Crop Biotech.
Winter (2017) 20: 75-85.

مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌فناوری گیاهان زراعی
سال هفتم، شماره بیستم، زمستان ۱۳۹۶ (۸۵-۷۵)

بررسی کمی بیان ژن‌های کاندیدای مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم آلوده با قارچ *Mycosphaerella graminicola*

مریم صادقی[۱]، رضا حاجی‌حسینی [۲]، قاسم عطایی[۳] ، محسن مردی[٤*]
۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۲. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
۳. استادیار، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شاهرود، شاهرود، ایران
٤. استاد، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۸/۱۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٦/۱۲/۱۱)

Quantitative gene expression of Candidate Genes for Septoria tritici blotch (STB) Resistance in Wheat Infected by *Mycosphaerella graminicola*

Maryam Sadeghi[1], Reza Haji-Hosseini[2], Ghasem Ataei[3], Mohsen Mardi[4*]
1. Former M.Sc. Student, Payame Noor University, Tehran, Iran
2. Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran
3. Assistant Professor, Medical School of Shahroud, Islamic Azad University, Shahroud, Iran
4. Professor, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
(Received: Oct. 1, 2017 - Accepted: Mar. 2, 2018)

چکیده

بیماری سپتوریوز برگی گندم که بوسیله قارچ *Mycosphaerella graminicola* ایجاد می‌شود یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد گندم در ایران و جهان به شمار می‌رود. با این وجود در حال حاضر مقاومت به تنش زیستی تسهیل شده توسط ژن‌های کاندیدای مقاومت به تنش‌های زیستی یکی از معیارهای انتخاب مهم در برنامه‌های اصلاح گندم است. در این مطالعه پنج ژن متعلق به پنج خانواده ژنی کاندیدای مختلف مقاومت به بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. آغازگرهای اختصاصی با استفاده از نرم افزار Molecular Beacon طراحی شدند. بیان افتراقی این ژن‌ها در زمان‌های صفر، سه، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت بعد از آلودگی در رقم مقاوم ونگشوبای و حساس فلات با استفاده از واکنش کمی زنجیره پلیمراز (Real Time PCR) بررسی شد. نتایج نشان داد که سطح بیان ژن *Bsi* inhibitors protease ۱۲ ساعت بعد از آلودگی در گیاه مقاوم در مقایسه با حساس ۲٤ برابر بیشتر بود. همچنین بیان دو ژن (*PR-1*) Pathogenesis–protein related و (*Per*) Peroxidase در ساعات اولیه پس از آلودگی و در گیاه مقاوم افزایش یافتند. تفاوت الگوی بیان ژن‌های وابسته به ساز و کارهای مقاومت در ارقام مقاوم و حساس گندم مهمترین مرحله مطالعاتی جهت گزینش ارقام جدید در سیستم‌های اصلاح سنتی و مدرن می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سپتوریوز برگی، گندم، *Mycosphaerella graminicola*، *Bsi* inhibitors protease، Peroxidase، *PR-1*، Real time PCR.

Abstract

Septoria tritici blotch (STB), caused by the fungus *Mycosphaerella graminicola* is one of the most important factors in reducing wheat yield in Iran and the world. However, biotic stress resistance facilitated by candidate genes is one of important selection criteria in wheat breeding programs. In this study, five different families of resistance to the disease were studied. Specific primers were designed using Molecular Beacon software. The differential expression of these genes was investigated at 0, 3, 6, 12 and 24 hours after inoculation.in resistant (*Wangshubai)* and sensitive cultivars (Seri 82) using quantitative gene expression analysis. The results showed expression level of inhibitors protease *Bsi* was 24 times higher in *Wangshubai* than Seri 82 12 hours after inoculation. Further, the expression of protein-related pathogenesis (*PR-1*) and peroxidase (*Per*) increased at early hours after infection in *Wangshubai*. The difference between the expression pattern of the gene linked to resistance mechanisms is the most important step in study of the selection of new cultivars in traditional and modern breeding strategy.

Keywords: Septoria tritici blotch (STB), *Mycosphaerella graminicola*, inhibitors protease *Bsi*, Peroxidase, *PR-1*, Real time PCR

* نویسنده مسئول: محسن مردی
E-mail: mardi@abrii.ac.ir

مقدمه

در میان گیاهان زراعی، گندم *Triticum aestivum* به علت داشتن مواد غذایی با ارزش مانند انواع پروتیین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و تنوع محصولات، حدود ۲۰ درصد از کالری غذایی مردم جهان را تامین می‌نماید (Kumar *et al*., 2011).

تنش‌های زیستی مانند آفات و بیماری‌های گیاهی از جمله عوامل کاهش عملکرد در واحد سطح می‌باشند (Datta *et al*., 2009; Moud and Maghsoudi, 2008). بیماری سپتوریای برگی گندم یا Septoria tritici blotch (STB) یکی از بیماری‌های مهم قارچی گندم نان و دوروم و همچنین غلاتی که در نواحی مرطوب و نیمه‌مرطوب کشت می‌گردند، به شمار می‌رود. این بیماری توسط قارچ *Mycosphaerella graminicola* ایجاد می‌گردد و اولین بار توسط پتراک (۱۳۲۰) و اسفندیاری در سال (۱۳۲۶) در استان‌های گلستان، مازندران، خوزستان، فارس و ایلام گزارش شده است. اهمیت بیماری و خسارت ناشی از آن زمانی افزایش یافت که ارقامی با خواص زراعی خوب نظیر عملکرد بالا، سازش با اقلیم‌های مختلف و مقاومت در برابر زنگ‌ها در اکثر کشورها کشت گردید. از آنجایی که این ارقام نسبت به بیماری سپتوریوز حساس بودند در بسیاری از کشورها خسارت قابل توجهی وارد نمودند (Eyal, 1981). شدت بیماری در دهه گذشته و همچنین اهمیت اقتصادی گندم باعث شد تا تحقیقات گسترده‌ای در مورد این بیماری صورت گیرد. این بیماری تا حدودی به کمک قارچ کش‌ها و استفاده از ارقام مقاوم کنترل می‌شود (Cowger *et al*., 2000) ولی به دلیل تولید اسکوسپور در تمام سال و پراکنش آن توسط باد، تنوع ژنتیکی زیادی در جمعیت‌های طبیعی این قارچ وجود دارد. از طرفی تولید محصول در ارقام مقاوم نسبت به ارقام حساس به میزان قابل توجهی کمتر است (Cowger and Mundt, 2002). ارقام مقاومی که در حال حاضر کشت می‌شوند در اثر تغییرات ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر که به طور مکرر اتفاق می‌افتد، تنها به صورت نسبی و محدود می‌توانند در برابر این بیماری از خود مقاومت نشان دهند. از طرفی آلودگی‌های زیست محیطی و مقاومت به قارچ کش‌های رایج باعث شده است تا استفاده از قارچ کش‌ها نیز کارایی خود را تا حدود زیادی از دست بدهند (Castroagudín *et al*., 2015; Cools and Fraaije, 2008). در نتیجه، ایجاد ارقام اصلاح شده به عنوان استراتژی موثری برای مبارزه با این بیماری و بهبود سلامت انسان و محیط زیست مورد نیاز است (Kogel and Langen, 2005). در ده سال اخیر تلاش گسترده‌ای برای شناسایی ژن‌های مقاومت به *M.graminicola* انجام گرفته است که منجر به شناسایی دوازده ژن مقاومت شده است (Stintzi *et al*., 1993).

گیاهان همواره مورد حمله طیف وسیعی از بیمارگرها نظیر ویروس‌ها، قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتد-ها قرار می‌گیرند. در اثر عملکرد سیستم دفاعی گیاهان، آن‌ها میزبان بسیاری از بیمارگرها محسوب نشده (مقاومت غیر میزبانی) و یا با تشخیص نژادهای خاصی از بیمارگرهای اختصاصی نسبت به آن‌ها مقاومت (مقاومت میزبانی یا نژادی) نشان می‌دهند. در هر دو صورت، مسیرهای بیوشیمیایی که منجر به بروز مقاومت می‌شود بسیار مشابه بوده و پاسخ مناسبی در مقابل حمله بیمارگر داده می‌شود. در نتیجه دریافت و تشخیص سیگنال‌های خارج سلولی به عنوان عوامل بیماریزا، انتقال این سیگنال‌ها به درون سلول و به دنبال آن راه اندازی واکنش‌های دفاعی روی می‌دهد (Odjakova and Hadjiivanova, 2001).

اولین و مهم‌ترین عاملی که موجب می‌شود گیاهی نسبت به یک بیمارگر خاص حساس یا مقاوم باشد به نوع بر هم کنش ژن‌های مقاومت (Resistance gene) در گیاه و ژن بیماریزایی

متناظر با آن به نام Avr در بیمارگر بستگی دارد. این مفهوم در قالب نظریه ژن برای ژن فلور مطرح می‌گردد و در نهایت پیشروی بیمارگر و یا القای مقاومت در گیاه را تعیین می‌کند. هنوز چگونگی برهم‌کنش بین بیمارگر و گیاه به خوبی مشخص نشده است. گرچه با تعیین توالی ژنوم گیاه آرابیدوپسیس به عنوان یک گیاه مدل در تحقیقات مولکولی، امید زیادی به پیشرفت در این زمینه وجود دارد. گیاه آرابیدوپسیس دارای ۱۵۰ ژن مقاومت است در حالیکه بسیاری از گیاهان دو تا سه برابر این میزان ژن مقاومت دارند. تا کنون چند ژن مقاومت از گیاهان مهم زراعی که موجب بروز مقاومت به طیف وسیعی از بیمارگرها می‌شوند جدا گردیده است. اما عاملی که موجب راه‌اندازی یا خاموشی این ژن‌ها در خلال حمله بیمارگر می‌گردد هنوز مشخص نمی‌باشد (Odjakova and Hadjiivanova, 2001). از دیدگاه ملکولی فرآیند ایجاد مقاومت اختصاصی به بیمارگر توسط گیاه شروع می‌شود. در مقاومت میزبانی گیرنده‌هایی با عمل بسیار اختصاصی برای نژادهای بیمارگر در غشای پلاسمایی و یا در سیتوزول قرار دارند که توسط ژن‌های R بیان می‌شوند. در یک گیاه تعداد بسیار زیادی ژن R با عملکردهای متفاوت وجود دارد که هر کدام بیمارگر خاصی را شناسایی می‌کنند. تاکنون ۲۰ ژن R با شناسایی اختصاصی برای ژن‌های Avr مشخص از هفت گونه مختلف گیاهی شامل دو لپه‌ای‌ها و تک لپه‌ای‌ها جدا شده که در برابر باکتری‌ها، ویروس ها، قارچ‌ها، نماتدها و شته‌ها مؤثرند. با وجود تنوع زیاد این بیمارگرها دیده شده است که تمامی پروتئین‌های R متناظر با آن‌ها دارای موتیف‌های مشخصی هستند که براساس آن‌ها تقسیم بندی شده‌اند.

اشکال مختلف اکسیژن آزاد (Reactive Species Oxygen) و یا ROS از منابع مختلفی مانند تنفس سلولی، مواد شیمیایی زائد رها شده در طبیعت و پاسخ دفاعی اولیه گیاهان به حمله انواع بیمارگرها تولید می‌شود. ملکول ROS بسیار فعال است و می‌تواند به ماکروملکول‌های زیستی مانند پروتیین‌ها، اسیدهای نوکلئیک و چربی‌ها آسیب وارد کند. متیونین موجود در پروتیین در مقابل اکسیداسیون بسیار حساس است. در اثر اکسیداسیون مخلوط راسمیک methionine-S-sulfoxide و methionine-R-sulfoxide تولید می‌شود. اغلب سلول‌های یوکاریوت و پروکاریوت دارای آنزیم‌های ترمیم‌کننده مانند Methionine sulfoxide reductases یا *Msr* می‌باشند. این آنزیم فرایند احیا وابسته به thioredoxin را به متیونین، چه در متیونین سولفوکسید آزاد [Met(O)] و چه در متیونین سولفوکسید موجود در پروتیین کاتالیز می‌کند. آنزیم *Msr* به دو فرم A و B وجود دارد. *MsrA* تنها از اپیمر S به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. به طور کلی *MsrA* برای بیماریزایی و زنده ماندن باکتری‌های تحت تنش ضروری است. *MsrB* نیز تنها از اپیمر R به عنوان سوبسترا استفاده می‌کند. این آنزیم در اوباکترها ارکی باکترها و یوکاریوت‌هایی مانند ماکروفاژها، نوتروفیل کلیه و سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه که تحت تنش زیاد هستند فراوان است (Moskovitz *et al*., 2000).

خانواده ژنی Peptidyl-prolyl isomerases یا (*PPIs*) در زنجیره‌های پلی پپتیدی، ایزومریزاسیون سیس و ترانس پیوندهای پپتیدی انتهای N اسید آمینه پرولین را تسهیل می‌کند. همچنین در تاخوردگی پروتیین‌های تازه سنتز شده با چپرون‌ها همکاری می‌کنند. آنزیم‌های *Ppi* در کنترل چرخه سلولی نیز نقش دارند. تحقیقات اخیر نشان داده است که در رویدادهای دیگر هسته‌ای نیز دخالت دارند. این آنزیم‌ها به صورت Ubiquitous هستند و در یوکاریوت‌ها و پروکاریوت‌ها به طور مشابه‌ای بیان می‌شوند (Kruse *et al*., 1995; Schmid, 1995).

ژن‌های کدکننده Pathogenesis related protein یا *PR-1* گروه بزرگ و متنوعی از

پروتیین‌های غیرخویشاوند را رمز می‌کند که در پاسخ به هر گونه استرس و حمله میکروارگانیزم‌ها در سلول‌های گیاهی تجمع می‌یابند (Przymusiński *et al*., 2004). این پروتیین‌ها فعالیت هضم‌کنندگی دارند و با خاصیت کیتینازی و گلوکانازی باعث تضعیف دیواره سلولی قارچ و تخریب هیف‌های قارچی در حین نفوذ به سلول‌های گیاهی می‌شوند. همچنین باعث ته‌نشین شدن مواد پلی‌مری مانند کالوز، لیگنین، گلیکوپروتیین‌ها در سطح دیواره سلولی شده و با ایجاد موانع فیزیکی باعث جلوگیری از نفوذ هیف‌های قارچ به سلول گیاه می‌شود. خانواده *PR-1* در تمام گونه‌های گیاهی به شدت محافظت شده است. هومولوگ این ژن در قارچ‌ها، حشرات و مهره‌داران از جمله انسان نیز دیده شده است (Chassot *et al*., 2007).

ژن *Bsi* پروتیین ترشحی Protease Inhibitor را که غنی از سیستین و دارای ۸۹ اسید آمینه است را رمز می‌کند. این آنزیم با فرم فعال آنزیم‌هایی Protease واکنش داده و مانع فعالیت این آنزیم‌ها می‌شود. این آنزیم در پاسخ به حمله بیمارگرها و حشرات القا می‌شود. این پروتیین مانع از فعالیت پروتئازهای موجود در روده حشرات گیاه‌خوار و ترشحات میکروارگانیزم‌ها شده و در نتیجه اسید آمینه‌های لازم برای رشد و بلوغ آن‌ها تامین نمی‌شود (Lawrence and Koundal, 2002).

ژن *Per* خانواده‌ای از Peroxidase مونومر گلیکوپروتیینی دارای گروه هم را کد می‌کند. در اثر فعالیت این آنزیم‌ها ملکول‌های ROS تولید می‌شود. ملکول‌های ROS به عنوان ملکول سیگنال در راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی، چوب پنبه‌ای شدن دیواره سلولی، بهبودی زخم‌ها، باز و بسته شدن روزنه‌ها، کنترل واکنش‌های اکسیداسیون- احیا و رشد طولی سلول عمل می‌کنند (Hiraga *et al*., 2001). با وجود اینکه تا کنون تنها تعداد معدودی والد مقاوم قابل استناد گزارش شده است، هنوز اصلاح کلاسیک موثرترین راهکار جهت افزایش مقاومت به STB به شمار می‌آید. نشانگرهای مولکولی پیوسته با مقاومت به STB در گندم را می‌توان به همراه روش‌های کلاسیک، جهت تولید ارقام مقاوم از طریق تجمع ژن‌های مقاومت مورد استفاده قرار داد. با توجه به وجود اطلاعات کافی در مورد ساختار و عملکرد ژن‌ها در بانک‌های اطلاعاتی، امکان شناسایی نشانگرهای ساختاری و عملکردی یک موجود زنده بر مبنای نشانگرهای ساختاری و عملکردی ژنوم سایر موجودات زنده وجود دارد. شناخت عملکرد ژن‌ها با استفاده از همانندی توالی‌های EST (Expressed sequence tags) و ژن‌های شناخته شده، می‌تواند الگوی مناسبی از توالی‌های تظاهر یافته در بافت‌های مختلف در شرایط طبیعی و بعد از اعمال تنش‌های زنده و غیر زنده ارائه نماید. در زیست شناسی پیشرفته، بررسی دقیق بیان ژن‌ها اهمیت روزافزونی پیدا کرده است. در سال‌های پیش روش مرسوم برای بررسی بیان ژن‌ها لکه‌گذاری نورتون بلات، هیبریداسیون درجا و یا سنجش مقاومت به RNase بوده است. اگرچه این روش‌ها هنوز هم به طور گسترده استفاده می‌شوند ولی به طور کلی وقت‌گیر بوده و از حساسیت پایینی برخوردار می‌باشند. استفاده از روش Real time PCR برای بررسی بیان ژن و تشخیص نسخه‌های نادر RNA تحولی را در زمینه مطالعات بیان ژن بوجود آورده است.

هدف از این تحقیق بررسی بیان کمی پنج ژن احتمالی مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی گندم در زمان آلودگی این گیاه به قارچ در شرایط آزمایشگاهی و در زمان‌های مختلف با استفاده از آنالیز Real time PCR بود. با بررسی بیان کمی این ژن‌ها بیشترین و کمترین میزان بیان آن‌ها در یک رقم مقاوم Wangshuibai و یک رقم حساس Falat یا Seri82 مشخص گردید. ژن‌های مقاوم احتمالی می‌توانند به‌عنوان ابزاری در بحث ایجاد ارقام مقاوم به بیماری با استفاده از روش‌های اصلاحی یا در

مباحث انتقال ژن در جهت ایجاد ارقام مقاوم در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این تحقیق از دو رقم گندم موجود در بانک ذخائر توارثی بخش ژنومیکس پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (ABRII) با نام‌های فلات و ونگشوبای که به ترتیب نسبت به بیماری سپتوریوز برگی حساس و مقاوم می‌باشند استفاده شد.

آلوده‌سازی

قطعه کوچکی از کاغذ فیلتر منجمد شده با خلا را که در دمای ۸۰°C- نگهداری می‌شود و حاوی کشت خالص *M.graminicola* است، از استوک اصلی جدا کرده و به پتری‌دیش حاوی آگار دکستروز سیب‌زمینی انتقال داده شد. پتری‌دیش در معرض نور فلورسنت سفید و تحت شرایط فتوپریود ۱۲ ساعت و در دمای ۲۵°C قرار داده شد. پس از رشد قارچ یک سانتی‌متر مربع از محیط کشت جدا شد و در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر و ۱۰ گرم سوکروز قرار داده شد. برای جلوگیری از آلودگی ثانویه سولفات‌کانامایسین به میزان $mg\ ml^{-1}$ ۲۵ به محیط کشت اضافه شد. جهت تولید اسپور ارلن‌ها روی شیکر با دور ۱۵۰rpm به مدت سه تا پنج روز قرار داده شدند. توده سلولی قارچ با استفاده از کاغذ فیلتر دو لایه از محیط کشت جدا شد. جهت تعیین تعداد اسپور قارچ در مایه تلقیح (محیط کشت) از لام هماسیتومتر استفاده شد. سوسپانسیون اسپور 3×10^{6} spores/ml به منظور ایجاد آلودگی مصنوعی گیاه با قارچ تهیه گردید. جهت ایجاد چسبندگی مایه تلقیح یک قطره Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate به ۱۰۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون به صورت دستی روی گیاه ۳۵ روزه اسپری شد. محیط کشت به اضافه Polyoxyethylene-sorbitan monolaurate جهت تلقیح گیاهان شاهد استفاده شد. کلیه نمونه‌های گیاهی با یک لایه پلی‌اتیلن تیره پوشانده شدند. گلدان‌های حاوی گیاهان تلقیح شده با قارچ و کنترل در محیطی با رطوبت صد در صد قرار داده شدند. ۳ روز پس از تلقیح صفحات تیره برداشته و گلدان‌ها به گلخانه منتقل گردیدند. دمای گلخانه برای روز ۲۴°C و برای شب حدود ۲۰°C تنظیم شد. گلدان‌ها روزانه آبیاری و مورد بررسی قرار داده شدند. گیاهان سالمی که رشد طبیعی داشته‌اند جهت بررسی مولکولی انتخاب گردیدند.

نمونه‌گیری

نمونه‌گیری در زمان‌های صفر، سه، شش، دوازده و بیست و چهار ساعت بعد از آلوده‌سازی انجام شد. اندام‌های هوایی از انتهای ساقه با قیچی تیز جداسازی و به سرعت در نیتروژن مایع منجمد شدند. نمونه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه در فریزر با دمای ۸۰°C- نگهداری شدند. این آزمایش در سه تکرار و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد.

استخراج RNA

استخراج RNA با کیت RNeasy® Mini Kit از شرکت QIAGEN و طبق دستورالعمل مربوطه استخراج شد. برای تعیین کمیت RNA از دستگاه Nanodrop استفاده شد. جهت تعیین کیفیت RNA از روش الکتروفورز ژل اگارز ۱/۳ درصد با بافر 1xMOPS استفاده شد.

سنتز cDNA

سنتز Total cDNA به‌وسیله کیت TM iscript cDNA synthesis Kit(Bio Rad Cat.# 170-8891) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. cDNA سنتز شده به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق گردید. با استفاده از اطلاعات موجود در رابطه با ژن‌های مورد

مطالعه در بانک اطلاعاتی NCBI و Tiger یک جفت آغازگر برای هر یک از ژن‌های *Mrs*، *Bsi*، *Ppi*، *Per*، *PR1* و *18sRNA* طراحی شد. جهت طراحی آغازگر از نرم‌افزار Beacon designer (Primer Biotech) استفاده شد. توالی آغازگرهای طراحی شده در جدول یک نشان داده شده است.

جدول ۱. توالی آغازگرهای طراحی شده برای بررسی بیان در گیاهان آلوده و غیرآلوده به قارچ

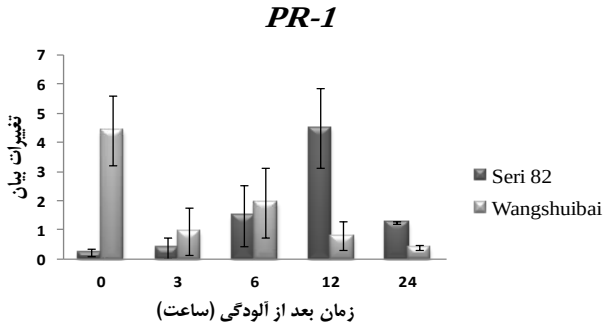
نام	توالی
Ppi F	GAGATCGACCCGGACAACAG
Ppi R	CTCCGTCTTCCTCCATTTGG
18s F	GTGACGGGTGACGGAGAATT
18s R	GACACTAATGCGCCCGGTAT
Bsi F	GGGCCCTGCAAGAAGTACTG
Bsi R	ACACGCATAGGCACGATGAC
Per F	CCAGCACGACACGTGAATG
Per R	CATGATTTGCTGCTGCTCGTA
PR-1 F	CATGCGATTAGGGACGAAAGA
PR-1 R	CCGCGGGAATATCATTGG
Msr F	CATGCAGATGTTTCGGACAAA
Msr R	ACCATCGCGTCCCATGTAAA

واکنش Real Time PCR

با استفاده از دستگاه MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System و در حجم واکنش ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Green Supermix iQ™ SyBR®، یک میکرولیتر Primer Forward و یک میکرولیتر Primer Reverse، هفت میکرولیتر cDNA، ۳/۵ میکرولیتر Steril Water و در چرخه حرارتی شامل یک سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دو سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، و یک سیکل سه دقیقه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، یک سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۵ سیکل ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد، یک سیکل ۵ دقیقه‌ای در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۹۰ سیکل ۱۰ ثانیه‌ای در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های Real-Time از نرم‌افزار طراحی شده توسط شرکت Bio Rad و ABI براساس مقدار threshold cycle (Ct) استفاده شد.

نتایج و بحث

علائم بیماری سپتوریوز و اثرات آن بر روی برگ گیاه ۱۶ تا ۱۸ روز بعد از آلودگی در رقم حساس فلات مشاهده شد. با توجه به اینکه بررسی عملکرد بیان ژن در نمونه‌ها وابستگی کاملی به آلوده شدن گیاه و اطمینان از قدرت تهاجمی ایزوله مورد آزمایش دارد، بررسی روزانه، یادداشت‌برداری و نمونه‌برداری تا ۲۷ روز بعد از القاء آلودگی مصنوعی و ظهور پیکنید انجام شد. شدت بیماری به صورت درصد ناحیه آلوده شده برگ محاسبه می‌شود. ۵۰ درصد برگ در روز ۲۴ در رقم فلات علائم بیماری را به صورت مناطق نکروزه شده همراه با نقاط موازی و تیره (پیکنیدی) نشان داد.



شکل ۱. آنالیز تغییرات بیان ژن *PR1* در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی. بارها انحراف از معیار را برای نمونه ها در سه تکرار نشان می‌دهد.

بیان ژن‌های هدف

نتایج حاصل از بررسی بیان پنج ژن مورد مطالعه نشان داد که بیان کمی ژن‌های *Bsi*، *Per*، *PR-1* صرف‌نظر از نوع ژنوتیپ حساس یا مقاوم پس از آلودگی با قارچ افزایش یافت. در رقم حساس فلات میزان بیان ژن *PR-1* در ساعت ۱۲ بعد از آلودگی به بالاترین میزان خود یعنی ۴/۵ برابر رسید. در گیاه مقاوم بلافاصله پس از آلودگی (در زمان صفر) میزان بیان این ژن در بالاترین حد خود قرار دارد که پس از آن در زمان‌های سه و شش پس از آلودگی کاهش یافته و در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ به پایین‌ترین میزان بیان می‌رسد. نمودار بیان ژن *PR-1* در شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی مقایسه‌ای بیان ژن *PR-1* در گیاه حساس و مقاوم نشان می‌دهد که این ژن در گیاه مقاوم دارای سطح بالایی از بیان در زمان صفر بوده که بعد از گذشت زمان این میزان کاهش قابل ملاحظه ای را نشان می‌دهد. در مقابل در گیاه حساس میزان بیان این ژن با گذشت زمان با افزایش معنی‌دارتری روبرو می‌شوند. شکل یک آنالیز بیان ژن *PR-1* را در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی نشان می‌دهد. رونویسی از ژن‌های *PR-1* تنها دارای یک قله است و در مراحل اولیه آلودگی القا می‌شود. همچنین ژن‌های *PR* به شدت در سه ساعت اول بعد از آلوده‌سازی در ارقام مقاوم به *M. graminicola* القا می‌شوند. بر پایه مطالعه الگوی بیان ژن در طول چهار روز اول بعد از آلوده‌سازی نشان شده‌است که سه پروتیین وابسته به بیماریزایی (PR) به نام‌های *PR-1*، *PR-2* و *PR-5* در برگ‌های گیاهان آلوده سه تا دوازده ساعت پس از آلودگی القا شده‌اند (Ray *et al*., 2003). افزایش بیان این ژن علیرغم تفاوت زمان القاء آن در این مطالعه و مطالعه قبلی، می‌تواند نشان‌دهنده اهمیت ژن در پاسخ به بیماری باشد.

بررسی بیان کمی ژن *Per* نشان داد که میزان بیان ژن *Per* در زمان با نوسانات خاص‌تری همراه است (شکل ۲).

میزان بیان این ژن در رقم فلات در ۶ ساعت بعد از آلودگی به ۱۰/۸ به نسبت به نمونه شاهد افزایش داشت و در ساعت ۱۲ به حداکثر میزان بیان خود یعنی ۱۸/۹ نسبت به شاهد رسید ولی بتدریج با افزایش زمان کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان بیان آن مشاهده شد. در رقم مقاوم ونگ شوبای میزان بیان ژن per در گیاه مقاوم در زمان‌های ۳ و ۶ ساعت بعد از آلودگی افزایش بیان را نشان می‌دهد که این افزایش در زمان ۲۴ با کاهشی به حدود نصف نسبت به زمان ۳ ساعت بعد از آلودگی می‌رسد ولی مجدد در زمان ۲۴ ساعت به میزان ۸ فولد نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. مقایسه بیان ژن *Per* در گیاه حساس و مقاوم نشان می‌دهد که سطح بیان ژن در گیاه مقاوم همواره بالا می‌باشد. مطالعات اخیر نشان دادند که ژن‌های کدکننده آنزیم Peroxidase در زمان‌های سه تا ۲۴ پس از آلوده‌سازی و طی واکنش‌های دفاعی بیان می‌شوند (Adhikari *et al*., 2007). نتایج بدست آمده از این تحقیق علاوه بر تایید این نتایج دلیلی بر الگوی بیان وابسته به زمان تلقیح نیز ارائه کرده است.

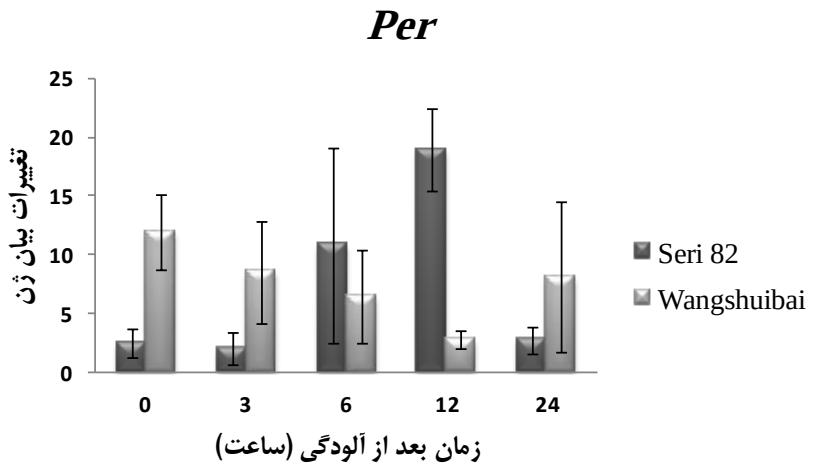
علاوه براین بررسی بیان کمی ژن *Ppi* نیز نشان داد که در رقم فلات میزان بیان ژن *Ppi* دارای یک شیب افزایش بیان کم از زمان ۰ تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی می‌باشد (شکل ۳).

این میزان بیان در ۲۴ ساعت بعد از آلودگی به بالاترین میزان یعنی ۲/۵ برابر نسبت به شاهد می‌رسد. در رقم مقاوم ونگ شوبای میزان بیان ژن *Ppi* نسبت به شاهد افزایش بیان قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد و ۲۴ ساعت بعد از آلودگی دارای افزایش بیان به میزان دو برابر نسبت به شاهد است. مقایسه بیان کمی این ژن در گیاه حساس و مقاوم نشان داد که سطح بیان این ژن در گیاه حساس نسبت به مقاوم دارای افزایش بیان است. تحقیقات اخیر نشان دادند که عملکرد این ژن به عنوان قسمتی از مجموعه انتقال سیگنال است. این تحقیقات نشان دادند علیرغم تاثیر آلودگی به بیماری در

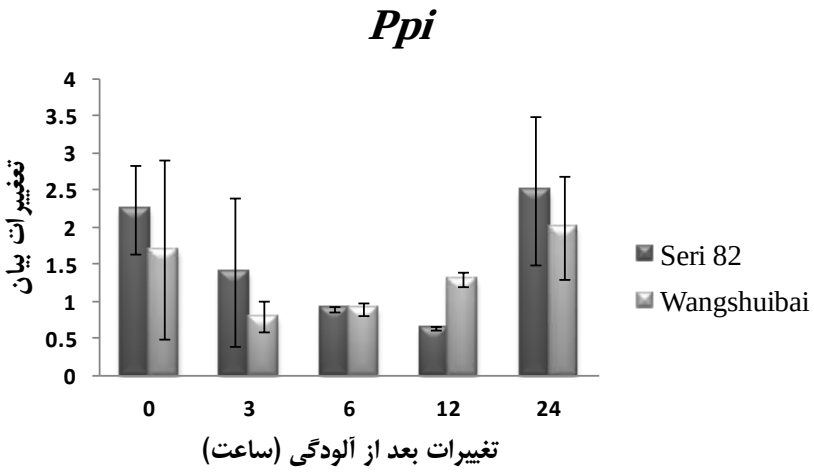
تغییر الگوی بیان این ژن، رفتار ژن مورد نظر در بین گیاهان مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار و همبسته با سطح مقاومت نداشت (Reddy *et al*., 1998).

علاوه بر این بررسی بیان کمی ژن *Msr* نشان داد که افزایش بیان این ژن در رقم حساس فلات در ساعات اولیه آلودگی القاء می‌گردد اما با افرایش زمان پس از آلودگی بیان این ژن کاهش یافت .در رقم مقاوم ونگشوبای نوسانی در افزایش و کاهش بیان دیده شد. بیان این ژن در زمان ۲۴ ساعت بعد از آلودگی تا حدود دو برابر افزایش یافت. مطالعه بیان این ژن در گیاه حساس و مقاوم نشان می‌دهد که در هر دو رقم افزایش بیان پس از آلودگی وجود دارد که می‌تواند نقش مثبت و معنی‌دار این ژن در مقاومت به بیماری باشد. شکل ۴ آنالیز بیان ژن *Msr* را در زمان‌های ۰ تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی نشان می‌دهد.

علیرغم نظرات ارائه شده که نشان دادند این ژن واجد نقش تنظیم‌کنندگی رونویسی است (Alexandrov *et al*., 2006). بر پایه نتایج تحقیق حاضر رفتار این ژن در بین گیاهان مورد مطالعه بیان افتراقی نشان نداد. با این وجود به نظر می‌رسد این ژن نقش موثری در قالب تحقیق انجام شده در پاسخ به سپتوزیوز ندارد.



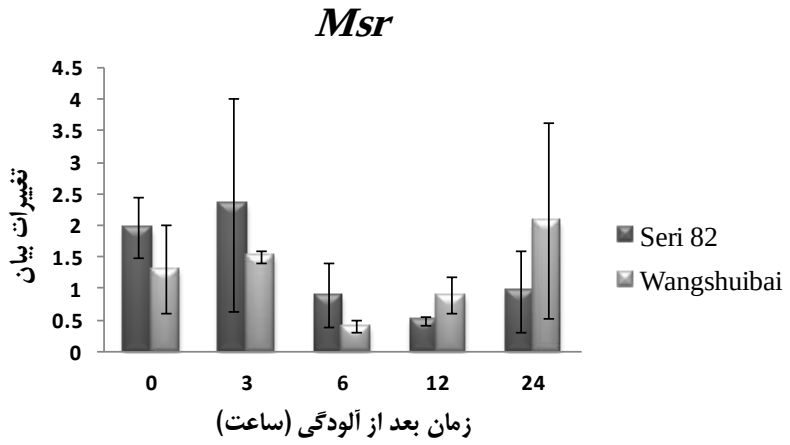
شکل ۲. آنالیز تغییرات بیان ژن *Per* در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی. بارها انحراف از معیار را برای نمونه ها در سه تکرار نشان می‌دهد.



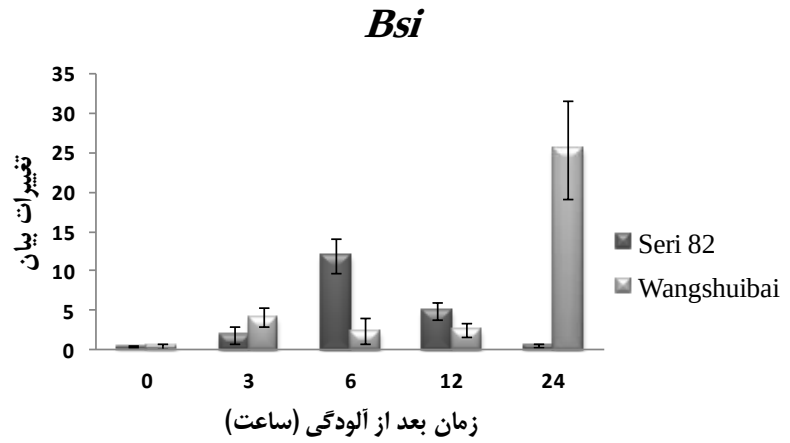
شکل ۳. آنالیز تغییرات بیان ژن *Per* در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی. بارها انحراف از معیار را برای نمونه ها در سه تکرار نشان می‌دهد.

بررسی بیان کمی ژن *Bsi* نشان داد که این ژن در رقم فلات در ساعت ۶ بعد از آلودگی به میزان ۱۱/۹۴ افزایش یافته است این میزان با افزایش زمان به تدریج به نصف کاهش یافت. در رقم ونگشوبای یک افزایش تدریجی از بیان ژن *Bsi* دیده می‌شود و در ساعت ۲۴ به بالاترین میزان بیان خود یعنی ۲۴ برابر نسبت به حالت بدون استرس رسید. شکل ۵ آنالیز بیان ژن را در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی نشان می‌دهد. نشاد داده شده‌است که بیان ژن *Bsi* یک افزایش دیرهنگام داشنه که با نتایج تحقیق حاضر تطابق دارد و می‌تواند بعنوان یکی از ژن‌های کاندیدای در مطالعات آینده مورد استفاده قرار گیرد (Adhikari *et al*., 2007).

امروزه با گسترش تعداد جمعیت که در قرن‌های آینده این تعداد به هشت تا نه میلیارد نفر هم خواهد رسید بحث امنیت غذایی (Food Security) از اهمیت ویژه‌ای برخوردار خواهد بود. با توجه به کم بودن منابع خاکی غنی برای کشاورزی و تنوع و گسترش بیماری‌های گیاهی مختلف با دامنه میزبانی وسیع و تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری، گرما و غیره، افزایش تولید در واحد سطح از اهداف بلندمدت در بحث توسعه پایدار قلمداد خواهد شد.



شکل ۴. آنالیز تغییرات بیان ژن *Per* در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی.
بارها انحراف از معیار را برای نمونه ها در سه تکرار نشان می‌دهد.



شکل ۵. آنالیز تغییرات بیان ژن *Per* در زمان‌های صفر تا ۲۴ ساعت بعد از آلودگی.
بارها انحراف از معیار را برای نمونه ها در سه تکرار نشان می‌دهد.

امروزه علاوه بر روش‌های اصلاح کلاسیک گیاهان، اصلاح ملکولی به عنوان یک راهکار مهم در جهت ایجاد ارقام مقاوم به بیماری و تنش‌هایی مانند شوری و خشکی و غیره به کار می‌روند. با گسترش تکنولوژی جدید در سطح ملکولی امکان شناسایی و تعیین مشخصات ژن‌های موثر در افزایش مقاومت به تنش‌های زنده و غیر زنده با استفاده از راهکارهای ترانسکریپتوم امکان‌پذیر شده است و توان بررسی صد هزار ژن در هر آزمایش را فراهم ساخته است. این راهکارها در حال حاضر و در آینده نزدیک در راه رسیدن به ایجاد ارقام و واریته‌های مناسب جهت افزایش تولید در واحد سطح و ایجاد توسعه پایدار در بخش کشاورزی کارگشا خواهد بود.

سپاسگزاری

از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی جهت تامین منابع مالی این پروژه، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Adhikari TB, Balaji B, Breeden J, Goodwin SB (2007) Resistance of wheat to Mycosphaerella graminicola involves early and late peaks of gene expression. Physiol Mol Plant Pathol. 71: 55-68.

Alexandrov NN, Troukhan ME, Brover VV, Tatarinova T, Flavell RB, Feldmann KA, (2006) Features of Arabidopsis genes and genome discovered using full-length cDNAs. Plant Mol. Biol. 60: 69-85.

Castroagudín VL, Ceresini PC, de Oliveira SC, Reges JT, Maciel JL, Bonato AL, Dorigan AF, McDonald BA (2015) Resistance to QoI fungicides is widespread in Brazilian populations of the wheat blast pathogen Magnaporthe oryzae. Phytopathology. 105: 284-294.

Chassot C, Nawrath C, Métraux JP (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. The Plant Journal. 49: 972-980.

Cools HJ, Fraaije BA (2008) Are azole fungicides losing ground against Septoria wheat disease? Resistance mechanisms in Mycosphaerella graminicola. Pest Manag. Sci. 64: 681-684.

Cowger C, Hoffer M, Mundt C (2000) Specific adaptation by Mycosphaerella graminicola to a resistant wheat cultivar. Plant Pathology. 49: 445-451.

Cowger C, Mundt CC (2002) Aggressiveness of Mycosphaerella graminicola isolates from susceptible and partially resistant wheat cultivars. Phytopathology. 92: 624-630.

Datta J, Nag S, Banerjee A, Mondai N (2009) Impact of salt stress on five varieties of Wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars under laboratory condition. JASEM. 13.

Eyal Z (1981) Integrated control of Septoria diseases of wheat. Plant Dis. 65: 763-768.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiol. 42: 462-468.

Kogel KH, Langen G (2005) Induced disease resistance and gene expression in cereals. Cell Microbiol. 7**:** 1555-1564.

Kruse M, Brunke M, Escher A, Szalay AA, Tropschug M, Zimmermann R (1995) Enzyme assembly after de novo synthesis in rabbit reticulocyte lysate involves molecular chaperones and immunophilins. J Biol Chem. 270**:** 2588-2594.

Kumar P, Yadava R, Gollen B, Kumar S, Verma RK, Yadav S (2011) Nutritional contents and medicinal properties of wheat: a review. Life Sci Med Res. 22: 1-10.

Lawrence PK, Koundal KR (2002) Plant protease inhibitors in control of

phytophagous insects. EJB. 5: 5-6.

Moskovitz J, Poston JM, Berlett BS, Nosworthy NJ, Szczepanowski R, Stadtman ER (2000) Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) and its substrate stereospecificity. J Biol Chem. 275: 14167-14172.

Moud AM, Maghsoudi K (2008) Salt stress effects on respiration and growth of germinated seeds of different wheat (Triticum aestivum L.) cultivars. World J. Agric. Sci. 4: 351-358.

Odjakova M, Hadjiivanova C (2001) The complexity of pathogen defense in plants. Bulg. J. Plant Physiol. 27: 101-109.

Przymusiński R, Rucińska R, Gwóźdź E (2004) Increased accumulation of pathogenesis-related proteins in response of lupine roots to various abiotic stresses. Environ Exp Bot. 52: 53-61.

Ray S, Anderson JM, Urmeev FI, Goodwin SB (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen Mycosphaerella graminicola. Plant Mol Biol. 53: 741-754.

Reddy RK, Kurek I, Silverstein AM, Chinkers M, Breiman A, Krishna P (1998) High-molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. Plant Physiol. 118: 1395-1401.

Schmid FX (1995) Protein folding: Prolyl isomerases join the fold. Curr Biol. 5: 993-994.

Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant ‘pathogenesis-related’proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie. 75: 687-706.