ژنتیک نوین
دوره هشتم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
صفحه ۱۵۸-۱۴۹

بررسی الگوی بیان ژن‌های مرتبط با مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم نان (*Triticum aestivum*)

Study of resistance related gene expression pattern to *Septoria tritici* Blotch (STB) in wheat (*Triticum aestivum*)

معصومه حبیبی*[۱]، ندا میرآخورلی[۲]، بهروزشیران[۳]، محسن مردی[۴]

۱،۲و۳- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، استادیار و دانشیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، ایران
۴- دانشیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی، کرج، ایران

Habibi M*[1], Mirakhorli N[2], Shiran B[3], Mardi M[4]

1,2,3. MSc Student, Assistant Professor and Associate Professor, Faculty of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.
4. Associate Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran,Karaj,Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Masoomeh.habibi@yahoo.com
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۱)

چکیده

بیماری سپتوریوز برگی که توسط *Mycosphaerella graminicola* (آنامورف: *Septoria tritici*) ایجاد می‌شود، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد که در کاهش عملکرد گندم در سطح جهان تاثیر بسزایی داشته است. مطالعات قبلی در ارتباط با الگوی بیان ژن‌ها نشان داده است که علاوه بر ژن‌های اصلی ایجاد کننده مقاومت به سپتوریوز برگی (stb1-15)، در طول پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد. در این مطالعه به منظور بررسی الگوی بیان ۵ ژن مرتبط با دفاع شامل *PR-1*، کیتیناز، پراکسیداز، *PR-5* و پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتناز، سطح بیان آن‌ها در ۸ زمان (صفر تا ۶ روز) بعد از آلودگی در رقم مقاوم ونگشوبای و رقم حساس فلات با استفاده از روش RT-PCR نیمه‌کمی اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که بیان ژن‌های مورد بررسی در اثر آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی در هر دو رقم حساس و مقاوم تغییر می‌کند. بررسی روند تغییرات بیان این ژن‌ها در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی نشان داد که بیان این ژن‌ها در اثر تنش در رقم ونگشوبای سریع‌تر از رقم فلات افزایش می‌یابد. همچنین آنالیز نتایج RT-PCR نیمه‌کمی تایید می‌کند که در اغلب تیمارهای زمانی سطح تظاهر این ژن‌ها صرف‌نظر از حالت تنش در رقم مقاوم بالاتر از رقم حساس می‌باشد. با توجه به این نتایج می‌توان گفت این ژن-ها در کنار ژن‌های اصلی، باعث تشدید و حفظ مقاومت می‌شوند.

واژه‌های کلیدی

بیان ژن،
RT-PCR،
Mycosphaerella graminicola،
PR genes،
Triticum aestivum

Archive of SID

مقدمه

گندم نان (*Triticum aestivum*) یکی از مهم‌ترین گیاهان زراعی در جهان می‌باشد که در معرض پاتوژن‌های زیادی قرار می‌گیرد. یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی گندم، بیماری سپتوریوز برگی (*Septoria tritici* Blotch) می‌باشد که بوسیله قارچ *Mycosphaerella graminicola* (آنامورف: *Septoria tritici*) ایجاد می‌شود. میزان کاهش محصول در اثر این بیماری در آلودگی‌های شدید ۳۱ تا ۵۳ درصد گزارش شده است (Kia and Torabi 1387). کنیدی‌های این قارچ، صرف‌نظر از ژنوتیپ حساس یا مقاوم، دو ساعت پس از آلودگی بر روی سطح برگ جوانه می‌زنند (Cohen and Eyal 1993). این پاتوژن، در هر دو حالت میزبان حساس و مقاوم در ۱۲ الی ۲۴ ساعت پس از آلودگی از طریق فضای زیر روزنه‌ای وارد گیاه شده و بعد از آن هیف‌های قارچ در بین سلول‌ها رشد می‌کند (Duncan and Howard 2000). قارچ آپوپلاست سلول را از طریق تغییر در ساختار مزوفیل احاطه می‌کند. در گیاهان مقاوم استعمار مزوفیل محدود و قارچ در تشکیل پیکنیدیوم روی برگ ناتوان می‌شود (Ray et al. 2003). تحقیقات نشان داده که بیومس قارچی در ۱۲ الی ۱۵ روز بعد از آلودگی در هر دو حالت میزبان حساس و مقاوم یکسان می‌باشد ولی بعد میزان آن در رقم حساس به صورت نمایی افزایش می‌یابد در حالیکه رشد قارچ در رقم مقاوم دارای ژن‌های مقاومت stb، متوقف می‌شود (Adhikari et al. 2004). احتمالا فعالیت زودهنگام مکانیسم‌های دفاعی در رقم مقاوم از رشد هیف‌های قارچ در منفذ زیر روزنه جلوگیری کرده و باعث پایین ماندن بیومس قارچی می‌شود و این به دلیل تفاوت در زمان بیان ژن‌های موثر در مقاومت در رقم حساس و مقاوم می‌باشد (Cohen and Eyal 1993).

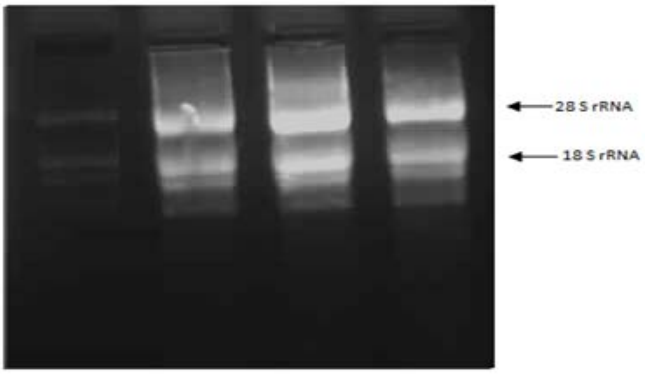
بر اساس گزارشات موجود ۱۵ ژن (*Stb1-Stb15*) ایجاد کننده مقاومت به سپتوریوزبرگی (STB) در گندم شناخته شده است (Raman et al. 2009). ژن غالب *Stb1*، اولین ژن شناخته شده مقاومت می‌باشد. این ژن ازگندم زمستانه Bulgaria88 به گندم زمستانه نرم هندی انتقال داده شده است که این رقم به مدت ۲۵ سال پایدار بود. ژن *Stb4* در ارقام گندم کالیفرنیایی یافت شد که این ارقام تقریبا به مدت ۱۵ سال پایداری نشان دادند (Patterson et al. 1979). مطالعات انجام شده جهت شناسایی ژن‌های موثر در ایجاد مقاومت به سپتوریوز برگی از طریق تکنیک cDNA-AFLP نشان داده است که، علاوه بر این نوع مقاومت اختصاصی یا تک ژنی، در طول پاسخ مقاومت گیاه به این بیماری تظاهر تعداد زیادی از ژن‌ها افزایش می‌یابد (Adhikari et al. 2007). تفاوت در الگوی بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس پس از آلودگی با قارچ *M.graminicola*، ممکن است نقش اصلی را در مکانیزم‌های مقاومت در گندم داشته باشد. به طور مثال در مطالعه‌ای که توسط Ray et al. (2003) انجام شد بیان ژن‌های درگیر در مقاومت به سپتوریوز برگی با استفاده از روش Real time PCR و آنالیزهای نورتن بلات مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که در رقم مقاوم ژن *PDI* (Protein Disulfide Isomerase) در سه ساعت اول بعد ازآلودگی بیان می‌شود. همچنین در این مطالعه مشخص شد که ۳ ژن *PR* پروتئین (PR-1، PR-2، PR-5) در ۱۲ ساعت اول آلودگی بیان می‌شوند در حالیکه این افزایش بیان در رقم حساس ۹۶ ساعت پس از آلودگی اتفاق می‌افتد. ایشان بر اساس این یافته‌ها نتیجه گرفتند که چگونگی تعامل گیاه و قارچ در ۲۴ ساعت اول پس از مایه‌کوبی تعیین می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر که به‌وسیله Adhikari et al. (2007) بر روی بیان ژن‌های کاندید (۱۴ ژن) در مقاومت به سپتوریا روی ارقام حساس و مقاوم گندم بوسیله روش Real-time PCR انجام شد معلوم شد که بیان این ژن‌ها در ارقام مقاوم و حساس در زمان‌های مختلف متفاوت است و چهار ژن کیتیناز، فنیل آلانین آمونیا لیاز، PR-1 و پراکسیداز تظاهر زودهنگام دارند و در۲۴ ساعت اول پس از آلودگی بیان می‌شوند ولی دردوره زمانی ۲۴-۱۸ روز بعد ازآلودگی (زمان رشد پاتوژن) همچنان مقاومت توسعه می‌یابد و ۹ ژن شامل (ATPase، پراکسیداز دو، براسینواستروئید ۶ اکسیداز، پپتیدیل پرولیل ایزومراز، پروتئین ۴۰S ریبوزومی، پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتئاز، متیونین سولفوکسید ردوکتاز، پروتئین S-Like RNase، ADP گلوکز پیروفسفریلاز) دارای حداکثر تظاهر در دو دوره زمانی ۳-۱ روز بعد از آلودگی و ۲۴-۱۲ روز بعد ازآلودگی هستند و همچنین ژن چهاردهم یک سرین کربوکسی پپتیداز بود که در سه مرحله در رقم مقاوم Tadinia به مقدار زیاد بیان شد. این نتایج نشان داد که پاسخ مقاومت گندم به قارچ *M*

Archive of SID
www.SID.ir

graminicola. طی ۲۴ ساعت اول پس از آلودگی کامل نمی‌شود و تا ۲۴ روز پس از آلودگی به ویژه در رقم مقاوم ادامه می‌یابد. بنابراین آنالیز الگوی بیان این ژن‌ها می‌تواند روشی صحیح و سریع برای تفکیک لاین‌ها و ارقام مقاوم از حساس باشد (Adhikari et al. 2007). هدف از این تحقیق، بررسی الگوی تظاهر ژن‌های کد کننده PR-1، آنزیم کیتیناز، پراکسیداز، پروتئین-های بازدارنده پروتئاز و پروتئین‌های شبه تئوماتین به عنوان ژن-های دفاعی در گیاه گندم در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی به بیماری سپتوریوز برگی بود که به منظور تعیین اثرات آن‌ها در ایجاد مقاومت، الگوی تظاهر آن‌ها در واریته فلات به عنوان رقم حساس و واریته ونگشوبایی (Wangshuibai) به عنوان رقم مقاوم با استفاده از روش RT-PCR نیمه کمی (Semi quantitative RT-PCR) مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق از دو رقم گندم، با نام‌های فلات و ونگشوبای که به ترتیب نسبت به بیماری سپتوریوز برگی حساس و مقاوم می-باشند استفاده شد. جهت ایجاد آلودگی از ایزوله .SA852-2 قارچ *M .graminicola* استفاده شد. ابتدا ایزوله‌های قارچ روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شده و به مدت ۵ روز در دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتی‌گراد در زیر لامپ فلورسنت نگهداری شدند. سپس میسلیوم‌های رشد کرده به داخل محیط کشت مایع YGA (Yeast Glucose Agar) منتقل شدند. محیط کشت مایع روی شیکر (۳۰ دور در دقیقه) در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز گذاشته شد. بعد از این مدت که قارچ خوب رشد کرد، فلاسک‌های حاوی محیط کشت مایع بصورت کج روی پایه‌های فلزی به مدت ۵-۳ ساعت گذاشته شدند تا اسپورهای قارچ رسوب کنند. سپس فاز مایع خالی شده و اسپورهای رسوب کرده در آب مقطر حل شده و با استفاده از لام هموسایتومتر در زیر میکروسکوپ میزان غلظت قارچ‌ها تعیین شد. غلظت نهایی برای اسپورپاشی ۲×۱۰^{۶} در نظر گرفته شد. پس از آنکه سوسپانسیون قارچ به غلظت مورد نظر رسانده شد، به هر لیتر از سوسپانسیون، ۱۰ قطره توین ۲۰ اضافه شد که منجر به چسبندگی اسپورها و باقی ماندن آن‌ها روی برگ در هنگام اسپورپاشی می‌شود. اسپورپاشی بوسیله اسپری دستی انجام شد. بعد از اسپورپاشی، گیاهان به مدت ۷۲ ساعت در داخل پاکت‌های پلاستیکی جهت تامین رطوبت قرار گرفتند و روی آن‌ها با پلاستیک سیاه پوشیده شد. بعد از ۷۲ ساعت گیاهان از پلاستیک خارج شده و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۶-۲۲°C و رطوبت نسبی ۹۵-۹۰ درصد و حداقل ۱۶ ساعت روشنایی در روز قرار گرفتند. از گیاهان آلوده و شاهد دو رقم حساس و مقاوم نمونه-های برگی در زمان‌های صفر، ۳، ۶، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت و ۶ روز پس از آلودگی و هر کدام در سه تکرار گرفته شد و بعد از قرار گرفتن درون فویل سریعا بوسیله ازت مایع منجمد شد و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای استخراج RNA انتقال یافت. به منظور استخراج RNA، حدود ۱۰۰ میلی‌گرم از نمونه گیاهی منجمد شده به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی به خوبی سائیده شده و به تیوپ دو میلی‌لیتری انتقال یافت. استخراج RNA با استفاده از کیت RNeasy® Mini Kit از شرکت QIAGEN (#74903) انجام شد. تعیین کمیت RNA استخراج شده با استفاده از روش اسپکتروفتومتری انجام شد و به منظور تعیین کیفیت نمونه‌ها از روش الکتروفورز ژل آگارز ۱/۳ درصد در بافر MOPS 1x استفاده شد. نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ در شکل ۱ آورده شده است. تفکیک باندهای ۱۸s و ۲۸s نشان دهنده کیفیت خوب RNA می‌باشد.



شکل ۱- نمونه‌ای از الکتروفورز RNA استخراج شده از برگ بر روی ژل آگارز ۱/۳ درصد

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱- لیست آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

ردیف	نام ژن	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	محصول	منبع
۱	*PR-1*	CATGCGATTAGGGACGAAAGA	CCGCGGGAATATCATTGG	۱۲۰	Adhikari et al. 2007
۲	*Chitinase2*	CGATGCCGAAGATGTCACAA	CCCGGGTATGGTGTCATCAC	۱۲۱	Adhikari et al. 2007
۳	*TLP (X58394.1)*	GCCGCAAGCCTACCAACA	CGCGGTGCGACGTATAGAG	۱۰۷	Ray et al. 2003
۴	*Peroxidase*	CCAGCACGACACGTGAATG	CATGATTTGCTGCTGCTCGTA	۱۰۱	Adhikari et al. 2007
۵	*PIS*	GGGCCCTGCAAGAAGTACTG	ACACGCATAGGCACGATGAC	۱۰۶	Adhikari et al. 2007
۶	*Actin*	GCCGTGCTTTCCCTCTATG	GCTTCTCCTTGATGTCCCTTA	۲۳۵	Ji et al. 2011

سنتز رشته اول cDNA با استفاده از کیت Viva 2-steps RT-PCR (#RTPL12)Kit with M-MuLV RT/Taq DNA Polymerase ساخت شرکت Vivantis و برطبق دستورالعمل آن شرکت انجام شد. برای این منظور یک میکروگرم RNA استخراج شده مورد استفاده قرار گرفت. از واکنش RT-PCR نیمه‌کمی به منظور آنالیز الگوی بیان ۵ ژن مرتبط با دفاع در دوره ۶ روزه پس از آلودگی استفاده شد. به منظور انجام واکنشRT-PCR، از یک میکرولیتر cDNA سنتز شده و آغازگرهای اختصاصی مربوط به ژن‌های مورد بررسی و ژن کنترل داخلی اکتین (جدول۱) استفاده شد. لازم به ذکر است این آغازگرها با توجه به منابع مورد بررسی انتخاب شدند. واکنش PCR در حجم نهایی 20 µl حاوی بافر PCR (1x)، 200µM dNTP، یک واحد Taq پلی‌مراز و 0.4 µM از هر کدام ازآغازگرها، انجام گرفت. شرایط دمایی برای تکثیر PCR، ۳ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال مربوط به هر جفت آغازگر، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و سپس نگه‌داری در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بود.

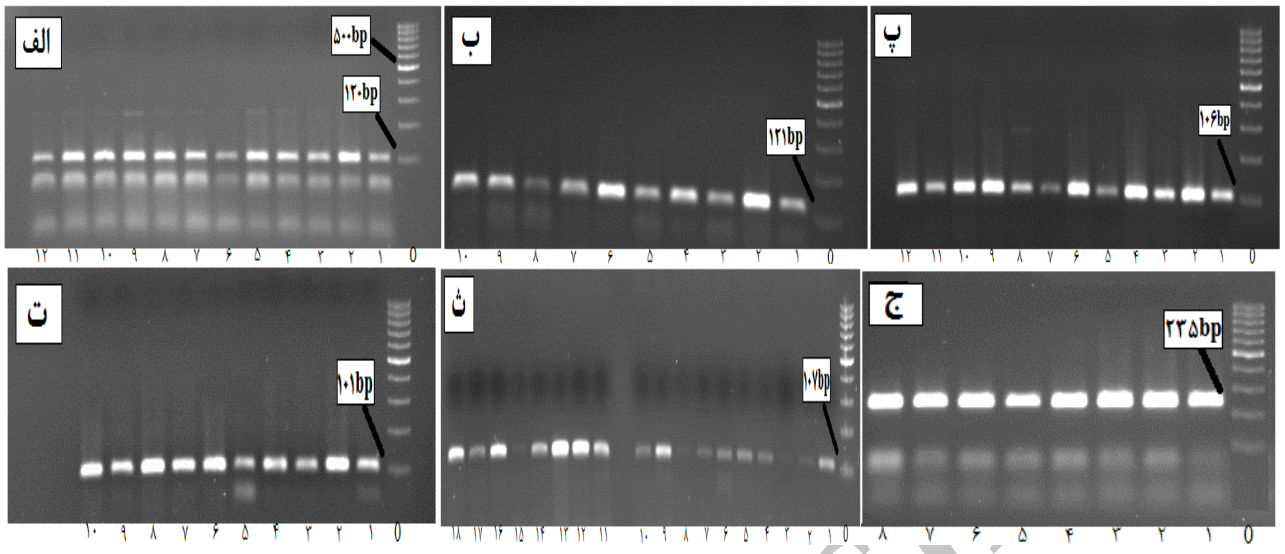
پس از اتمام واکنش PCR، فراورده PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵درصد با بافرTBE ۰/۵x الکتروفورز شد. و نهایتا از ژل زیر نور UV با استفاده از دستگاه UV-transiluminator عکس گرفته شد. نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده RT-PCR ۵ ژن مورد بررسی در شکل ۲ آورده شده است، تفاوت بین ضخامت باندها در شکل به خوبی مشاهده می‌شود. سپس با استفاده از نرم افزار Image J (ImageJ software; Rasband 2011)، میزان بیان هر ژن کمی شد و هر نمونه با توجه به اکتین خود نسبی شد و سپس میزان عددی بدست آمده برای هر دو حالت کنترل و تنش ارقام نسبت کنترل رقم حساس نسبی شدند و میانگین بیان هر ژن با استفاده از سه تکرار بیولوژیک محاسبه شد. آزمون t-test دو طرفه به منظور بررسی اختلاف‌های معنی‌دار بین تیمارها استفاده شد.

به منظور تایید ژن‌های مورد بررسی، قطعه تکثیر شده بوسیله هر جفت آغازگر در رقم فلات و ونگشوبایی، داخل باکتری E.coli کلون شد و پس از تعیین توالی، این قطعه در سایت NCBI بلاست شد. به این منظور ابتدا فراورده PCR توسط کیت PCR Clean-up kit ساخت شرکت Vivantis (#GF-PC-050) خالص-سازی شد و سپس با استفاده از کیت CloneJET PCR Cloning kit (#k1231) ساخت شرکت فرمنتاز قطعه مورد نظر به داخل وکتور pJET1.2 کلون شد. سپس وکتور درون باکتری E.coli سویه DH5α انتقال داده شد و پس از انتخاب کلونی‌های تراریخت، پلاسمیدها با استفاده از کیت استخراج پلازمید ساخت شرکت Vivantis (#GF-PL-050) انجام شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق، الگوی بیان ژن‌های کد کننده پروتئین‌های PR-1، آنزیم کیتیناز، پراکسیداز، پروتئین‌های بازدارنده آنزیم پروتئاز و پروتئین‌های شبه تئوماتین، در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی در دو رقم حساس فلات و مقاوم ونگشوبایی مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز نتایج RT-PCR نیمه-کمی تایید نمود که بیان همه ژن‌های مورد بررسی در هر دو رقم حساس و مقاوم در اثر بیماری سپتوریوز برگی بطور قابل توجه و معنی‌داری افزایش یافته است. بررسی روند تغییرات بیان این ژن-ها در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی نشان می‌دهد که سطح

Archive of SID
www.SID.ir



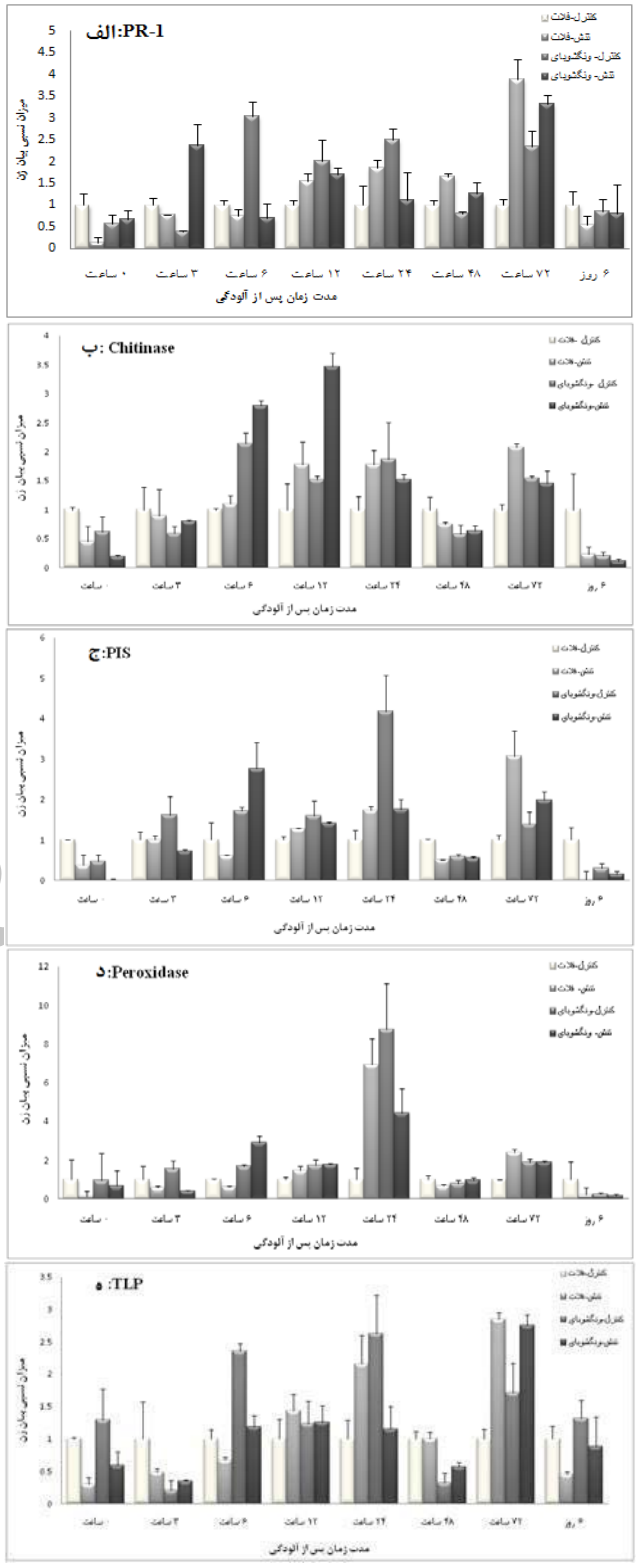
شکل ۲- نمونه‌ای از الکتروفورز فراورده RT-PCR ۵ ژن مورد بررسی و ژن کنترل داخلی اکتین الف) ژن *PR-1*؛ ب) ژن کیتیناز؛ پ) ژن *PIS*؛ ت) ژن پراکسیداز؛ ث) ژن *TLP* و ج) ژن اکتین- در تمامی عکس‌ها چاهک صفر سایز مارکر است و شماره‌های فرد مربوط به نمونه‌های کنترل و شماره‌های زوج مربوط به نمونه‌های تحت تنش با بیماری می‌باشد.

تظاهر هر ۵ ژن مورد بررسی در زمان‌های مختلف پس از آلودگی و در هر دو رقم فلات و ونگشوبای متفاوت است. نمودار روند تغییر بیان این ژن‌ها در دو رقم در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از بررسی الگوی بیان ژن‌های مورد مطالعه با کلون‌سازی قطعات تکثیر شده بوسیله هر جفت آغازگر داخل باکتری اکلایی و بررسی نتایج بلاست نوکلئوتیدی این قطعات در بانک ژن، هویت ژن مربوطه مورد تایید قرارگرفت. توالی‌های مربوط به هر ژن و میزان شباهت توالی مربوط به دو رقم فلات و ونگشوبایی در جدول ۲ آورده شده است.

با استفاده از بانک اطلاعاتی ExPASy و بررسی دمین‌ها، پپتیدهای راهبر و مناطق فعال پروتئین این ژن‌ها، در رابطه با هر پنج ژن، توالی کلون شده خارج از مناطق ذکر شده قرار دارد و در ناحیه زنجیره‌ی اصلی ژن می‌باشد. لذا جهت کلون‌سازی مناطق فعال و دمین‌های این ژن‌ها باید آغازگرهای جدید طراحی شد. همچنین با مطالعه ساختمان پروتئین این ژن‌ها، دمین ویا سایت فعال مشترکی یافت نشد. از این رو جهت بررسی وجود فاکتور رونویسی مشترک برای این ژن‌ها، راه‌اندازها در سایت Plant Pan مورد مطالعه قرار گرفتند. نتیجه این بررسی بیست فاکتور رونویسی مشترک بود که در میان آن‌ها فاکتور W-box دیده شد. چگونگی فعالیت این فاکتور رونویسی که در ناحیه راه‌انداز ژن *NPR1* قرار دارد در گیاه آرابیدوپسیس مورد مطالعه قرار گرفته است (Yu et al. 2001). فعالیت این ژن با القای بیماری افزایش می‌یابد وگیاهان تراریخته که تظاهر این ژن در آن‌ها تشدید شده است در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا مقاومت نشان می‌دهند.

بررسی الگوی بیان ژن *PR-1* (شکل۳- الف) نشان می‌دهد که بیان این ژن در رقم فلات در ۱۲ ساعت پس از آلودگی القاء شده و به تدریج افزایش یافته و در ۳ روز پس از آلودگی نسبت به حالت کنترل ۴ برابر شده و به حداکثر میزان خود رسیده است. این اختلاف در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود. در حالیکه بیان این ژن در رقم ونگشوبای خیلی سریع‌تر و در ۳ ساعت بعد از تلقیح افزایش یافته و بعد از کاهش بیان در فاصله زمانی ۳ تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی مجددا در ۳ روز پس از آلودگی افزایش یافته و به حداکثر مقدار خود رسیده است. این پروتئین

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۳- نمودار روند تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی در دوره ۶ روزه پس از آلودگی با بیماری سپتوریوز برگی error barهای رسم شده standard error را نشان می‌دهد.

ها، اولین *PR* پروتئین‌هایی می‌باشند که توسط Van Loon et al. (1970) از برگ‌های توتون آلوده شده با ویروس موزاییک توتون یافت شدند. در مطالعه‌ای که توسط Alexander et al. (1993) انجام شد مشخص شد که افزایش بیان ژن *PR-1* در توتون منجر به بالا بردن مقاومت گیاه در مقابل دو پاتوژن قارچی *Peronospora tabacina* و *Peronospora parasitica var. nicotianae* می‌شود. این پروتئین‌ها با اثر مستقیمی که بر روی پاتوژن‌ها دارند از رشد و گسترش آن‌ها در گیاه میزبان جلوگیری می‌کنند. افزایش بیان سریع این ژن در ۳ ساعت اول پس از آلودگی در رقم ونگشوبای موجب ممانعت از گسترش بیشتر پاتوژن و از بین رفتن آن در اتاقک زیر روزنه می‌شد و بدین شکل منجر به مقاومت در رقم مقاوم می‌شود (Buchel and Linthorst 1999). بررسی بلاست نوکلئوتیدی نشان داد که توالی مربوط به ژن *PR-1* در هر دو رقم با توالی‌های گزارش شده برای دو ژن *PR-1* در گندم نان (HQ848391.1) و جو (Z21494.1) به ترتیب به میزان ۸۴ درصد و ۳۸ درصد شباهت دارد.

کیتینازها گروهی دیگر از *PR* پروتئین‌ها می‌باشند که از طریق تجزیه کیتین دیواره سلولی از رشد هیف‌های قارچ جلوگیری می کنند. در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است که آنزیم کیتیناز می‌تواند با لیز کردن نوک هیف‌های قارچ از رشد آن جلوگیری کند (Punja and Zhang 1993). به طور مثال Caruso et al. (2001) چهار پروتئین (wheatwin1 تا wheatwin4) متعلق به گروه PR –4 را از دانه‌های گندم جدا کردند و نشان دادند که این پروتئین‌ها دارای فعالیت ضد قارچی علیه قارچ‌هایی از قبیل *Botrytis cinerea*، *Fusarium culmurum*، *Fusarium graminearum* می‌باشند. در این تحقیق مشخص شد که بیان ژن کیتیناز در رقم ونگشوبای در ۳ ساعت پس از آلودگی القاء شده و در ۱۲ ساعت پس از آلودگی نسبت به حالت کنترل دو برابر افزایش یافته و به حداکثر میزان بیان خود رسیده است که این افزایش بیان در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار می‌باشد. در حالیکه حداکثر میزان بیان این ژن در رقم فلات در ۷۲ ساعت پس از آلودگی است (شکل۳- ب). بنابراین افزایش سطح تظاهر ژن کیتیناز در رقم حساس با تاخیر و از نظر میزان در فاصله

Archive

www.SID.ir

جدول ۲- توالی نوکلئوتیدی مربوط به هر ژن پس از حذف توالی پلاسمید

ردیف	نمونه	توالی نوکلئوتیدی	شباهت دو رقم (درصد)
۱	ChitinaseII-F	TCCGGGTATGGTGTCATCACCAACGTCATCAACGGCGGGATCGAATGCG GCATGGGGCAGAACGACAAGGTGGCGGATCGGATCGGGTTCTACAAGCG CTATTGTGACATCTTCGGCATCG	۹۹/۲
	ChitinaseII-W	CCCGGGTATGGTGTCATCACCAACGTCATCAACGGCGGGATCGAGTGCG GCATGGGGCAGAACGACAAGGTGGCCGATCGGATCGGGTTCTACAAGCG CTATTGTGACATCTTCGGCATCG	
۲	Peroxidase-F	CCAGCACGACACGTGAATGAATAAGGCCACAGAACCAGTGGCCAATATA AATACCAGCTCTAGAAAACGTGTATTTTATGTACGAGCAGCAGCAAATCA TG	۳۲/۷
	Peroxidase-W	TATGATTTGCTGCTGCTCGTACATAAAATACACGTTTTCTAGAGCTGGTAT TTATATTGGCCACTGGTTCTGTGGCCTTATTCATTCACGTGTCGTGCTGG	
۳	PR-1-Falat	CTCGAGTTTTTCAGCAGATCCGCGGGAATATCATTGGACAGAAACCATAC TAACTGTGATGCACGTCTTCGCAGTACATACATGCATACATACATCTAGT CTTTCGTCCCTAATCGCATG	۹۷/۵
	PR-1-W	GCTCGAGTTTTCAGCAGATCCGCGGGAATATCATTGGACAGAAACCATAC TAACTGTGATGCACGCCTTCGCAGTACATACATGCATACATACATCTAGT CTTTCGTCCCTAATCGCATG	
۴	PIS-Falat	GGGCCCTGCAAGAAGTACTGATCGGCTCATGCCAGCATGATATGTTCCGC CTAAAATGAAATAAAAGCTCAGACGAGATGAGCAGCGTCATCGTGCCTA TGCGTGT	۹۲/۶
	PIS-W	GCCCTGCAAGAAGTACTGATCGGTTCATGCCGGCATATGATATGTTCCGC CTAAAATTAAATAAAAGCTCGGACGAGATGAGCAGCGTCATCGTGCCTA TGCGTGT	
۵	*TLP*-F	CGCGGTGCGACGTATAGAGGCTTCATGGACAGAAGGTGATCTGGTAGTT ATTATTGCCACTGCAGGCGTGTGTGGCGACGTCGTTGGGGTGTTGGTAGG CTTGCGGC	۳۶/۹
	TLP-W	GCCGCAAGCCTACCAACACCCCAACGACGTCGCCACACACGCCTGCAGT GGCAATAATAACTACCAGATCACCTTCCGTCCATGAAGCCTCTATACGTG GCACCGCG	

F) رقم فلات، W) رقم ونگشوبایی

زمانی ۳ تا ۷۲ ساعت پس از آلودگی پایین‌تر از رقم مقاوم است. بیان زود هنگام این ژن در رقم مقاوم باعث تجزیه سریع کیتین دیواره سلولی قارچ شده و از طریق جلوگیری از رشد پاتوژن در مزوفیل برگ و ایجاد الیگومرهای کیتین به عنوان الیسیتورهای محرک مکانیسم‌های دفاعی از قبیل بیان ژن‌های مرتبط با دفاع (Sharma et al. 2001)، می‌تواند در ایجاد مقاومت در رقم ونگشوبایی نقش موثری داشته باشد. بر اساس نتایج بلاست نوکلئوتیدی، توالی مربوط به ژن کیتیناز در هر دو رقم فلات و

Archive of SID
www.SID.ir

ونگشوبای دارای شباهت ۷۸ درصد با ژن کیتیناز II در گیاه گندم، با شماره دسترسی AB029935.1 بود.

در اثر آلودگی گندم با بیماری سپتوریوز برگی میزان بیان ژن کد کننده آنزیم بازدارنده پروتئاز در رقم مقاوم در ۶ ساعت پس از آلودگی نسبت به حالت کنترل افزایش معنی‌داری نشان داد در حالیکه در رقم حساس این افزایش بیان با تاخیر و در ۲۴ و۷۲ ساعت پس از آلودگی اتفاق افتاد (شکل۳- ج). این پروتئین‌ها کمپلکس‌های پایداری با مکان فعال پروتئازهای هدف ایجاد کرده و باعث بلوکه شدن و تغییر این مکان‌ها و در نهایت باعث جلوگیری از فعالیت این آنزیم‌ها خواهند شد و با کاهش توانایی پاتوژن در بدست آوردن مواد غذایی از طریق هضم پروتئین‌های میزبان و محدودیت در ترشح تعدادی از آمینواسیدها، در دفاع گیاه نقش دارند (Habib and Fazili 2007). بر اساس نتایج بلاست نوکلئوتیدی مشخص شد که توالی مربوط به ژن کد کننده پروتئین بازدارنده آنزیم پروتئاز هم در رقم فلات و هم در رقم ونگشوبای دارای شباهت صد درصد با توالی ژن بازدارنده آنزیم پروتئاز در گیاه جو (Bsi1) با شماره دسترسی (Z48729.1) می-باشد.

بررسی نمودار الگوی بیانی ژن پراکسیداز در طی دوره ۶ روزه پس از آلودگی (شکل۳- د) نشان می‌دهد سطح بیان این ژن در رقم ونگشوبایی در ۶ ساعت پس از آلودگی بطور معنی‌داری ($P\leq$ ۰/۰۵) افزایش یافته ولی در رقم فلات بیان این ژن در ۲۴ ساعت پس از آلودگی به حداکثر رسیده است. با توجه به القاء سریع و بیان بالای این ژن در حالت کنترل رقم مقاوم (ونگشوبایی) نسبت به رقم حساس (فلات) می‌توان چنین نتیجه گرفت که این ژن در واکنش‌های مرتبط با مقاومت دخیل می‌باشد. به طوریکه افزایش بیان این ژن در رقم مقاوم در تولید سریع گونه‌های فعال اکسیژن موثر است و باعث می‌شود مکانیسم‌های مرتبط با دفاع سریعا در رقم مقاوم فعال شده و به ایجاد مقاومت منجر شود (Kotchoni and Gachomo 2006). همچنین این ژن می‌تواند با افزایش بیان موثر خود باعث استحکام دیواره سلولی از طریق رسوب مواد مورد نیاز برای فرایند چوبی شدن و برقراری پیوندهای عرضی پلی ساکاریدها شود و در نتیجه موجب افزایش مقاومت گیاهان با ساخت یک سد دیواره سلولی خواهند شد که مانع نفوذ پاتوژن و انتشار آن‌ها می‌شد (Yoshida et al. 2003). توالی مربوط به ژن پراکسیداز در هر دو رقم فلات و ونگشوبای با ژن پراکسیداز متعلق به خانواده III در گندم نان با شماره دسترسی (EU595578.1) و ژن *POX1* متعلق به خانواده I پراکسیدازها در *Triticum monococcum* با شماره دسترسی (AY857755.1) شباهت نشان داد. میزان شباهت آن در رقم فلات به ترتیب ۹۹ و ۹۸ درصد و در رقم ونگشوبای ۹۸ و۹۷ درصد بود.

پروتئین‌های شبه تئوماتین در حدود ۱۵ تا ۳۰ کیلو دالتون وزن داشته و به دلیل شباهت توالی آمینواسیدی با پروتئین‌های شیرین مزه تئوماتین میوه گیاهان قطبی جنس *Thaumatococcus* به این نام خوانده می‌شوند (Velazhan et al. 1999). اولین مدرک مبنی بر وجود فعالیت ضد قارچی پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاهان با شناسایی زئوماتین در بذر ذرت بدست آمد (Robert and Selitrennikoff 1990). تولید پروتئین‌های شبه تئوماتین در گیاهان مختلف در پاسخ به آلودگی‌های میکروبی به میزان زیادی مورد مطالعه قرار گرفته است. به طور مثال Saaedi (1385) دو cDNA (tlp-3 و tlp-4) مربوط به پروتئین‌های شبه تئوماتین را در گیاه یونجه یکساله ردیابی نمود و بعد از جداسازی، ژن‌های این دو پروتئین را داخل باکتری *E.coli* کلون کرد و مشخص شد که پروتئین‌های تولیدی توسط این دو ژن از رشد قارچ‌های بیماریزا از قبیل *Rizoctonia solani*، *Altenaria alternate* و *Fusarium graminearum* جلوگیری می‌کند. نتایج این تحقیق نیز نشان می-دهد که بیان ژن *TLP* در اثر بیماری سپتوریوز برگی افزایش می-یابد. با توجه به (شکل۳- ه) بیان ژن کد کننده *TLP* در رقم حساس در دو زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از آلودگی بطور معنی-داری نسبت به کنترل خود افزایش یافته و در هر دو رقم در ۳ روز پس از آلودگی به حداکثر میزان خود رسیده است. اگرچه بیان ژن *TLP* در رقم مقاوم با تاخیر نسبت به رقم حساس و فقط در زمان ۳ روز پس از آلودگی افزایش می‌یابد ولی بیان آن در حالت کنترل، در همه زمان‌های پس از آلودگی بالاتر از رقم فلات است. در واقع تجمع این پروتئین‌ها در گیاه به واسطه فعالیت بتا ۱و۳ گلوکانازی که دارند باعث هضم دیواره سلولی قارچ شده و از این طریق از رشد و شاخه شاخه شدن هیف‌های قارچ درون

Archive of SID
www.SID.ir

سلول میزبان جلوگیری می‌کند (Liu et al. 2010). نتایج بلاست نوکلئوتیدی نشان داد که این توالی در هر دو رقم فلات و ونگشوبایی با دو ژن تئوماتین متعلق به گروه ۵ پروتئین‌های مرتبط با بیماریزایی در گندم و جو به ترتیب با شماره دسترسی (X58394.1) و (AY839293.1) شباهت دارد. میزان شباهت با این دو ژن به ترتیب صد درصد و ۹۹ درصد بود..

بنابراین نتایج این تحقیق نشان داد که بیان این ژن‌ها در اکثریت زمان‌ها در رقم مقاوم صرف نظر از حالت تنش بالاتر از رقم حساس می‌باشد. همچنین سطح بیان این ژن‌ها در رقم مقاوم در اثر بیماری سپتوریوز برگی نسبت به حالت کنترل سریع‌تر افزایش می‌یابد و بر این اساس تصور می‌رود نه تنها بالا بودن سطح بیان ژن‌های مرتبط با دفاع در ایجاد مقاومت تاثیر دارد بلکه زمان القاء بیان نیز از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج این تحقیق و تحقیقات مشابه می‌توان چنین نتیجه گرفت که این ژن‌ها می‌توانند در کنار ژن‌های اصلی ایجاد کننده مقاومت (STB)، باعث تشدید، حفظ و بهبود مقاومت در گندم در مقابله با بیماری‌ها از جمله بیماری سپتوریوز برگی شوند.

تشکر و قدردانی

از تمامی پرسنل آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد و پژوهشکده بیوتکنولوژی کرج کمال تشکر را دارم.

منابع

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Anderson JM, Goodwin SB (2004) Quantification of *Mycosphaerella graminicola* in wheat by real-time PCR. Phytopathology 94: S2.

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

Alexander D, Goodman RM, Gutrella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L (1993) Increased tolerance to 2 oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis related protein1-a. Proceeding National Academy of Sciences USA 90: 7327-7333.

Buchel AS, Linthorst HJM (1999) PR-1: A group of plant protein induced upon pathogen infection. In: Datta S K and Subbaratnam. Pathogenasis-related protein in plants, CRC Press 33-39.

Caruso C, Nobile M, Leonardi L, Bertini L, Buonocore V, Caporal C (2001) Isolation and Amino acid sequence of two new PR-4 protein from wheat. Protein Chemistry 20: 327-335.

Cohen L, Eyal Z (1993) The histology of processes associated with the infection of resistant and susceptible wheat cultivars with *Septoria tritici*. Plant Pathology 42: 737-743.

Duncan KE, Howard RJ (2000) Cytological analysis of wheat infection by the leaf blotch pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Mycology Research 104: 1074-1082.

Habib H, Fazili KM (2007) Plant protease inhibitor: a defense strategy in plant. Biotechnology and Molecular Biology 2: 68-85.

Ji X, Dong B, Shiran B, Talbot MJ, Edlington J E, White R G, Gubler F and Dolferus R (2011) Control of abscisic acid catabolism and abscisic acid homoeostasis is important for reproductive stage stress tolerance in cereals. Plant Physiology 156: 617-662.

Kia Sh, Torabi M (1387) Effect of infection with Septoria tritici leaf Blotch (Septoria tritici Rob. ex Desm) at different growth stages on yield and yield components of wheat cultivars in Gorgan. Young tree and seed magazine 24: 237-250 (In Farsi).

Kotchoni SO, Gachomo EV (2006) The reactive oxygen species network pathway: an essential prerequisite for perception of pathogen attack and acquired disease resistance in plant. Journal Bioscience 31: 389-404.

Liu JJ, Sturrock R, Ekramoddoullah AKM (2010) The super family of thaumatin-like protein its origin, evolution and expression toward biological function. Plant Cell Report, 29: 419-436.

Patterson FL, Shaner GE, Huber DM, Ohm HW, Finney R E, Galun RL, Robert JJ (1979) Registration of Sullivan wheat. Crop Science 19: 279-284.

Punja ZK, Zhang YY (1993) Plant chitinases and their roles in resistance to fungal disease. Journal of Nematology 25: 526-540.

Raman R, Milgate AW, Imtiaz M, Tan MK, Raman H, Lisle C, Coombes N, Martin P (2009) Molecular mapping and physical location of major gene conferring seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat. Molecular Breeding 24:153-164.

Rasband WS (2011) Image J institutes of helth. Bethesda, Maryland, USA, htpp://image.nih.gov/ij/.

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfid isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. Plant Molecular Biology 53: 741-745.

Robert WK, Selitrennikoff CP (1990) Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. Genetic Microbiology 136: 1771-1778.

Saaedi K (1385) Isolation, Abundant expression and evalution of physiological characteristics of thaumatin-like

Archive of SID
www.SID.ir

Velazhan R, Datta RK, Muthukrishnan S (1999) The PR-5 family:thaumatin-Like protein. In: Datta S K and subbaratnam. Pathogenesis-related proteins in plant, CRC Press 119-123 and 125-130.
Yoshida K, Kaothien P, Matusi T, Kawaoka A (2003) Molecular biology and application of peroxidase gene. Applied Microbial Biotechnology 60: 665-670.
Yu D, Chen C, Chen Z (2001) Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. Plant Cell 13: 1527-1540.

protein in annual medicago. Dissertation, Isfahan University of Technology, Iran (In Farsi).
Sharma N, Sharma KP, Gaur PK, Gupta VK (2011) Role of chitinase in plant defense. Asian Journal of Biochemistry 6: 29-37.
Van Loon LC, Van Kammen A (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf protein from *Nicotiana tabaccum* var " Samsun" and " samsun NN" II changes in protein constitution after infection with TMV. Virology 67: 566-575.

Archive of SID

www.SID.ir