

## Evaluation of the effect of *Iranian johenson grass mosaic virus* infection on some morphological and phenological traits of twelve maize hybrids

Saeedeh Alvani Jami<sup>1</sup>, Saeed Nasrollanejad<sup>2</sup>(ORCID: 0000000283890146), Leila Fahmideh<sup>3</sup>

1. Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

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

Correspondence:

Saeed Nasrollanejad

Email: [snasrollanejad@gau.ac.ir](mailto:snasrollanejad@gau.ac.ir)

Received: 13, Nov. 2024

Accepted: 28, Dec. 2024

### How to cite:

Alvani Jami, S., Nasrollanejad, S., & Fahmideh, L. (2024). Evaluation of the effect of *Iranian johenson grass mosaic virus* infection on some morphological and phenological traits of twelve maize hybrids. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 1-17. (DOI: [10.30473/cb.2024.72778.1989](https://doi.org/10.30473/cb.2024.72778.1989))

### ABSTRACT

Corn (*Zea mays*) belongs to Poaceae family. In recent years, the cultivated area and its uses have increased rapidly in most countries of the world. The *Iranian johenson grass mosaic virus* is one of the most important potyviruses of cereals, and the most effective way to combat it is to use resistant cultivars. In the present study, the response of 12 corn hybrids to this virus was investigated using a randomized complete block design. The extract of infected plants was inoculated mechanically on the leaves of corn hybrids at the four-leaf stage. Indirect ELISA test and RT-PCR test were performed using specific primers in order to ensure infection of the samples using *IJMV* specific antibody. One month after inoculation, notes were taken of phonological and morphological characteristics and measurements of the severity and percentage of infection showed significant differences between treatments. The results of the indirect ELISA test showed that the inoculated samples reacted positively with the virus. After performing the RT-PCR test, the amplification of a fragment of 327 base pairs in the inoculated samples indicated the presence of *IJMV*. By examining all traits, especially the severity and percentage of infection and yield, the hybrids were categorized. So that hybrids No. 3 and 4 (KLM78023/35-1-1-1-1× MO17 and K47/2-2-1-4-1-1-1 x K18) were more susceptible to *IJMV* virus, but hybrids No. 5 and 12 (KSC 705 and K47/2-2-1-2-2-1-1-1× K18 (KSC715) were relatively resistant or tolerant to the virus. Therefore, they are recommended for use in future corn breeding work.

### KEYWORDS

Resistance to the virus, *Iranian Johnson grass mosaic virus*, Maize hybrids.



## «مقاله پژوهشی»

# ارزیابی تاثیر آلودگی ویروس موزائیک ایرانی قیاق روی برخی صفات مورفولوژی و فنولوژی دوازده هیبرید ذرت

سعیده الوانی جامی<sup>۱</sup>، سعید نصرالله نژاد<sup>۲</sup> (ارکید: ۲۸۳۸۹-۱۴۶)، لیلا فهمیده<sup>۳</sup>

### چکیده

ذرت (*Zea mays*) از خانواده *Poaceae* است. در سال‌های اخیر سطح زیر کشت و موارد مصرف آن در اغلب کشورهای جهان به سرعت افزایش یافته است. ویروس موزائیک ایرانی قیاق یکی از مهم‌ترین پوتی‌ویروس‌های غلات است و مؤثرترین روش مبارزه با آن استفاده از ارقام مقاوم است. در پژوهش حاضر واکنش ۱۲ هیبرید ذرت نسبت به ویروس موزائیک ایرانی قیاق، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره گیاهان آلوده روی برگ هیبریدهای ذرت، در مرحله چهار برگ، به صورت مکانیکی مایه‌زنی گردید. آزمون الایزای غیرمستقیم و آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی به منظور اطمینان از آلودگی نمونه‌ها انجام شد. یک ماه پس از مایه‌زنی، یادداشت برداری از ویژگی‌های فنولوژی و مورفولوژی و اندازه‌گیری میزان شدت و درصد آلودگی صورت گرفته نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین تیمارها بود. نتایج ارزیابی آزمون الایزای غیرمستقیم نشان داد که نمونه‌های مایه‌زنی شده با ویروس واکنش مثبت نشان دادند. پس از انجام آزمون RT-PCR، تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۳۲۷ جفت باز در نمونه‌های مایه‌زنی شده، نشان دهنده حضور ویروس موزائیک ایرانی قیاق بود. با بررسی تمام صفات به‌ویژه شدت، درصد آلودگی و میزان عملکرد اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد و هیبریدها دسته بندی شدند. به طوریکه هیبریدهای شماره ۳ و ۴ (KLM78023/35-1-1-1) تیمارهای ۱-1-1 × MO17 و ۱-1-1 × K18 (K47/2-2-1-4-1-1-1) نسبت به ویروس IJMV حساس‌تر بوده ولی هیبریدهای شماره ۵ و ۱۲ (KSC 705) و ۱-1-1 × K18 (KSC715) (K47/2-2-1-2-2-1-1-1) در مقابل ویروس مذکور نسبتاً مقاوم و یا متحمل بودند، بنابراین برای استفاده در کارهای به‌نژادی ذرت در آینده معرفی می‌شوند.

### واژه‌های کلیدی

مقاومت به ویروس، ویروس موزائیک ایرانی قیاق، هیبریدهای ذرت.

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. دانشیار گروه اصلاح نباتات و بیوتکنولوژی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

نویسنده مسئول:

سعید نصرالله نژاد

رایانامه: snasrollanejad@gau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۸

### استناد به این مقاله:

الوانی جامی، سعیده؛ نصرالله نژاد، سعید و فهمیده، لیلا (۱۴۰۳). ارزیابی تاثیر آلودگی ویروس موزائیک ایرانی قیاق روی برخی صفات مورفولوژی و فنولوژی دوازده هیبرید ذرت، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۲)، ۱-۱۷.

(DOI: 10.30473/cb.2024.72778.1989)



## مقدمه

ذرت (*Zea mays*) از خانواده Poaceae است. ذرت که به انگلیسی کورن و در زبان فرانسه و آلمانی مایز نام دارد، بومی آمریکای مرکزی و جنوبی بوده و سابقه کاشت آن در کشورهای مختلف جهان چندان طولانی نیست. اما در سال‌های اخیر سطح زیر کشت و موارد مصرف آن در اغلب کشورهای جهان به سرعت افزایش پیدا نموده است. این گیاه سومین غله جهان می‌باشد که از لحاظ میزان تولید بعد از گندم در رتبه دوم و از نظر سطح زیر کشت، مکان سوم را بعد از گندم و برنج دارد (FAO, 2020).

ذرت میزبان طبیعی بیش از ۵۰ نوع ویروس است (Zambrano et al, 2014). ویروس موزائیک ایرانی قیاق<sup>۱</sup> (IJMV) یکی از مهم‌ترین پوتی‌ویروس‌های غلات در ایران می‌باشد (Masumi et al, 2018) که اولین بار توسط Izadpanah (1982) از روی قیاق و از شیرازو پس از آن از روی ذرت، سورگوم و قیاق دارای علائم موزائیکی از دیگر مناطق کشور گزارش شد (Afsharifar and Izadpanah, 1991; Izadpanah and Kamran, 1995; Moini and Izadpanah, 2001; Masumi Afsharifar and Izadpanah, 1995). سپس Izadpanah (1991) با مطالعه روی عامل موزائیک ذرت در منطقه بید زرد (شیراز) آن را پوتی‌ویروس معرفی کردند. ابتدا به دلیل واکنش خفیف IJMV با آنتی‌سرم -SCMV D از آمریکا، آن را به‌عنوان سویه‌ای از SCMV تحت عنوان SCMV-MS (maize shiraz mosaic virus-) (Afsharifar and Izadpanah, 1991). تحقیقات بعدی نشان داد -SCMV MS ارتباطی با گونه SCMV ندارد و از میان پوتی‌ویروس‌های گزارش شده از غلات تنها با ویروس موزائیک ذرت (*Zea mosaic virus*, ZeMV) از فلسطین اشغالی قرابت دارد و میزان تشابه آنها کمتر از حد تمایز بین گونه است و بنابراین به‌عنوان گونه جدید، IJMV نامیده شد (Masumi and Izadpanah, 2000). قیاق منبع اصلی این ویروس است و ذرت و سورگوم میزبان‌های زراعی آن می‌باشند و علائم موزائیک روی

قیاق عمدتاً مربوط به آلودگی به IJMV است (Zare et al, 2018; Masumi et al, 2018).

پوتی‌ویروس‌های غلات ویروس‌هایی رشته‌ای از خانواده گندمیان در جنس پوتی‌ویروس و خانواده پوتی‌ویریده گفته می‌شود که گسترش وسیعی در دنیا دارند و خسارات زیادی به غلات وارد می‌کنند. این گروه بر اساس ویژگی‌های سرولوژیکی پروتئین پوششی تا مدت‌ها شامل چهار ویروس موزائیک کوتولگی ذرت (MDMV)، ویروس موزائیک نیشکر (SCMV)، ویروس موزائیک سورگوم (SrMV) و ویروس موزائیک قیاق (JgMV) بود (Shukla, 1989). بعدها ویروس موزائیک ذرت (ZeMV) از اسرائیل و ویروس موزائیک پنی‌ستوم (PeMV) از چین، ویروس موزائیک ایرانی قیاق (IJMV)، ویروس موزائیک مرغ (BGMV) و ویروس موزائیک جنوبی مرغ (SBGMV) به این گروه اضافه شدند، SCMV اولین ویروس از این گروه بود که در سال ۱۹۱۹ روی نیشکر و در سال ۱۹۶۳ در ذرت گزارش شد (Fan et al, 2003). در ایران این ویروس اولین بار در سال ۱۳۷۲ از خوزستان گزارش شد (Amiri and Izadpanah, 1993).

استفاده از ارقام مقاوم در جهت مدیریت بیماری‌ها، با توجه به مزیت‌های فراوانی که دارد، امروزه دغدغه بسیاری از کشورها می‌باشد. با توجه به گسترش کشت ذرت در استان گلستان و نیز افزایش علائم بیماری‌های ویروسی آن، بررسی واکنش ارقام و یا هیبریدهای مختلف ذرت به ویروس IJMV که دارای پراکنش وسیعی در مزارع ذرت استان گلستان می‌باشد، امری ضروری است. بر همین اساس در پژوهش حاضر واکنش ۱۲ هیبرید ذرت نسبت به ویروس موزائیک ایرانی قیاق براساس بررسی برخی صفات مهم مورفولوژیکی و فنولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفت.

## روش‌شناسی پژوهش

این پژوهش در مزرعه ایستگاه تحقیقاتی کشاورزی عراقی محله که در ناحیه شمال شرقی ایران (ارتفاع از سطح دریا ۵/۵ متر) و دارای عرض جغرافیایی ۳۶/۸۵ درجه و ۵۵ دقیقه، طول جغرافیایی ۵۴/۲۷ درجه ۲۰ دقیقه می‌باشد

1. Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV

انجام شد. به منظور بررسی عکس العمل هیبریدهای ذرت نسبت به ویروس موزائیک ایرانی قیاق، آزمایش حاضر در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار و در دو شرایط آلودگی با ویروس IJMV و عدم آلودگی با ویروس (شاهد) انجام شد.

### مواد گیاهی

در این تحقیق از هیبریدهای موجود در بانک بذر مرکز تحقیقات و آموزش استفاده شد، نام این هیبریدها در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. اسامی هیبریدهای مورد بررسی ذرت

Table 1. The names of corn hybrids investigated

| شماره هیبریدها    | نام هیبریدها                       |
|-------------------|------------------------------------|
| Number of hybrids | Names of hybrids                   |
| 1                 | KLM77021/4-1-2-1-2-4-1 × MO17      |
| 2                 | KLM78027/2-1-3-1-1-1 × K18         |
| 3                 | K47/2-2-1-4-1-1-1 × K18            |
| 4                 | KLM78023/35-1-1-1-1-1 × MO17       |
| 5                 | K47/2-2-1-2-2-1-1-1 × K18 (KSC715) |
| 6                 | KLM77012/4-1-1-5-1-2-1 × MO17      |
| 7                 | K47/2-2-1-2-2-1-1-1 × K166B        |
| 8                 | KLM75010/4-4-1-2-1-1-1 × MO17      |
| 9                 | KLM77002/10-1-1-1-1-3-1 × K18      |
| 10                | KLM78018/6-1-1-1-3-2 × K18         |
| 11                | KSC 704                            |
| 12                | KSC 705                            |

### کشت بذور و عملیات داشت

هر کرت شامل ۴ ردیف کاشت به طول ۵/۶۰ متر و نیز فاصله ردیف‌ها ۷۵ سانتی‌متر و فاصله بوته‌ها روی ردیف ۱۷/۵ سانتی‌متر در نظر گرفته شد. هیبریدهای مورد ارزیابی هر کدام در یک کرت شامل ۶ ردیف ۱۶ کپه‌ای کشت شد. یک ردیف بعنوان ردیف مورد آزمایش، ۴ ردیف به‌عنوان بادشکن و یک ردیف نیز بعنوان شاهد. طول ردیف‌های کاشت ۵/۶۰ متر، فاصله ردیف‌ها ۷۵ سانتی‌متر و فاصله کپه‌ها ۱۷/۵ سانتی‌متر بود. در هر کپه ۴ بذر کشت شد و در زمان ۳-۵ برگه شدن بوته‌ها، بوته‌های اضافی تنک و فقط دو بوته در هر کپه نگهداری شد. جهت کنترل علف‌های هرز و چین دستی صورت گرفت و جهت کنترل آفات هر دو هفته یکبار کرت‌ها با سم مالاتیون سمپاشی گردید.

### منبع ویروس و فرآیند انتقال ویروس

در این تحقیق، جهت مایه‌زنی هیبریدها از قسمت‌های مختلف گیاه محک (ارزن مرواریدی) به ویروس موزائیک کوتولگی ذرت که در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه شیراز تهیه گردید، گرفته شد. پس از انتخاب بافت‌های آلوده مناسب و همگن‌سازی<sup>۱</sup> آن‌ها با استفاده از هاون چینی سرد، مایه ویروس تهیه شد. با توجه به ماهیت IJMV که دارای قابلیت انتقال مکانیکی از طریق عصاره شیره گیاهی می‌باشد، در کلیه مراحل، مایه‌زنی به طریق مکانیکی انجام شد.

### منبع و آماده‌سازی مایه تلقیح

مایه تلقیح ویروس برای مایه‌زنی و انتقال عصاره از برگ‌های جوان گیاه محک سورگوم پیام که قبلاً ویروس IJMV خالص سازی شده بود که حاوی غلظت بالاتری از ویروس (OD=۲/۷) داشتند و علایم آلودگی ویروسی را خوب نشان دادند، انتخاب شد. پس از انتخاب بافت‌های آلوده مناسب و همگن‌سازی آن‌ها با استفاده از هاون چینی سرد، مایه ویروس تهیه گردید. بدین منظور از بافت گیاه مذکور آلوده به ویروس موزائیک ایرانی قیاق، در ۵ برابر حجم بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار، pH ۷، در هاون سترون عصاره‌گیری شد. عصاره با استفاده از پارچه لملل به داخل ظرفی مناسب صاف گردید و سپس تا موقع مصرف در داخل ظرف یخ قرار داده شد. عصاره‌ی به‌دست آمده روی برگ گیاهان مورد مطالعه که قبلاً با کاربوراتوم گردپاشی شده بودند، در مرحله چهاربرگی، به‌صورت مکانیکی مایه‌زنی شد (از هر تیمار ۳ بوته و جمعاً ۱۲ بوته از هر تیمار). به نحوی که انگشت آغشته شده به مایه تلقیح ویروسی به آرامی بر روی سطح دو برگ از گیاه کشیده شد. برگ‌های مایه‌زنی شده زیر جریان ملایم آب شسته شدند. در تیمار شاهد (۱۲ بوته)، گیاهانی که پودر کربوراتوم روی آنها پاشیده شده بود، به‌عنوان شاهد منفی تنها با محلول فسفات پتاسیم مایه‌زنی شدند. غلظت ویروس جهت مایه‌زنی (۱۳۸/۵) طبق فرمول  $C = \frac{OD}{E}$  محاسبه شد. در این فرمول C غلظت ویروس، OD میزان

1. Homogenization

برای هر جفت آغازگر (دمای اتصال به تناسب هر جفت آغازگر مطابق جدول ۴) و بسط آغازگر در ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و به علاوه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه بود.

## جدول ۲. مواد مورد نیاز برای واکنش نسخه برداری معکوس

Table 2. Required materials of the reverse transcription reaction

| نوع ماده<br>Type of material                           | مقدار مواد در هر واکنش ۵۰ میکرولیتری (میکرولیتر)<br>The amount of material per reaction is 50 $\mu$ M ( $\mu$ M) |
|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| dNTPs (10 mM)                                          | 2                                                                                                                |
| DTT (Dithiothreitol) (100 mM)                          | 2                                                                                                                |
| Mmulv RT buffer (5x)                                   | 10                                                                                                               |
| Reverse Primer (RCF1) 10 $\mu$ M                       | 3                                                                                                                |
| Mmulv Reverse Transcriptase (200U/ $\mu$ l)(Fermentas) | 1                                                                                                                |
| Deionized water                                        | 32                                                                                                               |

## جدول ۳. مواد مورد نیاز در واکنش PCR

Table 3. Materials needed in PCR reaction

| نوع ماده<br>Type of material      | مقدار مواد در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری (میکرولیتر)<br>The amount of material per reaction is 25 $\mu$ M ( $\mu$ M) |
|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Taq buffer (10x)                  | 2.5                                                                                                              |
| MgCl <sub>2</sub> (50 mM)         | 0.75                                                                                                             |
| dNTPS (10 mM)                     | 0.5                                                                                                              |
| Primer-forward (10 $\mu$ M)       | 1                                                                                                                |
| Primer-reverse (10 $\mu$ M)       | 1                                                                                                                |
| Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) | 0.25                                                                                                             |
| cDNA                              | 2                                                                                                                |
| Deionized water                   | 17                                                                                                               |

## جدول ۴. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR و دمای اتصال آن‌ها

Table 4. Primers used in PCR reaction and their binding temperature

| نام آغازگر<br>Primer name | توالی<br>Sequence                            | دمای اتصال ( )<br>Annealing temperature (°C) |
|---------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Oligo1n                   | Forward 5'-ATg gTH Tgg TgY ATH gAR AAY gg-3' | 55                                           |
| Oligo2n                   | Reverse 5'-TgC TgC KgC YTT CAT YTg-3'        | 55                                           |

کدهای دژنر: H=(A/C/T) و K=(G/T), Y=(C/T), R=(A/G)

## تهیه ی ژل و انجام الکتروفورز برای بررسی نتایج

### آزمون PCR

از الکتروفورز ژل آگاروز یک درصد برای بررسی نتایج آزمون PCR استفاده شد. پس از انجام الکتروفورز، ژل مربوطه بر روی صفحه UV Transilluminator مورد بررسی قرار

جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و E ضریب جذب که برای ویروس‌های خانواده پوتی‌ویریده برابر با ۲/۷ است، بدست آمد (Clark and Adams, 1977).

## آزمون الیزای غیرمستقیم (Indirect ELISA)

به منظور تعیین غلظت ویروس و اطمینان از آلوده بودن نمونه‌های تلقیح شده با عصاره گیاه آلوده به IJMV از آزمون الایزای غیرمستقیم با آنتی‌بادی IgG-IJMV استفاده گردید. مراحل این آزمون با اصلاحاتی در روش Clark and Adams (1977) انجام شد. بدین صورت که در آزمون الایزا با توجه به میزان جذب عصاره برگ سالم (کنترل منفی) با استفاده از فرمول  $X+3 SD$ ، آستانه جذب گیاهان آلوده تعیین گردید. در این فرمول، X میانگین جذب و SD انحراف معیار چاهک‌های حاوی نمونه سالم است.

## تهیه cDNA و آزمون RT-PCR

تهیه cDNA از RNA ویروسی مستلزم آزاد شدن RNA از پوشش پروتئینی و استفاده از روش نسخه برداری معکوس<sup>۱</sup> می‌باشد. RNA ویروس مورد مطالعه توسط کیت mRNA capture استخراج شد. پس از استخراج RNA با استفاده از الکتروفورز ژل آگاروز مورد بررسی قرار گرفت. آر ان ای به دام افتاده در واکنش نسخه برداری معکوس تبدیل به cDNA می‌شود. برای همین منظور جهت تهیه cDNA، مخلوط واکنش نسخه برداری معکوس طبق جدول ۲ به میکروتیوب اضافه شد و به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی گراد نگهداری شد. از محصول واکنش نسخه برداری معکوس در واکنش PCR استفاده گردید.

برای انجام واکنش PCR (دستگاه Thermocycler شرکت اپندورف) از ترکیبات لازم طبق جدول ۳ و آغازگرهای جدول ۴ (Seifers et al., 2000) استفاده شد. برنامه PCR متشکل از یک چرخه ی ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه به منظور واسرشته سازی اولیه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال به مدت ۴۵ ثانیه در دمای مناسب

1. Reverse Transcriptase, RT

گرفت و از آن عکسبرداری شد و با کمک مارکهای مخصوص اندازه قطعه تکثیر شده تخمین زده شد.

#### نمونه برداری و اندازه گیری صفات

یک ماه پس از مایه زنی هیبریدهای ذرت به ویروس IJMV یادداشت برداری های مورد نیاز از مراحل مختلف رشد و نمو (تعداد روز از سبز شدن تا ظهور کاکل، تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک، تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک) و اندازه گیری های مربوط به خصوصیات مورفولوژیکی هیبریدها مانند ارتفاع بوته و ارتفاع بلال و پس از برداشت نیز اندازه گیری های مربوط به تعداد دانه در هر ردیف، تعداد ردیف دانه، قطر بلال، قطر چوب بلال، عمق دانه، وزن هزار دانه، عملکرد بلال و عملکرد در هر کرت انجام شد. همچنین صفاتی چون شدت و درصد آلودگی نیز محاسبه شد (جدول ۵).

#### جدول ۵. لیست صفات اندازه گیری در پژوهش حاضر به همراه علائم اختصاری

**Table 5.** The list of characteristics measured in the present study along with abbreviations

| شماره | نام صفت                                                                       | کد    |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------|-------|
| No.   | Adjective                                                                     | Code. |
| 1     | تعداد روز از سبز شدن تا ظهور کاکل                                             | DGEE  |
|       | The number of days from germination to the appearance of the crown            |       |
| 2     | تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک                                    | DEEM  |
|       | The number of days from the appearance of the crown to physiological maturity |       |
| 3     | تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک                                      | DGM   |
|       | The number of days from germination to maturity                               |       |
| 4     | ارتفاع بوته                                                                   | PH    |
|       | Plant height                                                                  |       |
| 5     | ارتفاع بلال                                                                   | CH    |
|       | Cob height                                                                    |       |
| 6     | تعداد ردیف دانه در بلال                                                       | SRC   |
|       | The number of seed rows in the cob                                            |       |
| 7     | تعداد دانه در هر ردیف بلال                                                    | SPRC  |
|       | The number of seeds in per row of cob                                         |       |
| 8     | قطر بلال                                                                      | CD    |
|       | Cob diameter                                                                  |       |
| 9     | قطر چوب بلال                                                                  | CWD   |
|       | Cob wood diameter                                                             |       |
| 10    | عمق دانه                                                                      | SD    |
|       | Seed depth                                                                    |       |
| 11    | وزن هزار دانه                                                                 | WS    |
|       | The weight of 1000 seeds                                                      |       |
| 12    | عملکرد کرت                                                                    | Y     |
|       | Yield                                                                         |       |
| 13    | شدت آلودگی                                                                    | SI    |
|       | Severity of infection                                                         |       |
| 14    | درصد آلودگی                                                                   | PI    |
|       | Percentage of infection                                                       |       |

#### سنجش شدت بیماری

جهت اندازه گیری شدت علائم بیماری ایجاد شده در گیاهان آلوده (با استفاده از الگوی ۱۱ شماره ای جدول ۶)، از روش Verrier *et al.* (2001) با فرمول زیر استفاده شد:

$$= 100 \times \frac{(\text{تعداد برگ} \times \text{نمره آلودگی})}{\text{بالاترین نمره} \times \text{تعداد کل برگها}} = \text{شدت علائم}$$

#### جدول ۶. الگوی ۱۱ شماره ای جهت ارزیابی میزان بازدارندگی

عصاره های استفاده شده روی موزائیک ایرانی قیاق

**Table 6.** The number pattern to evaluate the inhibition rate of the extracts used on the Iranian johonson grass mosaic virus

| درجه علائم         | شرح علائم                                                                        |
|--------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| Degree of symptoms | Description of symptoms                                                          |
| 0                  | گیاه سالم<br>Healthy plant                                                       |
| 1                  | موزائیک خفیف<br>Mild mosaic                                                      |
| 3                  | موزائیک<br>Mosaic                                                                |
| 5                  | موزائیک شدید<br>Sever mosaic                                                     |
| 7                  | یک تا دو برگ دارای رگبرگ های نکروتیک<br>One to two leaves with necrotic veins    |
| 9                  | سه تا پنج برگ دارای رگبرگ های نکروتیک<br>Tree to five leaves with necrotic veins |
| 11                 | نکروز ساقه<br>Stem necrosis                                                      |

#### تجزیه و تحلیل داده ها

پس از اتمام آزمایش برای ثبت داده ها از نرم افزار Excel استفاده شد. در ادامه تجزیه واریانس داده ها بر اساس طرح بلوک های کامل تصادفی، مقایسه میانگین با روش حداقل اختلاف معنی دار (LSD) و تجزیه خوشه ای با استفاده از نرم افزارهای SAS و SPSS انجام شد.

#### یافته های پژوهش

##### ارزیابی نتایج مایه زنی IJMV به گیاهان تیمار

نتایج ارزیابی آزمون الایزای غیر مستقیم (شکل ۱) نشان داد که نمونه های مایه زنی شده با ویروس واکنش مثبت نشان دادند.



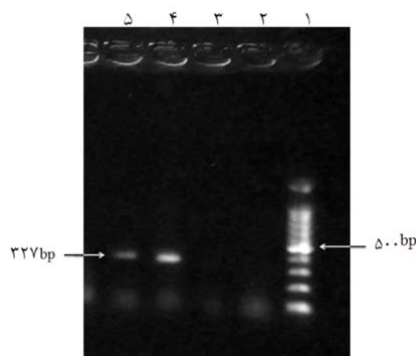
**شکل ۲.** علائم ایجاد شده توسط ویروس موزائیک ایرانی قیاق روی (الف) برگ قیاق و (ب) ذرت.

**Figure 2.** Symptoms caused IJMV on (a) Johnson grass leaves and (b) maize.



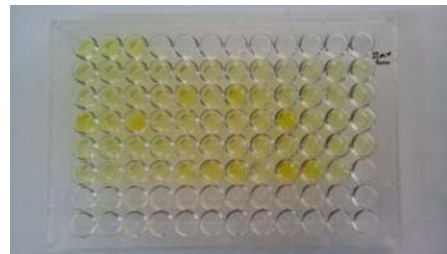
**شکل ۳.** علائم موزائیک ایجاد شده در نتیجه تلقیح مکانیکی IJMV روی هیبریدهای ذرت.

**Figure 3.** Mosaic symptoms resulting from mechanical inoculation of IJMV on maize hybrids.



**شکل ۴.** نتایج واکنش PCR در ژل آگارز: چاهک ۱ نشانگر 100bp، GenRuler™ 100bp DNA Ladder از شرکت Fermentas، چاهک ۲ و ۳ نمونه‌های شاهد و چاهک ۴ و ۵ به ترتیب قطعات تکثیر شده مربوط به IJMV جدا شده از هیبریدهای تیمار شده.

**Figure 4.** Results of PCR reaction in agarose gel: well 1, 100bp marker, GenRuler™ 100bp DNA Ladder from Fermentas, wells 2 and 3, control samples, and wells 4 and 5, respectively, amplified fragments related to IJMV isolated from treated hybrids.



**شکل ۱.** نتایج آلودگی نمونه‌های ذرت در پلیت الایزای غیر مستقیم (چاهک رنگی واکنش مثبت و چاهک بی‌رنگ واکنش منفی بوده است).

**Figure 1.** The results of the contamination of the corn samples in the indirect ELISA plate (the colored well has a positive reaction and the colorless well has a negative reaction).

علائم گیاهان آلوده به IJMV به صورت موزائیک و نوارهای زرد رنگ به موازات برگ‌ها و نیز نکروز قرمز رنگ به ویژه در سورگوم بود (شکل ۲). این علائم بطور معمول از قاعده برگ‌ها شروع شده و به سمت نوک برگ ادامه پیدا می‌کند. در برخی نمونه‌های قیاق دارای علائم موزائیک مشاهده شد که افزایش دمای هوا موجب کاهش شدت علائم در برگ‌ها می‌شود. نمونه‌هایی با علائم موزائیک به صورت نقطه نقطه در پهنک برگ و نیز زردی پهنک برگ و یا رگبرگ‌ها در آزمون الایزا واکنش منفی نشان دادند. علائم کمبود آهن در ذرت به صورت راه راه شدن برگ ظاهر می‌شود که در این مورد رگبرگ‌ها سبز و فواصل بین آن‌ها زرد رنگ و منظم خواهد بود. گاهی ممکن است این علائم با علائم ناشی از موزائیک نواری اشتباه گرفته شوند. علائم آلودگی ویروس پس از یک ماه به صورت موزائیک نواری روی برگ‌های مایه‌زنی شده قابل مشاهده بود (شکل ۳).

#### نتایج آزمون RT-PCR و الکتروفورز

به منظور اطمینان از آلوده شدن هیبریدهای ذرت تیمار شده، با استفاده از جفت آغازگرهای عمومی پوتی ویروس‌ها، Oligo1n و Oligo2n، بخشی از پروتئین پوششی ویروس به روش (Ghorbani et al., 2024) تکثیر شد. پس از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد، مشاهده قطعه‌ای در محدوده ۳۲۷ جفت باز تکثیر بخشی از پروتئین پوششی ویروس را تأیید کرد (شکل ۴).

### نتایج حاصل از ارزیابی صفات مورد بررسی در شرایط

#### بدون آلودگی و شرایط آلودگی به ویروس IJMV

در شرایط بدون آلودگی نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به تعداد روز از سبز شدن تا ظهور کاکل، ارتفاع بوته، تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک، تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک، تعداد دانه در هر ردیف بلال و وزن هزار دانه نشان داد که بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۷).

در شرایط آلودگی به ویروس، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به تعداد روز از سبز شدن تا ظهور کاکل، ارتفاع بوته و ارتفاع بلال بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش مشاهده نشد (جدول ۸).

#### ارتفاع بلال

در شرایط بدون آلودگی نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌ها نشان داد (جدول ۷) که این صفت در بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. همچنین نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به این صفت نشان

داد (جدول ۹) که بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدها مورد آزمایش، به هیبرید شماره‌ی ۱۲ با ارتفاع بلال ۱۳۱ سانتی‌متر و کم‌ترین مقدار این صفت به هیبرید شماره‌ی ۶ با ارتفاع بلال ۱۰۳ سانتی‌متر تعلق داشت. در شرایط آلودگی به ویروس، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به ارتفاع بلال در بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، مشاهده نشد (جدول ۸).

#### تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک

در شرایط بدون آلودگی، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، مشاهده نشد (جدول ۷). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک در جدول ۱۰ آمده است. بیش‌ترین مقدار این صفت در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش، با ۶۱ روز، به هیبرید شماره‌ی ۸ تعلق داشت. همچنین کم‌ترین مقدار این صفت متعلق به هیبریدهای شماره‌ی ۱۰، ۶ و ۲ به ترتیب با ۵۳، ۵۳/۵ و ۵۵ روز زمان بود.

### جدول ۷. تجزیه‌ی واریانس صفات مورد مطالعه بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط بدون آلودگی

**Table 7.** The analysis of variance of the studied traits between 12 corn hybrids under control conditions

| Y            | WS        | SD      | CWD      | CD       | SPRC     | SRC     | CH       | SPRC     | DGM     | DEEM    | DGEE     | درجه آزادی<br>DF | منابع تغییرات<br>SOV                     |
|--------------|-----------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|----------|---------|---------|----------|------------------|------------------------------------------|
| 108940.9 ns  | 2817.3 ns | 0.42 ns | 1.491 ns | 2.385 ns | 8.34 ns  | 1.86 *  | 179.3 ns | 752.3 ns | 3.94 ns | 6.74 ns | 0.854 ns | 3                | بلوک<br>Block                            |
| 1894824.8 ** | 2383.4 ns | 0.875 * | 5.583 ** | 13.58 ** | 11.55 ns | 4.93 ** | 273.2 *  | 619.5 ns | 7.10 ns | 7.27 ns | 0.702 ns | 11               | هیبرید<br>Hybrid                         |
| 497766.7     | 2570.7    | 0.524   | 1.598    | 3.017    | 11.26    | 0.942   | 151.8    | 739      | 7.71    | 9.30    | 1.41     | 33               | اشتباه آزمایش<br>Experiment error        |
| 15.54        | 15.88     | 6.80    | 4.90     | 6.68     | 9.95     | 6.50    | 10.51    | 11.01    | 2.56    | 5.52    | 2.24     | -                | ضریب تغییرات<br>Coefficient of variation |

ns, \* and \*\*: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively.

### جدول ۸. تجزیه‌ی واریانس صفات مورد مطالعه بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط آلودگی به IJMV

**Table 8.** The analysis of variance of the studied traits between 12 corn hybrids under IJMV infection conditions

| Y            | WS       | SD        | CWD      | CD      | SPRC    | SRC      | CH       | SPRC     | DGM     | DEEM     | DGEE    | درجه آزادی<br>DF | منابع تغییرات<br>SOV                     |
|--------------|----------|-----------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|---------|----------|---------|------------------|------------------------------------------|
| 220208.3 ns  | 28185 ** | 0.1507 ns | 1.386 ns | 3.54 ns | 11.7 ns | 2.977 *  | 22082 ** | 5678.5 * | 4.75 ns | 11.5 ns  | 2083 ns | 3                | بلوک<br>Block                            |
| 4064753.7 ** | 10003 *  | 2.602 *   | 6.821 ** | 1850 ** | 20.09 * | 5.549 ** | 378.6 ns | 16846 ns | 19.03 * | 23.72 ** | 1796 ns | 11               | هیبرید<br>Hybrid                         |
| 558996.2     | 573.5    | 0.823     | 0.854    | 3.708   | 10.33   | 1.13     | 349.5    | 1357.6   | 8.31    | 8.46     | 1.416   | 33               | اشتباه آزمایش<br>Experiment error        |
| 18.30        | 7.51     | 8.92      | 3.63     | 4.20    | 10.03   | 7.24     | 17.10    | 16.63    | 2.63    | 5.10     | 2.27    | -                | ضریب تغییرات<br>Coefficient of variation |

ns, \* and \*\*: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively.



**جدول ۹.** مقایسه‌ی میانگین صفات مورد مطالعه بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط بدون آلودگی

**Table 9.** Comparison of the averages of the studied traits between 12 corn hybrids under control conditions

| Y<br>(gr)   | SD<br>(mm) | CWD<br>(mm) | CD<br>(cm) | SRC        | CH<br>(cm) | صفات   | شماره هیبرید<br>Number of hybrid |
|-------------|------------|-------------|------------|------------|------------|--------|----------------------------------|
|             |            |             |            |            |            | Traits |                                  |
| 4850 abcd   | 11.3 a     | 26.8 abc    | 49.5 ab    | 15.5 abc   | 117.5 abcd |        | 1                                |
| 4387.5 cd   | 10.4 abc   | 25.4 abcd   | 46.3 bcd   | 13.5 d     | 110 cde    |        | 2                                |
| 4100 de     | 10.3 abc   | 24.5 cd     | 45.2 d     | 13.5 d     | 108.5 de   |        | 3                                |
| 5525 a      | 10.7 abc   | 26.3 abcd   | 47.8 abcd  | 17 a       | 124.5 abc  |        | 4                                |
| 5237.5 ab   | 10.7 abc   | 27.1 ab     | 48.6 abc   | 16 ab      | 112.7 cde  |        | 5                                |
| 4737.5 abcd | 9.9 c      | 24.8 bcd    | 44.7 d     | 14.25 bcd  | 103 e      |        | 6                                |
| 4637.5 bcd  | 10.5 abc   | 25.8 abcd   | 47.7 abcd  | 15.5 abc   | 122.7 abcd |        | 7                                |
| 4550 bcd    | 10.5 abc   | 23.9 d      | 44.9 d     | 13.75 cd   | 118.7 abcd |        | 8                                |
| 4537.5 bcd  | 11.1 ab    | 24.6 abc    | 48.7 abc   | 15.75 ab   | 114 bcd    |        | 9                                |
| 3212.5 f    | 9.9 c      | 25.8 abcd   | 45.6 cd    | 15.5 abc   | 115.2 bcd  |        | 10                               |
| 3462.5 ef   | 11.08 ab   | 27.8 a      | 50 a       | 14.625 bcd | 127.7 ab   |        | 11                               |
| 5225 abc    | 11.06 ab   | 24.4 cd     | 46.5 bcd   | 14.25 bcd  | 131 a      |        | 12                               |

Similarity letters indicate no significant differences.

حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

**جدول ۱۰.** مقایسه‌ی میانگین صفات مورد مطالعه بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط آلودگی به ویروس IJMV

**Table 10.** Comparison of the averages of the studied traits between 12 corn hybrids under IJMV infection conditions

| Y<br>(gr) | WS<br>(gr) | SD<br>(mm) | CWD<br>(mm) | CD<br>(cm) | SPRC      | SRC        | CH<br>(cm) | DGM       | DEEM      | صفات   | شماره هیبرید<br>Number of hybrid |
|-----------|------------|------------|-------------|------------|-----------|------------|------------|-----------|-----------|--------|----------------------------------|
|           |            |            |             |            |           |            |            |           |           | Traits |                                  |
| 4825 abc  | 359 a      | 11.20 a    | 26.5 ab     | 48.9 ab    | 32 bc     | 16.12 ab   | 115.5 ns   | 110.5 ab  | 58.25 abc |        | 1                                |
| 3275 d    | 293 c      | 9.40 bc    | 24.6 cd     | 43.4 def   | 30.2 bc   | 13 d       | 106.5 ns   | 106 c     | 55 bc     |        | 2                                |
| 2825 d    | 328.5 b    | 9.75 bc    | 23.8 d      | 42.9 ef    | 32.18 bc  | 13 d       | 114.2 ns   | 109 abc   | 56.5 abc  |        | 3                                |
| 5450 a    | 311.7 bc   | 10.32 ab   | 26.6 bc     | 46.3 abcde | 32.68 abc | 16.87 a    | 115.5 ns   | 111.7 ab  | 59.2 ab   |        | 4                                |
| 5250 a    | 314 bc     | 10.11 ab   | 26.5 ab     | 46.7 abcd  | 29.25 c   | 15.37 abc  | 92 ns      | 112.2 a   | 59.7 ab   |        | 5                                |
| 5300 a    | 308.2 bc   | 10.32 ab   | 24.6 cd     | 45.2 bcd   | 30.75 bc  | 14 cd      | 105 ns     | 106 c     | 53.5 c    |        | 6                                |
| 3125 d    | 319 bc     | 10.24 ab   | 25.6 bc     | 46.1 abcd  | 30.12 bc  | 15.25 abc  | 116.5 ns   | 109.5 abc | 56 abc    |        | 7                                |
| 3750 bcd  | 321.7 b    | 10.4 ab    | 23.9 cd     | 44.7 cdef  | 33.12 ab  | 13.75 cd   | 111.7 ns   | 112.5 a   | 61 a      |        | 8                                |
| 3525 cd   | 324.2 b    | 11.26 a    | 26.5 ab     | 49.1 a     | 31 bc     | 14.87 abcd | 90.2 ns    | 110.2 ab  | 57.7 abc  |        | 9                                |
| 3100 d    | 306.5 bc   | 8.79 c     | 24.9 bcd    | 42.5 f     | 30.5 bc   | 15.12 abc  | 106.2 ns   | 107.7 bc  | 53 c      |        | 10                               |
| 3500 cd   | 319.5 bc   | 9.72 bc    | 28.1 a      | 47.5 abc   | 36.12 a   | 14.62 bcd  | 118.2 ns   | 110.2 ab  | 57.2 abc  |        | 11                               |
| 5100 ab   | 319.7 bc   | 10.65 ab   | 24.4 cd     | 45.7 abcd  | 36.18 a   | 14.37 bcd  | 119.5 ns   | 108.5 abc | 56 abc    |        | 12                               |

Similarity letters indicate no significant differences.

حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی‌دار است.

### تعداد ردیف دانه در بلال

در شرایط بدون آلودگی، براساس نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به این صفت، بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۷). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت تعداد ردیف دانه نشان داد که بیش‌ترین مقدار این صفت در بین ژنوتیپ‌های مورد آزمایش به هیبرید شماره‌ی ۴ تعلق داشت. همچنین هیبریدهای شماره‌ی ۲ و ۳ کم‌ترین تعداد ردیف دانه را به تعداد ۱۲/۵ ردیف داشتند (جدول ۹). در شرایط آلودگی به ویروس، نتایج تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به تعداد

### تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک

در شرایط بدون آلودگی، اختلاف معنی‌داری در نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، مشاهده نشد (جدول ۷). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک نشان داد، هیبریدهای شماره‌ی ۸ و ۵ به ترتیب با ۱۱۲/۵ و ۱۱۲/۲۵ روز، بیش‌ترین تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن فیزیولوژیک را داشته و در یک گروه قرار گرفتند. همچنین کم‌ترین مقدار این صفت به هیبریدهای شماره‌ی ۶ و ۲ با ۱۰۶ روز و سپس هیبرید شماره ۱۰ با ۱۰۷/۷۵ روز تعلق داشت (جدول ۱۰).

ردیف دانه در بلال نشان داد (جدول ۸)، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصدی اختلاف معنی دار داشت. براساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌ها، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۱۶/۸۷۵ ردیف، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۴ بود و هیبریدهای شماره‌ی ۲ و ۳ کم‌ترین تعداد ردیف دانه را با تعداد ۱۳ ردیف داشتند (جدول ۱۰).

#### تعداد دانه در هر ردیف بلال

در شرایط بدون آلودگی، از نظر آماری اختلاف معنی‌داری در نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به تعداد دانه در هر ردیف بلال، بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، مشاهده نشد (جدول ۷). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به تعداد دانه در هر ردیف بلال، بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، نشان داد در سطح احتمال آماری پنج اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۸). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به این صفت در جدول ۱۰ آمده است. بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش به هیبریدهای شماره‌ی ۱۲ و ۱۱ به ترتیب با تعداد ۳۶/۱۸۸ و ۳۶/۱۲۵ تعلق داشت و این دو هیبرید در یک گروه آماری قرار گرفتند. کم‌ترین تعداد دانه نیز به هیبرید شماره‌ی ۵ به میزان ۲۹/۲۵ عدد تعلق داشت.

#### قطر بلال

در شرایط بدون آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به قطر بلال نشان داد که این صفت در بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۷). بر اساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت قطر بلال، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۵۰/۰۰۵ میلی‌متر قطر، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۱۱ بود. همچنین هیبریدهای شماره‌ی ۳، ۸ و ۶ کم‌ترین قطر بلال را به ترتیب به میزان ۴۵/۲۰، ۴۴/۹۷ و ۴۴/۷۰ میلی‌متر داشتند (جدول ۹). در شرایط آلودگی، نتایج

حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به قطر بلال مندرج در جدول ۸ نشان داد، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت قطر بلال نشان داد بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۴۹/۰۹۳ میلی‌متر قطر، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۹ بود. همچنین هیبرید شماره‌ی ۱۰ کم‌ترین قطر بلال ۴۲/۵۴۵ میلی‌متر را نشان داد (جدول ۱۰).

#### قطر چوب بلال

در شرایط بدون آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به قطر چوب بلال نشان داد (جدول ۷) که این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت. بر اساس نتایج مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت قطر چوب بلال، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۲۷/۸۲۲۵ میلی‌متر قطر، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۱۱ بود. همچنین هیبرید شماره‌ی ۸ کم‌ترین قطر بلال را به ترتیب به میزان ۲۳/۹۸ میلی‌متر به خود اختصاص داد (جدول ۹). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به قطر چوب بلال در جدول ۸ نشان داده شد، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت قطر چوب بلال نشان داد، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۲۷/۱۸ میلی‌متر قطر، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۱۱ و کم‌ترین قطر بلال را نیز هیبرید شماره‌ی ۳ به میزان ۲۳/۷۹۲ میلی‌متر به خود اختصاص داد (جدول ۱۰).

#### عمق دانه

در شرایط بدون آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به عمق دانه نشان داد که در بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد مطالعه از نظر این صفت،

واریانس داده‌های مربوط به عملکرد کرت نشان داد (جدول ۷)، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری یک درصد اختلاف معنی‌دار داشت. با مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به عملکرد کرت، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۵۵۲۵ گرم، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۴ بود. همچنین هیبرید شماره‌ی ۱۰ با مقدار ۳۲۱۲/۵ گرم، کم‌ترین میزان عملکرد در واحد کرت را نشان داد (جدول ۹). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به عملکرد کرت در جدول ۸ نشان داد، این صفت در بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش، در سطح احتمال آماری یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود. براساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به عملکرد کرت، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۵۴۵۰، ۵۳۰۰ و ۵۲۵۰ گرم، به ترتیب متعلق به هیبریدهای شماره‌ی ۴، ۶ و ۵ بود که در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین هیبریدهای شماره‌ی ۳، ۱۰، ۷ و ۲ به ترتیب با مقادیر ۲۸۲۵، ۳۱۰۰، ۳۱۲۵ و ۳۲۷۵ گرم، کم‌ترین میزان عملکرد در واحد کرت را داشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۱۰).

#### نتایج بررسی شدت و درصد آلودگی در شرایط آلودگی به ویروس IJMV

نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس داده‌های جدول ۱۱ نشان داد که شدت آلودگی و درصد آلودگی از نظر آماری در سطح یک درصد معنی‌دار بود. براساس نتایج مقایسه میانگین بین هیبریدهای مورد بررسی، علائم شدت و درصد آلودگی آلودگی متفاوت بود (جدول ۱۲). هیبریدهای ۳ و ۴ بالاترین شدت آلودگی و هیبرید ۱۲ کمترین شدت آلودگی را نشان دادند. همچنین هیبرید ۴ بالاترین درصد آلودگی و هیبرید ۱۲ کمترین درصد آلودگی را داشت. در مجموع هیبرید ۴ با نشان دادن بیشترین شدت و درصد آلودگی به عنوان حساس‌ترین هیبرید و هیبرید ۱۲ با نشان دادن کمترین شدت و درصد آلودگی مقاوم‌ترین هیبرید در مواجهه با ویروس IJMV بود.

اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری یک درصد مشاهده شد (جدول ۷). نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به این صفت نشان داد که بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۱۱/۳۵۵ میلی‌متر، متعلق به هیبرید شماره‌ی ۱ بود. همچنین هیبریدهای شماره‌ی ۶ و ۱۰ با کم‌ترین عمق دانه به ترتیب به میزان ۹/۹۲۲۵ و ۹/۹۰۷۵ در یک گروه قرار گرفتند (جدول ۹). در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به عمق دانه بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود (جدول ۸). براساس نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به صفت عمق دانه، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با ۱۱/۲۶۷ و ۱۱/۲۰۵ میلی‌متر، به ترتیب متعلق به هیبریدهای شماره‌ی ۹ و ۱ بود که در یک گروه آماری قرار گرفتند و هیبرید شماره‌ی ۱۰ نیز کم‌ترین عمق دانه به میزان ۸/۷۹۵ میلی‌متر را به خود اختصاص داد (جدول ۱۰).

#### وزن هزاردانه

در شرایط بدون آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به وزن هزار دانه در جدول ۷ نشان داد، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش دارای اختلاف معنی‌دار نیست. در شرایط آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی واریانس داده‌های مربوط به وزن هزار دانه نشان داد (جدول ۸)، این صفت بین ۱۲ هیبرید ذرت مورد آزمایش در سطح احتمال آماری پنج درصد اختلاف معنی‌دار بود. نتایج حاصل از مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به این صفت نشان داد، بیش‌ترین مقدار این صفت در بین هیبریدهای مورد آزمایش، با مقدار ۳۵۹ گرم متعلق به هیبرید شماره‌ی ۱ بود. هیبرید شماره‌ی ۲ نیز کم‌ترین وزن هزار دانه به میزان ۲۹۳ گرم را داشت (جدول ۱۰).

#### عملکرد کرت

در شرایط بدون آلودگی، نتایج حاصل از تجزیه‌ی

**جدول ۱۱.** تجزیه ی واریانس شدت و درصد آلودگی بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط آلودگی به IJMV

**Table 11.** The analysis of variance of severity and percentage of infection between 12 corn hybrids under IJMV infection conditions

| درصد آلودگی<br>percentage of infection | شدت آلودگی<br>Severity of infection | درجه آزادی<br>Degree of freedom | منابع تغییرات<br>Sources of Variation    |
|----------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|
| 9.87 <sup>ns</sup>                     | 17.92 <sup>ns</sup>                 | 3                               | بلوک<br>Block                            |
| 74.58 <sup>**</sup>                    | 108.02 <sup>**</sup>                | 11                              | هیبرید<br>Hybrid                         |
| 23.05                                  | 15.33                               | 33                              | اشتباه آزمایش<br>Experiment error        |
| 15.1                                   | 12.2                                | -                               | ضریب تغییرات<br>Coefficient of variation |

ns, \* و \*\*: به ترتیب عدم اختلاف معنی دار، اختلاف معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, \* and \*\*: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively.

**جدول ۱۲.** مقایسه میانگین شدت و درصد آلودگی بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط آلودگی به ویروس IJMV

**Table 12.** Comparison of the average severity and percentage of infection between 12 corn hybrids under IJMV infection conditions

| درصد آلودگی<br>Percentage of infection | شدت آلودگی<br>Severity of infection | شماره هیبرید<br>Number of hybrid |
|----------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|
| 6.89 cde                               | 27.7 cd                             | 1                                |
| 7.60 cd                                | 31.2 abcd                           | 2                                |
| 12.02 ab                               | 34.3 a                              | 3                                |
| 14.90 a                                | 34.5 a                              | 4                                |
| 7.02 cde                               | 28.9 bcd                            | 5                                |
| 6.98 cde                               | 28.5 bcd                            | 6                                |
| 6.24 de                                | 27.6 cd                             | 7                                |
| 6.24 de                                | 26.5 d                              | 8                                |
| 6.37 de                                | 27.6 cd                             | 9                                |
| 9.16 bcd                               | 31.9 abc                            | 10                               |
| 10.51 bc                               | 32.7 ab                             | 11                               |
| 3.64 e                                 | 21.6 e                              | 12                               |

Similarity letters indicate no significant differences.

حروف مشترک نشان دهنده عدم اختلاف معنی دار است.

هیبرید ذرت که در جدول ۱۳ آورده شده است، مشاهده شد که صفت تعداد روز از سبز شدن تا ظهور کاکل در بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط طبیعی و آلودگی به ویروس از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت. صفت های همچون ارتفاع بوته و تعداد دانه در هر ردیف بلال در سطح احتمال آماری پنج درصد دارای اختلاف معنی داری بین هیبریدهای ذرت در شرایط آلودگی و بدون آلودگی به IJMV بودند. در مورد سایر صفات از جمله تعداد روز از ظهور کاکل تا رسیدن فیزیولوژیک، تعداد روز از سبز شدن تا رسیدن، تعداد ردیف دانه در بلال، قطر بلال، قطر چوب بلال، عمق دانه و عملکرد در کرت تفاوت معنی داری در سطح احتمال آماری یک درصد در بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط طبیعی و آلودگی به بیماری مشاهده شد (جدول ۱۳).

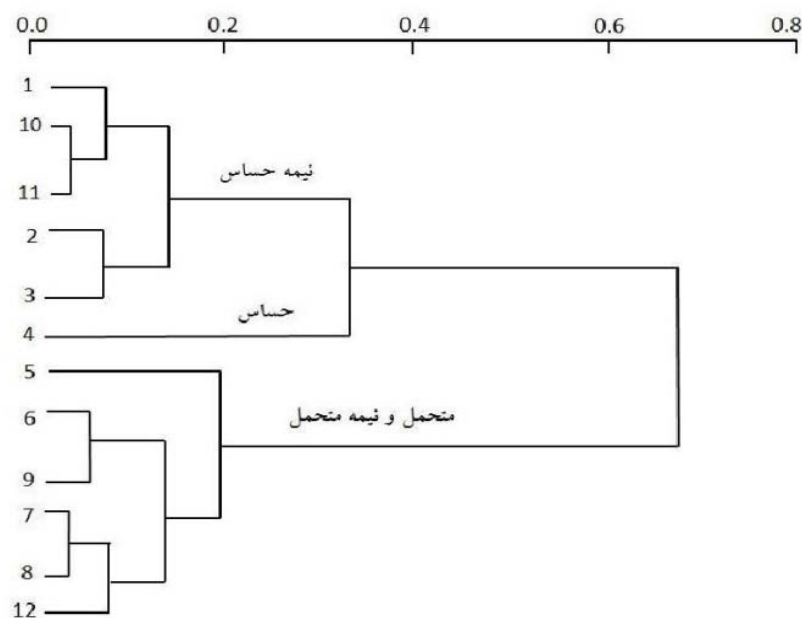
نتایج تجزیه خوشه ای انجام شده بین هیبریدهای مورد بررسی براساس صفات درصد و شدت آلودگی در شکل ۵ آورده شده است. بر اساس نتایج تجزیه خوشه ای هیبریدها در سه گروه قرار گرفتند. در گروه اول هیبریدهای ۱، ۱۰، ۱۱، ۲ و ۳ قرار دارند که واکنش نیمه حساس به ویروس نشان دادند. در گروه دوم که شامل هیبرید شماره ۴ بود واکنش حساسیت به ویروس نشان داد. گروه سوم که شامل هیبریدهای ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و ۱۲ است واکنش نیمه متحمل یا متحمل به ویروس داشتند.

**نتایج تجزیه واریانس مرکب و مقایسه میانگین اثر آلودگی ویروسی بر صفات مورد مطالعه**

طبق نتایج تجزیه واریانس داده های مربوط به اثر بیماری ناشی از IJMV بر عملکرد و اجزای عملکرد ۱۲

در بین ۱۲ هیبرید ذرت، در شرایط عدم آلودگی و آلودگی به IJMV در جدول ۱۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل می توان اثر آلودگی ویروس را بر صفتهای مختلف بررسی و عکس العمل هیبریدها را از نظر هر صفت مشخص کرد.

طبق نتایج حاصل از بررسی تمام صفتهای ۱۲ هیبرید مورد آزمایش، می توان گفت آلودگی به ویروس IJMV باعث کاهش معنی دار عملکرد کت، عمق دانه، قطر بلال، تعداد دانه در هر ردیف و ارتفاع گیاه شد. نتایج مقایسه میانگین صفتهای مورد بررسی در تحقیق حاضر



شکل ۵. نتایج تجزیه خوشه‌ای هیبریدهای مورد بررسی براساس درصد و شدت آلودگی به IJMV

Figure 5. Results of cluster analysis of the studied hybrids based on the percentage and severity infection to IJMV

جدول ۱۳. تجزیه واریانس مرکب صفات مورد مطالعه بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط بدون آلودگی و آلودگی به ویروس IJMV  
Table 13. Composite analysis of variance of studied traits between 12 corn hybrids under control and IJMV infection conditions

| Y<br>(gr)   | SD<br>(mm) | CWD<br>(mm) | CD<br>(mm) | SPRC    | SRC     | PH<br>(cm) | DGM      | DEEM     | DGEE    | درجه آزادی<br>DF | منابع تغییرات<br>SOV                     |
|-------------|------------|-------------|------------|---------|---------|------------|----------|----------|---------|------------------|------------------------------------------|
| 4927734.3** | 5.53**     | 2.63*       | 4.29**     | 69.8**  | 1.26ns  | 152762**   | 45.3**   | 73.5**   | 127**   | 1                | شرایط آزمایش<br>Exprimment Condition     |
| 987447.9 ns | 1.72 ns    | 8.63 ns     | 17.7ns     | 60.19ns | 14.53*  | 192927**   | 26.08 ns | 54.8 ns  | 8.81 ns | 6                | تکرار×شرایط<br>Replication×Condition     |
| 561459114** | 26.1**     | 132.8**     | 3204**     | 230.6*  | 1109**  | 17074.1*   | 2199**   | 2246**   | 155ns   | 11               | هیبرید<br>Hybrid×Condition               |
| 9409453.1*  | 6.05 ns    | 3.61 ns     | 32.4 ns    | 117.5ns | 3.42 ns | 8272.1 ns  | 67.6ns   | 116.5 ns | 11.1ns  | 11               | هیبرید×شرایط<br>Hybrid                   |
| 528381      | 0.674      | 1.22        | 3.36       | 10.7    | 1.037   | 1048.3     | 8.01     | 8.88     | 1.41    | 66               | اشتباه آزمایش<br>Experiment error        |
| 16.8        | 7.89       | 4.32        | 3.94       | 9.99    | 6.87    | 13.8       | 2.60     | 5.31     | 2.25    | -                | ضریب تغییرات<br>Coefficient of variation |

ns, \* و \*\*: به ترتیب عدم اختلاف معنی دار، اختلاف معنی دار در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, \* and \*\*: indicate non-significance, significance at 5% and 1% probability levels, respectively.

جدول ۱۴. مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه در بین ۱۲ هیبرید ذرت در شرایط بدون آلودگی و آلودگی به IJMV

**Table 14.** Comparison of the averages of the studied traits between 12 corn hybrids under control and IJMV infection conditions

| شماره<br>هیبرید<br>Number of<br>hybrid | شرایط<br>آزمایش<br>Experiment<br>condition | DGEE | DEEM | DGM   | PH<br>(cm) | SRC  | SPRC | CD<br>(mm) | CWD<br>(mm) | SD<br>(mm) | Y<br>(gr) |
|----------------------------------------|--------------------------------------------|------|------|-------|------------|------|------|------------|-------------|------------|-----------|
| 1                                      | 1                                          | 52   | 58.2 | 110.5 | 224        | 16.1 | 32   | 48.9       | 26.5        | 11.1       | 4825      |
|                                        | 2                                          | 523  | 53.7 | 107.2 | 237.7      | 15.5 | 33.3 | 49.5       | 26.8        | 11.3       | 4850      |
| 2                                      | 1                                          | 51   | 55   | 106   | 216.7      | 13   | 30.2 | 43.4       | 24.6        | 9.39       | 3275      |
|                                        | 2                                          | 52   | 54.5 | 107.2 | 236.5      | 13.5 | 35.4 | 46.3       | 25.4        | 10.4       | 4387.5    |
| 3                                      | 1                                          | 52   | 56.5 | 109.2 | 243.2      | 13   | 32.2 | 42.9       | 23.7        | 9.58       | 2825      |
|                                        | 2                                          | 53   | 57.2 | 109.7 | 235.2      | 13.5 | 32.7 | 45.2       | 24.5        | 10.2       | 4100      |
| 4                                      | 1                                          | 53   | 59.2 | 111.7 | 213.5      | 16.8 | 32.7 | 46.3       | 25.6        | 10.3       | 5450      |
|                                        | 2                                          | 52   | 57.2 | 109.7 | 246.2      | 17   | 35.6 | 47.8       | 26.3        | 10.7       | 5525      |
| 5                                      | 1                                          | 53   | 59.7 | 112.2 | 195.7      | 15.3 | 29.2 | 46.7       | 26.5        | 10.1       | 5250      |
|                                        | 2                                          | 53   | 56   | 109   | 228        | 16   | 34.2 | 48.6       | 27.1        | 10.7       | 5237.5    |
| 6                                      | 1                                          | 51   | 53.5 | 106   | 243.2      | 14   | 30.7 | 45.2       | 24.5        | 10.3       | 5300      |
|                                        | 2                                          | 52   | 54   | 106.5 | 247.2      | 14.2 | 32   | 44.7       | 24.8        | 9.92       | 4737.5    |
| 7                                      | 1                                          | 53   | 56   | 109.5 | 227.5      | 15.2 | 30.1 | 46.1       | 25.6        | 10.2       | 3125      |
|                                        | 2                                          | 53   | 56.2 | 109.5 | 256.5      | 15.5 | 34.8 | 47.7       | 25.8        | 10.5       | 4637.5    |
| 8                                      | 1                                          | 51   | 61   | 112.5 | 231        | 13.7 | 33.1 | 44.7       | 23.9        | 10.3       | 3750      |
|                                        | 2                                          | 53   | 55.2 | 108.5 | 265        | 13.7 | 33.6 | 44.9       | 23.9        | 10.4       | 4550      |
| 9                                      | 1                                          | 52   | 57.7 | 110.2 | 172        | 14.8 | 31   | 49.1       | 26.5        | 11.2       | 3525      |
|                                        | 2                                          | 53   | 54.7 | 107.7 | 239.7      | 15.7 | 31.8 | 48.7       | 26.4        | 11.1       | 4537.5    |
| 10                                     | 1                                          | 52   | 53   | 107.7 | 224.5      | 15.1 | 30.5 | 42.5       | 24.9        | 8.79       | 3100      |
|                                        | 2                                          | 52   | 54.5 | 107.2 | 266.7      | 15.5 | 30.8 | 45.6       | 25.8        | 9.90       | 3212.5    |
| 11                                     | 1                                          | 52   | 57.2 | 110.2 | 227.7      | 14.6 | 36.1 | 47.5       | 28.1        | 9.70       | 3500      |
|                                        | 2                                          | 53   | 55.7 | 10.5  | 243.2      | 14.6 | 36.4 | 50         | 27.8        | 11.1       | 3462.5    |
| 12                                     | 1                                          | 52   | 56   | 108.5 | 239        | 14.3 | 36.1 | 45.7       | 24.4        | 10.6       | 5100      |
|                                        | 2                                          | 53   | 53   | 106   | 258.7      | 14.2 | 33.7 | 46.5       | 24.4        | 11.1       | 5225      |

Experiment conditions: 1- IJMV infection and 2- no infection (control)

شرایط آزمایش: ۱- آلودگی به IJMV و ۲- عدم آلودگی (کنترل)

به دلیل درصد بالای آلودگی به ویروس کوتولگی زبر، عملکرد حدود ۶ تن در هکتار داشت. در بررسی آن‌ها بیشترین درصد آلودگی به ویروس‌های کوتولگی زبر و موزائیک ایرانی در هیبرید KSC704 مشاهده شد و کمترین درصد آلودگی نسبت به ویروس کوتولگی زبر در هیبرید BC572 و نسبت به ویروس موزائیک ایرانی در هیبرید ZP677 دیده شد. همچنین در پژوهش آن‌ها، اختلاف عملکرد دانه در بین هیبریدها به دلیل تفاوت در درصد آلودگی به ویروس‌ها بود و تاخیر در کاشت، اثر قابل توجهی بر کنترل ویروس‌ها داشت. آن‌ها بیان کردند که ارقام چینی دارای تحمل خوبی نسبت به ویروس‌ها بوده و می‌توان از ژن‌های مقاومت آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد (Estakhr and Choukan, 2006).

امروزه کشت وسیع ارقام دارای زمینه ژنتیکی یکنواخت، باعث تکامل فزاینده سویه‌های پرازار بیمارگرها و بروز همه‌گیری‌های گسترده بیماری‌های گیاهی شده است. بنابراین نیاز فراوانی به تولید مقاومت بادوام به بیمارگرها در گیاهان وجود دارد. عملکرد ذرت در سال‌های اخیر به دلیل تاثیر بیماری‌های ویروسی به‌ویژه در کشت‌های اول، به شدت کاهش یافته است. طبق نتایج به‌دست آمده از پژوهشی که توسط Estakhr and Choukan (2006) انجام شد، با یک ماه تاخیر در کاشت درصد آلودگی به ویروس‌های گیاهی در ذرت به شدت کاهش یافت و به یک تا دو درصد رسید و هیبرید OSSK602 با تولید ۱۰۲۱۵ کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد دانه را داشت. در صورتی که در تاریخ کشت قبلی،

مقاومت از ناسازگاری‌های بین متابولیسم میزبان و عامل بیماری که هر یک توسط عوامل ژنتیکی کنترل می‌شود، ناشی می‌گردد (Mostafavi Neishaburi et al., 2020). قحطی‌های بزرگی در طول تاریخ مثلاً در ایرلند، بیماری بادزدگی سیب زمینی، در قبل از سال ۱۹۲۰ در آمریکا به وسیله زنگ ساقه روی گندم و... در ایران چندین سال پیش اپیدمی زنگ زرد روی گندم رخ داده است که تنها با کنترل ژنتیکی و نه شیمیایی یا زراعی این موضوع قابل رفع است. در سال ۱۳۸۲ به‌منظور یافتن ارقام خارجی پرمحصول‌تر نسبت به ارقام ایرانی، تعداد ۱۷ هیبرید خارجی ذرت و سه رقم داخلی در استان فارس کشت شدند. در آن سال در منطقه زرگان استان فارس اپیدمی ویروس کوتولگی زبر ذرت رخ داد و به هیبریدها خسارت شدیدی وارد کرد. همه هیبریدها حساس بودند و دامنه درصد آلودگی از ۳۰ تا ۸۰ درصد بود و تنها هیبریدهای خارجی SP1042 و KSC700 آلودگی کمتر از ۵۰ درصد داشتند (Estakhr and Choukan, 2006). ژن‌هایی که باعث ایجاد مقاومت ذرت نسبت به ویروس‌ها می‌شوند ممکن است در مقابل یک یا تعدادی از پوتی‌ویروس‌های غلات عملکرد مناسبی داشته باشند (Mostafavi Neishaburi et al., 2020). گزارش شده است که برخی لاین‌های ذرت، در هر دو شرایط گلخانه و مزرعه، در برابر چهار ویروس MDMV، SCMV، JGMV و SrMV مقاوم بودند (Kuntze et al., 1995). همچنین لویی و همکاران (۱۹۹۰) با بررسی ژنتیک مقاومت لاین‌های ذرت بیان کردند که برخی لاین‌ها به سه جدایه از ویروس SCMV و دو جدایه از ویروس MDMV مقاوم هستند.

### نتیجه‌گیری کلی

با توجه به اهمیت ذرت در شمال ایران و اهمیت بیماری‌های ویروسی در غلات شناسایی شده که ویروس موزائیک ایرانی قیاق (Iranian Johnson grass mosaic virus, IJMV) یکی از مهم‌ترین آن‌ها محسوب می‌شود ضمن اینکه این ویروس بومی ایران بوده و از پراکنش وسیعی در ایران برخوردار است. در این پژوهش

راستای کنترل بیماری‌های ویروسی، استفاده از ارقام مقاوم احتمالاً ارزان‌ترین و موثرترین راه مبارزه با ویروس‌های گیاهی است. عملی نبودن کنترل شیمیایی بیماری‌ها باعث گردیده مقاومت ژنتیکی به‌عنوان امیدبخش‌ترین استراتژی مطرح گردد (Mostafavi Neishaburi et al., 2020). هزینه کشت ارقام مقاوم از هزینه کشت ارقام حساس بیشتر نیست، همچنین در استفاده از ارقام مقاوم به علت عدم نیاز به روش‌های پرهزینه دیگر مثل کنترل ناقلین، در هزینه‌ها صرفه‌جویی خواهد شد. به علاوه، به واسطه اجتناب از مصرف مواد شیمیایی، از آلودگی محیط زیست و به وجود آمدن ناقلین مقاوم به مواد شیمیایی جلوگیری می‌شود. استفاده از ارقام مقاوم به ویژه در کنترل ویروس‌هایی که به وسیله شته‌ها به طریق ناپایا منتقل می‌شوند، مفیداست (Sylvester, 1969).

بنابراین از یک طرف آلودگی‌های ویروسی شدید و مخلوط در ذرت و از طرف دیگر عملی نبودن کنترل شیمیایی به‌ویژه در مورد بیماری‌های ویروسی باعث گردیده مقاومت ژنتیکی به‌عنوان امیدبخش‌ترین استراتژی مطرح گردد (Toit and Pataky, 1999). از سال ۱۹۱۸ به بعد مشخص شد که مقاومت ژنتیکی بهترین روش کنترل بیماری‌های ویروسی بوده که قابل توارث است (Smith and White, 1988). رایبسنسون مقاومت را به قدرت میزبان در جلوگیری از بروز بیماری یا عواملی که باعث کند شدن بیماری می‌شوند، تعریف کرد (Robinson, 1969). کنترل ژنتیکی، تهیه و استفاده از واریته‌های کاملاً مقاوم باعث عدم آلودگی محیط زیست، کاهش خسارت بیماری و هزینه‌های ناشی از سایر روش‌های کنترل بیماری می‌گردد و در هر صورت کاری صحیح و قابل اعتبار است که بهره اقتصادی را امکان‌پذیر می‌سازد (Mostafavi Neishaburi et al., 2019). به طور کلی عوامل بسیاری در ایجاد مقاومت در ارقام مختلف گیاهی و نیز شکستن مقاومت آن‌ها نقش دارند. با این وجود استفاده از ارقام مقاوم در جهت مدیریت بیماری‌ها، با توجه به مزیت‌های فراوانی که دارد، امروزه دغدغه بسیاری از کشورها می‌باشد.

بررسی تمام صفات‌ها بخصوص نتایج حاصله از تجزیه صفات درصد و شدت آلودگی و میزان عملکرد محصول و خسارت بیماری در کنار هم هیبریدهای نسبتاً مقاوم که در شرایط وجود آلودگی ویروس تا حدی خسارت وارد شده را تحمل کردند و محصول خوبی تولید کردند، شناسایی شدند. از این رو با بررسی مجموع صفات مورد بررسی در این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که در بین هیبریدهای مورد بررسی هیبریدهای شماره ۳ و ۴ نسبت به ویروس IJMV حساس‌تر بوده و هیبریدهای شماره ۵ و ۱۲ در مقابل ویروس مذکور نسبتاً مقاوم و یا متحمل بودند و تا حدی خسارت وارد شده را تحمل و حد مطلوبی از صفات را حفظ کردند. لذا برای استفاده در کارهای بهنجاری ذرت در آینده معرفی می‌شوند.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

واکنش ۱۲ هیبرید مورد مطالعه ذرت نسبت به ویروس موزائیک ایرانی قیاق در دو شرایط آلودگی با ویروس و عدم آلودگی با ویروس (شاهد) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون الایزا غیرمستقیم و تست RT-PCR به منظور اطمینان از آلودگی نمونه‌های تیمار شده بیانگر تایید آلودگی هیبریدها بود. تجزیه و تحلیل‌های آماری در هر دو حالت شرایط آلودگی و عدم آلودگی، برای صفات مورد بررسی انجام شد و نتایج مقایسه میانگین صفات‌های مربوط به عملکرد و اجزای عملکرد از جمله عملکرد کرت، عمق دانه، قطر بلال، قطر چوب بلال، تعداد ردیف دانه در بلال و تعداد دانه در هر ردیف، مشخص کرد که آلودگی به ویروس IJMV سبب کاهش عملکرد کرت در تمامی هیبریدها شد که در برخی هیبریدها میزان کاهش کمتر بود. اما از آنجا که نمی‌توان بر اساس یک یا دو صفت خاص، مقاومت یا حساسیت یک هیبرید را تعیین کرد. بنابراین با

### References

- Afsharifar, A.R., & Izadpanah, K. (1991). Occurrence of a new type of mosaic in maize fields in the vicinity of Shiraz. Iran. *Journal Plant Pathology*, 27, 119. (In Persian)
- Amiri, F., & Izadpanah, K. (1993a). Purification, serology and transmission of sugarcane mosaic virus in Khuzestan. (Abst.). *Iran. J. Plant Pathology*, 29, 191-192. (In Persian)
- Amiri, F., & Izadpanah, K. (1993b). Sugarcane mosaic virus strain variation in Khuzestan. (Abst.). *Iran Journal Plant Pathology*, 29, 190-191. (In Persian)
- Clark, M.F., & Adams, A.N. (1977). Characteristics of the microplate method of Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. gen. Virol.*, 34, 475-483.
- Estakhr, A., & Choukan, R. (2006). Study of yield, yield component and correlation between them in foreign and local maize hybrids. *Iranian Journal of Agricultural Science*, 37, 85-91. (In Persian)
- Fan, Z., Chen, H., Cai, S., Dong, C., Wang, W., Liang, X., & Li, H. (2003). Molecular characterization of a distinct potyvirus from white grass in China. *Arch. Virol.*, 148, 1219-1224.
- FAO. (2020). FAOSTAT. Available online at: <http://faostat3.fao.org/compare/E>.
- Ghorbani, M., Nasrollanejad, S., & Mohammadi, M. (2024). Decoding the genetic diversity and taxonomic position of two novel potyviruses of Tuberose crop in Iran. *Indian Phytopathology*, <https://doi.org/10.1007/s42360-024-00775-5>.
- Izadpanah, K. (1982). Annotated list of viral and viroides diseases of plants in Fars province. Shiraz Faculty of Agriculture. 183 pages.
- Izadpanah, K., & Kamran, R. (1995). Racial isolation of *Sugarcane mosaic virus* from corn in Sepidan region of Fars. Summary of articles of the 12th *Iranian plant protection congress*, Karaj. Page 94.
- Kuntze, L., Fuchs, E., Gruntzig, M., Schulz, B., Henning, U., Hohmann, F., & Melchinger, A.E. (1995). Evaluation of maize inbred lines for resistance to *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) and *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV). *Agronomie*, 15, 463-467.
- Louie, R., Knoke, J.K., & Findley, W.R. (1990). Elite maize germplasm-reactions to Maize dwarf mosaic and Maize chlorotic dwarf viruses. *Crop Sci.*, 30, 1210-1215.
- Masoumi, M., Zare, A., & Izadpanah, K. (2018). Biological, serological and molecular comparison of potyviruses of cereal plants in Iran. *Plant diseases*, 47(1), 66-47.
- Masumi, M., & Izadpanah, K. (2000). Transmission, purification and serology of *Bermuda grass mosaic virus*. Proc. 14th Iran. Plant. Protec. Cong., Isfahan Univ. *Technol. Vol. II*. 183p.



- Masumi, M., & Izadpanah, K. (1995). Natural infection of Johnsongrass and certain other gramineous species with a type of sugarcane mosaic virus (SCMV). Proc. 12th Iran. *Plant Protec. Cong.*, Karaj. 73p.
- Moini, A.A., & Izadpanah, K. (2001). Identification and purification of A MDMV-like potyvirus of maize in Mazandaran. *Iran. J. Plant Path.*, 37, 147-159 (Farsi) and 43-45 (English).
- Mostafavi Neishaburi, F., Sabbagh, S.K., Yamchi, A., & Nasrollanejad, S. (2019). Molecular study on some of physiological changes in susceptible and tolerant genotypes of maize in response to Maize Dwarf Mosaic Virus infection. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 7 (3), 1-17.
- Mostafavi Neishaburi, F., Sabbagh, S.K., Yamchi, A., Nasrollanejad, S., & Panjehkeh, N. (2020). Expression analysis of some defense-related genes in susceptible and tolerant maize genotypes in response to infection of maize dwarf mosaic virus (MDMV). *Journal of Plant Protection (Mashhad)*, 32(4), 449-461. (In Persian)
- Robinson, R.A. (1969). Disease resistance terminology. *Review Applied Mycology*, 47(8), 593-606.
- Seifers, D.L., Salomon, R., Marie-Jeanne, V., Alliot, B., Signoret, P., Haber, S., Loboda, A., Ens, W., She, Y.M., & Standing, K.G. (2000). Characterization of a novel potyvirus isolate from maize in Israel. *Phytopathology*, 90, 505-513.
- Shukla, D.D., Jilka, J., Tosic, M., & Ford, R.E. (1989a). A novel approach to serology of potyviruses involving affinity purified polyclonal antibodies directed towards virus-specific N-termini of coat proteins. *J. Gen. Virology.*, 70, 13-23.
- Shukla, D.D., Tosic, M., Jilka, J., Ford, R.E., Toler, R.W., & Langham, M. (1989b). 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.
- Smith, D.R., & White, D.G. (1988). Disease of corn. Corn and corn improvement Academic Press. New Yourk. 699p.
- Sylvester, E.S. (1969). Evidence of transovarial passage of Sowthistle yellow vein virus in the aphid *Hyperomyzus lactucae*. *Virology*. 38, 440-448.
- Toit, L.J., & Pataky, J.K. (1999). Effects of silk maturity and pollination on infection of maize ears by *Ustilago maydis*. *Plant Dis.*, 73, 921-925.
- Verrier, J.L., Marchand, V., Cailleateau, B., & Delon, R. (2001). Chemical change & cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV and PVY infection in burley tobacco. Coresta Meet. Agro Phyto Groups. Cape Town, South Africa, P01.
- Zambrano, J.L., Jones, M.W., Brenner, E., Francis, D.M., Tomas, A., & Redinbaugh, M.G. (2014). Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus resistant maize inbred line. *Theor Appl Genet.*, 127, 867-880.
- Zare, A., Masumi, M., & Izadpanah, K. (2005). *Bermuda grass mosaic virus*: A distinct potyvirus infecting several geramineous species in Iran. *Parasitica*, 61, 105-110.

## ORIGINAL ARTICLE

# Bioinformatics study of ascorbate peroxidase (APX) gene family in *Camellia sinensis* genome

Nahid Azami<sup>1</sup>, Ali Aalami<sup>1</sup>(ORCID: 0000-0002-6791-833X), Amin Abedi<sup>1</sup>

1. Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.

Correspondence:

Ali Aalami

Email: [ali\\_aalami@guilan.ac.ir](mailto:ali_aalami@guilan.ac.ir)

Received: 8, May 2024

Accepted: 1, Jul. 2024

### How to cite:

Azami, N., Aalami, A., & Abedi, A. (2024). Bioinformatics study of ascorbate peroxidase (APX) gene family in *Camellia sinensis* genome. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 19-34. (DOI: [10.30473/cb.2024.71227.1967](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71227.1967))

## ABSTRACT

Tea is native to East Asia, the Indian subcontinent and Southeast Asia, and its leaves are used as one of the most popular drinks in the world. Environmental stresses are one of the most important factors affecting the quantity and quality of agricultural and garden crops, including tea. One of the prominent effects of environmental stresses on plants is the increase in reactive oxygen species (ROS) production. Ascorbate peroxidase (APX) is a key antioxidant enzyme to inhibit ROS in plants. This study was conducted to identify, study the evolution, function of the APX gene family in tea. To identify APX homologous proteins in the tea genome, protein sequences of the APX family from several monocot and dicot plants were used. BlastP results identified 9 homologous sequences from the APX gene family on different tea scaffolds. Based on phylogenetic relationships, APX gene family proteins in tea and the studied plants, including *Arabidopsis*, rice, maize, and potato, were divided into four distinct evolutionary groups. Due to the relatively equal distribution of genes from monocot and dicot plants in phylogenetic groups, it seems that the evolution of these genes occurred from a common ancestral gene before the divergence of monocot and dicot plants. Investigation of the expression of APX homologous genes in different tissues and various environmental stresses showed that *CsAPX1*, *CsAPX3*, *CsAPX4*, *CsAPX5*, and *CsAPX8* genes had moderate to high expression levels, indicating the importance and key role of these genes in different growth stages and various abiotic stresses in plants.

## KEYWORDS

Abiotic stress, Bioinformatics, Evolution, Gene expression, Phylogenetic tree.





## مقدمه

چای (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) معروفترین، طعم‌دارترین و یک نوشیدنی غیر الکلی درمانی است که دو سوم جمعیت جهان آن را می‌نوشند. این محصول همیشه سبز در بیش از ۶۰ کشور واقع در پنج قاره جهان کشت می‌شود. ثابت شده است که برگ‌های چای حاوی بسیاری از ترکیبات فعال زیستی از جمله پلی‌فنول‌ها، اسیدهای آمینه، ترکیبات فرار و آلکالوئیدها هستند که همگی دارای پتانسیل خوبی برای کاربردهای زیست پزشکی هستند (Samynathan et al., 2021).

گیاهان به عنوان موجودات غیرمتحرک، باید در محیط‌هایی با تغییرات مداوم زندگی کنند که گاهی این تغییرات منجر به تنش می‌شود. سیستم بیولوژیکی یک سیستم درون‌زا و پویا است که همیشه به دنبال جریان دائمی انرژی برای حفظ وضعیت متاپایدار خود به نام هموستاز است. هر گونه اختلال محیطی در این هموستاز ممکن است به عنوان تنش بیولوژیکی تعریف شود. مفهوم تنش برای اولین بار توسط "سلی" در سال ۱۹۳۶ به عنوان محدودیت‌های محیطی نامطلوب برای گیاهان تعریف شد (Szabo et al., 2017). تنش در گیاهان به شرایط خارجی اطلاق می‌شود که بر رشد، نمو یا بهره‌وری گیاهان تأثیر منفی می‌گذارد. تنش‌ها باعث ایجاد طیف وسیعی از پاسخ‌های گیاهی مانند تغییر بیان ژن، متابولیسم سلولی، تغییر در نرخ رشد، عملکرد محصول و غیره می‌شوند (Jena et al., 2020).

تنش غیرزیستی به هر عامل محیطی گفته می‌شود که می‌تواند رشد و بهره‌وری گیاه را محدود سازد. از نظر تاریخی، تنش غیرزیستی در نیم قرن گذشته به دلیل رشد سریع جمعیت انسانی (که امنیت غذایی جهانی را تهدید می‌کند) مورد توجه دانشمندان و متخصصان کشاورزی قرار گرفت. افزایش تقاضای مواد غذایی، بررسی دلایل کاهش تولید محصول را اجتناب‌ناپذیر کرد که اغلب نادیده گرفته می‌شد. در همین زمان بود که دانشمندان شروع به تخمین کاهش عملکرد محصولات، ناشی از تنش‌های محیطی و بررسی دلایل آن کردند. در اوایل دهه ۸۰، بوبر تخمین زد که عوامل محیطی ممکن است تولید محصول

را تا ۷۰ درصد کاهش دهد. از آن زمان تاکنون، گزارش‌های متعددی منتشر شده است که به کاهش محصول به دلیل تنش‌های غیرزیستی مختلف اشاره می‌کند. برخی از این تنش‌ها اثرات جبران‌ناپذیری بر زمین‌های تحت کشت و در نهایت بر تولید و کیفیت محصول می‌گذارد (Cramer et al., 2011).

تنش‌های غیرزیستی مانند دمای پایین یا زیاد، کمبود یا بیش بود آب، شوری، فلزات سنگین و تابش فرابنفش، رشد و نمو گیاهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این تنش‌ها، که در مجموع به عنوان تنش‌های غیرزیستی نامیده می‌شوند، تهدیدی جدی برای کشاورزی و اکوسیستم به شمار می‌روند و باعث کاهش عملکرد محصول می‌شوند. گیاهان به دلیل ماهیت ساکن بودنشان باید با تنش‌ها مقابله کنند و تاکتیک‌های انطباقی قوی برای اجتناب یا تحمل اثرات نامطلوب آن‌ها به منظور بقاء و رشد ایجاد کنند. در پاسخ به شرایط تنش، مقاومت گیاهان به اشکال مختلف توسط یک شبکه نظارتی پیچیده شامل مولکول‌های سیگنال‌دهنده بالادستی از جمله هورمون‌های تنش، گونه‌های فعال اکسیژن، گازوترنسmitterها، پلی‌آمین‌ها، فیتوکروم‌ها و کلسیم و همچنین عوامل پایین‌دست ژن، به ویژه فاکتورهای رونویسی تنظیم می‌شود (He et al., 2018).

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) محصولات جانبی متابولیسم‌های فیزیولوژیکی هستند و دقیقاً توسط سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی کنترل می‌شوند. ROSها به طور قابل توجهی در شرایط تنش غیرزیستی تجمع می‌یابند که باعث آسیب اکسیداتیو و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود. اخیراً، ROSها نیز به عنوان بازیگران کلیدی در شبکه سیگنالینگ پیچیده پاسخ‌های تنش گیاهان شناخته شده‌اند. شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که ROSها نقش مهمی در پاسخ‌های تنش غیرزیستی گیاهان زراعی برای فعال‌سازی مسیرهای واکنش به تنش و دفاع دارد. مهمتر از آن، دستکاری سطوح ROS فرصتی برای افزایش تحمل به تنش گیاهان زراعی در شرایط مختلف محیطی نامطلوب فراهم می‌کند (You and Chan, 2015).

### پیشینه پژوهش

در حال حاضر، گزارش های زیادی در مورد اعضای خانواده ژنی APX وجود دارد. خانواده APX در *Arabidopsis thaliana* دارای هشت ژن است که سه ژن *APX1*، *APX2* و *APX6* پروتئین های سیتوپلاسمی، دو ژن *sAPX* و *tAPX* به ترتیب پروتئین های موجود در ماتریکس کلروپلاست و غشای تیلاکوئید و سه ژن *APX4*، *APX5* و *APX6*، پروتئین های پراکسیداز را کد می کنند (Panchuk et al., 2002; Narendra et al., 2006). همچنین گزارش های مشابه زیادی در مورد محصولاتی مانند برنج، گوجه فرنگی، سیب زمینی و پنبه وجود دارد (Leonardis et al., 2000; Lu et al., 2005; Teixeira et al., 2006; Najami et al., 2008; Tao et al., 2018a, b).

لیانگ و همکاران (Liang et al., 2024) خانواده ژنی APX را در گیاه شاهدانه (*Cannabis sativa* L.) تحت تنش های غیرزیستی مختلف مورد تجزیه و تحلیل ژنومی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که سطح بیان ژن های *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX8* تحت چهار تنش سرما، خشکی، شوری و اکسیداتیو افزایش معنی داری داشت. سطح بیان ژن *CsAPX2* تحت تنش خشکی افزایش قابل توجهی در مقایسه با سایر تنش های مورد بررسی از خود نشان داد.

سان و همکاران (Sun et al., 2023) در مطالعه ای روی کلزا (*Brassica napus* L.)، گستره ژنومی و چگونگی بیان ژن های APX را تحت تنش دمای پایین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان دهنده وجود ۱۸ ژن با سه دامنه حفاظت شده مختلف در کلزا بود که بر اساس تحلیل فیلوژنتیکی به سه شاخه اصلی تقسیم بندی شدند. اکثر ژن های APX به خصوص *APX2*، *APX4*، *APX12* و *APX18* افزایش بیان در سطح رونویسی تحت تنش دمای پایین از خود نشان دادند.

Aleem et al. (2022) خانواده های ژنی APX و CAT را در سویای زراعی و وحشی بررسی کردند. در این مطالعه، به ترتیب ۱۱ و ۱۰ ژن APX در ژنوم سویای زراعی و وحشی شناسایی شد، در حالی که تعداد ژن های

فرآیند سم زدایی ROS در گیاهان برای محافظت از سلول های گیاهی و اندامک های آن ها در برابر اثر سمی این ROS ها ضروری است. تفاوت در مکان یابی درون سلولی و خواص بیوشیمیایی آنزیم های آنتی اکسیدانی و پاسخ های متمایز در بیان ژن، علاوه بر وجود مکانیسم های غیر آنزیمی، منجر به یک سیستم آنتی اکسیدانی همه کاره و انعطاف پذیر نیز می شود که قادر به کنترل سطوح بهینه ROS است. سیستم های سم زدایی ROS شامل اجزای آنتی اکسیدانی آنزیمی و غیر آنزیمی است. آسکوربات (AsA) و گلوتاتیون (GSH)، آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی بسیار مهم برای دفاع گیاه در برابر تنش اکسیداتیو هستند و نقش کلیدی به عنوان بافرهای آنتی اکسیدانی دارند. سایر آنتی اکسیدان های غیر آنزیمی درگیر شامل فلاونوئیدها، ترکیبات فنلی، آلکالوئیدها، توکوفرول و کاروتنوئیدها هستند. آنتی اکسیدان های آنزیمی شامل سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، آسکوربات پراکسیداز (APX)، کاتالاز (CAT)، گلوتاتیون پراکسیداز (GPX) و پراکسی ردوکسین (PrxR) هستند. این آنزیم ها عملاً در تمام بخش های درون سلولی وجود دارند. معمولاً یک اندامک دارای بیش از یک آنزیم است که قادر به حذف یک ROS است. سیستم اصلی سم زدایی پراکسید هیدروژن در کلروپلاست های گیاهی چرخه آسکوربات-گلوتاتیون است که در آن APX یک آنزیم کلیدی است (Scandalios et al., 2005; Caverzan et al., 2012).

آسکوربات پراکسیداز (APX: Ascorbate peroxidase) یکی از اجزای آنزیمی سیستم دفاعی آنتی اکسیدانی است. APX ها در اکثر گیاهان عالی شناسایی شده است و شامل خانواده ای از ایزوآنزیم ها با ویژگی های مختلف است. ایزوآنزیم های APX حداقل در چهار جایگاه سلولی مجزا یافت می شوند: APX سیتوزولی (cAPX)، APX متصل به غشای تیلاکوئید در کلروپلاست (tAPX)، APX استروما (sAPX) و APX متصل به غشای میکروبادی، شامل غشای گلی اکسی زوم و پراکسی زوم (mAPX). ایزوفرم های مختلف APX به سیگنال های متابولیکی و محیطی پاسخ متفاوتی می دهند (Gangwar et al., 2014).

چای همچون بسیاری از گیاهان دیگر تحت تاثیر تنش‌های زیستی و به خصوص غیرزیستی قرار دارد. چای معمولاً در اکوسیستم‌های دیم کشت می‌شود و بنابراین با شرایط کمبود آب فصلی مواجه می‌شود که باعث کاهش عملکرد محصول می‌شود. همچنین بسیاری از مناطق تحت کشت چای در معرض فلزات سنگین همچون کادمیوم، مس و آلومینیوم قرار دارند که منجر به کاهش رشد و پاسخ آنتی‌اکسیدانی می‌شوند. تنش‌های غیر زیستی، منجر به افزایش تولید ROSها و تنش اکسیداتیو شده و در نهایت بهره‌وری چای را محدود می‌کند (Upadhyaya and Panda, 2013).

اگرچه مطالعات بسیاری جهت بررسی ساز و کارهای مولکولی و بیوشیمیایی گیاهان مختلف تحت تنش‌های زیستی و غیر زیستی انجام شده است اما همچنان زوایای مختلف آن ناشناخته است. از این رو مطالعه حاضر با هدف شناسایی و مطالعه تکامل و کارکرد خانواده ژنی آسکوربات پراکسیداز (APX) در گستره ژنوم گیاه چای (*Camellia sinensis*) انجام شد.

### روش‌شناسی پژوهش

شناسایی ژن‌های همولوگ APX در گستره ژنوم چای اطلاعات اولیه و امکان دسترسی به داده‌های ژنومی گیاهان آرابی‌دوپسیس تالیانا (*Arabidopsis thaliana*)، برنج-گونه ژاپونیکا (*Oryza sativa- Japonica*)، ذرت (*Zea mays*) و سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) سبب انتخاب آنها برای استخراج توالی‌های پروتئینی خانواده ژنی APX به عنوان توالی اولیه جهت شناسایی پروتئین‌های همولوگ در چای شد. اسم ژن‌ها و شماره دسترسی آنها با بررسی منابع قبلی به دست آمد (جدول ۱) و برای دریافت توالی‌های پروتئینی از پایگاه داده EnsemblPlants به نشانی (<https://plants.ensembl.org>) استفاده شد.

توالی پروتئینی خانواده APX در آرابی‌دوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی به عنوان توالی اولیه با روش BlastP جهت شناسایی پروتئین‌های همولوگ در بانک اطلاعاتی اختصاصی ژنوم چای به نام TeaCoN به نشانی <http://teacon.wchoda.com/> (Zhang et

CAT شناسایی شده در هر گونه چهار عدد بود. تجزیه و تحلیل تطبیقی فیلوژنتیک همسانی بیشتری را در بین سویای زراعی و وحشی نسبت به سایر حبوبات نشان داد. ساختار اگزون-اینترون و موتیف‌ها در گونه‌های زراعی و وحشی حفاظت شده بودند. با توجه به مقدار Ka/Ks، فشار گزینش منفی عامل اصلی تکامل این خانواده‌های ژنی در سویای وحشی است. در حالی که خانواده ژنی APX در سویای زراعی توسط هر دو فشار گزینش مثبت و منفی تکامل یافته است.

Bakir and Yildirim (2022) بیان ژن *LcAPX* را در گیاهچه‌های عدس (*Lens culinaris* Medik.) در شرایط تنش خشکی بررسی کردند. ژن *LcAPX* در هر دو رقم Firat-87 مقاوم و حساس به خشکی با شدت تنش خشکی سطح بیان متفاوتی داشت. این محققین از مطالعه انجام شده به این نتیجه رسیدند که تغییرات وابسته به زمان در بیان ژن *LcAPX* نشان می‌دهد که ژن *LcAPX* دارای مشخصات بیان ژنی بسیار خاص و تنظیم پیچیده در پاسخ به خشکی در عدس است.

Raza et al. (2022) مطالعه جامعی در سطح ژنوم بادام‌زمینی برای کشف ژن‌های APX انجام دادند. در این بررسی، ۱۶۶ ژن *AhAPX* در ژنوم بادام‌زمینی شناسایی شد که در ۱۱ گروه اصلی طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل ژن‌های مضاعف شده نشان داد که ژن‌های *AhAPX* دارای مضاعف‌شدگی سگمنتال و فشار گزینش منفی بودند. بررسی ساختار ژن و موتیف‌ها نشان داد که اکثر ژن‌های *AhAPX* یک الگوی اگزون-اینترون نسبتاً حفاظت شده داشتند. بررسی عناصر تنظیمی سیس نیز منجر به شناسایی پنج عنصر تنظیمی مرتبط با هورمون گیاهی، شش عنصر تنظیمی مرتبط با تنش‌های غیر زیستی، و پنج عنصر سیس مرتبط با رشد و توسعه در مناطق پروموتور *AhAPX* شد. همچنین چهارده *ah-miRNA* فرضی از ۱۲ خانواده شناسایی شدند که ۳۳ ژن *AhAPX* را هدف قرار دارند. علاوه بر این، ۳۲۵۷ فاکتور رونویسی را از ۳۸ خانواده (شامل AP2، ARF، B3، WRKY، NAC، MYB، ERF، bZIP، bHLH و غیره) در ۱۶۲ ژن *AhAPX* شناسایی شد.

al., 2020). پس از دریافت تمام توالی‌ها، توالی‌های تکراری حذف شده و در نهایت تأیید وجود دمین مورد نظر (PF00141) با استفاده از بانک اطلاعاتی SMART به نشانی (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) انجام شد (Letunic et al., 2012). در این پایگاه داده با وارد کردن اطلاعات توالی‌های پروتئینی و انتخاب گزینه PFAM domains، وجود دمین‌های کارکردی موردنظر بررسی شد.

#### جدول ۱. اسم و شماره دسترسی ژن‌های همولوگ APX در

آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی

**Table 1.** Name and accession number of homologous APX genes in arabidopsis, rice, corn and potato

| Accession number     | Genes   | Plant species                     |
|----------------------|---------|-----------------------------------|
| AT1G07890            | AtAPX1  | <i>Arabidopsis thaliana</i> (At)  |
| AT3G09640            | AtAPX2  |                                   |
| AT4G35000            | AtAPX3  |                                   |
| AT4G09010            | AtAPX4  |                                   |
| AT4G35970            | AtAPX5  |                                   |
| AT4G32320            | AtAPX6  |                                   |
| AT4G08390            | SAPX    |                                   |
| AT1G77490            | TAPX    |                                   |
| OS03G0285700         | OsAPX1  | <i>Oryza sativa Japonica</i> (Os) |
| OS07G0694700         | OsAPX2  |                                   |
| OS04G0223300         | OsAPX3  |                                   |
| OS08G0549100         | OsAPX4  |                                   |
| OS12G0178200         | OsAPX5  |                                   |
| OS12G0178100         | OsAPX6  |                                   |
| OS04G0434800         | OsAPX7  |                                   |
| OS02G0553200         | OsAPX8  |                                   |
| Zm00001d016802       | APXa1   | <i>Zea mays</i> (Zm)              |
| Zm00001d003643       | APXa2   |                                   |
| Zm00001d023582       | APXa3   |                                   |
| Zm00001d025047       | APXb1   |                                   |
| Zm00001d053223       | APXb2   |                                   |
| Zm00001d047757       | APXc1.1 |                                   |
| Zm00001d028709       | APXc1.2 |                                   |
| Zm00001d007234       | APXc2   |                                   |
| PGSC0003DMG401001731 | StAPX2  | <i>Solanum tuberosum</i> (St)     |
| PGSC0003DMG400006175 | StAPX3  |                                   |
| PGSC0003DMG402003646 | StAPX5  |                                   |
| PGSC0003DMG400000894 | St2341  |                                   |
| PGSC0003DMG400030056 | St7268  |                                   |
| PGSC0003DMG400030063 | St7286  |                                   |
| PGSC0003DMG400003645 | St9378  |                                   |

#### بررسی ویژگی‌های پروتئین‌های APX در گستره ژنوم چای

ویژگی‌های عمومی پروتئین‌های APX مانند وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک (PI) و تعداد اسیدهای آمینه از سایت Expasy به نشانی (<https://web.expasy.org/protparam/>) دریافت شد

(Artimo et al., 2012). از آن جا که توالی‌یابی ژنوم چای به صورت کامل انجام نشده است، لذا توالی‌ها به شکل اسکافولد (Scaffold) ارائه می‌شود. اطلاعات اسکافولد به همراه محل شروع و پایان ژن به همراه اطلاعات توالی پروتئینی قابل دریافت است. برای پیش‌بینی جایگاه درون سلولی پروتئین‌ها نیز از پایگاه داده CELLO v.2.5 به نشانی (<https://cello.life.nctu.edu.tw/>) استفاده شد (Yu et al., 2014).

#### رسم درخت فیلوژنتیکی

برای رسم درخت فیلوژنتیکی در ابتدا هم‌ردیف‌سازی پروتئین‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX یا سایت <https://www.genome.jp/tools-clustalw> به نشانی <https://www.genome.jp/tools-clustalw> انجام شد. سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA7 رسم شد (Kumar et al., 2016). از آنجا که نرم‌افزار MEGA تنها فرمت FASTA را شناسایی می‌کند، لذا از داده‌های ClustalX یا [clustalW](https://www.genome.jp/tools-clustalw) به شکل FASTA خروجی گرفته شد. برای رسم درخت فیلوژنتیکی از الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه استفاده شد و صحت درخت رسم شده از طریق آزمون Bootstrap ارزیابی شد.

#### بررسی ساختار اگزونی-اینترونی

جهت تعیین تعداد و طول اگزون‌های خانواده ژنی APX در گستره ژنوم چای و همچنین بررسی فاز اسپیلیسینگ از سایت Gene Structure Display Server (GSDS) به نشانی <http://gsds.gao-lab.org/> استفاده شد (Hu et al., 2015). برای رسم ساختار اگزونی-اینترونی از توالی‌های CDS و DNA ژنومی و همچنین نتیجه حاصل از درخت فیلوژنتیکی که به شکل Newick ذخیره شده بود، استفاده شد.

#### بررسی پروفایل بیانی ژن‌های APX در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی

جهت بررسی بیان ژن‌های APX در گستره ژنوم چای، از

صورت کامل انجام نشده است، لذا محل قرارگیری ژن‌ها به شکل اسکافولد ارائه شد. مرتب‌سازی ژن‌ها بر اساس شماره اسکافولدها انجام شد و برای نامگذاری ژن‌ها ابتدا از حرف اول نام گونه چای (Cs)، در ادامه کلمه *APX* و سپس شماره استفاده شد. به این ترتیب، نامگذاری ژن‌ها از *CsAPX1* شروع و تا *CsAPX9* خاتمه یافت (جدول ۲).

مشخصات عمومی ژن‌های شناسایی شده نشان داد که ژن‌ها به ترتیب روی اسکافولدهای ۲۸۲، ۳۹۹، ۵۶۵، ۲۸۸۰، ۳۳۶۴، ۳۸۱۵، ۳۹۸۲، ۶۲۵۵ و ۲۴۴۷ قرار داشتند. وزن مولکولی پروتئین‌های شناسایی شده بین ۳۱/۶۵۷ کیلودالتون برای *CsAPX3* تا ۸۴/۱۴۵ کیلودالتون برای *CsAPX2* متغیر بود. کمترین طول پروتئین نیز متعلق به *CsAPX3* و *CsAPX4* با ۲۸ اسیدآمینه و بیشترین طول پروتئین متعلق به *CsAPX2* با ۷۴۵ اسیدآمینه بود. نقطه ایزوالکتریک (pI) نیز بین مقادیر ۵/۰۳ (*CsAPX6*) تا ۹/۱۱ (*CsAPX1*) متغیر بود. محل فعالیت پروتئین‌های *CsAPX3*، *CsAPX4* و *CsAPX9* در سیتوپلاسم، *CsAPX5*، *CsAPX6* و *CsAPX8* در کلروپلاست و *CsAPX2* در غشای پلاسمای پیش‌بینی شد. برای پروتئین *CsAPX1* دو جایگاه سلولی شامل سیتوپلاسم و میتوکندری پیش‌بینی شد. پیش‌بینی محل فعالیت برای پروتئین *CsAPX7* نیز در دو جایگاه میتوکندری و خارج سلولی بود (جدول ۲).

نتایج بررسی خانواده ژنی *APX* در برنج نشان داد که دارای هشت عضو است که به ترتیب دو ایزوفرم سیتوزولی، دو ایزوفرم پراکسیزومی و چهار ایزوفرم کلروپلاستی را کد می‌کنند (Teixeira et al., 2004).

داده‌های RNA-seq مربوط به بافت‌های مختلف گیاه چای شامل جوانه رأسی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ‌های جوان، بالغ و پیر و در پاسخ به تنش‌های غیرزیستی مختلف شامل شوری، پلی اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات حاصل از پایگاه داده TPIA به نشانی (<http://tpia.teaplant.org/>) استفاده شد (Xia et al., 2019). پایگاه داده TPIA، از داده‌های حاصل از مطالعات شی و همکاران (Shi et al., 2015)، وانگ و همکاران (Wang et al., 2013)، وی و همکاران (Wei et al., 2018) و ژانگ و همکاران (Zhang et al., 2017) به ترتیب مرتبط با تیمار متیل جاسمونات، تنش سرما، مراحل رشدی و تنش شوری و خشکی تشکیل شده است. نقشه حرارتی (Heat map) بیان ژن‌های *APX* از طریق نرم‌افزار TBtools ترسیم شد (Chen et al., 2018).

## یافته‌های پژوهش

### شناسایی پروتئین‌های خانواده ژنی *APX* و بررسی

#### مشخصات عمومی آن‌ها در گستره ژنوم چای

برای شناسایی پروتئین‌های همولوگ در گستره ژنوم چای از توالی‌های پروتئینی خانواده *APX* در تعدادی از گیاهان تک‌لپه و دولپه استفاده شد. از این رو، تعداد هشت توالی پروتئینی از آرکیدوپسیس، برنج و ذرت و هفت توالی پروتئینی از سیب‌زمینی به عنوان توالی اولیه استفاده شد تا با انجام BlastP، پروتئین‌های همولوگ چای شناسایی شوند. پس از حذف توالی‌های تکراری و تأیید وجود دمین کارکردی مورد نظر، تعداد نه توالی همولوگ از خانواده ژنی *APX* شناسایی شد. از آن جا که توالی‌یابی ژنوم چای به

جدول ۲. مشخصات عمومی ژن‌های خانواده ژنی *APX* در گستره ژنوم چای

Table 2. General characteristics of *APX* genes family members in the tea genome

| Cellular localization      | Isoelectric point | Protein length(aa) | Weight (Kilo Daltons) | Gene end | Gene start | Scaffold      | Gene name     | Gene ID     |
|----------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|----------|------------|---------------|---------------|-------------|
| Cytoplasm                  | 9.11              | 551                | 61.912                | 908111   | 897441     | Scaffold282   | <i>CsAPX1</i> | TEA026035.1 |
| Mitochondria               |                   |                    |                       |          |            |               |               |             |
| Plasma membrane            | 6.02              | 745                | 84.145                | 3034087  | 3016631    | Scaffold399   | <i>CsAPX2</i> | TEA030817.1 |
| Cytoplasm                  | 6.72              | 288                | 31.657                | 399209   | 388039     | Scaffold565   | <i>CsAPX3</i> | TEA000543.1 |
| Cytoplasm                  | 7.06              | 288                | 31.895                | 420631   | 414081     | Scaffold2880  | <i>CsAPX4</i> | TEA019211.1 |
| Chloroplast                | 6.73              | 421                | 45.658                | 685085   | 678480     | Scaffold3364  | <i>CsAPX5</i> | TEA012379.1 |
| Chloroplast                | 5.03              | 406                | 44.517                | 79075    | 72572      | Scaffold3815  | <i>CsAPX6</i> | TEA021205.1 |
| Extracellular Mitochondria | 6.07              | 384                | 41.991                | 1055211  | 1048196    | Scaffold3982  | <i>CsAPX7</i> | TEA018635.1 |
| Chloroplast                | 5.53              | 352                | 38.2                  | 803466   | 797035     | Scaffold6255  | <i>CsAPX8</i> | TEA028541.1 |
| Cytoplasm                  | 6.11              | 450                | 49.897                | 647887   | 641965     | Scaffold12447 | <i>CsAPX9</i> | TEA017156.1 |

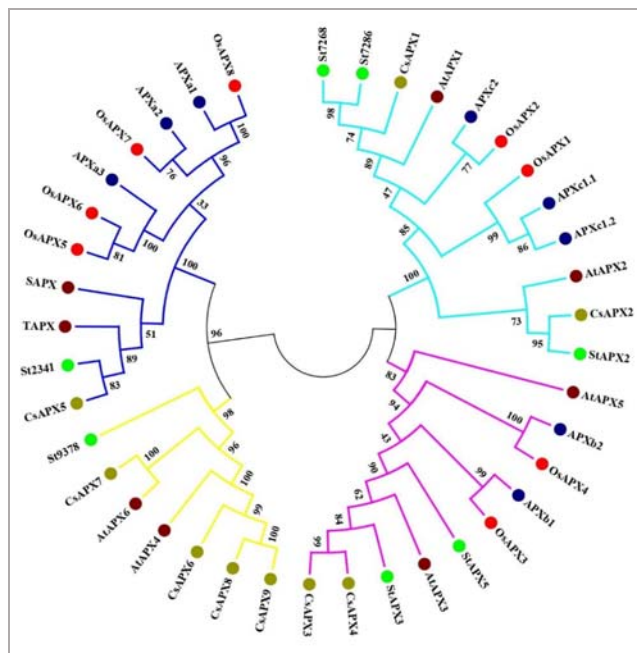


گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آرابیدوپسیس تالیانا، برنج، ذرت و سیب‌زمینی در شکل یک نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد بر اساس روابط فیلوژنتیکی، پروتئین‌های خانواده ژنی APX در گیاهان مورد مطالعه بر اساس امتیاز بوت استرپ (Felsenstein, 1985) به چهار گروه تکاملی مجزا تقسیم شدند. گروه اول شامل ۱۲ ژن مشتمل بر دو ژن آرابیدوپسیس تالیانا، دو ژن برنج، سه ژن ذرت، سه ژن سیب‌زمینی و دو ژن چای بود. گروه دوم از ۱۰ ژن تشکیل شده که شامل دو ژن از آرابیدوپسیس تالیانا، دو ژن از برنج، دو ژن از ذرت، دو ژن از سیب‌زمینی و دو ژن از چای است. گروه سوم که از نظر فراوانی ژن‌ها، کوچکترین گروه با کمترین تعداد ژن (هفت عدد) است شامل دو ژن از آرابیدوپسیس تالیانا، یک ژن از سیب‌زمینی و چهار ژن چای بود. تعداد ۱۱ ژن در گروه چهارم جای گرفتند که شامل دو ژن آرابیدوپسیس تالیانا، چهار ژن برنج، سه ژن ذرت، یک ژن سیب‌زمینی و یک ژن چای بودند (شکل ۱).

خانواده ژنی APX در گیاه گوجه‌فرنگی شامل ژن‌هایی است که سه APX سیتوزولی، دو APX پراکسیزومی و دو APX کلروپلاستی را کد می‌کنند (Najami et al., 2008). همچنین نه عضو از خانواده APX در سورگوم (Akbadak et al., 2018)، به ترتیب ۱۱ و ۱۰ ژن APX در سویای زراعی و وحشی (Aleem et al., 2022)، هشت عضو در آرابیدوپسیس (Panchuk et al., 2002; Narendra et al., 2006)، ۱۱ عضو در صنوبر کالیفرنایی (*Populus trichocarpa*) (Leng et al., 2021)، ۱۳ عضو در کویو (رقم: Hongyang) (Liao et al., 2020)، ۲۱ عضو در گندم (Tyagi et al., 2020) و به ترتیب ۱۶ و نه عضو در کلزا، گونه‌های *B. rapa* و *B. juncea* (Verma et al., 2022) شناسایی شده است.

#### مطالعه فیلوژنتیکی خانواده ژنی APX در چای و سایر گونه‌های گیاهی

درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی APX در



شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی پروتئین‌های خانواده ژنی APX در گستره ژنوم چای و سایر گونه‌های گیاهی شامل آرابیدوپسیس، برنج، ذرت و سیب‌زمینی

**Figure 1.** Phylogenetic tree of APX gene family proteins in the tea genome and other plant species including arabidopsis, rice, corn and potato

پروتئین‌ها کد نشده و در مرحله رونویسی pre-mRNA توسط مکانیسم RNA اسپلایسینگ حذف می‌شوند (Zhu et al., 2009).

تعداد اگزون‌های موجود در همولوگ‌های خانواده ژنی APX چای بین نه تا ۱۶ اگزون متغیر بود. کمترین تعداد اگزون به ژن‌های CsAPX3 و CsAPX4 با نه اگزون و بیشترین تعداد اگزون به ژن CsAPX2 با ۱۶ اگزون تعلق داشت. طول اگزون‌ها در گروه سوم که شامل ژن‌های CsAPX6، CsAPX8 و CsAPX9 بود، از فراوانی تقریباً یکسانی برخوردار است که نشان می‌دهد حفاظت‌شدگی بالایی در ساختار ژنی این گروه فیلوژنتیکی وجود دارد (شکل ۲). Raza et al. (2022) در مطالعه‌ای روی ژن‌های APX بادام‌زمینی گزارش کردند که اکثر ژن‌های AhAPX یک الگوی اگزون-اینترونی نسبتاً حفاظت‌شده دارند. تعداد اگزون‌ها در خانواده ژنی APX گندم بین هفت تا ۱۲ متغیر بود (Tyagi et al., 2020).

بیشترین تنوع در فراوانی اگزون‌ها در گروه اول مشاهده شد که بیانگر تغییرات تکاملی ژن‌های این گروه فیلوژنتیکی می‌باشد. اتصالات پله‌ای یا زنجیره‌ای (Chaining) ژن‌ها نیز موید این مطلب است که تکامل تدریجی در این ژن‌ها اتفاق افتاده است. شواهد بسیاری نشان می‌دهد که اگزون‌های جدید نیز دائماً به ژنوم‌های در حال تکامل اضافه می‌شوند. مکانیسم‌های متعددی به ایجاد اگزون‌های جدید در ژنوم‌ها، از جمله تکثیر ژنی و مضاعف‌شدگی اگزون‌ها کمک می‌کنند. همچنین اگزون‌زایی (Exonization) نیز یکی از دلایل ایجاد اگزون می‌تواند باشد، جایی که توالی‌های اینترونی به اگزون‌های جدید تبدیل می‌شوند (Sorek, 2007).

نتایج حاصل از بررسی فاز اسپلایسینگ نشان داد که در گروه سوم فیلوژنتیکی (ژن‌های CsAPX6، CsAPX8 و CsAPX9) توزیع اینترون‌ها مانند اگزون‌ها، تقریباً یکسان بوده به شکلی که ژن CsAPX6، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۰۰۲۱۱۰۰۰، ژن CsAPX8، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۰۰۲۱۰۰۰ و ژن CsAPX9، الگوی فازی اسپلایسینگ ۰۰۱۱۰۰۲۲۱۰۰۰ داشتند. گروه اول همچنان مشابه نتایج حاصل از بررسی توالی اگزونی، تنوع بسیاری در فاز

ژن‌های موجود در گروه‌های اول، سوم و چهارم از همه گیاهان مورد مطالعه شامل برنج، ذرت، آرابیدوپسیس، سیب‌زمینی و چای با فراوانی تقریباً نزدیک به هم بودند. از آنجاکه ذرت و برنج در گروه گیاهان تک‌لپه و آرابیدوپسیس تالیانا، سیب‌زمینی و چای در گروه گیاهان دولپه قرار می‌گیرند؛ لذا قرارگیری تعداد زیادی از ژن‌های مورد بررسی به نسبت تقریباً مساوی در گروه‌های ذکر شده نشان‌دهنده‌ی تکامل این ژن‌ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی گیاهان تک‌لپه و دولپه می‌باشد (Qu et al., 2020).

ایزوفرم‌های مختلف APX توسط یک فرآیند تکاملی پیچیده که شامل چندین تکرار ژنی است به وجود آمده‌اند. سازماندهی ساختاری ژن‌های APX نیز این فرآیند را منعکس می‌کند و شواهدی برای ارتباط نزدیک بین پروتئین‌های واقع در همان بخش درون سلولی ارائه می‌دهد. به عبارت دیگر محل فعالیت ژن‌های APX نیز در مسیر تکامل آن‌ها اثر می‌گذارد. لذا قرارگیری ژن‌های گیاهان تک‌لپه و دولپه در کنار یکدیگر می‌تواند به دلیل محل فعالیت پروتئین در سلول گیاهی باشد (Teixeira et al., 2004).

ژن‌های موجود در گروه سوم، فقط از گیاهان دولپه شامل آرابیدوپسیس تالیانا، سیب‌زمینی و چای بود و هیچ ژنی از گیاهان تک‌لپه در این گروه قرار نداشت. این موضوع نشان‌دهنده‌ی رابطه تکاملی نزدیک در گیاهان دولپه از نظر هفت ژن موجود در این گروه بود. عوامل بسیاری می‌تواند بر تکامل ژن‌ها اثر بگذارد. از جمله این موارد می‌توان به مضاعف‌شدگی و فشار گزینش اشاره نمود (Shoeva et al., 2017). وجود رابطه نزدیک بین تک‌لپه‌ای‌ها و بین دولپه‌ای‌ها در خانواده‌های ژنی AGO، DCL و RDR نیز در گیاه چای مشاهده شده است (Krishnatreya et al., 2021).

## بررسی ساختار اگزونی-اینترونی و فاز اسپلایسینگ خانواده ژنی APX چای

اگزون‌ها و اینترون‌ها، توالی‌های نوکلئوتیدی در DNA و RNA هستند. اگزون‌ها در مسیر رونویسی RNA حفظ می‌شوند، در حالی که اینترون‌ها مستقیماً در رونویسی

طور کاملی توضیح نمی‌دهد که چرا اینترون‌های فاز یک رایج‌تر از اینترون‌های فاز دو هستند (Roy, 2003).

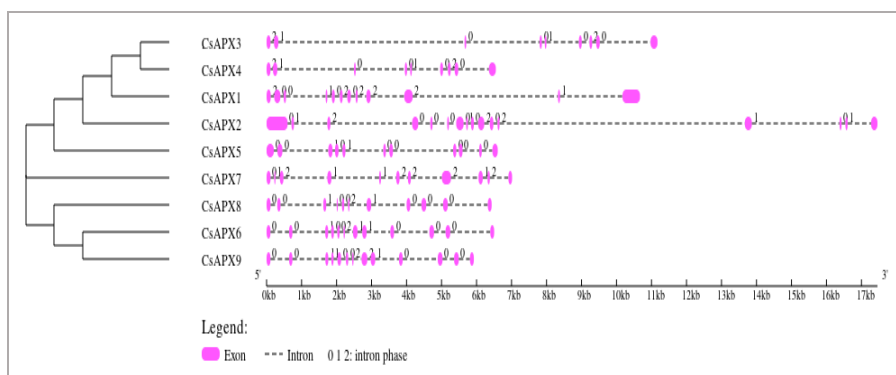
در مقابل، نظریه دوم که نظریه الحاق اینترون (Insertional theory of introns) است پیشنهاد می‌کند که عدم یکنواختی توزیع فاز اینترون ممکن است از الحاق غیر تصادفی اینترون ناشی شده باشد. پیشنهاد شده است که اینترون‌ها فقط در یک الگوی توالی ثابت الحاق شوند که به آن "محل اتصال اولیه" (Proto-splice site) می‌گویند. با این حال، هنوز شواهد روشنی وجود ندارد که توزیع مشاهده شده فاز اینترون ناشی از الحاق اینترون باشد (Dibb and Newman, 1989). افزایش اینترون توسط مکانیسم‌های ناشناخته در نماتدها، قارچ‌ها و تعداد محدودی از موجودات دیگر شناسایی شده است، در حالی که از دست دادن اینترون در بسیاری از موجودات مشاهده شده است (Roy et al., 2003).

بیشترین تعداد اینترون در ژن *CsAPX2* مشاهده شد که به همین دلیل بیشترین طول ژنی را نیز دارا بود. البته این ژن بیشترین تعداد اگزون را نیز داشت. با بررسی خانواده ژنی *APX* در کیوی گزارش شد که *AcAPX*‌ها از چهار الی ۲۲ اینترون تشکیل شده‌اند، با این تفاوت که *AcAPX10* بدون اینترون بود (Liao et al., 2020). در مطالعه دیگری در خانواده ژنی *APX* در ژنوم گندم مشخص شد که در بین تمام ژن‌ها، ۶۰ درصد اینترون در فاز صفر و پس از آن ۲۳ و ۱۷ درصد در فازهای یک و دو قرار داشتند (Tyagi et al., 2020).

اسپلایسینگ از خود نشان دادند. الگوی فاز اسپلایسینگ در اعضای این گروه به شکل ۲۱۰۰۰۲۰، ۲۱۰۰۱۰۲۰، ۲۰۰۱۰۲۰۲۲۲۱، ۲۰۰۱۰۲۰۲۲۲۱ و ۰۱۲۰۰۰۰۱۰۲۰۲۱۰۱ و ۰۰۱۰۱۰۰۰۰۰ بود. الگوی فاز اسپلایسینگ در ژن *CsAPX6* نیز به صورت ۰۱۲۱۱۲۲۲۲۱ بود (شکل ۲).

در همه ژن‌های شناسایی شده هر سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو وجود داشت. فراوانی سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو در مطالعه حاضر به ترتیب معادل ۵۳/۱۹، ۲۴/۴۷ و ۲۲/۳۴ درصد بود. اینترون‌های فاز صفر، یک و دو به ترتیب اینترون‌هایی هستند که قبل از اولین، بعد از اولین و بعد از نوکلئوتید دوم کدون قرار دارند. فاز یک اینترون در طول تکامل حفظ می‌شود، زیرا تغییر در فاز اینترون تنها از طریق جهش‌های همزمان امکان‌پذیر است که انتهای ۵' و ۳' اینترون را به صورت مکمل تغییر می‌دهند. توزیع فازهای اینترون غیر یکنواخت است؛ اینترون‌های فاز صفر بیشترین و اینترون‌های فاز دو کمترین فراوانی را دارند (Fedorov et al, 1992; Long et al, 1998).

دو نظریه در ارتباط با اینترون‌ها وجود دارد. نظریه اول در ارتباط با توزیع غیر یکنواخت اینترون‌ها می‌گوید که ۳۵ درصد از اینترون‌های امروزی قدیمی هستند، یعنی در اجداد وجود داشته‌اند تا همگذاری (Assembly) اولین ژن‌ها را تسهیل کنند. از آن جایی که اگزون‌ها بقایای مینی‌ژن‌های اولیه (Primordial minigenes) هستند، اکثر اینترون‌های قدیمی در فاز صفر قرار می‌گیرند که منجر به افزایش اینترون‌های فاز صفر شده است. با این حال، این نظریه به



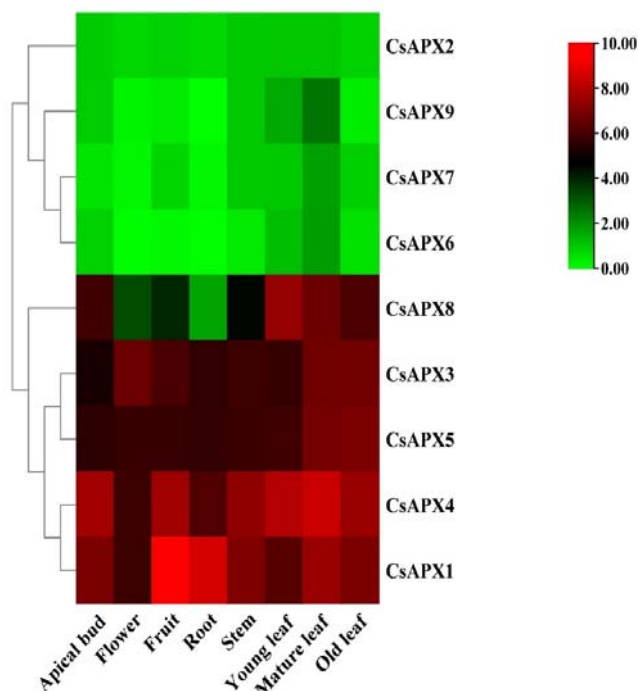
شکل ۲. ساختار اگزونی-اینترونی و فاز اسپلایسینگ در همولوگ‌های خانواده ژنی *APX* در چای  
Figure 2. Exon-intron structure and splicing phase of *APX* gene family homologs in tea

### بیان همولوگ‌های ژن APX چای

بیان ژن‌های همولوگ APX در بافت‌های مختلف چای بررسی شد (شکل ۳). نتایج نشان داد ژن‌های شناسایی شده را می‌توان در دو گروه متمایز تفکیک کرد. گروه اول شامل ژن‌های *CsAPX7*، *CsAPX6*، *CsAX2* و *CsAPX9* بود که میزان بیان آن‌ها در اندام‌های مختلف گیاهی شامل جوانه انتهایی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ‌های جوان، بالغ و پیر بین مقادیر کم تا متوسط متغیر بود. گروه دوم شامل ژن‌های *CsAPX3*، *CsAPX1*، *CsAPX4* و *CsAPX5* بود که میزان بیان آن‌ها در بافت‌های مختلف گیاهی بین مقادیر متوسط تا زیاد متغیر بود. بیشترین مقدار بیان ژن *CsAPX1* به ترتیب در بافت‌های میوه و ریشه بود. *CsAPX3* در اکثر بافت‌های مورد مطالعه، از میزان بیان تقریباً یکسان برخوردار بود. بیشترین میزان بیان *CsAPX3* و *CsAPX4* به ترتیب در برگ‌های پیر و بالغ مشاهده شد. *CsAPX5* در برگ‌های پیر دارای بیشترین میزان بیان و در جوانه

انتهایی دارای کمترین میزان بیان بود. تفاوت میزان بیان ژن *CsAPX8* در بافت‌های مختلف گیاهی بسیار متفاوت بود. به گونه‌ای که بیشترین میزان بیان با مقدار ۷/۴۲ در برگ‌های جوان و کمترین میزان بیان با مقدار ۱/۶۹ در ریشه مشاهده شد (شکل ۳).

تقسیم‌بندی بیان ژن‌های شناسایی شده همولوگ‌های APX در ژنوم چای در تنش‌های مختلف شامل شوری، پلی‌اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات نیز آن‌ها را به دو گروه مجزا تفکیک کرد (شکل ۴). همانند آن چه در بررسی پروفایل بیان ژنی در بافت‌های مختلف گیاهی مشاهده شد، ژن‌های *CsAPX2*، *CsAX2*، *CsAPX6*، *CsAPX7* و *CsAPX9* دارای میزان بیان کم تا متوسط و ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* دارای میزان بیان متوسط تا زیاد بودند. این نتایج نشان‌دهنده نقش کلیدی ژن‌های *CsAPX1*، *CsAPX3*، *CsAPX4*، *CsAPX5* و *CsAPX8* در مراحل مختلف رشدی و تنش‌های مختلف غیرزیستی بودند.

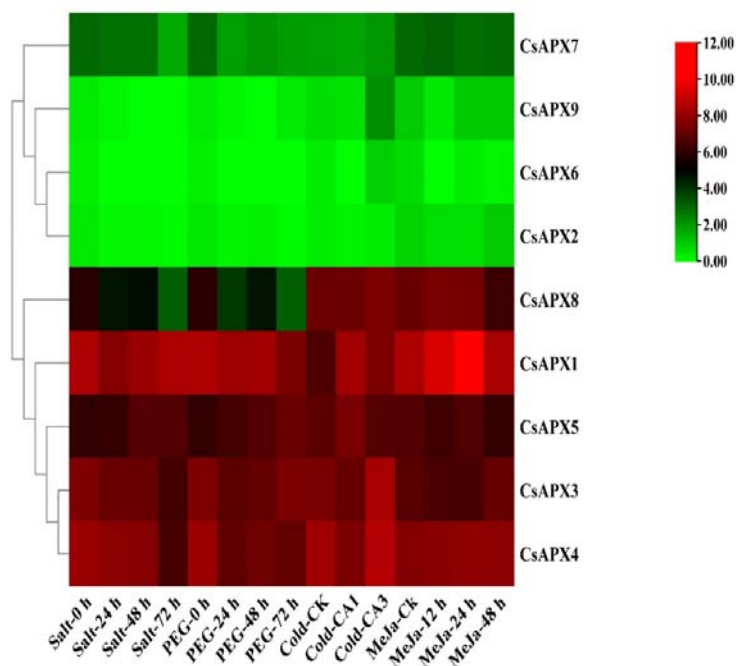


شکل ۳. الگوی بیان ژن‌های APX در بافت‌های مختلف چای. رنگ سبز نشان‌دهنده بیان کم و رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان زیاد ژن است.

**Figure 3.** Expression pattern of APX genes in different tea tissues. Green color indicates low expression, red color indicates high expression of the genes.

*CsAPX6*، *CsAPX2* و *CsAPX9* در همه تنش‌های غیرزیستی نشان می‌دهد که این ژن‌ها ممکن است در شرایط عادی فعال باشند و تحت شرایط تنش به منظور صرفه‌جویی در منابع سلولی، سرکوب می‌شوند. پروفایل بیان ژن‌های *BjuAPX* و *BraAPX* در دو گونه کلزا *Brassica juncea* و *Brassica rapa* نشان داد که سه ژن *BjuAPX*، هفت ژن *BraAPX* و دو ژن *BraAPX-R* در شرایط تنش خشکی و گرما بیان می‌شوند (Verma et al., 2022). همچنین در آرابیدوپسیس ژن‌های *APX3-6*، *APXT* و *APXS* از خانواده ژنی *APX*، بیان ژن متفاوتی تحت شرایط تنش داشتند. در درجه اول، نور زیاد و همچنین تنش‌های شوری و سرما به طور قابل توجهی بیان ژن را تنظیم کرد، در حالی که تنش سرما به طور قابل توجهی منجر به کاهش بیان ژن‌ها شد. الگوی بیان کلی اکوتیپ‌ها نشان داد که ژنوتیپ‌های آرابیدوپسیس مورد مطالعه تحمل به تنش متفاوتی داشتند (Filiz et al., 2019).

بیشترین میزان بیان ژن *CsAPX1* ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمار متیل جاسمونات بود. سرکوب بیان ژن *CsAPX2* در همه تنش‌های غیرزیستی مورد مطالعه مشاهده شد. بیشترین میزان بیان ژن‌های *CsAPX3*، *CsAPX4* و *CsAPX8* در شرایط تنش سرما (Cold-acclimated plants for 3 days) و ژن *CsAPX5* در شرایط تنش سرما (Cold-acclimated plants for 1 days) مشاهده شد. سرکوب بیان ژن *CsAPX6* در همه تنش‌های غیرزیستی مشاهده شد، به گونه‌ای که در اکثر تنش‌های مورد بررسی میزان بیان ژن معادل صفر بود. میزان بیان ژن *CsAPX7* بین مقادیر ۱/۶۵ (۷۲ ساعت پس از تنش شوری) و ۳/۱۱ (۱۲ ساعت پس از تیمار متیل جاسمونات) متغیر بود. سرکوب بیان ژن *CsAPX9* در بسیاری از تنش‌های غیرزیستی مشاهده شد. بیان این ژن در شرایط ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تنش شوری و ۴۸ ساعت پس از تیمار پلی اتیلن گلیکول معادل صفر بود (شکل ۴).



شکل ۴. الگوی بیان ژن‌های *APX* در تنش‌های مختلف غیر زیستی در چای. رنگ سبز نشان‌دهنده بیان کم و رنگ قرمز نشان‌دهنده بیان زیاد ژن است.

**Figure 4.** Expression pattern of APX genes in different abiotic stresses in tea. Green color indicates low expression and red color indicates high expression of the genes.

گیاهان تک لپه و دولپه می باشد. البته تعدادی از ژن های چای به همراه گیاهان دولپه آراییدوپسیس تالینا و سیب زمینی در گروهی مجزا قرار گرفتند که نشان می دهد روابط تکاملی نزدیک بین گیاهان دولپه نیز در تعدادی از ژن ها وجود دارد که منجر به تفکیک این ژن ها از تک لپه ای ها شده است. تعداد اگزون های موجود در پروتئین های همولوگ خانواده ژنی APX چای بین نه تا ۱۶ اگزون متغیر بود. همچنین تنوع فاز اسپلایسینگ در اعضای گروه های فیلوژنتیکی وجود داشت. در همه ژن های شناسایی شده هر سه فاز اسپلایسینگ صفر، یک و دو وجود داشت. اینترون های فاز صفر بیشترین و اینترون های فاز دو کمترین فراوانی را داشتند. بررسی بیان ژن های شناسایی شده همولوگ APX در ژنوم چای در بافت های مختلف گیاهی شامل جوانه راسی، گل، میوه، ریشه، ساقه، برگ های جوان، بالغ و پیر و تنش های مختلف محیطی شامل شوری، پلی اتیلن گلیکول، سرما و متیل جاسمونات آن ها را به دو گروه مجزا تفکیک کرد. در هر دو پروفایل بیانی، ژن های CsAX2، CsAPX6، CsAPX7، CsAPX9 و CsAPX1 دارای میزان بیان کم تا متوسط و ژن های CsAPX3، CsAPX4، CsAPX5 و CsAPX8 دارای میزان بیان متوسط تا زیاد بودند. این نتایج نشان دهنده نقش کلیدی ژن های CsAPX1، CsAPX3، CsAPX4، CsAPX5 و CsAPX8 در مراحل مختلف رشدی و تنش های مختلف غیرزیستی بودند. این مطالعه، یک گام ابتدایی در مسیر درک فعالیت ژن های APX چای بوده و در مطالعات آتی، این یافته ها جهت بررسی نقش اختصاصی این ژن ها در شرایط تنش، مراحل مختلف رشدی و متابولیسم ترکیبات زیستی کارآمد خواهد بود.

### تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

### References

Akbudak, M. A., Filiz, E., Vatansever, R., & Kontbay, K. (2018). Genome-wide identification and expression profiling of ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX) genes

نتایج این مطالعه نشان داد الگوی بیان ژن های APX در چای، شباهت ها و تفاوت هایی با سایر گیاهان دارد که ممکن است به دلیل تفاوت ماهیت ژنتیکی گونه ها و مکانیسم های تنظیمی مختلف باشد.

تنظیم بیان ژن های APX در پاسخ به تنش های محیطی نشان دهنده اهمیت بالای این ژن ها در حفاظت گیاهان در برابر تنش های محیطی است. افزایش بیان ژن های APX می تواند با کاهش تنش اکسیداتیو ناشی از تنش های محیطی به بقای گیاه کمک کند. این ژن ها نقش مهمی در مدیریت رادیکال های آزاد و حفظ تعادل اکسیداتیو-احیای در سلول ها دارند که برای بقای گیاه تحت شرایط تنش ضروری است. مکانیسم های مولکولی منجر به تنظیم بیان ژن های APX در چای هنوز به طور کامل مشخص نشده است، بنابراین یافته های این مطالعه می تواند گوشه ای از زوایای ناشناخته تنظیم این ژن را آشکار کند و به برنامه ریزی محققین برای افزایش تحمل گیاه چای در برابر تنش های محیطی می تواند کمک موثر کند. استفاده از روش های اصلاح سنتی و مولکولی با تاکید بر افزایش بیان ژن های APX احتمالاً می تواند به افزایش تحمل گیاهان از جمله چای در برابر تنش های محیطی منجر شود. به عنوان نمونه استفاده از موادی مانند متیل جاسمونات یا اسید سالیسیلیک که باعث افزایش بیان ژن های APX می شود، می تواند به عنوان یک استراتژی مدیریتی برای کاهش خسارات ناشی از تنش های محیطی در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد.

### نتیجه گیری و پیشنهادها

بر اساس روابط فیلوژنتیکی، پروتئین های خانواده ژنی APX در گیاهان مورد مطالعه به چهار گروه تکاملی مجزا تقسیم شدند. قرارگیری گیاهان تک لپه و دولپه به نسبت تقریباً مساوی در دو گروه تکاملی نشان دهنده ی تکامل این ژن ها از یک ژن اجدادی قبل از واگرایی

under drought stress in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 37, 925-936. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9788-9>.

- Aleem, M., Aleem, S., Sharif, I., Aleem, M., Shahzad, R., Khan, M. I., Batool, A., Sarwar, G., Farooq, J., Iqbal, A., Jan, B. L., Kaushik, P., Feng, X., Bhat, J. A., & Ahmad, P. (2022). Whole-genome identification of APX and CAT gene families in cultivated and wild soybeans and their regulatory function in plant development and stress response. *Antioxidants*, 11, 1626. <https://doi.org/10.3390/antiox11081626>.
- Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., De Castro, E., Duvaud, S., Flegel, V., Fortier, A., Gasteiger, E., & Grosdidier, A. (2012). ExPASy: SIB bioinformatics resource portal. *Nucleic Acids Research*, 40 (W1), W597-W603. <https://doi.org/10.1093/nar/gks400>.
- Bakir, M., & Yildirim, C. (2022). Isolation of ascorbate peroxidase (APX) gene in lentil (*Lens culinaris* Medik.) and expression analysis under drought stress conditions. *Ege Universitesi Ziraat Fakultesi Dergisi*, 59 (3), 439-447, <https://doi.org/10.20289/zfdergi.1007041>
- Caverzan, A., Passaia, G., Rosa, S. B., Ribeiro, C. W., Lazzarotto, F., & Margis-Pinheiro, M. (2012). Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology*, 35 (4), 1011-1019. <https://doi.org/10.1590/s1415-47572012000600016>.
- Chen, C., Chen, H., He, Y., & Xia, R. (2018). TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. *bioRxiv*, 289660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.
- Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., & Shinozaki, K. (2011). Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology*, 11, 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>.
- Dibb, N. J., & Newman, A. J. (1989). Evidence that introns arose at proto-splice sites. *EMBO Journal*, 8, 2015-2021. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb03609.x>.
- Fedorov, A., Suboch, G., Bujakov, M., & Fedorova, L. (1992). Analysis of nonuniformity in intron phase distribution. *Nucleic Acids Research*, 20, 2553-2557. <https://doi.org/10.1093/nar/20.10.2553>.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39 (4), 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>.
- Filiz, E., Ozyigit, I. I., Saracoglu, I. A., Uras, M. E., Sen, U., & Yalcin, B. (2019). Abiotic stress-induced regulation of antioxidant genes in different *Arabidopsis* ecotypes: microarray data evaluation. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 33 (1), 128-143. <https://doi.org/10.1080/13102818.2018.1556120>
- Gangwar, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., & Maurya, J. N. (2014). Plant responses to metal stress: the emerging role of plant growth hormones in toxicity alleviation. In: Ahmad, P., & Rasool, S (Eds.). *Emerging technologies and management of crop stress tolerance*. Academic Press, 215-248. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800875-1.00010-7>.
- He, M., He, C. Q., & Ding, N. Z. (2018). Abiotic stresses: general defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1771. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01771>.
- Jena, J., Sahoo, S. K & Dash, G. K. (2020). An introduction to abiotic stress in plants. In: *Advances in agronomy*. 9, 163-186, AkiNik Publications, New Delhi. <https://doi.org/10.22271/ed.book.725>.
- Krishnatreya, D. B., Baruah, P. M., Dowarah, B., Chowrasia, S., Mondal, T. K., & Agarwala, N. (2021). Genome-wide identification, evolutionary relationship and expression analysis of AGO, DCL and RDR family genes in tea. *Scientific Reports*, 11, 8679, <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87991-5>.
- Kumar, S., Stecher G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33 (7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Leng, X., Wang, H., Zhang, S., Qu, C., Yang, C., Xu, Z., & Liu, G. (2021). Identification and characterization of the APX gene family and its expression pattern under phytohormone treatment and abiotic stress in *Populus trichocarpa*. *Genes*, 12 (3), 334. <https://doi.org/10.3390/genes12030334>.
- Leonardis, S. D., Dipierro, N., & Dipierro, S. (2000). Purification and characterization of an ascorbate peroxidase from potato tuber mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (10), 773-779. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01188-8](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01188-8).
- Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2012). SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Research*, 40 (D1), D302-D305. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr931>.
- Liao, G. L., Liu, Q., Li, Y. Q., Zhong, M., Huang, C. H., Jia, D. F., & Xu, X. B. (2020). Identification



- and expression profiling analysis of ascorbate peroxidase gene family in *Actinidia chinensis* (Hongyang). *Journal of Plant Research*, 133 (5), 715-726. <https://doi.org/10.1007/s10265-020-01206-y>.
- Long, M., de Souza, S. J., Rosenberg, C., & Gilbert, W. (1998). Relationship between proto-splice sites and intron phases: evidence from dicodon analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 95, 219-223. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.1.219>.
- Lu, Z., Takano, T., & Liu, S. (2005). Purification and characterization of two ascorbate peroxidases of rice (*Oryza sativa* L.) expressed in *Escherichia coli*. *Biotechnology Letters*, 27 (1), 63-67. <https://doi.org/10.1007/s10529-004-6587-0>.
- Najami, N., Janda, T. Barriah, W. Kayam, G. Tal, M. Guy M., & Volokita. M. (2008). Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization. *Molecular Genetics and Genomics*, 279, 171-182. <https://doi.org/10.1007/s00438-007-0305-2>.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G. X., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Korniyev, D., Holaday, A. S., & Zhang, H. (2006). The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 57, 3033-3042. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl060>.
- Panchuk, I. I., Volkov R. A., & Schoeffl. F. (2002). Heat stress and heat shock transcription factor-dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129, 838-853. <https://doi.org/10.1104/pp.001362>.
- Qu, C., Wang, L., Zhao, Y., & Liu, C. (2020). Molecular evolution of maize ascorbate peroxidase genes and their functional divergence. *Genes (Basel)*, 11 (10), 1204. <https://doi.org/10.3390/genes11101204>.
- Raza, A., Sharif, Y., Chen, K., Wang, L., Fu, H., Zhuang, Y., Chitkineni, A., Chen, H., Zhang, C., Varshney, R. K., & Zhuang, W. (2022). Genome-wide characterization of ascorbate peroxidase gene family in peanut (*Arachis hypogaea* L.) revealed their crucial role in growth and multiple stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 13, 962182. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.962182>.
- Roy, S. W. (2003). Recent evidence for the exon theory of genes. *Genetica*, 118, 251-266. <https://doi.org/10.1023/A:1024190617462>.
- Roy, S. W., Fedorov, A., & Gilbert, W. (2003). Large-scale comparison of intron positions in mammalian genes shows intron loss but no gain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100, 7158-7162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1232297100>.
- Samynathan, R., Shanmugam, K., Nagarajan, C., Murugasamy, H., Ilango, R. V. J., Shanmugam, A., Venkidasamy, B., & Thiruvengadam, M. (2021). The effect of abiotic and biotic stresses on the production of bioactive compounds in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Plant Gene*, 27, 100316. <https://doi.org/10.1016/j.plgene.2021.100316>.
- Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 995-1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>.
- Szabo, S., Yoshida, M., Filakovszky, J., & Juhasz, G. (2017). "Stress" is 80 years old: from Hans Selye original paper in 1936 to recent advances in GI ulceration. *Current Pharmaceutical Design*, 23 (27), 4029-4041. <https://doi.org/10.2174/1381612823666170622110046>.
- Shi, J., Ma, C., Qi, D., Lv, H., Yang, T., Peng, Q., Chen, Z., & Lin, Z. (2015). Transcriptional responses and flavor volatiles biosynthesis in methyl jasmonate-treated tea leaves. *BMC Plant Biology*, 15, 233. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0609-z>.
- Shoeva, O. Y., Glagoleva, A. Y., & Khlestkina, E. K. (2017). The factors affecting the evolution of the anthocyanin biosynthesis pathway genes in monocot and dicot plant species. *BMC Plant Biology*, 17 (Suppl 2), 256. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1190-4>.
- Sorek, R. (2007). The birth of new exons: mechanisms and evolutionary consequences. *RNA*, 13 (10), 1603-1608. <https://doi.org/10.1261/rna.682507>.
- Tao, C. C., Jin, X., Zhu, L. P., Xie, Q. L., Wang, X. C., & Li, H. B. (2018a). Genome-wide investigation and expression profiling of APX gene family in *Gossypium hirsutum* provide new insights in redox homeostasis maintenance during different fiber development stages. *Molecular Genetics and Genomics*, 293, 685-697. <https://doi.org/10.1007/s00438-017-1413-2>.
- Tao, J. J., Wu, H., Li, Z. Y., Huang, C. H., & Xu, X. B. (2018b). Molecular evolution of GDP-d-mannose epimerase (GME) a key gene in plant ascorbic acid biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1293. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01293>.
- Teixeira, F. K., Menezes, B. L., Galvão, V. C., Margis R., & Margis, P. M. (2006). Rice ascorbate peroxidase gene family encodes



- functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments. *Planta*, 224, 300-314. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0214-8>.
- Teixeira, F. K., Menezes-Benavente, L., Margis, R., & Margis-Pinheiro, M. (2004). Analysis of the molecular evolutionary history of the ascorbate peroxidase gene family: inferences from the rice genome. *Journal of Molecular Evolution*, 59 (6), 761-770. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-2666-z>.
- Tyagi, S., Shumayla, P. C. Verma, Singh, K., & Upadhyay, S. K. (2020). Molecular characterization of ascorbate peroxidase (APX) and APX-related (APX-R) genes in *Triticum aestivum* L. *Genomics*, 112, 4208-4223. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.07.023>.
- Upadhyaya, H., & Panda, S. K. (2013). Abiotic stress responses in tea [*camellia sinensis* L (o) Kuntze]: an overview. *Reviews in Agricultural Science*, 1, 1-10. <https://doi.org/10.7831/ras.1.1>.
- Verma, D., Upadhyay, S. K., & Singh, K. (2022). Characterization of APX and APX-R gene family in *Brassica juncea* and *B. rapa* for tolerance against abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 41, 571-592. <https://doi.org/10.1007/s00299-021-02726-0>.
- Wang, X. C., Zhao, Q. Y., Ma, C. L., Zhang, Z. H., Cao, H. L., Kong, Y. M., Yue, C., Hao, X. Y., Chen, L., Ma, J. Q., Jin, J. Q., Li, X., & Yang, Y. J. (2013). Global transcriptome profiles of *Camellia sinensis* during cold acclimation. *BMC Genomics*, 14, 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-415>.
- Wei, C., Yang, H., Wang, S., Zhao, J., Liu, C., Gao, L., Xia, E., et al. (2018). Draft genome sequence of *Camellia sinensis* var. *sinensis* provides insights into the evolution of the tea genome and tea quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 115 (18), E4151-E4158. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719622115>.
- Xia, E. H., Li, F. D., Tong, W., Li, P. H., Wu, Q., Zhao, H. J., Ge, R. H., Li, R. P., Li, Y. Y., Zhang, Z. Z., Wei, C. L., & Wan, X. C. (2019). Tea plant information archive: a comprehensive genomics and bioinformatics platform for tea plant. *Plant Biotechnology Journal*, 17 (10), 1938-1953. <https://doi.org/10.1111/pbi.13111>.
- You, J., & Chan, Z. (2015). ROS regulation during abiotic stress responses in crop plants. *Frontiers in Plant Science*, 6, 1092. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01092>.
- Yu, C. S., Cheng, C. W., Su, W. C., Chang, K. C., Huang, S. W., Hwang, J. K., & Lu, C. H. (2014). CELLO2GO: a web server for protein subCELLular Localization prediction with functional gene ontology annotation. *PLoS One*, 9 (6), e99368. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099368>.
- Zhang, R., Ma, Y., Hu, X., Chen, Y., He, X., Wang, P., Chen, Q., Ho, C. T., Wan, X., Zhang, Y., & Zhang, S. (2020). TeaCoN: A database of gene co-expression network for tea plant (*Camellia sinensis*). *BMC genomics*, 21, 461. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06839-w>.
- Zhu, L., Zhang, Y., Zhang, W., Yang, S., Chen, J. Q., & Tian, D. (2009). Patterns of exon-intron architecture variation of genes in eukaryotic genomes. *BMC Genomics*, 10, 47. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-47>.
- Zhang, Q., Cai, M., Yu, X., Wang, L., Guo, C., Ming, R., & Zhang, J. (2017). Transcriptome dynamics of *Camellia sinensis* in response to continuous salinity and drought stress. *Tree Genetics and Genomes*, 13, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1161-9>.

## Proteome analysis of root in wheat (*Triticum aestivum* cv. Baran) under water deficit stress

Sayna Toraby<sup>1</sup>, Mahmoud Toorchi<sup>2</sup>(ORCID: 0000000171239914), Mozafar Roustaii<sup>3</sup>

1. M.Sc. of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

2. Professor, Department of Plant Breeding and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran.

3. Professor, Dryland Agricultural Research Institute, Maragheh, Iran.

Correspondence:

Mahmoud Toorchi

Email: [mtoorchi@tabrizu.ac.ir](mailto:mtoorchi@tabrizu.ac.ir)

Received: 21/May/2024

Accepted: 31/Dec/2024

### How to cite:

Toraby, S., Toorchi, M., & Roustaii, M. (2024). Proteome analysis of root in wheat (*Triticum aestivum* cv. Baran) under water deficit stress. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 35-49.

(DOI: [10.30473/cb.2024.71391.1970](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71391.1970))

### ABSTRACT

Cereals, especially wheat, is one of the most important food sources for humans. Approximately 55% of proteins, 15% of fats, 70% of glucosides, and generally 50-55% of calories consumed by human come from cereals. Water scarcity is an important limiting factor in wheat production in rainfed and irrigated farming can affect different traits. Therefore, adaptation of plants to drought stress is critical to increase production. Many factors such as genotype, growth stage, intensity and duration of stress, physiological growth stage, different patterns of gene expression and environmental factors can influence the response of plants to drought stress. Different methods have been used to study the expression of genes, and proteomic analysis has priority for the study of the final gene product. In this regard, the seeds of wheat cultivars were grown in plastic pots in a greenhouse and divided into two and root random groups one month after growing in which water deficit stress was imposed to half of the pot, randomly, by increment of irrigation interval. Twenty days after imposing stress, shoot and root length, shoot dry and wet weight, root volume and proline content were measured in both groups. Protein extraction was performed by phosphate buffer method and two-dimensional electrophoresis was performed by IEF in 1<sup>st</sup> dimension and SDS-PAGE in 2<sup>nd</sup> dimension. Proteomic analysis of root tissue by two-dimensional electrophoresis with Coomassie brilliant blue staining revealed 99 repeatable protein spots each gel. Among the identified protein spots, 15 spots were shown a significant change in expression under water deficit stress condition compared with the control, in such a way 13 spots increased expression and 2 spots with reduced expression. These spots were identified according to the isoelectric point and the molecular weight. These proteins based on functional groups were classified in starch synthesis, light respiration and metabolism, proteins involved in cell structure, stress response and defense, and various proteins. Proteins Peroxidase, Phosphoglycerate mutase, Triose phosphate-isomerase, Adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase, Glutathione S-transferase, Monomeric alpha-amylase inhibitor, Cytosolic-3-phosphoglycerate kinase, Probable voltage-gated potassium channel subunit beta, Serine hydroxy methyltransferase, late embryogenesis abundant protein D-29,  $\beta$ -Hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, 2-Cys peroxiredoxin BAS1 and other late embryogenesis abundant proteins were identified with increased changed expression under water deficit stress conditions indicating the importance of these proteins in reducing the effects of water deficit stress. The proteins S-Adenosylmethionine synthetase 3 and Germin-Like protein were shown reduced changed expression. The result of this research indicated that different groups of proteins interfering in reduction of destructive effects of water deficiency stress but the contribution of response / defense and metabolism proteins were more than the others.

### KEYWORDS

Iso-electric focusing (IEF), Mass spectrometry, SDS-PAGE, Two-dimensional electrophoresis.





## مقدمه

کمبود آب عامل محدودکننده مهمی در تولید گندم در زراعت دیم و آبی محسوب می‌شود بنابراین تطبیق گیاهان با تنش خشکی، برای افزایش تولید حیاتی است. غلات، بخصوص گندم یکی از مهمترین منابع غذایی برای انسان است. تنش‌های محیطی همچون تنش کمبود آب، شوری و حرارت از عوامل مهم محیطی هستند که محصولات کشاورزی را در سراسر جهان به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند بسیاری از مناطق تولیدی در سرتاسر جهان به دلیل خشکسالی طولانی مدت آسیب‌های قابل توجهی به محصولات کشاورزی وارد کرده‌اند. مشابه بسیاری از محصولات زراعی، تولید گندم نان (*Triticum aestivum* L.) نیز تحت تأثیر خشکسالی قرار دارد. تغییرات اخیر در آب و هوا، دسترسی به آب آبیاری را کاهش داده و باعث شده است که تنش کمبود آب در رشد گیاهان و میزان تولید آن‌ها تغییرات مهمی را ایجاد کند (Zadrazilnik et al., 2013). پیش‌بینی می‌شود که خشکسالی‌های طولانی مدت در نتیجه تغییرات اقلیمی در سراسر جهان رخ دهند (Sengupta et al., 2011). از جمله تغییراتی که در اثر تنش خشکی در گیاه بوجود می‌آید، می‌توان تغییرات پروتئینی، تولید آنتی اکسیدان، تنظیم اسمزی، ترشح هورمون، بسته شدن روزنه‌ها، تغییر ضخامت کوتیکول، مهار فتوسنتز، کاهش محتوای کلروفیل و کاهش تعرق را نام برد (Yordanov et al., 2000). تنش کمبود آب همچنین سبب ناپایداری گرده و از دست دادن دانه‌ها در سنبله گندم‌های حساس به خشکی می‌شود. مطالعات نشان داده است که تغییرات بیان ژن در سطح رونویسی اغلب رابطه‌ای با تغییرات در سطح پروتئین ندارد. بنابراین مطالعه تغییرات پروتئوم گیاهان در پاسخ به تنش‌ها مهم و سودمند می‌باشد (Bogeat-Triboulot et al., 2007). بسیاری از پروتئین‌ها تحت تأثیر تغییرات پس از ترجمه قرار می‌گیرند که قابل رهیابی با تجزیه ترانسکریپتوم نیست (Kosova et al., 2011). پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی به دو گروه اصلی تقسیم می‌شوند: ۱- پروتئین‌های مرتبط با تنش غیر زیستی مانند چپرون‌ها، آنزیم‌های سم‌زدایی و پروتئین‌های

مرتبط با mRNA و ۲- پروتئین‌های تنظیمی یا (Regulatory Protein) که شامل پروتئین کینازها، پروتئین فسفاتازها یا سایر پروتئین‌های مرتبط با پیام رسانی هستند (Ashoub et al., 2013). گیاهان با القای تولید دسته‌ای از پروتئین‌های تنشی که موجود را از آسیب سلولی محافظت می‌کنند، به انواع تنش‌های محیطی پاسخ می‌دهند (Kamal et al., 2010). پروتئین‌ها همچنین عملکردهای سازگاری به تنش را جهت‌دهی می‌کنند که منجر به بروز تغییر در غشای پلاسمایی، سیتوپلاسم سلولی و ترکیب اجزای داخل سلولی می‌شوند که در نهایت خصوصیات آن‌ها مثل تمایل سیتوپلاسم سلولی به آب را تغییر می‌دهند (Kosova et al., 2011). علاوه بر این مطالعات نشان داده‌اند که تنش کمبود آب در گیاهان باعث افزایش تولید اسید آمینه پرولین که در تنظیم اسمزی نقش دارد (Ahmed et al., 2017) و نیز افزایش تولید پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی (LEA) که در حفاظت ساختارهای سلولی نقش دارند (Moons et al., 1995)، می‌گردد. تجزیه و تحلیل دقیق و همزمان پروتئوم و متابولوم در ارقام گیاهی تحمل به خشکی و مستعد، برای درک اصول فیزیولوژی سازگاری با استرس و بیوشیمی ضروری است. بنابراین با مطالعه الگوی پروتئوم، درک ساز و کار پاسخ به تنش کم آبی امکانپذیر است (Caruso et al., 2009). از آنجایی که پروتئین‌ها به طور مستقیم در پاسخ به تنش‌های محیطی درگیر هستند، تجزیه پروتئوم یک روش ایده‌آل شناسایی الگوی بیان و عملکرد پروتئین‌های مرتبط با تنش است (Bonhomme et al., 2012; Shi, Ye, and Chan 2013). تجزیه و تحلیل همزمان پروتئوم و متابولوم در ارقام گیاهی متحمل به خشکی و مستعد، برای درک فیزیولوژی سازگاری با تنش و بیوشیمی آن ضروری است. تکنیک‌های پرقدرت "omics" به محققان این امکان را می‌دهد تا در یک دیدگاه جامع تر پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی را مطالعه کنند. در راستای بررسی مکانیسم‌های پاسخ پروتئینی گندم به تنش کمبود آب، پژوهش حاضر برای

شناسایی مسیرهای متابولیکی مهم در ریشه گندم رقم باران جهت تحمل تنش کمبود آب طراحی و اجرا گردیده است. گندم باران از جمله گندم‌های نانوائی است که در سال ۱۳۹۳ معرفی توسط مرکز تحقیقات بین‌المللی دیم مراغه معرفی شده است. تیپ رشدی آن زمستانه بوده و درصد پروتئین دانه‌ی آن ۱۱/۲ درصد است.

### مروری بر پژوهش‌ها

در مطالعه‌ای (Michaletti et al., 2018) روی ارقام گندم ایرانی، پروتئین‌های مرتبط با تنش خشکی با روش 2D-PAGE و طیف سنجی جرمی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در مجموع ۸۵ لکه پروتئینی متفاوت در رقم بهار (حساس به خشکی) و ۲۰ لکه پروتئینی معنی دار در رقم کویر (متحمل به خشکی) در مقایسه با شاهد وجود دارد. در تحقیق دیگری (Hao et al., 2015) تجزیه پروتئومیک از پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش خشکی در ریشه، برگ و میان‌گره‌های دو رقم گندم چینی، حساس به خشکی (CS) و مقاوم به خشکی (HX-10) انجام گرفت. نتایج نشان داد که HX-10 تحمل بیشتری نسبت به CS در برابر تنش خشکی داشت. بطوریکه بر خلاف HX-10، گیاهان CS پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت تنش، دچار پژمردگی شدند. پروتئوم بافت‌های ارقام HX-10 و CS بوسیله الکتروفورز دو بعدی مورد بررسی قرار گرفت و تعداد ۹۶۵، ۹۹۳ و ۷۳۳ لکه پروتئینی بترتیب در بافت‌های ریشه، میان‌گره و برگ شناسایی گردید. از این تعداد توسط روش طیف‌سنجی جرمی تعداد ۱۰۰ لکه پروتئینی با بیان متفاوت در ریشه، ۱۱۵ پروتئین در میان‌گره و ۱۶۳ پروتئین در برگ، مورد شناسایی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد که با افزایش طول دوره خشکی، بیان پروتئین‌های دفاعی و اکسیداتیو مانند پروتئین‌های شوک حرارتی و پراکسیداز برای سازگاری با شرایط تنش را افزایش می‌یابد.

کمال و همکاران (Kamal et al., 2013) با مطالعه الگوی پروتئوم در برگ گندم گونه Keumkang تحت تنش کمبود آب به مدت سه روز به روش 2-DE و طیف‌سنجی دریافتند که عمدتاً پروتئین‌های کلروپلاستی

تغییر یافته روی فتوستنتز تاثیر می‌گذارد. در مطالعه‌ی دیگری (Ge et al., 2012) دو رقم گندم بهار متحمل و حساس به تنش کمبود آب برای بررسی تغییرات پروتئوم در دانه‌های در حال نمو به روش پروتئومیک تحت تنش کمبود آب، مورد مقایسه قرار گرفتند. در مجموع ۱۵۲ لکه پروتئینی تغییر حداقل دو برابری در ژل‌های الکتروفورز دو بعدی نشان دادند. تعداد ۶۹ پروتئین شناسایی شده در دفاع و سمیت زدایی تنش، فتوستنتز، متابولیسم کربوهیدرات، متابولیسم نیتروژن، پروتئین‌های ذخیره‌ای و برخی فعالیت‌های مهم درگیر بودند. فورد و همکاران (Ford et al., 2011) با استفاده از دسته‌ای از آزمایشات چندگانه، تغییرات در فراوانی لکه‌های پروتئینی روی ژل الکتروفورز دو بعدی را در سه رقم گندم نان استرالیایی در پاسخ به تنش کمبود آب مطالعه کردند. یک رقم حساس و دو رقم متحمل که در توانایی حفظ عملکرد دانه تحت شرایط تنش خشکی متفاوت بودند در گلخانه با تیمار خشکی دوره ای رشد داده شدند. این محققین با اعمال تنش ۱۴ و ۵۴ روزه بر گیاه و بررسی پروتئوم برگ موفق به ملاحظه ۵۱۳۳ لکه پروتئینی تکرارپذیر روی ژل‌ها شدند. عملکرد پروتئین‌های تغییر یافته به گلیکولیز و گلیکوزنز، تاشدگی پروتئین، پاسخ به تنش، چرخه کالوین، فتوستنتز، ترجمه و انتقال مربوط بودند. یکی از ارقام متحمل فاقد تغییرات معنی دار در پروتئین‌ها در طول مراحل اولیه کمبود آب بود ولی رقم متحمل دیگر تغییرات معنی داری نشان داد. هر سه گونه تغییرات مرتبط با افزایش متابولیسم در تنش اکسیداتیو و ظرفیت مهار گونه‌های فعال اکسیژن از طریق افزایش سوپر اکسید دیسموتاز و کاتالاز را داشتند. در مطالعه‌ای (Bazargani et al., 2011) برای تعیین مکانیسم مولکولی مصرف ذخایر ساقه تحت شرایط خشکی، الگوی پروتئوم ساقه دو توده محلی گندم را تحت تنش کمبود آب بعد از گلدھی مقایسه کردند. با استفاده از الکتروفورز دو بعدی، تعداد ۹۰ پروتئین به عنوان پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب شناسایی شد. تجزیه و تحلیل مقایسه‌ای بین دو توده محلی، چندین پروتئین ساقه را به عنوان اعضای اصلی در انتقال ذخایر ساقه به دانه گندم معرفی کرد.

## مواد و روش‌ها

### آماده سازی و کشت گیاه

ماده گیاهی مورد استفاده در این آزمایش گندم رقم باران می‌باشد که از مرکز تحقیقات بین‌المللی دیم مراغه تهیه شد. آزمایش در گلدان‌های پلاستیکی به وزن سه کیلوگرم انجام شد که با خاک زراعی معمولی پر شده بود. برای انجام آزمایش تعداد ۳۰ گلدان آماده گردید و بذور در عمق ۱/۵ سانتی‌متری خاک کاشته شدند. ۱۵ روز پس از کاشت که گیاهان سبز شدند آن‌ها را تنک کرده و تعداد ۵ گیاه در هر گلدان حفظ شد. گلدان‌ها تا مرحله سه برگگی که حدود یک ماه طول کشید بطور روزانه آبیاری شدند. کشت بذور با متوسط دمای روزانه‌ی ۲۸-۲۶ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۹-۱۷ درجه‌ی سانتی‌گراد صورت گرفت.

### طرح آزمایشی و نحوه اعمال تنش کمبود آب

برای اجرای آزمایش از طرح کاملاً تصادفی در ۱۰ تکرار استفاده شد. سطوح آبیاری شامل آبیاری عادی و تنش کمبود آب، تیمارهای آزمایش را تشکیل دادند. گلدان‌های شاهد بصورت روزانه آبیاری شدند و تیمار تنش کمبود آب با قطع آبیاری در مرحله سه برگگی برای گلدان‌های تحت تنش به فاصله سه روز در میان، بمدت ۲۰ روز اعمال گردید. پس از ۲۰ روز علایم ظاهری تنش در بخش هوایی گیاهان قابل مشاهده بود.

### صفات مورد اندازه گیری

حدود ۲۰ روز پس از اعمال تنش کمبود آب، صفات رشدی شامل وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه، حداکثر طول و حجم ریشه و بالاخره غلظت پروتئین به روش نین‌هیدرین (Bates et al., 1973) مورد اندازه گیری قرار گرفتند. برای تجزیه‌های آماری صفات مورفولوژیکی و تجزیه بیان پروتئین‌ها از برنامه SAS و رسم نمودارها از Excel استفاده شد.

### استخراج پروتئین

برای تجزیه پروتئوم، نمونه‌های ریشه گیاهچه‌های تصادفی از

هر واحد آزمایشی وزن گردید و درون فویل آلومینیومی داخل ازت مایع به آزمایشگاه منتقل گردید و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در مرحله استخراج پروتئین یک گرم بافت ریشه داخل هاون چینی به همراه ۲ میلی لیتر بافر استخراج پروتئین و شن کوارتز، کاملاً له گردید. میکروتیوب‌های حاوی عصاره یک دقیقه ورتکس شده سپس با تنظیمات ۱۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شدند و روشناور به تیوب جدید منتقل گردید. بافر استخراج پروتئین شامل ( $K_2HPO_4$  65mM,  $KH_2PO_4$  2.6 mM, NaCl 400 mM,  $NaN_3$  3mM) در ۷/۶ pH می‌باشد. تمام مراحل استخراج پروتئین روی یخ انجام گردید. برای تعیین غلظت پروتئین استخراج شده از روش بردفورد (Bradford, 1976) استفاده گردید.

### الکتروفورز بعد اول (Isoelectric focusing (IEF)

برای تفکیک پروتئین‌ها، الکتروفورز دو بعدی (در بعد اول به روش IEF و بعد دوم SDS-PAGE) در سه تکرار مورد استفاده قرار گرفت. ژل بعد اول شامل (اوره ۶۰۰ میلی گرم، آب دیونیزه ۳۵۵ میکرولیتر، استوک آکریل آمید ۳۰ درصد ۱۴۵ میکرولیتر، آمفولین (pH 5-8) ۳۱/۲۵ میکرولیتر، آمفولین (pH 3-10) ۳۱/۲۵ میکرولیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۱/۸۷۵ میکرولیتر و TEMED ۱/۲۵۱ میکرولیتر) می‌باشد.

مخزن دستگاه الکتروفورز تا نصف با  $H_3PO_4$  با غلظت ۰/۰۲ نرمال پر شد. درون لوله‌های شیشه‌ای حاوی ژل بعد اول، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئینی و ۲۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه گردید. سپس الکتروفورز با ولتاژهای ۲۰۰ ولت به مدت ۳۰ دقیقه، ۴۰۰ ولت به مدت ۱۶ ساعت و ۶۰۰ ولت به مدت یک ساعت (در مجموع ۱۷/۵ ساعت) اجرا شد.

### الکتروفورز بعد دوم

ژل‌های بعد دوم به صورت دو قسمتی، شامل ژل جداکننده و ژل نگه دارنده تهیه شدند. ابتدا محلول ژل جداکننده

درصد حجمی نقاط برای تکرارهای مختلف به دست آمد و آزمون  $t$  برای درصد حجمی هر لکه پروتئینی بین تیمارهای آبیاری انجام شد. بدین ترتیب که لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی‌دار مشخص شدند و روند افزایشی و کاهش‌ی بیان آنها در اثر تنش کمبود آب بر اساس فاکتور القاء (IF)<sup>۱</sup> مشخص شدند. نقاطی که دارای IF بالاتر از ۲ بودند لکه‌های پروتئینی با افزایش بیان و نقاطی که IF کمتر از ۰/۵ داشتند به عنوان لکه‌های پروتئینی با کاهش بیان معرفی شدند (Toorchi et al., 2014). فرآیند هضم آنزیمی لکه‌های پروتئینی با تریپسین انجام شد. شناسایی پروتئین‌های دارای تغییرات بیان به روش انگشت‌نگاری جرم پپیدی MALDI-TOF در مرکز ژنومیکس و پروتئومیکس دانشگاه Tucsia ایتالیا صورت گرفت.

## نتایج و بحث

### تجزیه و تحلیل صفات

ابتدا آزمون نرمال بودن برای داده‌های صفات مورفولوژیکی مورد مطالعه انجام شد و نتایج نشان داد که کلیه صفات دارای توزیع نرمال بودند. نتایج حاصل از آزمون  $t$  برای صفات مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است. اختلاف بین شرایط شاهد و تنش کمبود آب برای صفات وزن خشک ریشه، حجم ریشه (شکل ۱-ب) و طول ریشه از نظر آماری در سطح احتمال ۰/۰۱ و صفات وزن تر ریشه و میزان پرولین (شکل ۱-الف) در سطح احتمال ۰/۰۵ معنی دار شد که نشان دهنده وجود تفاوت آماری بین دو گروه از لحاظ این صفات است. این درحالی است که برای صفات وزن خشک اندام هوایی، وزن تر اندام هوایی و طول اندام هوایی، اختلاف بین میانگین شرایط شاهد و تنش کمبود آب غیر معنی دار گردید. به نظر می‌رسد به دلیل نمونه برداری در مراحل اولیه رشد، گیاهان فرصت کافی برای پاسخ به تنش در مورد برخی صفات مورفولوژیکی را نداشتند.

آکریل آمید برای ژل جداکننده ۸/۵ میلی لیتر، بافر ژل جداکننده (pH= ۸/۸) ۶/۳ میلی لیتر، آب دیونیزه ۲ میلی لیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۱۲۰ میکرولیتر، TEMED ۲۰ میکرولیتر تهیه گردید. بافر ژل جداکننده شامل (تریس ۷/۷۵ گرم، گلیسرول ۱۰۰ میلی لیتر، سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۲۵ گرم، مرکاپتواتانول ۵۰ میلی لیتر) می باشد.

ژل نگه دارنده (شامل آکریل آمید برای ژل تعیین مسیر ۱ میلی لیتر، بافر ژل جداکننده (pH= ۶/۸) ۳ میلی لیتر، آب دیونیزه ۲ میلی لیتر، آمونیوم پرسولفات ۱۰ درصد ۳۰ میکرولیتر، TEMED ۲۰ میکرولیتر) تهیه شد. غلظت ژل های نگه دارنده و جدا کننده به ترتیب ۵٪ و ۱۵٪ بود. در نهایت مخزن پایین و فضای بین دو شیشه با بافر رانش SDS-PAGE (تریس ۷/۵ گرم، SDS ۲۵ گرم، گلايسين ۳۶ گرم و مابقی حجم تا ۲/۵ لیتر آب دیونیزه) پر گردید. عملیات رانش با جریان ۳۵ میلی آمپر برای هر ژل انجام شد.

### رنگ آمیزی ژل

رنگ آمیزی ژل ها با محلول کوماسی بلو (شامل کوماسی بلو ۷/۵ گرم، متانول ۱۲۵۰ میلی لیتر، استیک اسید ۲۵۰ میلی لیتر و مابقی حجم تا ۲/۵ لیتر آب دیونیزه) انجام گرفت.

### تصویر برداری و تجزیه لکه‌های پروتئینی

تصویربرداری از ژل‌ها توسط دانسیتومتر GS800 ساخت شرکت بیوراد و با انتخاب نوع ژل و روش رنگ‌آمیزی (آبی کوماسی) با نرم افزار Quantity one انجام گردید. توسط نرم‌افزار PDQuest کلیه تصاویر ژل‌ها به همراه تکرارهای آنها فراخوانده شدند و لکه‌های مشترک بین تکرارها برچسب زده شد. با مشخص نمودن نقاط حداقل و حداکثر (pH در بازه ۵ تا ۸)، نقطه ایزوالکتریک و وزن مولکولی هر لکه پروتئینی با استفاده از مارکر پروتئینی به دست آمد. پس از غربال نمودن لکه‌ها از نظر کیفیت و حذف نقاط ناخواسته در نرم افزار، داده‌های کمی حاصل از ژل‌ها بصورت فایل Excel ذخیره شدند. پس از پایان لکه‌یابی،

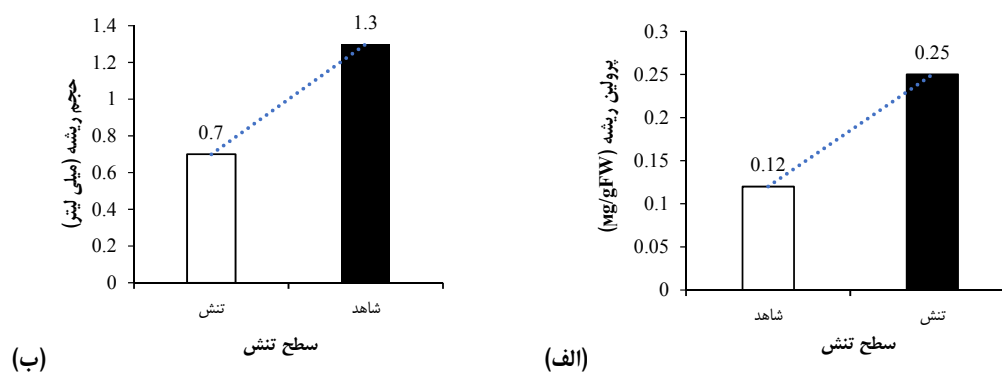
# جدول ۱. میانگین صفات مورد مطالعه در گندم رقم باران و سطح معنی داری آماری t برای شرایط شاهد و تنش کمبود آب

**Table 1.** The mean of traits studied in wheat cultivar Baran and significance level of t-statistic for normal and water deficit stress conditions

| صفات    | وزن تر اندام هوایی | وزن خشک اندام هوایی | طول اندام هوایی    | وزن تر ریشه | وزن خشک ریشه | طول ریشه | حجم ریشه | پرولین ریشه |
|---------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------|--------------|----------|----------|-------------|
| شاهد    | ۰/۲۵               | ۰/۰۳                | ۲۱/۶۹              | ۰/۱۸        | ۰/۱۰         | ۲۵/۵۷    | ۱/۳۴     | ۰/۱۱        |
| تنش     | ۰/۲۳               | ۰/۰۳                | ۲۰/۰۲              | ۰/۰۹        | ۰/۰۴         | ۱۲/۶۸    | ۰/۷      | ۰/۲۶        |
| P-value | ۰/۲۳ <sup>ns</sup> | ۰/۲۵ <sup>ns</sup>  | ۰/۱۰ <sup>ns</sup> | ۰/۰۲*       | ۰/۰۱**       | ۰/۰۱**   | ۰/۰۰**   | ۰/۰۲*       |
| CV(%)   | ۱۴/۵۹              | ۱۰/۲۴               | ۹/۰۰               | ۳۹/۶۲       | ۲۷/۵۳        | ۳۱/۲۷    | ۳۱/۵۹    | ۴۴/۷۷       |

ns, \* و \*\*: به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد را نشان می دهد.

ns, \* and \*\*: Indicate non-significant and significant at the probability levels 5% and 1%, respectively.



**شکل ۱.** میانگین محتوای حجم ریشه (الف) و پرولین ریشه (ب) در شرایط شاهد و تنش کمبود آب در گندم رقم باران

**Figure 1.** (a) The mean of root volume (a) and root prolin content (b) under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

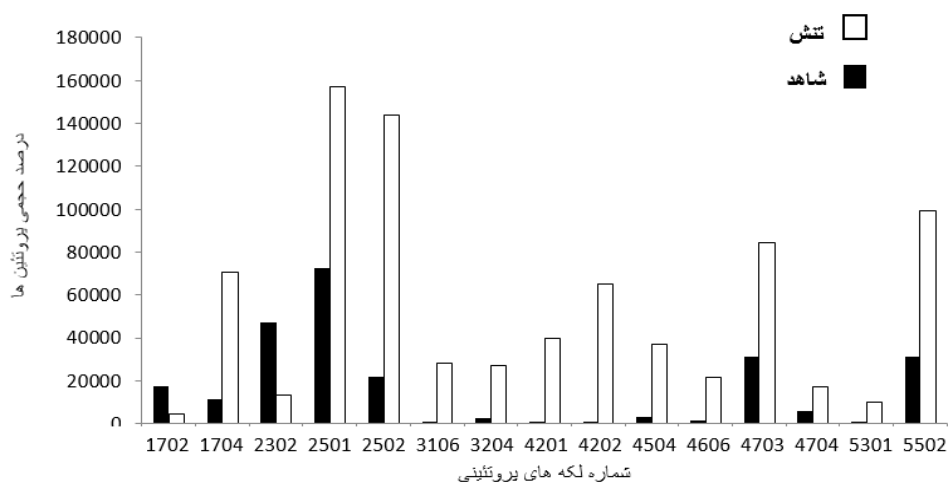
نشان دادند که تعداد لکه‌های دارای افزایش تغییر بیان ۱۳ و لکه‌های با کاهش تغییر بیان و برابر ۲ بود. عامل القا بزرگتر از دو و کوچکتر از ۵/۰ به ترتیب برای افزایش و کاهش تغییر بیان تعیین شدند (Hajheidari et al., 2005). شماره و میزان افزایش یا کاهش بیان لکه‌های پروتئین انتخابی در شکل ۲ و موقعیت این لکه‌ها روی ژل‌های پلی آکریل آمید دو بعدی در شکل ۳ نشان داده شده است.

تنش‌های محیطی از جمله تنش کمبود آب پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلفی را تحت تاثیر قرار می‌دهد که هر کدام جزئی از متابولیسم‌ها و چرخه‌های حیاتی سلول می‌باشند. بر اساس مطالعات مختلف مشخص شده است که در طی تنش یکسری از پروتئین‌ها افزایش بیان یا کاهش بیان می‌یابند و برخی از پروتئین‌ها در طی تنش بیان نمی‌شوند (Hashimoto and Komatsu 2007; Zang and Komatsu, 2007).

## تجزیه و تحلیل پروتئومیک

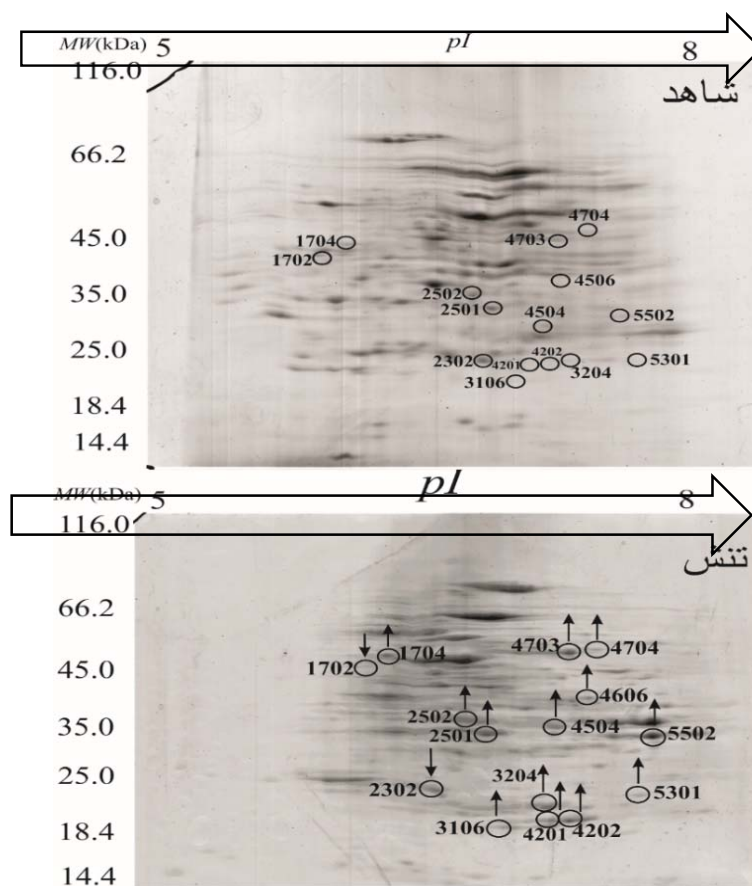
برای بررسی تغییرات پروتئوم، استخراج پروتئین از بافت ریشه در شرایط تنش کمبود آب و آبیاری عادی انجام شد. الکتروفورز دو بعدی در بعد اول به روش متمرکزسازی براساس نقطه ایزوالکتریک و در بعد دوم به روش SDS-PAGE و رنگ آمیزی ژل‌ها با آبی کوماسی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل لکه‌های پروتئینی بوسیله نرم افزار PDQuest با مقایسه درصد حجمی لکه‌های پروتئینی بین شاهد و تیمار تنش کمبود آب منجر به شناسایی تعداد ۹۹ لکه پروتئین تکرار پذیر شد. درصد حجمی لکه‌های مشابه در شرایط شاهد و تنش کمبود آب توسط نرم افزار محاسبه و آزمون t برای شناسایی لکه‌های با افزایش یا کاهش بیان معنی دار استفاده گردید. در مجموع تعداد ۱۵ لکه تفاوت تغییرات بیان معنی‌داری نسبت به شرایط شاهد





شکل ۲. درصد حجمی پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی دار تحت شرایط کمبود آب در گندم رقم باران

**Figure 2.** The volume percentage of the protein with significant expression changes under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

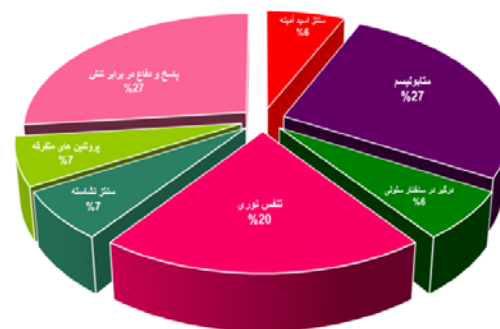


شکل ۳. موقعیت نسبی و برچسب لکه‌های پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در الکتروفورز دو بعدی تحت شرایط عادی و تنش کمبود آب در گندم رقم باران

**Figure 3.** The relative positions and tags of proteins spots with significant expression changes in two-dimensional electrophoresis under normal and water deficit stress conditions in wheat cultivar Baran

آمیلاز می‌توان به محافظت در برابر تنش اکسیداتیو اشاره کرد. علاوه بر این به حفظ نشاسته دانه، یک جزء حیاتی برای جوانه زنی کمک می‌کنند (Hajheidari *et al.*, 2007). همچنین این آنزیم نقش مهمی در مقاومت در برابر آسیب ناشی از حمله حشرات در گیاهان دارند (Gibbs and Alli, 1998). لکه شماره ۴۷۰۴ که نسبت به حالت شاهد افزایش بیان نشان داد با وزن ۴۸/۰۸ کیلو دالتون و ۷/۱۱ pI در بیان پروتئین Late embryogenesis abundant protein D-29 در مقابل تنش کمبود آب نقش دارد. یکی از پروتئین‌های اصلی تشکیل‌دهنده بذر در گیاهان، پروتئین‌های فراوان اواخر جنین زایی (LEA) می‌باشد. تجمع این دسته از پروتئین‌ها باعث ایجاد سازگاری در عملکرد گیاهان در مقابل تنش‌های اسمزی و اکسیداتیو شده است (Mertens, Aliyu, and Cowan 2018). پروتئین‌های LEA از توده‌های مولکولی تشکیل شده اند که عمدتاً در مرحله دوم و سوم رشد بذر جمع می‌شوند، یعنی زمانی که مواد ذخیره شده در بذر به منظور آماده سازی آن برای ورود به مرحله خواب شروع به خشک شدن می‌کنند (Mukherjee *et al.*, 2006). لکه پروتئینی ۵۵۰۲ با افزایش بیان در رقم باران بعنوان پروتئین 2-Cys peroxiredoxin BAS1 مورد شناسایی قرار گرفت. تیوردوکسین‌ها پروتئین‌های کوچکی با دامنه سایت فعال Cys-Gly-Pro-Cys هستند که قادر به احیای پیوندهای دی سولفیدی در پروتئین‌های هدف هستند (Eklund *et al.*, 1991). علاوه بر عملکرد کلی در تنظیم فعالیت آنزیم از طریق کنترل واکنش‌های اکسایش-کاهش تیول، تیوردوکسین‌ها در بسیاری از فرایندها مانند جذب سولفات، تجمع فاژ، رونویسی DNA و آپوپتوز سلولی شرکت می‌کنند (Holmgren 1979; Schenk *et al.*, 1994). مطالعات نشان داده‌اند که این پروتئین در باکتری‌ها، مخمرها و گیاهان، در پاسخ تنش‌های اکسیداتیو نقش دارند.

تجزیه و تحلیل بیان لکه‌های پروتئینی در ژل‌ها بوسیله نرم افزار PDQuest نشان داد که ۱۵ لکه پروتئینی تغییر معنی‌دار داشتند بطوریکه ۲ لکه کاهش بیان و ۱۳ لکه افزایش بیان نشان داده است. خلاصه اطلاعات پروتئین‌های شناسایی شده توسط نرم افزار Mascot در جدول ۲ ارایه شده است. پروتئین‌های دارای تغییر بیان معنی‌دار در شش گروه عملکردی (شکل ۴) تفکیک شده‌اند. تعداد پروتئین‌های درگیر در پاسخ و دفاع در برابر تنش (۴ لکه)، متابولیسم (۴ لکه)، تنفس نوری (۳ لکه)، درگیر در ساختار سلولی (۱ لکه)، سنتز نشاسته (۱ لکه)، سنتز اسیدآمینه (۱ لکه) و پروتئین متفرقه (۱ لکه) گروه بندی شدند.



شکل ۴. گروه‌های عملکردی پروتئین‌های پاسخ دهنده به تنش کمبود آب در گندم رقم باران

Figure 4. Functional group of proteins responded to water deficit stress in wheat cultivar Baran

پروتئین‌های درگیر در پاسخ و دفاع در برابر تنش تعداد ۴ لکه (۲۷٪) جزو پروتئین‌های شناخته شده در پاسخ و دفاع در برابر تنش بودند که از این میان لکه‌های شماره ۴۲۰۱ و ۴۲۰۲ با داشتن وزن مولکولی و pI تقریباً مشابه هم، به عنوان پروتئین Monomeric alpha-amylase مورد شناسایی قرار گرفتند. مطابق مطالعات انجام گرفته مهارکننده‌های پروتئاز عموماً در بسیاری از گیاهان به‌ویژه در بافت‌های ذخیره‌سازی مانند دانه‌ها و غده‌ها پس از القای یک تنش زیستی، با افزایش بیان ظاهر می‌شوند (Van Dam *et al.*, 2001; Dombrowski, 2003). از نقش‌های مهارکننده‌های آلفا

**جدول ۲.** مشخصات ۱۵ لکه پروتئینی دارای تغییرات بیان معنی دار در پاسخ به تنش کمبود آب گندم رقم باران  
**Table 2.** The characteristics of 15 protein spots with significant expression changes under water deficit stress in wheat cultivar Baran

| نام پروتئین                                | شماره دسترسی | شماره لکه | گروه عملکردی             | Theoretical |      | Experimental |      |
|--------------------------------------------|--------------|-----------|--------------------------|-------------|------|--------------|------|
|                                            |              |           |                          | MW (kDa)    | pI   | MW (kDa)     | pI   |
| S-adenosylmethionine synthase 3            | XP_002881476 | ۱۷۰۲      | سنتز اسید آمینه          | 42.5        | 5.76 | 43.94        | 5.60 |
| Peroxidase                                 | gi/474004599 | ۱۷۰۴      | متابولیسم                | 46.23       | 5.85 | 46.88        | 5.83 |
| Germin-Like protein                        | EMS51159     | ۲۲۰۲      | درگیر در ساختار سلولی    | 24          | 6    | 21.85        | 6.08 |
| Phosphoglycerate mutase                    | 32400802     | ۲۵۰۱      | متابولیسم                | 30          | 5.43 | 30.64        | 6.48 |
| Triose phosphate- isomerase                | 136063       | ۲۵۰۲      | تنفس نوری                | 32.0        | 6.00 | 32.85        | 6.32 |
| Adenosindiphospha glucose                  | gi 21322655  | ۳۱۰۶      | سنتز نشاسته              | 21.97       | 5.68 | 18.43        | 6.69 |
| Glutathione S-transferase 5                | AAP58395     | ۳۲۰۴      | پروتئین متفرقه           | 23.9        | 6.8  | 20.62        | 6.88 |
| Monomeric alpha-amylase inhibitor          | ABO45950.1   | ۴۲۰۱      | پاسخ و دفاع در برابر تنش | 19.2        | 6.9  | 19.2         | 6.90 |
| Monomeric alpha-amylase inhibitor          | ABO45950.1   | ۴۲۰۲      | پاسخ و دفاع در برابر تنش | 19.2        | 6.9  | 19.19        | 6.98 |
| Cytosolic 3-phosphoglycerate kinase        | gi 20302473  | ۴۵۰۴      | متابولیسم                | 40.5        | 6.9  | 31.36        | 6.93 |
| Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase   | ANS54490     | ۴۶۰۶      | تنفس نوری                | 36.61       | 6.67 | 37.07        | 7.0  |
| Serine hydroxymethyltransferase 4          | NP_193129    | ۴۷۰۳      | متابولیسم                | 51.7        | 6.80 | 47.35        | 6.97 |
| Late embryogenesis abundant protein D-29   | gi 734319188 | ۴۷۰۴      | پاسخ و دفاع در برابر تنش | 48.3        | 7.1  | 48.08        | 7.11 |
| $\beta$ -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase 1 | Q9LKJ1       | ۵۳۰۱      | متابولیسم                | 23.25       | 7.66 | 21.93        | 7.3  |
| 2-cys Peroxiredoxin BASI                   | gi 657999067 | ۵۵۰۲      | پاسخ و دفاع در برابر تنش | 29.5        | 7.7  | 30.21        | 7.36 |

### پروتئین های درگیر در تنفس نوری و متابولیسم

گروه بعدی پروتئین ها در گروه عملکردی متابولیسم و تنفس نوری قرار دارند. از بین پروتئین های شناسایی شده در این گروه، لکه های ۱۷۰۴، ۲۵۰۱، ۲۵۰۲، ۴۵۰۴، ۴۷۰۳ و ۵۳۰۱ در مسیرهای متابولیسمی گیاهان نقش دارند. پروتئین شماره ۲۵۰۱ با وزن مولکولی ۳۰/۶۴ و ۶/۴۸ pI مربوط به Phosphoglycerate mutase می باشد که تحت تنش کمبود آب در ریشه های گندم افزایش یافت. فسفوگلیسررات موتاز یا PGM یک آنزیم گلیکولیزی است که باعث تبدیل گلیسررات ۳- فسفات و گلیسررات ۲- فسفات به یکدیگر می شود (Yan et al., 2006). افزایش بیان این آنزیم ممکن است به تولید انرژی بیشتر مورد نیاز در فرایندهای دفاعی متعدد کمک کند. از دیگر ترکیباتی که در چرخه تنفس

نوری (متابولیسم) شناسایی شده اند، فروکتوز بیس فسفات<sup>۱</sup>، تریوز فسفات ایزومراز سیتوسولی<sup>۲</sup>، آلدولاز<sup>۳</sup> و اینولاز<sup>۴</sup> هستند که جزء مرحله اولیه گلیکولیز می باشند. در این مرحله کربوهیدرات ها به هگزوز فسفات<sup>۵</sup> و سپس به تریوز فسفات<sup>۶</sup> تبدیل می شوند (Rocco et al., 2019). لکه ۲۵۰۲ که بعنوان تریوز فسفات ایزومراز<sup>۷</sup> شناسایی شد در مسیر گلیکولیز (مرحله اولیه تولید انرژی) درگیر می باشد که ایزومریزاسیون دی هیدروکسی استون فسفات<sup>۸</sup> و D-گلیسرآلدئید-۳

1. Fructose-bis phosphate
2. Cytosolic Triosephosphate isomerase
3. Aldolase
4. Enolase
5. Hexose phosphates
6. Triose phosphates
7. Triosephosphate isomerase
8. dihydroxyacetone phosphate

۴۷۰۳ به عنوان پروتئین دخیل در متابولیسم کربن شناسایی گردید. این پروتئین در شرایط تنش کمبود آب افزایش بیان معنی‌دار داشت. این لکه پروتئینی بعنوان سرین هیدروکسی متیل ترانستفراز<sup>۴</sup> در تبادلات مسیر تتراهیدروفولات دخیل است که بخشی از متابولیسم کربن بوده و در متابولیسم آمینواسیدها و نوکلئوتیدها درگیر هستند (Lovell et al., 1990). پروتئین سرین هیدروکسی متیل ترانستفراز مسئول کاتالیز تبادلات سرین و گلیسین می‌باشند. لکه شماره ۵۳۰۱ بعنوان بتا-هیدروکسی ایزوبوتیریل-کوآ هیدرولاز<sup>۵</sup> در متابولیسم والین نقش دارد. والین نقش بسزایی در گرده افشانی و در مقاومت به شرایط تنش‌های محیطی دارد (Zolman et al., 2001). لکه مربوط به پروتئین بتا-هیدروکسی ایزوبوتیریل-کوآ هیدرولاز در شرایط تنش کمبود آب دارای افزایش بیان بود. این افزایش بیان می‌تواند مربوط به افزایش پرولین در گیاه باشد. می‌توان گفت پرولین نقش بسیار مهمی در پاسخ به انواع تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری و کمبود آب در گیاه دارد و سایر مسیرها را نیز تحت تاثیر قرار می‌دهد (Zolman et al., 2001).

#### پروتئین درگیر در بیوسنتز نشاسته

لکه‌ی شماره ۳۱۰۶ یکی دیگر از پروتئین‌های شناسایی شده است که با افزایش بیان همراه گردید. این لکه بعنوان ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase)<sup>۶</sup> مورد شناسایی قرار گرفت. در غلات در حال رشد، ساکارز از طریق یک مسیر متابولیکی که شامل چندین مرحله متوالی آنزیمی است، به نشاسته تبدیل می‌شود. در سنتز نشاسته آدنوزین بیس فسفات، گلوکز پیرو فسفات، نشاسته سنتتاز و آنزیم منشعب‌کننده<sup>۷</sup> فعالیت دارند. وزن تقریبی پروتئین AGPase، در حدود ۲۰ کیلو دالتون می‌باشد. همچنین این پروتئین در گیاهان دارای ساختار نوع چهارم<sup>۸</sup> است و از دو زیر واحد متفاوت تشکیل شده‌اند که توسط ژن‌های متفاوت کد می‌شوند. AGPase واکنش تشکیل

فسفات<sup>۱</sup> را کاتالیز می‌کند (Kishor et al., 2005). نتایج حاصل از مطالعه دیگری نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها برای کارایی در هر دو مسیر گلیکولیز و کالوین نقش اساسی دارند (Rocco et al., 2019). لکه ۱۷۰۴ از پروتئین‌های دیگری است که در تنفس نوری و فرآیند متابولیسم دخیل است، این لکه بعنوان آنزیم پراکسیداز شناسایی شد که افزایش بیان داشته است. طی بیست سال اخیر به طور پیوسته آنزیم پراکسیداز به عنوان شاخص تغییرات اکولوژیکی در گیاه معرفی شده است و تغییرات کمی و کیفی این آنزیم در فرآیند فتوسنتز و نیاز نوری گیاه به اثبات رسیده است (Salin 1991). لکه پروتئینی<sup>۲</sup> ۴۵۰۴ که بعنوان ۳-فسفوگلیسرات کیناز سیتوسولی<sup>۳</sup> مورد شناسایی قرار گرفت، هفتمین آنزیم چرخه گلیکولیز است که واکنش ۱،۳ بیس فسفوگلیسرات و ADP را برای تولید تری فسفوگلیسرات و ATP کاتالیز می‌کند (Xiong et al., 2017). فسفوگلیسرات کیناز یکی از آنزیم‌های حیاتی در چرخه گلیکولیز است، افزایش آن در ریشه احتمالاً نشان دهنده الگوهای تغییر شکل کربن در پاسخ به افزایش نیاز برای تنظیم اسمزی باشد (Xiong et al., 2017). لکه پروتئینی<sup>۴</sup> ۴۶۰۶ با وزن مولکولی ۳۷،۰۷ کیلو دالتون و برابر ۷ به عنوان پروتئین گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز<sup>۳</sup> مورد شناسایی قرار گرفت. گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز یک واکنش کلیدی در مسیر گلیکولیز را کاتالیز می‌کند و نقش مهمی در تولید انرژی و تجزیه متابولیت‌های کربوهیدرات ایفا می‌کند (Guo et al., 2014). افزایش گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز ممکن است تجمع قندهای محلول را افزایش دهد و انرژی بیشتری برای گیاهان تحت تنش ایجاد کند. از این رو این آنزیم می‌تواند به عنوان شاخص تحمل به تنش باشد. افزایش این آنزیم توسط بنایی و همکاران، نیز در ریشه کلزا گزارش شده است (Banaei-Asl et al., 2015). همچنین افزایش فعالیت این آنزیم (Tanou et al., 2009) تحت تنش‌های محیطی به عنوان یک راهکار موثر تحمل تنش، در گندم (Kang et al., 2012) نیز گزارش شده است. لکه شماره

4. Serine hydroxymethyltransferase  
5.  $\beta$ -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase  
6. ADP-glucose pyrophosphorylase  
7. Branching enzyme  
8. Tetrameric

1. D-glyceraldehyde-3-Phosphate  
2. 3-phosphoglycerate kinase Cytosolic  
3. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

ADP-glucose و پیروفسفات را از ATP و گلوکز-۱-فسفات<sup>۱</sup> کاتالیز می‌کند. محصول نهایی این واکنش ADP-glucose است که پیش ماده برای سنتز نشاسته محسوب می‌شود (Boehlein et al., 2005). نشاسته کربوهیدرات اصلی ذخیره ای در غلات است از این رو عامل مهمی است که عملکرد دانه را تعیین می‌کند و منبع انرژی برای فرآیندهای متابولیکی مختلف می‌باشد (Balan et al., 2018).

### پروتئین‌های درگیر در ساختار سلولی

لکه دیگری که مورد شناسایی قرار گرفت و در گروه عملکردی ساختار سلولی درگیر است، لکه ۲۳۰۲ با وزن مولکولی ۲۷/۸۵ pI و ۶/۰۸ می باشد که به عنوان پروتئین شبه جرمین<sup>۲</sup>، در طی جوجه‌زنی دانه در گیاهچه‌های جوان گندم و همچنین در برگ‌های بالغ در واکنش به حمله پاتوژن بیان می‌شوند. پروتئین‌های شبه جرمین به عنوان پروتئین‌های مرتبط با دیواره سلولی توصیف شده‌اند، برخی از اعضای خانواده شبه جرمین فعالیت شبیه اگزالات اکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز نشان می‌دهند (Gucciardo et al., 2007). در گندم رقم باران نیز احتمال می‌رود لکه شماره ۲۳۰۲ جزو این پروتئین‌ها باشد که در شرایط تنش کاهش بیان داشت. در بررسی میزان بیان Germin-Like در گندم تحت تنش کمبود آب دریافتند که Germin-Like یکی از فراوان‌ترین پروتئین‌های موجود در دیواره سلولی گیاهان عالی است و از طریق تقویت دیواره سلولی و جلوگیری از آسیب بافت، نقش مهمی در دفاع گیاهان دارند. در این بررسی مشاهده کردند که پروتئین فوق در ریشه تحت تنش کمبود آب رقم متحمل ابتدا افزایش و سپس کاهش بیان داشته است (Membré et al., 2000).

### پروتئین درگیر در سنتز اسید آمینه

لکه ۱۷۰۲ در گروه عملکردی سنتز اسید آمینه قرار

دارد. این لکه با وزن مولکولی ۴۳/۹۴ کیلو دالتون و pI ۵/۶ که به عنوان اس-آدنوزیل متیونین سنتاز-۳<sup>۳</sup> شناسایی شد در رقم باران کاهش بیان معنی دار نشان داد. اس-آدنوزیل متیونین سنتاز-۳ یک آنزیم حیاتی است که میان‌کنش اتصال متیونین و ATP و تشکیل اس-آدنوزیل متیونین را کاتالیز می‌کند (Horikawa et al., 1990). بنایی و همکاران (Banaei-Asl et al., 2015) کاهش بیان این آنزیم را در ریشه کلزا تحت تنش شوری را گزارش کرده‌اند.

### پروتئین‌های متفرقه

لکه شماره ۳۲۰۴ با وزن مولکولی ۲۰/۶۲ و ۶/۸۸ pI که در گروه پروتئین‌های متفرقه قرار دارد، در شرایط تنش دارای افزایش بیان بود و به عنوان گلوکاتیون اس-ترانسفراز<sup>۴</sup> شناسایی گردید. این پروتئین‌ها در سم‌زدایی و محافظت در برابر تنش اکسیداتیو از طریق مهار رادیکال‌های آزاد دخیل هستند. GST به عنوان آنزیم سم‌زدایی در کاتالیز ترکیب گلوکاتیون با انواع ترکیبات هدف به خوبی شناخته شده است (Droog 1997; Dixon et al., 2002). برخی از مطالعات پروتئومیک نشان دادند که بیشتر ایزوفرم‌های GST در ریشه‌های *Arabidopsis* (Jiang et al., 2007)، برنج (Liu et al., 2014; Chitteti and Peng, 2007)، گندم (Wang et al., 2008) و جو (Sugimoto and Takeda, 2009) القا می‌شوند.

### نتیجه گیری کلی

بطور کلی نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که میانگین صفات وزن تر و خشک ریشه، طول ریشه و حجم ریشه در شرایط تنش کمبود آب در گندم رقم باران نسبت به شاهد کاهش و میزان پرولین ریشه افزایش معنی دار داشته است. تجزیه پروتئوم بافت ریشه منجر به شناسایی ۹۹ لکه پروتئینی تکرار پذیر در الکتروفورز دو بعدی شد. از بین لکه‌های پروتئینی ظاهر شده روی ژل

3. S-Adenosylmethionine synthetase 3  
4. Glutathione S-transferase (GST)

1. Glucose-1- phosphate  
2. Germin-Like

افزایش بیان معنی دار داشتند، می توان اظهار داشت که گندم رقم باران در شرایط تنش کمبود آب می تواند با افزایش هموستازی به تنش و حفظ پروتئین های عملکردی تحمل لازم را داشته باشد. این افزایش بیان پروتئین ها نشان دهنده فعال سازی مسیرهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی مختلفی است که به گیاه کمک می کنند تا با شرایط نامساعد محیطی مقابله کند. پروتئین های شناسایی شده می توانند نقش مهمی در حفاظت از سلول ها در برابر آسیب های اکسیداتیو و حفظ ساختار و عملکرد پروتئین ها ایفا کنند. همچنین، افزایش بیان آنزیم های مرتبط با سنتز اسمولیت ها مانند پرولین می تواند به حفظ تعادل اسمزی و کاهش اثرات منفی تنش آبی کمک کند. در مجموع، این مکانیسم ها به گندم رقم باران امکان می دهند تا در شرایط کمبود آب، عملکرد بهتری داشته باشد و از کاهش شدید محصول جلوگیری کند.

### تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

الکتروفورز دو بعدی تعداد ۱۵ لکه دارای تغییر بیان معنی دار در شرایط تنش کمبود آب نسبت به شاهد بودند. پروتئین های دخیل در تحمل به تنش خشکی رقم باران در فرایندهای بیولوژیکی تنفس نوری و متابولیسم، سنتز نشاسته، پروتئین های درگیر در ساختار سلولی، پاسخ و دفاع در برابر تنش و پروتئین متفرقه درگیر می باشند. پروتئین های پراکسیداز، آدنوزیل متیونین سنتتاز-۳، پروتئین شبه جرمین، فسفولیسرات-موتاز، تریوز فسفات-ایزومراز، آدنوزین دی فسفات گلوکز، گلوکاتایون-ترنسفراز-۵، مونومریک-آلفا آمیلاز، ۳-فسفو گلیسرات کیناز سیتوسولی، گلیسرالدهید-۳ فسفات دهیدروژناز، سرین هیدروکسی متیل ترنسفراز-۴، پروتئین های LEA، بتا-هیدروکسی بوتیریل-هیدرولاز ۱ و ۲-سیس پروکسی ردوکسین در شرایط تنش کمبود آب افزایش بیان نشان دادند که نشان گر اهمیت این دسته از پروتئین ها در کاهش اثرهای مخرب حاصل از تنش کمبود آب می باشد. بطور کلی با توجه به گروه های عملکردی پروتئین هایی که

### References

- Ahmed, M., Fayyaz, H., Ghulam, Q., Farid, A.S., & Muhammad, A.A. (2017). Response of proline accumulation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) under rainfed conditions. *Journal of Agricultural Meteorology*, D-14-00047.
- Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., & Bruggemann, W. (2013). Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta*, 237, 771-81.
- Balan, D., Tokas, J., & Singal, H.R. (2018). UDP-glucose pyrophosphorylase, Isolation, purification and characterization from developing thermotolerant wheat (*Triticum aestivum*) grains. *Protein Expression and Purification*, 148, 68-77. doi: 10.1016/j.pep.2018.04.007.
- Banaei-Asl, F., Bandehagh, A., Dorani, E., Farajzadeh, D., Sakata, K., Mustafa, G., & Komatsu, S. (2015). Proteomic analysis of canola root inoculated with bacteria under salt stress. *Journal of Proteomics*, 124, 88-111.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, 39, 205-07.
- Bazargani, M.M., Sarhadi, E., Bushehri, A.A., Matros, A., Mock, H.P., Naghavi, M.R., Hajihoseini, V. et al. (2011). A proteomics view on the role of drought-induced senescence and oxidative stress defense in enhanced stem reserves remobilization in wheat. *Journal of Proteomics*, 74(10), 1959-73.
- Boehlein, S. K., Sewell, A.K. Cross, J., Stewart, J. D., & Hannah, L. C. (2005). Purification and characterization of adenosine diphosphate glucose pyrophosphorylase from maize/potato mosaics. *Plant Physiology*, 138(3), 1552-62. doi: 10.1104/pp.105.060699.
- Bogeat-Triboulot, M. B., Brosché, M., Renaut, J., Jouve, L., Le Thiec, D., Fayyaz, P., Vinocur, B., Witters, E., Laukens, K., Teichmann, T., Altman, A., Hausman, J.F., Polle, A., Kangasjärvi, J., & Dreyer E. (2007). Gradual soil water depletion results in reversible changes of gene expression, protein profiles, ecophysiology, and growth performance in *Populus euphratica*, a poplar growing in arid regions. *Plant Physiology*, 143(2), 876-92. doi: 10.1104/pp.106.088708.
- Bonhomme, L., Valot, B., Tardieu, F., & Zivy, M. (2012). Phosphoproteome dynamics upon changes in plant water status reveal early events associated with rapid growth adjustment in maize leaves. *Molecular and Cellular Proteomics*, 11(10), 957-72. doi: 10.1074/mcp.M111.015867.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-54. doi: 10.1006/abio.1976.9999.

- Caruso, G., Cavaliere, C., Foglia, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2009). Analysis of drought responsive proteins in wheat (*Triticum durum*) by 2D-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. *Plant Science*, 177, 570-76.
- Chitteti, B. R., & Peng, Z. (2007). Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *Journal of Proteome Research*, 6, 1718-27. doi: 10.1021/pr060678z.
- Dixon, D. P., Laphorn, A., & Edwards, R. (2002). Plant glutathione transferases. *Genome Biology*, 3, 1-10. doi: 10.1186/gb-2002-3-3-reviews3004.
- Dombrowski, J.E. (2003). Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Journal of Plant Physiology*, 132(4), 2098-107. doi: 10.1104/pp.102.019927.
- Droog, F. (1997). Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Plant Growth Regulation*, 16, 95-107. doi.org/10.1007/PL00006984.
- Eklund, H., Gleason, F. K., & Holmgren A. (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. *Proteins*, 11(1), 13-28. doi: 10.1002/prot.340110103.
- Ford, K.L., Cassin, A., & Bacic, A.F. 2011. Quantitative proteomic analysis of wheat cultivars with differing drought stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 2, 44.
- Ge, P., Ma, C., Wang, S., Gao, L., Li, X., Guo, G., Ma, W. et al. 2012. Comparative proteomic analysis of grain development in two spring wheat varieties under drought stress. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(3), 1297-1313.
- Gibbs, B. F., & Alli, I. (1998). Characterization of a purified  $\alpha$ -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*). *Food Research International*, 31(3), 217-25.
- Gucciardo, S., Wisniewski, J. P., Brewin, N.J., & Bornemann, S. (2007). 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*, 58(5), 1161-71. doi: 10.1093/jxb/erl282.
- Guo, L., Ma, F., Wei, F., Fanella, B., Allen, D. K., & Wang, X. (2014). Cytosolic phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases affect *Arabidopsis* cellular metabolism and promote seed oil accumulation. *The Plant Cell*, 26(7), 3023-35. doi: 10.1105/tpc.114.126946.
- Hajheidari, M., Eivazi, A., Buchanan, B. B., Wong, J. H., Majidi, I., & Salekdeh, G. H. (2007). Proteomics uncovers a role for redox in drought tolerance in wheat. *Journal of Proteome Research*, 6(4), 1451-60. doi: 10.1021/pr060570j.
- Hao, P., Zhu, J., Gu, A., Lv, D., Ge, P., Chen, G., Li, X. et al. (2015). An integrative proteome analysis of different seedling organs in tolerant and sensitive wheat cultivars under drought stress and recovery. *Proteomics*, 15(9), 1544-1563.
- Hashimoto, M., & Komatsu, S. (2007). Proteomic analysis of rice seedlings during cold stress. *Proteomics*, 7, 1293-302.
- Holmgren, A. (1979). Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *Journal of Biological Chemistry*, 254, 9627-32.
- Horikawa, S., Sasuga, J., Shimizu, K., Ozasa, H., & Tsukada, K. (1990). Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding the rat kidney S-adenosylmethionine synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 13683-86.
- Jiang, Y., Yang, B., Harris, N. S., & Deyholos, M. K. (2007). Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3591-607. doi: 10.1093/jxb/erm207.
- Kamal, A. H. M., Kim, K. H., Kwang-Hyun, S., Choi, J. S., Baik, B. K., Tsujimoto, H., Heo, H. Y., Park, C. S., & Woo, S. H. (2010). Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian Journal of Crop Science*, 4, 196-208.
- Kamal, A.H.M., Cho, K., Choi, J.-S., Bae, K.-H., Komatsu, S., Uozumi, N., & Woo, S.H. 2013. The wheat chloroplastic proteome. *Journal of Proteomics*, 93, 326-342.
- Kang, G., Li, G., Zheng, B., Han, Q., Wang, C., Zhu, Y., & Guo T. (2012). Proteomic analysis on salicylic acid-induced salt tolerance in common wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins, and Proteomics*, 1824, 1324-33. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.07.012.
- Kishor, P., Sangam, S., Amrutha, R.N., Sri Laxmi, P., Naidu, K.R., Rao, M., Rao, S., Reddy, K.J., Theriappan, P., & Sreenivasulu, N. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants, its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88, 424-38.
- Kosova, K., Vitamvas, P., Prasil, I. T., & Renaut, J. (2011). Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. *Journal of Proteomics*, 74, 1301-22. doi: 10.1016/j.jprot.2011.02.006.
- Liu, C.W., Chang, T. S., Hsu, Y.K., Wang, A.Z., Yen, H.C., Wu, Y.P., Wang, C.S., & Lai C.C. (2014). Comparative proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in roots and leaves of rice. *Proteomics*, 14, 1759-75. doi: 10.1002/pmic.201300276.
- Lovell, C. R., Przybyla, A., & Ljungdahl, L. G. (1990). Primary structure of the thermostable formyltetrahydrofolate synthetase from *Clostridium thermoaceticum*. *Biochemistry*, 29(24), 5687-94.

- Membré N, Bernier F, Staiger D, Berna A. (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins, common and specific features point to a variety of functions. *Planta*, 211(3), 345-54.
- Mertens, J., Aliyu, H., & Cowan. D. A. (2018). LEA proteins and the evolution of the WHy domain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84, e00539-18. doi: 10.1128/AEM.00539-18.
- Michaletti, A., Naghavi, M.R., Toorchi, M., Zolla, L., & Rinalducci, S. (2018). Metabolomics and proteomics reveal drought-stress responses of leaf tissues from spring-wheat. *Scientific reports*, 8(1), 5710.
- Moons, A., Bauw, G., Prinsen, E., Van Montagu, M and Van Der Straeten, D. (1995). Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and salt-tolerant Indica rice varieties. *Plant Physiology*, 107, 177-86.
- Mukherjee, K., Choudhury, A. R., Gupta, B., Gupta, S., & Sengupta, D. N. (2006). An ABRE-binding factor, OSBZ8, is highly expressed in salt tolerant cultivars than in salt sensitive cultivars of indica rice. *BMC Plant Biology*, 6, 18. doi: 10.1186/1471-2229-6-18.
- Rocco, M., Tartaglia, M., Izzo, F. P., Varricchio, E., Arena, S., Scaloni, A., & Marra, M. (2019). Comparative proteomic analysis of durum wheat shoots from modern and ancient cultivars. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 253-62.
- Salin, M. L. (1991). Chloroplast and mitochondrial mechanisms for protection against oxygen toxicity. *Free Radical Research Communications*, 13, 851-58. doi: 10.3109/10715769109145867.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrügger, W., Dröge, W., & Osthoff, K. S. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 91, 1672-76.
- Sengupta, D., Kannan, M., & Reddy, A. R. (2011). A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Planta*, 233, 1111-27. doi: 10.1007/s00425-011-1365-4.
- Shi, H., Ye, T., & Chan, Z. (2013). Comparative proteomic and physiological analyses reveal the protective effect of exogenous polyamines in the bermudagrass (*Cynodon dactylon*) response to salt and drought stresses. *Journal of Proteome Research*, 12, 4951-64. doi: 10.1021/pr400479k.
- Sugimoto, M., & Takeda, K. (2009). Proteomic analysis of specific proteins in the root of salt-tolerant barley. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 2762-65. doi: 10.1271/bbb.90456.
- Tanou, G., Job, C., Rajjou, L., Arc, E., Belghazi, M., Diamantidis, G., Molassiotis, M., & Job, D. (2009). Proteomics reveals the overlapping roles of hydrogen peroxide and nitric oxide in the acclimation of citrus plants to salinity. *The Plant Journal*, 60, 795-804. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.04000.x.
- Toorchi, M., Dolati, M., & Adalatzaadeh-Aghdam, S. (2014). Differentially expressed proteins in canola leaf induced by salt stress-a proteomic approach. *International Journal of Biosciences*, 5, 433-42.
- Van Dam, N. M., Horn, M., Mareš, M., & Baldwin, I. T. (2001). Ontogeny constrains systemic protease inhibitor response in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Chemical Ecology*, 27, 547-68.
- Wang, M. C., Peng, Z.Y., Li, C.L., Li, F., Liu, C., & Xia, G.M. (2008). Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum*/Thinopyrum ponticum. *Proteomics*, 8, 1470-89. doi: 10.1002/pmic.200700569.
- Xiong, J., Sun, Y., Yang, Q., Tian, H., Zhang, H., Liu, Y., & Chen, M. (2017). Proteomic analysis of early salt stress responsive proteins in alfalfa roots and shoots. *Proteome Science*, 15, 19. doi: 10.1186/s12953-017-0127-z.
- Yan, S. P., Zhang, Q.Y., Tang, Z. C., Su, W. A., & Sun, W. N. (2006). Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular and Cellular Proteomics* 5, 484-96. doi: 10.1074/mcp.M500251-MCP200.
- Yordanov, I., Velikova, V., & Tsonev, T. (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica*, 38, 171-86.
- Zadražnik, T., Hollung, K., Egge-Jacobsen, W., Meglič, V., & Šuštar-Vozlič, J. (2013). Differential proteomic analysis of drought stress response in leaves of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Proteomics*, 78, 254-72. doi: 10.1016/j.jprot.2012.09.021.
- Zang, X., & Komatsu, S. (2007). A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 68, 426-37.
- Zolman, B.K., Monroe-Augustus, M., Thompson, B., Hawes, J. W., Krukenberg, K. A., Matsuda, S. P., & Bartel, B. (2001). chy1, an *Arabidopsis* mutant with impaired  $\beta$ -oxidation, is defective in a peroxisomal  $\beta$ -hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 31037-46. doi: 10.1074/jbc.M104679200.



## ORIGINAL ARTICLE

# The effect of *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* and *Bacillus subtilis* bacteria on biological control of *Pythium ultimum*

Mohammad Reza Shirafkan<sup>1</sup>, Samira Shahbazi<sup>2</sup>(ORCID: 0000000282913887), Mohammad Ali Ebrahimi<sup>3</sup>, Hamid Sobhanian<sup>4</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Science, Payame Noor University, Tehran, Iran.

2. Department of Plant Pathology, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran.

3. Department of Biotechnology, Payame Noor University, Tehran, Iran. & Systems Biology Research Department, ABRRI, Agricultural Research, Education, and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

### Correspondence

Samira Shahbazi

Email: [sshabbazi@aeoi.org.ir](mailto:sshabbazi@aeoi.org.ir)

Received: 2, Mar. 2024

Accepted: 19, Jun. 2024

### How to cite:

Shirafkan, M.R., Shahbazi, S., Ebrahimi, M.A., & Sobhanian, H. (2024). The effect of *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* and *Bacillus subtilis* bacteria on biological control of *Pythium ultimum*. *Crop Biotechnology*, 14(2), 51-68.

(DOI: [10.30473/cb.2024.70671.1960](https://doi.org/10.30473/cb.2024.70671.1960))

## ABSTRACT

Growth-promoting bacteria or plant probiotics are an effective part of biocompatible and sustainable agriculture. In this study, changes in some vegetative and plant physiological indicators and the biocontrol of *P. ultimum* (damping-off disease agent) in Lettuce plants treated with two types of growth stimulating bacteria (*A. lipoferum* and *A. brasilense*) and a biocontrol species (*B. subtilis* and two gamma irradiated mutant isolates 419 and 600) were investigated in greenhouse conditions in the form of a completely randomized design (CRD) with four replications. The results showed bacterial treatments in the all growth and physiological indicators, were significantly different from the control at the 5% level. In the *P. ultimum* inoculated treatments, the damping-off and diseases severity (DI) were significantly reduced as a result of the treatment with *B. subtilis* mutants obtained from gamma ray irradiation, but *Azospirillum* strains were not effective in biocontrol. The comparison of physiological indexes in infected plants showed that peroxidase, polyphenol oxidase enzymes and proline increased and malonaldehyde decreased as a result of treatment with *B. subtilis* mutants. From the total results of this research, it can be concluded that the induction of mutation with gamma ray due to the improvement of antagonistic potential of *B. subtilis*, led to increase the biological control activities of *B. subtilis* mutants without adverse effects on the growth and physiology of lettuce, so that the efficiency of these mutants in the biocontrol of pseudo-fungus *P. ultimum* and induction of physiological indicators of resistance in the lettuce plant is higher than that of *Azospirillum* efficiency.

## KEYWORDS

*Pythium ultimum*, *Azospirillum lipoferum*, *Azospirillum brasilense*, *Bacillus subtilis*, Biological control.





## مقدمه

استفاده از مواد شیمیایی برای کنترل بیماری‌های خاکبرد به دلیل پیچیدگی اکوسیستم خاک؛ احتمال جذب این مواد در کلونیدهای خاک؛ تأثیر متابولیت سایر میکروارگانیسم‌ها و تجزیه و غیرفعال شدن ترکیبات شیمیایی کارایی پایین تری در مقایسه با کاربرد سموم شیمیایی علیه بیماری‌های هوازاد دارد. بنابراین تولیدکنندگان محصولات کشاورزی از دزهای بالاتر سموم علیه بیماری‌های خاکبرد استفاده می‌کنند تا کارایی مورد نظر تأمین شود و همین امر به بروز آلودگی منابع آب و خاک می‌انجامد. برای جلوگیری از آلودگی‌های زیست محیطی، در برنامه‌های مدیریت تلفیقی بیماری‌های خاکبرد می‌توان تیمار خاک با ترکیباتی که ماده مؤثره زیستی (مانند باکتری *B. subtilis*) دارند را جایگزین ترکیبات شیمیایی کرد (Rostaminia et al., 2021). افزایش کارایی جزءزیستی از راهکارهای مهم ارائه ترکیبات زیستی جایگزین برای کنترل بیماری‌ها به منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی است. یکی از راهکارهای افزایش کارایی جزءزیستی، ارتقای قدرت آنتاگونیستی در جزءزیستی است (Afsharmanesh et al., 2014). باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPRs)، گروهی از میکروبیوم‌های مرتبط با گیاه هستند که تأثیری مفید در بهبود تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی دارند. این باکتری‌ها به جذب مواد مغذی توسط گیاهان کمک کرده و ارتقاء سلامت گیاه از تأثیرات آنهاست. بیشتر جنس‌های PGPR شامل سودوموناس، آئروموناس، کلبسیلا، آزوآروس، انتروباکتر، آزوسپیریلوم، کلستریدیوم، آروتوباکتر، آرتوباکتر، ریزوبیوم، گلوکوناستوباکتر و باسیلوس‌ها هستند (Rezalu et al., 2022). کاهو با نام علمی (*Lactuca sativa* L) جزء خانواده آستراسه و از سبزیجات برگی است. منبع غذایی کم‌کالری و مغذی متشکل از مواد معدنی و ویتامین دارد و به دلیل شکل مصرف به صورت تازه، تولید آن بدون استفاده از ترکیبات شیمیایی صورت می‌گیرد. تأثیر باکتری‌های محرک رشد مانند *Bacillus* و *Azospirillum* به منظور افزایش

جوانه‌زنی بذر و تحریک رشد کاهو تأیید شده است (Rezalu et al., 2022). از آنجایی که کاشت کاهو معمولاً به صورت نشاءکاری است، در صورت آلودگی به شبه‌قارچ *P. ultimum* در مرحله نشاءکاری و بروز مرگ گیاهچه (بوتهمیری) خسارت بالاتری به کاهو وارد می‌شود. این تحقیق کارایی دو سویه باکتری *A. brasilense* و *A. lipoferum* (که به عنوان محرک رشد شناخته می‌شوند) و دو موتانت باکتری *B. subtilis* (سویه‌های شماره های چهارصد و نوزده و شصت حاصل از القای جهش با پرتوتابی در ژنوم سویه والد که دارای توانایی آنتاگونیستی هستند) را با دو هدف مورد مطالعه قرار داده است: الف) بررسی کارایی این سویه‌های باکتریایی در کاهش بروز آلودگی گیاهچه کاهو به شبه‌قارچ *P. ultimum*؛ ب) بررسی امکان استفاده از روش القاء جهش در ژنوم باکتری *Bacillus* با پرتو گاما به منظور افزایش قدرت آنتاگونیستی آن علیه *P. ultimum* و بررسی اثرات جانبی تیمار با باکتری موتانت بر برخی شاخص‌های رشد و فیزیولوژی کاهو.

## پیشینه پژوهش

شبه‌قارچ *P. ultimum* از مخرب‌ترین بیمارگرهای خاکزاد گیاهی و محدودکننده تولید کاهو در سراسر دنیا است که به میکروارگانیسم‌های شبه‌قارچی (اوومیسیت) تعلق دارد. این شبه‌قارچ به صورت پوده‌زی در خاک فعال می‌ماند و قادر است از راه خاک، نشاء آلوده، بقایای گیاهی و آب آبیاری انتقال یابد. این بیمارگر شبه‌قارچی، با تولید کیسه اسپوری (اسپورانژیوم) که هر یک حاوی صدها زئوسپور است، منتشر می‌شود. زئوسپورها پس از رسیدن به سطح ریشه و سیستی‌شدن، جوانه زده و به بافت ریشه با تولید میسلیوم‌های آلوده‌گر، رخنه می‌کنند. نشانه‌های بروز آلودگی با این بیمارگر در کاهو براساس زمان بروز آلودگی ممکن است به صورت مرگ گیاهچه (آلوده‌شدن در مرحله نشاء) یا بروز پوسیدگی طوقه و ریشه (آلوده‌شدن در مراحل استقرار گیاه در گلخانه و مزرعه) بروز نماید (Amaradasa et al., 2024). مرگ گیاهچه می‌تواند پیش از خروج گیاهچه از خاک یا پس از

آن ظاهر شود و خسارت شدیدی وارد آورد. مؤثرترین راهکار برای مدیریت آلودگی با شبه‌قارچ، کنترل اینوکولوم بیمارگر در خاک است. این نوع کنترل را می‌توان با استفاده ضد عفونی خاک با سموم شیمیایی یا آفتاب‌دهی (به شرط غنی کردن بستر کاشت یا خاک گلخانه به‌ویژه پس از ضد عفونی) یا با استفاده از عوامل کنترل زیستی انجام داد. *B. subtilis* به دلیل داشتن ویژگی‌های خاص، از قبیل تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی ضد قارچی به‌ویژه ایتورین و آنزیم‌های هیدرولیتیک و توانایی تولید اسپور پایدار، عامل کنترل زیستی موفق علیه بیماری‌های گیاهی است (Constantinescu et al., 2010). مطالعات نشان داده است باکتری‌های محرک رشد مانند *Azospirillum*، اگرچه فعالیت آنتاگونیستی بالایی ندارند، با افزایش حلالیت و قابلیت جذب عناصر ماکرو و میکروالمنت توسط گیاه، می‌توانند موجب بهبود بنیه و رشد گیاه و سیستم ریشه‌ای شده و گیاه را در برابر عوامل بیماری‌زا مقاوم کنند (Yasari and Patwardhan, 2007).

باتوجه به اهمیت شناسایی عوامل زیستی مؤثر در تدوین برنامه‌های کنترل زیستی بیماری‌ها و کاهش مصرف سموم شیمیایی در محصولات تازه‌خوری مانند کاهو، مطالعه حاضر با هدف مقایسه کارایی سویه‌های محرک رشد *Azospirillum* و سویه آنتاگونیست *B. subtilis* بر میزان کاهش بروز علائم ناشی از بیمارگر *P. ultimum* انجام شد. همچنین تأثیر تیمار با این باکتری‌ها بر گیاهچه‌های کاهو از طریق اندازه‌گیری مؤلفه‌های رویشی و فیزیولوژیکی، تحت تنش زیستی با بیمارگر *P. ultimum* و شرایط عادی (بدون بیمارگر) مقایسه شد. با توجه به مشاهده کارایی بهتر سویه *B. subtilis* در مهار زیستی *P. ultimum* تأثیر القاء جهش با پرتو گاما در اصلاح ژنتیکی و بهبود کارایی گونه‌های *B. subtilis* از طریق مقایسه تیمار با سویه والد و موتانت *B. subtilis* علیه *P. ultimum* در کاهو در شرایط گلخانه بررسی شد و مؤلفه‌های رویشی و فیزیولوژیکی گیاهچه‌های کاهو، تحت تنش زیستی با *P. ultimum* و

بدون بیمارگر در تیمار با سویه‌های موتانت و والد *B. subtilis* مقایسه گردید.

### روش‌شناسی پژوهش

سویه‌های باکتری *Bacillus subtilis* و موتانت‌های شماره چهارصد و نوزده و شش صد حاصل از آن که با استفاده از تکنیک القاء جهش تصادفی حاصل از پرتوی گاما تولید شده‌اند (Afsharmanesh et al., 2014) از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی (گروه گیاه‌پزشکی - پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای - پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای) دریافت شدند. جدایه پرازار شبه‌قارچ *P. ultimum* نیز از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی (گروه بیماری‌شناسی - دانشکده کشاورزی - دانشگاه تربیت مدرس) دریافت شد. بررسی توانایی ممانعت از رشد سویه والد (پرتوندیده) باکتری *B. subtilis* و موتانت‌های آن با استفاده از روش محمدی و همکاران انجام شد و توانایی بیوکنترل هر دو موتانت و سویه والد باکتری به اثبات رسید (Mohamady et al., 2017). نشاءهای سالم واریته پرمصرف کاهوی پیچ بلند آمریکایی از شرکت بهاران (شهرستان قزوین) تهیه و در شرایط گلخانه ای (دمای ۲۰ تا ۲۲ درجه سلسیوس و نسبت نور به تاریکی ۱۶:۸ و رطوبت ۸۵٪) کشت شد. خاک گلدان‌های ۴ کیلویی با ترکیب ۵۰٪ خاک مزرعه (شنی - لومی) و ۵۰٪ پیت‌ماس پر شد. pH خاک گلدان حدود ۶/۶ تنظیم و خاک همه گلدان‌ها به‌منظور حذف فاکتورهای ارگانیک در ارزیابی‌ها، نخست با اتوکلاو استریل شده؛ سپس با عوامل باکتریایی و قارچی تلقیح شد.

تیمار با سویه‌های محرک رشد: دو کودزیستی با فرمولاسیون مایع، هر کدام حاوی گونه‌های *Azospirillum* *A. brasilense* *lipoferum* از مؤسسه تحقیقات آب و خاک کشور تهیه و برای ارزیابی گلخانه‌ای استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتر از کودزیستی مایع برای هر یک از باکتری‌ها، در هر گلدان (سه بار طی رشد از مرحله سه برگه نشاءها با فواصل سه هفته‌ای تا قبل از تشکیل ساقه گل بر روی بوته) طبق توصیه درج‌شده بر روی بسته‌بندی استفاده شد.

اسپکتروفتومتر قرائت شد. همچنین برای محاسبه میزان پروتئین با استفاده از نمودار استاندارد به دست آمده از پروتئین خالص سرم آلبومین گاوی، در محدوده غلظت ۰-۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه گردید ( Rezalouet *al.*, 2024). اندازه گیری میزان فعالیت آنزیم گایاکول پراکسیداز (POD) براساس میزان اکسیدشدن گایاکول توسط این آنزیم و در طول موج ۴۷۰ نانومتر محاسبه شد ( Altunkaya *et al.*, 2011). فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با استفاده از بافر فسفات و سوبسترای پیرو گالول انجام شد ( Altunkaya *et al.*, 2011). برای اندازه گیری کلروفیل، یک گرم برگ داخل فویل را در نیتروژن مایع انداخته با استون ۸۰٪ عصاره گیری شد. عصاره حاصله مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی در بالن های حجمی ۲۵ میلی لیتری با استون ۸۰٪ به حجم رسانده شد. محلول حاصل با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۴۶، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر قرائت و میزان کلروفیل *a* (رابطه ۱) و کلروفیل *b* (رابطه ۲) و کارتنوئید (رابطه ۳) با روابط زیر محاسبه شد:

$$\text{Chlorophyll a (U/g FW)} = \frac{12.25 \text{ Abs } 663\text{nm} - 2.79 \text{ Abs } 646\text{nm}}{\text{رابطه ۱}}$$

$$\text{Chlorophyll b (U/g FW)} = \frac{21.21 \text{ Abs } 646\text{nm} - 5.1 \text{ Abs } 663\text{nm}}{\text{رابطه ۲}}$$

$$\text{Carotenoid} = \frac{1000 \text{ Abs } 470\text{nm} - 1.8 \text{ Chl a} - 85.02 \text{ Chl b}}{198} \quad \text{رابطه ۳}$$

از برگ های تازه برداشت شده هر گلدان برای اندازه گیری پرولین (۰/۵ گرم نمونه برگ) به طور تصادفی نمونه برداری شد و با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۳٪ هموژن کرده و مدت ۱۵ دقیقه با ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد؛ سپس محلول صاف شده با دو میلی لیتر محلول نین هیدرین و دو میلی لیتر اسید استیک مخلوط و یک ساعت در بن ماری قرارداده تا کاملاً خنک شود. به هر لوله آزمایش چهار میلی لیتر تولوئن اضافه و ۲۰ دقیقه با همزن مغناطیسی مخلوط شد. مایع موجود در لوله آزمایش به دو بخش مجزا تقسیم و میزان جذب بخش رنگی حاوی تولوئن در طول موج ۵۲۰ نانومتر قرائت شد. مقدار پرولین با استفاده از منحنی استاندارد به دست آمد<sup>[۴]</sup>. اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی به وسیله تست تیوباربیتوریک اسید (TBA) با

تیمار با سویه های آنتاگونیست: تیمار هر گلدان (یک بار طی رشد در مرحله سه برگی نشاها) با سویه های باکتری *B. subtilis* و موتانت های آن به میزان ۱۰ میلی لیتر با غلظت ۱۰<sup>۴</sup> (سلول باکتری در هر میلی لیتر) انجام شد. شاخص های رویشی (ارتفاع ریشه و ساقه، حجم ریشه، وزن تر ریشه و ساقه) پیش از تشکیل ساقه گل بر روی بوته اندازه گیری شد. وزن تر به کمک ترازو با دقت ۰/۰۰۱ و ارتفاع توسط خط کش مدرج و برای تعیین حجم ریشه از روش تغییر حجم آب در استوانه مدرج استفاده شد. نمونه ها برای تعیین وزن خشک اندام هوایی و ریشه، مدت ۴۸ ساعت در آون در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد قرار داده شد. قبل از کشت محصول هر گلدان برای ارزیابی میزان کنترل بروز بیماری، با چهار تکرار در هر تیمار به جز شاهد، میزان ۵ گرم اینوکولوم قارچ بیمارگر (کشت ۱۰ روزه میسلیم بر روی بذر شاهدانه دوبار اتو کلاو شده) اضافه شد. درصد بروز مرگ گیاهچه با محاسبه درصد گیاهچه های زنده به صورت درصد محاسبه شد. شاخص شدت بیماری بر حسب درصد از رابطه (۱)، ۳۰ روز پس از کشت نشا، براساس مقیاس ۱ تا ۵ از روش اصلاح شده فاتوروس و همکاران محاسبه شده است ( Fatouroset *al.*, 2019).

- ۰- گیاهان سالم و بدون هیچ گونه علائم آلودگی.
- ۱- کمتر از ۲۰٪ گیاه آلوده شده و حداقل یک شانکر با ابعاد ۲ میلی متر و نکروز داشته باشد.
- ۲- حدود ۵۰٪ گیاه دارای شانکر تیپیک با ابعاد ۲ میلی متر باشد.
- ۳- بیش از ۶۰-۷۵٪ گیاه دارای شانکر تیپیک با ابعاد ۲ میلی متر باشد.
- ۴- مرگ گیاهچه پس از سبز شدن از خاک، طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی متر باشد.
- ۵- مرگ گیاهچه قبل از سبز شدن از خاک یا پوسیدگی بذر.

پروتئین محلول به منظور سنجش شاخص های فیزیولوژیکی، از بافت برگ (هر تیمار ۰/۵ گرم نمونه برگ) استخراج گردید. از روش برادفورد برای تعیین غلظت پروتئین استفاده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر با

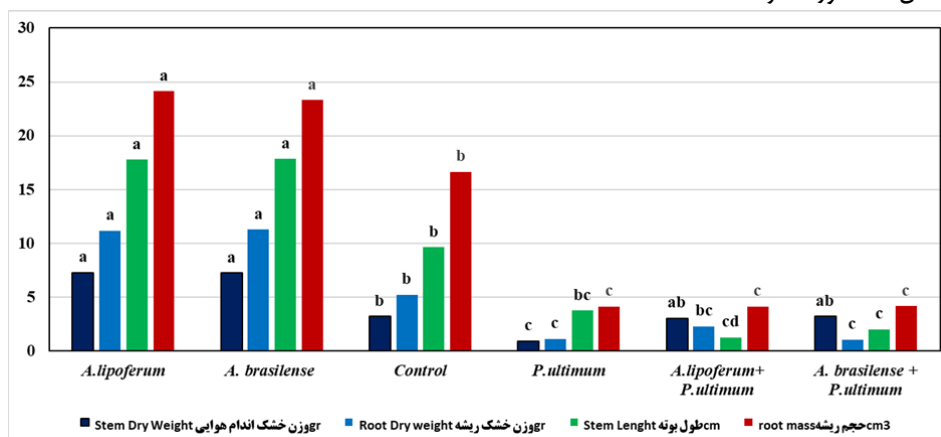
## یافته‌های پژوهش

### تأثیر تیمارها بر شاخص‌های رویشی

آنالیز واریانس شاخص‌های رویشی اندازه‌گیری شده در گیاه کاهوی تحت تیمار با کود زیستی با فرمولاسیون مایع حاوی گونه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* اثر تیمار را در سطح ۵٪ معنی‌دار نشان داد. مقایسه میانگین در تمامی شاخص‌ها نیز نشان داد تیمار با دو گونه مذکور در مقایسه با شاهد به‌صورت معنی‌داری بالاتر بوده است. شکل زیر شاهد این مدعا است.

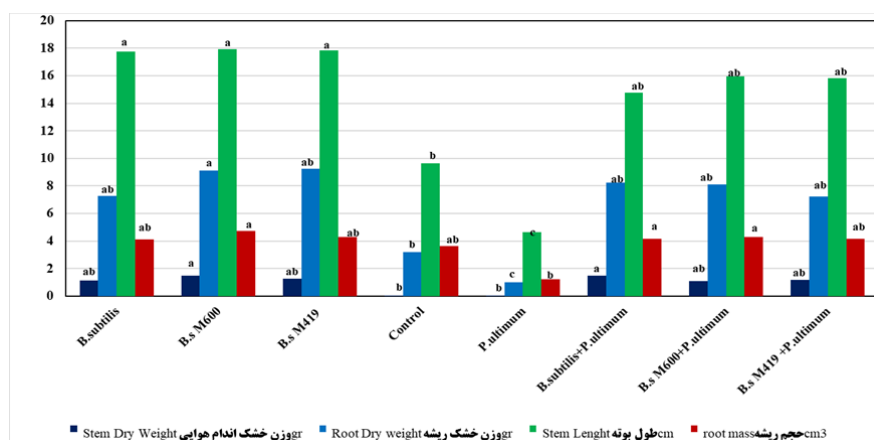
همان‌طور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود شاخص‌های رویشی (طول بوته، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و حجم ریشه) بین دو نوع باکتری تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما در تمام شاخص‌ها تیمار با *A. lipoferum* تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت و می‌توان به این نتیجه رسید که این سویه باکتری همزیست *A. lipoferum*، کارایی بهتری در افزایش رشد بوته در مقایسه با *A. brasilense* از خود نشان داده است.

سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید انجام شد. مقدار ۰/۵ گرم بافت تر برگ و ریشه در ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۰/۱٪ همگن شده؛ آنگاه عصاره حاصل به فالكون انتقال یافته و مدت ۵ دقیقه در ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گشت. مقدار چهار میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰٪ حاوی ۰/۵٪ تیوباربتوریک اسید به یک میلی‌لیتر از محلول رویی اضافه شد. مخلوط فوق مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم (۹۵ درجه سانتیگراد) انکوبه و بلافاصله در حمام یخ، سرد و با سرعت ۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گشت. میزان جذب مایع رویی در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت و جذب ناویژه در ۶۰۰ نانومتر از آن کسر شد. غلظت مالون‌دی‌آلدئید با استفاده از ضریب تصحیح ۰/۱۵۵ محاسبه و طبق واحد میکرومول بر گرم، وزن تر برگ ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{FW}$ ) محاسبه و ارائه گردید. خوانش‌ها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مدل GENWAY ۶۳۱۵ انجام شد. آزمایشات با چهار تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام و داده‌های آن با نرم‌افزار SPSS Var. 13 تجزیه شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن با سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.



**شکل ۱.** مقایسه ویژگی‌های رویشی گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* با شاهد. *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*؛ *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense*؛ Control: گیاه شاهد (بدون تیمار)، *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر پی‌تی‌اوم، *A. lipoferum* + *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 3.** Comparison of vegetative characteristics of lettuce plants treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains with the control; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense*; Control: control plant without pathogen treatment; and *P. ultimum*: plants treated with pathogen; *A. lipoferum* + *P. ultimum*: plants treated with *A. lipoferum* and *P. ultimum*; *A. brasilense* + *P. ultimum*: plants treated with *A. brasilense* and *P. ultimum*. (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).



**شکل ۲.** مقایسه ویژگی‌های رویشی گیاه کاهوی تلقیح‌شده با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد، *B.sM600* گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت 600، *B.sM419* گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصد و نوزده، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار) و *P.ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر، *B. subtilis*+*P.ultimum*: گیاهان تیمار شده با باکتری باسیلوس والد و بیمارگر، *B.sM600*+*P.ultimum* گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، *B.sM419*+*P.ultimum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصد و نوزده و بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 2.** Comparison of vegetative characteristics of lettuce plants treated with *P. ultimum*, wild type and mutants of *B. subtilis* with the control; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; B. sM419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; Control: control plant without treatment; *P. ultimum*: plants treated with pathogen; *B. subtilis*+*P.ultimum*: plants treated with wild type *B. subtilis* and *P.ultimum*; B. sM600+: *P.ultimum* plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and *P. ultimum*; B.sM419+*P.ultimum*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and *P. ultimum*. (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

خشک ریشه نیز همانند حجم ریشه بود. تیمار با سویه والد و موتانت شماره چهارصد و نوزده با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نداشت؛ اما تیمار با سویه *B. subtilis* موتانت شماره شش صد به طور معنی‌داری در سطح ۵٪ به طور معنی‌داری بالاتر از کنترل بود. میانگین داده‌های وزن خشک اندام هوایی مشابه با شاخص وزن خشک ریشه بودند. در شاخص ارتفاع اندام هوایی بین تیمارها و شاهد سالم تفاوت معنی‌دار نبود و فقط گیاهان بیمار به طور معنی‌داری ارتفاع کمتری داشتند. بین تیمار با سویه باکتری والد و موتانت‌های آن در شرایط آلودگی با بیمارگر و بدون بیمارگر، از نظر شاخص‌های رشد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما بالاتر بودن میانگین شاخص‌های رشد در تیمار با انواع *B. subtilis* در مقایسه با شاهد، توانایی کنترل زیستی *B. subtilis* والد و موتانت‌های آن را

در شکل بالا، آنالیز واریانس ویژگی‌های رویشی اندازه‌گیری شده در گیاه کاهوی تلقیح‌شده با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* در سطح ۵٪ اثر متقابل تیمار با شبه‌قارچ بیمارگر و باکتری‌های آنتاگونیست معنی‌دار را نشان داد. مقایسه میانگین در شاخص حجم ریشه نیز نشان داد تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* در سطح ۵٪ به طور معنی‌داری باعث توسعه و رشد ریشه شده و از بروز علائم توقف رشد ناشی از آلودگی به شبه‌قارچ پی‌تی‌اوم در ریشه ممانعت نموده است؛ تاجایی که با حجم ریشه گیاه شاهد سالم، تفاوت معنی‌داری نداشته است. این مسئله درحالی است که در گیاهان تلقیح‌شده با بیمارگر حجم ریشه به طور معنی‌داری پایین‌ترین میزان در تمامی تیمارها بوده است (شکل ۲). روند داده‌ها در شاخص وزن

تیمار با باکتری نیز باعث تولید کمترین میزان وزن خشک کاهو شد.

#### تأثیر تیمارها بر شاخص‌های کنترل بیولوژیکی

مقایسه درصد مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با *P. ultimum* در شرایط گلخانه‌ای نشان داد اینوکولوم استفاده شده و جدایه بیمارگر کاملاً فعال و پرآزار بوده و بیش از ۸۰٪ مرگ گیاهچه در گیاهان آلوده به بیمارگر و بدون تیمار با باکتری آنتاگونیست بوده است. این نتایج از شدت بالای بروز این علامت در کاهو و حساسیت رقم انتخاب شده به بیمارگر حکایت داشت. درصد بروز مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با سویه *B. subtilis* موتانت شماره به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از تیمار با سویه والد و موتانت شماره چهارصدونوزده بود و میزان بروز بوته‌میری در شاهد سالم با این دو تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت. داده‌های مذکور، موفقیت این عامل آنتاگونیست در بیوکنترل *P. ultimum* را در شرایط گلخانه‌ای نشان می‌دهد (شکل ۳). اما تیمار با سویه‌های *Azospirillum* نتوانست از بروز بوته‌میری به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد ممانعت کند. به عبارت دیگر، استفاده از کودهای زیستی، علی‌رغم تأثیر مثبتی که در افزایش شاخص‌های رشد از خود نشان دادند، کارایی مناسبی در کنترل بیماری در صورت بروز آلودگی در مراحل اولیه رشد گیاهچه ندارند.

شدت بروز بیماری در ارزیابی گلخانه‌ای، آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل باکتری‌های آنتاگونیست و عامل بیماری در سطح ۵٪ در مقایسه با شاهد سالم معنی‌دار بوده و تیمار با آنها بر شدت بروز بیماری تأثیر معنی‌داری داشته است. در گیاهان تلقیح‌شده با شبه‌قارچ *P. ultimum* در شرایط ارزیابی گلخانه‌ای، بالاترین شدت بروز علائم به ثبت رسید که پرآزار بودن جدایه شبه‌قارچ استفاده‌شده و حساسیت واریته میزبان را تأیید نمود. میزان شدت علائم در گیاهان تحت تیمار در سطح ۵٪ با سویه موتانت‌های *B. subtilis* موتانت شش‌صد تفاوت معنی‌داری با سویه والد و موتانت چهارصدونوزده نداشت؛ اما کلیه تیمارها با باکتری‌های آنتاگونیست به‌طور معنی‌داری با شاهد سالم تفاوت داشتند.

به‌منظور جلوگیری از بروز علائم نشان داد. تلقیح گیاه با بیمارگر، پایین‌ترین عملکرد را در گیاهان بیمار نشان داد، در تیمار با *B. subtilis* موتانت شش‌صد نیز تفاوت معنی‌داری با شاهد یا باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده و والد آن دیده شد. این مسئله نشان می‌دهد تأثیر این موتانت در بهبود عملکرد گیاه در شرایط بروز بیماری نیز بهتر از سویه والد یا موتانت شماره چهارصدونوزده بوده است.

عملکرد گیاهان تحت تیمار با *A. lipoferum* در شرایط تلقیح با بیمارگر به‌طور معنی‌داری بهتر از گیاهان تحت تیمار با *A. brasilense* بود. به‌طور کلی در تمامی تیمارها، بهبود شاخص عملکرد بوته در مقایسه با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری نشان داد که از تأثیر مثبت همه سویه‌های باکتری استفاده‌شده در تیمارها حکایت داشت. اثر تیمارهای آزمایش دو باکتری *B. subtilis* و *Azospirillum* با احتمال ۵٪ بر ارتفاع گیاه کاهو معنی‌دار بود. شکل ۲ و ۱ شاهد این مدعا هستند. بیشترین ارتفاع گیاه در شرایط عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در تیمار *B. subtilis* موتانت شماره شش‌صد با گیاهان تحت تیمار با *A. brasilense* و *A. lipoferum* بود؛ اما تیمار با دو باکتری *B. subtilis* والد و *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند. این مسئله، کارایی بهتر *Azospirillum* در القاء رشد در کاهو در مقایسه با *B. subtilis* نشان می‌دهد.

تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم و تیمار با باکتری *B. subtilis* والد نیز به‌طور معنی‌داری کارایی بهتری از تیمار با سایر باکتری‌ها داشت. بوته در گیاهان تلقیح‌شده با قارچ پی‌تی‌اوم و در شرایط بدون بیمارگر، در تیمار شاهد و *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده، کمترین ارتفاع را داشت. مقایسه میانگین اثر تیمارهای مختلف بر وزن خشک کاهو نشان داد وزن خشک در شرایط تلقیح/عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در *A. lipoferum* بیشترین میزان را داشت. کمترین میزان وزن خشک در شرایط عدم تلقیح با قارچ پی‌تی‌اوم در تیمار شاهد به‌دست آمد که تأثیر مثبت کلیه باکتری‌ها در افزایش رشد را نشان می‌دهد. تلقیح با بیمارگر در تیمار با *B. subtilis* والد و هر دو موتانت، کمترین میزان وزن خشک، حاصل آن بود. تلقیح بیمارگر در شرایط عدم

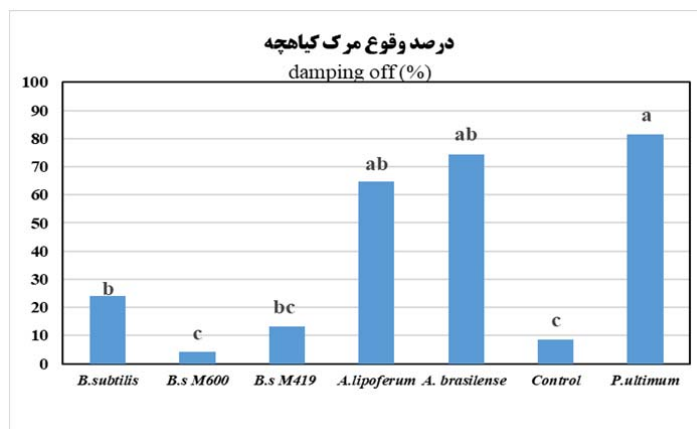


در برگ کاهو بین تیمارها و شاهد وجود دارد؛ و تیمارهای *B. subtilis* والد پرتوندیده و دو موتانت منتخب، باعث افزایش معنی دار تجمع پروتئین محلول در برگ کاهو نسبت به شاهد شده است. از این رو، بالاترین میزان تجمع پروتئین در گیاهان کاهوی تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده اندازه گیری شد. در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده نشد؛ اما در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر با استفاده از باکتری *B. subtilis* والد و آروسپرلیوم، توانست به افزایش بیان و تجمع پروتئین در بافت کمک کند. بیشترین میزان پروتئین برگ در گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و کمترین میزان در گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد مشاهده شد. بین تیمار با باکتری باسیلوس موتانت در شرایط بیماری و بدون بیماری اختلاف معنی داری وجود نداشت. این موضوع را می توان در شکل ۵ به وضوح دریافت.

باتوجه به شکل ۴ دوسویه باکتری های همزیست *A. brasilense* و *A. lipoferum* از نظر شدت بروز بیماری تفاوت معنی داری با شاهد آلوده به *P. ultimum* نداشتند؛ از سوی دیگر با میزان شدت بیماری ظهور یافته در گیاهان تحت تیمار با بیمارگر و *B. subtilis* والد نیز تفاوت نداشتند. این نتایج نشان داد کارایی دوسویه باکتری همزیست *A. brasilense* و *A. lipoferum* به طور معنی داری در شاخص میزان شدت بروز بیماری، پایین تر از موتانت های *B. subtilis* است. این مسئله ممکن است به دلیل عدم فعالیت آنتاگونیستی مؤثر این سویه ها علیه بیمارگر و نیز پرآزار بودن سویه بیمارگر مورد استفاده در این ارزیابی گلخانه ای باشد.

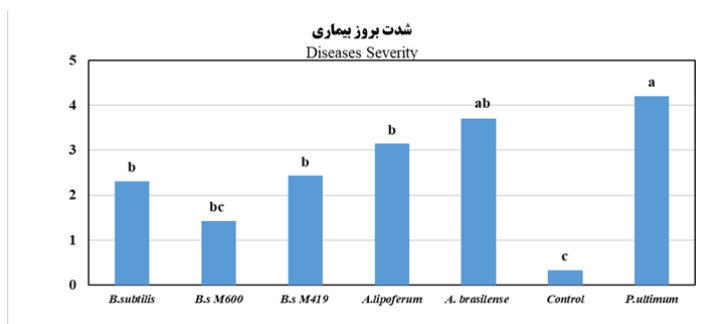
### تأثیر تیمارها بر شاخص های فیزیولوژیکی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد در سطح احتمال، ۵٪ تفاوت معنی داری در میزان تولید پروتئین محلول



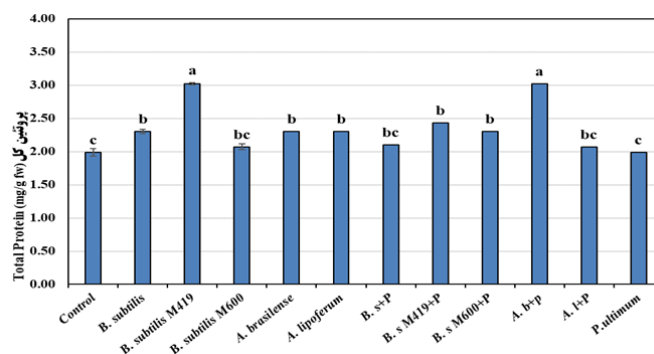
**شکل ۳.** مقایسه درصد وقوع مرگ گیاهچه ناشی از *P. ultimum* در گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه والد و موتانت های *B. subtilis* و سویه های *A. lipoferum* و *A. brasilense* با شاهد. *B. subtilis* گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM600* گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، *B.sM419*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده و بیمارگر، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر، *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار با بیمارگر) و *P. ultimum* گیاهان تیمار شده با بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستونها، اختلاف معنی دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می دهد).

**Figure 3.** Comparison of the of seedling damping off percentage caused by *P. ultimum* in lettuce plants treated with *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* with the control. *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *BsM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; Control: control plant without pathogen treatment and *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).



**شکل ۴.** مقایسه شدت بروز بیماری ناشی از *P. ultimum* در گیاه کاهوی تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. brasilense* و *A. lipoferum* با شاهد. *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، B.sM600: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، B.sM419: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده و بیمارگر، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر، *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، Control: گیاه شاهد (بدون تیمار با بیمارگر) و *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر. (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 4.** Comparison of the diseases severity caused by *P. ultimum* in lettuce plants treated with *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* with the control. *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; B.sM419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; Control: control plant without pathogen treatment and *P. ultimum*: plants treated with pathogen. (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).



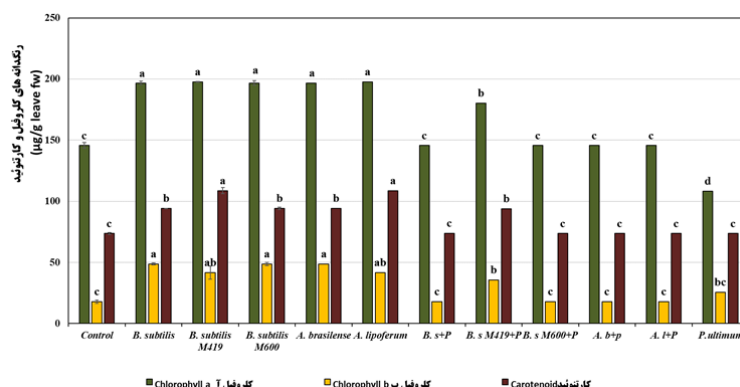
**شکل ۵.** مقایسه پروتئین کل (میلی‌گرم پروتئین به ازای هر گرم وزن تر گیاه) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. brasilense* و *A. lipoferum* با شاهد. Control: گیاه شاهد (بدون تیمار)، *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد، B.sM419: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، B.sM600: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، B.s+P: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، B.sM419+P: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، B.sM600+P: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر، A.l+P: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر، A.b+P: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 5.** Comparison of Total protein (mg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; B. sM419: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; B. sM600: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; B.s+P: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; B.sM419+P: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; B. sM600+P: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; A. l+P: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; A. b+P: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

نشان داد. میزان کلروفیل *b* نیز فقط در همان تیمار افزایش یافت و در سایر موارد تغییری نداشت. میزان کارتنوئید نیز در تیمار با موتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* و پی‌تی‌اوم افزایش یافت و تفاوت معنی‌داری با شاهد داشت.

میزان کارتنوئید بین گیاه شاهد و گیاهان بیمار تحت تیمار با باکتری *Azospirillum* تفاوت معنی‌داری نداشت و تنها *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده به‌طور معنی‌داری میزان کارتنوئید بالاتر از شاهد را نشان داد. در شرایط عدم آلودگی با بیمارگر، رنگدانه در کلیه تیمار گیاه با باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری بالاتر از شاهد بود (شکل ۶).

اندازه‌گیری میزان محتوای رنگدانه‌ها (کلروفیل و کارتنوئید) در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum*، میزان کلروفیل *a* در گیاه تیمارشده با *B. subtilis* والد و هر دو موتانت آن و دو سویه باکتری *A. brasilense* و *A. lipoferum* نشان می‌دهد افزایش معنی‌داری در مقایسه با شاهد یافته است. کلروفیل *b* و کارتنوئید هم در همین شرایط نسبت به شاهد، افزایش نشان می‌دهد. میزان کلروفیل *a* در تیمار گیاه با *B. subtilis* والد و موتانت شش‌صد و دو سویه *A. brasilense* و *A. lipoferum* در شرایط تلقیح با *P. ultimum* تغییری نشان نداد و درواقع، تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت؛ فقط در تیمار باموتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* و پی‌تی‌اوم، افزایش



**شکل ۶.** مقایسه کلروفیل *a* کلروفیل *b* و کارتنوئید (میکروگرم رنگدانه به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد. Control: گیاه شاهد (بدون تیمار); *B. subtilis*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* والد، *B. sM419*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B. sM600*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش‌صد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense*، *B. s+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B. sM419+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر، *B. sM600+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، *Ab+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *Al+P*: گیاهان تیمارشده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P. ultimum*: گیاهان تیمارشده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 6.** Comparison of Chlorophyll a and b and carotenoids (µg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B. s+P*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *B. sM419+P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600+P*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

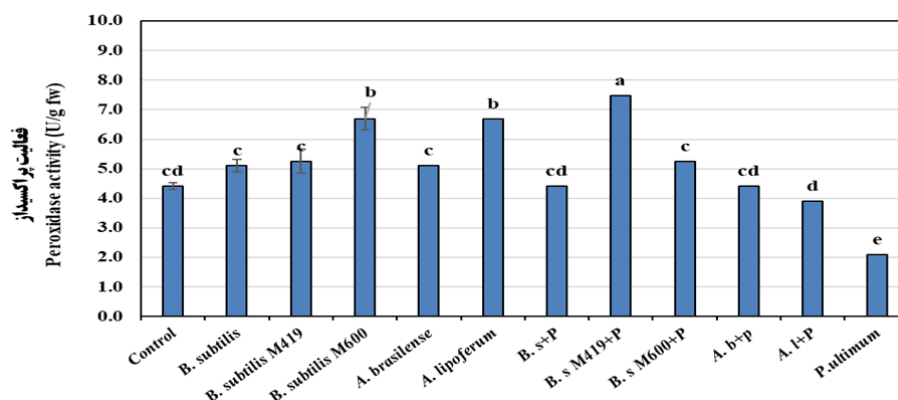
شرایط تلقیح پی‌تی‌اوم و تیمار با *A. lipoferum* مشاهده شد (شکل ۷).

نتایج سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شکل ۸، نشان داد در شرایط عدم تلقیح با بیمارگر، تیمار کاهو با *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین مقدار افزایش این آنزیم را در برگ گیاه داشته است. کمترین مقدار فعالیت در شاهد و گیاهان تیمار شده با *A. lipoferum* و *A. brasilense* بوده است.

بیشترین میزان فعالیت آنزیم پلی‌فنل اکسیداز در شرایط تلقیح بیمارگر در گیاهان تحت تیمار با *B. subtilis* موتانت شش‌صد و کمترین فعالیت این آنزیم در گیاهان تحت تیمار با *B. subtilis* والد مشاهده شد.

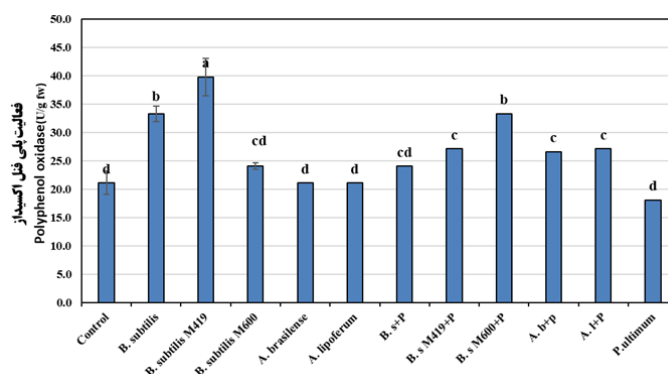
نتایج سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز نشان داد در اثر تیمار کاهو با باکتری‌ها در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum* و *B. subtilis* موتانت شش‌صد و *A. lipoferum* آنزیم پراکسیداز افزایش بیشتری داشته است و تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند.

در تیمار با *B. subtilis* والد و موتانت چهارصدونوزده و *A. brasilense* میزان فعالیت پراکسیداز نسبت به شاهد کمتر بود؛ اما در شرایط تلقیح با *P. ultimum*، تیمار با موتانت چهارصدونوزده *B. subtilis* آنزیم پراکسیداز بیشترین افزایش فعالیت را داشت که تفاوت معنی‌داری را با شاهد نشان داد. کمترین مقدار آنزیم پراکسیداز در



**شکل ۷.** مقایسه فعالیت پراکسیداز (Unit فعالیت آنزیم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد. Control: گیاه شاهد (بدون تیمار); *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد، *B.sM419*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش‌صد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense* گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و *B.s+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر، *B.sM600+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش‌صد و بیمارگر، *Ab+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *Al+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 7.** Comparison of Peroxidase activity (U/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *B.sM419+P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600+P*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

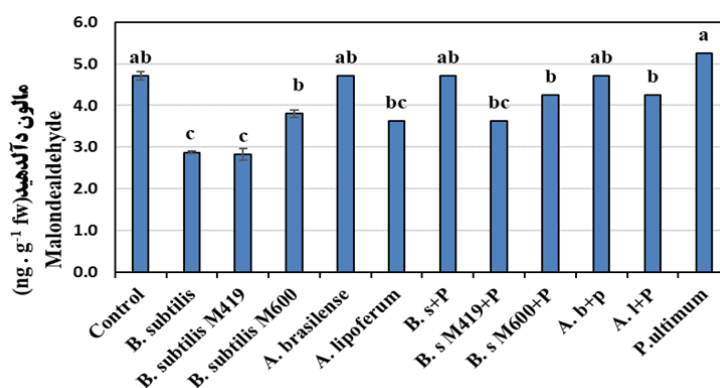


**شکل ۸.** مقایسه فعالیت پلی فنل اکسیداز (*Unit* فعالیت آنزیم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense* و شاهد. Control: گیاه شاهد (بدون تیمار); *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد، *B.sM419*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B.sM600*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense* گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* *B.s+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B.sM419+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر، *B.sM600+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، *Ab+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *Al+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 8.** Comparison of Polyphenol oxidase activity (U/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B.s+P*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *BsM419+P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600+P*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

باکتری *B. subtilis* به تجمع کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت انجامید و با توانایی آنتاگونیستی این سویه موتانت منطبق بود (شکل ۹).  
سنجش پرولین در بافت برگ‌ها در شکل ۱۰ نشان داد تیمار کاهو در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum* با موتانت شش صد *B. subtilis* بیشترین مقدار پرولین را داشته و کمترین مقدار در شرایط عدم تلقیح بیمارگر، مربوط به *Bacillus subtilis* بوده است. نتایج سنجش پرولین در شرایط تلقیح *Pythium ultimum* و تیمار با *A. lipoferum* و *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده بیشترین مقدار پرولین را نشان داد؛ اما تیمار با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد به جز گیاه آلوده به *P. ultimum* کمترین میزان پرولین مشاهده شد.

میزان مالون‌دی‌آلدئید با میزان بروز آسیب به غشای سیتوپلاسمی سلول‌ها مرتبط است. بیشترین مقدار آن در گیاهان تلقیح شده با *P. ultimum* مشاهده شد؛ که احتمالاً به دلیل تأثیر نامطلوب بیمارگر و ایجاد تنش فیزیولوژیک در سلول بوده است و با داده‌های درصد بروز بیماری (شکل ۳) و شدت بیماری (شکل ۴) در گیاهان تحت تیمار با این شبه‌قارچ تطابق داشت. گیاهان تحت تیمار در شرایط عدم تلقیح با *P. ultimum* نتایج سنجش میزان مالون‌دی‌آلدئید با *A. brasilense* تفاوت معنی‌داری با گیاهان بیمار نداشتند؛ اما گیاهان تحت تیمار با *A. lipoferum* تفاوت معنی‌داری داشتند؛ اگرچه این دو سویه باکتری همزیست در گیاهان سالم، تفاوت معنی‌داری نشان نداده بودند. این درحالی‌است که در گیاهان سالم، تیمار با موتانت چهارصدونوزده



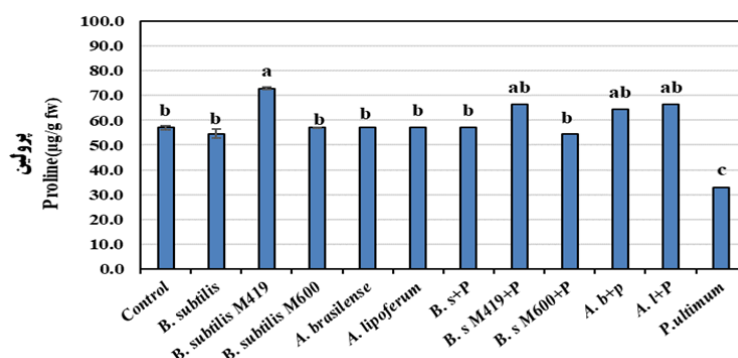
**شکل ۹.** مقایسه مالون دی‌آلدهید (نانوگرم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. brasilense* و *A. lipoferum* و شاهد. Control: گیاه شاهد (بدون تیمار); *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد، *B. sM419*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصد و نوزده، *B. sM600*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت ششصد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *B. s+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B. sM419+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصد و نوزده و بیمارگر، *B. sM600+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت ششصد و بیمارگر، *Ab+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *Al+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 9.** Comparison of Malondialdehyde (ng/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B. s+P*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *B. sM419+P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600+P*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *A. l+p*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

2007). تلقیح بذره‌های سیاهدانه نیز با آزوسپریلیوم، ازتوباکتر و سودوموناس فاکتورهای رشد نظیر ارتفاع گیاه را افزایش داده است (Liet al., 2007). فهرست طولانی کاربرد *A. lipoferum* و *A. brasilense* به عنوان تحریک‌کننده رشد در گیاهان مختلف نشان می‌دهد تیمار با این باکتری‌ها می‌تواند برای بهبود رشد و عملکرد گیاهان اثربخش باشد؛ به همین دلیل گزینه مناسبی برای جایگزینی ترکیبات شیمیایی محرک رشد در تولید محصولاتی مانند کاهو است (Utkhedeet al., 2000). نتایج این بررسی، نشان‌دادن کارایی هر دو سویه مذکور به منظور بهبود شاخص‌های رشد کاهوست.

گزارشاتی از تأثیر یک گونه باکتری *Azospirillum* بر افزایش تعداد برگ کاهو منتشر شده که نشان داده تلقیح گیاه ذرت با این نوع باکتری‌های محرک رشد می‌تواند باعث افزایش رشد گیاه شود. نتایج تحقیق یساری و همکارانش نشان داد استفاده از کودهای بیولوژیک حاوی آزوسپریلیوم و ازتوباکتر در کلزا سبب افزایش ارتفاع بوته و وزن خشک و تر اندام هوایی شده است (Yasariet al., 2007). آنها دلیل عمده افزایش وزن خشک برگ ذرت و افزایش وزن تر در تیمار با *A. brasilense* و *P. putida* را قابلیت تولید مواد هورمونی و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن توسط این سویه‌های باکتری همزیست ذکر کرده‌اند (Yasariet





**شکل ۱۰.** مقایسه پرولین (میکروگرم به ازای هر گرم وزن تر برگ) در برگ کاهو با اینوکولوم فعال *P. ultimum* تحت تیمار با سویه والد و موتانت‌های *B. subtilis* و سویه‌های *A. lipoferum* و *A. brasilense*. شاهد: Control: گیاه شاهد (بدون تیمار): *B. subtilis*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده، *B. sM600*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد، *A. lipoferum*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum*، *A. brasilense*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و *B. s+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* والد و بیمارگر، *B. sM419+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شماره چهارصدونوزده و بیمارگر، *B. sM600+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *B. subtilis* موتانت شش صد و بیمارگر، *Ab+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. brasilense* و بیمارگر، *Al+P*: گیاهان تیمار شده با باکتری *A. lipoferum* و بیمارگر و *P. ultimum*: گیاهان تیمار شده با بیمارگر (حروف انگلیسی متفاوت درج شده روی ستون‌ها با رنگ یکسان، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۰/۰۵ بین تیمارها را نشان می‌دهد).

**Figure 10.** Comparison of Proline (µg/g fw) of lettuce leaves treated with *P. ultimum*, *A. lipoferum* and *A. brasilense* strains and wild type and mutants of *B. subtilis* and control; Control: control plant without treatment; *B. subtilis*: plants treated with wild type *B. subtilis*; *B. sM419*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis*; *B. sM600*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis*; *A. brasilense*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *A. lipoferum*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *B. s+P*: plants treated with wild type *B. subtilis* and pathogen; *BsM419+P*: plants treated with mutant 419 of *B. subtilis* and pathogen; *B. sM600+P*: plants treated with mutant 600 of *B. subtilis* and pathogen; *A. l+P*: plants treated with *A. lipoferum* and pathogen; *A. b+P*: plants treated with *A. brasilense* and pathogen; *P. ultimum*: plants treated with pathogen (Different letters in each column indicate a statistically significant difference between different isolates  $p < 0.05$ ).

*B. subtilis* موتانت شش صد پایین‌ترین درصد مرگ گیاهچه را داشتند. مهم اینکه کارایی این موتانت در بیوکنترل این علائم بهتر از تیمار با سویه والد و موتانت چهارصدونوزده است؛ درحالی‌که تیمار با سویه‌های *Azospirillum* نتوانست از بروز بوته‌میری به‌طور معنی‌داری ممانعت کند. به‌عبارت‌دیگر، استفاده از سویه‌های *Azospirillum* با وجود بهبود معنی‌دار شاخص‌های رشد گیاهچه، کارایی مناسبی در کنترل بیماری در صورت بروز آلودگی در مراحل نخستین کاشت نشاء را ندارند. از نظر شاخص شدت علائم، سویه موتانت‌های *B. subtilis* تفاوت معنی‌داری با گیاه آلوده داشتند و توانایی بیوکنترل قابل قبولی را ارائه دادند؛ اما دو سویه باکتری همزیست

گونه *P. ultimum* دارای دامنه میزبانی تقریباً بزرگی است. استفاده از عامل کنترل‌زیستی قارچی و باکتریایی برای کنترل این بیمارگرها بسیار مؤثرتر و ایمن‌تر از سموم شیمیایی رایج است (Utkhedeet al., 2000). باتوجه به این مسئله، در هر دو شاخص، درصد کاهش مرگ گیاهچه و میزان کاهش شدت بیماری ناشی از تیمار با *P. ultimum* اندازه‌گیری شد تا میزان کارایی این‌نوع عوامل باکتریایی در بیوکنترل و بهبود شاخص‌های رشد در صورت بروز آلودگی در ابتدای فصل و فواصل رشد با هم مقایسه شود.

مقایسه میانگین درصد مرگ گیاهچه در گیاهان تحت تیمار با *P. ultimum* نشان داد گیاهان تحت تیمار با سویه

آزوسپریلیوم تفاوت معنی‌داری با شاهد بیمار نداشت؛ بنابراین می‌توان نتیجه گرفت کارایی دو سویه باکتری همزیست *Azospirillum* به‌طور معنی‌داری پایین‌تر از *B. subtilis* (والد و موتانت) بوده است؛ اما باتوجه به پرآزار بودن سویه بیمارگر مورد استفاده در این ارزیابی گلخانه‌ای، درصدی از کاهش بروز علائم در تیمار با باکتری‌های همزیست مشاهده شد که می‌تواند به‌دلیل مکانیسم‌های القاء رشد و بهبود جذب مواد مغذی و القاء مقاومت عمومی در گیاه باشد. در سال‌های اخیر مبحث کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست به‌ویژه باکتری‌های *B. subtilis* برای کنترل بیماری‌های قارچی و نیز باکتریایی ریشه گیاهان زراعی توجه فراوان شده است.

سویه‌های *B. subtilis* ازجمله مهم‌ترین انواع باکتری‌های عامل بیوکنترل محسوب می‌شوند؛ زیرا در بهبود رشد گیاه به‌طور غیرمستقیم؛ و ازسویی دیگر به‌طورمستقیم، ازطریق توانایی در حذف عوامل بیماری‌زا از حوزه فعالیت سیستم ریشه‌ای نقش اساسی دارند (Liet *et al.*, 2007). سویه آنتاگونیست *B. subtilis* تولید متابولیت‌های ثانویه ضدقارچی و طیف وسیعی از متابولیت‌های میکروبی شامل 2,4-diacetylphloroglucinol، Phenazines، Pyoluteorin و Pyrrolnitrin هستند (Liet *et al.*, 2007). گونه *B. subtilis* پیش‌تر به‌عنوان عامل بیوکنترل *P. ultimum* و تعدادی دیگر از بیمارگرهای خاک‌زاد قارچی و شبه‌قارچی گزارش شده بوده است (Mangmanget *et al.*, 2007; Romeroet *et al.*, 2011; Sartiet *et al.*, 2023).

دراین مطالعه، کارایی سویه والد و موتانت‌های این باکتری بر روی میزبان کاهو (*Lactuca sativa* L.) برای کنترل مرگ گیاهچه و کاهش شدت بروز علائم بیماری مشاهده شد. براساس نتایج به‌دست آمده از ارزیابی‌ها، کارایی روش القاء جهش در ژنوم *B. subtilis* برای بهبود ویژگی‌های آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی (حتی جدایه‌های پرآزار) کارآمد است. این روش، دسترسی به موتانت‌های شماره‌های ششصد و چهارصدونوزده است که کاندیدهای مناسبی برای مطالعات ارزیابی کارایی بعدی خواهد شد. پیشنهاد می‌شود بررسی‌های ایمنی‌زیستی از نظر

عدم سمیت موتانت‌های حاصل از پرتودهی با پرتوی گاما بر روی میزبان و موجودات مفید در اکوسیستم در گام‌های بعدی انجام شود.

تیمارهای باکتری *B. subtilis* (والد و موتانت) باعث افزایش معنی‌دار پروتئین برگ کاهو شده است؛ اما بیشترین میزان پروتئین در گیاهان تیمارشده با باکتری *A. brasilense* اندازه‌گیری شد؛ و کمترین میزان در گیاهان تیمارشده با باکتری *B. subtilis* پرتونیدیده دیده شد. بین تیمار با *B. subtilis* موتانت در شرایط بیماری و بدون بیماری، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

نتایج اندازه‌گیری میزان محتوای رنگدانه‌ها (کلروفیل و کارتنوئید) نشان داد میزان تجمع رنگدانه‌ها در تیمار با کلیه باکتری‌های *Azospirillum* و *B. subtilis* (والد و موتانت) بالا رفته است؛ اما در تیمار با بیمارگر موتانت‌های *B. subtilis* تفاوت معنی‌داری با شاهد داشتند. یکی از دلایل کاهش بیشتر شدت علائم در ارزیابی‌های گلخانه‌ای در تیمار با موتانت‌های *B. subtilis*، تأثیر فیزیولوژیک این گونه باکتری‌ها در بهبود تجمع رنگدانه‌ها و کاهش علائم زردی گیاهان است.

میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط عدم آلودگی به بیمارگر و تیمار با *B. subtilis* موتانت شش‌صد و *A. lipoferum* بالاتر بود؛ اما با بروز آلودگی، *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین تأثیر را در افزایش فعالیت پراکسیداز داشت. سنجش فعالیت آنزیم پلی‌فنل‌اکسیداز نشان داد *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین القاء فعالیت را در پی داشته است؛ اما هر دو سویه *Azospirillum* کمترین فعالیت این آنزیم را القاء نمودند. درحالی‌که با بروز بیماری، *B. subtilis* موتانت شش‌صد بیشترین تأثیر را در القاء فعالیت پلی‌فنل‌اکسیداز داشت و با نتایج کاهش شدت بیماری تطابق نشان داد.

سنجش پرولین نیز روند مشابهی از پاسخ فیزیولوژیک گیاهچه‌های کاهو را نشان داد و *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده بیشترین مقدار پرولین را در شرایط عدم تیمار با بیمارگر و بروز بیماری نشان داد؛ هرچند سویه‌های *Azospirillum* نیز قادر به القاء افزایش



بوته‌میری ناشی از *P. ultimum* باشد. نتایج این تحقیق نشان داد کارایی *B. subtilis* در بیوکنترل بیمارگر *P. ultimum* در شرایط گلخانه‌ای بهتر از سویه‌های همزیست *A. lipoferum* و *A. brasilense* بود؛ اما بررسی امکان تلفیق این دو جنس باکتری در خاک برای ایجاد کنسرسیوم زیستی با هدف تقویت گیاه و کنترل بیمارگر می‌تواند در بررسی‌های بعدی گنجانده شود. با ایجاد موتانت در *B. subtilis* و بالابردن اثر آنتاگونیستی آن و تولید متابولیت‌های ثانویه ضدقارچی و میکروبی می‌توان به مبارزه بیولوژیکی در آینده امیدوار بود. پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتر و ارزیابی کارایی این موتانت‌ها در گلخانه‌های تجاری و بررسی تثبیت کارایی این موتانت‌ها در خاک، موضوع تحقیقات بعدی باشد. همچنین تأکید می‌شود عدم سمیت موتانت‌های حاصل از پرتودهی با پرتوی گاما بر روی گیاه میزبان و موجودات مفید در اکوسیستم در گام‌های بعدی بررسی شود.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

تجمع پرولین در شرایط بروز بیماری بودند. در این تیمارها، کاهش شدت بیماری غیرمعنی‌داری که در شاخص بیماری مشاهده شد می‌تواند به دلایل مختلف از جمله افزایش تجمع پرولین باشد.

نتایج سنجش مالون‌دی‌آلدئید نیز نتایج سایر شاخص‌های فیزیولوژیکی را تأیید نمود. تیمار گیاه با *B. subtilis* موتانت چهارصدونوزده کمترین مقدار مالون‌دی‌آلدئید را نشان داد که با بیشترین توانایی بیوکنترل بیمارگر تطابق داشت.

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

براساس نتایج به‌دست‌آمده از ارزیابی‌ها، امکان استفاده از روش القاء جهش در ژنوم *B. subtilis* برای بهبود ویژگی‌های آنتاگونیستی علیه بیمارگرهای گیاهی متعلق به جنس شبه‌قارچ *P. ultimum* وجود دارد. این روش با ایجاد تنوع ژنتیکی از طریق القاء جهش، می‌تواند به دسترسی موتانت‌های شش‌صد و چهارصدونوزده بینجامد؛ زیرا بهبود کارایی زیستی آنها در نتایج نخستین ارزیابی گلخانه‌ای تأیید شده و می‌تواند کاندیدهای مناسبی برای استفاده در مدیریت

### REFERENCES

- Afsharmanesh, H., Ahmadzadeh, M., Javan-Nikkhah, M., & Behboudi, K. (2014). Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. *Crop Protection*, 60, 83-92. (in Persian).
- Altunkaya, A., et al. (2011). Purification and characterization of polyphenol oxidase, peroxidase and lipoxygenase from freshly cut lettuce (*L. sativa*). *Food Technology and Biotechnology*, 49(2), 249-256.
- Amaradasa, B. S., Mei, C., He, Y., Chretien, R. L., Doss, M., Durham, T., & Lowman, S. (2024). Biocontrol potential of endophytic *Pseudomonas* strain IALR1619 against two *Pythium* species in cucumber and hydroponic lettuce. *Plos one*, 19(2), e0298514.
- Constantinescu, F., Tomescu, A., Şesan, T. E., & Ştirbu, P. M. (2010, July). Biocontrol of Soil Borne Fungi in Tomato Crop by Using Beneficial *Bacillus subtilis* Strains. In *III International Symposium on Tomato Diseases*, 914, 381-384.
- Fatouros, G., Gkizi, D., Fragkogeorgi, G. A., Paplomatas, E. J., & Tjamos, S. E. (2018). Biological control of *Pythium*, *Rhizoctonia* and *Sclerotinia* in lettuce: association of the plant protective activity of the bacterium *Paenibacillus alvei* K165 with the induction of systemic resistance. *Plant pathology*, 67(2), 418-425.
- Li DeQuan, L.D., Nie FengYa, N.F., Wei LiHui, W.L., Wei BenQiang, W.B., & Chen ZhiYi, C.Z. (2007). Screening of high-yielding biocontrol bacterium Bs-916 mutant by ion implantation. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 1401-1408.
- Mangmang, J. S., Deaker, R., & Rogers, G. (2015). Optimal plant growth-promoting concentration of *Azospirillum brasilense* inoculated to cucumber, lettuce and tomato seeds varies between bacterial strains. *Israel Journal of Plant Sciences*, 62(3), 145-152.

- Mohamady, A., Abbas Akhavan Sepahi, A., & Hosseini Doust, S. R. (2017). Biological control of *Pythium ultimum* and *Fusarium solani* by indigenous strains *Bacillus subtilis*. *Journal of Microbial Biology*, 6(21), 1-14. (in Persian).
- Rezalou, Z., Shahbazi, S., Alilou, A. A., & Ghorbani, A. (2023). Biostimulant impact of *Trichoderma* species on physiological characteristics of beans. *Iranian Journal of Genetics & Plant Breeding (IJGPB)*, 12(2). (in Persian).
- Rezalu, Z., et al. (2022). *Investigating the effect of growth-promoting bacteria in stimulating germination and improving the growth components of seeds*. Iran seed science and technology. (in Persian).
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2011). An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms. *Molecular microbiology*, 80(5), 1155-1168.
- Rostaminia, M., et al. (2021). Effect of three commercial bio-fertilizers prepared with *Pseudomonas* on yield and morphophysiological traits of lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Iran Agricultural Research*, 39(2) 99-107. (in Persian).
- Sarti, G. C., Galelli, M. E., Arreghini, S., Cristóbal-Míguez, J. A. E., Curá, J. A., & Paz-González, A. (2023). Inoculation with Biofilm of *Bacillus subtilis* Promotes the Growth of *Lactuca sativa*. *Sustainability*, 15(21), 15406.
- Utkhede, R. S., Lévesque, C. A., & Dinh, D. (2000). *Pythium aphanidermatum* root rot in hydroponically grown lettuce and the effect of chemical and biological agents on its control. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(2), 138-144.
- Yasari, E., & Patwardhan, A. M. (2007). Effects of (*Azotobacter* and *Azospirillum*) inoculants and chemical fertilizers on growth and productivity of canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*.

## Identification and expression analysis of genes involved in the ETI defense pathway in saffron corms infected with corm rot disease (*Fusarium oxysporum*)

Nasrin Hematpour<sup>1</sup>, Farhad Nazarian-Firouzabadi<sup>2</sup>(ORCID: 0000000282913887), Seyed Sajad Sohrabi<sup>3</sup>, Mitra Khademi<sup>3</sup>

1. Former M.Sc. Student, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2. Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3. Assistant Professor, Production Engineering and Plant Genetics Department, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Correspondence:  
Farhad Nazarian-Firouzabadi  
Email: [nazarian.f@lu.ac.ir](mailto:nazarian.f@lu.ac.ir)

Received: 09, Aug. 2024  
Accepted: 06, Jan. 2025

### How to cite:

Hematpour, N., Nazarian-Firouzabadi, F., Sohrabi, S.S., & Khademi, M. (2025). Identification and expression analysis of genes involved in the ETI defense pathway in saffron corms infected with corm rot disease (*Fusarium oxysporum*). *Crop Biotechnology*, 14 (2), 69-82. (DOI: [10.30473/cb.2025.72010.1981](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72010.1981))

### ABSTRACT

Saffron (*Crocus sativus* L.), a perennial plant of the Iridaceae family, is predominantly cultivated in Iran. Despite its high economic value both domestically and globally as a precious spice, its cultivation faces substantial challenges from numerous pathogens which significantly impact both yield and quality. Resistance genes (R-genes) encode R-proteins that play a crucial role in activating plant defense mechanisms against pathogens. Nucleotide-binding site leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes are a family of intracellular R-genes that confer resistance to plants by initiating Effector-Triggered Immunity (ETI). In this study, an in silico study was conducted on the transcriptome of saffron corms infected with *Fusarium oxysporum* to identify NBS-LRR genes at 48 and 72 hours after inoculation using bioinformatics software and databases. Arabidopsis NBS-LRR gene sequences were used to identify NBS-LRR members in the saffron corm transcriptome. Then, the expression profile of NBS-LRR candidate genes was studied. Based on the results of BLASTX algorithms, 63326 transcripts were documented. The results of this study revealed the presence of 30 NBS-LRR gene transcripts in the transcriptome of saffron corms. The expression of the selected genes was significantly up-regulated in infected corms compared to healthy control corms. Furthermore, analysis of the selected NBS-LRR genes indicated that their expression levels were higher at 72 hours after inoculation compared to 48 hours. The LRR1 gene had a higher expression level than the LRR2 gene at 48 and 72-hours post-inoculation. Plus, the results of this study revealed that NBS-LRR genes are expressed in almost all saffron tissues, suggesting their involvement in the saffron's response to fungal infections. The findings of this study suggest that NBS-LRR genes hold significant potential for utilization in future saffron breeding programs.

### KEYWORDS

Bioinformatics, *Fusarium oxysporum*, Gene expression, NBS-LRR gene.



## «مقاله پژوهشی»

شناسایی و تحلیل برخی ژن‌های درگیر در مسیر دفاعی ETI در بنه‌های زعفران آلوده به بیماری یوسدگی بنه (*Fusarium oxysporum*)

نسرین، همت پور<sup>۱</sup>، فرهاد نظر بان، فیروز آبادی<sup>۲</sup> (الکد: ۲۸۳۹۱۳۸۸۷۰۰۰۰۰۰۰۰)، سید سجاد سهرابی<sup>۳</sup>، میترا خادمی<sup>۳</sup>

## چکیده

زعفران (*Crocus sativus* L.)، گیاهی چندساله از خانواده زنبقیان است که عمدتاً در ایران کشت می‌شود. علیرغم ارزش اقتصادی بالای زعفران در ایران و جهان به عنوان یک ادویه گران‌بها، عوامل بیماری‌زا متعددی تهدیدی برای گیاه زعفران بوده و باعث کاهش عملکرد و کیفیت آن می‌شود. ژن‌های مقاومت (R-genes)، پروتئین‌های R را کد می‌کنند که مقاومت گیاهان علیه بیمارگرها را فعال می‌کنند. ژن‌های NBS-LRR، خانواده‌ای از ژن‌های R درون سلولی هستند که مقاومت به گیاهان را از طریق ایجاد ایمنی تحریک شونده ETI القا می‌کنند. در این مطالعه ترنسکریپتوم بنه زعفران آلوده به بیمارگر *Fusarium oxysporum* به منظور شناسایی ژن‌های NBS-LRR در دو بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از تلقیح با کمک نرم افزار-های بیوانفورماتیک به صورت *in silico* آنالیز شدند. از توالی‌های ژنی NBS-LRR آرآیدوپسیس، برای شناسایی اعضای NBS-LRR در ترانسکریپتوم زعفران استفاده شد. سپس، پروفایل بیانی ژن‌های کاندید NBS-LRR مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج الگوریتم Blastx، تعداد ۶۳۳۲۶ رونوشت مستندسازی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که ترنسکریپتوم زعفران حاوی تعداد ۳۰ رونوشت از ژن‌های NBS-LRR است. تجزیه و تحلیل بیان ژن‌های انتخابی NBS-LRR نشان داد که بیان آن‌ها در ۷۲ ساعت پس از تلقیح در مقایسه با ۴۸ ساعت پس از تلقیح بیشتر بود. ژن LRR1 در ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تلقیح سطح بیان بالاتری نسبت به ژن LRR2 داشت. علاوه بر این، نتایج این مطالعه نشان داد که ژن‌های NBS-LRR تقریباً در تمام بافت‌های زعفران بیان می‌شوند و همچنین در پاسخ زعفران علیه بیمارگر قارچی نقش دارند که می‌توان از آنها در برنامه‌های آینده پهنزادی زعفران استفاده کرد.

## واژه‌های کلیدی

بیان ژن، بیوانفورماتیک، بیماری یوسیدگی بنه، ژن NBS-LRR.

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۲. استاد، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.
۳. استادیار، گروه مهندسی تولید و ژنتیک گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

نویسنده مسئول:

فرهاد نظریان فیروزآبادی

ایمان نامه: nazarian.f@lu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۷

استناد به این مقاله:

همت‌پور، نسرین: نظریات فیروزآبادی، فرهاد؛ سه‌پایی، سیدسیجاد و خادمی، میترا (۱۴۰۳). شناسایی و تحلیل برخی ژن‌های درگیر در مسیر دفاعی ETI در بنه‌های زعفران آلوده به بیماری پوسیدگی بنه ( *Fusarium oxysporum* )، فصلنامه علمی زیست‌فناوری گیاهان زراعی، ۱۴ (۲)، ۶۹-۸۲.

(DOI: [10.30473/cb.2025.72010.1981](https://doi.org/10.30473/cb.2025.72010.1981))

## مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.)، گیاهی چندساله و از خانواده زنبقیان (Iridaceae) است که اغلب در مناطقی با اقلیم خشک کشت می‌شود (Shah *et al.*, 2017). در صنایع غذایی از کلاله زعفران با رنگ قرمز و یا نارنجی به عنوان عامل طعم‌دهنده و رنگ دهنده طبیعی مواد غذایی استفاده می‌شود (Golmohammadi, 2014). به علاوه، زعفران به عنوان یکی از داروهای موثر در طب گیاهی و سنتی شناخته می‌شود که اثرات دارویی آن عمدتاً مربوط به متابولیت‌های اصلی این گیاه همانند؛ کروکسین، پیکروکروسین<sup>۱</sup> و سافرانال<sup>۲</sup> است (Golmohammadi, 2014). ایران با ۱۲۰ هزار هکتار سطح زیر کشت و ۴۳۹ تن تولید سالانه پیشرو در تولید زعفران جهان است (Saeedi *et al.*, 1400). در حال حاضر تنها ۲۰ درصد محصول زعفران به مصرف داخل کشور می‌رسد و بقیه تولید به سایر کشورهای جهان صادر می‌شود؛ از این رو، ایران به عنوان بزرگترین تولیدکننده و صادرکننده زعفران در جهان، شناخته می‌شود. با وجود ارزش اقتصادی و دارویی، زعفران به دلیل تریپلوئید بودن ( $2n=3x=24$ ) عقیم است و قادر به تولید بذر نیست به همین دلیل از طریق بذر کشت و تکثیر می‌شود (Golmohammadi, 2014).

بیمارگرهای گیاهی جزء مهم‌ترین عواملی هستند که تولید زعفران را تهدید می‌کنند و در بین این عوامل، قارچ‌ها از اهمیت زیادی برخوردارند (Khaledi, 2020). بیماری قارچی پوسیدگی بنه (*Fusarium oxysporum*) از مهم‌ترین بیماری‌های زعفران است که نه تنها موجب کاهش عملکرد می‌شود، بلکه بر کیفیت و کمیت بنه‌های دختری تاثیر می‌گذارد (Khaledi, 2020). یکی از راهکارهای مهم برای کنترل بیماری‌ها و کاهش خسارت ناشی از آن‌ها، تولید و استفاده از ارقام مقاوم به بیماری است (Ahmad *et al.*, 2022). لازمه چنین عملی، شناسایی و جداسازی ژن‌های مقاومت به بیماری، جهت استفاده از آن‌ها در برنامه‌های بهنجاری است. گیاهان از

ساز و کارهای دفاعی کارآمدی برای مقابله با حمله بیمارگرهای مختلف موجود در زیستگاه خود استفاده می‌کنند (Dangl and Jones, 2001; Van Der Biezen and Jones, 1998). علاوه بر موانع دائمی، گیاهان دارای سیستم‌های دفاعی دیگری موسوم به سیستم‌های ایمنی ذاتی (immunity Innate) هستند (Fallahzadeh, 2018; Jacob *et al.*, 2013) که در آن سلول‌های گیاهی مورد حمله بیمارگر، وجود بیمارگرها را حس کرده و بلافاصله واکنش‌هایی از خود نشان می‌دهند که از گسترش بیماری جلوگیری می‌کنند (Fallahzadeh, 2018).

گیرنده‌های ایمنی ذاتی گیاهی شامل گیرنده‌های تشخیص سطحی (PRRs) (Pattern Recognition Receptors) و همچنین گیرنده‌های درون سلولی (NLR Receptors) (Intracellular-Lular NLR Receptors) است (Chiang and Coaker, 2015). گیرنده‌های PRR می‌توانند الگوهای مولکولی مرتبط با میکروب یا بیمارگر<sup>۴</sup> (M/PAMPs)، الگوهای مولکولی مرتبط با آسیب<sup>۵</sup> (DAMPs) و پروتئین‌های مؤثر خارج سلولی را شناسایی کنند (Lolle *et al.*, 2020). الگوهای مولکولی مرتبط با بیمارگرها (PAMP) گروهی از بیمارگرها را برای گیاه شناسایی می‌کنند. به ایمنی که بعد از شناسایی PAMP ایجاد می‌شود به اصطلاح ایمنی ناشی از PAMP<sup>۶</sup> (Chisholm *et al.*, 2006) و ایمنی تحریک شده با الگو<sup>۷</sup> (PTI) می‌گویند (Jacob *et al.*, 2013). ایمنی ناشی از افکتور<sup>۸</sup> (ETI) به صورت عمومی منجر به پاسخ فوق حساسیت و مرگ سلولی بافت اطراف محل آلودگی می‌شود و بنابراین بیمارگر را به محل آلودگی محدود می‌کند (Fallahzadeh, 2018; Jacob *et al.*, 2013). اکثر پروتئین‌های رمز شده توسط ژن‌های مقاومت دارای محل اتصال نوکلئوتیدی (= Nucleotide Binding Site) و دمین‌های غنی از اسید آمینه لوسین (= Leucien-

4. Microbe-Associated or Pathogen-Associated Molecular Patterns (M/PAMPs)

5. Damage-Associated Molecular Patterns

6. PAMP-Triggered Immunity-PTI

7. Pattern-Triggered Immunity

8. Effector-Triggered Immunity

1. Crocin

2. Picrocrocin

3. Safranal

## مواد و روش‌ها

### تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی

#### جمع‌آوری و پردازش داده‌های خام

علاوه بر داده‌های حاصل از توالی‌یابی RNA بافت بنه زعفران تحت تیمار قارچ عامل پوسیدگی بنه (Darvishian *et al.*, 2022)، به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده، داده‌های بیانی حاصل از توالی‌یابی RNA از بافت‌های مختلف زعفران شامل بنه، برگ، گل‌برگ، پرچم و کلاله، جوانه اپیکال، جانبی و انتهایی، از پایگاه داده SRA دریافت شدند. به منظور بررسی کیفیت داده‌های خام از نرم افزار FastQC (Version 0.11.6) استفاده شد. برای انجام فرآیند تریمینگ (شامل حذف توالی‌های آداپتور باقی‌مانده در توالی‌های موجود، توالی‌های با کیفیت پایین (با میانگین Phredscore کمتر از ۳۰)، توالی‌های با میزان بالای نوکلئوتیدهای خوانش نشده (N) و توالی‌هایی با اندازه کمتر از ۱۰۰ جفت باز) از نرم‌افزار CLC GenomicsWorkbench (نسخه ۲۰) استفاده شد. سرهم‌بندی (اسمبلی) خوانش‌های تمیز شده (clean reads) با استفاده از نرم افزار CLC Genomics Workbench بر اساس شاخصه‌های پیش فرض انجام شد.

#### شناسایی اعضای خانواده ژنی NBS-LRR

به منظور شناسایی اعضای خانواده NBS-LRR در زعفران، ابتدا توالی‌های خانواده ژنی NBS-LRR آرآیدوپسیس از پایگاه داده TAIR (https://www.arabidopsis.org) دریافت شدند. سپس جهت شناسایی توالی‌های شامل دامین NBS-LRR در زعفران، توالی‌های دریافت شده علیه داده‌های ترنسکریپتوم زعفران (حاصل از سرهم‌بندی نوپدید داده‌های بیانی موجود زعفران در پایگاه داده SRA)، با استفاده از ابزار بلاست نرم‌افزار TBtools مورد جستجو قرار گرفتند. توالی‌های پروتئینی شناسایی شده براساس دامین LRR با استفاده از الگوریتم CLUSTAL W هم‌ردیف شدند. علاوه بر این، برای اطمینان از صحت توالی‌های شناسایی شده، تمام ORF‌ها برای وجود دامین‌های پروتئینی

(Rich Repeats=LRR) با طول متغیر در انتهای کربوکسیل هستند. این دامین‌ها در برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و ترانس‌آسانی پیام‌های مولکولی شرکت می‌کنند. ژن‌های مقاومت گروه NBS-LRR متداول‌ترین گروه ژن‌های مقاومت هستند. خانواده پروتئینی NBS-LRR در گیاهان را می‌توان به دو گروه اصلی تقسیم‌بندی کرد. گروه اول قسمت انتهایی N گیرنده‌های اینترلوکین-۱ (TIR) را کد می‌کند که NBS-LRR یا TNL نامیده می‌شوند (Zhou *et al.*, 2004). گروه دوم قسمت TIR را رمزگذاری نمی‌کنند و NBS-LRR یا CC یا CNL نامیده می‌شوند که حاصل آن‌ها معمولاً دامین‌های مارپیچ-مارپیچ در ناحیه N ترمینال می‌باشد (Zhou *et al.*, 2004). در واقع این پروتئین‌ها، محرک‌های وابسته به ژن‌های Avr<sup>۹</sup> تولید شده توسط بیمارگرها را به طور مستقیم و غیرمستقیم تشخیص می‌دهند (Keen, 1990).

هنگامی که یک گیرنده گیاهی LRR به محرک بیماری‌زای متصل می‌شود، پروتئین TNL و CNL دچار یک تغییر ساختاری شده و با سایر پروتئین‌ها موجود در مسیر پاسخ‌های دفاعی واکنش می‌دهد و منجر به مرگ سلول گیاهی آلوده می‌شود، بنابراین از گسترش بیشتر بیمارگر جلوگیری می‌کند. تاکنون صدها ژن NBS-LRR در ژنوم گیاهان مختلف همچون ذرت، سیب، سیب‌زمینی شیرین، آرآیدوپسیس و نخود به دلیل نقش اساسی آن‌ها در ایمنی گیاهی و فراوانی آن‌ها در ژنوم گیاهان شناسایی شده است. تعریف مجموعه کاملی از پروتئین‌های NBS-LRR در ژنوم گیاه، بینش‌هایی را در مورد تنوع ژن‌های دفاعی موجود در گیاه ارائه می‌دهد (Dangl and Jones, 1998; Van Der Biezen and Jones, 2001). از این رو هدف پژوهش حاضر شناسایی ژن‌های NBS-LRR در گیاه زعفران به منظور تعیین دخالت یا عدم دخالت آن‌ها در مقاومت این گیاه به بیماری فوزاریوم و بررسی بیوانفورماتیکی خانواده ژنی NBS-LRR در ترنسکریپتوم بنه‌های زعفران آلوده به بیماری *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli* می‌باشد.

### مایه‌زنی بنه‌های زعفران با قارچ فوزاریوم

قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli* از مطالعات پیشین درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) تهیه گردید (Darvishian et al., 2022). از جدایه قارچ *Fusarium oxysporum* با غلظت  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بنه‌ها استفاده شد. برای انجام تیمار قارچی بر روی هر یک از بنه‌های زعفران منافذی ایجاد شد و با سرنگ میزان ۵ میکرو لیتر از محلول سوسپانسیون قارچ به بنه‌ها تزریق گردید. برای تیمار شاهد به جای تزریق سوسپانسیون قارچ، از آب مقطر استریل استفاده شد. در هر شیشه مربا، تعداد سه بنه تیمار شده یا شاهد قرار داده شد. سپس بنه‌ها به مدت ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان‌های تیمار، برای اطمینان از آلودگی توسط قارچ فوزاریوم، کشت مجدد از قارچ انجام شد به این صورت که مجدداً در محیط کشت PDA واکشت قارچ انجام شد و به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای  $25 \pm 2$  درجه سانتی‌گراد آنکوبه شدند. وضعیت رشد قارچ توسط متخصص بیماری‌شناس با روش چشمی و میکروسکوپی بررسی و صحت آزمایش تایید شد.

### استخراج RNA و سنتز cDNA

جهت بررسی بیان ژن‌های کاندید خانواده‌های ژنی NBS-LRR از بنه‌های زعفران تحت تیمار قارچ و بنه‌های شاهد (بدون مایه‌زنی با قارچ)، استخراج RNA و سپس سنتز cDNA صورت گرفت. برای استخراج RNA از کیت ترایزول (شرکت NEB به شماره T2010S) و مطابق شیوه‌نامه شرکت سازنده استفاده شد. کیفیت RNA استخراج شده با انجام الکتروفورز RNA روی ژل آگارز ۱ درصد و کمیت سنجی غلظت RNA با استفاده از روش اسپکتوفتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ به ۲۸۰ و ۲۶۰ به ۲۳۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. به منظور حذف آلودگی احتمالی DNA ژنومی موجود در نمونه‌ها از تیمار با آنزیم DNase I استفاده شد. جهت سنتز cDNA از کیت

LRR، NBS، TIR یا R با استفاده از پایگاه CDD مورد ارزیابی مجدد قرار گرفتند. علاوه بر این، توالی پروتئینی ژن‌های شناسایی شده بر اساس آنالیز موتیف Pfam طبقه بندی شدند.

### بررسی بیان اعضای خانواده ژنی NBS-LRR

پس از نقشه‌یابی خوانش‌های تمیز شده علیه مرجع ترنسکریپتومی ساخته شده، مقادیر بیان ژن‌های شناسایی شده در مقیاس رونوشت در هر میلیون (TPM) در هر بافت-تیمار محاسبه شد. پس از کمی‌سازی بیان ژن‌ها، توالی‌های با مقادیر logFC بزرگ‌تر مساوی  $|\pm 1|$  و FDR کوچک‌تر از ۰/۰۵ به‌عنوان ژن‌های با بیان افتراقی (DEGs) شناسایی شدند. در نهایت به منظور گروه‌بندی ژن‌ها در تیمارهای مورد مطالعه، از تحلیل خوشه‌ای به‌همراه ترسیم نقشه حرارتی مبتنی بر مقادیر  $\text{Log(TPM+1)}$  استفاده شد.

### مایه‌زنی بنه‌های زعفران و بررسی بیان ژن‌های کاندید

#### تهیه و ضدعفونی بنه‌های زعفران

بنه‌های زعفران زراعی (*Crocus sativus* L.) مورد استفاده در این مطالعه از مزارع کشت زعفران در مشهد برداشت و پس از ارزیابی سلامت بنه‌ها تحت نظر متخصص بیماری‌های گیاهی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان منتقل شدند. برای انجام آزمایش‌ها، ابتدا بنه‌ها ضدعفونی شدند. به این ترتیب که بنه‌ها یک دقیقه در محلول اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس چندین مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس بنه‌ها در محلول هیپوکلرید سدیم ۱/۵ درصد به مدت سه دقیقه ضدعفونی و بار دیگر برای زدودن باقیمانده‌ی مواد ضدعفونی کننده، سه بار با آب مقطر هر بار به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند.

سنتز cDNA شرکت سینا کلون استفاده شد و سنتز مطابق با شیوه‌نامه شرکت سازنده صورت گرفت.

### طراحی آغازگر

پس از انتخاب توالی ژن‌های مورد نظر (براساس بیشترین میزان بیان) طراحی آغازگرها جهت استفاده در واکنش qRT-PCR، با استفاده از نرم افزار AlleleID انجام شد. برای اطمینان بیشتر از صحت این آغازگرهای طراحی‌شده از ابزار برخط Primer blast استفاده شد (جدول ۱).

### بررسی الگوی بیان ژن‌های LRR با روش Real-time RT-PCR

جهت بررسی میزان بیان ژن‌های مورد نظر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان واقعی (qRT-PCR) استفاده

شد. برای انجام این واکنش از کیت سایبرگرین SinaSYBR Blue IIS-qPCR Mix, 2x شرکت سینا کلون استفاده شد. هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix (2x)، ۱ میکرولیتر آغازگر رفت و ۱ میکرولیتر آغازگر برگشت، ۸ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۲/۵ میکرولیتر cDNA بود و واکنش‌ها در دستگاه Rotor-Gene Q شرکت Qiagen انجام گرفت. شرایط دمایی واکنش PCR کمی در جدول ۲ نشان داده شده است. در این آزمایش از ژن کنترل داخلی *elfl-α* جهت نرمال‌سازی مقادیر بیان ژن‌ها استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). هر نمونه در سه تکرار زیستی و سه تکرار فنی انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از نرم افزار LinRegPCR و Microsoft Excel (نسخه ۲۰۲۰) انجام شد.

جدول ۱. فهرست آغازگرهای طراحی شده برای ژن‌های NBS-LRR انتخاب شده و ژن کنترل داخلی

Table 1. List of primers designed for NBS-LRR genes and reference gene

| نام آغازگر<br>Primer                   | توالی آغازگر (۵'→۳')                                   | دمای اتصال (°C)<br>Tm (°C) |
|----------------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|
| LRR-1                                  | F: ATGACGATACTGAATCTC<br>R: GTTAATTGGTTGGATGTG         | 54                         |
| LRR-2                                  | F: ACTTGTAATTGCGTTGGATGTG<br>R: TCGGATACCTGGCTCTCAG    | 55                         |
| Elongation factor 1α ( <i>elfl-α</i> ) | F: TGAACCATCCAGGACAGATTG<br>R: TCTTAACCATAACCAGCATCACC | 57                         |

جدول ۲. سیکل دمایی واکنش PCR برای ژن‌های NBS-LRR انتخاب شده

Table 2. Temperature cycle of the PCR reaction for selected NBS-LRR genes

| تعداد چرخه<br>Number of cycles | زمان<br>Time | دما (°C)<br>Temperture (°C) | مرحله واکنش<br>Step                       |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------|-------------------------------------------|
| 1                              | 5 min        | 95                          | واسرشت‌سازی اولیه<br>Initial denaturation |
| 35                             | 15 s         | 95                          | واسرشت‌سازی<br>Denaturation               |
| 35                             | 20 s         | -                           | اتصال آغازگرها<br>Annealing               |
| 35                             | 30 s         | 72                          | بسط<br>Extension                          |
| 1                              | 5 min        | 72                          | بسط نهایی<br>Final Extension              |



## نتایج و بحث

### سرهم‌بندی نوپدید ترنسکرپتوم زعفران

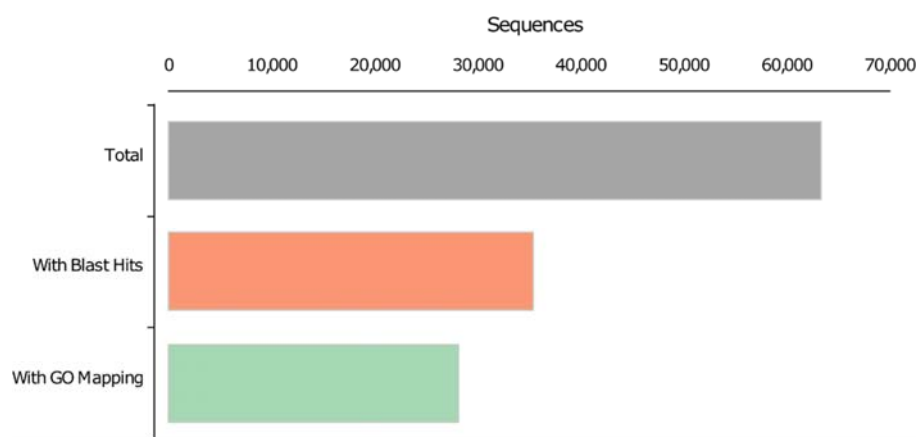
سرهم‌بندی پروفایل بیانی زعفران با استفاده از ادغام خوانش‌های تریم شده (Trimmed reads) با استفاده از نرم‌افزار CLC Genomics Workbench (نسخه ۲۰)، منجر به ایجاد ۶۳۳۲۶ توالی منحصر به فرد شد. همچنین حجم کل پروفایل بیانی زعفران ۶۴/۶۵ Mb محاسبه شد. پروفایل بیانی ایجادشده از نظر حجم و تعداد رونوشت مطابقت بالایی با دیگر پروفایل‌های بیانی گزارش شده زعفران داشت (جدول ۳) (Hu *et al.*, 2020).

نتایج بلاست اسمبلی ساخته‌شده علیه پایگاه NR نشان داد که تعداد ۳۵۳۹۴ (۵۵/۸۹ درصد) رونوشت با حد آستانه  $E\text{-value} \leq 1.0 \times 10^{-5}$  دارای رکورد مشابه در پایگاه NR بودند (شکل ۱). همچنین نتایج بلاست اسمبلی در مطالعه حاضر نشان داد که ترنسکرپتوم زعفران بیشترین شباهت را با ترنسکرپتوم مارچوبه (*Asparagus officinalis*) و پس از آن با نخل (*Phoenix dactylifera*) داشت (شکل ۲). با توجه به فقدان توالی‌های ژنی ثبت شده در پایگاه داده NCBI برای گیاه زعفران، مستندسازی و تعیین گروه‌های کارکردی رونوشت‌های حاصله، تولید محتوا و افزایش اطلاعات ژنتیکی این گیاه ارزشمند خواهد بود.

### جدول ۳. خلاصه‌ای از کمیت و کیفیت داده‌های خوانش شده مرجع ترنسکرپتومی زعفران

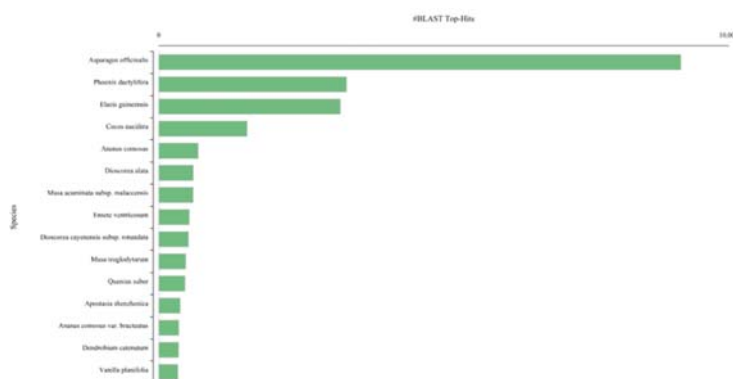
Table 3. Summary of the quantity and quality of read data for the saffron transcriptome reference

| پارامترها<br>Parameters                | ارزش<br>Value |
|----------------------------------------|---------------|
| Number of transcripts                  | 63326         |
| Size of the smallest transcript (nt)   | 200           |
| Size of the largest transcript (nt)    | 16256         |
| Number of bases (nt)                   | 64651404      |
| Mean length of the transcripts (nt)    | 9301020       |
| Number of transcripts greater than 1kb | 23146         |
| Number of transcripts with ORF         | 22388         |
| N90                                    | 482           |
| N70                                    | 935           |
| N50                                    | 1413          |
| N30                                    | 2100          |
| N10                                    | 3571          |
| %GC                                    | 36.43         |



شکل ۱. نتایج BLASTX ترنسکرپتوم زعفران علیه پایگاه داده NR و نقشه‌یابی آن‌ها علیه پایگاه GO

Figure 1. BLASTX results of the saffron transcriptome against the NR database and their mapping to the GO database



شکل ۲. توزیع فراوانی گونه‌های با همولوژی بالا نسبت به ترنسکرپتوم زعفران

Figure 2. Frequency distribution of species showing high homology to the saffron transcriptome

به کار می‌برند. این مکانیسم‌ها با ژن‌های مقاومت گیاه (R genes) فعال می‌شوند. یکی از بزرگترین خانواده‌های ژن R در گیاهان، خانواده ژن NBS-LRR است که نقش مهمی در تشخیص سیگنال‌های بیماری ایفا می‌کنند (Dangl and Jones, 2001; Yue et al., 2012). مطالعه این خانواده ژنی اطلاعات با ارزشی در مورد مکانیسم‌های ژنومی و مولکولی تنظیم ژن و عملکرد پروتئین در اختیار محققان قرار می‌دهد. نتایج این مطالعه، منجر به شناسایی ۳۰ توالی کدکننده NBS-LRR در پروفایل بیانی زعفران شد. تنوع در ساختار و توزیع اگزون-اینترون در بین اعضای خانواده ژن برای ظهور خانواده‌های ژنی متنوع بسیار مهم است و شواهد ارزشمندی برای روابط تکاملی ژن‌ها می‌دهد. در این مطالعه، توالی‌های اسیدآمینه کدکننده NBS-LRR برای شناسایی موتیف‌ها و ساختارهای دمین پروتئینی مورد بررسی قرار گرفت. این توالی‌ها به‌طور میانگین دارای ۲ تا ۶ دمین LRR بودند که طول تقریبی آن‌ها حدود ۲۰ تا ۶۰ اسیدآمینه بود. بیشترین تعداد موتیف (۱۵ موتیف) مربوط به توالی با شناسه contig-25817 بود و کمترین تعداد موتیف (۲ موتیف) در توالی با شناسه contig-29905 مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین تعداد اسیدآمینه کل به‌ترتیب مربوط به توالی با شناسه ۱۳۴۰۹-contig به تعداد ۱۲۰۴ اسیدآمینه و ۵۲۶۱۲-contig به تعداد ۴۲۸ اسیدآمینه بود. این نتایج بینش‌های مهمی را در مورد تنوع و تکامل ژن‌های NBS-LRR ارائه می‌دهد. همچنین در مطالعه مشابهی، السامان و همکاران (۲۰۲۳) به بررسی بیان ژن‌های

در یک مطالعه‌ی مشابه، درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی ژن‌های مختلف در فرآیند پاسخ بنه زعفران به آلودگی *F. oxysporum* در تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از مایه‌زنی با قارچ فوزاریوم پرداختند. نتایج حاصل از داده‌های RNA-seq این مطالعه نشان داد که از میان ۳۸۶۴۳ توالی مستندسازی شده، تعداد ۲۲۰۹ توالی دارای بیان افتراقی بودند که از این میان ۱۸۳۲ توالی کاهش و ۳۳۷ توالی افزایش بیان نشان دادند (Darvishian et al., 2022). در همین راستا، لیو و همکاران (۲۰۲۳) پروفایل بیانی بنه‌های زعفران آلوده به قارچ فوزاریوم را در سه و شش روز بعد از آلودگی مورد مطالعه قرار دادند (Luo et al., 2023). نتایج این مطالعه منجر به شناسایی تعداد ۸۴۵۴۴ یونی ژن و مستندسازی ۳۹۹۶۲ ژن گردید که از این میان تعداد ۱۴۲۶۳ ژن در روز سوم و تعداد ۱۶۳۹۷ ژن در روز ششم پس از آلودگی، بیان افتراقی داشتند (Luo et al., 2023). همچنین مقایسه میان نتیجه‌ی ژن‌های مستندسازی شده حاصل از مطالعه‌ی لیو و همکاران (۲۰۲۳) و درویشیان و همکاران (۲۰۲۲) با نتیجه مطالعه حاضر نشان می‌دهد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در تعداد یونی ژن و مستندسازی آن‌ها وجود دارد که از دلایل این امر می‌توان به استفاده از مجموعه داده‌های پایگاه‌های ژنی از مطالعات قبلی و همچنین زمان نمونه‌برداری اشاره نمود (Darvishian et al., 2022; Luo et al., 2023).

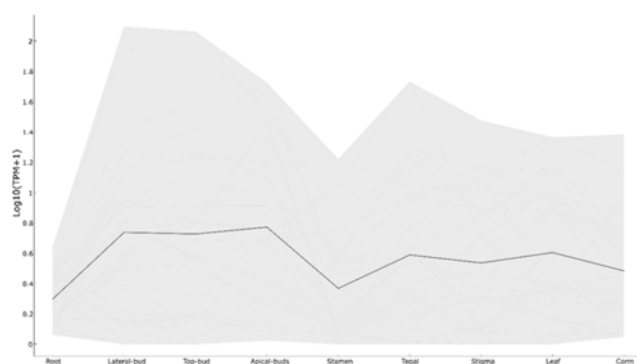
### شناسایی خانواده ژنی NBS-LRR

گیاهان مکانیسم‌های مختلفی برای دفاع در مقابل بیمارگرها

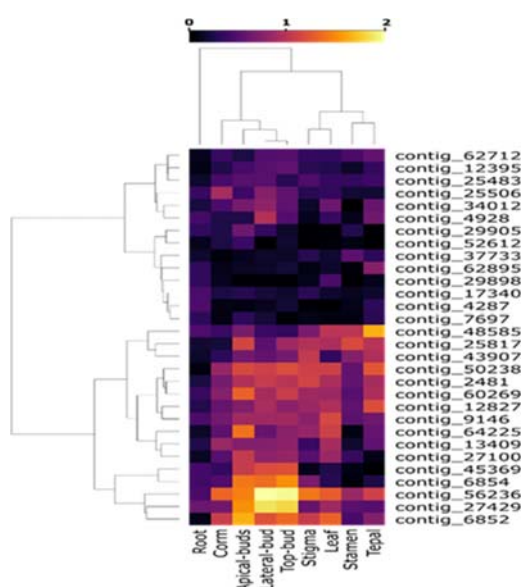
یک خانواده ژنی گیاهی تاثیر بگذارد (Zhang *et al.*, 2010). با توجه به شرایط کشت زعفران در مناطق خشک و نیمه خشک ایران، احتمالاً انتخاب طبیعی و بهنجاری از عوامل موثر بر تعداد خانواده ژنی NBS-LRR بوده‌اند. روند بیان ژن‌های شناسایی شده در بافت‌های مختلف زعفران در شکل ۳ ارائه شده است. بررسی بیان ژن‌های مورد مطالعه در بافت‌های مختلف زعفران نشان داد که ژن‌های شناسایی شده در انواع بافت جوانه بیشترین میزان بیان را داشتند (شکل ۳). همچنین گروه‌بندی ژن‌ها و بافت‌ها از نظر بیان در نقشه حرارتی در شکل ۴ آمده است. با توجه به نقشه حرارتی (شکل ۴) مشخص شد که ژن‌های شناسایی شده در دو گروه کلی قرار می‌گیرند؛ به طوری که ۱۶ ژن در گروه اول و ۱۴ ژن در گروه دوم جای گرفتند. همچنین نتایج نشان داد که مقادیر بیانی ثبت شده برای ژن‌های گروه اول بیشتر از مقادیر بیان برای ژن‌های گروه دوم بود. ژن‌هایی با شناسه contig-56236 و contig-27429 بالاترین میزان بیان را در بافت جوانه و ژن‌هایی با شناسه contig-48585 بالاترین میزان بیان را در بافت گلبرگ دارا بودند. کمترین میزان بیان در اکثر بافت‌ها مربوط به ژن‌هایی با شناسه contig-52612 و contig-29898 بود. علاوه بر این نتایج گروه‌بندی بافت‌های مختلف از نظر بیان ژن‌های شناسایی شده نشان داد که بافت ریشه در گروه مجزایی از سایر بافت‌ها قرار گرفت و کمترین میزان بیان را نسبت به سایر بافت‌ها داشت. پس از بافت ریشه، کمترین میزان بیان به ترتیب در بافت‌های پرچم و پیاز مشاهده شد. همچنین براساس تجزیه و تحلیل PCA (شکل ۵) بیان بافت ریشه بسیار متفاوت و دور از سایر بافت‌های زعفران بود و بنه و جوانه‌ها بیان تقریباً یکسانی داشتند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که میزان بیان ژن‌های NBS-LRR در اندام‌های هوایی همچون جوانه‌ها بسیار بیشتر از اندام‌های زمینی مانند ریشه بود. بنابراین، نقش کلیدی این ژن در اندام‌های هوایی علیه بیمارگر گیاهی مشهود است.

NBS-LRR و نقش کلیدی این ژن‌ها در تحمل به تنش‌های زیستی و غیرزیستی در گیاه نخود (*Lathyrus sativus*) پرداختند (Alsamman *et al.*, 2024). نتایج این مطالعه نشان داد که تعداد ۲۷۶ ژن NBS-LRR شناسایی شد و از این تعداد ۱۲۴ ژن دارای دمین TNL و تعداد ۱۵۰ ژن دارای دمین CNL است. همه ژن‌ها شناسایی حاوی ۱ تا ۷ اگزون بودند (Alsamman *et al.*, 2024). با توجه به نقش عملکردی پروتئین‌های NBS-LRR در مقاومت به بیماری و بررسی ساختار ژنی در مطالعه حاضر و السامان و همکاران (۲۰۲۴) می‌توان سرنخ‌های ارزشمندی برای مطالعه ویژگی‌های تکاملی، برهمکنش با پروتئین‌ها و فاکتورهای رونویسی، تفاوت و تنوع این خانواده ژنی بدست آورد.

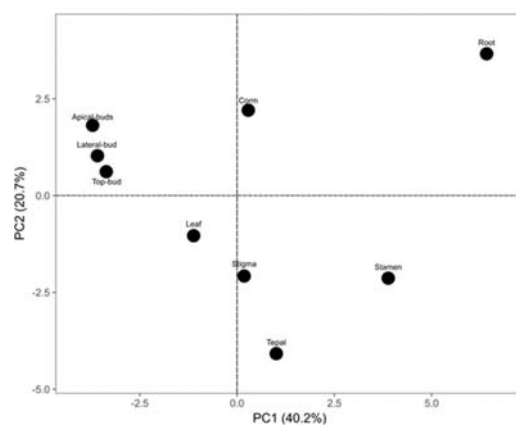
تعداد خانواده ژن‌های NBS-LRR در بین گونه‌های مختلف گیاهی بسیار متفاوت است و مطالعات متعددی نشان داده‌اند که هیچ ارتباط مستقیمی بین فراوانی ژن‌های NBS-LRR و اندازه ژنوم یا تعداد کل ژن‌های شناسایی شده وجود ندارد. در یک مطالعه که توسط مایرز و همکاران (۲۰۰۳) صورت گرفت، تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی ژن‌های کدکننده NBS وجود ۱۴۹ ژن کدکننده NBS-LRR را در آرآیدوپسیس نشان داد (Meyers *et al.*, 2003). در مطالعه‌ی دیگری به تجزیه و تحلیل بیان ژن در ژنوتیپ‌های مختلف نخود در پاسخ به آلودگی (*Fusarium oxysporum f.sp. ciceri*) پرداخته شد. در مطالعه مذکور چهارده ژن NBS-LRR با بیان متفاوت در نخود شناسایی شدند که نشان از نقش مؤثر این ژن‌ها در مقاومت علیه بیماری پژمردگی فوزاریوم بود (Priyadarshini *et al.*, 2023). همچنین تعداد ژن‌های NBS-LRR بین گونه‌های گیاهی و حتی در زیرگونه‌های گیاهی که باهم قرابت ژنتیکی دارند تفاوت زیادی دارد (Alsamman *et al.*, 2023). به عنوان مثال، در خانواده سولاناسه تعداد ژن NBS-LRR در سیب‌زمینی حدوداً دو برابر بیشتر از ژن‌های موجود در گوجه‌فرنگی و فلفل است (Qian *et al.*, 2017). با مقایسه نتایج حاصل از این مطالعه با سایر مطالعات پیشین باید به این نکته اشاره کرد که عوامل متعددی مانند اندازه ژنوم، توزیع و پراکنش ژن‌ها، انتخاب طبیعی و بهنجاری می‌توانند بر تعداد اعضای



شکل ۳. پروفایل بیان ژن‌های NBS-LRR شناسایی شده در بافت‌های مختلف زعفران  
Figure 3. Expression profile of NBS-LRR genes identified in different tissues of saffron



شکل ۴. نقشه حرارتی بیان ژن‌های خانواده NBS-LRR در بافت‌های مختلف زعفران  
Figure 4. Heat map of of NBS-LRR family gene expression across different saffron tissues



شکل ۵. تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) بیان ژن در انواع بافت‌های زعفران  
Figure 5. Principal component analysis (PCA) of gene expression in different saffron tissues

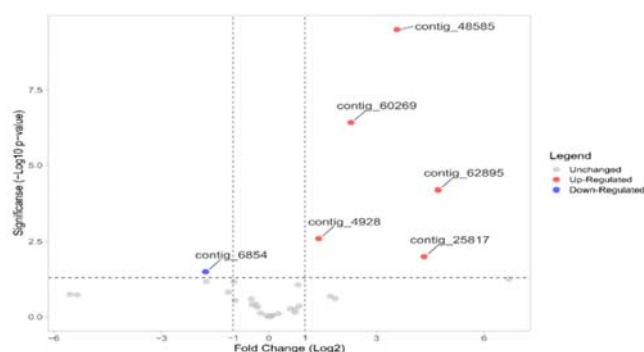
در تیمار ۷۲ ساعت نسبت به تیمار ۴۸ ساعت میزان بیان ژن‌ها بیشتر شده و به ترتیب در LRR1 بیشتر از LRR2 بوده و همینطور شاهد بیان کمتری در مقایسه با این دو ژن دارد (شکل ۷).

در گیاهان، ژن‌های متعددی در پاسخ به بیمارگر فعال یا خاموش می‌شوند و همچنین ممکن است بیان آن‌ها افزایش یا کاهش پیدا کند. بنابراین بررسی بیان متمایز ژن‌ها از جمله NBS-LRR یکی از روش‌های مهم برای مشخص کردن اساس زیستی سیستم‌های بیولوژیک است. میزان بیان بالا و پایین ژن NBS-LRR به عنوان یک عامل مهم در پاسخ‌های دفاعی در پاسخ در بنه زعفران علیه بسیاری از بیمارگرها می‌باشد. در همین راستا مطالعه‌ای توسط احمد و همکاران (۲۰۲۴) به آنالیز گسترده ژنومی ژن‌های NBS-LRR در بازه زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از آلودگی با بیمارگر سوختگی آلترناریا پرداختند (Ahmed *et al.*, 2024). نتایج حاصل از داده‌های RNA-seq این مطالعه نشان داد که در تیمار ۴۸ ساعت بعد از تلقیح، تعداد ۳۳۹۶ و ۲۳۲۳۹ توالی به ترتیب دارای بیان بالا و پایین بودند همچنین در تیمار ۷۲ ساعت بعد از تلقیح، ۴۰۲۳ توالی کاهش و ۲۱۱۶ توالی افزایش بیان نشان دادند (Ahmed *et al.*, 2024). همچنین در این مطالعه خواص فیزیکوشیمیایی، ساختار ژن و تجزیه و تحلیل موتیف، هستی شناسی ژن‌ها و حاشیه نویسی عملکردی مورد بررسی قرار گرفت که نشان از اهمیت این ژن در برنامه‌های اصلاحی است.

**بررسی روند تغییرات بیان ژن‌های شناسایی شده**  
بر اساس بررسی بیان این سیلیکو (*in silico*) ژن‌های شناسایی شده (داده‌های بیانی به دست آمده از مطالعه لوو و همکاران (۲۰۲۳)، (شکل ۶) مشخص شد که از بین توالی‌های شناسایی شده، توالی‌هایی با شناسه contig\_۶۲۸۹۵ و contig\_۲۵۸۱۷ و contig\_۴۸۵۸۵ و contig\_۶۰۲۶۹ و contig\_۴۹۲۸ پس از تیمار قارچی افزایش بیان و ژن‌هایی با شناسه contig\_۵۸۵۴ بیان پایین تری نسبت به شاهد داشتند. بیشترین میزان افزایش بیان مربوط به contig\_۶۲۸۹۵ و پس از آن به contig\_۲۵۸۱۷ اختصاص داشت که از بین ژن‌هایی با بیان افتراقی بالا، این دو ژن به دلیل دارا بودن بیان بالاتر، برای آزمایش ریل تایم انتخاب شدند (Luo *et al.*, 2023).

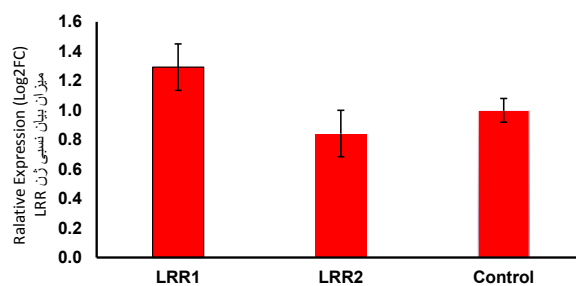
#### آنالیز بررسی بیان ژن NBS-LRR

موتیف LRR معمولاً در تعاملات پروتئین-پروتئین نقش دارد و مسئول شناسایی بیمارگرها است. در این مطالعه، میزان بیان نسبی ژن‌های انتخاب شده (contig\_۶۲۸۹۵ و contig\_۲۵۸۱۷) پس از انجام واکنش Real time-PCR و آنالیز داده‌ها به روش  $\Delta\Delta CT$  محاسبه شد. با توجه به شکل‌های ۷ و ۸ می‌توان چنین اظهار نمود که در هر دو ژن تیمار ۴۸ ساعت بیان کمتری نسبت به تیمار ۷۲ ساعت داشته است و همچنین در تیمار ۴۸ ساعت و تیمار ۷۲ ساعت بیان ژن LRR1 در مقایسه با LRR2 بیشتر شده است. در تیمار ۴۸ ساعت با توجه به شکل ۷ میزان بیان LRR1 بیشتر بوده و همینطور بیان شاهد نسبت به LRR2 بالاتر است.



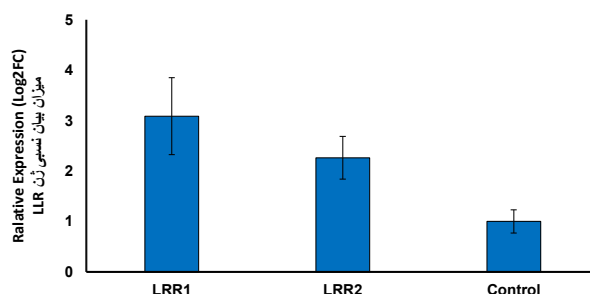
شکل ۶. نمودار آتشفشانی ژن‌های منتخب با بیان افتراقی

Figure 6. The volcanic plot for selected differentially expressed genes (DEGs)



شکل ۷. بیان نسبی ژن‌های NBS-LRR مربوط به بنه زعفران ۴۸ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*

**Figure 7.** Relative expression of the NBS-LRR gene in saffron corms 48 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*



شکل ۸. بیان نسبی ژن NBS-LRR مربوط به بنه زعفران ۷۲ ساعت پس از تلقیح با قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*

**Figure 8.** Relative expression of the NBS-LRR gene in saffron corms 72 hours post-inoculation with *Fusarium oxysporum f.sp. Gladioli*

بیولوژیکی مرتبط با ایجاد پاسخ‌های دفاعی گیاه میزبان در برابر تنش نقش داشتند. نتایج حاصل از مطالعه حاضر و محمودی و همکاران (۲۰۲۴) نشان دهنده وجود یک شبکه تنظیم کننده ژن را در مسیرهای برهمکنش گیاه با بیمارگر نشان می‌دهد (Mahmoodi et al., 2024).

بنابراین تفاوت اصلی گیاه حساس و مقاوم در شناسایی به موقع بیمارگر مهاجم و فعال‌سازی سریع و موثر مکانیسم‌های دفاعی گیاه است که احتمالاً بیان بالای ژن LRR1 در مقایسه با LRR2 نشان دهنده نقش مهم این ژن در پاسخ اولیه گیاه به آلودگی قارچی است. همچنین روند بیان متفاوت LRR نسبت به شاهد می‌تواند به مکانیسم مولکولی متفاوتی برای درک و کنترل بیمارگر اشاره نمود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که دوره زمانی برای ارزیابی پاسخ‌های متفاوت گیاه به آلودگی بیمارگر متفاوت است. بنابراین بیان و تنوع بالای دمین‌های LRR و با توجه به نقش آن‌ها در شناسایی سیگنال‌های ژن Avr می‌تواند به افزایش مقاومت گیاه علیه نژادهای خاص بیمارگرها کمک شایانی کند.

مقایسه نتایج حاصل از واکنش Real time-PCR در هر دو بازه‌ی زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که LRR1 (contig\_۶۲۸۹۵) بیان بالاتری نسبت به LRR2 (contig\_۲۵۸۱۷) نشان می‌دهد و بیان در بازه زمانی ۷۲ ساعت بیشتر از بیان ۴۸ ساعت بود. بیان ژن‌های LRR1 در بازه زمانی بیشتری بعد از تلقیح با قارچ فوزاریوم بیان می‌شود (شکل‌های ۷ و ۸) و احتمالاً این ژن‌های نقش مهمی در فعال کردن مکانیسم دفاعی گیاه علیه بیمارگر دارد که با نتایج احمد و همکاران (۲۰۲۴) مطابقت دارد (Ahmed et al., 2024). همچنین در مطالعه‌ای توسط محمودی و همکاران (۲۰۲۴) با هدف شناسایی و بررسی بیان ژن‌های lncRNA در گیاهچه‌های سیب زمینی آلوده به ویروس PVY پرداختند (Mahmoodi et al., 2024). نتایج این مطالعه نشان داد که از میان ۷۶۹ عدد ژن با بیان افتراقی، تعداد ۳۱۰ ژن کاهش بیان و ۴۵۹ عدد ژن افزایش بیان نشان دادند. طبق نتایج این بررسی، تعداد زیادی از ژن‌های هم بیان با lncRNAهای پیش‌بینی‌شده در فرآیندهای

### نتیجه‌گیری و پیشنهادها

زعفران از مهم‌ترین گیاهان دارویی جهان است که به دلایلی از جمله نیاز آبی کم، سهولت در عملیات کشت و کار، سودآوری، به صورت گسترده‌ای در ایران و برخی دیگر از کشورها کشت می‌شود. چون تکثیر زعفران از طریق کشت بنه صورت می‌گیرد و بنه‌ها چندین ساله در خاک مزارع ماندگار هستند، از این رو، بیماری پوسیدگی ناشی از قارچ فوزاریوم کشت این گیاه با ارزش را تهدید می‌کند. توسعه واریته‌های مقاوم به بیماری می‌تواند یکی از راهکارهای موثر در این زمینه باشد. بنابراین کاوش و شناسایی ژن‌های مرتبط در پاسخ‌های دفاعی گیاه کمک زیادی به مدیریت بیمارگرهای گیاهی می‌کند. در این مطالعه به بررسی تغییرات ترنسکریپتوم و شناسایی خانواده‌ی ژنی مهم NBS-LRR در بنه گیاه زعفران در پاسخ ایمنی علیه بیمارگرهای قارچی *Fusarium oxysporum sp. Gladioli* پرداخته شد. تجزیه و تحلیل ترنسکریپتوم بنه زعفران با استفاده از روش‌های RNA

seq صورت گرفت. نتایج این مطالعه منجر به مستندسازی تعداد ۶۳۳۲۶ ژن شد. از بین این ژن‌های مستندسازی شده، بیشترین و کمترین بیان ژن‌ها به ترتیب مربوط به بافت جوانه و ریشه بود. از بین این ژن‌های مستندسازی شده، بیشترین بیان ژن‌ها در بافت جوانه مشاهده شد و کمترین بیان بعد از ریشه مربوط به بافت‌های پرچم و پیاز بود. همچنین در این مطالعه، با بررسی میزان بیان ژن NBS-LRR مقاومت گیاه زعفران در برابر آلودگی به قارچ فوزاریوم در مرحله دفاعی ETI که ایمنی ناشی از افکتور است، سنجیده شد. این یافته‌ها بینش‌های مهمی را در مورد NBS-LRRهای در پاسخ به بیمارگر پژمردگی فوزاریوم ارائه می‌دهند، که می‌توانند به عنوان اهداف محوری برای برنامه‌های مولکولی و مهندسی ژنتیک با هدف افزایش مقاومت به بیماری در گیاه زعفران باشد.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

### References

- Ahmad, T., Bashir, A., Farooq, S., & Riyaz Ul Hassan, S. (2022). Burkholderia gladioli E39CS3, an endophyte of Crocus sativus Linn., induces host resistance against corm rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 495-508.
- Ahmed, R., Dey, K. K., Senthil-Kumar, M., Modi, M. K., Sarmah, B. K., & Bhorali, P. (2024). Comparative transcriptome profiling reveals differential defense responses among *Alternaria brassicicola* resistant *Sinapis alba* and susceptible *Brassica rapa*. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1251349.
- Alsamman, A. M., Mousa, K. H., Nassar, A. E., Faheem, M. M., Radwan, K. H., Adly, M. H., Elakkad, T. A. (2023). Identification, characterization, and validation of NBS-encoding genes in grass pea. *Frontiers in Genetics*, 14, 1187597.
- Chiang, Y.-H., & Coaker, G. (2015). Effector triggered immunity: NLR immune perception and downstream defense responses. *The Arabidopsis Book*, 13-19.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., & Staskawicz, B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124(4), 803-814.
- Dangl, J.L., & Jones, J.D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, 411(6839), 826-833.
- Darvishian, A., Nazarian Firouzabadi, F., Darvishnia, M., & Ismaili, A. (2022). Transcriptome analysis of saffron corm in response to the most important fungal infection. *ph.D Thesis, Lorestan University*.
- Fallahzadeh, M. V. (2018). Innate immunity in plants. *Biology, Environmental Science*, 343-361.
- Golmohammadi, F. (2014). Saffron and its farming, economic importance, export, medicinal characteristics, and various uses in South Khorasan Province-East of Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3(5), 566-596.
- Hu, J., Liu, Y., Tang, X., Rao, H., Ren, C., & Chen, Pei, J. (2020). Transcriptome profiling of the flowering transition in saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientific reports*, 10(1), 9680.
- Jacob, F., Vernaldi, S., & Maekawa, T. (2013). Evolution and conservation of plant NLR functions. *Frontiers in immunology*, 4, 297.
- Keen, N. (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annual review of genetics*, 24, 447-463.

- Khaledi, N. (2020). Evaluation of cell wall degrading enzymes of *Fusarium* species associated with root and corm of saffron in South Khorasan province. *Saffron agronomy and technology*, 8(2), 243-259.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Lolle, S., Stevens, D., & Coaker, G. (2020). Plant NLR-triggered immunity: from receptor activation to downstream signaling. *Current opinion in immunology*, 62, 99-105.
- Luo, J., Zhang, A., Tan, K., Yang, S., Ma, X., Bai, X., & Bai, J. (2023). Study on the interaction mechanism between *Crocus sativus* and *Fusarium oxysporum* based on dual RNA-seq. *Plant Cell Reports*, 42(1), 91-106.
- Mahmoodi, E., Nasrollahnejad, S., Ahmadvand, R., & Tohidfar, M. (2024). We are identifying and predicting the function of long non-coding RNAs in the expression profile of PVY-infected potatoes. *Agricultural biotechnology journal*. Electronic ISSN: 2228-6500. P118-130.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., & Michelmore, R. W. (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 15(4), 809-834.
- Priyadarshini, P., Sahu, S., Kalwan, G., Yadava, Y. K., Nagar, R., Rai, V., ... & Jain, P. K. (2023). Unraveling the mechanism of *Fusarium* wilt resistance in chickpea seedlings using biochemical studies and expression analysis of NBS-LRR and WRKY genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 124, 101958.
- Qian, L.-H., Zhou, G.-C., Sun, X.-Q., Lei, Z., Zhang, Y.-M., Xue, J.-Y., & Hang, Y.-Y. (2017). Distinct patterns of gene gain and loss: Diverse evolutionary modes of NBS-encoding genes in three Solanaceae crop species. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(5), 1577-1585.
- Saeedi Rad, M. H., Mahdinia, A., & Neshat, S. Z. (1400). Challenges and solutions to develop the mechanization of saffron cultivation. *Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research and Education center*, 3, 17-24.
- Shah, Z. A., Mir, R., Matoo, J. M., Dar, M. A., & Beigh, M. (2017). Medicinal importance of saffron: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(5), 2475-2478.
- Van Der Biezen, E. A., & Jones, J. D. (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in biochemical sciences*, 23(12), 454-456.
- Yue, J. X., Meyers, B. C., Chen, J. Q., Tian, D., & Yang, S. (2012). Tracing the origin and evolutionary history of plant nucleotide binding site-leucine rich repeat (NBS LRR) genes. *New Phytologist*, 193(4), 1049-1063.
- Zhang, M., Wu, Y.-H., Lee, M.-K., Liu, Y.-H., Rong, Y., Santos, T. S., ... Zhang, H.-B. (2010). Numbers of genes in the NBS and RLK families vary by more than four-fold within a plant species and are regulated by multiple factors. *Nucleic Acids Research*, 38(19), 6513-6525.
- Zhou, T., Wang, Y., Chen, J.-Q., Araki, H., Jing, Z., Jiang, K., & Tian, D. (2004). Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 402-415.



## Proteome analysis of susceptible and resistant genotypes of wild barley (*Hordeum spontaneum*) in response to drought stress

Hooman Shirvani<sup>1</sup>, Ali Ashraf Mehrabi<sup>2</sup>(ORCID: 0000000200603114), Mohsen Farshadfar<sup>3</sup>, Hooshmand Safari<sup>3</sup>, Ali Arminian<sup>1</sup>, Foad Fatehi<sup>4</sup>

1. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, Ilam University, Iran.

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agricultural Sciences, Shahed University, Tehran, Iran.

3. Forests and Rangelands Research Department, Kermanshah Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Kermanshah, Iran.

4. Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran.

Correspondence:

Ali Ashraf Mehrabi

Email: [amehrabi@shahed.ac.ir](mailto:amehrabi@shahed.ac.ir)

Received: 25, Jul. 2024

Accepted: 10, Dec. 2024

### How to cite:

Shirvani, H., Mehrabi, A.A., Farshadfar, M., Safari, H., Arminian, A., & Fatehi, F. (2024). Proteome analysis of susceptible and resistant genotypes of wild barley (*Hordeum spontaneum*) in response to drought stress. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 83-96. (DOI: [10.30473/cb.2024.71844.1975](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71844.1975))

### ABSTRACT

The wild barley (*Hordeum spontaneum*) plays a crucial role in enhancing drought resistance in cultivated barley varieties. The genetic diversity of wild barley genotypes in Iran indicates their superiority in drought tolerance and agronomic traits. Proteomic studies help identify key pathways involved in plant stress responses and facilitate the development of drought-resistant cultivars. In this research, based on the grain yield data of 114 wild barley genotypes under both rainfed and irrigated conditions over two agricultural years (2019-2020 and 2020-2021) and using the STS index, drought-resistant and sensitive genotypes were identified. The experiment was conducted under two conditions: absence of drought stress and severe drought stress, with various genotypes examined. After seedling growth, drought stress was applied at the two-leaf stage, based on soil field capacity (FC), at two levels: 90-95% and 25-30% of field capacity. Following protein extraction, IPG strips with pH 3-10 and 13 cm in length were used for the first dimension, while 14% polyacrylamide gel was used for the second dimension. Results from two-dimensional electrophoresis showed that 224 protein spots were reproducible. In the drought-resistant genotype, 32 spots and in the sensitive genotype, 29 spots exhibited significant changes. The resistant genotype had 22 spots with increased expression and 10 with decreased expression, while the sensitive genotype had 16 spots with increased expression and 13 with decreased expression. Eight spots showed shared expression. These results indicate that various proteins are differentially expressed in response to drought stress in resistant and sensitive genotypes, highlighting the diverse strategies of plants in coping with environmental stresses.

### KEYWORDS

Isoelectric focusing, Two-dimensional electrophoresis, Proteomics, STS index.





## مقدمه

جو یک محصول غله‌ای چند منظوره است که به‌طور گسترده در سراسر جهان کشت می‌شود و در میان غلات رتبه چهارم را دارد (راج و همکاران، ۲۰۲۳؛ لوکیناچ و جوکیچ، ۲۰۲۲). این گیاه دارای ویژگی‌های منحصربه‌فردی مانند بتا-گلوکان‌ها، فیبر محلول و ترکیبات زیست‌فعال مختلف است که آن را برای مصرف انسانی و خوراک دام ارزشمند می‌سازد (مگ و همکاران، ۲۰۲۳؛ لیو، ۲۰۲۳). جو زراعی (*H. vulgar*) و جد زراعی آن (*H. spontaneum*) به‌عنوان یک گیاه مدل مناسب و هم‌چنین با صرفه اقتصادی مناسب برای کشت بهره‌برداری ژنتیکی مناسب می‌باشند. هر دو گونه، دیپلوئید و قابل تلاقی با یکدیگر بوده و مجموعه‌ای از ابزار ژنومیکس مشتمل بر نقشه‌های لینکازی، داده‌های QTL، ESTها، کتابخانه‌های BAC و آرایه‌ها برای تجزیه ژنوم H که همولوگ ژنوم‌های A، B و D گندم هگزاپلوئید است، موجود می‌باشد (هیز و همکاران، ۲۰۰۳). نواحی غرب ایران، خاورمیانه و هلال حاصل‌خیز شامل مرکز تنوع جو وحشی می‌باشند (مورل، ۲۰۱۱؛ نوو و چن، ۲۰۱۱).

از طرفی تنش خشکی به‌عنوان تهدید قابل توجهی برای بهره‌وری محصول در سطح جهانی به شمار می‌رود که بر فرآیندهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی گیاهان تأثیر می‌گذارد (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴؛ برائور و همکاران، ۲۰۲۴). به علت کمبود منابع آب و در نتیجه بروز تنش برای گیاه در ایران، عملکرد گیاهان به‌شدت کاهش می‌یابد. در همین راستا درک اثر تنش خشکی و رژیم‌های آبی بر عملکرد، می‌تواند گام مؤثری در توسعه ژنوتیپ‌هایی با عملکرد بالا و پایدار داشته باشد (گارسا دل مورال، ۲۰۲۳). شبکه پیچیده آبشارهای سیگنالینگ، اصلاحات اپی‌ژنتیکی و تنظیم هورمونی، از جمله فیتوهورمون‌ها مانند اسید آبسزیک، آکسین، سیتوکینین و اتیلن نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی ایفا می‌کنند و پیچیدگی مکانیسم‌های سازگاری گیاهان در شرایط کمبود آب را برجسته می‌کنند (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴؛ سیم و همکاران، ۲۰۲۴). درک این پاسخ‌ها در سطوح مولکولی، سلولی و اندام برای توسعه

گونه‌های زراعی مقاوم به خشکی با صفات انعطاف‌پذیری بیشتر و پایداری عملکرد بالاتر در مواجهه با شرایط آب و هوایی متغیر ضروری است. (گوسین و همکاران، ۲۰۲۴).

پروتئین‌ها نقش مهمی در پاسخ گیاهان به تنش خشکی (کمبود آب) دارند. برخی مطالعات، پروتئین‌های کلیدی مانند پروتئازها و مهارکننده‌های پروتئاز را شناسایی کرده‌اند که در مکانیسم‌های سازگاری با خشکی در گیاهان دخیل هستند (مولای و نگارا، ۲۰۲۳). واژه پروتئوم (Proteome) به تمام پروتئین‌هایی اطلاق می‌گردد که به وسیله موجود زنده تولید می‌شود. برخلاف ژنوم (Genome) که دارای ماهیتی ثابت و پایدار است، پروتئوم ماهیتی دینامیک و متغیر دارد و به عنوان پروتئین‌های موجود در یک سلول، بافت و یا اندام ارگانیسم در یک مقطع زمانی مشخص تعریف می‌شود. این پروتئوم است که فاصله بین ژنوم و مکانیسم مولکولی رفتار سلولی را پر می‌کند (مچینف، ۲۰۰۳). پروتئومیک علم مطالعه گسترده پروتئوم شامل بیان، تغییرات پس از ترجمه و مطالعه برهم کنش پروتئین‌ها با سایر مولکول‌هاست. در حقیقت پروتئومیک دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن‌های بیان شده توسط سلول، بافت یا اندامک خاص تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند (گیگی اس پی و همکاران، ۲۰۰۰).

جهت غلبه بر طیف گسترده تنش‌های زیستی و غیرزیستی گیاهان مکانیسم‌های پیچیده‌ای را تکامل داده‌اند. تنش‌ها شبکه‌های پیچیده‌ای از سیگنال‌دهی انطباقی و دفاعی را فعال می‌کنند که منجر به تغییر در بیان ژن‌ها، دگرگونی‌های متابولیکی، تغییرات پروتئومیکی و کاهش سرعت رشد می‌شود؛ این فرآیندها در نهایت موجب افزایش مقاومت یا تحمل گیاه می‌گردند. مطالعه برهمکنش گیاه-محیط، بطور معمول با استفاده از تکنیک‌های بیوشیمیایی، ژنتیک و تکنیک‌های ترانسکریپتومیک صورت می‌پذیرد. پروتئومیک در حال حاضر سهم بزرگی در آشکار سازی اجزای دخیل در درک و ترانس‌اسی تنش دارد. برای چنین مطالعاتی، می‌توان از واژه "پروتئومیک محیطی" استفاده نمود (جوزف و جینی، ۲۰۱۰).

می‌باشد. Si انحراف معیار شاخص است که بعد از استاندارد کردن STS محاسبه می‌شود. b نیز ضریب رگرسیون خطی بین میانگین عملکرد در همه محیط‌ها می‌باشد. بر اساس نتایج شاخص‌های مبتنی بر عملکرد دانه در مزرعه، ژنوتیپ موچش از کردستان ( $35.0571^{\circ} \text{ N}$ ,  $47.1522^{\circ} \text{ E}$ , MSL: 1368, Accession code: IUGB-01975) به عنوان ژنوتیپ حساس، و ژنوتیپ کوزران از کرمانشاه ( $34.4965^{\circ} \text{ N}$ ,  $46.5982^{\circ} \text{ E}$ , MSL: 1368, Accessioncode: IUGB-01657) به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش خشکی با استفاده از روش امتیازدهی تحمل تنش (STS) انتخاب گردیدند.

### آزمایشات گلخانه‌ای

ابتدا بذور هر یک از ژنوتیپ‌های مورد مطالعه درون گلدان‌های پلاستیکی ( $20 \times 120$  سانتی‌متری) کشت شدند. شرایط رشدی گلخانه با دوره نوری ۸:۱۶ (روشنایی: تاریکی) و شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس در حد مطلوب برای رشد گیاهچه‌ها بهینه گردید. محتوای هر گلدان نیز شامل مخلوطی از خاک زراعی و ماسه با نسبت ۳:۱ (ماسه : خاک) در نظر گرفته شد. پس از جوانه‌زنی، در هر گلدان تعداد پنج بوته نگهداری و مابقی گیاهچه‌ها حذف شدند. آبیاری به صورت منظم و بر اساس نیاز گیاه هفته‌ای دو الی سه بار صورت گرفت. ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به خشکی در یک آزمایش فاکتوریل جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار بیولوژیکی در شرایط گلخانه کشت شدند. در این آزمایش دو سطح شاهد و تنش خشکی به عنوان فاکتور اول و ژنوتیپ‌های مورد بررسی به عنوان فاکتور دوم در نظر گرفته شدند. پس از رشد و استقرار گیاهچه‌ها شرایط اعمال تنش خشکی در مرحله دو برگ و براساس ظرفیت زراعی خاک (FC) و در دو سطح فاقد تنش خشکی (۹۰-۹۵ درصد FC) و تنش خشکی شدید (۲۵-۳۰ درصد FC) تعیین شد. تنش خشکی به مدت سه هفته تا ابتدای مرحله ساقه‌دهی (بادر، ۲۰۰۲) اعمال و پس از ظهور علائم آن مقدمات لازم جهت نمونه‌برداری و ارزیابی صفات فراهم گردید. پس از رشد و استقرار کامل

در این پژوهش، شناسایی و بررسی پروتئین‌ها بر اساس تکنیک الکتروفورز دو بعدی صورت گرفته و هدف آن شناسایی و معرفی پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های مقاومت به تنش خشکی در جو وحشی است. نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند به عنوان مبنایی برای انتخاب و به‌نژادی ارقام مقاوم به خشکی در شرایط اقلیمی ایران مورد استفاده قرار گیرد.

### روش‌شناسی پژوهش

#### محاسبه شاخص نمره تحمل به تنش (STS)

برای انتخاب ژنوتیپ‌های حساس و مقاوم به خشکی، در سال‌های زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۳۹۹-۱۴۰۰، تعداد ۱۱۴ ژنوتیپ جو وحشی که از چهار استان غربی ایران جمع‌آوری شده بودند تحت شرایط تنش خشکی و رطوبت نرمال ارزیابی شدند. این آزمایش با استفاده از طرح آگمنت با پنج تکرار و نه والد تکراری در ایستگاه تحقیقاتی ماهیدشت وابسته به مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان کرمانشاه انجام گردید.

به دست آوردن یک افزایش ژنتیکی در عملکرد در محیط‌های تنش خشکی و بدون تنش خشکی برای اصلاح‌گران گیاهی، چالش‌های زیادی را به همراه داشته است. با این حال پیشرفت در میزان عملکرد دانه در محیط‌های مساعد بالاتر بوده است (ریچارد و همکاران، ۲۰۰۲). بنابراین شاخص‌های خشکی که براساس کاهش عملکرد ارقام تحت شرایط تنش خشکی می‌باشند، برای گزینش ارقام مقاوم به خشکی با شرایط نرمال مقایسه می‌شوند (میترا، ۲۰۰۱). مطابق با روش‌های چند متغیره پیچیده معادله STS به صورت زیر محاسبه می‌شود (عبدالشاهی و همکاران، ۲۰۱۳؛ ساردوئی نسب و همکاران، ۲۰۱۴):

$$STS = GMP + STI + HMP + MP - TOL - SSI - b$$

شاخص‌ها براساس فرمول زیر استاندارد شدند:

$$Z_{ij} = (X_{ij} - \bar{X}) / S_i$$

$Z_{ij}$  در واقع مقدار استاندارد شده ژنوتیپ  $i$ ام در شاخص  $j$ ام می‌باشد.  $X_{ij}$  مقدار ژنوتیپ  $i$  در شاخص  $j$ ام می‌باشد و  $\bar{X}$  میانگین تمام ژنوتیپ‌ها برای شاخص  $j$ ام

مولار Urea، ۲ مولار Tiurea، ۴ درصد CHAPS، ۳۵ میلی مولار Tris، ۸۰ میلی مولار DTT و حداکثر ۲ درصد (IPG Buffer) و ۳-۲ میکرولیتر PMSF اضافه گردید، سپس رسوب در آن خوب حل شده و یک ساعت در دمای محیط قرار داده شد.

تیوپها در دمای محیط به مدت ۱۵ دقیقه و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. از مایع رویی مقدار کمی را برای تعیین غلظت جدا گردید (حدود ۵۰ میکرولیتر). طبق نتایج تعیین غلظت نمونه در دمای ۸۰- سانتی گراد قرار داده شدند. تعیین غلظت پروتئین مورد نظر به روش برادفورد (۰/۱ گرم رنگ G-250، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد و ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصد) انجام گرفت.

#### بعد اول: ایزوالکتریک فوکوسینگ<sup>۵</sup>

##### رهیدراسیون نوارهای IPG

ابتدا محلول رهیدراسیون تهیه گردید، انتخاب محلول رهیدراسیون مناسب بستگی به میزان محلولیت پروتئین نمونه دارد. یک محلول رهیدراسیون معمولاً دارای اوره، شوینده غیر یونی یا ژوئیر یونیک (IPG بافر)، DTT، IPG بافر مناسب و رنگ می باشد. سینی رهیدراسیون تمیز و کاملاً خشک شد و با استفاده از پیچهای مخصوص متعادل گردید. نوارهای IPG را به تعداد لازم از فریزر بیرون آورده و اجازه داده شد تا به دمای اتاق برسند. در این تحقیق از IPG با pH ۳-۱۰ و ۱۳ سانتی متر استفاده گردید. پروتئنیهای استخراج شده به آرامی در امتداد شیارهای سینی پخش گردید طوری که در کل طول آن میزان یکنواختی جای گیرد. نوار IPG را برداشته و محافظ آن را جدا کرده و طوری که قسمت ژل آن رو به پایین باشد در شیار قرار داده شد. باید دقت شود که حباب ایجاد نشود. در انتها روی هر نوار ۳ میلی لیتر روغن معدنی ریخته شد. رهیدراسیون کامل در طول شب انجام گرفت.

گیاهچهها، نمونه برداری در یک بازه زمانی معین و یکسان از گیاهچهها صورت گرفت.

#### استخراج پروتئین

برگهای جو وحشی با استفاده ازت مایع، بخوبی پودر گردید بطوری که یک پودر نرم و یکدستی بوجود آید. نمونهها بصورت ۰/۱ گرمی وزن و در میکروتیوپهای دو میلی لیتری ریخته شدند. به هر تیوپ حاوی نمونه حدود ۲۰۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (۲۰ میلی مولار Tris-HCl، pH= 8.5، ۲۵۰ میلی مولار Sucrose، ۱ میلی مولار DTT<sup>۱</sup>، ۱۵ میلی مولار EDTA<sup>۲</sup> و ۱ درصد Triton x-100) و ۲۰ میکرولیتر بازدارنده پروتئازها (PMSF) اضافه و با پستل بخوبی بهم زده شد تا یک مخلوط همگن بدست آمد، سپس تیوپ حدود یک الی دو دقیقه ورتکس گردید و ۱۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد. سپس تیوپها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در این مرحله مایع رویی را برداشته و در تیوپهای جدید ریخته و رسوب باقی مانده دور ریخته شد. روی هر تیوپ حدود ۱۰ برابر حجم مایع رویی TCA/ACETON (۱۰ گرم TCA، ۲۰ میلی مولار DTT و تا ۱۰۰ میلی لیتر ACETON) سرد ۱۰ درصد اضافه و ورتکس گردید و یک شب در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد گذاشته شد. به هر تیوپ ۲۰۰۰ میکرولیتر محلول شستشوی (۲۰ میلی مولار DTT و تا ۱۰۰ میلی لیتر ACETON) سرد (۲۰-°C) اضافه و با پستل رسوب ته ویال قطعه قطعه گردید. تیوپها در دمای ۲۰-°C به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند. تیوپها را درآورده و در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از دور ریختن آخرین مایع رویی، تیوپها ۲۰ دقیقه در دمای محیط گذاشته شد تا رسوب خشک شود. به ازای هر ۲۰ میلی گرم رسوب، ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر بافر لایز (۸)

1. Dithio Threitol
2. Ethylen dinitro tera acetic acid
3. Protease Inhibitor
4. Trichloroacetic acid

### متمرکز کردن ایزوالکتریک پروتئین‌ها

نوارهای IPG را از سینی خارج کرده و به پشت روی کاغذ تمیز قرار داده شد تا روغن اضافی آن گرفته شود. نوارهای IPG را با پنس گرفته و با پیست حاوی آب مقطر دو بار تقطیر به آرامی شسته شدند. سپس نوارها را از طرف طلق روی کاغذ صافی قرار داده تا آب آن گرفته شود. نوارها رو به بالا (ژل به سمت بالا) در کانال‌های دستگاه ایزوالکتریک قرار داده شدند. قطب مثبت نوار می‌بایست سمت مثبت سینی و قطب منفی هم سمت منفی قرار می‌گرفت. روی ژل با روغن معدنی پوشانده شد. دستگاه IEF را برنامه ریزی کرده (جدول ۱) و پس از اتمام برنامه بلافاصله ژل‌ها درون محلول متعادل‌سازی و یا در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جدول ۱. برنامه دستگاه IEF

Table 1. IEF device program

| ولتاژ     | مرحله    | زمان     |
|-----------|----------|----------|
| Voltage   | Stage    | Time     |
| Volt 500  | Gradient | 1 hour   |
| Volt 500  | step     | 2 hour   |
| Volt 5000 | Gradient | 2.5 hour |
| Volt 5000 | step     | 4 hour   |

### بعد دوم SDS-PAGE

برای هر نوار ۱۰ میلی لیتر محلول متعادل‌سازی (جدول ۲) از فریزر بیرون آورده شد تا به دمای اتاق برسد. سپس به دو قسمت مساوی ۵ میلی‌لیتری تقسیم شده و هر کدام در لوله آزمایش سرپوش‌دار ریخته شد. نوارهای IPG نیز از فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد بیرون آورده شد و در محلول متعادل‌سازی اول که حاوی یک درصد DTT است گذاشته و به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد. محلول اول کاملاً دور ریخته و نوارها با آب مقطر دو بار تقطیر شسته و سپس با کاغذ صافی آب آن گرفته و نوارها در محلول دوم که حاوی یدواستامید پنج درصد به مدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه شیکر قرار داده شد.

در حین انجام این مرحله آگارز یک درصد را در بافر الکتروود (۳ گرم Tris، ۱۴/۴ گرم Glycine و ۱ گرم SDS) آماده کرده و حرارت داده تا حل گردید. نوارها با آب مقطر

شسته و بر روی ژل پلی اکریل آمید پلیمریزه شده در قالب شیشه‌ای قرار داده شد، سپس دستگاه الکتروفورز با برنامه مورد نظر روشن گردید. الکتروفورز به روش ژل پلی اکریل آمید با ژل ۱۴ درصد انجام شد (لاملی، ۱۹۷۰). پس از اتمام الکتروفورز ژل‌ها از شیشه خارج گردید. حدود ۲۵۰ میلی‌لیتر محلول رنگ کوماسی بلو G250 (۱ گرم رنگ کوماسی بلو بلرینانت G250، ۳۴۰ میلی‌لیتر متانول، تا حجم یک لیتر آب مقطر، ۳۵ میلی‌لیتر فسفریک اسید و ۱۷۰ گرم آمونیوم سولفات  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) اضافه گردید. سپس روی ژل ۲۵۰ میلی لیتر محلول رنگ‌بر (۱۰۰ میلی‌لیتر متانول، ۵۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۳۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر) ریخته شد. اینکار تا زمانی که زمینه ژل کاملاً شفاف شود انجام گردید. ژل‌ها با دستگاه اسکنر مدل Epson expression اسکن شدند. بعد از اسکن کردن، ژل‌ها با نرم افزار Melanie 9 آنالیز شدند، در نهایت هر لکه پروتئینی با تغییر بیان معنی‌دار، با توجه به وزن مولکولی، نقطه ایزوالکتریک و شکل لکه با جستجو در مقالات مرتبط و سایت Uniprot به طور احتمالی شناسایی گردید. نمودارها با استفاده از نرم‌افزارهای GraphPad Prism 8 و Excel رسم گردید.

### جدول ۲. محلول متعادل سازی

Table 2. Equilibration solution

| ماده             | غلظت           |
|------------------|----------------|
| Material         | Concentration  |
| Tris-Hcl pH=7.5  | 30 millimolar  |
| Urea             | 7 molar        |
| Glycerol         | 30%            |
| SDS              | 2%             |
| Bromophenol blue | A few crystals |

### یافته‌های پژوهش

تحمل خشکی یک صفت کمی و پیچیده با جنبه‌های مختلف مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی است که توسط تعداد زیادی ژن کنترل می‌شود (بلوم، ۲۰۱۰). بنابراین انتخاب هم زمان برای همه معیارهای مهم انتخاب با در نظر گرفتن قابلیت‌های توارثی و همبستگی آن‌ها با میزان تحمل خشکی مؤثرترین روش برای انتخاب ژنوتیپ‌های برتر می‌باشد. در این روش یک شاخص با

در وحشی تبت به سختی نشان می‌دهد (وانگ و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه دیگری بر روی پاسخ پروتئوم برگ جو تحت تنش شوری، بیش از ۵۰۰ لکه پروتئینی با تکرارپذیری بالا شناسایی شدند و تعداد ۱۲۴ لکه تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان دادند. با استفاده از طیف‌سنج جرمی MALDI-TOF-TOF، ۲۱ لکه پروتئینی شناسایی شد که شامل پروتئین‌هایی بودند که در مکانیسم‌های فتوسنتز، اکسایش-کاهش، ترجمه، انتقال سیگنال و انتقال پروتئین دخیل بودند (فاتحی و همکاران، ۲۰۱۱).

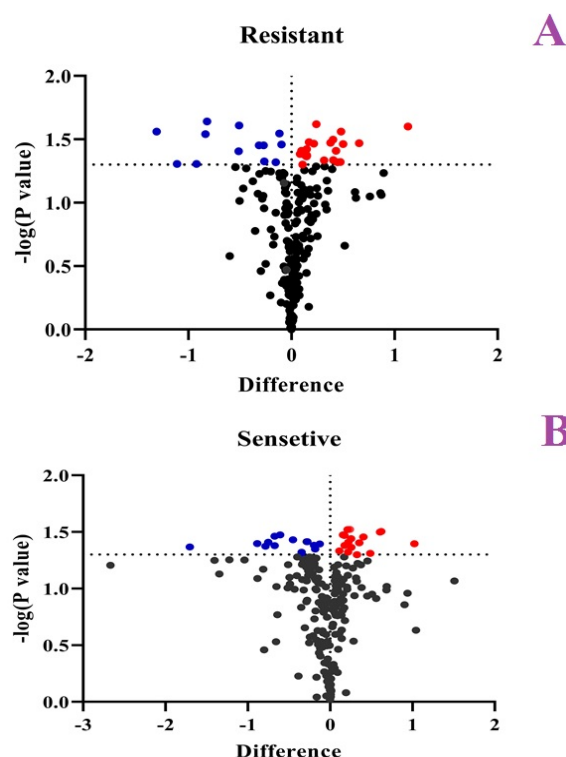
نقاط برچسب خورده و درصد حجمی نقاط به‌عنوان میزان تظاهر پروتئین‌ها در نظر گرفته شد. طبق دستورالعمل Inter Class Report ذکر شده در نرم افزار Melanie لکه‌هایی که درصد حجمی آن‌ها در مقایسه دو تیمار بیشتر از ۱/۵ و یا کمتر از ۰/۵ بوده و مقدار t-Test آنها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود به‌عنوان پروتئین‌های کاندیدا شناخته شدند. در حقیقت تعیین درصد حجمی لکه‌ها روش مناسبی برای بررسی تفاوت‌های کمی لکه‌ها بین ژل‌های مختلف یک تیمار و ژل‌های تیمارهای مختلف است. در آنالیز ژل الکتروفورز دو بعدی برای هر دو ژنوتیپ، ۲۲۴ نقطه پروتئینی که دارای تکرارپذیری بودند مشخص گردید. با توجه به نتایج حاصله از این تجزیه در ژنوتیپ مقاوم و حساس به ترتیب ۳۲ و ۲۹ لکه که دارای افزایش یا کاهش معنی‌داری بین دو ژنوتیپ بودند انتخاب شدند (شکل ۱ منحنی آتشفشانی این لکه‌ها را نشان می‌دهد).

در بررسی الگوی پروتئوم و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت جو تحت تنش شوری، ژنوتیپ مقاوم ۹۷ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار (۷۸ درصد افزایش و ۲۲ درصد کاهش بیان) و ژنوتیپ حساس ۹۴ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار (۳۷ درصد افزایش و ۶۳ درصد کاهش بیان) نشان دادند. طیف‌سنجی جرمی منجر به شناسایی پروتئین‌های درگیر در مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی و تولید انرژی شد (رسول‌نیا و همکاران، ۲۰۱۳). در بررسی تاثیر تنش خشکی بر صفات فیزیولوژیک و الگوی بیان پروتئین‌ها در جو، ژنوتیپ مقاوم یوسف ۲۳ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار و ژنوتیپ حساس مورکو ۳۰ لکه پروتئینی با تغییرات معنی‌دار نشان دادند (کشاورز نیا، ۲۰۱۳).

کمک کلیه صفات مورد ارزیابی تعریف و ژنوتیپ‌های ایده‌آل بر مبنای این شاخص منفرد گزینش می‌شوند (فیضیاصل و همکاران، ۲۰۱۰). معادله STS بسیار آسان‌تر از تجزیه به عامل‌ها است و پیشنهاد می‌شود به عنوان یک ابزار برای شناسایی ژنوتیپ‌های متحمل به خشکی و شوری از آن استفاده شود (عبدالشاهی و همکاران، ۲۰۱۳؛ ساردوئی نسب و همکاران، ۲۰۱۴). بر اساس نتایج شاخص‌های مبتنی بر عملکرد در مزرعه در سال‌های زراعی ۱۳۹۸-۱۳۹۹ و ۱۳۹۹-۱۴۰۰، ژنوتیپ موجش از کردستان به عنوان ژنوتیپ حساس، و ژنوتیپ کوزران از کرمانشاه به عنوان ژنوتیپ مقاوم به تنش رطوبتی انتخاب گردیدند (شیروانی و همکاران، ۲۰۲۴). ویژگی روش STS در این است که انتخاب بر مبنای یک شاخص مقاومت نمی‌باشد، بلکه همزمان چندین شاخص مد نظر قرار داده خواهد شد.

نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل پروتئومیک دو بعدی ژل‌ها نشان‌دهنده تفاوت‌های معنی‌داری بین ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس به تنش خشکی در گیاه جو وحشی است. بررسی‌های انجام‌شده بر روی لکه‌های پروتئینی نشان داد که هر دو ژنوتیپ، به روش‌های متفاوتی به تنش خشکی پاسخ می‌دهند. این تفاوت‌ها در بیان پروتئین‌های مختلف نشان‌دهنده مکانیسم‌های مختلفی است که گیاهان برای مقابله با شرایط تنش به کار می‌برند. فراوانی پروتئین‌ها تحت تنش خشکی در ژنوتیپ مقاوم نسبت به حساس بیانگر فعالیت‌های متابولیکی خاص برای مقابله با تنش خشکی است. فراوانی بیشتر یکسری از پروتئین‌ها در ژنوتیپ حساس نسبت به مقاوم نیز با توجه به مطالعات مختلف، به پروتئین‌های بازدارنده نسبت داده می‌شود.

در مطالعه آنالیز پروتئومی مقایسه‌ای ژنوتیپ جو وحشی تبتی (XZ5) مقاوم به خشکی و XZ54 حساس به خشکی) منجر به شناسایی ۳۸ پروتئین مرتبط با تحمل به خشکی شد که در دسته عملکردی فتوسنتز، پاسخ استرس، فرآیند متابولیک، انرژی و بیوسنتز اسید آمینه قرار گرفتند. از ۳۸ پروتئین، ۲۰ پروتئین در XZ5 تنظیم شده و به طور همزمان در XZ54 کاهش یافت، که اهمیت پروتئین‌های خاص مرتبط با تحمل به خشکی را در تحمل به خشکی



شکل ۱. منحنی آتشفشانی برای ۲۲۴ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری. A: ژنوتیپ مقاوم و B: ژنوتیپ حساس

رنگ قرمز: افزایش بیان، رنگ آبی: کاهش بیان و رنگ مشکی: غیر معنی دار می‌باشد.

**Figure 1.** Volcano plot for 224 reproducible protein spots. A: Resistant genotype and B: Sensitive genotype  
Red color: increased expression, blue color: decreased expression, and black color: non-significant.

طاہری و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی پروتئوم پاسخ به تنش خشکی در گیاه جو *Hordeum vulgare* L با استفاده از تکنولوژی DIGE عنوان داشتند از میان ۷۶۸ لکه پروتئینی دارای تکرارپذیری، ۳۷ لکه تغییرات معنی داری را به عنوان اثرات ژنوتیپ یا اثرات متقابل سطوح آبیاری و ژنوتیپ نشان دادند و در نهایت تجزیه طیف سنج جرمی با استفاده از MALDI-TOF-TOF منجر به شناسایی پروتئین‌هایی شد که در فرایندهای متابولیسم، انرژی، ساختار سلولی، واکنش‌های دفاعی، انتقال سیگنالی و تمایز سلولی نقش ایفاء می‌کنند. بوستانی و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه پاسخ پروتئوم برگ جو وحشی *H. marinum* در شرایط تنش شوری بیان کردند پروتئین‌های شناسایی شده شامل روییسکو، روییسکو اکتیواز، پروتئین‌های ریبوزومی، کولین فامیلی، پروتئین‌های متصل شونده به RNA، ملات دهیدروژناز

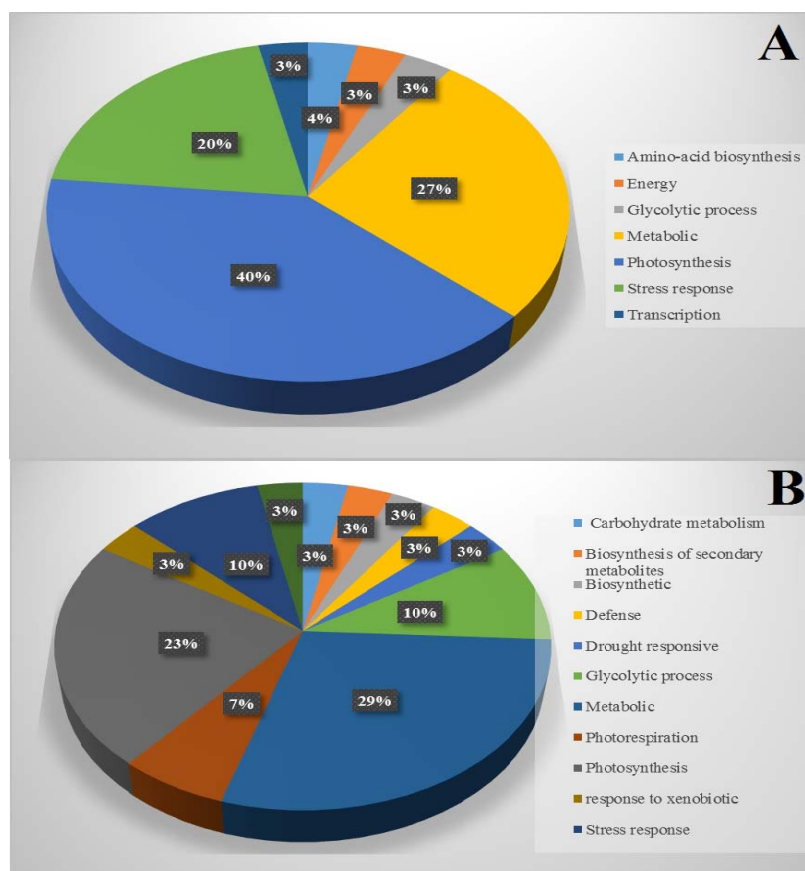
نتایج حاصل از ژل‌های دو بعدی دو ژنوتیپ حساس و مقاوم جو وحشی در شرایط عدم تنش خشکی (۹۰-۹۵ درصد FC) و تنش خشکی (۲۵-۳۰ درصد FC) نشان داد که الگوی پروتئوم برگ در هنگام پاسخ گیاه به تنش خشکی در مقایسه با عدم تنش خشکی به طور وسیعی تغییر کرده است. این تغییرات حاکی از طیف وسیع پروتئین‌های پاسخ دهنده پس از اعمال تنش خشکی بود. از ۳۲ و ۲۹ لکه پروتئین معنی دار در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس، پس از انطباق با پایگاه داده‌ها از نظر وزن ملکولی و نقطه ایزو الکتریک و هم چنین تطبیق با تصاویر ژل، تعداد هشت لکه مشترک شناسایی شدند. ژنوتیپ مقاوم در ۲۲ لکه افزایش بیان و ۱۰ لکه کاهش بیان نشان داد. هم چنین ژنوتیپ حساس نیز در ۱۶ لکه افزایش بیان و ۱۳ لکه کاهش بیان نشان داد که برخی لکه‌ها (هشت لکه) نیز بیان مشترک داشتند.



منتسب به هر گروه را نشان می‌دهد. در تجزیه و تحلیل پروتئوم مقایسه‌ای دو رقم مقاوم به خشکی و حساس به خشکی، پروتئین‌های متفاوتی تحت تنش خشکی شناسایی شدند. پروتئین‌های دخیل در متابولیسم، شامل لیپواکسیژناز، آنزیم مالیک وابسته به NADP، ساکارز سنتاز و بتا‌آلدئید دهیدروژناز، در رقم حساس افزایش یافتند. آنزیم‌های مربوط به سم‌زدایی سلول‌ها و کنترل تنفس نوری در رقم مقاوم به خشکی افزایش یافتند، در حالی که تغییری در رقم حساس مشاهده نشد. پروتئین‌های مرتبط با تولید ترکیبات فعال اسمزی در ژنوتیپ حساس افزایش یافت که نشان می‌دهد تنش خشکی پاسخ‌های اسمزی قوی‌تری را در ژنوتیپ حساس ایجاد می‌کند (آشوب و همکاران، ۲۰۱۳).

سیتوزولی، فروکتوکلیناز، تیوردوکسین، پروتئین‌های مرتبط با سیستمین بودند. این پروتئین‌ها در مراحل نموی گوناگون و مسیرهای متابولیکی مختلف مانند متابولیسم انرژی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ترجمه، پردازش، تجزیه پروتئین، فتوسنتز، انتقال سیگنال نقش دارند.

اسامی پروتئین‌های شناسایی شده بر اساس گروه‌بندی انجام شده و سایر مشخصات مربوطه در جدول‌های ۳ و ۴ آورده شده است. گروه‌های پروتئینی شناسایی شده شامل: پروتئین‌های دخیل در متابولیسم، پروتئین‌های درگیر در دفاع اکسیداتیو و مقابله با تنش، پروتئین‌های درگیر در نسخه برداری، پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز، پروتئین‌های درگیر در مسیرهای انرژی و پروتئین‌های ساختاری بودند. شکل ۲ درصد پروتئین‌های



شکل ۲. درصد پروتئین‌های دارای تغییرات معنادار بر اساس نقش و عمل آنها. A: ژنوتیپ مقاوم و B: ژنوتیپ حساس  
**Figure 2.** Percentage of proteins with significant changes based on their role and action. A: Resistant genotype and B: Sensitive genotype

بالایی بوده و بنابراین نقش مهمی در اکسیداسیون و احیای سلولی دارند. این آنزیم از آنزیم‌های مهم در مسیرهای متابولیک و تنظیمی دیگر همچون چرخه کالوین، متابولیسم انرژی، فتوسنتز، پیمایش پروتئین‌ها و سنتز آمینواسیدها محسوب می‌گردند (سانچز و هوشتراسر، ۱۹۹۹). علاوه بر این، خاصیت آنتی اکسیدانی تیوردوکسین‌ها باعث محافظت سلول‌ها در برابر تنش‌های اکسیداتیو حاصل از تنش‌ها می‌شود و از طریق حذف  $H_2O_2$  و برخی رادیکال‌های آزاد، در فرایند سمزدایی این ترکیبات شرکت می‌نمایند (زو، ۲۰۰۱).

لکه شماره ۲۳۳ به عنوان Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش خشکی بود Ribulose biphosphate carboxylase. رویسکو دو واکنش را کاتالیز می‌کند: تنش خشکی است. اولاً 1,5-bisphosphate D-ribulose را در ابتدای رویداد تثبیت دی اکسید کربن کربوکسیله می‌کند و ثانیاً پیش ماده پنتوز را بوسیله فعالیت اکسیداتیو خرد می‌کند. پروسه‌های بیولوژیکی آن شامل سیکل کلون، تثبیت دی اکسیدکربن، حساسیت نوری و فتوسنتز می‌باشد.

لکه شماره ۷۱۱ مربوط به پروتئین Dehydroascorbate reductase (DHAR)-Oxidoreductase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان نشان داد. که بیان آن در رقم مقاوم به دلیل وجود مکانیسم تحمل بیشتر بود. دهیدروآسکوربات ردوکتاز (DHAR) وابسته به گلوکاتیون (GSH) دهیدروآسکوربات را کاتالیز می‌کند و نقش مستقیمی در بازسازی اسید اسکوربیک، یک آنتی اکسیدان گیاهی ضروری برای دفاع در برابر استرس اکسیداتیو دارد. DHAR مجموعه‌ای از آسکوربات کاهش یافته را بازسازی می‌کند و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) را سم‌زدایی می‌کند. آنزیم‌های DHAR تشابه ساختاری نزدیکی با ابرخانواده آنزیم‌های گلوکاتیون ترانسفراز (GST) دارند و حاوی همان موتیف سایت فعال هستند، اما اکثر GSTها فعالیت DHAR

لکه شماره ۴۰۵ مربوط به پروتئین Cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان نشان داد. آنزیم سیتوزولی گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (GAPC) یک واکنش کلیدی در گلیکولیز را کاتالیز می‌کند، اما سهم آن در متابولیسم و رشد گیاه به‌خوبی تعریف نشده است. حذف یا بیان بیش از حد GAPCها باعث تغییرات قابل توجهی در سطح واسطه‌ها در مسیر گلیکولیتیک و نسبت‌های ATP/ADP و NAD(P)H/NAD(P) می‌گردد. سطوح GAPC نقش مهمی در تولید کلی سلولی احیاکننده‌ها، انرژی و متابولیت‌های کربوهیدرات دارد.

لکه شماره ۷۱۷ به عنوان Ribulose biphosphate carboxylase large chain precursor شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان‌دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس بود. این پروتئین یک پروتئین فتوسنتزی است که سطح بیان این پروتئین با افزایش غلظت نمک کاهش پیدا می‌کند، کاهش فعالیت Rubisco large subunit باعث محدود شدن تثبیت  $CO_2$  و نقص تنظیم آنزیم‌هایی می‌شود که وابسته به سیکل کلون هستند که همین امر سبب انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها می‌شود و پروتئین‌هایی که مسئول محافظت از گیاه در برابر زیان‌های فتواکسیداتیو هستند کاهش می‌یابند.

لکه شماره ۲۰۴ مربوط به پروتئین Trx- Thioredoxin M-type, chloroplast precursor(M) بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم و حساس افزایش بیان داشت که در رقم مقاوم به دلیل وجود مکانیسم تحمل این نرخ بیش‌تر بود. تیوردوکسین‌ها (Trxs) اکسیدو ردوکتازهای دی سولفیدی هستند که بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی را تنظیم می‌کنند. آنالیزهای بیوشیمیایی و پروتئومی گسترده بسیاری از پروتئین‌های هدف TrxA را در موجودات فتوسنتزی مختلف شناسایی کرده‌اند. این پروتئین‌ها طی تنش خشکی بیان می‌شوند و دارای توان احیا کننده‌گی

انرژی در یوکاریوت‌ها است که تبدیل مالات به اگزوالاستات (OAA) را در رابطه با نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD<sup>+</sup>) به NADH کاتالیز می کند. سه ایزوآنزیم MDH گزارش شده است: MDH1، MDH2 و MDH3. MDH3 یک آنزیم گلی اکسیژومال است که در اکسیداسیون مجدد NADH که در طی اکسیداسیون اسید چرب بتا تولید می شود، نقش دارد.

لکه شماره ۱۳۲ به عنوان Putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1 شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان دهنده کاهش بیان این پروتئین در اثر تنش در هر دو ژنوتیپ مقاوم و حساس بود. این پروتئین عنصر پایانی زنجیره تنفسی میتوکندری و گیرنده الکترون از سیتوکروم c جهت احیای اکسیژن است. تغییر نرخ این پروتئین رابطه معکوس با تنش داشته که با مکانیسمی متفاوت افزایش تنش موجب کاهش این پروتئین شد. هم چنین می توان کاهش این پروتئین را با افزایش مجدد فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و خسارت غشایی مرتبط با تنش مرتبط دانست که در ژنوتیپ مقاوم نیز با افزایش تنش بیش از آستانه تحمل، امکان کاهش این پروتئین محتمل است (حیدروند، ۲۰۱۲).

را نشان نمی دهند. وجود یک سیستمین در محل فعال برای عملکرد کاتالیزوری DHAR ضروری است، زیرا جهش این سیستمین فعالیت را از بین می برد.

لکه شماره ۲۲۷ به عنوان Cp31AHv protein شناسایی شد. مقایسه مقادیر مربوط به درصد حجمی این لکه در ژل‌های دو رقم نشان دهنده افزایش بیان این پروتئین در اثر تنش در ژنوتیپ مقاوم بود. در ژنوتیپ حساس این پروتئین کاهش بیان داشت. Cp31AHv نوعی پروتئین متصل شونده به RNA (RBPs) می باشد. به نظر می رسد بیان این پروتئین تحت کنترل مثبت نور است. در مطالعات متعددی افزایش بیان این پروتئین در ژنوتیپ‌های مقاوم و کاهش بیان آن در ژنوتیپ‌های حساس گزارش شده است که ممکن است یکی از دلایل حساسیت گیاه به تنش همین پروتئین باشد (فاتحی و همکاران، ۲۰۱۲؛ مولر و همکاران، ۲۰۱۱).

لکه شماره ۲۷۶ مربوط به پروتئین Glyoxysomal malate dehydrogenase بود در ژل‌های سطوح مختلف تنش، این پروتئین در ژنوتیپ مقاوم افزایش بیان و در ژنوتیپ حساس کاهش بیان نشان داد. مالات دهیدروژناز (MDH)، یک آنزیم متابولیسم کربوهیدرات و

### جدول ۳. پروتئین‌های دارای تغییرات معنی دار در ژنوتیپ مقاوم

Table 3. Proteins with significant changes in the resistant genotype

| Match ID | pI    | MW      | Name                                                                       | Organism                     | Function                |
|----------|-------|---------|----------------------------------------------------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| 861      | 5.900 | 80.860  | Melanoma-associated antigen p97                                            | <i>Gallus gallus</i>         | Stress response         |
| 276*     | 6.960 | 37.754  | Glyoxysomal malate dehydrogenase                                           | <i>Zea mays</i>              | Metabolic               |
| 965      | 6.300 | 25.100  | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain (RuBisCO large subunit)        | <i>Welwitschia mirabilis</i> | Photosynthesis          |
| 204*     | 8.700 | 44.000  | Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (Trx-M)                          | <i>Spinacia oleracea</i>     | Metabolism              |
| 170      | 6.010 | 53.979  | ATP synthase subunit alpha                                                 | <i>Secale strictum</i>       | Metabolic               |
| 649      | 7.000 | 21.000  | Alternative oxidase                                                        | <i>Triticum aestivum</i>     | Photosynthesis          |
| 405*     | 6.670 | 36.605  | cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | <i>Pisum sativum</i>         | Glycolytic process      |
| 401      | 5.710 | 35.765  | Stress-responsive protein                                                  | <i>Zea mays</i>              | Stress response         |
| 717*     | 6.400 | 31.000  | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain precursor                      | <i>Pisum sativum</i>         | Photosynthesis          |
| 227*     | 4.500 | 31.900  | Cp31AHv protein                                                            | <i>Hordeum vulgare</i>       | Transcription           |
| 233*     | 8.000 | 41.800  | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor | <i>Hordeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 52       | 7.200 | 53.000  | Putative dihyrolipoamide Dehydrogenase                                     | <i>Oryza sativa</i>          | Metabolic               |
| 42       | 6.880 | 83.000  | Ribulose1,5 biphosphate carboxylase/oxygenase                              | <i>Hordeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 625      | 5.400 | 21.400  | Elongation factor G                                                        | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | Amino-acid biosynthesis |
| 916      | 6.000 | 18.500  | Pyruvate, phosphate dikinase 1, chloroplastic                              | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 661      | 5.500 | 23.300  | Adenosylhomocysteinase                                                     | <i>Nicotiana tabacum</i>     | Amino-acid biosynthesis |
| 642      | 6.800 | 18.000  | chloroplast-localized cyclophilin                                          | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 712      | 4.600 | 26.100  | Proteasome subunit alpha type 5                                            | <i>Glycine max</i>           | Metabolic               |
| 711*     | 6.300 | 26.500  | Dehydroascorbate reductase (DHAR)- Oxidoreductase                          | <i>Triticum aestivum</i>     | Stress response         |
| 600      | 7.700 | 28.600  | Thylakoid lumenal 29.8 kDa protein                                         | <i>Ricinus communis</i>      | photosynthesis          |
| 146      | 5.100 | 53.500  | ATP synthase beta subunit                                                  | <i>Catabrosa aquatica</i>    | Energy                  |
| 251      | 4.650 | 33.4.48 | Chitinase class III                                                        | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 132*     | 4.350 | 40.000  | putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1                                 | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 961      | 5.200 | 28.100  | LHCI                                                                       | <i>Hurdeum vulgare</i>       | Photosynthesis          |
| 699      | 6.700 | 22.000  | Thaumatococin-like protein                                                 | <i>Triticum aestivum</i>     | Metabolic               |
| 266      | 7.000 | 48.300  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, cytosolic                        | <i>Zea mays</i>              | Stress response         |
| 131      | 8.290 | 62.179  | Chloroplastic leucine aminopeptidase                                       | <i>Oryza sativa</i>          | Photosynthesis          |
| 662      | 7.428 | 25.000  | type homeodomain protein – IBE                                             | <i>Arabidopsis thaliana</i>  | Stress response         |
| 912      | 5.500 | 15.100  | Transketolase, chloroplast                                                 | <i>Zea mays</i>              | Photosynthesis          |
| 700      | 7.850 | 20.000  | High-affinity phosphate transporter PT1- transmembrane                     | <i>Medicago sativa</i>       | Photosynthesis          |
| 650      | 6.900 | 24.000  | Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                                   | <i>Triticum aestivum</i>     | Stress response         |

\*: Common proteins in resistant and sensitive genotypes

\*: پروتئین‌های مشترک در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس

## جدول ۴. پروتئین‌های دارای تغییرات معنی‌دار در ژنوتیپ حساس

Table 4. Proteins with significant changes in sensitive genotype

| Match ID | pI    | MW     | Name                                                                       | Organism                    | Function                |
|----------|-------|--------|----------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 159      | 7.430 | 55.900 | Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform 1- Oxidoreductase | <i>Oryza sativa</i>         | Biosynthesis            |
| 135      | 6.9   | 64.2   | Elongation factor EF-G                                                     | <i>Brassica napus</i>       | Metabolic               |
| 405*     | 6.670 | 36.605 | cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase                         | <i>Pisum sativum</i>        | Glycolytic process      |
| 717*     | 6.6   | 52.73  | Ribulosebiphosphate carboxylase large chain precursor                      | <i>Pisum sativum</i>        | Photosynthesis          |
| 826      | 5.6   | 19     | FTSH1 (FtsH protease 1); ATP-dependent peptidase/ATPase/ metallopeptidase  | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Stress response         |
| 136      | 6.200 | 53.400 | Ribulose-1,5-bisphosphate                                                  | <i>Oryza sativa</i>         | Photorespiration        |
| 204*     | 8.7   | 44     | Thioredoxin M-type, chloroplast precursor (Trx-M)                          | <i>Spinacia oleracea</i>    | Metabolism              |
| 688      | 7.890 | 25.000 | Manganese superoxide dismutase- Oxidoreductase                             | <i>Zea mays</i>             | response to xenobiotic  |
| 233*     | 8     | 41.8   | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplast precursor | <i>Hordeum vulgare</i>      | Photosynthesis          |
| 694      | 7.42  | 36.500 | G protein beta-subunit-like protein                                        | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Defense                 |
| 195      | 7.720 | 48.500 | Putative fructose 1-6 biphosphate aldolase                                 | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Carbohydrate metabolism |
| 733      | 6.300 | 25.000 | Oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast                            | <i>Arabidopsis thaliana</i> | Photosynthetic          |
| 553      | 7.700 | 29.800 | Probable glutathione S-transferase DHAR2, chloroplastic                    | <i>Oryza sativa</i>         | Metabolism              |
| 798      | 5.3   | 29.3   | Glutathione S-transferase 1                                                | <i>Triticum aestivum</i>    | Stress response         |
| 176      | 6.300 | 55.000 | Adenosyl homocysteinease1 NP                                               | <i>Lupinus luteus</i>       | Metabolism              |
| 711*     | 6.3   | 25.000 | Dehydroascorbate reductase (DHAR)- Oxidoreductase                          | <i>Triticum aestivum</i>    | Stress response         |
| 267      | 9.700 | 39.200 | Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH] 2, chloroplastic             | <i>Oryza sativa subsp</i>   | Biosynthetic            |
| 227*     | 4.500 | 31.900 | Cp31AHv protein                                                            | <i>Hordeum vulgare</i>      | Transcription           |
| 346      | 6.040 | 39.500 | putativ fructose 1,6 by phpsphat carbohydrat metabolism aldolas            | <i>Solanum lycopersicum</i> | Metabolism              |
| 276*     | 6.854 | 40.000 | Glyoxysomal malate dehydrogenase                                           | <i>Zea mays</i>             | Metabolism              |
| 132*     | 4.350 | 40.000 | putative cytochrome c oxidase subunit 6b-1                                 | <i>Oryza sativa</i>         | Photosynthesis          |
| 437      | 6.2   | 43     | Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase                                           | <i>Triticum aestivum</i>    | Photosynthesis          |
| 888      | 5.7   | 15     | Rubisco small subunit                                                      | <i>Triticum aestivum</i>    | Drought responsive      |
| 113      | 7.640 | 33.733 | Triosephosphate isomerase, chloroplastic                                   | <i>Fragaria ananassa</i>    | Metabolism              |
| 85       | 5.830 | 92.863 | Sucrose synthase                                                           | <i>Triticum aestivum</i>    | Metabolism              |
| 835      | 4.6   | 18.8   | Type I chlorophyll a/b-binding protein b                                   | <i>Amaranthus tricolor</i>  | Photosynthesis          |
| 418      | 5.900 | 28.000 | Ribulose bisphosphate carboxylase small chain                              | <i>Nicotiana tabacum</i>    | Photorespiration        |
| 427      | 6.600 | 28.000 | Oxygen- evolving enhancer protein                                          | <i>Zea mays</i>             | Photosynthetic          |
| 376      | 6.800 | 32.600 | ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit                             | <i>Oryza sativa subsp</i>   | Metabolism              |

\*: Common proteins in resistant and sensitive genotypes

\*: پروتئین‌های مشترک در ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

مطالعه حاضر با هدف شناسایی مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به خشکی در جو وحشی، با مقایسه پروتئوم دو ژنوتیپ مقاوم و حساس به تنش خشکی پرداخت. نتایج این پژوهش نشان داد که تنش خشکی تغییرات قابل توجهی در بیان پروتئین‌های دو ژنوتیپ ایجاد می‌کند. بین ژنوتیپ مقاوم و حساس به تنش خشکی، تفاوت‌های معنی‌داری در بیان پروتئین‌ها مشاهده شد. این تفاوت‌ها نشان می‌دهد که هر دو ژنوتیپ از استراتژی‌های متفاوتی برای مقابله با تنش خشکی استفاده می‌کنند. ژنوتیپ مقاوم با افزایش بیان پروتئین‌هایی که در متابولیسم انرژی، فتوسنتز و دفاع اکسیداتیو نقش دارند، به‌طور مؤثرتری با تنش خشکی مقابله می‌کند. این پروتئین‌ها در شرایط کم آبی به گیاه کمک می‌کنند تا انرژی مورد نیاز خود را تأمین واز آسیب‌های اکسیداتیو جلوگیری کرده و به فتوسنتز ادامه دهد. ژنوتیپ حساس با کاهش بیان برخی از پروتئین‌های کلیدی، نتوانسته است به‌طور مؤثری با شرایط تنش مقابله کند. این کاهش بیان، نشان‌دهنده اختلال در عملکرد برخی از فرایندهای سلولی در این ژنوتیپ است. یافته‌های این پژوهش نشان داد که پروتئین‌های مختلفی در

پاسخ به تنش خشکی نقش دارند. این پروتئین‌ها شامل پروتئین‌های مرتبط با متابولیسم، دفاع اکسیداتیو، فتوسنتز، ساختار سلولی و تنظیم متابولیک هستند. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئومیک یک ابزار قدرتمند برای مطالعه مکانیسم‌های مقاومت به خشکی در گیاهان است. شناسایی پروتئین‌های کلیدی که در پاسخ به تنش خشکی نقش دارند، می‌تواند به ما در درک بهتر این مکانیسم‌ها کمک کند. همچنین، این اطلاعات می‌تواند برای توسعه ارقام جدید گیاهان با مقاومت بیشتر به خشکی مورد استفاده قرار گیرد.

پروتئین‌های شناسایی شده به چند گروه عمده تقسیم شدند: که شامل، پروتئین‌های دخیل در متابولیسم؛ افزایش بیان GAPC در هر دو ژنوتیپ نشان می‌دهد که این آنزیم نقش مهمی در تولید انرژی و متابولیت‌های کربوهیدرات در شرایط تنش ایفا می‌کند. پروتئین‌های دفاعی و مقابله با تنش (DHAR) که نقش مهمی در دفاع آنتی‌اکسیدانی دارند، افزایش بیان در ژنوتیپ مقاوم و حساس داشتند. این پروتئین‌ها با تنظیم اکسیداسیون اسید اسکوریک و همچنین بازسازی آنتی‌اکسیدان‌های مهم مانند اسید اسکوریک، نقش مهمی در حفاظت سلول‌ها در برابر آسیب‌های ناشی از تنش خشکی ایفا

پروتئومیک تعاملی، می‌توان شبکه‌های تعاملی پروتئین‌ها را در شرایط تنش خشکی بررسی کرد و درک بهتری از مکانیسم‌های مولکولی مقاومت به خشکی به‌دست آورد. با مطالعه تغییرات اپی‌ژنتیکی در پاسخ به تنش خشکی، می‌توان به نقش اپی‌ژنتیک در تنظیم بیان ژن‌ها و مقاومت به خشکی پی برد. با استفاده از اطلاعات حاصل از مطالعات پروتئومیک، می‌توان نشانگرهای مولکولی جدیدی برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به خشکی توسعه داد. با انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه، می‌توان به توسعه ارقام جدید گیاهان با عملکرد بالاتر و مقاومت بیشتر به تنش‌های محیطی کمک کرد و در نتیجه، امنیت غذایی را افزایش داد.

### تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

می‌کنند. پروتئین‌های مرتبط با فتوسنتز شامل: افزایش بیان پروتئین‌های Ribulose در هر دو ژنوتیپ نشان‌دهنده اهمیت این پروتئین‌ها در حفظ فرایندهای فتوسنتزی تحت شرایط تنش خشکی است. با این حال، کاهش فعالیت Rubisco می‌تواند منجر به محدودیت در تثبیت  $\text{CO}_2$  و نقص در تنظیم آنزیم‌های وابسته به سیکل کالوین شود که باعث انباشتگی ATP و NADPH در کلروپلاست‌ها می‌شود. پروتئین‌های ساختاری و تنظیمی: پروتئین‌های مانند Cp31AHv و MDH نقش مهمی در ساختار و تنظیم متابولیک سلول‌ها ایفا می‌کنند. افزایش بیان این پروتئین‌ها در ژنوتیپ مقاوم نشان‌دهنده اهمیت آن‌ها در پاسخ به تنش خشکی است.

پیشنهادات کاربردی این پژوهش این است که توالی دقیق پروتئین‌های شناسایی شده را می‌توان با تکنیک‌های طیف‌سنجی جرمی تعیین کرد و عملکرد دقیق آن‌ها را در گیاهان مشخص نمود. همچنین با استفاده از تکنیک‌های

### References

- Abdolshahi, R., Safarian, A., Nazari, M., Pourseyedi, S., & Mohamadi-Nejad, G. (2013). Screening drought-tolerant genotypes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) using different multivariate methods. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 59(5), 685-704. (in Farsi).
- Ashoub, A., Beckhaus, T., Berberich, T., Karas, M., & Brüggemann, W. (2013). Comparative analysis of barley leaf proteome as affected by drought stress. *Planta*, 237, 771-781.
- Bauder, J. (2002). When necessary, Just-in-time, irrigating can save water. MSU Extension Publications. 406-994-3273.
- Berauer, B. J., Steppuhn, A., & Schweiger, A. H. (2024). The multidimensionality of plant drought stress: The relative importance of edaphic and atmospheric drought. *Plant, Cell & Environment*, 47(9), 3528-3540.
- Blum, A. (2010). *Plant breeding for water-limited environments*. Springer Science & Business Media.
- Boustani, A., Fatehi, F., & Azizinezhad, R. (2018). Study on leaf proteome response of H. marinum to salinity stress. *Modern Genetics Scientific Quarterly*, 13(1), 143-155. (in Farsi).
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Haji Abbasi, M., & Shabani, A. (2011). Studying the response of barley leaf proteome under salinity stress conditions. *Iranian Plant Sciences*, 42(3): 617-626. (in Farsi).
- Fatehi, F., Hosseinzadeh, A., Alizadeh, H., Brimavandi, T., & Struik, P. C. (2012). The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley genotypes to long-term salinity stress. *Molecular Biology Reports*, 39, 6387-6397.
- Feiziasl, V., Jafarzadeh, J., Ahmed, A. M. R. I., Ansari, Y., Mousavi, S. B., & Chenar, M. A. (2010). Analysis of yield stability of wheat genotypes using new Crop Properties Balance Index (CPBI) method. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(1), 228-233.
- Gusain, S., Kumari, K., & Joshi, R. (2024). Physiological, hormonal and molecular dynamics of root system architectural response to drought stress signaling in crops. *Rhizosphere*, 100922.
- Gygi, S. P., Rist, B., & Aebersold, R. (2000). Measuring gene expression by quantitative proteome analysis. *Current opinion in biotechnology*, 11(4), 396-401.
- Hayes, P. M., Castro, A., Marquez-Cedillo, L., Corey, A., Henson, C., Jones, B. L., ... & Sato, K. (2003). Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In *Developments in plant genetics and breeding* (Vol. 7, pp. 201-226). Elsevier.
- Heidarvand, L. (2012). Evaluation of chickpea proteome in early stages of cold. Ph. D thesis in plant breeding. University of Tehran. (In Farsi).

- Joseph, B., & Jini, D. (2010). Proteomic analysis of salinity stress-responsive proteins in plants. *Asian Journal of Plant Sciences*, 9(6), 307.
- Keshavarznia, R. (2013). Investigating the effect of drought stress on physiological traits and expression pattern of proteins in barley. Master's thesis. Faculty of Agriculture, University of Tehran. (in Farsi).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
- Liu, D. (2023) Barley: From Molecular Basis of Quality to Advanced Genomics-Based Breeding. In *Compendium of Crop Genome Designing for Nutraceuticals* (pp. 1-38). Singapore: Springer Nature Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-19-3627-2\\_4-1](https://doi.org/10.1007/978-981-19-3627-2_4-1)
- Lukinac, J., & Jukić, M. (2022). Barley in the production of cereal-based products. *Plants* 2022, 11, 3519.
- Mechin, V., Consoli, L., Le Guilloux, M., & Damerval, C. (2003). An efficient solubilization buffer for plant proteins focused in immobilized pH gradients. *PROTEOMICS: International Edition*, 3(7), 1299-1302.
- Meng, G., Rasmussen, S. K., Christensen, C. S., Fan, W., & Torp, A. M. (2023). Molecular breeding of barley for quality traits and resilience to climate change. *Frontiers in Genetics*, 13, 1039996.
- Mitra, J. (2001). Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. *Current Science* 80: 758-763
- Møller, A. L., Pedas, P. A. I., Andersen, B., Svensson, B., Schjoerring, J. K., & Finnie, C. (2011). Responses of barley root and shoot proteomes to long-term nitrogen deficiency, short-term nitrogen starvation and ammonium. *Plant, cell & environment*, 34(12), 2024-2037.
- Moloi, S. J., & Ngara, R. (2023). The roles of plant proteases and protease inhibitors in drought response: a review. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1165845.
- Morrel, P. L. (2011). Hordeum. pp. 309-320, In: C. Kole (Ed.), *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*,
- Nevo, E., & Chen, G. (2010). Drought and salt tolerances in wild relatives for wheat and barley improvement. *Plant, cell & environment*, 33(4), 670-685.
- Raj, R., Shams, R., Pandey, V. K., Dash, K. K., Singh, P., & Bashir, O. (2023). Barley phytochemicals and health promoting benefits: A comprehensive review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100677.
- Rasul Nia, A., Bi Hamta, m., Peighambari, S., Alizadeh, H., Teklo, S., & Mujahid.K. (2013). Investigating the proteome pattern and activity of some antioxidant enzymes of barley under salinity stress. *Iranian Plant Sciences*, 43(2), 231-241. (in Farsi).
- Richard, A.J., & Dean, W.W. (2002). Applied multivariate statistical analysis. Prentice Hall, London. 265.
- Sanchez, J. C., & Hochstrasser, D. F. (1999). *High-resolution, IPG-based, mini two-dimensional gel electrophoresis* (pp. 227-233). Humana Press.
- Sardouie-Nasab, S., Mohammadi-Nejad, G., & Nakhoda, B. (2014). Field screening of salinity tolerance in Iranian bread wheat lines. *Crop Science*, 54(4), 1489-1496.
- Seem, K., Kaur, S., Selvan, T., & Kumar, S. (2024). Plant response to drought stress: epigenomic perspective. In *Current Omics Advancement in Plant Abiotic Stress Biology* (pp. 323-341). Academic Press.
- Shirvani, H., Mehrabi, A. A., Farshadfar, M., Safari, H., Arminian, A., Fatehi, F., ... & Poczai, P. (2024). Investigation of the morphological, physiological, biochemical, and catabolic characteristics and gene expression under drought stress in tolerant and sensitive genotypes of wild barley [*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum* (K. Koch) Asch. & Graebn.]. *BMC Plant Biology*, 24(1), 214.
- Taheri, H., Bi Hamta, M. Hosseinzadeh, A. Naqvi, M., & March, T. (2013). Investigation of proteome response to drought stress in barley plant (*Hordeum vulgare* L.) using DIGE technology. *Modern Genetics Scientific Quarterly*, 7(3). (In Farsi).
- Wang, N., Zhao, J., He, X., Sun, H., Zhang, G., & Wu, F. (2015). Comparative proteomic analysis of drought tolerance in the two contrasting Tibetan wild genotypes and cultivated genotype. *BMC genomics*, 16, 1-19.
- Zhu, J. K. (2001). Plant salt tolerance. *Trends in plant science*, 6(2), 66-71.

## A review of plant genetic diversity analysis using PCR-based markers banding pattern

Zahra Sadat Mousavi<sup>1</sup>, Fatemeh Nasernakhaei<sup>1</sup>(ORCID: 0000000277144331)

1. Department of Production Engineering and Plant Genetics, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

Correspondence:  
Fateme Nasernakhaei  
Email: [f.nasernakhaei@scu.ac.ir](mailto:f.nasernakhaei@scu.ac.ir)

Received: 4/Aug/2024  
Accepted: 4/Nov/2024

### How to cite:

Mousavi, Z.S., & Nasernakhaei, F. (2025). A review of plant genetic diversity analysis using PCR-based markers banding pattern. *Crop Biotechnology*, 14 (2), 97-114. (DOI: [10.30473/cb.2024.71938.1980](https://doi.org/10.30473/cb.2024.71938.1980))

### ABSTRACT

Genetic diversity is a crucial component of biodiversity, essential for preserving gene banks and enriching plant genetic resources. One way to assess genetic diversity is using band patterns (0 and 1) produced by PCR-based DNA markers (such as RAPD, SSR, ISSR, AFLP, SCoT etc.). After achieving reproducibility, the bands are selected, scored, and analyzed. The data is analyzed using multivariate statistical methods, including cluster and principal coordinate analysis. Genetic similarity or dissimilarity coefficients are used based on 0 and 1 data (for dominant and codominant markers), and allelic frequency coefficients (for codominant markers). Some algorithms such as UPGMA and Ward are employed to group the studied individuals and investigate their genetic relationships. Quantifying polymorphism and assessing genetic diversity within and between populations will depend on the type of marker (dominant and codominant) and reproduction mode. Parameters such as polymorphic information content (PIC), resolving power (Rp), marker index (MI), polymorphic loci/marker ratio, heterozygosity (H)/gene diversity, allelic diversity (A), the effective number of alleles (Ae), Shannon's index (I), Wright's F statistic ( $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ),  $G_{st}$  and analysis of molecular variance (AMOVA) are evaluated. Software tools (NTSYSpc, R, DARwin, PAST, Excel, PowerMarker, Popgen, and GenAlEx) can assist with grouping and estimating genetic diversity.

### KEYWORDS

Dominant and Codominant markers, Gel scoring, Genetic diversity measurement, Multivariate statistical methods, Polymorphism measurement.





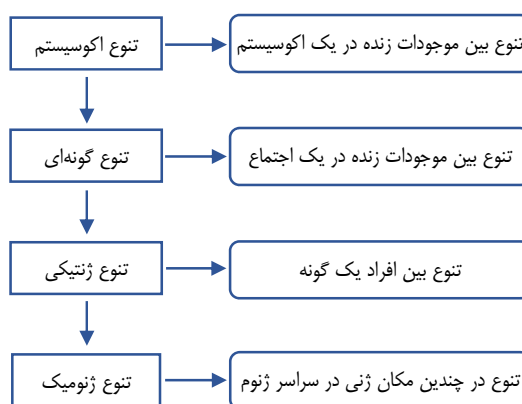


**Figure 1.** Types of diversity (Bhandari *et al.*, 2017)

به تغییرات ویژگی‌های وراثتی موجود در جمعیت یک گونه تنوع ژنتیکی می‌گویند (Swingland, 2001). تنوع در صفات وراثتی ممکن است خود را به شکل تغییر مورفولوژی، آناتومی، رفتار فیزیولوژیکی یا ویژگی‌های بیوشیمیایی نشان دهد (Bhandari *et al.*, 2017). تنوع ژنتیکی میان افراد، نشان‌دهنده وجود آلل‌های مختلف در مخزن ژنی و نیز ژنوتیپ‌های متفاوت در جمعیت‌ها می‌باشد (Caliskan, 2012). برخی منابع به گوناگونی‌های موجود در بین ژنوتیپ‌های مختلف با توجه به ترکیب ژنتیکی ژنوتیپ‌های مربوط به یک گونه یا بین گونه‌ها، تنوع ژنتیکی می‌گویند (Bhandari *et al.*, 2017). همچنین Salgotra and Chauhan (2023) تنوع ژنتیکی را در سه سطح تنوع بین گونه‌ها، تنوع بین جمعیت‌های یک گونه و تنوع بین افراد یک جمعیت تعریف می‌کنند. بنابراین تنوع ژنتیکی یک اصطلاح گسترده است که در تعبیر رایج، با گوناگونی ژنتیکی<sup>۱</sup> به اشتباه، مترادف یکدیگر در نظر گرفته می‌شوند. گوناگونی<sup>۱۱</sup> به تفاوت در یک یا چند صفت موجود زنده گفته می‌شود. به عبارتی گوناگونی ژنتیکی، تغییر در آلل‌های ژن یا تغییر در توالی‌های DNA/RNA در مخزن ژنی یک گونه یا جمعیت است که خود را در قالب فنوتیپ‌های متفاوت بیان می‌کند (Bhandari *et al.*, 2017). تنوع ژنتیکی از طریق شمارش تعداد ژن‌های مختلف در یک مخزن ژنی قابل اندازه‌گیری است، اما گوناگونی ژنتیکی<sup>۱۲</sup> را تنها می‌توان تخمین زد و آن را می‌توان به عنوان بلوک‌های سازنده تنوع ژنتیکی در نظر گرفت (Bhandari *et al.*, 2017). جهش<sup>۱۳</sup>، رانش ژنتیکی<sup>۱۴</sup>، نوترکیبی<sup>۱۵</sup> و جریان ژنی<sup>۱۶</sup> برخی از منابع مختلف ایجادکننده تنوع ژنتیکی هستند (Salgotra and Chauhan, 2023).

## مقدمه

تنوع زیستی<sup>۱</sup> به گوناگونی<sup>۱۱</sup> موجودات زنده اشاره دارد (Swingland, 2001) که ارزش آن برای بشر در دهه‌های اخیر به خوبی شناخته شده است و بسیاری استدلال می‌کنند که وجود آن برای توسعه پایدار فعالیت‌های مختلف انسانی، ضروری است (Shiva, 1994). به‌طور کلی تنوع در چهار سطح تعریف می‌گردد (شکل ۱). تنوع اکوسیستم<sup>۲</sup> نشان‌دهنده تغییرپذیری در میان جوامع مختلف گونه‌ها است. در سطح بعدی تنوع گونه‌ای<sup>۳</sup> است که نشان‌دهنده گونه‌های مختلف در یک اجتماع<sup>۴</sup> است که به آن غنای گونه‌ای<sup>۵</sup> نیز گفته می‌شود. تنوع ژنتیکی<sup>۶</sup> به تنوع موجود در ژنوتیپ‌های مختلف یک گونه اطلاق می‌گردد. به این دلیل، وجود آلل‌های متفاوت یک ژن در افراد مختلف، سبب ایجاد فنوتیپ‌های متفاوت می‌شود. تنوع ژنومیک<sup>۸</sup> را می‌توان به عنوان تنوع در چندین مکان ژنی<sup>۷</sup> در یک فرد تعریف کرد. در این میان، تنوع ژنتیکی بیش‌ترین توجه را در بین محققین بخش کشاورزی به خود اختصاص داده است (Bhandari *et al.*, 2017).

**شکل ۱. انواع تنوع (Bhandari *et al.*, 2017)**

- 1 . Genetic variability
- 1 . Variability
- 1 . Genetic variation
- 1 . Mutation
- 3
- 1 . Genetic drift
- 4
- 1 . Recombination
- 1 . Gene flow
- 6

1. Biodiversity
2. Variety
3. Ecological diversity
4. Species diversity
5. Community
6. Species richness
7. Genetic diversity
8. Genomic diversity
9. Gene-loci

همچنین با استفاده از نشانگرها، شناسایی مولکولی منابع گیاهی در سطح DNA از طریق الگوی باندها یا انگشت‌نگاری<sup>۱</sup> امکان‌پذیر است. مقایسه اثر انگشت در مطالعات منابع ژنتیکی گیاهی برای برآورد تنوع ژنتیکی در یک مجموعه<sup>۲</sup> (درون یا بین گروهی)، و یا تخمین مفید بودن نشانگرهای DNA در شناسایی یک اکشن<sup>۳</sup> خاص استفاده می‌شود (Laurentin, 2009).

در این مطالعه مفاهیم مرتبط با ارزیابی تنوع ژنتیکی منابع گیاهی و چگونگی اندازه‌گیری آن با استفاده از نتایج حاصل از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR که شناسایی چندشکلی در آن‌ها بر اساس جداسازی روی ژل و امتیازدهی<sup>۴</sup> (الگوی نوارها) است، مرور می‌گردد.

#### نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR

نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR (Kumar et al., 2009; Kalendar and Schulman, 2014; Dar et al., 2019; Amiteye, 2021; Bidyananda et al., 2024; Rani et al., 2024) (جدول ۱) بازتاب تفاوت‌های موجود در ردیف DNA افراد می‌باشند و چندشکلی<sup>۵</sup> را در سطح DNA با استفاده از PCR شناسایی می‌کنند. این نشانگرها نواحی ژنومی رمزکننده و غیر رمزکننده خاصی هستند که به منظور تجزیه و تحلیل ژنوم مورد استفاده قرار می‌گیرند. همچنین به دلیل فراوانی فوق‌العاده آن‌ها، عدم تاثیرپذیری از شرایط محیطی، دقت و قابلیت مطلوب تفسیر نتایج، هم‌پارز<sup>۶</sup> بودن بسیاری از این نشانگرها و سهولت تشخیص افراد هتروزیگوت<sup>۷</sup> (ناخالص) از هموزیگوت<sup>۸</sup> (خالص) اهمیت بیش‌تری نسبت به نشانگرهای ریخت‌شناسی پیدا کرده‌اند (Agarwal et al., 2008; Naghavi et al., 2009; Heidari, 2011; Darvish Zadeh and Azizi,

ذخایر ژنتیکی گیاهی یکی از ارزشمندترین منابع طبیعی می‌باشند که آگاهی از تنوع موجود در آن از ملزومات ایجاد و غنی‌سازی بانک‌های ژنی و همچنین توسعه‌ی انواع محصولات زراعی جدید می‌باشد (Mohammadi, 2006; Darvish Zadeh and Azizi, 2015). بنابراین حفظ و استفاده از این ذخایر ژنتیکی نقش مهمی در کشاورزی، امنیت غذایی و جنگلداری خواهد داشت. موضوع تنوع ژنتیکی برای کشاورزان و به‌نژادگران به منظور به دست آوردن ارقام جدید با عملکرد بالا، کیفیت بهتر یا سازگارتر در برابر تنش‌های غیرزیستی (مانند گرما و سرمای شدید)، یا مقاوم‌تر در برابر آفات و عوامل بیماری‌زا و نیز مقاوم به آلاینده‌های مختلف هوا و خاک لازم است (Rao, 2004; Laurentin, 2009; Bhandari et al., 2017; Shashidhara et al., 2023). لذا وجود تنوع ژنتیکی بالا برای یک جمعیت به لحاظ بقا، سازگاری و تکامل آن جمعیت حیاتی است (Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019).

با توجه به اهمیت تنوع ژنتیکی، ارزیابی آن با استفاده از نشانگرهای ژنتیکی<sup>۹</sup> می‌تواند اطلاعات ارزشمندی را در زمینه حفظ و نگهداری از گیاهان و همچنین استفاده از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی در اختیار پژوهشگران قرار دهد. نشانگرهای ژنتیکی، اشکال بیولوژیکی مانند ویژگی‌های فوتوپتی<sup>۱۰</sup> (صفات ریخت‌شناسی)، آنزیم‌ها/پروتئین‌ها و قطعاتی از DNA بوده که از والدین به نتاج<sup>۱۱</sup> ارث می‌رسند و به دلیل استفاده از آن‌ها در ردیابی یک فرد یا یک ژن، نشانگر نامیده می‌شوند (Kadirvel et al., 2015). نشانگرهای ژنتیکی به نشانگرهای ریخت‌شناسی و نشانگرهای مولکولی در سطح پروتئین و DNA (مبتنی و غیرمبتنی بر PCR) تقسیم می‌شوند. این نشانگرها در مطالعات فیلوژنتیک و تعیین میزان قرابت، انتقال ژن از گونه‌های خودرو، رده‌بندی گیاهان زراعی، تعیین محل ژن‌های کنترل‌کننده صفات کیفی و کمی، تهیه نقشه‌های ژنتیک و تسهیل انتخاب به کمک نشانگر کاربرد دارند (Naghavi et al., 2009).

- 2 . Molecular identity
- 2 . Fingerprint 1
- 2 . Collection 2
- 2 . Accession 3
- 2 . Scoring 4
- 2 . Polymorphism
- 2 . Co-dominant 6
- 2 . Heterozygous 7
- 2 . Homozygous 8

- 1 . Genetic marker
- 1 . Traits 8
- 1 . Progeny 9

پلیمر از انجام می‌گیرد. جهت مشاهده قطعات تکثیر شده می‌توان از ژل آگارز یا پلی‌آکریل آمید استفاده نمود. سپس باندهای مشاهده شده بر روی ژل امتیازدهی شده و نهایتاً تجزیه و تحلیل داده‌ها انجام می‌گردد.

#### امتیازدهی

امتیازدهی باندها به صورت دستی یا با کمک برخی نرم‌افزارها (Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016) نظیر TotalLab, PyElph, CLIQS, Quantity One, ImageQuant انجام می‌شود. روش کار به این صورت خواهد بود که باندهای واضح انتخاب و به صورت وجود و عدم وجود باند (یک و صفر) برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز و به صورت فراوانی آلی برای نشانگرهای هم‌بارز امتیازدهی می‌شود؛ البته در اکثر موارد نشانگرهای هم‌بارز مانند نشانگرهای غالب به صورت یک و صفر امتیازدهی می‌شوند (Mohammadi, 2006; Heras et al., 2016) (شکل ۳) و داده‌ها به صورت یک ماتریس دوتایی<sup>۵</sup> ژر اکسل آماده می‌شود (Sarwat, 2012). این ماتریس برای نشانگرهای غالب و هم‌بارز متفاوت است (شکل ۳). در صورت استفاده از نشانگر هم‌بارز، ماتریس دوتایی باید به ماتریسی از ژنوتیپ‌ها (هموزیگوت و هتروزیگوت) برای هر فرد در هر مکان<sup>۶</sup> تبدیل شود (Laurentin, 2009).

#### تجزیه و تحلیل اطلاعات

تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و ساختار جمعیت‌ها شامل کمی کردن تنوع درون جمعیت<sup>۷</sup> و بین جمعیت‌ها و/یا افراد<sup>۸</sup> کمی کردن روابط ژنتیکی<sup>۹</sup> و نمایش روابط ژنتیکی است (De Vicente et al., 2004) که در ادامه به آن‌ها پرداخته می‌شود.

نشانگرهای مولکولی ممکن است به صورت نشانگرهای چند مکانی<sup>۹</sup> و یا تک مکانی<sup>۱۰</sup> باشند. در یک تجزیه و تحلیل با استفاده از نشانگرهای چند مکانی، امکان مشاهده باندهای زیادی وجود دارد، در حالی که برای نشانگرهای تک مکانی، حداکثر دو باند که مربوط به آلل‌های ژنوم دیپلوئید می‌باشد، رویت می‌گردد. بسته به اهداف مطالعه، محقق ممکن است از نشانگرهای تک یا چند مکانی و یا ترکیبی از هر دو استفاده کند. نشانگرهای چند مکانی اطلاعات گسترده‌ای از ژنوم افراد را ارائه می‌دهند، به همین دلیل در مطالعات ژنتیک جمعیت، با توجه به اینکه هدف تمایز میان افراد یک جمعیت بر اساس الگوی باندها (نوارها) است، نشانگرهای چند مکانی کارآمدتر هستند (Simpson, 1997). نشانگرهای مولکولی می‌توانند به صورت نشانگرهای چندشکل<sup>۱۱</sup> و یک شکل<sup>۱۲</sup> مشاهده شوند؛ بدین معنا که اگر نشانگر قادر به شناسایی تفاوت‌های میان افراد یک گونه یا گونه‌های متفاوت باشند، چندشکل و در صورتی که پتانسیل ایجاد تمایز میان ژنوتیپ‌ها را نداشته باشند، یک شکل تلقی می‌گردند (Kanouni and Khalily, 2010). نشانگرها را می‌توان تحت عنوان غالب<sup>۱۳</sup> (بارز) و هم‌بارز نیز تقسیم‌بندی کرد (Kadirvel et al., 2015). مزیت نشانگرهای هم‌بارز نسبت به نشانگرهای غالب، تمایز افراد هموزیگوت از هتروزیگوت است (Laurentin, 2009).

#### روند شناسایی گوناگونی‌های ژنتیکی افراد مورد

مطالعه (ژنوتایپینگ)<sup>۱۴</sup> با استفاده از نشانگرهای

مبتنی بر PCR بر اساس امتیازدهی ژل

روش کلی ژنوتایپینگ با استفاده از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR به شرح شکل ۲ می‌باشد. ابتدا DNA گیاهی استخراج شده و پس از سنجش کمیت و کیفیت آن، با استفاده از نشانگرهای DNA واکنش زنجیره‌ای

3 . Binary matrix

3 . Locus 6

3 . Intrapopulation genetic diversity

3 . Interpopulation genetic diversity

3 . Genetic relationships

2 . Multi-locus 9

3 . Single-locus 0

3 . Polymorph 1

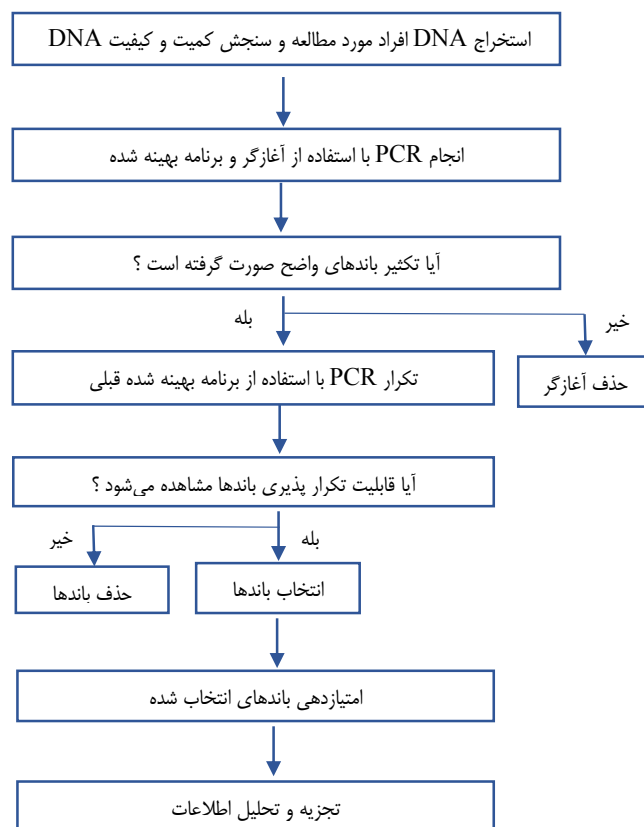
3 . Monomorph 2

3 . Dominant 3

3 . Genotypings 4

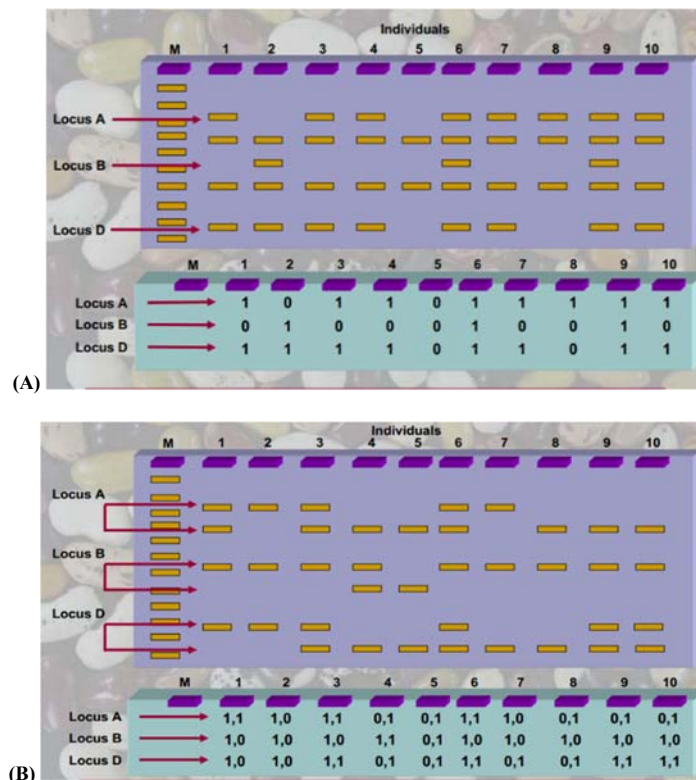
**جدول ۱.** برخی از نشانگرهای مبتنی بر PCR و استفاده شده در ارزیابی تنوع ژنتیکی  
**Table 1.** Some of the PCR-based markers used in genetic diversity assessment

| نام نشانگر                                                                                                    | منبع                         | مزایا                                                            | معایب و محدودیت‌ها                              | مثال                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| دی‌ان‌ای چندشکل تکثیر شده تصادفی (RAPD) Randomly Amplified Polymorphic DNA                                    | Williams et al., (1990)      | پوشش بهتر ژنوم                                                   | تکرارپذیری پایین، نشانگر غالب                   | <i>Abelmoschus esculentus</i> L. (Hamdan et al., 2024)                                                   |
| ردیف‌های تکراری ساده یا ریزماهوره (SSR) Simple Sequence Repeats                                               | Akkaya et al., (1992)        | تکرارپذیری و چندشکلی بالا، نشانگر هم‌باز                         | نیاز به اطلاعات توالی                           | <i>Hordeum vulgare</i> L. (Esmaili et al., 2014); <i>Solanum lycopersicum</i> L. (Hosseini et al., 2023) |
| توالی‌های چندشکل تکثیر شده شکسته شده (CAPS) Cleaved Amplified Polymorphic Sequence                            | Akopyanz et al., (1992)      | تکرارپذیری بالا، نشانگر هم‌باز                                   | نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر          | <i>Solanum lycopersicum</i> L. (Pozharskiy et al., 2023)                                                 |
| ناحیه تکثیر شونده با ردیف مشخص (SCAR) Sequence Characterized Amplified Region                                 | Paran and Michelmore, (1993) | تکرارپذیری بالا، نشانگر هم‌باز                                   | نیازمند توالی ژن جهت ساخت آغازگر                | <i>Amaranthus</i> (Ray and Roy, 2009)                                                                    |
| تفاوت‌های ریزماهوره تکثیر شونده تصادفی (RAMP) Random Amplified Microsatellite Polymorphisms                   | Wu et al., (1994)            | عدم نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر، نشانگر هم‌باز        | مشکل تکرارپذیری                                 | <i>Hordeum vulgare</i> (Yongcui et al., 2005)                                                            |
| توالی‌های تکراری ساده میانی (ISSR) Inter-Simple Sequence Repeat                                               | Zietkiewics et al., (1994)   | عدم نیاز به اطلاعات توالی برای ساخت آغازگر، نیاز به مقدار کم DNA | مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب                    | <i>Ricinus communis</i> (Sharifi Soltani et al., 2023)                                                   |
| تفاوت طول قطعات حاصل از تکثیر (AFLP) Amplified Fragment Length Polymorphism                                   | Vos et al., (1995)           | عدم نیاز به اطلاعات توالی                                        | مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب                    | <i>Oryza sativa</i> L. (Alizadeh et al., 2013); <i>Sorghum bicolor</i> L. Moench (Medraoui et al., 2024) |
| چندشکلی در تکثیر بین رتروترانسپوزون‌ها (IRAP) Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism                    | Kalendar et al., (1999)      | چندشکلی و پوشش ژنومی بالا                                        | تشخیص آلل، نشانگر غالب                          | <i>Gladiolus</i> (Nazarbeigi et al., 2024)                                                               |
| چندشکلی در تکثیر بین ریزماهوره و رتروترانسپوزون (REMAP) Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism | Kalendar et al., (1999)      | چندشکلی و پوشش ژنومی بالا                                        | از نظر تکنیکی دارای مشکل تشخیص آلل، نشانگر غالب | <i>Triticum turgidum</i> L. (Marzang et al., 2020)                                                       |
| چندشکلی نوای هدف کدون آغاز (SCoT) Start Codon Targeted                                                        | Collard and Mackill, (2009)  | سادگی، مقرون به صرفه                                             | گاه‌ها مشکل تکرارپذیری، نشانگر غالب             | <i>Foeniculum vulgare</i> Mill. (Nikkerdar et al., 2018); <i>Cressa cretica</i> L. (Jahangir, 2021)      |



**شکل ۲.** ژنوتایپینگ با استفاده از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR بر اساس الگوی باندها (Ng and Tan, 2015)

**Figure 2.** Genotyping using PCR-based DNA markers banding pattern (Ng and Tan, 2015)



شکل ۳. امتیازدهی ژل نشانگر (A) غالب و (B) هم‌باز در ۱۰ فرد (De Vicente *et al.*, 2004)

**Figure 3.** Gel scoring A) dominant and B) codominant marker in 10 individuals (De Vicente *et al.*, 2004)

Vicente *et al.*, 2004; Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019). همچنین در ارزیابی تنوع بین جمعیتی از تمایز بین جمعیتی برای یک مکان ( $g_{st}^{42}$ )، تمایز بین جمعیتی برای چندین مکان ( $G_{st}^{43}$ )، سهم جمعیت در تنوع ژنتیکی کل؛ آماره F رایت<sup>45</sup> و تجزیه واریانس مولکولی (AMOVA)<sup>46</sup> استفاده می‌شود (De Vicente *et al.*, 2004; Nonić and Šijačić-Nikolić, 2019). برای برآورد پارامترهای مذکور می‌توان از نرم‌افزارهایی همچون POPGENE، PowerMarker، Excel و GenA1Ex بهره برد. در ادامه به توضیح برخی از مفاهیم پارامترهای مورد استفاده برای بررسی میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی (جدول ۲) پرداخته می‌شود.

جمعیت به گروهی از افراد که علاوه بر مخزن ژنی مشترک، از توانایی تلاقی با یکدیگر نیز برخوردار هستند اطلاق می‌شود. ساختار هر جمعیت در سه سطح افراد<sup>40</sup>، زیرجمعیت<sup>41</sup> و جمعیت کل تقسیم می‌گردد. توصیف تنوع ممکن است در درون یک جمعیت یا بین جمعیت‌ها انجام شود (De Vicente *et al.*, 2004). زمانی که الگوی باندها امتیازدهی شد، می‌بایست بر اساس نوع نشانگر مورد استفاده (غالب یا هم‌باز) و سیستم زادآوری گیاه، میزان چندشکلی و تنوع مشاهده شده در درون یا بین جمعیت‌ها از نظر کمی تعیین شود. از مهم‌ترین پارامترها در برآورد تنوع درون جمعیتی می‌توان به اندازه‌گیری میزان چندشکلی، نسبت مکان‌های چندشکل، میانگین تعداد آلل‌ها در هر مکان، تعداد آلل‌های موثر در هر مکان و میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار اشاره کرد (De

42. Interpopulation differentiation for one locus ( $g_{st}$ )  
 43. Interpopulation differentiation for several loci ( $G_{st}$ )  
 44. Population's contribution to total genetic diversity  
 45. Wright's F statistics  
 46. Analysis of Molecular Variance (AMOVA)

40. Individuals  
 41. Subpopulation

## جدول ۲. برخی از پارامترهای مورد استفاده در برآورد میزان چندشکلی و تنوع ژنتیکی

Table 2. Some parameters used in the estimation of polymorphism and genetic diversity

| پارامتر | محتوای اطلاعات چندشکلی | قدرت تفکیک | شاخص نشانگری | نسبت مکان‌های ژنی چندشکل | نسبت نشانگرهای چندشکل | هتروزیگوسیتی / تنوع ژنی | شاخص شانون | تنوع آلی | تعداد آلل‌های موثر | تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی | آماره F رایت | پارامترهای نی |
|---------|------------------------|------------|--------------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|------------|----------|--------------------|-------------------------------|--------------|---------------|
| غالب    | ✓                      | ✓          | ✓            | ✓                        | ✓                     | ✓                       | ✓          | ✓        | ✓                  | ✓                             | ✓            | ✓             |
| هم‌بارز | ✓                      | ✓          | ✓            | ✓                        | ✓                     | ✓                       | ✓          | ✓        | ✓                  | ✓                             | ✓            | ✓             |

آماره  $F_{st}$  برای نشانگرهای غالب نیز قابل محاسبه است.

محتوای اطلاعات چندشکلی<sup>۴۷</sup>

محتوای اطلاعات چندشکلی نشان‌دهنده توانایی یک نشانگر در تشخیص چندشکلی میان افراد یک جمعیت است و به تعداد آلل‌های موجود و فراوانی توزیع آن‌ها بستگی دارد. لذا هر چه این پارامتر بالاتر باشد، ارزش آن نشانگر بیش‌تر است (Serrote *et al.*, 2020). این پارامتر برای نشانگرهای هم‌بارز از طریق رابطه  $PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$  (Botstein *et al.*, 1980) و برای نشانگرهای غالب به روش  $PIC = 2f_i(1 - f_i)$  محاسبه می‌شود که در آن‌ها منظور از  $p_i$  و  $f_i$  فراوانی آلل نام است. دامنه تغییرات این پارامتر برای نشانگرهای هم‌بارز از صفر تا یک و برای نشانگرهای غالب صفر تا نیم می‌باشد (Serrote *et al.*, 2020). برخی محققین همچون Chesnokov and Artemyeva (2015) آن را معادل تنوع ژنی<sup>۴۸</sup> نظر گرفته‌اند.

نسبت مکان‌های ژنی چندشکل/نسبت نشانگرهای چندشکل<sup>۴۹</sup>

یکی از پارامترهایی که برای بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای غالب و هم‌بارز قابل استفاده است محاسبه چندشکلی می‌باشد. از آن‌جا که Ott (1992) سیستمی که فراوانی رایج‌ترین مرحله آن کم‌تر از ۰/۹۵

باشد را به عنوان چندشکل معرفی می‌کند، در نشانگرهای غالب که فرض می‌شود هر باند یک مکان را نشان می‌دهد مرحله‌ای که او به آن اشاره می‌کند همان توجه به «حضور و عدم حضور باند در هر فرد» در میان افراد تشکیل‌دهنده گروه مورد مطالعه است. به عنوان مثال اگر یک باند در ۹۴ درصد از افراد دیده شود، رایج‌ترین مرحله «حضور باند» خواهد بود، بنابراین به عنوان چندشکل در نظر گرفته می‌شود. همچنین اگر باندی فقط در ۶ درصد افراد مشاهده شود، شایع‌ترین مرحله «عدم حضور باند» خواهد بود که در ۹۴ درصد افراد دیده می‌شود، بنابراین باز هم، باند چندشکل خواهد بود (Laurentin, 2009). این پارامتر برای نشانگرهای غالب به‌جای مکان‌های چندشکل، نشانگر چندشکل نامیده می‌شود. در نشانگرهای هم‌بارز یک مکان با تعداد باندهایی که آلل می‌نامند نشان داده می‌شود؛ بنابراین، اگر رایج‌ترین مرحله یعنی حضور یا عدم حضور باند (آلل) در کم‌تر از ۹۵ درصد از افراد تشکیل‌دهنده گروه مورد مطالعه دیده شود، مکان چندشکل است. این پارامتر به صورت نسبت تعداد مکان‌های ژنی چندشکل بر تعداد کل مکان‌ها برای نشانگرهای هم‌بارز یا نسبت نشانگرهای چندشکل بر تعداد کل نشانگرها برای نشانگرهای غالب قابل محاسبه است (Laurentin, 2009).

4 . Polymorphic Information Content (PIC)

4 . Gene diversity

4 . Polymorphic loci/marker ratio

5 . Stage 0

اندازه نمونه کم‌تر حساس است. هنگامی که  $H_E$  و  $H_O$  مشابه هستند (تفاوت قابل توجهی نداشته باشند)، تلاقی در جمعیت تقریباً تصادفی است (Chesnokov and Artemyeva, 2015). هتروزیگوسیتی برای هر مکان به روش  $h = 1 - \sum p_i^2$  محاسبه می‌گردد که در آن  $p_i$  فراوانی آلل نام است (De Vicente et al., 2004). مقادیر این پارامتر از صفر تا یک متغیر است و زمانی که تعداد زیادی آلل در فراوانی‌های مشابه وجود داشته باشد هتروزیگوسیتی مورد انتظار به حداکثر می‌رسد. میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در تمام مکان‌ها تخمینی از گوناگونی ژنتیکی<sup>۵۷</sup> در جمعیت است که با کم کردن فراوانی‌های مورد انتظار هموزیگوت‌ها در یک مکان از ۱ محاسبه می‌شود، این عمل برای همه مکان‌ها تکرار و سپس میانگین آن‌ها محاسبه می‌گردد (De Vicente et al., 2004). به گفته Laurentin (2009) رابطه فوق جهت محاسبه فراوانی آللی است و هتروزیگوسیتی یا تنوع ژنی برای هر مکان طبق رابطه  $h = 2n(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$  برآورد می‌گردد؛ که در این رابطه منظور  $x_i$  فراوانی آلل نام (یا نشانگر) و  $n$  تعداد افراد است. برای به دست آوردن یک دید کلی از تنوع ژنتیکی در یک جمعیت (از نظر مفهومی) هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی مفهومی مناسب‌تر از PIC است (Laurentin, 2009).

#### تنوع آللی<sup>۵۸</sup> و تعداد آلل‌های موثر<sup>۵۹</sup>

ساده‌ترین راه برای اندازه‌گیری تنوع ژنتیکی، کمی کردن تعداد آلل‌های موجود است. تنوع آللی (A) میانگین تعداد آلل‌ها در هر مکان است و برای توصیف تنوع ژنتیکی استفاده می‌شود و از طریق  $A = n_i/n_1$  برآورد می‌گردد که در آن  $n_i$  تعداد کل آلل‌های موجود در مکان‌ها و  $n_1$  تعداد مکان‌ها است (Govindaraj et al., 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016). این پارامتر نسبت به اندازه نمونه حساس بوده و با افزایش

قدرت تفکیک<sup>۵۶</sup> شاخص نشانگری<sup>۵۷</sup> قدرت تفکیک پارامتری است که برای مشخص کردن توانایی نشانگر در تشخیص تفاوت میان ژنوتیپ‌ها استفاده می‌شود و به روش  $R_p = \sum I_b$  محاسبه می‌گردد (Kumar and Agrawal, 2019). در این رابطه، منظور از  $I_b$  اطلاعات باندها<sup>۵۸</sup> است که میزان عددی آن از صفر تا یک متغیر و حاصل از رابطه  $I_b = 1 - (2|0.5 - p|)$  می‌باشد. در رابطه مذکور  $p$  نسبت افراد دارای باند به کل افراد است (Chesnokov and Artemyeva, 2015; Govindaraj et al., 2015).

شاخص نشانگری معیاری برای تعیین کارایی نشانگر در شناسایی مکان‌های چندشکل در بین ژنوتیپ‌های مختلف است که از حاصل ضرب محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) و نسبت چندگانه موثر<sup>۵۹</sup> (EMR) از طریق رابطه  $MI = EMR \times PIC$  برآورد می‌گردد. نسبت چندگانه موثر از طریق رابطه  $EMR = n_p(n_p/n)$  محاسبه می‌گردد که در آن منظور از  $n_p$  تعداد مکان‌های چندشکل و  $n$  تعداد کل مکان‌ها است (Nagaraju et al., 2001; Kumar and Agrawal, 2019).

#### هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی<sup>۵۵</sup>

هتروزیگوسیتی (H) احتمال متفاوت بودن دو آلل در یک مکان (که به طور تصادفی از جمعیت انتخاب شده‌اند) است که تنها در نشانگرهای هم‌بارز (به دلیل شناسایی افراد هموزیگوت از هتروزیگوت) قابل استفاده است. اصطلاح تنوع ژنی همین کاربرد را دارد با این تفاوت که برای نشانگرهای غالب به کار می‌رود زیرا افراد هموزیگوت و هتروزیگوت به‌طور مستقیم متمایز نمی‌گردند (Laurentin, 2009). هتروزیگوسیتی در دو سطح هتروزیگوسیتی مورد انتظار ( $H_E$ ) و هتروزیگوسیتی مشاهده شده ( $H_O$ ) تعریف می‌گردد که معمولاً از  $H_E$  به منظور توصیف تنوع ژنتیکی استفاده می‌گردد زیرا نسبت به

56 . Frequencies  
57 . Genetic variability  
58 . Allelic diversity (A)  
59 . Effective number of alleles (Ae)

56 . Resolving Power (RP)  
57 . Marker Index2(MI)  
58 . Informative bands (Ib)  
59 . Effective Multiplex Ratio (EMR)  
5 . Heterozygosity (H)/Gene diversity

بیش‌تری نسبت به غنای آلی یا تعداد آل‌ها می‌باشد (Sherwin *et al.*, 2017). این پارامتر بر اساس رابطه  $p_i = -\log_2 p_i$  حساب می‌شود که در این رابطه  $p_i$  فراوانی حضور یا عدم حضور یک باند در یک مکان است (Shannon and Weaver, 1949). از نرم‌افزاری نظیر GenAIX می‌توان برای اندازه‌گیری این شاخص استفاده نمود.

#### آماره F رایت و $G_{ST}$ <sup>۶۴</sup>

یکی از راه‌های مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌ها استفاده از آماره‌های  $F$  ( $F_{IT}$ ,  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ) است که امکان آنالیز ساختار جمعیت‌های در حال تقسیم<sup>۶۵</sup> را فراهم می‌کند (De Vicente *et al.*, 2004). آماره  $F$  رایت یا شاخص تثبیت<sup>۶۶</sup> به منظور برآورد تفاوت هتروزیگوسیتی مشاهده شده و هتروزیگوسیتی مورد انتظار وقتی که تعادل هاردی واینبرگ برقرار باشد به کار می‌رود (Laurentin, 2009). تمایز در سه سطح کل گروه ( $F_{IT} = 1 - (H_I/H_T)$ )، بین گروه‌های فرعی ( $F_{ST} = 1 - (H_S/H_T)$ ) و درون گروه‌های فرعی ( $F_{IS} = 1 - (H_I/H_S)$ ) ارزیابی می‌شود؛ که در این روابط منظور از  $H_I$  میانگین هتروزیگوسیتی مشاهده شده در تمام مکان‌ها،  $H_T$  میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در کل گروه و  $H_S$  میانگین هتروزیگوسیتی مورد انتظار در گروه‌های فرعی است. آماره‌های مذکور برای نشانگرهای هم‌باز قابل محاسبه‌اند زیرا نیازمند برآورد هتروزیگوسیتی مشاهده شده می‌باشند (Laurentin, 2009). آماره  $F_{ST}$  برای نشانگرهای غالب نیز قابل اجرا است. دامنه تغییرات آن از صفر (عدم تمایز ژنتیکی) تا یک (حداکثر تمایز) متغیر می‌باشد؛ در این میان بازه ۰-۰/۰۵ نشان دهنده تمایز ژنتیکی کم، ۰/۱۵-۰/۰۵ متوسط، ۰/۲۵-۰/۱۵ زیاد و بالاتر از ۰/۲۵ بسیار زیاد می‌باشد (De Vicente *et al.*, 2004; Laurentin, 2009).

اندازه نمونه جمعیت احتمال آشکار شدن یک آل جدید (نادر) افزایش می‌یابد (Laurentin, 2009).

اصطلاح تعداد آل‌های موثر ( $A_e$ ) که توسط Hartl and Clark (1997) مطرح شد (Laurentin, 2009) عبارت از اندازه‌گیری تعداد آل‌های با فراوانی برابر است و جهت دستیابی به سطح معینی از تنوع ژنی لازم می‌باشد. از آن‌جا که جمعیتی با سه آل با فراوانی مشابه نسبت به جمعیتی که یک آل با فراوانی بالا و دو آل با فراوانی کم، چندشکلی بیش‌تری نشان می‌دهد، لذا  $A_e$  معیار بهتری نسبت به  $A$  است (Bagherieh Najjar *et al.*, 2014). تعداد آل‌های موثر از طریق  $A_e = 1/(1 - h) = 1/\sum p_i^2$  محاسبه می‌شود که  $p_i$  فراوانی آل  $i$ ام در یک مکان و  $h = 1 - \sum p_i^2$  میزان هتروزیگوسیتی در یک مکان است (De Vicente *et al.*, 2004). بنابراین دستیابی به بیش‌ترین تعداد آل‌های موثر زمانی رخ می‌دهد که هتروزیگوسیتی بالا باشد و این مسئله مستلزم برابر بودن فراوانی همه آل‌ها است. البته این محاسبه ممکن است تحت تاثیر اندازه نمونه قرار گیرد (De Vicente *et al.*, 2004).

#### شاخص شانون<sup>۶۷</sup>

شاخص تنوع شانون برای ارزیابی تنوع در سطوح مختلف از ژن‌ها و جمعیت‌ها گرفته تا همه گونه‌ها و اکوسیستم‌ها پیشنهاد شده است. اگرچه برخی از محققین استفاده از این شاخص به عنوان معیار تنوع ژنتیکی را رد می‌کنند (Hennink and Zeven, 1990; Konopiński, 2020). در مطالعات ژنتیک جمعیت، وقتی در برخی از جمعیت‌ها چند آل مشترک غالب باشد و در جمعیت‌های دیگر تغییرات به‌طور یکنواخت توسط همه آل‌ها ایجاد شود امکان تشخیص سطح تغییرات بین جمعیت‌ها (با تعداد آل یکسان) توسط شاخص شانون فراهم خواهد شد. شاخص شانون در مقایسه با هتروزیگوسیتی، به از دست دادن واریانت‌های نادر (مثلاً به دلیل تنگناهای ژنتیکی)<sup>۶۸</sup> حساس‌تر است. همچنین این شاخص حامل اطلاعات

64 . Wright's F-statistics  
65 . Interpopulation differentiation for several loci  
66 . Subdivided populations  
67 . Fixation index

68 . Shannon's index  
69 . Variation  
70 . Genetic bottlenecks



استفاده می‌گردد (Kosman and Leonard, 2005). در واقع ژنوتیپ‌هایی با ژن‌های مشابه، فاصله ژنتیکی کم‌تری با یکدیگر دارند (Bhandari *et al.*, 2017). جهت برآورد عدم تشابه ژنتیکی می‌توان از ضرایب مبتنی بر فراوانی آللی نظیر اقلیدسی<sup>۶</sup>، راجر<sup>۷</sup>، راجر تغییر یافته<sup>۸</sup>، رینولد<sup>۹</sup>، نی<sup>۱۰</sup> (فاصله ژنتیکی استاندارد نی)<sup>۱۱</sup> و همکاران<sup>۱۲</sup> استفاده نمود (Mohammadi, 2006).

دسته دیگر ضرایب مورد استفاده جهت برآورد تشابه ژنتیکی یا عدم تشابه افراد، مبتنی بر داده‌های صفر و یک<sup>۱۳</sup> است که متداول‌ترین آن‌ها شامل ضرایب جاکارد<sup>۱۴</sup> (J)، دایس<sup>۱۵</sup> (D) یا نی و لی<sup>۱۶</sup> (NL) و تطابق ساده<sup>۱۷</sup> (SM) می‌باشد (Mohammadi, 2006). در انتخاب ضرایب مذکور، Laurentin (2009) به نوع نشانگر (غالب یا هم‌بارز) و همچنین به نوع سیستم زادآوری گیاه (خودگشن یا دگرگشن) توجه کرده است. او ضرایب جاکارد و دایس را در بررسی افراد غیرخویشاوند و ضریب تطابق ساده را در بررسی افراد خویشاوند با استفاده از نشانگرهای غالب پیشنهاد کرده است. همچنین او در بررسی روابط ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای هم‌بارز به‌طور عمده ضریب دایس را برای گیاهان خودگشن پیشنهاد می‌کند (Laurentin, 2009). از آن‌جا که در ضریب دایس وزن تعداد باندهای مشترک بین دو فرد، دو برابر ضریب جاکارد در نظر گرفته می‌شود، در صورت هموزیگوت بودن افراد مورد بررسی، برآورد شباهت ژنتیکی آن‌ها با استفاده از این دو ضریب (دایس و جاکارد) یکسان است و در صورت هتروزیگوت بودن آن‌ها، برآورد این دو ضریب با استفاده از نشانگرهای هم‌بارز که قدرت تفکیک افراد هموزیگوت و

برخی منابع  $G_{ST}$  را معادل  $F_{ST}$  گزارش کرده‌اند (Nei, 1973) که تنوع ژنی بین جمعیت‌ها را اندازه‌گیری می‌کند؛ لذا برای برآورد آن باید تعداد زیادی از مکان‌ها را مورد مطالعه قرار داد (De Vicente *et al.*, 2004). این پارامتر جهت مطالعه ساختار ژنتیکی یک جمعیت تقسیم شده بدون در نظر گرفتن تعداد آلل‌ها در هر مکان یا نیروهای تکاملی کاربردی می‌باشد. تمایز ژنی ( $G_{ST}$ ) طبق رابطه  $G_{ST} = D_{ST}/H_T$  برآورد می‌گردد که در آن  $G_{ST}$  تمایز ژنی مرتبط با کل جمعیت،  $D_{ST}$  تمایز ژنی (میانگین تنوع ژنی) میان زیرجمعیت‌ها و  $H_T$  تنوع ژنی در کل جمعیت است (Laurentin, 2009).

### تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی

از روش‌های رایج برای محاسبه آماره‌های  $F$  می‌توان به تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی (AMOVA) اشاره کرد که آزمایش وجود ساختار جمعیت سلسله‌مراتبی را آسان می‌کند (Excoffier *et al.*, 1992). با این‌حال، این تکنیک مستلزم آن است که ساختار سلسله‌مراتبی جمعیت از قبل شناخته شده باشد. بنابراین، یک تجزیه و تحلیل خوشه‌بندی به عنوان مثال، Structure (Pritchard *et al.*, 2000) ممکن است بر روی داده‌ها انجام شود، که نتایج آن سپس به عنوان مبنایی برای AMOVA استفاده می‌شود (Meirmans, 2012). همچنین AMOVA می‌تواند اجزای واریانس بین و درون گروه‌ها را تخمین زند و سهم هر یک از تنوع درون و بین جمعیت‌ها را نسبت به تنوع کل مشخص نماید (Excoffier *et al.*, 1992).

### اندازه‌گیری تشابه و عدم تشابه ژنتیکی (فاصله

#### ژنتیکی) و ضرایب مورد استفاده

در ارزیابی روابط ژنتیکی میان افراد می‌توان از ماتریس عدم تشابه ژنتیکی استفاده کرد که میزان تفاوت میان جفت افراد، محاسبه و از آن برای توصیف ساختار جمعیت بر اساس قرابت نسبی هر فرد با سایر افراد مورد مطالعه،

6 . Genetic dissimilarity coefficients for allelic informative marker data

7 . Euclidean 0

7 . Rogers 1

7 . Modified Rogers

7 . Reynolds *et al.*, (1983)

7 . Nei, (1972) 4

7 . Nei's standard genetic distance

7 . Nei *et al.*, (1983)

7 . Similarity coefficients for allelic noninformative marker data

7 . Jaccard (J) 8

7 . Dice (D) 9

8 . Nei and Li (NL)

8 . Simple Matching (SM)

6 . Similarity 7

6 . Dissimilarity & distance matrix

شروع شده و هدف آن ایجاد نمودار گرافیکی بر اساس فاصله‌ی میان افراد است؛ به گونه‌ای که فاصله بین نقاط در نمودار، نزدیک به تفاوت‌های اصلی باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003).

تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی با استفاده از برخی نرم‌افزارها مانند NTSyspc, DARwin, PAST و R بر اساس ضرایب و الگوریتم‌های متفاوتی ترسیم می‌گردند.

### انواع الگوریتم‌های گروه‌بندی

در گروه‌بندی سلسله‌مراتبی بر اساس روش اندازه‌گیری فاصله بین افراد، از الگوریتم‌هایی نظیر نزدیک‌ترین همسایگی<sup>۸</sup>، دورترین همسایگی<sup>۸</sup>، جفت گروه بدون وزن با میانگین حسابی<sup>۹</sup> (UPGMA) و نیز روش Ward استفاده می‌گردد. مبنای اندازه‌گیری در این چهار روش به ترتیب کم‌ترین، بیش‌ترین، میانگین و مجموع مربعات فاصله جفت افراد می‌باشد (De Vicente et al., 2004; Maulik et al., 2011). UPGMA و Ward از متداول‌ترین الگوریتم‌های مورد استفاده هستند (Mohammadi and Prasanna, 2003) که اهمیت آن‌ها را می‌توان به سهولت دسترسی به آن‌ها در برنامه‌های آماری، درک آسان‌تر نتایج حاصل از آن‌ها و کوتاه بودن زمان مورد نیاز برای تجزیه و تحلیل نسبت داد (Ebrahimi & Zienalabedini, 2013). در روش UPGMA وجود اثر زنجیره‌ای، تفسیر داده‌ها را مشکل می‌کند که از معایب اصلی آن شمرده شده است در صورتی که در روش Ward اثر زنجیره‌ای به‌ندرت دیده می‌شود (Mohammadi and Prasanna, 2003). روش دیگری به نام اتصال همسایگی<sup>۱</sup> (NJ) نیز وجود دارد که ابتدا با یک درخت با توپولوژی ستاره مانند شروع و سپس با انتخاب متوالی جفت تاکسون‌ها بر اساس فاصله آن‌ها ادامه یافته تا درخت نهایی ترسیم گردد (Yang and Rannala, 2012). در برخی منابع توصیه به استفاده از روش NJ و Ward شده است (Ebrahimi & Zienalabedini, 2013).

هتروزیگوت را دارند، متفاوت خواهد بود (Link et al., 1995; Mohammadi, 2006). در ضریب تطابق ساده، عدم وجود باند برای هر دو فرد مورد مقایسه به عنوان تشابه در نظر گرفته می‌شود، در حالی که ضرایب جاکارد و دایس آن را به عنوان معیاری برای تشابه در نظر نمی‌گیرند (Kosman and Leonard, 2005).

### تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی

روش‌های آماری چند متغیره راه مهمی برای نمایش روابط ژنتیکی و گروه‌بندی افراد می‌باشد که رایج‌ترین آن‌ها شامل تجزیه خوشه‌ای<sup>۲</sup> و تجزیه به مختصات اصلی<sup>۳</sup> می‌باشد (Mohammadi and Prasanna, 2003). در تجزیه خوشه‌ای، افراد بر اساس اطلاعات توصیف‌کننده آن‌ها و روابطشان گروه‌بندی می‌گردند. در واقع افراد درون یک گروه، مشابه یا مرتبط با یکدیگر بوده و از افراد گروه‌های دیگر متمایز می‌شوند. هر چه شباهت در یک گروه و تفاوت بین گروه‌ها بیش‌تر باشد، خوشه‌بندی بهتر یا متمایزتر است (Tan et al., 2006). یکی از روش‌های خوشه‌بندی، سلسله‌مراتبی<sup>۴</sup> است که با ساختار درخت‌مانند مشخص می‌شود. این روش دارای دو رویکرد بالا به پایین (تجزیه‌ای)<sup>۵</sup> و پایین به بالا (تجمعی)<sup>۶</sup> می‌باشد. در حالت تجمعی هر فرد در یک خوشه مجزا قرار گرفته و سپس خوشه‌ها با توجه به شباهت‌شان با یکدیگر ادغام می‌شوند. ابتدا، دو خوشه مشابه (آن‌هایی که کم‌ترین فاصله را دارند) ادغام شده تا یک خوشه جدید در پایین سلسله‌مراتب تشکیل شود؛ سپس یک جفت دیگر از خوشه‌ها ادغام شده و به سطح بالاتری از سلسله‌مراتب پیوند داده می‌شود و به همین ترتیب سلسله‌مراتبی از خوشه‌ها از پایین به بالا ایجاد می‌گردد. در صورتی که در رویکرد بالا به پایین ابتدا همه افراد در یک خوشه قرار گرفته، سپس به تدریج تقسیم می‌شوند (Sarstedt and Mooi, 2011). تجزیه به مختصات اصلی (PCoA) روشی است که با ماتریسی از شباهت‌ها یا عدم تشابه بین مجموعه‌ای از افراد

8 . Single linkage  
8 . Complete linkage  
8 . Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)  
9 . Chaining effect

8 . Cluster analysis  
8 . Principal Coordinate Analysis (PCoA)  
8 . Hierarchical clustering  
8 . Divisive clustering  
8 . Agglomerative clustering

نمونه‌ها یا زمان و بودجه محدود است مناسب می‌باشد (De Vicente *et al.*, 2004).

**برنامه‌های نرم‌افزاری برای بررسی تنوع ژنتیکی**  
تجزیه و تحلیل بر پایه ابزار آماری سبب تفسیر بهتر داده‌ها می‌گردد. انواع مختلفی از نرم‌افزارها (Aremu, 2012; Tanavar *et al.*, 2014; Pagnotta, 2018) برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی وجود دارد که اکثر آن‌ها بر اساس تحلیل آماری چند متغیره هستند. اغلب نرم‌افزارها به صورت رایگان در دسترس و برای رایانه‌های شخصی مناسب هستند (Bhandari *et al.*, 2017). در این مطالعه به برخی از پرکاربردترین نرم‌افزارها در جدول ۳ اشاره شده است.

یکی از رایج‌ترین روش‌های سنجش کارایی هر یک از الگوریتم‌های مورد استفاده در تجزیه خوشه‌ای، ضریب همبستگی کوفاکتیک (r) است که به منظور تطابق شباهت نشان داده شده توسط درخت و ماتریس تشابه به کار می‌رود. مقادیر مساوی ۰/۹ و یا بیش‌تر، کارایی الگوریتم مورد استفاده را نشان می‌دهد اما لازم به ذکر است که پایین بودن مقدار ضریب همبستگی مبنی بر عدم کارایی درخت نبوده و ممکن است مرتبط به داده‌های مولکولی گمشده باشد (Mohammadi, 2006; Darvish Zadeh, 2015). همچنین روش دیگری به نام نمونه برداری مجدد با جایگزینی با همان ماتریس داده (بوتسترپ) وجود دارد که امکان محاسبه انحراف معیارها و واریانس‌ها را فراهم می‌کند و برای شرایطی که تعداد

**جدول ۳.** برخی از رایج‌ترین برنامه‌های نرم‌افزاری برای تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی (Govindaraj *et al.*, 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016; Bhandari *et al.*, 2017)

**Table 3.** Some of the most common software programs for analyzing genetic diversity (Govindaraj *et al.*, 2015; Mukhopadhyay and Bhattacharjee, 2016; Bhandari *et al.*, 2017)

| نرم‌افزار                                                                    | برخی از ویژگی‌های اصلی                                                                                                                                                                                                               | منبع                                  | آدرس سایت                                                                                                                     |
|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NTSYSpc<br>(Numerical Taxonomy System for personal computer)                 | مبتنی بر ضرایب تشابه و عدم تشابه، تجزیه خوشه‌ای، تجزیه به مختصات اصلی و تجزیه به مولفه‌های اصلی                                                                                                                                      | Rohlf, (2002)                         | <a href="https://www.appliedbiostat.com/ntsyspc/ntsyspc.html">https://www.appliedbiostat.com/ntsyspc/ntsyspc.html</a>         |
| DARwin<br>(Dissimilarity Analysis and Representation for windows)            | تخمین فاصله و عدم تشابه، تجزیه خوشه‌ای و تجزیه به مختصات اصلی                                                                                                                                                                        | Perrier and Jacquemoud-Collet, (2006) | <a href="https://darwin.cirad.fr/product.php">https://darwin.cirad.fr/product.php</a>                                         |
| PAST<br>(PAleontological STatistics software for analysis and education)     | پارسیمونی، تجزیه به مولفه‌های اصلی و تجزیه به مختصات اصلی                                                                                                                                                                            | Hammer <i>et al.</i> , (2001)         | <a href="https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/">https://www.nhm.uio.no/english/research/resources/past/</a> |
| PowerMarker<br>(A Powerful software for Marker data analysis)                | مناسب داده‌های SSR در بررسی ژنتیک جمعیت، تعداد آلل‌ها، تنوع ژنی، ضریب خودگشتی، ساختار جمعیت، آزمون منتل، هتروزیگوسیتی، محتوای اطلاعات چندشکلی، فراوانی آللی، تعادل هاردی-واینبرگ                                                     | Liu and Muse, (2005)                  | <a href="https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/powermarker/">https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/powermarker/</a>                   |
| POPGENE<br>(Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis) | مناسب برای نشانگرهای غالب و هم‌باز، فراوانی ژنی، تعداد آلل‌ها، تعداد آلل‌های موثر، مکان‌های چندشکل، تنوع ژنی، شاخص شانون، آماره‌های F، جریان ژنی، فاصله ژنتیکی (مبتنی بر ضریب نی) و تجزیه خوشه‌ای (بر اساس Neighbor Joining و UPGMA) | Yeh <i>et al.</i> , (1999)            | <a href="https://sites.ualberta.ca/~feyeh/popgene.html">https://sites.ualberta.ca/~feyeh/popgene.html</a>                     |
| GenAIEx<br>(Genetic Analysis in Excel)                                       | مناسب برای نشانگرهای غالب و هم‌باز، هتروزیگوسیتی مشاهده شده و مورد انتظار، شاخص نشانگری، شاخص تثبیت، Fst، فاصله ژنتیکی نی، شاخص شانون و تجزیه به مختصات اصلی                                                                         | Peakall and Smouse, (2006)            | <a href="http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html">http://biology-assets.anu.edu.au/GenAIEx/Welcome.html</a>     |
| Arlequin                                                                     | تخمین فراوانی آللی، تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی                                                                                                                                                                                    | Excoffier <i>et al.</i> , (2010)      | <a href="https://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35">https://cmpg.unibe.ch/software/arlequin35</a>                             |
| FSTAT                                                                        | تنوع ژنی، بوتسترپ                                                                                                                                                                                                                    | Goudet, (2002)                        | <a href="https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm">https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm</a>                 |

1. Neighbor-joining (NJ)
2. Bootstrapping

## نتیجه‌گیری

تنوع ژنتیکی برای سازگاری گیاهان با تغییرات محیطی لازم و ضروری است. واکنش گیاهان و توانایی‌های سازگاری آن‌ها به تغییرات آب و هوایی به سطح تنوع ژنتیکی آن‌ها بستگی دارد. نشانگرهای مولکولی به‌طور گسترده برای مطالعات تنوع ژنتیکی منابع گیاهی و ژنتیک جمعیت کاربرد دارند. استفاده از این نشانگرها به منظور اصلاح و بهبود محصولات، حفاظت و معرفی گیاهان در معرض خطر و با ارزش ضروری است. همچنین شناسایی واریته‌های گیاهی جدید و تشخیص تغییرات ژنتیکی انواع گیاهان را امکان‌پذیر می‌سازند و بینش‌های ارزشمندی را در مورد تغییرات ژنتیکی موجود در درون و بین جمعیت‌های گیاهی ارائه می‌دهند. لذا شناسایی و برآورد مناسب تنوع ژنتیکی برای اهداف مذکور حائز اهمیت است. بنابراین ابزارهای مولکولی و روش‌های آماری می‌توانند دریچه جدیدی را برای درک بهتر چندشکلی و روابط ژنتیکی بین افراد باز کنند و به محققین اجازه دهند تا به سؤالات مهم در این زمینه‌ها پاسخ دهند.

لذا در این مطالعه مروری بر مفاهیم پایه مرتبط به کمی کردن تنوعات درون جمعیت‌های گیاهی (تنوع آلی، تعداد آلل‌های موثر و هتروزیگوسیتی/تنوع ژنی)، تنوعات بین جمعیت‌های گیاهی (و یا افراد) (آماره F رایت،  $G_{st}$  و تجزیه و تحلیل واریانس مولکولی)، روابط ژنتیکی بین آنها (ضرایب مبتنی بر تشابه و فاصله ژنتیکی) و نیز نمایش این روابط (خوشه‌بندی و تجزیه به مختصات اصلی) بر اساس داده‌های مولکولی مبتنی بر امتیازدهی ژل صورت گرفته است. همچنین به برخی از رایج‌ترین برنامه‌های نرم‌افزاری در این زمینه اشاره می‌گردد.

## تشکر و قدردانی

از حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه شهید چمران اهواز در قالب پژوهانه به شماره SCU.AA1402.165 در انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

## References

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27, 617-631.
- Akkaya, M. S., Bhagwat, A. A., & Cregan, P. B. (1992). Length polymorphisms of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 132 (4), 1131-1139.
- Alizadeh, M., Nematzadeh, G. A., Ebrahimi, M.A., & Hashemi, H. (2013). Fingerprinting of some rice (*Oryza sativa* L.) germplasm via AFLP markers. *Crop Biotechnology*, 3 (4), 53-60. (In Persian)
- Akopyanz, N., Bukanov, N. O., Westblom, T. U., & Berg, D. E. (1992). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 20 (23), 6221-6225.
- Amiteye, S. (2021). Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding. *Heliyon*, 7 (10), 1-20.
- Aremu, C. O. (2012). Exploring statistical tools in measuring genetic diversity for crop improvement. *Genetic Diversity in Plants*, 340-348.
- Bagherieh Najjar, M. B., Kohan Baghkheirati, E., & Abasi, Z. (2014). *DNA fingerprinting in plants principles, methods and applications*. Gorgan, Golestan University. (In Persian)
- Bhandari, H. R., Bhanu, A. N., Srivastava, K., Singh, M. N., & Shreya, H. A. (2017). Assessment of genetic diversity in crop plants - an overview. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 7 (3), 279-286.
- Bidyananda, N., Jamir, I., Nowakowska, K., Varte, V., Vendrame, W. A., Devi, R. S., & Nongdam, P. (2024). Plant genetic diversity studies, insights from DNA marker analyses. *International Journal of Plant Biology*, 15 (3), 607-640.
- Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3), 314.
- Caliskan, M. (Ed.). (2012). *Genetic diversity in plants*. BoD-Books on Demand.

- Chesnokov, Y. V., & Artemyeva, A. M. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Agricultural Biology*, 50 (5), 571-578.
- Collard, B. C., & Mackill, D. J. (2009). Start codon targeted (SCoT) polymorphism, a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 27, 86-93.
- Dar, A. A., Mahajan, R., & Sharma, S. (2019). Molecular markers for characterization and conservation of plant genetic resources. *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 89 (11), 1764-1772.
- Darvish Zadeh, R., & Azizi, H. (2015). *Molecular markers and their application in the analysis of genetic diversity*. Urmia, University of Urmia. (In Persian)
- De Vicente, M. C., Lopez, C., & Fulton, T. (2004). Genetic diversity analysis with molecular marker data, learning module. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI).
- Ebrahimi, M. A., & Zienalabedini, M. (2013). Application of genomic and unigene-based microsatellite markers in conservation and management of genetic resources of some Iranian crops. *Crop Biotechnology*, 4, 133-148.
- Esmaili, A., Talebi, B., Drikvand, R., Ebrahimi, M. A., & Hossienpour, T. (2014). Evaluation of genetic diversity among hull-less and hulled rain-fed barley genotypes using SSR molecular marker. *Crop Biotechnology*, 3 (5), 103-111. (In Persian)
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes, application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131 (2), 479-491.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L. (2010) Arlequin suite ver 3.5, a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Goudet, J. (2002). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9. 3.2). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Govindaraj, M., Vetriventhan, M., & Srinivasan, M. (2015). Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances, an overview of its analytical perspectives. *Genetics Research International*, 2015, 1-14.
- Hamdan, Y. A., Hawamda, A. I., Basheer-Salimia, R., & Salman, M. (2024). Genetic diversity assessment of Palestinian okra landraces (*Abelmoschus esculentus* L.) through RAPD marker. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1-8.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST, paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4 (1), 1-9.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1997). *Principles of population genetics*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates.
- Heidari, B. (2011). *Plant molecular breeding*. Shiraz, University of Shiraz. (In Persian)
- Hennink, S., & Zeven, A. C. (1990). The interpretation of Nei and Shannon-Weaver within population variation indices. *Euphytica*, 51, 235-240.
- Heras, J., Domínguez, C., Mata, E., Pascual, V., Lozano, C., Torres, C., & Zarazaga, M. (2016). A survey of tools for analysing DNA fingerprints. *Briefings in Bioinformatics*, 17 (6), 903-911.
- Hosseini, F., Niknejad, A., Sorkhilaleloo, B., Kohpalekani, J. A., & Khameneh, M. M. (2023). Valuation of genetic diversity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) based on the comparison of ISSR and SSR marker efficiency. *Agricultural Biotechnology Journal*, 15 (2), 63-82. (In Persian)
- Jaccoud, D., Peng, K., Feinstein, D., & Kilian, A. (2001). Diversity arrays, a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research*, 29 (4), e25.
- Jahangir, M. (2021). Genetic diversity and population structure of *Cressa cretica* L. in Ahvaz using morphological and molecular markers (SCoT and ISSR). The thesis was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Master of Science degree (M.Sc.). Shahid Chamran University of Ahvaz. (In Persian)
- Kadirvel, P., Senthilvel, S., Geethanjali, S., Sujatha, M., & Varaprasad, K. S. (2015). Genetic markers, trait mapping and marker-assisted selection in plant breeding. *Plant Biology and Biotechnology, Volume II, Plant Genomics and Biotechnology*, 65-88.
- Kalendar, R., Grob, T., Regina, M., Suoniemi, A., & Schulman, A. (1999). IRAP and REMAP, two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. *Theoretical and Applied Genetics*, 98, 704-711.
- Kalendar, R., & Schulman, A. H. (2014). Transposon-based tagging, IRAP, REMAP, and iPBS. *Molecular plant taxonomy, methods and protocols*, 233-255.

- Kanouni, H., & Khalily, M. (2010). *Advances in crop breeding, laboratory protocols of molecular markers*. Urmia, Academic Jihad. (In Persian)
- Konopiński, M. K. (2020). Shannon diversity index, a call to replace the original Shannon's formula with unbiased estimator in the population genetics studies. *PeerJ*, 8, e9391.
- Kosman, E., & Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology*, 14 (2), 415-424.
- Kumar, J., & Agrawal, V. (2019). Assessment of genetic diversity, population structure and sex identification in dioecious crop, *Trichosanthes dioica* employing ISSR, SCoT and SRAP markers. *Heliyon*, 5 (3), 1-26.
- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., & Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2 (4), 141-162.
- Laurentin, H. (2009). Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 56, 277-292.
- Link, W., Dixkens, C., Singh, M., Schwall, M., & Melchinger, A. E. (1995). Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 90, 27-32.
- Liu, K., & Muse, S. V. (2005). PowerMarker, an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics*, 21 (9), 2128-2129.
- Marzang, N., Abdollahi Mandoulakani, B., Shaaf, S., Ghadmizadeh, M., Bernousi, I., Abbasi Holasou, H., & Sadeghzadeh, B. (2020). IRAP and REMAP -based genetic diversity among Iranian, Turkish, and international durum wheat (*Triticum turgidum* L.) cultivars. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 22 (1), 271-285.
- Maulik, U., Bandyopadhyay, S., & Mukhopadhyay, A. (2011). *Multiobjective genetic algorithms for clustering, applications in data mining and bioinformatics*. Germany, Springer Berlin Heidelberg.
- Medraoui, L., Rabeh, K., Ater, M., & Filali-Maltouf, A. (2024). Genetic diversity analysis of sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) landraces from northwestern Morocco using ISSR and AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 71 (2), 835-850.
- Meirmans, P.G. (2012). AMOVA-based clustering of population genetic data. *Journal of Heredity*, 103 (5), 744-750.
- Mohammadi, A. (2006). *Analysis of molecular data from the point of view of genetic diversity*. The 9th Congress of Agricultural Sciences and Plant Breeding of Iran, 96-119. (In Persian)
- Mohammadi, S. A., & Prasanna, B. M. (2003). Analysis of genetic diversity in crop plants—salient statistical tools and considerations. *Crop Science*, 43(4), 1235-1248.
- Mooi, E., & Sarstedt, M. (2011). *A concise guide to market research*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Mukhopadhyay, T., & Bhattacharjee, S. (2016). Genetic diversity, importance and measurements. conserving biological diversity, a multiscaled approach. *Research India Publications, New Delhi*, 251-295.
- Nagaraju, J., Reddy, K. D., Nagaraja, G. M., & Sethuraman, B. N. (2001). Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity*, 86 (5), 588-597.
- Naghavi, R., Ghariazi, B., & Hosseini Salekdeh, G. H. (2009). *Molecular markers*. Tehran, University of Tehran. (In Persian)
- Nazarbeigi, M., Rooin, Z., & Sabouri, A. (2024). Investigating the genetic diversity of native Iranian *Gladiolus* with ISSR and IRAP molecular markers. *Journal of Plant Production Research*, 31 (1), 89-110. (In Persian)
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106 (949), 283-292.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (12), 3321-3323.
- Ng, W. L., & Tan, S. G. (2015). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers, are we doing it right. *ASM Science Journal*, 9 (1), 30-39.
- Nikkerdar, F., Farshadfar, M., Ebrahimi, M. A., & Shirvani, H. (2018). Genetic diversity among fennel (*Foeniculum Vulgare* Mill.) landrace using SCoT Markers. *Journal of Crop Breeding*, 9 (24), 95-102. (In Persian)
- Nonić, M., & Šijačić-Nikolić, M. (2019). Genetic diversity, sources, threats, and conservation. *Life on Land*, 1-15.
- Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., & Hayashi, K. (1989). Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5 (4), 874-879.
- Ott, J. (1992). Strategies for characterizing highly polymorphic markers in human gene mapping. *American Journal of Human Genetics*, 51 (2), 283-290.

- Pagnotta, M. A. (2018). Comparison among methods and statistical software packages to analyze germplasm genetic diversity by means of codominant markers. *Multidisciplinary Science Journal*, 1 (1), 197-215.
- Paran, I., & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 85, 985-993.
- Peakall, R., & Smouse, P.E., (2006). GenAlEx 6, genetic analysis in Excel. population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6 (1), 288-295.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. P. (2006). DARwin software, <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Pozharskiy, A., Kostyukova, V., Khusnitdinova, M., Adilbayeva, K., Nizamdinova, G., Kapytina, A., Kerimbek, N., Taskuzhina, A., Kolchenko, M., Abdrakhmanova, A., Kisselyova, N., Kalendar, R., & Gritsenko, D. (2023). Genetic diversity of the breeding collection of tomato varieties in Kazakhstan assessed using SSR, SCAR and CAPS markers. *PeerJ*, 11, 1-19.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155 (2), 945-959.
- Rani, V., Yadav, M. K., Singh, R., & Yadav, D. (2024). Genetic diversity assessment in cereal crops. in sustainable utilization and conservation of plant genetic diversity (pp. 363-398). Singapore, Springer Nature Singapore.
- Rao, N. K. (2004). Plant genetic resources, advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3 (2), 136-145.
- Ray, T., & Roy, S. C. (2009). Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *Journal of Heredity*, 100 (3), 338-347.
- Rohlf, F. J. (2002). NTSYSpc, numerical taxonomy system, version 2.1, Exeter Publishing, Setauket, NY, USA.
- Salgotra, R. K., & Chauhan, B. S. (2023). Genetic diversity, conservation, and utilization of plant genetic resources. *Genes*, 14 (1), 174.
- Sarwat, M. (2012). ISSR, a reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. *Plant DNA Fingerprinting and Barcoding, Methods and Protocols*, 103-121.
- Serrote, C. M. L., Reiniger, L. R. S., Silva, K. B., dos Santos Rabaiolli, S. M., & Stefanel, C. M. (2020). Determining the polymorphism information content of a molecular marker. *Gene*, 726, 1-15.
- Shannon, C. E., & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication, by CE Shannon (and recent contributions to the mathematical theory of communication), W. Weaver. University of Illinois Press.
- Shashidhara, N., Dhanalakshmi, T. N., & Santosh, D. T. (2023). *Plant genetic resources in sustainable agriculture, current state, future perspectives, and challenges*. New Delhi.
- Sharifi Soltani, S., Ranjbar, G. A., Kazemitabar, S. K., Pakdin-Parizi, A., & Najafi Zarrini, H. (2023). Investigation of genetic diversity in castor (*Ricinus communis*) ecotypes using ISSR markers. *Journal of Plant Research (Iranian Journal of Biology)*, 36 (3), 294-308. (In Persian)
- Sherwin, W. B., Chao, A., Jost, L., & Smouse, P. E. (2017). Information theory broadens the spectrum of molecular ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 32 (12), 948-963.
- Shiva, V. (1994). Agriculture and food production. *Environmental Education Dossiers*, 9, 2-3.
- Simpson, J. (1997). Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 60, 73-76.
- Swingland, I. R. (2001). Biodiversity, definition of. *Encyclopedia of Biodiversity*, 1, 377-391.
- Tan, P. N., Steinbach, M., & Kumar, V. (2006). Cluster analysis, basic concepts and algorithms. *Introduction to Data Mining*. (Boston), 525-612.
- Tanavar, M., Kelestanie, A. R. A., & Hoseni, S. A. (2014). Software programs for analyzing genetic diversity. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 3 (5), 462-466.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Lee, T. V. D., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995). AFLP, a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21), 4407-4414.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A., & Tingey, S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18, 6531-6535.
- Wu, K. S., Jones, R., Danneberger, L., & Scolnik, P. A. (1994). Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*, 22 (15), 3257-3258.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics, principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13 (5), 303-314.
- Yeh, F. C., Yang, R. C., & Boyle, T. (1999). POPGENE. microsoft windows based freeware for population genetic analysis. release 1.31. University of Alberta, Edmonton. (<http://www.ualberta.ca/s-fyeh/fyeh>).

- Yongcui, H., Zehong, Y., & Xiujin, L. (2005). Genetic diversity among barley germplasm with known origins based on the RAMP and ISSR markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 38 (12), 2555-2565.
- Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20 (2), 176-183.