مطالعه الگوی بیان ژن کیتیناز طی آلودگی نسبت به بیماریهای زنگ زرد و قهوه‌ای در لاینهای تقریباً ایزوژن گندم دارای مکان ژنی *Lr34/Yr18*

حسن سلطانلو*[۱]، سیده ساناز رمضانپور[۱] و دنیس گودت[۲]

[۱] گرگان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گروه اصلاح‌نباتات و بیوتکنولوژی

[۲] کانادا، دانشگاه لتبریج، مرکز تحقیقات کشاورزی، موسسه غذا و کشاورزی، بخش ژنتیک مولکولی

تاریخ دریافت: ۸۷/۶/۲۸ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲

چکیده

زنگ زرد و قهوه‌ای از جمله عوامل بیماریزای مخرب گیاه گندم در جهان محسوب می‌شود. یکی از راههای مبارزه با این بیماریها استفاده از ژنهای مقاومت تدریجی می‌باشد که باعث ایجاد مقاومت در یک دوره زمانی طولانی، در محیطهای مختلف و در مقابل نژادهای متنوع قارچ زنگ می‌شود. در بین ژنهای مقاومت تدریجی که تاکنون در گندم معرفی شده‌اند، مکان ژنی *Yr18/Lr34* به عنوان مهم‌ترین مکان ژنی محسوب می‌شود، چون تاکنون در هیچ یک از مناطق گندم خیز دنیا مقاومت حاصل از این ژن شکسته نشده است. از طرف دیگر این ژن باعث ایجاد مقاومت به بیش از شش نوع بیماری مختلف شامل زنگ زرد، زنگ قهوه‌ای، زنگ سیاه، سفیدک پودری، ویروس پاکوتاهی جو و بیماری لکه خالی می‌شود. ژن کیتیناز از گروه ژنهای مسئول واکنش دفاعی می‌باشد و معمولاً پس از حمله بیمارگر، سطح بیان آن توسط سلولهای گیاهی افزایش می‌یابد. به منظور مطالعه الگوی تظاهر ژن کیتیناز پس از آلودگی با بیماری زنگ زرد و قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای و بلوغ، از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی استفاده شد. مقایسه الگوی تظاهر ژن کیتیناز نشان داد پس از آلودگی با بیماریهای زنگ زرد و قهوه‌ای، سطح بیان این ژن در هر دو مرحله، در رقم مقاوم افزایش بیشتری از رقم حساس دارد. در رقم مقاوم سه روز پس از آلودگی با زنگ زرد در مرحله بلوغ، افزایش سطح تظاهر ژن کیتیناز ۵۲ برابر و رقم حساس تنها ۱۵ برابر می‌باشد. همچنین همراه با تظاهر تأخیری ژن کیتیناز، میسیلیوم قارچ زنگ گسترش بیشتری در سلولهای مزوفیل رقم حساس نشان داد.

واژه های کلیدی: گندم، کیتیناز، Real-time PCR، بیان ژن

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۱۲۷۱۹۷۶۷ ، پست الکترونیکی SoltanlooH@gau.ac.ir

مقدمه

زنگ زرد (*Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*) و قهوه‌ای (*Puccinia triticina* (= *P. recondita* Roberage ex Desmaz f. sp. *tritici* Eriks & E. Henn.) از جمله عوامل بیماریزای مخرب گیاه گندم (*Triticum aestivum* L) در جهان محسوب می‌شود. یکی از راههای مبارزه با این عوامل بیماریزا، به منظور جلوگیری از کاهش عملکرد، استفاده از ژنهای مقاومت به زنگ می‌باشد که از نظر اثرات اقتصادی و زیست محیطی بسیار کارآمدتر از روشهای دیگر مثل مبارزه شیمیایی می‌باشد (۱ و ۷). بسیاری از ژنهای مقاومت به زنگ که تاکنون در گندم شناسایی شده‌اند، در تقابل با نژادهای اختصاصی و در حالت «ژن برای ژن» عمل می‌کنند (۱۵). با این حال، مقاومت حاصل از ژنهای نژاد اختصاصی توسط نژادهای جدید قارچ زنگ که به سرعت در حال تغییر و تکامل هستند، خیلی زود شکسته می‌شود (۸ و ۱۲). همچنین زمانی که ارقام دارای ژنهای مشابه در یک منطقه وسیع کشت شوند، خطر

Archive of SID

www.SID.ir

شکسته شدن ژن مقاومت نژاد اختصاصی می‌تواند منجر به همه‌گیری گسترده‌تر گردد (۲ و ۳۰). مطالعات انجام شده در مناطق کشت گندم دنیا نشان می‌دهد که مقاومتهای بالا بر علیه نژادهای مختلف، توسط ژنهایی اعطاء می‌شود که یا تاکنون تعیین خصوصیت نشده‌اند و یا تعداد زیادی از آنها فقط در مرحله گیاه بالغ تظاهر می‌یابند (۲ و ۷). گزارش شده است ژنهای مقاومت تدریجی (Slow rusting)، برعکس تک‌ژنهای مقاومت نژاد اختصاصی، باعث ایجاد مقاومت در یک دوره زمانی طولانی، در محیطهای مختلف و در مقابل نژادهای متنوع قارچ زنگ می‌شوند (۲۵ و ۲۷). تاکنون نزدیک به ٦۰ ژن مقاومت به زنگ قهوه‌ای و بیش از ۳۰ ژن مقاومت به زنگ زرد شناسایی شده است که از میان تعداد بسیار زیاد ژنهای مقاومت به زنگ قهوه‌ای تنها ژنهای *Lr34* و *Lr49* که به ترتیب با ژنهای مقاومت به زنگ زرد *Yr18* و *Yr29* پیوستگی ژنتیکی کامل دارند، به عنوان ژنهای مقاومت تدریجی دسته‌بندی شده‌اند (١٤، ١٦، ۲۳ و ۲۵). طبق مطالعات ژنهای *Lr34/Yr18* باعث ایجاد مقاومت در مرحله گیاه بالغ (Adult plant resistance) (APR) می‌شوند. برعکس در مرحله گیاهچه‌ای، ارقام دارای ژنهای *Lr34/Yr18*، تیپ‌آلودگی حساس نشان می‌دهند (۱۸). یکی از جنبه‌های مهم ژن *Lr34*، خصوصیت غیر نژاد اختصاصی (Non race specific) بودن آن است که برای ایجاد مقاومت پایدار به زنگ الزامی می‌باشد. در مرحله گیاه بالغ، فنوتیپ *Lr34* به صورت عمومی باعث ایجاد شیب شدت (Gradiant) جوش زنگ در برگ پرچم (Flag leaf) می‌شود به طوری که جوشهای قاعده برگ بیشتر و بزرگتر می‌شود و به سمت نوک برگ از تعداد جوشها کاسته شده و اندازه آنها کوچکتر می‌شود. معمولاً شیب شدت جوش همراه با حضور سوختگی نوک برگ (Leaf tip necrosis) (Ltn) همراه می‌باشد (۸، ۲۱ و ۳۰). ژن *Lr34* به عنوان ژن مقاومت تدریجی به زنگ قهوه‌ای که قبلاً تحت عنوان *LrT2* نامگذاری شده بود، برای اولین بار توسط دایک (١٩٦٦) در رقم فرونتانا شناسایی شد (۵). مطالعات بعدی نشان داد، این ژن در تعداد زیادی از ارقام اروپایی، آمریکای شمالی و اصلاحی در مرکز بین‌المللی تحقیقات گندم و ذرت سیمیت وجود داشته است (۵، ۳، ۲۲ و ۲۸). دایک (۱۹۸۷) با تولید لاینهای تقریباً ایزوژن Thatcher و RL6058 (Thatcher+*Lr34/Yr18*)، ژن *Lr34* را بر روی کروموزوم شماره ۷ ژنوم D مکان‌یابی کرد و مدتها بعد مک‌اینتاش (۱۹۹۲) و سینگ (۱۹۹۲) نشان دادند که ژنهای *Lr34* و *Yr18* بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۷ ژنوم D نسبت به هم پیوستگی ژنتیکی شدیدی دارند (٤، ۱۲ و ۲۷). مطالعات انجام شده در کشورهای مختلف، بیانگر وجود یک QTL بزرگ بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۷ ژنوم D و مسئول کنترل مقاومت تدریجی مرتبط به *Lr34/Yr18* می‌باشد (۱۳، ۱۹، ۲۰، ۲٦، ۳۱). وارد کردن QTL مزبور باعث ایجاد مقاومت پایدار در ارقام حساسی می‌شود که معمولاً هرساله تحت تأثیر آلودگی شدید قرار می‌گیرند. مطالعات متعدد دیگر بر روی جمعیتهای نقشه‌یابی بزرگتر، همگی مؤید پیوستگی شدید این دو ژن هستند و تا به حال حتی در جمعیتهای بسیار بزرگ نیز پدیده نوترکیبی قادر به شکستن این پیوستگی نبوده است. بنابراین پیش‌بینی می‌شود ژنهای *Lr34* و *Yr18* ژن یکسانی باشند (۹، ۲۱ و ۲۹). همچنین گزارش شده است چندین صفت دیگر همراه با ژن *Lr34* مشاهده می‌شود، این صفات شامل، تقویت مقاومت ژنهای مقاومت به زنگ ساقه در مکانهای ژنی مستقل در رقم Thatcher (٤)؛ مقاومت به بیماری ویروس پاکوتاهی جو (Barley Yellow Dwarf Virus) (*Bdv1*) (۲۲)؛ و اخیراً مقاومت به سفیدک پودری (Powdery Mildew) گندم در مرحله گیاه بالغ (۲۹) می‌باشد. بنابراین قطعه ژنی *Lr34/Yr18* گندم تا به حال باعث ایجاد مقاومت به حداقل شش بیمارگر کاملاً متفاوت شده است. به همین دلیل *Ltn1/Lr34/Yr18* یک مکان ژنی منحصر به فرد است و به عنوان منبعی بسیار با ارزش در اصلاح گندم و نیز به عنوان مدلی ایده‌آل برای درک اساس

Archive of SID

www.SID.ir

مولکولی مقاومت تدریجی محسوب می‌شود. امروزه تنها سه مکان ژنتیکی مقاومت تدریجی در گندم شناسایی شده است که تحت عنوان مکانهای ژنتیکی *Lr34/Yr18*، *Lr46/Yr29* و *Sr2/Yr30* نامگذاری شده‌اند و به ترتیب بر روی کروموزومهای 7DS، 1BL و 3BS گندم مکان‌یابی شده‌اند (۲٤). این مکانهای ژنتیکی دارای چندین ژن به هم پیوسته هستند و یا دارای یک ژن با اثرات پلیوتروپیک می‌باشند. این احتمال وجود دارد که این ژنهای مقاومت در برخی از ساز و کارهای ضروری برای توقف یا کاهش سرعت مراحل مختلف آلودگی نقش داشته باشند که نه تنها برای نژادهای مختلف مشترک هستند بلکه در میان قارچها و بیمارگرهای مختلف نیز یکسان می‌باشند. اگر این نوع مکانیسمهای درگیر در فرآیند مقاومت به طور کامل شناخته شوند، ممکن است بتوان روشهایی با استفاده از مهندسی ژنتیک، برای ایجاد طیف وسیعی از مقاومتهای پایدار را معرفی نمود (۱۷). بنابراین پیش‌بینی می‌شود مکان ژنتیکی *Lr34/Yr18* از مسیرهای بیوشیمیایی همگانی مختص ژنهای مقاومت اختصاصی استفاده نمی‌کند. از آنجایی که مکان ژنتیکی *Lr34/Yr18* موجب مقاومت به چندین بیماری غیرمرتبط شامل زنگها و سفیدک پودری می‌شود، پس این نوع مقاومت می‌تواند نوعی از مقاومت غیرمیزبان (Non host resistance) باشد. یکی از راهکارهای موجود برای درک اساس مولکولی فرآیندهای دخیل در مقاومت القایی گندم نسبت به بیماریهای مختلف می‌تواند معرفی و شناسایی ژنهایی باشد که بلافاصله پس از القاء مقاومت فعال می‌شوند. هدف از این تحقیق، ارزیابی الگوی کمّی تظاهر ژن کیتیناز به عنوان ژن رمزکننده پروتئین مرتبط با مقاومت به بیماریزایی (Pathogenesis related proteins) برای بررسی نحوه شروع واکنش دفاعی پس از آلودگی با زنگ زرد و قهوه‌ای در مرحله گیاهچه‌ای و بلوغ لاینهای تقریباً ایزوژن Thatcher و RL6058 (Thatcher+*Lr34/Yr18*) بود.

مواد و روشها

مواد گیاهی: مواد ژنتیکی که قبلاً توسط محققین دیگر برای مقاومت در مرحله گیاه بالغ نسبت به زنگ زرد و قهوه‌ای ارزیابی شده بودند (شامل ارقام استرالیایی Avocet و Avocet+*Lr34/Yr18*، ارقام کانادایی Thatcher و RL6058 معادل Thatcher+*Lr34/Yr18*، ارقام مکزیکی Jupateco73 و Jupateco73+*Lr34/Yr18*)، برای انجام مطالعات آلوده‌سازی با بیمارگر زنگ زرد و قهوه‌ای انتخاب شدند. در نهایت لاینهای تقریباً ایزولاین Thatcher و RL6058 (Thatcher+*Lr34/Yr18*) برای انجام آزمایش تظاهر ژن انتخاب گردیدند.

آلودگی با زنگ زرد و قهوه‌ای: پس از کشت بذور در مخلوط خاک کرنل (Cornell) (۲)، گلدانها به اتاقک رشد با شرایط ۱٦ ساعت روشنایی (با شدت µE ۳۰۰)، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل و به مدت ۳ هفته در این شرایط نگهداری شدند تا گیاهچه‌ها رشد نمایند. سپس گیاهچه‌های یکنواخت در مرحله پنجه‌زنی به گلدانهای یک گالونی (یک گیاه در هر گلدان) منتقل شدند و تا رسیدن به مرحله بلوغ در اتاقک رشد با شرایط ۱٦ ساعت روشنایی در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت تاریکی در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. آبیاری روزانه گلدانها برای نگهداری رطوبت در حد ظرفیت مزرعه‌ای انجام شد. گلدانها با فاصله زمانی ۱٤ روز با استفاده از کود ۲۰-۲۰-۲۰ (ازت-فسفر-پتاس) کوددهی شدند و در طول مدت نگهداری در اتاقک رشد، به دلیل عدم وجود بیماری یا آفت، از تیمار قارچ‌کش یا حشره‌کش استفاده نگردید. گیاهان در مرحله ۵۵ از مقیاس زادوکس (۳۲) یعنی زمان شروع شکافته شدن غلاف توسط ریشک، با استفاده از جدایه LRC484 زنگ زرد و جدایه WPG2003 زنگ قهوه‌ای مایه‌کوبی شدند. برای مایه‌کوبی زنگ قهوه‌ای، سوسپانسیون ٤۰ گرم اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از روغن

Archive of SID

www.SID.ir

معدنی سبک یا سورتورول ۱۷۰ (Sortrol 170) به طور یکنواخت روی سطح برگ مایه‌کوبی شد. برای مایه‌کوبی زنگ زرد از مخلوط ۱:٤ پودر تالک و اسپور با استفاده از یک پودرپاش (Duster) مخصوص استفاده شد. گیاهان مایه‌کوبی شده به مدت ٢٤ و ٤٨ ساعت و دمای ۱۵ و ۱۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای زنگ قهوه‌ای و زرد در اتاقک سرد و تاریک با رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد قرار داده شدند. پس از این مرحله، گیاهان به اتاقک رشد با شرایط ١٦ ساعت روشنایی (۳۰۰µE)، دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل شدند. نمونه‌برداری از برگ پرچم در زمانهای ۱، ۲، ۳، ۵، ۷ و ۱۰ روز پس از مایه‌کوبی با زنگ قهوه‌ای و ۳، ٦، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی با زنگ زرد انجام شد.

برای مایه‌کوبی در مرحله گیاهچه‌ای پس از کشت بذور در مخلوط خاک کرنل، گلدانها به اتاقک رشد با شرایط ١٦ ساعت روشنایی (با شدت µE ۳۰۰)، دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد منتقل و به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. گیاهچه‌های یکنواخت در مرحله دو برگی با روش ذکر شده در قسمت بالا با استفاده از جدایه LRC484 زنگ زرد مایه‌کوبی شدند و برای مطابقت زمانی آلودگی زنگ زرد با زنگ قهوه‌ای آزمایشات هیستولوژیک انجام گردید. نمونه‌برداری برای استخراج RNA برای آلودگی با زنگ زرد در زمان ۳، ٦، ۹ و ۱۲ روز پس از مایه‌کوبی صورت گرفت.

استخراج RNA کل: بلافاصله پس از نمونه‌برداری، بافت برگ در نیتروژن مایع منجمد و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. به منظور استخراج RNA، ۸۰۰ میلی‌گرم برگ پرچم در نیتروژن مایع پودر گردید. RNA کل با استفاده از محلول ترایزول (TRIzol®) شرکت اینویتروژن (Invitrogen) با تغییرات جزئی در دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. به منظور حذف آلودگی کربوهیدرات، استخراج مجدد RNA کل روی مواد حاصل از استخراج مرحله اول با مقیاس حجمی $^{1}/_{10}$ مواد مورد استفاده انجام گردید. تخلیص RNA با استفاده از کیت آرای‌اِن‌ایزی‌مینی‌کلین‌آپ (RNeasy Mini Clean up kit) شرکت کایژن (Qiagen) انجام شد و کیفیت RNA روی ژل آگارز ۱/۵ درصد توسط الکتروفورز و کمیت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد.

ساخت cDNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی: ساخت رشته اول cDNA با استفاده از ۵ میکروگرم RNA کل، ۵۰۰ نانوگرم آغازگر الیگودی‌تی (Oligo dT18)، ۰/۱ میکرومول آغازگر پس‌رو ژن RNA ریبوزومی ۱۸S و آب عاری از RNase تا حجم نهایی ۱۱ میکرولیتر انجام شد. مخلوط مورد نظر به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد حرارت داده شد و بلافاصله روی یخ، سرد گردید. سپس ٤ میکرولیتر بافر ۵X رشته اول، ۱۰ میلی‌مول DTT، ٤۰ واحد RNaseOUT به عنوان ممانعت‌کننده فعالیت آنزیم RNase و ۵ میلی‌مول dNTP به مخلوط آنزیمی تا حجم نهایی ۱۱ میکرولیتر اضافه شد. مخلوط آنزیمی مورد نظر به مدت ۲ دقیقه در دمای ٤۲ درجه نگهداری شد. سرانجام یک میکرولیتر (۲۰۰ واحد) آنزیم سوپراسکریپت III (SuperScript III) شرکت اینویتروژن به محلول اضافه شد و محلول در دمای ٤۲ درجه به مدت ۵۰ دقیقه تیمار شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید. پس از رقیق سازی cDNA ساخته شده، واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی (Quantitative real-time PCR) در دستگاه آی‌سایکر (iCycler) شرکت بیوراد (Biorad) با استفاده از کیت کوانتی‌تک سایبرگرین (QuantiTect SYBR Green kit) شرکت کایژن به عنوان رنگ فلورسنت برای اندازه‌گیری کمّی انجام شد. آغازگرهای مرتبط به ژن کیتیناز به عنوان ژن مورد بررسی و آغازگرهای مربوط به ژنهای فاکتور تطویل ترجمه ۱- آلفا (TEF۱α) (Translation elongation factor 1 alpha-subunit)، ژن

Archive of SID

www.SID.ir

اکتین و ژن 18s-rRNA به عنوان ژنهای مرجع (Reference Gene) با استفاده از نرم‌افزار اینترنتی پرایمر ۳ (http://www.embnet.sk/cgi-bin/primer3_www.cgi) طراحی شد (جدول ۱). cDNA ساخته شده با رقت ۲۰ برابر به عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده گردید. هر واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مخلوط سایبرگرین، ۰/٦ میکرولیتر آغازگرهای پیش‌رو و پس‌رو با غلظت ۱۰ میکرومول، ۳/۳ میکرولیتر آب عاری از RNase، ۰/۵ میکرولیتر فلورسین (Flourencein) با غلظت ۰/۵ میلی‌مول و ۵ میکرولیتر cDNA الگو بود. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، ۱۵ دقیقه دمای ۹٤ درجه سپس ٤۰ چرخه ۳۰ ثانیه در دمای ۹٤ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ٦۰ درجه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه و سپس نگهداری در دمای ٤ درجه بود. مقدار تکثیر محصول در انتهای هر چرخه توسط نرم‌افزار آی‌سایکلر شرکت بیوراد اندازه‌گیری شد. سریهای رقت ۱۰ برابری مخلوطی از نمونه‌های cDNA شامل حجم مساوی از هر نمونه cDNA برای ارزیابی بازده واکنش PCR استفاده گردید. از نرم‌افزار REST (Relative Expression Software tools) برای مقایسه تظاهر افتراقی ژن در نمونه‌های مختلف استفاده شد. به دلیل این که رنگ سایبرگرین علاوه بر محصولات تکثیر شده اختصاصی با محصولات حاصل از تکثیر غیر اختصاصی و یا دایمرهای (Dimmers) آغازگر نیز اتصال می‌یابد، تجزیه منحنی ذوب برای بررسی وجود یا عدم وجود قطعات غیر اختصاصی و دایمرهای آغازگر در واکنش PCR استفاده شد. برای ترسیم منحنی ذوب آغازگرها، محصولات PCR در دمای ۹٤ درجه به مدت یک دقیقه گرم شدند و سپس با ۱۱۰ چرخه ۱۰ ثانیه‌ای ادامه پیدا کرد که نقطه شروع آن ٤۰ درجه و مقدار افزایش دما برای هر چرخه ۰/۵ درجه بود.

جدول ۱- توالی آغازگرهای مربوط به ژنهای کیتیناز، فاکتور تطویل ترجمه ۱- آلفا، اکتین و RNA ریبوزومی ۱۸S مورد استفاده برای آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

نام آغازگر	شماره دسترسی	نوع ژن	توالی	دمای ذوب	%GC	اندازه نوار
Chi-F	*AB029936*	کیتیناز	5'GTTTAAGACGGCGTTGTGGT3'	۵۸	۵۰	۱۵۱
Chi-R			5'ACCGTTGATGATGTTGGTGAT3'	۵۷	٤۳	
TEF1α***-F***	M90077	فاکتور تطویل ترجمه ۱-آلفا	5'GGTGATGCTGGCATAGTGAA3'	۵۸	۵۰	۱٤۲
TEF1α***-R***			5'GATGACACCAACAGCCACAG3'	٦۰	۵۵	
ActinF	*DN551593*	اکتین	5'GGAAAAGTGCAGAGAGACACG3'	٦۱	۵۲	۱۵۰
ActinR			5'TACAGTGTCTGGATCGGTGGT3'	٦۱	۵۲	
18S-F	*AB029936*	RNA ریبوزمی 18s	5'CGGCTACCACATCCAAGGAA3'	٦۰	۵۵	۱٤۸
18S-R			5'GCTGGAATTACCGCGGCT3'	۵۸	٦۱	

نتایج و بحث

ارزیابیهای فنوتیپی در مرحله گیاهچه‌ای و گیاه بالغ نشان داد، پس از مایه‌کوبی با زنگ زرد و قهوه‌ای، لاینهای مقاوم RL6058، Avocet+*Lr34/Yr18* و Jupateco73+*Lr34/Yr18* در مرحله گیاهچه‌ای دارای تیپ آلودگی حساس بودند. اما در مرحله گیاه بالغ، تمام لاینهای مقاوم، تیپ آلودگی متوسط و فنوتیپ سوختگی نوک برگ را نشان دادند، هر چند مقدار لکه‌های نکروتیک اطراف جوش در لاین مقاوم RL6058 کمتر از سایر لاینهای مقاوم بود. در لاینهای دارای مکان ژنی *Lr34/Yr18* مقدار تراکم اسپور به تدریج از سمت قاعده برگ تا نوک آن کم و در

Archive of SID

www.SID.ir

منطقه سوختگی برگ به حداقل مقدار خود کاهش یافت. از میان سه جفت لاین تقریباً ایزوژن که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته بود، با توجه به نوع واکنش و نیز ارزیابیهای فنوتیپی صورت گرفته، نمونه‌برداریهای صورت گرفته از ایزولاین Thatcher به عنوان لاین حساس و لاین RL6058 (Thatcher+*Lr34/Yr18*) به عنوان لاین مقاوم وارد مرحله آزمایشات استخراج RNA گردید. این به دلیل این بود که نوع واکنش این دو لاین تقریباً ایزوژن با نتایج محققین قبلی منطبق بود (۱۸) و از طرف دیگر مقدار واکنش مرگ سلولی در اطراف جوش کمتر از جفت لاینهای دیگر بود. همچنین دلیل دیگر انتخاب این دو لاین، تعدد تحقیقات قبلی صورت گرفته بر روی لاینهای تقریباً ایزوژن Thatcher و RL6058 بود. این دو لاین تقریباً ایزوژن قبلاً توسط دایک و همکاران (۱۹۸۷) در کانادا تهیه شده بود (٤). به منظور بررسی نحوه پاسخ ژنهای دفاعی به آلودگی با بیمارگرهای زنگ زرد و قهوه‌ای، آغازگرهای ژن کیتیناز گندم با استفاده از توالی این ژن با شماره دسترسی ***AB029936*** در سایت NCBI و بر اساس ناحیه نزدیک به پایانه ´۳ توالی mRNA این ژن طراحی شد که قطعه ۱۵۱ جفت بازی را تکثیر نمود. محل قرارگیری آغازگرهای مربوطه در شکل یک نشان داده شده است.

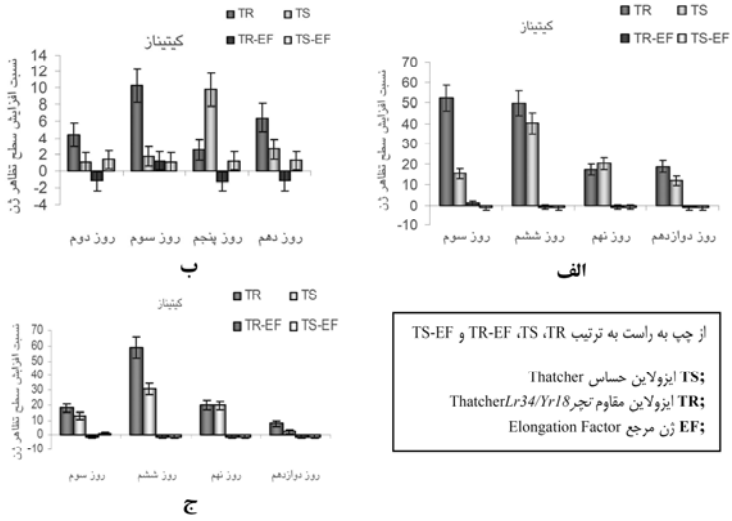
```
5'-GCAGTGTGACACACAATCACCAGCTGAGCGGACTCTGCTTCATTGCCCAAGATGAGAGGA
   GTTGTGGTGGTGGCCATGCTGGCCGCGGCCTTCGCCGTGTCTGCGCACGCCGAGCAATGC
   GGCTCGCAGGCCGGCGGGGCGACGTGCCCCAACTGCCTCTGCTGCAGCAAGTTCGGTTTC
   TGCGGCACCACCTCCGACTACTGCGGCACCGGCTGCCAGAGCCAGTGCAATGGCTGCAGC
   GGCGGCACCCCGGTACCGGTACCGACCCCCTCCGGCGGCGGCGTCTCCTCCATTATCTCG
   CAGTCGCTCTTCGACCAGATGCTGCTGCACCGCAACGACGCGGCGTGCCTGGCCAAGGGG
   TTCTACAACTACGGCGCCTTCGTCGCCGCCGCCAACTCGTTCTCGGGCTTCGCGACCACA
   GGTAGCACCGACGTCAAGAAGCGCGAGGTGGCCGCGTTCCTCGCTCAGACTTCCCACGAG
   ACGACCGGCGGGTGGCCGACGGCGCCCGACGGCCCCTACTCCTGGGGCTACTGCTTCAAC
   CAGGAGCGCGGCGCCACCTCCGACTACTGCACGCCGAGCTCGCAGTGGCCATGTGCGCCG
   GGCAAGAAGTACTTCGGGCGCGGGCCCATCCAGATCTCACACAACTACAACTACGGGCCG
   GCGGGGCAGGCCATCGGCACCGACCTGCTCAACAACCCGGACCTTGTGGCGTCGGACGCG
   ACCGTGTCGTTTAAGACGGCGTTGTGGTTCTGGATGACGCCGCAATCACCCAAGCCTTCG
   AGCCACGACGTGATCACGGGCCGGTGGAGCCCCTCGGGCGCCGACCAGGCGGCGGGGAGG
   GTGCCTGGGTACGGTGTGATCACCAACATCATCAACGGTGGGCTCGAGTGCGGGCGCGGG
   CAGGACGGCCGTGTCGCCGACCGGATCGGGTTCTACAAGCGCTACTGCGACCTCCTTGGC
   GTCAGCTACGGTGACAACCTGGACTGCTACAACCAAAGGCCGTTCGCATAGTCGATCGAC
   TATATGATGCGAGAAGACATGCAAAAAATAAAGGCTCACACTAAATATTGTAACAATGGC
   GTTGCGATAGACATCGCCTAGTACAAGGGAATAATGGTGCGATCATCGTAAAAAAAAAAA
   AAAAAAAA-3'
```

شکل ۱- محل قرارگیری آغازگرهای مورد استفاده برای انجام آزمایش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی در توالی ژن کیتیناز گندم با شماره دسترسی ***AB029936*** همان طور که در شکل ملاحظه می‌شود آغازگر پس‌رو و پیش‌رو نزدیک به دنباله ´۳ ژن کیتیناز طراحی شده است.

ژن کیتیناز به عنوان یکی از ژنهای مهم رمزکننده Pr پروتئین می‌باشد. گزارشات متعدد حاکی از واکنش شدید این ژن به عنوان یک ژن دفاعی عمومی نسبت به طیف گسترده‌ای از بیماریهای مختلف مخصوصاً قارچهای بیماریزا در گیاهان متفاوت می‌باشد (٦، ۱۰ و ۱۱). در حقیقت می‌توان با بررسی نحوه تظاهر چنین ژنهایی، شروع و پایان فرآیند واکنش دفاعی گیاه را شناسایی نمود. شناسایی مراحل مختلف دفاع گیاه، در انتخاب زمان صحیح نمونه برداری برای جداسازی ژنهای کلیدی و انتقال‌دهنده علائم (Signal) کمک خواهد نمود (۲). از طرف دیگر با بررسی نحوه تظاهر ژنهایی از قبیل کیتیناز به عنوان پروتئین مرتبط به واکنش دفاعی می‌توان نوع واکنش یک ژن مقاومت غیر نژاد اختصاصی را ارزیابی نمود. نحوه افزایش تظاهر ژن کیتیناز در مرحله گیاه بالغ نشان می‌دهد که این ژن پس از حضور عامل بیمارگر به میزان بسیار بالایی بیان می‌شود. این ژن یکی از ژنهای مهم برای مقاومت به قارچها در گیاهان می‌باشد، به طوری که به سرعت سه روز پس از آلودگی با قارچ زنگ زرد در مرحله گیاه بالغ، سطح تظاهر آن به بیش از ۵۰ برابر مقدار اولیه خود رسید. همانطور که در شکل ۲ (الف) نشان داده شده است، در رقم مقاوم سه روز پس از آلودگی، سطح تظاهر ژن کیتیناز ۵۲ برابر و در رقم حساس تنها ۱۵ برابر افزایش یافته

Archive of SID
www.SID.ir

است. اما در رقم حساس در روز ششم سطح تظاهر ژن کیتیناز به ٤٠ برابر مقدار اولیه رسیده است. در رقم مقاوم سطح تظاهر ژن کیتیناز حتی پس از گذشت شش روز از بیماری زنگ زرد کاهش معنی‌داری نداشته است که بیانگر فعالیت شدید ژن کیتیناز در رقم مقاوم می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد پروتئین کیتیناز به عنوان یک فرآورده زیان‌آور برای قارچ زنگ زرد در گیاه ساخته می‌شود و تا مرحله‌ای که رشد قارچ در بافت مزوفیل ادامه پیدا می‌کند، بیان ژن در سطح بالایی حفظ می‌شود. در رقم حساس، افزایش سطح تظاهر با تأخیر، گذرا و از نظر میزان تظاهر پایین‌تر از رقم مقاوم می‌باشد. همانطور که در شکل ۲ (ج) نشان داده شد است در مرحله گیاهچه‌ای، افزایش سطح بیان ژن کیتیناز سه روز پس از آلودگی با زنگ زرد، شروع گردیده است و به تدریج در روز ششم پس از آلودگی به بالاترین میزان خود رسیده است. بنابراین به نظر می‌رسد تظاهر تأخیری ژن کیتیناز به قارچ زنگ، فرصتی برای گسترش قارچ در میزبان فراهم می‌آورد. با این حال، در مرحله گیاهچه‌ای نیز مقدار تظاهر ژن کیتیناز در رقم مقاوم بالاتر از رقم حساس می‌باشد. تصور می‌شود پتانسیل دفاع گیاه از طریق ژن کیتیناز در رقم مقاوم بالاتر از رقم حساس می‌باشد. بنابراین اگر این پتانسیل در زمان درست به کار گرفته شود موجب مقاومت (در مرحله گیاه بالغ) می‌شود. در مورد مقاومت به زنگ قهوه‌ای نیز سطح تظاهر ژن کیتیناز از روز دوم پس از آلودگی به تدریج افزایش یافته است و در روز سوم به بالاترین میزان خود رسیده است، در حالی که در رقم حساس سطح بیان ژن در روز پنجم حداکثر میزان خود را نشان داده است (شکل ۲–ب). تأخیر بیان ژن در رقم حساس می‌تواند به دلیل دیرفعال شدن انتقال علائم حضور بیمارگر باشد. در مجموع می‌توان گفت، ژن کیتیناز از الگوی افزایش سطح تظاهر در روزهای اولیه پس از شناسایی قارچ زنگ بعد از تشکیل *اپرسوریوم* پیروی می‌کند. اگر این افزایش در سطح تظاهر دیرتر اتفاق افتد، نشان‌دهنده تأخیر واکنش دفاعی می‌باشد که در حالت گیاهچه‌ای منجر به حساسیت در هر دو رقم می‌شود و در حالت بلوغ تنها در رقم حساس، حساسیت را ایجاد می‌کند. ذکر این نکته نیز ضروری است که پتانسیل افزایش سطح تظاهر در رقم مقاوم بالاتر از رقم حساس می‌باشد. چنین نتایجی قبلاً توسط افراد مختلف برای بیماریهای دیگر گندم مثل سیاهک و سفیدک پودری گزارش شده است (۱۷ و ۱۸).



شکل ۲– مقایسه مقدار افزایش کمی تظاهر ژن کیتیناز پس از مایه‌کوبی با زنگ زرد و قهوه‌ای نسبت به زمان قبل از مایه‌کوبی در ایزولاین مقاوم تاجر Thatcher*Lr34/Yr18* و ایزولاین حساس Thatcher. الف– آلودگی با زنگ زرد در مرحله گیاه بالغ ب– آلودگی با زنگ قهوه‌ای در مرحله گیاه بالغ ج– آلودگی با زنگ زرد در مرحله گیاهچه‌ای

Archive of SID
www.SID.ir

با توجه به نتایج حاصل از بررسی این ژن، به نظر می‌رسد مکان ژنی *Lr34/Yr18* نیز چون سایر ژنهای نژاد اختصاصی، از Pr پروتئینهایی مثل کیتیناز برای افزایش توان دفاعی گیاه استفاده نماید. اگر این فرضیه به اثبات برسد شاید پاسخ به این سوال که آیا مکان ژنی *Lr34/Yr18* با استفاده از مکانیسم مشابه آنچه که در مورد ژنهای نژاد اختصاصی رخ می‌دهد روشن‌تر شود. هولبرت و همکاران (۲۰۰۷) با استفاده از روش ریزآرایه افزایش تظاهر ژن LTP (Lipid transfer protein) را پس از آلودگی با زنگ زرد گزارش نمودند (۳۱). از طرف دیگر بررسی الگوی تظاهری ژن کیتیناز نشان داد که در حالت مقاومت، تظاهر سریع و فوق‌العاده این ژن در پاسخ به آلودگی زنگ زرد رخ می‌دهد، در حالی که گیاه حساس با تاخیر به آلودگی بیمارگر پاسخ می‌دهد. همچنین میزان بیان این ژن در رقم حساس کمتر از رقم مقاوم می‌باشد. از طرف دیگر، مشخص شد رقم مقاوم با وجود دارا بودن پتانسیل ژنتیکی تظاهر به موقع واکنش دفاعی در مرحله بلوغ، در مرحله گیاهچه‌ای قادر نیست از این پتانسیل ژنتیکی استفاده نماید و نوع واکنش آن شبیه به رقم حساس می‌باشد. اینکه چگونه رقم مقاوم در مرحله بلوغ قادر است واکنش به موقع دفاعی را فعال کند مشخص نیست، اما پیش‌بینی می‌شود با توالی‌یابی مکان ژنی *Lr34/Yr18* و مطالعه توالی راه‌انداز این ژن و سایر ژنهای مرتبط، بتوان به این گونه سوالات پاسخ مناسبی داد. اما سوال مهم بی‌پاسخ دیگر این است که چگونه این مکان ژنی در مرحله بلوغ نسبت به قارچهای مختلف بیماریزا مقاومت ایجاد می‌کند. شاید همسانه‌سازی و جداسازی این مکان ژنی تنها راه‌حل باقی‌مانده برای درک چگونگی عمل این مکان ژنی باشد. اما متأسفانه با وجود تلاشهای موازی که در کشورهای مختلف به منظور همسانه‌سازی این مکان ژنی در حال انجام است، هنوز یکی از مشکلات جداسازی و همسانه‌سازی این مکان ژنی، عدم وجود دانش کافی در مورد معرفی ژنهای کاندید می‌باشد. زیرا محققین در راستای همسانه‌سازی این مکان ژنی، واقعاً نمی‌دانند به دنبال جداسازی چه نوع ژنی هستند (٦ و ١٧). بنابراین با بررسی تعداد بیشتری از ژنهای پاسخ‌دهنده به آلودگی از جمله Pr پروتئینهای شناخته شده می‌توان اطلاعات بیشتری در رابطه با چگونگی انتقال علایم این بیماری و مجموعه ژنهای دخیل در فرآیند دفاع گیاه به دست آورد که از طریق این مکان ژنی در ارقام مقاوم ایجاد می‌شود.

تشکر و قدردانی: از همکاریهای میشل‌فریک و سایر پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی غلات مؤسسه تحقیقاتی لتبریج کانادا در اجرا و تأمین منابع مالی این آزمایش تشکر و قدردانی می گردد.

منابع

۱. سلطانلو ح.۱۳۸۰. تجزیه ژنتیکی مقاومت به زنگ در گندم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران، دانشکده کشاورزی کرج، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، ۱۳۸ص.

۲. سلطانلو ح.۱۳۸۵. نقشه‌یابی، شناسایی و تعیین خصوصیت ژنهای بیان شونده در واکنش گندم نسبت به بیماری زنگ زرد. پایان‌نامه دکتری، دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج، گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، ۳۲۵ص.

3. Dyck PL (1977) Genetics of leaf rust reaction in three introductions of common wheat. *Can J Genet Cytol* 19:711–716.

4. Dyck PL (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome* 29:467–469.

5. Dyck PL, Samborski DJ, Anderson RG (1966) Inheritance of adult-plant leaf rust resistance derived from the common wheat varieties Exchange and Frontana**.** *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 8:665-671.

6. Hulbert SH, Bai J, Fellers JP, Pacheco MG, Bowden RL (2007) Gene Expression Patterns in Near Isogenic Lines for Wheat Rust Resistance

Archive of SID
www.SID.ir

Gene *Lr34/Yr18. phytopathology* 97: 1083-1093.

7. Khanna R, Bansal UK, Saini RG (2005) Genetics of durable resistance to leaf rust and stripe rust of an Indian wheat cultivar HD2009. *J Appl Genet* 46: 259-265.
8. Kolmer JA (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust. Annu Rev Phytopathol 34:435–455.
9. Lagudah ES, McFadden H, Singh RP, Huerta-Espino J, Bariana HS, Spielmeyer W (2006). Molecular genetic characterization of the *Lr34*/*Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. *Theor Appl Genet* 114:21-30.
10. Lu ZX, Gaudet DA, Frick M, Puchalski B, Genswein B, Laroche A (2005) Identification and characterization of genes differentially expressed in the resistance reaction in wheat infected with *Tilletia tritici*, the common bunt pathogen. *J Biochem Mol Biol*. 38(4):420-31.
11. Mallard S, Nègre S, Pouya S, Gaudet D, Lu ZX, Dedryver F. (2008) Adult plant resistance-related gene expression in 'Camp Remy' wheat inoculated with Puccinia striiformis. *Mol Plant Pathol*. 2:213-25.
12. McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat rusts: an atlas of resistance genes. *CSIRO Australia, Kluwer Academic Publishers, Melbourne, Australia.*
13. Nelson JC, Singh RP, Autrique JE, Sorrells ME (1997) Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat. *Crop Sci* 37:1928–1935.
14. Parlevliet JE (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu Rev Phytopathol* 17:202–222.
15. Person C (1959) Gene-for-gene relationships in host:parasite systems. *Can J Bot* 37:1101–1130 24
16. Plank JE van der (1963) Plant diseases: Epidemics and control. *Academic Press, New York*.
17. Rosewarne GM, Singh RP, Huerta-Espino J, William HM, Bouchet S, Cloutier S, McFadden H, Lagudah ES (2006) Leaf tip necrosis, molecular markers and _1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46*/*Yr29*. *Theor Appl Genet* 112:500–508
18. Rubiales D, Niks RE (1995) Characterization of *Lr34*, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Dis* 79:1208–1212.
19. Schnurbusch T, Bossolini E, Messmer M, Keller B (2004b) Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar Forno. *Phytopathology* 94:1036–1041.
20. Schnurbusch T, Paillard S, Schori A, Messmer M, Schachermayr G, Winzeler M, Keller B (2004a) Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region. *Theor Appl Genet* 108:477–484.
21. Singh RP (1992) Association between gene *Lr34* for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in wheat. *Crop Sci* 32:874–878.
22. Singh RP (1993) Genetic association of gene Bdv1 for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat. *Plant Dis* 77:1103–1106.
23. Singh RP, Gupta AK (1991) Genes for leaf rust resistance in Indian and Pakistani wheats tested with Mexican pathotypes of *Puccinia recondita fsp. tritici*. *Euphytica* 57:27–36.
24. Singh RP, Huerta-Espino J, William HM (2005) Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat. *Turk J Agric For* 29:121–127.
25. Singh RP, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J (1998) Lr46: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat. *Phytopathology* 88:890–894.
26. Singh RP, Nelson JC, Sorrells ME (2000) Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Sci* 40:1148–1155.
27. Singh RP, Rajaram S (1992) Genetics of adult plant resistance of leaf rust in Frontana and 3 CIMMYT wheats. *Genome* 35:24–31.
28. Singh RP, Rajaram S (1994) Genetics of adult plant resistance to stripe rust in ten spring bread wheats. *Euphytica* 72:1–7.
29. Spielmeyer W, McIntosh RA, Kolmer J, Lagudah ES (2005) Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat. *Theor Appl Genet* 111:731–735.
30. Soltanloo H., D. Gaudet, S.S. Ramezanpour, M. Frick, B. Puchalski, T. Despines and A. Laroche. 2005. Identification and characterization of genes differentially expressed in wheat carrying the *Lr34/Yr18*

Archive of SID

www.SID.ir

genes for adult plant resistance to leaf and stripe rust. *26 Annual PPSA meeting, Canmore, Canada*.

31. Sun JY, Gaudet DA, Lu ZX, Frick M, Puchalski B, Laroche A (2008) Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. *Mol Plant Microbe Interact*. 3:346-60.
32. Zadoks JC, Chang TT, Konzak CF. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weeds Res* 14:415–21.

The study of *Chitinase* gene expression during infection of wheat near isogenic lines carrying *Lr34/Yr18* locus to stripe and leaf rust pathogens

Soltanloo H.[1], Ramezanpour S.S.[1], and Gaudet D.[3]

[1] agronomy and plant breeding dept., University of Agricultural Sciences and Natural Resources; Gorgan, I.R.of IRAN

[2] Molecular Genetic Dept., Lethbridge Re search Centre, Agriculture and Agri-Food, Canada

Abstract

Leaf and stripe rust known as destructive disease of wheat word wide. One of the strategies to control these diseases is employing slow rusting gene which confers resistance in long period, different climate and against various fungi races. Through slow rusting genes have been introduced yet, *Yr18/Lr34* is the most important locus because resistance derived is not broken down in most of the wheat growing areas. Indeed, *Yr18//Lr34* locus confer resistance at least to six different pathogen including stripe rust, leaf rust, stem rust, powdery mildew, barley yellow dwarf virus as well as spot blotch of wheat. Chitinase belong to defense response cluster and is up-regulated post-inoculation of pathogen in the plant cells. Quantitative real-time PCR has been employed to study the expression profile of *Chitinase* post-inculcation of leaf and stripe rust at seedling and adult stages. Comparing of *Chitinase* expression profile against both pathogens has been revealed that the level of expression is increased more in resistant isoline rather than susceptible one at seedling and adult stage. The level of expression was increased 52 times relative to mock inoculation after 3 days of stripe rust inoculation at adult stage, whereas it was only 15 times more in susceptible isoline. Delay in expression of chitinase led to development of fungi mycelium in host cells of susceptible isoline.

Keywords: Wheat, *chitinase*, Real-time PCR, Gene expression

Archive of SID

www.SID.ir