

آنالیز بیان تعدادی از ژن‌های دفاعی در ژنوتیپ حساس و متحمل ذرت در پاسخ به آلودگی ویروس موزاییک کوتولگی ذرت

فروه سادات مصطفوی نیشابوری^۱ - سید کاظم صباغ^{۲*} - احد یامچی^۳ - سعید نصراله‌نژاد^۴ - ناصر پنجه‌که^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۹

چکیده

ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) یکی از بیماری‌های رایج و محدودکننده رشد در ذرت بشمار می‌رود. در این پژوهش به منظور بررسی نقش مقاومت ژنتیکی در القاء مقاومت دو ژنوتیپ حساس (SC705) و هیبرید متحمل (شماره ۸) به MDMV، بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با مقاومت شامل *Germin like protein (GLP)*، *GF14-6*، *Peroxiredoxin (Prx)* و *S-adenosylmethionine synthase (SAMS)* با استفاده از روش سنجش کمی در زمان واقعی مورد بررسی قرار گرفت. مایه‌زنی گیاهان با ویروس به روش مکانیکی و در سه تکرار انجام شد. نمونه‌برداری در پنج بازه زمانی انجام شد. آنالیز بیان ژن‌ها نشان داد که بیان همه ژن‌های مورد بررسی در گیاه ذرت متحمل نسبت به حساس افزایش قابل ملاحظه‌ای داشته است. اما بیشترین بیان در مورد دو ژن *GLP* و *Peroxiredoxin* در بازه زمانی یک ساعت بعد از مایه‌زنی مشاهده گردید و برای ژن‌های *SAMS* و *GF14-6* بیشترین میزان بیان ژن در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی ثبت شد. کمترین میزان بیان برای ژن‌های بررسی شده ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی ویروس مشاهده گردید. با توجه به نتایج به دست آمده و الگوی متفاوت بیان ژن‌های مورد بررسی در گیاهان حساس و متحمل می‌توان از این ژن‌ها به عنوان بیومارکرهای مولکولی در جهت انتخاب ارقام مقاوم به بیماری استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: سنجش کمی در زمان واقعی، مقاومت ژنتیکی، ویروس موزاییک کوتولگی ذرت

مقدمه

است که منجر به کاهش قابل توجهی از میزان تولید این محصول و خسارت‌های اقتصادی شده است. بیش از ۴۰ ویروس در ذرت ایجاد بیماری می‌کنند که یکی از آنها ویروس موزاییک کوتولگی ذرت (*Maize dwarf mosaic virus*, MDMV) است (۱۲). MDMV دارای یک قطعه RNA تک لای مثبت و متعلق به خانواده پوتی ویریده و جنس پوتی‌ویروس می‌باشد (۳۴). ویروس موزاییک کوتولگی ذرت سابقاً نژادی از ویروس موزاییک نیشکر (*Sugarcane mosaic virus*, SCMV) محسوب می‌شد اما در سال ۱۹۸۹ به صورت یک عضو مستقل از پوتی‌ویروس‌ها گزارش شد (۳۰). این ویروس یکی از بیماری‌های مهم و مخرب ذرت با پراکنش نسبتاً وسیع است که در اکثر کشورهایی که ذرت و سورگوم کشت می‌شود وجود دارد و باعث ایجاد علائم موزاییک، کلروتیک یا حالت ابلقی روی بافت‌های سبز (به‌طور مشخص در برگ‌های جوان) شده و در حالت شدید باعث ایجاد کوتولگی، ایجاد شاخه‌های متعدد و کاهش قدرت بذر می‌شود (۶ و ۱۶). آلودگی به این بیماری ویروسی منجر به کاهش ۱۰-۴۵ درصدی محصول می‌شود اما خسارت ممکن است به ۱۰۰ درصد هم برسد (۳۲). حدود دو سوم ارقام در حال کشت ذرت در

بیش از ۳/۴ درصد انرژی و ۱/۲ درصد پروتئین مورد نیاز بشر از غلات بدست می‌آید (۳). ذرت (*Zea mays*) از خانواده Poaceae و سومین غله جهان می‌باشد. به علت اهمیت غذایی این محصول برای انسان و دام و همچنین قدرت تطابق زیستی آن با شرایط اقلیمی گوناگون، این محصول جزو عمده‌ترین محصولات مناطق معتدله، معتدله گرم، نیمه گرمسیر و مرطوب محسوب شده است (۱۵). کشت بی‌رویه این محصول منجر به تطابق میزبانی گسترده‌ای بین ویروس‌های بیمارگر گیاهی و طغیان بیماری‌های ویروسی گردیده

۱- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه زابل

۲- دانشیار گروه زیست‌شناسی، پردیس علوم دانشگاه یزد

(*) نویسنده مسئول: Email: sksabbagh@yazd.ac.ir

۳- استادیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

DOI: 10.22067/jpp.v32i4.66848

(KLM75010/4-4-1-2-1-1-1 × MO17) به عنوان ژنوتیپ متحمل به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت جهت انجام این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند. بذور فوق از مؤسسه تحقیقات نهال و بذر کرج و مرکز تحقیقات کشاورزی گرگان تهیه شدند. بذور ذرت با استفاده از کلرامین T (۳٪) به مدت یک و نیم دقیقه ضد عفونی سطحی شده و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو و در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک شامل خاک مزرعه و ماسه شسته شده به نسبت ۱:۱ (دو دفعه به مدت یک ساعت سترون شده) کشت داده شدند. گیاهان در گلخانه تحت شرایط کنترل شده دمای ۲۵ درجه و رطوبت ۶۰ درصد کشت شدند و هر هفته به منظور جلوگیری از ورود حشرات سمپاشی صورت گرفت.

طی بازدید از مزارع ذرت استان گلستان نمونه برداری از گیاهان ذرت با علائم موزاییک و کوتولگی انجام شد و جهت اطمینان از آلوده بودن نمونه‌های جمع‌آوری شده به MDMV و عدم وجود آلودگی با ویروس موزاییک ایرانی قیاق *Iranian Johnson grass mosaic virus* (IJMV) که معمولاً همراه با MDMV روی گیاه است از آزمون الایزای غیرمستقیم با آنتی بادی اختصاصی MDMV و IJMV تهیه شده از مرکز ویروس‌شناسی دانشگاه شیراز استفاده شد (۸). از گیاهانی که در واکنش الایزا نتیجه مثبت نشان دادند و به MDMV آلوده بودند جهت مایه‌زنی به ذرت‌های کشت شده استفاده شد. پس از گذشت ۱۴ روز گیاهان در مرحله سه برگگی با عصاره گیاهان آلوده به MDMV که در ۵ حجم بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار (pH ۷) در هاون سترون عصاره‌گیری شده بودند مایه‌زنی شدند، قبل از مایه‌زنی جهت ایجاد خراش در گیاه برای نفوذ ویروس از پودر کاربوراندوم استفاده شد. گیاهان شاهد به روش آلوده‌سازی ویروسی تنها با بافر فسفات مایه‌زنی شدند. با توجه به لزوم درک واکنش‌های سریع اولیه در دو ژنوتیپ ذرت در پاسخ به آلودگی ویروسی در چهار بازه زمانی (زمان‌های صفر، یک، ۹، ۲۴ و ۷۲ ساعت) بعد از آلوده‌سازی نمونه برداری جهت آنالیز بیان ژن‌های مسئول مقاومت به تنش زیستی برای گیاهان شاهد، حساس و متحمل صورت گرفت. گیاهان جمع‌آوری شده بلافاصله در نیتروژن مایع قرار گرفته و به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

برای ارزیابی بیان ژن‌ها، استخراج RNA کل با استفاده از کیت Biozol P- (Bio Flux) طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. پس از تیمار با *DNaseI* (Fermentas) جهت حذف DNA ژنومی، کمیت و کیفیت RNA استخراج شده با دستگاه طیف‌سنجی و الکتروفورز در ژل آگارز تعیین گردید. به منظور ساخت cDNA میزان یک میکروگرم از هر نمونه RNA در واکنش نسخه‌برداری معکوس به همراه آغازگر

دنیا به MDMV حساس هستند و حتی گیاهچه‌های بسیار جوان ارقام مقاوم در مرحله دو تا سه برگگی می‌توانند مورد حمله ویروس قرار گرفته و علائم بیماری را نشان دهند (۳۷). در شرایط تنش زنده، میزان بیان ژن‌های گیاهی مرتبط با ایجاد مقاومت تغییر می‌کند و موجب فعال شدن پاسخ‌های دفاعی گیاه می‌شود. (۱۷). در طی تکثیر ویروس، اندامک‌های مختلف گیاهی آلوده می‌شوند و کاهش عملکرد طی آلودگی مشاهده می‌شود (۳۶). جزئیات مولکولی کاملی از پاسخ ذرت به این ویروس در دسترس نمی‌باشد، با این حال بررسی‌های صورت گرفته نشان می‌دهد که خاموشی ژن، تولید و تغییرات بیان برخی ژن‌ها مثل *S-adenosylmethionine synthase (SAMS)*، *Germin like protein (GLP)*، *Peroxiredoxin (Prx)*، *G-box factor 14-6 (GF14-6)* و ژن‌های دیگر، پاسخ‌های مشخص وارپته‌های ذرت در مقابل این ویروس هستند (۴، ۵ و ۳۵). در مطالعات ریز آرایه‌ای ذرت آلوده به ویروس موزاییک نیشکر و موزاییک کوتولگی ذرت، ۶۸ ژن در زمان‌های مختلف شناسایی شدند که اختلاف بیان معنی‌داری با گیاه سالم به عنوان گیاه شاهد داشتند که در این میان رونوشت ژن‌های *S-adenosylmethionine synthase (SAMS)*، *Germin like protein*، *G-box factor 14-6 (GF14-6)* در گیاه آلوده افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان دادند (۳۵). آنالیز پروتئومیکس دو ژنوتیپ حساس و مقاوم ذرت به ویروس موزاییک نیشکر حاکی از بیان ۹۶ پروتئین مختلف بود که پروتئین‌های *Peroxiredoxin* و *Superoxide dismutase* مهم‌ترین پروتئین‌های مرتبط با سیگنال‌های تنش و بیماری‌زایی معرفی شدند، همچنین آنالیز لکه‌گذاری به روش وسترن بلات نشان داد که پروتئین پروکسی‌ردوکسین در ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به شاهد در حضور عامل ویروسی داشت (۳۸). تفاوت اصلی گیاهان حساس، مقاوم و متحمل، شناسایی به موقع بیمارگر و فعال‌سازی سریع و مؤثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است. تمام این مسیرها وابسته به رابطه ژن‌های مرتبط با مقاومت در گیاهان است که در پاسخ به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شود و در نتیجه بیان آن‌ها افزایش یا کاهش می‌یابد (۱۶). بنابراین تجزیه الگوی بیان ژن‌ها می‌تواند در تفکیک ارقام مقاوم، متحمل و حساس از یکدیگر مناسب باشد (۲). به منظور مطالعه نقش تعدادی از ژن‌های دفاعی ذرت به بیماری ویروسی موزاییک کوتولگی ذرت در زمان‌های مختلف بعد از آلودگی به ویروس در رقم حساس و هیبرید متحمل، الگوی بیان آن‌ها با استفاده از روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی، آلوده‌سازی ویروسی و نمونه‌برداری

بذور SC705 به عنوان ژنوتیپ حساس و هیبرید ۸

طراحی آغازگرها

آغازگرهای مورد استفاده در ارزیابی الگوی بیان ژن‌های *Germin like protein*، *S-adenosylmethionine synthase*، *Peroxiredoxin* و *GF14-6* بر اساس اطلاعات موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI و Uniprot طراحی شدند. این طراحی با استفاده از نرم‌افزارهای AlleID7.0 و Oligo7 انجام شد. در بین آغازگرهای طراحی شده به وسیله نرم‌افزار، آغازگرهای دارای پایین‌ترین میزان درصد بازهای آلی سیتوزین و گوانین انتخاب و جهت سنتز به شرکت سازنده سفارش داده شد (پیشگام، ایران). از ژن Actin که دارای بیان یکسانی در تمام مراحل نمونه‌برداری است به‌عنوان ژن مرجع استفاده شد (۳۵). توالی و مشخصات آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

18 (dT) Oligo، آب تیمار شده با DEPC، بافر آنزیم، مخلوط نوکلئوتیدها، آنزیم بازدارنده ریپونوکلئاز و آنزیم رونوشت‌بردار معکوس (*M-MuLV Reverse Transcriptase* (Fermentas) به روش پیشنهادی شرکت فرمنتاز استفاده شد. به‌منظور تایید cDNA های سنتز شده، تکثیر قطعات با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی مرز و جفت آغازگر ژن *Actin* انجام شد. ارزیابی محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد در بافر TBE صورت گرفت. رنگ آمیزی ژل با استفاده از ماده $6\times$ FluoroDye (SMOBIO) DNA Loading Dye انجام شد.

جدول ۱- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای واکنش سنجش کمی در زمان واقعی

Table 1- Characteristics of primers used for quantitative real time PCR

Primer name نام آغازگر	Sequence (5'-3') توالی	Annealing temperature دمای اتصال	Product length (bp) طول محصول (جفت باز)	Accession number رس شمار	Reference منبع
Peroxiredoxin-F	CGGCAAGAAGGTCATCC	59°C	126	NP001149765	38
Peroxiredoxin-R	AGCAGGATCTCGTCTACA				
GLP-F	CGAGATCATCTTCGTCCT	59°C	134	AF032974	35
GLP-R	GTTCTGCTGGAAGTGGA				
GF14-6-F	GGAGCTGAGAGAAAGGA	59°C	109	P49106	22
GF14-6-R	CCAGTCCAAGCCTAATAG				
SAM-F	GCTGACCACTGCAAGG	59°C	166	BT054969	35,22
SAM-R	GGCTGAGGGGCATCA				
Actin-F	AAGAGAGGCATCCTGACA	59°C	127	J01238	35
Actin-R	CAGGGTGATCTTCAGGC				

کدام به مدت ۱۰ ثانیه تنظیم گردید. هر آزمایش در سه تکرار بیولوژیکی و سه تکرار تکنیکی انجام شد. ارزیابی میزان بیان نسبی ژن‌ها بر اساس رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ نسبت به گیاهان کنترل در همان مرحله انجام شد (۲۷). تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار GenEx 6 و رسم نمودارها با اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

در گیاهان ذرت حساس و متحمل به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت ایجاد علائم موزاییک شدید در رقم حساس بعد از ۱۶ روز و موزاییک خفیف در هیبرید متحمل بعد از ۱۹ روز مشاهده شد (شکل ۱).

آنالیز بیان ژن با روش سنجش کمی در زمان واقعی

بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در ژنوتیپ‌های ذرت حساس و متحمل به بیماری ویروسی موزاییک کوتولگی ذرت با استفاده از روش کمی‌سنجی توسط دستگاه iCycler (iQ5, BioRad, USA) انجام شد. محلول واکنش شامل سه میکرولیتر cDNA (با رقت ۱:۲۰)، نیم میکرولیتر از هر آغازگر (۱۰ میکرومولار)، ۱۰ میکرولیتر 2X Real Time PCR Master Mix سایبرگرین، نیم میکرولیتر DMSO، آنزیم *Taq DNA Polymerase* (۵ u/μl) بوده و با استفاده از آب مقطر دوبار تقطیر عاری از RNase به حجم ۲۰ میکرولیتر تنظیم و برای انجام واکنش مورد استفاده قرار گرفت. چرخه‌های حرارتی واکنش شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و به دنبال آن ۴۰ چرخه ۹۴، ۵۹ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد هر



شکل ۱- گیاه شاهد بدون علائم (A)، علائم موزاییک خفیف در هیبرید متحمل ۸ (۱۹ روز بعد از آلودگی ویروسی) (B) و علائم موزاییک شدید در رقم حساس SC705 (۱۶ روز بعد از آلودگی ویروسی) (C)

Figure 1- Control plant without symptoms (A), mild mosaic symptoms in tolerant hybrid 8 (19 days after viral infection) (B) and severe mosaic symptoms in susceptible SC705 variety (16 days after viral infection) (C)

Peroxiredoxin در هر دو گیاه حساس و متحمل آلوده به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت افزایش یافت. در گیاه متحمل در اولین ساعت پس از آلوده‌سازی افزایش بیان این ژن قابل توجه بود. بالاترین میزان بیان ژن یک ساعت بعد از آلوده‌سازی ثبت گردید و اگر چه در هیبرید متحمل در تمام بازه‌های زمانی افزایش قابل توجهی از بیان ژن نسبت به رقم حساس دیده شد ولی در گیاه متحمل بیان ژن با گذشت زمان روند کاهشی از خود نشان داد. در مقابل در گیاه حساس بیان ژن در ساعات اولیه (یک ساعت) و ۹ ساعت پس از آلودگی تقریباً به یک میزان افزایش نشان داد و مانند ژنوتیپ متحمل این میزان در ۲۴ و ۷۲ ساعت با درجات مختلف روند نزولی داشت (شکل ۳).

Peroxiredoxin (Prx) آنتی‌اکسیدان‌های مبتنی بر تیول هستند که آنزیم‌ها، چربی‌ها و DNA را از گونه‌های فعال اکسیژن محافظت می‌کنند و به عنوان پروتئین‌های مهم مرتبط با سیگنال‌های تنش و بیماری‌زایی معرفی شده‌اند (۱۸). این آنزیم کنترل و آغاز سیگنال‌دهی سلولی مؤثر بر فتوسنتز، بیان ژن‌های هسته‌ای وابسته به کلروپلاست و میتوکندری و فعال‌سازی آنزیم‌های چرخه کلونین را بر عهده دارد (۱۰). انفجار اکسیداتیو پاسخ اولیه به حمله بیمارگر است که منجر به تشکیل گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شامل H_2O_2 می‌شود (۳۳). دفاع آنتی‌اکسیدانی، سم زدایی ROS و القای علامت

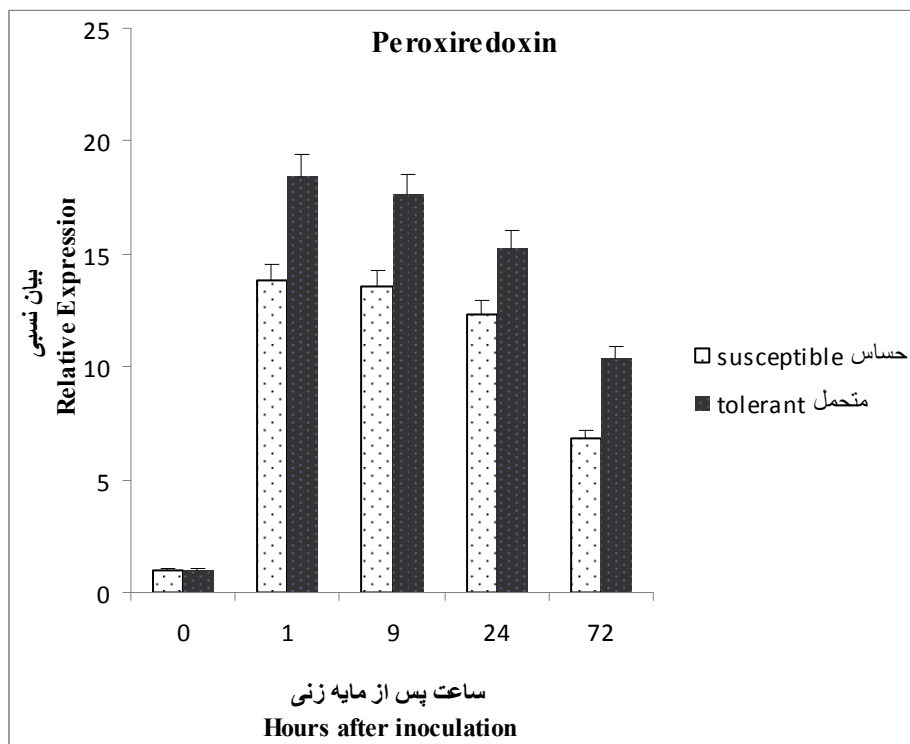
نتایج حاصل از استخراج RNA و سنتز مولکول‌های cDNA استفاده از آغازگرهای طراحی شده نشان داد که مولکول‌های حاصل، کمیت و کیفیت لازم برای انجام مراحل بعدی و استفاده در آنالیز بیان ژن را دارا می‌باشند. مشاهده باندهای مربوط به مولکول‌های RNA استخراج شده نشان داد که استخراج به خوبی صورت گرفته است و می‌توان از آنها برای سنتز رشته اول و همچنین مولکول‌های cDNA استفاده نمود. سپس با استفاده از آغازگرهای طراحی شده علاوه بر تأیید مولکول‌های cDNA، اختصاصی بودن و کارایی آغازگرها نیز مورد ارزیابی قرار گرفت و پس از بررسی توانایی در تکثیر قطعه مورد نظر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، از آنها در آنالیز بیان ژن‌ها استفاده گردید.

نتایج حاصل از بررسی منحنی ذوب آغازگرهای مربوط به ژن‌های مورد استفاده نشان داد که در هیچ یک از نمونه‌های تکثیر شده آلودگی مربوط به توالی‌های ناخواسته DNA گیاهی و یا جفت شدگی آغازگرها وجود ندارد. دمای ذوب برای آغازگرها متفاوت بود و از طیف دمایی ۸۰ - ۹۱ درجه سانتی‌گراد تعیین شد. دمای ذوب برای ژن پراکسی‌ردوکسین ۸۵ درجه سانتی‌گراد و برای سه ژن دیگر در محدوده ۹۱ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد که نشان از اختصاصی عمل کردن این آغازگرها می‌باشد.

نتایج حاصل از بررسی بیان ژن نشان داد که بیان ژن

داشته است ولی میزان افزایش تعداد رونوشت‌ها در ژنوتیپ مقاوم به مراتب بیشتر از حساس بود که مطابق با یافته‌های این مطالعه است (۳۸). این نتایج حاکی از نیاز سیستم دفاعی گیاه به سطح بالایی از پروکسی‌ردوکسین برای محافظت از سلول‌ها در مقابل تنش است و یکی از عوامل حساسیت به تنش، کاهش میزان پروکسی‌ردوکسین در سلول‌های گیاهی است (۱۱).

در حین تنش اکسیداتیو و دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله فعالیت‌های اثبات شده برای پروکسی‌ردوکسین در گیاهان می‌باشد (۳۳). این آنزیم علاوه بر سم‌زدایی H_2O_2 در خنثی کردن پروکسید نیتروژن فعال نیز نقش دارد (۱۱). آنالیز پروتئومیکس گیاهان ذرت حساس و مقاوم به ویروس موزاییک نیشکر نشان داد که بیان پروتئین پروکسی‌ردوکسین در هر دو ژنوتیپ افزایش قابل توجهی



شکل ۳- تغییرات بیان ژن *Peroxioredoxin* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به ویروس موزاییک کوتوله ذرت در زمان‌های مختلف
 Figure 3- Changes of gene expression of *Peroxioredoxin* in maize seedlings infected by *maize dwarf mosaic virus* in a time courses assay

پاتوژن‌ها را در برمی‌گیرند (۳۵). پروتئین‌های شبه جرمین (GLPs) در گونه‌های متعددی از گیاهان به وسیله خانواده‌های چندژنی کد می‌شوند، بر اساس مطالعات تنظیم بیان ژن و دیدگاه‌های ترنس‌ژنیک پیشنهاد شده است که تعدادی از GLPها در دفاع گیاه علیه بیمارگرها نقش دارند (۳۵). برخی از اعضای خانواده GLPها فعالیت شبه اکزالات اکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز (تولید H_2O_2) نشان می‌دهند که حاکی از نقش این دسته از پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت در برابر حمله پاتوژن‌ها است (۲۶).

تحقیقات نشان داده که افزایش بیان گروه مشخصی از GLPها در گیاه جو منجر به افزایش مقاومت گیاه به بیماری سفیدک پودری (۳۹) و در برنج آلوده به بیماری‌های بلاست و شیت بلایت برنج افزایش بیان پروتئین شبه جرمین خصوصاً زیرخانواده GER4 باعث

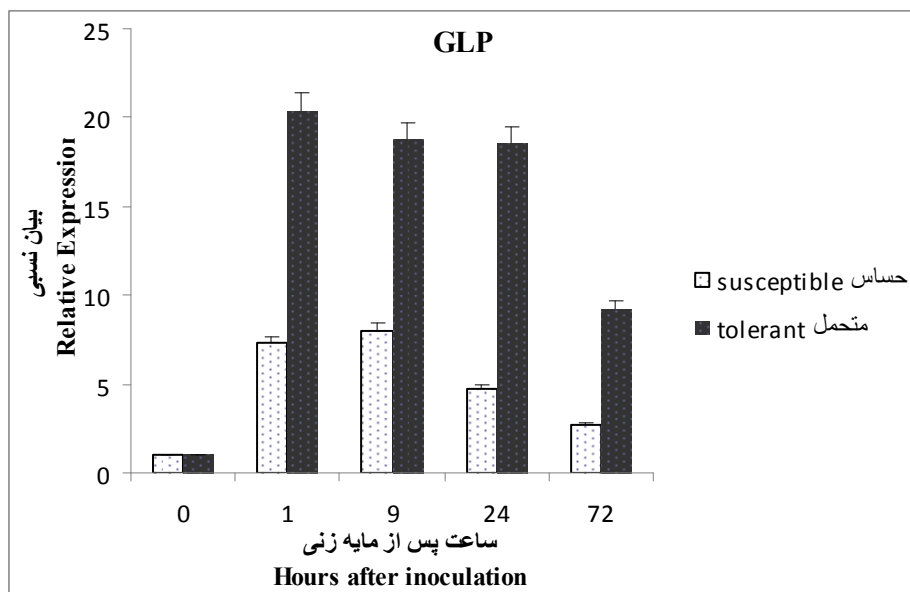
آنالیز بیان ژن با استفاده از روش سنجش کمی در زمان واقعی نشان داد که بیان *Germin like protein (GLP)* در هر دو گیاه حساس و متحمل آلوده به ویروس موزاییک کوتولگی ذرت افزایش قابل توجهی نسبت به شاهد داشته است. نتایج نشان دهنده افزایش در اولین ساعت پس از آلوده‌سازی بود به طوری که یک ساعت پس از آلودگی میزان رونوشت ژن مذکور ۲۱ برابر شاهد بود و میزان بیان با گذشت زمان روند کاهشی پیدا کرد اما در ۷۲ ساعت همچنان افزایش بیان نسبت به گیاه شاهد وجود داشت، در رقم حساس افزایش تعداد رونوشت‌ها به مراتب کمتر از هیبرید متحمل بود به طوری که بیشینه بیان در گیاه متحمل ۳ برابر حساس بود (شکل ۴).

پروتئین‌های جرمین در طی جوانه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و جو بیان می‌شوند و در برگ گیاهان بالغ نیز پاسخ به حمله

مقاومت به این دو بیماری شده است (۲۳).

در گیاه فلفل مقاوم به بیماری ویروسی ایجاد شده به وسیله پاتوتیپ P0 (TMV- P0) ویروس موزاییک توتون مشخص شده است که واکنش فوق حساسیت همراه با افزایش توالی‌های مشابه با پروتئین شبه جرمین با نام CaGLP1 (*Capsicum annuum* GLP1) بوده است که در گیاه فلفل مقاوم آلوده به باکتری *Xanthomonas* تعیین گردیده بود (۲۵).

طبق نتایج Park و همکاران (۲۰۰۴) و مطابق با نتایج این تحقیق، *GLP* در پاسخ دفاعی گیاه علیه آلودگی ویروسی درگیر است. *CaGLP1* در رده جدیدی از خانواده PR پروتئین‌ها به نام PR-16 طبقه‌بندی شده است. مکانیسمی که به وسیله آن *GLP* روی دفاع گیاهان تأثیر می‌گذارد احتمالاً مربوط به تولید گونه‌های فعال اکسیژن توسط گیاه است (۱۴).



شکل ۴- تغییرات بیان ژن *GLP* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به ویروس موزاییک کوتوله ذرت در زمان‌های مختلف

Figure 4- Changes of gene expression of *GLP* in maize seedlings infected by *maize dwarf mosaic virus* in a time courses assay

(۲۸ و ۱۳). بیان ژن *SAM*، به‌وسیله القاء‌کنندگان بیوسنتز اتیلن شامل تنش شوری، الیستورهای باکتریایی و قارچی و محرک‌های مکانیکی افزایش می‌یابد (۳۱).

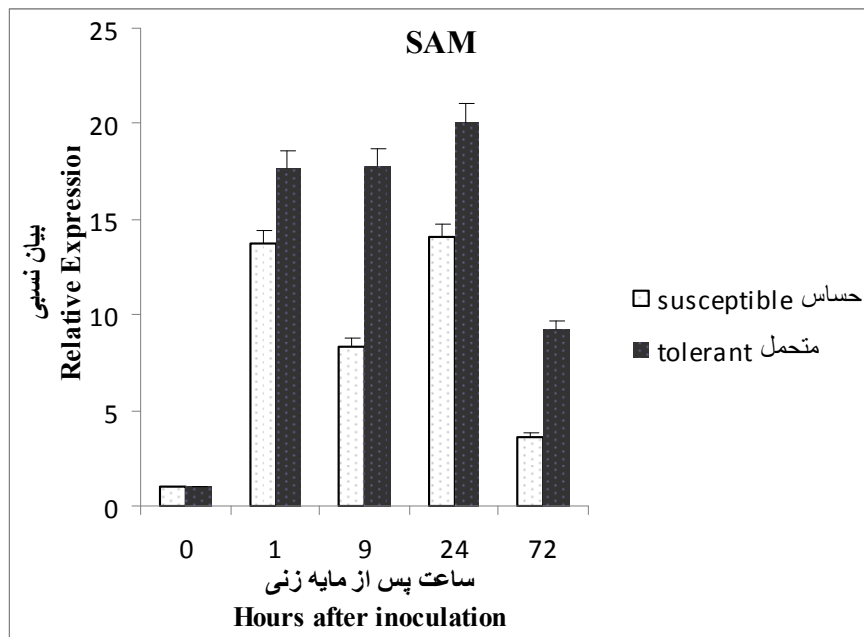
مطابق با نتایج این آزمایش، آنالیز نسخه‌برداری به روش ریزآرایه در گیاه ذرت آلوده به *SCMV* (*Sugarcane mosaic virus*)، نشان دهنده‌ی افزایش بیان ژن *S-adenosylmethionine synthase* در هر دو ژنوتیپ حساس و مقاوم به *SCMV* بوده است و همچنین اختلاف معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم مشاهده شده است (۳۵). نتایج بررسی حاصل از پیش تیمار گیاهان ذرت آلوده با *MDMV* با ماده *S-methylmethionine* نشان داد که در هفته اول تحریک، بیان ژن *S-adenosylmethionine synthase* افزایش سریع داشته است و در هفته‌های دوم و سوم به تدریج کاهش یافته است، بنابراین پیشنهاد شده است که این ژن بوسیله افزایش تولید *S-adenosylmethionine* در پاسخ به آلودگی با *MDMV* به ویژه در روزهای اولیه آلودگی نقش دارد (۲۲). در ارتباط با القاء مقاومت در گیاهان با استفاده از القاگرهای مختلف لازم است زمان کافی برای

بیان ژن *S-adenosylmethionine synthase* (*SAMS*) در هر دو ژنوتیپ یک ساعت پس از مایه‌زنی افزایش معنی‌دار داشت، در حالیکه میزان بیان آن در هیبرید متحمل ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی به بالاترین مقدار خود رسید سپس در هر دو ژنوتیپ مورد بررسی تا زمان ۷۲ ساعت پس از آلودگی سیر نزولی طی کرد. میزان رونوشت‌های ژن در زمان پیشینه بیان در هیبرید متحمل ۲۰ برابر و در رقم حساس حدود ۱۴ برابر زمان صفر بود. ضمناً میزان بیان این ژن در گیاه متحمل حدود ۱/۵ برابر در مقایسه با میزان بیان در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی در گیاه حساس بالاتر بود (شکل ۵).

S-adenosylmethionine synthase یک آنزیم کلیدی در متابولیسم گیاهان است که از *ATP* و متیونین تولید *S-adenosylmethionine* (*SAM*) می‌کند. این ماده به عنوان یک پیش‌ساز در سنتز اتیلن عمل می‌کند. نقش اتیلن در مسیره‌های ایجاد مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زیستی و همچنین تنش‌های غیرزیستی نظیر زخم‌های مکانیکی، مواد شیمیایی، فلزات سنگین، خشکسالی و افزایش شدید دما به خوبی مشخص و اثبات شده است

ذرت به ویروس نشان دهنده نقش کلیدی این ژن در زمان اولیه مواجهه گیاه با تنش زنده می‌باشد. برخی بیمارگرها می‌توانند از طریق فعال‌سازی مسیر انتقال سیگنال اتیلن، القا کننده پاسخ‌های دفاعی گیاه باشند و این در حالی است که اگر گیاهان در سیگنال‌دهی اتیلن دچار مشکل شوند حساسیت یا مقاومت آنها به تنش‌های زیستی و غیر زیستی دچار تغییر خواهد شد (۱۹).

جذب فاکتور تیمار کننده به گیاه داده و نمونه‌برداری حداقل یک هفته بعد از القاء انجام شود تا حداکثر میزان تغییرات قابل اندازه‌گیری باشد ولی در مطالعه حاضر با توجه به رشد و تکثیر حداکثری ویروس در گیاه و لزوم بررسی واکنش‌های مقاومتی در ساعات اولیه بعد از آلودگی، نمونه‌برداری در ساعات اولیه بعد از آلودگی صورت گرفت. افزایش میزان بیان ژن SAM در زمان اولیه آلوده‌سازی گیاه



شکل ۵- تغییرات بیان ژن SAM در گیاهچه‌های ذرت آلوده به ویروس موزاییک کوتوله ذرت در زمان‌های مختلف

Figure 5- Changes of gene expression of SAM in maize seedlings infected by maize dwarf mosaic virus in a time courses assay.

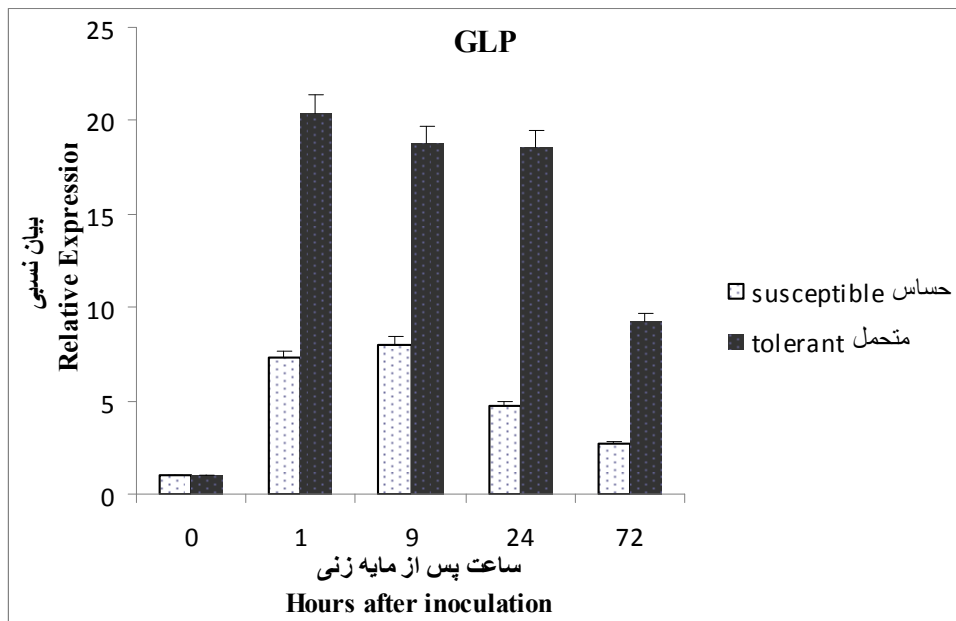
اولیه رشد جنینی گیاه تعیین گردید (۴). در این تحقیق بیشترین میزان بیان در ژنوتیپ متحمل در بازه زمانی ۲۴ ساعت بعد از آلودگی ویروسی ثبت گردید ولی ۳ روز بعد از آلودگی به شدت میزان بیان کاهش یافت. افزایش بیان این ژن در هر دو ژنوتیپ و در ساعات اولیه بعد از آلودگی نشان از اهمیت این ژن و محصول پروتئینی آن در القاء مقاومت گیاهان به تنش‌های زیستی دارد. در مطالعه مشابهی با این مطالعه افزایش میزان بیان دو ژن *GF14-6* و *SAMS* در ذرت آلوده به ویروس MDMV تحت تیمار القاگر در ذرت آلوده به S-methylmethionine و آلوده به MDMV مشاهده شد (۲۲). Konagaya و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که *GF14-6* در تعاملات بین ژن مقاومت در توتون و ایسیتور ویروس موزاییک توتون (TMV) مشارکت دارد که این مسئله نشان دهنده نقش محصول ژن این پروتئین در مقاومت در برابر تنش زنده است. بر این اساس پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ می‌توانند بخشی از پروتئین پوششی TMV را تشخیص دهند و به تخریب آن کمک کنند (۲۰). مکانیسم مشابهی را می‌توان در مورد آلودگی به MDMV نیز متصور شد و

در گیاهان، پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ نقش عملکردی در تعاملات پروتئین-پروتئین دارند که واسطه مسیرهای انتقال سیگنال و تنظیم بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند متابولیسم، هورمون، کنترل چرخه سلولی و پاسخ به تنش‌ها هستند. پروتئین‌های ۱۴-۳-۳ در تمام موجودات هسته‌دار واقعی دیده می‌شوند و به عنوان تنظیم‌کنندگان مسیرهای سیگنال‌دهی مختلف درگیر در طیف گسترده‌ای از مسیرهای بیولوژیکی مورد بررسی قرار گرفته است (۴). در این مطالعه بیان ژن *GF14-6* در هر دو گیاه حساس و متحمل آلوده به MDMV افزایش نشان داد. بیشینه بیان در رقم حساس ۹ ساعت و در هیبرید متحمل ۲۴ ساعت پس از آلودگی به ویروس بود. در زمان اوج بیان تعداد رونوشت‌های ژن در گیاه متحمل نسبت به گیاه شاهد و حساس به ترتیب ۱۷ و ۱/۳ برابر بود (شکل ۶).

تأثیر این گروه از پروتئین‌ها در ایجاد مقاومت به انواع مختلف تنش‌ها متفاوت است به طوری که در برنج آلوده به بیماری قارچی و تنش‌های شوری و خشکی، الگوی متفاوتی از سطح بیان ژن *ZmGF14-6* مشاهده شده است و بیشترین میزان بیان در مراحل

Peroxiredoxin نقش مهمی در ایجاد مقاومت گیاه در ساعات اولیه آلودگی ایفاء می‌کند در حالی که این افزایش حداکثری برای سایر ژن‌ها در زمان‌های طولانی‌تری اتفاق افتاد. با توجه به این داده‌ها ژن *Peroxiredoxin* می‌تواند به عنوان یک نشانگر زیستی مطمئن برای ارزیابی سریع واکنش‌های مقاومتی ارقام ذرت به این ویروس مورد توجه قرار گیرد.

پیشنهاد می‌شود که محصول ژن *GF14-6* شناسایی و تخریب پروتئین پوششی MDMV را تنظیم می‌کند (۲۲). با استفاده از تکنیک ریزآرایه Uzarowska و همکاران (۲۰۰۹) *GF14-6* را به عنوان یکی از ژن‌هایی که در پاسخ به آلودگی ذرت با SCMV و MDMV القا می‌شود شناسایی کردند (۳۵). بررسی الگوی بیان ژن‌های مورد استفاده در این تحقیق نشان می‌دهد که ژن



شکل ۶- تغییرات بیان *GF14-6* در گیاهچه‌های ذرت آلوده به ویروس موزاییک کوتوله ذرت در زمان‌های مختلف

Figure 6- Changes of gene expression of *GF14-6* in maize seedlings infected by *maize dwarf mosaic virus* in a time courses assay

تنش بیماری تاثیرگذار باشد.

افزایش بیان پروتئین‌های مختلف درگیر در مسیرهای دفاعی در زمان‌های مختلف بعد از تنش نشان می‌دهد که مجموعه‌ای از پروتئین‌ها با مکانیسم‌های مختلف از جمله سم‌زدایی گونه‌های اکسیژن فعال، در پاسخ گیاه به بیمارگر دخالت دارند.

این افزایش در اولین ساعت پس از آلوده‌سازی احتمالاً به دلیل فعالیت سریع ویروس در مونتاز نسخه‌های جدید با استفاده از پروتئین‌های خود گیاه است به طوری که بصورت میانگین ۱۰ ساعت پس از مایه‌زنی اولین پیکره‌های کامل ویروس در گیاه ایجاد می‌شوند (۱). اگر چه برخی از پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی به طور طبیعی به میزان اندکی در بافت‌های گیاه بیان می‌شوند، ولی بیان آنها پس از آلودگی با عامل بیماری‌زا و یا تنش‌های محیطی به میزان زیادی افزایش می‌یابد که خود دلیل محکمی بر نقش این پروتئین‌ها در پاسخ و مقاومت به آسیب‌هایی با منشاء عوامل زنده و غیرزنده می‌باشد.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثر ژنوتیپ، زمان و اثر متقابل این دو تفاوت‌های معنی‌داری بر بیان ژن‌های مورد بررسی دخیل در مسیرهای دفاعی داشتند (جدول ۲) که نشان دهنده تفاوت و تنوع در بین ژنوتیپ‌ها و نیز واکنش متفاوت ژنوتیپ‌ها تحت تنش ویروسی در زمان‌های مختلف نمونه‌برداری است. با توجه به داده‌های حاصل از آنالیز واریانس مقادیر مربوط به اختلاف میانگین مربعات در حالت بررسی اثر متقابل زمان و ژنوتیپ برای ژن‌های *GLP*، *SAMS* و *GF14-6* در سطح ۱٪ معنادار بوده و این درحالی است که برای ژن *Peroxiredoxin* اختلاف بین میانگین مربعات داده‌ها در سطح ۵٪ معنی‌دار شده است. با توجه به اینکه اختلاف بین مجموع مربعات برای تمام ژن‌ها معنادار بوده است و در تمام موارد تست شده در هر دو ژنوتیپ با گذشت زمان میزان بیان ژن‌ها با کاهش قابل توجهی روبرو بوده است افزایش بازه‌های زمانی بعد از آلودگی ویروسی جهت نمونه‌برداری و تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها می‌توانست بر روی میزان بیان و درک صحیح پاسخ‌های دفاعی سریع و اولیه گیاه به

جدول ۲- تجزیه واریانس داده‌های بیان ژن‌ها تحت تنش ویروس موزاییک کوتولگی ذرت در زمان‌های مختلف
Table 2- Analysis of variance for gene expression data under *maize dwarf mosaic virus* stress at different time courses

منبع تغییر S.O.V	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Mean square			
		GF14-6	GLP	SAMS	Peroxiredoxin
زمان Time	4	104.9241**	167.587**	134.6347**	70.8635**
ژنوتیپ Genotype	1	64.8788	59.999**	63.817**	85.95735**
زمان × ژنوتیپ Time × Genotype	4	9.84736**	7.19131**	8.11567**	0.86156*
خطا Error	10	0.398	0.485	0.668	0.469
کل	19	--	--	--	--

* و **: به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۵ و ۰/۰۱

* and ** Significant differences in 0.05 and 0.01 level respectively

نتیجه‌گیری

ارقام متحمل و یا نسبتاً مقاوم به این بیماری ویروسی استفاده نمود. با توجه به اهمیت زمان در تشخیص بیماری‌های ویروسی و با توجه به نتایج بدست آمده ژن *GLP* علاوه بر آن که در بازه زمانی یک ساعت بعد از آلودگی میزان بیان بالاتری را در رقم متحمل نسبت حساس نشان داد اختلاف بیان نسبتاً قابل توجهی هم نسبت به رقم حساس در کل بازه‌ها داشته است و بدین ترتیب نسبت به سایر ژن‌های مورد استفاده در این تحقیق می‌تواند در غربالگری ارقام مقاوم به بیماری‌های ویروسی ذرت مورد استفاده قرار گیرد.

بیماری ویروسی موزاییک کوتولگی ذرت یکی از بیماری‌های مخرب ذرت در مناطق زیر کشت این محصول می‌باشد. عدم وجود ارقام مقاوم، کنترل این بیماری را با مشکلات عدیده‌ای روبرو کرده است. در این تحقیق میزان بیان ژن‌های مورد آزمایش اگر چه در هر دو ژنوتیپ حساس و متحمل نسبت به شاهد غیر آلوده افزایش داشته است ولی در گیاهان متحمل این افزایش قابل توجه بوده است. لذا با توجه به داده‌های حاصل از این مطالعه چنین نتیجه‌گیری می‌شود که می‌توان از این ژن‌ها به عنوان بیومارکرهای مناسب در جهت انتخاب

منابع

1. Agrios G. 2005. Plant Pathology. 5th Edition. Academic press, USA.
2. Adhikari T.B., Balaji B., Breeden J., and Goodwin S.B. 2007. Resistance of wheat to *Mycosphaerella graminicola* involves early and late peaks of gene expression. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 55-68.
3. Beaulieu A., Williams N., and Patience J. 2009. Response to dietary digestible energy concentration in growing pigs fed cereal grain-based diets. *Journal of Animal Science*, 87: 965-976.
4. Campo S., Peris-Peris C., Montesinos L., Penas G., Messeguer J., and San Segundo B. S. 2012. Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of Experimental Botany*, 63(2): 983-99.
5. Chen F., Li Q., Sun L., and He Z. 2006. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA Research*, 13: 53-63.
6. Cheng J., Chen J., and Chen J. 2002. The complete sequence of a Sugarcane mosaic virus isolate causing *Maize dwarf mosaic* disease in China. *Journal of Science in China*, 45: 322-330.
7. Chevalier D., Morris E.R., and Walker J.C. 2009. 14-3-3 and FHA domains mediate phosphoprotein interactions. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 67-91.
8. Converse R.H., and Martin R.R. 1990. ELISA methods for plant viruses. APS Press. pp. 179-196.
9. Denison F. C., Paul A. L., Zupanska A. K., and Ferl R. J. 2011. 14-3-3 proteins in plant physiology. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 22:720-727.
10. Dietz K. J. 2008. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. *Plant Physiology*, 133: 459-468.

11. Fomenko D.E., Koc A., Agisheva N., Jacobsen M., Kaya A., Malinouski M., Rutherford J.C., Siu K.C., Jin D.Y., Winqe D.R., and Gladyshev V.N. 2011. Thiol peroxidases mediate specific genome-wide regulation of gene expression in response to hydrogen peroxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 2729-2734.
12. Garcia-Arenal F., Fraile A., and Malpica J.M. 2001. Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39: 157-186.
13. Gomez-Gomez L., and Carrasco P. 1998. Differential Expression of the S-Adenosyl-L-Methionine Synthase Genes during Pea Development. *Plant Physiology*, 117: 397-405.
14. Gucciardo S., Wisniewski J., Brewin N., and Bornemann S. 2006. A germin-like protein with superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. *Journal of Experimental Botany*, 1-11.
15. Godfray H.C.J., Beddington J.R., Crute I.R., Haddad L., Lawrence D., Muir J.F., Pretty J., Robinson S., Thomas S.M., and Toulmin C. 2010. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science*, 327: 812-818.
16. Cueto-Ginzo I., Serrano L., Sin E., Rodríguez R., Morales J., Lade S., Medina V., and Achon M. 2016. Exogenous salicylic acid treatment delays initial infection and counteracts alterations induced by *Maize dwarf mosaic virus* in the maize proteome. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 96: 47-59.
17. Hao Z., Wang L., and Tao R. 2010. Defense genes and antioxidant enzymes in stage-dependent resistance to rice neck blast. *Journal of Plant Pathology*, 92(3): 747-752
18. Hao Z., Wang L., Huang F., and Tao R. 2012. Expression of defense genes and antioxidant defense responses in rice resistance to neck blast at the preliminary heading stage and full heading stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 222-230.
19. Haslekas C., Viken M.K., Grini P. E., Nygaard V., Nordgard S.H., Meza T.J., and Aalen R.B. 2003. Seed 1-Cysteine Peroxiredoxin Antioxidants Are Not Involved in Dormancy, but Contribute to Inhibition of Germination during Stress. *Plant Physiology*, 133: 1148-1157.
20. Huang Z., Yeakley J.M., Garcia E.W., Holdridge J.D., Fan J.B., and Whitham S.A. 2005. Salicylic acid-dependent expression of host genes in compatible Arabidopsis-virus interactions. *Plant Physiology*, 137: 1147-1159.
21. Konagaya K.I., Matsushita Y., Kasahara M., and Nyunoya H. 2004. Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *Journal of General Plant Pathology*, 70: 221-231.
22. Lu G., DeLisle A. J., Vetten N.C., and Ferl R.J. 1992. Brain proteins in plants: An Arabidopsis homolog to neurotransmitter pathway activators is part of a DNA binding complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89: 11490-11494.
23. Ludmerszki E., Almasi A., Racz I., Szigeti Z., Solti A., Olah C., and Rudnoy S. 2015. S-methylmethionine contributes to enhanced defense against *Maize dwarf mosaic virus* infection in maize. *Brazilian Journal of Botany*, 38(4):771-782.
24. Manosalva P.M., Davidson R.M., Xiaoyuan Zhu B.L., Hulbert S.H., Leung H., and Leach J. N. 2009. A Germin-Like Protein Gene Family Functions as a Complex Quantitative Trait Locus Conferring Broad-Spectrum Disease Resistance in Rice. *Plant Physiology*, 149: 286- 296.
25. Oh C.S., Pedley K.F., and Martin G.B. 2010. Tomato 14-3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAPKKK α . *The Plant Cell*, 22:260-272.
26. Park Ch.J., An J., Shin Y., Kim K., Lee L., and Paek K. 2004. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta*, 219: 797-806.
27. Patnaik D., and Khurana P. 2001. Germin and Germin like protein: an overview. *Indian Journal of Experimental Biology*, 39:191-200.
28. Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:2002-2007.
29. Ravanel S., Gakiere B., Job D., and Douce R. 1998. The specific features of methionine biosynthesis and metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 7805-7812
30. Rose R., Erdmann S., Bovens S., Wolf A., Rose M., Hennig S., Waldmann H., and Ottmann C. 2010. and Identification and structure of small molecule stabilizers of 14-3-3 protein interaction. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 4129-4132.
31. Shukla D.D., Jilka J., Tosic M., Ford R.E., Toler R.W., and Langham M. 1989. Taxonomy of potyviruses infecting maize, sorghum and sugarcane in Australia and the United States as determined by reactivities of polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *Phytopathology*, 79: 223-229.
32. Takusagawa F., Kamitori Sh., Misaki Sh., and Markham G.D. 1996. Crystal Structure of S Adenosylmethionine Synthetase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(1): 136-140.
33. Tobias I., Bakardjieva N., and Palkovics L. 2007. Comparison of Hungarian and Bulgarian isolates of Maize dwarf mosaic virus. *Journal of Cereal Research Communications*, 35(4): 1643-1651.

34. Tripathi B.N., Bhatt I., and Dietz K.J. 2009. Peroxiredoxins: A less studied component of hydrogen peroxide detoxification in photosynthetic organisms. *Protoplasma*, 235: 3-15.
35. Trzmiel K., and Jezewska M. 2008. Identification of *Maize dwarf mosaic virus* in Maize in Poland. *Plant Disease*, 92(6): 981-992. Abstract.
36. Uzarowska A., Dionisio G., Sarholz B., Piepho H.P., Xu M., Ingvarsdson C.R., Wenzel G., and Lubberstedt T. 2009. Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology*, 9: 1-15.
37. Wei T., Huang T.S., McNeil J.F., Laliberte J.F., Hong J., Nelson R.S., and Wang A. 2010. of the Sequential recruitment endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *Journal of Virology*, 84: 799–809.
38. Williams M.M., and Pataky J.K. 2012. Interactions between maize dwarf mosaic and weed interference on sweet corn. *Field Crop Research*, 128: 48–54.
39. Wu L., Wang S., Chen X., Wang X., and Wu L. 2013. Proteomic and Phytohormone Analysis of the Response of Maize (*Zea mays* L.) Seedlings to Sugarcane Mosaic Virus. *PLoS ONE*, 8(7): 1-17.
40. Zimmermann G., Baumlein H., Mock H., Himmelbach A., and Schweizer P. 2006. The multigene family encoding germin-like proteins of barley: regulation and function in basal host resistance. *Plant Physiology*, 142: 181–19.



Expression Analysis of Some Defense-related Genes in Susceptible and Tolerant Maize Genotypes in Response to Infection of Maize Dwarf Mosaic Virus (MDMV)

F.S. Mostafavi Neishaburi¹- S.K. Sabbagh^{2*}- A. Yamchi³- S. Nasrollanejad⁴- N. Panjehkeh⁵

Received: 24-10-2017

Accepted: 10-11-2018

Introduction: Maize (*Zea mays* L.) is one of the most widely cultivated crops worldwide. More than 40 viruses can infect sweet corn. *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) is a positive-sense single strand RNA potyviruses that cause significant crop yield loss in susceptible sweet corn varieties. Infected young leaves by MDMV show chlorotic spotting which may eventually turn into a mosaic or mottled pattern. Approximately two-thirds of maize varieties are susceptible to MDMV infection, and even young resistant plants may be infected to the virus at 2-3 leaf stage. These symptoms vary *greatly depending on the* host genotype, time of infection, and on the strain causing the injection. However, the precise molecular details of maize responses to MDMV infection are largely unknown. In sensitive and tolerant plants during viral infection, the expression level of defense -related genes are altered based on plants ability to recognize pathogen attack. The elevated expression of defense-related genes such as *SAMS* and *G-box factor 14-6* (*GF146*) leads to production of resistance proteins which are considered as molecular response of maize to variety of biotic stresses. The production of resistance proteins and the enhanced expressions of *Peroredoxin*, *SAMS*, *G-box factor 14-6* (*GF14-6*), and other genes are considered as typical responses in maize varieties. Proteomic analysis in susceptible and tolerant maize seedlings infected by sugarcane mosaic virus showed a high expression of 96 different proteins. In this study, the expression level of some defense genes including *Germin like protein* (*GLP*), *Peroxiredoxin* (*Prx*), *GF14-6* and *S-adenosylmethionine synthase* (*SAMS*) was investigated in both susceptible and tolerant maize genotypes against MDMV at different times after inoculation by qRT-PCR.

Material and Methods: The seed of SC705 cultivar and the number of hybrid number 8 (KLM75010/4-4-1-2-1-1-1×MO17) were used as susceptible and tolerant cultivar to MDMV, respectively. All the seeds were sterilized with chloramine T (3%), washed three times with distilled water and then grown in a greenhouse under controlled conditions at 25°C. Leaves of infected plants by MDMV showing macroscopic symptoms were homogenized in phosphate buffer (pH 7.2, 0.06 M) and were used for inoculation using carborundum. The leaves of mock-plants were mechanically injured and infected with phosphate buffer. Sampling was done at 5-time intervals including 0, 1, 9, 24 and 72 hours after plant viral infection. Total RNA was extracted from the leaf tissue and further treated with RNase free *DNaseI* to eliminate any DNA contamination. Reverse transcription reaction was performed using *M-MuLV* reverse transcriptase. Gene expression analysis was done using qRT-PCR method by an iCycler instrument (iQ5, BioRad, USA) using SYBR Green PCR MasterMix and the relative gene expression was calculated according to $\Delta\Delta C_T$ method according to the Pfaffl method. The reaction of PCR was carried out at 50 °C for 2 min, 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 59 °C for 20 s, and 72 °C for 20 s. Reactions were finished with a dissociation step, starting at 55°C to 95 °C by increasing 0.5°C per cycle for 80 cycles.

Results and Discussion: Symptoms of infected susceptible and tolerant plants were monitored for 20 days post inoculation (dpi). The success of infection was verified using the ELISA technique. All the susceptible SC705 cultivars showed visible mosaic symptoms at 16 dpi to MDMV while 8-hybrid plants showed mild mosaic symptoms at 19 dpi. Gene expression analysis showed that the expression level of all tested genes was significantly increased in tolerant

1- Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran

2- Associate Professor, Department of Biology, Campus of Sciences. Yazd University, Iran

(*- Corresponding Author Email: sksabbagh@yazd.ac.ir)

3- Assistant Professor, Department of Plant Breeding & Biotechnology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran

4- Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Iran

5- Former Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran

maize in comparing with susceptible maize plants. One hour after maize inoculation an increase of expression level was seen for all tested genes. *Peroxiredoxin* and *GLP* were up-regulated at 1 hpi and then decreased over time. *SAM* and *GF14-6* were up-regulated in the all-time intervals but the highest expression level was noted at 24 hpi. The lowest expression level for all tested genes was observed at 72 hpi. *In the other word*, the expression levels of *SAM* and *GF14-6* genes were elevated in a moderate rate with a continuous increase in the infected maize from first time point after inoculation until last time point of sampling. The rapid induction of defense-related genes is required to activate defense mechanisms and respond to against pathogens attacks. In this research, we tested the expression profile of four genes which have been defined as important proteins related to disease and stress signals.

Conclusion: Based on these results, we can conclude that tested genes in this research could be suitable as biomarkers for the selection of tolerant or relatively tolerant maize cultivars against MDMV. Among them, *GLP* gene was more efficient as a screen able marker.

Keywords: Genetically resistance, Maize dwarf mosaic virus, qRT-PCR

