمان‌ها تجمع فنول افزایش یافت. تجمع فنول‌ها نشان می‌دهد که القاء آنزیم‌های دفاعی درگیر در مسیر فنیل پروپانوییدی و پروتئین‌های PR، ممکن است به محدود کردن حمله *F. oxysporum* کمک کند (Rai *et al.*, 2011).

بیان ژن PAL در چندین گیاه دیگر مورد مطالعه قرار گرفته است. بر اساس مطالعات *Hahlbrock & Grisebach* (1979) گزارش کردند در نخود پاسخ به حمله قارچ با فعال شدن متابولیسم فنیل پروپانویید همراه است. فعالیت PAL در ۲ روز پس از تلقیح اسپور قارچ، افزایش چشمگیری پیدا کرده است. همچنین اهمیت PAL در مقاومت به پوسیدگی سیب

مربوط نیست بلکه به سرکوب بیان ژن در رقم حساس مربوط است. تولید سرکوب کننده‌های زود هنگام توسط بیمارگر، به ویژه اسپوره‌های تازه جوانه زده، می‌تواند گیاهان را به تهاجم بیمارگر قبل از نفوذ مستعد کند. طبق گزارش El Modafar *et al.* (2006) بیان ژن PAL در رقم حساس توسط *F.oxysporum* سرکوب می‌شود، در حالی که در رقم مقاوم، سرکوب بیان ژن وجود ندارد و یا به طور قابل ملاحظه‌ای کم است. به نظر می‌رسد سرکوب PAL یکی از عوامل اصلی تعیین کننده حساسیت گیاه به بیمارگر را تشکیل می‌دهد. سرکوب کننده‌ها معمولاً قندهای محلول Lu & Higgings (1993) یا گلیکوپروتئین‌ها Shiraishi *et al.* (2001) یا ترکیبات پروتئینی Yamada (1994) هستند که توسط بیمارگرهای قارچی تولید می‌شوند. در دیگر تداخل‌های انگل-میزبان، سموم می‌توانند بیان مکانیسم‌های دفاعی میزبان را سرکوب کنند (Vurro & Ellis, 1997). سرکوب تحریک PAL در زمان تعامل بیمارگر-گیاه عامل تعیین کننده رفتار میزبان (حساسیت یا مقاومت) است (Yamada *et al.*, 1996).

حداکثر بیان ژن PR-1 در نمونه ابریشم لاین مقاوم در ساعات اولیه بعد از آلودگی نسبت به شاهد مشاهده شد. بعد از مایه‌زنی بیان ژن به تدریج کاهش یافت و در ساعات پایان آلودگی (۹۶ ساعت) به کمترین مقدار و پایین‌تر از زمان قبل آلودگی رسید (شکل ۶). در نمونه دانه لاین مقاوم شاهد کاهش شدید بیان در ۲۴ ساعت بعد

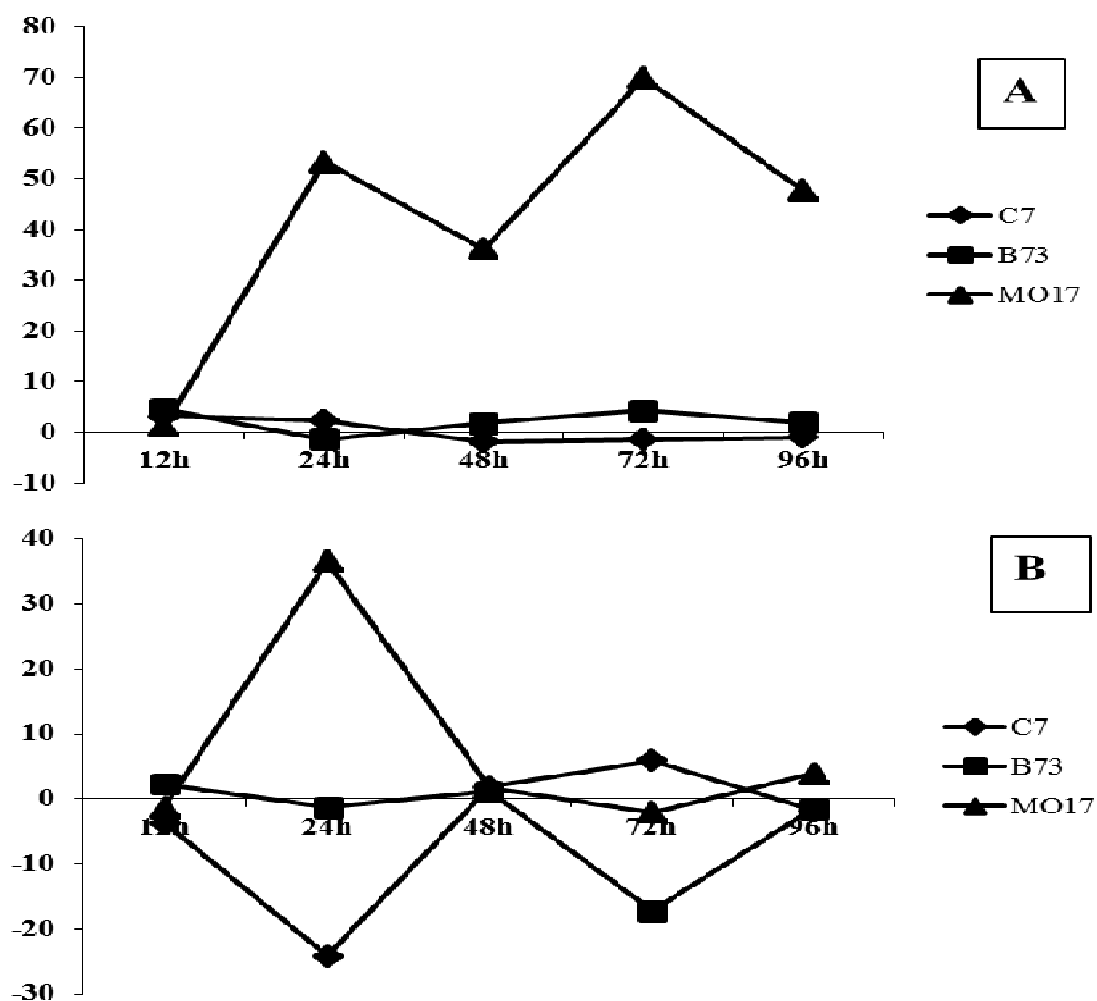
بیمارگرهای قارچی Kervinen *et al.* (1998) مشخص شده است.

با توجه به نمودارهای بیان ژن PAL در رقم حساس و مقاوم به نظر می‌رسد بیان ژن PAL در رقم مقاوم سریعتر و با شدت بیشتری از رقم حساس فعال می‌شود (شکل ۳ و ۴). همچنین بیان ژن در رقم مقاوم پایدارتر از رقم حساس است. رقم حساس در هر دو نمونه ابریشم و دانه دارای نمودار باینومیال است. یعنی توانایی کمتری در تنظیم بیان ژن بعد از آلودگی دارد. بیان ژن PAL قبل و بعد از آلودگی به طور متوسط در نمونه ابریشم بیشتر از نمونه دانه مشاهده شد. در حالی که بعد از آلودگی بیان ژن در نمونه دانه به سطح بالاتری از کنترل نسبت به نمونه ابریشم رسید. در نتیجه می‌توان چنین برداشت کرد که هر چه سطح بیان ژن قبل از آلودگی بیشتر باشد بعد از آلودگی چون گیاه مقداری بیان ژن دارد به افزایش بیان ادامه می‌دهد. ولی زمانی که گیاه بعد از آلودگی از سطح پایه بیان ژن را شروع می‌کند به افزایش بیان بیشتری نیاز دارد تا بتواند با بیمارگر مقابله کند و مکانیسم‌های دفاعی در برابر آلودگی را فعال کند. ولی هنگامی که گیاه دارای سطحی از بیان قبل از آلودگی باشد توانایی بیشتری دارد تا به حمله بیمارگر پاسخ دهد و به همین علت لزومی به افزایش یکباره سطح بیان ژن ندارد.

در مطالعه‌ای El Modafar *et al.* (2006) گزارش نمودند القاء مکانیسم‌های دفاعی در هر دو رقم مقاوم و حساس خرما، به میزان بیان ژن

با مقایسه بیان ژن PR-1 در دو نمونه دانه و ابریشم ذرت مشخص شد بیان ژن PR-1 در نمونه ابریشم و دانه لاین مقاوم از نمونه دانه و ابریشم لاین حساس و نیمه مقاوم در قبل از آلودگی بالاتر است. ولی تفاوت بیان ژن PR-1 در دانه لاین مقاوم نسبت به لاین نیمه مقاوم و حساس بسیار کمتر از نمونه ابریشم است. ولی تفاوتی که در بیان ژن PR-1 در مقایسه نمونه دانه و ابریشم سه لاین مشاهده شد این بود که در ساعات اولیه و قبل از آلودگی بیان در بافت ابریشم به شدت افزایش می یابد ولی در اواخر آلودگی بیان ژن کاهش می یابد. در مورد ابریشم بدیهی است زودتر از دانه آلوده شده و بیان ژن-های دفاعی در آن فعال شود. ولی دانه به دلیل اینکه در اکثر مواقع از طریق ابریشم ذرت آلودگی به آن انتقال داده می شود دیرتر ژن های دفاعی آن فعال شده و به همین دلیل تا ساعات پایان آلودگی بیان ژن همچنان ادامه پیدا می کند. بیان ژن PR-1 قبل از آلودگی در ابریشم و لاین مقاوم به ترتیب ۳۲ و ۱۱ برابر لاین حساس بود. بعد از آلودگی، در نقطه زمانی ۱۲ ساعت، بیان در نمونه ابریشم لاین مقاوم به شدت افزایش یافت و به حدود ۱۳۱ برابر لاین حساس رسید (شکل ۷).

از آلودگی بودیم. بعد از کاهش در یک روز بعد از آلودگی، بیان در ۴۸ ساعت افزایش یافت و در ۷۲ ساعت به حداکثر مقدار بیان ژن نسبت به شاهد رسید (شکل ۶). در نمونه ابریشم و دانه لاین مقاوم، بیان ژن در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی کاهش یافت که کاهش بیان در نمونه ابریشم شدیدتر بود. بعد از کاهش بیان ژن در ۲۴ ساعت، در نمونه ابریشم لاین نیمه مقاوم بیان تا ۷۲ ساعت بعد از آلودگی افزایش یافت (شکل ۶). در نمونه ابریشم لاین حساس، بیان ژن PR-1 به صورت نمودار باینومیال مشاهده شد. اوج بیان در ابریشم لاین حساس در ۲۴ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد و بعد از آن بیان ژن کاهش یافت. در نمونه دانه لاین حساس، اوج شدید بیان ژن PR-1 در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد و بعد از آن بیان کاهش یافت و در ساعات پایانی آلودگی بیان دوباره افزایش یافت (شکل ۶). نمونه دانه وضعیت متفاوت بود. در نمونه دانه در ساعات اولیه و قبل از آلودگی بیان در لاین مقاوم نسبت به نیمه مقاوم و حساس بالاتر بود ولی به اندازه نمونه ابریشم نبود. بعد از آلودگی بیان به تدریج افزایش یافت و در ساعات پایان آلودگی شاهد اوج بیان ژن PR-1 در نمونه دانه بودیم. شاید این امر به دلیل بافت حساس تر ابریشم نسبت به دانه ذرت بود. اولین اندامی از بلال ذرت که در معرض آلودگی قرار می گیرد ابریشم است.

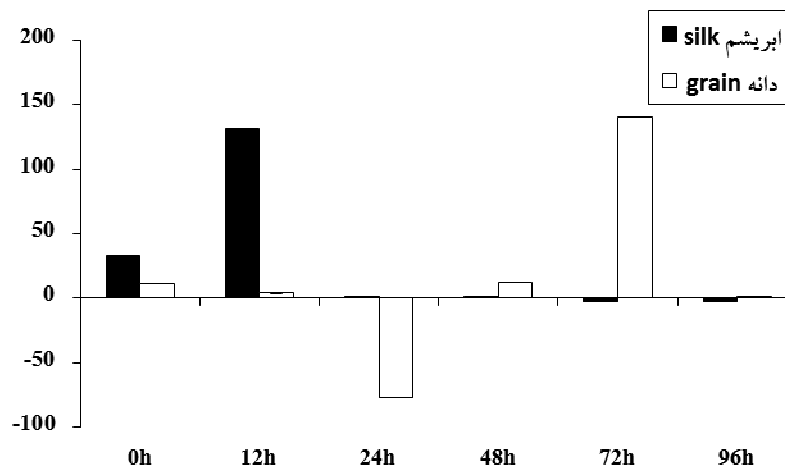


شکل ۶- الگوی بیان ژن PR-1 در نمونه ابریشم (A) و نمونه دانه (B) لاین‌های مقاوم C7، نیمه‌مقاوم B73 و حساس MO17 ذرت (محور عمودی: تغییر نسبی بیان ژن و محور افقی: زمان پس از آلودگی).

Figure 6- PR-1 gene expression pattern in grain (A) and silk samples (B) of resistant (C7), semi resistant (B73) and sensitive (MO17) corn lines. Bars: Relative changes of gene expression and Horizontal: Time after inoculation.

کل در نمونه ابریشم لاین مقاوم نسبت به لاین حساس بیان ژن به تدریج تا ساعت پایان آلودگی کاهش یافت ولی در نمونه دانه لاین مقاوم بیان ژن تا ساعات پایان آلودگی نسبت به لاین حساس افزایش داشت.

در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی بیان ژن در نمونه دانه لاین حساس به یکباره افزایش یافت و به حدود ۷۶ برابر لاین مقاوم رسید. بیشترین تفاوت نسبت بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم و حساس در ۱۲ ساعت (در نمونه ابریشم) و ۷۲ ساعت (در نمونه دانه) مشاهده شد (شکل ۷).

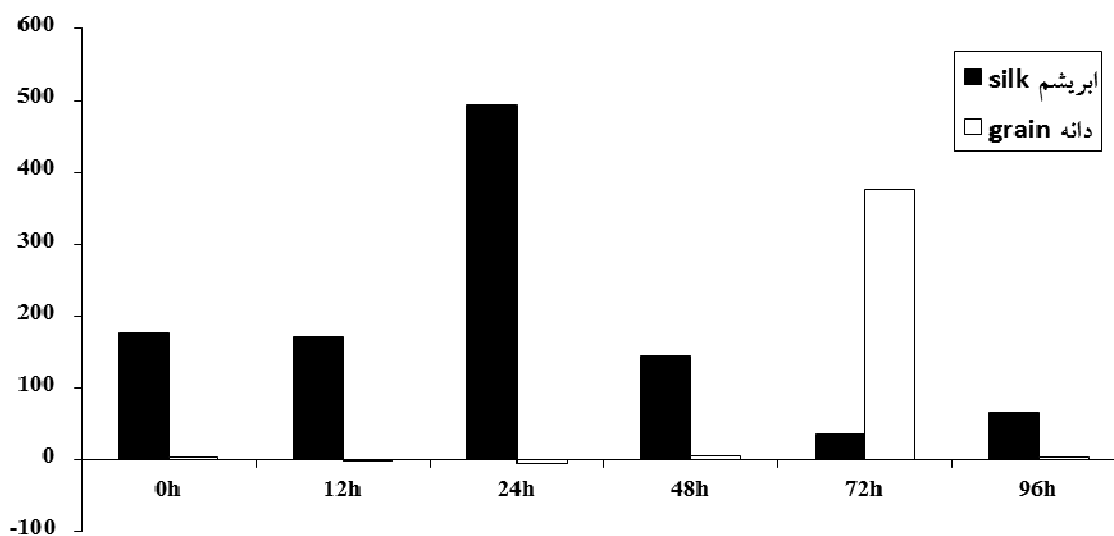


شکل ۷- مقایسه الگوی بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم نسبت به حساس (محور عمودی: میزان بیان ژن در لاین C7 نسبت به MO17، محور افقی: زمان‌های مورد مطالعه بعد از آلودگی).

Figure 7- Comparison of the PR-1 gene expression pattern in resistant to sensitive line. Bars: Amount of gene expression in line C7 compare to line MO17, Horizontal: Studied times after inoculation.

از لاین نیمه‌مقاوم است ولی بعد از مایه‌زنی بیان ژن در لاین نیمه‌مقاوم افزایش یافت و به بالاتر از لاین مقاوم رسید. این وضعیت تا ۴۸ ساعت بعد از آلودگی مشاهده شد ولی در ۷۲ ساعت بیان ژن در لاین مقاوم به شدت افزایش یافت و به ۳۷۷ برابر لاین نیمه‌مقاوم رسید (شکل ۸). بر اساس مطالعات Lanubile *et al.* (2013) واکنش ژنوتیپ حساس ذرت به بیمارگر در مراحل اولیه پس از تلقیح است.

با مقایسه نسبت بیان در نمونه ابریشم لاین مقاوم و نیمه‌مقاوم مشاهده شد بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم حدود ۱۷۶ برابر لاین نیمه‌مقاوم بود. این در حالی است که بیان ژن در دانه لاین مقاوم حدود سه برابر نمونه دانه لاین نیمه‌مقاوم مشاهده شد. بعد از مایه‌زنی، بیان ژن در نمونه ابریشم لاین مقاوم نسبت به نیمه‌مقاوم افزایش یافت و در ۲۴ ساعت به حدود ۴۹۴ برابر لاین نیمه‌مقاوم رسید. بعد از آن بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم نسبت به نیمه‌مقاوم به تدریج تا ساعات پایان آلودگی کاهش یافت ولی در ۹۶ ساعت بیان دوباره در لاین مقاوم رو به افزایش گذاشت (شکل ۸). در نمونه دانه لاین مقاوم و نیمه‌مقاوم تقریباً وضعیت متفاوتی مشاهده شد. در نمونه دانه لاین مقاوم، بیان ژن PR-1 قبل از آلودگی بالاتر



شکل ۸- مقایسه الگوی بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم نسبت به نیمه مقاوم (محور عمودی: میزان بیان ژن در لاین C7 نسبت به B73، محور افقی: زمان‌های مورد مطالعه بعد از آلودگی).

Figure 8- Comparison of the PR-1 gene expression pattern in resistant to semi resistant line. Bars: Amount of gene expression in line C7 compare to line B73, Horizontal: Studied times after inoculation.

داشتن سطح پایه ژن PR-1 قبل از مایه‌زنی، با ایجاد آلودگی احتمالاً دیگر نیازی به افزایش بیان ژن PR-1 نداشته است. با این حال در مقایسه لاین مقاوم و حساس همچنان بیان ژن PR-1 در لاین مقاوم در بیشتر ساعات بالاتر از لاین حساس است.

در نمونه ابریشم و دانه لاین حساس در ۴۸ ساعت بعد از آلودگی شاهد کاهش شدید بیان هستیم. در حالی که در مورد دو لاین مقاوم و نیمه مقاوم در ۴۸ ساعت کاهش بیان مشاهده نشد. در پژوهشی *Lanubile et al.* (2010) گزارش کردند در ۴۸ ساعت پس از آلودگی بیمارگر، حالت نکروتروفیک رخ می‌دهد و میزبان آلودگی را شناسایی کرده و با انواع استراتژی‌های دفاعی

لاین حساس نسبت به لاین مقاوم به آلودگی زودتر پاسخ داد ولی از طرفی لاین مقاوم قبل از ایجاد آلودگی دارای سطح بالایی از ژن‌های دفاعی است و همین بالا بودن بیان ژن PR-1 شاید دلیلی بر مقاومت لاین مقاوم در برابر حمله قارچ فوزاریوم باشد و دیرتر از لاین حساس آلوده می‌شود. ولی لاین حساس به دلیل نداشتن بیان ژن‌های دفاعی قبل از آلودگی، با حمله قارچ، آلودگی خیلی زود گسترش پیدا می‌کند و به همین دلیل سیستم دفاعی گیاه حساس بیان را از سطح پایه آغاز می‌کند و بیان به یکباره بالا رفته به طوری که در ۲۴ ساعت نمونه دانه به حدود ۵۳ (در نمونه ابریشم) و ۳۶ برابر (در نمونه دانه) شاهد رسید. لاین مقاوم به دلیل

تنها تفاوت آن‌ها در سطح بیان ژن‌ها است. تغییرات عمده در بیان ژن‌های دفاعی در لاین مقاوم و حساس قبل از آلودگی اتفاق افتاد. لاین مقاوم قبل از ایجاد آلودگی دارای سطح بالایی از بیان ژن‌های PAL و PR-1 است و شاید همین به‌عنوان مانع اولیه در برابر حمله بیمارگر عمل کند ولی لاین حساس از سطح پایه بعد از آلودگی شروع به بیان ژن PAL و PR-1 می‌کند. بیان ژن-های دفاعی در رقم مقاوم پایدارتر و بیشتر از رقم نیمه‌مقاوم و حساس است.

بر علیه آن مبارزه می‌کند. در این نقطه زمانی تعداد کل رونوشت برای ژن‌های دفاعی میزبان ثابت بود.

نتیجه گیری

سطح بالایی از تنوع در بیان ژن‌های PAL و PR-1 در نمونه دانه و ابریشم ذرت آلوده در پاسخ به آلودگی *Fusarium verticillioides* مشاهده شد. همه ژنوتیپ‌ها قادر به بیان ژن‌های دفاعی بعد از آلودگی به قارچ فوزاریوم هستند و

منابع

- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahl-Goy P, Luntz T, Ward E, Ryals J (1993). Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90: 7327-7331.
- Bacon CW, Hinton DM, Porter JK, Glenn AE, Kulda G (2004) Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *Canadian Journal of Botany* 82: 878-885.
- Camm EL, Towers GHN (1977). Phenylalanine ammonia lyase. *Progress in Phytochemistry* 4: 169-188.
- Chen C, Belanger RR, Benhamou N, Paulitz T (2000). Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermantum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 13-23.
- Corsini DL, Pavsek JJ (1980). Phenylalanine ammonia lyase activity and fungi toxic metabolites produced by potato cultivars in response to *Fusarium tuber rot*. *Physiological Plant Pathology* 16: 63-72.
- Daayf F, Bel-Rhild R, Belanger RR (1997). Methyl ester of P-coumaric acid: a Phytoalexin-like compound from long English cucumber leaves. *Journal Chemical Ecology* 23: 1517-1526.
- Drepper, WJ, Renfro BL (1990) Comparison of methods for inoculation of ears and stalks of maize with *Fusarium moniliforme*. *Plant Disease* 74: 952-956.
- Ebel J, Schmidt WE, Loyal R (1984). Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthesis mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Archives Biochemistry Biophysics* 232: 240-248.
- El Modafar C, El Boustani E (2001). Cell wall-bound phenolic acid and lignin contents in date palm as related to its resistance to *Fusarium oxysporum*. *Biologia Plantarum* 44: 125-130.
- El Modafar C, El Boustani E (2005). The role of phenolics in plant defense mechanisms. *Biopesticides of Plant Origin* 157-172.

- El Modafar C, Tantaoui A, El Boustani E (2001). Differential induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in date palm roots in response to inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* and to elicitation with fungal wall elicitor. *Journal of Plant Physiology* 158: 715-722.
- El Modafar C, El Boustani E, Rahioui B, El Meziane A, El Alaoui-talibi Z (2006). Suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity elicited in date palm by *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis* hyphal wall elicitor. *Biologia Plantarum* 50 (4): 697-700.
- Fernández C, Szyperski T, Bruyère T, Ramage P, Mössinger E, Wütrich K (1997). NMR solution structure of the pathogenesis-related protein p14a. *Journal of Molecular Biology* 266: 576-593.
- Fukasawa-Akada T, Kung S, Watson JA (1996). Phenylalanine ammonia lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Molecular Biology* 30: 711-722.
- Geetha NP, Amruthesh KN, Sharathchandra RG, Shetty HS (2005). Resistance to downy mildew in pearl millet is associated with increased phenylalanine ammonia lyase activity. *Functional Plant Biology* 32: 267-275.
- Gelderblom W, Jaskiewicz K, Marasas WF, Thiel PG, Horak RM, Vleggaar R, Kriek NP (1988) Fumonisin--novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Applied and environmental microbiology* 54: 1806-1811.
- Hahlbrock K, Grisebach H (1979). Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annual Review of Plant Physiology* 30: 105-130.
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C (2004). Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *The Plant Journal* 38: 765-778.
- Kavitha R, Umesha S (2008). Regulation of defense-related enzymes associated with bacterial spot resistance in tomato. *Phytoparasitica* 36: 144-159.
- Kervinen BT, Peltonen S, Teeri TH, Karjalainen R (1998). Differential expression of phenylalanine ammonia-lyase genes in barley induced by fungal infection or elicitors. *New Phytologist Journal* 139: 293-300.
- Lanubile A, Logrieco A, Battilani P, Proctor RH, Marocco A (2013). Transcriptional changes in developing maize kernels in response to fumonisin-producing and nonproducing strains of *Fusarium verticillioides*. *Plant Science* 210: 183-192.
- Lanubile A, Pasini L, Marocco A (2010). Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection. *Journal of Plant Physiology* 167: 1398-1406.
- Lu H, Higgings VJ (1993). Partial characterization of a nonproteinaceous suppressor of non-specific elicitors from *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Plant Pathology* 42: 427-439.
- Munkvold GP (2003). Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. *European Journal of Plant Pathology* 109: 705-13.
- Niranjanraj S, Sarosh BR, Shetty HS (2006). Induction and accumulation of polyphenol oxidase activities as implicated in development of resistance against pearl millet downy mildew disease. *Functional Plant Biology* 33: 563-571.
- Rai GK, Kumar R, Singh J, Rai PK, Rai SK (2011). Peroxidase, polyphenol oxidase activity, protein profile and phenolic content in tomato cultivars tolerant and susceptible to *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici*. *Pakistan Journal of Botany* 43: 2987-2990.
- Reid LM, Zhu X (2005). Screening corn for resistance to common diseases in Canada. *Agriculture and Agri-Food Canada*.

- Repka V, Fischerová I, Šilharová K (2004). Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum* 48: 273-283.
- Sekhon RS, Kuldau G, Mansfield M, Chopra S (2006). Characterization of Fusarium-induced expression of flavonoids and PR genes in maize. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69: 109-117.
- Shiraishi T, Toyoda K, Yamada T, Ichinose Y, Kiba A, Sugimoto M (2001). Suppressors of defense-suppressions and plant receptor molecules. *Delivery and Perception of Pathogen Signals in Plants* 21: 112-121.
- Souaze F, Ntodou-Thome A, Tran CY, Rostene W, Forgez P (1996). Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* 21: 280-285.
- Umesha S (2006). Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. *Phytoparasitica* 34: 68-71.
- Vanitha SC, Niranjana SR, Umesha S (2009). Role of Phenylalanine Ammonia Lyase and Polyphenol Oxidase in host resistance to Bacterial wilt of Tomato. *Journal of Phytopathology* 157: 552-557.
- Vurro M, Ellis BE (1997). Effects of fungal toxins on induction of phenylalanine ammonia-lyase activity in elicited cultures of hybrid poplar. *Plant Science* 126: 29-38.
- Wang L, An C, Qian W, Liu J, Chen Z (2004). Detection of the putative cis-region involved in the induction by *Pyricularia oryzae* elicitor of the promoter of a gene encoding phenylalanine ammonia-lyase in rice. *Plant Cell Reports* 22: 513-518.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC (1991). Coordinate gene activity in response to reagents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-94.
- Yamada T, Shiraishi T, Ichinose Y, Kato H, Seki H, Murakami Y (1996). Regulation of genes for phenylpropanoid synthesis in pea by elicitor and suppressor. *Molecular Aspects of Pathogenicity and Resistance* 43: 151-162.
- Yamada T, Sriprasertsak P, Kato H, Hashimoto T, Shimizu H, Shiraishi T (1994). Functional analysis of promoters of phenylalanine ammonia-lyase genes in pea. *Plant and Cell Physiology* 35: 917-926.
- Yuan G, Zhang Z, Xiang K, Shen Y, Du J, Lin H, Liu L, Zhao M, Pan G (2013). Different gene expressions of resistant and susceptible maize inbreds in response to *Fusarium verticillioides* Infection. *Plant Molecular Biology Report* 31: 925-935.

The accumulation of PAL and PR-1 gene transcription before exposure to corn ear rot infection is an effective factor in resistance to *Fusarium* fungus

Mosavat S.A.¹, Mazahery-Laghab H.^{*2}, Soltanloo H.³

¹ Graduated PhD, Bu-Ali Sina University, Research Instructor of Agronomy & Horticulture Research Department, Golestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan-Iran.

² Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

³ Associate Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Plant Production College, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

Fusarium ear rot with *Fusarium verticillioides* is one of the most important corn diseases around the world. Plants respond to pathogens attack by activating complex defense strategies. Defense response to pathogen infection includes changes in the expression of a large number of plant genes which may be a gene expression increase or decrease. Three lines with different resistance levels to fusarium fungus (C7, B73, MO17) cultivated based on RCBD design. After silking manual pollination was carried out and 15 days after that inoculation with fusarium fungus was done by syringe (for seed inoculation) or needle (for silk inoculation). Then, silk and corn grain were sampled at 12, 24, 48, 72 and 96 hours after contamination. Non inoculated ear was used as control. After RNA extraction and cDNA production, synthesis the Real-Time PCR technique, the relative expression pattern of PAL, PR-1 genes were measured and data were analyzed using REST software. All genotypes are able to express PAL and PR-1 genes after infection with *Fusarium* fungus and their only difference is in the level of gene expression. Major changes in the expression of defense genes in the resistant and susceptible lines occur before infection. Resistant line have a high level of expression of PAL and PR-1 genes before contamination and that may be the primary barrier against a pathogen attack, but susceptible line to resistant line, after infection, the expression of PAL, PR-1 genes begins.

Keywords: *Corn, Fusarium fungus, Gene expression, PAL, PR-1.*

* Corresponding Author: Mazahery-Laghab H. Tel:09183122167 Email: hojat.mazahery@yahoo.co.uk :